



**ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ
ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ - ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ**

***ΤΙΤΛΟΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ :
ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ
ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΟΥ
ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΜΕ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥΣ
ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΣΤΗ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΝΟΣΟ***

ΦΙΛΗ ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ Α.Μ. 20339

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Γ. Δεδούσης, Επίκουρος
Καθηγητής Χαροκοπείου Πανεπιστημίου**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

**Γ. Δεδούσης, Επίκουρος Καθηγητής Χαροκοπείου
Πανεπιστημίου**

Μ. Γιαννακούλια, Λέκτορας Χαροκοπείου Πανεπιστημίου

Δ. Παναγιωτάκος, Λέκτορας Χαροκοπείου Πανεπιστημίου

-ΑΘΗΝΑ 2007-

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου, κύριο Γεώργιο Δεδούση που μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με την έρευνα, συνδυάζοντας γνώσεις στον τομέα της διατροφής με τα επιτεύγματα της μοριακής γενετικής. Οι διδασκαλίες του κατά τη διάρκεια των σπουδών μου επηρέασαν καθοριστικά την επιλογή της παρούσας πτυχιακής μελέτης, καθώς ανέδειξαν τη χρησιμότητα της γενετικής στην ερμηνεία των φαινομένων της επιστήμης της διατροφής.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την Ειρήνη Θεοδωράκη για την πολύτιμη βοήθεια και τις γνώσεις που πρόσφερε, και για την υπομονή με την οποία πάντα αντιμετώπιζε τις δυσκολίες και τους προβληματισμούς μου. Πολύ σημαντική ήταν και η βοήθεια του Βασίλη Παπαμίκου, ο οποίος με τις ικανότητές του και το αστείρευτο χιούμορ του, συνέβαλλε καθοριστικά στη πραγματοποίηση της παρούσας πτυχιακής εργασίας. Τέλος, δεν θα μπορούσα να ξεχάσω τη συνάδελφο Άννα Ευλογημένου, καθώς και όλους τους προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές και τους εργαζόμενους στο εργαστήριο, χωρίς τη συμβολή των οποίων, η διεξαγωγή της παρούσας εργασίας δεν θα ήταν τόσο ευχάριστη.

Περίληψη.....	5
I. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	6
1. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ.....	7
1.1. Διεθνή στοιχεία	7
1.2. Στοιχεία από τον ελληνικό πληθυσμό	10
2. ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ.....	12
2.1. Στοιχεία φυσιολογίας	12
2.2. Αιτιολογία	12
2.3. Παθοφυσιολογία της Αθηροσκλήρυνσης.....	13
3. ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑΣ ΝΟΣΟΥ	16
3.1. Στηθάγχη (angina pectoris)	16
3.2. Έμφραγμα μυοκαρδίου	17
4. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ	20
4.1. Μη τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου.....	20
4.1.1. Ηλικία.....	20
4.1.2. Φύλο	20
4.1.3. Οικογενειακό ιστορικό.....	21
4.2. Τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου.....	22
4.2.1. Υπερλιπιδαιμία.....	22
4.2.2. Υπέρταση	23
4.2.3. Σακχαρώδης διαβήτης / Δυσανεξία στη γλυκόζη	24
4.2.4. Κάπνισμα.....	24
4.2.5. Παχυσαρκία.....	26
4.3. Άλλοι τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου.....	26
5. ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΝΟΣΟΣ.....	28
5.1. Εισαγωγή.....	28
5.2. Μεσογειακή Διατροφή.....	28
5.2.1. Μεσογειακή διατροφή και υπέρταση.....	29
5.2.2. Επίδραση της Μεσογειακής διατροφής στο λιπιδαιμικό προφίλ.....	31
5.2.3. Επίδραση της Μεσογειακής διατροφής σε άλλους παράγοντες κινδύνου	32
5.2.4. Επίδραση της Μεσογειακής Διατροφής στην εμφάνιση στεφανιαίας νόσου	33
5.2.5. Η χρήση των Μεσογειακών σκορ στην εκτίμηση του καρδιαγγειακού κινδύνου	35
6. ΚΥΚΛΟΟΞΥΓΕΝΑΣΗ-2 ΚΑΙ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΥΝΣΗ.....	37
6.1. Προσταγλανδίνες και θρομβοξάνες: φλεγμονή και αθηρογένεση.....	37
6.2. Κυκλοοξυγενάση-2 (prostaglandin H synthase 2)	39
6.2.1. Έκφραση	39
6.2.2. Κυτταρική εντόπιση, δομή και κύριες δράσεις.....	39
6.2.3. Το γονίδιο της κυκλοοξυγενάσης-2 (PTGS2).....	42
6.2.4. Ρυθμιστικά στοιχεία του υποκινητή.....	43
6.3. Ο πολυμορφισμός -765G→C του γονιδίου PTGS2: Προστατευτικές επιδράσεις ενάντια στη φλεγμονή, την αθηροσκλήρυνση και τη στεφανιαία νόσο	46
7. Αλληλεπιδράσεις γονιδίων – θρεπτικών συστατικών.....	49
7.1. Nutritigenomics – Nutrigenetics	49
7.2. Αλληλεπίδραση μεταξύ πολυμορφισμών στο γονίδιο PTGS2 και θρεπτικών συστατικών ..	50
II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	52
8. ΣΚΟΠΟΣ.....	53
9. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	53

9.1. Δείγμα Μελέτης	53
9.2. Συλλογή Δεδομένων.....	54
9.3. Αποτίμηση Μεσογειακού Σκορ	55
9.4. Στατιστική Ανάλυση	57
9.5. Απομόνωση DNA	58
9.6. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης - Polymerase Chain Reaction (PCR)	59
9.7. Έλεγχος επιτυχίας PCR.....	62
8.8. Πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση	64
9.9. Έλεγχος του προϊόντος της πέψης	66
9.10. Διαλύματα	66
10. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	69
10.1. Αποτελέσματα PCR και πέψης	69
10.2. Συχνότητα γονοτύπων στον πληθυσμό	70
10.3. Χαρακτηριστικά του δείγματος.....	70
10.4. Λογαριθμιστική παλινδρόμηση.....	73
11. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	74
III. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	78

Σύμφωνα με υπολογισμούς του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, το 2002 οι θάνατοι από στεφανιαία νόσο παγκοσμίως ήταν 7,22 εκατομμύρια και υπολογίζεται ότι το 2020 ο αριθμός αυτός θα ανέλθει σε 11,1 εκατομμύρια.

Η πιο συχνή αιτία στεφανιαίας νόσου είναι η απόφραξη των μεγάλων επικαρδιακών αγγείων λόγω αθηροσκλήρυνσης. Παλιότερα, η αθηροσκλήρυνση είχε περιγραφεί ως εκφυλιστική νόσος που αποτελούσε αναπόφευκτη συνέπεια της γήρανσης. Η έρευνα τα τελευταία χρόνια έχει δείξει ότι κάτι τέτοιο δεν ισχύει, και η αθηροσκλήρυνση περιγράφεται πλέον ως χρόνια φλεγμονώδης κατάσταση που μπορεί να προληφθεί.

Πολυάριθμες κλινικές και στατιστικές μελέτες έχουν συμβάλλει στην αναγνώριση ορισμένων παραγόντων που αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης οξέος στεφανιαίου συνδρόμου (ηλικία, φύλο, οικογενειακό ιστορικό, υπερλιπιδαιμία, υπέρταση, σακχαρώδης διαβήτης, κ.ά.). Με την αύξηση της γνώσης και την προσφορά της έρευνας, διαρκώς ανακαλύπτονται νέοι πιθανοί παράγοντες κινδύνου, συμβάλλοντας σημαντικά στην πρόληψη και θεραπεία της ασθένειας.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της επίδρασης της μεσογειακής διατροφής στην εμφάνιση οξέος στεφανιαίου συνδρόμου. Επίσης, η εξέταση της συμβολής του πολυμορφισμού $-765G \rightarrow C$ στο γονίδιο της COX-2, καθώς και η αλληλεπίδραση μεταξύ αυτού και του μεσογειακού διατροφικού προτύπου. Παράλληλα, εξετάζεται η επίδραση των κλασσικών παραγόντων κινδύνου.

Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δεν προκύπτει συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού και της εμφάνισης οξέος στεφανιαίου συνδρόμου και δεν επιβεβαιώνεται η υπόθεση της αλληλεπίδρασης μεταξύ του πολυμορφισμού $-765G \rightarrow C$ και της μεσογειακής διατροφής. Η υιοθέτηση μεσογειακής διατροφής, όπως αξιολογείται από το 'Μεσογειακό διατροφικό σκορ' των Panagiotakos et al⁽¹⁹⁴⁾, εμφανίζει αρνητική συσχέτιση με την εμφάνιση οξέος στεφανιαίου συνδρόμου. Συγκεκριμένα, η αύξηση στο σκορ κατά 1 μονάδα φαίνεται να μειώνει τον κίνδυνο κατά 6,7% ($p\text{-value} = 0,054$). Επιπλέον, με το διαχωρισμό του δείγματος σε τριτημόρια ανάλογα με τη βαθμολογία στο μεσογειακό σκορ, η μετάβαση από το ένα τριτημόριο στο αμέσως υψηλότερο σχετίζεται με μείωση του κινδύνου εμφάνισης εμφράγματος κατά 33,7% ($p\text{-value}=0,035$).

Περαιτέρω έρευνες, σε διαφορετικούς πληθυσμούς είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθούν, ώστε να επιβεβαιωθεί ο ρόλος του πολυμορφισμού ως προστατευτικός παράγοντας έναντι της εμφάνισης οξέος στεφανιαίου συνδρόμου.

I. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

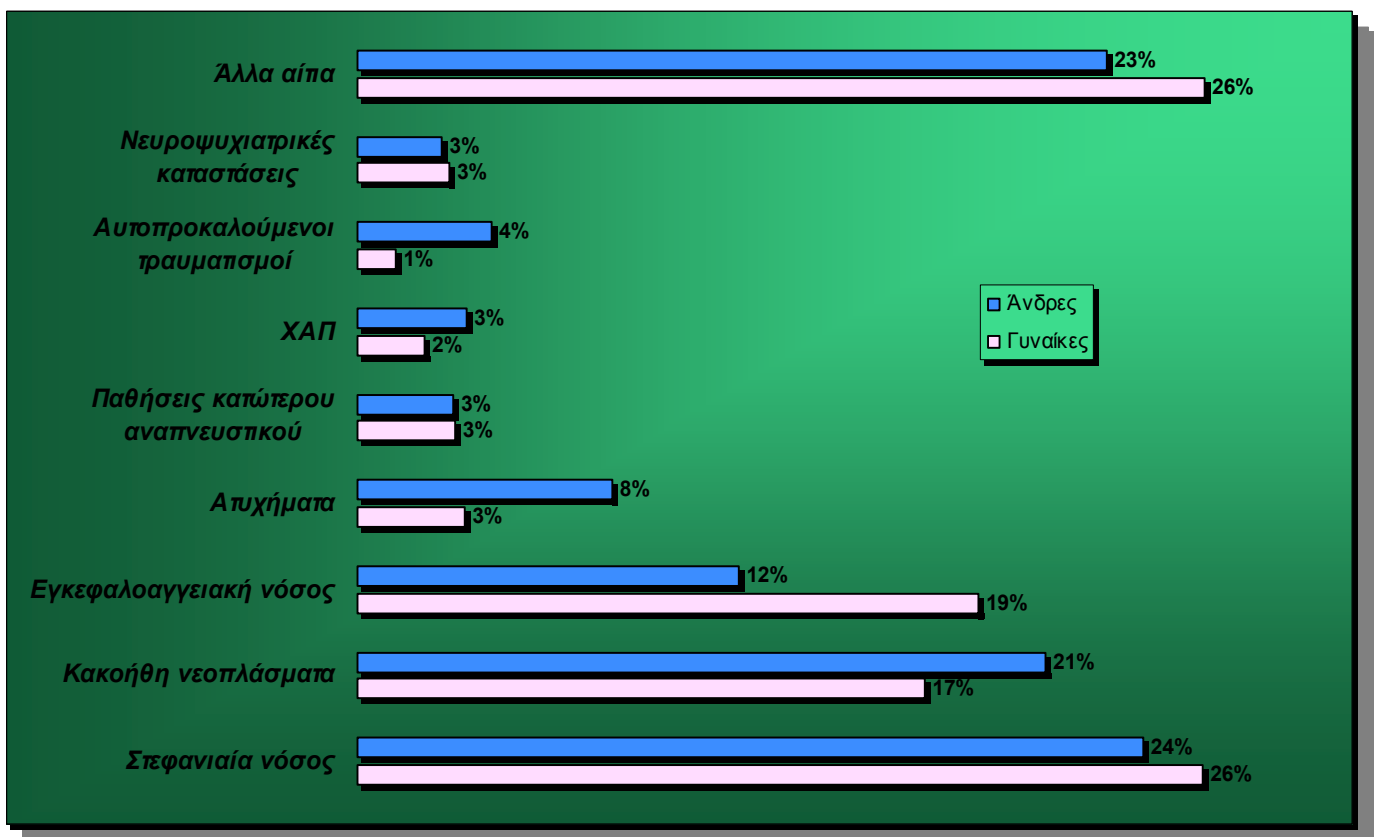
1. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

1.1. Διεθνή στοιχεία

Γενικά

Σύμφωνα με υπολογισμούς του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας για το έτος 2003, 16,7 εκατομμύρια άνθρωποι πεθαίνουν κάθε χρόνο λόγω καρδιαγγειακής νόσου. Ο αριθμός αυτός αποτελεί το 29% της παγκόσμιας θνησιμότητας. Προβλέπεται ότι έως το 2020 η καρδιαγγειακή νόσος θα αποτελεί την κύρια αιτία θανάτου και ανικανότητας, με αριθμό θανάτων που θα ανέλθει σε περισσότερο από 20 εκατομμύρια ετησίως.⁽¹⁾ Στην Ευρώπη η καρδιαγγειακή νόσος αποτελεί την πρώτη αιτία θανάτου και ευθύνεται για περίπου 5 εκατομμύρια θανάτους το χρόνο, δηλαδή για το 50% της θνησιμότητας.⁽²⁾

Γράφημα 1.1. Οι κυριότερες αιτίες θανάτου στην Ευρώπη, 2002



Πηγή : Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας – *Global Burden of Disease: Deaths by sex and cause for the year 2002 in Europe.*

Στις ΗΠΑ 72.300.000 άνθρωποι πάσχουν από καρδιαγγειακή νόσο, εκ των οποίων :

- 65.000.000 άνθρωποι έχουν υπέρταση
- 13.200.000 πάσχουν από στεφανιαία νόσο
- 5.000.000 έχουν καρδιακή ανεπάρκεια
- 1.000.000 έχουν κάποια εκ γενετής καρδιαγγειακή ανωμαλία ⁽³⁾

Σχεδόν 2,500 Αμερικάνοι πεθαίνουν από καρδιαγγειακά κάθε μέρα, με μέσο όρο 1 θάνατο κάθε 35 δευτερόλεπτα. Τα καρδιαγγειακά νοσήματα προκαλούν περισσότερους θανάτους από ότι προκαλούν οι επόμενες τέσσερις αιτίες θανάτου μαζί (καρκίνος, αναπνευστικά νοσήματα, ατυχήματα και σακχαρώδης διαβήτης). Πάνω από 152.000 άνθρωποι που χάνουν τη ζωή τους λόγω καρδιαγγειακής νόσου έχουν ηλικία μικρότερη των 65 ετών.

Το άμεσο και έμμεσο κόστος των καρδιαγγειακών νοσημάτων στην Ευρώπη για το έτος 2003, υπολογίστηκε στα 169 δισεκατομμύρια ευρώ, με το 21% να αποτελεί κόστος λόγω απώλειας παραγωγικότητας.⁽⁴⁾ Στις ΗΠΑ για το 2006 το συνολικό κόστος υπολογίστηκε στα 403,1 δισεκατομμύρια δολάρια, ποσό διπλάσιο από το αντίστοιχο κόστος που προκαλείται λόγω καρκίνου.⁽⁵⁾

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας εκτίμησε ότι περισσότερο από 50% των θανάτων και της ανικανότητας που προκαλούνται από καρδιακές παθήσεις και εγκεφαλικά επεισόδια θα μπορούσαν να προληφθούν με το συνδυασμό οικονομικών αποδοτικών, εθνικών ή και ατομικών προσπαθειών για τη μείωση σημαντικών παραγόντων κινδύνου όπως η υψηλή αρτηριακή πίεση, η υψηλή χοληστερόλη, η παχυσαρκία και το κάπνισμα. ⁽¹⁾

Στεφανιαία νόσος

Το 2002 οι θάνατοι από στεφανιαία νόσο παγκοσμίως ήταν 7,22 εκατομμύρια και υπολογίζεται ότι το 2020 ο αριθμός αυτός θα ανέλθει σε 11,1 εκατομμύρια. ^(6,7)

Αποτελέσματα μελέτης του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (MONICA Project) δείχνουν τη διαφοροποίηση που υπάρχει από πληθυσμό σε πληθυσμό, με τη Φινλανδία να παρουσιάζει τον υψηλότερο αριθμό περιστατικών στεφανιαίας νόσου στους άντρες (Βόρεια Καρέλια, 835 ανά 100,000) και το Ηνωμένο Βασίλειο στις γυναίκες (Γλασκώβη, 265 ανά 100,000). Ο χαμηλότερος αριθμός περιστατικών παρατηρείται στην Κίνα για άντρες και γυναίκες (Πεκίνο,

81 ανά 100,000 για άντρες και 35 ανά 100,000 για τις γυναίκες), καθώς και στην Ισπανία για τις γυναίκες (Καταλωνία, 35 ανά 100,000).⁽⁸⁾

Στο Ηνωμένο Βασίλειο συμβαίνουν ετησίως περίπου 259.500 εμφράγματα του μυοκαρδίου (142.000 στους άντρες και 117.500 στις γυναίκες). Υπολογίζεται ότι σχεδόν 1,5 εκατομμύριο άντρες και 1,1 εκατομμύρια γυναίκες, κάτοικοι του Ηνωμένου Βασιλείου, έχουν εμφανίσει κλινικές εκδηλώσεις στεφανιαίας νόσου κάποια στιγμή στη ζωή τους (είτε έχουν παρουσιάσει στηθάγχη είτε έμφραγμα του μυοκαρδίου).⁽⁹⁾

Στις ΗΠΑ η επίπτωση νέων περιστατικών εμφράγματος του μυοκαρδίου είναι 565.000 το χρόνο, ενώ παράλληλα συμβαίνουν άλλα 300.000 σε άτομα με ιστορικό εμφράγματος. Για το έτος 2003, ένας στους πέντε θανάτους προκλήθηκε από στεφανιαία νόσο, αριθμός που αντιστοιχεί σε ένα θάνατο το λεπτό από στεφανιαίο επεισόδιο. 50% των αντρών και 64% των γυναικών που πέθαναν αιφνίδια από στεφανιαίο επεισόδιο, δεν είχαν παρουσιάσει συμπτώματα της νόσου νωρίτερα στη ζωή τους.⁽⁵⁾

Στην Ευρώπη, η στεφανιαία νόσος αποτελεί την κύρια αιτία θανάτου τόσο στις γυναίκες όσο και στους άντρες, παρουσιάζοντας υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας στις χώρες της ανατολικής και κεντρικής Ευρώπης. Τα τελευταία 30 χρόνια παρατηρήθηκε αύξηση της θνησιμότητας λόγω στεφανιαίας νόσου στις χώρες αυτές, ενώ στις περισσότερες βόρειες και δυτικές υπήρξε σημαντική πτώση. Ενδεικτικά, στη Φινλανδία παρατηρήθηκε μείωση του αριθμού θανάτων σε άνδρες ηλικίας 35 – 74 ετών κατά 41%, ενώ στην ίδια χρονική περίοδο παρατηρείται αύξηση του αντίστοιχου αριθμού στη Ρουμανία, κατά 33%.⁽¹⁰⁾

Στοιχεία από τη μελέτη Interheart δείχνουν ότι τα ποσοστά στεφανιαίας νόσου αυξήθηκαν ιδιαίτερα σε χαμηλού και μεσαίου εισοδήματος χώρες. Από τους εννέα δυνητικά τροποποιήσιμους παράγοντες κινδύνου που συσχετίστηκαν με εμφάνιση εμφράγματος του μυοκαρδίου κατά τη διάρκεια της μελέτης, το κάπνισμα και οι διαταραχές των λιπιδίων φαίνεται να ευθύνονται για τα 2/3 των σχετιζόμενων με τροποποιήσιμους παράγοντες εμφραγμάτων.⁽¹¹⁾

Μέσα στην ίδια χώρα υπάρχει άνιση κατανομή της επίπτωσης στεφανιαίας νόσου, η οποία εμφανίζεται υψηλότερη στις χαμηλότερες κοινωνικο-οικονομικές ομάδες. Ο κίνδυνος εμφάνισης στεφανιαίας νόσου καθώς και άλλων χρόνιων ασθενειών είναι δύο φορές υψηλότερος στις ομάδες αυτές, σε σύγκριση με ομάδες υψηλότερου κοινωνικο – οικονομικού επιπέδου. Ακόμα και όταν οι τεχνολογικές εξελίξεις εφαρμόζονται στον τομέα της πρόληψης και της θεραπείας, οι ανισότητες παραμένουν, καθώς η πρόσβαση των ομάδων στην υγειονομική περίθαλψη δεν είναι ισότιμη.⁽¹⁰⁾

1.2. Στοιχεία από τον ελληνικό πληθυσμό

Σύμφωνα με στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, οι δύο κυριότερες αιτίες θανάτου στον ελληνικό πληθυσμό είναι η εγκεφαλοαγγειακή νόσος και η στεφανιαία νόσος. Συνολικά προκαλούν το 34,7% των συνολικών θανάτων και το 17,4% των ετών ζωής προσαρμοσμένων στην αναπηρία (DALYs)⁽¹²⁾. Η στεφανιαία νόσος αποτελεί τη δεύτερη αιτία θανάτου, με επίπτωση 110 θανάτους ανά 100.000 άτομα (1998).⁽¹³⁾

Πίνακας 1.1. Αιτίες θανάτου στην Ελλάδα για το έτος 2002

<i>Αιτία</i>	<i>Αριθμός θανάτων</i>	<i>% συνολικών θανάτων</i>
Εγκεφαλοαγγειακή νόσος	22.694	19.9
Ισχαιμική καρδιακή νόσος	16.825	14.8
Καρκίνος τραχείας, βρόγχων και πνευμόνων	6.274	5.5
Ορθοκολικός καρκίνος	2.948	2.6
Λοίμωξη ανώτερου αναπνευστικού	2.375	2.1
Τροχαία ατυχήματα	2.152	1.9
Καρκίνος ήπατος	2.038	1.8
Καρκίνος στήθους	1.999	1.8
Καρκίνος στομάχου	1.831	1.6
Χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια	1.784	1.6
Όλες οι αιτίες	113.810	100.0

Πηγή : Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας

Πίνακας 1.2. Οι ασθένειες με τη μεγαλύτερη επίδραση στην ποιότητα ζωής, όπως αυτή εκφράζεται με τα έτη ζωής προσαρμοσμένα στην αναπηρία.

<i>Αιτία</i>	<i>DALYs</i>	<i>% DALYs</i>
Εγκεφαλοαγγειακή νόσος	130.517	9.4
Ισχαιμική καρδιακή νόσος	111.885	8.0
Μονοπολικές καταθλιπτικές διαταραχές	72.775	5.2
Τροχαία ατυχήματα	51.404	3.7
Κώφωση (με έναρξη στην ενηλικίωση)	50.397	3.6
Νόσος Alzheimer και άλλου τύπου άνοια	50.146	3.6
Καρκίνος τραχείας, βρόγχων και πνευμόνων	48.553	3.5
Διαταραχές σχετιζόμενες με κατανάλωση αλκοόλ	48.424	3.5
Σακχαρώδης διαβήτης	38.437	2.8
Οστεοαρθρίτιδα	32.509	2.3
Όλες οι αιτίες	1.393.137	100.0

Πηγή : Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας

Η μελέτη των Επτά Χωρών, που άρχισε στις αρχές της δεκαετίας του 1960 και συμπεριέλαβε περίπου 13.000 άτομα από διαφορετικούς πληθυσμούς, κατέδειξε ύστερα από παρακολούθηση δεκαπέντε ετών ότι η Κρήτη είχε το χαμηλότερο ποσοστό θνησιμότητας ανεξάρτητα από την αιτία θανάτου. Τα χαμηλά ποσοστά στεφανιαίας νόσου που παρατηρήθηκαν στις νότιες Ευρωπαϊκές χώρες οδήγησαν τον Ancel Keys στο συμπέρασμα ότι οι συνήθειες διατροφής των μεσογειακών χωρών, και ιδιαίτερα της Κρήτης, ίσως εξηγούν τα παρατηρούμενα ωφέλη υγείας. Η μελέτη των Επτά Χωρών αποτέλεσε την πρώτη σημαντική συμμετοχή της Ελλάδας σε επιδημιολογική μελέτη και υπήρξε το έναυσμα για περαιτέρω διερεύνηση της επίδρασης της διατροφής στα καρδιαγγειακά νοσήματα.⁽¹³⁻¹⁵⁾

Με βάση στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, το έτος 1980 η Ελλάδα βρισκόταν σε μία από τις χαμηλότερες θέσεις όσον αφορά τη θνησιμότητα από καρδιαγγειακές ασθένειες μέχρι την ηλικία των 64 ετών, συγκριτικά με 18 Ευρωπαϊκές χώρες. Το 1993 όμως, η εικόνα αυτή άλλαξε, με τη θνησιμότητα από εγκεφαλοαγγειακές ασθένειες να βρίσκεται στις υψηλότερες θέσεις, και τη θνησιμότητα από στεφανιαία νόσο να πλησιάζει το μέσο όρο.

Υπάρχουν στοιχεία που υποδεικνύουν διαφοροποιήσεις στη θνησιμότητα μεταξύ αστικού και αγροτικού πληθυσμού. Τα στεφανιαία επεισόδια είναι συχνότερα στον αστικό πληθυσμό και είναι ιδιαίτερα συχνά στην Ήπειρο (Υπουργείο Υγείας, Πρόνοια και Κοινωνική Ασφάλιση, 1992). Μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Κρήτη, σε αγροτική περιοχή, παρουσίασε χαμηλότερη θνησιμότητα από στεφανιαία νόσο, συγκρινόμενη με την υπόλοιπη Ελλάδα. Αυτή η έστω και μικρή διαφοροποίηση, είναι μάλλον επακόλουθο της αλλαγής διαιτητικών συνηθειών και των γενικότερων αλλαγών στον τρόπο ζωής που παρατηρούνται σε αστικές περιοχές.⁽¹⁶⁾

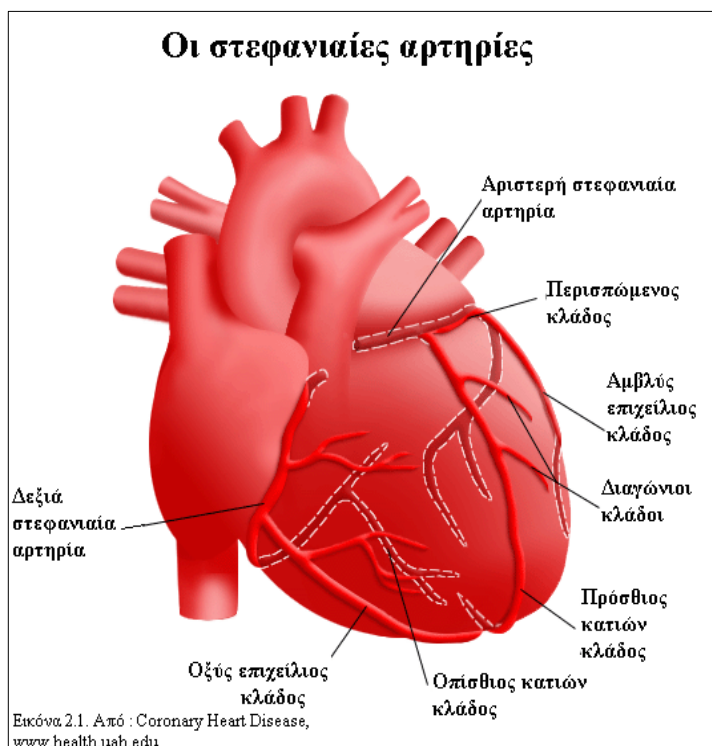
2. ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

2.1. Στοιχεία φυσιολογίας

Η λειτουργία της καρδιάς είναι η προώθηση του αίματος σε όλα τα όργανα και τους ιστούς του σώματος. Για να επιτελεί αυτό το έργο, ο καρδιακός μυς χρειάζεται πλούσια ροή αίματος (στεφανιαία αιμάτωση), που μπορεί να αυξάνεται κατάλληλα όταν αυτό απαιτείται. Τα στεφανιαία αγγεία μεταφέρουν οξυγόνο προς τα μυοκύτταρα και απομακρύνουν τα προϊόντα του μεταβολισμού (διοξείδιο του άνθρακα, γαλακτικό οξύ, ιόντα υδρογόνου, κ.ά.). Χαρακτηριστικό της στεφανιαίας κυκλοφορίας είναι ότι ακόμα και κατά τη συνηθισμένη δραστηριότητα, η καρδιά προσλαμβάνει το 75% του οξυγόνου του αρτηριακού αίματος, σε αντίθεση με άλλα όργανα που προσλαμβάνουν περίπου 25%. Όταν οι μυοκαρδιακές ανάγκες σε οξυγόνο είναι αυξημένες, απαιτείται η αύξηση της στεφανιαίας ροής αίματος. Εάν η στεφανιαία ροή αίματος δεν μπορεί να καλύψει τις ανάγκες σε οξυγόνο, προκαλείται ισχαιμία του μυοκαρδίου.^(17,18)

2.2. Αιτιολογία

Η πιο συχνή αιτία στεφανιαίας νόσου είναι η απόφραξη των μεγάλων επικαρδιακών αγγείων λόγω **αθηροσκλήρυνσης**. Οι στεφανιαίες αρτηρίες είναι ιδιαίτερα επιρρεπείς σε αθηρωμάτωση του εσωτερικού τους χιτώνα, που συνίσταται σε ανώμαλη πάχυνση και σχηματισμό πλακών. Η στεφανιαία αθηροσκληρωτική διεργασία περιορίζεται στα τμήματα των αγγείων που βρίσκονται στην καρδιακή επιφάνεια. Συχνότερα εμπλέκεται η αριστερή πρόσθια κατιούσα αρτηρία, με δεύτερη τη δεξιά στεφανιαία και λιγότερο συχνά τον περισπώμενο κλάδο της αριστερής στεφανιαίας αρτηρίας. Η στεφανιαία αθηρωμάτωση μπορεί να υπάρχει χωρίς σημεία και συμπτώματα για πολλά χρόνια, ώσπου η διεργασία της νόσου να προκαλέσει ένα βαθμό απόφραξης που εμποδίζει την αιμάτωση του μυοκαρδίου. Αν η διαδικασία απόφραξης είναι βαθμιαία, μπορεί να αναπτυχθεί διαστεφανιαία παράπλευρη κυκλοφορία και η παρουσία κλινικών εκδηλώσεων να αναβάλλεται ή να μη συμβεί ποτέ.



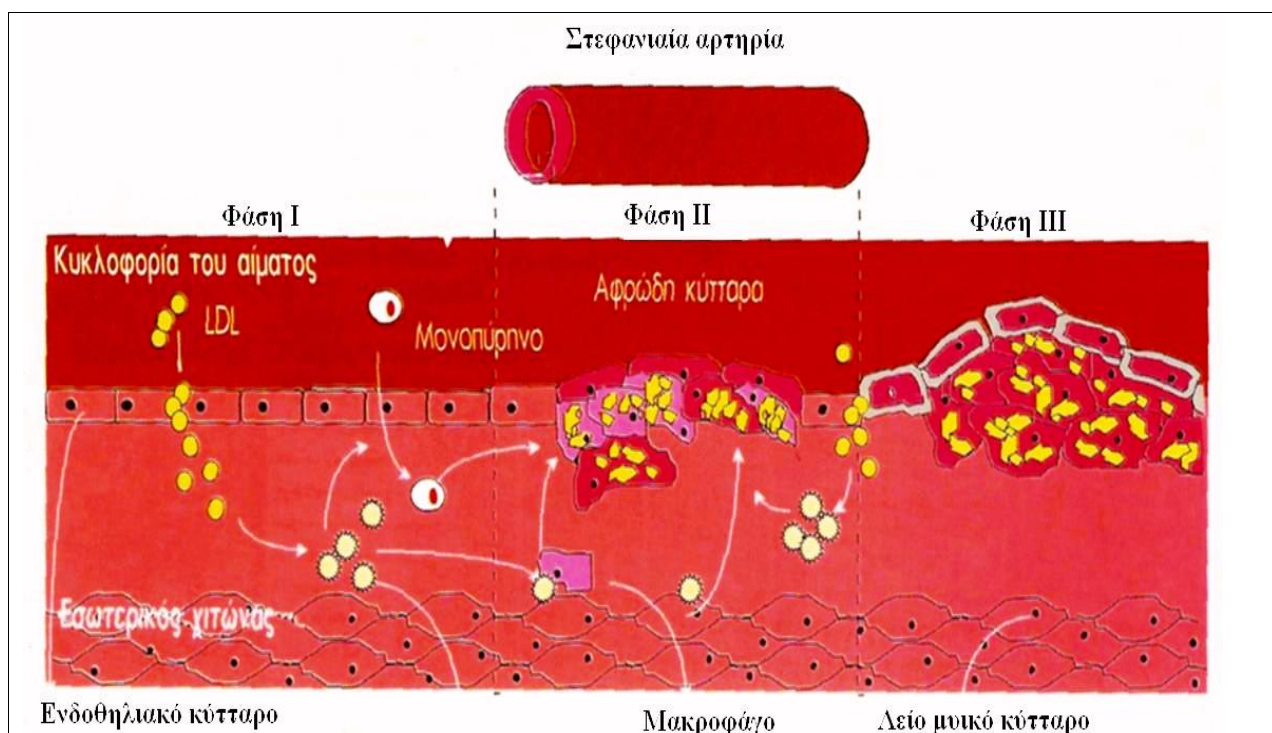
Αντίθετα, αν μία αρτηρία αποφραχθεί μερικώς, ενώ δεν έχει αναπτυχθεί παράπλευρη κυκλοφορία, η απόφραξη μπορεί να παραβιάσει την αιματική ροή κάτω από συνθήκες αυξημένων αναγκών. Κατά συνέπεια, μπορεί να συμβούν συμπτώματα διαλείπουσας αγγειακής ανεπάρκειας (στηθάγχη).⁽¹⁷⁻¹⁹⁾

Έχει επίσης περιγραφεί σπασμός των στεφανιαίων αγγείων από διάφορους μεσολαβητές, όπως είναι η σεροτονίνη και η ισταμίνη, φαίνεται όμως ότι το φαινόμενο αυτό είναι συχνότερο στους Ιάπωνες. Σπανίως, η στεφανιαία νόσος μπορεί να οφείλεται σε συγγενείς διαμαρτίες, με μικρό όμως ποσοστό των διαταραχών αυτών να οδηγεί σε ισχαιμία με κλινικές εκδηλώσεις.⁽¹⁹⁾

2.3. Παθοφυσιολογία της Αθηροσκλήρυνσης

Παλιότερα, η αθηροσκλήρυνση είχε περιγραφεί ως εκφυλιστική νόσος που αποτελούσε αναπόφευκτη συνέπεια της γήρανσης. Η έρευνα τα τελευταία χρόνια έχει δείξει ότι κάτι τέτοιο δεν ισχύει, και η αθηροσκλήρυνση περιγράφεται πλέον ως χρόνια φλεγμονώδης κατάσταση που μπορεί να προληφθεί.⁽²⁰⁾

Η αθηροσκληρωτική εξεργασία υπάρχει σε κάποιο βαθμό σε όλες τις ηλικίες και στα δύο φύλα, αλλά η έκτασή της διαφέρει σε κάθε άτομο και κατά ένα μέρος εξαρτάται από το γενετικό υπόστρωμα, τους παράγοντες κινδύνου και τις τοπικές αιμοδυναμικές συνθήκες. Λιπώδης ράβδωση έχει παρατηρηθεί ακόμα και σε βρέφη ενώ η ινώδης πλάκα αρχίζει να εμφανίζεται νωρίς κατά την ενήλικη ζωή.⁽²¹⁾



Εικόνα 2.2. Στάδια αθηρογένεσης. Από: Κλινική Διαιτολογία και Διατροφή με στοιχεία Παθολογίας, Αντώνιος Ζαμπέλας, εκδόσεις Πασχαλίδης.

Εναρκτήριο γεγονός αποτελεί η βλάβη του αγγειακού ενδοθηλίου. Το υγιές ενδοθήλιο αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή του αγγειακού τόνου, παράγοντας αγγειοδραστικές ουσίες (προστακυκλίνη, ενδοθηλιογενής παράγοντας χάλασης), και εμπλέκεται κατά περίπλοκο τρόπο στον τοπικό έλεγχο της ενδαγγειακής θρόμβωσης.⁽²²⁾ Όταν το ενδοθήλιο έρχεται σε επαφή με βακτηριακά προϊόντα, ή παράγοντες κινδύνου τόσο ετερογενείς όσο η δυσλιπιδαιμία, αγγειοσυσταλτικές ορμόνες που εμπλέκονται στην υπέρταση, προϊόντα οξειδωσης που σχετίζονται με υπεργλυκαιμία, ή προφλεγμονώδεις κυτοκίνες που εκκρίνονται από το λιπώδη ιστό, προκαλείται βλάβη του ενδοθηλίου, η οποία οδηγεί σε ελάττωση της εξαρτώμενης από το ενδοθήλιο αγγειοδιαστολής και τοπική κατάσταση (δυσλειτουργία του ενδοθηλίου) που ευνοεί τη θρόμβωση.⁽²³⁾ Η αλλοίωση αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση μακροφάγων (που προέρχονται από μονοκύτταρα της κυκλοφορίας) και λιπιδίων (κυρίως λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας) στη θέση της αγγειακής βλάβης.⁽²²⁾ Οι λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας εισέρ-



χονται στο αρτηριακό τοίχωμα, με μία διαδικασία που δεν απαιτεί τη μεσολάβηση υποδοχέα, αλλά εξαρτάται από τη συγκέντρωσή τους στο πλάσμα. Σε πρώτη φάση, η οξείδωσή τους πραγματοποιείται κυρίως από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, με αποτέλεσμα την παραγωγή μερικώς οξειδωμένων λιποπρωτεϊνών.⁽²⁰⁾ Τα μερικώς οξειδωμένα προϊόντα θεωρείται ότι επηρεάζουν την παραγωγή γλυκοπρωτεϊνών επιφανείας στα ενδοθηλιακά κύτταρα (E – σελεκτίνη, VCAM-1, ICAM-1), που ευνοούν με τη σειρά τους

τη μετανάστευση και προσκόλληση των μονοκυττάρων στο αρτηριακό τοίχωμα. Τα μονοκύτταρα εισέρχονται στον υπενδοθηλιακό χώρο και διαφοροποιούνται σε μακροφάγα υπό την επίδραση συγκεκριμένων μορίων (π.χ. χημειοτακτική πρωτεΐνη 1 των μονοκυττάρων, παράγοντες διέγερσης σχηματισμού αποικιών, αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού-B (TGF-B)). Οι μερικώς οξειδωμένες λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας οξειδώνονται περαιτέρω από τα μακροφάγα, προσλαμβάνονται από ειδικούς υποδοχείς τους, τους υποδοχείς – εκκαθαριστές (scavenger receptors) και εισέρχονται σ' αυτά, δημιουργώντας αφρώδη κύτταρα. Σωροί τέτοιων αφρωδών κυττάρων αποτελούν την πρώτη ορατή αλλοίωση της αθηροσκλήρυνσης, τη λιπώδη ράβδωση. Τα αφρώδη κύτταρα μπορούν να απελευθερώνουν ουσίες, όπως ιντερλευκίνες και παράγοντες νέκρωσης όγκων, που ενισχύουν την προσκόλληση

και χημειοταξία επιπλέον μονοκύτταρων στο σημείο της βλάβης. Επιπλέον, τα μακροφάγα απελευθερώνουν ένζυμα, οξειδωμένη χοληστερόλη και ελεύθερες ρίζες που προάγουν την απόπτωση του ενδοθηλίου, η οποία συνεπάγεται την προσκόλληση αιμοπεταλίων στη θέση της βλάβης.⁽²⁴⁾

Καθώς η πλάκα ωριμάζει, αυξητικοί παράγοντες, (PDGF, bFGF, TGF- β , κ.α.) προερχόμενοι από τα αιμοπετάλια και τα μακροφάγα, διεγείρουν τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό λείων μυϊκών κυττάρων και ινοβλαστών, με αποτέλεσμα το σχηματισμό είτε μιας ινώδους αλλοίωσης του έσω χιτώνα είτε μιας ινώδους καλύπτρας επάνω από ένα πλούσιο σε λιπίδια πυρήνα. Με την περαιτέρω αύξηση της πλάκας ο αυλός του αγγείου γίνεται στενότερος και η ροή του αίματος στο σημείο ελαττώνεται. Η αιμοδυναμική σημασία της πλάκας διαφέρει ανάλογα με το μήκος και τη μορφολογία της αλλοίωσης.⁽²²⁾

Η συσσώρευση λιπιδίων μέσα στα μακροφάγα συνεπάγεται νέκρωση των κυττάρων αυτών, με αποτέλεσμα να μένει ελεύθερη μια δεξαμενή λιπιδίων στον πυρήνα της πλάκας. Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και μαστοκύτταρα απελευθερώνουν μεταλλοπρωτεΐνες, που διασπούν τις πρωτεΐνες της μεσοκυττάριας ουσίας, ενώ T-λεμφοκύτταρα που βρίσκονται στην πλάκα, παράγουν κυτταροκίνες, οι οποίες αναστέλλουν το σχηματισμό διαμέσου κολλαγόνου από τα λεία μυϊκά κύτταρα. Έτσι, σχηματίζεται μια ευπρόσβλητη πλάκα με πυρήνα έμφορτο λιπιδίων και με εξασθενημένη ινώδη καλύπτρα. Οι πλάκες αυτού του είδους είναι επιρρεπείς σε σχηματισμό ρωγμών ή σε ρήξη, ιδιαίτερα όταν αυξάνονται οι δυνάμεις διάσχισης (πίεση μέσα στον αυλό). Τις πιθανότητες ρήξης της πλάκας αυξάνει επίσης η διακοπή των τροφοφόρων αγγείων του αγγειακού τοιχώματος.^(22,25)

Συχνά η ρήξη της πλάκας συμβαίνει στο κυρτό τμήμα της. Η δημιουργία ρωγμής στην περιοχή αυτή συνεπάγεται την αποκάλυψη και επαφή με την κυκλοφορία του κολλαγόνου και των λιπιδίων που έχουν έντονα θρομβογόνες ιδιότητες, με αποτέλεσμα το σχηματισμό θρόμβου μέσα στον αυλό. Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια μεσολαβούν στην πρόκληση αγγειοσύσπασης και περαιτέρω αύξησης του θρόμβου, διακυβεύοντας απότομα τη στεφανιαία ροή αίματος. Τη βαρύτητα της ρήξης της πλάκας και την έκταση της θρόμβωσης αντικατοπτρίζει κλινικά το φάσμα των οξέων στεφανιαίων συνδρόμων, όπως είναι η ασταθής στηθάγχη, το έμφραγμα του μυοκαρδίου χωρίς επάρματα Q και το έμφραγμα με επάρματα Q.^(22,26,27)

3. ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑΣ ΝΟΣΟΥ

3.1. Στηθάγχη (*angina pectoris*)

Τη συνηθέστερη εκδήλωση της στεφανιαίας νόσου αποτελεί η **στηθάγχη**. Εμφανίζεται ως πρώτη κλινική εκδήλωση περίπου στο ένα τρίτο των ατόμων με στεφανιαία νόσο. Τυπικά είναι παροξυσμός οπισθοστερνικού πόνου ήπιου ή ισχυρού, που περιγράφεται από τον ασθενή σαν σφίξιμο, κάψιμο, βάρος, μούδιασμα ή πνιγμονή με αγωνιώδη χαρακτήρα. Μπορεί επίσης να εντοπίζεται ή να αντανακλάται στην κάτω γνάθο, στο λαιμό, στον αριστερό ή και στους δύο βραχίονες, αγκώνες και καρπούς. Ο πόνος εμφανίζεται συνήθως κατά την προσπάθεια, υποχωρεί σύντομα με τη διακοπή της, ή καταστέλλεται με υπογλώσσια νιτρογλυκερίνη. Μερικές φορές ο πόνος εμφανίζεται παρουσία έντονης συγκίνησης ή θυμού, μετά από ευμεγέθες γεύμα ή κατά την απότομη έκθεση του οργανισμού σε ψυχρό περιβάλλον.^(19,28,29)

Η στηθάγχη οφείλεται σε παροδική ισχαιμία του μυοκαρδίου, η οποία συμβαίνει όταν οι ανάγκες του σε οξυγόνο είναι αυξημένες ενώ η προσφορά οξυγόνου μειωμένη, λόγω σημαντικής στένωσης του αυλού στεφανιαίου αγγείου από αρτηριοσκληρυντικές βλάβες. Μπορεί επίσης να οφείλεται σε άλλες αιτίες, όπως αορτίτιδα ή στένωση της αορτικής βαλβίδας.^(18,19)

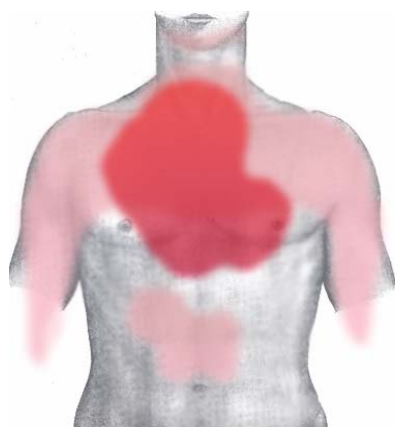
Όταν η κρίση στηθάγχης εμφανίζεται μόνο με τη συνύπαρξη ενός εκλυτικού παράγοντα και η κατάσταση αυτή είναι σταθερή τους τελευταίους 3-5 μήνες, τότε χαρακτηρίζεται ως **σταθερή** στηθάγχη και οφείλεται συνήθως σε στένωση άνω του 50%. Στην περίπτωση αυτή, ο ασθενής είναι συχνά σε θέση να προβλέψει την κρίση, διότι γνωρίζει το μέγεθος της προσπάθειας που την προκαλεί και λαμβάνει μέτρα. Ιδιαίτερες μορφές στηθάγχης, ανεξάρτητες από συγκεκριμένο εκλυτικό παράγοντα και στις οποίες ο ασθενής δεν μπορεί να προβλέψει την κρίση, είναι η **ασταθής στηθάγχη** (συχνά προεμφραγματική) και η **στηθάγχη Prinzmetal** (στηθάγχη από σπασμό των στεφανιαίων αρτηριών). Η ασταθής στηθάγχη χαρακτηρίζεται από συμπτώματα στηθάγχης, σε περίοδο ξεκούρασης ή κατά τη διάρκεια πολύ ελαφριάς φυσικής δραστηριότητας και οφείλεται συνήθως σε στένωση άνω του 90%. Κατά την κρίση ασταθούς στηθάγχης, η ρήξη της αθηρωματικής πλάκας προκαλεί τοπική συσσώρευση αιμοπεταλίων καθώς και παροδικά επεισόδια θρόμβωσης, διάρκειας 10-20 λεπτών. Επιπλέον, η απελευθέρωση από τα αιμοπετάλια αγγειοσυσπαστικών ουσιών, όπως η θρομβοξάνη A₂ και η σεροτονίνη,

καθώς και οι αλλοιώσεις του ενδοθηλίου προκαλούν αγγειοσύσπαση και συμβάλλουν στην μείωση της αιματικής ροής.^(18,19,28,29)

3.2. Έμφραγμα μυοκαρδίου

Πολύ βαρύτερη κλινική εκδήλωση της στεφανιαίας νόσου αποτελεί το **οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου**, το οποίο είτε εμφανίζεται ως πρώτη εκδήλωση της νόσου, είτε έπεται της εμφάνισης στηθάγχης. Το έμφραγμα μυοκαρδίου είναι ισχαιμική νέκρωση μιας εντοπισμένης περιοχής του μυοκαρδίου, που οφείλεται σε απότομη απόφραξη κλάδου της στεφανιαίας αρτηρίας εξαιτίας σχηματισμού θρόμβου ή υπενδοθηλιακής αιμορραγίας σε σημείο αθηρωματικής στένωσης. Σπανιότερα, η απόφραξη οφείλεται σε υπερπλασία των ενδοθηλιακών πλακών ή σε αιμορραγία μέσα στην ίδια την πλάκα. Έμφραγμα μπορεί να συμβεί και όταν δεν υπάρχει τέλεια απόφραξη, αν η στεφανιαία αιματική ροή μειωθεί παροδικά, όπως σε μετεγχειρητικό ή τραυματικό shock, σε γαστρεντερική αιμορραγία ή σε υπέρταση οποιασδήποτε αιτιολογίας. Σπάνια, είναι δυνατόν να προκαλέσουν έμφραγμα ο εμβολικός αποκλεισμός, η συφιλιδική αορτίτιδα και η οξεία αγγειίτιδα.^(17,22)

Η έναρξη των συμπτωμάτων οξέος εμφράγματος είναι συνήθως βαθμιαία και σπάνια ακαριαία.⁽³⁰⁾ Στην πλειονότητα των περιπτώσεων οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου, ως πρώιμη κλινική εκδήλωση, εμφανίζεται χαρακτηριστικός ισχυρός πόνος, ο οποίος μοιάζει με το στηθαγχικό πόνο στο χαρακτήρα, στην εντόπιση και στην αντανάκλαση, αλλά διαφέρει από αυτόν στο ότι συνήθως εμφανίζεται στην ηρεμία, διαρκεί πολύ (πάνω από 15'-30'), δεν βελτιώνεται ούτε υποχωρεί με την ανάπαυση ή τη λήψη νιτρογλυκερίνης και συχνά συνδυάζεται με ωχρότητα, ψυχρό ιδρώτα, ζάλη, ναυτία ή ακόμα και έμετο, οπότε εκλαμβάνεται ως γαστρίτιδα.^(17,22) Ο πόνος πολλές φορές αντανακλά στον αριστερό βραχίονα, αλλά μπορεί επίσης να εντοπίζεται στην κάτω γνάθο, στο λαιμό, στον δεξιό βραχίονα, στην πλάτη και στο επιγάστριο.⁽³¹⁾



Εικόνα 3.3. Σημεία εντόπισης του πόνου σε οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου



Από : J. Heuser

Ορισμένες φορές ο πόνος απουσιάζει, οπότε το οξύ έμφραγμα μπορεί να εκδηλωθεί ως απότομη αδιαθεσία με δύσπνοια, πνευμονικό οίδημα, shock, κοιλιακή ταχυκαρδία, περιφερικές εμβολές ή να περάσει απαρατήρητο. Μπορεί επίσης να συμβεί κατά τη διάρκεια χειρουργικής αναισθησίας, εγκεφαλικού κώματος ή κατά τον ύπνο.^(17,22)

Οι γυναίκες αρκετές φορές αναφέρουν διαφορετικά συμπτώματα, όπως δύσπνοια, αδυναμία και αίσθημα κόπωσης, τα οποία εκδηλώνονται σε διάρκεια έως και ένα μήνα πριν την εκδήλωση του εμφράγματος.⁽³²⁾

Η διάγνωση του οξέος εμφράγματος γίνεται μέσα από τη σύνθεση των πληροφοριών και ευρημάτων της κλινικής εξέτασης, του ιατρικού ιστορικού, του ηλεκτροκαρδιογραφήματος και του ελέγχου βιοχημικών δεικτών.⁽³³⁾

Ιατρικό ιστορικό

Σημαντικότερες πληροφορίες που πρέπει να συλλεχθούν είναι ή ύπαρξη ή όχι ιστορικού στεφανιαίας νόσου ή άλλης καρδιακής νόσου, ή φύση των συμπτωμάτων στηθάγχης, το φύλο, η ηλικία και η παρουσία παραγόντων κινδύνου, όπως σακχαρώδης διαβήτης και υπέρταση.⁽³⁴⁾

Κλινική εξέταση

Στην κλινική εξέταση, ο ασθενής συνήθως εμφανίζεται με ψυχρό και ωχρο δέρμα και σημεία αγγειοσυστολής, σε αρκετές περιπτώσεις με πυρετό μεταξύ 38–39 °C, με αύξηση ή μείωση της πίεσης του αίματος και με αυξημένο ρυθμό αναπνοής. Πολλές φορές όμως όλα τα παραπάνω απουσιάζουν, και ο ασθενής εμφανίζεται ήρεμος, με κλινική εικόνα που δεν παραπέμπει εύκολα σε παθολογική κατάσταση, αλλά απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση.^(22,35)

Ηλεκτροκαρδιογράφημα(ECG)

Στα αρχικά στάδια ενός εμφράγματος του μυοκαρδίου, το ηλεκτροκαρδιογράφημα μπορεί να είναι φυσιολογικό, με λιγότερο από το 50% των ασθενών να εμφανίζουν αλλαγές σε πρώιμη φάση. Αλλαγές στο σύμπλεγμα QRS (σχηματισμός στο ηλεκτροκαρδιογράφημα που αντικατοπτρίζει την εκπόλωση των κοιλιών) ενδέχεται να αντιπροσωπεύουν καρδιακή νέκρωση. Παθολογικά επάρματα Q αντιπροσωπεύουν έμφραγμα που οφείλεται σε πλήρη θρομβωτική απόφραξη της στεφανιαίας αρτηρίας και αρχικά είναι δυνατόν να εκδηλώνονται με συμμετρικά οξυκόρυφα επάρματα T, τα οποία υποχωρούν μετά από μερικά λεπτά, καθώς εμφανίζεται χαρακτηριστική ανύψωση του τμήματος ST. Τα εμφράγματα χωρίς επάρματα Q οφείλονται σε μεγάλο βαθμού αλλά μη αποφρακτικούς θρόμβους και αποτελούν ενδιάμεσο σύνδρομο μεταξύ της ασταθούς στηθάγχης και των εμφραγμάτων με επάρματα Q.^(22,33,36,37) Το ηλεκτροκαρδιογράφημα έχει όμως και ορισμένους περιορισμούς, καθώς αντιπροσωπεύει μικρή χρονική διάρκεια, γι' αυτό και πρέπει να λαμβάνονται περισσότερα του ενός ECG. Επιπλέον,

ένα φυσιολογικό ηλεκτροκαρδιογράφημα δεν αποκλείει την παρουσία μυοκαρδιακής νέκρωσης και δεν πρέπει να αποτελεί κριτήριο για την απόρριψη παρουσίας εμφράγματος.^(22,38)

Βιοχημικός έλεγχος

Σε βιοχημικό επίπεδο, διαγνωστική αξία έχει ο έλεγχος της τροπονίνης (κλάσματα I και T) και της κινάσης της κρεατίνης (ισοένζυμο MB), ως οι περισσότερο αντιπροσωπευτικοί δείκτες της καρδιακής νέκρωσης. Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν τα ισοένζυμα της γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH), η ασπαραγινική αμινοτρανσφεράση (AST) και η μυοσφαιρίνη, αλλά με μικρότερη διαγνωστική αξία από τον έλεγχο της τροπονίνης και της κινάσης της κρεατίνης.^(22,33,34,39,40)

4. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

Πολυάριθμες κλινικές και στατιστικές μελέτες έχουν συμβάλλει στην αναγνώριση ορισμένων παραγόντων που αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου και εμφράγματος του μυοκαρδίου. Σημαντικότεροι παράγοντες κινδύνου θεωρούνται αυτοί που έχουν προκύψει από τα ευρήματα πολυάριθμων επιδημιολογικών ερευνών. Η αναζήτηση των παραγόντων κινδύνου όμως δεν σταματά εδώ, καθώς και άλλοι παράγοντες φαίνεται να σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου, παρόλο που η σημαντικότητα και η ισχύς τους δεν έχουν ακόμα καθοριστεί με ακρίβεια.⁽⁴¹⁾

Οι κυριότεροι παράγοντες κινδύνου παρουσιάζονται στον πίνακα 4.1.

Πίνακας 4.1. Παράγοντες κινδύνου ανάπτυξης στεφανιαίας νόσου		
Χαρακτηριστικά τρόπου ζωής	Βιοχημικά - φυσιολογικά χαρακτηριστικά	Μη τροποποιήσιμοι
Κάπνισμα	Αυξημένη αρτηριακή πίεση	Ηλικία
Αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ	Υπερλιπιδαιμία	Φύλο
Χαμηλή φυσική δραστηριότητα	Χαμηλή HDL χοληστερόλη	Οικογενειακό ή ατομικό ιστορικό καρδιαγγειακών νοσημάτων
Διατροφικές συνήθειες	Αυξημένα τριγλυκερίδια	
	Δυσανεξία στη γλυκόζη/ Σακχαρώδης διαβήτης	
	Παχυσαρκία	

4.1. Μη τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου

4.1.1. Ηλικία

Με την πρόοδο της ηλικίας ο επιπολασμός της στεφανιαίας νόσου αυξάνεται. Περίπου 85% των ανθρώπων που πεθαίνουν από στεφανιαία νόσο είναι άνω των 65 ετών.⁽⁴¹⁾ Η αύξηση του κινδύνου με την πάροδο της ηλικίας αντανακλά την προοδευτική επιδείνωση της στεφανιαίας αθηροσκλήρυνσης και την εμφάνιση στεφανιαίων επεισοδίων. Σε μεγαλύτερες ηλικίες ο σχετικός κίνδυνος εμφάνισης στεφανιαίας νόσου που οφείλεται σε τροποποιήσιμους παράγοντες μειώνεται, αλλά ο απόλυτος κίνδυνος αυξάνεται σημαντικά, δηλαδή ο κίνδυνος λόγω ηλικίας είναι ανεξάρτητος των συνυπαρχόντων παραγόντων κινδύνου (μελέτη Framingham).^(13,42-45)

4.1.2. Φύλο

Η διαφορά των δύο φύλων στην εμφάνιση στεφανιαίας νόσου είναι γνωστή. Μεταξύ ατόμων μέσης ηλικίας, η στεφανιαία νόσος εμφανίζεται 2 με 5 φορές συχνότερα στους άνδρες από ότι στις γυναίκες, με την αναλογία αυτή να διαφέρει μεταξύ των πληθυσμών. Μετά την ηλικία των

60 όμως, φαίνεται ότι η θνησιμότητα της νόσου εξισώνεται στα δύο φύλα.⁽⁴⁶⁻⁴⁸⁾ Στις γυναίκες η νόσος τείνει να εκδηλώνεται κατά μέσο όρο 10 περίπου χρόνια αργότερα σε σχέση με τους άντρες, διαφορά η οποία εν μέρει οφείλεται στις προστατευτικές επιδράσεις των οιστρογόνων. Αυτό φαίνεται από τη σημαντική αύξηση της στεφανιαίας νόσου μετά την εμμηνόπαυση και από την άμβλυνση αυτής της αύξησης με τη χορήγηση οιστρογόνων κατά τη μετεμμηνόπαυσιακή περίοδο.^(22,42,49) Τη δεκαετία του '70, σύμφωνα με δεδομένα της μελέτης Framingham φάνηκε ότι οι παράγοντες κινδύνου στεφανιαίας νόσου επιπόλαζαν σε μεγαλύτερο βαθμό στους άνδρες, αλλά το γεγονός αυτό δεν μπορούσε πλήρως να εξηγήσει τις παρατηρούμενες διαφορές στη θνησιμότητα μεταξύ των δύο φύλων. Οι ερευνητές των μελετών MONICA και ARIC ανέλυσαν τη συνεισφορά των διαφορών φύλου στους καρδιαγγειακούς παράγοντες κινδύνου καθώς και την καρδιαγγειακή θνητότητα σε 46 χώρες. Η επίδραση του φύλου φάνηκε να διαφέρει στους παρακάτω παράγοντες κινδύνου: κάπνισμα, παχυσαρκία, υψηλή αρτηριακή πίεση, υψηλή ολική χοληστερόλη και χαμηλή HDL χοληστερόλη. Οι διαφορές αυτές φαίνεται να εξηγούν το 40% των διαφορών που παρατηρούνται στην καρδιαγγειακή θνητότητα μεταξύ των δύο φύλων.⁽⁵⁰⁾

Στην Ελλάδα, η μελέτη CARDIO2000 έδειξε ότι η χρονική υστέρηση στην εμφάνιση στεφανιαίας νόσου είναι 5 με 15 έτη αργότερα στις γυναίκες, επιβεβαιώνοντας την προστατευτική επίδραση του γυναικείου φύλου στην πρόωμη εκδήλωση της ασθένειας. Επίσης επιβεβαίωσε τη διαφορετική επίδραση των παραγόντων κινδύνου ανάλογα με το φύλο. Η παρουσία υπερχοληστερολαιμίας και οικογενειακού ιστορικού φάνηκε να επηρεάζει περισσότερο τον στεφανιαίο κίνδυνο στους άνδρες, ενώ η υπέρταση, η υιοθέτηση Μεσογειακής δίαιτας, το υψηλότερο μορφωτικό επίπεδο και η παρουσία βραχείας διάρκειας καταθλιπτικών συνδρόμων φαίνεται να επηρεάζουν περισσότερο τις γυναίκες.^(13,51)

4.1.3. Οικογενειακό ιστορικό

Το οικογενειακό ιστορικό στεφανιαίας νόσου αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση στεφανιαίων επεισοδίων.⁽⁵²⁻⁵⁷⁾ Οι μηχανισμοί με τους οποίους συμβαίνει αυτό δεν έχουν επαληθευτεί, αλλά πιστεύεται ότι συμπεριλαμβάνουν μια αυξημένη επιδεκτικότητα στην αθηροσκλήρυνση, μια αυξημένη τάση για θρόμβωση ή άλλους περιβαλλοντικούς και γενετικούς παράγοντες.^(22,58,59) Σύμφωνα με τη μελέτη CARDIO2000 η παρουσία οικογενειακού ιστορικού πρόωμης εκδήλωσης στεφανιαίας νόσου σχετίζεται με τετραπλασιασμό του κινδύνου εκδήλωσης μη θανατηφόρου στεφανιαίου επεισοδίου στους άνδρες. Στις γυναίκες ο ίδιος κίνδυνος βρέθηκε ελαφρά μικρότερος. Η ίδια μελέτη έδειξε επίσης ότι το οικογενειακό ιστορικό των κλασσικών παραγόντων κινδύνου, όπως η υπέρταση και η υπερχοληστερολαιμία, αυξάνει

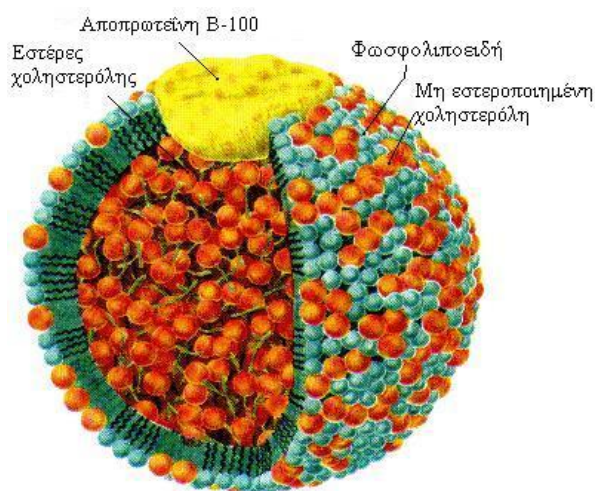
επίσης τον κίνδυνο εμφάνισης μη θανατηφόρου στεφανιαίου επεισοδίου σε άτομα ελεύθερα καρδιαγγειακών νοσημάτων.⁽¹³⁾

4.2. Τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου

4.2.1. Υπερλιπιδαιμία

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα λιπίδια παίζουν κεντρικό ρόλο στην αθηροσκληρυντική διαδικασία και τα υψηλά επίπεδα χοληστερόλης (κυρίως χοληστερόλης χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών) συνδέονται με γρήγορη εξέλιξη της νόσου.^(22,60) Η μελέτη Framingham, η MRFIT (Multiple Risk Factor Intervention Trial), και η LRC (Lipid Research Clinics) έδειξαν άμεση σχέση μεταξύ των επιπέδων ολικής και LDL χοληστερόλης και του ρυθμού νέων περιστατικών στεφανιαίας νόσου σε άνδρες και γυναίκες.⁽⁶¹⁻⁶³⁾

Η ικανότητα των αυξημένων επιπέδων LDL χοληστερόλης να προκαλεί στεφανιαία νόσο φαίνεται ξεκάθαρα σε άτομα με οικογενείς μορφές υπερχοληστερολαιμίας. Στα άτομα αυτά εμφανίζεται στεφανιαία αθηροσκλήρωση προχωρημένου σταδίου και πρόωρη στεφανιαία νόσος ακόμα και υπό την πλήρη απουσία άλλων παραγόντων κινδύνου.⁽⁶⁴⁾



Εικόνα 4.1. Το μόριο της LDL

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η LDL διαδραματίζει κυρίαρχο ρόλο στην ανάπτυξη αθηροσκλήρυνσης. Το μεγαλύτερο ποσοστό χοληστερόλης που εναποτίθεται στο αρτηριακό τοίχωμα προέρχεται από την λιποπρωτεΐνη LDL, της οποίας η οξείδωση ευνοεί και επιταχύνει την εξέλιξη της αρτηριακής αλλοίωσης.⁽²⁰⁾

Ένας ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου στεφανιαίας νόσου, ιδιαίτερα στις γυναίκες, μπορεί επίσης να είναι τα υψηλά τριγλυκερίδια.

Αντίθετα, οι υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες φαίνεται ότι ασκούν προστατευτική λειτουργία και έχουν αντίστροφη σχέση με τον κίνδυνο στεφανιαίας νόσου. Μελέτες των τελευταίων χρόνων τονίζουν την σημασία των τριγλυκεριδίων και της HDL στην πρόγνωση της στεφανιαίας νόσου και υποστηρίζουν ότι αποτελούν εξίσου σημαντικούς παράγοντες κινδύνου με την LDL και την ολική χοληστερόλη.^(22,65)

Η προστατευτική δράση της HDL χοληστερόλης ξεκινά από το βασικό της μηχανισμό, δηλαδή από τη μεταφορά των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας στο ήπαρ. Η ισορροπία μεταξύ LDL και HDL είναι καίριας σημασίας για το ρυθμό σχηματισμού της λιπώδους αλλοίωσης στο

αρτηριακό τοίχωμα. Φαίνεται επίσης ότι η HDL μειώνει τον αριθμό μορίων προσκόλλησης, τα οποία αποτελούν σημείο εισόδου των μονοπύρηνων στο αρτηριακό τοίχωμα. Η προστατευτική δράση της όμως δεν σταματάει εδώ, καθώς οι αντιφλεγμονώδεις, αντιθρομβωτικές και αντιοξειδωτικές της ιδιότητες αποτελούν επιπλέον μηχανισμούς προστασίας του αρτηριακού ενδοθηλίου.⁽⁶⁶⁻⁶⁹⁾

Σύμφωνα με στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, το 11,6% των θανάτων στην Ελλάδα οφείλονται σε υψηλά επίπεδα χοληστερόλης.⁽⁷⁰⁾ Ανάλυση δεδομένων της μελέτης CARDIO2000 έδειξε ότι η παρουσία υπερχοληστερολαιμίας σχετίζεται με τετραπλασιασμό του στεφανιαίου κινδύνου στους άνδρες, και με πενταπλασιασμό του κινδύνου στις γυναίκες της μελέτης.⁽¹³⁾

4.2.2. Υπέρταση

Η υπέρταση, που καθορίζεται ως συστολική πίεση του αίματος υψηλότερη από 140 mm Hg ή ως διαστολική υψηλότερη από 90 mm Hg, αυξάνει σημαντικά τον κίνδυνο αθηροσκληρυντικής καρδιοπάθειας και αποτελεί μια από τις κυριότερες αιτίες θνησιμότητας και ανικανότητας παγκοσμίως.^(11,22,71,72) Περίπου το ένα τέταρτο του παγκόσμιου πληθυσμού έχει υπέρταση, αριθμός που αναμένεται να ανέβει κατά περίπου 5% στα επόμενα 20 χρόνια.⁽⁷³⁾

Η υπέρταση ευθύνεται για αλλαγές του αρτηριακού τοιχώματος, παρόμοιες με αυτές που εμφανίζονται παρουσία υπερχοληστερολαιμίας. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρούνται αλλαγές στο ενδοθήλιο, προσκόλληση και είσοδος λευκοκυττάρων, συσσώρευση μακροφάγων, αυξημένη διαπερατότητα σε λιπίδια, μετανάστευση και πολλαπλασιασμός λείων μυϊκών κυττάρων. Απουσία υπερχοληστερολαιμίας η υπέρταση συνήθως οδηγεί σε στένωση του αρτηριακού τοιχώματος. Παρουσία υπερχοληστερολαιμίας όμως, η υπέρταση αποτελεί ακόμα σημαντικότερο προαγωγέα της αθηροσκληρωτικής εξεργασίας.⁽⁷⁴⁾ Μελέτες έχουν δείξει ότι η παρουσία υπέρτασης σχετίζεται με μειωμένη αγγειοδιαστολή και ενδέχεται να δρα ως ερέθισμα για την υπερτροφία των λείων μυϊκών κυττάρων του αρτηριακού τοιχώματος. Ευρήματα άλλων μελετών δείχνουν επίσης ότι παρουσία υπέρτασης παρατηρείται αυξημένη σύνθεση κολλαγόνου και μεγαλύτερη εναπόθεση ασβεστίου στις στεφανιαίες αρτηρίες. Επιπλέον, η αύξηση στο αίμα ορμονών, όπως η αλδοστερόνη και η αγγιοτενσίνη II, ευνοεί την ανάπτυξη των ινοβλαστών στο αρτηριακό τοίχωμα.^(75,76)

Σύμφωνα με στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, το 25% των θανάτων στην Ελλάδα οφείλονται στην υπέρταση.⁽⁷⁰⁾ Η μελέτη ΑΤΤΙΚΗ έδειξε ότι ο επιπολασμός υπέρτασης σε αστικές και αγροτικές περιοχές της περιφέρειας Αττικής ήταν 37% στους άνδρες και 25% στις γυναίκες. Έτσι, υπολογίζεται ότι περίπου 2,8 εκατομμύρια Έλληνες ενήλικες έχουν αυξημένα επίπεδα αρτηριακής πίεσης.⁽⁷⁷⁾

Η μελέτη CARDIO2000 έδειξε ότι οι αυξημένες τιμές αρτηριακής πίεσης φαίνεται να σχετίζονται με διπλασιασμό του στεφανιαίου κινδύνου στους άνδρες και με τετραπλασιασμό στις γυναίκες.⁽¹³⁾

4.2.3. Σακχαρώδης διαβήτης / Δυσανεξία στη γλυκόζη

Σε παγκόσμιο επίπεδο, υπολογίζεται ότι 171 εκατομμύρια άνθρωποι πάσχουν από διαβήτη, αριθμός που το 2030 αναμένεται να διπλασιαστεί, με την προϋπόθεση ότι ο επιπολασμός της παχυσαρκίας θα παραμείνει σταθερός.⁽⁷⁸⁾

Ο σακχαρώδης διαβήτης και η αντίσταση στη δράση της ινσουλίνης σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης στεφανιαίας νόσου, ακόμα και σε άτομα με τιμές γλυκόζης και γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης μέσα στα αποδεκτά όρια. Η αύξηση του κινδύνου φαίνεται εντονότερα στις γυναίκες, καθώς η διαφορά στην επίπτωση μεταξύ των δύο φύλων παύει να υφίσταται.^(79,80)

Η θνησιμότητα λόγω οξέος στεφανιαίου συνδρόμου είναι μεγαλύτερη σε διαβητικά άτομα και η επιβίωση τους μετά από ένα μη θανατηφόρο επεισόδιο εμφανίζεται μικρότερη σε σύγκριση με μη διαβητικά. Εκτός από τους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στην αυξημένη θνησιμότητα, οι κλασσικοί παράγοντες κινδύνου, όπως η υπέρταση και η υπερλιπιδαιμία, επιπολάζουν σε υψηλότερα ποσοστά σε διαβητικά άτομα.⁽⁸¹⁻⁸⁴⁾

Χωρίς έκδηλο διαβήτη, η αντίσταση στην ινσουλίνη και η υπερινσουλιναιμία προάγουν την αθηροσκληρωτική εξεργασία μέσα από μια ποικιλία μηχανισμών. Η κυριότερη πορεία που εμπλέκεται στην επιτάχυνση της αθηροσκληρώσεως είναι πιθανότερα η αύξηση της μη ενζυματικής γλυκοζυλίωσης των πρωτεϊνών και των λιπιδίων και η παραγωγή τελικών προϊόντων υψηλής γλυκοζυλίωσης. Η υπεργλυκαιμία προάγει την παραγωγή προθρομβωτικών πρωτεϊνών, αυξάνει το ρυθμό απόπτωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων, μειώνει το ρυθμό πολλαπλασιασμού τους, και αναστέλλει την ινωδόλυση, με αποτέλεσμα τη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου.^(85,86)

Περίπου το 75% των ατόμων με σακχαρώδη διαβήτη πεθαίνουν από κάποια μορφή καρδιακής νόσου.⁽⁴¹⁾ Στην Ελλάδα, δεδομένα της μελέτης CARDIO2000 έδειξαν ότι ο σακχαρώδης διαβήτης επιπόλαζε σε ποσοστό 31% στις γυναίκες και 25% στους άνδρες, και τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης έδειξαν ότι η παρουσία σακχαρώδους διαβήτη σχετίζεται με τριπλασιασμό του στεφανιαίου κινδύνου στους άνδρες και τετραπλασιασμό στις γυναίκες.⁽¹³⁾

4.2.4. Κάπνισμα

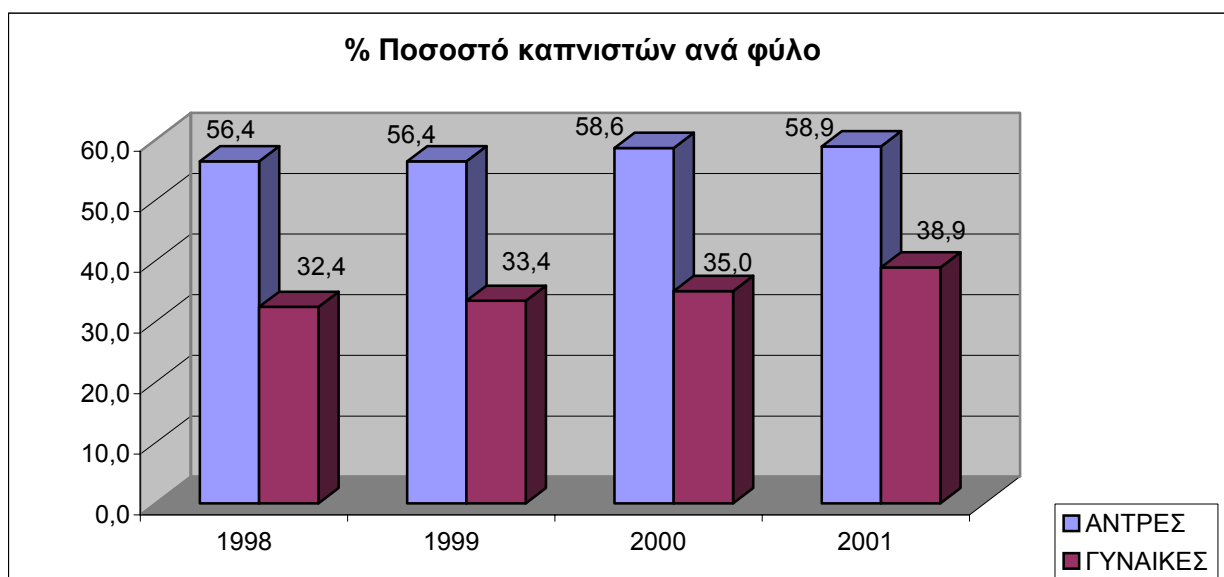
Το κάπνισμα αποτελεί έναν από τους κυριότερους παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου. Φαίνεται ότι σχετίζεται με ελαττωματική ανταπόκριση της στεφανιαίας

αιματικής ροής κατά τη διάρκεια αυξημένων μυοκαρδιακών αναγκών και επομένως ενδέχεται να συμβάλλει στην μυοκαρδιακή ισχαιμία σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο.⁽⁸⁷⁻⁸⁹⁾ Πολλές επιδημιολογικές μελέτες έχουν επίσης ασχοληθεί με την επίδραση του παθητικού καπνίσματος στον κίνδυνο στεφανιαίας νόσου, με ευρήματα που δείχνουν ότι οι παθητικοί καπνιστές διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου σε σχέση με μη καπνιστές.⁽⁹⁰⁻⁹²⁾

Οι μηχανισμοί που φαίνεται να αιτιολογούν τον αυξημένο κίνδυνο στεφανιαίας νόσου σε καπνιστές συμπεριλαμβάνουν την αυξημένη αθηροσκληρωτική εξεργασία, την προαγωγή της συσσώρευσης αιμοπεταλίων και δημιουργίας θρόμβωσης και την μειωμένη ινωδολυτική δραστηριότητα στο αίμα.⁽⁹³⁾

Στις ΗΠΑ υπολογίζεται ότι 30% των θανάτων από στεφανιαία νόσο οφείλονται στο κάπνισμα, με τον κίνδυνο να εμφανίζεται ισχυρά δοσοεξαρτώμενος. Το κάπνισμα δρα συνεργιστικά με άλλους παράγοντες κινδύνου, αυξάνοντας σημαντικά τον κίνδυνο στεφανιαίας νόσου. Αρκετές προοπτικές μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει ουσιαστική μείωση στην θνησιμότητα λόγω της ασθένειας σε πρώην καπνιστές, σε σύγκριση με καπνιστές.⁽⁹⁴⁾ Έρευνες έχουν επίσης παρουσιάσει πλεονεκτήματα από τη διακοπή του καπνίσματος, σε άτομα που έχουν ήδη αναπτύξει ασθένειες σχετιζόμενες με το κάπνισμα. Σε καπνιστές με ιστορικό στεφανιαίου επεισοδίου εμφανίζεται 50% μείωση του κινδύνου για δεύτερο επεισόδιο μετά τη διακοπή του καπνίσματος, καθώς και ανάλογη μείωση στη θνησιμότητα.⁽⁹⁵⁾

Γράφημα 4.1. Οι καπνιστικές συνήθειες στην Ελλάδα



Πηγή: Eurostat

Στην Ελλάδα, η μελέτη ΑΤΤΙΚΗ εκτίμησε τον επιπολασμό του καπνίσματος σε 49% στους άνδρες και 32% στις γυναίκες. Στη μελέτη CARDIO2000 παρατηρήθηκαν παρόμοιες

καπνιστικές συνήθειες και επιβεβαιώθηκε και στον ελληνικό πληθυσμό η αύξηση του κινδύνου ανάπτυξης στεφανιαίας νόσου σε καπνιστές. Τα ευρήματα για το παθητικό κάπνισμα έρχονται σε συμφωνία με άλλες επιδημιολογικές μελέτες, και συσχετίζουν επίσης το παθητικό κάπνισμα με αύξηση του στεφανιαίου κινδύνου.⁽¹³⁾

4.2.5. Παχυσαρκία

Η σχέση μεταξύ παχυσαρκίας και αθηροσκληρώσεως έχει αποτελέσει αντικείμενο έρευνας για πολλά χρόνια. Ευρήματα ερευνών, όπως η μελέτη των Επτά Χωρών, βρήκαν μικρή συσχέτιση μεταξύ παχυσαρκίας και στεφανιαίας αθηροσκληρώσεως.⁽⁹⁶⁾ Η μελέτη Framingham αντίθετα, έδειξε ότι η παχυσαρκία σχετίζεται με μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης στεφανιαίας νόσου, φαίνεται όμως ότι η συσχέτιση αυτή οφείλεται στη συνύπαρξη των κλασικών παραγόντων κινδύνου.⁽⁹⁷⁾ Άλλες προοπτικές μελέτες όμως, έδειξαν ότι η παχυσαρκία, και ιδιαίτερα η κεντρικού τύπου, αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου στεφανιαίας νόσου, και η πρόσληψη βάρους αυξάνει τον στεφανιαίο κίνδυνο ανεξάρτητα με την συνύπαρξη άλλων παραγόντων κινδύνου.^(98,99)

Ανεξάρτητα με το τι ακριβώς ισχύει στην πραγματικότητα, η παχυσαρκία είτε άμεσα είτε έμμεσα αποτελεί παράγοντα κινδύνου, καθώς το αυξημένο σωματικό βάρος μπορεί να προκαλέσει αύξηση του έργου της καρδιάς, της πίεσης του αίματος, του επιπέδου των τριγλυκεριδίων και χοληστερόλης (ολικής και LDL) και μείωση των επιπέδων HDL χοληστερόλης, καθώς επίσης αποτελεί παράγοντα κινδύνου για εμφάνιση ινσουλινοαντοχής και σακχαρώδη διαβήτη.^(100,101)

4.3. Άλλοι τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου

Στον κίνδυνο ανάπτυξης αθηροσκληρώσεως συντελούν και μερικοί άλλοι παράγοντες :

- Η **έλλειψη σωματικής δραστηριότητας** αποτελεί επίσης παράγοντα κινδύνου ανάπτυξης στεφανιαίας νόσου. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι αυξημένα επίπεδα φυσικής δραστηριότητας σχετίζονται με χαμηλότερα επίπεδα νοσηρότητας και θνησιμότητας λόγω στεφανιαίας νόσου.⁽¹⁰²⁻¹⁰⁴⁾ Τα ωφέλη της άσκησης μπορεί να οφείλονται σε πολλούς μηχανισμούς που συμπεριλαμβάνουν αλλαγές στο λιπιδαιμικό προφίλ, στον μεταβολισμό των υδατανθράκων, στα επίπεδα ινωδογόνου και στην πίεση του αίματος.⁽¹⁰⁵⁻¹⁰⁷⁾ Επιπλέον, η άσκηση, ακόμα και μικρής έντασης, αποτελεί σημαντικό κομμάτι της διατήρησης υγιούς σωματικού βάρους και της πρόληψης εμφάνισης παχυσαρκίας και διαβήτη.⁽²²⁾
- Η **λιποπρωτεΐνη(a) Lp(a)** είναι μια λιποπρωτεΐνη με άγνωστη λειτουργία, η οποία αποτελείται από την απολιποπρωτεΐνη B-100 στην οποία συνδέεται ομοιοπολικά ένα μόριο απολιποπρωτεΐνης a. Αυξημένα επίπεδα λιποπρωτεΐνης(a) Lp(a) σχετίζονται με την παρουσία

στεφανιαίας νόσου, ιδιαίτερα σε ασθενείς με υπερχοληστερολαιμία.⁽¹⁰⁸⁾ Φαίνεται ότι προφλεγμονώδη οξειδωμένα φωσφολιποειδή σχετίζονται ισχυρά με τα επίπεδα Lp(a) στο πλάσμα.⁽¹⁰⁹⁻¹¹¹⁾ Επιπλέον, η Lp(a) είναι δομικά ομόλογη με το πλασμινογόνο και φαίνεται ότι παρεμβαίνει στην παραγωγή της πλασμίνης προδιαθέτοντας, για το λόγο αυτό, σε θρομβωτικές επιπλοκές της αθηροσκλήρυνσης.⁽²²⁾

- Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι τα **υψηλά επίπεδα ομοκυστεΐνης** συνδέονται με μεγαλύτερο κίνδυνο αθηροσκλήρυνσης και εμφάνισης στεφανιαίας νόσου.⁽¹¹²⁻¹¹⁴⁾ Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι η ομοκυστεΐνη μειώνει την εξαρτώμενη από το ενδοθήλιο αγγειοδιαστολή, πιθανά μέσω μειώνοντας τη βιοδιαθεσιμότητα του οξειδίου του αζώτου είτε μειώνοντας τη σύνθεσή του, είτε αυξάνοντας την αποικοδόμησή του μέσω της παραγωγής ελευθέρων ριζών.⁽¹¹⁵⁾ Σε πολλές περιπτώσεις τα υψηλά επίπεδα ομοκυστεΐνης μπορούν να αντιμετωπισθούν αποτελεσματικά με συμπλήρωση του φυλλικού οξέος της διατροφής, μολονότι δεν έχει ακόμη καθορισθεί η επίδραση της αντιμετώπισης της υψηλής ομοκυστεΐνης στη συχνότητα των καρδιαγγειακών επεισοδίων.⁽²²⁾
- Αρκετές προοπτικές μελέτες έχουν δείξει συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων **ινωδογόνου** πλάσματος και στεφανιαίας νόσου, αλλά δεν έχει αποδειχτεί σχέση αιτίου αποτελέσματος, καθώς το ινωδογόνο εμφανίζεται αυξημένο παρουσία άλλων παραγόντων κινδύνου. Το ινωδογόνο αποτελεί πρωτεΐνη οξείας φάσης και είναι λογικό να αυξάνεται σε φλεγμονώδεις καταστάσεις, όμως στατιστικές αναλύσεις μελετών δείχνουν ότι εκτός από το ότι αποτελεί δείκτη φλεγμονώδους κατάστασης, συμμετέχει άμεσα και στο σχηματισμό θρόμβων.⁽¹¹⁶⁻¹¹⁸⁾ Αντίστοιχα ευρήματα προκύπτουν από έρευνες που μελετούν τη σχέση της **C αντιδρώσας πρωτεΐνης** (CRP) με την στεφανιαία νόσο, αλλά επίσης η αιτιώδης σχέση δεν έχει επαρκώς εξακριβωθεί.⁽¹¹⁹⁾
- Η συσχέτιση μεταξύ **ψυχολογικών παραγόντων** και στεφανιαίας νόσου είναι γνωστή για δεκαετίες αλλά πρόσφατα εξακριβώθηκε εμπειρικά. Από την άλλη, υπάρχουν μελέτες που δεν βρήκαν τέτοια συσχέτιση, και τα αποτελέσματα παραμένουν αντικρουόμενα. Οι γυναίκες φαίνεται να επηρεάζονται περισσότερο από ψυχοκοινωνικούς παράγοντες από ότι οι άντρες.⁽¹²⁰⁻¹²⁴⁾
- Η αυξημένη κατανάλωση **αλκοόλ** συμβάλλει στα υψηλά επίπεδα τριγλυκεριδίων, στην εμφάνιση αρρυθμιών και στην εμφάνιση παχυσαρκίας.^(17,22) Αντίθετα, η κατανάλωση σε μέτρια επίπεδα φαίνεται να σχετίζεται με μικρότερο στεφανιαίο κίνδυνο.⁽¹²⁵⁾ Ο ρόλος της κατανάλωσης αλκοόλ στην εμφάνιση στεφανιαίας νόσου θα συζητηθεί εκτενέστερα στο επόμενο κεφάλαιο, καθώς επίσης και ο ρόλος της **διατροφής**.

5. ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΝΟΣΟΣ

5.1. Εισαγωγή

Οι επιδράσεις της διατροφής στην εμφάνιση στεφανιαίας νόσου έχουν αποτελέσει αντικείμενο ενδιαφέροντος για περισσότερο από 40 χρόνια, και τα ευρήματα στον τομέα αυτό ολοένα και πληθαίνουν.⁽¹²⁶⁻¹³⁰⁾ Τα αποτελέσματα της μελέτης των Επτά Χωρών υπήρξαν η αφορμή για μεγάλο αριθμό επόμενων μελετών που εξέτασαν τη σχέση της συνολικής ποσότητας λίπους, βαθμού κορεσμού των λιπαρών οξέων, χοληστερόλης και άλλων διατροφικών παραγόντων με τα επίπεδα λιπιδίων και λιποπρωτεϊνών του ορού.⁽¹²⁶⁾

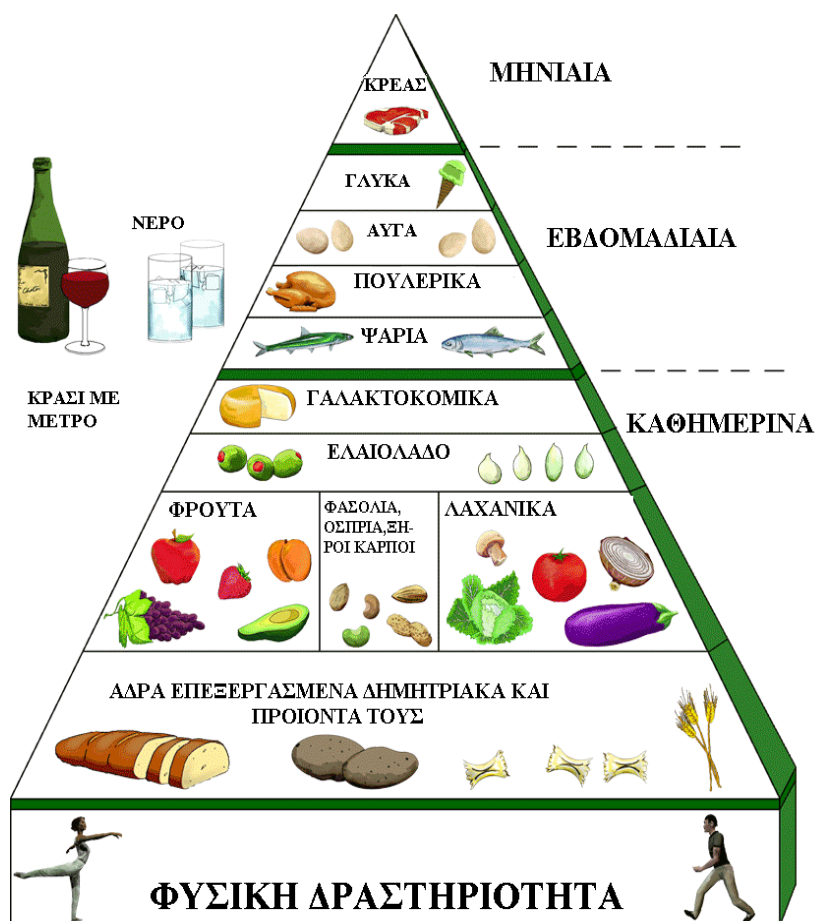
Οι περισσότερες μελέτες έως τώρα έχουν εστιάσει στην επίδραση που έχουν τα λιπαρά οξέα της διατροφής στα επίπεδα χοληστερόλης, και ιδιαίτερα στα επίπεδα της LDL. Φαίνεται όμως ότι και άλλα θρεπτικά συστατικά μπορούν να επηρεάσουν το λιπιδαιμικό προφίλ ή και να μειώσουν τον κίνδυνο στεφανιαίας νόσου, μέσα από μηχανισμούς που δεν εμπλέκουν καν τις λιποπρωτεΐνες.⁽¹³¹⁾

5.2. Μεσογειακή Διατροφή

Ο όρος ‘Μεσογειακή διατροφή’ φαίνεται να έχει διαφορετική έννοια από χώρα σε χώρα, αλλά αναφέρεται κυρίως στην παραδοσιακή διατροφή της Κρήτης, που κατά τη διάρκεια της μελέτης των Επτά Χωρών συσχετίστηκε με μικρότερη θνησιμότητα από στεφανιαία νόσο αλλά και από όλες τις αιτίες.^(132,133) Τα ευρήματα της μελέτης έδειξαν ότι η χαμηλότερη επίπτωση στεφανιαίας νόσου δεν σχετιζόταν με το επίπεδο λιπιδίων, καθώς οι μέσες τιμές χοληστερόλης δεν διέφεραν σημαντικά από τους άλλους μεσογειακούς πληθυσμούς.⁽¹³⁾

Η παραδοσιακή Μεσογειακή διατροφή χαρακτηρίζεται από αυξημένη πρόσληψη λαχανικών, οσπρίων, φρούτων, ξηρών καρπών και δημητριακών (στο παρελθόν ήταν κυρίως μη επεξεργασμένα) και από μία αυξημένη πρόσληψη ελαιολάδου. Χαμηλή είναι η πρόσληψη κρέατος, μέτρια η κατανάλωση ψαριών και πουλερικών και χαμηλή έως μέτρια η πρόσληψη γαλακτοκομικών προϊόντων. Τακτική αλλά μέτρια είναι και η κατανάλωση αθανόλης, κυρίως με τη μορφή κρασιού και συνήθως κατά τη διάρκεια των γευμάτων.^(126,132,134)





Εικόνα 5.1. Η πυραμίδα της Μεσογειακής Διατροφής

Νέα δεδομένα ενθαρρύνουν την άποψη ότι η Μεσογειακή διατροφή σχετίζεται με μειωμένο στεφανιαίο κίνδυνο, καθώς δίαιτες πλούσιες σε φρούτα, λαχανικά, μη επεξεργασμένα δημητριακά και ψάρια φαίνεται ότι σχετίζονται με μικρότερη επίπτωση χρονίων ασθενειών^(135,136). Επιπλέον, μελέτες και στον ελληνικό πληθυσμό, όπως η CARDIO2000, επιβεβαιώνουν τα ευρήματα παλαιότερων ερευνών, εξακριβώνοντας και στο σύγχρονο κόσμο την προστατευτική δράση της Μεσογειακής διαίτας.⁽¹³⁾ Η πλειοψηφία των μελετών που αφορούν τη σχέση διατροφής και στεφανιαίας νόσου, έχουν εστιάσει κυρίως στην αποτίμηση της επίδρασης συγκεκριμένων θρεπτικών συστατικών, παρά διαιτητικών συνηθειών, αλλά τα τελευταία χρόνια η έρευνα έχει στραφεί και προς αυτόν τον τομέα.⁽¹³⁷⁻¹³⁹⁾

5.2.1. Μεσογειακή διατροφή και υπέρταση

Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη ενότητα, η υψηλή αρτηριακή πίεση αποτελεί έναν από τους κύριους παράγοντες κινδύνου εμφάνισης στεφανιαίας νόσου. Ο ρόλος της διατροφής στην πρόληψη της υπέρτασης είναι ήδη τεκμηριωμένος^(140,141), και όσον αφορά μια Μεσογειακού τύπου διατροφή, νέα δεδομένα συνηγορούν ότι συμβάλλει στη μείωση της αρτηριακής πίεσης⁽¹⁴²⁾. Εντυπωσιακό είναι ότι η Μεσογειακή διατροφή, σύμφωνα με αποτελέσματα της

μελέτης CARDIO2000, οδηγεί σε μείωση του κινδύνου εμφάνισης οξέος στεφανιαίου επεισοδίου ακόμα και σε υπερτασικά άτομα με μη ρυθμισμένη αρτηριακή πίεση.⁽¹³⁾

Από τα συστατικά της Μεσογειακής διατροφής, τα λαχανικά, τα φρούτα και το ελαιόλαδο φαίνεται να ασκούν την κύρια προστατευτική δράση έναντι της υπέρτασης⁽¹⁴²⁾, όμως μελέτες δείχνουν ότι το ευεργετικό αποτέλεσμα οφείλεται στο σύνολό της, και όχι σε συγκεκριμένα συστατικά.⁽¹³⁷⁾

Ένα κύριο χαρακτηριστικό της Μεσογειακής διατροφής είναι η αυξημένη περιεκτικότητα σε μονοακόρεστα λιπαρά, κυρίως από το ελαιόλαδο. Αρκετές επιδημιολογικές μελέτες έχουν εξετάσει τη σχέση μεταξύ των λιπιδίων της διατροφής και της επίπτωσης της υπέρτασης, εκ των οποίων οι περισσότερες πραγματοποιήθηκαν στις ΗΠΑ (Nurses' Health Study, Health Professionals' Follow-up Study, Multiple Risk Factor Intervention Trial), όπου η πρόσληψη μονοακόρεστων λιπαρών προέρχεται κυρίως από το κρέας, και επομένως σχετίζεται επίσης με υψηλή πρόσληψη κορεσμένων λιπαρών. Ίσως αυτή είναι και η αιτία που οι μελέτες αυτές είτε δεν εμφάνισαν συσχέτιση μεταξύ μονοακόρεστων λιπαρών και υπέρτασης, είτε βρήκαν θετικές συσχετίσεις⁽¹⁴³⁻¹⁴⁵⁾.

Από την άλλη μεριά, οι λίγες επιδημιολογικές μελέτες στην περιοχή της Μεσογείου παρουσιάζουν τελείως διαφορετικά αποτελέσματα. Οι ερευνητές της μελέτης Italian Nine Communities Study βρήκαν στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ κατανάλωσης ελαιολάδου και αρτηριακής πίεσης, καθώς και μια αρνητική σχέση μεταξύ πολυακόρεστων λιπαρών και συστολικής πίεσης⁽¹⁴⁶⁾. Στην Ελλάδα, η μελέτη EPIC κατέληξε σε παρόμοια αποτελέσματα, δείχνοντας επιπλέον ότι ο λόγος μονοακόρεστων προς κορεσμένα λιπαρά σχετίζεται αρνητικά με τα επίπεδα αρτηριακής πίεσης⁽¹⁴²⁾.



Η Μεσογειακή διατροφή είναι πλούσια σε φυτικά τρόφιμα, όπως φρούτα, λαχανικά και δημητριακά, η περιεκτικότητά των οποίων σε μέταλλα όπως κάλιο, μαγνήσιο και ασβέστιο ίσως αποτελεί επιπλέον μηχανισμό μείωσης της αρτηριακής πίεσης. Η αυξημένη περιεκτικότητά τους σε αντιοξειδωτικές ουσίες (όπως και στο ελαιόλαδο) μπορεί να συμβάλλει επίσης στη διατήρηση υγιούς αγγειακού συστήματος⁽¹⁴⁷⁻¹⁴⁹⁾. Η χαμηλή πρόσληψη κρέατος, η υψηλή πρόσληψη ψαριών, η μέτρια πρόσληψη γαλακτοκομικών και αλκοόλ συμβάλλουν επίσης στο ευεργετικό αποτέλεσμα της Μεσογειακής διατροφής στην αρτηριακή πίεση^(13,150-153).

5.2.2. Επίδραση της Μεσογειακής διατροφής στο λιπιδαιμικό προφίλ

Η συνολική πρόσληψη λίπους μέσω της Μεσογειακής διατροφής φτάνει έως και το 40% της συνολικά προσλαμβανόμενης ενέργειας. Παρά το υψηλό ποσοστό λίπους, η πρόσληψη κορεσμένων λιπαρών είναι μικρότερη του 10% της συνολικής ενέργειας. Τα trans λιπαρά οξέα είναι σχεδόν ανύπαρκτα, ενώ η πρόσληψη μονοακόρεστων λιπαρών που παρατηρήθηκε στην μελέτη των Επτά Χωρών έφτανε περίπου τα 80 γραμμάρια ημερησίως. Η πρόσληψη πολυακόρεστων λιπαρών υπολογίστηκε περίπου στα 15 γραμμάρια ημερησίως.⁽¹³²⁾

Προοπτικές επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει θετική συσχέτιση μεταξύ κορεσμένων λιπαρών και εμφάνισης στεφανιαίας νόσου, και η σχέση αυτή επηρεάζεται από μηχανισμούς πέρα της επίδρασης στο λιπιδαιμικό προφίλ ⁽¹⁵⁴⁻¹⁵⁷⁾. Τα κορεσμένα λίπη αυξάνουν την ολική χοληστερόλη και την χοληστερόλη LDL, με το μυριστικό λιπαρό οξύ, το παλμιτικό και το λαυρικό να εμφανίζουν την μεγαλύτερη υπερχοληστερολαιμική δράση.⁽¹⁵⁸⁾

Η Μεσογειακή διατροφή είναι πλούσια σε μονοακόρεστα λιπαρά, με το συχνότερα εμφανιζόμενο λιπαρό οξύ το ελαϊκό, τα οποία όταν αντικαθιστούν τα κορεσμένα στη διατροφή, οδηγούν σε μείωση της ολικής και LDL χοληστερόλης, καθώς και των τριγλυκεριδίων. Επιπλέον, όταν το ποσοστό του προσλαμβανόμενου λίπους είναι μικρότερο του 30%, τα μονοακόρεστα λιπαρά συμβάλλουν στην αύξηση της HDL χοληστερόλης.^(126,158)

Η περιεκτικότητα της Μεσογειακής διατροφής σε πολυακόρεστα λιπαρά είναι επίσης υψηλή. Πρόσφατες μελέτες συμφωνούν ότι η αντικατάσταση κορεσμένων λιπαρών με πολυακόρεστα, εκτός από μονοακόρεστα λιπαρά, έχει θετική επίδραση στο λιπιδαιμικό προφίλ. ⁽¹⁵⁹⁻¹⁶⁰⁾

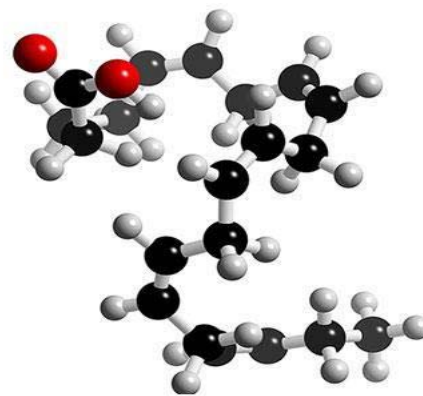
Τα ω-6 λιπαρά οξέα (βρίσκονται κυρίως στα φυτικά έλαια), με κύριο το λινελαϊκό οξύ, οδηγούν σε μείωση της LDL και HDL χοληστερόλης όταν αντικαθιστούν τα κορεσμένα λιπαρά της δίαιτας, και σε μείωση της LDL όταν αντικαθιστούν υδατάνθρακες.⁽¹²⁶⁾

Τα ω-3 λιπαρά οξέα έχουν συσχετιστεί με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου, καθώς και με μείωση στη θνησιμότητα λόγω της ασθένειας.^(161,162) Αποτελέσματα της μελέτης δευτερογενούς πρόληψης Lyon Diet Heart Study συσχέτισαν την πρόσληψη α-λινολενικού οξέος με μικρότερο αριθμό στεφανιαίων επεισοδίων⁽¹⁶³⁾, ενώ η μελέτη DART έδειξε ότι η κατανάλωση λιπαρών ψαριών σχετίζεται με μείωση της θνησιμότητας από όλες τις αιτίες.⁽¹⁶⁴⁾ Σε παρόμοια αποτελέσματα κατέληξε και η ιταλική μελέτη GISSI, η οποία χρησιμοποιώντας συμπλήρωμα ιχθυελαίων, έδειξε ότι η πρόσληψη ω-3 λιπαρών οδηγεί σε μείωση της ολικής και καρδιαγγειακής θνησιμότητας.⁽¹⁶⁵⁾

Ο μηχανισμός μέσω του οποίου τα ω-3 λιπαρά προστατεύουν έναντι καρδιαγγειακών νοσημάτων δεν έχει κατανοηθεί πλήρως, αλλά φαίνεται να περιλαμβάνει αντιθρομβωτικές και

αντιφλεγμονώδεις δράσεις, καθυστερημένη ανάπτυξη της αθηροσκληρωτικής πλάκας και μειωμένη σύνθεση μορίων προσκόλλησης και αυξητικών παραγόντων που εμπλέκονται στην αθηροσκληρωτική εξεργασία.⁽¹⁶⁶⁾

Τα μακράς αλυσού ω-3 λιπαρά οξέα εικοσαπεντανοϊκό (EPA) και δοκοσαεξανοϊκό (DHA), τα οποία βρίσκονται κυρίως στα ψάρια και στα ιχθυέλαια, αυξάνουν την LDL χοληστερόλη αλλά μειώνουν τα τριγλυκερίδια, με την ολική χοληστερόλη να μην επηρεάζεται.^(167,168) Μελέτες πάνω στο λινολενικό οξύ, το οποίο βρίσκεται σε φυτικής προέλευσης προϊόντα (λιναρόσπορος, λινέλαιο, κ.α.) έδειξαν επίσης θετικές επιδράσεις στο λιπιδαιμικό προφίλ, και μάλιστα σε κάποιες φάνηκε ότι έχει εξίσου σημαντική επίδραση στη μείωση της ολικής χοληστερόλης με το ελαϊκό οξύ.⁽¹⁶⁹⁾



Εικόνα 5.2. Η δομή του εικοσαπεντανοϊκού οξέος

Τέλος, τα trans λιπαρά οξέα, που περιέχονται κυρίως σε υδρογονωμένα φυτικά έλαια, στο λίπος του γάλακτος και του μοσχαριού, προκαλούν παρόμοιες επιδράσεις με τα κορεσμένα λιπαρά οξέα, και σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο στεφανιαίας νόσου.⁽¹⁷⁰⁾ Επιπλέον πλεονέκτημα επομένως της Μεσογειακής διατροφής, αποτελεί η σχεδόν μηδαμινή περιεκτικότητά της σε trans λιπαρά.

5.2.3. Επίδραση της Μεσογειακής διατροφής σε άλλους παράγοντες κινδύνου

Λίγες μελέτες έχουν μελετήσει την ύπαρξη ή όχι ευνοϊκής επίδρασης της Μεσογειακής διατροφής στην πρόληψη της παχυσαρκίας και του διαβήτη. Πρόσφατα, σε έναν αντιπροσωπευτικό μεσογειακό πληθυσμό στην Ισπανία, φάνηκε αρνητική συσχέτιση μεταξύ μεσογειακής διατροφής και δείκτη μάζας σώματος⁽¹⁷¹⁾, όμως αντίθετα, σε έρευνα της Τριχοπούλου και συν. σε μεγάλο δείγμα του ελληνικού πληθυσμού, δεν προέκυψε τέτοια συσχέτιση.⁽¹⁷²⁾ Άλλες μελέτες συμπέραναν ότι η Μεσογειακού τύπου διατροφή βελτιώνει την λειτουργία του ενδοθηλίου, βοηθά στην διατήρηση ευγλυκαιμίας, μειώνει τη συγκέντρωση ινσουλίνης στο πλάσμα και βελτιώνει το λιπιδαιμικό προφίλ. Επιπλέον, αποτελέσματα παρεμβάσεων συσχετίζουν την Μεσογειακή διατροφή με μικρότερες τιμές HbA_{1c}, χαμηλότερο δείκτη μάζας σώματος και βελτίωση του μεταβολισμού της γλυκόζης⁽¹⁷²⁻¹⁷⁷⁾. Στον ελληνικό πληθυσμό, η μελέτη ΑΤΤΙΚΗ κατέληξε σε αρνητική συσχέτιση μεταξύ Μεσογειακής διατροφής και παχυσαρκίας, και έδειξε ότι όσο πλησιέστερα στη Μεσογειακή είναι η διατροφή ενός ατόμου, τόσο μικρότερος είναι ο κίνδυνος αύξησης βάρους, ανεξάρτητα από άλλους παράγοντες, όπως η ηλικία και το επίπεδο φυσικής δραστηριότητας.⁽¹⁷⁸⁾ Επίσης, η μελέτη CARDIO 2000 κατέληξε σε παρόμοια συμπεράσματα, συσχετίζοντας την Μεσογειακή διατροφή

με μικρότερη συχνότητα εμφάνισης σακχαρώδους διαβήτη, καθώς και με χαμηλότερο δείκτη μάζας σώματος.⁽¹³⁾

Γενικότερα, η Μεσογειακή διατροφή φαίνεται να ασκεί προστατευτική δράση έναντι της αθηροσκληρωτικής εξεργασίας, ανεξάρτητα από την τροποποίηση των παραγόντων κινδύνου. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι ορισμένα συστατικά του ελαιολάδου μπορούν να μειώσουν την οξείδωση της LDL και τη συσσώρευση αιμοπεταλίων, να τροποποιήσουν την ενεργοποίηση του ενδοθηλίου και να μειώσουν την έκφραση μορίων προσκόλλησης (όπως VCAM-1). Επιπλέον, οι πολυφαινόλες που περιέχει το ελαιόλαδο και το κόκκινο κρασί, φαίνεται να μειώνουν την προσκόλληση των μονοκύτταρων στο ενδοθήλιο, καθώς και την παραγωγή mRNA για την έκφραση του VCAM-1, παρεμποδίζουν τη μετανάστευση λείων μυϊκών κυττάρων και βελτιώνουν την έκφραση και δραστηριότητα της συνθάσης του οξειδίου του αζώτου. Παρόμοιες δράσεις εντοπίζονται, όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα, και στα ω-3 λιπαρά οξέα. Επίσης, μία υψηλή κατανάλωση φρούτων και δημητριακών φαίνεται να σχετίζεται με χαμηλότερες συγκεντρώσεις ιντερλευκίνης-6, ενώ υψηλή κατανάλωση ξηρών καρπών και ελαιολάδου σχετίζεται με χαμηλότερες συγκεντρώσεις VCAM-1, ICAM-1, IL-6 και CRP. Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων ασκούνται αυτές οι προστατευτικές δράσεις δεν έχουν διευκρινιστεί σε ικανοποιητικό βαθμό, αλλά είναι πλέον σαφές ότι η θετική επίδραση της Μεσογειακής διατροφής είναι πολυσύνθετη και δεν περιορίζεται μόνο στην τροποποίηση του λιπιδαιμικού προφίλ.⁽¹⁷⁹⁻¹⁸⁴⁾

5.2.4. Επίδραση της Μεσογειακής Διατροφής στην εμφάνιση στεφανιαίας νόσου

Η μελέτη των 7 χωρών αποτελεί μία από τις σημαντικότερες έρευνες που συνέβαλαν στην κατανόηση της επίδρασης της Μεσογειακής διατροφής στην ολική και καρδιαγγειακή θνησιμότητα. Στο τέλος της 25-ετούς παρακολούθησης, οι ερευνητές της μελέτης ανακάλυψαν συσχετίσεις μεταξύ της μειωμένης στεφανιαίας θνησιμότητας και πληθυσμιακών διαφορών στην διαιτητική πρόσληψη κορεσμένων λιπαρών οξέων και φλαβονοειδών.⁽¹⁸⁵⁾

Οι ερευνητές της μελέτης CARDIO 2000 μελέτησαν ένα δείγμα 661 ατόμων μέσης ηλικίας που εμφάνισαν πρώτη φορά επεισόδιο εμφράγματος ή ασταθούς στηθάγχης, καθώς και αντίστοιχο αριθμό υγιών ατόμων (ομάδα ελέγχου) από ποικίλες Ελληνικές περιοχές. Η υιοθέτηση μιας μεσογειακής δίαιτας συσχετίστηκε με 16% μείωση του κινδύνου πρώτης εμφάνισης οξέος στεφανιαίου συνδρόμου. Επιπλέον, σε μια υπο-μελέτη της CARDIO 2000, και αφού συνυπολογίστηκε η επίδραση αρκετών συγχυτικών παραγόντων, οι ερευνητές εκτίμησαν την μείωση του κινδύνου σε 7-10% σε υπερτασικούς ασθενείς, υπό αγωγή, απουσία αγωγής και μη ρυθμισμένους. Επιπλέον, στην ομάδα των ασθενών με υπερχοληστερολαιμία, η μείωση του κινδύνου με υιοθέτηση μεσογειακής δίαιτας υπολογίστηκε στο 12%, ανεξάρτητα από τα επίπεδα

χοληστερόλης και άλλους καρδιαγγειακούς παράγοντες. Τέλος, σε ασθενείς με μεταβολικό σύνδρομο, η μείωση του κινδύνου υπολογίστηκε στο 35%, αφού έγιναν οι απαραίτητες προσαρμογές ανάλογα με την ηλικία, το φύλο, το μορφωτικό και οικονομικό επίπεδο καθώς και με τους κλασικούς παράγοντες κινδύνου. ^(13,185)

Πρόσφατα, σε μία προοπτική μελέτη που συμπεριέλαβε 22,043 ενήλικες μέσης ή μεγαλύτερης ηλικίας από την Ελλάδα, η Τριχοπούλου και συν. κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι υπάρχει αρνητική συσχέτιση μεταξύ συμμόρφωσης με τη μεσογειακή διατροφή και στεφανιαίας θνησιμότητας. Συγκεκριμένα, αύξηση στο Μεσογειακό σκορ περίπου κατά 2/9, συσχετίστηκε με 25% μείωση στη στεφανιαία θνησιμότητα. Οι συσχετίσεις αυτές ήταν ανεξάρτητες του φύλου, των καπνιστικών συνηθειών, του δείκτη μάζας σώματος και του επιπέδου φυσικής δραστηριότητας. ^(130,185)

Οι Martinez-Gonzalez et al. ⁽¹⁸⁶⁾, σε μία μελέτη ασθενών-μαρτύρων που συμπεριλάμβανε 171 ασθενείς, και 171 υγιείς ως ομάδα ελέγχου, παρατήρησαν ότι όσο υψηλότερη η τιμή του μεσογειακού διατροφικού σκορ, τόσο μικρότερος ήταν ο κίνδυνος εμφάνισης εμφράγματος του μυοκαρδίου. Τα δεδομένα της μελέτης αυτής υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η Μεσογειακή διατροφή είναι μία αποτελεσματική προσέγγιση μείωσης του στεφανιαίου κινδύνου. ^(185,186)

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι παραπάνω μελέτες που διερεύνησαν την επίδραση της Μεσογειακής διατροφής στην εμφάνιση οξέος στεφανιαίου συνδρόμου.

Πίνακας 5.1. Μελέτες που αξιολόγησαν τη σχέση μεταξύ της Μεσογειακής διατροφής και της εμφάνισης οξέος στεφανιαίου συνδρόμου

Ερευνητές	Πληθυσμός	Είδος μελέτης	Κύρια ευρήματα
Παναγιωτάκος και συν. ⁽¹⁸⁷⁾	661 με ΟΣΣ 661 ως δείγμα ελέγχου	Ασθενών – μαρτύρων	16% μείωση στεφανιαίου κινδύνου με υιοθέτηση Μ.Δ. *
Πίτσαβος και συν. ⁽¹⁸⁸⁾	534 με ΟΣΣ 399 με υπερχοληστερολαμία ως δείγμα ελέγχου	Ασθενών – μαρτύρων	12% μείωση στεφανιαίου κινδύνου με υιοθέτηση Μ.Δ. *
Πίτσαβος και συν. ⁽¹⁸⁹⁾	418 άτομα με ΟΣΣ 303 με υπέρταση ως δείγμα ελέγχου	Ασθενών – μαρτύρων	25% μείωση στεφανιαίου κινδύνου σε ρυθμισμένους υπέρτασικούς με υιοθέτηση Μ.Δ. και φυσικής δραστηριότητας (p-value<0,01)
Πίτσαβος και συν. ⁽¹⁹⁰⁾	307 με ΟΣΣ 118 με μεταβολικό σύνδρομο ως δείγμα ελέγχου	Ασθενών – μαρτύρων	35% μείωση στεφανιαίου κινδύνου σε ασθενείς με μεταβολικό σύνδρομο με υιοθέτηση Μ.Δ (p-value<0,01)
Τριχοπούλου και συν. ⁽¹³⁰⁾	22,034 ενήλικες άντρες και γυναίκες	Προοπτική πληθυσμιακή	25% μείωση στη στεφανιαία θνησιμότητα με αύξηση του σκορ Μ.Δ. κατά 2/9 (p-value<0,001)
Martinez – Gonzalez et al ⁽¹⁸⁶⁾	171 με OEM 171 ως δείγμα ελέγχου	Ασθενών – μαρτύρων	8% μείωση στεφανιαίου κινδύνου με αύξηση του σκορ κατά 1 μονάδα (p-value<0,05)

ΟΣΣ: οξύ στεφανιαίο σύνδρομο, OEM: οξύ έμφραγμα μυοκαρδίου, Μ.Δ.: Μεσογειακή διατροφή

* P-value μη διαθέσιμο λόγω συγκέντρωσης των παραπάνω στοιχείων από δευτερογενείς πηγές.

5.2.5. Η χρήση των Μεσογειακών σκορ στην εκτίμηση του καρδιαγγειακού κινδύνου

Η χρήση των Μεσογειακών σκορ αποτελεί μια προσπάθεια αποτίμησης της ποιότητας της διατροφής σε σχέση με το πόσο πλησιάζει στις συστάσεις του Μεσογειακού προτύπου. Οι συνήθειες διατροφής μεταφράζονται σε έναν αριθμό, μέσω κάποιας συνάρτησης που περιλαμβάνει τρόφιμα, ομάδες τροφίμων ή θρεπτικά συστατικά ή ακόμα και συνδυασμό αυτών. Τα διατροφικά σκορ έχουν αρκετές φορές χρησιμοποιηθεί για τη διερεύνηση της ύπαρξης συσχετίσεων μεταξύ της Μεσογειακής διατροφής και παραμέτρων υγείας, όπως το προσδόκιμο επιβίωσης, ο επιπολασμός της παχυσαρκίας, τα καρδιαγγειακά νοσήματα και ο καρκίνος. Επιπλέον, τα σκορ αποτελούν χρήσιμα εργαλεία στη μέτρηση διαιτητικών συνηθειών καθώς και στην ανάπτυξη συστάσεων κατανοητών στο γενικό πληθυσμό.⁽¹⁹¹⁾

Στην Ελλάδα η χρήση των Μεσογειακών σκορ ξεκίνησε σε μια προσπάθεια αποτίμησης της σχέσης μεταξύ Μεσογειακής διατροφής και μακροβιότητας (Τριχοπούλου και συνεργάτες). Η θετική συσχέτιση που προέκυψε αποτέλεσε κίνητρο για ολοένα και περισσότερους ερευνητές, οδηγώντας στην ευρύτερη χρησιμοποίηση των Μεσογειακών σκορ στην αναζήτηση συσχετίσεων διατροφής και υγείας.⁽¹⁹²⁾ (Πίνακας 5.2.)

Πίνακας 5.2. Η χρήση των Μεσογειακών σκορ στην Ελλάδα

Ερευνητές	Αριθμός δείγματος/ Ηλικιακή ομάδα	Κύρια ευρήματα
Τριχοπούλου και συν. 1995, 'Mediterranean Diet Score' (MDS-1) ¹⁹²	182 / ♀♂ >70 ετών	Υψηλότερο MDS-1 κατά 1 βαθμό σχετίζεται με 17% μείωση της θνησιμότητας (p-value=0,04)
Τριχοπούλου και συν. 2003 ¹³² , 2005 ¹⁹³ , 2η έκδοση του MDS (MDS-2) (EPIC)	1. 22.043 / ♀♂ 20-84 ετών 2. 1.302 / ♀♂ στεφανιαίοι ασθενείς 3. 74.607 / ♀♂ >60 ετών	Υψηλότερο MDS-2 κατά 2 βαθμούς σχετίζεται με μείωση της θνησιμότητας κατά: 1. 25% 2. 27% 3. 8%
Ψαλτοπούλου και συν. 2004, παραλλαγή του MDS-2 ¹⁴² (EPIC)	20.343 / ♀♂ 20-86 ετών	Υψηλότερο MDS-2 σχετίζεται με μικρότερη συχνότητα αρτηριακής υπέρτασης (P-value<0,001)
Παναγιωτάκος και συν. 2004, Dietary Score (DS) ¹⁹⁴ (ΑΤΤΙΚΗ)	2.282 / ♀♂ >18 ετών	Υψηλότερο DS κατά 10 βαθμούς σχετίζεται με μείωση κατά 22mg/dl της οξειδωμένης LDL. Σε σύγκριση με δυτικού τύπου δίαιτες, η Μεσογειακή σχετίζεται με 32% μείωση της οξειδωμένης LDL*

* P-value μη διαθέσιμο λόγω συγκέντρωσης των παραπάνω στοιχείων από δευτερογενείς πηγές.

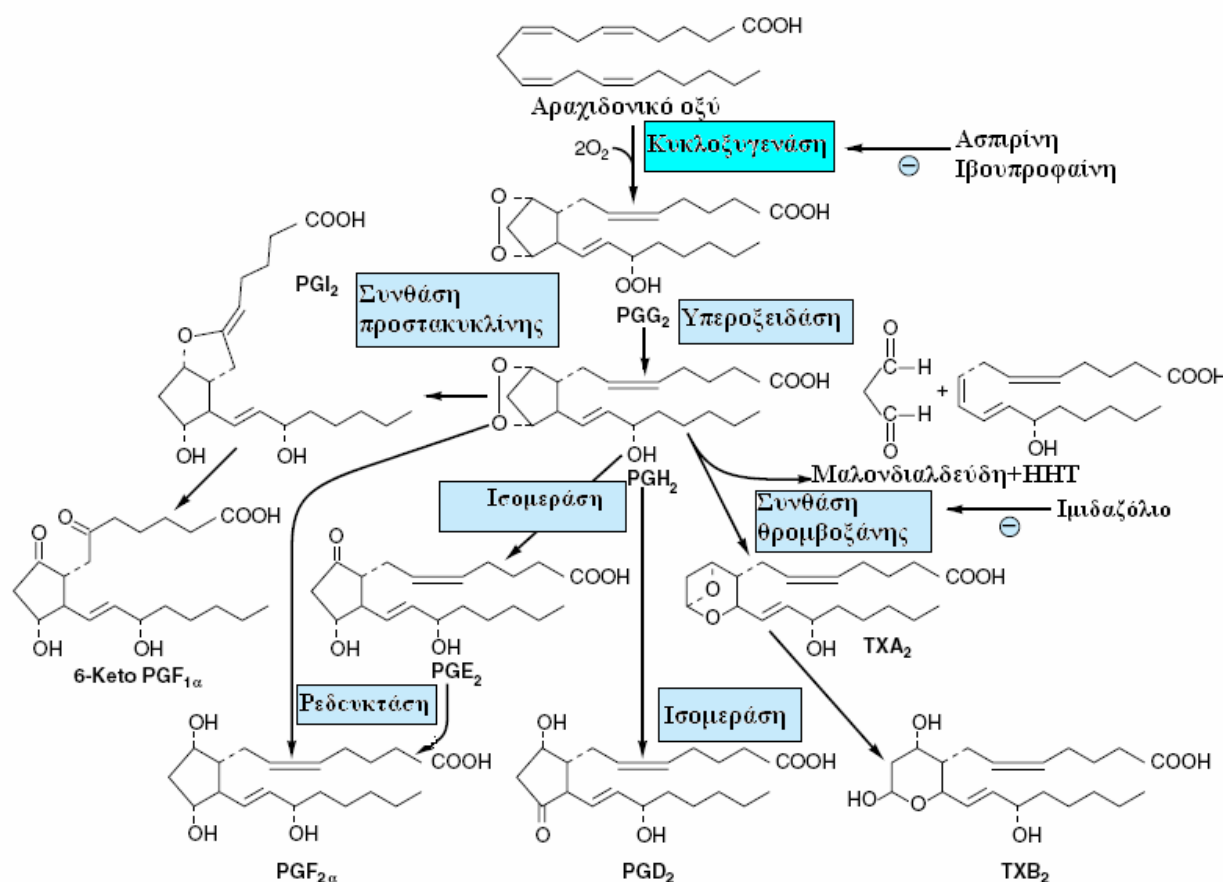
Πρόσφατα, όπως φαίνεται και στον παραπάνω πίνακα, δημιουργήθηκε ένα καινούργιο διατροφικό σκορ μεγάλης κλίμακας που ενσωματώνει τα χαρακτηριστικά της Μεσογειακής διατροφής και συσχετίζεται με τον καρδιαγγειακό κίνδυνο και βιολογικούς δείκτες

(Παναγιωτάκος και συν.)⁽¹⁹⁴⁾. Το σκορ αυτό έχει εύρος τιμών από 0 έως 55 και συμπεριλαμβάνει την εβδομαδιαία κατανάλωση 9 ομάδων τροφίμων : μη επεξεργασμένα δημητριακά, φρούτα, λαχανικά, όσπρια, πατάτες, ψάρια, κρέας και προϊόντα τους, πουλερικά, πλήρη γαλακτοκομικά, καθώς και την πρόσληψη αλκοόλ και ελαιολάδου. Η συχνότητα κατανάλωσης των φαγητών από αυτές τις ομάδες, μεταφράζεται μέσω συναρτήσεων σε ένα αριθμό. Για την κατανάλωση τροφίμων που θεωρούνται ‘κοντά’ στο μεσογειακό πρότυπο, το σκορ είναι 0 όταν κάποιος αναφέρει μηδενική πρόσληψή τους, και από 1 έως 5 από σπάνια έως καθημερινή κατανάλωση. Αντίθετη είναι η βαθμολογία για ομάδες τροφίμων που θεωρούνται ‘μακριά’ από το Μεσογειακό πρότυπο. Για το αλκοόλ χρησιμοποιείται διαφορετική βαθμολογία, με την μέτρια κατανάλωση (<300ml) να βαθμολογείται με 5, την υψηλή (>700ml) ή καθόλου με 0, και την κατανάλωση 600–700, 500–600, 400–500 και 300–400 ml με 1 έως 4 αντίστοιχα. Υψηλότερες τιμές του σκορ αντικατοπτρίζουν μεγαλύτερη συμμόρφωση με το Μεσογειακό πρότυπο.⁽¹⁹⁴⁾

6. ΚΥΚΛΟΟΞΥΓΕΝΑΣΗ-2 ΚΑΙ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΥΝΣΗ

6.1. Προσταγλανδίνες και θρομβοξάνες: φλεγμονή και αθηρογένεση

Οι προσταγλανδίνες και οι θρομβοξάνες διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στη φλεγμονή και φαίνεται να εμπλέκονται στην παθογένεση των καρδιαγγειακών νοσημάτων, του καρκίνου και άλλων φλεγμονωδών νόσων⁽¹⁹⁵⁻¹⁹⁷⁾. Οι κύριες προσταγλανδίνες στον άνθρωπο, και αυτές με τη μεγαλύτερη βιολογική σημασία, είναι η προσταγλανδίνες της σειράς 2⁽¹⁹⁸⁾. Η **κυκλοοξυγενάση** (COX) καταλύει το πρώτο βήμα στη βιοσύνθεσή τους, μετατρέποντας το αραχιδονικό οξύ σε προσταγλανδίνη H₂ (PGH₂). Το αραχιδονικό οξύ απελευθερώνεται από τα φωσφολιποειδή με τη δράση της φωσφολιπάσης A₂, ως απόκριση σε ερεθίσματα, όπως η αγγειοτενσίνη II, η βραδυκίνη, η θρομβίνη και η επινεφρίνη. Η PGH₂ μετατρέπεται ταχέως σε αρκετά διαφορετικά εικοσανοειδή, που περιλαμβάνουν τις προσταγλανδίνες PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}, PGI₂ και την θρομβοξάνη (TX)A₂.⁽¹⁹⁹⁾ (Εικόνα 6.1)



Εικόνα 6.1. Βιοσύνθεση θρομβοξανών και προσταγλανδινών σειράς 2

Από: Robert K. Murray, MD, PhD et al, Harper's Illustrated Biochemistry, Twenty-Sixth Edition, 2003, McGraw-Hill Companies

Οι προσταγλανδίνες εκφράζονται και απελευθερώνονται σχεδόν από όλα τα κύτταρα και τους ιστούς, με το χαρακτηριστικό ότι δεν αποθηκεύονται αλλά συντίθενται και απελευθερώνονται άμεσα μετά τη σύνθεσή τους. Η τελική σύνθεση των κύριων προσταγλανδινών (A,E,F), των θρομβοξανών και της προστακυκλίνης απαιτεί συγκεκριμένα ένζυμα, των οποίων η παρουσία ποικίλει ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και ιστό. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να υπάρχει ιστική εξειδίκευση ως προς τον τύπο και την ποσότητα των προσταγλανδινών που παράγονται. Στα αιμοφόρα αγγεία παράγονται κυρίως η PGI_2 και η PGF_{2a} , ενώ η TXA_2 παράγεται κυρίως στα αιμοπετάλια. Στην καρδιά, οι PGI_2 , PGF_{2a} και PGE_2 παράγονται περίπου σε ίσες ποσότητες.⁽²⁰⁰⁾

Παθοφυσιολογικά δεδομένα μελετών των τελευταίων χρόνων δείχνουν ότι η αθηροσκλήρυνση συνοδεύεται από αλλαγές στο μεταβολισμό των εικοσανοειδών, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι με κάποιο τρόπο εμπλέκονται στην ανάπτυξη αθηροσκληρωτικών αλλοιώσεων.⁽²⁰¹⁾ Οι προσταγλανδίνες φαίνεται να συμμετέχουν σε μια ποικιλία φυσιολογικών διεργασιών στην αθηροσκλήρυνση και θρόμβωση, όπως η κυτταρική προσκόλληση, η αγγειοδιαστολή και η συσσώρευση αιμοπεταλίων.⁽¹⁹⁶⁾ Στα αιμοπετάλια παράγεται κυρίως θρομβοξάνη A_2 , η οποία αποτελεί επαγωγέα της αγγειοσυστολής και της προσκόλλησης αιμοπεταλίων.⁽¹⁹⁹⁾ Στα ενδοθηλιακά κύτταρα η κυρίαρχη προσταγλανδίνη που παράγεται είναι η προστακυκλίνη (PGI_2). Η προστακυκλίνη, όπως ήδη αναφέρθηκε, αποτελεί έναν ισχυρό αγγειοδιαστολέα καθώς και αποκλειστή της συσσώρευσης αιμοπεταλίων και προσκόλλησης λευκοκυττάρων, και επομένως πιστεύεται ότι ασκεί προστατευτική δράση έναντι της αθηροθρόμβωσης.⁽²⁰¹⁾

Στα λεία μυϊκά κύτταρα του αγγειακού τοιχώματος παράγονται κυρίως οι PGI_2 , PGE_2 και PGF_{2a} , ως απάντηση στη δράση της αγγειοτενσίνης II, της σεροτονίνης και του αιμοπεταλιακού αυξητικού παράγοντα. Τα μακροφάγα παράγουν εικοσανοειδή που έχουν προφλεγμονώδη δράση, όπως η PGE_2 , η οποία διεγείρει την παραγωγή της φλεγμονώδους κυτοκίνης ιντερλευκίνης-6. Φαίνεται ότι η PGE_2 ευνοεί την απελευθέρωση και ενεργοποίηση μεταλλοπρωτεϊνών, οι οποίες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην μετανάστευση των μακροφάγων. Επομένως, η παραγωγή προσταγλανδινών (που μεσολαβείται από την κυκλοοξυγονάση-2) στα ενεργοποιημένα μακροφάγα του αρτηριακού τοιχώματος, ίσως ευνοεί την αθηροσκλήρωση μέσα από μηχανισμούς όπως η ενεργοποίηση της χημειοταξίας, αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας, διάδοση του καταρράκτη φλεγμονωδών κυτοκινών και διέγερση της μετανάστευσης και πολλαπλασιασμού των λείων μυϊκών κυττάρων.⁽¹⁹⁶⁾

6.2. Κυκλοοξυγενάση-2 (prostaglandin H synthase 2)

6.2.1. Έκφραση

Πρόσφατα ανακαλύφθηκε ότι η κυκλοοξυγενάση υπάρχει σε δύο ισομορφές, τις COX-1 και COX-2, οι οποίες κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια. Η COX-1 εκφράζεται στους περισσότερους ιστούς, κυρίως όμως στο γαστρικό βλεννογόνο, στα αιμοπετάλια, στο αγγειακό ενδοθήλιο και στα νεφρά, ρυθμίζοντας βασικές λειτουργίες των κυττάρων. Τα μακροφάγα και τα μονοκύτταρα αποτελούν τους κύριους κυτταρικούς τύπους έκφρασης της COX-2, μετά από διέγερσή τους από τον παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF), την ιντερλευκίνη-1 και το βακτηριδιακό λιποπολυσακχαρίτη (LPS). Άλλοι κυτταρικοί τύποι που εκφράζουν την COX-2 είναι τα λεία μυϊκά κύτταρα, τα ενδοθηλιακά, τα επιθηλιακά και οι νευρώνες. Η έκφραση της COX-2 αυξάνεται ταχέως σε φλεγμονώδεις καταστάσεις με τη μεσολάβηση κυτοκινών, μιτογόνων και προσταγλανδινών, ενώ μειώνεται από τη δράση γλυκοκορτικοειδών και αντιφλεγμονωδών κυτοκινών, όπως η IL-4 και η IL-6^(196,199,202). Στον παρακάτω πίνακα αναφέρονται ενδεικτικά οι επαγωγείς της έκφρασης της COX-2 στα ενδοθηλιακά κύτταρα.

Πίνακας 6.1. Επαγωγείς έκφρασης COX-2 στα ενδοθηλιακά κύτταρα

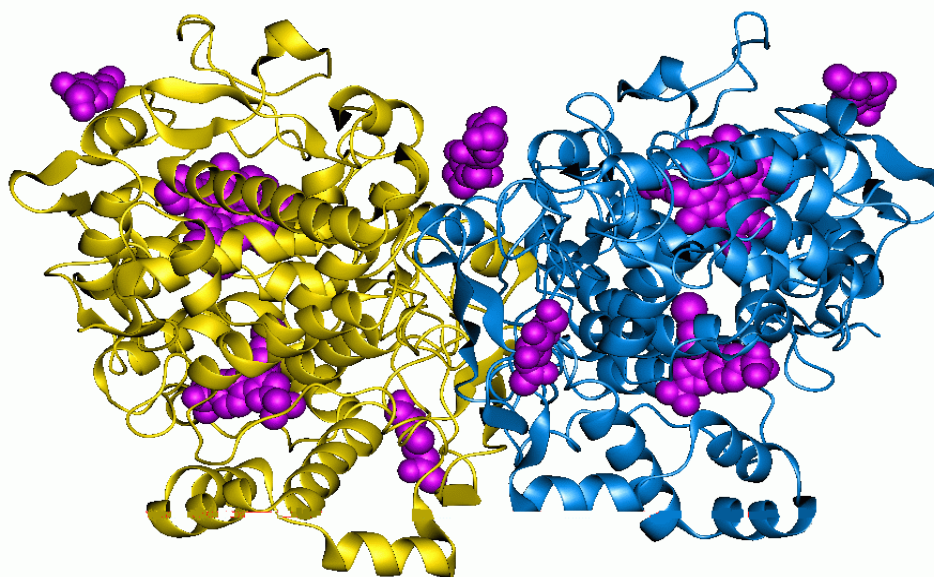
Κυτοκίνες	Αυξητικοί παράγοντες/ επαγωγείς όγκων	Άλλοι επαγωγείς
IL-1 ^α	aFGF	PGE ₂
IL-1β	bFGF	NO
IL-6	Ινσουλίνη	Υποξία
IL-8	IGF	Μηχανικό stress
IL-11	EGF	25-Υδροξυχοληστερόλη
TNFα	PDGF	
LPS	TGFβ	
IFN-γ	VEGF	
	Φορβολεστέρας	

6.2.2. Κυτταρική εντόπιση, δομή και κύριες δράσεις

Η COX-2 ανήκει στην ομάδα των *οξειδοορεδοκτασών* και καταλύει την οξειδωτική κυκλοποίηση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Είναι υδρόφοβο ένζυμο το οποίο αποτελείται από διμερές 604 αμινοξέων, με μία εσωτερική θέση πρόσδεσης υποκαταστάτη, και έχει βάρος 69 kDa^(203,204). Το ένζυμο έχει δύο ενεργά κέντρα. Το ενεργό κέντρο κυκλοοξυγενάσης βρίσκεται βαθιά μέσα στο ένζυμο, και το υπόστρωμα εισέρχεται μέσα από ένα κανάλι το οποίο εκτείνεται εκτός ενζύμου. Όταν πραγματοποιηθεί η πρώτη αντίδραση, το προϊόν μεταφέρεται στο άλλο ενεργό κέντρο (δίπλα σε ένα μόριο αίμης), όπου πραγματοποιείται η αντίδραση υπεροξειδωσης.

Έπειτα το προϊόν απελευθερώνεται στο κυτοσόλιο. Το ενεργό κέντρο του ενζύμου είναι μεγαλύτερο από το αντίστοιχο της COX-1 και μπορεί να δεχτεί υποστρώματα μεγαλύτερου μεγέθους (Εικόνα 6.2.). Το ένζυμο αποτελεί στόχο των μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων, όπως η ασπιρίνη και η ινδομεθακίνη, τα οποία έχουν αναλγητικές, αντιπυρετικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες.^(202,203)

Εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο καθώς και στον πυρηνικό φάκελο των κυττάρων, με μεγαλύτερη συγκέντρωση στον πυρηνικό φάκελο⁽²⁰²⁾. Έχει πλέον εξακριβωθεί ότι η ενεργοποιημένη κυτοσολική φωσφολιπάση A₂ μεταναστεύει στον πυρηνικό φάκελο και το αραχιδονικό οξύ απελευθερώνεται από τα φωσφολιποειδή της πυρηνικής μεμβράνης. Εργαστηριακά δεδομένα δείχνουν ότι μικρές συγκεντρώσεις αραχιδονικού οξέος οξυγονώνονται αποκλειστικά από την COX-2, ενώ αντίθετα υψηλές συγκεντρώσεις απαιτούν τη δράση κυρίως της COX-1. Η συγκέντρωση του αραχιδονικού που απελευθερώνεται είναι συνήθως μικρότερη από 1 μM , επομένως το αραχιδονικό που απελευθερώνεται ενδογενώς χρησιμοποιείται κυρίως από την COX-2^(205,207). Ο μηχανισμός του επιλεκτικού μεταβολισμού του αραχιδονικού από την COX-2 πιθανότατα δεν εξαρτάται μόνο από κινητικές ιδιότητες του ενζύμου, καθώς η τιμή K_m των δύο ισοενζύμων είναι σχεδόν ίδια ⁽²⁰²⁾.



Εικόνα 6.2. Τρισδιάστατη δομή της COX-2

Η COX-2 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε αρκετές παθοφυσιολογικές διεργασίες, όπως η φλεγμονή, η αγγειογένεση, και η ογκογένεση.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η COX-2 καταλύει την παραγωγή προσταγλανδινών και θρομβοξανών, αφού διεγερθεί από ορισμένους επαγωγείς σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους. Οι προσταγλανδίνες παράγονται σε ιστούς παρουσία **φλεγμονής**, με μία εντυπωσιακή αύξηση στα

επίπεδα COX-2, ενώ τα επίπεδα COX-1 παραμένουν σταθερά. Επιπλέον, όταν χορηγούνται ειδικοί αναστολείς της COX-2, η παραγωγή προσταγλανδινών και η συνακόλουθη φλεγμονή υποχωρούν σημαντικά. Τα δεδομένα αυτά έχουν οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι η COX-2 εμπλέκεται σημαντικά στη φλεγμονώδη διεργασία ⁽²⁰⁷⁾. Το γονίδιο της COX-2 είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο σε μεσολαβητές της φλεγμονής. Για παράδειγμα, οι IL-1α, IL-1β, TNFα και LPS επάγουν την έκφραση του γονιδίου της COX-2 και της συνακόλουθης παραγωγής προσταγλανδινών.⁽²⁰²⁾

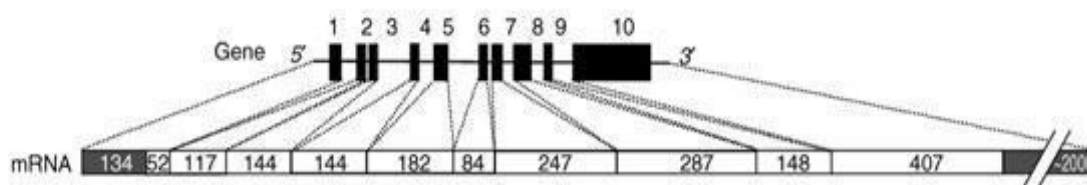
Η COX-2 φαίνεται να εμπλέκεται στην ανάπτυξη κακοήθων νεοπλασμάτων, όπως προκύπτει από αποτελέσματα επιδημιολογικών μελετών. Υπερέκφραση της COX-2 σε καρκινικά κύτταρα προκαλεί τη διαφυγή τους από τη φάση απόπτωσης, και την είσοδό τους στη μεσοκυττάρια ουσία.⁽²⁰⁸⁾ Η συνεισφορά της COX-2 στην *ογκογένεση* μεσολαβείται από τρεις κύριες πορείες: επαγωγή αγγειογενετικών παραγόντων όπως ο VEGF (Vascular endothelial growth factor), παρεμπόδιση απόπτωσης και ανάπτυξη κακοήθειας. In vivo μελέτες σε καρκινικά κύτταρα δείχνουν ότι παράγεται PGE2 μέσω της COX-2, και η παραγόμενη PGE2 επάγει την παραγωγή VEGF, με τελικό αποτέλεσμα τη διέγερση αγγειογένεσης⁽²⁰⁹⁾. Στον παρακάτω πίνακα συνοψίζονται τα χαρακτηριστικά του ενζύμου COX-2:

Πίνακας 6.2. Χαρακτηριστικά της COX-2

Ομάδα	Οξειδοοξειδοκτάσες
Μέγεθος mRNA	Περίπου 4,5kb
Σταθερότητα mRNA	Ασταθές
Αριθμός αμινοξέων	604
Βάρος	69kDa
Ιδιότητα	Επαγωγίμο
Κύτταρα στα οποία εκφράζεται	Μακροφάγα, μονοκύτταρα, ενδοθηλιακά, επιθηλιακά, λεία μυϊκά, νευρώνες, καρκινικά
Κυτταρική εντόπιση	Κυρίως πυρηνική μεμβράνη, ενδοπλασματικό δίκτυο
Υπόστρωμα	Αραχιδονικό οξύ (ενδογενές και εξωγενές)

6.2.3. Το γονίδιο της κυκλοοξυγενάσης-2 (PTGS2)

Το γονίδιο PTGS2 ανακαλύφθηκε το 1991⁽²¹⁰⁾. Έχει μήκος περίπου 8.3 kbp και αποτελείται από 10 εξώνια (Εικόνα 6.3). Οι διαφορές του γονιδίου με αυτό της COX-1 είναι ότι το πρώτο ιντρόνιο στο γονίδιο της COX-1 δεν υπάρχει στο PTGS2, και το ότι τα ιντρόνια του γονιδίου PTGS2 έχουν μικρότερο μήκος από αυτά του γονιδίου της COX-1. Το μεγαλύτερο εξώνιο στο γονίδιο PTGS2 κωδικοποιεί ολόκληρη την 3' αμετάφραστη περιοχή (3'-UTR), η οποία περιέχει 23 αντίγραφα της ακολουθίας 'ATTTA', που αποτελεί στοιχείο αστάθειας του RNA. Ανάλυση της ακολουθίας της 5' πλευρικής περιοχής έχει αποκαλύψει την ύπαρξη ορισμένων στοιχείων που αποτελούν πιθανούς ρυθμιστές της μεταγραφής, συμπεριλαμβανομένου ενός κουτιού TATA, ενός στοιχείου NF-IL6, δύο θέσεων AP-2, τριών θέσεων Sp1, δύο θέσεων NF-κB, ενός στοιχείου CRE και ενός κουτιού E.⁽²¹¹⁾ Ο γενετικός τόπος του γονιδίου εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 1, και είναι ο 1q25.2–q25.3, όπως προκύπτει από δεδομένα του προγράμματος του ανθρώπινου γονιδιώματος.



Εικόνα 6.3. Το γονίδιο PTGS2

Η COX-2 όπως έχει ήδη αναφερθεί διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή των προσταγλανδινών σε παθοφυσιολογικές συνθήκες. Πολυάριθμες μελέτες πάνω στην έκφραση του γονιδίου της COX-2 σε ποικίλους ιστούς και κύτταρα έχουν ανακαλύψει αρκετούς παράγοντες που διεγείρουν την έκφρασή του⁽²¹²⁻²¹⁴⁾. Το γονίδιο PTGS2 εκφράζεται ως απάντηση σε προφλεγμονώδεις παράγοντες (Πίνακας 6.3), και σχετίζεται με αρκετές ασθένειες. Η ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου περιλαμβάνει κάποια μονοπάτια – σηματοδότες, που αφορούν τα στοιχεία του υποκινητή που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Τρία μονοπάτια που σχετίζονται με τις πρωτεϊνικές κινάσες που ενεργοποιούνται από μιτογόνα (MAPK-mitogen activated protein kinases) συμβάλλουν στην επαγωγή του γονιδίου, δρώντας συνολικά ή ανεξάρτητα.⁽²¹⁵⁾

Η οικογένεια MAPK αποτελείται από τουλάχιστον τρεις υποομάδες που συμπεριλαμβάνουν τις ERKs (extracellular signal regulated kinases), JNKs/SAPKs (c Jun amino terminal kinases/stress activated protein kinases) και p38 MAPK. Τα μονοπάτια των JNK/SAPK και p38 MAPK μοιράζονται κοινούς ενεργοποιητές: φλεγμονώδεις κυτοκίνες, βακτηριακές ενδοτοξίνες και

περιβαλλοντικό stress, όπως ακτινοβολία, υπεροσμωτικότητα, θερμικό σοκ και οξειδωτικό stress^(216,217), ενώ το μονοπάτι των ERKs ενεργοποιείται κυρίως από αυξητικούς παράγοντες και ογκογονίδια (v-Src, v-Ras). Οι MAPKs όταν ενεργοποιηθούν μπορούν να φωσφορυλιώσουν και να ενεργοποιήσουν μεταγραφικούς παράγοντες που ρυθμίζουν την έκφραση του γονιδίου.⁽²¹⁷⁾ Η IL-1β αποτελεί γνωστή κυτοκίνη που ενεργοποιεί το μονοπάτι των JNK/SAPK και p38 MAPK⁽²¹⁸⁾. Το γονίδιο PTGS2 αποτελεί σημαντικό στόχο του ογκογονιδίου Ras⁽²¹⁹⁾. Μεταλλάξεις του ογκογονιδίου Ras ανευρίσκονται σε αρκετά είδη καρκίνου, με σύγχρονη υπερέκφραση του γονιδίου της COX-2, όπως το ορθοκολικό καρκίνωμα και ο καρκίνος του στήθους⁽²²⁰⁾. Η επαγωγή ενός ενεργού γονιδίου Ras αυξάνει τη μεταγραφή του γονιδίου της COX-2 και αυξάνει το χρόνο ημιζωής του παραγόμενου mRNA. Η έκφραση της COX-2 επάγεται επίσης από μιτογόνα όπως ο αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας (PDGF)⁽²²¹⁾.

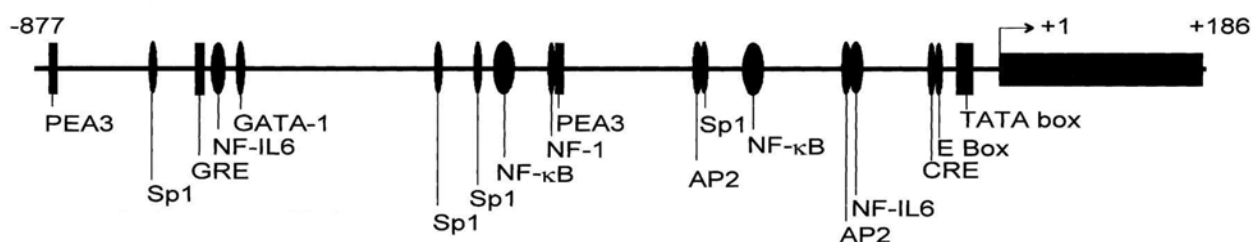
Πίνακας 6.3. Επαγωγείς του γονιδίου PTGS2

Επαγωγείς	Κυτταρικός τύπος
LPS	Μακροφάγα, αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα, κύτταρα νευρογλοίας
EGF	Ινοβλάστες, επιθηλιακά κύτταρα, οστεοβλάστες, αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα
FGF	Αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα, οστεοκύτταρα
PDGF	Ινοβλάστες, αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα
v-Ras	Ινοβλάστες, επιθηλιακά κύτταρα
v-Src	Ινοβλάστες, επιθηλιακά κύτταρα
TGFα,β	Οστεοβλάστες, εντερικά επιθηλιακά κύτταρα
TNFα,β	Αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα, περιτοναϊκά επιθηλιακά κύτταρα
IL-1α,β	Ινοβλάστες, επιθηλιακά κύτταρα, αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα, χονδροκύτταρα, οστεοβλάστες, κύτταρα νησιδίων παγκρέατος
TPA	Ινοβλάστες, μονοκύτταρα, μακροφάγα, επιθηλιακά, λεία μυϊκά κύτταρα, ενδοθηλιακά, ηπατοκύτταρα, κερατινοκύτταρα
LH, FSH	Κοκκιώδη κύτταρα ωοθηκών

6.2.4. Ρυθμιστικά στοιχεία του υποκινητή

Στην 5' πλευρική περιοχή υπάρχουν αρκετά στοιχεία που ρυθμίζουν την μεταγραφή του γονιδίου PTGS2. Τα στοιχεία αυτά σηματοδοτούν τη θέση έναρξης της μεταγραφής και

ελέγχουν την ποσότητα του παραγόμενου mRNA.(Εικόνα 6.4.)⁽²²²⁾ Παρακάτω αναφέρονται κάποια από τα ρυθμιστικά στοιχεία του υποκινητή της COX-2.



Εικόνα 6.4. Ο υποκινητής του γονιδίου PTGS2

A. Κουτί TATA

Αποτελεί μία εξελικτικά συντηρημένη αλληλουχία η οποία βρίσκεται 25-30 bp πριν τη θέση έναρξης της μεταγραφής, από την οποία φαίνεται ότι εξαρτάται η ακριβής εντόπιση της έναρξης. Είναι το σημείο πρόσδεσης είτε μεταγραφικών παραγόντων είτε ιστονών και εμπλέκεται στην διαδικασία της μεταγραφής από την RNA πολυμεράση. Στο κουτί TATA συνδέεται συνήθως η πρωτεΐνη TBP (TATA Binding Protein) καθώς και μεταγραφικοί παράγοντες, δημιουργώντας ένα σύμπλοκο αναγνώρισης και πρόσδεσης της RNA πολυμεράσης.⁽²²²⁾

B. Στοιχείο CRE (cAMP Response Element)

Το στοιχείο CRE έχει αναγνωρισθεί ως ένα από τα κυριότερα ρυθμιστικά στοιχεία του υποκινητή του γονιδίου της COX-2. Φαίνεται ότι ποικιλία πρωτεϊνών, καθώς και η πρωτεΐνη CREB (cAMP response element binding protein) μπορούν να προσδεθούν στο στοιχείο αυτό και να επάγουν την έκφραση του γονιδίου, ενώ άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες συνδεόμενοι στο CRE μπορούν να την αναστείλουν.^(221,223)

Γ. Κουτί E

Το κουτί E αποτελεί μια συγκεκριμένη αλληλουχία βάσεων που εμπλέκεται στη ρύθμιση της μεταγραφής. Οι πρωτεΐνες ρύθμισης της μεταγραφής USF-1 (Upstream Stimulatory Factors) προσδένονται στο κουτί E στο γονίδιο της COX-2 σε ποντίκια, διαδικασία απαραίτητη για την βασική ενεργοποίηση του γονιδίου.⁽²²⁴⁾ Το κουτί E επικαλύπτεται με το στοιχείο CRE στον υποκινητή του γονιδίου PTGS2.⁽²²¹⁾ Πυρηνικές πρωτεΐνες προσδένονται τόσο στο στοιχείο CRE όσο και στο κουτί E, τα οποία δρουν συνεργιστικά με άλλα στοιχεία του υποκινητή για να επάγουν τη μεταγραφή του γονιδίου.⁽²²⁵⁾

Δ. Στοιχείο NF-IL6 (Nuclear Factor – IL-6)

Η έκφραση της COX-2 απαιτεί την ύπαρξη τουλάχιστον ενός στοιχείου NF-IL6⁽²²⁶⁾. Η ενεργοποίηση του στοιχείου NF-IL6 σχετίζεται συχνότερα με μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας πρωτεϊνών C/EBP (CAAT Enhancer Binding Proteins), οι οποίες έχουν τη δυνατότητα είτε επαγωγής είτε μείωσης της έκφρασης του γονιδίου⁽²²¹⁾. Κάποιες πρωτεΐνες της οικογένειας σχετίζονται με τη ρύθμιση της φλεγμονώδους απόκρισης και ενεργοποιούνται από την πλειοψηφία των φλεγμονωδών ερεθισμάτων που ρυθμίζουν την έκφραση του γονιδίου PTGS2. Οι δράσεις των C/EBP μεταγραφικών παραγόντων ρυθμίζονται από τα επίπεδα των πρωτεϊνών καθώς και από τη φωσφορυλίωση συγκεκριμένων καταλοίπων σερίνης και τυροσίνης⁽²²⁷⁾.

Ε. Θέση πρόσδεσης AP-2 (Activator protein 2 binding site)

Οι μεταγραφικοί παράγοντες AP-2 εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης, της απόπτωσης και της καρκινογένεσης. Το στοιχείο AP-2 έχει βρεθεί σε γονίδια των οποίων η έκφραση ελέγχεται από το cAMP, και έχει τη δυνατότητα πρόσδεσης των AP-2 μεταγραφικών παραγόντων. Μελέτες έχουν δείξει ότι συμμετέχει τόσο στη βασική όσο και στην επαγόμενη από το cAMP ενεργοποίηση της μεταγραφής.^(228,229)

ΣΤ. Στοιχείο NF-κB (Nuclear Factor kappa B)

Οι NF-κB αποτελούν μία ομάδα επαγωγίμων μεταγραφικών παραγόντων που δρουν ως σημαντικοί ρυθμιστές της φλεγμονώδους απάντησης και ανοσοαντίδρασης. Πολλές μελέτες του γονιδίου PTGS2 εμπλέκουν τους NF-κB στη σηματοδότηση της μεταγραφής του, μέσω ενεργοποίησής τους από ποικιλία ερεθισμάτων.⁽²³⁰⁻²³²⁾

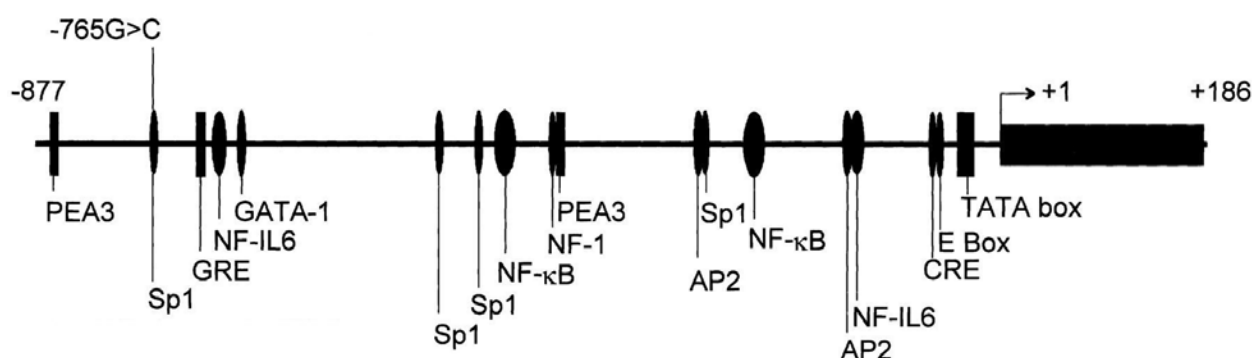
Η. Θέση πρόσδεσης Sp1 (Stimulatory protein 1)

Ο Sp1 αποτελεί μεταγραφικό παράγοντα ο οποίος έχει την ιδιότητα να προσδένεται σε περιοχές του DNA πλούσιες σε κατάλοιπα G και C. Η πρόσδεσή του στον υποκινητή απαιτείται για την ενεργοποίηση της μεταγραφής πολλών γονιδίων, και φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης κυτοκινών σε συνδυασμό με τους μεταγραφικούς παράγοντες της ομάδας NF-κB⁽²³³⁻²³⁵⁾. Η ύπαρξη θέσης πρόσδεσης του Sp1 στους υποκινητές γονιδίων έχει συσχετιστεί σε μελέτες με την παθοφυσιολογία των καρδιαγγειακών νοσημάτων⁽²³⁶⁻²³⁸⁾ και του καρκίνου^(239,240), αλλά απαιτείται περαιτέρω έρευνα πάνω στο πεδίο αυτό.

Η οικογένεια Sp συμπεριλαμβάνει τους Sp1, Sp2, Sp3, και Sp4 μεταγραφικούς παράγοντες. Και τα τέσσερα μέλη περιέχουν αμινοξέα τα οποία 'διπλώνονται' σε μία δομική μονάδα γύρω από

ένα άτομο ψευδαργύρου, το οποίο συνδέεται με δύο κυστεΐνες και δύο ιστιδίνες (δακτύλιος ψευδαργύρου). Κάθε δακτύλιος απαιτείται για την αναγνώριση μίας συγκεκριμένης αλληλουχίας περίπου 5 ζευγών βάσεων. Στους περισσότερους υποκινητές, οι Sp1 και Sp3 μεταγραφικοί παράγοντες αναγνωρίζουν το στοιχείο πρόσδεσης Sp1 με συγκρίσιμη συγγένεια και εξειδίκευση, συμβάλλοντας παρόλα αυτά με διαφορετικό τρόπο στη δραστηριότητα του υποκινητή.^(233,234)

6.3. Ο πολυμορφισμός $-765G \rightarrow C$ του γονιδίου *PTGS2*: Προστατευτικές επιδράσεις ενάντια στη φλεγμονή, την αθηροσκλήρυνση και τη στεφανιαία νόσο



Εικόνα 6.5. Ο πολυμορφισμός $-765G \rightarrow C$ στον υποκινητή του γονιδίου *PTGS2*

Γενετικοί πολυμορφισμοί του γονιδίου *PTGS2* θεωρείται ότι έχουν επίδραση στην έκφραση της COX-2 και στη βιοσύνθεση προσταγλανδινών. Αρκετοί πολυμορφισμοί έχουν βρεθεί στο γονίδιο *PTGS2* αλλά η επίδρασή τους στην έκφραση του ενζύμου, καθώς και στην παθοφυσιολογία ασθενειών παραμένουν υπό διερεύνηση.⁽²⁴¹⁾

Πρόσφατα, η Papafili et al.⁽²⁴⁰⁾ περιέγραψαν τον πολυμορφισμό $-765G \rightarrow C$ στην πλευρική 5' περιοχή, ο οποίος πιστεύεται ότι αλλάζει την ικανότητα πρόσδεσης της πρωτεΐνης Sp1, αλλά ίσως και την πρόσδεση άλλων μεταγραφικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένης της πρωτεΐνης Sp3. Φαίνεται ότι η παρουσία του πολυμορφισμού σχετίζεται με μειωμένη δραστηριότητα του υποκινητή *in vitro* και με μειωμένα επίπεδα C-αντιδρώσας πρωτεΐνης, σε ασθενείς με κλινική και υποκλινική αθηροσκλήρυνση. Ο μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός έχει επίσης συσχετιστεί με μείωση του κινδύνου ανάπτυξης κλινικών καρδιαγγειακών επεισοδίων (Cipollone et al.)⁽²⁴¹⁾.

Οι Orbe et al.⁽²⁴²⁾ σε πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η εξαρτώμενη από την COX-2 απελευθέρωση PGE₂ στα μονοκύτταρα, σχετίζεται με υποκλινική αθηροσκλήρυνση σε φαινομενικά υγιή άτομα που εκτίθενται σε καρδιαγγειακούς παράγοντες κινδύνου. Όπως έχει

ήδη αναφερθεί, η σύνθεση PGE₂ ευνοεί την απελευθέρωση μεταλλοπρωτεϊνών (MMP-2, MMP-9) που πιθανά εμπλέκονται στην αύξηση της αθηροσκληρωτικής πλάκας καθώς και στη ρήξη της.⁽²⁴³⁾ Οι ίδιοι ερευνητές, σε μελέτη του πολυμορφισμού -765G→C πάνω σε υπερχοληστερολαιμικούς ασθενείς, έδειξαν ότι η παρουσία του C αλληλίου σχετίζεται με μικρότερη πάχυνση του καρωτιδικού έσω χιτώνα καθώς και με χαμηλότερα επίπεδα CRP, IL-6 και vWF (von Willebrand factor)¹, προτείνοντας ότι η παρουσία του πολυμορφισμού αποτελεί προστατευτικό παράγοντα έναντι της φλεγμονής και της ανάπτυξης αθηροσκληρωτικής πλάκας.⁽²⁴³⁾

Καθώς η χαμηλότερη δραστηριότητα της COX-2 μπορεί να οδηγήσει σε μείωση των επιπέδων CRP και της παραγωγής μεταλλοπρωτεϊνών, οι ερευνητές Cipollone et al. υπέθεσαν ότι ο πολυμορφισμός -765G→C αποτελεί προστατευτικό παράγοντα ενάντια στην αστάθεια της αθηροσκληρωτικής πλάκας, οδηγώντας έτσι σε χαμηλότερο κίνδυνο οξέος εμφράγματος και εγκεφαλικού επεισοδίου.⁽²⁴¹⁾

Οι ερευνητές πραγματοποίησαν προοπτική έρευνα ασθενών – μαρτύρων (864 άτομα με ιστορικό εμφράγματος ή εγκεφαλικού επεισοδίου και 864 ως δείγμα ελέγχου), η οποία επιβεβαίωσε τις υποθέσεις τους, καθώς φάνηκε ότι τα άτομα με τον -765CC γονότυπο είχαν τον μικρότερο κίνδυνο εμφράγματος και εγκεφαλικού επεισοδίου, και επίσης τα μικρότερα επίπεδα έκφρασης και δραστηριότητας της COX-2 στην αθηροσκληρωτική πλάκα, στα μακροφάγα της πλάκας και στα μονοκύτταρα της κυκλοφορίας. Επιπλέον, η παρουσία τουλάχιστον ενός C αλληλίου συσχετίστηκε με μία σημαντική μείωση των επιπέδων CRP στον ορό, δείχνοντας ότι ο πολυμορφισμός επηρεάζει την φλεγμονώδη κατάσταση του οργανισμού. Διαφορές στην σοβαρότητα των αθηροσκληρωτικών αλλοιώσεων δεν βρέθηκαν μεταξύ των τριών γονότυπων, γεγονός που δείχνει ότι η COX-2 δεν εμπλέκεται τόσο στην ανάπτυξη της αθηροσκληρωτικής πλάκας, αλλά στην αστάθειά της.⁽²⁴¹⁾ Το εύρημα αυτό έρχεται σε συμφωνία με άλλες μελέτες των ίδιων ερευνητών που εξέτασαν την υπόθεση αυτή.^(244,245)

Οι ερευνητές παρατήρησαν επίσης ότι ο πολυμορφισμός -765G→C δεν σχετίζεται με την ενδοθηλιακή απελευθέρωση προστακυκλίνης, υποδεικνύοντας ότι ο μεταγραφικός παράγοντας Sp1 έχει διαφορετική επίδραση στην επαγωγή της έκφρασης COX-2 στα ενδοθηλιακά και επιθηλιακά κύτταρα σε σύγκριση με τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα.⁽²⁴²⁾ Καθώς η προστακυκλίνη αποτελεί αντιαθηρογόνο μεσολαβητή, το γεγονός ότι η παραγωγή της δεν

¹ Von Willebrand factor: Γλυκοπρωτεΐνη αίματος που εμπλέκεται στην πήξη. Παράγεται στο ενδοθήλιο, στα μεγακαρυοκύτταρα και στον υπενδοθηλιακό συνδετικό ιστό. Εμπλέκεται σε ποικιλία ασθενειών, όπως η θρομβωτική θρομβοκυτοπενική πορφύρα, το σύνδρομο Heyde's και το αιμολυτικό-ουραιμικό σύνδρομο.

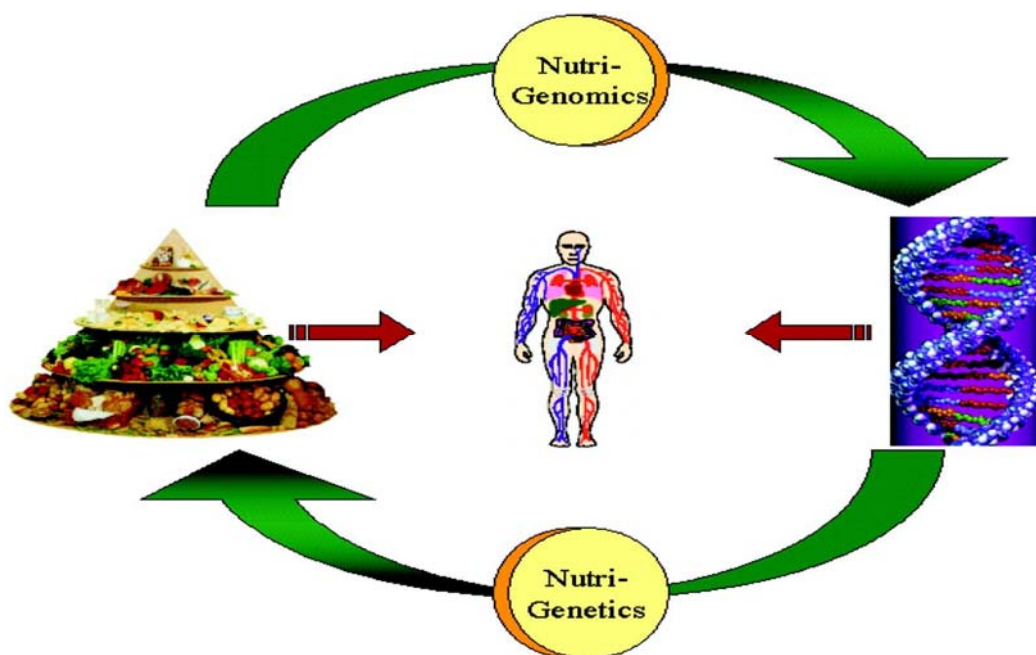
εμποδίζεται από τον πολυμορφισμό -765G→C αποτελεί επιπλέον απόδειξη του προστατευτικού του ρόλου, σε αντίθεση με τους αποκλειστές της COX-2, οι οποίοι παρεμποδίζουν και την ενδοθηλιακή δράση του ενζύμου. ^(246,247)

Αντίθετα με τα παραπάνω ευρήματα, έρευνα των Morgan et al.⁽²⁴⁸⁾, μελέτησε 85 πολυμορφισμούς σε 70 γονίδια και δεν επιβεβαίωσε τη συσχέτιση πολυμορφισμών με την εμφάνιση οξέων στεφανιαίων συνδρόμων. Το εύρημα αυτό έρχεται σε ασυμφωνία με πλήθος μελετών, και αντικατοπτρίζει την ανάγκη διεξαγωγής περισσότερων και προσεκτικά σχεδιασμένων ερευνών, έτσι ώστε να ξεκαθαριστεί η επίδραση των πολυμορφισμών στην ανάπτυξη στεφανιαίας νόσου και οξέων στεφανιαίων συνδρόμων.

7. Αλληλεπιδράσεις γονιδίων – θρεπτικών συστατικών

7.1. *Nutritigenomics* – *Nutrigenetics*

Η ενσωμάτωση του όρου ‘genomics’ (δράσεις – αλληλεπιδράσεις μεταξύ γονιδίων, καθώς και αλληλεπιδράσεις γονιδίων με περιβαλλοντικούς παράγοντες) στις επιστήμες της διατροφής έριξε φως στην πολυπλοκότητα της γονιδιακής αντίδρασης στην έκθεση σε θρεπτικά συστατικά, ενώ συγχρόνως δίνει τη δυνατότητα πραγματοποίησης αποδοτικότερων διατροφικών παρεμβάσεων σε ατομικό και συλλογικό επίπεδο.⁽²⁴⁹⁾ Τα θρεπτικά συστατικά προκαλούν την εκδήλωση φυσιολογικών αποκρίσεων που επηρεάζουν τη σταθερότητα των γονιδίων καθώς και την έκφρασή τους. Αυτές οι επιδράσεις επιφέρουν είτε ωφέλη στην υγεία είτε κινδύνους, με το αποτέλεσμα πολλές φορές να εμφανίζεται αργότερα στη ζωή.⁽²⁵⁰⁾ Από την άλλη, το σύνολο των γονιδίων των ατόμων προκαλεί διαφορετική απόκριση στα θρεπτικά συστατικά.⁽²⁵¹⁾ Οι αλληλεπιδράσεις γονιδίων – θρεπτικών συστατικών, που εκφράζονται με τους όρους *nutrigenomics* και *nutrigenetics*, αναφέρονται στις αμοιβαίες και περίπλοκες αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στο ανθρώπινο γονιδίωμα και στα διαιτητικά συστατικά, και στο ρόλο τους στη φυσιολογία και παθοφυσιολογία.⁽²⁵²⁾ Η κατανόηση αυτών των αλληλεπιδράσεων μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία διαιτητικών συστάσεων με υψηλή προγνωστική αξία, να μειώσει τον κίνδυνο ανεπιθύμητων αποτελεσμάτων και να ερμηνεύσει τις σύνθετες επιδράσεις της γενετικής ποικιλομορφίας.⁽²⁵⁰⁾



Εικόνα 7.1. Αλληλεπιδράσεις γονιδίων – θρεπτικών συστατικών

Από : David M. Mutch et al, Nutrigenomics and nutrigenetics: the emerging faces of nutrition.

Η μελέτη της αλληλεπίδρασης γονιδίων – θρεπτικών συστατικών στην παθογένεια πολυπαραγοντικών νοσημάτων επεκτείνεται τα τελευταία χρόνια, αλλά έως τώρα, η ταχύτερη ανάπτυξη εντοπίζεται στο πεδίο των ασθενειών του καρδιαγγειακού συστήματος. Το γεγονός αυτό πιθανά οφείλεται στην εύκολη ποσοτικοποίηση και μέτρηση του καρδιαγγειακού κινδύνου.^(253,254)

Οι περισσότερες μελέτες έχουν διερευνήσει το μηχανισμό με τον οποίο τα διαιτητικά λιπίδια ρυθμίζουν τα επίπεδα λιπιδίων νηστείας ή μεταγευματικά, καθώς και αρκετά γονίδια που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών (απολιποπρωτεΐνες A-I, A-IV, B, C-III και E, λιποπρωτεϊνική λιπάση, ηπατική λιπάση, κ.ά.).⁽²⁵⁵⁻²⁵⁸⁾ Οι μελέτες αυτές ανοίξει το δρόμο της έρευνας στον τομέα των αλληλεπιδράσεων γονιδίων - θρεπτικών συστατικών στα καρδιαγγειακά νοσήματα, αλλά ακόμα δεν έχουμε τη δυνατότητα μετάφρασης αυτής της γνώσης σε πληροφορία με σημασία για την κλινική πρακτική και τη δημόσια υγεία.⁽²⁵⁴⁾

7.2. Αλληλεπίδραση μεταξύ πολυμορφισμών στο γονίδιο PTGS2 και θρεπτικών συστατικών

Η αλληλεπίδραση μεταξύ πολυμορφισμών στο γονίδιο PTGS2 και θρεπτικών συστατικών βρίσκεται ακόμα σε πρωταρχικό στάδιο. Όσον αφορά την επιρροή των αλληλεπιδράσεων αυτών στην εμφάνιση στεφανιαίας νόσου, δεν έχουν πραγματοποιηθεί σχετικές μελέτες μέχρι τώρα.

Τρεις γνωστές έρευνες υπάρχουν μέχρι στιγμής, που μελέτησαν την αλληλεπίδραση μεταξύ θρεπτικών συστατικών και πολυμορφισμών στο γονίδιο PTGS2. Η Christine Siezen et al.⁽²⁵⁹⁾ πραγματοποίησε μία αναδρομική μελέτη ασθενών – μαρτύρων στην Ολλανδία μεταξύ 1997 και 2001, συμπεριλαμβάνοντας συνολικά 925 ενήλικες. Οι ερευνητές μελέτησαν την υπόθεση εάν πολυμορφισμοί στο γονίδιο COX-2, μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με την πρόσληψη ψαριών σχετίζονται με τον κίνδυνο ανάπτυξης ορθοκολικού αδενώματος. Ο πολυμορφισμός c.-1329A→G, ο οποίος εντοπίζεται στον υποκινητή του γονιδίου, σε συνδυασμό με υψηλή πρόσληψη ψαριών, φάνηκε να σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο αδενώματος, σε σύγκριση με το γονότυπο AA σε συνδυασμό με χαμηλή πρόσληψη ψαριών. Η κατανάλωση ψαριών φάνηκε επίσης να ενισχύει τον προστατευτικό ρόλο του πολυμορφισμού V102V. Μία στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση παρατηρήθηκε επίσης μεταξύ της πρόσληψης ψαριών και του πολυμορφισμού c.2242T→C, ο οποίος εντοπίζεται στην 3' - αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου, με τον γονότυπο TT να εμφανίζει αρνητική συσχέτιση με την εμφάνιση ορθοκολικού αδενώματος, σε συνδυασμό με υψηλή πρόσληψη ψαριών.

Πρόσφατα, οι Maria Hedelin et al.⁽²⁶⁰⁾ μελέτησαν την αλληλεπίδραση μεταξύ πολυμορφισμών στο γονίδιο της COX-2 και κατανάλωσης ψαριών στην εμφάνιση καρκίνου του προστάτη, σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στη Σουηδία μεταξύ 1.378 ασθενών και 782 μαρτύρων. Τα αποτελέσματα έδειξαν μία στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του πολυμορφισμού rs5275: +6365 T/C και της κατανάλωσης ψαριών τύπου σολωμού, η οποία παρουσιάζει ισχυρή αρνητική συσχέτιση με την εμφάνιση καρκίνου του προστάτη. Μεταξύ των άλλων πολυμορφισμών που μελετήθηκαν, δεν προέκυψε κάποια συσχέτιση.

Οι δύο παραπάνω έρευνες δεν συμπεριέλαβαν τη μελέτη του πολυμορφισμού -765G→C. Η μοναδική μελέτη έως τώρα που έχει μελετήσει την αλληλεπίδραση μεταξύ του παραπάνω πολυμορφισμού και της πρόσληψης θρεπτικών συστατικών είναι η μελέτη των Koh et al.⁽²⁶¹⁾ (Singapore Chinese Health Study). Οι ερευνητές μελέτησαν 1177 μάρτυρες και 310 ασθενείς με ορθοκολικό καρκίνο (από συνολικά 63.257 άτομα που συμμετείχαν στη μελέτη), με σκοπό να διερευνήσουν την ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ της αλληλεπίδρασης του πολυμορφισμού -765G→C και της πρόσληψης ω-6 λιπαρών οξέων, με τον κίνδυνο ανάπτυξης ορθοκολικού καρκίνου. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν μία στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου στο κόλον και του πολυμορφισμού -765G→C σε συνδυασμό με υψηλή πρόσληψη ω-6 λιπαρών οξέων (odds ratio = 2,38, p=0,07).

Είναι προφανές, ότι η έρευνα της αλληλεπίδρασης του πολυμορφισμού -765G→C με θρεπτικά συστατικά βρίσκεται ακόμα σε πρωταρχικό στάδιο. Απαιτείται λοιπόν η διεξαγωγή προσεκτικά σχεδιασμένων μελετών ώστε να εξακριβωθεί ο ρόλος τυχόν αλληλεπιδράσεων στην παθογένεση χρονίων νοσημάτων, έτσι ώστε να είναι δυνατή η εφαρμογή των ευρημάτων στην αντιμετώπιση των νοσημάτων αυτών, καθώς και σε στρατηγικές προληπτικής ιατρικής και δημόσιας υγείας.

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

8. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της μελέτης είναι η διερεύνηση της επίδρασης της μεσογειακής διατροφής στην εμφάνιση οξέος στεφανιαίου συνδρόμου. Επίσης, η εξέταση της συμβολής του πολυμορφισμού $-765G \rightarrow C$ στο γονίδιο της COX-2, καθώς και η αλληλεπίδραση μεταξύ αυτού και του μεσογειακού διατροφικού προτύπου. Παράλληλα, εξετάζεται η επίδραση των κλασσικών παραγόντων κινδύνου.

9. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

9.1. Δείγμα Μελέτης

Το δείγμα αποτελούν δύο ομάδες ασθενών και η ομάδα ελέγχου. Τα χαρακτηριστικά των ομάδων φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 9.1. Χαρακτηριστικά δείγματος

1η ΟΜΑΔΑ	
Γενικά χαρακτηριστικά	Ασθενείς με Στεφανιαία Νόσο που δεν έχουν υποστεί στο παρελθόν έμφραγμα μυοκαρδίου
Κριτήριο επιλογής	• Στένωση $\geq 50\%$ σε ένα ή περισσότερα στεφανιαία αγγεία που προσδιορίζεται με στεφανιογραφικό έλεγχο • 1^η διάγνωση εντός του τελευταίου μήνα
2η ΟΜΑΔΑ	
Γενικά χαρακτηριστικά	Ασθενείς που έχουν υποστεί έμφραγμα μυοκαρδίου ή ασταθή στηθάγχη ως πρώτη εκδήλωση στεφανιαίας νόσου
Κριτήριο επιλογής	• 1^ο επεισόδιο εντός του τελευταίου μήνα
ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ	
Γενικά χαρακτηριστικά	Υγιή άτομα αντίστοιχου φύλου και ηλικιακής ομάδας
Κριτήριο επιλογής	• στένωση των στεφανιαίων αγγείων $\leq 30\%$ μετά από στεφανιογραφικό έλεγχο ή αρνητική δοκιμασία κόπωσης • Κατανομή φύλου και ηλικιών αντίστοιχη με των ασθενών της μελέτης

Στην παρούσα μελέτη το δείγμα που εξετάστηκε αφορούσε την ομάδα των ασθενών με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο (ασταθής στηθάγχη ή οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου) και την ομάδα ελέγχου.

Ο χρονικός περιορισμός σε σχέση με τη διάγνωση της νόσου και την επίπτωση του εμφράγματος καθιστά δυνατή την αξιολόγηση των συνηθειών του τρόπου ζωής πριν από την αλλαγή που πιθανά προκύπτει όταν η νόσος καθίσταται γνωστή.

Η συλλογή του δείγματος γίνεται από τα παρακάτω νοσηλευτικά ιδρύματα:

- Ωνάσειο Καρδιοχειρουργικό Κέντρο
- ΓΝΑ Αλεξάνδρα
- ΓΝΑ Σωτηρία

Όλοι οι ασθενείς αφού ενημερωθούν για τους σκοπούς της μελέτης δίνουν ενυπόγραφη συγκατάθεσή για τη συμμετοχή τους.

9.2. Συλλογή Δεδομένων

- ο **Ιατρικό ιστορικό:** λαμβάνεται από τους συμμετέχοντες αναλυτικό ιατρικό ιστορικό και γίνεται αναλυτική καταγραφή της φαρμακευτικής αγωγής πριν και κατά τη διάρκεια της νοσηλείας, καθώς και το πόρισμα της στεφανιογραφίας εφόσον είναι διαθέσιμο.
- ο **Οικογενειακό ιστορικό:** λαμβάνεται αναλυτικό οικογενειακό ιστορικό για την στεφανιαία νόσο αλλά και για όλους τους παράγοντες κινδύνου.
- ο **Εργαστηριακές αναλύσεις:** περιλαμβάνουν πλήρη εξέταση αίματος καθώς και εκτίμηση βιοχημικών δεικτών (γλυκόζη, ολική χοληστερόλη, LDL χοληστερόλη, HDL χοληστερόλη, τριγλυκερίδια, ουρία, ουρικό οξύ, χρόνων πήξης, ενζύμων). Οι αναλύσεις γίνονται από τα συνεργαζόμενα νοσοκομεία. Για την ομάδα των εμφραγματιών ζητούνται από τους ασθενείς εξετάσεις που πραγματοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια του τελευταίου έτους, εφόσον είναι διαθέσιμες.
- ο **Δημογραφικά στοιχεία:** ερωτηματολόγιο που αφορά σε δημογραφικούς παράγοντες (καταγωγή, ημερομηνία γέννησης, επίπεδο εκπαίδευσης, κάπνισμα, ετήσιο οικογενειακό εισόδημα) συμπληρώνεται από όλους τους συμμετέχοντες
- ο **Φυσική δραστηριότητα:** Σταθμισμένο ερωτηματολόγιο χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της φυσικής δραστηριότητας. Αξιολογείται η δραστηριότητα στην εργασία, στο σπίτι και στον ελεύθερο χρόνο.
- ο **Στρες:** το ερωτηματολόγιο STAI-Gr.X-1 χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση των επιπέδων άγχους.

ο Ανθρωπομετρικά δεδομένα:

-Βάρος: μετράται πρωί με ελαφρά ρούχα με τη χρήση ζυγού ακριβείας.

-Ύψος: μετράται με τη χρήση ορθογώνιου τριγώνου και μεζούρας που τοποθετείται στον τοίχο. Η μέτρηση γίνεται χωρίς παπούτσια, κατά την εκπνοή, με το κεφάλι να κοιτά ευθεία μπροστά.

-Περιφέρεια μέσης: μετράται κατά την εκπνοή στο μέσο της απόστασης μεταξύ υπερλαγονίας ακρολοφίας και τελευταίας πλευράς.

-Περιφέρεια γλουτών: μετράται στο σημείο των γλουτών με την μεγαλύτερη περιφέρεια.

ο **Διατροφική αξιολόγηση**: Η εκτίμηση της διατροφικής πρόσληψης γίνεται με τη χρήση Ερωτηματολογίου Συχνότητας Κατανάλωσης Τροφίμων, το οποίο συντάχθηκε για τους σκοπούς της παρούσας μελέτης σύμφωνα με αντίστοιχα ερωτηματολόγια που υπάρχουν στη διεθνή βιβλιογραφία. Συγκεκριμένα, αξιολογείται η συχνότητα και η ποσότητα κατανάλωσης 172 τροφίμων και ποτών κατά τη διάρκεια του τελευταίου έτους.

Για τις παρούσες αναλύσεις τα διαγνωστικά κριτήρια ήταν :

- ο Υπερχοληστερολαιμία: Ολική χοληστερόλη >200 mg/dl ή/και LDL χοληστερόλη >130mg/dl ή/και χορήγηση υπολιπιδαιμικής αγωγής
- ο Υπέρταση: Συστολική αρτηριακή πίεση>14mmHg ή/και διαστολική αρτηριακή πίεση >9 mmHg ή/και χορήγηση αντιυπερτασικής αγωγής
- ο Σακχαρώδης διαβήτης: Γλυκόζη νηστείας>126mg/dl ή/και σάκχαρο αίματος>200mg/dl, 2 ώρες μετά από χορήγηση 75gr γλυκόζης ή/και χορήγηση αντιδιαβητικής αγωγής.

9.3. Αποτίμηση Μεσογειακού Σκορ

Η μέθοδος αποτίμησης της συμμόρφωσης των συμμετεχόντων στο πρότυπο της Μεσογειακής Διατροφής το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην έρευνα είναι το **‘Σκορ Μεσογειακής Διατροφής’**, το οποίο αναπτύχθηκε από τους Panagiotakos et al.⁽¹⁹⁴⁾ και χρησιμοποιήθηκε κατά τη διεξαγωγή της έρευνας ΑΤΤΙΚΗ.

Σύμφωνα με τις Μεσογειακές διαιτητικές συνήθειες, το σκορ συμπεριλαμβάνει την εβδομαδιαία κατανάλωση των ακόλουθων 9 ομάδων τροφίμων : μη επεξεργασμένα δημητριακά (ολικής αλέσεως ψωμί και ζυμαρικά, καστανό ρύζι, κτλ), φρούτα, λαχανικά, όσπρια, πατάτες, ψάρια, κρέας και προϊόντα κρέατος, πουλερικά, πλήρη γαλακτοκομικά προϊόντα (τυρί, γιαούρτι, γάλα), καθώς και ελαιόλαδο και αλκοόλ. Έπειτα, με βάση την προτεινόμενη πρόσληψη

χρησιμοποιήθηκαν από τους ερευνητές μονοτονικές συναρτήσεις (εκτός από το αλκοόλ) έτσι ώστε να μπορεί να αξιολογηθεί η συχνότητα κατανάλωσης των τροφίμων αυτών.

Συγκεκριμένα, για κάθε ομάδα τροφίμων δίνεται ένας βαθμός (από 0 έως 5 ή αντίστροφα) σύμφωνα με τη θέση τους στη Μεσογειακή διατροφική πυραμίδα. Για την κατανάλωση τροφίμων που θεωρούνται ‘κοντά’ στο μεσογειακό πρότυπο (π.χ. αυτά που συστήνονται καθημερινά ή σε ποσότητες μεγαλύτερες των τριών μερίδων την εβδομάδα) δίνεται σκορ μεταξύ 1 και 5 για σπάνια έως καθημερινή κατανάλωση, ενώ 0 για απουσία κατανάλωσης. Οι πατάτες, αν και δεν βρίσκονται στη βάση της πυραμίδας, συμπεριλήφθηκαν σε αυτή την ομάδα τροφίμων, καθώς αποτελούν καλή πηγή βιταμινών C, B1, B2, νιασίνης, υδατανθράκων, ινών, καλίου και μαγνησίου, συστατικά τα οποία έχουν συσχετιστεί με καρδιαγγειακούς δείκτες κινδύνου. Παρόλα αυτά πρέπει να λαμβάνεται υπ’όψη ότι η κατανάλωση πατατών έχει συσχετιστεί με τον σακχαρώδη διαβήτη λόγω του υψηλού γλυκαιμικού τους δείκτη.

Από την άλλη, για την κατανάλωση φαγητών που θεωρούνται ‘μακριά’ από τα πρότυπα της Μεσογειακής διατροφής (σπάνια ή μηνιαία κατανάλωση, π.χ. κόκκινο κρέας) τα σκορ δίνονται με αντίστροφη διαβάθμιση (από 5 όταν αναφέρεται μηδενική κατανάλωση έως 0 όταν η κατανάλωση είναι καθημερινή). Ειδικά για το αλκοόλ, δεν χρησιμοποιήθηκε μονοτονική συνάρτηση, αλλά αποδίδεται το σκορ 5 για κατανάλωση μικρότερη των 300ml ανά ημέρα, σκορ 0 για μηδενική κατανάλωση ή μεγαλύτερη των 700ml ανά ημέρα, και σκορ από 4 έως 1 για κατανάλωση 600-700, 500-600, 400-500 και 300-400 ml ανά ημέρα. Έτσι το σκορ έχει εύρος από 0 έως 55. Υψηλότερες τιμές του σκορ υποδεικνύουν μεγαλύτερη συμμόρφωση στο Μεσογειακό πρότυπο. Ο πίνακας 9.2. παρουσιάζει το σύστημα βαθμολόγησης σύμφωνα με το Μεσογειακό Διατροφικό Σκορ.

Το Μεσογειακό Διατροφικό Σκορ έχει ορισμένους περιορισμούς. Κατ’αρχάς βασίζεται σε συγχρονική έρευνα και όχι σε μία προοπτική μελέτη, γεγονός που ίσως οδηγεί σε λανθασμένη ταξινόμηση που επηρεάζει την ευαισθησία του. Επιπλέον, τα συστατικά του έχουν ισότιμη βαρύτητα και βαθμολογούνται με παρόμοιο τρόπο από 1 έως 5, κάτι το οποίο ίσως να μην είναι ακριβές, καθώς δεν έχουν όλα τα τρόφιμα ή ομάδες τροφίμων την ίδια επίδραση στα μελετούμενα αποτελέσματα υγείας. Η αδυναμία να ληφθεί υπ’όψη το ποσό της συνολικής προσλαμβανόμενης ενέργειας αποτελεί έναν ακόμα περιορισμό. Τέλος, η θετική και αρνητική προγνωστική αξία του σκορ υπολογίστηκαν με βάση το σκορ Framingham, που ενδεχομένως δεν είναι κατάλληλο για πληθυσμούς εκτός των Βόρειων Αμερικανών. Το Μεσογειακό Διατροφικό Σκορ ίσως χρειάζεται κάποιες βελτιώσεις για να αυξηθεί η ακρίβειά του, όμως η εφαρμογή του μπορεί να αποτελέσει χρήσιμο εργαλείο για την πρωτοβάθμια πρόληψη των καρδιαγγειακών νοσημάτων.

Πίνακας 9.2. Το Μεσογειακό Διατροφικό Σκορ

	Συχνότητα κατανάλωσης (μερίδες/ εβδομάδα)					
Μη – επεξεργασμένα Δημητριακά	Ποτέ 0	1-6 1	7-12 2	13-18 3	19-31 4	>32 5
Πατάτες	Ποτέ 0	1-4 1	5-8 2	9-12 3	13-18 4	>18 5
Φρούτα	Ποτέ 0	1-4 1	5-8 2	9-15 3	16-21 4	>22 5
Λαχανικά	Ποτέ 0	1-6 1	7-12 2	13-20 3	21-32 4	>33 5
Όσπρια	Ποτέ 0	<1 1	1-2 2	3-4 3	5-6 4	>6 5
Ψάρια	Ποτέ 0	<1 1	1-2 2	3-4 3	5-6 4	>6 5
Κόκκινο κρέας και προϊόντα του	≤1 5	2-3 4	4-5 3	6-7 2	8-10 1	>10 0
Πουλερικά	≤3 5	4-5 4	5-6 3	7-8 2	9-10 1	>10 0
Πλήρη γαλακτοκομικά	≤10 5	11-15 4	16-20 3	21-28 4	29-30 5	>30 0
Ελαιόλαδο στο μαγείρεμα (φορές/εβδομάδα)	Ποτέ 0	Σπάνια 1	<1 2	1-3 3	3-5 4	Καθημερινά 5
Αλκοολούχα ροφήματα (ml/ημέρα, 100 ml = 12 gr αιθανόλης)	<300 5	300 4	400 3	500 2	600 1	>700 ή 0 0

9.4. Στατιστική Ανάλυση

Οι συνεχείς μεταβλητές παρουσιάζονται ως μέσος $\pm$ τυπική απόκλιση, ενώ οι κατηγορικές μεταβλητές παρουσιάζονται ως απόλυτες και σχετικές συχνότητες. Η ανάλυση Student's t χρησιμοποιήθηκε για να αξιολογηθούν οι συσχετίσεις μεταξύ κατηγορικών και συνεχών μεταβλητών, ενώ ο έλεγχος χ^2 χρησιμοποιήθηκε για να αξιολογηθούν οι συσχετίσεις μεταξύ κατηγορικών μεταβλητών.

Η κατανομή του πολυμορφισμού στο δείγμα συγκρίθηκε με την αναμενόμενη κατανομή που προκύπτει από την ισορροπία Hardy-Weinberg.

Ανάλυση λογαριθμιστικής παλινδρόμησης χρησιμοποιήθηκε για να υπολογιστεί ο σχετικός κίνδυνος εμφάνισης οξέος στεφανιαίου συνδρόμου, καθώς και το αντίστοιχο διάστημα εμπιστοσύνης, λαμβάνοντας υπ' όψη πιθανούς συγχυτικούς παράγοντες.

Όλοι οι έλεγχοι πραγματοποιήθηκαν σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $>0,05$ με το στατιστικό πακέτο SPSS 10.0.

9.5. Απομόνωση DNA

Η απομόνωση DNA έγινε από λευκοκύτταρα ολικού αίματος (3 ml) που έχει τοποθετηθεί σε σωληνάριο με αντιπηκτικό Na_2EDTA , με τη μέθοδο NaCl . Τα βήματα της μεθόδου περιγράφονται παρακάτω:

HMEPA 1^η

1. Απομάκρυνση πλάσματος με πλαστική πιπέτα Pasteur μετά από φυγοκέντρηση (10min, 3000rpm).
2. Μεταφορά 3ml κυττάρων αίματος σε σωληνάριο πολυπροπυλενίου (Falcon) 15ml.
3. Προσθήκη διαλύματος Lysis I (αραιωμένο 1x) μέχρι τελικό όγκο 15ml.
4. Ισχυρή ανακίνηση και επώαση σε πάγο για 20min (ανακίνηση και κατά τη διάρκεια των 20min).
5. Φυγοκέντρηση (10min, 2000rpm, 20°C).
6. Απομάκρυνση υπερκείμενου.
7. Προσθήκη 10-12ml Lysis I (αραιωμένο 1x) και ισχυρή ανακίνηση για διάλυση ιζήματος.
8. Φυγοκέντρηση (10min, 2500rpm, 20°C).
9. Απομάκρυνση υπερκείμενου.
10. Προσθήκη 1.5ml διαλύματος LysisII και ισχυρή ανακίνηση.
11. Προσθήκη 25μl πρωτεϊνάσης K (20mg/ml).
12. Προσθήκη 75μl SDS 20% και ήπια ανάδευση.
13. Επώαση στους 56°C σε υδατόλουτρο για 12 ώρες.

HMEPA 2^η

1. Προσθήκη 0,5ml NaCl 6M και ισχυρή ανακίνηση για 15-20sec.
2. Φυγοκέντρηση (10min, 3000rpm, 20°C). Με την φυγοκέντρηση, παρουσία της μεγάλης συγκέντρωσης άλατος που αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες, γίνεται κατακρήμνιση των πρωτεϊνών. Το DNA είναι διαλυτό σε διαλύματα αλάτων.

3. Ισχυρή ανακίνηση για διάλυση του ιζήματος και φυγοκέντρηση (10min, 3000rpm, 20°C).
4. Μεταφορά υπερκείμενου σε σωλήνα Falcon 50ml που περιέχει 12-15ml 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 με κίτρινο tip σε eppendorf 1.5ml στο οποίο έχουμε προηγουμένως τοποθετήσει 1ml αιθανόλης 70%.
8. Προσθήκη 4-5 σταγόνων οξικού αμμωνίου 10M.
9. Φυγοκέντρηση (15min, 14000g, 20°C) .
10. Άδειασμα υπερκείμενου και στέγνωμα για 20-30min έως ότου δεν υπάρχουν υπολείμματα αιθανόλης.
11. Προσθήκη 0,5ml διαλύματος TE.
12. Διαλυτοποίηση DNA με παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 1 εβδομάδα.

9.6. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης - Polymerase Chain Reaction (PCR)

Μετά την απομόνωση ακολούθησε εφαρμογή της μεθόδου PCR, η οποία χρησιμεύει στην εκλεκτική αντιγραφή μέχρι και 10^6 φορές μιας επιλεγμένης αλληλουχίας DNA, χρησιμοποιώντας ελάχιστη ποσότητα αρχικού DNA. Η αντίδραση χαρακτηρίζεται από μεγάλη ταχύτητα και ειδικότητα. Πρόκειται για μία 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 μιας 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 θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* και είναι ανθεκτική στις 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.
4. 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 στη συνέχεια για τη μελέτη του τμήματος DNA που πολλαπλασιάστηκε.

Για την εφαρμογή της μεθόδου PCR στον υποκινητή του γονιδίου της κυκλοοξυγενάσης-2 χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια:

▪ ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ

Ο αριστερός εκκινητής (forward primer) είχε την αλληλουχία 5'-CCG-CTT-CCT-TTG-TCC-ATC-3' και ο δεξιός εκκινητής (reverse primer) είχε την αλληλουχία 5'-GGC-TGT-ATA-TCT-GCT-CTA-TAT-GC-3'. Οι εκκινητές ήταν σε μορφή σκόνης. Τελικά με απεσταγμένο νερό δημιουργήθηκε διάλυμα συγκέντρωσης 12,5pmol/μl.

▪ Taq ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗ

Χρησιμοποιήθηκε πολυμεράση με συγκέντρωση 5 U/ μl. Το αντιδραστήριο διατηρείται σε θερμοκρασία -20°C.

▪ **PCR BUFFER**

Η συγκέντρωσή του ήταν 10X και περιείχε: 200 mM Tris-HCL (pH 8,4) και 500 mM KCL. Το αντιδραστήριο διατηρείται σε θερμοκρασία -20°C .

▪ **ΔΙΑΛΥΜΑ MgCl_2**

Η συγκέντρωσή του ήταν 25 mM. Το αντιδραστήριο διατηρείται σε θερμοκρασία -20°C .

▪ **ΜΙΓΜΑ ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ (dNTP's)**

Τα τέσσερα ολιγονουκλεοτίδια είχαν συγκέντρωση 100 mM το καθένα. Αναμίχθηκαν και μεταφέρθηκαν σε eppendorf. Το αντιδραστήριο διατηρείται σε θερμοκρασία -20°C .

▪ **ΑΠΕΣΤΑΓΜΕΝΟ ΚΑΙ ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΜΕΝΟ ΝΕΡΟ**

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την πραγματοποίηση της PCR έχει ως εξής:

1. Αρχικά παρασκευάζεται το μίγμα των αντιδραστηρίων της PCR. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον πίνακα 9.3. Τα αντιδραστήρια διατηρούνται σε πάγο σε όλη τη 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 9.3. ΜΙΓΜΑ ΓΙΑ PCR

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΟΓΚΟΣ (μl)
Taq ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗ	0,3
PCR BUFFER	2
MgCl_2	1,2
dNTP's	2
ΔΕΞΙΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΗΣ	1
ΑΡΙΣΤΕΡΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΗΣ	1
ΝΕΡΟ ΑΠΕΣΤΑΓΜΕΝΟ ΚΑΙ ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΜΕΝΟ	12,5
ΣΥΝΟΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ	20

2. Το μίγμα χωρίζεται σε αποστειρωμένες οχτάδες. Σε κάθε θέση της οχτάδας τοποθετούνται 24,6 μl από το μίγμα. Οι οχτάδες με το μίγμα διατηρούνται στον πάγο.

3. Σε κάθε θέση της πλάκας προστίθενται 0,4 μ l DNA. Ο συνολικός όγκος του μίγματος για την PCR είναι 25 μ l.
4. Οι οχτάδες μεταφέρονται σε θερμικό κυκλοποιητή (μηχάνημα PCR) και ακολουθείται το ακόλουθο πρόγραμμα:

BHMA 1^ο : 94°C για 4 min

BHMA 2^ο: 94°C για 45 seconds

BHMA 3^ο: 56°C για 45 seconds

BHMA 4^ο: 72°C για 45 seconds

BHMA 5^ο: (Βήμα 2^ο, Βήμα 3^ο και Βήμα 4^ο) x 39

BHMA 6^ο: 72°C για 2 min

BHMA 7^ο: 4°C αποθήκευση

9.7. 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 τη συγκέντρωση της αγαρόζης. Η ταχύτητα μετακίνησης του DNA είναι αντιστρόφως ανάλογη του μεγέθους των κλασμάτων DNA που ηλεκτροφορούνται και αντιστρόφως ανάλογη της συγκέντρωσης του πηκτώματος. Σημειώνεται τέλος, ότι χρησιμοποιώντας πηκτώματα διαφορετικών συγκεντρώσεων μπορούμε να διαχωρίσουμε ένα μεγάλο εύρος μεγεθών DNA. Με συγκέντρωση 1% γίνεται διαχωρισμός γραμμικών τμημάτων DNA μήκους 0,1-3 Kbp.

➤ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ ΑΓΑΡΟΖΗΣ 1%

- Ζυγίζονται 0,5 gr αγαρόζης και τοποθετούνται σε κωνική φιάλη.
- Προσθήκη 50 ml διαλύματος TBE 0,5X (Tris Borate Acid).
- Ταχεία θέρμανση μερικών λεπτών σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη.
- Αφού κρυώσει το διάλυμα προστίθενται 5ml διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου 10 mg/ml (EtBr) και αναδεύεται το διάλυμα.

Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι μια 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.

- Το διάλυμα χύνεται στο εκμαγείο της ηλεκτροφορητικής συσκευής, αφού πρώτα έχουν τοποθετηθεί σε αυτό “χτένες” ώστε να δημιουργηθούν “πηγάδια” καθώς πήζει το πήκτωμα της αгарόζης.
- Το διάλυμα αφήνεται να πήξει (~10 min).
- Αφού δημιουργηθεί το πήκτωμα αгарόζης, 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.

➤ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

- Σε μη αποστειρωμένα erppendorf των 0,5 ml μεταφέρονται 7 μl του προϊόντος PCR από κάθε δείγμα και σε ένα erppendorf τοποθετείται 0,5 μl μάρτυρα (DNA ladder 100bp). Το υπόλοιπο προϊόν της PCR διατηρείται στους 4 °C, ενώ ο μάρτυρας διατηρείται στους -20 °C.
- Σε όλα τα erppendorf προστίθενται 2 μl χρωστικής κυανού της ξυλόλης και φυγοκεντρώνονται (short spin) για να αναμιχθεί η χρωστική με το προϊόν της PCR και το μάρτυρα.
- Στη συνέχεια, μεταφέρεται κάθε δείγμα με τη χρωστική σε ένα από τα “πηγάδια” του πηκτώματος, ενώ σε ένα από τα πηγάδια μεταφέρεται ο “μάρτυρας”.

➤ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΟΥ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ

- Η ηλεκτροφόρηση γίνεται στα 80 V 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.

8.8. Πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση

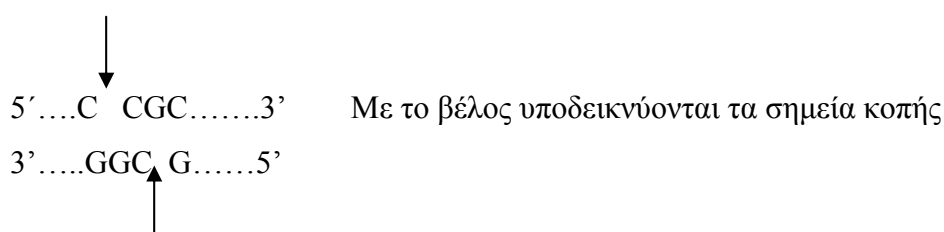
Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα που αναγνωρίζουν ειδικές δίκλωνες αλληλουχίες DNA και κόβουν το μόριο μέσα ή κοντά στην αλληλουχία αναγνώρισης. Οι αλληλουχίες αναγνώρισης έχουν συνήθως μήκος 4-8 νουκλεοτίδια και συχνά είναι παλίνδρομες (‘‘διαβάζονται’’ το ίδιο και από τις δύο κατευθύνσεις 5’-3’ και 3’-5’ του DNA).

Τα τμήματα DNA που παράγονται από την πέψη με μια 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.

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

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε για την πέψη το ένζυμο **Aci I**. Αυτή η περιοριστική ενδονουκλεάση απομονώνεται από το στέλεχος *Arthrobacter citreus*.

Η αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου είναι η εξής:



Για την πέψη του προϊόντος της PCR χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια:

- **ENZYMO**

Η συγκέντρωση του ενζύμου είναι 10.000 U/ml και διατηρείται σε θερμοκρασία -20°C .

- **ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ (BUFFER 2)**

Το ρυθμιστικό διάλυμα ήταν σε συγκέντρωση 1X και περιέχει: 100mM NaCl, 50mM Tris-HCL, 10mM MgCl_2 , 1mM DTT. Διατηρείται στους -20°C .

- **ΑΠΕΣΤΑΓΜΕΝΟ ΚΑΙ ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΜΕΝΟ ΝΕΡΟ**

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την πραγματοποίηση της πέψης έχει ως εξής:

1. Αρχικά παρασκευάζεται το μίγμα αντιδραστηρίων της πέψης. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον πίνακα 9.4. Τα αντιδραστήρια διατηρούνται σε πάγο σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας. Η ποσότητα από το κάθε αντιδραστήριο πολλαπλασιάζεται με τον αριθμό των δειγμάτων στα οποία θα γίνει πέψη, συν 2 δείγματα για τυχόν απώλειες. Το μίγμα τοποθετείται σε eppendorf του 0,5ml, αναδεύεται σε vortex και διατηρείται σε πάγο.

Πίνακας 9.4. ΜΙΓΜΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΕΨΗ.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΟΓΚΟΣ (μL)
ENZYMO ACI I	0,4
BUFFER 2	1
ΑΠΕΣΤΑΓΜΕΝΟ ΚΑΙ ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΜΕΝΟ ΝΕΡΟ	1,6
ΣΥΝΟΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ	3

2. Στη συνέχεια, το μίγμα μοιράζεται σε οχτάδες όπου έχουν προηγουμένως τοποθετηθεί 7 μl από το προϊόν της PCR, μέχρι τελικού όγκου 10 μl .
3. Οι οχτάδες τοποθετούνται σε εκκολαπτικό θάλαμο στους 37°C για 12 ώρες.

9.9. Έλεγχος του προϊόντος της πέψης

Ο έλεγχος του προϊόντος της πέψης έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης 3% κατά τον ίδιο τρόπο που έγινε η διαδικασία ελέγχου του προϊόντος της PCR που περιγράφεται αναλυτικά παραπάνω.

9.10. Διαλύματα

➤ Lysis I (20x)

- ο 82,9gr NH_4CL (3,1M).
- ο 10,01gr KHCO_3 (200mM).
- ο 20ml EDTA (0,5M).
- ο Ανάδευση.
- ο Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι $V_{\text{τελ}}=500\text{ml}$.
- 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.

➤ Πρωτεΐνάση K (20mg/ml)

- ο 100mg πρωτεΐνάση K.
- ο 5ml αποστειρωμένο νερό.
- ο Ανάδευση σε Vortex.
- ο Κατανομή σε eppendorfs των 1,5ml.

- ο Αποθήκευση στους -20°C .
- Tris Borate Acid 5x (TBE 5x)
 - ο 54gr Tris Base.
 - ο 27,5gr Boric Acid.
 - ο 20ml EDTA 0,5M.
 - ο Προσθήκη ~800ml απεσταγμένου νερού.
 - ο Ανάδευση.
 - ο Έλεγχος και ρύθμιση pH στο 8,3.
 - ο Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι $V_{\text{τελ}}=1\text{lt}$.
- Tris Borate Acid 1x (TBE 1x)
 - ο 200ml TBE 5x.
 - ο Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι $V_{\text{τελ}}=1\text{lt}$.
 - ο Ανάδευση.
- EDTA 0,5M
 - ο 186,1gr EDTA $2\text{H}_2\text{O}$.
 - ο Προσθήκη ~700ml απεσταγμένου νερού.
 - ο Ρύθμιση pH με προσθήκη NaOH (pellets) υπό ανάδευση στο 8.
 - ο Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι $V_{\text{τελ}}=1\text{lt}$.
- SDS 20%
 - ο 20gr SDS.
 - ο 60ml απεσταγμένο νερό.
 - ο Ανάδευση.
- Βρωμιούχο αιθίδιο (10mg/ml)
 - ο 10mg EtBr.
 - ο 1ml αποστειρωμένο νερό.
 - ο Ανάδευση σε Vortex.
 - ο Φύλαξη στους 4°C .
- Tris-EDTA (TE)
 - ο 0,61gr Tris Base 10Mm.

- ο 1ml EDTA 0,05M.
- ο Προσθήκη $\approx 400\text{ml}$ απεσταγμένο νερό.
- ο Ανάδευση.
- ο Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι $V_{\text{τελ}}=500\text{ml}$.
- ο Έλεγχος και ρύθμιση pH στο 7,4
- ο Αποστείρωση.

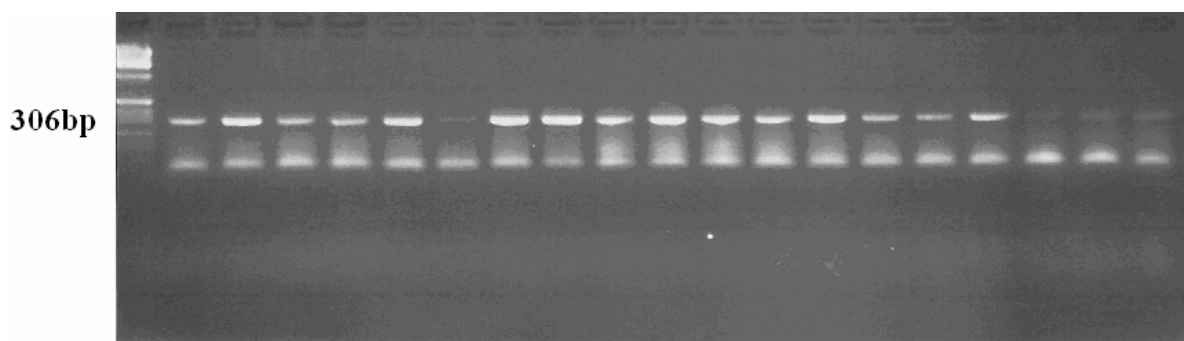
➤ Οξικό αμμώνιο 10M

- ο 77gr $\text{CH}_3\text{COONH}_4$.
 - ο Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι τελικού όγκου 100ml.
 - ο Ανάδευση.
-

10. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

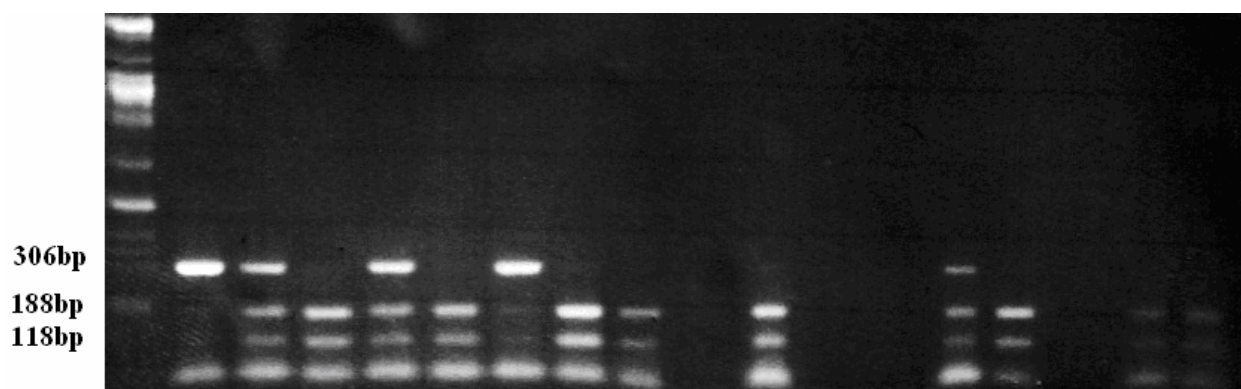
10.1. Αποτελέσματα PCR και πέψης

Η επιτυχία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης στον υποκινητή του γονιδίου της COX-2 επιβεβαιώθηκε με την παρατήρηση των πήκτωμάτων αγαρόζης στο υπεριώδες. Ένα πήκτωμα παρουσιάζεται στην εικόνα 10.1. Η ζώνη που φαίνεται σε κάθε δείγμα αντιστοιχεί σε κομμάτι DNA ίσο με 306 bp, συγκρινόμενο με τον μάρτυρα (αριστερά της εικόνας).



Εικόνα 10.1. Έλεγχος επιτυχίας PCR σε πήκτωμα αγαρόζης

Ο προσδιορισμός του γονοτύπου για τον πολυμορφισμό $-765G \rightarrow C$ στον υποκινητή του γονιδίου της COX-2, πραγματοποιήθηκε με την πέψη του προϊόντος της PCR με το περιοριστικό ένζυμο Acl I. Το προϊόν κάθε πέψης ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης και παρατηρήθηκε το πήκτωμα στο υπεριώδες. Η αλληλουχία αναγνώρισης για το ένζυμο Acl I υπάρχει στον υποκινητή του γονιδίου παρουσία της βάσης G, οπότε η πέψη οδηγεί σε δύο κομμάτια μήκους 188 και 118 bp. Παράδειγμα πέψης με το ένζυμο Acl I βλέπουμε στην εικόνα 10.2.



Εικόνα 10.2. Ηλεκτροφόρηση μετά από πέψη προϊόντος PCR με το περιοριστικό ένζυμο Acl I, σε πήκτωμα αγαρόζης

10.2. Συχνότητα γονοτύπων στον πληθυσμό

Αποτελέσματα για τη συχνότητα των γονοτύπων προέκυψαν για 250 άτομα. Από τους 112 μάρτυρες, προέκυψαν 62 ομόζυγοι ως προς το G αλληλόμορφο (γονότυπος GG), 42 ετερόζυγοι (γονότυπος GC) και 8 ομόζυγοι ως προς το C αλληλόμορφο (γονότυπος CC). Στους ασθενείς, 138 συνολικά, προέκυψαν 83 ομόζυγοι ως προς το G αλληλόμορφο, 48 ετερόζυγοι και 7 ομόζυγοι ως προς το C αλληλόμορφο. Στον πίνακα 10.1. παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι αντίστοιχες συχνότητες σε κάθε ομάδα.

Πίνακας 10.1. Συχνότητες αλληλομόρφων και γονοτύπων στον πληθυσμό

	Μάρτυρες (N=112) %	Ασθενείς (N=138) %
G αλληλόμορφο	74,1	77,5
C αλληλόμορφο	25,9	22,5
Γονότυπος GG	55,4	58
Γονότυπος GC	37,5	36
Γονότυπος CC	7,1	5,1
P-value	0,666	

Η κατανομή του πολυμορφισμού στο δείγμα συγκρίθηκε με την αναμενόμενη κατανομή που προκύπτει από την ισορροπία Hardy-Weinberg και τα αποτελέσματα έδωσαν για το σύνολο του δείγματος $p\text{-value}=0,97$, για τους μάρτυρες $p\text{-value} = 0,99$ και για τους ασθενείς $p\text{-value} = 0,97$. Προκύπτει ότι οι συχνότητες των γονοτύπων βρίσκονται σε ισορροπία Hardy-Weinberg.

10.3. Χαρακτηριστικά του δείγματος

Στον πίνακα 10.2. παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά του δείγματος. Οι συνεχείς μεταβλητές παρουσιάζονται στον πίνακα ως μέσες τιμές $\pm$ τυπικές αποκλίσεις. Παρουσιάζονται τα εξής χαρακτηριστικά : ηλικία, δείκτης μάζας σώματος (BMI), πηλίκo περιφέρειας μέσης / περιφέρεια ισχίου (Waist to hip ratio), ολική χοληστερόλη, LDL χοληστερόλη, HDL χοληστερόλη, επίπεδα γλυκόζης νηστείας, έτη εκπαίδευσης, επίπεδα τριγλυκεριδίων και βαθμολογία στο σκορ μεσογειακής διατροφής (MEDSCORE). Οι κατηγορικές μεταβλητές παρουσιάζονται ως σχετικές συχνότητες. Παρουσιάζονται τα εξής χαρακτηριστικά : φύλο, οικογενειακό ιστορικό οξέος εμφράγματος, παρουσία υπερχοληστερολαιμίας, υπέρτασης, σακχαρώδη διαβήτη, καθώς και πανεπιστημιακή εκπαίδευση.

Πίνακας 10.2. Ανθρωπομετρικά, δημογραφικά, κλινικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά του δείγματος

Χαρακτηριστικά	Μάρτυρες N = 112	Ασθενείς N = 138	P-value
Φύλο (%)			<0,001
Άντρες	59,7	80,5	
Γυναίκες	40,3	19,5	
Ηλικία (έτη)	58,34 ± 10,52	59,93 ± 10,8	0,224
BMI (kg/m²)	28,76 ± 4,28	27,5 ± 4,51	0,026
Waist to hip ratio	0,93 ± 0,09	0,96 ± 0,1	0,026
Οικογενειακό Ιστορικό (%)	17,8	27,2	0,075
Κάπνισμα			<0,001
Μη καπνιστές	43,7	20,3	
Καπνιστές	27,7	57,5	
Πρώην καπνιστές	28,6	22,2	
Υπερχοληστερολαιμία (%)	68,4	73,6	0,409
Ολική χοληστερόλη (mg/dl)	199,85 ± 42,66	196,67 ± 47,05	0,625
LDL χοληστερόλη (mg/dl)	129,62 ± 36,85	132,94 ± 43,92	0,587
HDL χοληστερόλη (mg/dl)	48,89 ± 12,75	47,22 ± 18,62	0,469
Τριγλυκερίδια (mg/dl)	129,8 ± 69,06	136,28 ± 69,65	0,525
Σακχαρώδης Διαβήτης (%)	18,3	27,3	0,107
Γλυκόζη νηστείας (mg/dl)	103,2 ± 30,09	111,77 ± 38,22	0,060
Υπέρταση (%)	57	62,2	0,446
Έτη εκπαίδευσης	12,03 ± 4,91	11,07 ± 4,67	0,131
Πανεπιστημιακή εκπαίδευση (%)	82,1	20	<0,001
MEDSCORE	29,82 ± 4,42	28,89 ± 4,45	0,105

Επιπλέον του υπολογισμού του μέσου όρου σε κάθε ομάδα για το μεσογειακό σκορ, τόσο οι μάρτυρες όσο και οι ασθενείς χωρίστηκαν σε τριτημόρια, από το χαμηλότερο στο υψηλότερο σκορ. Τα αποτελέσματα του διαχωρισμού παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα :

Πίνακας 10.3. Διαχωρισμός του δείγματος σε τριτημόρια σύμφωνα με τα επίπεδα του μεσογειακού διατροφικού σκορ

	Μέσος ± τυπική απόκλιση	Μάρτυρες %	Ασθενείς %
Q1	24,57 ± 2,36	29,9	36,5
Q2	29,33 ± 1,04	32,7	39,4
Q3	34,58 ± 2,37	37,4	24,1
P-value	0,079		

Ανάλογος με το μεσογειακό σκορ διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε όσον αφορά το βάρος. Το δείγμα της μελέτης χωρίστηκε σε τριτημόρια ανάλογα με τον δείκτη μάζας σώματος, σε φυσιολογικού βάρους ($BMI < 25$), υπέρβαρους ($25 \leq BMI < 30$) και παχύσαρκους ($BMI \geq 30$) όπως παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα :

Πίνακας 10.4. Διαχωρισμός του δείγματος ανάλογα με το δείκτη μάζας σώματος

	Μάρτυρες %	Ασθενείς %
Φυσιολογικού βάρους	19,3	22,6
Υπέρβαροι	42,1	55,6
Παχύσαρκοι	38,6	21,8
P-value	0,015	

Για τον έλεγχο ύπαρξης συσχετίσεων μεταξύ των παραπάνω μεταβλητών και της εμφάνισης εμφράγματος του μυοκαρδίου ελέγχουμε την υπόθεση :

H_0 : Η χ μεταβλητή και η εμφάνιση εμφράγματος του μυοκαρδίου είναι ανεξάρτητες.

H_1 : Η χ μεταβλητή και η εμφάνιση εμφράγματος δεν είναι ανεξάρτητες

Για $p < 0,05$ απορρίπτουμε τη μηδενική υπόθεση ενώ για $p > 0,05$ δεχόμαστε την H_0 και καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι οι μεταβλητές είναι ανεξάρτητες.

Ο έλεγχος των συσχετίσεων για τις κατηγορικές μεταβλητές πραγματοποιήθηκε με τον έλεγχο χ^2 του Pearson. Σύμφωνα με το κριτήριο $p < 0,05$ παρατηρούμε ότι συσχετίσεις με την εμφάνιση οξέος στεφανιαίου συνδρόμου παρατηρούνται για τις μεταβλητές φύλο, κάπνισμα και πανεπιστημιακή εκπαίδευση. Όσον αφορά το οικογενειακό ιστορικό, παρατηρείται διαφορά 9,4% μεταξύ των δύο ομάδων, αν και δεν προκύπτει στατιστικά σημαντική συσχέτιση. Διαφορά 9% παρατηρείται επίσης και στον επιπολασμό του σακχαρώδη διαβήτη, αλλά επίσης δεν προκύπτει στατιστικά σημαντική συσχέτιση. Για τις μεταβλητές ηλικία, υπέρταση και υπερχοληστερολαιμία δεν προκύπτει κάποια συσχέτιση.

Ο έλεγχος των συσχετίσεων μεταξύ συνεχών και κατηγορικής μεταβλητής (εμφάνιση οξέος στεφανιαίου συνδρόμου) πραγματοποιήθηκε με τον έλεγχο T – test του Student. Αντίστοιχα με τις κατηγορικές μεταβλητές, και για τις συνεχείς για $p < 0,05$ απορρίπτεται η H_0 . Όσον αφορά λοιπόν τις συνεχείς μεταβλητές, στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις εμφανίζονται για τις μεταβλητές δείκτης μάζας σώματος και λόγος περιφέρειας μέσης/περιφέρεια ισχίου. Ο διαχωρισμός των ατόμων σε τριτημόρια ανάλογα με το μεσογειακό σκορ, παρουσιάζει μία σαφή διαφοροποίηση μεταξύ των ομάδων. Δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική συσχέτιση στο απαιτούμενο επίπεδο, αλλά η τιμή p-value πλησιάζει το αποδεκτό επίπεδο σημαντικότητας (p-

value=0,079). Ο ανάλογος διαχωρισμός σε τριτημόρια σύμφωνα με το δείκτη μάζας σώματος παρουσιάζει στατιστική ισχύ, όπως εμφανίζεται και απουσία του διαχωρισμού. Για τις υπόλοιπες συνεχείς μεταβλητές δεν προκύπτουν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις.

10.4. Λογαριθμιστική παλινδρόμηση

Τα αποτελέσματα της λογαριθμιστικής παλινδρόμησης παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα :

Πίνακας 10.5. Αποτελέσματα παλινδρόμησης

	P-value	Odds ratio	95% CI
COX-2	0,549	0,855	0,513-1,426
Medscore	0,054	0,933	0,87-1,001
Τριτημόρια medscore	0,035	0,663	0,453-0,972
Αλληλεπίδραση medscore – COX-2	0,645	1,031	0,906-1,173

Λαμβάνοντας υπ'όψην ως πιθανούς συγχυτικούς παράγοντες τις μεταβλητές φύλο, ηλικία, υπερχοληστερολαιμία, σακχαρώδη διαβήτη, υπέρταση, οικογενειακό ιστορικό και κάπνισμα, προκύπτουν τα παρακάτω:

Δεν εμφανίζεται συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού της COX-2 και της εμφάνισης οξέος στεφανιαίου συνδρόμου. Η βαθμολογία στο σκορ μεσογειακής διατροφής παρουσιάζει συσχέτιση με την εμφάνιση οξέος στεφανιαίου συνδρόμου και συγκεκριμένα, η αύξηση στο σκορ κατά 1 μονάδα φαίνεται να μειώνει τον κίνδυνο κατά 6,7% (p-value = 0,054). Όσον αφορά το διαχωρισμό του δείγματος σε τριτημόρια ανάλογα με τη βαθμολογία στο μεσογειακό σκορ, η μετάβαση από το ένα τριτημόριο στο αμέσως υψηλότερο φαίνεται να μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης εμφράγματος κατά 33,7% (p-value=0,035). Η αλληλεπίδραση πολυμορφισμού – μεσογειακού σκορ δεν φαίνεται να σχετίζεται με την εμφάνιση οξέος στεφανιαίου συνδρόμου.

11. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα, στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις παρατηρούνται μεταξύ της εμφάνισης οξέος στεφανιαίου συνδρόμου και των παρακάτω μεταβλητών : Φύλο, κάπνισμα, πανεπιστημιακή εκπαίδευση, δείκτης μάζας σώματος, λόγος περιφέρειας μέσης/περιφέρεια ισχίου και υιοθέτηση μεσογειακής διατροφής.

Η επίδραση του φύλου είναι γνωστή από πολυάριθμες μελέτες^(22,42,49) και επιβεβαιώνεται στην παρούσα μελέτη. Η χρονική υστέρηση των γυναικών στην εμφάνιση της ασθένειας οδηγεί σε μεγαλύτερη επίπτωση στους άντρες σε δεδομένη ηλικιακή ομάδα.^(13,42) Στην ομάδα ελέγχου ο αριθμός των γυναικών είναι υψηλότερος (40,3% έναντι 19,5%, $p\text{-value}<0,001$). Η υψηλότερη συχνότητα γυναικών στο δείγμα ελέγχου οφείλεται επίσης στο ότι οι γυναίκες δίνουν μεγαλύτερη σημασία στον προσυμπτωματικό έλεγχο και επομένως εισέρχονται στο νοσοκομείο (από όπου συλλέχθηκε το δείγμα) για προληπτικούς λόγους.

Το κάπνισμα αποτελεί επίσης έναν καλά τεκμηριωμένο παράγοντα κινδύνου εμφάνισης οξέος εμφράγματος.⁽⁸⁷⁻⁸⁹⁾ Στο δείγμα της παρούσας μελέτης ο επιπολασμός του καπνίσματος παρουσιάζεται κατά 29,8% υψηλότερος στην ομάδα των ασθενών ($p\text{-value}<0,001$), επιβεβαιώνοντας την αρνητική επίδρασή του στην επίπτωση της ασθένειας.

Η πανεπιστημιακή εκπαίδευση σύμφωνα με τα στοιχεία της μελέτης, εμφανίζει αρνητική συσχέτιση με την εμφάνιση οξέος στεφανιαίου συνδρόμου. Στην ομάδα ελέγχου, 82,1% των ατόμων έχουν πανεπιστημιακό τίτλο, ενώ στην ομάδα των ασθενών μόνο 20% ($p\text{-value}<0,001$). Το κοινωνικοοικονομικό επίπεδο έχει αναγνωριστεί ως ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων από αρκετές μελέτες.⁽²⁶²⁾ Φαίνεται ότι περισσότερο μορφωμένα άτομα, με δυνατότητα κριτικής επεξεργασίας των πληροφοριών που δέχονται, πιθανά λαμβάνουν υψηλότερα μέτρα πρόληψης έναντι χρόνιων ασθενειών και ίσως ακολουθούν περισσότερο υγιεινό τρόπο ζωής. Η συσχέτιση αυτή αποτελεί ιδιαίτερα ενδιαφέρον εύρημα, καθώς παρουσιάζει την αναγκαιότητα διεξαγωγής προγραμμάτων ενημέρωσης και εκπαίδευσης ατόμων με χαμηλό εκπαιδευτικό επίπεδο, με στόχο την πρόληψη της εμφάνισης καρδιαγγειακών αλλά και άλλων χρόνιων νοσημάτων.

Ο δείκτης μάζας σώματος παρουσιάζει αρνητική συσχέτιση με την εμφάνιση οξέος στεφανιαίου συνδρόμου ($p\text{-value}=0,026$), παρά το ότι είναι γνωστό ότι η παχυσαρκία αποτελεί τεκμηριωμένο παράγοντα κινδύνου της ασθένειας⁽⁹⁷⁾. Η συσχέτιση αυτή παρουσιάζεται πιθανά λόγω του ότι το δείγμα ελέγχου αποτελεί ομάδα που συλλέχθηκε από το νοσοκομειακό περιβάλλον στο οποίο βρέθηκε για προληπτικούς λόγους, επομένως εμφανίζει κάποιους παράγοντες κινδύνου σε μεγαλύτερη συχνότητα από το γενικό πληθυσμό. Επίσης, το αυξημένο βάρος είναι ένας από τους

παράγοντες κινδύνου που αναγνωρίζεται εύκολα από το ευρύ κοινό, και οδηγεί σε προσυμπτωματικό έλεγχο λόγω ανησυχίας για μελλοντική ασθένεια.

Στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση παρουσιάζεται επίσης μεταξύ της εμφάνισης οξέος στεφανιαίου συνδρόμου και του λόγου περιφέρειας μέσης/περιφέρεια ισχίου ($p\text{-value}=0,026$). Η συσχέτιση αυτή επιβεβαιώνει την υπόθεση ότι η κεντρικού τύπου παχυσαρκία είναι πιο επικίνδυνη^(98,99), και μάλιστα ενισχύεται από το γεγονός ότι η ομάδα ελέγχου παρουσιάζει χαμηλότερες τιμές του λόγου παρά τις υψηλότερες τιμές δείκτη μάζας σώματος.

Για τις μεταβλητές ηλικία, οικογενειακό ιστορικό, υπέρταση, σακχαρώδης διαβήτης, υπερχοληστερολαιμία, λιπιδαιμικό προφίλ (ολική, LDL και HDL χοληστερόλη, τριγλυκερίδια) και γλυκόζη νηστείας δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις, παρά το γεγονός ότι η επίδρασή τους έχει μελετηθεί σε πολυάριθμες μελέτες^(13,61,73). Παρ'όλα αυτά, η αύξηση των επιπέδων γλυκόζης νηστείας φαίνεται να σχετίζεται θετικά με την εμφάνιση οξέος στεφανιαίου συνδρόμου, σε επίπεδο σημαντικότητας που πλησιάζει τα αποδεκτά όρια ($p\text{-value}=0,06$). Επίσης, η διαφορά 9% στον επιπολασμό του σακχαρώδη διαβήτη μεταξύ ασθενών και μαρτύρων δεν είναι αμελητέα, σημειώνοντας βέβαια ότι δεν είναι στατιστικά σημαντική ($p\text{-value}=0,107$). Τέλος, για την μεταβλητή οικογενειακό ιστορικό εμφανίζεται μία θετική συσχέτιση (9,4% διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων), αλλά επίσης μη στατιστικά σημαντική.

Η απουσία συσχέτισης με τις παραπάνω μεταβλητές πιθανά οφείλεται στην επιλογή του δείγματος ελέγχου. Στην παρούσα έρευνα πρώτο στόχο αποτελεί η μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ γενετικών παραγόντων και θεραπευτικών συστατικών. Έτσι, η συλλογή του δείγματος ελέγχου από το ίδιο περιβάλλον με αυτό των ασθενών, οδηγεί και στην παρόμοια συχνότητα παραγόντων κινδύνου (αφού η ύπαρξή τους οδηγεί το δείγμα ελέγχου σε προσυμπτωματικό έλεγχο).

Η επίδραση της μεσογειακής διατροφής στην εμφάνιση οξέος στεφανιαίου συνδρόμου έχει επίσης μελετηθεί τα τελευταία έτη, με άλλες μελέτες να υποστηρίζουν την προστατευτική της επίδραση και άλλες όχι.^(185,193,194) Στην παρούσα μελέτη ο διαχωρισμός των ατόμων σε τριτημόρια ανάλογα με το μεσογειακό σκορ, παρουσιάζει μία διαφοροποίηση μεταξύ των ομάδων, χωρίς όμως να παρατηρείται στατιστικά σημαντική συσχέτιση στο απαιτούμενο επίπεδο σημαντικότητας ($p\text{-value}=0,079$). Λαμβάνοντας υπ'όψη τους πιθανούς συγχυτικούς παράγοντες, η βαθμολογία στο σκορ μεσογειακής διατροφής παρουσιάζει αρνητική συσχέτιση με την εμφάνιση οξέος στεφανιαίου συνδρόμου και συγκεκριμένα, η αύξηση στο σκορ κατά 1 μονάδα φαίνεται να μειώνει τον κίνδυνο κατά 6,7% ($p\text{-value}=0,054$). Επιπλέον, με το διαχωρισμό του δείγματος σε τριτημόρια, η μετάβαση από το ένα τριτημόριο στο αμέσως

υψηλότερο σχετίζεται με μείωση του κινδύνου εμφάνισης οξέος στεφανιαίου συνδρόμου κατά 33,7% (p-value=0,035).

Τα παραπάνω ευρήματα έρχονται σε συμφωνία με τα ευρήματα άλλων ερευνών στην Ελλάδα. Συγκεκριμένα, σε μελέτη της Τριχοπούλου και συν., η αύξηση του μεσογειακού σκορ (με κλίμακα 0 έως 9) κατά 2/9 συσχετίστηκε με μείωση της στεφανιαίας θνησιμότητας κατά 25% (p-value<0,001)^(130,185). Σε έρευνα των Παναγιωτάκος και συν., η υιοθέτηση μιας μεσογειακής διαίτας συσχετίστηκε με 16% μείωση του κινδύνου πρώτης εμφάνισης οξέος στεφανιαίου συνδρόμου. Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και σε ασθενείς με υπέρταση, υπερχοληστερολαιμία, καθώς και με μεταβολικό σύνδρομο⁽¹⁸⁷⁻¹⁹⁰⁾

Το δείγμα που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη ήταν μικρό σε σχέση με των παραπάνω ερευνών, επομένως σε μεγαλύτερο δείγμα ίσως εμφανιστεί ισχυρότερη συσχέτιση (p-value<0,05) και απουσία του διαχωρισμού σε τριτημόρια. Μεγαλύτερο δείγμα απαιτείται καθώς ο σύγχρονος τρόπος ζωής οδηγεί στην ολοένα και μεγαλύτερη μείωση των ατόμων που ακολουθούν ‘Μεσογειακή Διατροφή’. Επίσης, οι ασθενείς ίσως επηρεάζονται από ψυχολογικούς παράγοντες (μετεμφραγματικοί) κατά την συμπλήρωση του ερωτηματολογίου, με αποτέλεσμα την απόκρυψη κάποιων ‘κακών’ διατροφικών συνηθειών. Όσο πιο ‘κακή διατροφή’ κάνει το άτομο, τόσο πιο δύσκολο είναι να το δηλώσει στον ερευνητή (επιρροή της απάντησης λόγω παρουσίας ερευνητή, πιθανά λόγω αισθημάτων ντροπής η/και ενοχής). Αυτό βέβαια δεν σημαίνει ότι αποκλείεται να συμβαίνει το ίδιο και στο δείγμα ελέγχου, απλά ίσως η πιθανότητα μειώνεται καθώς το δείγμα αυτό επηρεάζεται λιγότερο από την ύπαρξη ψυχολογικού stress.

Το ένζυμο COX-2 κατέχει ένα πολύ σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στην παραγωγή προστανοϊδών που σχετίζονται με το τραύμα και τη φλεγμονή. Ο πολυμορφισμός -765G→C, εμφανίζεται σε ποσοστό μεγαλύτερο του 25% στον υγιή πληθυσμό του Ηνωμένου Βασιλείου⁽²⁴⁰⁾. Οι μελέτες των λειτουργικών επιδράσεων του πολυμορφισμού -765G→C έχουν αποκαλύψει ότι το C αλληλίο σχετίζεται με περίπου 30% λιγότερη έκφραση του ενζύμου COX-2 σε σύγκριση με το πιο συχνό αλληλίο G⁽²⁶³⁾. Επιπλέον, in vivo παρατηρήσεις από ασθενείς που υπόκεινται σε χειρουργείο στεφανιαίας παράκαμψης δείχνουν ότι οι ασθενείς που φέρουν το C αλληλίο έχουν χαμηλότερα επίπεδα C – αντιδρώσας πρωτεΐνης στο πλάσμα, σε σύγκριση με τους ασθενείς με GG γονότυπο. Πρόσφατα, ανακαλύφθηκε ότι το C αλληλίο σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο εμφράγματος μυοκαρδίου και εγκεφαλικού επεισοδίου⁽²⁴¹⁾.

Οι συχνότητες των αλληλίων στον υγιή πληθυσμό της μελέτης είναι παρόμοιες με τα ευρήματα των Cipollone et al.⁽²⁴¹⁾ σε δείγμα κατοίκων της Ιταλίας, καθώς και με των Abdullah et al⁽²⁶³⁾, οι οποίοι διερεύνησαν την ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ του πολυμορφισμού και της νόσου Alzheimer’s σε δείγμα κατοίκων στις ΗΠΑ (Φλόριντα, Μαϊάμι). Παρ’όλα αυτά, στους ασθενείς

εμφανίζεται χαμηλότερη συχνότητα του G αλληλίου (και αντίστοιχα υψηλότερη του C) κατά 8-12%.

	Μάρτυρες (N=112) %		Ασθενείς (N=138) %	
	G αλληλόμορφο	C αλληλόμορφο	G αλληλόμορφο	C αλληλόμορφο
Cipollone et al ²⁴¹	74,8	25,2	89,6	10,4
Abdullah et al ²⁶³	77,3	22,7	85,1	14,9
Παρούσα μελέτη	74,1	25,9	77,5	22,5

Στην παρούσα μελέτη δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού και της εμφάνισης οξέος στεφανιαίου συνδρόμου, παρά το γεγονός ότι παρατηρείται υψηλότερη συχνότητα του C αλληλίου στην ομάδα ελέγχου. Λαμβάνοντας υπ'όψην πιθανούς συγχυτικούς παράγοντες, επίσης δεν εμφανίζεται κάποια συσχέτιση. Η απουσία συσχέτισης ίσως οφείλεται στο μικρό μέγεθος του δείγματος.

Η αλληλεπίδραση μεταξύ του πολυμορφισμού και της βαθμολογίας στο μεσογειακό σκορ δεν προκύπτει να σχετίζεται με την εμφάνιση οξέος στεφανιαίου συνδρόμου. Έως σήμερα, η μόνη αλληλεπίδραση μεταξύ του πολυμορφισμού -765G→C με θρεπτικά συστατικά που έχει μελετηθεί, είναι η αλληλεπίδρασή του με την πρόσληψη ω-6 λιπαρών οξέων (Singapore Chinese Health Study). Η αλληλεπίδραση παρουσιάζει μία θετική συσχέτιση με τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου στο κόλον (p-value=0,07)⁽²⁶¹⁾. Οι διαφορές στην υπό μελέτη έκβαση μεταξύ των μελετών δεν επιτρέπουν τη σύγκρισή τους. Η απουσία της συσχέτισης στην παρούσα μελέτη είναι πιθανό να οφείλεται και πάλι στο μικρό μέγεθος του δείγματος, ή ενδεχομένως απαιτείται επιλογή συγκεκριμένων θρεπτικών συστατικών για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης.

Περαιτέρω έρευνες, σε διαφορετικούς πληθυσμούς είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθούν, ώστε να επιβεβαιωθεί ο ρόλος του πολυμορφισμού ως προστατευτικός παράγοντας έναντι της εμφάνισης οξέος στεφανιαίου συνδρόμου. Μια καλή επιλογή ίσως αποτελεί η μελέτη της αλληλεπίδρασης του πολυμορφισμού -765G→C με την πρόσληψη ω-3 λιπαρών οξέων, καθώς τα ω-3 λιπαρά αποτελούν πρόδρομα μόρια για τη σύνθεση των εικοσανοειδών. Για την πραγματοποίηση της παραπάνω μελέτης, μία καλή επιλογή πιθανά αποτελεί μία έρευνα ασθενών-μαρτύρων, με τη χρήση ενός κατάλληλα σχεδιασμένου ερωτηματολογίου για την αξιολόγηση της πρόσληψης ω-3 λιπαρών. Εναλλακτική δυνατότητα αποτελεί η πραγματοποίηση προοπτικής μελέτης παρακολούθησης, αν και είναι δύσκολη και υψηλότερου κόστους. Ο υπολογισμός της πρόσληψης ω-3 θα μπορούσε και πάλι να γίνει μέσω ερωτηματολογίων ανά κάποια χρονικά διαστήματα, ή με τη χορήγηση συγκεκριμένης δόσης ω-3 λιπαρών, εκτός της διατροφικής πρόσληψης (π.χ. συμπλήρωμα ιχθυελαίων), μεθοδολογία που είναι δυστυχώς δύσκολα επιτεύξιμη για μεγάλο χρονικό διάστημα.

III. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. World Health Organisation, *Cardiovascular disease prevention and control*, www.who.int
2. World Health Organisation, *Global Burden of Disease: Deaths by sex and cause for the year 2002 in Europe*, www.who.int
3. National Health and Nutrition Examination Survey [NHANES 1999–2002], CDC/NCHS, www.cdc.gov
4. Jose' Leal, Ramo'n Luengo-Ferna'ndez¹, Alastair Gray¹, Sophie Petersen, Mike Rayner, *Economic burden of cardiovascular diseases in the enlarged European Union*, *European Heart Journal* (2006) 27, 1610–1619
5. American Heart Association, *Heart Disease and Stroke Statistics — 2006 Update*. Dallas, Texas; 2006, www.americanheart.org
6. World Health Organisation, *Cardiovascular diseases*, www.who.int/ncd/cvd/
7. World Health Organisation, *Atlas of heart disease and stroke 2004*, www.who.int
8. World Health Organisation, *World health report 2002*, www.who.int
9. British Heart foundation, *Coronary heart disease statistics, 2005 edition*, www.bhf.org.uk
10. European heart network, *European cardiovascular disease statistics, 2005 edition*, www.ehnheart.org
11. S. Yusuf, S. Hawken, S. Ôunpuu, T. Dans, A. Avezum, F. Lanas, M. McQueen, A. Budaj, P. Pais, J. Varigos, *Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study*, *The Lancet*, Volume 364, Issue 9438, Pages 937-952
12. World Health Organisation, *Deaths and DALYs attributable to the 10 leading causes in the WHO European Region 2002*, www.who.int
13. Δ. Παναγιωτάκος, Χ. Πίτσαβος, Χ. Στεφανίδης, *Η επιδημιολογία της στεφανιαίας νόσου στην Ελλάδα*, Εκδόσεις Κωστάκη, Αθήνα 2004.
14. Ancel Keys, *Mediterranean diet and public health: personal reflections*, *American Journal of Clinical Nutrition*, Vol 61, 1321S-1323S
15. Simin Liu, *Mediterranean Diets*, *American Journal of Clinical Nutrition*, Vol. 73, No. 4, 847, April 2001
16. World Health Organisation, *Highlights on health in Greece*, www.who.int
17. Άννα Σαχίνη – Καρδάση, Μαρία Πάνου, *Παθολογική Και Χειρουργική Νοσηλευτική*, σελ. 27 – 35, Εκδόσεις BHΤΑ, 2004

18. Fred Kusumoto, *Καρδιαγγειακές Διαταραχές: Νοσήματα της καρδιάς*, Παθολογική Φυσιολογία, Stephen McPhee, Χαράλαμπος Μουτσόπουλος, σελ. 393 – 397, Εκδόσεις Λίτσας, 2000
19. Φραγκίσκος Χανιώτης, Δημήτριος Χανιώτης, *Νοσολογία – Παθολογία*, σελ.629 - 673, Εκδόσεις Λίτσας, 2002
20. J. A. Berliner, M. Navab, A. M. Fogelman, Joy S. Frank, L. L. Demer, P. A. Edwards, A. D. Watson, A. J. Lusis, *Atherosclerosis: Basic Mechanisms: Oxidation, Inflammation, and Genetics*, *Circulation*, 1995;91:2488-2496
21. J. L. Orford, A. P. Selwyn, P. Ganz, J. J. Popma, C. Rogers, *The comparative pathobiology of atherosclerosis and restenosis*, *The American Journal of Cardiology*, Volume 86, Issue 4, Supplement 2, 24 August 2000, Pages 6H-11H
22. Eric H. Awtry, Joseph Loscalzo, *Στεφανιαία Καρδιοπάθεια*, Cecil Παθολογία, σελ. 99-116, Εκδόσεις Λίτσας, 2003
23. Peter Libby, Pierre Theroux, *Pathophysiology of Coronary Artery Disease*, *Circulation*, 005;111:3481-3488
24. Valentin Fuster, *Mechanisms Leading to Myocardial Infarction: Insights From Studies of Vascular Biology*, *Circulation* Vol 90, No 4 October 1994
25. Jorge Plutzky, *Atherosclerotic plaque rupture: emerging insights and opportunities*, *The American Journal of Cardiology*, Volume 84, Issue 1, Supplement 1, 8 July 1999, Pages 15-20
26. Peter Libby, *What Have We Learned About the Biology of Atherosclerosis? The Role of Inflammation*, *The American Journal of Cardiology* 2001;88(suppl):3J–6J
27. L. Maximilian Buja, James T. Willerson, *Role of Inflammation in Coronary Plaque Disruption*, *Circulation* 1994;89;503-505
28. Eugene Braunwald et al, *Unstable Angina, Diagnosis and Management, Clinical Practice Guideline*, U.S. Department of Health and Human Services, AHCPR Publication, May 1994
29. Carl J. Pepine, Wilmer W. Nichols, *The Pathophysiology of Chronic Ischemic Heart Disease*, *Clinical Cardiology*, 30 (Suppl. I), I-4–I-9 (2007)
30. National Heart, Lung and Blood Institute, *Heart Attack Warning Signs*. Retrieved November 22, 2006, www.nhlbi.nih.gov
31. American Heart Association , *Acute Coronary Syndrome*, Retrieved November 25, 2006, www.americanheart.org

32. McSweeney JC, Cody M, O'Sullivan P, Elberson K, Moser DK, Garvin BJ, *Women's early warning symptoms of acute myocardial infarction*, *Circulation*, 2003; 108 (21): 2619-23.
33. Elliott Antman, Jean-Pierre Bassand, Werner Klein, Magnus Ohman, Jose Luis Lopez Sendon, Lars Rydén, Maarten Simoons, Michal Tendera, *Myocardial infarction redefined — a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology committee for the redefinition of myocardial infarction*, *Journal of the American College of Cardiology*, Volume 36, Issue 3, September 2000, Pages 959-969
34. ACC/AHA *Guidelines for the Management of Patients With ST-Elevation Myocardial Infarction—Executive Summary*, *Circulation*. 2004;110:588-636
35. S. Garas et al., *Myocardial Infarction*, eMedicine. Retrieved November 22, 2006
36. Francis Morris and William J Brady, *ABC of clinical electrocardiography - Acute myocardial infarction—Part I*, *British Medical Journal*, 2002 April 6; 324(7341): 831–834
37. ACC/AHA 2002 *Guideline Update for the Management of Patients With Unstable Angina and Non-ST-Segment Elevation Myocardial Infarction* A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on the Management of Patients With Unstable Angina), www.acc.org/clinical/guidelines/unstable/incorporated/index.htm
38. Michael P. Somers, William J. Brady, Andrew D. Perron, Amal Mattu, *The Prominent T Wave: Electrocardiographic Differential Diagnosis*, *The American Journal of Emergency Medicine*, Volume 20, Issue 3 , May 2002, Pages 243-251
39. Russell V. Luepker, Fred S. Apple, Robert H. Christenson, et al, *Case Definitions for Acute Coronary Heart Disease in Epidemiology and Clinical Research Studies*, A Statement From the AHA Council on Epidemiology and Prevention; AHA Statistics Committee; World Heart Federation Council on Epidemiology and Prevention; the European Society of Cardiology Working Group on Epidemiology and Prevention; Centers for Disease Control and Prevention; and the National Heart, Lung, and Blood Institute, *Circulation*, 2003;108:2543
40. P O Collinson, P J Stubbs and A-C Kessler, For The Multicentre Evaluation Of Routine Immunoassay Of Troponin T Study (MERIT), *Multicentre evaluation of the diagnostic value of cardiac troponin T, CK-MB mass, and myoglobin for assessing patients with suspected acute coronary syndromes in routine clinical practice*, *Heart*, 2003;89:280-286

41. American Heart Association, *Risk factors and coronary heart disease, AHA scientific position*, www.americanheart.org
42. Δ. Τριχόπουλος, Β. Καλαποθάκη, Ε. Πετρίδου, *Προληπτική Ιατρική και Δημόσια Υγεία*, Εκδόσεις ZHTA, Αθήνα 2000.
43. Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR., *Predicting coronary heart disease in middle-aged and older persons: the Framingham Study*, Journal of The American Medical Association, 1977;238:497–499.[Abstract]
44. William B. Kannel, Ralph B. D'Agostino, Lisa Sullivan, and Peter W. F. Wilson, *Concept and usefulness of cardiovascular risk profiles*, American Heart Journal, Volume 148, Issue 1, July 2004, Pages 16-26
45. Dannenberg AL, Levy D, Garrison RJ, *Impact of age on echocardiographic left ventricular mass in a healthy population (the Framingham Study)*, The American Journal of Cardiology, 1989; 64:1066–1068.
46. Njolstad I, Arnesen E, Lund-Larsen PG., *Smoking, serum lipids, blood pressure, and sex differences in myocardial infarction: a 12-year follow-up of the Finnmark Study*, Circulation, 1996;93:450–456
47. Rich-Edwards JW, Manson JAE, Hennekens CH, Buring JE., *The primary prevention of coronary heart disease in women*, New England Journal of Medicine, 1995;332:1758–1766
48. P. Jousilahti, E. Vartiainen, Jaakko Tuomilehto, Pekka Puska, *Sex, Age, Cardiovascular Risk Factors, and Coronary Heart Disease*, Circulation, 1999;99:1165-1172
49. Vera S Castanho, Letícia S Oliveira, Hildete P Pinheiro, Helena C F Oliveira, and Eliana C de Faria, *Sex differences in risk factors for coronary heart disease: a study in a Brazilian population*, BMC Public Health, 2001; 1: 3
50. WHO MONICA Project (prepared by Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Amouyel P, Arveiler D, Rajakangas A-M, Pajak A), *Myocardial infarction and coronary deaths in the World Health Organization MONICA Project: registration procedures, event rates, and case-fatality rates in 38 populations from 21 countries in four continents*, Circulation, 1994;90:583–612
51. Christina Chrysoshoou, Demosthenes B. Panagiotakos, Christos Pitsavos, Peter Kokkinos, Nick Marinakis, Christodoulos Stefanadis, Pavlos K. Toutouzas, *Gender Differences on the Risk Evaluation of Acute Coronary Syndromes: The CARDIO2000 Study*, Preventive Cardiology, 6(2):71-77, 2003[Abstract]
52. Barrett-Connor E, Khaw K., *Family history of heart attack as an independent predictor of death due to cardiovascular disease*, Circulation, 1984; 69: 1065–1069.

53. Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, et al., *A prospective study of parental history of myocardial infarction and coronary heart disease in women*, American Journal of Epidemiology, 1986; 123: 48–58
54. Colditz GA, Rimm EB, Giovannucci E, et al., *A prospective study of parental history of myocardial infarction and coronary artery disease in men*, American Journal of Cardiology, 1991; 67: 933–938
55. Friedlander Y, Siscovick DS, Weinmann S, et al., *Family history as a risk factor for primary cardiac arrest*, Circulation, 1998; 97: 155–160
56. Sesso HD, Lee IM, Gaziano JM, et al., *Maternal and paternal history of myocardial infarction and risk of cardiovascular disease in men and women*, Circulation, 2001; 104: 393–398
57. Thomas J. Wang, Byung-Ho Nam, Ralph B. D’Agostino, et al, *Carotid Intima-Media Thickness Is Associated With Premature Parental Coronary Heart Disease The Framingham Heart Study*, Circulation, 2003;108:572
58. Gaeta G, De Michele M, Cuomo S, et al., *Arterial abnormalities in the offspring of patients with premature myocardial infarction*, New England Journal of Medicine, 2000; 343: 840–846
59. O’Donnell CJ, Larson MG, Feng D, et al., *Genetic and environmental contributions to platelet aggregation: the Framingham heart study*, Circulation, 2001; 103: 3051–3056
60. Emma S Houslay, Jaydeep Sarma and Neal G Uren, *The effect of intensive lipid lowering on coronary atheroma and clinical outcome*, Heart, 2007;93:149-151[Abstract]
61. Stamler J, Wentworth D, Neaton JD., *Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356,222 primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT)*, Journal of The American Medical Association, 1986;256:2823-2828. [Abstract]
62. Paula C. Zemel, James R. Sowers, *Relation between lipids and atherosclerosis: Epidemiologic evidence and clinical implications*, The American Journal of Cardiology, Volume 66, Issue 21 , 18 December 1990, Pages 7-12
63. JC LaRosa, D Hunninghake, D Bush, MH Criqui, GS Getz, AM Gotto, Jr, SM Grundy, L Rakita, RM Robertson, and ML Weisfeldt, *The cholesterol facts. A summary of the evidence relating dietary fats, serum cholesterol, and coronary heart disease*, A joint statement by the American Heart Association and the National Heart, Lung, and Blood Institute. The Task Force on Cholesterol Issues, American Heart Association, Circulation, May 1990; 81: 1721 - 1733.

64. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults, National Cholesterol Education Program, *Second report of the Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults* (Adult Treatment Panel III), Circulation, Dec 2002; 106: 3143
65. Gerd Assmann, Helmut Schulte, *Relation of high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides to incidence of atherosclerotic coronary artery disease (the PROCAM experience)*, The American Journal of Cardiology, Volume 70, Issue 7 , 15 September 1992, Pages 733-737
66. Brian G. Choi, Gemma Vilahur, Juan F. Viles-Gonzales and Juan J. Badimon, *The Role of High-Density Lipoprotein Cholesterol in Atherothrombosis*, Mount Sinai Journal Of Medicine, 2006, Vol 73; Numb 4, pages 690-701
67. Mohamad Navab, Judith A. Berliner et al, *HDL and the Inflammatory Response Induced by LDL-Derived Oxidized Phospholipids*, Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2001;21:481
68. Mohamad Navab, Susan Y. Hama, G. M. Anantharamaiah, Kholood Hassan, Greg P. Hough, Andrew D. Watson, Srinivasa T. Reddy, Alex Sevanian, Gregg C. Fonarow, and Alan M. Fogelman, *Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: steps 2 and 3*, Journal of Lipid Research, Vol. 41, 1495-1508, September 2000
69. Peter Libby, *Managing the Risk of Atherosclerosis: The Role of High-Density Lipoprotein*, The American Journal of Cardiology, 2001;88(suppl):3N–8N
70. World Health Organisation, *Shares of total deaths and DALYs attributable to 10 leading risk factors in the WHO European Region*, 2002, www.who.int
71. Moorman J., West D., Chambers S., *Disease overview, Hypertension and coronary artery disease*, Drugs in Context, Volume 2, Issue 1, 2006, Pages 5-15
72. Ilke Sipahi, E. Murat Tuzcu, Paul Schoenhagen, Katherine E. Wolski, Stephen J. Nicholls, Craig Balog BS, Timothy D. Crowe and Steven E. Nissen, *Effects of Normal, Pre-Hypertensive, and Hypertensive Blood Pressure Levels on Progression of Coronary Atherosclerosis*, Journal of the American College of Cardiology, Volume 48, Issue 4, 15 August 2006, Pages 833-838
73. Patricia M Kearney, Megan Whelton, Kristi Reynolds, Paul Muntner, ProfPaul K Whelton, DrJiang He, *Global burden of hypertension: analysis of worldwide data*, The Lancet, Volume 365, Issue 9455, 15 January 2005, Pages 217-223
74. Aram V. Chobanian, *Pathophysiology of Atherosclerosis*, The American Journal of Cardiology, 1992;70:3G-7G

75. Schwartzkopff, Bodo; Motz, Wolfgang; Frenzel, Hartmut; Vogt, Martin; Knauer, Sabine; Strauer, Bodo Eckehard, *Hypertension: Structural and Functional Alterations of the Intramyocardial Coronary Arterioles in Patients With Arterial Hypertension*, Circulation, Volume 88(3), September 1993, pp 993-1003
76. Jean Louis Megnien; Alain Simon; Michel Lemarié; Marie Christine Plainfossé; Jaime Levenson, *Hypertension Promotes Coronary Calcium Deposit in Asymptomatic Men*, Hypertension, 1996;27:949-954
77. Christos Pitsavos, Demosthenes B. Panagiotakos, Christina Chrysoshoou and Christodoulos Stefanadis, *Epidemiology of cardiovascular risk factors in Greece: aims, design and baseline characteristics of the ATTICA study*, BMC Public Health, 2003, 3:32
78. Sarah Wild et al., *Global prevalence of diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030*, Diabetes Care, 2004; 27: 1047 – 1053
79. Cathy E. Lloyd; Lewis H. Kuller; Demetrius Ellis; Dorothy J. Becker; Rena R. Wing; Trevor J. Orchard, *Coronary Artery Disease in IDDM-Gender Differences in Risk Factors but Not Risk*, Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 1996;16:720-726
80. Amanda I. Adler, Managing diabetes: what to do about cardiovascular disease, Diabetes Research and Clinical Practice, Volume 61, Supplement 1, July 2003, Pages S3-S8
81. Kannel WB, McGee DL., *Diabetes and glucose tolerance as risk factors for cardiovascular disease: the Framingham Study*, Diabetes Care, 1979;2:120-126.[Abstract]
82. Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D., *Diabetes, other risk factors, and 12-year cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial*, Diabetes Care, 1993;16:434-444.[Abstract]
83. Iwan CC van der Horst, Maarten WN Nijsten, Mathijs Vogelzang and Felix Zijlstra, *Persistent hyperglycemia is an independent predictor of outcome in acute myocardial infarction*, Cardiovascular Diabetology, 2007, 6:2
84. Agewall S, Fagerberg B, Attvall S, Wendelhag I, Urbanavicius V, Wikstrand J., *Carotid artery wall intima-media thickness is associated with insulin-mediated glucose disposal in men at high and low coronary risk*, Stroke, 1995; 26: 956–960
85. Sameer Bansilal, Michael E. Farkouh, Valentin Fuster, *Role of Insulin Resistance and Hyperglycemia in the Development of Atherosclerosis*, The American Journal of Cardiology, 2007;99[suppl]:6B–14B

86. Getz GS., *Report on the Workshop on Diabetes and Mechanisms of Atherogenesis* (September 17th and 18th, 1992, Bethesda, Maryland), *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 1993;13:459-464.
87. Jonas MA, Oates JA, Ockene JK, Hennekens CH., *Statement on smoking and cardiovascular disease for health care professionals*, *Circulation*, 1992;86:1664-1669
88. Andreas M. Zeiher, Volker Schächinger, Jan Minners, *Long-term Cigarette Smoking Impairs Endothelium-Dependent Coronary Arterial Vasodilator Function*, *Circulation*, 1995;92:1094-1100
89. Doll R, Peto R, Wheatley K, Gray R, Sutherland I., *Mortality in relation to smoking: 40 years' observations on male British doctors*, *British Medical Journal*, 1994;309:901-911
90. La Vecchia C, D'Avanzo B, Franzosi MG, Tognoni G., *Passive smoking and the risk of acute myocardial infarction*, *The Lancet*, 1993;341:505-506
91. He Y, Lam TH, Li LS, et al., *Passive smoking at work as a risk factor for coronary heart disease in Chinese women who have never smoked*, *British Medical Journal*, 1994; 308:380-384
92. Jiang He, Suma Vupputuri, Krista Allen, Monica R. Prerost, Janet Hughes, Paul K. Whelton, *Passive Smoking and the Risk of Coronary Heart Disease — A Meta-Analysis of Epidemiologic Studies*, *The New England Journal of Medicine* Volume 340:920-926
93. Joseph Hung, Jules Y.T. Lam, Lucie Lacoste, Glaci Letchacovski, *Cigarette Smoking Acutely Increases Platelet Thrombus Formation in Patients With Coronary Artery Disease Taking Aspirin*, *Circulation*, 1995;92:2432-2436
94. Ira S. Ockene, Nancy Houston Miller, For the American Heart Association Task Force on Risk Reduction, *Cigarette Smoking, Cardiovascular Disease, and Stroke A Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association*, *Circulation*, 1997;96:3243-3247
95. Salonen JT, *Stopping smoking and long-term mortality after acute myocardial infarction*, *British Heart Journal*, 1980;43:463-469
96. Keys A, Menotti A, Aravanis C, et al., *The seven countries study: 2289 deaths in 15 years*, *Preventive Medicine*, 1984; 13: 141–154 [Abstract]
97. Hubert HB, Fenileib M, McNamara PM, et al., *Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham heart study*, *Circulation*, 1983; 67: 968–977
98. Eckel RH, Krauss RM, *American Heart Association call to action: obesity as a major risk factor for coronary heart disease: AHA Nutrition Committee*, *Circulation*, 1998; 97: 2099–2100

99. Andrea E. Cassidy, Lawrence F. Bielak, Yan Zhou, Patrick F. Sheedy, Stephen T. Turner, Jerome F. Breen, Philip A. Araoz, Iftikhar J. Kullo, Xihong Lin, Patricia A. Peyser, *Progression of Subclinical Coronary Atherosclerosis Does Obesity Make a Difference?*, *Circulation*, 2005;111:1877-1882
100. Scott M. Grundy, *Obesity, Metabolic Syndrome, and Coronary Atherosclerosis*, *Circulation*, 2002;105:2696
101. Robert Wolk, Peter Berger, Ryan J. Lennon, Emmanouil S. Brilakis, Virend K. Somers, *Body Mass Index A Risk Factor for Unstable Angina and Myocardial Infarction in Patients With Angiographically Confirmed Coronary Artery Disease*, *Circulation*, 2003; 108 :2206
102. A.S. Leon, J. Cornett, D.R. Jacobs and R. Rauramara, *Leisure time physical activity levels and risk of coronary heart disease and death: the Multiple Risk Factor Intervention Study*, *Journal of the American Medical Association*, 273(1987), 2388–2395.[Abstract]
103. N. Blair, H.W. Kohl, C.E. Barlow, R.S. Paffenbarger, L.W. Gibbons and C.A. Macera, *Changes in physical fitness and all cause mortality. A prospective study of healthy and unhealthy men*, *Journal of the American Medical Association*, 273(1995), 1093–1098. .[Abstract]
104. T.A. Lakka, J.M. Venalainen, R. Rauramara, R. Salonen, J. Tuomilehto and J.T. Salonen, *Relation of leisure-time physical activity and cardiorespiratory fitness to the risk of acute myocardial infarction in men*, *New England Journal of Medicine*, 330 (1994),1549–1554.
105. P.D. Wood, M.L. Stefanick, P.T. Williams and W.L. Haskell, *The effects on plasma lipoproteins of prudent weight reducing diet, with or without exercise in overweight men and women*, *The New England Journal of Medicine*, Volume 325 (1991), pp. 461–466
106. S.P. Helmrigh, D.R. Ragland, R.W. Leung and R.S. Paffenbarger, *Physical activity and reduced occurrence of non-insulin-dependent diabetes mellitus*, *The New England Journal of Medicine*, Volume, 325 (1991), pp. 147–152
107. G. Schuler, R. Hambrecht, G. Schlierf *et al.*, *Regular physical exercise and low fat diet: effects on progression of coronary artery disease*, *Circulation*, 86 (1992), 1–11
108. Danesh J, Collins R, Peto R., *Lipoprotein(a) and coronary artery disease: meta-analysis of prospective studies*, *Circulation*, 2000;102:1082-1085
109. Tsimikas S, Bergmark C, Beyer RW, *et al.*, *Temporal increases in plasma markers of oxidized low-density lipoprotein strongly reflect the presence of acute coronary syndromes*, *Journal of the American College of Cardiology*, 2003;41:360-370

110. Tsimikas S, Witztum JL, Miller ER, et al., *High-dose atorvastatin reduces total plasma levels of oxidized phospholipids and immune complexes present on apolipoprotein B-100 in patients with acute coronary syndromes in the MIRACL trial*, *Circulation*, 2004;110:1406-1412
111. Edelstein C, Pfaffinger D, Hinman J, et al., *Lysine-phosphatidylcholine adducts in Kringle V impart unique immunological and potential pro-inflammatory properties to human apolipoprotein(a)*, *Journal of Biological Chemistry*, 2003;278:52841-52847
112. Genest JJ Jr, McNamara JR, Salem DN, Wilson PW, Schaefer EJ, Malinow MR, *Plasma homocyst(e)ine levels in men with premature coronary artery disease*, *Journal of the American College of Cardiology*, 1990, 16:1114-1119
113. Virdis A, Ghiadoni L, Salvetti G, Versari D, Taddei S, Salvetti A, *Hyperhomocyst(e)inemia: Is a novel risk factor in hypertension?*, *Journal of Nephrology* 2002, 15:414-421
114. Saeed Sadeghian, Faramarz Fallahi, Mojtaba Salarifar, Gholamreza Davoodi, Mehran Mahmoodian, Nader Fallah, Soodabeh Darvish, Abbasali Karimi and Tehran Heart Center, *Homocysteine, vitamin B12 and folate levels in premature coronary artery disease*, *BMC Cardiovascular Disorders*, 2006, 6:38
115. Ahmed Tawakol, Torbjørn Omland, MD, Marie Gerhard, James T. Wu, Mark A. Creager, *Hyperhomocyst(e)inemia Is Associated With Impaired Endothelium-Dependent Vasodilation in Humans*, *Circulation*, 1997;95:1119-1121
116. Margita Eriksson; Nils Egberg; Sarah Wamala; Kristina Orth-Gomér; Murray A. Mittleman; Karin Schenck-Gustafsson, *Relationship Between Plasma Fibrinogen and Coronary Heart Disease in Women*, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1999;19:67-72
117. Stefanick M, Legault C, Tracy R, Howard G, Kessler C, Lucas D, Bush T., *Distribution and correlates of plasma fibrinogen in middle-aged women: initial findings of the Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Study*, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1995;15:2085–2093
118. Wolfgang Koenig, *Fibrinogen and Coronary Risk*, *Current Cardiology Reports*, 1999, 1:112-118
119. Antonio M. Gotto, Jr., *Role of C-Reactive Protein in Coronary Risk Reduction: Focus on Primary Prevention*, *The American Journal of Cardiology*, Volume 99, Issue 5 , March 2007, Pages 718-725

120. Hallman T, Burell G, Setterlind S, Oden A, Lisspers J., *Psychosocial risk factors for coronary heart disease, their importance compared with other risk factors and gender differences in sensitivity*, Journal of Cardiovascular Risk, 2001 Feb;8(1):39-49
121. Hemingway H, Marmot M., *Evidence based cardiology: psychosocial factors in the aetiology and prognosis of coronary heart disease: systematic review of prospective cohort studies*, British Medical Journal, 1999;318:1460-1467
122. Kawachi I, Sparrow D, Kubzansky LD, Spiro A III, Vokonas PS, Weiss ST., *Prospective study of a self-report type A scale and risk of coronary heart disease: test of the MMPI-2 type A scale*, Circulation, 1998;98:405-412
123. Mendes de Leon CF, Krumholz HM, Seeman TS, et al., *Depression and risk of coronary heart disease in elderly men and women: New Haven EPESE, 1982-1991: Established Populations for the Epidemiological Studies of the Elderly*, Archives of Internal Medicine, 1998;158:2341-2348
124. Patrick G. O'Malley, David L. Jones, Irwin M. Feuerstein, Allen J. Taylor, *Lack of Correlation between Psychological Factors and Subclinical Coronary Artery Disease*, The New England Journal of Medicine, 2000 Volume 343:1298
125. Romana Femia, Andrea Natali, Antonio L'Abbate, Ele Ferrannini, *Coronary Atherosclerosis and Alcohol Consumption Angiographic and Mortality Data*, Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2006;26:1607
126. Αντώνιος Ζαμπέλας, *Καρδιαγγειακά νοσήματα και διατροφή*, Κλινική Διαιτολογία και Διατροφή με στοιχεία Παθολογίας, σελ.239-279, εκδόσεις Πασχαλίδης, 2007
127. Stampfer M. J., Hu F. B., Manson J. E., Rimm E. B., Willett W. C, *Primary Prevention of Coronary Heart Disease in Women through Diet and Lifestyle*, The New England Journal of Medicine, 2000; 343:16-22
128. Halton T. L., Willett W. C., Liu S., Manson J. E., Albert C. M., Rexrode K., Hu F. B, *Low-Carbohydrate-Diet Score and the Risk of Coronary Heart Disease in Women*, The New England Journal of Medicine, 2006; 355:1991-2002
129. Hu F. B., Stampfer M. J., Manson J. E., Rimm E., Colditz G. A., Rosner B. A., Hennekens C. H., Willett W. C, *Dietary Fat Intake and the Risk of Coronary Heart Disease in Women*, The New England Journal of Medicine, 1997; 337:1491-1499
130. Antonia Trichopoulou, Tina Costacou, Christina Bamia, Dimitrios Trichopoulos, *Adherence to a Mediterranean Diet and Survival in a Greek Population*, The New England Journal of Medicine, 2003, Volume 348:2599-2608

131. Gary E. Fraser, *Diet and Coronary Heart disease: beyond dietary fats and low-density lipoprotein cholesterol*, American Journal of Clinical Nutrition, 1994;59(suppl): 1117S-23S
132. Frans J. Kok, Daan Kromhout, *Atherosclerosis: Epidemiological studies on the health effects of a Mediterranean diet*, European Journal of Nutrition, (2004) [Suppl 1] 43 : I/2–I/5
133. A Menotti, M Lanti, P E Puddu, D Kromhout, *Coronary heart disease incidence in northern and southern European populations: a reanalysis of the seven countries study for a European coronary risk chart*, Heart, 2000;84:238-244
134. Michel De Lorgeril, MD, *Mediterranean Diet and the Prevention of Coronary Heart Disease*, Nutrition, Vol.14, No 1, 1998
135. L. Appel, T. Moore, E. Obarzanek, W. Vollmer, L. Svetkey and F. Sacks *et al.*, *A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure*, New England Journal of Medicine, 336 (1997), pp. 1117–1124.
136. J.F. Price and F.G.R. Fowkes, *Antioxidant vitamins in the prevention of cardiovascular disease*, European Heart Journal, 18 (1997), pp. 719–727
137. Demosthenes B. Panagiotakos, Christos Pitsavos and Christodoulos Stefanadis, *Dietary patterns: A Mediterranean diet score and its relation to clinical and biological markers of cardiovascular disease risk*, Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases, Volume 16, Issue 8 , December 2006, Pages 559-568
138. F.B. Hu, *Dietary pattern analysis: a new direction in nutritional epidemiology*, Current Opinion in Lipidology, 13 (2002), pp. 3–9
139. P.A. Quatromoni, D.L. Copenhafer, S. Demissie, R.B. D'Agostino, C.E. O'Horo, B.H. Nam *et al.*, *The internal validity of a dietary pattern analysis. The Framingham nutrition studies*, Journal of Epidemiology and Community Health, 56 (2002), pp. 381–388
140. Hermansen K, *Diet, blood pressure and hypertension*, British Journal of Nutrition, 2000, 83 S113 – 9
141. Reddy KS, Katan MB, *Diet, nutrition and the prevention of hypertension and cardiovascular diseases*, Public Health Nutrition, 2004; 7: 167 – 86
142. Psaltopoulou T, Naska A, Orfanos P, Trichopoulos D, Mountokalakis T, Trichopoulou A, *Olive oil, the Mediterranean diet, and arterial blood pressure: the Greek European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study*, American Journal of Clinical Nutrition, 2004; 80 1012 – 8

143. Witteman JCM Willett WC Stampfer MJ Colditz GA Sacks FM Speizer FE, *A prospective study of nutritional factors and hypertension among US women*, Circulation, 1989; 80 1320 – 7
144. Stamler J Caggiula A Grandits GA Kjelsberg M Cutler JA, *Relationship to blood pressure of combinations of dietary macronutrients: findings of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT)*, Circulation, 1996; 94 2417 – 23
145. Ascherio A Rimm EB Giovannucci EL Colditz GA Rosner B Willett WC, *A prospective study of nutritional factors and hypertension among US men*, Circulation, 1992; 86, 1475 – 84
146. Trevisan M Krogh V Freudenheim J Blake A Muti P Panico S (1990), *Consumption of olive oil, butter, and vegetable oils and coronary heart disease risk factors*. The Research Group ATS-RF2 of the Italian National Research Council, Journal of the American Medical Association, 263 688 – 92 [Abstract]
147. Liu S, Lee IM, Ajani U, et al., *Intake of vegetables rich in carotenoids and risk of coronary heart disease in men: The Physicians' Health Study*, International Journal of Epidemiology, 2001;30(1):130–5.
148. Pamnani MB, Bryant HJ, Clough DL, Schooley JF., *Increased dietary potassium and magnesium attenuate experimental volume dependent hypertension possibly through endogenous sodium-potassium pump inhibitor*, Clinical and Experimental Hypertension, 2003;25(2):103–15
149. Herrera MD, Perez-Guerrero C, Marhuenda E, Ruiz-Gutierrez V., *Effects of dietary oleic-rich oils (virgin olive and high-oleic-acid sunflower) on vascular reactivity in Wistar- Kyoto and spontaneously hypertensive rats*, British Journal of Nutrition 2001;86(3):349–57
150. Fuchs FD, Chambless LE, Whelton PK, Nieto FJ, Heiss G., *Alcohol consumption and the incidence of hypertension. The Atherosclerosis Risk in Communities Study*, Hypertension, 2001;37(5):1242–50
151. Thadhani R, Camargo CA Jr, Stampfer MJ, Curhan GC, Willett WC, Rimm EB., *Prospective study of moderate alcohol consumption and risk of hypertension in young women*, Archives of Internal Medicine, 2002;162(5):569–74.
152. Engler MM, Engler MB, Pierson DM, Molteni LB, Molteni A., *Effects of docosahexaenoic acid on vascular pathology and reactivity in hypertension*, Experimental Biology Medicine, 2003;228(3):299–307

153. Seppo L, Jauhiainen T, Poussa T, Korpela R., *A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects*, American Journal of Clinical Nutrition, 2003;77(2):326–30
154. Ronald P Mensink, Peter L. Zock, Arlond DM Kester and Martijn B Katan, *Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials*, The American Journal Of Clinical Nutrition, Vol.77, No 5, 1146-1155, 2003
155. McGee DL, Reed DM, Yano K, Kagan A., Tillotson J., *Ten year incidence of coronary heart disease in the Honolulu Heart Program: relationship to nutrient intake*, American Journal of Epidemiology, 1984;119:667-676 [Abstract]
156. Kushi LH, Lew RA, Stare FJ, et al, *Diet and 20-year mortality from coronary heart disease: the Ireland-Boston Heart Study*, The New England Journal of Medicine, 1985; 312:811-818
157. Ascherio A., Rimm EB, Giovannucci EL, Spiegelman D, Stampfer MJ, Willet WC., *Dietary fat and risk of coronary heart disease in men: cohort follow-up study in the United States*, British Medical Journal, 1996;313:84-90
158. Pedro Mata, Odabella Varela, Rodrigo Alonso, Carlos Lahoz, Manuel de Oya, Lina Badimon, *Monounsaturated and Polyunsaturated n-6 Fatty Acid–Enriched Diets Modify LDL Oxidation and Decrease Human Coronary Smooth Muscle Cell DNA Synthesis*, Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 1997;17:2088 -2095
159. Scott M. Grundy and Margo A. Denke, *Dietary influences on serum lipids and lipoproteins*, Journal of Lipid Rerearch, Volume 31, 1990
160. Kratz M, Cullen P, Kannenberg F, et al., *Effects of dietary fatty acids on the composition and oxidizability of low-density lipoprotein*, European Journal of Clinical Nutrition, 2002; 56:72-81
161. Hodson L, Skeaff CM, Chisholm W-AH., *The effect of replacing dietary saturated fat with polyunsaturated or monounsaturated fat on plasma lipids in free-living young adults*, European Journal of Clinical Nutrition, 2001; 55:908-915
162. Kris-Etherton PM, Harris WS, Appel LJ, for the Nutrition Committee. AHA Scientific Statement: *Fish consumption, fish oil, ω -3 fatty acids, and CVD*, Circulation, 2002; 106: 2747–2757
163. He K, Song Y, Daviglus ML, Liu K, Van Horn L, Dyer AR, Greenland P., *Accumulated evidence on fish consumption and coronary heart disease mortality: a meta-analysis of cohort studies*, Circulation, 2004; 109: 2705–2711

164. Michel de Lorgeril, Patricia Salen, Jean-Louis Martin, Isabelle Monjaud, Jacques Delaye, Nicole Mamelle, *Mediterranean Diet, Traditional Risk Factors, and the Rate of Cardiovascular Complications After Myocardial Infarction Final Report of the Lyon Diet Heart Study*, *Circulation*, 1999;99:779-785
165. ML Burr, JF Gilbert and RM Holliday *et al.*, *Effects of changes in fat, fish and fibre intake on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART)*, *The Lancet*, 2 (1989), pp. 757–761[Abstract]
166. GISSI-Prevenzione Investigators, *Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial*, *The Lancet*, Volume 354, Issue 9177 , 7 August 1999, Pages 447-455
167. Penny M. Kris-Etherton, William S. Harris, Lawrence J. Appel, *Fish Consumption, Fish Oil, Omega-3 Fatty Acids, and Cardiovascular Disease*, *Circulation*,. 2002;106:2747
168. Harris WS, *N-3 fatty acids and serum lipoproteins: human studies*, *American Journal of Clinical Nutrition*. 1997; 65(suppl) : 1645S-54S
169. Joanna K Chan, Vivian M Bruce, Bruce E McDonald, *Dietary α -linolenic acid is as effective as oleic and linoleic acid in lowering blood cholesterol in normolipidemic men*, *American Journal of Clinical Nutrition*, 1991;53: 1230-4.
170. Joseph T Judd, Beverly A Clevidence, Richard A Muesing, Janet Wittes, Matthew E Sunkin, and John J Podczasy, *Dietary trans fatty acids: effects on plasma lipids and lipoproteins of healthy men and women*, *American Journal of Clinical Nutrition*, 1994;59:861-8.
171. H. Schroder, J. Marrugat, J. Vila, M.I. Covas and R. Elosua, *Adherence to the traditional Mediterranean diet is inversely associated with body mass index and obesity in a Spanish population*, *Journal of Nutrition*, 134 (2004) (12), pp. 3355–3361. [Abstract]
172. A. Trichopoulou, A. Naska, P. Orfanos and D. Trichopoulos, *Mediterranean diet in relation to body mass index and waist-to-hip ratio: the Greek European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition Study*, *American Journal of Clinical Nutrition*, 82 (2005) (5), pp. 935–940
173. F. Perez-Jimenez, J. Lopez-Miranda, M.D. Pinillos, P. Gomez, E. Paz-Rojas and P. Montilla *et al.*, *A Mediterranean and a high-carbohydrate diet improve glucose metabolism in healthy young persons*, *Diabetologia*, 44 (2001) (11), pp. 2038–2043.
174. K. Esposito, R. Marfella, M. Ciotola, C. Di Palo, F. Giugliano and G. Giugliano *et al.*, *Effect of a Mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomized trial*, *Journal of the American Medical Association*, 292 (2004) (12), pp. 1440–1446.

175. D.J. Toobert, R.E. Glasgow, L.A. Strycker, M. Barrera Jr., J.L. Radcliffe and R.C. Wander *et al.*, *Biologic and quality-of-life outcomes from the Mediterranean Lifestyle Program: a randomized clinical trial*, *Diabetes Care*, 26 (2003) (8), pp. 2288–2293.
176. S. Vincent-Baudry, C. Defoort, M. Gerber, M.C. Bernard, P. Verger and O. Helal *et al.*, *The Medi-RIVAGE study: reduction of cardiovascular disease risk factors after a 3-months intervention with a Mediterranean-type diet or a low-fat diet*, *American Journal of Clinical Nutrition*, 82 (2005) (5), pp. 964–971. [Abstract]
177. M. Ryan, D. McInerney, D. Owens, P. Collins, A. Johnson and G.H. Tomkin, *Diabetes and the Mediterranean diet: a beneficial effect of oleic acid on insulin sensitivity, adipocyte glucose transport and endothelium-dependent vasoreactivity*, *Quarterly Journal of Medicine*, 2000; 93: 85-91 2000
178. Demosthenes B. Panagiotakos, Christina Chrysohoou, Christos Pitsavos, Christodoulos Stefanadis, *Association between the prevalence of obesity and adherence to the Mediterranean diet: the ATTICA study*, *Nutrition*, Volume 22, Issue 5, May 2006, Pages 449-456
179. M.A. Carluccio, L. Siculella, M.A. Ancora, M. Massaro, E. Scoditti and C. Storelli *et al.*, *Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals*, *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 23 (2003), pp. 622–629
180. Cecilia Bellido, José López-Miranda, Pablo Pérez-Martínez, Elier Paz, Carmen Marín, Purificación Gómez, Juan A. Moreno, Rafael Moreno and Francisco Pérez-Jiménez, *The Mediterranean and CHO diets decrease VCAM-1 and E-selectin expression induced by modified low-density lipoprotein in HUVECs*, *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, Volume 16, Issue 8, December 2006, Pages 524-530
181. Pendurthi UR, Williams JT, Rao LV., *Resveratrol, a polyphenolic compound found in wine, inhibits tissue factor expression in vascular cells: a possible mechanism for the cardiovascular benefits associated with moderate consumption of wine*, *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 1999; 19: 419–426
182. Iijima K, Yoshizumi M, Hashimoto M, Akishita M, Kozaki K, Ako J, Watanabe T, Ohike Y, Son B, Yu J, Nakahara K, Ouchi Y., *Red wine polyphenols inhibit vascular smooth muscle cell migration through two distinct signaling pathways*, *Circulation*, 2002; 105: 2404–2410
183. Maria-Isabel Covas *et al.*, *The Effect of Polyphenols in Olive Oil on Heart Disease Risk Factors A Randomized Trial*, *Annals of Internal Medicine*, 2006, Volume 145, Issue 5, Pages 333-341

184. J Salas-Salvadó, A Garcia-Arellano, R Estruch, F Marquez-Sandoval, D Corella, M Fiol, E Gómez-Gracia, E Viñoles, F Arós, C Herrera, C Lahoz, J Lapetra, J S Perona, D Muñoz-Aguado, M A Martínez-González and E Ros for the PREDIMED, *Investigators Components of the mediterranean-type food pattern and serum inflammatory markers among patients at high risk for cardiovascular disease*, European Journal of Clinical Nutrition, advance online publication 18 April 2007; doi: 10.1038/sj.ejcn.1602762
185. Panagiotakos D, Pitsavos C, Polychronopoulos E, Chrysoshoou C, Zampelas A, Trichopoulou A., *Can a Mediterranean diet moderate the development and clinical progression of coronary heart disease? A systematic review*, Medical Science Monitor 2004; 10: 193–8
186. Martinez-Gonzalez MA, Fernandez-Jarne E, Serrano-Martinez M et al, *Mediterranean diet and reduction in the risk of a first acute myocardial infarction: an operational healthy dietary score*, European Journal of Nutrition, 2002;41: 153–60
187. Panagiotakos DB, Pitsavos C, Chrysoshoou C et al, *The role of traditional Mediterranean-type of diet and lifestyle, in the development of acute coronary syndromes: preliminary results from cardio2000 study*, European Journal of Public Health, 2002; 1–2; 7–11
188. Pitsavos C, Panagiotakos DB, Chrysoshoou C et al, *The benefits from Mediterranean diet on the risk of developing acute coronary syndromes in hypercholesterolemic subjects: a case-control study*, (CARDIO2000), Coronary Artery Disease, 2002; 13: 295–300
189. Pitsavos C, Panagiotakos DB, Chrysoshoou C et al, *The effect of the combination of Mediterranean diet and leisure time physical activity on the risk of developing acute coronary syndromes, in hypertensive subjects*, Journal of Human Hypertension, 2002; 16: 517–524
190. Pitsavos C, Panagiotakos DB, Chrysoshoou C et al, *The adoption of Mediterranean diet attenuates the development of acute coronary syndromes in people with the metabolic syndrome*, Nutrition Journal, 2003; 3: 9
191. Anna Bach, Lluís Serra-Majem, Josep L Carrasco, Blanca Roman, Joy Ngo, Isabel Bertomeu and Biel Obrador, *The use of indexes evaluating the adherence to the Mediterranean diet in epidemiological studies: a review*, Public Health Nutrition, 9(1A), 132–146
192. Trichopoulou A, Kouris-Blazos A, Wahlqvist M, Gnardellis D, Lagiou P, Polychronopoulos E, et al., *Diet and overall survival in elderly people*, British Medical Journal 1995;311: 1457–60.

193. Trichopoulou A, Bamia C, Trichopoulos D., *Mediterranean diet and survival among patients with coronary heart disease in Greece*, Archives of Internal Medicine 2005; 165: 929–35
194. Demosthenes B. Panagiotakos, Christos Pitsavos, Fotini Arvaniti, Christodoulos Stefanadis, *Adherence to the Mediterranean food pattern predicts the prevalence of hypertension, hypercholesterolemia, diabetes and obesity, among healthy adults; the accuracy of the MedDietScore*, Preventive Medicine, 44 (2007) 335–340
195. MacRae F Linton, Sergio Fazio, *Cyclooxygenase-2 and inflammation in atherosclerosis*, Current Opinion in Pharmacology 2004, 4:116–123
196. S.M. Prescott and F.A. Fitzpatrick, *Cyclooxygenase-2 and carcinogenesis*, Biochimica et Biophysica Acta, 1470 (2000), pp. M69–M78
197. D.S. Pisetsky and E.W. St. Clair, *Progress in the treatment of rheumatoid arthritis*, Journal of the American Medical Association, 286 (2001), pp. 2787–2790
198. Thomas M. Devlin, *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*, pages 766-770, Wiley-Liss, New York, 2002, Fifth Edition
199. Robert K. Murray et al, *Harper's Illustrated Biochemistry*, Twenty-Sixth Edition, 2003, McGraw-Hill Companies
200. Pomerantz, K., and Hajjar, D., *Eicosanoids in regulation of arterial smooth muscle cell phenotype, proliferative capacity, and cholesterol metabolism*, Arteriosclerosis, 9, 413-429
201. Ikuo Morita, *Distinct functions of COX-1 and COX-2*, Prostaglandins & Other Lipid Mediators, Volumes 68-69, August 2002, Pages 165-175
202. GENATLAS: Gene Database : PTGS2
203. R.M. Botting, *Inhibitors of cyclooxygenases: mechanisms, selectivity and uses*, Journal Of Physiology And Pharmacology 2006, 57, Supp 5, 113.124
204. M. Shitashige, I. Morita and S. Murota, *Different substrate utilization between prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2 in NIH3T3 fibroblasts*, Biochim. Biophys. Acta, 1389 (1998), pp. 57–66
205. W. Chen, T.R. Pawelek and R.J. Kulmacz , *Hydroperoxide dependence and cooperative cyclooxygenase kinetics in prostaglandin H synthase-1 and -2*, Journal of Biological Chemistry, 274 (1999), pp. 20301–20306
206. W.L. Smith, D.L. DeWitt and R.M. Garavito, *Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology*, Annual Reviews of Biochemistry, 69 (2000), pp. 145–182

207. M. Tsujii and R.N. DuBois, *Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase-2*, Cell, 83 (1995), pp. 493–501
208. H. Bamba, S. Ota, A. Kato, C. Kawamoto and F. Matsuzaki, *Effect of prostaglandin E1 on vascular endothelial growth factor production by human macrophages and colon cancer cells*, Journal of Experimental and Clinical Cancer Research, 19 (2000), pp. 219–223 [Abstract]
209. W.L. Xie, J.G. Chipman, D.L. Robertson, R.L. Erikson and D.L. Simmons, *Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing*, Proceedings of the National Academy of Science, U S A, 88 (1991), pp. 2692–2696
210. A. Tay, J.A. Squire, H. Goldberg and K. Skorecki, *Assignment of the human prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2) gene to 1q25 by fluorescence in situ hybridization*, Genomics, 23 (1994), pp. 718–719. [Abstract]
211. H.R. Herschman, *Prostaglandin synthase 2*, Biochimica et Biophysica Acta, 1299 (1996), pp. 125–140
212. D. DeWitt and W.L. Smith, *Yes, but do they still get headaches?*, Cell, 83 (1995), pp. 345–348
213. W.L. Smith, D.L. DeWitt and R.M. Garavito, *Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology*, Annual Reviews Biochemistry, 69 (2000), pp. 145–182
214. B. Su and M. Karin, *Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression*, Current Opinion in Immunology, 8 (1996), pp. 402–411
215. M.A. Cahill, R. Janknecht and A. Nordheim, *Signalling pathways: jack of all cascades*, Current Biology, 6 (1996), pp. 16–19
216. M. Kyriakis and J. Avruch, *Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines*, Bioessays, 18 (1996), pp. 567–577
217. Z. Guan, S.Y. Buckman, B.W. Miller, L.D. Springer and A.R. Morrison, *Interleukin-1beta-induced cyclooxygenase-2 expression requires activation of both c-Jun NH2-terminal kinase and p38 MAPK signal pathways in rat renal mesangial cells*, Journal of Biological Chemistry, 273 (1998), pp. 28670–28676
218. G.G. Sheng, J. Shao, H. Sheng, E.B. Hooton, P.C. Isakson, J.D. Morrow *et al.*, *A selective cyclooxygenase 2 inhibitor suppresses the growth of H-ras-transformed rat intestinal epithelial cells*, Gastroenterology, 113 (1997), pp. 1883–1891
219. H. Sheng, C.S. Williams, J. Shao, P. Liang, R.N. DuBois and R.D. Beauchamp, *Induction of cyclooxygenase-2 by activated Ha-ras oncogene in Rat-1 fibroblasts and the*

- role of mitogen-activated protein kinase pathway*, Journal of Biological Chemistry, 273 (1998), pp. 22120–22127
220. Tadashi Tanabe, Norimitsu Tohnai, *Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression*, Prostaglandins & Other Lipid Mediators, Volumes 68-69, August 2002, Pages 95-114
 221. Stephen T. Smale, James T. Kadonaga, *The RNA Polymerase II Core Promoter*, Annual Reviews of Biochemistry 2003. 72:449–79
 222. W. Du, D. Thanos and T. Maniatis, *Mechanisms of transcriptional synergism between distinct virus-inducible enhancer elements*, Cell, 74 (1993), pp. 887–898 [Abstract]
 223. J.K. Morris and J.S. Richards, *An E-box region within the prostaglandin endoperoxide synthase-2 (PGS-2) promoter is required for transcription in rat ovarian granulosa cells*, Journal of Biological Chemistry, 271 (1996), pp. 16633–16643
 224. Mestre J.R. et al, *Overlapping CRE and E-box promoter elements can independently regulate COX-2 gene transcription in macrophages*, FEBS Letters, Volume 496, Number 2, 11 May 2001, pp. 147-151(5)[Abstract]
 225. D.J. Wadleigh, S.T. Reddy, E. Kopp, S. Ghosh and H.R. Herschman, *Transcriptional activation of the cyclooxygenase-2 gene in endotoxin-treated RAW 264.7 macrophages*, Journal of Biological Chemistry, 275 (2000), pp. 6259–6266
 226. Gallois, A. Habib, J. Tao, S. Moulin, J. Maclouf, A. Mallat *et al.*, *Role of NF-kappaB in the antiproliferative effect of endothelin-1 and tumor necrosis factor-alpha in human hepatic stellate cells. Involvement of cyclooxygenase-2*, Journal of Biological Chemistry, 273 (1998), pp. 23183–23190
 227. Pellikainen JM, Kosma VM, *Activator protein-2 in carcinogenesis with a special reference to breast cancer-A mini review*, International Journal of Cancer, 2007 May 15;120(10):2061-7
 228. Bin Gao, Jianping Chen, Carl Johnson, and George Kunos, *Both the Cyclic AMP Response Element and the Activator Protein 2 Binding Site Mediate Basal and Cyclic AMP-Induced Transcription from the Dominant Promoter of the Rat α_{1B} -Adrenergic Receptor Gene in DDT₁MF-2 Cells*, Molecular Pharmacology, Vol. 52, Issue 6, 1019-1026, 1997
 229. A.S. Baldwin, *The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights*, Annual Reviews of Immunology, 14 (1996), pp. 649–681
 230. L.J. Crofford, B. Tan, C.J. McCarthy and T. Hla, *Involvement of nuclear factor kappa B in the regulation of cyclooxygenase-2 expression by interleukin-1 in rheumatoid synoviocytes*, Arthritis and Rheumatism, 40 (1997), pp. 226–236

231. S. Gerondakis, R. Grumont, I. Rourke and M. Grossmann , *The regulation and roles of Rel/NF- κ B transcription factors during lymphocyte activation*, Current Opinion of Immunology, 10 (1998), pp. 353–359.
232. Kadonaga, J. T., Carner, K. R., Masiarz, F. R., and Tjian, R., *Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain*, Cell, Volume 51, Issue 6, 24 December 1987, Pages 1079-1090 [Abstract]
233. Qing Xu, Yan-Shan Ji, and John F. Schmedtje Jr., *Sp1 Increases Expression of Cyclooxygenase-2 in Hypoxic Vascular Endothelium*, Journal of Biological Chemistry, Vol. 275, Issue 32, 24583-24589, August 11, 2000
234. Fuminori Hirano, Hirotoshi Tanaka, Yoshiko Hirano, Masaki Hiramoto, Hiroshi Handa, Isao Makino, and Claus Scheidereit, *Functional Interference of Sp1 and NF- κ B through the Same DNA Binding Site*, Molecular and Cellular Biology, March 1998, p. 1266-1274, Vol. 18, No.3
235. Karantzoulis-Fegaras, F., Antoniou, H., Lai, S. L., Kulkarni, G., D'Abreo, C., Wong, G. K., Miller, T. L., Chan, Y., Atkins, J., Wang, Y., and Marsden, P. A., *Characterization of the Human Endothelial Nitric-oxide Synthase Promoter*, Journal of Biological Chemistry, Vol. 274, Issue 5, 3076-3093, January 29, 1999
236. T. Abumiya, T. Sasaguri, Y. Taba, Y. Miwa, and M. Miyagi, *Shear Stress Induces Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Flk-1/KDR Through the CT-Rich Sp1 Binding Site*, Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, June 1, 2002; 22(6): 907 - 913.
237. Hata, Y., Duh, E., Zhang, K., Robinson, G. S., and Aiello, L. P., *Transcription Factors Sp1 and Sp3 Alter Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Expression through a Novel Recognition Sequence*, Journal of Biological Chemistry, Vol. 273, Issue 30, 19294-19303, July 24, 1998
238. L. Wang, D. Wei, S. Huang, Z. Peng, X. Le, T. T. Wu, J. Yao, J. Ajani, and K. Xie, *Transcription Factor Sp1 Expression Is a Significant Predictor of Survival in Human Gastric Cancer*, Clinical Cancer Research, December 15, 2003; 9(17): 6371 - 6380.
239. J. C. Yao, L. Wang, D. Wei, W. Gong, M. Hassan, T.-T. Wu, P. Mansfield, J. Ajani, and K. Xie, *Association between Expression of Transcription Factor Sp1 and Increased Vascular Endothelial Growth Factor Expression, Advanced Stage, and Poor Survival in Patients with Resected Gastric Cancer*, Clinical Cancer Research, June 15, 2004; 10(12): 4109 - 4117.

240. A. Papafili, M.R. Hill and D.J. Brull et al., *Common promoter variant in cyclooxygenase-2 represses gene expression: evidence of role in acute-phase inflammatory response*, Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology, 22 (2002), pp. 1631–1636
241. F. Cipollone, E. Toniato and S. Martinotti et al., *A polymorphism in the cyclooxygenase 2 gene as an inherited protective factor against myocardial infarction and stroke*, Journal of the American Medical Association, 291 (2004), pp. 2221–2228
242. Orbe, O. Belouqui, J.A. Rodriguez, M.S. Belzunce, C. Roncal and J.A. Páramo, *Protective effect of the G-765C COX-2 polymorphism on subclinical atherosclerosis and inflammatory markers in asymptomatic subjects with cardiovascular risk factors*, Clinica Chimica Acta, Volume 368, Issues 1-2, June 2006, Pages 138-143
243. F. Cipollone, M. Fazia and A. Iezzi et al., *Suppression of the functionally coupled cyclooxygenase-2/prostaglandin E synthase as a basis of simvastatin-dependent plaque stabilization in humans*, Circulation, 107 (2003), pp. 1479–1485
244. Cipollone F, Fazia M, Iezzi A, et al., *Blockade of the angiotensin II type I receptor stabilizes atherosclerotic plaques in humans by inhibiting PGE2-dependent matrix metalloproteinase activity*, Circulation, 2004;109:1482-1488
245. Cipollone F, Prontera C, Pini B, et al., *Overexpression of functionally coupled cyclooxygenase-2 and prostaglandin E synthase in symptomatic atherosclerotic plaques as a basis of prostaglandin E(2)-dependent plaque instability*, Circulation, 2001; 104:921-927
246. Cullen L, Kelly L, Connor SO, Fitzgerald DJ., *Selective cyclooxygenase-2 inhibition by nimesulide in man*, Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1998; 287:578-582.
247. McAdam BF, Catella-Lawson F, Mardini IA, Kapoor S, Lawson JA, FitzGerald GA., *Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2*, Proceedings of the National Academy of Science, U S A, 1999;96:272-277
248. Thomas M. Morgan, Harlan M. Krumholz, Richard P. Lifton, John A. Spertus, *Nonvalidation of Reported Genetic Risk Factors for Acute Coronary Syndrome in a Large-Scale Replication Study*, JAMA, 2007;297:1551-1561\
249. Peltonen L and McKusick VA., *Genomics and medicine, Dissecting human disease in the postgenomic era*, Science 291: 1224–1229, 2001
250. Patrick J. Stover, *Nutritional genomics*, Physiological Genomics, 16: 161-165, 2004
251. David M. Mutch, Walter Wahli and Gary Williamson, *Nutrigenomics and nutrigenetics: the emerging faces of nutrition*, The FASEB Journal, 2005;19:1602-1616

252. Elliott R and Ong TJ., *Nutritional genomics*, *BMJ*, 324: 1438–1442, 2002
253. José M Ordovas, *Genetic interactions with diet influence the risk of cardiovascular disease*, *American Journal of Clinical Nutrition*, 2006;83(suppl):443S– 6S
254. José M Ordovas, Mooser, Vincent, *Nutrigenomics and nutrigenetics*, *Current Opinion in Lipidology*, Volume 15(2), April 2004, pp 101-108
255. Couture P, Archer WR, Lamarche B, *et al.*, *Influences of apolipoprotein E polymorphism on the response of plasma lipids to the ad libitum consumption of a high-carbohydrate diet compared with a high-monounsaturated fatty acid diet*, *Metabolism*, 2003; 52:1454-1459
256. Lottenberg AM, Nunes VS, Nakandakare ER, *et al.*, *The human cholesteryl ester transfer protein I405V polymorphism is associated with plasma cholesterol concentration and its reduction by dietary phytosterol esters*, *Journal of Nutrition*, 2003; 133:1800-1805 [Abstract]
257. Tai ES, Corella D, Deurenberg-Yap M, *et al.*, *Dietary fat interacts with the -514C>T polymorphism in the hepatic lipase gene promoter on plasma lipid profiles in a multiethnic Asian population: the 1998 Singapore National Health Survey*, *Journal of Nutrition*, 2003; 133:3399-3408[Abstract]
258. Marin C, Lopez-Miranda J, Gomez P, *et al.*, *Effects of the human apolipoprotein A-I promoter G-A mutation on postprandial lipoprotein metabolism*, *American Journal of Clinical Nutrition*, 2002; 76:319-325[Abstract]
259. Siezen CL, van Leeuwen AI, Kram NR, Luken ME, van Kranen HJ, Kampman E., *Colorectal adenoma risk is modified by the interplay between polymorphisms in arachidonic acid pathway genes and fish consumption*, *Carcinogenesis*, 2005; 26: 449-57
260. Maria Hedelin, Ellen T. Chang , Fredrik Wiklund, Rino Bellocco, Åsa Klint, Jan Adolfsson, Katarina Shahedi, Jianfeng Xu, Hans-Olov Adami, Henrik Grönberg, Katarina Augustsson Bälter, *Association of frequent consumption of fatty fish with prostate cancer risk is modified by COX-2 polymorphism*, *International Journal of Cancer*, 2006; Volume 120, Issue 2, Pages 398-405
261. W-P Koh, J-M Yuan, D van den Berg, H-P Lee, MC Yu, *Interaction between cyclooxygenase – 2 gene polymorphism and dietary polyunsaturated fatty acids on colon cancer risk: The Singapore Chinese Health Study*, *British Journal of Cancer*, 2004, Volume 90, Pages 1760-1764
262. Mackenbach et al 2000 J.P. Mackenbach, A.E. Cavelaars, A.E. Kunst and F. Groenhouf, *Socioeconomic inequalities in cardiovascular disease mortality; an international study*, *European Heart Journal* 21 (2000), pp. 1141–1151.

263. Laila Abdullah, Ghania Ait-Ghezala, Fiona Crawford, Timothy A. Crowell, Warren W. Barker, Ranjan Duara, Michael Mullan, *The cyclooxygenase 2 -765 C promoter allele is a protective factor for Alzheimer's disease*, Neuroscience Letters, Volume 395, Issue 3, 13 March 2006, Pages 240-243