



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ: «ΚΛΙΝΙΚΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

*«Διατροφή και ψευδάργυρος στην τρίτη ηλικία. Εκτίμηση βιοχημικών
γενετικών και παραγόντων του τρόπου ζωής στην υγιή γήρανση»*

Κανόνη Σταυρούλα dp423417



Επιβλέπων καθηγητής: ΔΕΛΟΥΣΗΣ Γ.

Επίκουρος καθηγητής

Τριμελής επιτροπή: ΔΕΛΟΥΣΗΣ Γ.

Επίκουρος καθηγητής

ΜΑΝΙΟΣ Ι.

Λέκτορας

ΠΑΝΑΓΙΩΤΑΚΟΣ Δ.

Λέκτορας

ΑΘΗΝΑ 2005

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	Σελ. 4
1. Εισαγωγή	Σελ. 5
1.1 Το γήρας	Σελ. 6
1.1.1 Θεωρίες γήρατος	Σελ. 6
1.2 Δείκτες μακροβιότητας και νοσηρότητας	Σελ. 8
1.2.1 Παχυσαρκία-σαρκοπενία	Σελ. 8
1.2.2 Δυσλιπιδαιμία	Σελ. 10
1.2.3 Μεταβολικό σύνδρομο	Σελ. 11
1.2.4 Φλεγμονώδεις παράγοντες	Σελ. 12
1.2.5 Γενετικοί δείκτες	Σελ. 12
1.2.6 Παράγοντες συμπεριφοράς	Σελ. 13
1.3 Διατροφή στην τρίτη ηλικία	Σελ. 14
1.3.1 Μεσογειακή διατροφή και μακροβιότητα	Σελ. 14
1.3.2 Ο ψευδάργυρος στην τρίτη ηλικία	Σελ. 15
1.4 C- αντιδρώσα πρωτεΐνη	Σελ. 19
2. Πειραματικό μέρος	Σελ. 20
2.1 Σκοπός	Σελ. 20
2.2 Δείγμα	Σελ. 20
2.2.1 Έρευνα Zincage	Σελ. 20
2.2.2 Κριτήρια εθελοντικής συμμετοχής	Σελ. 21
2.3 Ανθρωπομετρικές και κλινικές παράμετροι	Σελ. 21
2.4 Ερωτηματολόγια	Σελ. 22
2.5 Αιμοληψία	Σελ. 23
2.5.1 Απομόνωση ορού	Σελ. 23
2.5.2 Απομόνωση DNA	Σελ. 24
2.6 Βιοχημικές παράμετροι	Σελ. 25

2.6.1	Κριτήρια μέτρησης CRP	Σελ. 25
2.6.2	Μέτρηση CRP με ανοσοενζυματική μέθοδο	Σελ. 26
2.7	Γενετικές παράμετροι	Σελ. 27
2.7.1	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	Σελ. 29
2.7.2	Έλεγχος επιτυχίας PCR	Σελ. 32
2.7.3	Πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση	Σελ. 34
2.7.4	Έλεγχος του προϊόντος της πέψης	Σελ. 36
2.8	Διαλύματα	Σελ. 37
2.9	Στατιστική επεξεργασία	Σελ. 38
3.	Αποτελέσματα	Σελ. 39
3.1	Δημογραφικά χαρακτηριστικά του δείγματος	Σελ. 39
3.2	Διατροφική αξιολόγηση και εκτίμηση επαρκούς πρόσληψης ψευδαργύρου	Σελ. 40
3.3	Σύγκριση ανθρωπομετρικών, κλινικών και βιοχημικών χαρακτηριστικών ανά φύλο και κατάσταση υγείας	Σελ. 42
3.4	Αποτελέσματα PCR και πέψης	Σελ. 47
3.5	Συχνότητα γονότυπων και αλληλομόρφων στο δείγμα	Σελ. 49
3.6	Έλεγχος συσχέτισης του πολυμορφισμού -286C/T/A με χαρακτηριστικά του δείγματος	Σελ. 50
3.7	Υπολογισμός συγκέντρωσης CRP με την μέθοδο ELISA	Σελ. 51
3.8	Χαρακτηριστικά των ατόμων σύμφωνα με τα επίπεδα CRP	Σελ. 52
3.9	Επίπεδα CRP και ο πολυμορφισμός -286C/T/A	Σελ. 54
3.10	Έλεγχος συσχέτισης του πολυμορφισμού με τα επίπεδα CRP, βιοχημικούς, κλινικούς δείκτες και διατροφή	Σελ. 55
4.	Συζήτηση	Σελ. 57
5.	Βιβλιογραφία	Σελ. 61

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

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

Στην παρούσα έρευνα μελετήθηκαν δημογραφικά στοιχεία, ιατρικό ιστορικό, διατροφικές συνήθειες, βιοχημικοί δείκτες (ολική χοληστερόλη, HDL-C, LDL-C, τριγλυκερίδια, γλυκόζη), ο δείκτης μάζας σώματος και η αρτηριακή πίεση σε δείγμα 435 (288 γυναίκες και 147 άντρες) ηλικιωμένων άνω των 60 ετών ($M \pm SD$: $73,70 \pm 7,0$ έτη). Παράλληλα, μετρήθηκε η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) και η συχνότητα εμφάνισης του πολυμορφισμού -286 C/T/A στο γονίδιο της CRP.

Τα αποτελέσματα έδειξαν αυξημένη συχνότητα εμφάνισης υπέρβαρου (40,2%) και παχυσαρκίας (48,0%) στους ηλικιωμένους, αυξημένη συχνότητα εμφάνισης υπέρτασης (76,4%), και υπερχοληστερολαιμίας (77,8%). Οι ηλικιωμένες γυναίκες εμφάνιζαν υψηλότερο δείκτη μάζας σώματος και ολικής χοληστερόλης από τους άντρες. Η συχνότητα εμφάνισης των αλληλομόρφων για τον πολυμορφισμό -286C/T/A του γονιδίου της CRP ήταν C: 51,0%, T: 41,3% και A: 7,7%. Βρέθηκε σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού με τα επίπεδα της CRP. Τα άτομα με γονότυπο CA ή TA εμφάνιζαν υψηλότερα επίπεδα CRP συγκριτικά με τα άτομα CC και τα άτομα CT ($M \pm SD$: $4,65 \pm 3,3$ mg/dl έναντι $2,02 \pm 2,2$ mg/dl, $p < 0,001$, και έναντι $2,75 \pm 2,5$ mg/dl, $p = 0,014$, αντίστοιχα). Τα επίπεδα CRP είχαν σημαντική θετική επίδραση από το δείκτη μάζας σώματος ($\beta = 0,259$, $p < 0,001$) και αρνητική επίδραση από την κατανάλωση θαλασσινών ($\beta = -0,128$, $p = 0,039$).

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι ηλικιωμένοι αντιπροσωπεύουν ένα αυξανόμενο τμήμα του Ευρωπαϊκού πληθυσμού, κυρίως λόγω της αύξησης του προσδόκιμου επιβίωσης και της μείωσης της νεογνικής θνησιμότητας. Το 1995 το 16% (58 εκατομμύρια) του πληθυσμού της Ευρώπης ήταν ηλικιωμένοι (>65 ετών) και το 3% (13 εκατομμύρια) πάνω από 80 ετών. Δημογραφικές απεικονίσεις προβλέπουν ότι ως το 2050, το 32% του πληθυσμού θα είναι πάνω από 65 ετών και το 11% πάνω από 80 ετών στην πλειοψηφία τους γυναίκες. Το 1998, η Ιταλία και η Ελλάδα ήταν οι χώρες με το μεγαλύτερο ποσοστό ηλικιωμένων (23%) (1).

Ενώ ένα σημαντικό ποσοστό των ηλικιωμένων διατηρούν καλή κατάσταση υγείας, τα γηρατειά σχετίζονται με αυξημένη συχνότητα εμφάνισης νοσημάτων. Τα γηρατειά επιδρούν στην λειτουργία των περισσότερων φυσιολογικών συστημάτων του οργανισμού, αυξάνοντας τον κίνδυνο νοσηρότητας και θνησιμότητας. Η απορύθμιση του ανοσολογικού συστήματος συνεισφέρει κυρίως στη αύξηση της νοσηρότητας και θνησιμότητας λόγω της αυξημένης συχνότητας εμφάνισης λοιμώξεων και καρκίνου και αυτοάνοσων φαινομένων που εμπλέκονται σε ασθένειες του γήρατος, όπως η αθηροσκλήρυνση (2). Από την άλλη μεριά, οι ηλικιωμένοι που φτάνουν μέχρι τα βαθιά γηρατειά έχουν αποφύγει σημαντικές ασθένειες του γήρατος, όπως καρδιαγγειακά νοσήματα, σακχαρώδη διαβήτη και καρκίνο, ασθένειες υπεύθυνες για το μεγαλύτερο ποσοστό θανάτων στους ηλικιωμένους (3).

Προσπάθειες για την πιστοποίηση παραγόντων κινδύνου για την λειτουργική έκπτωση και τη θνησιμότητα στους ηλικιωμένους έχουν εντατικοποιηθεί τα τελευταία χρόνια. Δημογραφικά στοιχεία, παράγοντες του τρόπου ζωής, διατροφικές συνήθειες, βιολογικοί δείκτες και γενετικό υπόβαθρο είναι υποψήφιοι παράγοντες για προβλεπτική αξία στη νοσηρότητα ή στη μακροβιότητα στην τρίτη ηλικία.

1.1 ΤΟ ΓΗΡΑΣ - ΘΕΩΡΙΕΣ ΓΗΡΑΤΟΣ

Βιολογικά, επιδημιολογικά και δημογραφικά δεδομένα αποτελούν βάση για την δημιουργία αρκετών θεωριών που αποσκοπούν στην εξακρίβωση της αιτίας ή της διαδικασίας του γήρατος και του αναπόφευκτου θανάτου. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια, η αναζήτηση μιας μόνο ανεξάρτητης αιτίας για τη γήρανση, όπως ένα γονίδιο ή η έκπτωση ενός οργανικού συστήματος, έχει αντικατασταθεί από την θεώρηση των γηρατειών ως μιας ιδιαίτερα περίπλοκης και πολυπαραγοντικής διαδικασίας. Επομένως, οι διάφορες θεωρίες του γήρατος δεν είναι αποκλειστικές και κάθε μια μπορεί να περιγράψει επαρκώς κάποια ή όλα τα χαρακτηριστικά των φυσιολογικών γηρατειών μόνη της ή σε συνδυασμό με άλλες θεωρίες. Οι θεωρίες του γήρατος που έχουν διατυπωθεί κατά καιρούς μπορούν να ομαδοποιηθούν στις εξής κατηγορίες: εξελικτικές θεωρίες, μοριακές θεωρίες, κυτταρικές θεωρίες, συστηματικές θεωρίες.

Η εξελικτική θεωρία του γήρατος διατυπώθηκε αρχικά τη δεκαετία του '40 και οι βασικές αρχές της, σύμφωνα με τις οποίες εξηγεί το φαινόμενο της γήρανσης, είναι η μείωση της δύναμης της φυσικής επιλογής με το πέρασμα των χρόνων. Σύμφωνα με τις επιμέρους θεωρίες που συγκαταλέγονται σε αυτή την κατηγορία, η εξέλιξη ασκεί πιέσεις προς την αύξηση της αναπαραγωγικής ικανότητας και όχι για την μακροβιότητα (4). Επομένως, μεταλλάξεις που επιδρούν στην υγεία σε μεγάλες ηλικίες δεν υπόκεινται στην αρνητική πίεση της φυσικής επιλογής. Παράλληλα, τα σωματικά κύτταρα μετά το πέρας της αναπαραγωγικής δυνατότητάς τους καθίστανται αναλώσιμα. Στη βάση της ίδιας θεωρίας, διατυπώνεται επίσης πως γονίδια ευεργετικά για νέες ηλικίες έχουν καταστροφικές συνέπειες για τα μετέπειτα χρόνια της ζωής, ωστόσο διατηρούνται στην εξέλιξη γιατί εξυπηρετούν τον βασικό σκοπό της φυσικής επιλογής που είναι η αναπαραγωγή (5).

Οι υποθέσεις που συγκαταλέγονται στην μοριακή θεωρία του γήρατος, υποστηρίζουν πως το γήρας οφείλεται σε αλλαγές της γονιδιακής έκφρασης (6). Η μετάφραση της γενετικής πληροφορίας δεν γίνεται με ακρίβεια, με αποτέλεσμα να παράγονται μη φυσιολογικές πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες αυτές συντελούν στην αύξηση των επιπέδων μοριακών ζημιών που επιδεινώνουν περαιτέρω τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και την απώλεια της κυτταρικής διαφοροποίησης (5).

Οι κυτταρικές θεωρίες του γήρατος υποστηρίζουν πως το γήρας είναι αποτέλεσμα αύξησης των γηρασμένων κυττάρων. Τα γηρασμένα κύτταρα είναι αποτέλεσμα του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ή άλλων στρεσογόνων παραγόντων. Η γήρανση λόγω κυτταρικού πολλαπλασιασμού είναι αποτέλεσμα απώλειας τελομερών (επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες στο τέλος κάθε χρωμοσώματος). Σε κάθε κυτταρικό πολλαπλασιασμό χάνεται ένα μικρό κομμάτι τελομερών, που αθροιστικά οδηγεί αλλαγή της δομής και λειτουργίας των τελομερών και σε γήρανση πολλαπλασιασμού (replicate senescence) (7). Η γήρανση των κυττάρων μπορεί επίσης να προκαλείται από τη συσσώρευση ελευθέρων ριζών στο κύτταρο που καταστρέφουν δομικά λιπίδια, πρωτεΐνες και DNA (8). Οι ελεύθερες ρίζες φαίνεται πως επιδρούν κυρίως στο μιτοχονδριακό DNA

προκαλώντας μεταλλάξεις που απορυθμίζουν την κυτταρική λειτουργία (8). Τα φαινόμενα αυτά, σε συνδυασμό με τη συσσώρευση φυσιολογικών κυτταρικών τραυματισμών πυροδοτούν την έναρξη της διαδικασίας του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου ή και της απόπτωσης (5).

Η συστηματική θεωρία της γήρανσης υποστηρίζει πως αλλαγές στον νευροενδοκρινολογικό έλεγχο της ομοιόστασης και έκπτωση της ανοσολογικής λειτουργίας οδηγούν στην γήρανση του οργανισμού (5). Η θεωρία της ανοσογήρανσης (immunosenescence) καταλαμβάνει τα τελευταία χρόνια ένα σημαντικό κομμάτι του διεθνούς επιστημονικού ενδιαφέροντος, καθώς φαίνεται πως εξηγεί σε μεγάλο βαθμό την πορεία του οργανισμού προς τη γήρανση και το θάνατο. Σύμφωνα με τη θεωρία της ανοσογήρανσης, η χρόνια ευαισθητοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος από αντιγόνα που δρα προστατευτικά απέναντι σε νοσήματα στα νεότερα χρόνια, έχει ως αποτέλεσμα την σταδιακή επιδείνωση προφλεγμονώδους κατάστασης στον οργανισμό και την έκπτωση της ανοσοποιητικής λειτουργίας (9). Τα παρατεταμένα υψηλά επίπεδα κυτταροκινών (IL-3, IL-6, TNF-α κ.α.) ως αποτέλεσμα χρόνιου αντιγονικού στρες πιθανόν να πυροδοτεί φλεγμονώδη νοσήματα (αθηροσκλήρυνση, Alzheimer, διαβήτη, καρκίνο) στην τρίτη ηλικία (10). Η βασική υπόθεση της θεωρίας είναι πως όσο πιο επιτυχές είναι το ανοσοποιητικό σύστημα στην αντιμετώπιση λοιμώξεων και νοσημάτων στη διάρκεια της ζωής, τόσο πιο επιρρεπής γίνεται ο οργανισμός σε φλεγμονώδη νοσήματα καθώς γερνά (9, 10).

1.2 ΔΕΙΚΤΕΣ ΜΑΚΡΟΒΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΝΟΣΗΡΟΤΗΤΑΣ

1.2.1 ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑ - ΣΑΡΚΟΠΕΝΙΑ

Το γήρας συνοδεύεται από πλήθος μεταβολών στις φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού. Όσον αφορά σε σωματομετρικές παραμέτρους, παρατηρείται μείωση στο ύψος με το πέρασ της ηλικίας (2-3 εκατοστά ανά δεκαετία μετά τα 65 χρόνια, ενώ παρατηρείται και μείωση στο σωματικό βάρος (0-0,65 κιλά/ έτος) μετά τα 65 έτη ηλικίας (11). Η πιο αξιοσημείωτη μεταβολή είναι στη σύσταση σώματος, όπου μετά τα 20-30 έτη ζωής παρατηρείται σταδιακή μείωση στην άλιπη μάζα σώματος και αύξηση στο λιπώδη ιστό (12, 13). Η άλιπη μάζα σώματος (κυρίως σκελετικοί μύες) μειώνεται έως και 40% από την ηλικία των 20 έως την ηλικία των 70 ετών (14). Παράλληλα, με την αύξηση της ηλικίας σημειώνεται σταδιακή μείωση του υποδόριου λίπους και αύξηση του σπλαχνικού και συνολικού λίπους (13). Η σημαντική μείωση στην άλιπη μάζα σώματος στους ηλικιωμένους οδηγεί στην κλινική κατάσταση της σαρκοπενίας, που χαρακτηρίζεται από κόπωση, εξάντληση, απώλεια βάρους, αδυναμία (15).

Παράλληλα, η συχνότητα εμφάνισης υπέρβαρου και παχυσαρκίας στους ηλικιωμένους (>60 ετών) είναι συνεχώς αυξανόμενη. Οι παράγοντες που ευνοούν την παχυσαρκία στους ηλικιωμένους περιλαμβάνουν το θετικό ενεργειακό ισοζύγιο, τη μειωμένη φυσική δραστηριότητα, οικονομικούς και κοινωνικούς λόγους (αγορά φτηνών και μη θρεπτικών τροφίμων), κατάθλιψη (16). Οι γυναίκες στην τρίτη ηλικία εμφανίζουν σε μεγαλύτερο ποσοστό παχυσαρκία και σε μικρότερο ποσοστό υπέρβαρο σε σχέση με τους άντρες, φαινόμενο που πιθανά οφείλεται στο γεγονός ότι οι γυναίκες παρουσιάζουν μεγαλύτερη τάση στη αύξηση βάρους και λιπώδους ιστού, κυρίως μετεμμηνοπαυσιακά (14, 16). Παρά τον αυξανόμενο ρυθμό του ηλικιωμένου πληθυσμού και των αυξανόμενων ποσοστών παχυσαρκίας ιδιαίτερα στις ανεπτυγμένες και αναπτυσσόμενες κοινωνίες, η παχυσαρκία στην τρίτη ηλικία δεν είναι ιδιαίτερα μελετημένη. Τα περιορισμένα επιδημιολογικά δεδομένα καταδεικνύουν μεγάλο εύρος επιπολασμού της παχυσαρκίας ανάλογα με την γεωγραφική τοποθεσία στον ερευνητικό σχεδιασμό. Στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής η μελέτη NHANES III καταγράφει το 64.0% των γυναικών και το 70.0% των αντρών ηλικίας 60-69 ετών, υπέρβαρους ή παχύσαρκους (17), ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά είναι χαμηλότερα για τους ηλικιωμένους πάνω από 70 ετών (56.1% των γυναικών και 61.1% των αντρών) (18). Η ίδια μελέτη εμφανίζει προοπτικά στοιχεία αύξησης των ποσοστών παχυσαρκίας σε διάρκεια μιας δεκαετίας (1991-2001) κατά 56% στους ηλικιωμένους 60-69 ετών και κατά 36% στους ηλικιωμένους άνω των 70 ετών (19). Χαμηλά ποσοστά παχυσαρκίας καταγράφονται σε ηλικιωμένους άνω των 50 ετών (16% στους άντρες και 33% στις γυναίκες) στην Ιερουσαλήμ (20) και στην Ταϊβάν, όπου 41,3% των γυναικών και 30,5% των αντρών (≥65 ετών) είναι υπέρβαροι ή παχύσαρκοι (21). Στις μεσογειακές χώρες η συχνότητα εμφάνισης της παχυσαρκίας στην τρίτη ηλικία είναι υψηλότερη. Σε επιδημιολογική μελέτη με δείγμα 3356 ηλικιωμένους Ιταλούς (65-84 χρονών), βρέθηκε 48,6% των αντρών και 54,9% των γυναικών με Δ.Μ.Σ. ≥25 kg/m² (22), ενώ στη νότια Ιταλία τα ποσοστά ήταν υψηλότερα (76% στους

άντρες και 86% στις γυναίκες) (23). Σε Ισπανικό πληθυσμό ηλικιωμένων η συχνότητα εμφάνισης υπέρβαρου και παχυσαρκίας υπολογίζεται σε 49% και 31,5% αντίστοιχα στους άντρες και 39,8% και 40,8% αντίστοιχα στις γυναίκες (24). Στην Ουγγαρία τα ποσοστά διαφοροποιούνται ανάμεσα στα δύο φύλα, όπου 51,5% των ηλικιωμένων γυναικών εμφανίζουν υπέρβαρο ή παχυσαρκία και 70,9% των αντρών (25).

Ωστόσο, η επίδραση της παχυσαρκίας στη θνησιμότητα των ηλικιωμένων παραμένει αμφιλεγόμενη. Στις περισσότερες μελέτες δεν έχει βρεθεί στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στο αυξημένο δείκτη μάζα σώματος και την θνησιμότητα, παρά το μεγάλο αριθμό πληθυσμιακού δείγματος (26). Επιπρόσθετα, ενώ κάποιες μελέτες εντόπισαν σημαντική συσχέτιση U-μορφής ή γραμμική ανάμεσα στο δείκτη μάζα σώματος και τη συνολική θνησιμότητα ή τη θνησιμότητα από καρδιαγγειακά νοσήματα, η συσχέτιση ήταν υπαρκτή για τιμές Δ.Μ.Σ. μεγαλύτερες από 28 kg/m² (27, 28, 29, 30, 31, 32). Παράλληλα, η συσχέτιση αυτή φαίνεται να εξασθενεί στους ηλικιωμένους άνω των 70 ετών (28, 30, 31, 33, 34). Προοπτικές μελέτες έχουν δείξει πως ο μειωμένος δείκτης μάζας σώματος σχετίζεται με μεγαλύτερο κίνδυνο θνησιμότητας από την παχυσαρκία σε ηλικιωμένους άνω των 70 ετών (34, 35). Τα δεδομένα των περισσότερων επιδημιολογικών μελετών επισημαίνουν πως ο ιδεατός δείκτης μάζας σώματος για τους ηλικιωμένους θα πρέπει να είναι υψηλότερος από τα σημερινά φυσιολογικά όρια.

Σε σχέση με τη νοσηρότητα, πρόσφατες μελέτες προτείνουν σημαντική συσχέτιση του αυξημένου δείκτη μάζας σώματος και στα δύο φύλα με το σύνδρομο αδυναμίας (frailty syndrome) στους ηλικιωμένους (36, 37). Αποτέλεσμα της σαρκοπενικής παχυσαρκίας στους ηλικιωμένους, απώλεια σκελετικών μυών και αύξηση λιπώδους ιστού, είναι η μειωμένη φυσική δραστηριότητα, ο αυξημένος κίνδυνος για εμφάνιση αρθρίτιδας, οι διαταραχές της αναπνευστικής λειτουργίας, η προδιάθεση για την εμφάνιση μεταβολικού συνδρόμου και η επιδείνωση ινσουλινοαντίστασης (13, 15). Παράλληλα, η αύξηση του σπλαχνικού λίπους, κεντρικού τύπου παχυσαρκία, φαίνεται σχετίζεται με την υπέρταση (38) και τη δυσλιπιδαιμία (39).

1.2.2 ΔΥΣΛΙΠΙΔΑΙΜΙΑ

Η δυσλιπιδαιμία είναι αρκετά συχνή στους ηλικιωμένους, με τις ηλικιωμένες γυναίκες να εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα ολικής χοληστερόλης από τους άντρες (40, 41). Παρότι στους μεσήλικες τα επίπεδα ολικής χοληστερόλης και LDL χοληστερόλης είναι αποδεδειγμένα παράγοντες κινδύνου για καρδιαγγειακά νοσήματα, στους ηλικιωμένους ο ρόλος των λιποπρωτεϊνών παραμένει αδιευκρίνιστος. Κάποιες μελέτες έχουν δείξει πως τα επίπεδα ολικής χοληστερόλης είναι σημαντικός προβλεπτικός δείκτης στεφανιαίας νόσου στους ηλικιωμένους άντρες (42, 43, 44, 45), ωστόσο στις περισσότερες μελέτες η συσχέτιση αυτή δεν φαίνεται να ισχύει μετά την ηλικία των 80 ετών (42, 44). Ωστόσο, μεγάλες προοπτικές μελέτες δεν έχουν εντοπίσει σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα αυξημένα επίπεδα ολικής χοληστερόλης και τη θνησιμότητα σε πληθυσμούς ηλικιωμένων (46, 47). Όσον αφορά στις ηλικιωμένες γυναίκες, οι περισσότερες μελέτες συναινούν στην έλλειψη συσχέτισης ανάμεσα στα υψηλά επίπεδα ολικής χοληστερόλης και στον κίνδυνο καρδιαγγειακών νοσημάτων (42, 44). Η σχέση ανάμεσα στα επίπεδα ολικής χοληστερόλης και LDL χοληστερόλης φαίνεται πως είναι U-μορφής στους ηλικιωμένους (45, 48), όπου χαμηλά επίπεδα λιπιδίων σχετίζονται με αυξημένη θνησιμότητα και το σύνδρομο αδυναμίας και στα δύο φύλα (40, 45) και με μεγαλύτερη θνησιμότητα από νεοπλαστικά νοσήματα στις ηλικιωμένες γυναίκες (45).

Ο ρόλος της HDL χοληστερόλης στην τρίτη ηλικία φαίνεται να είναι καλύτερα αποδεδειγμένος, καθώς θεωρείται σημαντικός παράγοντας μακροβιότητας. Οι υγιείς ηλικιωμένοι παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα HDL χοληστερόλης σε σχέση με νεότερες ηλικίες (48), ενώ η πλειοψηφία των ηλικιωμένων άνω των 70 ετών (~90%) έχουν επίπεδα HDL χοληστερόλης πάνω από 40 mg/dl (49). Οι ηλικιωμένες γυναίκες εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα HDL χοληστερόλης (περίπου κατά 10 mg/dl) από τους άντρες (50). Τα επίπεδα HDL χοληστερόλης φαίνεται από πολλές μελέτες να έχουν αθηροπροστατευτικό ρόλο στην τρίτη ηλικία, καθώς εμφανίζουν ισχυρή αρνητική συσχέτιση με τον κίνδυνο θανάτου από στεφανιαία νόσο, έμφραγμα μυοκαρδίου, εγκεφαλικό (43, 44, 51, 52, 53, 54, 55). Οι επιδημιολογικές ενδείξεις προτείνουν την HDL χοληστερόλη ως σημαντικό παράγοντα μακροβιότητας, μέσω μηχανισμών που περιλαμβάνουν αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές της, όπως μειωμένη οξείδωση της LDL χοληστερόλης, μειωμένη έκφραση μορίων προσκόλλησης στο ενδοθήλιο, ενίσχυση παραγωγής ενδοθηλιακού νιτρικού οξέος και μειωμένη κυτταρική απόπτωση (56).

Τα αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων φαίνεται πως είναι ασθενής παράγοντας κινδύνου στεφανιαίων επεισοδίων στις ηλικιωμένες γυναίκες και όχι στους άντρες (57), ενώ σε άλλες μελέτες δεν έχει βρεθεί συσχέτιση της υπετριγλυκεριδαιμίας με τον κίνδυνο εκδήλωσης εγκεφαλικού, περιφερικής αρτηριακής νόσου ή αθηροσκλήρυνσης σε ηλικιωμένους (58).

1.2.3 ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ

Το μεταβολικό σύνδρομο αποτελεί αποδεδειγμένα παράγοντα κινδύνου για καρδιαγγειακά νοσήματα και αυξημένη θνησιμότητα (59, 60). Έχουν διαμορφωθεί δύο σετ κριτηρίων για τον ορισμό του μεταβολικού συνδρόμου. Σύμφωνα με τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας η διάγνωση του μεταβολικού συνδρόμου γίνεται με την παρουσία τριών ή περισσότερων από τα ακόλουθα χαρακτηριστικά: διαγνωσμένος διαβήτης ή γλυκόζη πλάσματος ≥ 140 mg/dl δύο ώρες μετά από φόρτιση με γλυκόζη, συστολική πίεση ≥ 140 mmHg ή/και διαστολική πίεση ≥ 90 mmHg, επίπεδα τριγλυκεριδίων > 150 mg/dl ή HDL χοληστερόλη < 35 mg/dl στους άντρες και < 39 mg/dl στις γυναίκες, λόγος περιφέρειας μέσης γοφών $> 0,9$ στους άντρες και $> 0,85$ στις γυναίκες ή δείκτης μάζας σώματος > 30 kg/m² (61). Σύμφωνα με το ATP III (62) η διάγνωση του μεταβολικού συνδρόμου γίνεται με την παρουσία τριών ή περισσότερων από τα ακόλουθα χαρακτηριστικά: περιφέρεια μέσης > 102 εκατοστά για τους άντρες και > 88 εκατοστά για τις γυναίκες, τριγλυκερίδια ≥ 150 mg/dl, HDL χοληστερόλη < 40 mg/dl για τους άντρες και < 50 mg/dl για τις γυναίκες, αρτηριακή πίεση $\geq 130/ \geq 85$ mmHg και γλυκόζη νηστείας ≥ 110 mg/dl (62).

Τα περισσότερα χαρακτηριστικά του μεταβολικού συνδρόμου υπάρχουν στους ηλικιωμένους. Υπολογίζεται από επιδημιολογικά δεδομένα πως τα επίπεδα γλυκόζης νηστείας αυξάνονται κατά 1-2 mg/dl και τα μεταγευματικά επίπεδα γλυκόζης αυξάνονται κατά 10-20 mg/dl για κάθε δεκαετία ζωής μετά τα 30 χρόνια ζωής (63). Η υπεργλυκαιμία και ο διαβήτης τύπου 2 έχουν μεγάλη συχνότητα εμφάνισης στους ηλικιωμένους, ενώ η σταδιακή εκδήλωση ινσουλινοαντίστασης με την αύξηση της ηλικίας φαίνεται πως σχετίζεται με την κεντρικού τύπου παχυσαρκία και την μειωμένη φυσική δραστηριότητα (64). Παράλληλα, η αύξηση της ηλικίας συνοδεύεται με αύξηση των επιπέδων της συστολικής αρτηριακής πίεσης, ενώ η διαστολική αρτηριακή πίεση σταθεροποιείται ή και μειώνεται μετά τα 60 έτη (65). Παρά το γεγονός ότι οι ηλικιωμένοι συγκεντρώνουν τα περισσότερα από τα χαρακτηριστικά του μεταβολικού συνδρόμου, η συχνότητα εμφάνισής του και η επίδρασή του στη νοσηρότητα και θνησιμότητα ηλικιωμένων πληθυσμών δεν είναι καλά μελετημένη. Πρόσφατη επιδημιολογική μελέτη κατέγραψε συχνότητα εμφάνισης του μεταβολικού συνδρόμου σε ηλικιωμένους μεταξύ 21-28%, ανάλογα με τα κριτήρια προσδιορισμού (66). Στην ίδια έρευνα βρέθηκε πως η παρουσία μεταβολικού συνδρόμου είναι ισχυρός και ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων στην τρίτη ηλικία (66).

1.2.4 ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΕΙΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Αυξημένη φλεγμονώδης δράση συνοδεύει το γήρας και είναι χαρακτηριστικό της παθολογικής διαδικασίας εκδήλωσης καρδιαγγειακών νοσημάτων και αυξημένης νοσηρότητας. Αρκετές μελέτες σε ηλικιωμένους πληθυσμούς καταγράφουν αυξημένα επίπεδα δεικτών φλεγμονής. Από τις κυτταροκίνες, η IL-6 και ο TNF-α φαίνεται πως αυξάνονται στην τρίτη ηλικία 2-4 φορές σε σχέση με νεότερες ηλικίες (67, 68), ενώ μέτρια αύξηση παρατηρείται και στα επίπεδα της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης στους ηλικιωμένους άντρες (69, 70).

Οι περισσότερες μελέτες προτείνουν πως τα επίπεδα TNF-α, IL-6 και CRP αποτελούν ανεξάρτητους παράγοντες κινδύνου νοσηρότητας και θνησιμότητας στην τρίτη ηλικία. Συσχετίζονται τόσο με τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων, όσο και με τον κίνδυνο εμφάνισης ή επιδείνωσης κατάθλιψης, περιοδοντίτιδας, αναπνευστικών νοσημάτων, αρθρίτιδας, οστεοπόρωσης, έκπτωσης γνωστικών λειτουργιών και με αυξημένη θνησιμότητα (71, 72). Παράλληλα, τα αυξημένα επίπεδα κάποιων κυτταροκινών στους ηλικιωμένους φαίνεται πως συντελούν και άμεσα ή και έμμεσα στη σαρκοπενία και το σύνδρομο αδυναμίας. Ο TNF-α έχει βρεθεί να επιδρά στην εξέλιξη της σαρκοπενίας μέσω αύξησης της βασικής ενεργειακής δαπάνης, της πρόκλησης ανορεξίας, της απώλειας μυϊκής και οστικής μάζας και της διατήρησης χρόνιας κατάστασης φλεγμονής (73). Μελέτες έχουν δείξει την εμπλοκή κυτταροκινών (CRP, IL-6, TNF-α) και στο μεταβολικό σύνδρομο αλλά και στην ανάπτυξη ινσουλινοαντίστασης και διαβήτη τύπου 2 (10).

1.2.5 ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Η άποψη της γενετικής προδιάθεσης για μακροβιότητα ή νοσηρότητα στην τρίτη ηλικία συγκεντρώνει αυξανόμενο επιστημονικό ενδιαφέρον, ενώ πληθαίνουν οι ερευνητικές προσπάθειες για την ταυτοποίηση των «γονιδίων της μακροβιότητας». Αν και μελέτες σε οικογένειες υπεραίωνόβιων αποδίδουν το 25% την μακροβιότητας στην κληρονομικότητα (74), τα σημερινά επιστημονικά δεδομένα αποτελούνται από ενδείξεις για πιθανά γονίδια και μηχανισμού που σχετίζονται με την μακροβιότητα στον άνθρωπο. Τα γονίδια αυτά μπορούν να χωριστούν αδρά στις εξής κατηγορίες: γονίδια που σχετίζονται με την επιδιόρθωση του DNA, γονίδια που ρυθμίζουν το μήκος των τελομερών, γονίδια που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες, γονίδια του μιτοχονδριακού DNA, γονίδια που σχετίζονται με τους υποδοχείς ινσουλίνης και IGF-1, και γονίδια που σχετίζονται με την φλεγμονή (75). Μεταλλάξεις σε γονίδια ίσως μεταβάλλουν τη λειτουργία ή την ποσότητα της παραγόμενης πρωτεΐνης, ή συνδυασμοί μεταλλάξεων και πολυμορφισμών σε διαφορετικούς γενετικούς τόπους ίσως μεταβάλλουν τη λειτουργία βιοχημικών μονοπατιών με αποτέλεσμα την δημιουργία προδιάθεσης για νοσηρότητα ή για μακροβιότητα. Ο πολυμορφισμός -174C/T στο γονίδιο της IL-6 φαίνεται να σχετίζεται με την μακροβιότητα, καθώς ο γονότυπος CC σχετίζεται με

την παραγωγή μειωμένων επιπέδων της πρωτεΐνης και εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα στους ηλικιωμένους (76). Το ίδιο παρατηρείται και για το γονότυπο Pro/Ala στους ηλικιωμένους άντρες για τη μετάλλαξη Pro12Ala του γονιδίου PPAR- γ 2 (77).

1.2.6 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ

Στους παράγοντες συμπεριφοράς, η αποχή από το κάπνισμα (μη καπνιστές ή πρώην καπνιστές) φαίνεται να σχετίζεται με υγιή γηρατειά (78, 79, 80). Για τους πρώην καπνιστές μόνο μια έρευνα προσδιορίζει τον ελάχιστο χρόνο αποχής από το κάπνισμα (>15 χρόνια) και μόνο για τους άντρες (78). Η μέτρια κατανάλωση αλκοόλ (< 60 ποτά/ μήνα) από τους ηλικιωμένους φαίνεται πως έχει ευεργετικά δράση στην κατάσταση της υγείας τους (81). Ακόμη, η φυσική δραστηριότητα φαίνεται να σχετίζεται με καλύτερη κατάσταση υγείας στους ηλικιωμένους (82, 83, 84). Η φυσική δραστηριότητα αναψυχής έχει βρεθεί να σχετίζεται με τη διατήρηση καλής κατάστασης υγείας στους ηλικιωμένους (82). Σε παρεμβατική μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ηλικιωμένους, παρατηρήθηκε αύξηση της άλιπης μάζας και της HDL χοληστερόλης, μείωση ολικού και σπλαχνικού λίπους και των επιπέδων διαστολικής πίεσης, μετά από έξι μήνες μέτριας αεροβικής άσκησης (83). Παράλληλα, η φυσική δραστηριότητα έχει συσχετιστεί στους ηλικιωμένους με μειωμένα επίπεδα IL-6 και CRP χωρίς να είναι διευκρινισμένος ο ακριβής μηχανισμός (84).

1.3 ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΣΤΗΝ ΤΡΙΤΗ ΗΛΙΚΙΑ

Η αύξηση της ηλικίας συνοδεύεται από μείωση στην αίσθηση της γεύσης και της οσμής, αλλά και σε εμφάνιση ξηροστομίας, που επηρεάζουν σημαντικά τη διατροφική πρόσληψη των ηλικιωμένων (85). Παράλληλα, συχνά υπάρχουν και προβλήματα στοματικής υγιεινής, πρόσθετες οδοντοστοιχίες που δυσκολεύουν την πρόσληψη τροφής και οδηγούν τους ηλικιωμένους σε περιορισμένες διαιτητικές επιλογές. Κοινωνικοοικονομικοί λόγοι επιδεινώνουν το πρόβλημα, όπως η έλλειψη επαρκούς μορφωτικού επιπέδου ή η οικονομική αδυναμία αγοράς ποιοτικών τροφών. Το πρόβλημα του υποσιτισμού στους ηλικιωμένους, που μπορεί να είναι ενεργειακός ή να αφορά μεμονωμένα θρεπτικά συστατικά, γίνεται πιο σύνθετο αν ληφθούν υπόψη οι αλλαγές στη γαστρεντερική λειτουργία (μειωμένη απορρόφηση) και στο μεταβολισμό βιταμινών και ιχνοστοιχείων που παρατηρούνται στην τρίτη ηλικία (86), καθώς και η επίδραση της κατάθλιψης (που είναι συχνή στους ηλικιωμένους) στην όρεξη. Επιδημιολογικές μελέτες προτείνουν πως η διατροφή αποτελεί σημαντικό παράγοντα της κατάστασης υγείας και επιβίωσης στην τρίτη ηλικία (87).

1.3.1 ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΜΑΚΡΟΒΙΟΤΗΤΑ

Αρκετές επιδημιολογικές μελέτες έχουν διερευνήσει τη συσχέτιση διατροφικών συνηθειών με τον κίνδυνο νοσηρότητας και θνησιμότητας στην τρίτη ηλικία. Στην ευρωπαϊκή μελέτη EPIC για ηλικιωμένους πληθυσμούς, η σύγκριση διαφόρων διατροφικών σχημάτων μεταξύ των ευρωπαϊκών χωρών οδηγεί στο συμπέρασμα πως η μεσογειακή διατροφή και διατροφικά σχήματα που πλησιάζουν προς αυτή σχετίζονται με πιο υγιεινό τρόπο ζωής στην τρίτη ηλικία (88, 89). Η παραδοσιακή μεσογειακή διατροφή αποτελείται από οχτώ βασικά χαρακτηριστικά: υψηλό λόγο μονοακόρεστων/ κορεσμένων λιπαρών οξέων, μέτρια κατανάλωση αλκοόλ, αυξημένη κατανάλωση οσπρίων, αυξημένη κατανάλωση μη κατεργασμένων δημητριακών, αυξημένη κατανάλωση φρούτων, αυξημένη κατανάλωση λαχανικών, χαμηλή κατανάλωση κρέατος και μέτρια κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων (90). Με βάση αυτά τα χαρακτηριστικά εκτιμάται ο βαθμός υιοθέτησης της μεσογειακής διατροφής από πληθυσμούς ηλικιωμένων και ελέγχεται η συσχέτιση του διατροφικού σχήματος με τη μακροβιότητα. Από μελέτες σε ελληνικό πληθυσμό προκύπτει πως για κάθε ένα χαρακτηριστικό της μεσογειακής διατροφής που ακολουθείται, μειώνεται κίνδυνος θνησιμότητας κατά 17% στους ηλικιωμένους (91). Παράλληλα η μεσογειακή διατροφή φαίνεται να σχετίζεται ξεχωριστά και με μειωμένο κίνδυνο θνησιμότητας από καρδιαγγειακά νοσήματα και καρκίνο (92). Ανάλογα αποτελέσματα προκύπτουν και από άλλες ευρωπαϊκές χώρες (93, 94). Ιδιαίτερα ισχυρή φαίνεται πως είναι η συσχέτιση σε ιταλικό πληθυσμό ηλικιωμένων, όπου για κάθε ένα χαρακτηριστικό της μεσογειακής διατροφής που ακολουθείται, μειώνεται κίνδυνος θνησιμότητας κατά 31%, ενώ η συσχέτιση δεν παραμένει σημαντική για ηλικιωμένους άνω των 80

ετών (95). Σε πρόσφατη μελέτη σε ηλικιωμένους από την Κύπρο, παρατηρήθηκε σημαντική αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στην υιοθέτηση της μεσογειακής διατροφής και της υπερχοληστερολαιμίας και για τα δύο φύλα (96). Όπως φαίνεται από τα επιδημιολογικά δεδομένα, η μεσογειακή διαίτα αποτελεί σημαντικό παράγοντα μακροβιότητας.

1.3.2 Ο ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΣ ΣΤΗΝ ΤΡΙΤΗ ΗΛΙΚΙΑ

Πέρα από τα διατροφικά σχήματα που ενισχύουν την καλή κατάσταση υγείας στην τρίτη ηλικία, ένα από τα μικροθρεπτικά συστατικά που εμπλέκονται στην υγιή γήρανση είναι ο ψευδάργυρος. Ο ψευδάργυρος αποτελεί απαραίτητο μέταλλο για τον οργανισμό και περιέχεται στο ανθρώπινο σώμα σε ποσότητα 1,5-2,5 γραμμαρίων. Ο ψευδάργυρος απαντάται σε όλα τα όργανα, ιστούς και υγρά, με την μεγαλύτερη συγκέντρωση ψευδαργύρου να βρίσκεται στα οστά, το ήπαρ, τα νεφρά και το δέρμα. Η απορρόφηση του ψευδαργύρου πραγματοποιείται στο εγγύς λεπτό έντερο, είτε ενεργητικά μέσω πρωτεϊνικού φορέα σε χαμηλές διαιτητικές προσλήψεις του ιχνοστοιχείου, είτε παθητικά με διάχυση σε αυξημένη διαιτητική πρόσληψή του. Η εντερική απορρόφηση του ψευδαργύρου κυμαίνεται από 12-59% και υπόκειται σε μηχανισμό εντερικής έκκρισης και επαναρρόφησης που ρυθμίζει την απορροφούμενη ποσότητα ψευδαργύρου ανάλογα με τις ανάγκες του οργανισμού. (97)

Η συνιστώμενη διαιτητική πρόσληψη για τον ψευδάργυρο είναι 11mg για τους ενήλικες άντρες και 8 mg για τις ενήλικες γυναίκες (Πίνακας 1.1).

Nutrient	Function	Life Stage Group	RDA/AI*
Zinc	Component of multiple enzymes and proteins; involved in the regulation of gene expression.	Infants	(mg/d)
		0-6 mo	2*
		7-12 mo	3
		Children	
		1-3 y	3
		4-8 y	5
		Males	
		9-13 y	8
		14-18 y	11
		19-30 y	11
		31-50 y	11
		50-70 y	11
		> 70 y	11
		Females	
		9-13 y	8
		14-18 y	9
		19-30 y	8
		31-50 y	8
		50-70 y	8
		> 70 y	8
		Pregnancy	
		≤ 18 y	12
		19-30y	11
		31-50 y	11
		Lactation	
		≤ 18 y	13
		19-30y	12
		31-50 y	12

Πίνακας 1.1. Συνιστώμενες διαιτητικές προσλήψεις ψευδαργύρου (98).

Καλές διατροφικές πηγές ψευδαργύρου αποτελούν το κόκκινο και λευκό κρέας, τα οστρακοειδή, τα γαλακτοκομικά προϊόντα και τα δημητριακά ολικής άλεσης (Πίνακας 1.2). Αλληλεπιδράσεις του διατροφικού ψευδαργύρου με άλλα θρεπτικά συστατικά και ουσίες που μεταβάλλουν την απορρόφησή του από το γαστρεντερικό, περιλαμβάνουν την αρνητική επίδραση από το φυτικό οξύ (περιέχεται σε δημητριακά, καλαμπόκι, ρύζι), το σίδηρο και το κάδμιο. Η ποσότητα της πρωτεΐνης φαίνεται πως έχει θετική επίδραση στην απορρόφηση του ψευδαργύρου, που εξαρτάται και από τον τύπο της πρωτεΐνης. Η καζεΐνης φαίνεται πως έχει την πιο μικρή επίδραση. Αμινοξέα, όπως η ιστιδίνη και η μεθειονίνη, ιόντα μικρού μοριακού βάρους, όπως EDTA, και οργανικά οξέα, όπως το κιτρικό οξύ έχουν θετική επίδραση στην απορρόφηση του ψευδαργύρου και χρησιμοποιούνται και ως συστατικά των συμπληρωμάτων (99).

ZINC CONTENT OF SELECTED COMMON FOODS

Food (3 ounces, cooked, lean only)	Zinc (mg)
Beef	
Shank crosscuts, simmered	8.9
Chuck, arm pot roast, braised	7.4
Roundtip, roasted	6.0
Sirloin, broiled	5.5
Top round, broiled	4.7
Ground, 17% fat, broiled	4.6
Top loin, broiled	4.4
Tenderloin, roasted	4.1
Eye round, roasted	4.0
Pork	
Shoulder, blade, Boston roasted	3.6
Ham, boneless, 5% fat	2.4
Tenderloin, roasted	2.2
Loin chop, broiled	2.0
Lamb	
Leg, shank half, roasted	4.3
Loin, roasted	3.5
Veal	
Sirloin, braised	4.0
Cutlet, pan fried	2.4
Chicken	
Liver, simmered	3.7
Dark meat, roasted	2.4
Light meat, roasted	1.0
Turkey	
Dark meat, roasted	3.8
Light meat, roasted	1.7
Fish	
Tuna, light meat, canned	.7
Ocean perch, dry heat	.5
Halibut, dry heat	.5
Salmon, sockeye, dry heat	.4
Shellfish	
Oysters, 6 medium, raw	49.8
Crab, Alaskan king, moist heat	6.5
Shrimp, moist heat	1.3

Food	Zinc (mg)
Dairy Products	
Yogurt, lowfat, plain, 1 cup	2.2
Milk, lowfat, 1 cup	1.0
Cheese, cheddar, 1 ounce	.9
Cheese, cottage, lowfat, ½ cup	.4
Cereals	
Raisin bran, dry, 1 cup	3.0
Shredded wheat, dry, 1 cup	1.0
Oatmeal, instant, ½ cup	.6
Cream of wheat, instant, ½ cup	.2
Corn flakes, dry, 1 cup	.2
Grains	
Bran muffin, 1 medium	.6
Brown rice, cooked, ½ cup	.6
Bagel, 1-3½ inch	.6
Whole wheat bread, 1 slice	.5
White rice (enrich), cooked, ½ cup	.4
White bread (enrich), 1 slice	.2
Fruits	
Banana, 1 medium	.2
Apricots, dried, 7 halves	.2
Prunes, dried, 3 medium	.1
Orange, 1 medium	.1
Apple, 1 medium	.1
Raisins, 2 tablespoons	.1
Vegetables	
Peas, green, cooked, ½ cup	.9
Potato, baked w/skin, 1 medium	.6
Corn, cooked, ½ cup	.4
Broccoli, raw, ½ cup	.2
Spinach, raw, 1 cup	.2
Lettuce, iceberg, chopped, 1 cup	.1
Carrots, raw, 1 medium	.1
Beans/Legumes	
Baked beans, canned, plain, ½ cup	1.8
Chickpeas, boiled, ½ cup	1.3
Kidney beans, boiled, ½ cup	.9
Meat Substitutes	
Egg, substitute, ½ cup	1.6
Tofu, raw, ½ cup	1.0
Peanut butter, 2 tablespoons	.9
Egg, whole, cooked, scrambled	.6

Copyright © 1997, NATIONAL CATTLEMAN'S BEEF ASSOCIATION
This sheet may be duplicated for classroom use.

17-214A

USDA Nutrient Database for Standard Reference, Release 11
(September 1996).

Πίνακας 1.2. Διαιτητικές πηγές ψευδαργύρου.

Η έλλειψη ψευδαργύρου έχει ως αποτέλεσμα μειωμένη ανάπτυξη σε παιδιά, υπογοναδισμό, αλωπεκία, καθυστερημένη επούλωση πληγών, δερματοπάθειες, ανοσολογικές ανεπάρκειες, μειωμένη όρεξη, υπογευσία, διάρροια, φωτοφοβία και νυχταλωπία (97). Ο βιολογικός ρόλος του ψευδαργύρου στον οργανισμό περιλαμβάνει: την καταλυτική του δράση, καθώς απαιτείται ως συμπράγοντας για περισσότερα από 300 ένζυμα, τον δομικό του ρόλο σε ένζυμα και μεμβράνες και το ρυθμιστικό του ρόλο, καθώς αποτελεί συστατικών μεταγραφικών παραγόντων (zinc fingers), ενώ παράλληλα ρυθμίζει την ενζυματική δράση και τη σταθερότητα των πρωτεϊνών ως ενεργοποιητής ή αναστολέας με τη μορφή Zn^{+2} (100).

Ο ρόλος του ψευδαργύρου στο ανοσοποιητικό σύστημα είναι πολύ σημαντικός, αποτελεί απαραίτητο μέταλλο για την άρτια οργάνωση και λειτουργία των ανοσολογικών αντιδράσεων. Η ανεπάρκεια ψευδαργύρου εμπλέκεται στην παθολογία νοσημάτων φθοράς (καρκίνος, αθηροσκλήρυνση) και στην έκπτωση των ανοσολογικών μηχανισμών με την πάροδο της ηλικίας. Η παραγωγή, ωρίμανση και ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων εξαρτάται από την επάρκεια ψευδαργύρου, μέσω της συμμετοχής του στα ένζυμα της αντιγραφής και μεταγραφής του DNA στον κυτταρικό κύκλο των λεμφοκυττάρων, μέσω της συμμετοχής του σε δομικές πρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης των λεμφοκυττάρων και μέσω ενεργοποίησης της θυμουλίνης. Η θυμουλίνη είναι ορμόνη που παράγεται από τα επιθηλιακά κύτταρα του θύμου αδένος και στην ενεργή της μορφή είναι συνδεδεμένη με ψευδάργυρο. Η θυμουλίνη είναι απαραίτητη για την ωρίμανση, διαφοροποίηση και ενεργοποίηση των Τα κυττάρων, την παραγωγή κυτταροκινών και τη δράση των κυττάρων φονιάδων. Έλλειψη ψευδαργύρου συνοδεύεται από ατροφία του θύμου αδένος, λεμφοπενία, ελαττωμένη κυτταροτοξική ικανότητα του ανοσοποιητικού συστήματος και μειωμένη δραστηριότητα της θυμουλίνης. (101).

Τα Τ λεμφοκύτταρα είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στην επαρκή παρουσία ψευδαργύρου. Έλλειψή του συνοδεύεται από μειωμένο αριθμό περιφερικών Τ λεμφοκυττάρων, μειωμένη δράση Τ βοηθητικών λεμφοκυττάρων, και μειωμένη κυτταροτοξικότητα. Ο ψευδάργυρος είναι επίσης απαραίτητος για το μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (MCH I & II) και έλλειψή του συνοδεύεται από ελαττωμένη ικανότητα παραγωγής αντισωμάτων (102). Ανεπάρκεια ψευδαργύρου διαταράσσει επίσης και τη φυσιολογική παραγωγή κυτταροκινών από τα Τ- βοηθητικά κύτταρα με αποτέλεσμα την μειωμένη παραγωγή IL-2, IL-12, IFN- α , IFN- γ και αυξημένη παραγωγή των φλεγμονωδών παραγόντων TNF- α , IL-1 και IL-6 (101, 103). Η διαταραχή στην παραγωγή κυτταροκινών λόγω έλλειψης ψευδαργύρου προκαλεί μειωμένη ενεργοποίηση και δράση των κυττάρων φονιάδων του ανοσοποιητικού συστήματος (100). Ο ψευδάργυρος είναι επίσης απαραίτητος για την ωρίμανση των Β λεμφοκυττάρων και έλλειψή του προκαλεί μείωση του αριθμού των ανώριμων Β λεμφοκυττάρων (104). Σε σχέση με άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, η έλλειψη ψευδαργύρου προκαλεί μειωμένη ικανότητα χημειοταξίας και φαγοκυττάρωσης στα ουδετερόφιλα, στα μονοκύτταρα και στα ιστικά μακροφάγα (105).

Ο ψευδάργυρος εμφανίζει αντιοξειδωτικές δράσεις στα κύτταρα του ανοσοποιητικού, κυρίως ως: δομικό συστατικό των κυτταρικών μεμβρανών (προστασία από αυτοοξείδωση), ως δομικό συστατικό της συνθέσεως του νιτρικού οξέος, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του πυρηνικού ενζύμου PARP προς την κατεύθυνση επιδιόρθωσης του DNA και όχι κυτταρικής απόπτωσης παρουσία οξειδωτικού στρες και ως συστατικό των μεταλλοθειονινών (101). Οι μεταλλοθειονίνες είναι πρωτεΐνες πλούσιες σε κυστεΐνη, παράγονται κυρίως από το ήπαρ και εμφανίζουν υψηλή συγγένεια με μέταλλα (Zn, Cu). Οι μεταλλοθειονίνες απαντούνται σε τέσσερις ισομορφές (I, II, III, IV) και κύριος ρόλος τους είναι η ενδοκυτταρική ομοιοστάση μετάλλων, κυρίως του ψευδαργύρου

(102). Κάθε μόριο μεταλλοθειονίνης δεσμεύει επτά άτομα ψευδαργύρου και το αποδίδει ενδοκυτταρικά όπου χρειάζεται (ένζυμα, θυμουλίνη, μεμβράνες). Οι μεταλλοθειονίνες διαδραματίζουν προστατευτικό ρόλο απέναντι στη φλεγμονή, στο οξειδωτικό στρες και σε τοξικότητα από μέταλλα ή φάρμακα (102). Η παραγωγή τους επηρεάζεται από την παρουσία ψευδαργύρου, οξειδωτικού στρες και φλεγμονής, κυρίως μέσω της συγκέντρωσης IL-6, IL-1, IFN- α , TNF- α και γλυκοκορτικοειδών (106).

Η φυσιολογική λειτουργία των μεταλλοθειονινών φαίνεται να μεταβάλλεται με την αύξηση της ηλικίας, επηρεάζοντας την ομοιοστάση και βιοδιαθεσιμότητα του ψευδαργύρου στο ανοσοποιητικό σύστημα. Σε νεαρές ηλικίες η αυξημένη παραγωγή μεταλλοθειονινών οδηγεί σε αυξημένη απόδοση ψευδαργύρου και επαρκή λειτουργία του ανοσολογικού συστήματος, παρουσία οξειδωτικού στρες ή φλεγμονής. Η διασφάλιση επαρκούς παραγωγής NO από τη συνθέση του νιτρικού οξέος οδηγεί την ενεργοποίηση του PARP προς την κατεύθυνση επιδιόρθωσης του DNA. Αντίθετα, σε μεγαλύτερες ηλικίες, η έλλειψη ψευδαργύρου (λόγω μειωμένης διαιτητικής πρόσληψης ή απορρόφησης) οδηγεί σε μεγάλη παραγωγή μεταλλοθειονινών και περιορισμένη ικανότητάς τους για απόδοση ψευδαργύρου. Η φυσιολογική λειτουργία του ανοσοποιητικού εκτρέπεται και η ενεργοποιείται το PARP προς την κυτταρική απόπτωση. Μέσω αυτών των μηχανισμών φαίνεται πως εμπλέκεται ο διατροφικός ψευδάργυρος στην ανοσογήρανση και στον αυξημένο κίνδυνο νοσηρότητας και θνησιμότητας στους ηλικιωμένους. (106) Παράλληλα, μελέτες συσχετίζουν την έλλειψη ψευδαργύρου με τον αυξημένο ρυθμό κυτταρικής απόπτωσης των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων, μέσω έκπτωσης της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος, επιδεινώνοντας την εξέλιξη αθηροσκλήρυνσης (107).

Η εκτίμηση της διατροφικής πρόσληψης και βιοδιαθεσιμότητας του ψευδαργύρου σε πληθυσμούς ηλικιωμένων δεν είναι καλά μελετημένη. Στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, τα αποτελέσματα της μελέτης CFSII (1994-1996) εμφανίζουν επαρκή διαιτητική πρόσληψη ψευδαργύρου στους ηλικιωμένους άντρες και γυναίκες (108). Αντίθετα, στην έρευνα NHANES III καταγράφεται ανεπαρκής πρόσληψη ψευδαργύρου σε ποσοστό 35-45% του ηλικιωμένου πληθυσμού (109). Στην Ευρώπη τα αποτελέσματα της μελέτης ZENITH παρουσιάζουν ανεπαρκή πρόσληψη ψευδαργύρου σε ποσοστό <5% των ηλικιωμένων, σε περιορισμένο όμως μέγεθος

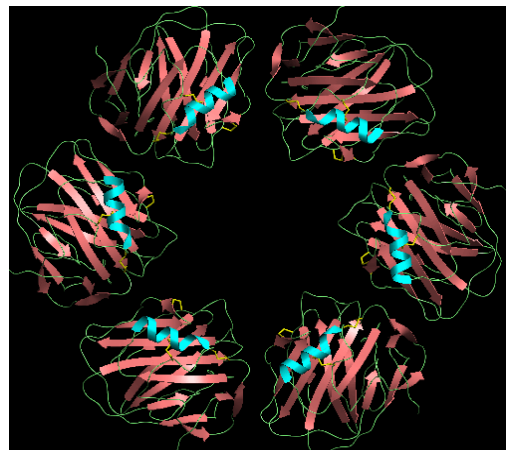
δείγματος (110). Παρεμβατικές μελέτες χορήγησης συμπληρώματος ψευδαργύρου σε ηλικιωμένους παρουσιάζουν αισιόδοξα αποτελέσματα στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος και στη μείωση των λοιμώξεων (101, 111, 112). Περαιτέρω έρευνες είναι απαραίτητες για την επιβεβαίωση της ευεργετικής δράσης των συμπληρωμάτων ψευδαργύρου στην τρίτη ηλικία και την αναθεώρηση της συνιστώμενης διαιτητικής πρόσληψης για αυτή την πληθυσμιακή ομάδα.

1.4 C-ΑΝΤΙΔΡΩΣΑ ΠΡΩΤΕΪΝΗ

Η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (C-reactive protein, CRP) αποτελεί πρωτεΐνη οξείας φάσης στον ανθρώπινο οργανισμό. Ανακαλύφθηκε πριν 70 χρόνια και πήρε το όνομά της από την ικανότητά της να κατακρημνίζει τα μόρια C-πολυσακχαρίτη στο κυτταρικό τοίχωμα του *Streptococcus Pneumoniae* (113). Η παραγωγή της CRP γίνεται από το ήπαρ ως απάντηση σε υψηλά επίπεδα IL-6 και IL-1 β (114, 115). Η CRP ανήκει στην οικογένεια των πεντραξινών (pentraxin protein family) και αποτελείται από μια κυκλική δομή με πέντε υποομάδες μεγέθους 25kb η καθεμία (116) (**Εικόνα 1.1**). Παρουσία φλεγμονής τα επίπεδα της CRP αυξάνονται έως και 300 mg/L, ενώ σε φυσιολογικές συνθήκες κυμαίνονται κάτω από 2 mg/L (117).

Τα αυξημένα επίπεδα της CRP έχουν συσχετιστεί σε επιδημιολογικές μελέτες με αυξημένο κίνδυνο για καρδιαγγειακά νοσήματα σε ηλικιωμένους (118), με αυξημένη θνησιμότητα (119, 120), αλλά και με την υπέρταση (121). Αντίθετα, διατροφικοί παράγοντες, όπως η κατανάλωση ψαριών (122), η κατανάλωση φρούτων και λαχανικών (123) και η μέτρια κατανάλωση αλκοόλ (124, 125) φαίνεται πως μειώνει τα επίπεδα της πρωτεΐνης.

Τα επίπεδα της CRP εξαρτώνται από γενετικούς παράγοντες σε ποσοστό 35-40% (126). Το γονίδιο της CRP βρίσκεται στη θέση 1q23 του ανθρώπινου γονιδιώματος (127). Από τους πολυμορφισμούς που έχουν ταυτοποιηθεί στο γονίδιο της CRP, ένας τριαλληλικός πολυμορφισμός στον υποκινητή του γονιδίου (-286C/T/A) έχει βρεθεί σε κλινικές και επιδημιολογικές μελέτες να σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης (128, 129, 130, 131).



Εικόνα 1.1. Κρυσταλλική δομή της CRP.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η εκτίμηση βιοχημικών (ολική χοληστερόλη, HDL-C, LDL-C, τριγλυκερίδια, γλυκόζη ορού, CRP), ανθρωπομετρικών (βάρος, ύψος, δείκτης μάζας σώματος), κλινικών (αρτηριακή πίεση), γενετικών παραμέτρων (-286C/T/A στο γονίδιο της CRP), ιατρικού ιστορικού, διατροφικών συνηθειών (με έμφαση στην διαιτητική πρόσληψη ψευδαργύρου), εκτίμηση παρουσίας κατάθλιψης και γνωσιακών λειτουργιών σε δείγμα ηλικιωμένων Ελλήνων και ο έλεγχος πιθανών συσχετίσεων ανάμεσα σε αυτούς τους παράγοντες. Παράλληλα, σκοπός της έρευνας είναι η εκτίμηση της συχνότητας εμφάνισης του μελετούμενου πολυμορφισμού σε ελληνικό πληθυσμό και ο έλεγχος συσχέτισής του με τα επίπεδα της παραγόμενης πρωτεΐνης ή/και τις διατροφικές συνήθειες των ηλικιωμένων. Η παρούσα μελέτη στοχεύει στην σφαιρική αποτίμηση της κατάστασης υγείας του δείγματος ηλικιωμένων και στην πιθανή ανάδειξη συσχετίσεων μεταξύ των μελετούμενων παραγόντων που ευνοούν την μακροβιότητα ή νοσηρότητα.

2.2 ΔΕΙΓΜΑ

Το δείγμα αποτελούν 435 ηλικιωμένα άτομα (≥ 60 ετών) από τους δήμους: Καλλιθέα, Νέα Σμύρνη και Μοσχάτο. Η συμμετοχή των ηλικιωμένων στην μελέτη είναι εθελοντική, έπειτα από έγγραφη συναίνεσή τους. Η συλλογή του δείγματος πραγματοποιείται από τα Κέντρα Ανοιχτής Προστασίας Ηλικιωμένων (Κ.Α.Π.Η.) των παραπάνω δήμων, έπειτα από έγγραφη έγκριση των αντίστοιχων δημοτικών συμβουλίων. Η παρούσα έρευνα αποτελεί τμήμα του ερευνητικού προγράμματος: “Nutritional zinc, oxidative stress and immunosenescence: biochemical, genetic and lifestyle implications for healthy ageing – ZINCAGE”, και έχει εγκριθεί από την Επιτροπή Βιοηθικής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου.

2.2.1 ΕΡΕΥΝΑ ZINCAGE

Η μελέτη Zincage αποτελεί ένα ευρωπαϊκό ερευνητικό πρόγραμμα, χρηματοδοτούμενο από το 6^ο Ευρωπαϊκό Πρόγραμμα – Πλαίσιο. Στην έρευνα συμμετέχουν 17 ευρωπαϊκές ερευνητικές ομάδες από 8 χώρες (Γαλλία, Γερμανία, Ελλάδα, Ηνωμένο Βασίλειο, Ισπανία, Ιταλία, Ουγγαρία και Πολωνία), με αντικείμενο την μελέτη βιοχημικών και γενετικών παραγόντων και παραγόντων του τρόπου ζωής στην υγιή γήρανση, με ιδιαίτερο επίκεντρο τον διατροφικό ψευδάργυρο, το οξειδωτικό στρες και την ανοσογήρανση (132). Το ερευνητικό πρόγραμμα Zincage περιλαμβάνει την συλλογή περίπου 800 υγιών ηλικιωμένων (60-85 ετών), 120 υγιών ενενηντάχρονων (≥ 85 ετών) και 120 ασθενών ηλικιωμένων (λοιμώξεις, καρκίνος ή αθηροσκληρυνση) από πέντε ευρωπαϊκές γεωγραφικές περιοχές (Γερμανία, Γαλλία, Ελλάδα, Ιταλία και Πολωνία).

Ο κύριος στόχος της έρευνας είναι η αποσαφήνιση του ρόλου που διαδραματίζει ο διατροφικός ψευδάργυρος στα υγιή γηρατειά και στη μακροβιότητα, μέσω της διατήρησης της ανοσολογικής επάρκειας σε κεντρικό και περιφερικό επίπεδο. Οι υποτιθέμενοι μηχανισμοί δράσης του ψευδαργύρου περιλαμβάνουν τον περιορισμό του οξειδωτικού στρες, επιδρώντας σε πρωτεΐνες, ένζυμα και φλεγμονώδεις παράγοντες, με τελικό αποτέλεσμα τη διατήρηση άρτιας ανοσολογικής κατάστασης. Σε αυτό το πλαίσιο, η έρευνα Zincage εστιάζει κυρίως στη διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μεταλλοθειονινών (MT), των πρωτεϊνών συνοδών (chaperons), της παραγωγής NO, του μήκους των τελομερών, του κυτταρικού κύκλου, της δραστηριότητας των ApoJ και PARP-1, της κυτταρικής μεταβίβασης μηνυμάτων και της επιδιόρθωσης του DNA στα λεμφοκύτταρα ηλικιωμένων και υπερήλικων ατόμων, με σκοπό την ανάδειξη βιολογικών δεικτών ανοσογήρανσης και υγιών γηρατειών.

2.2.2 ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΘΕΛΟΝΤΙΚΗΣ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗΣ

Οι εθελοντές θα πρέπει να είναι πάνω από 60 ετών, να μην είναι τρόφιμοι ιδρύματος και να μην χρειάζονται καθημερινή νοσοκομειακή φροντίδα. Παράλληλα, δεν θα πρέπει να λαμβάνουν στεροειδή, αντικαταθλιπτικά, αντιβίωση και αντιμεταβολίτες. Δεν συμπεριλαμβάνονται στη έρευνα ηλικιωμένοι που πάσχουν από: σακχαρώδη διαβήτη, αυτοάνοσα νοσήματα, νευρογενή νοσήματα, λοιμώξεις, νόσο Chron, acrodermatitis enteropathica, νεφροπάθεια, ηπατοπάθεια, δρεπανοκυτταρική αναιμία, χρόνιες δερματικές παθήσεις και καρκίνο. Όσοι εθελοντές πληρούν τα παραπάνω κριτήρια χαρακτηρίζονται ως υγιείς, ενώ ως καρδιοπαθείς χαρακτηρίζονται οι εθελοντές που πληρούν τα παραπάνω κριτήρια και στο ιατρικό ιστορικό τους περιλαμβάνεται κάποιο από τα ακόλουθα χαρακτηριστικά: καρδιακή ανεπάρκεια, καρωτιδική στένωση, στηθάγχη, καρδιακή αρρυθμία, έμφραγμα μυοκαρδίου, εγκεφαλικό, αθηροσκλήρυνση (αγγειοπλαστική, μπαλονάκι).

2.3 ΑΝΘΡΩΠΟΜΕΤΡΙΚΕΣ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ

Ανθρωπομετρικές παράμετροι: Το βάρος μετράται μία φορά για κάθε εθελοντή σε ηλεκτρονική ζυγαριά Seca. Η μέτρηση πραγματοποιείται χωρίς παπούτσια και βαρύ ρουχισμό σύμφωνα με τις διεθνείς οδηγίες (133). Οι μετρήσεις στρογγυλοποιούνται στη πλησιέστερη εκατοντάδα γραμμαρίων.

Το ύψος μετράται μια φορά σε κάθε εθελοντή σε αναστημόμετρο Seca. Η μέτρηση γίνεται σύμφωνα με τις διεθνείς οδηγίες (133): ο εθελοντής στέκεται χωρίς παπούτσια, ίσια με την πλάτη στην κάθετη κλίμακα του αναστημόμετρου, τα πόδια ενωμένα και το κεφάλι παράλληλο με το οριζόντιο επίπεδο. Το ύψος μετράται αφού ζητηθεί από τον εθελοντή να πάρει μια «βαθιά ανάσα». Οι μετρήσεις στρογγυλοποιούνται στο πλησιέστερο 0,5 cm του μέτρου.

Ο δείκτης μάζας σώματος υπολογίζεται ως βάρος (Kg) / ύψος² (m²).

Κλινικές παράμετροι: Η αρτηριακή πίεση μετράται σύμφωνα με τις διεθνείς οδηγίες (134). Η μέτρηση γίνεται στο αριστερό χέρι έχοντας τα άτομα σε καθιστή θέση και σε ήρεμη κατάσταση. Η τιμή της συστολικής πίεσης αντιστοιχεί στη τιμή που δείχνει το πιεσόμετρο όταν ακουστεί ο πρώτος ήχος. Η τιμή της διαστολικής πίεσης καθορίζεται όταν ο ήχος σταματά να ακούγεται ρυθμικός και ακούγεται συνεχόμενος.

Ως υπερτασικά χαρακτηρίζονται τα άτομα που έχουν συστολική αρτηριακή πίεση ≥ 140 mm Hg, ή/και διαστολική αρτηριακή πίεση ≥ 90 mm Hg ή λαμβάνουν αντιυπερτασική φαρμακευτική αγωγή.

2.4 ΕΡΩΤΗΜΑΤΟΛΟΓΙΑ

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

Καταγραφή δημογραφικών και κοινωνικών στοιχείων: Η καταγραφή δημογραφικών και κοινωνικών στοιχείων για κάθε εθελοντή πραγματοποιείται σε ειδικά σχεδιασμένο ερωτηματολόγιο. Οι ερωτήσεις αφορούν: ηλικία, φύλο, τόπο διαμονής, οικογενειακή κατάσταση και μορφωτικό επίπεδο.

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

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

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

Εκτίμηση κατάστασης μνήμης και παρουσίας κατάθλιψης: Η εκτίμηση της κατάστασης μνήμης πραγματοποιείται με το ερωτηματολόγιο Mini Mental State Examination (135) όπως έχει μεταφραστεί και σταθμιστεί για τον ελληνικό πληθυσμό (136). Πρόκειται για μια σύντομη και αξιόπιστη μέθοδο για την αξιολόγηση της έκπτωσης των γνωσιακών λειτουργιών. Κάθε εθελοντής

καλείται να απαντήσει σε ένα ερωτηματολόγιο τριάντα ερωτήσεων που εξετάζει: την ικανότητα προσανατολισμού, την μνήμη, την προσοχή, την κατανόηση και εκτέλεση γραπτών και προφορικών εντολών, την αυθόρμητη γραφή και την αντιγραφή ενός πολύπλοκου σχήματος. Σε ελληνικό πληθυσμό, βαθμολογίες πάνω από 24/23 αξιολογούνται ως ύπαρξη άνοιας, με επίπεδο ευαισθησίας 90,80 και ειδικότητας 90,62 (136).

Η εκτίμηση παρουσίας κατάθλιψης πραγματοποιείται με το ερωτηματολόγιο Geriatric Depression Scale (137) όπως έχει μεταφραστεί και σταθμιστεί για ελληνικό πληθυσμό (138). Πρόκειται για μια σύντομη και αξιόπιστη μέθοδο για την αξιολόγηση συμπτωμάτων κατάθλιψης στους ηλικιωμένους. Κάθε εθελοντής καλείται να απαντήσει σε ένα ερωτηματολόγιο δεκαπέντε ερωτήσεων που εξετάζει: την θετική διάθεση, τη θλίψη, την απραγία, τα προβλήματα μνήμης, το επίπεδο ενέργειας και την παραμονή στο σπίτι. Η μέγιστη βαθμολογία για το τεστ είναι το 15, βαθμολογίες μεταξύ 0 και 4 υποδηλώνουν φυσιολογική κατάσταση, 5 ως 9 μέτρια κατάθλιψη και 10 ως 15 δριμεία κατάθλιψη (137). Σε ελληνικό πληθυσμό, βαθμολογίες πάνω από 6/7 αξιολογούνται ως ύπαρξη κατάθλιψης, με επίπεδο ευαισθησίας 92,23 και ειδικότητας 95,24 (138).

2.5 ΑΙΜΟΛΗΨΙΑ

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

2.5.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΡΟΥ

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

2.5.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Η απομόνωση DNA πραγματοποιείται από λευκοκύτταρα ολικού αίματος (2 ml) με τη χρήση εμπορικού kit (NucleoSpin Blood L, Macherey-Nagel).

Η διαδικασία που ακολουθείται περιλαμβάνει:

1. Μεταφορά έως 2ml ολικού αίματος (σε θερμοκρασία δωματίου) σε falcon των 15ml. Προσθήκη 150 μ l πρωτεϊνάσης K και 2 ml του διαλύματος BQ1. Ισχυρή ανακίνηση για 10 δευτερόλεπτα και επώαση στους 56°C για 15 λεπτά. Κατά το στάδιο αυτό πραγματοποιείται λύση των κυτταρικών και πυρηνικών μεμβρανών και κατακρήμνιση των κυτταρικών πρωτεϊνών.
2. Προσθήκη 2 ml αιθανόλης (96-100%) στο δείγμα και ισχυρή ανακίνηση. Αναμονή μέχρι να φτάσει το δείγμα σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Προσθήκη 3 ml από κάθε δείγμα σε νέο falcon 15 ml στο οποίο έχει προσαρμοστεί η στήλη NucleoSpin. Φυγοκέντριση σε 4500 g για 3 λεπτά. Προσθήκη και του υπόλοιπου δείγματος στη στήλη και φυγοκέντριση σε 4500 g για 5 λεπτά. Απόρριψη του διαλύματος από το falcon. Το DNA είναι αδιάλυτο στην αιθανόλη και προσκολλάται στην μεμβράνη της στήλης κατά την φυγοκέντριση, ενώ τα υπόλοιπα συστατικά του αίματος διαπερνούν την μεμβράνη και απορρίπτονται με τη μορφή διαλύματος.
4. Προσθήκη 2 ml διαλύματος BQ2 στο falcon με τη στήλη και φυγοκέντριση σε 4500 g για 2 λεπτά. Προσθήκη 2 ml διαλύματος BQ2 στο falcon με τη στήλη και φυγοκέντριση σε 4500 g για 10 λεπτά. Το αιθανολικό διάλυμα BQ2 καθαρίζει το DNA που έχει προσκολληθεί στην μεμβράνη της στήλης από τυχόν κυτταρικά ή πρωτεϊνικά υπολείμματα, ενώ με τη δεύτερη παρατεταμένη φυγοκέντριση στεγνώνει η μεμβράνη της στήλης από την αιθανόλη.
5. Η στήλη μεταφέρεται σε νέο falcon 15 ml και προστίθενται 200 μ l προθερμασμένου (70°C) διαλύματος BE στο κέντρο της μεμβράνης. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά και φυγοκέντριση σε 4500 g για 2 λεπτά.
6. Το DNA διαλυτοποιείται στο BE και μετά τη φυγοκέντριση συλλέγεται το διάλυμα του DNA από το falcon, μεταφέρεται σε ειδικά φιαλίδια και αποθηκεύεται στους -20 °C. Το διάλυμα περιέχει 40-60 μ g γενωμικού DNA.

2.6 ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ

Στον ορό όλων των δειγμάτων πραγματοποιείται βιοχημικός έλεγχος σε αυτόματο βιοχημικό αναλυτή που περιλαμβάνει: γλυκόζη νηστείας (Glu), ολική χοληστερόλη (TC), HDL-C και τριγλυκερίδια (TG). Τα επίπεδα LDL-C υπολογίζονται από την εξίσωση Friedewald (139).

Στον ορό 280 ατόμων του δείγματος πραγματοποιείται μέτρηση της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP) με την ανοσοενζυματική μέθοδο (ELISA).

2.6.1 ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΜΕΤΡΗΣΗΣ CRP

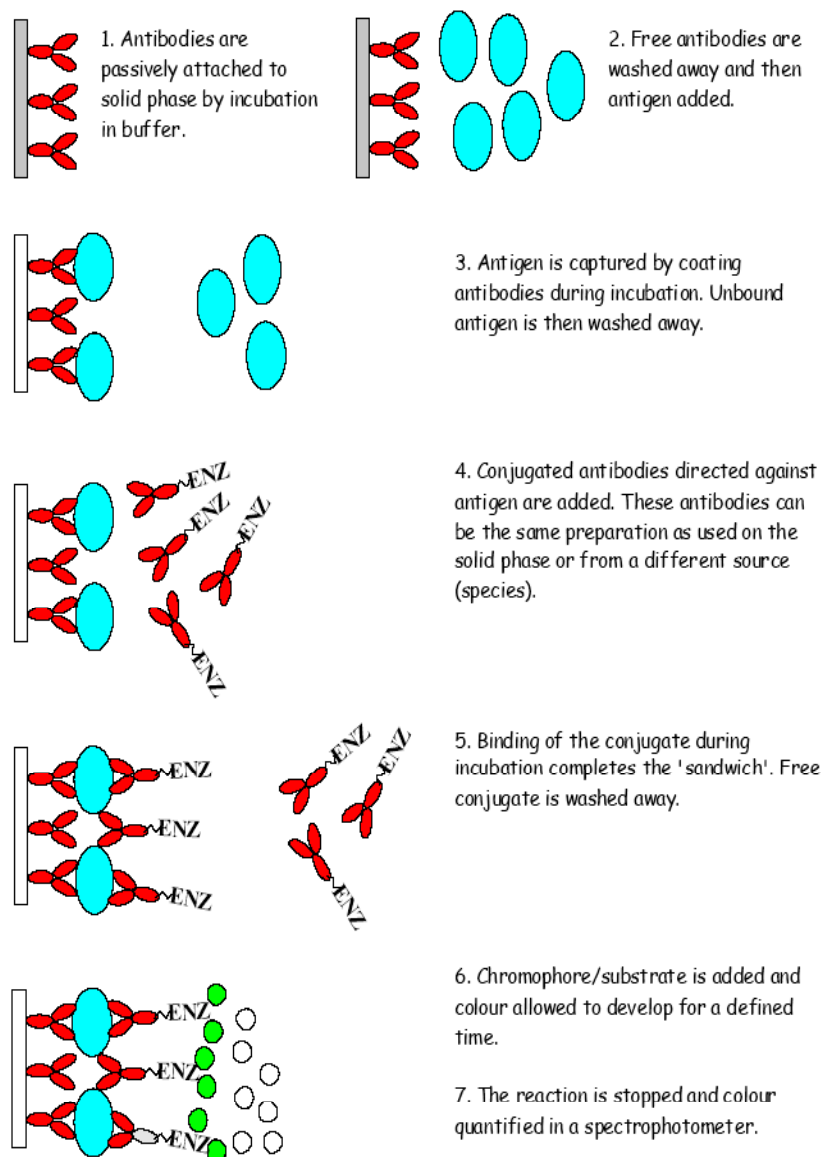
Η μέτρηση της CRP πραγματοποιείται σε 280 άτομα του δείγματος με βάση τα παρακάτω κριτήρια:

- ✓ Απουσία φαρμακευτικής αγωγής με κορτικοστεροειδή, παράγωγα σαλικυλικού οξέος, στατίνες, θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης.
- ✓ Απουσία καρδιαγγειακής νόσου (στηθάγχη, στεφανιαία νόσος, καρδιακή ανεπάρκεια) ή/και καρδιαγγειακών επεμβάσεων (αγγειοπλαστική, μπαλονάκι) ή/και ιστορικού εμφράγματος, εγκεφαλικού.
- ✓ Μη καπνιστές (τουλάχιστον 5 χρόνια από τη διακοπή του καπνίσματος για τους πρώην καπνιστές).

2.6.2 ΜΕΤΡΗΣΗ CRP ΜΕ ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΑΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟ

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

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



Εικόνα 2.1. Σχηματική αναπαράσταση της συζευγμένης ανοσοενζυματικής μεθόδου (sandwich ELISA).

και ξέπλυμα, προστίθεται χρωμοφόρο υπόστρωμα και στη συνέχεια διακόπτεται η αντίδραση και το χρώμα ποσοτικοποιείται σε φασματοφωτόμετρο.

Στην παρούσα μελέτη, η CRP μετράται με συζευγμένη ανοσοενζυματική μέθοδο. Η αρχή της μεθόδου (εικόνα 2.1) περιλαμβάνει την παθητική προσκόλληση αντισωμάτων σε στερεά κατάσταση. Τα αντισώματα δεσμεύουν τα προς μέτρηση αντιγόνα. Τα αντιγόνα διαλύονται σε ειδικό διαλύτη που αποτρέπει την μη ειδική σύνδεση ουσιών στα αντισώματα. Μετά από επώαση και ξέπλυμα, προκύπτει ένα σύμπλεγμα αντισώματος-αντιγόνου σε στερεά κατάσταση. Τα δεσμευμένα αντιγόνα προσδιορίζονται με την προσθήκη και επώαση με αντίσωμα, σημασμένο με ένζυμο. Το δεύτερο αντίσωμα μπορεί να είναι ίδιο με εκείνο που χρησιμοποιήθηκε για τη

δέσμευση του αντιγόνου ή διαφορετικό, από άποψη προέλευσης. Μετά από επώαση

Για την εφαρμογή της μεθόδου ELISA στη μέτρηση των επιπέδων CRP χρησιμοποιούνται τα ακόλουθα αντιδραστήρια (**hsCRP ELISA test kit, Biomerica, inc.**):

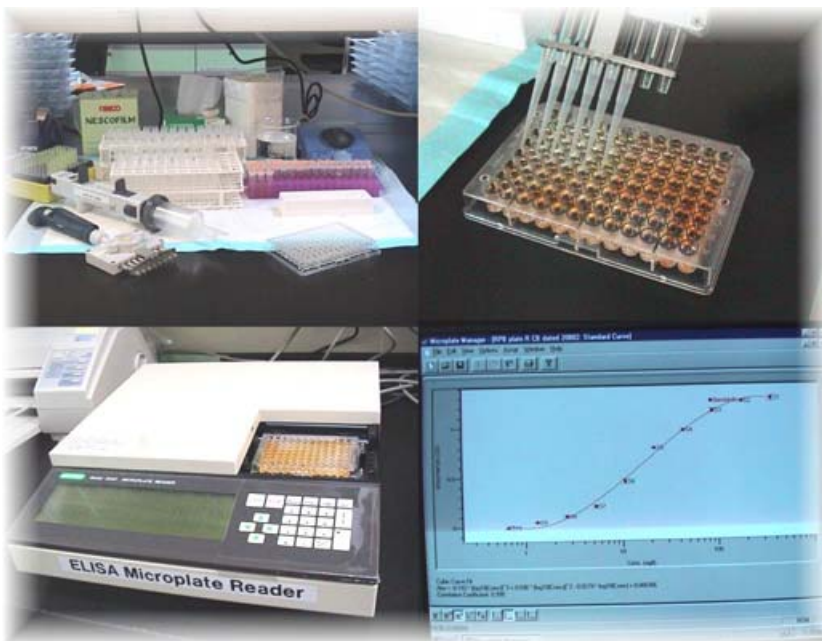
- ✓ **Πλάκα 96 «πηγαδιών» επικαλυμμένων με αντίσωμα.** Χρησιμοποιούνται τρεις πλάκες. Τα «πηγάδια» των πλακών έχουν σταθερά συνδεδεμένα στη βάση τους αντισώματα αντι-CRP (ποντικίου). Οι πλάκες αποθηκεύονται στους 4°C.
- ✓ **Διαλύματα CRP αναφοράς (Reference Standard Set).** Χρησιμοποιούνται έξι διαλύματα CRP γνωστής συγκέντρωσης (0,000 mg/l, 0,005 mg/l, 0,010 mg/l, 0,025 mg/l, 0,050 mg/l, 0,100 mg/l). Προμηθεύονται σε λυοφιλιωμένη μορφή και αποθηκεύονται στους 4°C.
- ✓ **Διαλύτης δειγμάτων CRP (Sample Diluent).** Αποθηκεύεται στους 4°C.
- ✓ **Αντιδραστήριο ενζυμικής σύνδεσης της CRP (CRP Enzyme Conjugate Reagent).** Περιέχει αντίσωμα αντι-CRP (εριφίου). Αποθηκεύεται στους 4°C.
- ✓ **Αντιδραστήριο TMB.** Περιέχει το ένζυμο 3,3',5,5'- τετραμεθυλβενζιδίνη. Αποθηκεύεται στους 4°C.
- ✓ **Το διάλυμα λήξης (STOP Solution).** Περιέχει HCL 1N. Αποθηκεύεται στους 4°C.

Η διαδικασία που ακολουθείται περιλαμβάνει:

1. Οι πλάκες και τα αντιδραστήρια πρέπει να βρίσκονται σε θερμοκρασία δωματίου πριν τη χρήση.
2. Αραίωση 1:100 στα δείγματα ορού που θα μετρηθούν. Σε μη αποστειρωμένα erppendorf 1,5 ml προσθέτονται 5 μl ορού από κάθε δείγμα και 495 μl sample diluent. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση. Σε δείγματα με αναμενόμενη συγκέντρωση CRP > 10 mg/l πραγματοποιείται περαιτέρω διάλυση 1:10.
Αποφεύγεται η χρήση αιμολυμένων ή λιπαιμικών δειγμάτων ορού.
3. Προσθήκη από 1 ml αποστειρωμένου νερού στα λυοφιλιωμένα δείγματα CRP αναφοράς και μετά το πέρας 20 λεπτών ακολουθεί ήπια ανάδευση.
4. Προσθήκη 10 μl από κάθε διάλυμα CRP αναφοράς και από κάθε δείγμα ορού (αραιωμένο) στα «πηγάδια» της πλάκας.
5. Προσθήκη 100 μl από το αντιδραστήριο ενζυμικής σύνδεσης της CRP (CRP enzyme conjugate reagent) σε κάθε «πηγάδι» της πλάκας. Ανάδευση για 30 δευτερόλεπτα.
6. Επώαση της πλάκας σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C) για 45 λεπτά. Κατά τη διάρκεια της επώασης, τα μόρια της CRP που περιέχονται στα δείγματα δεσμεύονται στα αντι-CRP αντισώματα με τα οποία είναι σταθερά επικαλυμμένη η βάση των «πηγαδιών». Παράλληλα, προσδένονται από πάνω τα αντι-CRP αντισώματα του αντιδραστηρίου ενζυμικής σύνδεσης της CRP. Τα μόρια της CRP εγκλωβίζονται ανάμεσα σε δυο αντισώματα (sandwich ELISA).
7. Μετά το τέλος της επώασης απομακρύνεται το επωαστικό μίγμα και τα «πηγάδια» ξεπλένονται με απεσταγμένο νερό (8 ξεπλύματα με 200 μl νερού κάθε φορά) για την απομάκρυνση ελεύθερων

αντισωμάτων. Η πλάκα χτυπιέται δυνατά σε απορροφητικό χαρτί για την αποβολή όλων των υπολειμμάτων νερού.

8. Προσθήκη 100 μ l TMB σε κάθε «πηγάδι» και ήπια ανάδευση για 5 δευτερόλεπτα.
9. Επώαση της πλάκας σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C) για 20 λεπτά. Μετά το πέρας της επώασης η ενζυμική αντίδραση οδηγεί στο σχηματισμό μπλε χρώματος.
10. Προσθήκη 100 μ l Stop Solution σε κάθε «πηγάδι» για την λήξη της αντίδρασης. Ήπια ανάδευση για 30 δευτερόλεπτα. Το μπλε χρώμα μετατρέπεται σε κίτρινο.
11. Μέτρηση απορρόφησης στα 450 nm μέσα σε 15 λεπτά από την λήξη της αντίδρασης.
12. Υπολογισμός συγκέντρωσης για κάθε δείγμα με βάση την πρότυπη καμπύλη που προκύπτει από τα διαλύματα CRP αναφοράς.



Εικόνα 2.2. Επισκόπηση της πειραματικής μεθόδου ELISA.

2.7 ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ

Στην παρούσα μελέτη ερευνάται ο πολυμορφισμός -286C/T/A στον υποκινητή του γονιδίου της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης. Για την ανίχνευση του πολυμορφισμού στα δείγματα DNA των εθελοντών της έρευνας χρησιμοποιούνται οι μέθοδοι της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και της πέψης με περιοριστική ενδονουκλεάση.

2.7.1 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ.

POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

Μετά την απομόνωση ακολουθεί εφαρμογή της μεθόδου PCR (140), η οποία χρησιμεύει στην εκλεκτική αντιγραφή κατά εκατομμύρια φορές ειδικών τμημάτων DNA. Η μέθοδος είναι εξαιρετικά ευαίσθητη και επιτρέπει τη γρήγορη ανάλυση περιοχών του DNA που περιέχονται σε ένα πολύ μικρό δείγμα. Πρόκειται για 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 5' άκρο της άλλης αλυσίδας. Τα ολιγονουκλεοτίδια αυτά μήκους 20-30 βάσεων χρησιμοποιούνται ως πρωταρχικά τμήματα (εκκινητές-primers) για *in vitro* σύνθεση DNA και οριοθετούν τα άκρα του τελικού προϊόντος. Παρουσία περίσσειας των τεσσάρων τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), ιόντων μαγνησίου και της κατάλληλης DNA πολυμεράσης επιτυγχάνεται η αντίδραση πολυμερισμού. Το ένζυμο που χρησιμοποιείται για τον πολυμερισμό είναι η Taq πολυμεράση, η οποία απομονώνεται από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus aquaticus* και είναι ανθεκτική στις υψηλές θερμοκρασίες. Η πολυμεράση αυτή παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ενεργότητα πολυμερισμού στους 72°C, ενώ παραμένει ενεργή σε θερμοκρασία μέχρι 95°C.

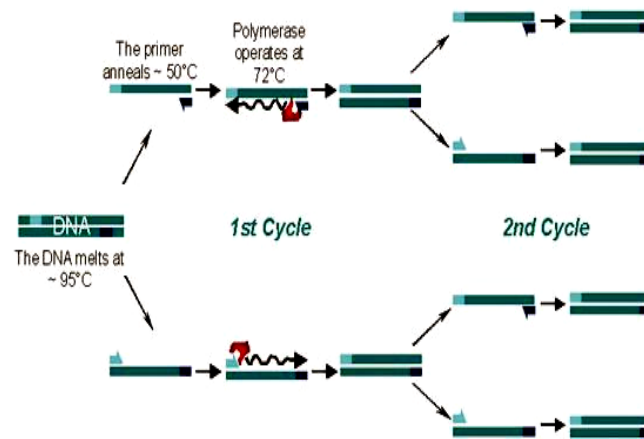
Η τεχνική της PCR περιλαμβάνει την κυκλική επανάληψη τριών αντιδράσεων, όπως φαίνεται στην **εικόνα 2.3**:

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.



Εικόνα 2.3. Σχηματική αναπαράσταση της PCR.

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 CRP χρησιμοποιούνται τα ακόλουθα αντιδραστήρια (128):

✓ **Εκκινητές:** Ο αριστερός εκκινητής (forward primer) με αλληλουχία 5'-CAT CTC CAG AAG CTG TCA G-3'. Προμηθεύεται σε ξηρή μορφή και προσθέτονται 783 μl απεσταγμένου και αποστειρωμένου νερού, έτσι ώστε η συγκέντρωση να είναι 100 pmol/μl. (stock solution).

Ο δεξιός εκκινητής (reverse primer) έχει την αλληλουχία 5'-TCA GAG CTT CGG GAA GAG-3'. Προμηθεύεται σε ξηρή μορφή και προσθέτονται 670 μl απεσταγμένου και αποστειρωμένου νερού, έτσι ώστε η συγκέντρωση να είναι 100 pmol/μl. (stock solution).

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

✓ **Taq πολυμεράση:** Χρησιμοποιείται η Takara Taq πολυμεράση με συγκέντρωση 5 U/ μl. Το αντιδραστήριο διατηρείται σε θερμοκρασία -20°C.

✓ **PCR Buffer:** Η συγκέντρωσή του είναι 10X και περιέχει: 100 mM Tris-HCL (pH 8,3) και 500 mM KCL. Το αντιδραστήριο διατηρείται σε θερμοκρασία -20°C.

✓ **Διάλυμα MgCl₂:** Η συγκέντρωσή του είναι 25 mM. Το αντιδραστήριο διατηρείται σε θερμοκρασία -20°C.

- ✓ **Μίγμα ολιγονουκλεοτιδίων (dNTP's):** Τα τέσσερα ολιγονουκλεοτίδια έχουν συγκέντρωση 100 mM το καθένα. Αναμίχθηκαν και μεταφέρθηκαν σε eppendorf. Το αντιδραστήριο διατηρείται σε θερμοκρασία -20°C .
- ✓ **Απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό.**

Η διαδικασία που ακολουθείται περιλαμβάνει:

1. Παρασκευή του μίγματος των αντιδραστηρίων της PCR. Σε αποστειρωμένο eppendorf 1,5 ml προσθέτονται για κάθε δείγμα 0,15 μl (0,75 Unit) Taq πολυμεράσης, 2 μl Buffer, 0,7 μl διαλύματος MgCl_2 (0,0175 mM), 0,15 μl (15 mM) διαλύματος dNTP's, 0,2 μl (2,5 pmol) αριστερού εκκινητή, 0,2 μl (2,5 pmol) δεξιού εκκινητή, 16,1 μl απεσταγμένου και αποστειρωμένου νερού. Αφού παρασκευαστεί το μίγμα, αναδεύεται σε vortex και διατηρείται σε πάγο.
2. Το μίγμα χωρίζεται σε αποστειρωμένα eppendorf των 0,2 ml όσα και τα δείγματα. Σε κάθε eppendorf τοποθετούνται 19,5 μl από το μίγμα και 0,5 μl DNA από το κάθε δείγμα. Τα eppendorf τοποθετούνται στην φυγόκεντρο (έως 8000 rpm για λίγα δευτερόλεπτα – short spin) ώστε να αναμιχθεί το μίγμα με το DNA και να μην υπάρχουν φυσαλίδες.
3. Τα eppendorf μεταφέρονται σε θερμικό κυκλοποιητή (μηχάνημα PCR) και ακολουθείται το πρόγραμμα:

CRP PROMOTOR:

Βήμα 1^ο: 94°C για 10 min

Βήμα 2^ο: 94°C για 1 min

Βήμα 3^ο: 55°C για 1 min

Βήμα 4^ο: 72°C για 1 min

Βήμα 5^ο: (Βήμα 2^ο, Βήμα 3^ο και Βήμα 4^ο) x 35

Βήμα 6^ο: 72°C για 10 min

Βήμα 7^ο: 4°C αποθήκευση



Εικόνα 2.4. Θερμικός κυκλοποιητής.

2.7.2 ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΠΙΤΥΧΙΑΣ PCR

Ο έλεγχος της επιτυχίας της PCR γίνεται με ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. 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 2% γίνεται διαχωρισμός γραμμικών τμημάτων DNA μήκους 0,1-3 Kb.

Προετοιμασία πηκτώματος αγαρόζης 2% και ηλεκτροφόρηση.

1. Προσθήκη 3 gr αγαρόζης και 150 ml διαλύματος TBE 0,5X (Tris Borate Acid) σε κωνική φιάλη.
2. Ταχεία θέρμανση μερικών λεπτών σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη.
3. Προσθήκη 9ml διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου 10 mg/ml (EtBr) αφού κρυώσει το διάλυμα και ανάδευση. 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 είναι καρκινογόνο.
4. Τοποθέτηση των ειδικών «χτενών» στο εκμαγείο της ηλεκτροφορητικής συσκευής (για τη δημιουργία «πηγαδιών» στο πήκτωμα της αγαρόζης και προσθήκη του διαλύματος αγαρόζης στο εκμαγείο.
5. Το διάλυμα αφήνεται να πήξει (~10 min) και αφού δημιουργηθεί το πήκτωμα αγαρόζης, αφαιρούνται οι «χτένες» και προστίθεται στο δοχείο της ηλεκτροφόρησης ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5X μέχρι την ένδειξη της ηλεκτροφορητικής συσκευής (fill line), ώστε να καλύπτεται πλήρως το πήκτωμα.
6. Ανάμιξη 2 μl του προϊόντος PCR από κάθε δείγμα με 2 μl χρωστικής κυανού της ξυλόλης.
7. Μεταφορά κάθε δείγματος με τη χρωστική σε ένα από τα «πηγάδια» του πηκτώματος.
8. Μεταφορά 2 μl «μάρτυρα» σε ένα «πηγάδι» του πηκτώματος.
9. Σύνδεση της ηλεκτροφορητικής συσκευής με το τροφοδοτικό και ηλεκτροφόρηση στα 120 V για περίπου 10 λεπτά.

10. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, γίνεται παρατήρηση του πηκτώματος 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.



Εικόνα 2.5. Ζώνες DNA σε πήκτωμα αгарόζης στο υπεριώδες.

2.7.3 ΠΕΨΗ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΗ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗ

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα που παράγονται από βακτήρια. Λέγονται ενδονουκλεάσες γιατί κόβουν το DNA στο εσωτερικό του μορίου και όχι στα άκρα, ενώ λέγονται περιοριστικές επειδή η δραστηρότητά τους περιορίζεται σε «ξένο» DNA. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες αναγνωρίζουν ειδικές δίκλωνες αλληλουχίες DNA και κόβουν το μόριο μέσα ή κοντά στην αλληλουχία αναγνώρισης. Οι αλληλουχίες αναγνώρισης έχουν συνήθως μήκος 4-8 νουκλεοτίδια και συχνά είναι παλίνδρομες («διαβάζονται» το ίδιο και από τις δύο κατευθύνσεις 5'-3' και 3'-5' του DNA). Τα τμήματα 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 (139).

Τα περιοριστικά ένζυμα ποικίλουν ως προς τις συνθήκες άριστης δράσης τους. Οι παραλλαγές αυτές αναφέρονται στη θερμοκρασία επώασης και στη σύσταση του διαλύματος επώασης. Η επιλογή της κατάλληλης θερμοκρασίας είναι αυστηρή, ενώ οι διαφορές στη σύσταση των διαλυμάτων επώασης είναι μικρές. Τα ρυθμιστικά διαλύματα μέσα στα οποία γίνεται η αντίδραση της επώασης περιέχουν συνήθως Mg^{+2} που λειτουργεί ως συμπαράγοντας του ενζύμου, καθώς και Na^{+} . Τα συστατικά των διαλυμάτων επώασης πρέπει να είναι καθαρά και απαλλαγμένα από νουκλεάσες. Οι σουλφυδρικοί 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 δραστηρότητα του ενζύμου. Τα ένζυμα διατηρούνται στους $-20^{\circ}C$ μέσα σε διάλυμα που περιέχει 50% v/v γλυκερόλη (140).

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιούνται τα ένζυμα **Hin4I** και **SpeI** (128). Η προέλευσή τους και οι αλληλουχίες αναγνώρισης φαίνονται στην **εικόνα 2.4**.

Hin4I	SpeI
5'...↓ ₈ (N) G A P γ(N) ₅ (A/C/G) T C(N) ₁₃₋₁₄ ↓...3' 3'...↑ ₁₃₋₁₄ (N) C T Pι(N) ₅ (T/G/C) A G(N) ₈ ↑...5'	5'...A↓C T A G T...3' 3'...T G A T C↑A...5'
Concentration: 2 units/μl Source: <i>Haemophilus influenzae</i> RFL4 Supplied with: 1ml of 10X Buffer Tango™ 0.1ml of 50X SAM (2.5mM)	Concentration: 10 units/μl Source: <i>Sphaerotilus natans</i> Supplied with: 1ml of 10X Buffer™ Store at -20°C
Store at -20°C       	    

Εικόνα 2.6. Γενικά χαρακτηριστικά των ενζύμων Hin4I και SpeI.

Για κάθε προϊόν της PCR των δειγμάτων πραγματοποιούνται δύο ξεχωριστές πέψεις με τα ακόλουθα αντιδραστήρια:

ΠΕΨΗ 1

- ✓ **Ένζυμο Hin4I (Fermentas):** Με συγκέντρωση 2 U/μl. Διατηρείται σε θερμοκρασία -20°C.
- ✓ **Buffer Tango:** Περιέχει 33mM Tris-acetate (pH 7,9), 10mM magnesium acetate, 66 mM potassium acetate, 0,1 mg/ml BSA. Διατηρείται στους -20°C.
- ✓ **SAM:** Διάλυμα S-αδενοσυλομεθειονίνης 2,5 mM. Ενισχύει τη δράση του ενζύμου.
- ✓ **Απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό.**

ΠΕΨΗ 2

- ✓ **Ένζυμο SpeI (Takara):** Με συγκέντρωση 10 U/μl. Διατηρείται σε θερμοκρασία -20°C.
- ✓ **Buffer 2:** Περιέχει 100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol, 500 mM NaCl. Διατηρείται στους -20°C.
- ✓ **Απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό.**

Η διαδικασία που ακολουθείται περιλαμβάνει:

1. Παρασκευή του μίγματος των αντιδραστηρίων για κάθε πέψη.

Για την πέψη 1: Σε αποστειρωμένο eppendorf 1,5 ml προσθέτονται για κάθε δείγμα 0,4 μl (0,8 U) του ενζύμου **Hin4I**, 1,2 μl Buffer Tango, 0,4 μl (0,01 mM) διαλύματος SAM και 5 μl απεσταγμένου και αποστειρωμένου νερού.

Για την πέψη 2: Σε αποστειρωμένο eppendorf 1,5 ml προσθέτονται για κάθε δείγμα 0,25 μl (2,5 U) του ενζύμου **SpeI**, 1 μl Buffer 2 και 3,75 μl απεσταγμένου και αποστειρωμένου νερού.

2. Το μίγμα της **πέψης 1** χωρίζεται σε μη αποστειρωμένα erpendorf των 0,5 ml όσα και τα δείγματα. Σε κάθε erpendorf τοποθετούνται 7 μl από το μίγμα της **πέψης 1** και 5 μl προϊόντος PCR από το κάθε δείγμα. Τα erpendorf τοποθετούνται στην φυγόκεντρο (έως 8000 rpm για λίγα δευτερόλεπτα – short spin) ώστε να αναμιχθεί το διάλυμα επώασης του ενζύμου με το προϊόν της PCR.
3. Το μίγμα της **πέψης 2** χωρίζεται σε μη αποστειρωμένα erpendorf των 0,5 ml όσα και τα δείγματα. Σε κάθε erpendorf τοποθετούνται 5 μl από το μίγμα της **πέψης 2** και 5 μl προϊόντος PCR από το κάθε δείγμα. Τα erpendorf τοποθετούνται στην φυγόκεντρο (έως 8000 rpm για λίγα δευτερόλεπτα – short spin) ώστε να αναμιχθεί το διάλυμα επώασης του ενζύμου με το προϊόν της PCR.
4. Τα erpendorf των πέψεων 1 και 2 τοποθετούνται σε εκκολαπτικό θάλαμο στους 37 °C για 3 ώρες.

2.7.4 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ ΤΗΣ ΠΕΨΗΣ

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

Προετοιμασία πηκτώματος αγαρόζης 3% και ηλεκτροφόρηση.

Ακολουθείται ακριβώς η ίδια διαδικασία με τον έλεγχο επιτυχίας της PCR, όπως αυτή περιγράφεται στην ενότητα 2.6. Οι μόνες διαφοροποιήσεις είναι:

1. Προσθήκη 4,5 gr αγαρόζης και 150 ml διαλύματος TBE 0,5X (Tris Borate Acid) σε κωνική φιάλη.
2. Το διάλυμα αφήνεται να πήξει για ~20 min.
3. Ανάμιξη 5 μl του προϊόντος πέψης από κάθε δείγμα με 5 μl χρωστικής κυανού της ξυλόλης.
4. Ηλεκτροφόρηση στα 120 V για περίπου 30 λεπτά.
5. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, γίνεται παρατήρηση του πηκτώματος στο υπεριώδες. Σε κάθε δείγμα φαίνονται ζώνες ανάλογα με την ύπαρξη ή όχι του πολυμορφισμού στο ένα ή και στα δύο αλληλόμορφα. Τα κομμάτια DNA που αντιστοιχούν στις ζώνες συγκρίνονται με τον «μάρτυρα» και γίνεται διάγνωση του γονότυπου για τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό (-286C/T/A) σε κάθε δείγμα.

2.8 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

✓ Πρωτεΐνάση K

60 mg πρωτεΐνάση K

3,15 ml proteinase buffer

Ανάδευση σε Vortex

Αποθήκευση στους 4 °C

✓ Διάλυμα BQ2

20 ml BQ2 buffer

80 ml αιθανόλη

✓ Tris Borate Acid 5x (TBE 5x)

54gr Tris Base

27,5gr Boric Acid

20ml EDTA 0,5M

Προσθήκη ~800ml απεσταγμένου νερού

Ανάδευση

Έλεγχος και ρύθμιση pH στο 8,3

Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι Vτελ=1lt

✓ Tris Borate Acid 1x (TBE 1x)

200ml TBE 5x

Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι Vτελ=1lt

Ανάδευση

✓ Βρωμιούχο αιθίδιο (10mg/ml)

10mg EtBr

1 ml αποστειρωμένο νερό

Ανάδευση σε Vortex

Φύλαξη στους 4 °C

2.9 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Η στατιστική επεξεργασία πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο SPSS 11.5. Οι συνεχείς μεταβλητές εκφράζονται ως μέσος $\pm$ τυπική απόκλιση ($M \pm SD$), ενώ οι κατηγορικές μεταβλητές ως απόλυτη τιμή ή/και ποσοστό (%). Η κανονική κατανομή ελέγχθηκε για όλες τις συνεχείς μεταβλητές με το τεστ Kolmogorov-Smirnov. Οι τιμές της CRP μετατράπηκαν σε λογαριθμική μορφή για να εξασφαλίζεται η κανονικότητα. Οι συγκρίσεις ανάμεσα σε κατηγορικές μεταβλητές πραγματοποιήθηκαν με τον έλεγχο χ^2 . Οι συγκρίσεις ανάμεσα σε κατηγορικές και συνεχείς μεταβλητές πραγματοποιήθηκαν με t-test, ANOVA και ANCOVA όταν εξασφαλιζόταν η κανονικότητα και με Mann-Whitney και Kruskal-Wallis test όταν οι κατανομές δεν ήταν κανονικές. Για τον έλεγχο συσχετίσεων χρησιμοποιήθηκαν οι συντελεστές Pearson και Spearman. Η επίδραση του πολυμορφισμού και της διατροφής στα επίπεδα της CRP εκτιμήθηκε με πολλαπλή παλινδρόμηση. Όλοι οι έλεγχοι θα πραγματοποιήθηκαν σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Το συνολικό δείγμα αποτελούν 435 άτομα ηλικίας άνω των 60 ετών (60-95 ετών). Τα γενικά χαρακτηριστικά του δείγματος παρουσιάζονται στον πίνακα 3.1.

Πίνακας 3.1. Γενικά χαρακτηριστικά του δείγματος.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ		
N		435
Δημογραφικά χαρακτηριστικά		
Φύλο (Άντρες/ γυναίκες)		147 /288
Ηλικία (M±SD) (έτη)		73,70 ± 7,0
Κάπνισμα (%)	Καπνιστές	10,4
	Πρώην καπνιστές	24,7
	Μη καπνιστές	64,9
Μόρφωση (%)	Καμία	9,0
	Πρωτοβάθμια	56,6
	Δευτεροβάθμια	25,6
Οικογενειακή κατάσταση (%)	Τριτοβάθμια	8,8
	Ελεύθεροι	3,7
	Έγγαμοι	49,4
	Χωρισμένοι	7,4
	Χήροι	39,5
Κλινικά χαρακτηριστικά		
Δείκτης μάζας σώματος (M±SD) (kg/m ²)		29,99 ± 4,6
Υπέρβαρο (%)		40,2
Παχυσαρκία (%)		48,0
Υπέρταση (%)		76,4
Δυσλιπιδαιμία (%)		88,7
Ολική χοληστερόλη >200 mg/dl (%)		77,8
LDL-C >130 mg/dl (%)		68,3
Υπεργλυκαιμία (%)		20,3
Φαρμακευτική αγωγή		
Αντιυπερτασική θεραπεία (%)		50,5
Αντιλιπιδαιμική θεραπεία (%)		22,6
Στατίνες (%)		16,6
Αντιδιαβητική θεραπεία (%)		5,1
Μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη (%)		18,0
Σαλικυλικό (%)		12,2
Ιατρικό ιστορικό		
Οστεοπόρωση (%)		17,3
Καρδιοπαθείς (%)		20,9
Αγγειοπλαστική (%)		5,5
Εγκεφαλικό (%)		2,8
Έμφραγμα (%)		4,1
Στηθάγχη (%)		4,6
Αρρυθμία (%)		11,5
Άλλη καρδιαγγειακή ανεπάρκεια (%)		6,9

Η μέση ηλικία των ατόμων ήταν 73,70 (SD:±7,0) έτη. Το 66,2% του δείγματος αποτελούσαν γυναίκες και το 33,8% άντρες. Ο μέσος δείκτης μάζας σώματος ήταν 29,99 (SD:±4,6) kg/m² και η συχνότητα εμφάνισης υπέρβαρου και παχυσαρκίας ήταν 40,2% και 48,0% αντίστοιχα. Το 76,4% του δείγματος είχε υπέρταση (πίεση ≥140 ή/και ≥90mm Hg ή/και αντιυπερτασική θεραπεία), ενώ το 88,7% εμφάνιζε δυσλιπιδαιμία (TC >200mg/dl ή/και LDL >130mg/dl ή/και TG>150mg/dl ή/και HDL <40mg/dl ή αντιλιπιδαιμική θεραπεία). Τα ποσοστά υπεργλυκαιμίας (γλυκόζη νηστείας>110 mg/dl ή αντιδιαβητικά δισκία) ήταν 20,3%.

Η συχνότητα εμφάνισης οστεοπενία ή/και οστεοπόρωσης υπολογίστηκε στο 17,3%, ενώ το 20,9% των ατόμων είχαν ιστορικό καρδιαγγειακής νόσου (αγγειοπλαστική, έμφραγμα, αρρυθμία, εγκεφαλικό, στηθάγχη, ισχαιμία, φλεβική ανεπάρκεια, καρδιακή ατροφία).

3.2 ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΕΠΑΡΚΟΥΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΥ

Από το ερωτηματολόγιο συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων εκτιμήθηκε η ημερήσια πρόσληψη για κάθε κατηγορία τροφίμων. Τα τρόφιμα χωρίστηκαν σε κατηγορίες ανάλογα με την περιεκτικότητά τους σε ψευδάργυρο και προσδιορίστηκε ένας συντελεστής περιεκτικότητας ψευδαργύρου για κάθε τρόφιμο ή ομάδα τροφίμων σύμφωνα με τους πίνακες συνθέσεως ελληνικών τροφίμων (141). Η ημερήσια κατανάλωση για κάθε τρόφιμο πολλαπλασιάστηκε με τον αντίστοιχο συντελεστή περιεκτικότητας ψευδαργύρου και το άθροισμα για όλα τα τρόφιμα συγκρίθηκε με τη συνιστώμενη ημερήσια πρόσληψη για το μικροθρεπτικό συστατικό (DRI: 11 mg για τους άντρες, 8 mg για τις γυναίκες). Για κάθε εθελοντή υπολογίστηκε ένα σκορ ψευδαργύρου που αντιστοιχούσε στο εκτιμώμενο ποσοστό κάλυψης της συνιστώμενης πρόσληψης. Σύμφωνα με το σκορ ψευδαργύρου χωρίστηκαν τα άτομα του δείγματος σε τρεις κατηγορίες: χαμηλή πρόσληψη ψευδαργύρου ($\leq 60\%$ DRI), μέτρια πρόσληψη ($60\%-80\%$ DRI), επαρκής πρόσληψη ($\geq 80\%$ DRI). Στον πίνακα 3.2 φαίνονται τα κλινικά χαρακτηριστικά των ατόμων ανά κατηγορία ψευδαργύρου.

Πίνακας 3.2. Σύγκριση δεικτών ανά κατηγορία πρόσληψης ψευδαργύρου.

	Πρόσληψη ψευδαργύρου			P-value
	Χαμηλή	Μέτρια	Επαρκής	
N (γυναίκες/ άντρες)	14/21	34/53	238/73	<0,001
Υγιείς/ καρδιοπαθείς (N)	10/25	20/67	61/250	0,412
Ηλικία (M $\pm$ SD) (έτη)	76,34 $\pm$ 7,5	75,23 $\pm$ 7,3	72,91 $\pm$ 6,7	0,001
Δ.Μ.Σ. (M $\pm$ SD) (kg/m ²)	29,66 $\pm$ 4,4	29,39 $\pm$ 4,7	30,21 $\pm$ 4,6	0,962
Συστολική πίεση (M $\pm$ SD) (mm Hg)	138,76 $\pm$ 16,1	145,05 $\pm$ 18,6	144,84 $\pm$ 18,8	0,091
Διαστολική πίεση (M $\pm$ SD) (mm Hg)	79,36 $\pm$ 9,8	79,25 $\pm$ 10,2	77,81 $\pm$ 10,6	0,880
Γλυκόζη (M $\pm$ SD) (mg/dl)	102,09 $\pm$ 16,5	99,25 $\pm$ 17,2	100,31 $\pm$ 18,8	0,532
TC (M $\pm$ SD) (mg/dl)	217,65 $\pm$ 50,2	229,48 $\pm$ 39,4	233,63 $\pm$ 40,4	0,389
HDL (M $\pm$ SD) (mg/dl)	51,25 $\pm$ 12,4	57,76 $\pm$ 12,9	57,59 $\pm$ 11,2	0,013
LDL (M $\pm$ SD) (mg/dl)	136,53 $\pm$ 44,3	146,94 $\pm$ 34,7	150,73 $\pm$ 36,8	0,430
TG (M $\pm$ SD) (mg/dl)	151,60 $\pm$ 83,5	122,21 $\pm$ 55,9	126,54 $\pm$ 50,6	0,038
Παχυσαρκία (%)	40,0	43,7	50,2	0,938
Υπέρταση (%)	77,1	87,4	73,3	0,052
Άνοια κατά MMSE (%)	65,7	67,8	70,7	0,667
Κατάθλιψη κατά GDS (%)	20,0	14,9	14,8	0,406

Δ.Μ.Σ.: δείκτης μάζας σώματος, TC: ολική χοληστερόλη, TG: τριγλυκερίδια, MMSE: Mini mental state examination, GDS: Geriatric depression scale

Οι τιμές p-value είναι προσαρμοσμένες για την ηλικία και το φύλο.

Το 71,8% των ατόμων (83,2% των γυναικών και 49,7% των αντρών) εμφάνιζαν επαρκή διαιτητική πρόσληψη ψευδαργύρου, ενώ μόνο το 8,0% εμφάνιζε χαμηλή πρόσληψη (4,9% των γυναικών και 14,3% των αντρών). Λαμβάνοντας υπόψη την ηλικία και το φύλο, βρέθηκε σημαντική διαφορά στα επίπεδα HDL και τριγλυκεριδίων ανάμεσα στις κατηγορίες ψευδαργύρου, με την ομάδα χαμηλής πρόσληψης να εμφανίζει τα χαμηλότερα επίπεδα HDL και τα υψηλότερα επίπεδα τριγλυκεριδίων (**Πίνακας 3.2**). Επειδή υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά (έλεγχος Kruskal-Wallis) στην κατανάλωση αμυλούχων ($p<0,001$), οσπρίων ($p=0,025$), λαχανικών ($p=0,007$), φρούτων ($p<0,001$), κρέατος ($p<0,001$), κόκκινου κρέατος ($p<0,001$), γαλακτοκομικών ($p<0,001$), τυριού ($p<0,001$), ελαιολάδου ($p=0,046$) και άλλων ελαίων ($p=0,041$) ανάμεσα στις τρεις κατηγορίες ψευδαργύρου, συμπεριλήφθηκαν ως συμμεταβλητές στον έλεγχο διακύμανσης των επιπέδων HDL και τριγλυκεριδίων. Η διαφορά για την HDL ως προς τις κατηγορίες ψευδαργύρου παρέμεινε σημαντική ($p=0,031$), ενώ για τα τριγλυκερίδια όχι ($p=0,114$). Δεν υπήρχε σημαντική διαφορά σε κανένα άλλο χαρακτηριστικό ανάλογα με την κατηγορία ψευδαργύρου (**Πίνακας 3.2**).

Σχετικά με τις υπόλοιπες διατροφικές συνήθειες των ηλικιωμένων, βρέθηκε αρνητική συσχέτιση της ηλικίας με την κατανάλωση λαχανικών ($\rho=-0,226$, $p=0,001$) και με την κατανάλωση θαλασσινών ($\rho=-0,145$, $p=0,026$) για τις μη καρδιοπαθείς γυναίκες, ενώ για τους μη καρδιοπαθείς άντρες υπήρχε θετική συσχέτιση της ηλικίας με την κατανάλωση γαλακτοκομικών ($\rho=0,204$, $p=0,034$) και αρνητική συσχέτιση με την κατανάλωση θαλασσινών ($\rho=-0,227$, $p=0,018$) και με την κατανάλωση πουλερικών ($\rho=-0,249$, $p=0,009$). Δεν βρέθηκε καμία συσχέτιση της ηλικίας με τις διατροφικές συνήθειες καρδιοπαθών αντρών και γυναικών.

3.3 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΝΘΡΩΠΟΜΕΤΡΙΚΩΝ, ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΑΝΑ ΦΥΛΟ ΚΑΙ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΥΓΕΙΑΣ

Το δείγμα των 435 ηλικιωμένων ατόμων αποτελείται από 344 (79,08%) άτομα χωρίς ιστορικό καρδιαγγειακής νόσου (236 γυναίκες και 108 άντρες) και 91 (20,92%) άτομα με καρδιαγγειακή νόσο (52 γυναίκες και 39 άντρες). Τα δημογραφικά και κοινωνικά χαρακτηριστικά των ατόμων ανά φύλο και κατάσταση υγείας φαίνονται στον **πίνακα 3.3**.

Πίνακας 3.3. Δημογραφικά χαρακτηριστικά ανά φύλο και κατάσταση υγείας.

		ΜΗ ΚΑΡΔΙΟΠΑΘΕΙΣ			ΚΑΡΔΙΟΠΑΘΕΙΣ		
		ΓΥΝΑΙΚΕΣ	ΑΝΤΡΕΣ	P value	ΓΥΝΑΙΚΕΣ	ΑΝΤΡΕΣ	P value
N (%)		236 (68,6)	108 (31,4)		52 (57,1)	39 (42,9)	
Ηλικία (έτη) (M±SD)		72,44±6,88	75,19±7,63	0,001	73,52±4,88	77,44±6,74	0,002
Μόρφωση N (%)	Καμία	25 (10,7)	5 (4,6)	0,071	6 (11,5)	3 (7,7)	0,001
	Πρωτοβάθμια	135 (57,7)	63 (58,3)		33 (63,5)	14 (35,9)	
	Δευτεροβάθμια	59 (25,2)	31 (28,7)		8 (15,4)	13 (33,3)	
	Τριτοβάθμια	15 (6,4)	9 (8,3)		5 (9,6)	9 (23,1)	
Μόρφωση (έτη) (M±SD)		6,75±4,19	7,28±4,13	0,075	6,62±4,66	9,72±4,87	<0,001
Κάπνισμα N (%)	Μη καπνιστές	190 (81,2)	36 (33,3)	<0,001	45 (86,5)	10 (25,6)	<0,001
	Πρώην καπνιστές	19 (8,1)	58 (53,7)		2 (3,8)	28 (71,8)	
	Καπνιστές	25 (10,7)	14 (13,0)		5 (9,6)	1 (2,6)	
Τσιγάρα/ εβδομάδα (M±SD)		0,16±0,49	0,20±0,56	0,143	0,17±0,55	0,05±0,32	0,460
Οικογενειακή κατάσταση N(%)	Άγαμοι	8 (3,4)	3 (2,8)	<0,001	4 (7,7)	1 (2,6)	<0,001
	Εγγαμοι	87 (37,2)	74 (68,5)		20 (38,5)	33 (84,6)	
	Χωρισμένοι	23 (9,8)	5 (4,6)		3 (5,8)	1 (2,6)	
	Χήροι	116 (49,6)	26 (24,1)		25 (48,1)	4 (10,3)	
MMSE (M±SD)		24,61±5,07	25,57±4,12	0,008	23,67±5,12	25,03±4,79	0,066
Άνοια κατά MMSE N(%)		73 (31,2)	26 (24,1)	0,052	19 (36,5)	13 (33,3)	0,508
GDS (M±SD)		4,15±3,59	2,87±2,69	<0,001	5,15±3,48	3,31±3,61	0,001
Κατάθλιψη κατά GDS N(%)		43 (18,4)	7 (6,5)	0,001	9 (17,3)	7 (17,9)	0,597

MMSE: Mini mental state examination, GDS: Geriatric depression scale

Οι τιμές p-value είναι προσαρμοσμένες για την ηλικία.

Στην ομάδα των καρδιοπαθών υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στο μορφωτικό επίπεδο και στα χρόνια μόρφωσης ανάμεσα σε άντρες και γυναίκες, ενώ δεν ίσχυε το ίδιο για τους υγιείς ηλικιωμένους (**Πίνακας 3.3**). Τόσο στους υγιείς, όσο και στους καρδιοπαθείς υπήρχε σημαντική διαφορά στις καπνιστικές συνήθειες, καθώς το μεγαλύτερο ποσοστό των γυναικών ήταν μη καπνίστριες και το μεγαλύτερο ποσοστό των αντρών ήταν πρώην καπνιστές. Σχετικά με τις γνωσιακές λειτουργίες, βρέθηκε οριακά σημαντική μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης άνοιας (κατά MMSE) στις υγιείς γυναίκες έναντι των υγιών αντρών, και μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης κατάθλιψης (κατά GDS), ενώ στην ομάδα των καρδιοπαθών δεν υπήρχαν διαφορές στις αντίστοιχες συχνότητες (**Πίνακας 3.3**). Η εμφάνιση κατάθλιψης δεν βρέθηκε να σχετίζεται με την κατάσταση υγείας ($p=0,856$) στις γυναίκες, όμως η συσχέτιση ήταν σημαντική για τους άντρες (6,5% υγιών με κατάθλιψη έναντι 17,9% καρδιοπαθών, $p=0,048$).

Πίνακας 3.4. Κλινικά χαρακτηριστικά ανά φύλο και κατάσταση υγείας.

	ΜΗ ΚΑΡΔΙΟΠΑΘΕΙΣ			ΚΑΡΔΙΟΠΑΘΕΙΣ		
	ΓΥΝΑΙΚΕΣ	ΑΝΤΡΕΣ	P-value	ΓΥΝΑΙΚΕΣ	ΑΝΤΡΕΣ	P-value
N (%)	236 (68,6)	108 (31,4)		52	39	
Ηλικία (έτη) (M±SD)	72,44±6,88	75,19±7,63	0,001	73,52±4,88	77,44±6,74	0,002
Δ.Μ.Σ. (M±SD)	30,51±4,71	28,58±4,05	0,001	31,00±5,16	29,43±4,05	0,426
Συστολική πίεση (M±SD)	142,78±18,60	145,90±18,17	0,290	145,39±18,91	148,33±19,08	0,504
Διαστολική πίεση (M±SD)	77,63±10,14	81,43±10,57	0,003	75,86±10,36	76,16±10,71	0,990
Γλυκόζη (M±SD)	98,82±16,78	102,28±20,76	0,095	100,43±18,82	103,26±18,81	0,647
TC (M±SD)	237,31±40,76	221,94±40,17	0,005	238,25±37,33	213,90±42,27	0,004
HDL (M±SD)	59,09±11,50	55,09±10,90	0,004	59,09±12,95	47,84±8,33	<0,001
LDL (M±SD)	152,75±37,44	143,11±37,02	0,081	151,52±34,34	137,32±35,87	0,051
TG (M±SD)	127,62±52,93	119,33±59,91	0,122	138,19±54,58	136,74±54,89	0,742
Αντιλιπιδαιμική θεραπεία N(%)	54 (23,0)	16 (14,8)	0,113	16 (30,8)	12 (30,8)	0,671
Αντιυπερτασική θεραπεία N(%)	117 (49,8)	47 (43,5)	0,108	30 (57,7)	25 (64,1)	0,889

Δ.Μ.Σ.: δείκτης μάζας σώματος, TC: ολική χοληστερόλη, TG: τριγλυκερίδια
Οι τιμές p-value είναι προσαρμοσμένες για την ηλικία.

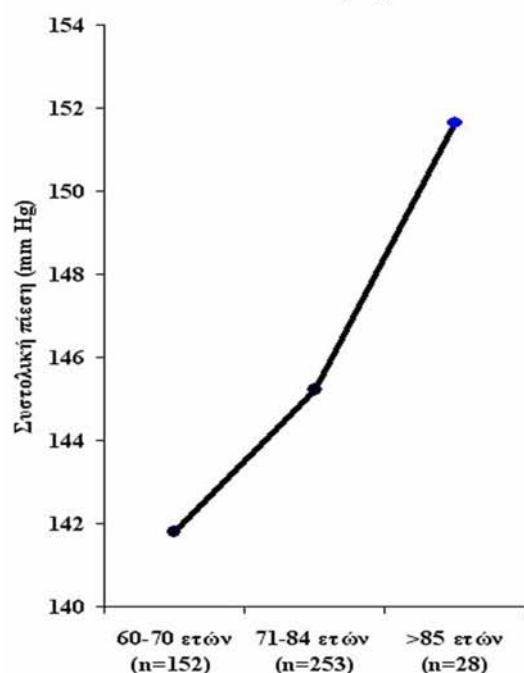
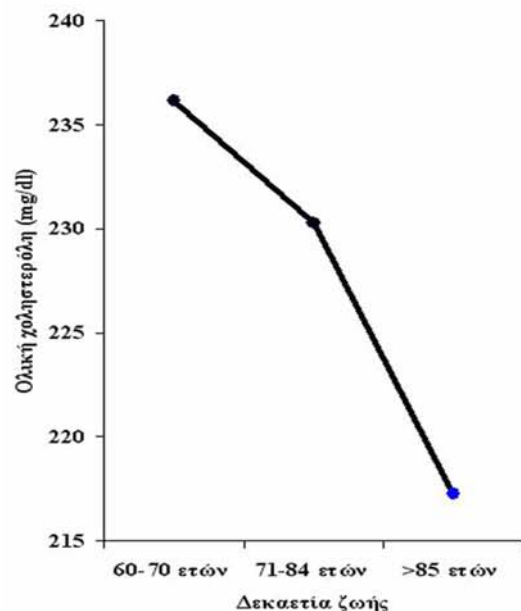
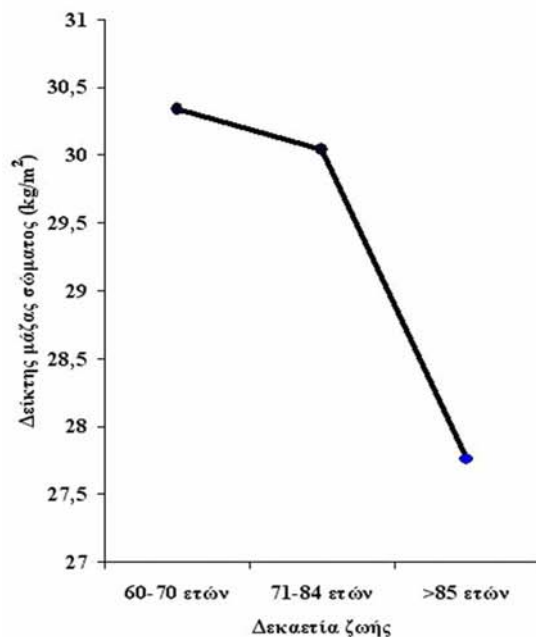
Οι υγιείς γυναίκες εμφάνιζαν μεγαλύτερο δείκτη μάζας σώματος σε σχέση με τους υγιείς άντρες ($p=0,001$), ενώ δεν υπήρχε η ίδια διαφορά ανάμεσα στα δύο φύλα στην ομάδα των καρδιοπαθών (**Πίνακας 3.4**). Συνολικά 86,9% των υγιών ατόμων (89,4% γυναικών και 81,5% των αντρών) και 93,5% των καρδιοπαθών (96,1% των γυναικών και 89,7% των αντρών) ήταν υπέρβαροι ή παχύσαρκοι (**Πίνακας 3.5**). Καρδιοπαθείς γυναίκες και άντρες είχαν ίδια επίπεδα συστολικής και διαστολικής πίεσης, ενώ για τους υγιείς άντρες τα επίπεδα διαστολικής πίεσης ήταν υψηλότερα σε σχέση με τις υγιείς γυναίκες ($p=0,003$) και σε σχέση με τους καρδιοπαθείς άντρες ($p=0,031$, προσαρμοσμένο για τη λήψη αντιυπερτασικής θεραπείας) (**Πίνακας 3.4**). Η συχνότητα εμφάνισης υπέρτασης ήταν 76,4% στο συνολικό δείγμα, χωρίς σημαντικές διαφορές ανά φύλο και κατάσταση υγείας ($p=0,556$ προσαρμοσμένο για την ηλικία) (**Πίνακας 3.5**). Δεν υπήρχαν διαφορές στα επίπεδα γλυκόζης νηστείας ανάμεσα στα δύο φύλα απουσία ή παρουσία καρδιαγγειακής νόσου ($p=0,310$) (**Πίνακας 3.4**, για τις συγκρίσεις ανά φύλο). Το 20,3% των ατόμων εμφάνιζαν υπεργλυκαιμία (γλυκόζη νηστείας ≥ 110 mg/dl ή/και αντιδιαβητική θεραπεία), χωρίς διαφορές ανάμεσα στα δύο φύλα ανά κατάσταση υγείας ($p=0,226$) (**Πίνακας 3.5**).

Βρέθηκε σημαντική διαφορά στα επίπεδα χοληστερόλης μεταξύ αντρών και γυναικών, τόσο στην ομάδα των υγιών όσο και στην ομάδα των καρδιοπαθών ηλικιωμένων (**Πίνακας 3.4**), ενώ ούτε οι γυναίκες ($p=0,793$), ούτε οι άντρες ($p=0,785$, προσαρμοσμένο για τη λήψη αντιλιπιδαιμικής θεραπείας) είχαν διαφορές στα επίπεδα ολικής χοληστερόλης ανάλογα με την κατάσταση υγείας. Το 81,2% των υγιών γυναικών και το 84,6% των καρδιοπαθών γυναικών είχαν υπερχοληστερολαιμία (ολική χοληστερόλη >200 mg/dl), ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν χαμηλότερα για τους άντρες (77,0% και 66,7%, πίνακας 3.5). Ανάλογες διαφορές υπήρχαν και για την HDL, όπου οι γυναίκες (υγιείς και καρδιοπαθείς) παρουσίαζαν υψηλότερα επίπεδα από τις αντίστοιχες ομάδες αντρών (**Πίνακας 3.4**). Δεν υπήρχε διαφορά στα επίπεδα HDL μεταξύ των γυναικών (καρδιοπαθών και μη) ($p=0,999$), ωστόσο οι καρδιοπαθείς άντρες παρουσίαζαν χαμηλότερα επίπεδα HDL σε σχέση με τους υγιείς άντρες ($p<0,001$). Μόνο το 4,8% των ατόμων είχαν επίπεδα HDL <40 mg/dl (**Πίνακας 3.5**). Δεν υπήρχαν διαφορές στα επίπεδα LDL και τριγλυκεριδίων ανάμεσα σε άντρες και γυναίκες υγιείς (**Πίνακες 3.4, 3.5**), ενώ οι καρδιοπαθείς άντρες εμφάνιζαν οριακά χαμηλότερα επίπεδα LDL από τις καρδιοπαθείς γυναίκες ($p=0,051$).

Πίνακας 3.5. Συχνότητες εμφάνισης κλινικών χαρακτηριστικών ανά φύλο και κατάσταση υγείας.

	ΜΗ ΚΑΡΔΙΟΠΑΘΕΙΣ			ΚΑΡΔΙΟΠΑΘΕΙΣ		
	ΓΥΝΑΙΚΕΣ	ΑΝΤΡΕΣ	p-value	ΓΥΝΑΙΚΕΣ	ΑΝΤΡΕΣ	p-value
N (%)	236 (68,6)	108 (31,4)		52	39	
Ελλιποβαρές N(%)	1 (0,4)	1 (0,9)	0,028	0 (0)	0 (0)	0,603
Φυσιολογικό βάρος N(%)	24 (10,2)	19 (17,6)		2 (3,8)	4 (10,3)	
Υπέρβαρο N(%)	81 (34,3)	49 (45,4)		23 (44,2)	22 (56,4)	
Παχυσαρκία N(%)	130 (55,1)	39 (36,1)		27 (51,9)	13 (33,3)	
Υπέρταση N(%)	172 (73,5)	85 (78,7)	0,539	33 (84,6)	41 (78,8)	0,995
Υπεργλυκαιμία N(%)	39 (16,6)	25 (23,1)	0,154	13 (25,0)	11 (28,9)	0,982
TC<200 mg/dl N(%)	44 (18,7)	31 (28,7)	0,058	8 (15,4)	13 (33,3)	0,016
200<TC<239 mg/dl N(%)	80 (34,0)	41 (38,0)		18 (34,6)	17 (43,6)	
TC≥240 mg/dl N(%)	111 (47,2)	36 (33,3)		26 (50,0)	9 (23,1)	
HDL<40 mg/dl (%)	6 (9,6)	8 (5,6)	0,400	2 (3,8)	5 (12,8)	0,065
TG≥150 mg/dl (%)	64 (27,2)	22 (20,4)	0,136	18 (34,6)	15 (38,5)	0,935
LDL<130 mg/dl N(%)	64 (27,2)	43 (39,8)	0,089	12 (23,1)	19 (48,7)	0,057
130<LDL<159 mg/dl N(%)	74 (31,5)	30 (27,8)		16 (30,8)	10 (25,6)	
160<LDL<189 mg/dl N(%)	55 (23,4)	25 (23,1)		17 (32,7)	7 (17,9)	
LDL≥190 mg/dl N(%)	42 (17,9)	10 (9,3)		7 (13,5)	3 (7,7)	

TC: ολική χοληστερόλη, TG: τριγλυκερίδια
Οι τιμές p-value είναι προσαρμοσμένες για την ηλικία.



Ο δείκτης μάζας σώματος βρέθηκε να σχετίζεται αρνητικά με την ηλικία ($r=-0,148$, $p=0,002$) για το σύνολο των ηλικιωμένων ατόμων και η συσχέτιση παρέμεινε σημαντική για τα άτομα ≥ 85 ετών σε σχέση με εκείνα 60-70 ετών και 71-84 ετών ($27,76 \pm 3,7$ έναντι $30,04 \pm 4,7$ kg/m², $p=0,018$ και $30,33 \pm 4,5$ kg/m² αντίστοιχα, $p=0,035$), ακόμα και όταν λήφθηκαν υπόψη το φύλο και η κατάσταση υγείας. (Σχήμα 3.1)

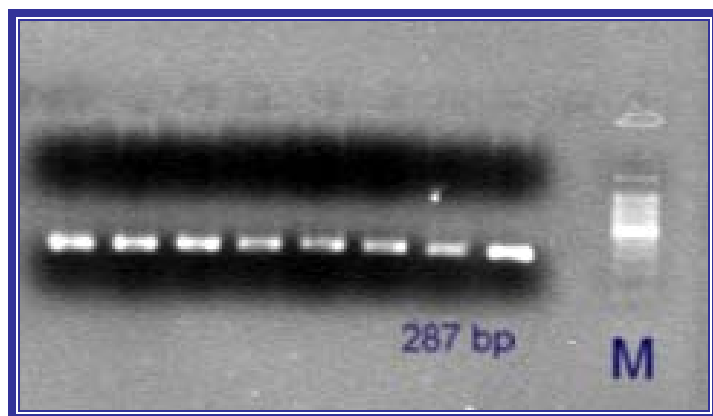
Τα επίπεδα ολικής χοληστερόλης είχαν επίσης αρνητική συσχέτιση με την ηλικία ($r=-0,124$, $p=0,010$) για το σύνολο των ηλικιωμένων, ενώ όταν λήφθηκαν υπόψη το φύλο και η αντιλιπιδαιμική θεραπεία, η διαφορά στα επίπεδα της ολικής χοληστερόλης παρέμεινε σημαντική μόνο για τους υπερήλικες (≥ 85 ετών) σε σχέση με τους νεότερους ηλικιωμένους (60-70 ετών) ($M \pm SD$: $217,29 \pm 44,2$ έναντι $236,14 \pm 41,1$ mg/dl, $p=0,055$). (Σχήμα 3.1)

Η συστολική πίεση παρουσίαζε θετική συσχέτιση με την ηλικία ($r=0,108$, $p=0,029$), ενώ όταν λήφθηκαν υπόψη το φύλο και η αντιυπερτασική θεραπεία, η διαφορά στα επίπεδα συστολικής πίεσης παρέμεινε σημαντική μόνο για τους υπερήλικες (≥ 85 ετών) σε σχέση με τους νεότερους ηλικιωμένους (60-70 ετών) ($M \pm SD$: $151,64 \pm 18,4$ έναντι $141,81 \pm 17,9$ mm Hg, $p=0,034$). (Σχήμα 3.1)

Σχήμα 3.1. Μεταβολή του δείκτη μάζας σώματος, της ολικής χοληστερόλης και της συστολικής πίεσης ανά δεκαετία ζωής.

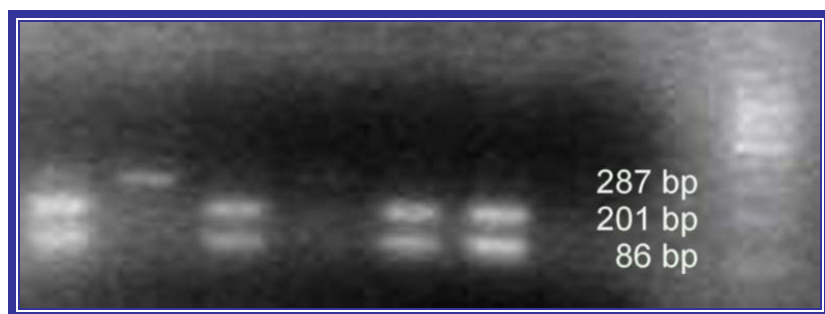
3.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PCR ΚΑΙ ΠΕΨΗΣ

Η επιτυχία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) στον υποκινητή του γονιδίου της CRP επιβεβαιώθηκε με την παρατήρηση των πηκτωμάτων αγαρόζης (όπως περιγράφονται στην παράγραφο 2.7.2) στο υπερίωδες. Ένα τέτοιο πηκτώμα φαίνεται στην εικόνα 3.1. Η ζώνη που φαίνεται σε κάθε δείγμα αντιστοιχεί σε κομμάτι DNA ίσο με 287 bp, συγκρινόμενο με τον μάρτυρα (M). Επιτυχημένες PCR πιστοποιήθηκαν σε 408 δείγματα.



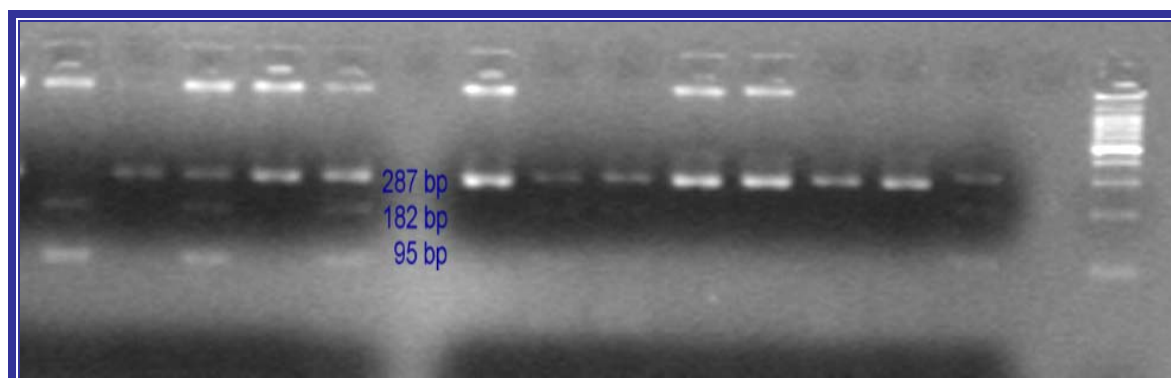
Εικόνα 3.1. Έλεγχος επιτυχίας PCR σε πηκτώμα αγαρόζης.

Ο προσδιορισμός του γονότυπου για τον πολυμορφισμό -286C/T/A στον υποκινητή του γονιδίου της CRP, πραγματοποιήθηκε με την πέψη του προϊόντος της PCR με τα περιοριστικά ένζυμα *Hin4I* και *SpeI*, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.7.3. Το προϊόν κάθε πέψης ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτώμα αγαρόζης. Τα πηκτώματα αγαρόζης παρατηρήθηκαν στο υπερίωδες και προσδιορίστηκε ο γονότυπος για κάθε δείγμα με συνδυασμό των δύο πέψεων. Η αλληλουχία αναγνώρισης για το ένζυμο *Hin4I* υπάρχει στον υποκινητή του γονιδίου παρουσία της βάσης C, οπότε η πέψη οδηγεί σε δύο κομμάτια DNA μήκους 201 bp και 86 bp. Παράδειγμα πέψης με το ένζυμο *Hin4I* φαίνεται στην εικόνα 3.2.



Εικόνα 3.2. Πέψη προϊόντος PCR με *Hin4I* σε πηκτώμα αγαρόζης.

Η αλληλουχία αναγνώρισης για το ένζυμο *SpeI* υπάρχει στον υποκινητή του γονιδίου παρουσία της βάσης A, οπότε η πέψη οδηγεί σε δύο κομμάτια DNA μήκους 182 bp και 95 bp. Παράδειγμα πέψης με το ένζυμο *Hin4I* φαίνεται στην εικόνα 3.3



Εικόνα 3.3. Πέψη προϊόντος PCR με *SpeI* σε πήκτωμα αγαρόζης.

Ο προσδιορισμός του γονότυπου για κάθε άτομο γίνεται με συνδυασμό των αποτελεσμάτων από την πέψη με κάθε ένζυμο, όπως φαίνεται στον πίνακα 3.6.

Πίνακας 3.6. Προσδιορισμός γονότυπου για τον πολυμορφισμό -286C/T/A από τα αποτελέσματα κάθε πέψης.

		<i>SpeI</i> πέψη		
	Ζώνες DNA	287 bp	287 / 182 / 95 bp	182 / 95 bp
Hin4I πέψη	287 bp	TT	TA	AA
	287 / 201 / 86 bp	CT	CA	<i>ΑΔΥΝΑΤΟ</i>
	201 / 86 bp	CC	<i>ΑΔΥΝΑΤΟ</i>	<i>ΑΔΥΝΑΤΟ</i>

3.5 ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΓΟΝΟΤΥΠΩΝ ΚΑΙ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ ΣΤΟ ΔΕΙΓΜΑ

Στα 408 άτομα του δείγματος που προσδιορίστηκε ο γονότυπος για τον πολυμορφισμό –286C/T/A στον υποκινητή του γονιδίου της CRP, βρέθηκαν 88 CC, 198 CT, 61 TT, 42 CA, 17 TA και 2 AA. Η συχνότητα εμφάνισης των γονότυπων και των αλληλομόρφων στο δείγμα φαίνεται στον πίνακα 3.3.

Πίνακας 3.7. Συχνότητα εμφάνισης γονότυπων και αλληλομόρφων.

	ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ							ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΑ		
	CC	CT	TT	CA	TA	AA	ΣΥΝΟΛΟ	C	T	A
N	88	198	61	42	17	2	408	416	337	63
(%)	(21,6)	(48,5)	(14,9)	(10,3)	(4,2)	(0,5)	(100)	(51,0)	(41,3)	(7,7)

Η συχνότητα εμφάνισης του πολυμορφισμού δεν είχε στατιστικά σημαντική διαφορά στα δύο φύλα ($p=0,912$), και στα υγιή και καρδιαγγειακά άτομα του δείγματος ($p=0,621$). Στον πίνακα 3.8 φαίνεται η συχνότητα εμφάνισης των γονότυπων ανά φύλο και παρουσία ή απουσία καρδιαγγειακής νόσου.

Πίνακας 3.8. Συχνότητα εμφάνισης γονότυπων ανά φύλο και κατάσταση υγείας.

		Γονότυπος						p-value
		CC	CT	TT	CA	TA	AA	
N		88	198	61	42	17	2	
Κατάσταση υγείας /φύλο n (%)	Άντρες μη καρδιοπαθείς	20 (22,7)	51 (25,8)	15 (24,6)	11 (26,2)	5 (29,4)	0 (0,0)	0,735
	Γυναίκες μη καρδιοπαθείς	49 (55,7)	106 (53,5)	28 (45,9)	23 (54,8)	9 (52,9)	1 (50,0)	
	Άντρες καρδιοπαθείς	10 (11,4)	17 (8,6)	9 (14,8)	1 (2,4)	1 (5,9)	1 (50,0)	
	Γυναίκες καρδιοπαθείς	9 (10,2)	24 (12,1)	9 (14,8)	7 (16,7)	2 (11,8)	0 (0,0)	

3.6 ΕΛΕΓΧΟΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ -286C/T/A ΜΕ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Ο πολυμορφισμός -286C/T/A στον υποδοχέα του γονιδίου της CRP δεν βρέθηκε να σχετίζεται με τον δείκτη μάζας σώματος, την πίεση, τη γλυκόζη ή τα λιπίδια (Πίνακας 3.9). Παράλληλα δεν βρέθηκε συσχέτιση του πολυμορφισμού με τη συχνότητα εμφάνισης παχυσαρκίας ($p=0,075$), ή με την υπέρταση ($p=0,363$), ή με την υπερχοληστερολαιμία (ολική χοληστερόλη >200 mg/dl) ($p=0,780$), ή με τα αυξημένα επίπεδα LDL (>130 mg/dl) ($p=0,553$).

Πίνακας 3.9. Έλεγχος συσχέτισης του πολυμορφισμού με ανθρωπομετρικούς και κλινικούς δείκτες.

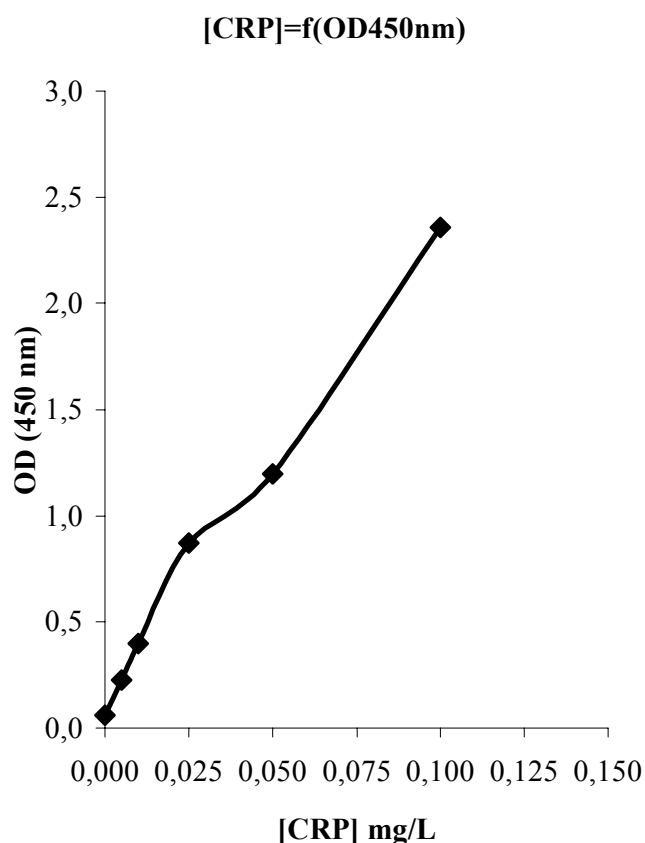
	ΓΟΝΟΤΥΠΟΣ					P-value
	CC (M±SD)	CT (M±SD)	TT (M±SD)	TA (M±SD)	CA ή AA (M±SD)	
N	88	198	61	17	44	
Ηλικία (έτη)	73,40±7,04	73,61±6,94	74,62±7,29	73,88±6,84	73,34±7,01	0,847
Δ.Μ.Σ. (kg/m ²)	30,72±4,43	29,92±4,62	30,26±4,07	29,28±4,09	29,34±5,50	0,447
Συστολική πίεση (mm Hg)	147,60±17,70	143,33±19,36	145,79±19,56	142,24±17,95	144,34±15,89	0,481
Διαστολική πίεση (mm Hg)	79,94±11,70	78,61±9,71	75,47±9,49	78,71±9,01	77,25±11,96	0,208
TC (mg/dl)	234,93±41,49	231,77±39,47	225,16±41,13	242,59±38,86	226,52±46,19	0,409
HDL-C (mg/dl)	56,17±10,43	58,53±12,03	54,13±10,87	55,12±12,59	55,43±12,81	0,070
LDL-C (mg/dl)	151,89±35,90	147,87±35,87	146,39±37,97	163,94±37,27	145,19±40,92	0,369
TG (mg/dl)	131,75±58,16	125,52±53,56	129,79±54,65	117,65±66,18	129,50±52,88	0,831
Γλυκόζη (mg/dl)	101,37±16,48	99,46±18,99	101,41±14,94	94,12±10,66	103,95±23,31	0,766 ^a

Δ.Μ.Σ.: δείκτης μάζας σώματος, TC: ολική χοληστερόλη, TG: τριγλυκερίδια

^a Διορθωμένο για τη λήψη αντιδιαβητικών δισκίων.

3.7 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ CRP ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ ELISA

Η CRP μετρήθηκε σε 280 άτομα του δείγματος με τη μέθοδο ELISA, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.6.2. Χρησιμοποιήθηκαν 5 πρότυπα δείγματα CRP για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης $[CRP]=f(OD_{450nm})$, που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης CRP στον ορό των 280 δειγμάτων. Η πρότυπη καμπύλη φαίνεται στο σχήμα 3.1.



ΣΧΗΜΑ 3.2 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς
 $[CRP]=f(OD_{450\text{ nm}})$

Στην πρότυπη καμπύλη προσαρμόστηκε η καλύτερη εξίσωση παλινδρόμησης, με χρήση του SPSS. Η εξίσωση που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της $[CRP]$ είναι η ακόλουθη:

$$[CRP]=0,0015042-(0,0010220 \text{ OD})+(0,0485626 \text{ OD}^2)-(0,0128907 \text{ OD}^3) \cdot 10^2$$

$$R^2_{\text{adj.}}=0,99 \quad p=0,006$$

όπου OD είναι η τιμή απορρόφησης για κάθε δείγμα (από την οποία έχει αφαιρεθεί η απορρόφηση του τυφλού δείγματος), ενώ η τελική συγκέντρωση υπολογίζεται ύστερα από πολλαπλασιασμό με τον συντελεστή της αραίωσης των δειγμάτων ορού ($\cdot 10^2$).

Επειδή οι τιμές $[CRP]$ δεν ακολουθούσαν την κανονική κατανομή (Kolmogorov-Smirnov $Z=2,675$, $p<0,001$), μετατράπηκαν σε λογάριθμους (log) ώστε να ακολουθούν την κανονική κατανομή (Kolmogorov-Smirnov $Z=1,037$, $p=0,233$). Σε όλες τις στατιστικούς ελέγχους χρησιμοποιήθηκαν οι λογαριθμικές τιμές για την CRP.

3.8 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΑΤΟΜΩΝ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ CRP

Τα 280 άτομα (190 γυναίκες, 90 άντρες) που επιλέχθηκαν για μέτρηση της CRP δεν είχαν ιστορικό στεφανιαίας νόσου (αγγειοπλαστική, by pass, στηθάγχη, καρδιαγγειακή ανεπάρκεια, εγκεφαλικό, έμφραγμα), δεν ήταν καπνιστές και δεν λάμβαναν στατίνες, παράγωγα σαλικυλικού οξέος ή/και στεροειδή. Οι τιμές συγκέντρωσης CRP κυμαίνονταν από 0,15 έως 10,7 mg/L ($M \pm SD$: $2,89 \pm 2,7$), ενώ δεν υπήρχε σημαντική διαφορά ανάμεσα σε γυναίκες και άντρες ($M \pm SD$: $2,99 \pm 2,7$ mg/L και $2,67 \pm 2,6$ mg/L, αντίστοιχα, $p=0,417$).

Στον πίνακα φαίνονται δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ηλικιωμένων ανάλογα με τα επίπεδα CRP πλάσματος, σύμφωνα με τις κατηγορίες κινδύνου κατά AHA (<1 mg/L χαμηλός, 1-3 mg/L μέτριος, >3mg/L αυξημένος κίνδυνος) (142).

Πίνακας 3.10. Χαρακτηριστικά των ατόμων σύμφωνα με τα επίπεδα CRP.

		Συγκέντρωση CRP			P-value
		<1mg/L	1-3 mg/L	>3 mg/L	
N (γυναίκες/ άντρες)		92 (57/35)	89 (65/24)	99 (68/31)	0,273
Ηλικία ($M \pm SD$) (έτη)		74,87 $\pm$ 7,5	73,51 $\pm$ 7,4	75,25 $\pm$ 7,6	0,254
Δ.Μ.Σ. ($M \pm SD$) (kg/m ²)		28,54 $\pm$ 4,2	29,73 $\pm$ 4,54	30,75 $\pm$ 4,7	0,003
Συστολική πίεση ($M \pm SD$) (mm Hg)		141,00 $\pm$ 17,7	146,53 $\pm$ 18,9	148,14 $\pm$ 19,4	0,033
Γλυκόζη ($M \pm SD$) (mg/dl)		95,61 $\pm$ 14,3	101,24 $\pm$ 17,8	102,58 $\pm$ 17,5	0,011
Τριγλυκερίδια ($M \pm SD$) (mg/dl)		117,48 $\pm$ 56,2	123,85 $\pm$ 50,8	140,23 $\pm$ 56,4	0,013
Υπέρταση (%)		74,7	74,2	85,9	0,085
Παχυσαρκία (%)		32,6	41,6	58,6	0,004
Υπεργλυκαιμία (%)		8,8	24,7	27,3	0,003
Έτη μόρφωσης ($M \pm SD$)		7,18 $\pm$ 4,5	6,65 $\pm$ 4,2	6,83 $\pm$ 4,1	0,840
Οικογενειακή κατάσταση (%)	Άγαμος	2,2	6,7	1,0	0,417
	Έγγαμος	44,0	47,2	46,5	
	Χωρισμένος	6,6	6,7	7,1	
	Χήρος	47,3	39,3	45,5	
Άνοια κατά MMSE (%)		29,7	27,0	32,3	0,725
Κατάθλιψη κατά GDS (%)		14,3	15,7	14,1	0,945

Δ.Μ.Σ.: δείκτης μάζας σώματος, MMSE: Mini mental state examination, GDS: Geriatric depression scale

Το 64,6% των ατόμων είχαν επίπεδα CRP<3 mg/L, ενώ το 6,8% είχαν >8,0 mg/L (ανώτερο φυσιολογικό όριο). Τα άτομα που είχαν επίπεδα CRP>3mg/L είχαν σημαντικά μεγαλύτερο δείκτη μάζας σώματος ($p=0,002$), συστολική πίεση ($p=0,036$), επίπεδα γλυκόζης ($p=0,014$) και τριγλυκεριδίων ($p=0,013$) σε σχέση με την ομάδα των χαμηλότερων επιπέδων CRP (<1 mg/L), ενώ δεν υπήρχε διαφορά στην εμφάνιση άνοιας ή κατάθλιψης ανάμεσα στις κατηγορίες [CRP] (**πίνακας 3.11**).

Στις γυναίκες δεν βρέθηκε σημαντική συσχέτιση των επιπέδων CRP με την ηλικία ($r=-0,004$, $p=0,377$), ωστόσο βρέθηκε σημαντική θετική συσχέτιση με την συστολική πίεση ($r=0,197$, $p=0,009$), το δείκτη μάζας σώματος ($r=0,240$, $p=0,001$), τα επίπεδα ολικής χοληστερόλης ($r=0,145$, $p=0,047$), τα επίπεδα τριγλυκεριδίων ($r=0,230$, $p=0,001$) και τα επίπεδα LDL ($r=0,140$, $p=0,054$), και αρνητική συσχέτιση με τα επίπεδα HDL ($r=0,150$, $p=0,040$). Από τα τρόφιμα, η κατανάλωση θαλασσινών εμφάνιζε τάση αρνητικής συσχέτισης με τα επίπεδα της CRP ($\rho=-0,129$, $p=0,077$), ενώ θετική συσχέτιση υπήρχε με την κατανάλωση κρέατος ($\rho=-0,174$, $p=0,017$) για τις γυναίκες.

Στους άντρες δεν υπήρχε σημαντική συσχέτιση της κατανάλωσης κάποιου τροφίμου με τα επίπεδα CRP, ενώ υπήρχε τάση θετικής συσχέτισης με την ηλικία ($r=0,192$, $p=0,070$) και ισχυρή θετική συσχέτιση με τα επίπεδα γλυκόζης νηστείας ($r=0,306$, $p=0,004$) και την συστολική πίεση ($r=0,239$, $p=0,029$).

3.9 ΕΠΙΠΕΔΑ CRP ΚΑΙ Ο ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ -286C/T/A

Από τα 280 άτομα στα οποία μετρήθηκαν τα επίπεδα CRP, προσδιορίστηκε ο γονότυπος για τον πολυμορφισμό -286C/T/A του γονιδίου της CRP στα 254 άτομα. Οι αναλογίες των γονότυπων ήταν: 54 CC, 129 CT, 37 TT, 25 CA, 9 TA. Λόγω του μικρού αριθμού των TA γονότυπων και της μη σημαντικής διαφοράς των επιπέδων CRP με τους CA γονότυπους ($p=1,000$), οι δύο γονότυποι συνυπολογίστηκαν. Στον πίνακα 3.12 παρουσιάζονται τα κλινικά χαρακτηριστικά των ατόμων ανά γονότυπο, καθώς και η πρόσληψη για επιλεγμένα τρόφιμα. Ο γονότυπος CA/TA είχε υψηλότερα επίπεδα CRP από τον γονότυπο CC ($p<0.001$), και τον γονότυπο CT ($p=0,014$) (Πίνακας 3.12). Εκτός από τα επίπεδα CRP δεν υπήρχε καμία διαφορά στα βιοχημικά και κλινικά χαρακτηριστικά, ούτε και στην διατροφική πρόσληψη ανάμεσα στους γονότυπους.

Πίνακας 3.11. Χαρακτηριστικά ατόμων με μέτρηση CRP ανά γονότυπο.

	ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ				
	CC (M±SD)	CT (M±SD)	TT (M±SD)	CA/ TA (M±SD)	P- value
N (γυναίκες/ άντρες)	54 (40/14)	129 (86/43)	37 (21/16)	34 (23/11)	0,394
Ηλικία (έτη)	74,07±7,8	74,66±7,3	76,30±7,9	73,88±7,1	0,485
CRP (mg/L)	2,02±2,2	2,75±2,5	3,00±2,7	4,65±3,3	<0,001
Δ.Μ.Σ. (kg/m ²)	30,48±4,08	29,70±4,6	29,70±4,1	28,96±5,0	0,470
Συστολική πίεση (mm Hg)	148,12±17,06	144,03±20,1	147,63±20,1	147,15±15,7	0,524
Διαστολική πίεση (mm Hg)	81,22±11,6	78,57±10,3	76,56±9,0	78,24±11,6	0,225
TC (mg/dl)	239,37±43,5	236,15±39,0	235,70±37,5	236,06±46,5	0,963
HDL-C (mg/dl)	57,34±9,75	58,77±11,7	55,07±11,3	55,35±13,4	0,227
LDL-C (mg/dl)	156,47±37,9	151,98±35,6	157,32±34,4	154,93±40,0	0,811
TG (mg/dl)	127,83±50,1	127,02±58,2	127,38±52,9	128,88±53,5	0,998
Γλυκόζη (mg/dl)	99,44±13,4	98,46±16,0	100,78±15,1	105,94±22,9	0,138
Έτη μόρφωσης	7,72±4,5	6,72±4,0	6,51±4,9	7,41±4,03	0,443
Αποχή από κάπνισμα (έτη)	22,56±14,9	24,02±17,7	21,70±7,8	19,29±13,8	0,128
Αλκοόλ (ποτήρια /ημ.)	0,38±0,6	0,49±1,0	0,52±0,9	0,40±0,6	0,742
Κρασί (ποτήρια/ ημ.)	0,32±0,6	0,43±0,9	0,36±0,6	0,34±0,6	0,767
Μερίδες θαλασσινών/ εβδο.	1,87±1,2	1,60±1,1	1,95±1,8	1,91±1,2	0,228
Μερίδες λαχανικών/ ημ.	1,38±0,6	1,38±0,5	1,26±0,5	1,31±0,49	0,563
Μερίδες φρούτων/ ημ.	2,38±1,6	2,12±1,4	2,58±1,5	2,30±1,4	0,246
Σπορέλαιο (κ.σ./ ημ.)	0,52±1,1	0,61±1,1	0,50±1,1	0,32±0,5	0,534

Δ.Μ.Σ.: Δείκτης μάζας σώματος, TC: ολική χοληστερόλη, TG: τριγλυκερίδια, ημ.: ημέρα, εβδο.: εβδομάδα, κ.σ.: κουταλιές της σούπας

3.10 ΕΛΕΓΧΟΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΜΕ ΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ CRP, ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΥΣ, ΚΛΙΝΙΚΟΥΣ ΔΕΙΚΤΕΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗ.

Τα επίπεδα CRP στα άτομα με CC γονότυπο εμφάνιζαν θετική συσχέτιση με το δείκτη μάζας σώματος ($r=0,277$, $p=0,043$) και τα επίπεδα τριγλυκεριδίων ($r=0,296$, $p=0,049$). Στα άτομα με γονότυπο CT υπήρχε θετική συσχέτιση των επιπέδων CRP με την συστολική αρτηριακή πίεση ($r=0,261$, $p=0,005$), με το δείκτη μάζας σώματος ($r=0,314$, $p<0,001$), με τα επίπεδα γλυκόζης ($\rho=0,220$, $p=0,013$), τα επίπεδα τριγλυκεριδίων ($\rho=0,278$, $p=0,001$) και την κατανάλωση σπορελαίων ($\rho=0,196$, $p=0,027$). Για τον γονότυπο TT υπήρχε αρνητική συσχέτιση με την κατανάλωση λαχανικών και θαλασσινών ($\rho=-0,345$, $p=0,037$ και $\rho=-0,446$, $p=0,006$, αντίστοιχα), ενώ για τους CA/TA γονότυπους υπήρχε θετική συσχέτιση με το δείκτη μάζας σώματος ($r=0,327$, $p=0,059$) και αρνητική συσχέτιση με την κατανάλωση λαχανικών ($\rho=-0,459$, $p=0,006$).

Τα αποτελέσματα της γραμμικής παλινδρόμησης (Πίνακας 3.12) έδειξαν σημαντική θετική επίδραση στα επίπεδα της CRP από τον γονότυπο ($\beta=0,286$, $p<0,001$), το δείκτη μάζας σώματος ($\beta=0,259$, $p<0,001$) και αρνητική επίδραση από την κατανάλωση θαλασσινών ($\beta=-0,128$, $p=0,039$).

Πίνακας 3.12. Μοντέλο παλινδρόμησης για την εκτίμηση της σχέσης των επιπέδων CRP με τον γονότυπο του πολυμορφισμού -286C/T/A.

Μεταβλητή	β-συντελεστής	P
Γονότυπος	0,286	<0,001
CT vs CC	0,178	0,019
TT vs CC	0,236	0,041
CA/TA vs CC	0,464	<0,001
TT vs CT	0,018	0,814
CA/TA vs CT	0,265	0,001
CA/TA vs TT	0,347	0,003
Ηλικία (έτη)	0,053	0,420
Άντρες vs. γυναίκες	0,038	0,568
Δείκτης μάζας σώματος (kg/m^2)	0,259	<0,001
Γλυκόζη (mg/dl)	0,098	0,121
Τριγλυκερίδια (mg/dl)	0,076	0,231
Συστολική πίεση (mm Hg)	0,107	0,094
Μερίδες θαλασσινών/ εβδ.	-0,128	0,039
Μερίδες λαχανικών/ ημ.	-0,076	0,224
Σπορέλαιο (κ.σ./ ημ.)	0,102	0,098

Βρέθηκε θετική επίδραση των CT, TT και CA/TA γονότυπων έναντι του CC στα επίπεδα της CRP, θετική επίδραση του CA/TA γονότυπου έναντι των CT και TT γονότυπων, ενώ η επίδραση του TT γονότυπου έναντι του CT ως προς τα επίπεδα της CRP δεν ήταν στατιστικά σημαντική (Πίνακας 3.12).

$p \text{ value} < 0.001$, $R^2 \text{adj.} = 18,5\%$

Όταν ερευνήθηκε η επίδραση των τροφίμων ανά γονότυπο βρέθηκε τάση για αρνητική επίδραση των θαλασσινών στα επίπεδα της CRP ($\beta=-0,257$, $p=0,067$) για τον CC γονότυπο, θετική επίδραση της κατανάλωσης σπορέλαιου ($\beta=0,234$, $p=0,008$) για τον CT γονότυπο και αρνητική επίδραση της κατανάλωσης λαχανικών ($\beta=-0,402$, $p=0,022$) για τους CA/TA γονότυπους (**Πίνακας 3.12**). Τα άτομα σε κάθε γονότυπο δεν είχαν σημαντικές διαφορές στην κατανάλωση αυτών των τροφίμων, ούτε και στα επίπεδα των βιοχημικών δεικτών εκτός της CRP (**Πίνακας 3.11**).

Πίνακας 3.12. Μοντέλο παλινδρόμησης για την εκτίμηση της σχέσης των επιπέδων CRP με τον γονότυπο του πολυμορφισμού -286C/T/A.

	CC		CT		TT		CA/TA	
Μεταβλητή	β-συντ.	P	β-συντ.	P	β-συντ.	P	β-συντ.	P
Μερίδες θαλασσινών/ εβδ.	-0,257	0,067	-0,068	0,442	-0,197	0,234	-0,019	0,910
Μερίδες λαχανικών/ ημ.	-0,035	0,800	0,042	0,637	-0,293	0,089	-0,402	0,022
Σπορέλαιο (κ.σ./ ημ.)	-0,010	0,942	0,234	0,008	0,107	0,535	0,184	0,271
p value/R ² adj.	0,329 / 1%		0,048 / 3,9%		0,091 / 10,1%		0,088 / 11,2%	

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα έρευνα μελετήθηκαν ανθρωπομετρικά, βιοχημικά και κλινικά χαρακτηριστικά ενός δείγματος 435 ηλικιωμένων (≥ 60 ετών) Ελλήνων (288 γυναίκες, 147 άντρες) και η σχέση του πολυμορφισμού -286C/T/A, στον υποδοχέα του γονιδίου της CRP, με τα επίπεδα της πρωτεΐνης και τη διατροφή.

Το 79,1% (236 γυναίκες, 108 άντρες) των ηλικιωμένων που συμμετείχαν στην παρούσα μελέτη είχαν καλή κατάσταση υγείας, χωρίς σοβαρές ασθένειες και χωρίς ιστορικό καρδιαγγειακής νόσου, ενώ το 20,1% (52 γυναίκες, 39 άντρες) ήταν καρδιοπαθείς. Το 88,2% των ηλικιωμένων (83,7% των αντρών και το 96,6% των γυναικών) ήταν υπέρβαροι ή παχύσαρκοι ($\Delta.Μ.Σ. \geq 25 \text{kg/m}^2$), ενώ μόνο το 0,5% ήταν υποσιτισμένοι. Η συχνότητα εμφάνισης της παχυσαρκίας σε ηλικιωμένους πληθυσμούς δεν είναι πολύ καλά καταγεγραμμένη και διαφέρει ανάλογα με την γεωγραφική τοποθεσία και το σχεδιασμό της μελέτης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της έρευνας NHANES III στην Αμερική, το 70,0% των αντρών και το 64,0% των γυναικών βρέθηκαν υπέρβαροι ή παχύσαρκοι (17), ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν χαμηλότερα για τους ηλικιωμένους >70 ετών (61,1% των αντρών, 56,1% των γυναικών) (18). Ανάλογα υψηλά ποσοστά υπέρβαρου και παχυσαρκίας καταγράφηκαν και στην Φιλανδία, όπου το 81,0% των αντρών και το 73,0% των γυναικών (55-64 ετών) είχαν $\Delta.Μ.Σ. \geq 25 \text{kg/m}^2$ (143). Στη Γερμανία, τα ποσοστά παχυσαρκίας για τους ηλικιωμένους (60-69 ετών) ήταν 24,0% για τους άντρες και 31,0% για τις γυναίκες (144), ενώ στη Γαλλία το 64,0% των αντρών και το 50% των γυναικών ήταν υπέρβαροι ή παχύσαρκοι (145). Έρευνες υγείας στην Αγγλία έδειξαν ποσοστά υπέρβαρου ή παχυσαρκίας ίσα με 62% στους άντρες και 60% στις γυναίκες (146). Χαμηλά ποσοστά παχυσαρκίας σε ηλικιωμένους άνω των 50 ετών έχουν καταγραφεί στην Ιερουσαλήμ (16,0% στους άντρες, 33,0% στις γυναίκες) (20) και στην Ταϊβάν, όπου το 30,5% των αντρών και το 41,3% των αντρών ήταν υπέρβαροι ή παχύσαρκοι (21).

Υψηλότερα ποσοστά, παρόμοια με την αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, καταγράφονται στην περιοχή της Μεσογείου. Σε επιδημιολογική μελέτη με δείγμα 3356 ηλικιωμένους Ιταλούς (65-84 χρονών), βρέθηκε 48,6% των αντρών και 54,9% των γυναικών με $\Delta.Μ.Σ. \geq 25 \text{kg/m}^2$ (22), ενώ στη νότια Ιταλία τα ποσοστά ήταν υψηλότερα (76% στους άντρες και 86% στις γυναίκες) (23). Σε Ισπανικό πληθυσμό ηλικιωμένων η συχνότητα εμφάνισης υπέρβαρου και παχυσαρκίας υπολογίζεται σε 49% και 31,5% αντίστοιχα στους άντρες και 39,8% και 40,8% αντίστοιχα στις γυναίκες (24). Στην Ουγγαρία τα ποσοστά διαφοροποιούνται σημαντικά ανάμεσα στα δύο φύλα, όπου 51,5% των ηλικιωμένων γυναικών και 70,9% των αντρών εμφανίζουν υπέρβαρο ή παχυσαρκία (25). Σε πρόσφατη επιδημιολογική μελέτη στην Κύπρο (147) τα ποσοστά παχυσαρκίας σε ηλικιωμένους ήταν 34% για τους άντρες και 52% για τις γυναίκες. Στην παρούσα μελέτη βρέθηκε επίσης πως οι γυναίκες είχαν υψηλότερα επίπεδα $\Delta.Μ.Σ.$ σε σχέση με τους άντρες (Πίνακας 3.4), εύρημα που συμφωνεί και με άλλες μελέτες σε δείγματα Ελλήνων ηλικιωμένων (148) και Κυπρίων (147). Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε μείωση του δείκτη μάζας σώματος

για τους υπερήλικες (≥ 85 ετών) (**Σχήμα 3.1**). Παρόμοια τάση έχει καταγραφεί σε μεγάλες πληθυσμιακές μελέτες με ηλικιωμένους (18, 22, 24) και έχει αποδοθεί κυρίως στην μείωση της άλιπης μάζας σώματος και του ύψους με την αύξηση της ηλικίας.

Στην παρούσα μελέτη βρέθηκε αυξημένη συχνότητα εμφάνισης υπερχοληστερολαιμίας, ιδιαίτερα στις γυναίκες. Υψηλά επίπεδα ολικής χοληστερόλης (>200 mg/dl) καταγράφηκαν για το 77,8% των ηλικιωμένων (81,2% των μη καρδιοπαθών γυναικών, 71,3% των μη καρδιοπαθών αντρών, 84,6% των καρδιοπαθών γυναικών και 66,7% των καρδιοπαθών αντρών). Οι γυναίκες παρουσίαζαν υψηλότερα επίπεδα ολικής χοληστερόλης από τους άντρες. Το εύρημα αυτό συμφωνεί με αποτελέσματα και άλλων ερευνών, σύμφωνα με τα οποία οι ηλικιωμένες γυναίκες συνήθως έχουν υψηλότερα επίπεδα χοληστερόλης σε σχέση με τους άντρες (40, 41, 147). Παρατηρήθηκε επίσης τάση για μείωση των επιπέδων ολικής χοληστερόλης με την ηλικία (**Σχήμα 3.1**). Τα επίπεδα της HDL ήταν επίσης υψηλότερα στις γυναίκες (καρδιοπαθείς και μη) σε σχέση με τους άντρες. Έχει αναφερθεί ότι οι ηλικιωμένες γυναίκες έχουν υψηλότερα επίπεδα HDL χοληστερόλης (περίπου κατά 10 mg/dl) από τους άντρες (50). Μόνο ένα μικρό ποσοστό των ηλικιωμένων (4,8%) εμφάνιζαν χαμηλά επίπεδα HDL (<40 mg/dl). Καταγράφεται και σε άλλες μελέτες πως οι υγιείς ηλικιωμένοι παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα HDL χοληστερόλης σε σχέση με νεότερες ηλικίες (48), ενώ η πλειοψηφία των ηλικιωμένων άνω των 70 ετών ($\sim 90\%$) έχουν επίπεδα HDL χοληστερόλης πάνω από 40 mg/dl (49).

Η συχνότητα εμφάνισης υπέρτασης στο δείγμα ηλικιωμένων της παρούσας έρευνας έφτανε το 76,4% (73,5% για τις γυναίκες και 78,7% για τους άντρες απουσία καρδιαγγειακής νόσου), ποσοστά που συμφωνούν με τον καταγραφόμενο επιπολασμό υπέρτασης από την έρευνα EPIC σε ελληνικό δείγμα ηλικιωμένων (149). Σχετικά με την συστολική αρτηριακή πίεση παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των επιπέδων της στους ηλικιωμένους ≥ 85 ετών σε σχέση με τους νεότερους ηλικιωμένους (60-70 ετών). Δεδομένα από την έρευνα Framingham προτείνουν συνεχή αύξηση της συστολικής πίεσης με την ηλικία (150), φαινόμενο που αποδίδεται στην προοδευτική σκλήρυνση των κεντρικών αρτηριών, ως αποτέλεσμα της βιολογικής γήρανσης τους (151).

Στην παρούσα μελέτη βρέθηκε επίσης αυξημένο ποσοστό άνοιας (κατά MMSE) στις υγιείς γυναίκες έναντι των αντρών (31,2% έναντι 24,1%) και αυξημένο ποσοστό κατάθλιψης (κατά GDS) (18,4% έναντι 6,5%), διαφορές που είναι σε συμφωνία με παλαιότερη μελέτη σε ελληνικό ηλικιωμένο πληθυσμό, όπου οι γυναίκες εμφάνιζαν σε μεγαλύτερο ποσοστό άνοια και κατάθλιψη από τους άντρες (152).

Σχετικά με την επαρκή διαιτητική πρόσληψη ψευδαργύρου, το 71,8% των ηλικιωμένων (83,2% των γυναικών, 49,7% των αντρών) εμφάνιζαν επαρκή πρόσληψη ($\geq 80\%$ DRI). Μόνο το 8,0% εμφάνιζε ανεπαρκή πρόσληψη ψευδαργύρου ($<60\%$ DRI). Η εκτίμηση της διατροφικής πρόσληψης και βιοδιαθεσιμότητας του ψευδαργύρου σε πληθυσμούς ηλικιωμένων δεν είναι καλά μελετημένη. Στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, τα αποτελέσματα της μελέτης CFSII (1994-1996)

εμφανίζουν επαρκή διαιτητική πρόσληψη ψευδαργύρου στους ηλικιωμένους άντρες και γυναίκες (108). Αντίθετα, στην έρευνα NHANES III καταγράφεται ανεπαρκής πρόσληψη ψευδαργύρου σε ποσοστό 35-45% του ηλικιωμένου πληθυσμού (109). Στην Ευρώπη τα αποτελέσματα της μελέτης ZENITH παρουσιάζουν ανεπαρκή πρόσληψη ψευδαργύρου σε ποσοστό <5% των ηλικιωμένων (110). Τα επίπεδα HDL των ηλικιωμένων με ανεπαρκή πρόσληψη ψευδαργύρου βρέθηκαν σημαντικά χαμηλότερα σε σχέση με τις ομάδες μέτριας και επαρκούς πρόσληψης ψευδαργύρου. Πρόσφατη έρευνα έχει δείξει πως τα επίπεδα HDL είναι καλός προβλεπτικός δείκτης της συσχέτισης ψευδαργύρου στο πλάσμα (153). Ένας πιθανός μηχανισμός που εξηγεί αυτή τη συσχέτιση ψευδαργύρου και HDL, είναι η πρωτεΐνη ZNF202, που ανήκει στην κατηγορία των δακτύλων ψευδαργύρου. Πρόκειται για μεταγραφικό παράγοντα με δομικό συστατικό τον ψευδάργυρο, που ελέγχει την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στον μεταβολισμό της HDL και άλλων λιπιδίων (154).

Στην παρούσα μελέτη μετρήθηκαν τα επίπεδα της CRP στον ορό 280 ατόμων (απουσία ιστορικού καρδιαγγειακής νόσου, απουσία λήψης στατινών και σαλικυλικού και απουσία καπνίσματος). Τα επίπεδα της CRP κυμαίνονταν από 0,15-10,7 mg/L ($M \pm SD: 2,89 \pm 2,7$). Δεν βρέθηκε σημαντική διαφορά ανάμεσα σε άντρες και γυναίκες. Σε κάποιες έρευνες παρατηρούνται σημαντικά υψηλότερα επίπεδα CRP στις γυναίκες σε σχέση με τους άντρες (155), ενώ σε έρευνες μόνο σε ηλικιωμένους δεν παρατηρούνται διαφορές στα επίπεδα της CRP ανάμεσα στα δύο φύλα (156). Για τις ηλικιωμένες γυναίκες βρέθηκε σημαντική θετική συσχέτιση της CRP με την συστολική πίεση, το δείκτη μάζας σώματος, τα επίπεδα λιπιδίων (ολική χοληστερόλη, τριγλυκερίδια, LDL) και αρνητική με τα επίπεδα HDL και την κατανάλωση θαλασσινών. Για τους άντρες υπήρχε τάση θετικής συσχέτισης με την ηλικία και ισχυρή θετική συσχέτιση με τα επίπεδα γλυκόζης και την συστολική πίεση. Επίσης, τα άτομα που είχαν επίπεδα $CRP > 3 \text{ mg/L}$ είχαν και μεγαλύτερο δείκτη μάζας σώματος, υψηλότερα επίπεδα τριγλυκεριδίων και γλυκόζης, αλλά και μεγαλύτερη συστολική πίεση σε σχέση με την ομάδα χαμηλών επιπέδων CRP ($< 1 \text{ mg/L}$). Σε πολλές έρευνες έχει πιστοποιηθεί η συσχέτιση των επιπέδων CRP με το δείκτη μάζας σώματος, την συστολική αρτηριακή πίεση και τα λιπίδια (120, 155, 157, 158).

Επίσης ερευνήθηκε και η συχνότητα εμφάνισης του πολυμορφισμού -286C/T/A στον υποδοχέα της CRP. Η συχνότητα κάθε αλληλομόρφου για το μελετούμενο δείγμα ήταν: C 0,51, T 0,41 και A 0,08. Η συχνότητα εμφάνισης των γονοτύπων ήταν ίδια ανάμεσα στα δύο φύλα και ανάμεσα στους ηλικιωμένους με ή χωρίς ιστορικό καρδιαγγειακής νόσου. Η συχνότητα εμφάνισης του πολυμορφισμού ήταν ανάλογη της συχνότητας που υπολογίζεται και σε άλλες έρευνες για Καυκάσιους πληθυσμούς (128, 129, 131). Ο πολυμορφισμός είχε θετική συσχέτιση με τα επίπεδα της CRP ($p < 0,001$), με το γονότυπο CA/TA να έχει υψηλότερα επίπεδα CRP από τον γονότυπο CC ($p < 0,001$), και τον γονότυπο CT ($p = 0,014$) (**Πίνακας 3.12**). Σε πρόσφατη έρευνα έχει βρεθεί πως η

αντικατάσταση του C στη θέση -286 του υποδοχέα του γονιδίου της CRP μεταβάλλει την δραστικότητα του υποδοχέα, αυξάνοντας τη μεταγραφή του γονιδίου και τα επίπεδα CRP στον ορό.

Από το μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης για τον έλεγχο της επίδρασης του πολυμορφισμού στα επίπεδα της CRP βρέθηκε, σημαντική θετική επίδραση του πολυμορφισμού με τα επίπεδα της πρωτεΐνης (**Πίνακας 3.11**), του δείκτη μάζας σώματος ($\beta=0,259$, $p<0,001$) και αρνητική επίδραση της κατανάλωση θαλασσινών ($\beta=-0,128$, $p=0,039$). Η επίδραση των τροφίμων ανά γονότυπο ήταν διαφορετική. Για τον CC γονότυπο υπήρχε οριακά σημαντική αρνητική επίδραση από την κατανάλωση θαλασσινών ($\beta=-0,257$, $p=0,067$), για τον CT γονότυπο θετική επίδραση από την κατανάλωση σπορελαίου ($\beta=0,234$, $p=0,008$) και για τον CA/TA γονότυπο αρνητική επίδραση από την κατανάλωση λαχανικών ($\beta=-0,402$, $p=0,022$). Τα επίπεδα της CRP έχουν συσχετιστεί αρνητικά με την κατανάλωση θαλασσινών σε ελληνικό πληθυσμό (έρευνα ΑΤΤΙΚΗ), με προτεινόμενο μηχανισμό την αντιφλεγμονώδη δράση των ω-3 λιπαρών οξέων (122). Η κατανάλωση λαχανικών έχει συσχετιστεί επίσης με την μείωση των επιπέδων της CRP, με προτεινόμενο μηχανισμό τη δράση των αντιοξειδωτικών (123). Η πιθανή σχέση του πολυμορφισμού -286C/T/A με τα επίπεδα της CRP και τη διατροφή θα πρέπει να επιβεβαιωθεί και σε περαιτέρω μελέτες, καθώς η CRP έχει αποδειχθεί ως παράγοντας κινδύνου για καρδιαγγειακά νοσήματα στους ηλικιωμένους (118, 119, 120).

Είναι προφανές πως οι ηλικιωμένοι αποτελούν μια ξεχωριστή ομάδα του πληθυσμού, με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά, τα οποία δεν είναι πλήρως διευκρινισμένα. Η προσπάθεια για την ανεύρεση δεικτών νοσηρότητας ή μακροβιότητας στους ηλικιωμένους είναι αρκετά επίπονη και απαιτεί την σφαιρική αξιολόγηση ποικίλων στοιχείων (ανθρωπομετρικών, κλινικών, γενετικών, βιοχημικών δεικτών, δημογραφικών χαρακτηριστικών, στοιχείων του τρόπου ζωής, διατροφικών παραγόντων).

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. EURODIET, 2000. Nutrition & Diet for Healthy Lifestyles in Europe. Working Party 1. Draft Report, Draft 7, 30.04.2000.
2. Wick G., Perschinka H., Xu Q. Autoimmunity and atherosclerosis. *Am. Heart J.* 1999;138:S444–S449.
3. Barzilai N., Shuldiner A.R. Searching for human longevity genes. The future history of gerontology in the post-genomic era. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2001;56A:M83–M87.
4. Partridge L, Gems D. Mechanisms of ageing: public or private? *Nat Rev Genet* 2002;3: 165–175.
5. Weinert B.T., Timiras P.S. Theories of aging. *J Appl Physiol* 2003;95:1706-1716.
6. Kanungo M.S. A model for ageing. *J Theor Biol* 1975;53: 253–261.
7. Blackburn E.H. Telomere states and cell fates. *Nature* 2000;408: 53–56.
8. Barja G. Free radicals and aging. *Trends in neurosciences* 2004;27 (10):595-600.
9. Franceschi C., Bonafè M., Valensin S., Olivieri F., De Luca M., Ottaviani E., De Benedictis G., Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann NY Acad Sci.*, 2000;908:24-254.
10. Licastro F., Candore G., Lio D., Porcellini E., Colonna-Romano G., Franceschi C., Caruso C. Innate immunity and inflammation in ageing: a key for understanding age-related diseases. *Immunity & Ageing*, 2005;2:8.
11. Perissinotto E., Pisent C., Sergi G., Grigoletto F., Enzi G. Anthropometric measurements in the elderly: age and gender differences. *Br J Nutr.* 2002;87:177-186.
12. Pierson R.N. Body composition in aging : a biological perspective. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2003;6:15-20.
13. Hughes V.A., Roubenoff R., Wood M., Frontera W.R., Evans W.J., Singh M.A.F. Anthropometric assessment of 10-y changes in body composition in the elderly. *Am J Clin Nutr* 2004;80:475–82.
14. Villareal D.T., Apovian C.M., Kushner R.F., Klein S. Obesity in older adults: technical review and position statement of the American Society for Nutrition and NAASO, the obesity society. *Am J Clin Nutr* 2005;82:923-934.
15. Roubenoff R. Sarcopenic obesity: The confluence of two epidemics. *Obes Res.* 2004;12(6):887-888.
16. Inelmen E.M., Sergi G., Coin A., Miotto F., Peruzza S., Enzi G. Can obesity be a risk factor in elderly people? *Obes Rev.* 2003;4: 147-155.
17. Flegal K.M., Carroll M.D., Kuczmarski R.J., Johnson C.L. Overweight and obesity in the United States: prevalence and trends, 1960–1994. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1998;22: 39–47.

18. Davison K.K., Ford E.S., Cogswell M.E., Dietz W.H. Percentage of body fat and body mass index are associated with mobility limitations in people aged 70 and older from NHANES III. *J Am Geriatr Soc.* 2002;50:1802–1809.
19. Mokdad A.H., Bowman B.A., Ford E.S., Vinicor F., Marks J.S., Koplan J.P. The continuing epidemics of obesity and diabetes in the United States. *JAMA* 2001;286:1195–200.
20. Gofin J, Abramson J.H., Kart J.D., Epstein L. The prevalence of obesity and its changes over time in middle-aged and elderly men and women in Jerusalem. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1996;20: 260–6.
21. Chiu H., Chang H., Mau L., Lee T., Liu H. Height, weight and body mass index of elderly persons in Taiwan. *J Gerontol.* 2000;55A: M684–90.
22. Perissinotto E., Pisent C., Sergi G., Grigoletto F., Enzi G. Anthropometric measurements in the elderly: age gender differences. *Br J Nutr.* 2002;87: 1–11.
23. Barbagallo C.M., Cavera G., Sapienza M., Noto D., Cefalu` A.B., Pagano M. Prevalence of overweight and obesity in a rural southern population and relationship with total and cardiovascular mortality: the Ventimiglia di Sicilia project. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2001 ;25:185–90.
24. Gutierrez-Fisac J.L., Lopez E., Banegas J.R., Graciani A., Rodriguez-Artalejo F. Prevalence of overweight and obesity in elderly people in Spain. *Obes Res.* 2004;12: 710-715.
25. Kiss C., Poór G., Donáth J., Gergely P.J., Pasky A., Zajkás G., Antal M. Prevalence of obesity in an elderly Hungarian population. *Eur J Epidemiol.* 2003;18:653-657.
26. Heiat A., Vaccarino V., Krumholz H.M. An evidence-based assessment of federal guidelines for overweight and obesity as they apply to elderly persons. *Arch Intern Med.* 2001;161:1194-1203.
27. Cornoni-Huntler J.C., Harris T.B, Everett D.F. An overview of body weight of older persons, including the impact on mortality: the National Health and Nutrition Examination Survey I, Epidemiologic follow-up study. *J Clin Epidemiol.* 1991;44 :743-753.
28. Stevens J., Cai J., Pamuk E.R., Williamson D.F., Thun M.J., Wood J.L. The effect of age on the association between body-mass index and mortality. *N Engl J Med.* 1998;338:1-7.
29. Calle E.E., Thun M.J., Petrelli J.M., Rodriguez C., Heath C.W. Jr. Body-mass index and mortality in a prospective cohort of U.S. adults. *N Engl J Med.* 1999;341:1097-1105.
30. Harris T., Cook E.F., Garrison R., Higgins M., Kannel W., Goldman L. Body mass index and mortality among nonsmoking older persons: the Framingham Heart Study. *JAMA.* 1998;259:1520-1524.
31. Menotti A., Kromhout D., Nissinen A. Short-term all-cause mortality and its determinants in elderly male populations in Finland, Netherlands, and Italy: the FINE study (Finland, Italy, Netherlands Elderly Study). *Prev Med.* 1996;25:319-326.

32. Engeland A., Bjorge T., Selmer R.M., Tverdal A. Height and body mass index in relation to total mortality. *Epidemiol.* 2003;14(3):293-299.
33. Diehr P., Bild D.E., Harris T.B., Duxbury A., Siscovick D., Rossi M. Body mass index and mortality in nonsmoking older adults: the Cardiovascular Health Study. *Am J Public Health.* 1998;88:623-629.
34. Dey D.K., Rothenberg E., Sundh V., Bosaeus I., Steen B. Body mass index, weight change and mortality in the elderly. A 15y longitudinal population study of 70y olds. *Eur J Clin Nutr.* 2001 ;55(6) :482-492.
35. Grabowski D.C., Ellis J.E. High body mass index does not predict mortality in older people: analysis of the Longitudinal Study of Aging. *J Am Geriatr Soc.* 2001;49: 968-979.
36. Blaum C.S., Xue Q.L., Michelon E., Semba R.D., Fried L.P. The association between obesity and the frailty syndrome in older women: the Women's health and Aging Studies. *J Am Geriatr Soc.* 2005;53:927-934.
37. Villareal D.T., Banks M., Siener C., Sinacore D.R., Klein S. Physical frailty and body composition in obese elderly men and women. *Obes Res.* 2004;12(6):913-920.
38. Masaki K.H., Curb J.D., Chiu D., et al. Association of body mass index with blood pressure in elderly Japanese American men. The Honolulu Heart Program. *Hypertension* 1997; 29:673–677.
39. Rodriguez C., Pablos-Mendez A., Palmas W. Comparison of modifiable determinants of lipids and lipoprotein levels among African-Americans, Hispanics, and Non-Hispanic Caucasians 565 years of age living in New York City. *Am J Cardiol* 2002; 89:178–183.
40. Schupf N., Costa R., Luchsinger J., Tang M-X., Lee J.H., Mayeux R. Relationship between plasma lipids and all-cause mortality in nondemented elderly. *J Am Geriatr Soc.* 2005;53, 219-226.
41. LaRosa J.C. Dyslipidemia and coronary artery disease in the elderly. *Clin Geriatr Med.* 1996;12: 33–40.
42. Anum E.A., Adera T. Hypercholesterolemia and coronary heart disease in the elderly: a meta-analysis. *Ann Epidemiol.* 2004;14: 705-721.
43. Houterman S., Boshuizen H.C., Verschuren W.M.M., Giampaoli S., Nissinen A., Menotti A., Kromhout D. Predicting cardiovascular risk in the elderly in different European countries. *Eur Heart J.* 2002;23: 294-300.
44. Po-Huang C., Eaker E.D. Serum cholesterol concentrations and all-cause mortality in older people. *Age Ageing* 2000;29: 69-74.
45. Casiglia E., Mazza A., Tikhonoff V., Scarpa R., Schiavon L., Pessiva A.C. Total cholesterol and mortality in the elderly. *J Intern Med.* 2003;254: 353-362.

46. Schatz I.J., Masaki K., Yano K., Chen R., Rodriguez B.L., Curb J.D. Cholesterol and all-cause mortality in elderly people from the Honolulu Heart Program: a cohort study. *Lancet* 2001;358: 351-355.
47. Anderson K.M., Castelli W.P., Levy D. Cholesterol and mortality: 30 years of follow up from the Framingham study. *JAMA* 1987;257: 2176-2180.
48. Schaefer E.J., Moussa P.B., Wilson P.W. Plasma lipoproteins in healthy octogenarians: lack of reduced high density lipoprotein cholesterol levels: results from the Framingham Heart Study. *Metabolism* 1989;38: 293-6.
49. Nikkila M., Heikkinen J.. High-density lipoprotein cholesterol and longevity. *Age Ageing* 1990;19:119-24.
50. Abbott R.D., Wilson P.W., Kannel W.B., Castelli W.P. High-density lipoprotein cholesterol, total cholesterol screening and myocardial infarction. The Framingham study. *Arteriosclerosis* 1998;8:207-11.
51. Corti M.C., Guralnik J.M., Salive M.E., Harris T., Field T.S., Wallace R.B., Berkman L.F., Seeman T.E., Glynn R.J., Hennekens C.H. HDL cholesterol predicts coronary heart disease mortality in older persons. *JAMA*. 1995;274(7):539-544.
52. Weverling-Rijnsburger A.W., Jonkers I.J., van Exel E., Gussekloo J., Westerdorp R.G. High-density vs low-density lipoprotein cholesterol as the risk factor for coronary artery disease and stroke in old age. *Arch Intern Med* 2003;163:1549-54.
53. Despres J.P., Lemieux I., Dagenais G.R. HDL-cholesterol as a marker of coronary heart disease risk: the Quebec cardiovascular study. *Atherosclerosis* 2000;153:263-72.
54. Shepherd J, Blauw G.J., Murphy M.B. Pravastatin in elderly individuals at risk of vascular disease (PROSPER): a randomized controlled trial. *Lancet* 2002;360:1623-30.
55. Curb D.J., Abbot R.D., Rodriguez B.L., Masaki K., Chen R., Popper J., Petrovitch H., Ross G.W., Schatz I., Belleau G.C., Yano K. High-density lipoprotein cholesterol and the risk of stroke in elderly men. The Honolulu Heart Program. *Am J Epidemiol*. 2004;160:150-157.
56. Barter P. HDL: A recipe for longevity. *Atherosclerosis Suppl*. 2004;5:25-31.
57. Aronow W.S., Ahn C. Correlation of serum lipids with the presence or absence of coronary artery disease in 1,793 men and women aged ≥ 62 years. *Am J Cardiol* 1994;73:702-703.
58. Suryadevara V., Storey S.G., Aronow W.S., Ahn C. Association of abnormal serum lipids in elderly persons with atherosclerotic vascular disease and dementia, atherosclerotic vascular disease without dementia, dementia without atherosclerotic vascular disease, and no dementia or atherosclerotic vascular disease. *J Gerontol Med Sci* 2003;58A:859-861.
59. Isomaa B., Almgren P., Tuomi T., Forsen B., Lahti K., Nissen M., Taskinen M.R., Groop L: Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2001;24:683-689.

60. Trevisan M., Liu J., Bashas F.B., Menotti A.: Syndrome X and mortality: a population based study. *Am J Epidemiol* 1998;148:958– 966.
61. Alberti K.G., Zimmet P.Z.: Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1. Diagnosis and classification of diabetes mellitus, provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 1998;15:539–553.
62. National Institutes of Health: Third Report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Washington, DC, U.S. Govt. Printing Office, 2001 (NIH publ. no. 01-3670)
63. Kahn S.E., Schwartz R.S., Porte D. Jr, Abrass I.B. The glucose intolerance of aging. Implications for intervention. *Hosp Pract (Off Ed)* 1991;26: 29–38.
64. Cefalu W.T., Wang Z.Q., Werbel S. Contribution of visceral fat mass to the insulin resistance of aging. *Metabolism* 1995;44:954 –9.
65. Franklin S.S., Gustin W., Wong N.D, Larson M.G., Weber M.A., Kannel W.B., Levy D. Hemodynamic patterns of age-related changes in blood pressure: the Framingham Heart Study. *Circulation* 1997;96:308–315.
66. Scuteri A., Najjar S., Morrelli C.H., Lakatta E.G. The metabolic syndrome in older individuals : Prevalence and prediction of cardiovascular events. *Diab Care*. 2005;28:882-887.
67. Bruunsgaard, H., Andersen-Ranberg, K., Jeune, B., Pedersen, A.N., Skinhoj, P., Pedersen, B.K. A high plasma concentration of TNF-alpha is associated with dementia in centenarians. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 1999;54:M357–M364.
68. Forsey R.J., Thompson J.M., Ernerudh J., Hurst T.L., Strindhall J., Johansson B., Nilsson B.O., Wikby A. Plasma cytokine profiles in elderly humans. *Mech Ageing Dev.* 2003;124:487-493.
69. Albert M.A., Glynn R.J., Ridker P.M. Plasma concentration of C-reactive protein and the calculated Framingham coronary heart disease risk score. *Circulation* 2003;108:161–5.
70. Koenig W., Sund M., Frohlich M., Fischer H.G., Lowel H., Doring A. C-Reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men: results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992. *Circulation* 1999;99:237– 42.
71. Krabbe K.S., Pedersen M., Bruunsgaard H. Inflammatory mediators in the elderly. *Exp Gerontol.*, 2004;39:687-699.
72. Kritchevsky S.B., Cesari M., Pahor M. Inflammatory markers and cardiovascular health in older adults. *Card Res.* 2005;1;66(2):265-75.
73. Roubenoff R.: Catabolism of aging: is it an inflammatory process? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2003;6:295-299.

74. Mitchell B.D., Hsueh W.C., King T.M. Heritability of life span in the Old Order Amish. *Am J Med Genet.* 2001;102:346–352.
75. Browner W.S., Kahn A.J., Ziv A., Reiner A.P., Oshima J., Cawthon R.M., Hsueh W-C, Cummings S.R. The genetics of human longevity. *Am J Med.* 2004;117:851-860.
76. Giacconia R., Cipriano C., Albanese F., Boccolib G., Sabab V., Olivieri F., Franceschi C., Mocchegiani E. The 2174G/C polymorphism of IL-6 is useful to screen old subjects at risk for atherosclerosis or to reach successful ageing. *Exp Ger.* 2004;39:621–628.
77. Barbieri M., Bonafe M., Rizzo M.R., Ragno E., Olivieri F., Marchegiani F., Franceschi C., Paolisso G. Gender specific association of genetic variation in peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ -2 with longevity. *Exp Geront.* 2004;39:1095–1100.
78. Haveman-Nies A, De Groot L.C., Van Staveren W.A. Dietary quality, lifestyle factors and healthy ageing in Europe: the SENECA study. *Age Ageing* 2003;32:427–34.
79. Newman A.B., Arnold A.M., Naydeck B.L. “Successful aging”: effect of subclinical cardiovascular disease. *Arch Intern Med* 2003;163:2315–22.
80. Ford A.B., Haug M.R., Stange K.C., Gaines A.D., Noelker L.S., Jones P.K. Sustained personal autonomy: a measure of successful aging. *J Aging Health* 2000;12:470–89.
81. Guralnik J.M., Kaplan G.A. Predictors of healthy aging: prospective evidence from the Alameda County study. *Am J Public Health* 1989;79:703– 8.
82. Malmberg J., Miilunpalo S., Pasanen M., Vuori I., Oja P. Characteristics of leisure time physical activity associated with risk of decline in perceived health—a 10-year follow-up of middle-aged and elderly men and women. *Prev Med.* 2005;41(1):141-50
83. Stewart K.J., Bacher A.C., Turner K., Lim J.G., Hees P.S., Shapiro E.P., Tayback M., Ouyang P. Exercise and Risk Factors Associated with Metabolic Syndrome in Older Adults. *Am J Prev Med* 2005;28(1):9–18.
84. Reuben D.B., Judd-Hamilton L., Harris T.B., Seeman T.E. The Associations Between Physical Activity and Inflammatory Markers in High-Functioning Older Persons: MacArthur Studies of Successful Aging. *J Am Geriatr Soc.* 2003;51:1125–1130.
85. Gariballa S.E., Sinclair A.J.: Nutrition, Ageing and ill-health. *Br J Nutr.* 1998;80: 7-21.
86. Mahan L.K., Escott-Stump S. Krause’s food, nutrition and diet therapy, 10th ed. Philadelphia: WB Saunders, 2000.
87. Steen B.A. ‘Healthy’ lifestyle in old age and its relation to health and disease. *Age Ageing.* 2003;32:365-366.
88. Bamia C., Orfanos P., Ferrari P., Overvad K., Hundborg H.H., Tjønneland A., Olsen A., Kesse E., Boutron-Ruault M.C., Clavel-Chapelon F., Nagel G., Boffetta P., Boeing H., Hoffmann K., Trichopoulos D., Baibas N., Psaltopoulou T., Norat T., Slimani N., Palli D., Krogh V., Panico S., Tumino R., Sacerdote C., Bueno-de-Mesquita H.B., Ocke M.C., Peeters P.H., van Rossum C.T.,

- Quiros J.R., Sanchez M.J., Navarro C., Barricarte A., Dorronsoro M., Berglund G., Wirfalt E., Hallmans G., Johansson I., Bingham S., Khaw K.T., Spencer E.A., Roddam A.W., Riboli E., Trichopoulou A. Dietary patterns among older Europeans: the EPIC-Elderly study. *Br J Nutr.* 2005;94(1):100-13.
89. Costacou T., Bamia C., Ferrari P., Riboli E., Trichopoulos D., Trichopoulou A. Tracing the Mediterranean diet through principal components and cluster analyses in the Greek population. *Eur J Clin Nutr.* 2003 ;57 :1378-1385.
 90. Trichopoulou A. Traditional Mediterranean diet and longevity in the elderly : a review. *Publ Health Nutr.* 2004;7(7):943-947.
 91. Trichopoulou A., Kouris-Blazos A., Wahlqvist M.L., Gnardellis C., Lagiou P., Polychronopoulos E., Vassilakou T., Lipworth L., Trichopoulos D. Diet and overall survival in elderly people. *BMJ* 1995;311:1457-1460.
 92. Trichopoulou A., Costacou T., Barnia C., Trichopoulos D. Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *New Engl J Med.* 2003;348 (26): 2599-2608.
 93. Knuops K.T., de Groot L.C., Kromhout D., Perrin A.E., Moreiras-Varela O., Menotti A., van Staveren W.A. Mediterranean diet, lifestyle factors, and 10-year mortality in elderly European men and women: the HALE project. *JAMA.* 2004;292(12):1433-9.
 94. Trichopoulou A., Orfanos P., Norat T., Bueno-de-Mesquita B., Ocké C.M., Peeters P., van der Schouw Y.T., Boeing H., Hoffmann K., Boffetta P., Nagel G., Masala G., Krogh V., Panico S., Tumino R., Vineis P., Bamia C., Naska A., Benetou V., Ferrari P., Slimani N., Pera G., Martinez-Garcia C., Navarro C., Rodriguez-Barranco M., Dorronsoro M., Spencer E.A., Key T.J., Bingham S., Khaw K-T., Kesse E., Clavel-Chapelon F., Boutron-Ruault M-C., Berglund G., Wirfalt E., Hallmans G., Johansson I., Tjønneland A., Olsen A., Overvad K., Heidi H., Hundborg H.H., Riboli E., Dimitrios Trichopoulos D.,. Modified Mediterranean diet and survival: EPIC-elderly prospective cohort study. *BMJ.* 2005;330 (30):991-997.
 95. Lasheras C., Fernandez S., Patterson A.M. Mediterranean diet and age with respect to overall survival in institutionalized, nonsmoking elderly people. *Am J Clin Nutr.* 2000;71:987-92.
 96. Polychronopoulos E., Panagiotakos D.B., Polystipioti A. Diet, lifestyle factors and hypercholesterolemia in elderly men and women from Cyprus. *Lip Health Disease.* 2005;4:17.
 97. Groff J.L., Gropper S.S. *Advanced nutrition and human metabolism*, 3rd ed. Belmont: Wadsworth/Thomson Learning, 1999.
 98. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. 2001, www.nap.edu
 99. Lönnerdal B. Dietary factors influencing zinc absorption. *J Nutr.* 2000;130:1378S-1383S.

100. Mocchegiani E, Muzzioli M, Giacconi R. Zinc, metallothioneins, immune response, survival and ageing. *Biogerontology*. 2000;1:133-143.
101. Mocchegiani E., Giacconi R., Muzzioli M., Cipriano C. Zinc, infections and immunosenescence. *Mech Ageing Develop*. 2000;121:21-35.
102. Mocchegiani E., Muzzioli M., Cipriano C., Giacconi R. Zinc, T-cell pathways, aging: role of metallothioneins. *Mech Ageing Develop*. 1998;106:183-204.
103. Bao B., Prasad A.S., Beck F.W.J., Godmere M. Zinc modulates mRNA levels of cytokines. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003;285:E1095-E1102.
104. Shankar A.H., Prasad A.S. Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. *Am J Clin Nutr*. 1998;68(Suppl):447S-63S.
105. Ibs K-H., Rink L. Zinc-altered immune function. *J Nutr*. 2003;133:1452S-1456S.
106. Mocchegiani E., Muzzioli M., Giacconi R., Cipriano C., Gasparini N., Franceschi C., Gaetti R., Cavalieri E., Suzuki H. Metallothioneins/PARP-1/IL-6 interplay on natural killer cell activity in elderly: parallelism with nonagenarians and old infected humans. Effect of zinc supply. *Mech Ageing Develop*. 2003;124:459-468.
107. Hennig B., Meerarani P., Ramadass P., Toborek M., Malecki A., Slim R., McClain C.J. Zinc nutrition and apoptosis of vascular endothelial cells: Implications in atherosclerosis. *Nutr*. 1999;15:744-748.
108. Ma J., Betts N.M. Zinc and Copper Intakes and Their Major Food Sources for Older Adults in the 1994–96 Continuing Survey of Food Intakes by Individuals (CSFII) *J. Nutr*. 2000;130:2838–2843.
109. Briefel R., Bialostosky K., Kennedy-Stephenson J., McDowell M.A., Ervin R.B., Wright J.D. Zinc Intake of the U.S. Population: Findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988–1994 *J. Nutr*. 2000;130:1367S–1373S.
110. Andriollo-Sanchez M., Hininger-Favier I., Meunier N., Toti E., Zaccaria M., Brandolini-Bunlon M., Polito A., O'connor J.M., Ferry M., Coudray C., Roussel A.M. Zinc intake and status in middle-aged and older European subjects: the ZENITH study. *Eur J Clin Nutr*. 2005;59 Suppl 2:S37-41.
111. Girodon F., Galan P., Monget A.L., Boutron-Ruault M.C., Brunet-Lecomte P., Preziosi-Arnaud J., Manguguerra J.C., Herchberg S. Impact of trace elements and vitamin supplementation on immunity infections in institutionalized elderly patients: a randomized control trial. *Arch Intern med*. 1999;159(7):748-754.
112. Feillet-Coudray C., Meunier N., Rambeau M., Brandolini-Bunlon M., Tressol J.C., Andriollo M., Mazur A., Cashman K.D., Coudray C. Long-term moderate zinc supplementation increases exchangeable zinc pool masses in late-middle-aged men: the Zenith Study. *Am J Clin Nutr*. 2005;82(1):103-10.

113. Tillett W.S., Francis T.J. Serological reactions in pneumonia with a non-protein fraction of pneumococcus, *J. Exp. Med.* 1930;52:561– 571.
114. Hurlimann J., Thorbecke G.J., Hochwald G.M. The liver as the site of C-reactive protein formation. *J. Exp. Med.* 1966;123:365– 378.
115. Mackiewicz A., Speroff T., Ganapathi M.K., Kushner I. Effects of cytokine combinations on acute phase protein production in two human hepatoma cell lines, *J. Immunol.* 1991;146:3032– 3037.
116. Marnell L., Mold C., Du Clos T.W. C-reactive protein: Ligands, receptors and role in inflammation. *Clinical Immunology* 2005 ;117:104 – 111.
117. de Ferranti S., Rifai N. C-reactive protein and cardiovascular disease: a review of risk prediction and interventions. *Clin Chim Acta* 2002;317:1– 15.
118. Tracy R.P., Lemaitre R.N.; Psaty B.M., Ives D.G., Evans R.W., Cushman M., Meilahn E.N., Kuller L.H. Relationship of C-Reactive Protein to Risk of Cardiovascular Disease in the Elderly Results From the Cardiovascular Health Study and the Rural Health Promotion Project Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 1997;17:1121-1127
119. Harris T.B., Ferrucci L., Tracy R.P., Corti M.C., Wacholder S., Ettinger W.H.J., Heimovitz H., Cohen H.J., Wallace R. Associations of Elevated Interleukin-6 and C-Reactive Protein Levels with Mortality in the Elderly. *Am J Med.* 1999;106:506–512.
120. Strandberg T.E., Tilvis R.S. C-Reactive Protein, Cardiovascular Risk Factors, and Mortality in a Prospective Study in the Elderly *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1057-1060.
121. Smith D.G., Lawlor D.A., Harbord R., Timpson N., Rumley A., Lowe G.D., Day I.N., Ebrahim S. Association of C-reactive protein with blood pressure and hypertension: life course confounding and mendelian randomization tests of causality. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(5):1051-6.
122. Zampelas A., Panagiotakos D.B., Pitsavos C., Das U.N., Chrysoshoou C., Skoumas Y., Stefanadis C. Fish Consumption Among Healthy Adults Is Associated With Decreased Levels of Inflammatory Markers Related to Cardiovascular Disease The ATTICA Study. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:120–4.
123. Gao X., Bermudez O.I., Tucker K.L. Plasma C-Reactive Protein and Homocysteine Concentrations Are Related to Frequent Fruit and Vegetable Intake in Hispanic and Non-Hispanic White Elders. *J. Nutr.* 134: 913–918, 2004.
124. Albert M.A., Glynn R.J., Ridker P.M. Alcohol Consumption and Plasma Concentration of C-Reactive Protein. *Circulation.* 2003;107:443-447.
125. Levitan E.B., Ridker P.M., Manson J.E., Stampfer M.J., Buring J.E., Cook N.R., Liu S. Association Between Consumption of Beer, Wine, and Liquor and Plasma Concentration of

- High-Sensitivity C-Reactive Protein in Women Aged 39 to 89 Years. *Am J Cardiol* 2005;96:83–88.
126. Pankow J.S., Folsom A.R., Cushman M. Familial and genetic determinants of systemic markers of inflammation: the NHLBI family heart study. *Atherosclerosis* 2001;154:681–9.
 127. Watson M.L., Kinsmore S.F., Johnston G.I. Genomic organization of the selectin family of leukocyte adhesion molecules on human and mouse chromosome 1. *J Exp Med* 1990;172:263–72.
 128. Russell A.I., Graham D.S.C., Shepherd C., Robertson C.A., Whittaker J., Meeks J., Powell R.J., Isenberg D.A., Walport M.J., Vyse T.J. Polymorphism at the C-reactive protein locus influences gene expression and predisposes to systemic lupus erythematosus. *Hum Mol Gen.* 2004;13(1):137–147.
 129. Kovacs A., Green F., Hansson L-O., Lundman P., Samnegard A., Boquist S., Ericsson C-G., Watkins H., Hamsten A., Tornvall P. A novel common single nucleotide polymorphism in the promoter region of the C-reactive protein gene associated with the plasma concentration of C-reactive protein. *Atherosclerosis* 2005;178:193–198.
 130. Carlson C.S., Aldred S.F., Lee P.K., Tracy R.P., Schwartz S.M., Rieder M., Liu K., Williams O.D., Iribarren C., Lewis E.C., Fornage M., Boerwinkle E., Gross M., Jaquish C., Nickerson D.A., Myers R.M., Siscovick D.S., Reiner A.P. Polymorphisms within the C-Reactive Protein (CRP) Promoter Region Are Associated with Plasma CRP Levels. *Am. J. Hum. Genet.* 77:64–77, 2005.
 131. Szalai A.J., Wu J., Lange E.M., McCrory M.A., Langefeld C.D., Williams A., Zakharkin S.O., George V., Allison D.B., Cooper G.S., Xie F., Fan Z.J.C., Kimberly R.P. Single-nucleotide polymorphisms in the C-reactive protein (CRP) gene promoter that affect transcription factor binding, alter transcriptional activity, and associate with differences in baseline serum CRP level. *J Mol Med.* 2005;83: 440–447.
 132. Mocchegiani E., Marcellini F., Pawelec G. Nutritional zinc, oxidative stress and immunosenescence: biochemical, genetic and lifestyle implications for healthy ageing *Biogerontology* 2004;5:271–273.
 133. World Health Organization. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. *Tech Rep Ser.* 1995;854:1-452.
 134. Joint National Committee, 2003. The seventh report of the Joint National Committee on detection, evaluation, and treatment of high blood pressure (JNC V), NIH Publication No. 03-5233.
 135. Folstein M.F., Folstein S.E. “MINI-MENTAL STATE” a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J. psychiat. Res.* 1975;12:189-198.

136. Φουντουλάκης Κ., Τσολάκη Μ., Χατζή Ε., Καζής Α. Mini mental state examination (MMSE): Στάθμισή του στον ελληνικό πληθυσμό σε ηλικιωμένους ασθενείς με άνοια. *Εγκέφαλος*. 1994;31:93-102.
137. Yesavage J.A., Brink T.L., Rose T.L., Lum O., Huang, V., Adey M., Leirer V.O. Development and Validation of a Geriatric Depression Screening Scale: A Preliminary Report. *Journal of Psychiatric Research*. 1983;17:37-49.
138. Fountoulakis K.N., Tsolaki M., Iacovides A., Yesavage J., O'Hara R., Kazis A., Ierodiakonou C. The Validation of the Short Form of Geriatric Depression Scale (GDS) in Greece. *Aging: Clin Exp Res*. 1999;11:367-372.
139. Friedewald W.T., Levy R.I., Fredrickson D.S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*. 1972;18:499-502.
140. Λεκανίδου Ρ., Τσιτήλου Σ., Ροδάκης Γ.. Εισαγωγή στη μοριακή βιολογία. Πανεπιστήμιο Αθηνών-Τμήμα βιολογίας. 1998.
141. Trichopoulou A. Composition of Greek foods and dishes. Athens, Greece: Athens School of Public Health, 1992.
142. William L.R. CDC/AHA Workshop on Markers of Inflammation and Cardiovascular Disease *Circulation*. 2004;110:e572-e576.
143. Lahti-Koski M., Vartiainen E., Mannisto S., Pietinen P. Age, education and occupation as determinants of trends in body mass index in Finland from 1982 to 1997. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2000;24:1669-76.
144. Hoffmeister H., Mensink G.B.M., Stolzenberg H. National trends in risk factors for cardiovascular disease in Germany. *Prev Med*. 1994;23:197-205.
145. Maillard G., Charles M.A., Thibult N. Trends in the prevalence of obesity in the French adult population between 1980 and 1991. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1999;23:389-94.
146. Breeze E., Maidment A., Bennett N., Flatley J., Carey S. Health survey for England 1992. London: HMSO, 1994.
147. Polychronopoulos E., Panagiotakos D.B., Polystipioti A. Diet, lifestyle factors and hypercholesterolemia in elderly men and women from Cyprus. *Lipids in Health and Disease* 2005;4:17.
148. Trichopoulou A., Gnardellis C., Lagiou A., Benetou V., Trichopoulos D. Body mass index in relation to energy intake and expenditure among adults in Greece. *Epidemiology*. 2000;11 (3): 333-336.
149. Psaltopoulou T., Orfanos P., Naska A., Lenas D., Trichopoulos D., Trichopoulou A. Prevalence, awareness, treatment and control of hypertension in a general population sample of 26 913 adults in the Greek EPIC study. *Intern. J. Epidem*. 2004;33:1345-1352.

150. Franklin S.S., Gustin W., Wong N.D, Larson M.G., Weber M.A., Kannel W.B., Levy D. Hemodynamic patterns of age-related changes in blood pressure: the Framingham Heart Study. *Circ.* 1997;96:308–315.
151. Aviv A. Pulse Pressure and Human Longevity. *Hypertension.* 2001;37:1060-1066.
152. Argyriadou S., Melissopoulou H., Krania E., Karagiannidou A., Vlachonicolis I., Lionis C. Dementia and depression : two frequent disorders of the aged in primary health care in Greece. *Family Practice.* 2001;18:87-91.
153. *Ann Clin Biochem.* 2005 Sep;42(Pt 5):364-75. Determinants of serum copper, zinc and selenium in healthy subjects. Ghayour-Mobarhan M, Taylor A, New SA, Lamb DJ, Ferns GA.
154. Schmitz G., Heimer S., Langmann T. Zinc finger protein ZNF202 structure and function in transcriptional control of HDL metabolism. *Cur. Opin. Lip.* 2004;15:199–208.
155. Bertran N., Camps J., Fernandez-Ballart J., Arijia V., Ferre N., Tous M., Simo D., Murphy M.M., Vilella E., Joven J. Diet and lifestyle are associated with serum C-reactive protein concentrations in a population-based study. *J Lab Clin Med.* 2005;145:41-46.
156. Herbeth B., Siest G., Henny J. High Sensitivity C-Reactive Protein (CRP) Reference Intervals in the Elderly. *Clin Chem Lab Med.* 2001;39(11):1169–1170.
157. Fredrikson G.N., Hedblad B., Nilsson J.A., Alm R., Berglund G., Nilsson J. Association between diet, lifestyle, metabolic cardiovascular risk factors, and plasma C-reactive protein levels. *Metabolism.* 2004;53(11):1436-42.
158. Khera A., McGuire D.K., Murphy S.A., Stanek H.G., Das S.R., Vongpatanasin W., Wians F.H., Grundy S.M., de Lemos J.A. Race and Gender Differences in C-Reactive Protein Levels. *J Am Coll Cardiol.* 2005;46:464 –9.