



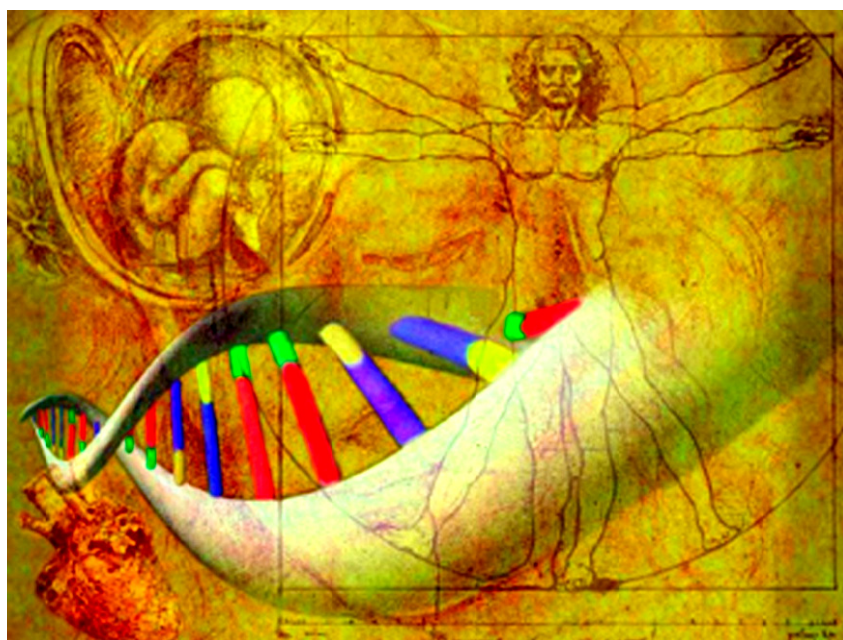
ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**«Αλληλεπιδράσεις γονιδίων, διατροφής και χαρακτηριστικών του τρόπου ζωής στην
τρίτη ηλικία»**

Υποψήφια Διδάκτωρ: Κανόνη Σταυρούλα, Κλινική Διαιτολόγος, M.Sc.

Επιβλέπων Καθηγητής: Δεδούσης Γ. - Αναπληρωτής Καθηγητής



Τριμελής Επιτροπή:

Ροδάκης Γ.	Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Δεδούσης Γ.	Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας- Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο Αθηνών
Πολυχρονόπουλος Ε.	Επικουρος Καθηγητής, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας- Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ευχαριστίες

Η παρούσα μελέτη είναι το αποτέλεσμα μακρόχρονης ομαδικής εργασίας υπό τη συνεχή επίβλεψη και αμέριστη συμπαράσταση του αναπληρωτή καθηγητή κ. Δεδούση. Ο κ. Δεδούσης ως επιστημονικός υπεύθυνος της παρούσας μελέτης, αλλά και ως γνήσιος ακαδημαϊκός και εξαιρετικός άνθρωπος εξασφάλισε την επιτυχή και άρτια ολοκλήρωση της ερευνητικής εργασίας. Οφείλω στον κ. Δεδούση τεράστια ευγνωμοσύνη για την καθοδήγηση και τη βοήθειά του, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και κυρίως για την πολυετή και εποικοδομητική συνεργασία του που διαμόρφωσε τα ερευνητικά μου ενδιαφέροντα. Παράλληλα, η συμβολή του καθηγητή κ. Ροδάκη και επίκουρου καθηγητή κ. Πολυχρονόπουλου ήταν σημαντική για την ολοκλήρωση της διδακτορικής μου διατριβής.

Οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλους τους ηλικιωμένους εθελοντές για την ενθουσιώδη συμμετοχή τους στη μελέτη, στο προσωπικό των Κ.Α.Π.Η. Καλλιθέας, Νέας Σμύρνης και Μοσχάτου για την ανιδιοτελή και καθοριστική βοήθεια που προσέφεραν, καθώς και σε όλους τους συναδέλφους που συμμετείχαν κατά περιόδους στην παρούσα έρευνα.

Περιεχόμενα

Συνοτομογραφίες	σελ. 6
Περίληψη	σελ. 7
Summary	σελ. 9
1. Εισαγωγή	σελ. 11
1.1 Δημογραφικά χαρακτηριστικά της τρίτης ηλικίας	σελ. 11
1.2 Θεωρίες γήρανσης	σελ. 12
1.3 Παράγοντες κινδύνου νοσηρότητας	σελ. 16
Παχυσαρκία και σαρκοπενική παχυσαρκία	σελ. 16
Δυσλιπιδαιμία	σελ. 18
Μεταβολικό σύνδρομο	σελ. 20
Παράγοντες της συμπεριφοράς και συνήθειες του τρόπου ζωής	σελ. 21
1.4 Γενετικοί δείκτες γήρανσης και μακροβιότητας	σελ. 22
1.5 Το μονοπάτι μεταβίβασης μηνυμάτων ινσουλίνης/IGF και μακροβιότητα	σελ. 25
1.6 Δείκτες φλεγμονής και ανοσογήρανση	σελ. 32
1.7 Η Μεσογειακή διατροφή στην τρίτη ηλικία	σελ. 35
1.8 Ο ρόλος του ψευδαργύρου στη γήρανση	σελ. 40
Διαιτητικές πηγές, απορρόφηση και μεταβολισμός του ψευδαργύρου	σελ. 40
Ο βιολογικός ρόλος του ψευδαργύρου	σελ. 44
2. Μεθοδολογία	σελ. 48
2.1 Σκοπός και σχεδιασμός της μελέτης	σελ. 48
Σκοπός	σελ. 48
Δείγμα	σελ. 48
Μελέτη Zincage	σελ. 48
Κριτήρια στρατολόγησης εθελοντών	σελ. 49
2.2 Αιμοληψία και απομόνωση βιολογικών υλικών	σελ. 50
2.3 Αιματολογικές και βιοχημικές αναλύσεις	σελ. 51

2.4 Κλινικές και σωματομετρικές μετρήσεις	σελ. 53
2.5 Καταγραφή και εκτίμηση διατροφικών συνηθειών και παραγόντων του τρόπου ζωής	σελ. 54
Δημογραφικά χαρακτηριστικά και στοιχεία του τρόπου ζωής	σελ. 54
Διατροφικές συνήθειες	σελ. 54
Εκτίμηση βαθμού υιοθέτησης της Μεσογειακής Διατροφής	σελ. 55
Εκτίμηση διατροφικής πρόσληψης ψευδαργύρου	σελ. 56
Ιατρικό ιστορικό	σελ. 58
Εκτίμηση ψυχολογικής και νοητικής κατάστασης	σελ. 58
2.6 Γενετική ανάλυση	σελ. 59
2.7 Σχεδιασμός της παρεμβατικής μελέτης χορήγησης συμπληρώματος ψευδαργύρου	σελ. 62
2.8 Στατιστική ανάλυση	σελ. 63
2.9 Προσχέδιο μελέτης	σελ. 65
 3. Αποτελέσματα	 σελ. 66
3.1 Δείκτες υγείας, διατροφικές συνήθειες και παράγοντες του τρόπου ζωής στον γηριατρικό πληθυσμό	σελ. 66
3.2 Η επίδραση της ηλικίας σε δείκτες υγείας, διατροφικές συνήθειες και παράγοντες του τρόπου ζωής	σελ. 83
3.3 Διατροφική αξιολόγηση και εκτίμηση παραγόντων του τρόπου ζωής των ηλικιωμένων	σελ. 90
Ανάλυση της επίδρασης του βαθμού υιοθέτησης της Μεσογειακής διατροφής σε δείκτες υγείας	σελ. 90
Αξιολόγηση της διατροφικής πρόσληψης ψευδαργύρου σε σχέση με δείκτες υγείας	σελ. 96
Εκτίμηση της φυσικής δραστηριότητας στον γηριατρικό πληθυσμό	σελ. 100
3.4 Γενετική ανάλυση	σελ. 103
Ανάλυση της συχνότητας αλληλομόρφων και γονοτύπων	σελ. 103
Εκτίμηση της συσχέτισης των γενετικών δεικτών με τον επιπολασμό νοσημάτων στους ηλικιωμένους	σελ. 104
Αξιολόγηση της επίδρασης των γενετικών δεικτών σε σωματομετρικούς, κλινικούς, βιοχημικούς και αιματολογικούς δείκτες	σελ. 109

Ανάλυση της συσχέτισης των γενετικών δεικτών με την παρουσία άνοιας και καταθλιπτικών συμπτωμάτων στους ηλικιωμένους	σελ. 126
3.5 Ανάλυση της αλληλεπίδρασης των γενετικών δεικτών με τη διατροφή και τα στοιχεία του τρόπου ζωής	σελ. 128
Αξιολόγηση της αλληλεπίδρασης του βαθμού υιοθέτησης της Μεσογειακής διατροφής και των γενετικών δεικτών στην κατάσταση υγείας των ηλικιωμένων	σελ. 128
Εκτίμηση της αλληλεπίδρασης της διατροφικής πρόσληψης ψευδαργύρου και των γενετικών δεικτών στον γηριατρικό πληθυσμό	σελ. 134
Έλεγχος της αλληλεπίδρασης της φυσικής δραστηριότητας και των γενετικών δεικτών στους ηλικιωμένους	σελ. 136
3.6 Αξιολόγηση της επίδρασης της χορήγησης συμπληρώματος ψευδαργύρου σε δείκτες υγείας των ηλικιωμένων	σελ. 138
4. Συζήτηση	σελ. 140
Δείκτες υγείας και παράγοντες νοσηρότητας στους ηλικιωμένους	σελ. 140
Επίδραση της διατροφής και της φυσικής δραστηριότητας στα επίπεδα βιομορίων σε γηριατρικούς πληθυσμούς	σελ. 142
Η γενετική επίδραση στους δείκτες υγείας	σελ. 143
Αλληλεπιδράσεις γενετικών δεικτών και διατροφής στους ηλικιωμένους	σελ. 145
Πλεονεκτήματα και αδυναμίες της παρούσας μελέτης	σελ. 146
Συμπεράσματα	σελ. 146
Βιβλιογραφία	σελ. 148
Δημοσιευμένες εργασίες	σελ. 167

Συντομογραφίες

Δ.Μ.Σ.:	Δείκτης Μάζας Σώματος
ATP III:	Adult Treatment Panel III, Θεραπευτική ομάδα ενηλίκων III
DNA:	Deoxyribonucleic acid, Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
HDL-C:	High Density Lipoprotein Cholesterol, Λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας σε χοληστερόλη
Homa-B:	Homeostatic model assessment of β -cells function, Ομοιοστατικό μοντέλο αξιολόγησης της λειτουργία των β -κυττάρων
Homa-IR:	Homeostatic model assessment of Insulin Resistance, Ομοιοστατικό μοντέλο αξιολόγησης της ινσουλινοαντίστασης
IFN:	Interferon, Ιντερφερόνη
IGF:	Insulin-like Growth Factor, Ινσουλινομιμητικός αυξητικός παράγοντας
IL:	Interleukin, Ιντερλευκίνη
LDL-C:	Low-density lipoprotein, Λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας σε χοληστερόλη
MET:	Metabolic Equivalent of Task, Μεταβολικά Ισοδύναμα Έργου
MCP-1:	Monocyte Chemotactic Protein-1, Χημειοτακτική πρωτεΐνη μονοκυττάρων1
MIP-1α:	Macrophage Inflammatory Protein-1 α , Φλεγμονώδης πρωτεΐνη μακροφάγων-1 α
MT:	Metallothionein, Μεταλλοθειονίνη
NCEP:	National Cholesterol Education Program, Εθνικό ενημερωτικό πρόγραμμα για τη χοληστερόλη των Η.Π.Α.
RANTES:	Regulated on Activation Normal T-Cell Expressed and Secreted, Ρυθμιζόμενο από την ενεργοποίηση φυσιολογικών T-κυττάρων εκφραζόμενο και εκκρινόμενο
RNA:	Ribonucleic acid, Ριβονουκλεϊκό οξύ
SGOT:	Serum glutamic oxaloacetic transaminase, Οξαλοξεϊκή τρανσαμινάση ορού
SGPT:	Serum glutamic pyruvic transaminase, Πυροσταφυλική τρανσαμινάση ορού
TNF-α:	Tumor Necrosis Factor- α , Παράγοντας νέκρωσης όγκου- α
TKE:	Ταχύτητα Καθίζησης Ερυθροκυττάρων
USDA:	United States Department of Agriculture, Υπουργείο Γεωργίας Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής
Zn:	Zinc, Ψευδάργυρος

Περίληψη

Η επιμήκυνση του προσδόκιμου επιβίωσης οδηγεί σε συνεχή αύξηση του αριθμού των ηλικιωμένων παγκοσμίως. Στην Ελλάδα καταγράφεται σημαντική αλλαγή της ηλικιακής σύνθεσης, καθιστώντας αναγκαία την εκτίμηση της κατάστασης υγείας των ηλικιωμένων. Η γήρανση είναι μια ετερογενής διαδικασία που χαρακτηρίζεται από έκπτωση των φυσιολογικών λειτουργιών, με αυξανόμενο κίνδυνο νοσηρότητας και θνησιμότητας. Σε αντιδιαστολή, οι υπερήλικες εμφανίζουν καλά διατηρημένη κατάσταση υγείας, αποφεύγοντας σημαντικές ασθένειες. Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στη γήρανση δεν είναι πλήρως διεκρινισμένοι, ωστόσο περιλαμβάνουν πληθώρα παραγόντων. Στο γενετικό υπόβαθρο αποδίδεται το 15-30% της μακροβιότητας, ενώ το υπόλοιπο ποσοστό περιλαμβάνει την επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων, όπως η διατροφή, η φυσική δραστηριότητα και οι συνήθειες του τρόπου ζωής. Η αναγνώριση των κλινικών, γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων που επιδρούν στη γήρανση και στη μακροβιότητα κρίνεται σημαντική για την καλύτερη κατανόηση της γήρανσης, αλλά και για την ανάπτυξη των κατάλληλων παρεμβάσεων, με σκοπό την επίτευξη της υγιούς γήρανσης.

Στην παρούσα μελέτη στρατολογήθηκαν 843 ηλικιωμένοι από την περιοχή της Αθήνας, στους οποίους πραγματοποιήθηκε αιμοληψία, μέτρηση αρτηριακής πίεσης, σωματομετρικές μετρήσεις (βάρος, ύψος), καθώς και καταγραφή ιατρικού ιστορικού, δημογραφικών στοιχείων, διατροφικών συνηθειών, χαρακτηριστικών του τρόπου ζωής, ψυχολογικής και νοητικής κατάστασης. Η απομόνωση βιολογικών υλικών περιελάμβανε ορό, πλάσμα, και DNA. Οι βιοχημικές και αιματολογικές μετρήσεις περιελάμβαναν επίπεδα λιπιδίων, γλυκόζης, ινσουλίνης, φλεγμονωδών παραγόντων (IL-6, IL-8, TNF- α , MCP-1, MIP-1 α και RANTES), ψευδαργύρου και γενική εξέταση αίματος. Πραγματοποιήθηκε γενετική ανάλυση για πολυμορφισμούς γονιδίων που εμπλέκονται στη φλεγμονώδη απόκριση, στο μονοπάτι μεταβίβασης μηνυμάτων ινσουλίνης/IGF και στο μεταβολισμό του ψευδαργύρου. Τα διατροφικά δεδομένα χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της ημερήσιας πρόσληψης ψευδαργύρου και για το βαθμό υιοθέτησης της Μεσογειακής διατροφής. Επίσης, πραγματοποιήθηκε η χορήγηση συμπληρώματος ψευδαργύρου (10 mg/ημέρα για 6 εβδομάδες) σε ηλικιωμένους που χαρακτηρίστηκαν από έλλειψη ψευδαργύρου. Τέλος, με τη χρήση κατάλληλων στατιστικών προγραμμάτων και μοντέλων εκτιμήθηκαν οι αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στους βιοχημικούς και γενετικούς δείκτες, τη διατροφή και τους παράγοντες του τρόπου ζωής, που επιδρούν στην κατάσταση υγείας των ηλικιωμένων.

Στον ηλικιωμένο πληθυσμό που μελετήθηκε, καταγράφηκαν υψηλά ποσοστά υπέρτασης (70,9%), υπερχοληστερολαιμίας (86,7%), υπέρβαρου (41,7%) και παχυσαρκίας (44,5%). Η συχνότητα εμφάνισης σακχαρώδη διαβήτη 2 (ΣΔ 2) ήταν 15,4% και των καρδιαγγειακών νοσημάτων 19,5%, ενώ ανεπάρκεια ψευδαργύρου πλάσματος καταγράφηκε στο 27,7%. Η αύξηση της ηλικίας βρέθηκε να επηρεάζει αρνητικά τα επίπεδα ολικής χοληστερόλης, LDL-C και οξειδωμένης LDL-C και θετικά τα επίπεδα συστολικής αρτηριακής πίεσης, IL-6 και IL-8 ($P=0,039$, $P=0,003$, $P=0,005$, $P=2,3 \times 10^{-5}$, $P=0,015$, $P=0,032$, αντίστοιχα). Η Μεσογειακή διατροφή σχετίστηκε αρνητικά με τα επίπεδα Δ.Μ.Σ., γλυκόζης νηστείας, τριγλυκεριδίων και IL-8 και θετικά με τα επίπεδα HDL-C ($P=0,008$, $P=0,003$, $P=0,018$, $P=0,005$, $P=0,001$, $P=0,038$, αντίστοιχα). Η διατροφική πρόσληψη ψευδαργύρου σχετίστηκε θετικά με τα επίπεδα ψευδαργύρου πλάσματος και αρνητικά με τα επίπεδα τριγλυκεριδίων ($P=0,045$, $P=0,002$, αντίστοιχα), ενώ η φυσική δραστηριότητα αρνητικά με τα επίπεδα Δ.Μ.Σ. ($P=0,025$). Αρκετές συσχετίσεις βρέθηκαν ανάμεσα στους γενετικούς δείκτες και τους μελετώμενους δείκτες υγείας με σημαντικότερες για τους πολυμορφισμούς: του γονιδίου *MT1A* με την εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων ($P<0,005$), του *CRY2* με τα επίπεδα συστολικής αρτηριακής πίεσης ($P=0,007$), του *DGKB/THEM195* με τα επίπεδα γλυκόζης νηστείας ($P=0,001$), του *SOD2* με τα επίπεδα τριγλυκεριδίων και οξειδωμένης LDL-C ($P=3,9 \times 10^{-4}$ και $P=6,5 \times 10^{-4}$, αντίστοιχα), του *SEC63D1* με τα επίπεδα IL-6 ($P=4,1 \times 10^{-4}$) και του *PROX1* με τα επίπεδα ολικής χολερυθρίνης ($P=8,7 \times 10^{-4}$). Ανάμεσα στις αλληλεπιδράσεις γενετικών δεικτών και διατροφής που ερευνήθηκαν οι σημαντικότερες εντοπίστηκαν ανάμεσα στη Μεσογειακή διατροφή και: του πολυμορφισμού rs7944584 (*MADD*) με τα επίπεδα συστολικής αρτηριακής πίεσης ($P=0,041$), του πολυμορφισμού rs1800629 (*TNF-α*) με τα επίπεδα διαστολικής αρτηριακής πίεσης ($P=0,018$) και του πολυμορφισμού rs2191349 (*DGKB/THEM195*) με τα επίπεδα ινσουλίνης νηστείας και Homa-IR ($P=0,023$ και $P=0,019$). Τα σημαντικότερα αποτελέσματα της χορήγησης συμπληρώματος ψευδαργύρου (10 mg/ημέρα για 6 εβδομάδες) ήταν η σημαντική μείωση στα επίπεδα γλυκόζης νηστείας ($P=1,6 \times 10^{-4}$) και η αύξηση στο σκορ εξέτασης νοητικής κατάστασης των ηλικιωμένων ($P=0,008$).

Η ολιστική αποτίμηση της κατάστασης υγείας των ηλικιωμένων και η αξιολόγηση της συνδυασμένης επίδρασης των γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων μπορούν συμβάλλουν στην πρόληψη της νοσηρότητας και στην προαγωγή της υγείας στην τρίτη ηλικία.

Summary

The increase in life expectancy is enhancing the continuing growth of the elderly population worldwide. In Greece, a marked change in the age structure of the population is documented, emerging the necessity for an assessment of the elderly health status. Aging is a heterogeneous process, characterized by a decline in physiological functions, resulting in increased risk of morbidity and mortality. In contradiction, centenarians exhibit a very well preserved health status, avoiding serious illnesses. Although the exact mechanisms implicated in the aging process are not fully elucidated, however they include a plethora of contributing factors. The genetic background accounts for 15-30% of the variability in longevity, while the remaining 70-85% includes the impact of environmental factors, such as nutrition, physical activity and lifestyle. Identifying the clinical, genetic and environmental factors that influence aging is important for clarifying the aging process, as well as for developing suitable interventions, in order to promote healthy aging.

In the current study, 843 elderly were recruited from the Athens region. All volunteers underwent blood sample collection, blood pressure measurements, anthropometric measurements (weight, height), as well as an interview including questions on medical history, demographic data, dietary and lifestyle habits, psychological state and mental function. The isolation of biological sample included serum, plasma and DNA. Biochemical and hematological measurements included lipids, glucose, insulin, inflammatory markers (IL-6, IL-8, TNF- α , MCP-1, MIP-1 α and RANTES), zinc and blood cell count. Genotyping was performed for polymorphisms in genes implicated in the inflammatory response, in the insulin/IGF signaling pathway and in zinc metabolism. Dietary data was processed for the assessment of daily dietary zinc intake and for the assessment of adherence to the Mediterranean diet. Furthermore, a supplementation trial (10 mg/day of zinc for 6 weeks) was conducted, including elderly with zinc deficiency. Finally, specific statistical programs were used for the assessment of the interactions among biochemical and genetic markers, nutrition and lifestyle factors, that affect the health status of the elderly.

Within the geriatric population examined, high percentages of hypertension (70.9%), hypercholesterolemia (86.7%), overweight (41.7%) and obesity (44.5%) were recorded. Type 2 diabetes (T2D) was prevalent in 15.4% and cardiovascular disease in 19.5% of the population, while plasma zinc deficiency was recorded in the 27.7%. The increase of age was negatively associated with total cholesterol, LDL-C and oxidized

LDL-C levels and positively with systolic blood pressure, IL-6 and IL-8 levels ($P=0.039$, $P=0.003$, $P=0.005$, $P=2.3 \times 10^{-5}$, $P=0.015$, $P=0.032$, respectively). Mediterranean diet was negatively associated with BMI, fasting glucose, triglycerides and IL-8 levels and positively with HDL-C levels ($P=0.008$, $P=0.003$, $P=0.018$, $P=0.005$, $P=0.001$, $P=0.038$, respectively). Dietary zinc intake was positively associated with plasma zinc levels and negatively with triglycerides levels ($P=0.045$, $P=0.002$, respectively), while physical activity was negatively associated with BMI levels ($P=0.025$). Several associations were detected between genetic markers and clinical markers; the strongest for *MT1A* variants with cardiovascular disease ($P<0.003$), *CRY2* variant with blood pressure levels ($P=0.007$), *DGKB/THEM195* variant with fasting glucose levels ($P=0.001$), *SOD2* variant with triglycerides and oxidized LDL-C levels ($P=3.9 \times 10^{-4}$ και $P=6.5 \times 10^{-4}$, respectively), *SEC63D1* variant with IL-6 levels ($P=4.1 \times 10^{-4}$) and *PROX1* variant with total bilirubin levels ($P=8.7 \times 10^{-4}$). Among the investigated gene-diet interactions the strongest were detected between Mediterranean diet and: rs7944584 (*MADD*) with systolic blood pressure levels ($P=0.041$), rs1800629 (*TNF- α*) with diastolic blood pressure levels ($P=0.018$) and rs2191349 (*DGKB/THEM195*) with fasting insulin levels and Homa-IR values ($P=0.023$ και $P=0.019$). The most important findings from the zinc supplementation trial (10 mg/day of zinc for 6 weeks) was a significant decrease in fasting glucose levels ($P=1.6 \times 10^{-4}$) and an increase in the score of the Mini Mental State Examination among the elderly ($P=0.008$).

The holistic assessment of the health status in the elders and the evaluation of the combined impact of both genetic and environmental factors can contribute to the morbidity prevention and health improvement of the elderly.

1. Εισαγωγή

1.1 Δημογραφικά χαρακτηριστικά της τρίτης ηλικίας

Η συνεχής αύξηση του ηλικιωμένου πληθυσμού παγκοσμίως αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους θριάμβους, και ταυτόχρονα πρόκληση, για την ανθρωπότητα. Η επιμήκυνση του προσδόκιμου επιβίωσης, κυρίως λόγω της εξέλιξης της ιατροφαρμακευτικής, καθώς και η μείωση του ρυθμού γεννήσεων, οδηγούν σε σημαντική αλλαγή της ηλικιακής σύνθεσης του παγκόσμιου πληθυσμού.

Σύμφωνα με την έκθεση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (1), το 2000 ο πληθυσμός των ηλικιωμένων (≥ 60 ετών) ανερχόταν στα 600 εκατομμύρια, ενώ ο αριθμός αυτός αναμένεται να φτάσει τα 1,2 δισεκατομμύρια το 2025 και τα 2 δισεκατομμύρια το 2050. Παράλληλα, εκτιμάται πως οι υπέργηροι (≥ 80 ετών) αποτελούν ένα σημαντικό τμήμα του ηλικιωμένου πληθυσμού (11%), με αναμενόμενη αύξηση στο 19% μέχρι το 2050 (1). Ανάμεσα στα ιδιαίτερα δημογραφικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού των ηλικιωμένων, αναφέρονται επίσης, το αυξημένο ποσοστό γυναικών έναντι των αντρών, με εκτιμώμενο λόγο 2 προς 1, καθώς και η ραγδαία αύξηση του ηλικιωμένου πληθυσμού στις αναπτυσσόμενες χώρες έναντι των ανεπτυγμένων (1).

Ειδικότερα στην Ευρώπη, οι ηλικιωμένοι αποτελούσαν το 21% του συνολικού πληθυσμού το 2006, ενώ σύμφωνα με τις δημογραφικές προβολές, το 2050 το ποσοστό αυτό θα φτάσει το 34% (2). Τα αντίστοιχα ποσοστά για τους υπέργηρους (≥ 80 ετών) είναι 18% για το 2006 και 28% το 2050, του συνολικού πληθυσμού των ηλικιωμένων (2). Τα σκήπτρα του μεγαλύτερου ποσοστού ηλικιωμένων στην Ευρώπη κατέχει η Ιταλία, με ποσοστό 24,5% του συνολικού πληθυσμού το 2002, ενώ η Ελλάδα βρίσκεται στην τρίτη θέση με ποσοστό 23,9% (1). Σύμφωνα με τα στοιχεία την Ελληνικής Στατιστικής Υπηρεσίας, το 2008 το ποσοστό των ηλικιωμένων ανερχόταν στο 24,3% του γενικού πληθυσμού, ενώ προβλέπεται πως ως το 2025, το αντίστοιχο ποσοστό θα φτάνει το 33,2% και το 2050 το 49,9% (3).

1.2 Θεωρίες γήρανσης

Το γήρας ορίζεται ως η συσσώρευση ποικίλων επιβλαβών αλλαγών στα κύτταρα και στους ιστούς με την αύξηση της ηλικίας, οι οποίες θεωρούνται υπεύθυνες για τον αυξημένο κίνδυνο νοσηρότητας και θνησιμότητας (4). Η διερεύνηση των πιθανών αιτίων και των μηχανισμών της γήρανσης, έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη αρκετών θεωριών, που παρέχουν σημαντικές διευκρινίσεις για την κατανόηση των φυσιολογικών αλλαγών κατά την γήρανση. Οι σημαντικότερες θεωρίες του γήρατος που έχουν διατυπωθεί περιλαμβάνουν, την *εξελικτική θεωρία*, τη *θεωρία των ελευθέρων ριζών*, τη *μιτοχονδριακή θεωρία*, τη *θεωρία της γενετικής ρύθμισης*, τη *θεωρία των τελομερών*, τη *θεωρία της ανοσογήρανσης* και την *νευροενδοκρινική θεωρία του γήρατος* (5).

Η εξελικτική θεωρία ορίζει την γήρανση ως αποτέλεσμα της μειωμένης ισχύς της φυσικής επιλογής με την αύξηση της ηλικίας. Διατυπώθηκε αρχικά στη δεκαετία του '40, έπειτα από παρατήρηση ασθενών με τη νόσο Huntington (5). Η εξελικτική θεωρία της γήρανσης στηρίζεται σε μεγάλο βαθμό στη Δαρβίνεια θεωρία, κατά την οποία η φυσική επιλογή επιδρά σε οργανισμούς που πεθαίνουν κυρίως λόγω θήρευσης και περιβαλλοντολογικών κινδύνων, και κατά συνέπεια διαμορφώνουν τη βέλτιστη διάρκεια ζωής για το συγκεκριμένο περιβάλλον (6). Η διάρκεια ζωής για κάθε είδος διαμορφώνεται μέσω της φυσικής επιλογής, με πρωταρχικό σκοπό την αναπαραγωγή και διαίωξη του είδους (7). Στα πλαίσια αυτής της θεωρίας, επισημαίνεται πως η ισορροπία μεταξύ των πόρων που επενδύονται στην αναπαραγωγική ικανότητα έναντι της μακροβιότητας, καθορίζει τη διάρκεια ζωής (5).

Η θεωρία των ελευθέρων ριζών διατυπώθηκε για πρώτη φορά τη δεκαετία του '50, υποθέτοντας μία κοινή διαδικασία, που υπόκειται στην επίδραση γενετικών και περιβαλλοντολογικών παραγόντων, κατά την οποία η συσσώρευση ενδογενών ελευθέρων ριζών ευθύνεται για τη γήρανση και το θάνατο των οργανισμών (8). Αργότερα, συμπεριλήφθηκε στη θεωρία και ο καθοριστικός ρόλος των μιτοχονδρίων στις αντιδράσεις παραγωγής των ελευθέρων ριζών (9). Η θεωρία των ελευθέρων ριζών λαμβάνει ευρεία αποδοχή, ως εύλογη εξήγηση των βασικών χημικών αντιδράσεων που εμπλέκονται στη γήρανση, καθώς η αύξηση του οξειδωτικού στρες με την ηλικία φαίνεται να είναι αποτέλεσμα της έλλειψης ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής ελευθέρων ριζών και της αντιοξειδωτικής προστασίας του οργανισμού (5). Η θεωρία των ελευθέρων ριζών

περιλαμβάνει αρκετές υποθέσεις, που εστιάζουν στο ρόλο συγκεκριμένων οργανιδίων και μορίων κατά τη γήρανση. Μία από αυτές τις υποθέσεις υποστηρίζει, ότι μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό DNA επιταχύνουν τη φθορά από τις ελεύθερες ρίζες, λόγω της εισαγωγής αλλοιωμένων ενζυμικών συστατικών στην αναπνευστική αλυσίδα (10). Η ελαττωματική ροή ηλεκτρονίων προκαλεί αυξημένη διαρροή ελευθέρων ριζών και ακολούθως μεγαλύτερο ποσοστό μεταλλάξεων στο μιτοχονδριακό DNA και επιδείνωση της οξειδωτικής παραγωγής, δημιουργώντας έναν φαύλο κύκλο μεταλλάξεων και παραγωγής ελευθέρων ριζών, που οδηγεί τελικά σε κυτταρική βλάβη και γήρανση (10). Η διερεύνηση της υπόθεσης αυτής, ως επέκταση της θεωρίας των ελευθέρων ριζών, οδήγησε στη **μιτοχονδριακή θεωρία** της γήρανσης (11). Υποστηρικτικά αποτελέσματα αυτής της θεωρίας, προκύπτουν από την μελέτη “Framingham”, όπου η μακροβιότητα βρέθηκε να σχετίζεται με την ηλικία θανάτου της μητέρας, υποδηλώνοντας το ρόλο της κληρονομικότητας του μιτοχονδριακού DNA στην μακροβιότητα (12). Μια άλλη υπόθεση υποστηρίζει, πως οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν τη γήρανση λόγω της συσσώρευσης οξειδωμένων πρωτεϊνών στα κύτταρα, σε συνδυασμό με την φθίνουσα ικανότητα αποικοδόμησής τους καθώς αυξάνεται η ηλικία (13). Ο προσδιορισμός των αντιδράσεων παραγωγής ελευθέρων ριζών που λειτουργούν ως εκκινητές της κυτταρικής γήρανσης, θα μπορούσε να αναδείξει τρόπους παρέμβασης για τη μείωση του ρυθμού γήρανσης (4). Ωστόσο, τα αποτελέσματα που προκύπτουν από παρεμβατικές μελέτες με συμπληρώματα αντιοξειδωτικών, κυρίως βιταμινών, δεν παρέχουν προς το παρόν επαρκείς αποδείξεις για την αποτελεσματική μείωση του οξειδωτικού στρες σε ανθρώπους (5).

Η θεωρία της γενετικής ρύθμισης προτείνει τη γήρανση ως αποτέλεσμα αλλαγών που πραγματοποιούνται στη γονιδιακή έκφραση (6). Μελέτες σε αιωνόβιους και στις οικογένειές τους έχουν πιστοποιήσει την επίδραση του γενετικού υπόβαθρου στη μακροβιότητα, εμπλέκοντας κυρίως γονιδιακές περιοχές του χρωμοσώματος 4 (14), ωστόσο απαιτούνται περισσότερες μελέτες για την πλήρη τεκμηρίωση αυτής της θεωρίας.

Η θεωρία των τελομερών σχετίζεται άμεσα με την θεωρία της κυτταρικής γήρανσης, με κύριο χαρακτηριστικό την μειωμένη κυτταρική διαίρεση (15). Τα τελομερή είναι ειδικές αλληλουχίες DNA που εντοπίζονται στα άκρα των ευκαρυωτικών χρωμοσωμάτων. Στον άνθρωπο, τα τελομερή αποτελούνται από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες TTAGGG σε μήκος ως 15 κιλοβάσεων κατά τη γέννηση (16). Τα τελομερή συνθέτονται από την τελομεράση, ένα ένζυμο αντίστροφης μεταγραφάσης

ριβονουκλεοπρωτεϊνών, η οποία διατηρεί το μήκος των χρωμοσωμάτων (17). Τα τελομερή διατηρούν τη χρωμοσωμική σταθερότητα, ενώ μειωμένη δράση της τελομεράσης οδηγεί σε διάρρηξη και αντιμετάθεση τμημάτων του DNA (18), συμβάλλοντας στην κυτταρική γήρανση (19). Παράλληλα, σε κάθε κύκλο κυτταρικής διαίρεσης χάνεται ένα μικρό τμήμα DNA από τα χρωμοσωμικά άκρα, οδηγώντας σε τελομερή με σταδιακά μειούμενο μήκος και διαφοροποιημένη δομή, με τελικό αποτέλεσμα τη λήξη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και την πυροδότηση της κυτταρικής γήρανσης (20).

Η θεωρία της ανοσογήρανσης προτείνει την ύπαρξη ενός δικτύου κυτταρικών και μοριακών μηχανισμών άμυνας, το οποίο ελέγχει τη γήρανση (21). Το δίκτυο αυτό αποτελείται από ένζυμα επιδιόρθωσης του DNA, ενζυμικά και μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά συστήματα (δισμουτάση υπεροξειδίου, καταλάση, υπεροξειδάση γλουταθειόνης) και από πρωτεΐνες θερμικού σοκ (heat shock proteins) (22). Οι λειτουργίες του δικτύου ελέγχονται γενετικά και στοχεύουν στην εξουδετέρωση των επιβλαβών επιπτώσεων από φυσικούς, χημικούς και βιολογικούς στρεσογόνους παράγοντες. Πρωταρχικό ρόλο σε αυτό το δίκτυο φαίνεται να διαδραματίζει το ανοσοποιητικό σύστημα. Συγκεκριμένα, τα μακροφάγα φαίνεται να είναι σημαντικοί ρυθμιστές του φαύλου κύκλου που δημιουργείται ανάμεσα στην επίκτητη ανοσία, στη φλεγμονή και στο στρες (21). Η ενεργοποίηση των μακροφάγων λόγω χρόνιου στρες, αποτελεί πιθανή εξήγηση της υποκλινικής χρόνιας φλεγμονώδους κατάστασης που χαρακτηρίζει τους ηλικιωμένους και ταυτόχρονα πιθανό χαρακτηριστικό της διαδικασίας γήρανσης (21).

Η νευροενδοκρινική θεωρία προτείνει, ότι η γήρανση οφείλεται σε αλλαγές νευρικών και ενδοκρινικών λειτουργιών, σημαντικών για τη συνεργασία, τον προγραμματισμό και την ανταπόκριση διαφορετικών συστημάτων στα περιβαλλοντολογικά ερεθίσματα, καθώς και για τη διατήρηση της βέλτιστης κατάστασης λειτουργίας με σκοπό την αναπαραγωγή και την επιβίωση (5). Ιδιαίτερη σημασία στα πλαίσια αυτής της θεωρίας δίνεται στον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (hypothalamo-pituitary-adrenal axis – HPA axis), καθώς θεωρείται βασικός ρυθμιστής της έναρξης και λήξης κάθε σταδίου της ζωής (6). Συγκεκριμένα, ο υποθάλαμος ρυθμίζει νευρικές λειτουργίες (συμπαθητικές και παρασυμπαθητικές σπλαχνικές λειτουργίες), συμπεριφορές και ενδοκρινικές λειτουργίες (παραγωγή υποφυσιοτροπικών ορμονών). Η υπόφυση, ανταποκρινόμενη στα υποθαλαμικά μηνύματα, ρυθμίζει σημαντικές λειτουργίες του οργανισμού είτε άμεσα μέσω ορμονών, είτε έμμεσα μέσω της ενεργοποίησης

περιφερικών ενδοκρινών αδένων (επινεφρίδια, θυροειδής). Οι κυριότερες από τις επινεφριδιακές ορμόνες είναι οι κατεχολαμίνες επινεφρίνη και νορ-επινεφρίνη, που δρουν ως νευροδιαβιβαστές για το συμπαθητικό τμήμα του αυτόνομου νευρικού συστήματος (6). Με την αύξηση της ηλικίας, η μείωση στην συμπαθητική ανταπόκριση ενάντια στο στρες χαρακτηρίζεται από μειωμένο αριθμό υποδοχέων κατεχολαμινών στους ιστούς, μειωμένα επίπεδα πρωτεϊνών θερμικού σοκ και μειωμένη ικανότητα των κατεχολαμινών να επάγουν τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ (5). Τα επινεφρίδια εκκρίνουν επίσης τα γλυκοκορτικοειδή που είναι υπεύθυνα για το μεταβολισμό λιπών, πρωτεϊνών και υδατανθράκων, τα μεταλλοκορτικοειδή που ρυθμίζουν το νερό και τους ηλεκτρολύτες, και τις ορμόνες του αναπαραγωγικού συστήματος. Με την αύξηση της ηλικίας και ως αποτέλεσμα χρόνιου στρες, παρουσιάζεται αδυναμία φυσιολογικής ρύθμισης της έκκρισης των γλυκοκορτικοειδών, τα οποία εμφανίζουν τοξική δράση στα νευρικά κύτταρα (6). Η επερχόμενη απώλεια των ομοιοστατικών μηχανισμών που ελέγχονται από το νευρικό και ενδοκρινικό σύστημα φαίνεται να σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο νοσηρότητας και θνησιμότητας (5, 23).

Ωστόσο, καμία από αυτές τις θεωρίες δεν έχει αποδειχτεί ως καταλληλότερη ή εγκυρότερη σε σχέση με τις υπόλοιπες, καθώς η γήρανση αποτελεί ιδιαίτερα σύνθετη και πολυπαραγοντική διαδικασία (6). Παρά τις διαφορετικές προσεγγίσεις, οι θεωρίες του γήρατος δεν αλληλοακυρώνονται, αλλά πιθανά αλληλοσυμπληρώνονται, αποσαφηνίζοντας κάποια ή και όλα τα χαρακτηριστικά της φυσιολογικής διαδικασίας γήρανσης (6).

1.3 Παράγοντες κινδύνου νοσηρότητας

Παχυσαρκία και σαρκοπενική παχυσαρκία

Η αύξηση της ηλικίας συνοδεύεται από μείωση στο ύψος, 2-3 εκατοστά ανά δεκαετία μετά τα 65 χρόνια, ενώ παράλληλα παρατηρείται και μικρή μείωση στο σωματικό βάρος, 0-0,65 κιλά/έτος μετά τα 65 έτη ηλικίας (24). Σημαντικές αλλαγές σημειώνονται και στη σύσταση του σώματος, καθώς μετά τα 20-30 έτη ζωής παρατηρείται σταδιακή μείωση στην άλιπη μάζα σώματος και αύξηση στο λιπώδη ιστό (25, 26). Η άλιπη μάζα σώματος, κυρίως σκελετικοί μύες, μειώνεται έως και 40% από την ηλικία των 20 έως την ηλικία των 70 ετών (27). Παράλληλα, με την αύξηση της ηλικίας πραγματοποιείται σταδιακή μείωση του υποδόριου λίπους και αύξηση του σπλαχνικού και συνολικού λίπους (25).

Ο συνδυασμός της σημαντικής μείωσης στην άλιπη μάζα σώματος και της αύξησης της λιπώδους μάζας στους ηλικιωμένους, οδηγεί στην κλινική κατάσταση της σαρκοπενικής παχυσαρκίας (28). Η σαρκοπενική παχυσαρκία σχετίζεται με μειωμένη φυσική δραστηριότητα και κακή φυσική κατάσταση (28). Στην παθολογία της νόσου φαίνεται ότι εμπλέκεται και η αυξημένη παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών και ορμονών από το λιπώδη ιστό (29). Η αυξημένη έκκριση TNF- α , IL-6 και λεπτίνης από το λιπώδη ιστό εικάζεται πως προάγει τη φλεγμονώδη κατάσταση, μειώνει την κατανάλωση ενέργειας, επιδεινώνει την ινσουλινοαντίσταση και προκαλεί αντίσταση στη λεπτίνη (30, 31). Ακολούθως, επάγεται η περαιτέρω απώλεια μυϊκής μάζας και αύξηση του σωματικού λίπους στους ηλικιωμένους.

Η συχνότητα εμφάνισης υπέρβαρου ($25,0 \leq \Delta.M.\Sigma \leq 29,9 \text{ kg/m}^2$) και παχυσαρκίας ($\Delta.M.\Sigma \geq 30 \text{ kg/m}^2$) στους ηλικιωμένους είναι αρκετά μεγάλη και συνεχώς αυξανόμενη. Οι παράγοντες που ευνοούν την παχυσαρκία στην τρίτη ηλικία περιλαμβάνουν το θετικό ενεργειακό ισοζύγιο, τη μειωμένη φυσική δραστηριότητα, οικονομικούς και κοινωνικούς λόγους επιλογής τροφίμων και την κατάθλιψη (32). Οι ηλικιωμένες γυναίκες εμφανίζουν σε μεγαλύτερο ποσοστό παχυσαρκία σε σχέση με τους άντρες, φαινόμενο που πιθανά οφείλεται στη μεγαλύτερη τάση για αύξηση του βάρους και του λιπώδους ιστού, κυρίως μετεμμηνοπαυσιακά (27, 32). Τα επιδημιολογικά δεδομένα παρουσιάζουν μεγάλο εύρος επιπολασμού της παχυσαρκίας στην τρίτη ηλικία, ανάλογα με την γεωγραφική τοποθεσία. Στη μελέτη “NHANES III”, καταγράφεται υπέρβαρο ή παχυσαρκία στο 64,0% των

γυναικών και στο 70,0% των αντρών ηλικίας 60-69 ετών (33), ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά είναι χαμηλότερα για τους ηλικιωμένους άνω των 70 ετών (56,1% των γυναικών και 61,1% των αντρών (34). Αντίθετα, αρκετά χαμηλά ποσοστά παχυσαρκίας καταγράφονται σε ηλικιωμένους στην Ιερουσαλήμ (16,0% των αντρών και 33,0% των γυναικών) (35), αλλά και στην Ταϊβάν για το σύνολο των υπέρβαρων και παχύσαρκων ηλικιωμένων (41,3% των γυναικών και 30,5% των αντρών) (36). Αρκετά μεγάλες διαφορές υπάρχουν και ανάμεσα στους Ευρωπαϊκούς πληθυσμούς, όπως καταγράφονται από μια πρόσφατη μελέτη (37). Συγκεκριμένα, τα ποσοστά της παχυσαρκίας στους Ευρωπαίους άνω των 50 ετών, κυμαίνονται από 12,8% στη Σουηδία ως 20,2% στην Ισπανία για τους άντρες και από 12,3% στην Ελβετία ως 25,6% στην Ισπανία για τις γυναίκες (37). Στις Μεσογειακές χώρες η συχνότητα εμφάνισης της παχυσαρκίας στην τρίτη ηλικία είναι αρκετά υψηλή. Στην Ιταλία, εκτιμάται πως το 48,6% των ηλικιωμένων αντρών και το 54,9% των γυναικών έχουν $\Delta.M.S. \geq 25 \text{ kg/m}^2$ (24), ενώ στη νότια Ιταλία τα ποσοστά είναι υψηλότερα (76% στους άντρες και 86% στις γυναίκες) (38). Στην Ισπανία, η συχνότητα εμφάνισης υπέρβαρου και παχυσαρκίας υπολογίζεται σε 49,0% και 31,5% αντίστοιχα στους άντρες και 39,8% και 40,8% αντίστοιχα στις γυναίκες (39). Στην Ουγγαρία τα ποσοστά διαφοροποιούνται ανάμεσα στα δύο φύλα, όπου 51,5% των ηλικιωμένων γυναικών και 70,9% των αντρών είναι υπέρβαροι ή παχύσαρκοι (40).

Η επίδραση της παχυσαρκίας στη θνησιμότητα των ηλικιωμένων παραμένει αμφιλεγόμενη. Στις περισσότερες μελέτες δεν έχει βρεθεί στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στον αυξημένο δείκτη μάζας σώματος και την θνησιμότητα, παρά το μεγάλο αριθμό πληθυσμιακού δείγματος (41). Επιπρόσθετα, ενώ σε κάποιες μελέτες έχει βρεθεί σημαντική συσχέτιση, U-μορφής ή γραμμική, ανάμεσα στο δείκτη μάζας σώματος και τη συνολική θνησιμότητα ή τη θνησιμότητα από καρδιαγγειακά νοσήματα, η συσχέτιση ήταν σημαντική για τιμές του $\Delta.M.S.$ μεγαλύτερες από 28 kg/m^2 (42-46). Παράλληλα, η συσχέτιση αυτή φαινόταν να εξασθενεί στους ηλικιωμένους άνω των 70 ετών (43-47). Αντίθετα, προοπτικές μελέτες έχουν δείξει πως ο μειωμένος δείκτης μάζας σώματος σχετίζεται με μεγαλύτερο κίνδυνο θνησιμότητας, σε σχέση με τον κίνδυνο από την παχυσαρκία, σε ηλικιωμένους άνω των 70 ετών (48, 49). **Με βάση τα αποτελέσματα των μελετών, κάποιοι ερευνητές επισημαίνουν πως ο βέλτιστος δείκτης μάζας σώματος για τους ηλικιωμένους, θα πρέπει να είναι υψηλότερος από τα ισχύοντα φυσιολογικά όρια.**

Αναφορικά με τη επίδραση της παχυσαρκίας στη νοσηρότητα, πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει σημαντική συσχέτιση του αυξημένου δείκτη μάζας σώματος με το σύνδρομο αδυναμίας (frailty syndrome) στους ηλικιωμένους (50, 51). Παράλληλα, ο συνδυασμός παχυσαρκίας και σαρκοπενίας, με απώλεια σκελετικών μυών και αύξηση λιπώδους ιστού, σχετίζεται με μειωμένη φυσική δραστηριότητα, με αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση αρθρίτιδας, με διαταραχές της αναπνευστικής λειτουργίας, με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης μεταβολικού συνδρόμου και με επιδείνωση της ινσουλινοαντίστασης (27, 28). Επίσης, η αύξηση του σπλαχνικού λίπους και η κεντρικού τύπου παχυσαρκία, αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση υπέρτασης και δυσλιπιδαιμίας στους ηλικιωμένους (27).

Δυσλιπιδαιμία

Σύμφωνα με το NCEP, ως δυσλιπιδαιμία χαρακτηρίζεται η παρουσία επιπέδων λιπιδίων στο αίμα: >200 mg/dl ολικής χοληστερόλης, ή/και >130 mg/dl LDL-C, ή/και <40 mg/dl HDL-C, ή/και >150 mg/dl τριγλυκεριδίων (52). Η δυσλιπιδαιμία είναι αρκετά συχνή στους ηλικιωμένους, με τις ηλικιωμένες γυναίκες να εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα ολικής χοληστερόλης από τους άντρες (53, 54). Ενώ στους μεσήλικες τα επίπεδα ολικής χοληστερόλης και LDL-C είναι αποδεδειγμένοι παράγοντες κινδύνου για καρδιαγγειακά νοσήματα, στους ηλικιωμένους ο ρόλος των λιποπρωτεϊνών παραμένει αμφιλεγόμενος.

Σε κάποιες μελέτες, τα επίπεδα ολικής χοληστερόλης έχουν αναδειχθεί σε σημαντικό προγνωστικό δείκτη στεφανιαίας νόσου στους ηλικιωμένους άντρες (55-58). Ωστόσο, στις περισσότερες μελέτες η συσχέτιση αυτή φαίνεται να εξασθενεί μετά την ηλικία των 80 ετών (55, 57). Σε μια πρόσφατη μελέτη μετα-ανάλυσης βρέθηκε θετική συσχέτιση των επιπέδων **ολικής χοληστερόλης** με αυξημένη θνησιμότητα από ισχαιμική καρδιακή νόσο, αλλά δεν βρέθηκε συσχέτιση με τη θνησιμότητα από εγκεφαλικό επεισόδιο (59). Παράλληλα, στα αποτελέσματα μεγάλων προοπτικών μελετών, όπως το “Honolulu Heart Programm” και η “Framingham study”, δεν έχει βρεθεί σημαντική επίδραση των αυξημένων επιπέδων ολικής χοληστερόλης στη θνησιμότητα σε γηριατρικούς πληθυσμούς (60, 61). Όσον αφορά στις ηλικιωμένες γυναίκες, οι περισσότερες μελέτες καταλήγουν σε έλλειψη συσχέτισης ανάμεσα στα υψηλά επίπεδα ολικής χοληστερόλης και στον κίνδυνο καρδιαγγειακών νοσημάτων (55, 57).

Ορισμένοι ερευνητές προτείνουν μια σχέση U-μορφής, ανάμεσα στα επίπεδα ολικής χοληστερόλης και τη νοσηρότητα και θνησιμότητα στους ηλικιωμένους, και αποδίδουν την ίδια μορφή σχέσης και στην LDL-C (56, 62). Υποστηρίζοντας αυτή την υπόθεση, **σε αρκετές μελέτες έχει βρεθεί συσχέτιση των χαμηλών επιπέδων λιπιδίων με αυξημένη θνησιμότητα και με το σύνδρομο αδυναμίας και στα δύο φύλα** (54, 56), καθώς και με μεγαλύτερη θνησιμότητα από νεοπλαστικά νοσήματα στις ηλικιωμένες γυναίκες (56).

Η **οξειδωμένη LDL-C** αποτελεί γνωστό παράγοντα κινδύνου καρδιαγγειακών νοσημάτων, καθώς διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθολογία της αθηροσκλήρυνσης. Συγκεκριμένα, η οξείδωση της LDL-C εμπλέκεται στη δημιουργία των αθηρωματικών αλλοιώσεων, μέσω του σχηματισμού αφρωδών κυττάρων. Ακολουθώντας, το οξειδωτικό στρες συμβάλλει στην αθηρογενετική διαδικασία (63, 64). Διατυπώνεται επίσης και η υπόθεση, πως η οξείδωση των λιπιδίων, ως αποτέλεσμα της δράσης των ελευθέρων ριζών, εμπλέκεται και στη διαδικασία της γήρανσης (65). Σε πρόσφατες μελέτες, έχει βρεθεί θετική συσχέτιση των επιπέδων οξειδωμένης LDL-C με τον κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου και εμφράγματος μυοκαρδίου σε πληθυσμούς ηλικιωμένων (66-68), αλλά και με τον επιπολασμό του μεταβολικού συνδρόμου (67).

Η HDL-C θεωρείται σημαντικός παράγοντας μακροβιότητας, καθώς ο ρόλος στη γήρανση φαίνεται να είναι αρκετά διευκρινισμένος. Οι προτεινόμενοι μηχανισμοί περιλαμβάνουν αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της HDL-C, όπως την παρεμπόδιση οξείδωσης της LDL-C, τη μειωμένη έκφραση μορίων προσκόλλησης στο ενδοθήλιο, την ενίσχυση παραγωγής ενδοθηλιακού νιτρικού οξέος και τη μειωμένη κυτταρική απόπτωση (69). **Οι υγιείς ηλικιωμένοι παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα HDL-C σε σχέση με νεότερες ηλικίες** (62), ενώ σε ποσοστό 90% οι ηλικιωμένοι (>70 ετών), έχουν επίπεδα HDL-C πάνω από 40 mg/dl (70). Οι ηλικιωμένες γυναίκες εμφανίζουν, κατά 10 mg/dl, υψηλότερα επίπεδα HDL-C από τους άντρες (71). Σε αρκετές μελέτες, τα επίπεδα HDL-C φαίνεται να διαδραματίζουν προστατευτικό ρόλο έναντι της αθηρογένεσης στην τρίτη ηλικία, καθώς εμφανίζουν ισχυρή αρνητική συσχέτιση με τον κίνδυνο θανάτου από στεφανιαία νόσο, έμφραγμα μυοκαρδίου και εγκεφαλικό επεισόδιο (57, 58, 72-75).

Τα αυξημένα επίπεδα **τριγλυκεριδίων** φαίνεται πως είναι οριακά σημαντικός παράγοντας κινδύνου στεφανιαίων επεισοδίων στις ηλικιωμένες γυναίκες και όχι στους άντρες (76), ενώ σε άλλες μελέτες δεν έχει βρεθεί σημαντική συσχέτιση της υπερτριγλυκεριδαιμίας με τον κίνδυνο εκδήλωσης εγκεφαλικού επεισοδίου, περιφερικής αρτηριακής νόσου ή αθηροσκλήρυνσης σε ηλικιωμένους (77).

Μεταβολικό σύνδρομο

Το μεταβολικό σύνδρομο αποτελεί αποδεδειγμένα παράγοντα κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων και αυξημένης θνησιμότητας (78, 79). Η διάγνωση του μεταβολικού συνδρόμου γίνεται με την αξιολόγηση αρκετών κλινικών παραμέτρων. Στη βιβλιογραφία προτείνονται αρκετοί τρόποι διάγνωσης, με κυριότερους εκείνους από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), το NCEP και τη Διεθνή Ομοσπονδία Διαβήτη (International Diabetes Federation - IDF) (80).

Οι ηλικιωμένοι έχουν αυξημένο κίνδυνο για την εμφάνιση μεταβολικού συνδρόμου, καθώς η αύξηση της ηλικίας σχετίζεται με αρκετά χαρακτηριστικά του συνδρόμου. Εκτός από την αύξηση στο **λιπώδη ιστό**, επιδημιολογικά δεδομένα εκτιμούν αύξηση των **επιπέδων γλυκόζης** νηστείας και μεταγευματικά κατά 1-2 mg/dl και 10-20 mg/dl αντίστοιχα, για κάθε δεκαετία ζωής μετά τα 30 έτη (81). Παράλληλα, η υπεργλυκαιμία και ο διαβήτης τύπου 2 έχουν μεγάλη συχνότητα εμφάνισης στους ηλικιωμένους, ενώ η εμφάνιση ινσουλινοαντίστασης φαίνεται πως σχετίζεται με την κεντρικού τύπου παχυσαρκία και τη μειωμένη φυσική δραστηριότητα (82). Με την αύξηση της ηλικίας παρατηρείται επίσης σημαντική αύξηση των επιπέδων της **συστολικής αρτηριακής πίεσης**, ενώ η διαστολική σταθεροποιείται ή και μειώνεται μετά τα 60 έτη (83).

Τα δεδομένα για τη συχνότητα εμφάνισης του μεταβολικού συνδρόμου, καθώς και την επίδρασή του στη νοσηρότητα και θνησιμότητα των ηλικιωμένων είναι περιορισμένα. Σε γηριατρικό δείγμα της “Cardiovascular Health Study” βρέθηκε συχνότητα εμφάνισης του μεταβολικού συνδρόμου 21,0-28,0%, ενώ στη μελέτη “NHANES III” το αντίστοιχο ποσοστό ήταν 42,0-44,0% (84, 85). Παράλληλα, σε κάποιες μελέτες επιβεβαιώνεται η επίδραση του μεταβολικού συνδρόμου στον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων, ενώ σε άλλες μελέτες δεν έχει βρεθεί συσχέτιση του συνδρόμου με την

εμφάνιση εμφράγματος μυοκαρδίου ή εγκεφαλικού επεισοδίου στους ηλικιωμένους (85, 86).

Παράγοντες της συμπεριφοράς και συνήθειες του τρόπου ζωής

Ανάμεσα στους παράγοντες συμπεριφοράς και στις συνήθειες του τρόπου ζωής, το κάπνισμα, η φυσική δραστηριότητα και η κατανάλωση αλκοόλ αποτελούν δείκτες της υγιούς γήρανσης και της μακροβιότητας (87). Η αποχή από το κάπνισμα έχει σχετιστεί με υγιή γηρατειά σε αρκετές μελέτες (88-90). Για τους πρώην καπνιστές, προσδιορίζεται ο ελάχιστος χρόνος αποχής από το κάπνισμα σε >15 χρόνια, για την εμφάνιση ωφέλιμης επίδρασης στους ηλικιωμένους άντρες (89). Η μέτρια κατανάλωση αλκοόλ (< 28 γρ. αιθανόλης/ ημέρα) φαίνεται πως έχει ευεργετική δράση στην υγεία των ηλικιωμένων (91).

Παράλληλα, η ήπια σωματική άσκηση, καθώς και η φυσική δραστηριότητα αναψυχής έχει συσχετιστεί με βελτιωμένη συνολική κατάσταση υγείας στους ηλικιωμένους (92-94). Συγκεκριμένα, σε μια παρεμβατική μελέτη παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της άλιπης μάζας και της HDL-C, μείωση του ολικού και σπλαχνικού λίπους, καθώς και των επιπέδων διαστολικής αρτηριακής πίεσης, μετά από έξι μήνες μέτριας αεροβικής άσκησης (94). Επιπροσθέτως, η φυσική δραστηριότητα έχει συσχετιστεί με μειωμένα επίπεδα φλεγμονωδών παραγόντων, όπως IL-6, TNF-α και CRP, σε γηριατρικούς πληθυσμούς (93, 95).

1.4 Γενετικοί δείκτες γήρανσης και μακροβιότητα

Οι γενετικοί δείκτες που σχετίζονται με την ανθρώπινη μακροβιότητα και τη γήρανση παραμένουν σε μεγάλο βαθμό άγνωστοι. Η μακροβιότητα υπολογίζεται πως είναι κληρονομήσιμη σε ποσοστό 15-30% (96, 97). Τα τελευταία χρόνια έχουν εντατικοποιηθεί οι επιστημονικές προσπάθειες για την ταυτοποίηση των γενετικών δεικτών που εμπλέκονται στην ανθρώπινη γήρανση.

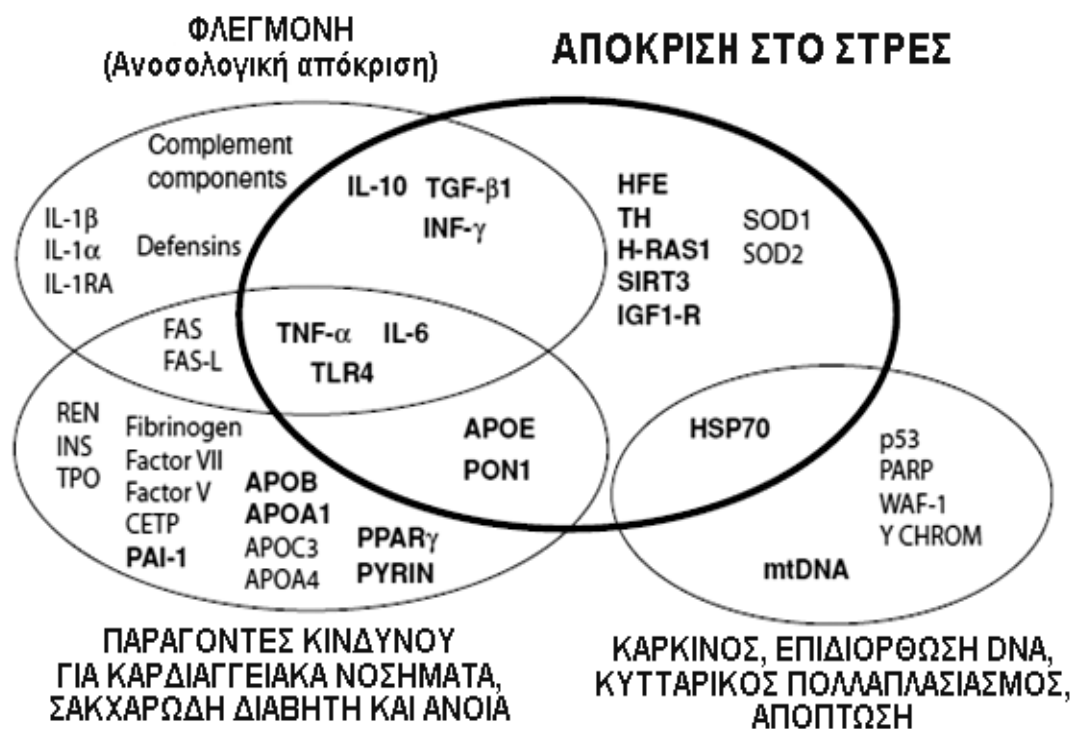
Οι κυριότερες **μεθοδολογικές προσεγγίσεις** που επιστρατεύονται, περιλαμβάνουν μελέτες: α) υπεραιωνόβιων σε σύγκριση με νεότερους εθελοντές, β) ηλικιωμένων αδερφιών, γ) νέων και ηλικιωμένων διδύμων, δ) οικογενειών με πολύ ηλικιωμένα μέλη, καθώς και ε) προοπτικής παρακολούθησης πληθυσμιακών δειγμάτων διαφορετικών ηλικιών (98).

Παράλληλα, εφαρμόζονται διαφορετικές **στρατηγικές γενετικής ανάλυσης**, όπως η μελέτη «υποψήφιων» γονιδίων, η μελέτη επιλεγμένων περιοχών του γονιδιώματος με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά και σχετικά πρόσφατα, η μελέτη συσχέτισης γονιδιωματικής επέκτασης (GWA – Genomic-Wide Association) (98). Η πιστοποίηση της συσχέτισης ενός γονότυπου με την μακροβιότητα απαιτεί αρκετά στάδια. Ένα πρώτο στάδιο είναι η αναζήτηση ενδείξεων για τη συσχέτιση του γενετικού δείκτη με συγκεκριμένο βιολογικό φαινότυπο, ενώ σε δεύτερο στάδιο θα πρέπει να αποδειχθεί η προστατευτική επίδραση του γονότυπου έναντι νοσημάτων γήρανσης (99).

Ανάμεσα στα γονίδια που έχουν μελετηθεί σε σχέση με την ανθρώπινη μακροβιότητα, συγκαταλέγονται γονιδιακές περιοχές υπεύθυνες για την επιδιόρθωση του DNA και για τη ρύθμιση του μήκους των τελομερών, γονιδιακές περιοχές που εμπλέκονται στο μονοπάτι μεταβίβασης μηνυμάτων ινσουλίνης/IGF και στη φλεγμονώδη απόκριση, καθώς και γονίδια του μιτοχονδριακού DNA (100). Τα υποψήφια γονίδια για τη συσχέτισή τους με την ανθρώπινη μακροβιότητα, καθώς και οι πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους, παρουσιάζονται στην **Εικόνα 1.1** (98).

Αρκετές μελέτες αποδεικνύουν την εμπλοκή γονιδίων απολιποπρωτεϊνών (ApoE, ApoB, ApoA1, ApoA4, ApoC3) στη γήρανση, τη μακροβιότητα και τη νοσηρότητα (98). Συγκεκριμένα, το αλληλόμορφο ApoE4 είναι το κατεξοχήν μελετημένο, με συμφωνία στα

αποτελέσματα μεταξύ των ερευνών, για την αρνητική επίδρασή του στην ανθρώπινη μακροβιότητα (98). Παράλληλα, πολυμορφισμοί σε γονίδια που εμπλέκονται στη φλεγμονώδη απόκριση πιθανά να επηρεάζουν την υγιή γήρανση και τη μακροβιότητα. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν συσχετίσει τα αυξημένα επίπεδα IL-6 και TNF- α με αυξημένη νοσηρότητα και θνησιμότητα στους ηλικιωμένους (101). Επομένως, πολυμορφισμοί στα αντίστοιχα γονίδια που επηρεάζουν τα επίπεδα των κυτταροκινών θα μπορούσαν να αποτελούν γενετικούς δείκτες υγιούς γήρανσης ή νοσηρότητας. Συγκεκριμένα, ο πολυμορφισμός -174 C/G (rs1800795) στο γονίδιο της IL-6 φαίνεται να σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα της κυτταροκίνης σε ηλικιωμένους άντρες με GG γονότυπο, ενώ παράλληλα φαίνεται να αποτελεί προγνωστικό δείκτη θανάτου σε ηλικιωμένους ασθενείς με οξύ στεφανιαίο σύνδρομο (102). Αντίθετα, στο γονίδιο της IL-10, το αλληλόμορφο G για τον πολυμορφισμό -1082G/A (rs1800896) έχει συσχετιστεί με αυξημένα επίπεδα της κυτταροκίνης, ενώ απαντάται με μεγαλύτερη συχνότητα στους υπεραιωνόβιους (103). Πρόσφατα, το γονίδιο του Toll-like Receptor 4 (TLR-4), ενός υποδοχέα που συμμετέχει στην έμφυτη ανοσία, βρέθηκε να εμπλέκεται στην ανθρώπινη μακροβιότητα, καθώς το Gly αλληλόμορφο για τον πολυμορφισμό Asp299Gly (rs4986790) ήταν πιο συχνό στους γηραιότερους (104).



Εικόνα 1.1. Υποψήφια γονίδια για την ανθρώπινη μακροβιότητα (98).

Γονίδια που σχετίζονται με την απόκριση στο οξειδωτικό στρες, όπως η δισμουτάση υπεροξειδίου (SOD1 και SOD2) και η παραοξονάση (PON1), είναι σημαντικά υποψήφια γονίδια για τη μακροβιότητα. Ομοίως, γονίδια που εμπλέκονται στο μονοπάτι μεταβίβασης μηνυμάτων ινσουλίνης/IGF συγκεντρώνουν ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον σε σχέση με τη μακροβιότητα. Σε μια πρόσφατη μελέτη συσχέτισης γονιδιωματικής επέκτασης στη έρευνα “Framingham”, βρέθηκαν σημαντικές συσχετίσεις πολυμορφισμών σε αρκετά γονίδια με τη μακροβιότητα (105). Ανάμεσα στα γονίδια αυτά περιλαμβάνονται: FOXO1A (μεταγραφικός παράγοντας Forkhead 1A), PON1 (Παραοξονάση 1), GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase – Αφυδρογονάση της 3-φωσφο-γλυκεραλδεϋδης), KLOTHO (Κλωθώ), LEPR (Leptin Receptor – Υποδοχέας Λεπτίνης), PSEN1 (Presenilin 1 – Πρεσενιλίνη 1), SOD2 (Superoxide Dismutase 2 – Δισμουτάση Υπεροξειδίου 2) και WRN (Werner syndrome protein) (105).

Η διερεύνηση των γενετικών δεικτών της υγιούς γήρανσης και μακροβιότητας αποτελεί αντικείμενο ενός πενταετούς Ευρωπαϊκού Προγράμματος. Το πρόγραμμα **GEHA (Genetics of Healthy Aging)** συγκεντρώνει 25 συνεργαζόμενους φορείς και στοχεύει στην πιστοποίηση των γενετικών δεικτών που εμπλέκονται στη μακροβιότητα (106). Ο σχεδιασμός της μελέτης περιλαμβάνει τη στρατολόγηση ενός μεγάλου αριθμού υπεραιωνόβιων αδερφιών και του αντίστοιχου αριθμού νεότερων μαρτύρων, από όλη την Ευρώπη (106). Ο σχεδιασμός της γενετικής ανάλυσης προβλέπει τη μελέτη πολυμορφισμών που έχουν ήδη συσχετιστεί με τη μακροβιότητα στο γονίδιο της apoE, στο χρωμόσωμα 4 (D4S1564), στο χρωμόσωμα 11 (11.p15.5) και στο μιτοχondριακό DNA (106). Επιπλέον, προβλέπεται και η μελέτη συσχέτισης γονιδιωματικής επέκτασης με σκοπό την ανίχνευση νέων γενετικών δεικτών της μακροβιότητας (106). Παράλληλα, αρωγός στην έρευνα των γενετικών δεικτών της μακροβιότητας αποτελεί η διαδικτυακή πλατφόρμα Human Ageing Genomic Resources (HAGR – <http://genomics.senescence.info>). Πρόκειται για μια πλατφόρμα που αποτελείται από δύο βασικές βάσεις δεδομένων, την GenAge και την AnAge (107). Η GenAge βάση περιλαμβάνει γονίδια που σχετίζονται με τη γήρανση και τη μακροβιότητα σε μοντέλα οργανισμών, γονίδια που πιθανά σχετίζονται με τη γήρανση στον άνθρωπο, καθώς και μια λίστα γονιδίων που έχουν μελετηθεί σε σχέση με την ανθρώπινη μακροβιότητα (107). Στη βάση περιλαμβάνεται επίσης πληθώρα βιολογικών δεδομένων και πληροφοριών. Η AnAge βάση περιλαμβάνει τα αντίστοιχα δεδομένα για τη γήρανση στα ζώα (107).

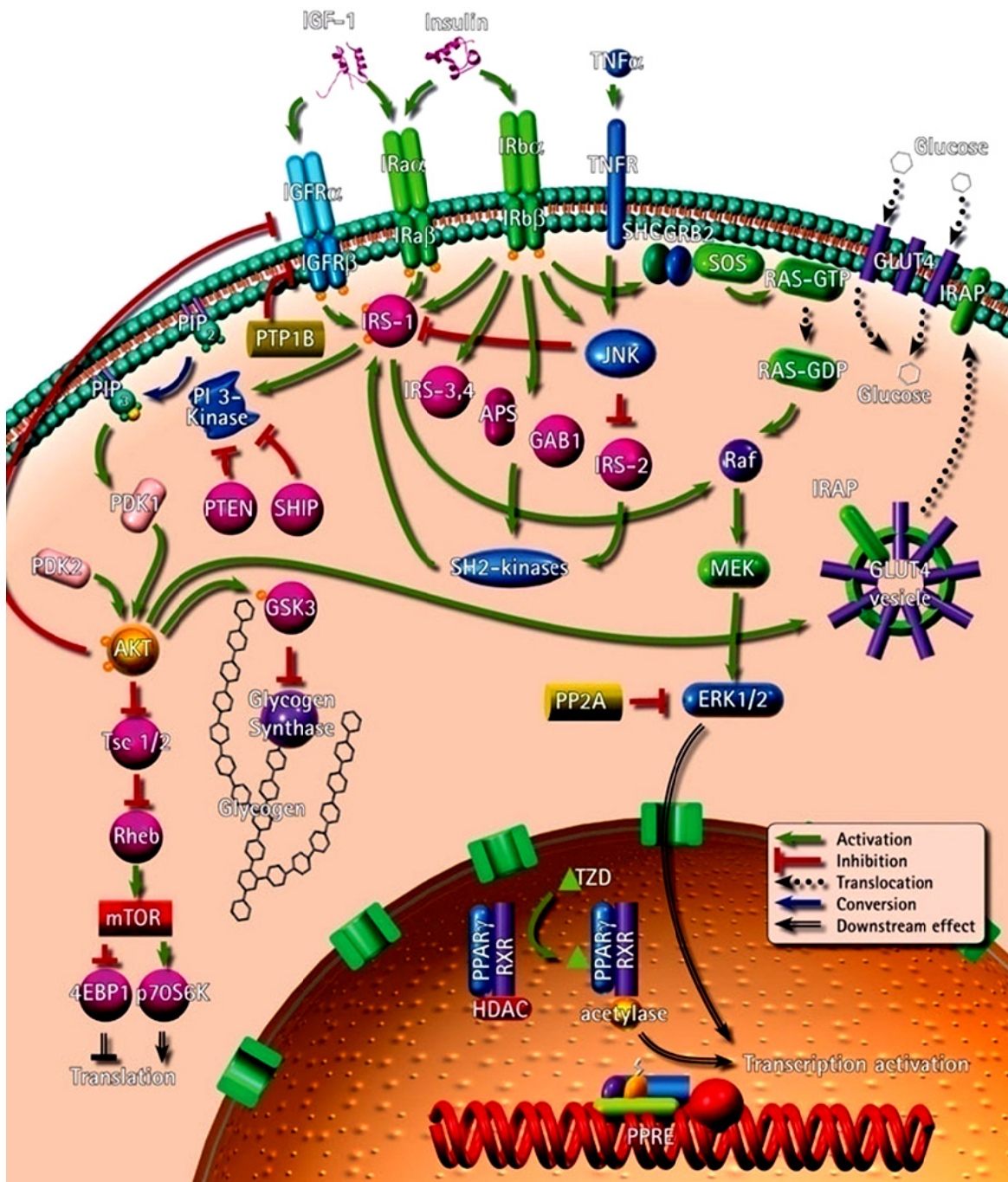
1.5 Το μονοπάτι μεταβίβασης μηνυμάτων ινσουλίνης/IGF και μακροβιότητα

Η ινσουλίνη και οι ινσουλινομιμητικοί αυξητικοί παράγοντες (IGF-1 και IGF-2) αντιπροσωπεύουν μια οικογένεια ορμονών/αυξητικών παραγόντων που ρυθμίζουν τον μεταβολισμό, την ανάπτυξη, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των περισσότερων ιστών στα θηλαστικά (108). Οι επιδράσεις αυτές μεσολαβούνται από δύο συγγενείς υποδοχείς, τον υποδοχέα ινσουλίνης και τον υποδοχέα IGF-1, οι οποίοι εκφράζονται στην επιφάνεια των περισσότερων κυττάρων στα θηλαστικά. Παράλληλα με τον σκελετικό μυϊκό ιστό, το ήπαρ και το λιπώδη ιστό, οι υποδοχείς της ινσουλίνης και του IGF-1 είναι λειτουργικοί και στα παγκρεατικά κύτταρα, στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα και στο κεντρικό νευρικό σύστημα (108). Ο υποδοχέας του IGF-1 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της σωματικής ανάπτυξης και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Σχεδόν όλοι οι ιστοί παράγουν IGF-1, με κυριότερο το ήπαρ. Ο υποδοχέας IGF-1 είναι παρόν στα περισσότερα είδη κυττάρων του οργανισμού και η αλληλεπίδρασή του με τον IGF-1 καθορίζει την ορμονική του δράση (109). Η ποσότητα του IGF-1 στην κυκλοφορία του αίματος καθορίζεται από το ρυθμό παραγωγής του, τη μεταβολική εκκαθάρισή του και τη διαμόρφωσή του από έξι πρωτεΐνες σύνδεσης στον IGF, οι οποίες συνδέονται στους ινσουλινομιμητικούς αυξητικούς παράγοντες με υψηλή συγγένεια και περιορίζουν τη διαθεσιμότητά τους στους αντίστοιχους υποδοχείς (110).

Η ινσουλίνη και ο IGF-1 κινητοποιούν τη δράση τους μέσω ομολόγων συστημάτων μεταβίβασης μηνυμάτων. Οι υποδοχείς ινσουλίνης και IGF-1 ανήκουν στην οικογένεια των κινασών τυροσίνης. Και οι δύο υποδοχείς αποτελούνται από δύο α- και β-υπομονάδες. Η ινσουλίνη και ο IGF-1 συνδέονται στις α-υπομονάδες των αντίστοιχων υποδοχέων τους, ενεργοποιώντας την δραστηριότητα κινάσης των β-υπομονάδων. Αυτό οδηγεί σε αυτοφωσφορυλίωση του υποδοχέα και περαιτέρω ενεργοποίηση του υποδοχέα κινάσης προς ενδοκυτταρικά υποστρώματα (108). Έχουν αναγνωριστεί τουλάχιστον δέκα ενδοκυτταρικά υποστρώματα των υποδοχέων ινσουλίνης και IGF-1, συμπεριλαμβάνοντας και τις πρωτεΐνες υποστρώματα του υποδοχέα ινσουλίνης (Insulin Receptor Substrate protein – IRS), IRS-1, -2, -3 και -4. Μετά την φωσφορυλίωση της τυροσίνης, καθένα από αυτά τα υποστρώματα σχετίζεται με ένα ή περισσότερα ενδοκυτταρικά μόρια, μέσω αλληλεπίδρασης των σημείων της φωσφορυλίωσης της τυροσίνης στα υποστρώματα και

των θειούχων ομάδων (SH2) των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών (108). Τα σημαντικότερα μόρια με θειούχες ομάδες για την ινσουλίνη είναι το ένζυμο 3-κινάση της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης και η πρωτεΐνη 2 σύνδεσης του υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα (Growth factor receptor-bound protein 2 – Grb2). Η Grb2 συνδέει τη δράση της ινσουλίνης στο μονοπάτι της Ras-πρωτεϊνικής κινάσης ενεργοποίησης μίτωσης (Mitogen-Activated Protein – MAP) και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη δυνατότητα της ινσουλίνης να επάγει την κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση (108). Η 3-κινάση της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης ενεργοποιεί το σύμπλεγμα Akt/πρωτεϊνικής κινάσης B (PKB) και την πρωτεϊνική κινάση C, και ακολούθως ενεργοποιείται ο p70 S6K και η κινάση 3 της συνθετάσης γλυκογόνου (108). Συνεπώς, κινητοποιείται η σύνθεση γλυκογόνου, λίπους και πρωτεϊνών, καθώς και η μεταφορά γλυκόζης μέσω μετατόπισης των υποδοχέων γλυκόζης στην κυτταρική μεμβράνη. Το σύμπλοκο Akt/PKB φωσφορυλιώνει και τους μεταγραφικούς παράγοντες forkhead, της οικογένειας FOXO (111). Υπό συνθήκες μειωμένων επιπέδων ινσουλίνης, οι πρωτεΐνες FOXO δεν φωσφορυλιώνονται και παραμένουν στον πυρήνα, όπου είναι ενεργές και ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση (111).

Η ινσουλίνη και ο IGF-1 ενεργοποιούν την Akt, οδηγώντας σε φωσφορυλίωση των FOXO μεταγραφικών παραγόντων, με συνεπαγόμενη μεταφορά τους στο κυτταρόπλασμα και μειωμένη μεταγραφική δραστηριότητα (112). Οι FOXO παράγοντες ρυθμίζουν την απόπτωση, τον κυτταρικό κύκλο, τη διαφοροποίηση, την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στην επιδιόρθωση του DNA και στην αντίσταση στο οξειδωτικό στρες (113, 114). Υπάρχουν ενδείξεις ότι η ενεργοποίηση του Akt/PKB ενισχύει την αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης μέσω του μονοπατιού p53/p21. Η αναστολή του FOXO3a από το Akt/PKB, το οποίο επηρεάζει τη δραστηριότητα του p53 ρυθμίζοντας τα επίπεδα των ελευθέρων ριζών, είναι απαραίτητη για την αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης. Παράλληλα, η ινσουλίνη αυξάνει τη δραστηριότητα του p53 μέσω ενός μηχανισμού εξαρτώμενου από το Akt/PKB και μειώνει τη διάρκεια ζωής σε ενδοθηλιακά κύτταρα. Ο φαινότυπος γήρανσης που επάγεται από το Akt/PKB ενδέχεται να εμπλέκεται στις αγγειοπάθειες, αφού η υπερινσουλιναίμία φαίνεται να ενεργοποιεί το Akt/PKB στα ενδοθηλιακά κύτταρα. (115, 116). Το μονοπάτι μεταβίβασης μηνυμάτων ινσουλίνης/IGF παρουσιάζεται στην **Εικόνα 1.2**.



Εικόνα 1.2. Το μονοπάτι μεταβίβασης μηνυμάτων ινσουλίνης/IGF.

Η εμπλοκή του μονοπατιού μεταβίβασης μηνυμάτων ινσουλίνης/IGF-1 στη μακροβιότητα παρατηρήθηκε αρχικά στο νηματοειδές *Caenorhabditis elegans* (117). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η σύνδεση ενός υποκαταστάτη ανάλογου της ινσουλίνης/IGF-1 στον αντίστοιχο υποδοχέα (DAF-2) πυροδοτεί μια αλυσίδα γεγονότων, που οδηγούν στη ρύθμιση ενός μεταγραφικού παράγοντα (DAF-16). Σε συνθήκες κυτταρικού στρες ή ασιτίας, η απενεργοποίηση του DAF-2 και η μειωμένη μεταγωγή μηνυμάτων μέσω

ινσουλίνης/IGF-1, αυξάνει τη δραστηριότητα του DAF-16. Αυτή η διαδικασία ευνοεί τη συσσώρευση λίπους, την προστασία από το οξειδωτικό στρες, την καθυστερημένη αναπαραγωγή και τη μακροβιότητα στο νηματοειδές (118). Προκαλώντας μεταλλάξεις στο γονίδιο του DAF-2, η διάρκεια ζωής του *C. elegans* μπορεί να τριπλασιαστεί (119). Παρομοίως, στη *Drosophila melanogaster*, μεταλλάξεις στα γονίδια του υποδοχέα ινσουλίνης και του υποστρώματός του, αυξάνουν ως 48,0% τη διάρκεια ζωής των θηλυκών (120).

Στα θηλαστικά, τα μονοπάτια της ινσουλίνης και του IGF-1 είναι υπεύθυνα για ξεχωριστές λειτουργίες, για τον κυτταρικό μεταβολισμό το μονοπάτι της ινσουλίνης και για την αύξηση και διαφοροποίηση το μονοπάτι του IGF-1. Ωστόσο, τα μονοπάτια που ρυθμίζουν τη διάρκεια ζωής μπορούν να εμπλέκουν και το μονοπάτι της ινσουλίνης ή/και το μονοπάτι του IGF-1. Αποτελέσματα από πειράματα σε επίμυες έχουν σχετίσει μεταλλάξεις που προκαλούν μειωμένα επίπεδα IGF-1 με μεγαλύτερη διάρκεια ζωής (121). Σε ίδια πειραματόζωα, έχει σχετιστεί η ανεπαρκής έκφραση του υποδοχέα IGF-1, σε ετερόζυγα knockout ποντίκια, με αυξημένη αντίσταση στο οξειδωτικό στρες και μεγαλύτερη διάρκεια ζωής (122).

Στους ανθρώπους, τα αντίστοιχα δεδομένα επιδημιολογικών μελετών είναι αντικρουόμενα. Η μειωμένη δραστηριότητα του IGF-1 λόγω ανεπάρκειας της υπόφυσης, σχετίζεται με αυξημένη νοσηρότητα στην ενήλικη ζωή και αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων και σακχαρώδη διαβήτη (123). Αντιστρόφως, αυξημένα επίπεδα IGF-1 σχετίζονται με καρκινογένεση, δεδομένου του ρόλου του IGF-1 στην ιστική ανάπτυξη, και ιδιαίτερα με αυξημένη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του προστάτη, του στήθους και του κάτω γαστρεντερικού σωλήνα (124). Η μέγιστη επιβίωση στον άνθρωπο φαίνεται να εξαρτάται από την αυστηρή ρύθμιση του άξονα υποθαλάμου-αυξητικής ορμόνης-IGF και την διατήρηση βέλτιστων επιπέδων IGF-1, ώστε να αποτρέπονται οι νοσηρότητες που σχετίζονται με την ανεπάρκεια ή την περίσσεια του παράγοντα. Δεδομένης της αυξημένης σχετικής συχνότητας εμφάνισης καρκίνου στην ενήλικη ζωή και του αυξανόμενου επιπολασμού των καρδιαγγειακών νοσημάτων με την πάροδο της ηλικίας, είναι πιθανό μειωμένα επίπεδα IGF-1 κατά την ενήλικη ζωή σε συνδυασμό με υψηλότερα φυσιολογικά επίπεδα κατά την γήρανση, να είναι ιδιαίτερα ευνοϊκά για την ανθρώπινη μακροβιότητα (109).

Τα επίπεδα IGF-1 μειώνονται σταδιακά με την αύξηση της ηλικίας. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα IGF-1, αφού φτάσουν στα μέγιστα επίπεδά τους κατά την εφηβεία, υποδιπλασιάζονται ως την τρίτη δεκαετία και συνεχίζουν να μειώνονται με σταθερό ρυθμό καθώς αυξάνεται η ηλικία (109). Το φαινόμενο της σχετικής ανεπάρκειας αυξητικής ορμόνης και IGF-1 κατά τη γήρανση αποδίδεται στην μειωμένη δραστηριότητα του άξονα υποθαλάμου-αυξητικής ορμόνης-IGF, καθώς η παραγωγή της αυξητικής ορμόνης μειώνεται κατά 14% ανά δεκαετία μετά τη μέση ηλικία ζωής (109). Ωστόσο, η φυσική δραστηριότητα, οι συνήθειες του τρόπου ζωής, οι αλλαγές στα επίπεδα των στεροειδών ορμονών, τα χρόνια νοσήματα και η διατροφή, φαίνεται πως επηρεάζουν επίσης τα επίπεδα του IGF-1.

Στους ανθρώπους, έχουν καταγραφεί αντικρουόμενες ενδείξεις για την εμπλοκή του μονοπατιού ινσουλίνης/IGF-1 στη γήρανση και τη μακροβιότητα, λόγω των σοβαρών μεταβολικών επιπλοκών και κυρίως της ανάπτυξης σακχαρώδους διαβήτη, ως επακόλουθο της ανεπάρκειας ινσουλίνης ή της ανεπάρκειας του υποδοχέα της ινσουλίνης (108). Η ινσουλινο-ευαισθησία φυσιολογικά μειώνεται κατά την γήρανση και η ινσουλινο-αντίσταση αποτελεί σημαντικό παράγοντα κινδύνου για αρκετές ασθένειες, συμπεριλαμβανομένης της υπέρτασης, της αθηροσκλήρυνσης, της παχυσαρκίας και του διαβήτη, που επηρεάζουν τη νοσηρότητα και τη θνησιμότητα στους ηλικιωμένους (125). Ωστόσο, οι μακροβιότεροι άνθρωποι χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερα μεταβολικά χαρακτηριστικά, όπως χαμηλότερες τιμές του δείκτη μάζας σώματος, χαμηλότερα επίπεδα ινσουλίνης και γλυκόζης νηστείας, μειωμένη ινσουλινοαντίσταση, μειωμένα επίπεδα ελεύθερης ινσουλίνης/IGF-1 στο πλάσμα, καθώς και διατηρημένη λειτουργία των β παγκρεατικών κυττάρων, σε σχέση με το αναμενόμενο (126, 127). Αρκετά δεδομένα μελετών επιβεβαιώνουν την υπόθεση, πως η επαρκής απόκριση της ινσουλίνης ευνοεί την ανθρώπινη μακροβιότητα (128).

Ευρήματα σε διαφορετικούς οργανισμούς υποστηρίζουν την υπόθεση ότι μεταλλάξεις σε γονίδια του ινσολινομιμητικού δικτύου μεταβίβασης μηνυμάτων συντελούν στην αντίσταση έναντι του οξειδωτικού στρες, καθώς και στην επιμήκυνση της διάρκειας ζωής (108). Αυτό υποδηλώνει, πως πιθανά η μειωμένη οξειδωτική βλάβη στα μακρομόρια, ως αποτέλεσμα μεταλλάξεων, αποτελεί το τελικό κοινό μονοπάτι του συστήματος μεταβίβασης μηνυμάτων ινσουλίνης/IGF-1, που επιδρά στη μακροβιότητα. Μελέτες σε ανθρώπους έχουν δείξει, πως οι ελεύθερες ρίζες διαδραματίζουν σημαντικό

ρόλο στην παθογένεια αρκετών νοσημάτων, όπως των καρδιαγγειακών, της αθηροσκληρώσεως και του σακχαρώδη διαβήτη (129). Επιβεβαιώνοντας αυτή την υπόθεση, οι υγιείς αιωνόβιοι παρουσιάζουν μικρού βαθμού οξειδωτικό στρες και αυξημένες αντιοξειδωτικές άμυνες (129). Επιπροσθέτως, έχει βρεθεί ότι η ινσουλίνη και ο IGF-1 επηρεάζουν και την κυτταρική γήρανση. Ενώ το σύμπλοκο Akt/PKB έχει βρεθεί να ενισχύει τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των κυττάρων στα θηλαστικά, πρόσφατες μελέτες παρουσιάζουν ανάλογη αύξηση της δραστηριότητας του Akt/PKB με την κυτταρική γήρανση και επιμήκυνση της διάρκειας ζωής με αναστολή του συμπλόκου (108).

Υπάρχουν αρκετές ενδείξεις για την ορμονική ρύθμιση της γήρανσης από το συντηρητικό εξελικτικά μονοπάτι μεταφοράς μηνυμάτων ινσουλίνης/IGF-1 στον άνθρωπο (130). **Ο ρόλος των πολυμορφισμών του μονοπατιού ινσουλίνης/IGF στη μακροβιότητα** μελετήθηκε αρχικά στην περιοχή των γονιδίων ινσουλίνης-IGF-2, όπου συσχετίστηκαν ορισμένοι απλότυποι με την μακροβιότητα σε Ιταλούς υπεραιωνόβιους άντρες (131). Ωστόσο, στη μελέτη “Leiden” σε ογδονταπεντάχρονους Ολλανδούς, δεν βρέθηκε καμία συσχέτιση ανάμεσα σε πολυμορφισμούς στο γονίδιο της ινσουλίνης και τη διάρκεια ζωής, ενώ διαπιστώθηκε πως οι γυναίκες φορείς του πολυμορφισμού rs2665802 στο γονίδιο του IGF-1, είχαν μικρότερο ύψος και μεγαλύτερη ηλικία επιβίωσης, σε σύγκριση με τους μη φορείς (132). Στη ίδια μελέτη, απλότυποι πολυμορφισμών στα γονίδια FOXO1a και FOXO3a σχετίστηκαν με το μεταβολικό προφίλ (επίπεδα γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης) και τον κίνδυνο θνησιμότητας στους ηλικιωμένους (132, 133). Αντίστοιχα, πολυμορφισμοί στο γονίδιο του FOXO1a, αλλά όχι του FOXO3a, σχετίστηκαν με την ηλικία θανάτου στη μελέτη “Framingham” (105). Σε σχέση με το γονίδιο του υποδοχέα της ινσουλίνης, βρέθηκε συσχέτιση ενός απλότυπου με την μακροβιότητα σε μια ομάδα υπεραιωνόβιων Ιαπώνων (134). Παράλληλα, έχει βρεθεί σε Ιταλούς υπεραιωνόβιους, ότι ο πολυμορφισμός A/G στη θέση 3174 στο γονίδιο του υποδοχέα IGF-1 σχετίζεται με μειωμένα επίπεδα IGF-1 για τους φορείς του A αλληλομόρφου, ενώ το ίδιο αλληλόμορφο έχει μεγαλύτερη συχνότητα στους μακροβιότερους (135). Στην ίδια μελέτη, βρέθηκε αλληλεπίδραση ανάμεσα στο A αλληλόμορφο του γονιδίου του υποδοχέα IGF-1 και στο T αλληλόμορφο του γονιδίου της 3-κινάση της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (στη θέση -359 bp από το κωδικόνιο έναρξης), με χαμηλότερα επίπεδα IGF-1 (135). Σε μια προοδευτική μελέτη ηλικιωμένων, βρέθηκε πως τα αυξημένα επίπεδα IGFBP-1 και IGFBP-2, που υποδηλώνουν μεγαλύτερη

δραστηριότητα του IGF-1, σχετίζονταν με χαμηλότερα επίπεδα γλυκόζης νηστείας και ινσουλίνης και χαμηλότερα ποσοστά λιπώδους ιστού, αλλά και με μεγαλύτερο κίνδυνο θνησιμότητας (136).

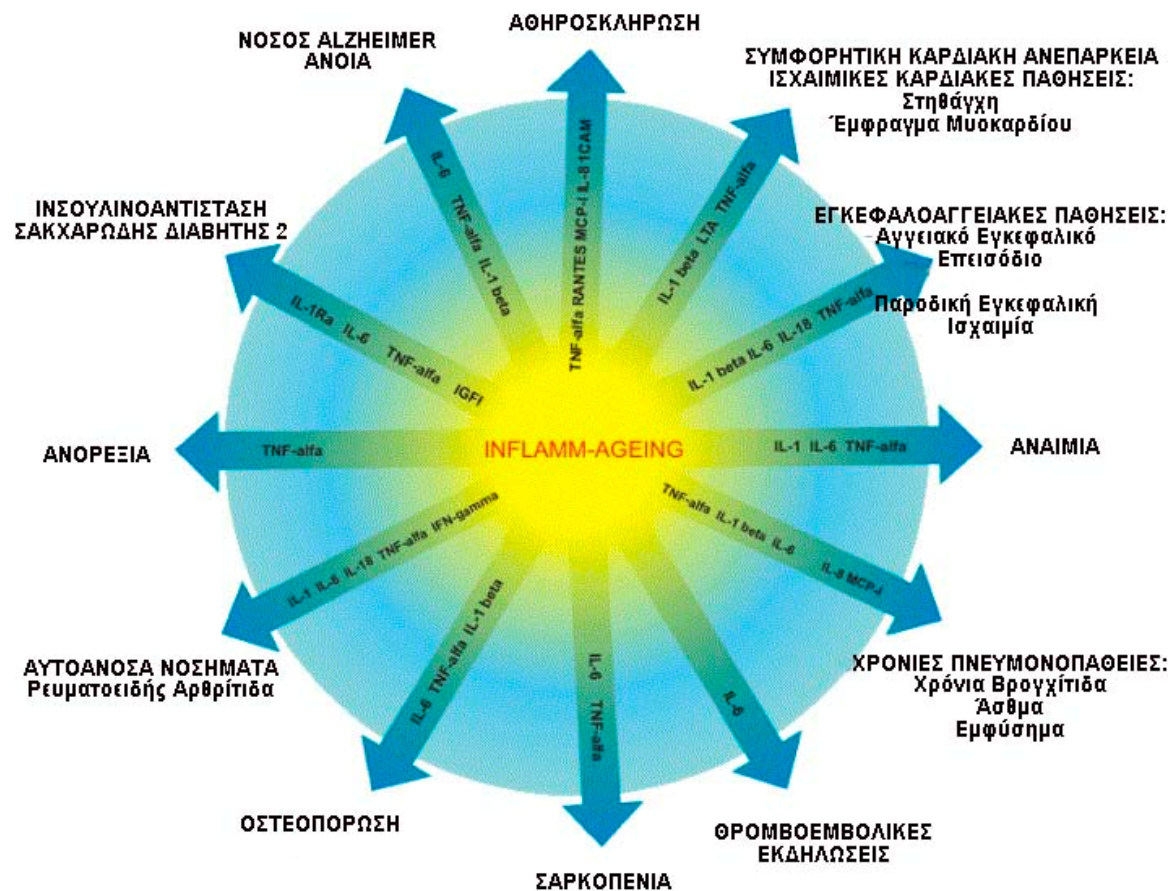
Το μονοπάτι της ινσουλίνης/IGF-1 αλληλεπιδρά με μια πληθώρα πρωτεϊνών και παράλληλα διαμορφώνει την έκφραση αρκετών γονιδίων (137, 138). Ένας από τους μεταγραφικούς στόχους του μονοπατιού ινσουλίνης/IGF-1 είναι το γονίδιο της μιτοχονδριακής δισμουτάσης υπεροξειδίου (Superoxide dismutase - SOD). Πολυμορφισμοί στο γονίδιο της SOD2 έχουν μελετηθεί σε πληθυσμούς ηλικιωμένων Ιταλών και Ολλανδών, χωρίς να έχει βρεθεί κάποια συσχέτιση με την μακροβιότητα (132). Ωστόσο, σε αντρικό πληθυσμό υπεραιωνόβιων Ashkenazi, βρέθηκε αυξημένη συχνότητα των ομοζυγωτών για την μετάλλαξη 401 Val/Val (139). Πρόσφατα, ένας πολυμορφισμός κοντά στην περιοχή του γονιδίου του SOD2 σχετίστηκε με την ηλικία θανάτου στη μελέτη Framingham (105). Τα γονίδια της τρανσφεράσης γλουταθειόνης (Glutathione transferases – GST) και της παραοξονάσης (Paraoxonase – PON) διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον ξενοβιοτικό μεταβολισμό και το οξειδωτικό στρες και αποτελούν επίσης μεταγραφικό στόχο του μονοπατιού ινσουλίνης/IGF-1 (140). Σε πληθυσμιακές μελέτες, βρέθηκε μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης του GSTT1 μη λειτουργικού αλληλομόρφου σε Ιταλίδες εκατοντάχρονες (141). Αντίστοιχα, η ομοζυγωτία για το λειτουργικό GSTT1 αλληλόμορφο σχετίστηκε με αυξημένη θνησιμότητα σε ηλικιωμένες Δανέζες (142). Παράλληλα, μελέτες σε Ιταλικούς και Ιρλανδικούς πληθυσμούς, έδειξαν μεγαλύτερα ποσοστά επιβίωσης για τους εκατοντάχρονους φορείς του Arg αλληλομόρφου στο κωδικόνιο 192 του γονιδίου PON1 (143).

1.6 Δείκτες φλεγμονής και ανοσογήρανση

Η γήρανση χαρακτηρίζεται από χρόνια, χαμηλού βαθμού φλεγμονώδη κατάσταση, που αναφέρεται ως **ανοσογήρανση** (inflamm-aging). Η ανοσογήρανση φαίνεται να απορρέει από το μακροχρόνιο αντιγονικό φορτίο (144-146), οδηγεί σε μακροπρόθεσμες ιστικές βλάβες λόγω της απορρύθμισης του ανοσοποιητικού συστήματος και σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο θνησιμότητας στους ηλικιωμένους (147). Αρκετές μελέτες έχουν προτείνει τη χρόνια φλεγμονή ως υποκείμενο βιολογικό μηχανισμό, υπεύθυνο για την έκπτωση των λειτουργιών κατά τη γήρανση. Συγκεκριμένα, ασθένειες όπως η νόσος Alzheimer, το Parkinson, η αθηροσκλήρυνση, ο διαβήτης τύπου 2, η σαρκοπενία, η οστεοπόρωση, η άνοια και το σύνδρομο αδυναμίας στους ηλικιωμένους, πυροδοτούνται ή και επιδεινώνονται από την παρουσία συστηματικής φλεγμονής (148-152). Οι **φλεγμονώδεις δείκτες** που χαρακτηρίζουν την ανοσογήρανση μπορούν να διακριθούν σε τρεις κατηγορίες: α) *τους βιοχημικούς*, β) *τους κυτταρικούς* και γ) *τους γενετικούς δείκτες*.

Στους **βιοχημικούς δείκτες** φλεγμονής συγκαταλέγονται προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες και οι αντίστοιχοι υποδοχείς τους, όπως ο TNF-α και οι υποδοχείς του, η IL-6 και ο ανταγωνιστής του υποδοχέα της ιντερλευκίνης-1 (IL-1Ra), που σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο νοσηρότητας και θνησιμότητας στους ηλικιωμένους (153). Παράλληλα, η ανοσογήρανση χαρακτηρίζεται και από αυξημένη παραγωγή χυμοκινών (RANTES, MIP-1α, IL-8, MCP-1) και της CRP (154, 155). Η μακροχρόνια, έστω και μικρού βαθμού, ενεργοποίηση του δικτύου των κυτταροκινών θεωρείται ιδιαίτερα επιζήμια για αρκετούς ιστούς και συστήματα. Η επίδραση των φλεγμονωδών παραγόντων σε διάφορα νοσήματα κατά την ανοσογήρανση συνοψίζεται στην **Εικόνα 1.3**. Τα επίπεδα TNF-α και IL-6 αποτελούν ανεξάρτητους προγνωστικούς δείκτες θνησιμότητας σε ηλικιωμένους και υπεραιωνόβιους (153, 156). Τα επίπεδα TNF-α στο πλάσμα βρέθηκαν να σχετίζονται θετικά με τα επίπεδα IL-6 και CRP σε υπεραιωνόβιους (157). Επιπροσθέτως, αυξημένα επίπεδα TNF-α έχουν συσχετιστεί με μεγαλύτερη συχνότητα της νόσου Alzheimer και του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (158, 159). Σε μια πρόσφατη μελέτη μη διαβητικών ηλικιωμένων, σχετίστηκαν τα αυξημένα επίπεδα TNF-α, IL-6 και CRP με το βαθμό ινσουλινοαντίστασης (160). Στην προοπτική γηριατρική μελέτη “InCHIANTI” βρέθηκε συσχέτιση των υψηλών επιπέδων IL-6, CRP και IL-1Ra με μειωμένη μυϊκή δύναμη, ενώ σε άλλες γηριατρικές μελέτες παρατηρήθηκε αρνητική επίδραση των αυξημένων επιπέδων IL-6 στα επίπεδα IGF-1, σε σχέση με τη μυϊκή λειτουργία (161). Παράλληλα, σε μια άλλη

προοπτική γηριατρική μελέτη βρέθηκε θετική συσχέτιση των επιπέδων IL-6, CRP και TNF- α με την εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων (162).



Εικόνα 1.3. Η επίδραση του δικτύου φλεγμονωδών παραγόντων σε διάφορα νοσήματα κατά την ανοσογήρανση (163).

Στους **κυτταρικούς δείκτες** της ανοσογήρανσης συγκαταλέγονται τα λευκά κύτταρα του αίματος, καθώς και συγκεκριμένοι τίτλοι λεμφοκυττάρων. Σε μια πρόσφατη μελέτη βρέθηκε πως ο αυξημένος αριθμός λευκών κυττάρων αποτελεί σημαντικό προγνωστικό δείκτη θνησιμότητας στους ηλικιωμένους (164). Αναφορικά με τους υποπληθυσμούς των λεμφοκυττάρων, ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά της ανοσογήρανσης είναι η συσσώρευση T-κυττάρων μνήμης (165-167). Στους υπερωονόβιους παρατηρείται εξάντληση των μη εξειδικευμένων (naïve) T-κυττάρων, όπως επιβεβαιώνεται από την έλλειψη του CD95 μορίου, σε συνδυασμό με τη παρουσία άλλων συνηθών δεικτών των μη εξειδικευμένων T-κυττάρων (CD45RA και CD62L) (168, 169). Συνεπώς, ο χαμηλός αριθμός των μη εξειδικευμένων T-κυττάρων μπορεί να θεωρηθεί ως δείκτης θνησιμότητας (170). Παράλληλα, ο συνδυασμός αυξημένων CD8+, μειωμένων CD4+ T-κυττάρων και

μειωμένων CD19+ B-κυττάρων σχετίζεται με αυξημένη νοσηρότητα και θνησιμότητα στους ηλικιωμένους (171). Ωστόσο, στους κυτταρικούς δείκτες της ανοσογήρανσης φαίνεται να εμπλέκονται και ιοί, όπως ο κυτταρομεγαλοϊός και ο ιός Epstein Barr (EBV) (146). Σε πρόσφατες μελέτες έχει βρεθεί, πως η εξάπλωση περιφερικών CD8+ T-κυττάρων που φέρουν υποδοχείς για τον κυτταρομεγαλοϊό και τον EBV είναι αρκετά συχνή στους ηλικιωμένους και σχετίζεται με την απώλεια των πρώιμων T-κυττάρων μνήμης (146). Τέλος, στους κυτταρικούς δείκτες της ανοσογήρανσης θα πρέπει να αναφερθεί και η μείωση του μήκους των τελομερών, καθώς σχετίζεται σημαντικά με την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος και τη φλεγμονή (172). Στους **γενετικούς δείκτες** της ανοσογήρανσης αναφέρονται οι πολυμορφισμοί στα γονίδια των κυταροκινών, που σχετίζονται με αυξημένα επίπεδά τους στην κυκλοφορία (163).

Η μελέτη της ανοσογήρανσης σε γηριατρικούς πληθυσμούς οδήγησε στον ορισμό του «**φαινότυπου ανοσολογικού κινδύνου**» (IRP – Immune Risk phenotype) (173). Ο φαινότυπος αυτός περιλαμβάνει βιο-παραμέτρους που σχετίζονται με ανεπαρκή ανοσοποιητική λειτουργία και αυξημένο κίνδυνο θνησιμότητας στους ηλικιωμένους. Ο χαρακτηρισμός του IRP έγινε με βάση τα αποτελέσματα δύο μεγάλων γηριατρικών προοπτικών μελετών στη Σουηδία, της “OCTO study” (174) και της “NONA study” (175). Τα χαρακτηριστικά του φαινότυπου ανοσολογικού κινδύνου περιλαμβάνουν: λόγο CD4+/CD8+ T-κυττάρων μικρότερο από ένα, χαμηλά επίπεδα B κυττάρων, αυξημένους τίτλους CD8+, CD28- και CD57+ T-κυττάρων, οροθετικότητα για τον μεγαλοκυτταροϊό, καθώς και μειωμένη πολλαπλασιαστική απόκριση των T-κυττάρων σε μιτογόνα (173).

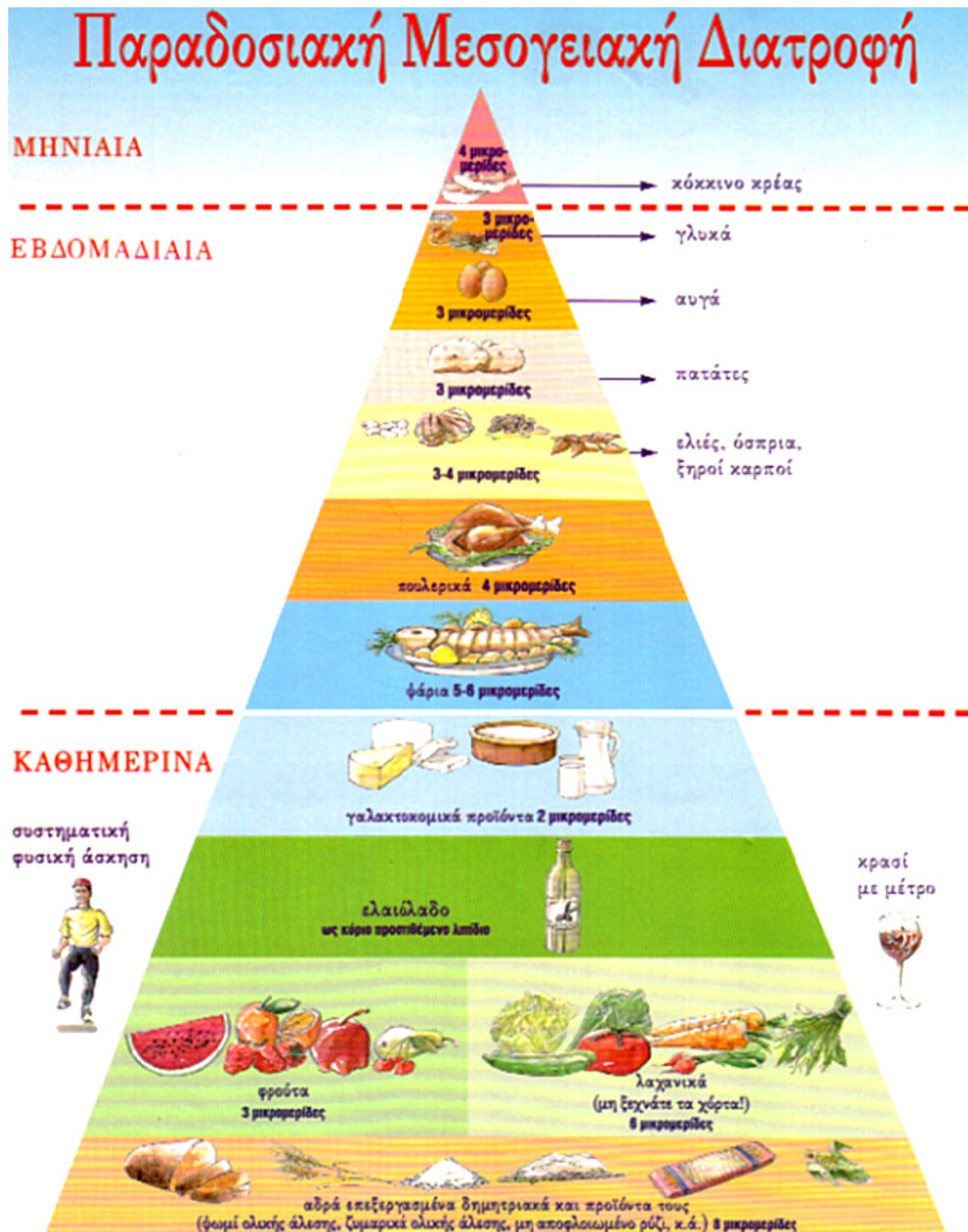
Η ανάλυση των ανοσολογικών αλλαγών κατά τη γήρανση και ο προσδιορισμός δεικτών χρόνιας φλεγμονής θα μπορούσαν να αποδειχθούν χρήσιμοι **προγνωστικοί δείκτες** νοσηρότητας και θνησιμότητας. Η αξιολόγηση των ηλικιωμένων με αυξημένο κίνδυνο θα επέτρεπε τη λήψη προληπτικών ή θεραπευτικών μέτρων για την εξασφάλιση υγιούς γήρανσης και επιβίωσης.

1.7 Η Μεσογειακή διατροφή στην τρίτη ηλικία

Η αύξηση της ηλικίας συνοδεύεται από μείωση στην αίσθηση της γεύσης και της οσμής, αλλά και σε εμφάνιση ξηροστομίας, που επηρεάζουν σημαντικά την όρεξη και ακολούθως τη διατροφική πρόσληψη των ηλικιωμένων (176). Κοινωνικοοικονομικοί λόγοι, όπως η έλλειψη επαρκούς μορφωτικού επιπέδου ή η οικονομική αδυναμία αγοράς ποιοτικών τροφών, επιδεινώνουν το πρόβλημα. Ο υποσιτισμός στους ηλικιωμένους μπορεί να είναι ενεργειακός ή να αφορά μεμονωμένα θρεπτικά συστατικά και συχνά επιβαρύνεται από τη μειωμένη εντερική απορρόφηση και τις αλλαγές στο μεταβολισμό βιταμινών και ιχνοστοιχείων που παρατηρούνται στην τρίτη ηλικία (177). Επιδημιολογικές μελέτες προτείνουν πως η διατροφή αποτελεί σημαντικό παράγοντα της κατάστασης υγείας και επιβίωσης στους ηλικιωμένους (176, 177).

Η Μεσογειακή διατροφή έχει καταξιωθεί ως το πιο υγιεινό διατροφικό μοντέλο κυρίως λόγω της συσχέτισής της με χαμηλά ποσοστά νοσηρότητας και θνησιμότητας. Η παραδοσιακή Μεσογειακή διατροφή χαρακτηρίζεται από υψηλή κατανάλωση φρούτων, λαχανικών, δημητριακών, πατάτας, πουλερικών, οσπρίων, ψαριών και γαλακτοκομικών προϊόντων, μικρή κατανάλωση κόκκινου κρέατος, μέτρια κατανάλωση αλκοόλ και χρήση ελαιολάδου ως κύρια πηγή λίπους. Συγκεκριμένα, η πυραμίδα της Μεσογειακής διατροφής περιλαμβάνει: καθημερινή κατανάλωση μη επεξεργασμένων δημητριακών (8 μερίδες), λαχανικών (6 μερίδες), φρούτων (3 μερίδες), ελαιολάδου και γαλακτοκομικών προϊόντων (2 μερίδες), εβδομαδιαία κατανάλωση ψαριού (5-6 μερίδες), πουλερικών (4 μερίδες), ελιών, οσπρίων και ξηρών καρπών (3 μερίδες), πατάτας, αυγού και γλυκών (3 μερίδες) και μηνιαία κατανάλωση κόκκινου κρέατος (4 μερίδες) (178). Η πυραμίδα της Μεσογειακής διατροφής παρουσιάζεται στην **Εικόνα 1.4**. Με βάση τα κύρια χαρακτηριστικά της Μεσογειακής διατροφής έχουν δημιουργηθεί αρκετοί διατροφικοί δείκτες για την εκτίμηση του βαθμού υιοθέτησής της (179). Πρόκειται για **διατροφικά σκορ** που συνοψίζουν την Μεσογειακή διατροφή από ένα σύνολο διατροφικών ομάδων ή θρεπτικών συστατικών ή και συνδυασμούς τους. Στη βιβλιογραφία αναφέρονται αρκετά σκορ της Μεσογειακής διατροφής που έχουν χρησιμοποιηθεί σε πληθυσμιακές μελέτες ανά τον κόσμο και διακρίνονται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες: α) σε εκείνα που βασίζονται στη θετική ή αρνητική βαθμολόγηση συστατικών (ομάδων τροφίμων ή/και θρεπτικών συστατικών) της Μεσογειακής διατροφής, β) σε εκείνα που προσθέτουν ή αφαιρούν

σταθμισμένα συστατικά της συγκεκριμένης διατροφής, και γ) σε εκείνα που βασίζονται σε λόγους ανάμεσα σε επιλεγμένα συστατικά της Μεσογειακής διατροφής (179).



Εικόνα 1.4. Η πυραμίδα της παραδοσιακής Μεσογειακής διατροφής.

Τα τελευταία χρόνια πληθαίνουν τα επιστημονικά δεδομένα για την **ωφέλιμη επίδραση της Μεσογειακής διατροφής** στην υγεία του ανθρώπου. Παράλληλα, αρκετές μελέτες επικεντρώνουν στο ρόλο της Μεσογειακής διατροφής στη γήρανση και στη μακροβιότητα. Συγκεκριμένα, η Μεσογειακή διατροφή φαίνεται να επιδρά ανασταλτικά, τόσο στους κύριους παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση των **καρδιαγγειακών νοσημάτων**, όσο και στη βαρύτητα των καρδιαγγειακών παθήσεων στους ηλικιωμένους. Αρκετές επιδημιολογικές (180-186) καθώς και παρεμβατικές μελέτες (187-190), έχουν συσχετίσει τη Μεσογειακή διατροφή με χαμηλά επίπεδα αρτηριακής πίεσης και **ολικής χοληστερόλης**, με χαμηλή συχνότητα εμφάνισης **διαβήτη**, με μειωμένη **φλεγμονή** και με βελτιωμένη πηκτική ικανότητα και **ενδοθηλιακή λειτουργία** σε γηριατρικούς πληθυσμούς, ακόμη και σε ηλικιωμένους ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη ή μεταβολικό σύνδρομο (191-193). Πρόσφατα, σε μια μελέτη ηλικιωμένων στην Κύπρο, βρέθηκε πως η μεγαλύτερου βαθμού υιοθέτηση της Μεσογειακής διατροφής συνδέεται με χαμηλότερα επίπεδα ολικής χοληστερόλης, ακόμη και σε ηλικιωμένους που λάμβαναν αντιλιπιδαιμική αγωγή με στατίνες (184). Παράλληλα, σε δύο ελληνικές επιδημιολογικές μελέτες, την “GREECS study” και την “CARDIO2000 study”, βρέθηκε μικρότερη βαρύτητα του οξέος στεφανιαίου συνδρόμου σε ηλικιωμένους (181) και μικρότερη πιθανότητα εμφάνισης οξέος στεφανιαίου συνδρόμου σε μεσήλικες, που ακολουθούσαν τη Μεσογειακή διατροφή (183). Τα ευρήματα αυτά φαίνεται πως επιβεβαιώνονται και από άλλες Ευρωπαϊκές μελέτες (194, 195). Επιπροσθέτως, τα αποτελέσματα της παρεμβατικής μελέτης “PREDIMED” σε ηλικιωμένους, έδειξαν σημαντική βελτίωση του λιπιδαιμικού προφίλ και μείωση των φλεγμονωδών παραγόντων, ύστερα από τρίμηνη υιοθέτηση της Μεσογειακής διατροφής (187, 196).

Η επίδραση της Μεσογειακής διατροφής έχει μελετηθεί επίσης και σε σχέση με την **παχυσαρκία** στους ηλικιωμένους. Στις μελέτες “EPIC” και “SUN” παρατηρήθηκε τάση για χαμηλότερα επίπεδα του δείκτη μάζα σώματος (Δ.Μ.Σ.) στους ηλικιωμένους που ήταν τυπικότεροι στη Μεσογειακή διατροφή, χωρίς ωστόσο στατιστική σημαντικότητα (197, 198). Σε μια έρευνα με ηλικιωμένους εθελοντές από τις μελέτες “Framingham” και “SENECA”, βρέθηκε αρνητική συσχέτιση της Μεσογειακής διατροφής με την περιφέρεια μέσης και τον Δ.Μ.Σ. (199). Στη μελέτη “MEDIS” καταγράφηκε επίσης μειωμένη πιθανότητα εμφάνισης παχυσαρκίας με τη μεγαλύτερου βαθμού υιοθέτηση της Μεσογειακής διατροφής σε ηλικιωμένους από Ελληνικά νησιά και την Κύπρο (200).

Το **μεταβολικό σύνδρομο** έχει επίσης ερευνηθεί σε σχέση με τη Μεσογειακή διατροφή, με αντικρουόμενα ωστόσο αποτελέσματα. Σε μια επιδημιολογική μελέτη στην Ισπανία (191), καθώς και σε μια μελέτη με δεδομένα από πέντε Μεσογειακές χώρες (201), δεν βρέθηκε συσχέτιση της Μεσογειακής διατροφής με χαμηλότερο επιπολασμό του μεταβολικού συνδρόμου. Αντίθετα, σε μια παρεμβατική μελέτη με μεσήλικες βρέθηκε μειωμένη συχνότητα εμφάνισης του μεταβολικού συνδρόμου, μειωμένα επίπεδα φλεγμονωδών παραγόντων και ινσουλινοαντίστασης, καθώς και βελτιωμένη ενδοθηλιακή λειτουργία, ύστερα από διαιτητική υιοθέτηση της Μεσογειακής διατροφής (202). Ωστόσο, αυτά τα αποτελέσματα δεν επιβεβαιώθηκαν σε μια αντίστοιχη παρεμβατική μελέτη ασθενών με στεφανιαία νόσο (203).

Ο ρόλος της Μεσογειακής διατροφής στις **νεοπλασίες** έχει μελετηθεί κυρίως σε σχέση με τον καρκίνο του μαστού και του γαστρεντερικού σωλήνα. Τα αποτελέσματα μιας μελέτης ασθενών-μαρτύρων στην Ιταλία έδειξαν χαμηλότερο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του πεπτικού συστήματος με αυξημένο σκορ της Μεσογειακής διατροφής (204). Παράλληλα, τα δεδομένα της προοπτικής μελέτης “Lyon Heart study” στον τέταρτο χρόνο επανεξέτασης, υποδηλώνουν προστατευτική επίδραση της Μεσογειακής διατροφής έναντι διαφόρων μορφών καρκίνου (205). Επιπροσθέτως, μια πρόσφατη μελέτη μετα-ανάλυσης σε δείγμα 1.574.299 εθελοντών, συσχέτισε την υιοθέτηση της Μεσογειακής διατροφής με μείωση κατά 6,0% της θνησιμότητας από καρκίνο (206).

Στην ίδια μελέτη μετα-ανάλυσης βρέθηκε επίσης μείωση της **συνολικής θνησιμότητας** κατά 9,0% με τον μεγαλύτερο βαθμό υιοθέτησης της Μεσογειακής διατροφής (206). Το εύρημα αυτό επιβεβαιώνεται και από άλλες μελέτες, τόσο σε Μεσογειακές χώρες (207-209), όσο και σε μη Μεσογειακές χώρες (210, 211). Συγκεκριμένα, σε αυτές τις μελέτες σχετίστηκε η αύξηση, κατά μία μονάδα, του σκορ της Μεσογειακής διατροφής με μείωση του ποσοστού συνολικής θνησιμότητας από 17,0% (208, 210) έως 31,0% (207). Παράλληλα, αύξηση του συγκεκριμένου διατροφικού σκορ κατά δύο μονάδες σχετίστηκε με μείωση της θνησιμότητας κατά 25,0% (209). Δεδομένα από τις Ευρωπαϊκές γηριατρικές μελέτες “SENECA” και “FINE” υποστηρίζουν επίσης τη συσχέτιση της Μεσογειακής διατροφής με χαμηλό κίνδυνο θνησιμότητας (89, 212). Αντίστοιχα αποτελέσματα προέκυψαν και από μελέτες σε ηλικιωμένους με ιστορικό εμφράγματος μυοκαρδίου (213, 214).

Στους ηλικιωμένους, η Μεσογειακή διατροφή φαίνεται πως έχει επίσης επίδραση στην **κατάθλιψη**, στη **νοητική κατάσταση** και στη **νόσο Alzheimer**. Συγκεκριμένα, η Μεσογειακή διατροφή έχει συσχετιστεί με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου Alzheimer και μειωμένη έκπτωση των γνωστικών λειτουργιών σε ηλικιωμένους (215, 216). Σε μια πρόσφατη μελέτη μετα-ανάλυσης εκτιμήθηκε μικρότερος κίνδυνος εμφάνισης της νόσου Alzheimer σε ποσοστό 13,0%, με την μεγαλύτερου βαθμού υιοθέτηση της Μεσογειακής διατροφής (206). Παράλληλα, τα αποτελέσματα από τον ένατο χρόνο επανεξέτασης στην Ιταλική γηριατρική μελέτη “Italian Longitudinal Study on Aging”, έδειξαν θετική επίδραση της Μεσογειακής διατροφής στη γνωστική λειτουργία (217). Αναφορικά με την κατάθλιψη, στην προοπτική μελέτη “SUN study” καταγράφηκε αντίστροφη συσχέτιση της πρόσληψης βιταμίνης B₁₂ και ω-3 λιπαρών οξέων με την κατάθλιψη στις γυναίκες και της πρόσληψης φυλικού οξέος με την κατάθλιψη στους άντρες (197). Παράλληλα, στη μελέτη “MEDIS” με δείγμα ηλικιωμένων από τα Ελληνικά νησιά και την Κύπρο, βρέθηκε σημαντική συσχέτιση της κατανάλωσης ψαριών με την απουσία συμπτωμάτων κατάθλιψης (218). Η επίδραση της Μεσογειακής διατροφής στη διανοητική υγεία φαίνεται να επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως η επαρκής πρόσληψη βιταμινών του συμπλέγματος B, φυλικού οξέος και ω-3 λιπαρών οξέων, θρεπτικά συστατικά που εμπλέκονται στη σύνθεση νευροδιαβιβαστών και φωσφολιπιδίων στο κεντρικό νευρικό σύστημα (219).

Τα αποτελέσματα της πλειοψηφίας των μελετών επιβεβαιώνουν την ευεργετική δράση της Μεσογειακής διατροφής στην τρίτη ηλικία. Ωστόσο, στις ίδιες μελέτες καταγράφεται μείωση στην υιοθέτηση της Μεσογειακής διατροφής, ακόμα και σε περιοχές της Μεσογείου (220).

1.8 Ο ρόλος του ψευδαργύρου στη γήρανση

Ο ψευδάργυρος (Zn) αποτελεί απαραίτητο μέταλλο για τον οργανισμό και περιέχεται στο ανθρώπινο σώμα σε ποσότητα 2-3 γραμμαρίων. Έχουν βρεθεί πάνω από 300 ένζυμα που περιέχουν ψευδάργυρο, ο οποίος είτε συμμετέχει άμεσα στην καταλυτική τους δράση ως συμπράγοντας, είτε συντελεί στη δομική τους σταθερότητα (221). Οι μεταγραφικοί παράγοντες αποτελούν επίσης μια ομάδα πρωτεϊνών που περιέχουν ψευδάργυρο, με τη μορφή «δάχτυλων ψευδαργύρου» (zinc fingers) και παρόμοιων δομικών μορίων. Εκτιμάται πως το **10%** του συνολικού ανθρώπινου **γονιδιώματος** κωδικοποιεί πρωτεΐνες που συνδέονται με τον **ψευδάργυρο** (222). Η εκτεταμένη **ανεπάρκεια ψευδαργύρου** χαρακτηρίζεται από καθυστερημένη ανάπτυξη, δερματικές πληγές, μειωμένη επούλωση πληγών, υπογοναδισμό, αναιμία, διάρροια, ανορεξία, διανοητική καθυστέρηση, εξασθενημένη λειτουργία της όρασης και του ανοσοποιητικού συστήματος (223, 224).

Τα δεδομένα σχετικά με την **διατροφική πρόσληψη και βιοδιαθεσιμότητα** του ψευδαργύρου σε γηριατρικούς πληθυσμούς είναι περιορισμένα. Στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, τα αποτελέσματα της μελέτης “CFSII” (1994-1996) παρουσιάζουν επαρκή διαιτητική πρόσληψη ψευδαργύρου σε ηλικιωμένους και των δύο φύλων (225). Αντίθετα, στην έρευνα “NHANES III” καταγράφεται ανεπαρκής πρόσληψη ψευδαργύρου σε ποσοστό 35-45% του ηλικιωμένου πληθυσμού (226). Στην Ευρώπη, οι ερευνητές της μελέτης “ZENITH”, κατέγραψαν ανεπαρκή πρόσληψη ψευδαργύρου σε ποσοστό <5% των ηλικιωμένων, σε περιορισμένο όμως μέγεθος δείγματος (227). Σε παρεμβατικές μελέτες χορήγησης συμπληρώματος ψευδαργύρου σε ηλικιωμένους, βρέθηκαν αισιόδοξα αποτελέσματα ως προς την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος και τη μείωση του ρυθμού εμφάνισης λοιμώξεων (228, 229).

Διαιτητικές πηγές, απορρόφηση και μεταβολισμός του ψευδαργύρου

Ο ψευδάργυρος βρίσκεται σχεδόν σε όλα τα τρόφιμα, ωστόσο οι **κύριες διατροφικές πηγές** του περιλαμβάνουν τα στρείδια, το κόκκινο κρέας, τα πουλερικά, τα ψάρια, τα θαλασσινά, τα φασόλια, τα φιστίκια, τα ολικής άλεσης δημητριακά και τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Στον **Πίνακα 1.1** απεικονίζονται οι κυριότερες διαιτητικές πηγές ψευδαργύρου. Η συνιστώμενη διαιτητική πρόσληψη του μικροθρεπτικού

συστατικού είναι **8 mg για τις ενήλικες γυναίκες και 11 mg για τους ενήλικους άντρες**, ενώ οι συστάσεις διαφοροποιούνται για την βρεφική και παιδική ηλικία, την εγκυμοσύνη και το θηλασμό, όπως φαίνεται στον **Πίνακα 1.2** (230).

Πίνακας 1.1. Οι κυριότερες διαιτητικές πηγές Zn (πηγή: USDA Nutrient Database for Standard Reference, Release 11).

Τρόφιμο (90 γρ., μαγειρεμένο, άπαχο)		Zn (mg)	Τρόφιμο	Zn (mg)	
Βοδινό	Στήθος βραστό	8,9	Γαλακτοκομικά	Γιαούρτι, χαμηλών λιπαρών, 250 γρ.	2,2
	Σπάλα ψητή	7,4		Γάλα, χαμηλών λιπαρών, 250 ml	1,0
	Κιλότο ψημένο	6,0		Τυρί τσένταρ, 30 γρ.	0,9
	Φιλέτο ψητό	5,5		Τυρί κρέμα, 125 γρ.	0,4
	Άνω κιλότο, ψητό	4,7	Σιτηρά	Ρυζάλευρο, 1 φλιτζάνι	3,0
	Κόντρα φιλέτο ψητό	4,4		Σιτάρευλο, 1 φλιτζάνι	1,0
Χοιρινό	Ωμοπλάτη ψητή	3,6		Αλεύρι βρώμης, 0,5 φλιτζάνι	0,6
	Χοιρομέρι, 5% λίπος	2,4		Κρέμα σιταριού, 1 φλιτζάνι	0,2
	Φιλέτο ψητό	2,2		Νιφάδες καλαμποκιού, 1 φλιτζάνι	0,2
	Μπριζόλα ψητή	2,0		Δημητριακά	Σκούρο ρύζι, βρασμένο, 0,5 φλιτζάνι
Αρνί	Μπούτι ψητό	4,3	Ολικής άλεσης ψωμί, 1 φέτα (30 γρ.)		0,5
	Φιλέτο ψητό	3,5	Λευκό ρύζι, βρασμένο, 0,5 φλιτζάνι		0,4
Μοσχάρι	Φιλέτο ψητό	4,0			Άσπρο ψωμί, 1 φέτα (30 γρ.)
	Κοτολέτα τηγανητή	2,4		Φρούτα	Μπανάνα, 1 μέτρια
Κοτόπουλο	Συκώτι βραστό	3,7	Βερίκοκα, αποξηραμένα, 7 μισά		0,2
	Σκούρο κρέας ψητό	2,4	Δαμάσκηνα, αποξηραμένα, 3 μέτρια		0,1
	Λευκό κρέας ψητό	1,0	Πορτοκάλι, 1 μέτριο		0,1
Γαλοπούλα	Σκούρο κρέας ψητό	3,8		Μήλο, 1 μέτριο	0,1
	Λευκό κρέας ψητό	1,7		Σταφίδες, 2 κουταλιές της σούπας	0,1
Ψάρι	Τόνος, κονσέρβα	0,7	Λαχανικά	Αρακάς, μαγειρεμένος, 0,5 φλιτζάνι	0,9
	Πέρκα στον ατμό	0,5		Πατάτα, ψητή, χωρίς δέρμα, 1 μέτρια	0,6
	Σολομός στον ατμό	0,4		Καλαμπόκι, βραστό, 0,5 φλιτζάνι	0,4
Οστρακοειδή	Στρείδια, 6 μέτρια, ωμά	49,8			Μπρόκολο, ωμό, 0,5 φλιτζάνι
	Καβούρι βραστό	6,5	Σπανάκι, ωμό, 1 φλιτζάνι		0,2
	Γαρίδα βραστή	1,3	Μαρούλι, 1 φλιτζάνι		0,2
			Καρότο, ωμό, 1 μέτριο		0,1
			Όσπρια	Φασόλια, βραστά, 0,5 φλιτζάνι	1,8
				Φάβα, μαγειρεμένη, 0,5 φλιτζάνι	1,3

Πίνακας 1.2. Συνιστώμενη διαιτητική πρόσληψη Zn (230).

Ηλικία	Άρρενες	Θήλυ	Εγκυμοσύνη	Θηλασμός
Γέννηση – 6 μηνών	2 mg	2 mg		
7 μηνών – 3 χρονών	3 mg	3 mg		
4 – 8 ετών	5 mg	5 mg		
9 – 13 ετών	8 mg	8 mg		
14 – 18 ετών	11 mg	9 mg	13 mg	14 mg
19+ ετών	11 mg	8 mg	11 mg	12 mg

Η **απορρόφηση** του ψευδαργύρου πραγματοποιείται από το λεπτό έντερο, κυρίως στη νήστιδα, 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 (231, 232). Η ρύθμιση της **ομοιόστασης** του ψευδαργύρου από το γαστρεντερικό σωλήνα περιλαμβάνει την παράλληλη λειτουργία πολλών μεταφορέων. Όλοι οι μεταφορείς ψευδαργύρου έχουν διαμεμβρανικές περιοχές και κωδικοποιούνται από δύο οικογένειες γονιδίων: ZnT (SLC30) και Zip (SLC39) (233). Στον άνθρωπο υπάρχουν 9 ZnT και 15 Zip μεταφορείς, με αντίθετους ρόλους (234). Συγκεκριμένα, οι ZnT μεταφορείς μειώνουν την ενδοκυτταρική συγκέντρωση ψευδαργύρου επάγοντας, είτε την εκροή ψευδαργύρου από τα κύτταρα, είτε την μετακίνησή του σε ενδοκυτταρικά σωματίδια. Αντίθετα, οι μεταφορείς Zip αυξάνουν την ενδοκυτταρική συγκέντρωση ψευδαργύρου ασκώντας την αντίθετη δράση. Ο ZnT1 είναι ο πρώτος μεταφορέας ψευδαργύρου που προσδιορίστηκε στο λεπτό έντερο, στο επιθήλιο των νεφρικών σωληναρίων και στον πλακούντα, με κύρια δράση τη μεταφορά ψευδαργύρου από τα εντεροκύτταρα στην κυκλοφορία (235). Η έκφρασή του ρυθμίζεται από το διαιτητικό ψευδάργυρο, καθώς αυξημένη πρόσληψη του ιχνοστοιχείου οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα mRNA του ZnT1. Ο υποδοχέας ZnT4 εκφράζεται κυρίως στους μαστικούς αδένες, ο Zip4 στο λεπτό έντερο και το ήπαρ, ενώ η έκφρασή του αυξάνεται σε συνθήκες έλλειψης ψευδαργύρου (236, 237).

Το μεγαλύτερο ποσοστό του ψευδαργύρου στον οργανισμό βρίσκεται αποθηκευμένο στους σκελετικούς μύες και τα οστά, το 11,0% βρίσκεται στο ήπαρ και στο δέρμα, ενώ η συγκέντρωσή του στο πλάσμα αντιστοιχεί μόνο στο 0,1% της συνολικής ποσότητας του μετάλλου στον οργανισμό (234, 238). Τα επίπεδα ψευδαργύρου στο

πλάσμα κυμαίνονται από 10-15 $\mu\text{mol/L}$ και διατηρούνται σταθερά ακόμα και με διακυμάνσεις στη διαιτητική πρόσληψη ψευδαργύρου, εκτός και αν οι διακυμάνσεις αυτές είναι μακροχρόνιες ή/και ακραίες (239). Ο ψευδάργυρος συνδέεται ισχυρά με πρωτεΐνες σε ουδέτερο pH, ενώ το 80,0% του ψευδαργύρου στο πλάσμα είναι συνδεδεμένο με αλβουμίνη (234). Η απώλεια του ψευδαργύρου γίνεται κυρίως μέσω του γαστρεντερικού σωλήνα από τις παγκρεατικές εκκρίσεις και κυμαίνεται από 27-90 $\mu\text{mol/ημέρα}$. Η απέκκριση ψευδαργύρου με τα ούρα είναι σχετικά μικρότερη, καθώς τα νεφρά επαναρροφούν τον ψευδάργυρο, με εκτιμώμενες απώλειες 8-11 $\mu\text{mol/ημέρα}$. Ωστόσο, η χρήση θειαζιδικών διουρητικών αυξάνει ως και 60,0% την νεφρική απέκκριση του ιχνοστοιχείου (234, 238).

Η εντερική απορρόφηση του ψευδαργύρου επηρεάζεται από αρκετούς **διατροφικούς παράγοντες** (231). Η συνολική ποσότητα της **πρωτεΐνης** ενός γεύματος φαίνεται να ευνοεί την απορρόφηση του ψευδαργύρου. Άλλωστε, τα τρόφιμα που είναι πλούσια σε πρωτεΐνη αποτελούν και καλές πηγές ψευδαργύρου, οπότε η αυξημένη διαιτητική πρόσληψη πρωτεΐνης οδηγεί και σε αυξημένη πρόσληψη και υψηλή βιοδιαθεσιμότητα του ψευδαργύρου (240). Ο τύπος της πρωτεΐνης επηρεάζει επίσης την βιοδιαθεσιμότητα του ιχνοστοιχείου, με τις περισσότερες ζωικές πρωτεΐνες να προάγουν την απορρόφηση, πιθανά λόγω απελευθέρωσης αμινοξέων που διατηρούν τον ψευδάργυρο σε διαλυτή μορφή (231, 240). Αντίθετα, η καζεΐνη του γάλακτος φαίνεται πως ασκεί αρνητική επίδραση στην απορρόφηση του ιχνοστοιχείου., πιθανά λόγω δέσμευσής του στα φωσφορυλιωμένα υπολείμματα σερίνης και θρεονίνης των άπεπτων τμημάτων της καζεΐνης (231). Οι φυτικές ίνες και κυρίως το **φυτικό οξύ**, ασκούν αρνητική επίδραση στην απορρόφηση του ψευδαργύρου, λόγω των συμπλόκων που δημιουργούν οι φωσφορικές ομάδες της εξαφωσφορικής ινοσιτόλης με τον ψευδάργυρο (231). Ο σίδηρος δεν φαίνεται να επηρεάζει την απορρόφηση ψευδαργύρου, ενώ η χορήγηση συμπληρώματος σιδήρου και ψευδαργύρου δεν εμφανίζει ανασταλτική δράση στην απορρόφηση και των δύο μετάλλων, παρά μόνο όταν ο λόγος σιδήρου/ψευδαργύρου είναι πολύ υψηλός. Οι χηλικοί υποκαταστάτες (όπως το EDTA), καθώς και ορισμένα αμινοξέα (όπως η ιστιδίνη και η μεθειονίνη) και οργανικά οξέα (όπως το κιτρικό) φαίνεται να αυξάνουν την απορρόφηση και βιοδιαθεσιμότητα του ψευδαργύρου (231).

Ο βιολογικός ρόλος του ψευδαργύρου

Τα βασικά χαρακτηριστικά του ψευδαργύρου περιλαμβάνουν το υψηλά συγκεντρωμένο φορτίο του, την μικρή ακτίνα του (0,65 Å), την έλλειψη σθένους (χαμηλός κίνδυνος παραγωγής ελευθέρων ριζών), την εύκολη μετάβαση από τη μια συμμετρία στην άλλη, τη γρήγορη ανταλλαγή υποκαταστατών και τη σύνδεση κυρίως με S- και N-δότες στα βιολογικά συστήματα (241). Αυτές οι ιδιότητες προσδίδουν στον ψευδάργυρο σημαντικό βιολογικό ρόλο ως **καταλύτη**. Ο ψευδάργυρος απαιτείται για τη βιολογική δράση τουλάχιστον 300 ενζύμων, ενώ παράλληλα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη δομή, λειτουργία, σταθερότητα και ρευστότητα των βιομεμβρανών, λόγω της σύνδεσής του στις σουλφυδρικές ομάδες με το σχηματισμό μερκαπτιδίων (221).

Ο ψευδάργυρος ρυθμίζει επίσης την ισορροπία ανάμεσα στην **γονιδιακή έκφραση** των μεταλλοπρωτεασών και των ιστικών αναστολέων του πλέγματος των μεταλλοπρωτεασών, η οποία είναι απαραίτητη για τη βέλτιστη λειτουργία αρκετών βιολογικών συστημάτων (221, 241). Ο ψευδάργυρος είναι παρόν στους «**δάκτυλους ψευδαργύρου**» αρκετών πρωτεϊνών, πεπτιδίων, ενζύμων, ορμονών, μεταγραφικών παραγόντων και κυτταροκινών, που εμπλέκονται στη διατήρηση της ομοιόστασης και άμυνας του οργανισμού. Στις λειτουργίες του ψευδαργύρου, περιλαμβάνεται επίσης η ρύθμιση της σταθερότητας του mRNA και του εξωκυτταρικού πλέγματος (221, 241, 242).

Συγκεκριμένα, ο ψευδάργυρος απαιτείται για τη διατήρηση της ενζυμικής δραστηριότητας της **συνθετάσης του νιτρικού οξέος (iNOS)**, μέσω σύνδεσης με δύο ομάδες κυστεΐνης στο αιμικό τμήμα του ενζύμου. Καθώς το νιτρικό οξύ (NO) εμπλέκεται στην έκφραση του mRNA των μεταλλοθειονινών και στην αναστολή του ενζύμου PARP (Poly ADP-Ribose Polymerase – Πολυμεράση πολύ-ADP-ριβόζης), ο δομικός ρόλος του ψευδαργύρου στην παραγωγή του NO είναι μεγάλης σημασίας. Παράλληλα, το NO εμπλέκεται και στην απελευθέρωση ψευδαργύρου από τις μεταλλοθειονίνες προς τα αντιοξειδωτικά ένζυμα (229, 243-246).

Οι **μεταλλοθειονίνες (MT)** είναι μια ομάδα πρωτεϊνών χαμηλού μοριακού βάρους που συνδέονται με μέταλλα, εμφανίζοντας υψηλή συγγένεια σύνδεσης με τον ψευδάργυρο και το χαλκό (247). Κάθε μόριο μεταλλοθειονίνης περιέχει 20 κυστεΐνες και έχει τη δυνατότητα δέσμευσης 7 ατόμων ψευδαργύρου, μέσω μερκαπτιδικών δεσμών (248). Στον

άνθρωπο, έχουν εντοπιστεί τουλάχιστον δέκα γονίδια (στο χρωμόσωμα 16), που κωδικοποιούν τέσσερεις υπο-οικογένειες μεταλλοθειονινών, την MT1 και MT2 που βρίσκονται σχεδόν σε όλους τους ιστούς, την MT3 που εντοπίζεται στον εγκέφαλο και την MT4 που βρίσκεται στο πλακώδες επιθήλιο (249). Μια από τις κυριότερες λειτουργίες των MT1 και MT2 είναι η ρύθμιση της ομοιόστασης του ψευδαργύρου και ο ενδοκυτταρικός περιορισμός του οξειδωτικού στρες.

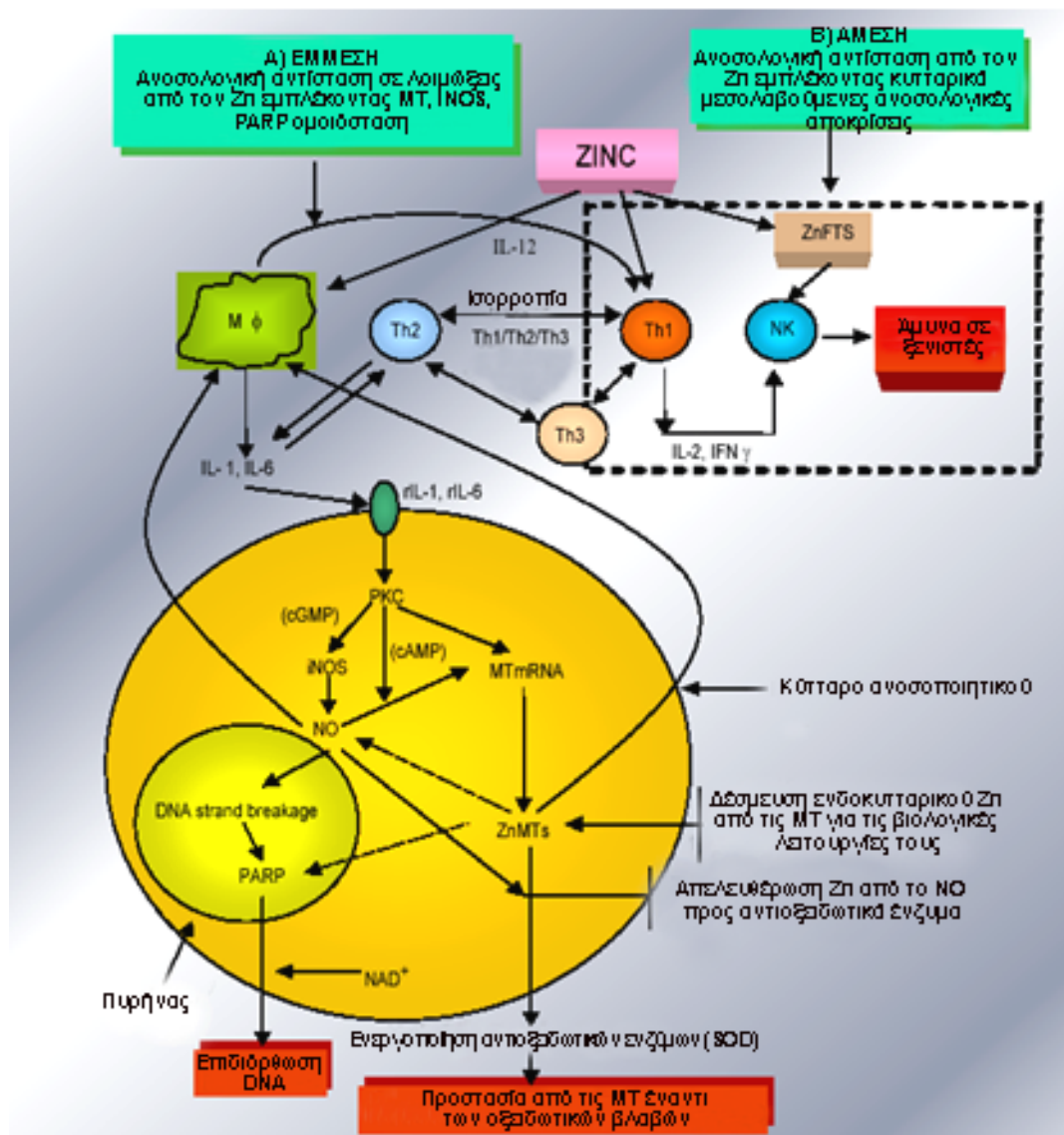
Οι **αντιοξειδωτικές** ιδιότητες των μεταλλοθειονινών, μέσω της ρύθμισης της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης ψευδαργύρου, προσδιορίζουν τον προστατευτικό τους ρόλο σε συνθήκες στρες, κατά τη νεαρή και ενήλικη ζωή. Ωστόσο, η φυσιολογική λειτουργία των μεταλλοθειονινών φαίνεται να μεταβάλλεται με την πάροδο της ηλικίας, επηρεάζοντας την ομοιόσταση και βιοδιαθεσιμότητα του ψευδαργύρου στο ανοσοποιητικό σύστημα. Συγκεκριμένα, **σε νεαρές ηλικίες** η παρουσία οξειδωτικού στρες ή φλεγμονής οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή μεταλλοθειονινών, με επακόλουθη αυξημένη απελευθέρωση ψευδαργύρου και αποτέλεσμα την άρτια λειτουργία του ανοσολογικού συστήματος. Η απελευθέρωση ψευδαργύρου από τις MT διασφαλίζει την επαρκή παραγωγή NO από την iNOS συνθετάση και την ενεργοποίηση του PARP προς την κατεύθυνση επιδιόρθωσης του DNA. Αντίθετα, **σε μεγαλύτερες ηλικίες** η έλλειψη ψευδαργύρου, λόγω της μειωμένης διαιτητικής πρόσληψης και εντερικής απορρόφησης, σε συνδυασμό με την αυξημένη παραγωγή MT, ως αποτέλεσμα της χρόνιας έκθεσης σε οξειδωτικό στρες, οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή μεταλλοθειονινών με περιορισμένη ικανότητα απελευθέρωσης ψευδαργύρου. Στους ηλικιωμένους, η παρουσία οξειδωτικού στρες ή φλεγμονής οδηγεί στην **υπέρμετρη παραγωγή μεταλλοθειονινών**, οι οποίες ουσιαστικά εγκλωβίζουν τον ψευδάργυρο. Η μειωμένη απελευθέρωση ψευδαργύρου οδηγεί στην εκτροπή της φυσιολογικής λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος και στην ενεργοποίηση του PARP προς την **κυτταρική απόπτωση** (241, 250).

Ο ρόλος του ψευδαργύρου στο **ανοσοποιητικό σύστημα** είναι πολύ σημαντικός, καθώς αποτελεί απαραίτητο μέταλλο για την άρτια οργάνωση και λειτουργία των ανοσολογικών αντιδράσεων, όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 1.3** (244). Η παραγωγή, ωρίμανση και ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων εξαρτάται από την επάρκεια ψευδαργύρου, καθώς συνδέεται στα ένζυμα της αντιγραφής και μεταγραφής του DNA στον κυτταρικό κύκλο των λεμφοκυττάρων, συμμετέχει σε δομικές πρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης των λεμφοκυττάρων και ενεργοποιεί τη θυμουλίνη. Πρόκειται για

μια 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 T-κυττάρων, την παραγωγή κυτταροκινών και τη δράση των κυττάρων φυσικών φονέων (Natural Killer cells – NK cells). Η **έλλειψη ψευδαργύρου** συνοδεύεται από ατροφία του θύμου αδένος, λεμφοπενία, ελαττωμένη κυτταροτοξική ικανότητα του ανοσοποιητικού συστήματος και μειωμένη δραστηριότητα της θυμουλίνης (229, 251).

Τα T-λεμφοκύτταρα είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στην επαρκή παρουσία ψευδαργύρου. Έλλειψή του, συνοδεύεται από μειωμένο αριθμό περιφερικών T-λεμφοκυττάρων, μειωμένη δράση T-βοηθητικών λεμφοκυττάρων και μειωμένη κυτταροτοξικότητα. Ο ψευδάργυρος είναι επίσης απαραίτητος για το μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (MHC I & II – Major Histocompatibility Class) και η έλλειψή του συνοδεύεται από ελαττωμένη ικανότητα παραγωγής αντισωμάτων (243, 251). Η ανεπάρκεια ψευδαργύρου διαταράσσει επίσης και τη φυσιολογική παραγωγή κυτταροκινών από τα T-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 (229, 249, 252). Η διαταραχή στην ισορροπία παραγωγής κυτταροκινών λόγω έλλειψης ψευδαργύρου, προκαλεί μειωμένη ενεργοποίηση και δράση των κυττάρων φυσικών φονέων (244, 251). Ο ψευδάργυρος είναι επίσης απαραίτητος για την ωρίμανση των B-λεμφοκυττάρων και η έλλειψή του προκαλεί μείωση του αριθμού των ανώριμων B-λεμφοκυττάρων (244, 251). Επιπροσθέτως, η έλλειψη ψευδαργύρου προκαλεί μειωμένη ικανότητα χημειοταξίας και φαγοκυττάρωσης στα ουδετερόφιλα, στα μονοκύτταρα και στα ιστικά μακροφάγα.

Στον άνθρωπο, το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα της επίδρασης της **ανεπάρκειας ψευδαργύρου** είναι η **εντεροπαθητική ακροδερματίτιδα** (acrodermatitis enteropathica). Πρόκειται για μια σπάνια αυτοσωμική υπολειπόμενη κληρονομική πάθηση που προκαλεί θυμική ατροφία και αυξημένη ευπάθεια σε βακτηριακές, μυκητιασικές και ιικές λοιμώξεις. Η παθολογία της νόσου περιλαμβάνει τη δυσανοχή του ψευδαργύρου, λόγω μεταλλάξεων στο γονίδιο που κωδικοποιεί την εντερική πρωτεΐνη μεταφοράς ψευδαργύρου hZip4 (251).



Εικόνα 1.3. Επισκόπηση του ρόλου του ψευδαργύρου στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος (244).

2. Μεθοδολογία

2.1 Σκοπός και σχεδιασμός της μελέτης

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας γηριατρικής μελέτης (GHRAS Study – Greek Health Randomized Ageing Study) είναι η αξιολόγηση βιοχημικών (λιπιδίων, γλυκόζης, ινσουλίνης, φλεγμονωδών δεικτών και ψευδαργύρου), γενετικών, ανθρωπομετρικών και κλινικών παραμέτρων, ιατρικού ιστορικού, διατροφικών συνηθειών και άλλων στοιχείων του τρόπου ζωής (δημογραφικά στοιχεία, φυσική δραστηριότητα, κάπνισμα, παρουσία κατάθλιψης και έκπτωση γνωστικών λειτουργιών) σε δείγμα ηλικιωμένων Ελλήνων. Η παρούσα μελέτη στοχεύει στην ολιστική αποτίμηση της κατάστασης υγείας των ηλικιωμένων και στην αξιολόγηση της συνδυασμένης επίδρασης των γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων στην υγιή γήρανση. (253)

Δείγμα

Το δείγμα αποτελούν 843 ηλικιωμένοι (≥ 60 ετών) από τους δήμους της Καλλιθέας, Νέας Σμύρνης και του Μοσχάτου. Η συμμετοχή των ηλικιωμένων στην μελέτη ήταν εθελοντική, έπειτα από ενυπόγραφη συναίνεσή τους. Η συλλογή του δείγματος πραγματοποιήθηκε στα Κέντρα Ανοιχτής Προστασίας Ηλικιωμένων (Κ.Α.Π.Η.) των παραπάνω δήμων, έπειτα από έγγραφη έγκριση των αντίστοιχων Δημοτικών Συμβουλίων. Ο σχεδιασμός της μελέτης είχε την έγκριση της Επιτροπής Βιοηθικής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου. Τμήμα της παρούσας μελέτης περιλαμβάνεται στα πλαίσια του Ευρωπαϊκού ερευνητικού προγράμματος: “Nutritional zinc, oxidative stress and immunosenescence: biochemical, genetic and lifestyle implications for healthy ageing – ZINCAGE”.

Μελέτη Zincage

Η μελέτη “Zincage” αποτελεί ένα Ευρωπαϊκό ερευνητικό πρόγραμμα, χρηματοδοτούμενο από το 6^ο Ευρωπαϊκό Πρόγραμμα – Πλαίσιο (FOOD-CT-2004-506850). Στην έρευνα συμμετείχαν 17 Ευρωπαϊκές ερευνητικές ομάδες από 8 χώρες (Γαλλία, Γερμανία, Ελλάδα, Ηνωμένο Βασίλειο, Ισπανία, Ιταλία, Ουγγαρία και Πολωνία), με αντικείμενο τη μελέτη βιοχημικών και γενετικών παραμέτρων και παραγόντων του τρόπου ζωής στην υγιή γήρανση, με ιδιαίτερο επίκεντρο τον διατροφικό ψευδάργυρο, το

οξειδωτικό στρες και την ανοσογήρανση (254). Το ερευνητικό πρόγραμμα “Zincage” περιελάμβανε την συλλογή περίπου 800 υγιών ηλικιωμένων (60-85 ετών), 120 υγιών ενενηντάχρονων (≥ 85 ετών) και 120 ασθενών ηλικιωμένων (λοιμώξεις, καρκίνος ή αθηροσκλήρυνση) από πέντε ευρωπαϊκές γεωγραφικές περιοχές (Γερμανία, Γαλλία, Ελλάδα, Ιταλία και Πολωνία). Στα πλαίσια της μελέτης “Zincage” στρατολογήθηκαν 250 Έλληνες ηλικιωμένοι.

Ο κύριος στόχος της έρευνας “Zincage” ήταν 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 προτεινόμενοι 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” εστίασε κυρίως στη διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μεταλλοθειονινών, 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 μακροβιότητας.

Πλήρης περιγραφή του ερευνητικού προγράμματος “Zincage” παρουσιάζεται στην ιστοσελίδα <http://www.zincage.org>.

Κριτήρια στρατολόγησης εθελοντών

Οι εθελοντές ήταν άνω των 60 ετών, μη τρόφιμοι ιδρύματος και δίχως την αναγκαιότητα καθημερινής νοσοκομειακής φροντίδας. Παράλληλα, δεν λάμβαναν στεροειδή, αντικαταθλιπτικά, αντιβίωση, αντιμεταβολίτες και συμπληρώματα διατροφής. Από την έρευνα εξαιρέθηκαν οι ηλικιωμένοι που έπασχαν από: ινσουλινοεξαρτώμενο σακχαρώδη διαβήτη, αυτοάνοσα νοσήματα, νευρογενή νοσήματα, λοιμώξεις, νόσο Crohn, εντεροπαθητική ακροδερματίτιδα, νεφροπάθεια, ηπατοπάθεια, δρεπανοκυτταρική αναιμία, χρόνιες δερματικές παθήσεις και καρκίνο.

Όσοι εθελοντές πληρούσαν τα παραπάνω κριτήρια χαρακτηρίστηκαν ως υγιείς, ενώ ως καρδιοπαθείς χαρακτηρίστηκαν οι εθελοντές που πληρούσαν τα παραπάνω

κριτήρια και το ιατρικό ιστορικό τους περιελάμβανε κάποιες από τις ακόλουθες παθήσεις: στεφανιαία νόσο, καρδιακή ανεπάρκεια, καρωτιδική στένωση, στηθάγχη, καρδιακή αρρυθμία, έμφραγμα μυοκαρδίου, εγκεφαλικό, αθηροσκλήρυνση.

2.2 Αιμοληψία και απομόνωση βιολογικών υλικών

Η αιμοληψία πραγματοποιήθηκε ύστερα από 12ωρη νηστεία. Στα δείγματα αίματος πραγματοποιήθηκε απομόνωση ορού και πλάσματος, έπειτα από φυγοκέντρηση (3000 rpm, 10 λεπτά, 4°C). Τα δείγματα ορού και πλάσματος αποθηκεύτηκαν στους -80°C.

Ποσότητα 5ml αίματος από κάθε εθελοντή χρησιμοποιήθηκε για απομόνωση DNA, με τη μέθοδο του χλωριούχου νατρίου (NaCl) (255). Συνοπτικά, η μέθοδος περιελάμβανε τη συλλογή της στοιβάδας λευκών κυττάρων ύστερα από φυγοκέντρηση (3000 rpm, 10 λεπτά, 4°C) του δείγματος αίματος και ανάμειξή της με 50ml διαλύματος Λύσης I με αραιώση 1x (διάλυμα Λύσης I 20x: 82,9g NH₄CL, 10,01g KHCO₃, 20ml EDTA 0,5M, απεσταγμένο νερό ως τα 500ml, pH=7,4). Ακολούθησε επώαση σε πάγο (20 λεπτά) και φυγοκέντρηση (2000 rpm, 10 λεπτά, 4°C). Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο, προστέθηκαν 25ml διαλύματος Λύσης I (αραιώση 1x) και ακολούθησε φυγοκέντρηση (2500 rpm, 10 λεπτά, 4°C). Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκαν 3 ml διαλύματος Λύσης II (0,61g TrisHCL, 11,69g NaCL, 2ml EDTA 0,5M, απεσταγμένο νερό ως τα 500ml, pH=8,4). Ύστερα από ανακίνηση, προστέθηκαν 50μl πρωτεΐνάσης K (20 mg/ml) και 150μl SDS 20% (Sodium Dodecyl Sulfate). Ακολούθησε ήπια ανάδευση και επώαση στους 56°C για 8-12 ώρες. Στη συνέχεια, προστέθηκε 1ml NaCl (6M), ακολούθησε ισχυρή ανακίνηση και φυγοκέντρηση (3000 rpm, 10 λεπτά, 4°C). Αν το υπερκείμενο δεν ήταν αρκετά διαυγές, επαναλήφθηκε η ανακίνηση και η φυγοκέντρηση. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε 10ml αιθανόλης (96%), όπου με ήπια κυκλική ανακίνηση έγινε ορατό το DNA. Το DNA απομακρύνθηκε με σιφόνιο Pasteur και ξεπλύθηκε σε διάλυμα αιθανόλης 70%. Μετά την εξάτμιση της αιθανόλης, το DNA διαλυτοποιήθηκε σε 0,5ml διαλύματος TE (0,61g Tris Base, 1ml EDTA 0,5M, απεσταγμένο νερό ως τα 500ml, pH=7,4) και αποθηκεύτηκε στους -20°C.

2.3 Αιματολογικές και βιοχημικές αναλύσεις

Οι αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν είναι οι ακόλουθες: γενική εξέταση αίματος, μέτρηση επιπέδων λιπιδίων, γλυκόζης, ινσουλίνης, φλεγμονωδών δεικτών και ψευδαργύρου.

Γενική εξέταση αίματος πραγματοποιήθηκε σε δείγματα ολικού αίματος από 250 εθελοντές. Η μέτρηση των επιπέδων λιπιδίων στο σύνολο των εθελοντών, έγινε σε δείγματα ορού με ενζυματική χρωματομετρική μέθοδο σε αυτόματο βιοχημικό αναλυτή και περιελάμβανε: ολική χοληστερόλη, HDL-C και τριγλυκερίδια. Τα επίπεδα LDL-C υπολογίστηκαν με βάση την εξίσωση Friedewald (256). Η υπερχοληστερολαιμία και η δυσλιπιδαιμία ορίστηκαν με βάση τις τιμές αναφοράς του NCEP (ολική χοληστερόλη >200 mg/dl, ή/και LDL-C >130 mg/dl, ή/και HDL-C <40 mg/dl, ή/και τριγλυκερίδια >150 mg/dl, ή/και λήψη αντιλιπιδαιμικής θεραπείας) (52).

Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε μέτρηση οξειδωμένης LDL-C (ox.LDL-C) σε δείγματα πλάσματος από 175 εθελοντές. Τα κριτήρια επιλογής των 175 εθελοντών περιελάμβαναν: ηλικία ≥ 75 έτη, απουσία σοβαρού καρδιαγγειακού ή φλεγμονώδους νοσήματος και μη λήψη αντιβίωσης, διουρητικών, αντιλιπιδαιμικών, αντιπηκτικών, στεροειδών και μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων. Η μέτρηση της ox.LDL-C πραγματοποιήθηκε με τη χρήση εμπορικού ELISA kit (Mercodia AB, Uppsala, Sweden), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η αρχή της συγκεκριμένης ανοσοενζυματικής μεθόδου ELISA, στηρίζεται στο μονοκλωνικό αντίσωμα 4E6 για έναν επίτοπο της οξειδωμένης ApoB-100 και στην ανταγωνιστική σύνδεση της ox.LDL-C με αντισώματα σημασμένα με βιοτίνη. Η σύνδεση της ox.LDL-C με τα αντισώματα ανιχνεύτηκε με 3,3',5,5'-τετραμεθυλβενζιδίνη, ύστερα από τη δημιουργία συμπλόκου με στρεπταβιδίνη. Η ποσοτικοποίηση των επιπέδων ox.LDL-C πραγματοποιήθηκε φασματοφωτομετρικά.

Στα δείγματα ορού του συνόλου των εθελοντών έγινε μέτρηση επιπέδων γλυκόζης νηστείας με ενζυματική χρωματομετρική μέθοδο σε αυτόματο βιοχημικό αναλυτή και μέτρηση επιπέδων ινσουλίνης νηστείας με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού σε αυτόματο αναλυτή. Ως διαβητικά, χαρακτηρίστηκαν τα άτομα που είχαν επίπεδα γλυκόζης νηστείας ≥ 126 mg/dl ή/και λάμβαναν αντιδιαβητική θεραπεία, σύμφωνα με τις διεθνείς οδηγίες (257). Για την εκτίμηση της λειτουργίας των β -κυττάρων και του βαθμού

ινσουλινοαντίστασης εφαρμόστηκε η μέθοδος ομοιοστατικού μοντέλου αξιολόγησης (Homeostatic Model Assessment – HOMA 2) (258). Ο υπολογισμός των τιμών Homa-B και Homa-IR έγινε με τη χρήση του λογισμικού “Homa Calculator 2” (<http://www.dtu.ox.ac.uk/index.php?maindoc=/homa/publications.php>).

Οι μετρήσεις των επιπέδων κυτταροκινών και χυμοκινών που μετρήθηκαν περιλαμβάνουν: IL (Interleukin)-6, IL-8, TNF-α (Tumor Necrosis Factor-α), MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1), MIP-1α (Macrophage Inflammatory Protein-1α) και RANTES. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε δείγματα πλάσματος 250 εθελοντών με τη πολλαπλή συζευγμένη ανοσολογική μέθοδο βασισμένη σε σφαιρίδια (multiplex bead-based sandwich immunoassay), σε Bio-Plex Protein Array System με τα αντίστοιχα αντιδραστήρια και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Bio-Rad Laboratories) (259). Η μέθοδος επιτρέπει την ταυτόχρονη μέτρηση πολλαπλών δεικτών στο πλάσμα, με τη χρήση σφαιριδίων (beads) πολυστυρενίου που φέρουν τα κατάλληλα αντισώματα. Τα σφαιρίδια είναι εσωτερικά βαμμένα με κόκκινα και υπέρυθρα φθοροφόρα διαφορετικής έντασης, που επιτρέπουν τη διαφοροποίησή τους. Κάθε τύπος σφαιριδίων συνδέεται ομοιοπολικά με ένα είδος αντισώματος και διαφορετικοί τύποι σφαιριδίων αναμειγνύονται για την αντίδραση. Με την ολοκλήρωση της συζευγμένης ανοσολογικής αντίδρασης, τα σφαιρίδια που φέρουν το σύμπλοκο αντισώματος και δείκτη πλάσματος εισάγονται στη συσκευή ανίχνευσης. Με τη χρήση διπλών ακτινών λέιζερ γίνεται η ταξινόμηση κάθε τύπου σφαιριδίου και η ποσοτικοποίηση των δεικτών του πλάσματος.

Τα επίπεδα ψευδαργύρου πλάσματος μετρήθηκαν σε δείγματα από 250 εθελοντές με φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry), για την ανίχνευση του ^{66}Zn (260). Η μέθοδος επιτρέπει τη μέτρηση συγκέντρωσης μετάλλων και βασίζεται στο συνδυασμό ενός επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος για την παραγωγή ιόντων και ενός φασματομέτρου μάζας για την ανίχνευση των ιόντων. Η ανεπάρκεια ψευδαργύρου ορίστηκε με την παρουσία επιπέδων Zn πλάσματος $\leq 10,5 \mu\text{M}$ (261).

Παράλληλα, μετρήθηκαν τα επίπεδα ολικής χολερυθρίνης, οξαλοξεϊκής τρανσαμινάσης (SGOT), πυροσταφυλικής τρανσαμινάσης (SGPT), κρεατινίνης και αλβουμίνης σε δείγματα ορού από 250 εθελοντές, με ενζυματική χρωματομετρική μέθοδο σε αυτόματο βιοχημικό αναλυτή.

2.4 Κλινικές και σωματομετρικές μετρήσεις

Η αρτηριακή πίεση μετρήθηκε στο αριστερό χέρι έχοντας τα άτομα σε καθιστή θέση και σε ήρεμη κατάσταση, σύμφωνα με τις διεθνείς οδηγίες (262). Η τιμή της συστολικής πίεσης ήταν αντίστοιχη της τιμής που έδειχνε το πιεσόμετρο στον πρώτο ήχο, ενώ η τιμή της διαστολικής όταν ο ήχος σταματούσε να ακούγεται ρυθμικός και ακουγόταν συνεχόμενος. Η παρουσία υπέρτασης ορίστηκε με την καταγραφή συστολικής αρτηριακής πίεσης ≥ 140 mm Hg, ή/και διαστολικής ≥ 90 mm Hg ή λήψης αντιϋπερτασικής φαρμακευτικής αγωγής.

Το βάρος μετρήθηκε μια φορά για κάθε εθελοντή σε ηλεκτρονική ζυγαριά Seca. Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε χωρίς παπούτσια και βαρύ ρουχισμό, σύμφωνα με τις διεθνείς οδηγίες (263). Το ύψος μετρήθηκε μια φορά για κάθε εθελοντή σε αναστημόμετρο Seca. Η μέτρηση έγινε σύμφωνα με τις διεθνείς οδηγίες: ο εθελοντής στεκόταν χωρίς παπούτσια, ίσια με την πλάτη στην κάθετη κλίμακα του αναστημόμετρου, τα πόδια ενωμένα και το κεφάλι παράλληλο με το οριζόντιο επίπεδο (263). Το ύψος μετρήθηκε αφού ζητήθηκε από τον εθελοντή να πάρει μια «βαθιά ανάσα».

Ο δείκτης μάζας σώματος (Δ.Μ.Σ.) υπολογίστηκε ως βάρος (Kg) / ύψος² (m²). Με βάση την τιμή του Δ.Μ.Σ., οι εθελοντές χαρακτηρίστηκαν ως λιποβαρείς (Δ.Μ.Σ. < 18,5 kg/m²), φυσιολογικού βάρους (18,5 ≤ Δ.Μ.Σ. ≤ 24,9 kg/m²), υπέρβαροι (25,0 ≤ Δ.Μ.Σ. ≤ 29,9 kg/m²) ή παχύσαρκοι (Δ.Μ.Σ. ≥ 30,0 kg/m²).

2.5 Καταγραφή και εκτίμηση στοιχείων τρόπου ζωής και διατροφικών συνηθειών

Η συλλογή στοιχείων που αφορούν δημογραφικά και κοινωνικά χαρακτηριστικά, ιατρικό ιστορικό, διατροφικές συνήθειες, κάπνισμα, φυσική δραστηριότητα, ψυχολογική και γνωστική κατάσταση, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ειδικά σχεδιασμένων ερωτηματολογίων. Τα ερωτηματολόγια συμπληρώθηκαν από κλινικούς διαιτολόγους κατά τη διάρκεια συνέντευξης με τους εθελοντές.

Δημογραφικά χαρακτηριστικά και στοιχεία του τρόπου ζωής

Καταγράφηκε η ηλικία, το φύλο, ο τόπος διαμονής, η οικογενειακή κατάσταση, το μορφωτικό επίπεδο και οι καπνιστικές συνήθειες των εθελοντών.

Η φυσική δραστηριότητα καταγράφηκε ως συχνότητα και διάρκεια (ώρες/εβδομάδα) δραστηριοτήτων μέσα και γύρω από το σπίτι και δραστηριοτήτων αναψυχής. Η ποσοτικοποίηση της έντασης της φυσικής δραστηριότητας πραγματοποιήθηκε με την μετατροπή σε μεταβολικά ισοδύναμα (Metabolic Equivalent of Task - MET), χρησιμοποιώντας δημοσιευμένο σύστημα κωδικοποίησης (264). Η μονάδα MET που αποδόθηκε σε κάθε τύπο φυσικής δραστηριότητας, πολλαπλασιάστηκε με την αντίστοιχη συχνότητα και διάρκεια της φυσικής δραστηριότητας και ακολούθως υπολογίστηκε το άθροισμα όλων των τύπων φυσικής δραστηριότητας. Η εκτίμηση της φυσικής δραστηριότητας για κάθε εθελοντή εκφράστηκε σε MET-λεπτά/εβδομάδα.

Διατροφικές συνήθειες

Η καταγραφή των διατροφικών συνηθειών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ερωτηματολογίου συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων, όπου καταγράφηκε η συχνότητα και η ποσότητα κατανάλωσης 53 τροφίμων από όλους τους εθελοντές. Τα τρόφιμα που περιλαμβάνονταν στο ερωτηματολόγιο είναι αντιπροσωπευτικά των βασικών ομάδων τροφίμων (κόκκινο κρέας και πουλερικά, ψάρι και θαλασσινά, γαλακτοκομικά προϊόντα, επεξεργασμένα και μη επεξεργασμένα δημητριακά, ωμά και μαγειρεμένα λαχανικά, φρούτα, αυγά, γλυκά, αναψυκτικά, έλαια και προστιθέμενο λίπος). Παράλληλα, καταγράφηκε η κατανάλωση αλκοόλ (συχνότητα, ποσότητα, είδος) και υπολογίστηκε σε ml/ημέρα, περιεκτικότητας 12g αιθανόλης/100ml. Επίσης, καταγράφηκαν 3 ανακλήσεις

διατροφικής κατανάλωσης 24-ώρου από 200 εθελοντές. Τα διατροφικά δεδομένα χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση του βαθμού υιοθέτησης της Μεσογειακής διατροφής, καθώς και της ημερήσιας πρόσληψης ψευδαργύρου.

Εκτίμηση βαθμού υιοθέτησης της Μεσογειακής διατροφής

Η εκτίμηση του βαθμού υιοθέτησης της Μεσογειακής διατροφής έγινε με την εφαρμογή διατροφικού σκορ (265), όπως αυτό παρουσιάζεται στον **Πίνακα 2.1**.

Πίνακας 2.1. Το σκορ της Μεσογειακής διατροφής (265).

Ομάδες τροφίμων	Συχνότητα κατανάλωσης (μερίδες/εβδομάδα)					
Μη επεξεργασμένα δημητριακά, ρύζι, ζυμαρικά	Ποτέ	1–6	7–12	13–18	19–31	> 32
	0	1	2	3	4	5
Πατάτες	Ποτέ	1–4	5–8	9–12	13–18	> 18
	0	1	2	3	4	5
Φρούτα	Ποτέ	1–4	5–8	9–15	16–21	> 22
	0	1	2	3	4	5
Λαχανικά	Ποτέ	1–6	7–12	13–20	21–32	> 33
	0	1	2	3	4	5
Όσπρια	Ποτέ	< 1	1–2	3–4	5–6	> 6
	0	1	2	3	4	5
Ψάρι	Ποτέ	< 1	1–2	3–4	5–6	> 6
	0	1	2	3	4	5
Κόκκινο κρέας	≤ 1	2–3	4–5	6–7	8–10	> 10
	5	4	3	2	1	0
Πουλερικά	≤ 3	4–5	5–6	7–8	9–10	> 10
	5	4	3	2	1	0
Πλήρη γαλακτοκομικά	≤ 10	11–15	16–20	21–28	29–30	> 30
	5	4	3	2	1	0
Χρήση ελαιολάδου (φορές/εβδομάδα)	Ποτέ	Σπάνια	< 1	1–3	3–5	Καθημερινά
	0	1	2	3	4	5
Αλκοόλ (ml/ημέρα, 100 ml = 12 g αιθανόλης)	< 300	300	400	500	600	> 700 ή 0
	5	4	3	2	1	0

Το διατροφικό σκορ που χρησιμοποιήθηκε βασίζεται στην πυραμίδα της Μεσογειακής διατροφής και έχει ελεγχθεί για την εγκυρότητά του σε Ελληνικό πληθυσμό (265). Ο βαθμός υιοθέτησης της Μεσογειακής διατροφής γίνεται με ένα σύστημα βαθμολόγησης της κατανάλωσης 11 ομάδων τροφίμων και οι τιμές του σκορ κυμαίνονται από 0-55. Για την κατανάλωση τροφίμων που είναι κοντά στη Μεσογειακή διατροφή (μη επεξεργασμένα δημητριακά, φρούτα, λαχανικά, πατάτες, όσπρια, ψάρι και ελαιόλαδο) βαθμολογείται με 0 η απουσία κατανάλωσης και με 1 ως 5 η σπάνια ως καθημερινή κατανάλωση. Αντίθετα, για την κατανάλωση τροφίμων που αποκλίνουν από τη Μεσογειακή διατροφή (κόκκινο κρέας, πουλερικά και πλήρη γαλακτοκομικά προϊόντα) βαθμολογείται με 0 ως 4 η καθημερινή ως σπάνια κατανάλωση και με 5 η απουσία κατανάλωσης. Για το αλκοόλ βαθμολογείται με 5 η κατανάλωση <300 ml/ημέρα, με 0 η κατανάλωση >700 ml/ημέρα ή η απουσία κατανάλωσης και με 1 ως 4 η κατανάλωση 300 ως 600 ml/ημέρα. (265)

Με βάση το παραπάνω σύστημα βαθμολόγησης, τα δεδομένα από τα ερωτηματολόγια συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων κωδικοποιήθηκαν σε κατάλληλα σχεδιασμένη βάση, υπολογίστηκε η κατανάλωση σε μερίδες/εβδομάδα των ομάδων τροφίμων και υπολογίστηκε το σκορ της Μεσογειακής διατροφής.

Εκτίμηση διατροφικής πρόσληψης ψευδαργύρου

Τα δεδομένα από τα ερωτηματολόγια συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων κωδικοποιήθηκαν σε κατάλληλα σχεδιασμένη βάση και υπολογίστηκε η κατανάλωση, σε μερίδες/ημέρα, των τροφίμων. Στη συνέχεια, η ημερήσια διατροφική πρόσληψη ψευδαργύρου (mg/ημέρα) εκτιμήθηκε με τη χρήση του πίνακα περιεκτικότητας ψευδαργύρου στα τρόφιμα από το USDA (**Πίνακας 2.2**).

Παράλληλα, οι 24-ωρες ανακλήσεις διατροφικής κατανάλωσης, από τους 200 εθελοντές, επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα διατροφικής ανάλυσης Nutritionist Pro (Axxya Systems) για την εκτίμηση της μέσης ημερήσιας πρόσληψης ψευδαργύρου. Τα δεδομένα διατροφικής πρόσληψης ψευδαργύρου από τις 24-ωρες ανακλήσεις, χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο εγκυρότητας της εκτιμώμενης διατροφικής πρόσληψης ψευδαργύρου από την αξιολόγηση των ερωτηματολογίων συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων.

Πίνακας 2.2. Περιεκτικότητα ψευδαργύρου (Zn)/μερίδα τροφίμου (mg), που χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της ημερήσιας πρόσληψης Zn, από το ερωτηματολόγιο συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων.

Τρόφιμο (μερίδα)	Zn/μερίδα (mg)	Τρόφιμο (μερίδα)	Zn/μερίδα (mg)
Στρείδια (90γρ.)	74,00	Αυγό (1 τεμάχιο)	0,50
Μοσχάρι (90γρ.)	5,50	Σάλτσα ντομάτας (0,5 φλιτζ.)	0,45
Συκώτι (90γρ.)	4,50	Πατάτα (1 φλιτζ.)	0,40
Οστρακοειδή (90γρ.)	4,00	Άλλο μαγειρεμένο λαχανικό (1 φλιτζ.)	0,40
Αρνί (90γρ.)	4,00	Ψάρι ³ (90γρ.)	0,40
Κρέας κονσέρβας (90γρ.)	3,00	Παγωτό (0,5 φλιτζ.)	0,40
Εντόσθια (90γρ.)	3,00	Ψωμί λευκό (1 φέτα)	0,20
Γαλοπούλα (90γρ.)	2,80	Ωμά λαχανικά (1 φλιτζ.)	0,20
Χοιρινό (90γρ.)	2,50	Σούπα λαχανικών (1 φλιτζ.)	0,20
Άλλο κρέας (90γρ.)	2,50	Χυμός φρούτων (1 φλιτζ.)	0,20
Γιαούρτι (1 φλιτζάνι)	2,00	Κέικ/Σνακ (1 κομμάτι)	0,13
Κοτόπουλο (90γρ.)	1,70	Φρούτο φρέσκο (1 μέτριο)	0,10
Όσπρια (0,5 φλιτζ.)	1,30	Φρούτο κονσέρβας (0,5 φλιτζ.)	0,10
Αρακάς (1 φλιτζ.)	1,10	Αποξηραμένο φρούτο (1 μέτριο)	0,10
Ψάρι κονσέρβας (90γρ.)	1,00	Σοκολάτα (0,5 πλάκα)	0,10
Γάλα ¹ (1 φλιτζ.)	1,00	Αναψυκτικό τύπου cola (1 φλιτζ.)	0,05
Σκληρό τυρί (30γρ.)	0,90	Μπισκότο (1 τεμάχιο)	0,02
Πίτσα (1 κομμάτι)	0,80	Τσάι (1 φλιτζ.)	0,02
Τυρί ² (30γρ.)	0,80	Βούτυρο (1 κουταλιά της σούπας)	0,01
Ζυμαρικά/Ρύζι (1 φλιτζ.)	0,70	Ζάχαρη/Μέλι (1 κουταλάκι του γλυκού)	0,00
Αλλαντικά (2 φέτες)	0,65	Λάδι ⁴ (1 κουταλιά της σούπας)	0,00
Ψωμί ολικής άλεσης (1 φέτα)	0,50		

¹Περιλαμβάνεται το άπαχο, ημίπαχο και πλήρες γάλα. ²Περιλαμβάνεται το φρέσκο και ημίσκληρο τυρί. ³Περιλαμβάνονται φρέσκα και κατεψυγμένα ψάρια. ⁴Περιλαμβάνεται το ελαιόλαδο, το σπορέλαιο και η μαργαρίνη.

Ιατρικό ιστορικό

Συλλέχθηκαν πληροφορίες σχετικά με: την παρούσα φαρμακευτική αγωγή (είδος, ποσότητα, συχνότητα και αιτιολογία), την ύπαρξη διαγνωσμένων παθήσεων (υπέρταση, διαβήτης, στηθάγχη, καρδιακή ανεπάρκεια, καρδιακή αρρυθμία, οστεοπόρωση, κ.α.), το ιστορικό εμφράγματος μυοκαρδίου, εγκεφαλικού, καρκίνου και το ιστορικό χειρουργικών επεμβάσεων (είδος, αιτιολογία, χρονολογία).

Εκτίμηση ψυχολογικής και νοητικής κατάστασης

Η εκτίμηση της ψυχολογικής κατάστασης πραγματοποιήθηκε με την γηριατρική κλίμακα κατάθλιψης (Geriatric Depression Scale) (266), όπως έχει μεταφραστεί και σταθμιστεί για ελληνικό πληθυσμό (267). Πρόκειται για μια σύντομη και αξιόπιστη μέθοδο για την αξιολόγηση των συμπτωμάτων κατάθλιψης στους ηλικιωμένους. 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 (136). Στον ελληνικό πληθυσμό, βαθμολογίες πάνω από 6/7 αξιολογούνται ως παρουσία κατάθλιψης, με επίπεδο ευαισθησίας 92,23 και ειδικότητας 95,24 (267).

Η εκτίμηση της νοητικής κατάστασης πραγματοποιήθηκε με το ερωτηματολόγιο εξέτασης της νοητικής κατάστασης (Mini Mental State Examination) (268), όπως έχει μεταφραστεί και σταθμιστεί για τον ελληνικό πληθυσμό (269). Πρόκειται για μια σύντομη και αξιόπιστη μέθοδο για την αξιολόγηση της έκπτωσης των γνωστικών λειτουργιών και της κατάστασης μνήμης στους ηλικιωμένους. Η μέγιστη βαθμολογία είναι το 30. Στον ελληνικό πληθυσμό, βαθμολογίες κάτω από 24/23 αξιολογούνται ως ύπαρξη άνοιας, με επίπεδο ευαισθησίας 90,80 και ειδικότητας 90,62 (269).

2.6 Γενετική ανάλυση

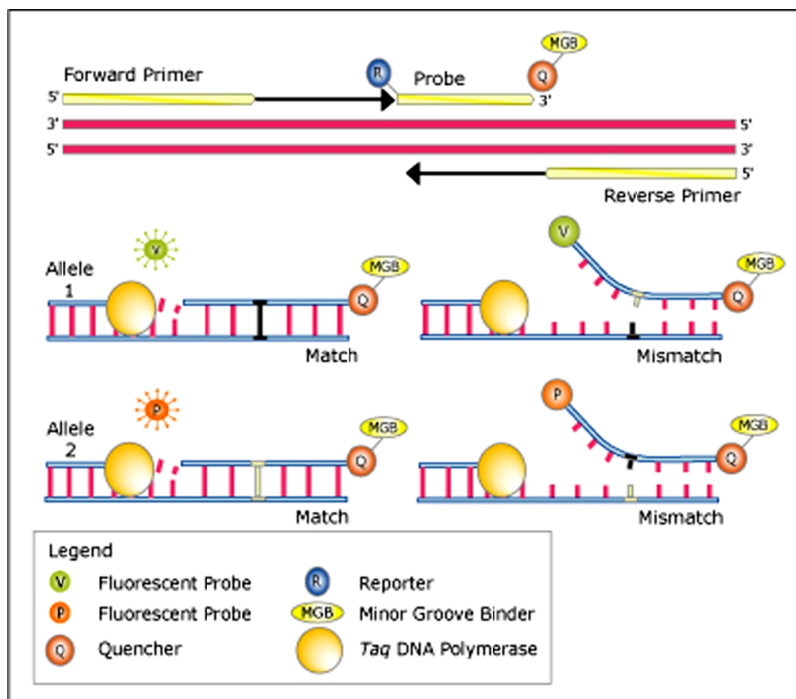
Η γενετική ανάλυση περιελάμβανε 27 πολυμορφισμούς (SNP – Single Nucleotide Polymorphism) σε γονίδια που εμπλέκονται στη φλεγμονώδη απόκριση, στο μονοπάτι μεταβίβασης μηνυμάτων ινσουλίνης/IGF και στο μεταβολισμό του ψευδαργύρου. Η γενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και πέψη με ενδονουκλεάση περιορισμού (PCR-RLFP) και με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αληθινού χρόνου Taqman.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction – PCR) αποτελεί μέθοδο εκλεκτικής αντιγραφής, κατά εκατομμύρια φορές, συγκεκριμένων τμημάτων DNA. Η μέθοδος είναι εξαιρετικά ευαίσθητη και επιτρέπει τη γρήγορη ανάλυση περιοχών του DNA που περιέχονται σε ένα πολύ μικρό δείγμα, μιμούμενη *in vitro* τον τρόπο με τον οποίο τα ένζυμα του πυρήνα (DNA πολυμεράσες) αντιγράφουν το DNA του κυττάρου. Η εφαρμογή της μεθόδου περιλαμβάνει την παρουσία: α) δύο ειδικών συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων, μήκους 20-30 βάσεων, που χρησιμοποιούνται ως πρωταρχικά τμήματα (εκκινητές-primers) για την *in vitro* σύνθεση του DNA και οριοθετούν τα άκρα του τελικού προϊόντος, β) μείγματος των τεσσάρων τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), γ) ιόντων μαγνησίου και δ) της κατάλληλης Taq πολυμεράσης (*Thermus aquaticus*). Η τεχνική της PCR περιλαμβάνει την κυκλική επανάληψη, 25-30 φορές, τριών σταδίων σε κυκλικό θερμοποιητή: α) του σταδίου αποδιάταξης (template denaturation), όπου το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται σε μονόκλωνες αλυσίδες σε υψηλή θερμοκρασία (94-96°C), β) του σταδίου σύνδεσης εκκινητών (primer annealing), όπου οι δύο εκκινητές συνδέονται με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες των αλυσίδων του DNA, και γ) του σταδίου επιμήκυνσης (primer extension), όπου γίνεται η σύνθεση του DNA με επιμήκυνση των εκκινητών υπό την καταλυτική δράση της Taq πολυμεράσης. (270)

Ο προσδιορισμός του γονότυπου στο προϊόν της PCR γίνεται με ενδονουκλεάση περιορισμού. Η μέθοδος βασίζεται στην ιδιότητα των ενδονουκλεασών να αναγνωρίζουν ειδικές δίκλωνες αλληλουχίες DNA και να κόβουν το μόριο μέσα ή κοντά στην αλληλουχία αναγνώρισης. Η συχνότητα και η θέση ανεύρεσης των αλληλουχιών αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης μέσα στο μόριο DNA, εξαρτάται από την ακριβή αλληλουχία του δείγματος που εξετάζεται. Τα τμήματα DNA που προκύπτουν από

την πέψη με μια περιοριστική ενδονουκλεάση είναι ενδεικτικά της ύπαρξης ή όχι ενός πολυμορφισμού. Με ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της πέψης σε πήκτωμα αγαρόζης και παρατήρηση στο υπεριώδες φως, επιτυγχάνεται ο προσδιορισμός του γονότυπου. (270)

Η μέθοδος Taqman είναι μια ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο, που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό πολυμορφισμών σε συγκεκριμένη αλληλουχία του DNA. Η εφαρμογή της μεθόδου περιλαμβάνει έναν ανιχνευτή υβριδισμού (probe), που φέρει στο ένα άκρο του χρωστική φθορισμού αναφοράς (reporter) και στο άλλο άκρο χρωστική παρεμπόδισης φθορισμού (quencher). Οι χρωστικές φθορισμού που χρησιμοποιούνται είναι η 6-καρβόξυ φλουορεσκίνη (FAM) ή η χρωστική VIC ως “reporter”, και η τετραμεθυλ-6-καρβοξυροδαμίνη TAMRA ως “quencher”. Η μέθοδος Taqman περιλαμβάνει επίσης τους παράγοντες της κλασσικής PCR (εκκινητές, τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτιδία, ιόντα μαγνησίου και Taq πολυμεράση) και τα αντίστοιχα στάδια της αποδιάταξης, της σύνδεσης και επιμήκυνσης των εκκινητών. Ο ανιχνευτής υβριδισμού συνδέεται με τον ένα από τους δύο εκκινητές της αντίδρασης και υδρολύεται από την πολυμεράση στο στάδιο της επιμήκυνσης, με αποτέλεσμα να εκπέμπεται σήμα φθορισμού αναφοράς (FAM ή VIC). Σε κάθε κυκλική επανάληψη των σταδίων πολλαπλασιάζεται το σήμα του φθορισμού, το οποίο ανιχνεύεται και ποσοτικοποιείται με τη χρήση ακτινών λέιζερ. Η αρχή της μεθόδου παρουσιάζεται στην **Εικόνα 2.1**. (271)



Εικόνα 2.1. Συνοπτική περιγραφή της μεθόδου Taqman.

Πίνακας 2.3. Οι μελετώμενοι πολυμορφισμοί, το γονίδιο και χρωμόσωμα (Chr) που εντοπίζονται, η μέθοδος γενετικής ανάλυσης που εφαρμόστηκε και ο αριθμός των δειγμάτων ανά πολυμορφισμό (N).

SNP	Chr	POS	Γονίδιο	Πρωτεΐνη	Μέθοδος	N
rs10493846	1	91497223	SEC63D1	SEC63 με τομέα 1	Taqman	800
rs340874	1	21547651	PROX1	Prospero homeobox πρωτεΐνη	Taqman	800
rs780094	2	27652888	GCKR	Ρυθμιστική πρωτεΐνη γλυκοκινάσης	Taqman	800
rs560887	2	169588655	G6PC2	Φωσφατάση 6-γλυκόζης	Taqman	800
rs4675095	2	227477472	IRS1	Υπόστρωμα του υποδοχέα ινσουλίνης	Taqman	800
rs11717195	3	124565088	ADCY5	Αδενυλική κυκλάση-5	Taqman	800
rs11920090	3	172200223	SLC2A2	Υποδοχέας γλυκόζης GLUT2	Taqman	800
rs11167682	5	153802535	SAP30L	Sin3A σχετιζόμενη πρωτεΐνη p-30 μιμητική	Taqman	800
rs4880	6	160033862	SOD2	Δισμουτάση υπεροξειδίου 2	PCR-RLFP (272)	175
rs1061581	6	31892565	Hsp70-2	Πρωτεΐνη θερμικού σοκ 70-2	PCR-RLFP (273)	250
rs1800629	6	31651010	TNF-α	Παράγοντας νέκρωσης όγκου-α	Taqman	800
rs1800795	7	22733170	IL-6	Ιντερλευκίνη-6	PCR-RLFP (274)	250
rs4607517	7	44008908	GCK	Γλυκοκινάση	Taqman	800
rs2191349	7	14837549	DGKB/ THEM195	Κινάση διακυλογλυκερόλης/ Διαμεμβρανική πρωτεΐνη	Taqman	800
rs7034200	9	4279050	GLIS3	GLI μιμητικός δάχτυλος ψευδαργύρου	Taqman	800
rs6479526	9	93910190	PTPDC1	Πρωτεΐνη 1 με περιοχή φωσφατάσης τυροσίνης	Taqman	800
rs457420	9	133938815	BRD3	Πρωτεΐνη 3 συνδεδεμένη με βρώμιο	Taqman	800
rs10885122	10	113032083	ADRA2A	α _{2α} αδρενεργικός υποδοχέας	Taqman	800
rs11605924	11	45829667	CRY2	Κρυπτόχρωμα 2	Taqman	800
rs7944584	11	47292896	MADD	Τομέας ενεργοποίησης θανάτου από MAP κινάση	Taqman	800
rs174550	11	61328054	FADS1	Δεσατουράση λιπαρών οξέων	Taqman	800
rs10830963	11	92348358	MTNR1B	Υποδοχέας μελατονίνης 1B	Taqman	800
rs35767	12	101378036	IGF1	Ινσουλινομιμητικός αυξητικός παράγοντας 1	Taqman	800
rs8052394	16	55231329	MT1A	Μεταλλοθειονίνη 1A	PCR-RLFP (260)	540
rs11640851	16	55230728	MT1A	Μεταλλοθειονίνη 1A	PCR-RLFP (260)	540
rs1610216	16	55199785	MT2A	Μεταλλοθειονίνη 2A	PCR-RLFP (275)	540
rs10636	16	55200844	MT2A	Μεταλλοθειονίνη 2A	PCR-RLFP (276)	540

POS: Θέση στο γονιδίωμα σύμφωνα με τη βάση HarMap 35.0.

2.7 Σχεδιασμός της μελέτης χορήγησης συμπληρώματος ψευδαργύρου

Η χορήγηση συμπληρώματος ψευδαργύρου πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της μελέτης Zincage. Ο σχεδιασμός της περιελάμβανε την επιλογή 30 ηλικιωμένων εθελοντών με ανεπάρκεια ψευδαργύρου ($\leq 10,5 \mu\text{M}$ στο πλάσμα), κατά τη χρονική στιγμή της στρατολόγησης (baseline). Η μελέτη παρέμβασης πραγματοποιήθηκε περίπου έναν χρόνο μετά την αρχική στρατολόγηση των εθελοντών.

Ύστερα από ενυπόγραφη συναίνεση των ηλικιωμένων, πραγματοποιήθηκε αιμοληψία, απομόνωση βιολογικών υλικών, αιματολογικές και βιοχημικές αναλύσεις, όπως περιγράφονται στις ενότητες 2.2 και 2.3. Συνοπτικά, έγινε απομόνωση ορού και πλάσματος και παράλληλα, πραγματοποιήθηκε γενική εξέταση αίματος και μέτρηση επιπέδων ολικής χοληστερόλης, HDL-C, τριγλυκεριδίων, γλυκόζης νηστείας, IL-6, IL-8, TNF- α , MCP-1, MIP-1 α , RANTES και ψευδαργύρου. Επιπροσθέτως, έγινε λήψη τριών ανακλήσεων διατροφικής κατανάλωσης 24-ώρου από κάθε εθελοντή, για την εκτίμηση της μέσης ημερήσιας διατροφικής πρόσληψης ψευδαργύρου, με το πρόγραμμα Nutritionist Pro. Τέλος, εκτιμήθηκε η παρουσία κατάθλιψης και η έκπτωση των γνωστικών λειτουργιών στους εθελοντές. Η δοκιμασία της παρέμβασης περιελάμβανε τη χορήγηση 10 mg/ημέρα ασπαρτικού ψευδαργύρου σε δισκία (Unizink 50, Köhler Pharma Corp., Alsbach-Hähnlein, Germany) για 6 εβδομάδες. Μετά το τέλος της παρέμβασης, επαναλήφθηκε η αιμοληψία, η απομόνωση βιολογικών υλικών, οι αιματολογικές και βιοχημικές αναλύσεις, καθώς και η εκτίμηση της παρουσίας κατάθλιψης και της γνωστικής λειτουργίας των εθελοντών.

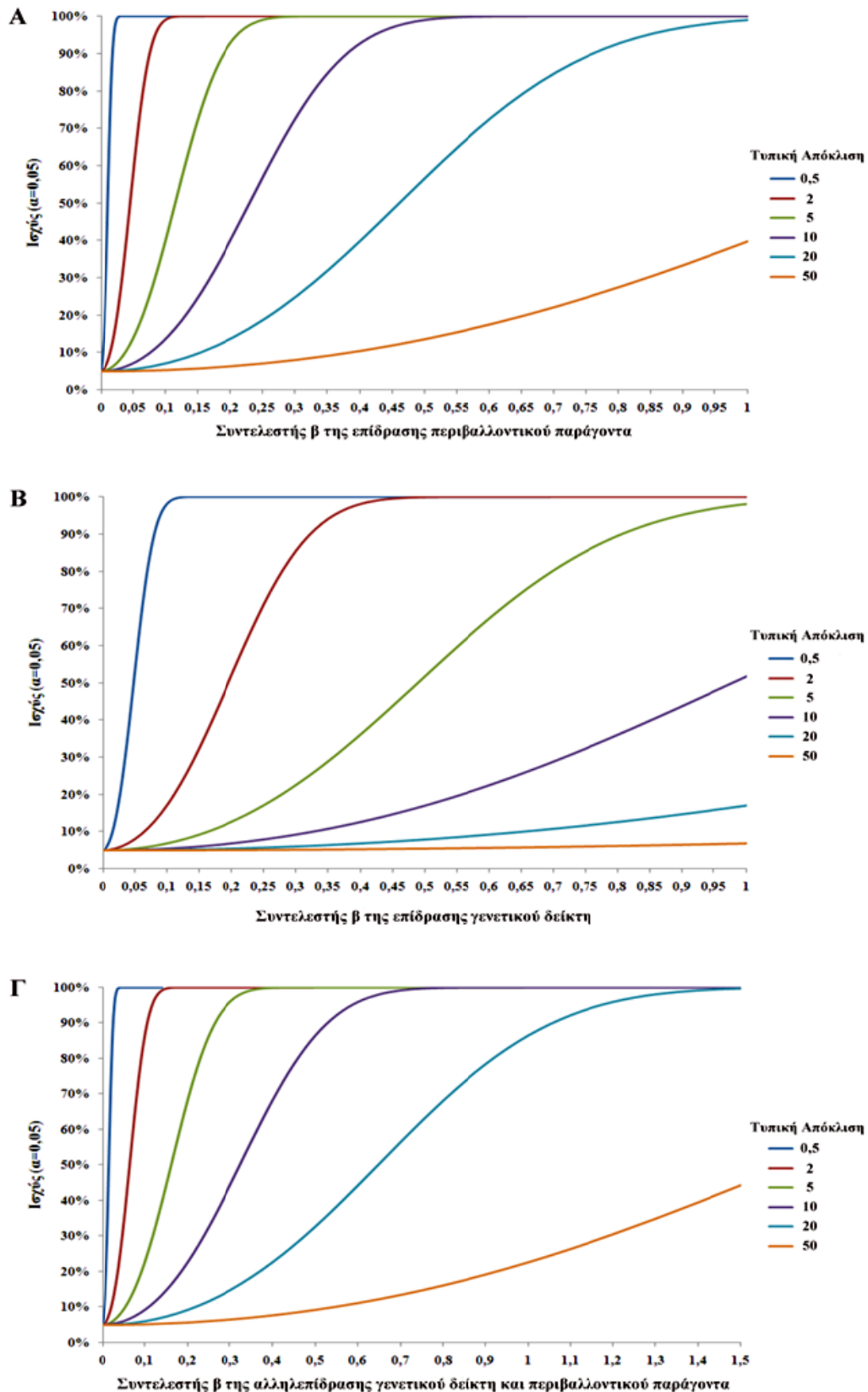
2.8 Στατιστική ανάλυση

Η ισχύς των αναλύσεων υπολογίστηκε με το πρόγραμμα Quanto (277). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης ισχύος παρουσιάζονται στην **Εικόνα 2.1**. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τα στατιστικά προγράμματα PASW 18.0 (πρώην SPSS) και plink (278) για την εκτίμηση των συσχετίσεων μεταξύ πολυμορφισμών και διατροφικών και περιβαλλοντολογικών παραγόντων.

Οι συνεχείς μεταβλητές παρουσιάζονται ως μέσοι $\pm$ τυπική απόκλιση (mean $\pm$ SD), ενώ οι κατηγορικές μεταβλητές ως απόλυτα και σχετικά ποσοστά. Η κανονική κατανομή των συνεχών μεταβλητών εκτιμήθηκε με το κριτήριο Kolmogorov-Smirnov, ενώ για τις μεταβλητές που δεν ακολουθούσαν την κανονική κατανομή χρησιμοποιήθηκαν οι λογαριθμικές τιμές τους (log). Οι διαφορές στις αναλογίες των κατηγορικών μεταβλητών εκτιμήθηκαν με το τεστ χ^2 (chi-squared test). Η σύγκριση των μέσων τιμών των συνεχών μεταβλητών ανάμεσα σε υπο-ομάδες του δείγματος έγινε με τη χρήση του Student's t τεστ, Wilcoxon's τεστ και της ανάλυσης συν-διακύμανσης (ANCOVA). Ο έλεγχος για το συνολικό σφάλμα τύπου I πραγματοποιήθηκε με τη διόρθωση Bonferroni. Οι δυαδικές συσχετίσεις μεταξύ των συνεχών μεταβλητών εκτιμήθηκαν με το συντελεστή Pearson (r).

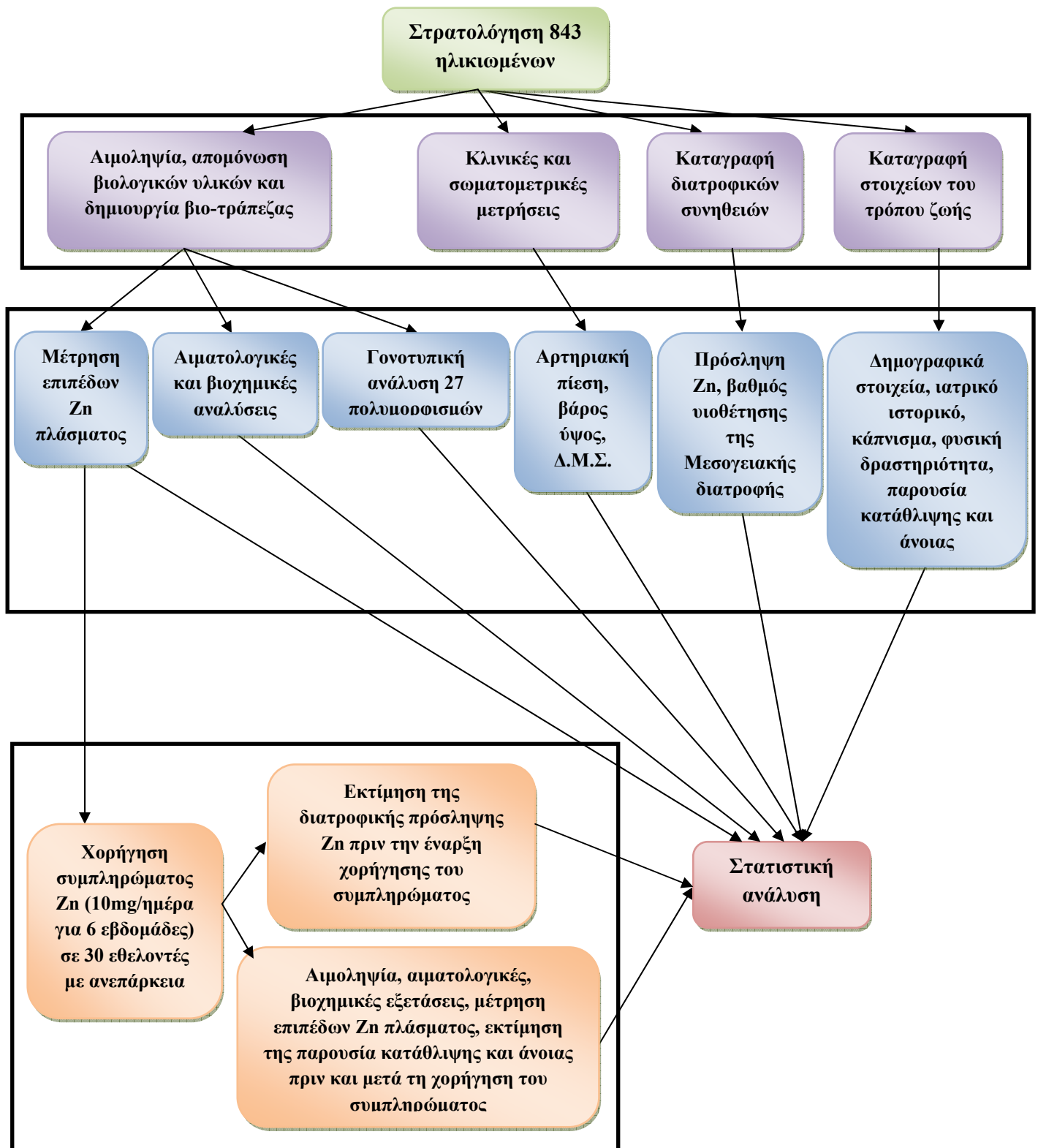
Η συχνότητα των μελετώμενων πολυμορφισμών στο δείγμα συγκρίθηκε με την αναμενόμενη συχνότητα σύμφωνα με την ισορροπία Hardy-Weinberg (HWE). Για την ανάλυση συσχέτισης των πολυμορφισμών με τις κατηγορικές μεταβλητές, χρησιμοποιήθηκε το Fischer's exact τεστ και μοντέλα λογιστικής παλινδρόμησης, ελέγχοντας για πιθανούς συμπαραγόντες. Για την ανάλυση συσχέτισης και αλληλεπίδρασης των πολυμορφισμών με συνεχείς μεταβλητές εφαρμόστηκαν μοντέλα πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης, χρησιμοποιώντας το προσθετικό (additive) γενετικό μοντέλο ανάλυσης και ελέγχοντας για πιθανούς συμπαραγόντες. Ο έλεγχος για τις πολλαπλές συγκρίσεις πολυμορφισμών πραγματοποιήθηκε με τη διόρθωση Bonferroni.

Η στατιστική σημαντικότητα σε όλους τους ελέγχους εκτιμήθηκε σε επίπεδο $p=0,05$.



Εικόνα 2.1. Εκτιμώμενη ισχύς των αναλύσεων στο δείγμα των 843 ατόμων, για **A.** εύρος επίδρασης περιβαλλοντικού παράγοντα, **B.** εύρος επίδρασης γενετικού δείκτη (προσθετικό γενετικό μοντέλο) και **Γ.** εύρος αλληλεπίδρασης γενετικού δείκτη (προσθετικό γενετικό μοντέλο) και περιβαλλοντικού παράγοντα. Οι καμπύλες αντιπροσωπεύουν διαφορετικά μεγέθη τυπικής απόκλισης της εξαρτημένης μεταβλητής.

2.9 Προσχέδιο μελέτης



3. Αποτελέσματα

3.1 Δείκτες υγείας, διατροφικές συνήθειες και παράγοντες του τρόπου ζωής στον γηριατρικό πληθυσμό

Τα δημογραφικά χαρακτηριστικά του δείγματος παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.1**.

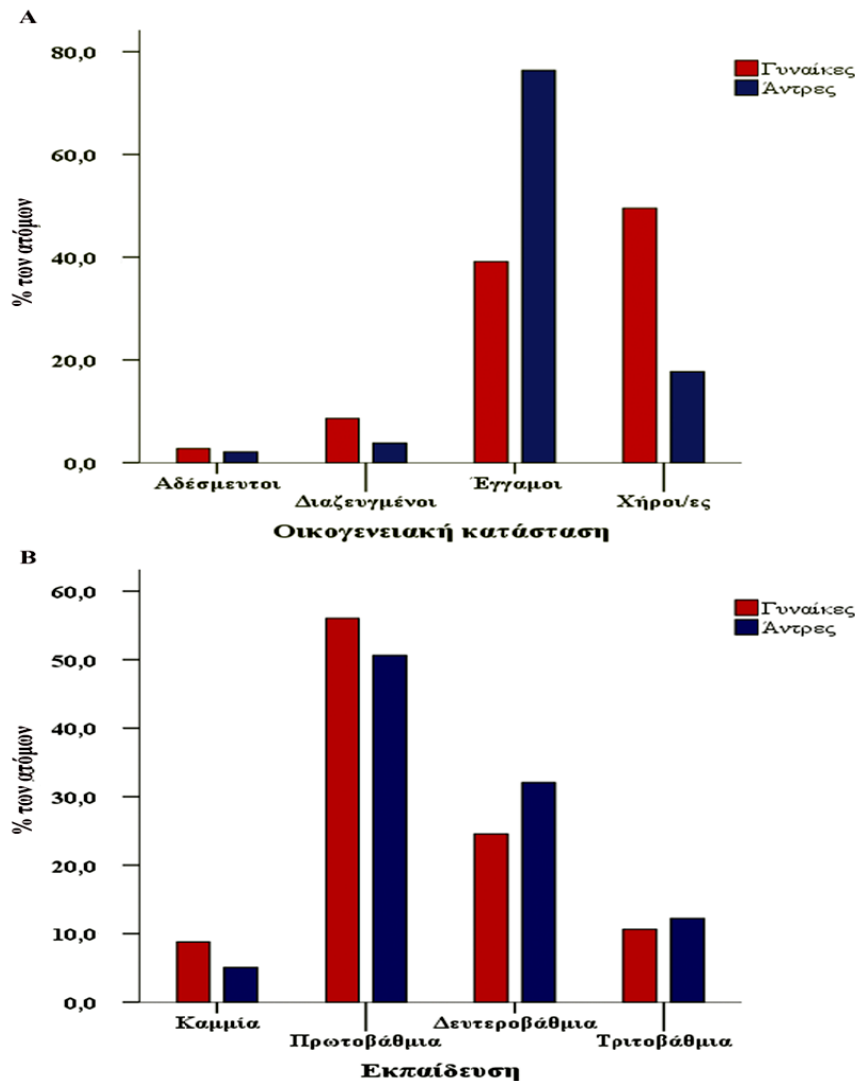
Πίνακας 3.1. Δημογραφικά χαρακτηριστικά και στοιχεία του ιατρικού ιστορικού.

Χαρακτηριστικό	Σύνολο	Γυναίκες	Άντρες	P*
N	843	605	238	
Δημογραφικά				
Ηλικία (έτη)	71,9 (7,4) ¹	70,8 (7,2)	74,6 (7,3)	3,7 x 10⁻¹¹
Γηραιότεροι (≥80 ετών) (N)	111	61	50	<0,001
Οικογενειακή κατάσταση				
Αδέσμευτοι	2,6 ²	2,7	2,1	1,1x10⁻³⁰
Διαζευγμένοι	7,1	8,6	3,8	
Έγγαμοι	50,4	39,1	76,4	
Χήροι/ες	39,9	49,5	17,7	
Μορφωτικό επίπεδο				
Καμία εκπαίδευση	7,7	8,8	5,1	0,001
Πρωτοβάθμια	54,4	56,0	50,6	
Δευτεροβάθμια	26,8	24,5	32,1	
Τριτοβάθμια	11,1	10,6	12,2	
Έτη εκπαίδευσης	7,6 (4,5)	7,4 (4,5)	8,0 (4,4)	0,001
Ιατρικό ιστορικό				
Υπέρταση	70,9	66,9	81,1	0,004
Σακχαρώδης Διαβήτης 2	15,4	13,6	20,2	0,046
Υπερχοληστερολαιμία	86,7	89,9	78,6	2,9x10⁻⁴
Λήψη αντιυπερτασικής αγωγής	56,5	55,2	59,7	0,94
Λήψη αντιδιαβητικής αγωγής	7,8	7,6	8,4	0,77
Λήψη αντιλιπιδαιμικής αγωγής	24,1	26,1	18,9	0,043
Καρδιαγγειακά νοσήματα	19,5	15,0	30,7	2,3x10⁻⁵
Έμφραγμα μυοκαρδίου	4,2	1,8	10,1	2,6x10⁻⁶
Αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο	4,0	2,8	7,1	0,016

¹Μέση τιμή (τυπική απόκλιση), ομοίως για όλες τις συνεχείς μεταβλητές. ²Ποσοστό (%), ομοίως για όλες τις κατηγορικές μεταβλητές). *Επίπεδο σημαντικότητας για τη σύγκριση ανάμεσα στα δύο φύλα, σταθμισμένο για την ηλικία.

Συνολικά, στρατολογήθηκαν 843 ηλικιωμένοι (71,8% γυναίκες και 28,2% άντρες), με μέση ηλικία τα 71,9±7,4 έτη (ελάχιστη 60 και μέγιστη 94,5 έτη). Οι γηραιότεροι εθελοντές (≥80 ετών) αποτελούσαν το 13,2% του συνολικού δείγματος. Η μεγαλύτερη

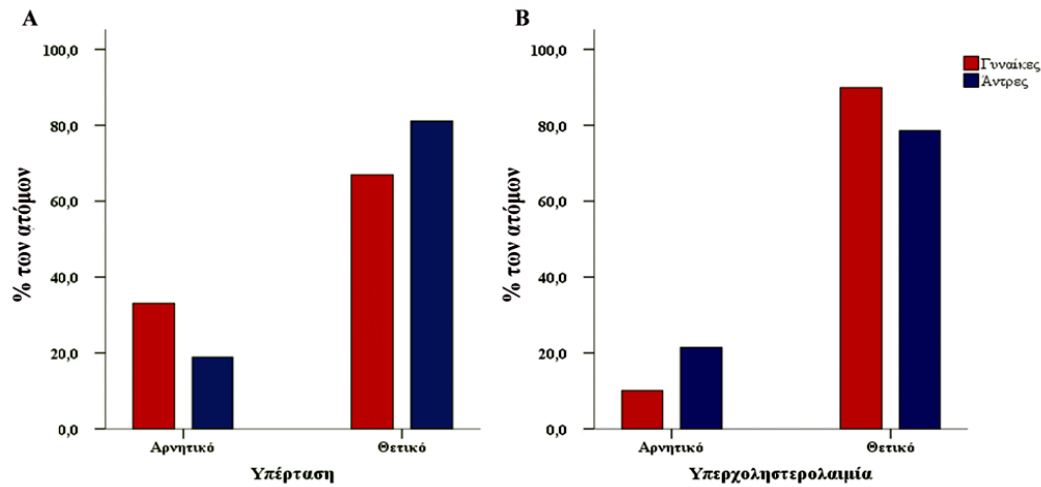
πλειοψηφία των αντρών ήταν έγγαμοι (76,4%), ενώ οι γυναίκες ήταν σε μεγαλύτερο ποσοστό χήρες σε σχέση με τους άντρες (49,5% έναντι 17,7% αντίστοιχα) (Πίνακας 3.1, Εικόνα 3.1Α). Αναφορικά με το μορφωτικό επίπεδο, το 54,4% των ηλικιωμένων ανέφεραν πρωτοβάθμια εκπαίδευση, ενώ το 7,7% καμία εκπαίδευση. Επίσης, υπήρχε σημαντική διαφορά στο μορφωτικό επίπεδο και στα συνολικά έτη εκπαίδευσης μεταξύ αντρών και γυναικών (Πίνακας 3.1, Εικόνα 3.1Β).



Εικόνα 3.1. Οικογενειακή κατάσταση (Α) και μορφωτικό επίπεδο (Β) ανά φύλο στο δείγμα των ηλικιωμένων εθελοντών.

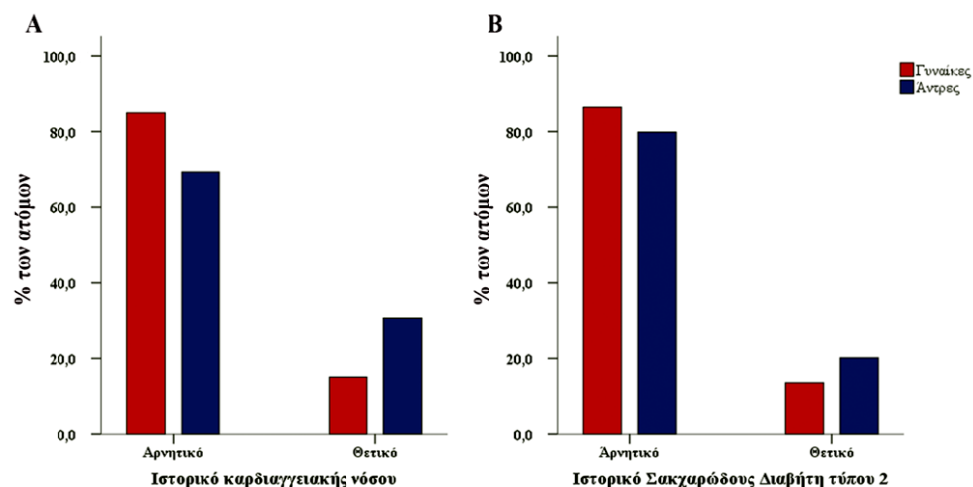
Ύστερα από την εκτίμηση του ιατρικού ιστορικού, καταγράφηκαν **υψηλά ποσοστά υπέρτασης (70,9%) και υπερχοληστερολαιμίας (86,7%)** στο σύνολο των ηλικιωμένων εθελοντών, ενώ αντιυπερτασική αγωγή λάμβανε μόνο το 56,5% του δείγματος και αντιλιπιδαιμική αγωγή το 24,1% (Πίνακας 3.1). Όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 3.2**, η υπέρταση είχε μεγαλύτερο επιπολασμό στους άντρες έναντι των γυναικών (81,1% έναντι

66,9% αντίστοιχα, $P=0,004$), ενώ η υπερχοληστερολαιμία ήταν πιο συχνή στις γυναίκες σε σχέση με τους άντρες (89,9% έναντι 78,6% αντίστοιχα, $P=2,9 \times 10^{-4}$).



Εικόνα 3.2. Συχνότητα εμφάνισης υπέρτασης (Α) και υπερχοληστερολαιμίας (Β) ανά φύλο στο δείγμα των ηλικιωμένων εθελοντών.

Η συχνότητα εμφάνισης **σακχαρώδη διαβήτη 2 (ΣΔ 2)** ήταν **15,4%**, ενώ μόνο το 7,8% λάμβανε αντιδιαβητική αγωγή και η συχνότητα εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων ήταν 19,5%, στο σύνολο του δείγματος (**Πίνακας 3.1**). Ο επιπολασμός του ΣΔ2 και των καρδιαγγειακών νοσημάτων ήταν μεγαλύτερος στους άντρες σε σχέση με τις γυναίκες (**Πίνακας 3.1** και **Εικόνα 3.3**). Παράλληλα, το ιστορικό εμφράγματος μυοκαρδίου και αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου ήταν πιο συχνό στους άντρες σε σχέση με τις γυναίκες (10,1% έναντι 1,8%, $P=2,6 \times 10^{-6}$ και 7,1% έναντι 2,8%, $P=0,016$, αντίστοιχα) (**Πίνακας 3.1**).



Εικόνα 3.3. Συχνότητα εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων (Α) και σακχαρώδη διαβήτη 2 (Β) ανά φύλο στο δείγμα των ηλικιωμένων εθελοντών.

Οι σωματομετρικοί, κλινικοί, γλυκαιμικοί και λιπιδαιμικοί δείκτες στο δείγμα των ηλικιωμένων εθελοντών παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.2**.

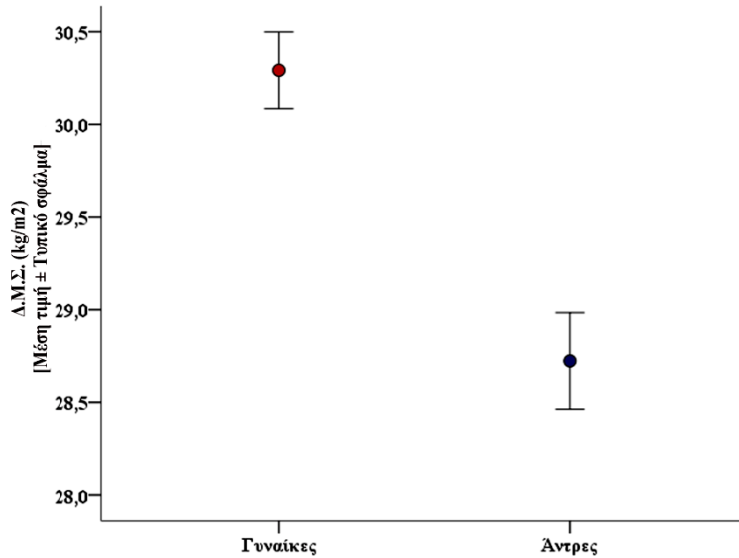
Πίνακας 3.2. Σωματομετρικοί, κλινικοί, γλυκαιμικοί και λιπιδαιμικοί δείκτες στο δείγμα των ηλικιωμένων εθελοντών.

Χαρακτηριστικό	Σύνολο	Γυναίκες	Άντρες	P*
N	843	605	238	
Σωματομετρικοί δείκτες				
Δ.Μ.Σ. (kg/m ²)	29,9 (4,9) ¹	30,3 (5,1)	28,7 (4,0)	1,1x10⁻⁴
Λιποβαρές	0,2 ²	0,2	0,4	
Φυσιολογικό βάρος	13,6	12,6	16,1	
Υπέρβαρο	41,7	38,8	49,2	0,007
Παχυσαρκία	44,5	48,4	34,3	
Κλινικοί δείκτες				
Συστολική αρτηριακή πίεση (mm Hg)	140,6 (18,3)	139,2 (18,2)	143,8 (18,1)	0,029
Διαστολική αρτηριακή πίεση (mm Hg)	77,9 (10,4)	77,3 (10,0)	79,3 (10,9)	0,005
Γλυκαιμικοί δείκτες				
Γλυκόζη νηστείας (mg/dl)	103,1 (23,5)	101,4 (20,2)	107,4 (29,8)	0,002
Ινσουλίνη νηστείας (pmol/L)	54,4 (40,8)	54,3 (41,1)	54,9 (40,3)	0,91
Homa-B (%)	74,9 (34,7)	76,6 (33,5)	70,9 (37,3)	0,005
Homa-IR	1,0 (0,8)	1,0 (0,8)	1,1 (0,8)	0,92
Λιπιδαιμικοί δείκτες				
Ολική χοληστερόλη (mg/dl)	232,9 (41,2)	237,1 (40,7)	222,2 (40,5)	3,6x10⁻⁵
LDL-C (mg/dl)	152,1 (36,2)	155,0 (36,2)	145,0 (35,3)	0,005
HDL-C (mg/dl)	55,0 (12,3)	56,6 (12,2)	51,1 (11,6)	1,3x10⁻⁷
Τριγλυκερίδια (mg/dl)	129,2 (59,8)	128,0 (55,6)	132,4 (69,1)	0,57
Οξειδωμένη LDL-C (mg/dl) ³	81,1 (23,7)	82,9 (25,8)	79,2 (21,3)	0,41

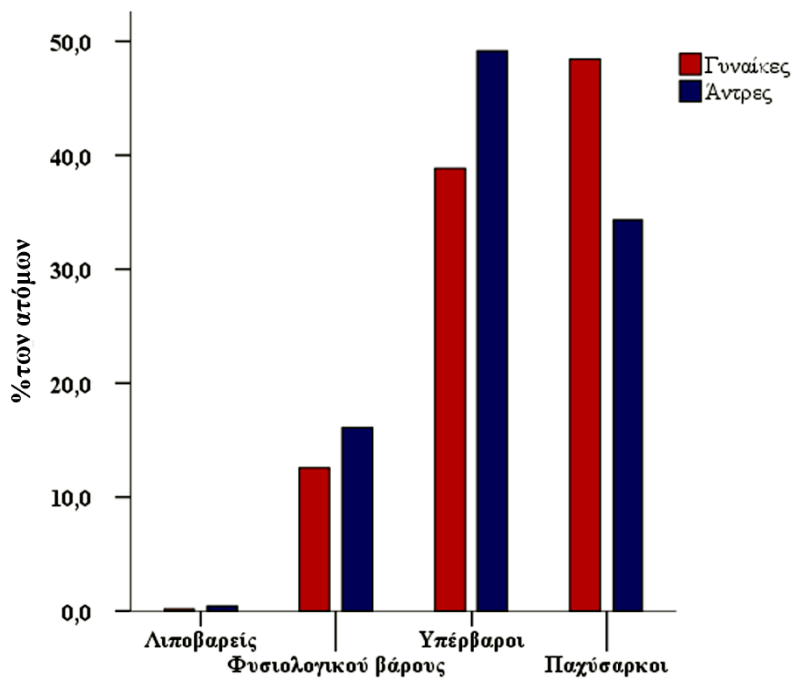
¹Μέση τιμή (τυπική απόκλιση), ομοίως για όλες τις συνεχείς μεταβλητές. ²Ποσοστό (%), ομοίως για όλες τις κατηγορικές μεταβλητές. ³Σε δείγμα 175 ατόμων (88 γυναίκες, 87 άντρες). *Επίπεδο σημαντικότητας για τη σύγκριση ανάμεσα στα δύο φύλα, σταθμισμένο για την ηλικία.

Η μέση τιμή του δείκτη μάζας σώματος (Δ.Μ.Σ.) στο σύνολο του δείγματος ήταν 29,9±4,9 kg/m², ενώ η συχνότητα εμφάνισης **υπέρβαρου** (25,0 kg/m² ≤ Δ.Μ.Σ. ≤ 29,9 kg/m²) και **παχυσαρκίας** (Δ.Μ.Σ. ≥ 30,0 kg/m²) ήταν **41,7% και 44,5%**, αντίστοιχα (**Πίνακας 3.2**). Τα επίπεδα Δ.Μ.Σ. ήταν μεγαλύτερα στις γυναίκες σε σχέση με τους άντρες (**Πίνακας 3.2 και Εικόνα 3.4**). Παράλληλα, οι ηλικιωμένες γυναίκες ήταν σε μεγαλύτερο ποσοστό παχύσαρκες σε σύγκριση με τους άντρες (48,4% έναντι 34,3%), ενώ

οι άντρες εμφάνιζαν μεγαλύτερα ποσοστά υπέρβαρου (49,2% έναντι 38,8%) (Πίνακας 3.2 και Εικόνα 3.5). Συνολικά, το 87,2% των γυναικών και το 83,5% των αντρών είχαν $\Delta\text{Μ.Σ.} \geq 25,0 \text{ kg/m}^2$ και μόνο το 12,6% και 16,1% αντίστοιχα είχαν φυσιολογικό βάρος.

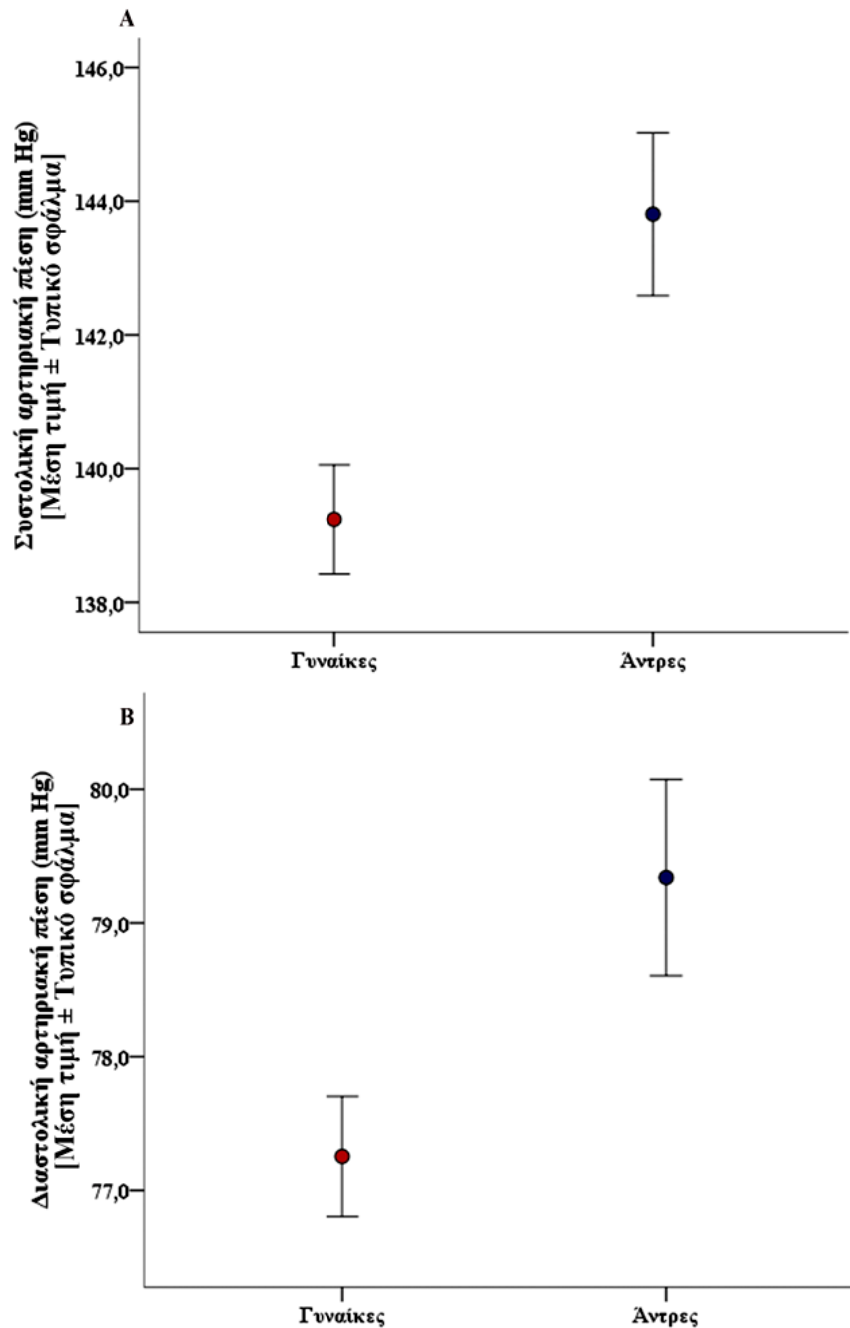


Εικόνα 3.4. Επίπεδα του $\Delta\text{Μ.Σ.}$ μεταξύ ηλικιωμένων γυναικών και αντρών ($P=1,1 \times 10^{-4}$).



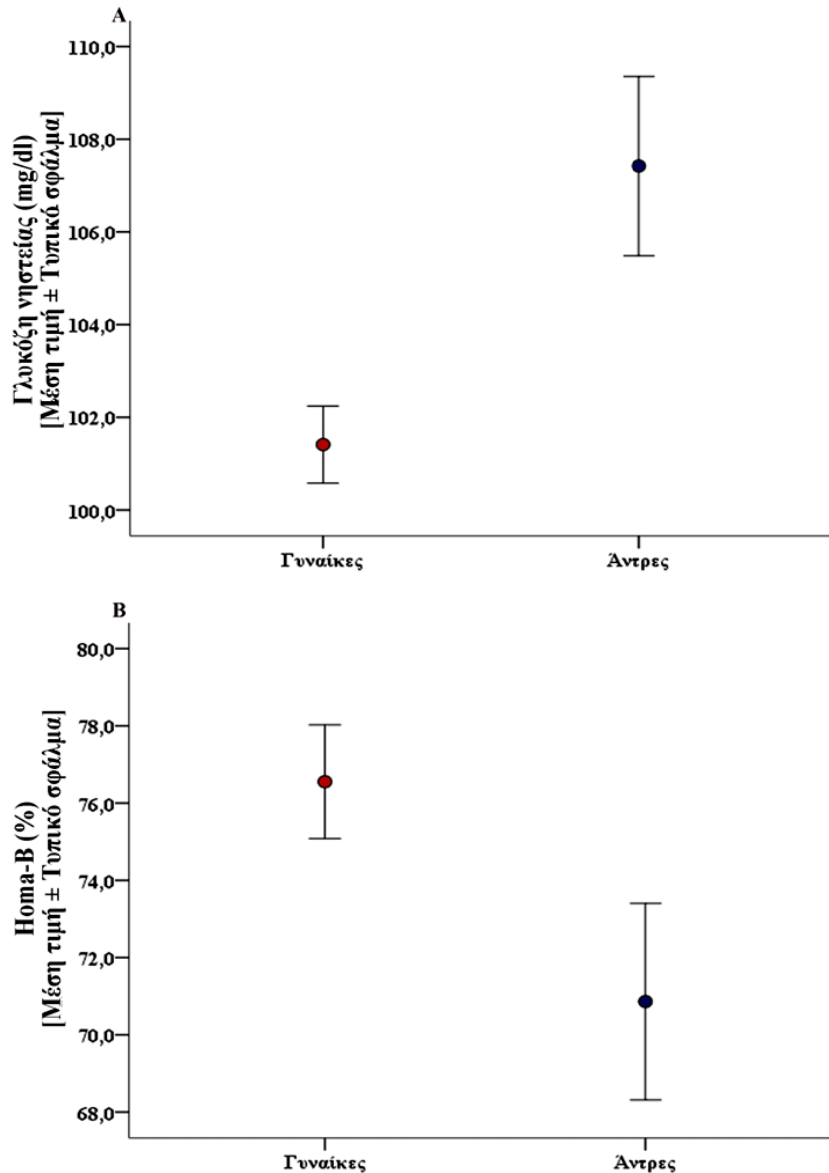
Εικόνα 3.5. Ποσοστά λιποβαρών, φυσιολογικού βάρους, υπέρβαρων και παχύσαρκων ηλικιωμένων γυναικών και αντρών ($P=0,007$).

Η μέση συστολική αρτηριακή πίεση στο δείγμα των ηλικιωμένων εθελοντών ήταν $140,6 \pm 18,3$ mm Hg και η διαστολική πίεση $77,9 \pm 10,4$ mm Hg (**Πίνακας 3.2**). Οι άντρες είχαν αυξημένες τιμές συστολικής και διαστολικής αρτηριακής πίεσης σε σχέση με τις γυναίκες (**Πίνακας 3.2** και **Εικόνα 3.6**).



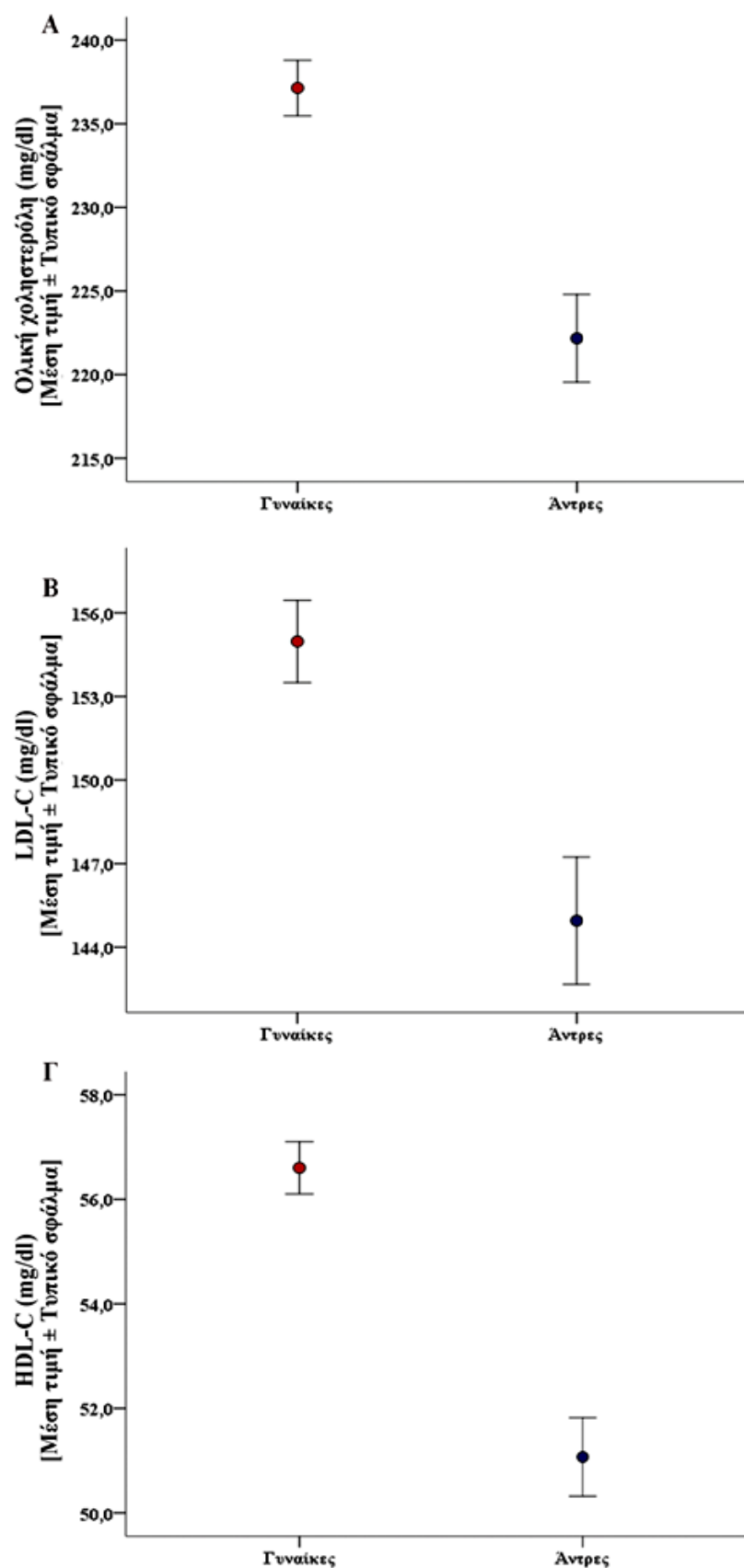
Εικόνα 3.6. Τιμές συστολικής (**A**) και διαστολικής (**B**) αρτηριακής πίεσης μεταξύ ηλικιωμένων γυναικών και αντρών ($P=0,029$ και $P=0,005$ αντίστοιχα).

Τα επίπεδα των γλυκαιμικών δεικτών (γλυκόζη και ινσουλίνη νηστείας, Homa-B και Homa-IR) στο σύνολο του δείγματος και ανά φύλο παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.2**. Οι άντρες είχαν αυξημένα επίπεδα γλυκόζης νηστείας και μειωμένα επίπεδα Homa-B σε σχέση με τις γυναίκες (**Εικόνα 3.7**), ενώ δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στα επίπεδα ινσουλίνης νηστείας και Homa-IR (**Πίνακας 3.2**).



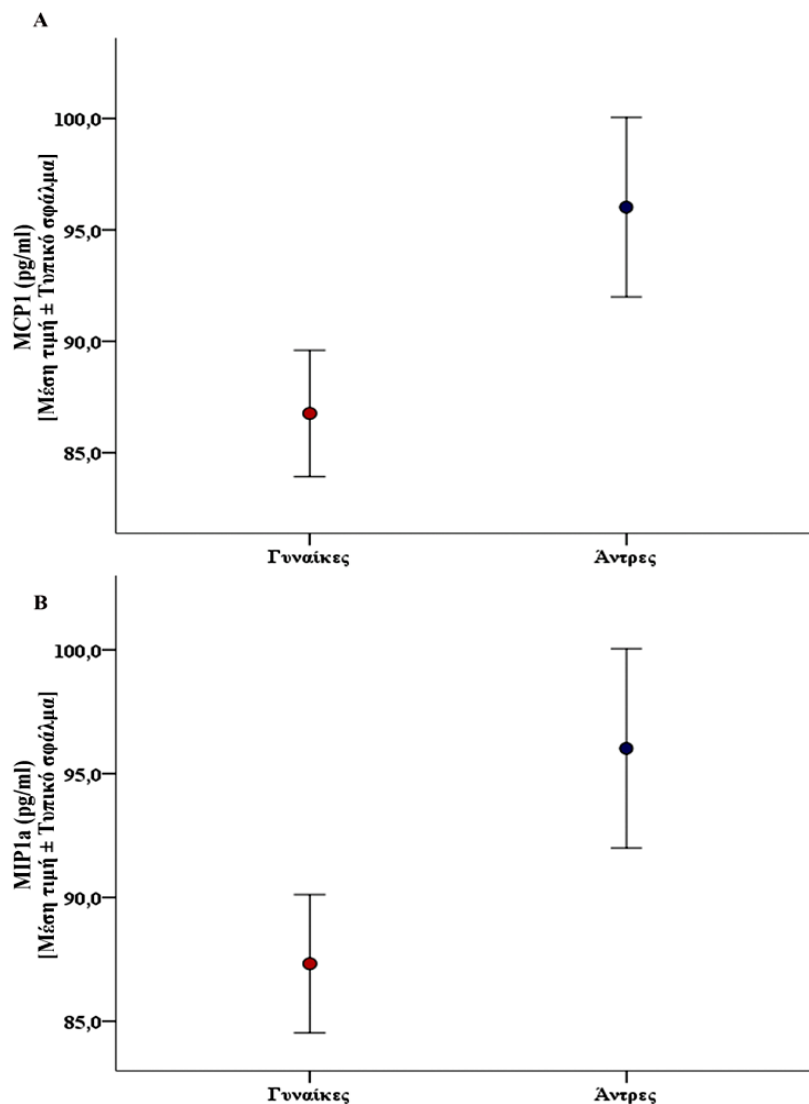
Εικόνα 3.7. Επίπεδα γλυκόζης νηστείας (A) και Homa-B (B) μεταξύ ηλικιωμένων γυναικών και αντρών ($P=0,002$ και $P=0,005$ αντίστοιχα).

Τα επίπεδα λιπιδίων στο σύνολο των ηλικιωμένων και ανά φύλο καταγράφονται στον **Πίνακα 3.2**. Οι γυναίκες εμφάνιζαν υψηλότερα επίπεδα ολικής χοληστερόλης, LDL-C και HDL-C σε σχέση με τους άντρες (**Εικόνα 3.8**), ενώ δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές στα επίπεδα τριγλυκεριδίων και οξειδωμένης LDL-C.



Εικόνα 3.8. Επίπεδα ολικής χοληστερόλης (A), LDL-C (B) και HDL-C (Γ) μεταξύ ηλικιωμένων γυναικών και αντρών ($P=3,6 \times 10^{-5}$, $P=0,005$ και $P=1,3 \times 10^{-7}$ αντίστοιχα).

Στον **Πίνακα 3.3** παρουσιάζονται τα επίπεδα φλεγμονωδών, βιοχημικών και αιματολογικών δεικτών στην υποομάδα 250 ηλικιωμένων εθελοντών. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα δύο φύλα για τους δείκτες φλεγμονής, εκτός από τις MCP1 και MIP1a, όπου οι άντρες εμφάνιζαν αυξημένα επίπεδα σε σχέση με τις γυναίκες (**Εικόνα 3.9**). Η μέση τιμή του ψευδαργύρου πλάσματος στο δείγμα των ηλικιωμένων ήταν $11,4 \pm 1,6$ μM , χωρίς σημαντική διαφορά ανάμεσα σε άντρες και γυναίκες. **Ανεπάρκεια ψευδαργύρου** πλάσματος ($\leq 10,5$ μM) καταγράφηκε στο **27,7%** του δείγματος των ηλικιωμένων (25,6% στις γυναίκες και 31,2% στους άντρες). Αναφορικά με τους υπόλοιπους βιοχημικούς δείκτες, υπήρχαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα δύο φύλα για τα επίπεδα ολικής χολερυθρίνης, SGPT, κρεατινίνης και αλβουμίνης, καθώς για κάποιους αιματολογικούς δείκτες (**Πίνακας 3.3**).



Εικόνα 3.9. Επίπεδα MCP1 (**A**) και MIP1a (**B**) μεταξύ ηλικιωμένων γυναικών και αντρών ($P=0,037$ και $P=0,045$ αντίστοιχα).

Πίνακας 3.3. Επίπεδα φλεγμονωδών, βιοχημικών και αιματολογικών δεικτών σε υποπληθυσμό (N=250) των ηλικιωμένων εθελοντών.

Χαρακτηριστικό	Σύνολο	Γυναίκες	Άντρες	P*
N	250	157	93	
Ηλικία (έτη)	73,8 (7,5) ¹	72,6 (7,2)	75,8 (7,5)	0,001
Φλεγμονώδεις δείκτες				
IL-6 (pg/ml)	14,3 (9,3)	13,7 (5,2)	15,2 (13,6)	0,47
IL-8 (pg/ml)	8,8 (5,1)	8,8 (4,3)	8,8 (6,1)	0,67
TNF-α (pg/ml)	59,2 (25,7)	60,1 (27,0)	57,8 (23,5)	0,51
MCP1 (pg/ml)	90,2 (36,9)	86,8 (35,4)	96,0 (38,8)	0,037
MIP1a (pg/ml)	90,6 (36,5)	87,3 (34,8)	96,0 (38,8)	0,045
RANTES (ng/ml)	6,4 (4,9)	6,4 (4,4)	6,2 (5,7)	0,49
Βιοχημικοί δείκτες				
Zn πλάσματος (μM)	11,4 (1,6)	11,5 (1,5)	11,4 (1,8)	0,98
Ανεπάρκεια Zn (≤10,5 μM)	27,7 ²	25,6	31,2	0,515
Ολική χολερυθρίνη (mg/dl)	0,6 (0,3)	0,5 (0,3)	0,6 (0,3)	2,2x10⁻⁴
SGOT (IU/L)	25,3 (6,8)	24,7 (5,8)	26,2 (8,1)	0,076
SGPT (IU/L)	36,1 (8,0)	34,8 (6,7)	38,1 (9,5)	0,001
Κρεατινίνη (mg/dl)	0,8 (0,3)	0,7 (0,2)	0,9 (0,2)	9,4x10⁻⁹
Αλβουμίνη (g/dl)	4,4 (0,2)	4,4 (0,2)	4,4 (0,2)	1,6x10⁻⁴
Αιματολογικοί δείκτες				
Λευκοκύτταρα (10 ³ /ml)	6,3 (1,7)	6,3 (1,6)	6,5 (1,9)	0,53
Ουδετερόφιλα (%)	60,1 (8,7)	60,2 (8,9)	59,9 (8,4)	0,37
Λεμφοκύτταρα (%)	31,9 (8,2)	32,2 (8,5)	31,4 (7,8)	0,94
Μονοπύρρηνα (%)	4,8 (1,5)	4,5 (1,3)	5,2 (1,8)	0,006
Ιωσινόφιλα (%)	2,7 (1,6)	2,5 (1,6)	3,0 (1,7)	0,033
Βασεόφιλα (%)	0,4 (0,5)	0,4 (0,5)	0,5 (0,5)	0,73
Ερυθροκύτταρα (10 ⁶ /ml)	4,7 (0,5)	4,5 (0,5)	4,9 (0,5)	3,0x10⁻¹⁰
Αιμοπετάλια (10 ³ /ml)	233,2 (63,4)	245,0 (67,6)	213,5 (50,2)	9,9x10⁻⁵
Αιματοκρίτης (%)	41,7 (3,9)	40,4 (3,6)	44,0 (3,4)	2,1x10⁻¹⁴
Αιμοσφαιρίνη (g/dl)	13,8 (1,4)	13,3 (1,2)	14,6 (1,2)	2,7x10⁻¹⁶
TKE (mm/h)	23,1 (17,9)	26,8 (18,6)	17,0 (14,8)	2,7x10⁻⁸

¹Μέση τιμή (τυπική απόκλιση), ομοίως για όλες τις συνεχείς μεταβλητές. ²Ποσοστό (%), ομοίως για όλες τις κατηγορικές μεταβλητές. *Επίπεδο σημαντικότητας για τη σύγκριση ανάμεσα στα δύο φύλα, σταθμισμένο για την ηλικία.

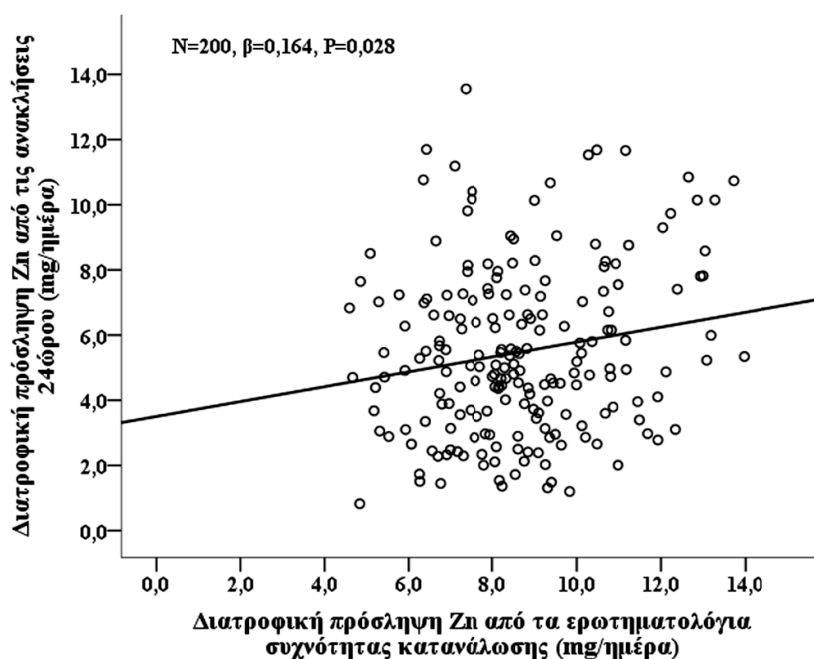
Η διατροφική πρόσληψη των ηλικιωμένων για τις κύριες ομάδες τροφίμων, ο βαθμός υιοθέτησης της Μεσογειακής διατροφής, η διατροφική πρόσληψη ψευδαργύρου (Zn) και η ενεργειακή πρόσληψη παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.4**.

Πίνακας 3.4. Εκτιμώμενη διατροφική πρόσληψη των ηλικιωμένων εθελοντών.

Χαρακτηριστικό	Σύνολο	Γυναίκες	Άντρες	P*	P§
N	843	605	238		
Διατροφικές συνήθειες					
Επεξεργασμένα δημητριακά (μερίδες/ημέρα)	2,1 (1,8) ¹	1,9 (1,7)	2,5 (1,9)	4,4x10⁻⁵	0,008
Ολικής άλεσης δημητριακά (μερίδες/ημέρα)	1,1 (1,5)	1,1 (1,5)	1,0 (1,6)	0,53	0,07
Ελαιόλαδο (μερίδες/ημέρα)	3,6 (1,4)	3,5 (1,3)	4,0 (1,4)	6,3x10⁻⁷	0,012
Λαχανικά (μερίδες/ημέρα)	1,4 (0,6)	1,4 (0,5)	1,5 (0,6)	0,005	0,17
Φρούτα (μερίδες/ημέρα)	2,4 (1,5)	2,4 (1,5)	2,4 (1,5)	0,75	0,008
Γαλακτοκομικά (μερίδες/ημέρα)	3,2 (1,5)	3,2 (1,5)	3,3 (1,5)	0,47	0,001
Ψάρια (μερίδες/εβδομάδα)	2,3 (1,4)	2,2 (1,3)	2,5 (1,5)	0,004	0,11
Πουλερικά (μερίδες/εβδομάδα)	1,7 (1,1)	1,7 (1,0)	1,7 (1,2)	0,36	0,87
Όσπρια (μερίδες/εβδομάδα)	2,3 (1,1)	2,1 (1,0)	2,6 (1,2)	1,7x10⁻¹¹	5,1x10⁻⁶
Πατάτες (μερίδες/εβδομάδα)	1,9 (1,3)	1,8 (1,3)	2,2 (1,4)	0,004	0,036
Κόκκινο κρέας (μερίδες/εβδομάδα)	3,0 (2,4)	2,8 (1,9)	3,6 (3,3)	3,6x10⁻⁶	0,14
Γλυκά (μερίδες/εβδομάδα)	5,4 (4,8)	5,2 (4,3)	5,9 (5,7)	0,033	0,56
Αλκοόλ (ml/ημέρα)	48,1	27,7	95,1	5,3x10⁻²²	0,023
περιεκτικότητα 12g αιθανόλης/100 ml)	(94,0)	(55,4)	(137,9)		
Χρήση ελαιολάδου	96,2 ²	96,2	96,2	0,95	
Σκορ Μεσογειακής Διατροφής (0-55)	30,0	29,7	30,8	9,8x10⁻⁶	0,73
	(3,2)	(3,0)	(3,4)		
Διατροφική πρόσληψη Zn (mg/ημέρα)	8,9 (2,7)	8,7 (2,4)	9,3 (3,2)	0,001	0,07
Ανεπαρκής πρόσληψη Zn (γυναίκες ≤9, άντρες ≤11 mg/ημέρα)	67,7	62,9	78,9	1,0x10⁻⁴	1,1x10⁻¹³
Ενεργειακή πρόσληψη (kcal/ημέρα)	2145,7	1999,9	2497,2	9,1x10⁻²⁵	
	(656,6)	(572,7)	(711,8)		

¹Μέση τιμή (τυπική απόκλιση), ομοίως για όλες τις συνεχείς μεταβλητές. ²Ποσοστό (%), ομοίως για όλες τις κατηγορικές μεταβλητές. *Επίπεδο σημαντικότητας για τη σύγκριση ανάμεσα στα δύο φύλα, σταθμισμένο για την ηλικία. §Σταθμισμένο για την ηλικία και τη θερμιδική πρόσληψη.

Η διατροφική πρόσληψη ψευδαργύρου (Zn) εκτιμήθηκε στο σύνολο του δείγματος από τα ερωτηματολόγια συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων. Η εγκυρότητα της εκτίμησης αξιολογήθηκε σε μια υποομάδα 200 εθελοντών με τη χρήση διατροφικών ανακλήσεων 24-ώρου. Η μέση διατροφική πρόσληψη Zn, όπως εκτιμήθηκε από τις ανακλήσεις 24-ώρου, ήταν $5,7 \pm 2,4$ mg/ημέρα και η αντίστοιχη μέση εκτιμώμενη πρόσληψη από τα ερωτηματολόγια συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων, ήταν $8,7 \pm 2,0$ mg/ημέρα. Η εκτιμώμενη πρόσληψη από τα ερωτηματολόγια είχε θετική συσχέτιση με την πρόσληψη από τις ανακλήσεις 24-ώρου (τυποποιημένος $\beta=0,164$, $P=0,028$, σταθμισμένο για την ηλικία και το φύλο), όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3.10**.

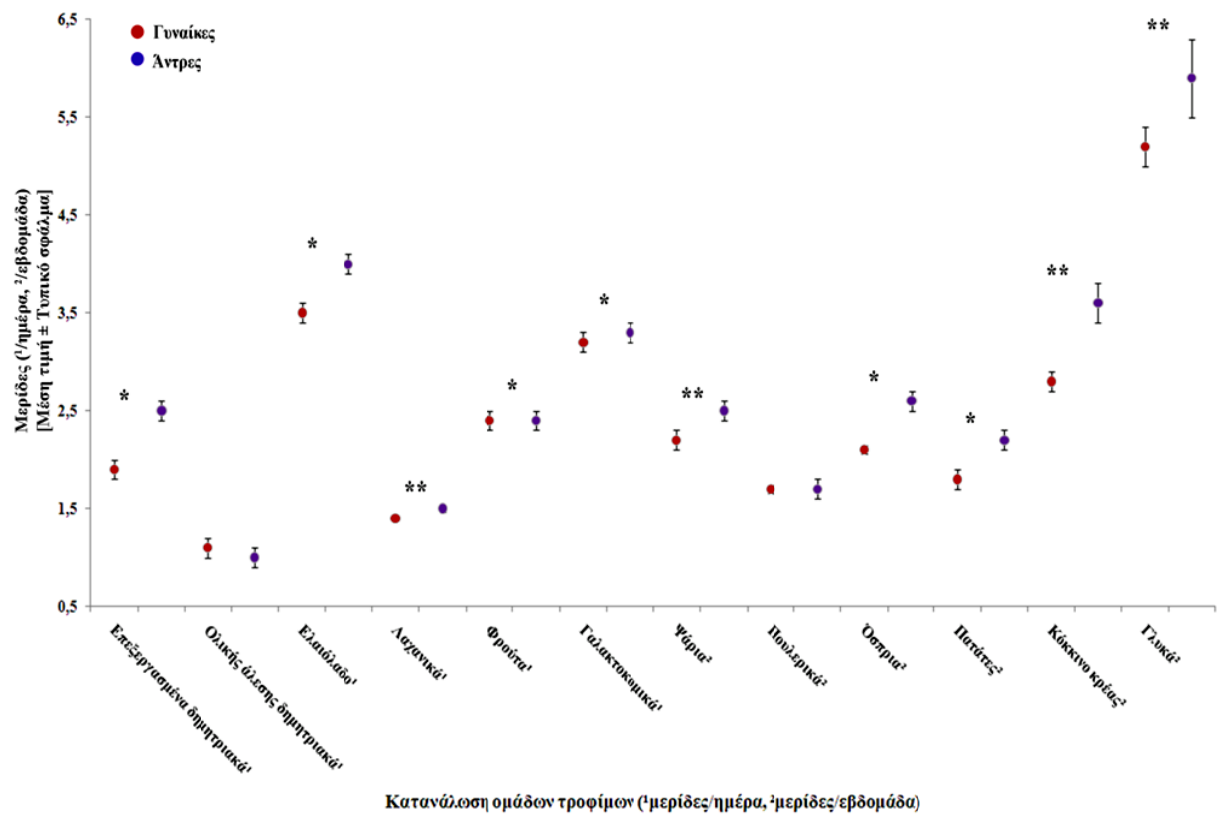


Εικόνα 3.10. Θετική συσχέτιση της εκτίμησης της διατροφικής πρόσληψης Zn από τα ερωτηματολόγια συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων και τις διατροφικές ανακλήσεις 24-ώρου.

Η μέση διατροφική πρόσληψη Zn, εκτιμώμενη από το ερωτηματολόγιο συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων, ήταν $8,9 \pm 2,7$ mg/ημέρα για το σύνολο των ηλικιωμένων. Το **67,7%** του δείγματος αξιολογήθηκε με **ανεπαρκή πρόσληψη Zn** (≤ 9 mg/ημέρα για τις γυναίκες και ≤ 11 mg/ημέρα για τους άντρες). Στις γυναίκες η εκτιμώμενη διατροφική πρόσληψη Zn ήταν χαμηλότερη από τους άντρες ($P=0,001$), συμπεριλαμβάνοντας την ηλικία ως συγχετικό παράγοντα, ωστόσο η διαφορά δεν παρέμεινε στατιστικά σημαντική όταν η σύγκριση σταθμίστηκε και για την συνολική ενεργειακή πρόσληψη. Αντίθετα, τα

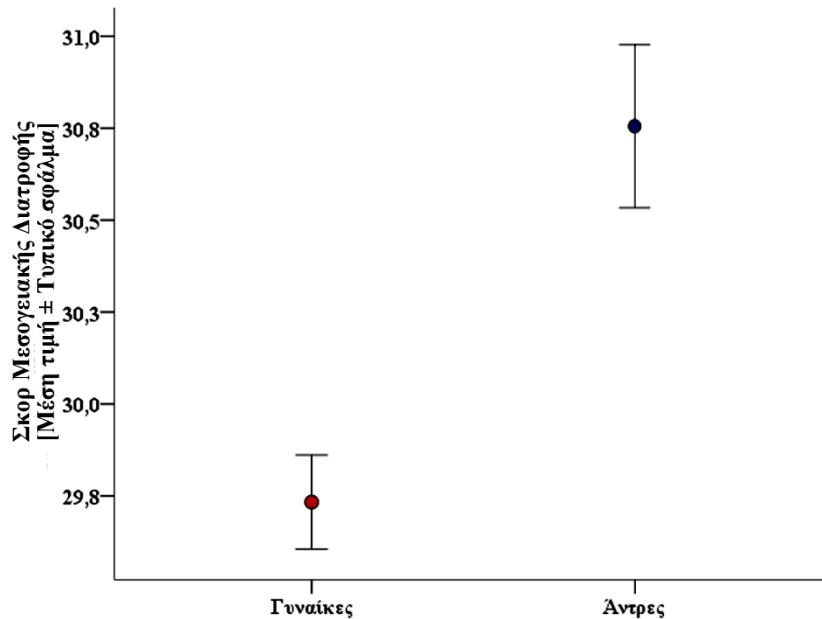
ποσοστά ανεπαρκούς πρόσληψης Zn ήταν μεγαλύτερα στους άντρες σε σχέση με τις γυναίκες. Η συνολική ενεργειακή πρόσληψη ήταν $2145,7 \pm 656,6$ kcal στο σύνολο των ηλικιωμένων, ενώ οι άντρες είχαν υψηλότερη θερμιδική πρόσληψη σε σχέση με τις γυναίκες (Πίνακας 3.4).

Οι άντρες δήλωσαν μεγαλύτερη κατανάλωση επεξεργασμένων δημητριακών, ελαιολάδου, λαχανικών, ψαριών, οσπρίων, πατάτας, κόκκινου κρέατος, γλυκών και αλκοόλ. Όταν λήφθηκε υπόψη η θερμιδική πρόσληψη, οι διαφορές στην κατανάλωση των ομάδων τροφίμων ανάμεσα στα δύο φύλα ήταν σημαντικές για επεξεργασμένα λαχανικά, το ελαιόλαδο, τα φρούτα, τα γαλακτοκομικά, τα όσπρια, τις πατάτες και το αλκοόλ (Πίνακας 3.4 και Εικόνα 3.10).



Εικόνα 3.11. Διαφορές στη διατροφική πρόσληψη των κυρίων ομάδων τροφίμων ανάμεσα σε γυναίκες και άντρες. *Στατιστικά σημαντική διαφορά σταθμισμένη για την ηλικία. **Στατιστικά σημαντική διαφορά σταθμισμένη για την ηλικία και την ενεργειακή πρόσληψη.

Ο βαθμός υιοθέτησης της Μεσογειακής διατροφής, όπως εκτιμήθηκε με τη χρήση του διατροφικού σκορ (0-55), ήταν $30,0 \pm 3,2$ για το σύνολο των ηλικιωμένων, με τους άντρες να προσεγγίζουν σε μεγαλύτερο βαθμό τη Μεσογειακή διατροφή σε σχέση με τις γυναίκες. Ωστόσο, όταν η σύγκριση σταθμίστηκε και για την ενεργειακή πρόσληψη, η διαφορά μεταξύ αντρών και γυναικών δεν παρέμεινε στατιστικά σημαντική (**Πίνακας 3.4** και **Εικόνα 3.12**).



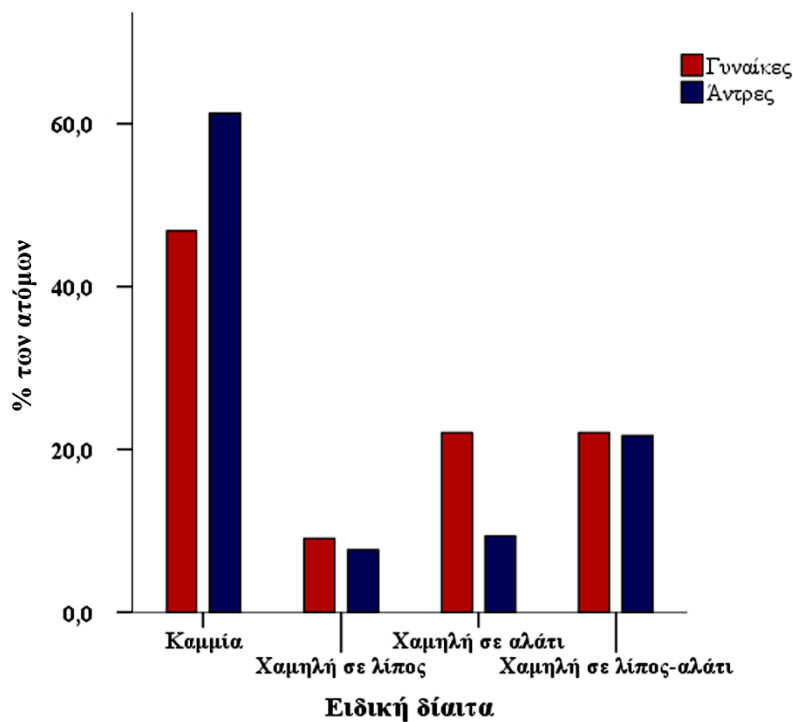
Εικόνα 3.12. Εκτίμηση του βαθμού υιοθέτησης της Μεσογειακής διατροφής μεταξύ ηλικιωμένων γυναικών και αντρών ($P=9,8 \times 10^{-6}$ σταθμισμένο για την ηλικία, $P=0,73$ σταθμισμένο για την ηλικία και την ενεργειακή πρόσληψη).

Αναφορικά με τις υπόλοιπες διατροφικές συνήθειες των ηλικιωμένων εθελοντών (**Πίνακας 3.5**), το 51,2% ανέφερε πως ακολουθεί ειδική διαίτα, το 8,6% ανέφερε πως ακολουθεί διαίτα χαμηλή σε λίπος, το 18,0% διαίτα χαμηλή σε αλάτι, ενώ το 21,9% διαίτα χαμηλή σε λίπος και σε αλάτι. Οι ηλικιωμένες γυναίκες δήλωσαν σε μεγαλύτερο ποσοστό την τήρηση ειδικής διαίτας και διαίτας χαμηλής σε αλάτι, σε σχέση με τους άντρες (**Πίνακας 3.5** και **Εικόνα 3.13**). Συνολικά, το **19,9%** των ηλικιωμένων ανέφερε την ύπαρξη **μασητικών προβλημάτων**, χωρίς σημαντική διαφορά ανάμεσα στα δύο φύλα.

Πίνακας 3.5. Διατροφικές συνήθειες των ηλικιωμένων εθελοντών.

Χαρακτηριστικό	Σύνολο	Γυναίκες	Άντρες	P*
N	843	605	238	
Ειδική διαίτα	51,2 ¹	56,3	39,2	4,8x10⁻⁵
Δίαιτα χαμηλή σε λίπος	8,6	9,1	7,7	
Δίαιτα χαμηλή σε αλάτι	18,0	22,0	9,4	1,8x10⁻⁴§
Δίαιτα χαμηλή σε λίπος και αλάτι	21,9	22,0	21,7	
Μασητικά προβλήματα	19,9	20,6	18,1	0,15

¹Ποσοστό (%), ομοίως για όλες τις κατηγορικές μεταβλητές). *Επίπεδο σημαντικότητας για τη σύγκριση ανάμεσα στα δύο φύλα, σταθμισμένο για την ηλικία. §Σταθμισμένο για την ηλικία και την παρουσία υπερχοληστερολαιμίας και υπέρτασης.



Εικόνα 3.13. Διαφορές στην τήρηση ειδικής διαίτας μεταξύ γυναικών και αντρών ($P=1,8 \times 10^{-4}$, σταθμισμένο για την ηλικία, την παρουσία υπερχοληστερολαιμίας και υπέρτασης).

Τα χαρακτηριστικά του τρόπου ζωής και οι ψυχοκοινωνικοί δείκτες των ηλικιωμένων εθελοντών παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.6**. Το μεγαλύτερο ποσοστό των εθελοντών **δεν ήταν καπνιστές (63,6%)**, το 22,2% ήταν πρώην καπνιστές, ενώ το 14,2% ήταν καπνιστές. Οι γυναίκες ήταν σε μεγαλύτερο ποσοστό μη καπνίστριες σε σχέση με τους άντρες (76,5% έναντι 30,8%), ενώ οι άντρες ήταν σε μεγαλύτερο ποσοστό πρώην καπνιστές σε σχέση με τις γυναίκες (53,2% έναντι 10,0%) (**Εικόνα 3.14**). Οι ηλικιωμένες

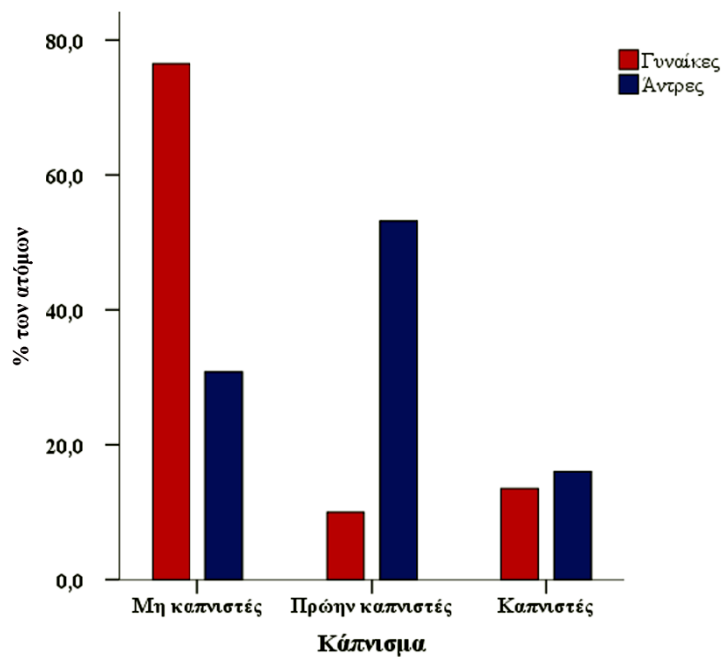
γυναίκες είχαν μεγαλύτερα επίπεδα φυσικής δραστηριότητας σε σχέση με τους άντρες ($P=4,8 \times 10^{-27}$, σταθμισμένο για την ηλικία).

Η **άνοια** παρατηρήθηκε στο **27,5%** του συνολικού δείγματος των ηλικιωμένων, ενώ το **19,3%** των εθελοντών εμφάνιζε **καταθλιπτικά συμπτώματα**. Οι γυναίκες είχαν μεγαλύτερο σκορ στην γηριατρική κλίμακα κατάθλιψης σε σχέση με τους άντρες και εμφάνιζαν σε μεγαλύτερο ποσοστό καταθλιπτικά συμπτώματα (**Πίνακας 3.6** και **Εικόνα 3.15**).

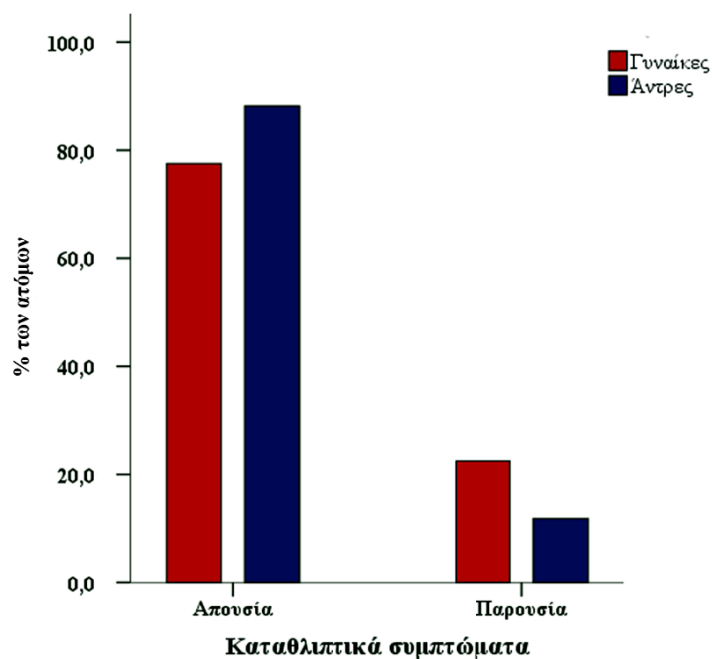
Πίνακας 3.6. Χαρακτηριστικά του τρόπου ζωής και ψυχοκοινωνικοί δείκτες των ηλικιωμένων εθελοντών.

Χαρακτηριστικό	Σύνολο	Γυναίκες	Άντρες	P*
N	843	605	238	
Τρόπος ζωής και ψυχοκοινωνικοί δείκτες				
Καπνιστικές συνήθειες				
Μη καπνιστές	63,6 ¹	76,5	30,8	
Πρώην καπνιστές	22,2	10,0	53,2	3,0x10⁻⁴⁰
Καπνιστές	14,2	13,5	16,0	
Φυσική δραστηριότητα (MET-λεπτά/εβδομάδα)	5942,8 ² (2320,3)	6574,3 (2268,8)	4481,8 (1698,2)	4,8x10⁻²⁷
Εξέταση νοητικής κατάστασης (0-30)	25,2 (4,6)	25,0 (4,7)	25,5 (4,2)	0,045§
Παρουσία άνοιας	27,5	28,2	25,8	0,52§
Γηριατρική κλίμακα κατάθλιψης (0-15)	3,7 (3,4)	4,0 (3,6)	2,9 (3,1)	0,003†
Καταθλιπτικά συμπτώματα	19,3	22,5	11,8	0,025†

¹Ποσοστό (%), ομοίως για όλες τις κατηγορικές μεταβλητές). ²Μέση τιμή (τυπική απόκλιση), ομοίως για όλες τις συνεχείς μεταβλητές. *Επίπεδο σημαντικότητας για τη σύγκριση ανάμεσα στα δύο φύλα, σταθμισμένο για την ηλικία. §Σταθμισμένο για την ηλικία και το μορφωτικό επίπεδο. †Σταθμισμένο για την ηλικία και την οικογενειακή κατάσταση.



Εικόνα 3.14. Διαφορές στις καπνιστικές συνήθειες μεταξύ γυναικών και αντρών ($P=3,0 \times 10^{-40}$, σταθμισμένο για την ηλικία).



Εικόνα 3.15. Διαφορές στην εμφάνιση καταθλιπτικών συμπτωμάτων μεταξύ γυναικών και αντρών ($P=0,0025$, σταθμισμένο για την ηλικία και την οικογενειακή κατάσταση).

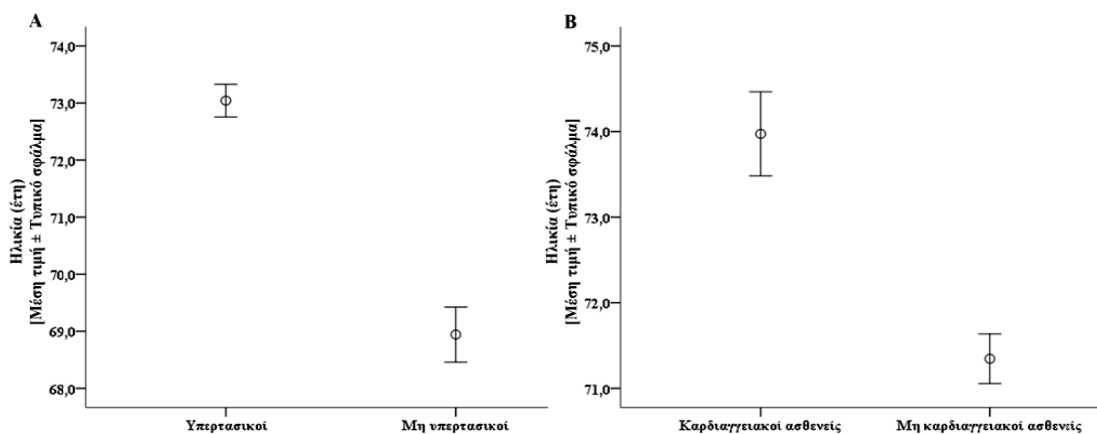
3.2 Η επίδραση της ηλικίας σε δείκτες υγείας, διατροφικές συνήθειες και παράγοντες του τρόπου ζωής

Τα αποτελέσματα των μοντέλων λογιστικής παλινδρόμησης για τον έλεγχο συσχέτισης της πιθανότητας εμφάνισης νοσημάτων με την αύξηση της ηλικίας, παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.7**. Ανάμεσα στα χαρακτηριστικά του ιατρικού ιστορικού, βρέθηκε θετική επίδραση της ηλικίας στην πιθανότητα εμφάνισης **υπέρτασης** και **καρδιαγγειακών νοσημάτων**. Όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 3.16**, οι υπερτασικοί είχαν μεγαλύτερη μέση ηλικία σε σχέση με τους μη υπερτασικούς (Μέση τιμή $\pm$ Τυπική απόκλιση: $73,0 \pm 7,0$ έναντι $68,9 \pm 7,5$ έτη αντίστοιχα, $P=2,5 \times 10^{-12}$, σταθμισμένο για το φύλο και τον Δ.Μ.Σ.), ενώ το ίδιο ίσχυε και για τους καρδιαγγειακούς ασθενείς (Μέση τιμή $\pm$ Τυπική απόκλιση: $74,0 \pm 6,3$ έναντι $71,3 \pm 7,5$ έτη αντίστοιχα, $P=0,002$, σταθμισμένο για το φύλο και τον Δ.Μ.Σ.).

Πίνακας 3.7. Συσχέτιση της ηλικίας με τον κίνδυνο εμφάνισης νοσημάτων στο σύνολο (N=843) των ηλικιωμένων εθελοντών.

Εξαρτημένη μεταβλητή	Λόγος πιθανοτήτων* (95% διαστήματα εμπιστοσύνης)	P
Ιατρικό ιστορικό		
Υπέρταση ¹	0,925 (0,90; 0,95)	$4,9 \times 10^{-11}$§
Σακχαρώδης Διαβήτης 2 ¹	0,987 (0,96; 1,01)	0,33§
Υπερχοληστερολαιμία ¹	1,023 (0,99; 1,05)	0,11†
Καρδιαγγειακά νοσήματα ¹	0,962 (0,94; 0,99)	0,002§
Έμφραγμα μυοκαρδίου ¹	0,977 (0,93; 1,02)	0,33†
Αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο ¹	0,974 (0,93; 1,02)	0,27†
Υπέρβαρο ¹	1,001 (0,97; 1,03)	0,95†
Παχυσαρκία ¹	1,012 (0,99; 1,03)	0,24†

¹Απουσία έναντι παρουσίας. *Λόγος πιθανοτήτων της επίδρασης της ηλικίας ανά έτος. §Σταθμισμένο για το φύλο και τον Δ.Μ.Σ. †Σταθμισμένο για το φύλο.



Εικόνα 3.16. Διαφορές στη μέση ηλικία μεταξύ Α) υπερτασικών και μη υπερτασικών και Β) καρδιαγγειακών και μη καρδιαγγειακών ασθενών.

Παράλληλα, η αύξηση της ηλικίας σχετίστηκε με αυξημένα επίπεδα **συστολικής αρτηριακής πίεσης** στο σύνολο των εθελοντών ($P=2,3 \times 10^{-5}$), ενώ η αντίστοιχη συσχέτιση για την διαστολική αρτηριακή πίεση ήταν αρνητική χωρίς στατιστική σημαντικότητα (**Πίνακας 3.8**). Οι γλυκαιμικοί δείκτες δεν βρέθηκε να μεταβάλλονται με την αύξηση της ηλικίας στο δείγμα των ηλικιωμένων. Αντίθετα, τα επίπεδα **ολικής χοληστερόλης**, **LDL-C** και **οξειδωμένης LDL-C** είχαν αρνητική συσχέτιση με την αύξηση της ηλικίας ($P=0,039$; $P=0,003$; $P=0,005$, αντίστοιχα) (**Πίνακας 3.8**).

Πίνακας 3.8. Συσχέτιση της ηλικίας με σωματομετρικούς, κλινικούς, γλυκαιμικούς και λιπιδαιμικούς δείκτες στο σύνολο ($N=843$) των ηλικιωμένων εθελοντών.

Εξαρτημένη μεταβλητή	β^*	P
Σωματομετρικοί δείκτες		
Δ.Μ.Σ. (kg/m^2)	-0,046	0,19§
Κλινικοί δείκτες		
Συστολική αρτηριακή πίεση (mm Hg)	0,155	$2,3 \times 10^{-5}$†
Διαστολική αρτηριακή πίεση (mm Hg)	-0,054	0,16†
Γλυκαιμικοί δείκτες		
Γλυκόζη νηστείας (mg/dl)	0,004	0,89‡
Ινσουλίνη νηστείας (pmol/L)	-0,025	0,30**
Homa-B (%)	-0,067	0,18‡
Homa-IR	-0,028	0,22**
Λιπιδαιμικοί δείκτες		
Ολική χοληστερόλη (mg/dl)	-0,070	0,039§§
LDL-C (mg/dl)	-0,100	0,003§§
HDL-C (mg/dl)	0,004	0,90††
Τριγλυκερίδια (mg/dl)	0,054	0,12††
Οξειδωμένη LDL-C (mg/dl) ¹	-0,211	0,005§

*Τυποποιημένος συντελεστής β της επίδρασης της ηλικίας ανά έτος. §Σταθμισμένο για το φύλο. †Σταθμισμένο για το φύλο, τον Δ.Μ.Σ. και τη λήψη αντιυπερτασικής θεραπείας. ‡Σταθμισμένο για το φύλο, τον Δ.Μ.Σ. και τη λήψη αντιδιαβητικής θεραπείας. **Σταθμισμένο για το φύλο και τον Δ.Μ.Σ. §§Σταθμισμένο για το φύλο και τη λήψη αντιλιπιδαιμικής θεραπείας. ††Σταθμισμένο για το φύλο, τον Δ.Μ.Σ. και τη λήψη αντιλιπιδαιμικής θεραπείας. ¹ $N=175$ άτομα.

Ο έλεγχος συσχέτισης της ηλικίας με δείκτες φλεγμονής σε δείγμα 250 ηλικιωμένων εθελοντών, έδειξε θετική επίδραση της ηλικίας στα επίπεδα **IL-6** και **IL-8** ($P=0,015$ και $P=0,032$, αντίστοιχα), ενώ υπήρχε και τάση για αύξηση των επιπέδων **RANTES** ($P=0,06$), όπως φαίνεται στον **Πίνακα 3.9**.

Αναφορικά με τους υπόλοιπους βιοχημικούς δείκτες (**Πίνακας 3.9**), βρέθηκε αρνητική επίδραση της ηλικίας στα επίπεδα ολικής χολερυθρίνης, SGPT και αλβουμίνης ($P=0,001$, $P=0,048$ και $P=0,001$, αντίστοιχα), και θετική επίδραση στα επίπεδα κρεατινίνης ορού ($P=2,7 \times 10^{-4}$). Ανάμεσα στους αιματολογικούς δείκτες (**Πίνακας 3.9**), τα λεμφοκύτταρα, τα ερυθροκύτταρα, ο αιματοκρίτης και η αιμοσφαιρίνη φαίνονταν να μειώνονται με την αύξηση της ηλικίας ($P=6,0 \times 10^{-5}$, $P=1,3 \times 10^{-5}$, $P=0,031$ και $P=0,007$, αντίστοιχα), ενώ τα ουδετερόφιλα και η ταχύτητα καθίζησης ερυθροκυττάρων (ΤΚΕ) να αυξάνονται ($P=0,001$ και $P=2,8 \times 10^{-8}$).

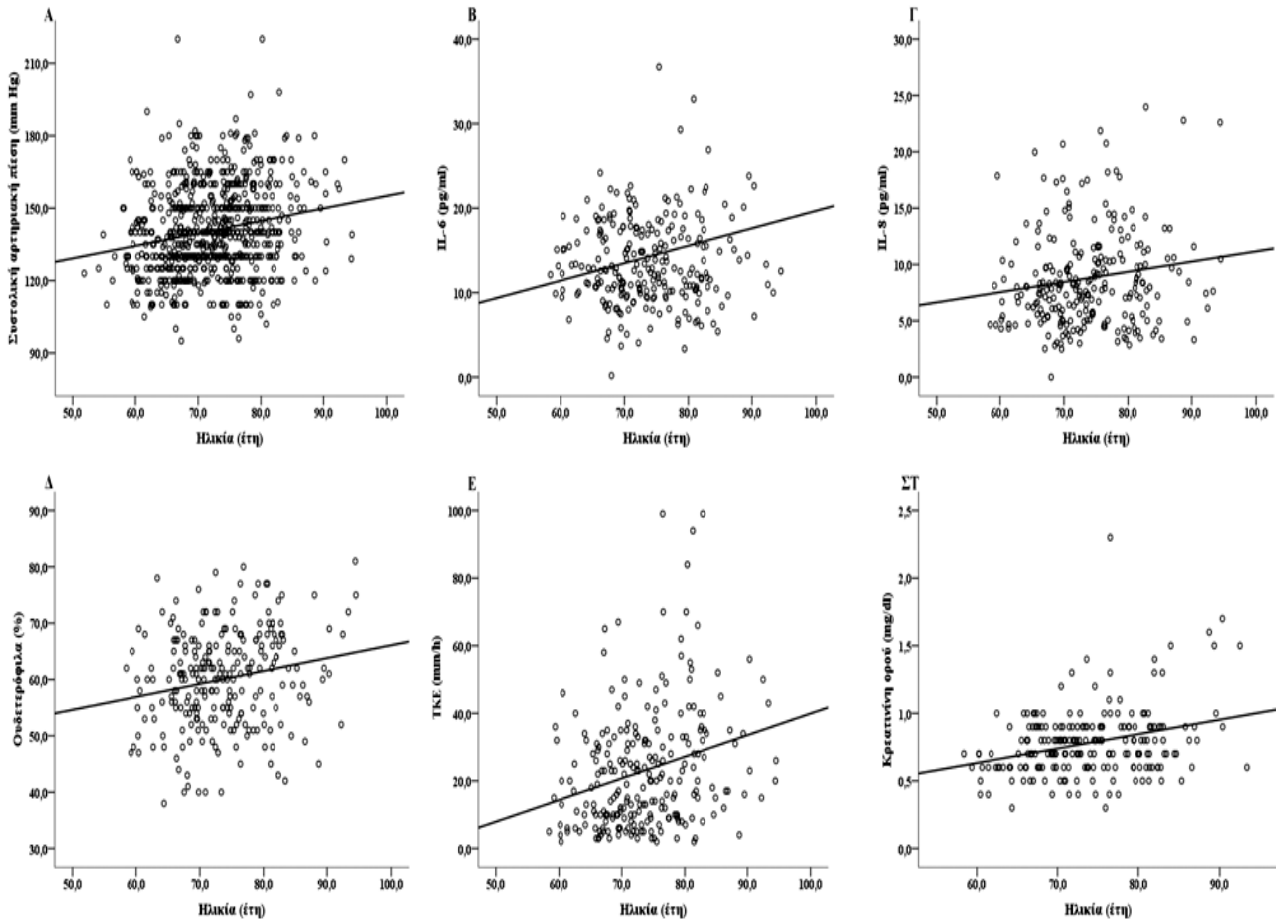
Πίνακας 3.9. Συσχέτιση της ηλικίας με φλεγμονώδεις, βιοχημικούς και αιματολογικούς δείκτες σε υποομάδα (N=250) των ηλικιωμένων εθελοντών.

Εξαρτημένη μεταβλητή	β^*	P§
Φλεγμονώδεις δείκτες		
IL-6 (pg/ml)	0,157	0,015
IL-8 (pg/ml)	0,139	0,032
TNF- α (pg/ml)	0,002	0,98
MCP1 (pg/ml)	-0,067	0,30
MIP1a (pg/ml)	-0,074	0,25
RANTES (ng/ml)	0,123	0,06
Βιοχημικοί δείκτες		
Zn πλάσματος (μM)	-0,100	0,12
Ολική χολερυθρίνη (mg/dl)	-0,220	0,001
SGOT (IU/L)	-0,060	0,39
SGPT (IU/L)	-0,136	0,048†
Κρεατινίνη (mg/dl)	0,228	$2,7 \times 10^{-4}$
Αλβουμίνη (g/dl)	-0,220	0,001
Αιματολογικοί δείκτες		
Λευκοκύτταρα (10^3 /ml)	0,057	0,38
Ουδετερόφιλα (%)	0,209	0,001
Λεμφοκύτταρα (%)	-0,258	$6,0 \times 10^{-5}$
Μονοπύρηνα (%)	0,100	0,12
Ιωσινόφιλα (%)	0,091	0,16
Βασεόφιλα (%)	-0,017	0,80
Ερυθροκύτταρα (10^6 /ml)	-0,263	$1,3 \times 10^{-5}$
Αιμοπετάλια (10^3 /ml)	0,046	0,46
Αιματοκρίτης (%)	-0,125	0,031
Αιμοσφαιρίνη (g/dl)	-0,156	0,007
ΤΚΕ (mm/h)	0,342	$2,8 \times 10^{-8}$

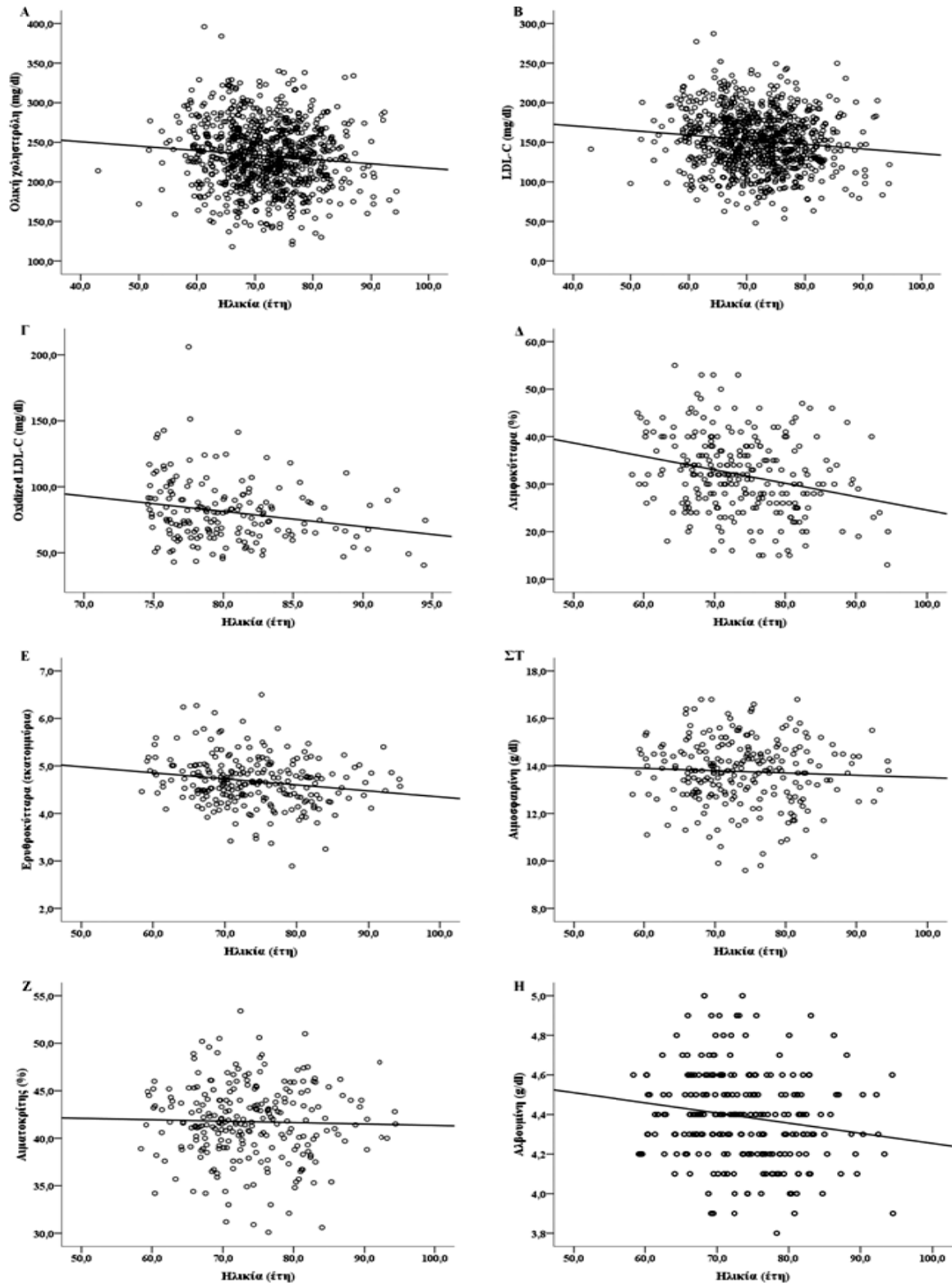
*Τυποποιημένος συντελεστής β της επίδρασης της ηλικίας ανά έτος. §Σταθμισμένο για το φύλο.

†Σταθμισμένο για το φύλο και τον Δ.Μ.Σ.

Στην **Εικόνα 3.17** συνοψίζονται οι θετικές επιδράσεις της ηλικίας στους μελετώμενους δείκτες, ενώ στην **Εικόνα 3.18** συνοψίζονται οι αρνητικές επιδράσεις της ηλικίας.



Εικόνα 3.17. Θετική επίδραση της ηλικίας στα επίπεδα **Α)** συστολικής αρτηριακής πίεσης ($N=843$, $\beta=0,155$, $P=2,3 \times 10^{-5}$), **Β)** IL-6 ($N=250$, $\beta=0,157$, $P=0,015$), **Γ)** IL-8 ($N=250$, $\beta=0,139$, $P=0,032$), **Δ)** ουδετερόφιλων ($N=250$, $\beta=0,209$, $P=0,001$), **Ε)** στην ταχύτητα καθίζησης ερυθροκυττάρων (ΤΚΕ) ($N=250$, $\beta=0,342$, $P=2,8 \times 10^{-8}$) και **ΣΤ)** στα επίπεδα κρεατινίνης ορού ($N=250$, $\beta=0,228$, $P=2,7 \times 10^{-4}$).



Εικόνα 3.18. Αρνητική επίδραση της ηλικίας στα επίπεδα **A)** ολικής χοληστερόλης ($N=843$, $\beta=-0,070$, $P=0,039$), **B)** LDL-C ($N=250$, $\beta=-0,100$, $P=0,003$), **Γ)** οξειδωμένης LDL-C ($N=175$, $\beta=-0,211$, $P=0,005$), **Δ)** λεμφοκυττάρων ($N=250$, $\beta=-0,258$, $P=6,0 \times 10^{-5}$), **E)** ερυθροκυττάρων ($N=250$, $\beta=-0,263$, $P=1,3 \times 10^{-5}$), **ΣΤ)** αιμοσφαιρίνης ($N=250$, $\beta=-0,156$, $P=0,007$), **Z)** αιματοκρίτη ($N=250$, $\beta=-0,125$, $P=0,031$) και **H)** αλβουμίνης ($N=250$, $\beta=-0,220$, $P=0,001$).

Στον **Πίνακα 3.10** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των ελέγχων συσχέτισης της ηλικίας με τις διατροφικές συνήθειες, τα στοιχεία του τρόπου ζωής και τους ψυχοκοινωνικούς δείκτες στο σύνολο των ηλικιωμένων εθελοντών. Ο βαθμός υιοθέτησης της Μεσογειακής διατροφής και η διατροφική πρόσληψη ψευδαργύρου επηρεάζονταν αρνητικά, αλλά όχι σημαντικά από την αύξηση της ηλικίας. Αντίθετα, **η ενεργειακή πρόσληψη και τα επίπεδα φυσικής δραστηριότητας** σημείωναν σημαντική μείωση με την αύξηση της ηλικίας (**Πίνακας 3.10** και **Εικόνα 3.19**).

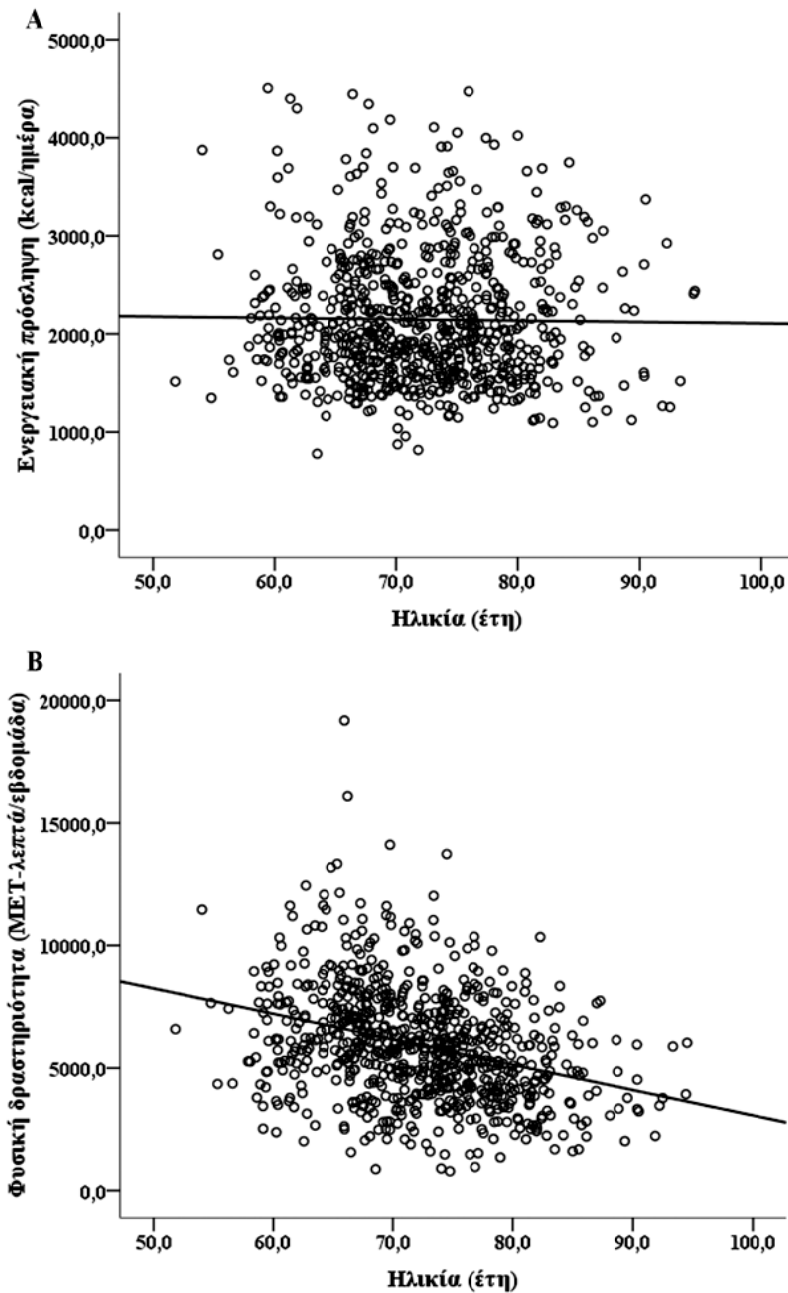
Πίνακας 3.10. Συσχέτιση της ηλικίας με διατροφικές συνήθειες, στοιχεία του τρόπου ζωής και ψυχοκοινωνικούς δείκτες στο σύνολο (N=843) των ηλικιωμένων εθελοντών.

Εξαρτημένη μεταβλητή	β^*	P
Διατροφικές συνήθειες		
Σκορ Μεσογειακής Διατροφής (0-55)	-0,057	0,19§
Διατροφική πρόσληψη Zn (mg/ημέρα)	-0,062	0,09§
Ενεργειακή πρόσληψη (kcal/ημέρα)	-0,097	0,005§
Τρόπος ζωής και ψυχοκοινωνικοί δείκτες		
Φυσική δραστηριότητα (MET-λεπτά/εβδομάδα)	-0,240	3,2x10⁻¹³§
Εξέταση νοητικής κατάστασης (0-30)	-0,175	2,0x10⁻⁷†
Γηριατρική κλίμακα κατάθλιψης (0-15)	0,100	0,007‡
	Λόγος πιθανοτήτων** (95% διαστήματα εμπιστοσύνης)	P
Διατροφικές συνήθειες		
Ανεπαρκής πρόσληψη Zn (γυναίκες ≤9, άντρες ≤11 mg/ημέρα) ¹	0,974 (0,94; 1,01)	0,17§
Τρόπος ζωής και ψυχοκοινωνικοί δείκτες		
Άνοια ¹	1,047 (1,02; 1,07)	2,4x10⁻⁴†
Καταθλιπτικά συμπτώματα ¹	0,979 (0,95; 1,01)	0,13‡

*Τυποποιημένος συντελεστής β της επίδρασης της ηλικίας ανά έτος. §Σταθμισμένο για το φύλο.

†Σταθμισμένο για το φύλο και το μορφωτικό επίπεδο. ‡Σταθμισμένο για το φύλο, τον Δ.Μ.Σ. και την οικογενειακή κατάσταση. **Λόγος πιθανοτήτων της επίδρασης της ηλικίας ανά έτος.

¹Απουσία έναντι παρουσίας.



Εικόνα 3.19. Αρνητική επίδραση της ηλικίας (Α) στην ενεργειακή πρόσληψη ($N=843$, $\beta=-0,097$, $P=0,005$) και (Β) στην φυσική δραστηριότητα ($N=843$, $\beta=-0,240$, $P=3,2 \times 10^{-13}$).

Η αύξηση της ηλικίας σχετίστηκε επίσης με μειωμένο σκορ στην εξέταση της νοητικής κατάστασης ($P=2,0 \times 10^{-7}$) και παράλληλα με την αυξημένη πιθανότητα παρουσίας **άνοιας** στους ηλικιωμένους ($P=2,4 \times 10^{-4}$). Επιπροσθέτως, η αύξηση της ηλικίας σχετίστηκε θετικά με μεγαλύτερα σκορ στην γηριατρική κλίμακα κατάθλιψης ($P=0,007$), χωρίς ωστόσο να υπάρχει συσχέτιση της ηλικίας με την αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης καταθλιπτικών συμπτωμάτων ($P=0,13$) (Πίνακας 3.10).

3.3 Διατροφική αξιολόγηση και εκτίμηση παραγόντων του τρόπου ζωής των ηλικιωμένων

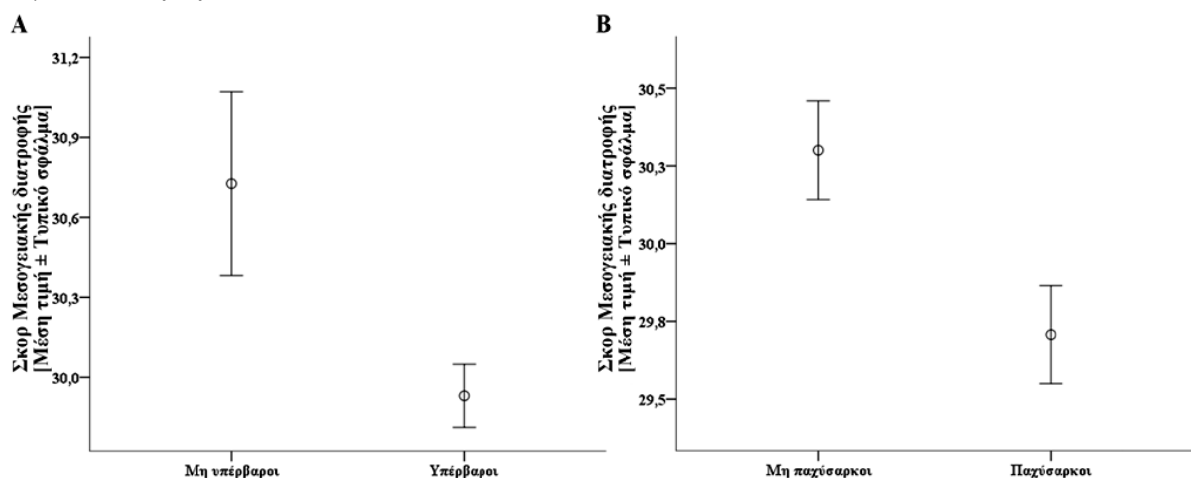
Ανάλυση της επίδρασης του βαθμού υιοθέτησης της Μεσογειακής διατροφής σε δείκτες υγείας

Στον Πίνακα 3.11 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των ελέγχων συσχέτισης του βαθμού υιοθέτησης της Μεσογειακής διατροφής με την πιθανότητα εμφάνισης νοσημάτων. Η αύξηση στο σκορ Μεσογειακής διατροφής σχετίστηκε σημαντικά με τη μειωμένη πιθανότητα εμφάνισης **υπέρβαρου** ($25,0 \leq \Delta.Μ.Σ. \leq 29,9 \text{ kg/m}^2$) και **παχυσαρκίας** ($\Delta.Μ.Σ. \geq 30,0 \text{ kg/m}^2$) στους ηλικιωμένους.

Πίνακας 3.11. Συσχέτιση του σκορ Μεσογειακής Διατροφής (0-55) με την πιθανότητα παρουσίας νοσημάτων στο σύνολο (N=843) των ηλικιωμένων εθελοντών.

Εξαρτημένη μεταβλητή	Λόγος πιθανοτήτων* (95% διαστήματα εμπιστοσύνης)	P
Ιατρικό ιστορικό		
Υπέρταση ¹	1,024 (0,97;1,08)	0,41§
Σακχαρώδης Διαβήτης 2 ¹	0,999 (0,94; 1,09)	0,98§
Υπερχοληστερολαιμία ¹	0,983 (0,92;1,05)	0,61†
Καρδιαγγειακά νοσήματα ¹	1,018 (0,96;1,08)	0,54§
Έμφραγμα μυοκαρδίου ¹	1,007 (0,91;1,12)	0,89†
Αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο ¹	1,025 (0,92;1,14)	0,65†
Υπέρβαρο ¹	1,077 (1,01;1,15)	0,027†
Παχυσαρκία ¹	1,051 (1,00;1,10)	0,036†

¹Απουσία έναντι παρουσίας. *Λόγος πιθανοτήτων της επίδρασης του σκορ Μεσογειακής διατροφής ανά μονάδα. §Σταθμισμένο για το φύλο, την ηλικία και τον Δ.Μ.Σ. †Σταθμισμένο για το φύλο και την ηλικία.



Εικόνα 3.20. Διαφορές στο βαθμό υιοθέτησης της Μεσογειακής διατροφής μεταξύ **A)** μη υπέρβαρων και υπέρβαρων και **B)** μη παχύσαρκων και παχύσαρκων ηλικιωμένων.

Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3.20**, οι μη υπέρβαροι είχαν υψηλότερο σκορ Μεσογειακής διατροφής σε σχέση με τους υπέρβαρους (Μέση τιμή $\pm$ Τυπική απόκλιση: $30,7 \pm 3,5$ έναντι $29,9 \pm 3,1$ αντίστοιχα, $P=0,026$, σταθμισμένο για το φύλο και την ηλικία), ενώ το ίδιο ίσχυε και για τους μη παχύσαρκους (Μέση τιμή $\pm$ Τυπική απόκλιση: $30,3 \pm 3,3$ έναντι $29,7 \pm 2,9$ αντίστοιχα, $P=0,037$, σταθμισμένο για το φύλο και την ηλικία).

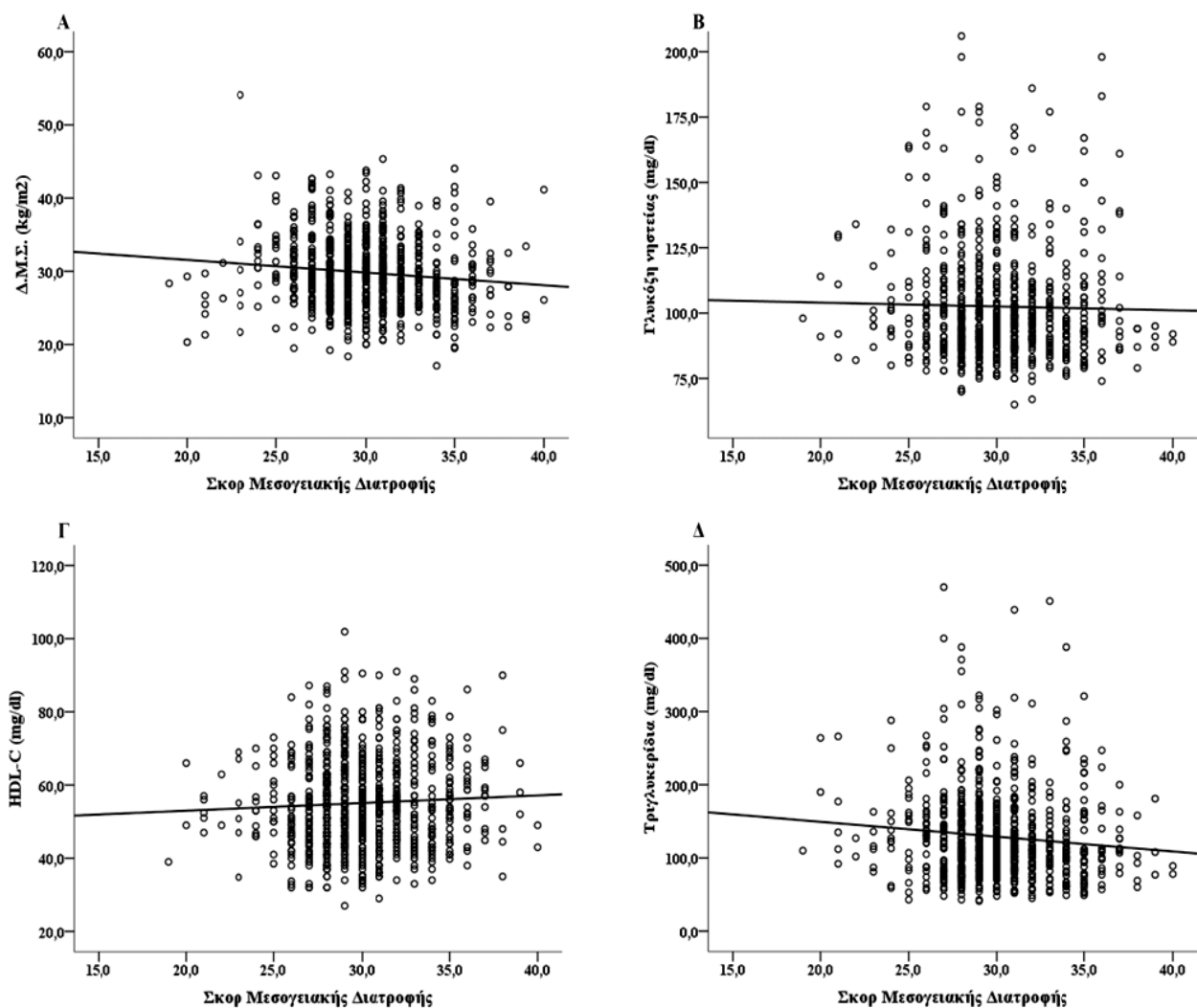
Στον **Πίνακα 3.12** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μοντέλων γραμμικής παλινδρόμησης για τον έλεγχο συσχέτισης του βαθμού υιοθέτησης της Μεσογειακής διατροφής με σωματομετρικούς, κλινικούς, γλυκαιμικούς και λιπιδαιμικούς δείκτες στο σύνολο των ηλικιωμένων εθελοντών.

Πίνακας 3.12. Συσχέτιση του σκορ Μεσογειακής Διατροφής (0-55) με σωματομετρικούς, κλινικούς, γλυκαιμικούς και λιπιδαιμικούς δείκτες στο σύνολο (N=843) των ηλικιωμένων εθελοντών.

Εξαρτημένη μεταβλητή	β^*	<i>P</i>
Σωματομετρικοί δείκτες		
Δ.Μ.Σ. (kg/m ²)	-0,094	0,008§
Κλινικοί δείκτες		
Συστολική αρτηριακή πίεση (mm Hg)	-0,043	0,22†
Διαστολική αρτηριακή πίεση (mm Hg)	-0,005	0,88†
Γλυκαιμικοί δείκτες		
Γλυκόζη νηστείας (mg/dl)	-0,073	0,018‡
Ινσουλίνη νηστείας (pmol/L)	-0,004	0,91**
Homa-B (%)	0,034	0,54‡
Homa-IR	-0,010	0,19**
Λιπιδαιμικοί δείκτες		
Ολική χοληστερόλη (mg/dl)	0,004	0,90§§
LDL-C (mg/dl)	0,010	0,77§§
HDL-C (mg/dl)	0,073	0,038††
Τριγλυκερίδια (mg/dl)	-0,102	0,005††

*Τυποποιημένος συντελεστής β της επίδρασης του σκορ Μεσογειακής διατροφής ανά μονάδα. §Σταθμισμένο για το φύλο και την ηλικία. †Σταθμισμένο για το φύλο, την ηλικία, τον Δ.Μ.Σ. και τη λήψη αντιυπερτασικής θεραπείας. ‡Σταθμισμένο για το φύλο, την ηλικία, τον Δ.Μ.Σ. και τη λήψη αντιδιαβητικής θεραπείας. **Σταθμισμένο για το φύλο, την ηλικία και τον Δ.Μ.Σ. §§Σταθμισμένο για το φύλο, την ηλικία και τη λήψη αντιλιπιδαιμικής θεραπείας. ††Σταθμισμένο για το φύλο, την ηλικία, τον Δ.Μ.Σ. και τη λήψη αντιλιπιδαιμικής θεραπείας.

Η επίδραση του βαθμού υιοθέτησης της Μεσογειακής διατροφής ήταν αρνητική στα επίπεδα του **δείκτη μάζας σώματος (Δ.Μ.Σ.)**, της **γλυκόζης νηστείας**, των επιπέδων **τριγλυκεριδίων** και θετική στα επίπεδα **HDL-C**. Συγκεκριμένα, εκτιμήθηκε πως η αύξηση του σκορ της Μεσογειακής διατροφής ανά 1 μονάδα, προκαλούσε μείωση κατά 0,094 kg/m² στα επίπεδα Δ.Μ.Σ. ($P=0,008$), κατά 0,073 mg/dl στα επίπεδα γλυκόζης νηστείας ($P=0,018$), κατά 0,102 mg/dl στα επίπεδα τριγλυκεριδίων ($P=0,038$) και αύξηση κατά 0,073 mg/dl στα επίπεδα HDL-C ($P=0,005$). Οι σημαντικές συσχετίσεις του βαθμού υιοθέτησης της Μεσογειακής διατροφής απεικονίζονται στην **Εικόνα 3.21**.



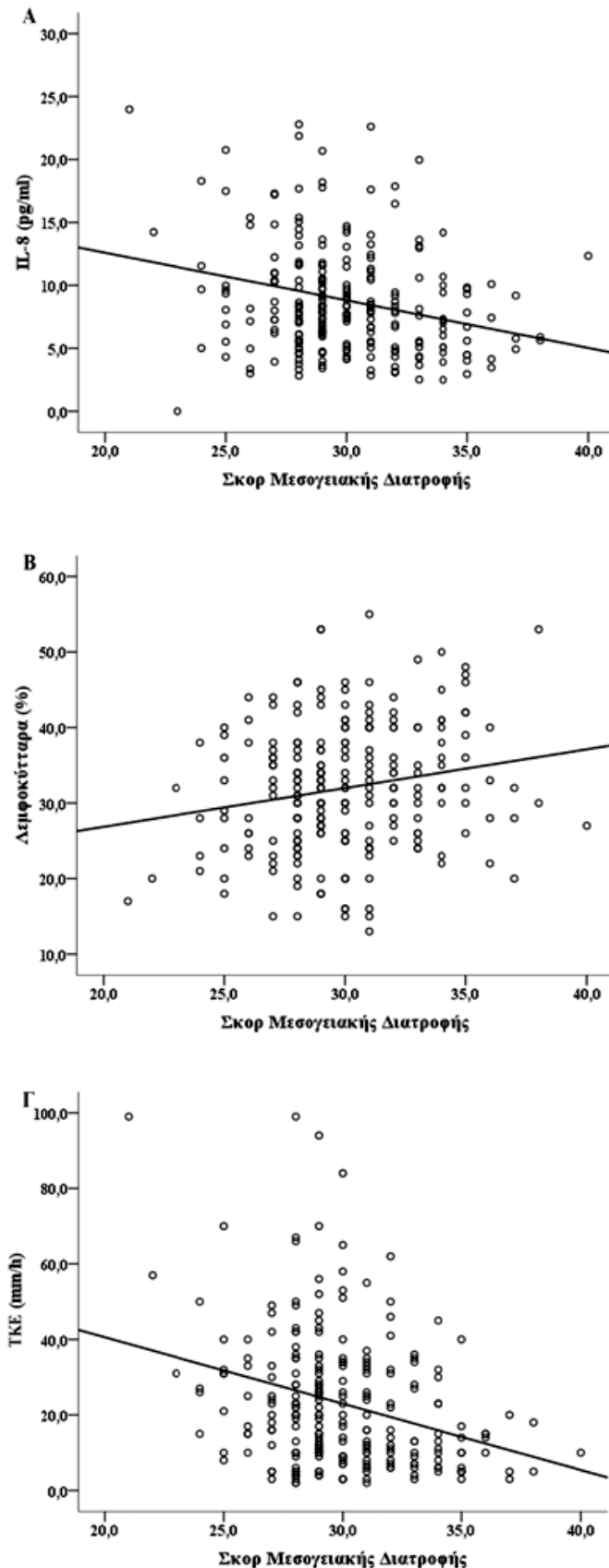
Εικόνα 3.21. Επίδραση του βαθμού υιοθέτησης της Μεσογειακής διατροφής στα επίπεδα (Α) Δ.Μ.Σ., (Β) γλυκόζης νηστείας, (Γ) HDL-C και (Δ) τριγλυκεριδίων.

Αντίστοιχα, στον **Πίνακα 3.13** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μοντέλων γραμμικής παλινδρόμησης για τον έλεγχο συσχέτισης του βαθμού υιοθέτησης της Μεσογειακής διατροφής με φλεγμονώδεις, βιοχημικούς και αιματολογικούς δείκτες. Η επίδραση της Μεσογειακής διατροφής ήταν σημαντικά αρνητική για τα επίπεδα **IL-8**, **κρεατινίνης ορού**, **ουδετερόφιλων** και **της ταχύτητας καθίζησης ερυθροκυττάρων** (TKE), ενώ σημαντικά θετική για τα επίπεδα **λεμφοκυττάρων**.

Πίνακας 3.13. Συσχέτιση του σκορ Μεσογειακής Διατροφής (0-55) με φλεγμονώδεις, βιοχημικούς και αιματολογικούς δείκτες σε υποομάδα (N=250) των ηλικιωμένων εθελοντών.

Εξαρτημένη μεταβλητή	β^*	P§
Φλεγμονώδεις δείκτες		
IL-6 (pg/ml)	-0,026	0,68
IL-8 (pg/ml)	-0,215	0,001
TNF- α (pg/ml)	0,025	0,70
MCP1 (pg/ml)	0,120	0,07
MIP1a (pg/ml)	0,097	0,14
RANTES (ng/ml)	-0,067	0,31
Βιοχημικοί δείκτες		
Zn πλάσματος (μM)	-0,081	0,22
Ολική χολερυθρίνη (mg/dl)	-0,053	0,44
SGOT (IU/L)	0,026	0,71
SGPT (IU/L)	0,008	0,90†
Κρεατινίνη (mg/dl)	-0,128	0,039
Αλβουμίνη (g/dl)	-0,036	0,57
Αιματολογικοί δείκτες		
Λευκοκύτταρα (10^3 /ml)	-0,098	0,13
Ουδετερόφιλα (%)	-0,133	0,040
Λεμφοκύτταρα (%)	0,172	0,007
Μονοπύρηνα (%)	-0,038	0,56
Ιωσινόφιλα (%)	-0,050	0,44
Βασεόφιλα (%)	-0,039	0,56
Ερυθροκύτταρα (10^6 /ml)	0,060	0,32
Αιμοπετάλια (10^3 /ml)	-0,048	0,45
Αιματοκρίτης (%)	-0,012	0,84
Αιμοσφαιρίνη (g/dl)	0,014	0,81
TKE (mm/h)	-0,209	$4,3 \times 10^{-4}$

*Τυποποιημένος συντελεστής β της επίδρασης του σκορ Μεσογειακής διατροφής ανά μονάδα. §Σταθμισμένο για το φύλο και την ηλικία. †Σταθμισμένο για το φύλο, την ηλικία και τον Δ.Μ.Σ.



Εικόνα 3.22. Επίδραση του βαθμού υιοθέτησης της Μεσογειακής διατροφής στα επίπεδα (Α) IL-8, (Β) λεμφοκυττάρων και (Γ) ΤΚΕ.

Στην **Εικόνα 3.22** παρουσιάζονται οι ισχυρότερες συσχετίσεις ανάμεσα στο βαθμό υιοθέτησης της Μεσογειακής διατροφής και σε φλεγμονώδεις και αιματολογικούς δείκτες.

Η αύξηση του σκορ της Μεσογειακής διατροφής ανά 1 μονάδα, σχετίστηκε με μείωση κατά 0,215 pg/ml στα επίπεδα IL-8 ($P=0,001$), κατά 0,209 mm/h στις τιμές ταχύτητας καθίζησης των ερυθροκυττάρων ($P=4,3 \times 10^{-4}$) και αύξηση κατά 0,172% στα λεμφοκύτταρα ($P=0,007$).

Σε σχέση με τις διατροφικές συνήθειες, τα στοιχεία του τρόπου ζωής και τους ψυχοκοινωνικούς δείκτες, βρέθηκε θετική επίδραση της Μεσογειακής διατροφής στη διατροφική πρόσληψη ψευδαργύρου και αρνητική επίδραση στην εμφάνιση καταθλιπτικών συμπτωμάτων (Πίνακας 3.14).

Πίνακας 3.14. Συσχέτιση του σκορ Μεσογειακής Διατροφής (0-55) με διατροφικές συνήθειες, στοιχεία του τρόπου ζωής και ψυχοκοινωνικούς δείκτες στο σύνολο (N=843) των ηλικιωμένων εθελοντών.

Εξαρτημένη μεταβλητή	β^*	<i>P</i>
Διατροφικές συνήθειες		
Διατροφική πρόσληψη Zn (mg/ημέρα)	0,111	0,002§
Τρόπος ζωής και ψυχοκοινωνικοί δείκτες		
Εξέταση νοητικής κατάστασης (0-30)	0,012	0,72†
Γηριατρική κλίμακα κατάθλιψης (0-15)	-0,111	0,002‡
Λόγος πιθανοτήτων** (95% διαστήματα εμπιστοσύνης)		<i>P</i>
Διατροφικές συνήθειες		
Ανεπαρκής πρόσληψη Zn (γυναίκες ≤ 9 , άντρες ≤ 11 mg/ημέρα) ¹	0,973 (0,88; 1,07)	0,58§
Τρόπος ζωής και ψυχοκοινωνικοί δείκτες		
Άνοια ¹	1,015 (0,96;1,07)	0,58†
Καταθλιπτικά συμπτώματα ¹	1,084 (1,02;1,15)	0,010‡

*Τυποποιημένος συντελεστής β της επίδρασης του σκορ Μεσογειακής διατροφής ανά μονάδα. §Σταθμισμένο για το φύλο και την ηλικία. †Σταθμισμένο για το φύλο, την ηλικία και το μορφωτικό επίπεδο. ‡Σταθμισμένο για το φύλο, την ηλικία, τον Δ.Μ.Σ. και την οικογενειακή κατάσταση. **Λόγος πιθανοτήτων της επίδρασης του σκορ Μεσογειακής διατροφής ανά μονάδα.

¹Απουσία έναντι παρουσίας.

Αξιολόγηση της διατροφικής πρόσληψης ψευδαργύρου σε σχέση με δείκτες υγείας

Η διατροφική πρόσληψη ψευδαργύρου, όπως εκτιμήθηκε από τα ερωτηματολόγια συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων σε mg/ημέρα, δεν βρέθηκε να σχετίζεται σημαντικά με την πιθανότητα εμφάνισης των νοσημάτων που αξιολογήθηκαν στο ιατρικό ιστορικό των ηλικιωμένων εθελοντών, όπως παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.15**. Παράλληλα, ο έλεγχος συσχέτισης της διατροφικής πρόσληψης ψευδαργύρου με σωματομετρικούς, κλινικούς, γλυκαιμικούς και λιπιδαιμικούς δείκτες, ανέδειξε την αρνητική επίδραση του διατροφικού ψευδαργύρου στα επίπεδα **τριγλυκεριδίων (Πίνακας 3.16)**. Συγκεκριμένα, η αύξηση της διατροφικής πρόσληψης του ιχνοστοιχείου κατά 1 mg/ημέρα προκαλούσε μείωση κατά 0,111 mg/dl στα επίπεδα τριγλυκεριδίων ($P=0,002$). Η **Εικόνα 3.23** απεικονίζει τη συσχέτιση.

Πίνακας 3.15. Συσχέτιση της διατροφικής πρόσληψης ψευδαργύρου (mg/ημέρα) με την πιθανότητα παρουσίας νοσημάτων στο σύνολο ($N=843$) των ηλικιωμένων εθελοντών.

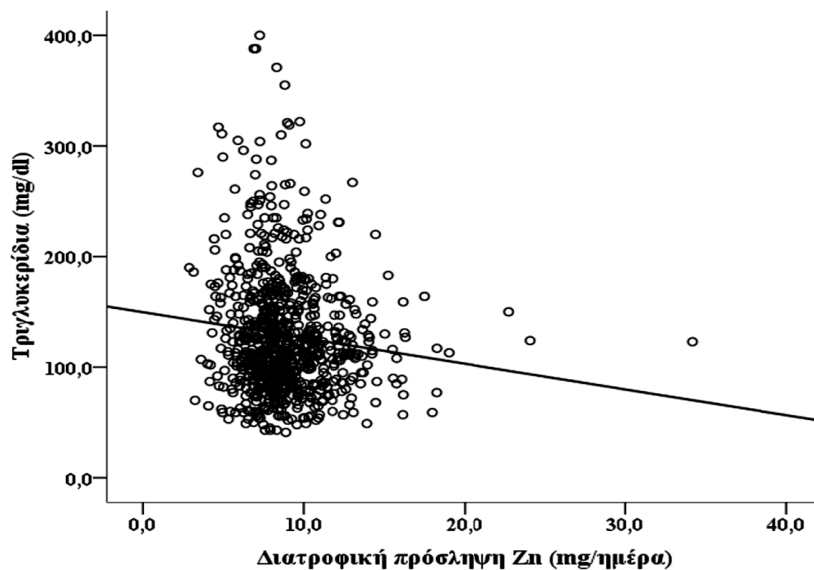
Εξαρτημένη μεταβλητή	Λόγος πιθανοτήτων* (95% διαστήματα εμπιστοσύνης)	<i>P</i>
Ιατρικό ιστορικό		
Υπέρταση ¹	1,034 (0,97;1,10)	0,29§
Σακχαρώδης Διαβήτης ²	1,011 (0,93;1,10)	0,80§
Υπερχοληστερολαιμία ¹	0,975 (0,89;1,07)	0,59†
Καρδιαγγειακά νοσήματα ¹	1,008 (0,94;1,08)	0,81§
Έμφραγμα μυοκαρδίου ¹	1,016 (0,89;1,16)	0,81†
Αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο ¹	0,991 (0,86;1,14)	0,90†
Υπέρβαρο ¹	0,978 (0,90;1,06)	0,61†
Παχυσαρκία ¹	0,936 (0,88;0,99)	0,06†

*Λόγος πιθανοτήτων της επίδρασης της διατροφικής πρόσληψης Zn ανά mg/ημέρα. §Σταθμισμένο για το φύλο, την ηλικία και τον Δ.Μ.Σ. †Σταθμισμένο για το φύλο, την ηλικία και την θερμιδική πρόσληψη. ¹Απουσία έναντι παρουσίας.

Πίνακας 3.16. Συσχέτιση της διατροφικής πρόσληψης ψευδαργύρου (mg/ημέρα) με σωματομετρικούς, κλινικούς, γλυκαιμικούς και λιπιδαιμικούς δείκτες στο σύνολο (N=843) των ηλικιωμένων εθελοντών.

Εξαρτημένη μεταβλητή	β^*	P
Σωματομετρικοί δείκτες		
Δ.Μ.Σ. (kg/m ²)	0,074	0,07§
Κλινικοί δείκτες		
Συστολική αρτηριακή πίεση (mm Hg)	0,058	0,10†
Διαστολική αρτηριακή πίεση (mm Hg)	0,027	0,46†
Γλυκαιμικοί δείκτες		
Γλυκόζη νηστείας (mg/dl)	-0,012	0,70‡
Ινσουλίνη νηστείας (pmol/L)	-0,030	0,72**
Homa-B (%)	-0,018	0,61‡
Homa-IR	-0,022	0,53**
Λιπιδαιμικοί δείκτες		
Ολική χοληστερόλη (mg/dl)	-0,026	0,45§§
LDL-C (mg/dl)	0,009	0,80§§
HDL-C (mg/dl)	-0,009	0,79††
Τριγλυκερίδια (mg/dl)	-0,111	0,002††
Οξειδωμένη LDL-C (mg/dl) ¹	0,030	0,73§

*Τυποποιημένος συντελεστής β της επίδρασης της διατροφικής πρόσληψης Zn ανά mg/ημέρα. §Σταθμισμένο για το φύλο, την ηλικία και την θερμιδική πρόσληψη. †Σταθμισμένο για το φύλο, την ηλικία, τον Δ.Μ.Σ. και τη λήψη αντιυπερτασικής θεραπείας. ‡Σταθμισμένο για το φύλο, την ηλικία, τον Δ.Μ.Σ. και τη λήψη αντιδιαβητικής θεραπείας. **Σταθμισμένο για το φύλο, την ηλικία και τον Δ.Μ.Σ. §§Σταθμισμένο για το φύλο, την ηλικία, την θερμιδική πρόσληψη και τη λήψη αντιλιπιδαιμικής θεραπείας. ††Σταθμισμένο για το φύλο, την ηλικία, τον Δ.Μ.Σ. και τη λήψη αντιλιπιδαιμικής θεραπείας. ¹N=175 άτομα.



Εικόνα 3.23. Αρνητική συσχέτιση της διατροφικής πρόσληψης Zn (mg/ημέρα) με τα επίπεδα τριγλυκεριδίων (mg/dl).

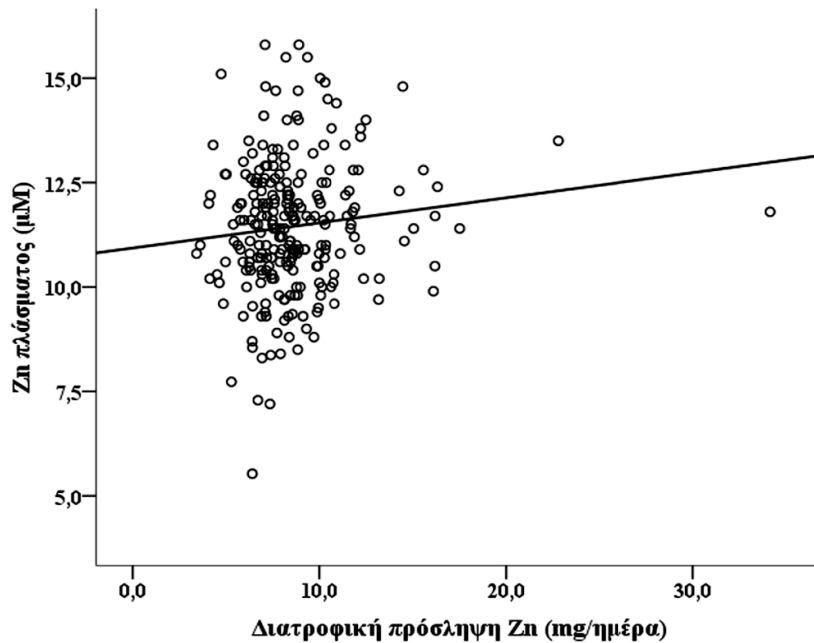
Τα αποτελέσματα των μοντέλων γραμμικής παλινδρόμησης για τον έλεγχο συσχέτισης της διατροφικής πρόσληψης ψευδαργύρου με δείκτες φλεγμονής, βιοχημικούς και αιματολογικούς δείκτες στην ομάδα 250 ηλικιωμένων εθελοντών, παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.17**. Η διατροφική πρόσληψη ψευδαργύρου φάνηκε να επηρεάζει θετικά τα επίπεδα **IL-8** και **RANTES**.

Πίνακας 3.17. Συσχέτιση της διατροφικής πρόσληψης ψευδαργύρου (mg/ημέρα) με φλεγμονώδεις, βιοχημικούς και αιματολογικούς δείκτες σε υποομάδα (N=250) των ηλικιωμένων εθελοντών.

Εξαρτημένη μεταβλητή	β^*	P§
Φλεγμονώδεις δείκτες		
IL-6 (pg/ml)	0,039	0,59
IL-8 (pg/ml)	0,184	0,011
TNF- α (pg/ml)	0,001	0,99
MCP1 (pg/ml)	-0,026	0,72
MIP1a (pg/ml)	-0,019	0,79
RANTES (ng/ml)	0,181	0,013
Βιοχημικοί δείκτες		
Zn πλάσματος (μM)	0,147	0,045
Ολική χολερυθρίνη (mg/dl)	0,046	0,54
SGOT (IU/L)	-0,075	0,35
SGPT (IU/L)	-0,031	0,64†
Κρεατινίνη (mg/dl)	0,099	0,15
Αλβουμίνη (g/dl)	0,015	0,83
Αιματολογικοί δείκτες		
Λευκοκύτταρα (10^3 /ml)	-0,043	0,56
Ουδετερόφιλα (%)	-0,031	0,67
Λεμφοκύτταρα (%)	0,028	0,69
Μονοπύρηνα (%)	-0,053	0,46
Ιωσινόφιλα (%)	0,061	0,40
Βασεόφιλα (%)	0,027	0,71
Ερυθροκύτταρα (10^6 /ml)	0,043	0,52
Αιμοπετάλια (10^3 /ml)	-0,030	0,67
Αιματοκρίτης (%)	0,059	0,37
Αιμοσφαιρίνη (g/dl)	0,045	0,48
TKE (mm/h)	0,052	0,43

*Τυποποιημένος συντελεστής β της επίδρασης της διατροφικής πρόσληψης Zn ανά mg/ημέρα.
 §Σταθμισμένο για το φύλο, την ηλικία και την θερμιδική πρόσληψη. †Σταθμισμένο για το φύλο, την ηλικία και τον Δ.Μ.Σ.

Παράλληλα, βρέθηκε θετική συσχέτιση ανάμεσα στη διατροφική πρόσληψη ψευδαργύρου και στα αντίστοιχα επίπεδά του στο πλάσμα (**Εικόνα 3.24**), εκτιμώντας αύξηση κατά 0,147 μM στα **επίπεδα πλάσματος** ανά 1 mg/ημέρα διατροφικής πρόσληψης του ιχνοστοιχείου.



Εικόνα 3.24. Θετική συσχέτιση της διατροφικής πρόσληψης Zn (mg/ημέρα) με τα επίπεδα Zn στο πλάσμα (μM).

Η ανάλυση λογιστικής παλινδρόμησης για τον έλεγχο επίδρασης της διατροφικής πρόσληψης Zn στην πιθανότητα εμφάνισης καταθλιπτικών συμπτωμάτων και έκπτωσης των γνωστικών λειτουργιών, δεν ανέδειξε σημαντικές συσχετίσεις (**Πίνακας 3.18**).

Πίνακας 3.18. Συσχέτιση της διατροφικής πρόσληψης ψευδαργύρου (mg/ημέρα) με τις διατροφικές συνήθειες, στοιχεία του τρόπου ζωής και ψυχοκοινωνικούς δείκτες στο σύνολο (N=843) των ηλικιωμένων εθελοντών.

	Λόγος πιθανοτήτων* (95% διαστήματα εμπιστοσύνης)	P
Ψυχοκοινωνικοί δείκτες		
Άνοια ¹	1,002 (0,93;1,08)	0,96§
Καταθλιπτικά συμπτώματα ¹	0,982 (0,90;1,07)	0,69†

¹ Απουσία έναντι παρουσίας. *Λόγος πιθανοτήτων της επίδρασης της διατροφικής πρόσληψης Zn ανά mg/ημέρα. §Σταθμισμένο για το φύλο, την ηλικία, την θερμιδική πρόσληψη και το μορφωτικό επίπεδο. †Σταθμισμένο για το φύλο, την ηλικία, τον Δ.Μ.Σ. και την οικογενειακή κατάσταση.

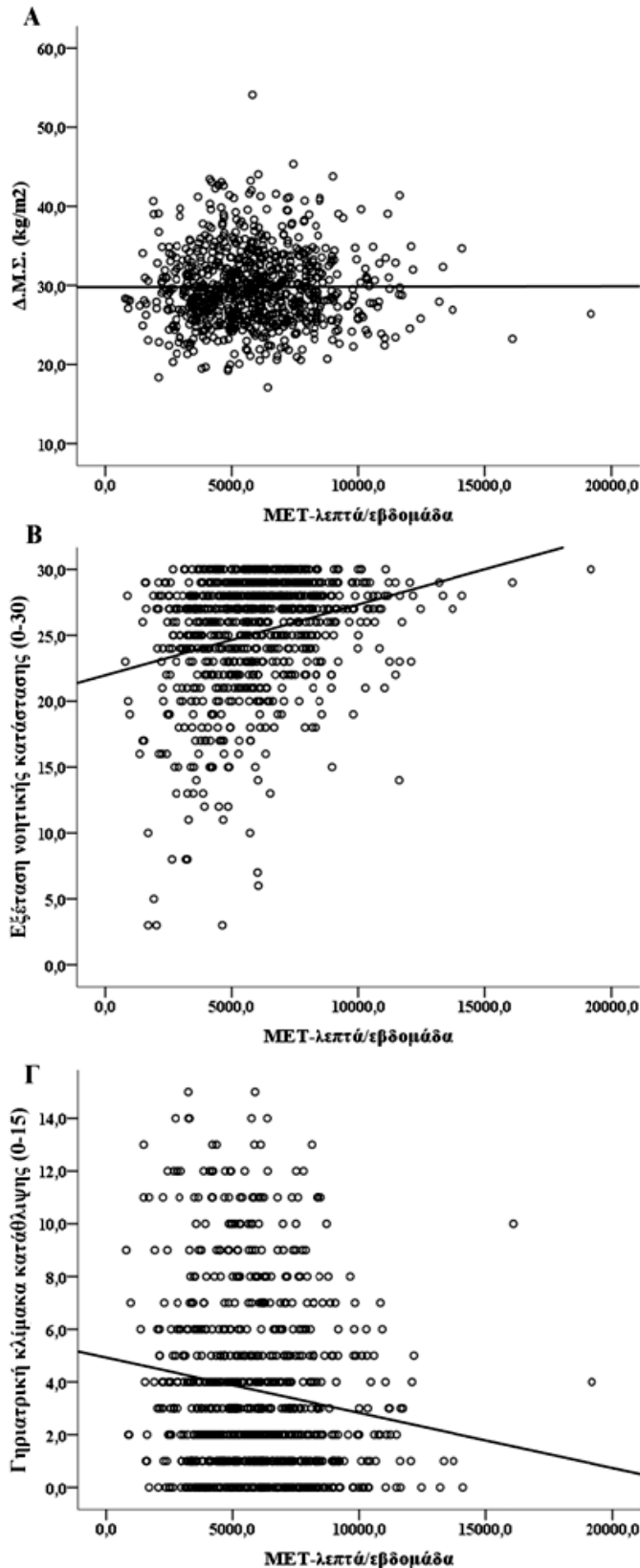
Εκτίμηση της φυσικής δραστηριότητας στον γηριατρικό πληθυσμό

Η επίδραση της φυσικής δραστηριότητας (ως MET-λεπτά/εβδομάδα) στα επίπεδα σωματομετρικών, κλινικών, γλυκαιμικών και λιπιδαιμικών δεικτών παρουσιάζεται στον **Πίνακα 3.19**. Σημαντικές συσχετίσεις εντοπίστηκαν με τον **Δ.Μ.Σ.**, το σκορ στην εξέταση της **νοητικής** κατάστασης και το σκορ στην γηριατρική κλίμακα **κατάθλιψης**.

Πίνακας 3.19. Συσχέτιση της φυσικής δραστηριότητας (MET-λεπτά/εβδομάδα) με σωματομετρικούς, κλινικούς, γλυκαιμικούς λιπιδαιμικούς και ψυχοκοινωνικούς δείκτες στο σύνολο (N=843) των ηλικιωμένων εθελοντών.

Εξαρτημένη μεταβλητή	β^*	<i>P</i>
Σωματομετρικοί δείκτες		
Δ.Μ.Σ. (kg/m ²)	-0,090	0,025§
Κλινικοί δείκτες		
Συστολική αρτηριακή πίεση (mm Hg)	0,042	0,29†
Διαστολική αρτηριακή πίεση (mm Hg)	-0,003	0,95†
Γλυκαιμικοί δείκτες		
Γλυκόζη νηστείας (mg/dl)	0,070	0,07‡
Ινσουλίνη νηστείας (pmol/L)	0,043	0,28**
Homa-B (%)	0,010	0,80‡
Homa-IR	0,047	0,24**
Λιπιδαιμικοί δείκτες		
Ολική χοληστερόλη (mg/dl)	-0,018	0,65§§
LDL-C (mg/dl)	-0,022	0,57§§
HDL-C (mg/dl)	0,018	0,64††
Τριγλυκερίδια (mg/dl)	-0,023	0,56††
Οξειδωμένη LDL-C (mg/dl) ¹	-0,038	0,64§
Ψυχοκοινωνικοί δείκτες		
Εξέταση νοητικής κατάστασης (0-30)	0,226	4,7x10⁻¹⁰***
Γηριατρική κλίμακα κατάθλιψης (0-15)	-0,208	9,9x10⁻⁸***

*Τυποποιημένος συντελεστής β της επίδρασης της φυσικής δραστηριότητας ανά MET-λεπτά/εβδομάδα. §Σταθμισμένο για το φύλο και την ηλικία. †Σταθμισμένο για το φύλο, την ηλικία, τον Δ.Μ.Σ. και τη λήψη αντιυπερτασικής θεραπείας. ‡Σταθμισμένο για το φύλο, την ηλικία, τον Δ.Μ.Σ. και τη λήψη αντιδιαβητικής θεραπείας. **Σταθμισμένο για το φύλο, την ηλικία και τον Δ.Μ.Σ. §§Σταθμισμένο για το φύλο, την ηλικία και τη λήψη αντιλιπιδαιμικής θεραπείας. ††Σταθμισμένο για το φύλο, την ηλικία, τον Δ.Μ.Σ. και τη λήψη αντιλιπιδαιμικής θεραπείας. ‡‡Σταθμισμένο για το φύλο, την ηλικία και το μορφωτικό επίπεδο. ***Σταθμισμένο για το φύλο, την ηλικία, τον Δ.Μ.Σ. και την οικογενειακή κατάσταση. ¹N=175 άτομα.



Ο δείκτης μάζας σώματος (Δ.Μ.Σ.) βρέθηκε να σχετίζεται αρνητικά με τη φυσική δραστηριότητα, με εκτιμώμενη μείωση κατά 0,090 kg/m² του Δ.Μ.Σ. με αύξηση κατά 1 MET-λεπτά/εβδομάδα της φυσικής δραστηριότητας, σε επίπεδο σημαντικότητας $P=0,025$ (Εικόνα 3.25 Α).

Το σκορ στην εξέταση νοητικής κατάστασης σχετίστηκε θετικά με τη φυσική δραστηριότητα των ηλικιωμένων ($\beta=0,226$; $P=4,7 \times 10^{-10}$) (Εικόνα 3.25 Β).

Το σκορ στη γηριατρική κλίμακα κατάθλιψης (GDS) σχετίστηκε αρνητικά με τη φυσική δραστηριότητα των ηλικιωμένων ($\beta=-0,208$; $P=9,9 \times 10^{-8}$) (Εικόνα 3.25 Γ).

Εικόνα 3.25. Συσχέτιση της φυσικής δραστηριότητας με (Α) το Δ.Μ.Σ., (Β) το σκορ στην εξέταση νοητικής κατάστασης και (Γ) το σκορ στη γηριατρική κλίμακα κατάθλιψης.

Στον **Πίνακα 3.20** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τα μοντέλα γραμμικής παλινδρόμησης για την εκτίμηση της επίδρασης της φυσικής δραστηριότητας στα επίπεδα φλεγμονωδών, βιοχημικών και αιματολογικών δεικτών. Δεν βρέθηκαν σημαντικές συσχετίσεις στην υποομάδα των 250 ηλικιωμένων εθελοντών.

Πίνακας 3.20. Συσχέτιση της φυσικής δραστηριότητας (MET-λεπτά/εβδομάδα) με φλεγμονώδεις, βιοχημικούς και αιματολογικούς δείκτες σε υποομάδα (N=250) των ηλικιωμένων εθελοντών.

Εξαρτημένη μεταβλητή	β^*	P§
Φλεγμονώδεις δείκτες		
IL-6 (pg/ml)	-0,009	0,91
IL-8 (pg/ml)	-0,020	0,79
TNF- α (pg/ml)	0,067	0,38
MCP1 (pg/ml)	0,034	0,65
MIP1a (pg/ml)	0,031	0,68
RANTES (ng/ml)	-0,026	0,73
Βιοχημικοί δείκτες		
Zn πλάσματος (μM)	0,107	0,15
Ολική χολερυθρίνη (mg/dl)	0,119	0,12
SGOT (IU/L)	0,025	0,75
SGPT (IU/L)	-0,033	0,66†
Κρεατινίνη (mg/dl)	0,013	0,85
Αλβουμίνη (g/dl)	-0,073	0,31
Αιματολογικοί δείκτες		
Λευκοκύτταρα (10^3 /ml)	-0,065	0,39
Ουδετερόφιλα (%)	0,038	0,61
Λεμφοκύτταρα (%)	0,004	0,95
Μονοπύρηνα (%)	-0,067	0,36
Ιωσινόφιλα (%)	-0,139	0,06
Βασεόφιλα (%)	0,012	0,87
Ερυθροκύτταρα (10^6 /ml)	0,023	0,74
Αιμοπετάλια (10^3 /ml)	-0,081	0,27
Αιματοκρίτης (%)	0,029	0,66
Αιμοσφαιρίνη (g/dl)	0,032	0,62
TKE (mm/h)	-0,079	0,25

*Τυποποιημένος συντελεστής β της επίδρασης της φυσικής δραστηριότητας ανά MET-λεπτά/εβδομάδα. §Σταθμισμένο για το φύλο και την ηλικία. †Σταθμισμένο για το φύλο, την ηλικία και τον Δ.Μ.Σ.

3.4 Γενετική ανάλυση

Ανάλυση της συχνότητας αλληλομόρφων και γονοτύπων

Στον Πίνακα 3.21 παρουσιάζονται οι γενετικοί δείκτες που μελετήθηκαν, οι γονότυποι, το επίπεδο σημαντικότητας για τον έλεγχο Hardy-Weinberg Equilibrium και η συχνότητα εμφάνισης του σπάνιου αλληλομόρφου (MAF) για κάθε δείκτη. Οι συχνότητες εμφάνισης των σπάνιων αλληλομόρφων κυμαίνονταν από 0,08 (rs1800629 *TNF-α*) έως 0,48 (rs7034200 *GLIS3*). Όλοι οι πολυμορφισμοί ήταν σε συμφωνία με την ισορροπία Hardy-Weinberg, εκτός από τους rs11640851 (*MT1A*) και rs10636 (*MT2A*).

Πίνακας 3.21. Χαρακτηριστικά των γενετικών δεικτών στο δείγμα των ηλικιωμένων.

SNP	Chr	Γονίδιο	Γονότυποι (N)	N	HWE <i>P</i>	MAF
rs10493846	1	<i>SEC63D1</i>	GG/GT/TT: 467/207/25	699	0,706	0,18
rs340874	1	<i>PROX1</i>	CC/CT/TT: 213/405/180	798	0,671	0,48
rs780094	2	<i>GCKR</i>	CC/CT/TT: 228/398/166	792	0,775	0,46
rs560887	2	<i>G6PC2</i>	CC/CT/TT: 400/321/69	790	0,667	0,29
rs4675095	2	<i>IRS1</i>	AA/AT/TT: 614/156/10	780	1,000	0,11
rs11717195	3	<i>ADCY5</i>	TT/TC/CC: 483/226/34	743	0,249	0,20
rs11920090	3	<i>SLC2A2</i>	TT/TA/AA: 549/207/23	779	0,510	0,16
rs11167682	5	<i>SAP30L</i>	GG/GT/TT: 466/270/41	777	0,838	0,23
rs4880	6	<i>SOD2</i>	TT/TC/CC: 63/100/49	212	0,490	0,47
rs1061581	6	<i>Hsp70-2</i>	AA/AG/GG: 103/110/19	232	0,226	0,32
rs1800629	6	<i>TNF-α</i>	GG/GA/AA: 680/111/7	798	0,320	0,08
rs1800795	7	<i>IL-6</i>	GG/GC/CC: 163/72/9	244	0,831	0,18
rs4607517	7	<i>GCK</i>	GG/GA/AA: 525/242/37	804	0,181	0,20
rs2191349	7	<i>DGKB/THEM195</i>	TT/TG/GG: 252/354/161	767	0,079	0,44
rs7034200	9	<i>GLIS3</i>	AA/AC/CC: 206/370/181	757	0,561	0,48
rs6479526	9	<i>PTPDC1</i>	CC/CT/TT: 440/278/54	772	0,291	0,25
rs457420	9	<i>BRD3</i>	CC/CT/TT: 272/367/152	791	0,167	0,42
rs10885122	10	<i>ADRA2A</i>	GG/GT/TT: 611/155/14	780	0,297	0,12
rs11605924	11	<i>CRY2</i>	CC/CA/AA: 272/388/135	795	0,884	0,41
rs7944584	11	<i>MADD</i>	AA/AT/TT: 327/344/108	779	0,276	0,36
rs174550	11	<i>FADS1</i>	TT/TC/CC: 422/298/64	784	0,279	0,27
rs10830963	11	<i>MTNR1B</i>	CC/CG/GG: 414/317/46	777	0,166	0,26
rs35767	12	<i>IGF1</i>	GG/GA/AA: 482/264/35	781	1,000	0,21
rs8052394	16	<i>MT1A</i>	AA/AG/GG: 393/139/2	534	0,002	0,13
rs11640851	16	<i>MT1A</i>	AA/AC/CC: 215/272/35	522	2,8E-05	0,33
rs1610216	16	<i>MT2A</i>	AA/AG/GG: 335/178/18	531	0,418	0,20
rs10636	16	<i>MT2A</i>	GG/GC/CC: 252/251/25	528	1,1E-04	0,29

SNP: Single Nucleotide Polymorphism, Chr: Chromosome, HWE: Hardy-Weinberg Equilibrium, MAF: Minor Allele Frequency

Οι πολυμορφισμοί rs1800629 (*TNF-α*), rs1800795 (*IL-6*), rs8052394 (*MT1A*), rs11640851 (*MT1A*) και rs10636 (*MT2A*) μελετήθηκαν με την εφαρμογή του επικρατούς

γενετικού μοντέλου (φορείς του σπάνιου αλληλομόρφου έναντι μη φορέων). Οι υπόλοιποι πολυμορφισμοί μελετήθηκαν με την εφαρμογή του προσθετικού γενετικού μοντέλου (επίδραση ανά αλληλόμορφο αναφοράς).

Εκτίμηση της συσχέτισης των γενετικών δεικτών με τον επιπολασμό νοσημάτων στους ηλικιωμένους

Ο έλεγχος συσχέτισης των πολυμορφισμών με την πιθανότητα παρουσίας νοσημάτων στο δείγμα των ηλικιωμένων εθελοντών, πραγματοποιήθηκε με μοντέλα λογιστικής παλινδρόμησης, διορθωμένα για το φύλο και την ηλικία (Μοντέλο 1) και επιπλέον για τον Δ.Μ.Σ. (Μοντέλο 2), όπου ήταν απαραίτητο. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων με επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,10$ παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.22**.

Η παρουσία υπέρτασης σχετίστηκε σημαντικά με το C αλληλόμορφο για τον πολυμορφισμό rs780094 (*GCKR*) (λόγος πιθανοτήτων: 1,293, $P=0,039$, σταθμισμένο για το φύλο, την ηλικία και τον Δ.Μ.Σ.). Ερμηνεύοντας τη συσχέτιση, οι ηλικιωμένοι με CT γονότυπο είχαν 1,293 μεγαλύτερη πιθανότητα να είναι υπέρτατικοί σε σχέση με τους TT και οι CC 2,586 σε σχέση με τους TT (προσθετικό μοντέλο). Παράλληλα, η παρουσία υπέρτασης σχετίστηκε σημαντικά με το G αλληλόμορφο για τον πολυμορφισμό rs8052394 (*MT1A*) (λόγος πιθανοτήτων: 1,670, $P=0,032$, σταθμισμένο για το φύλο, την ηλικία και τον Δ.Μ.Σ.). Ερμηνεύοντας τη συσχέτιση, οι φορείς του G αλληλομόρφου (GG και GA) είχαν 1,670 μεγαλύτερη πιθανότητα να είναι υπέρτατικοί σε σχέση με τους AA (επικρατές μοντέλο). Αντίστοιχα, **η παρουσία υπερχοληστερολαιμίας** σχετίστηκε με το T αλληλόμορφο για τον πολυμορφισμό rs4880 (*SOD2*), η παρουσία υπέρβαρου με το T αλληλόμορφο για τον πολυμορφισμό rs6479526 (*PTPDC1*) και το G αλληλόμορφο για τον πολυμορφισμό rs35767 (*IGF1*), ενώ η παχυσαρκία με C αλληλόμορφο για τον πολυμορφισμό rs457420 (*BRD3*).

Σημαντικές συσχετίσεις των γενετικών δεικτών με το **ιστορικό καρδιαγγειακού νοσήματος** καταγράφηκαν για τους πολυμορφισμούς rs11640851 (*MT1A*) και rs8052394 (*MT1A*) ($P=0,003$ και $P=0,001$ αντίστοιχα). Το **ιστορικό αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου** βρέθηκε να σχετίζεται θετικά με το C αλληλόμορφο για τον πολυμορφισμό rs1800795 (*IL-6*) και με το C αλληλόμορφο για τον πολυμορφισμό rs11640851 (*MT1A*). Η πιθανότητα **εμφάνισης ανεπάρκειας Zn** (επίπεδα πλάσματος $\leq 10,5 \mu\text{M}$) ήταν μικρότερη παρουσία του T αλληλομόρφου για τον πολυμορφισμό rs7944584 (*MADD*) και το ίδιο ίσχυε για το G αλληλόμορφο του πολυμορφισμού rs10830963 (*MTNR1B*).

Πίνακας 3.22. Συσχέτιση των πολυμορφισμών με την πιθανότητα παρουσίας νοσημάτων στο σύνολο (N=843) των ηλικιωμένων εθελοντών.

			Μοντέλο 1 (συμμεταβλητές: φύλο, ηλικία)		Μοντέλο 2 (συμμεταβλητές: φύλο, ηλικία, Δ.Μ.Σ.)	
Εξαρτημένη μεταβλητή	SNP (γονίδιο)	Αλληλόμορφο αναφοράς (συχνότητα)	Λόγος πιθανοτήτων* (95% διαστήματα εμπιστοσύνης)	P	Λόγος πιθανοτήτων* (95% διαστήματα εμπιστοσύνης)	P
Ιατρικό ιστορικό						
Υπέρταση ¹	rs780094 (<i>GCKR</i>)	C (0,54)	1,293 (1,03; 1,62)	0,026	1,276 (1,01; 1,61)	0,039
	rs457420 (<i>BRD3</i>)	C (0,58)	1,254 (1,00; 1,56)	0,045	1,189 (0,95; 1,49)	0,13
	rs1800629 ² (<i>TNF-α</i>)	G (0,92)	1,448 (0,94; 2,21)	0,08	1,401 (0,90; 2,17)	0,13
	rs8052394 ² (<i>MT1A</i>)	A (0,87)	1,601 (1,01; 2,53)	0,043	1,670 (1,04; 2,67)	0,032
Σακχαρώδης Διαβήτης 2 ¹	rs35767 (<i>IGF1</i>)	G (0,79)	1,426 (0,98; 2,05)	0,06		
Υπερχοληστερολαιμία ¹	rs4880 (<i>SOD2</i>)	T (0,53)	1,674 (1,01; 2,77)	0,045		
	rs10636 ² (<i>MT2A</i>)	G (0,72)	1,516 (0,92; 2,48)	0,10		
Καρδιαγγειακά νοσήματα ¹	rs4675095 (<i>IRS1</i>)	A (0,89)	1,601 (1,00; 2,56)	0,049	1,598 (1,00; 2,56)	0,050
	rs11920090 (<i>SLC2A2</i>)	T (0,84)	1,479 (1,01; 2,16)	0,043	1,503 (1,02; 2,20)	0,037
	rs11640851 ² (<i>MT1A</i>)	C (0,33)	1,829 (1,19; 2,79)	0,005	1,906 (1,24; 2,93)	0,003
	rs8052394 ² (<i>MT1A</i>)	G (0,13)	1,948 (1,26; 2,99)	0,002	1,985 (1,29; 3,05)	0,001
Έμφραγμα μυοκαρδίου ¹	rs11717195 (<i>ADCY5</i>)	C (0,20)	1,745 (0,98; 3,08)	0,055		
	rs11920090 (<i>SLC2A2</i>)	T (0,84)	2,623 (0,95; 7,23)	0,06		
Αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο ¹	rs11167682 (<i>SAP30L</i>)	T (0,23)	1,695 (0,96; 2,97)	0,07		
	rs1800795 ² (<i>IL-6</i>)	C (0,18)	20,280 (2,80; 146,90)	0,002		
	rs11640851 ² (<i>MT1A</i>)	C (0,33)	2,731(1,07; 6,93)	0,034		

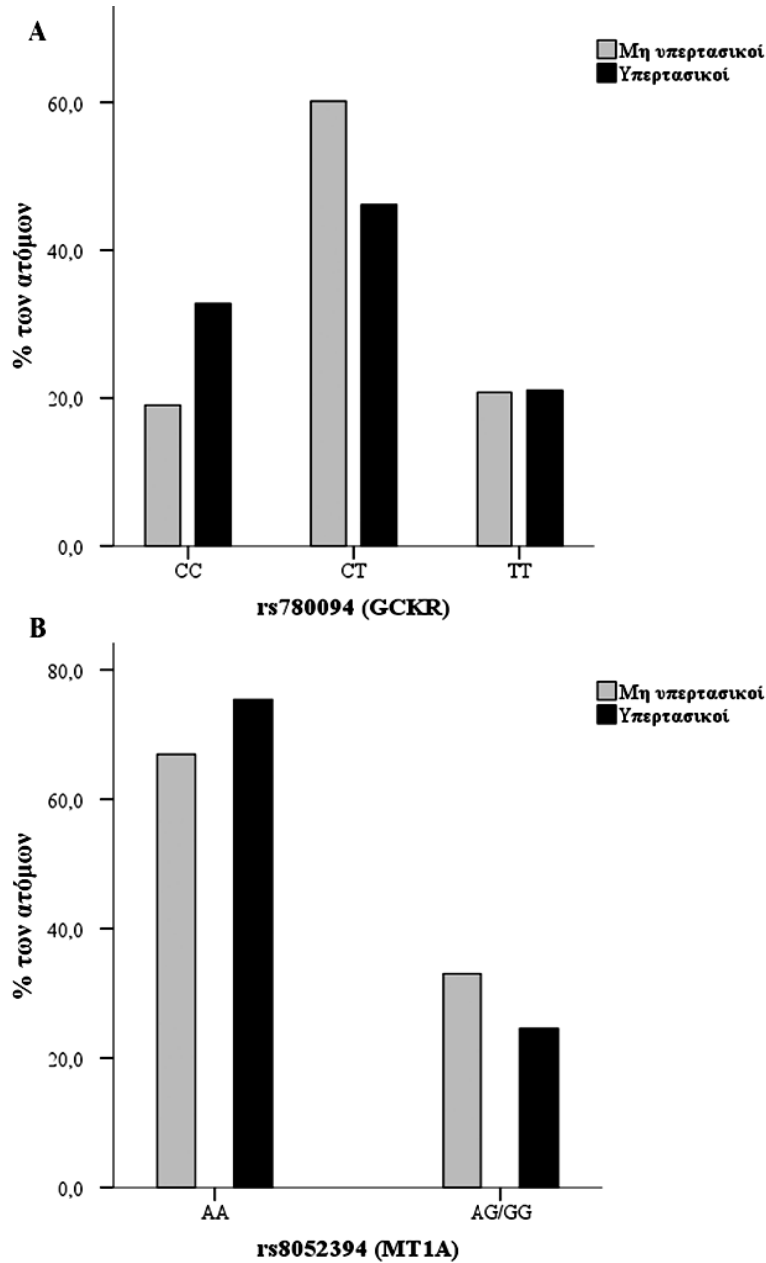
*Λόγος πιθανοτήτων της επίδρασης του πολυμορφισμού ανά αλληλόμορφο αναφοράς. ¹Απουσία έναντι παρουσίας. ²Επικρατές γενετικό μοντέλο.

³N=250.

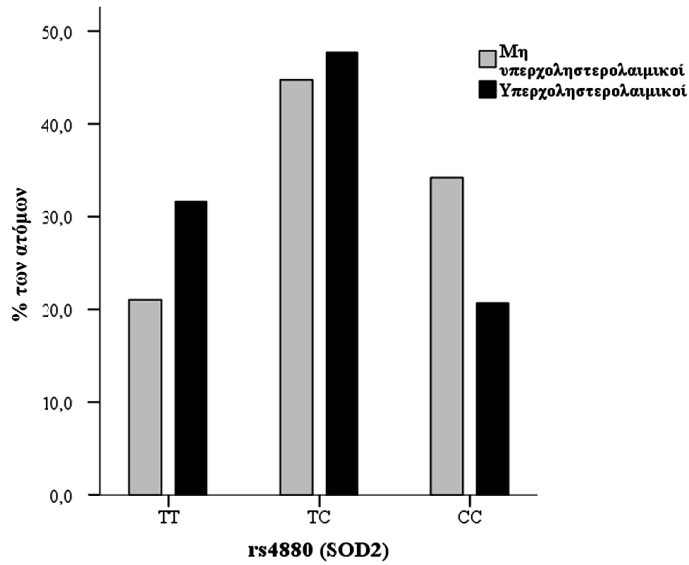
Μοντέλο 1 (συμμεταβλητές: φύλο, ηλικία)				
Εξαρτημένη μεταβλητή	SNP (γονίδιο)	Αλληλόμορφο αναφοράς (συχνότητα)	Λόγος πιθανοτήτων* (95% διαστήματα εμπιστοσύνης)	P
Υπέρβαρο ¹	rs11717195 (<i>ADCY5</i>)	T (0,80)	1,367 (0,97; 1,91)	0,07
	rs6479526 (<i>PTPDC1</i>)	T (0,25)	1,499 (1,04; 2,16)	0,029
	rs35767 (<i>IGF1</i>)	G (0,79)	1,425 (1,02; 1,99)	0,038
Παχυσαρκία ¹	rs11167682 (<i>SAP30L</i>)	T (0,23)	1,260 (0,99; 1,60)	0,06
	rs457420 (<i>BRD3</i>)	C (0,58)	1,226 (1,00; 1,49)	0,045
Ανεπάρκεια Zn ($\leq 10,5$ μM) ^{1,3}	rs780094 (<i>GCKR</i>)	C (0,54)	0,678 (0,45; 1,02)	0,06
	rs7944584 (<i>MADD</i>)	T (0,36)	0,590 (0,38; 0,92)	0,021
	rs10830963 (<i>MTNR1B</i>)	G (0,26)	0,607 (0,24; 0,37)	0,049
	rs10636 ² (<i>MT2A</i>)	C (0,28)	0,569 (0,29; 0,32)	0,056

*Λόγος πιθανοτήτων της επίδρασης του πολυμορφισμού ανά αλληλόμορφο αναφοράς. ¹Απουσία έναντι παρουσίας. ²Επικρατές γενετικό μοντέλο. ³N=250.

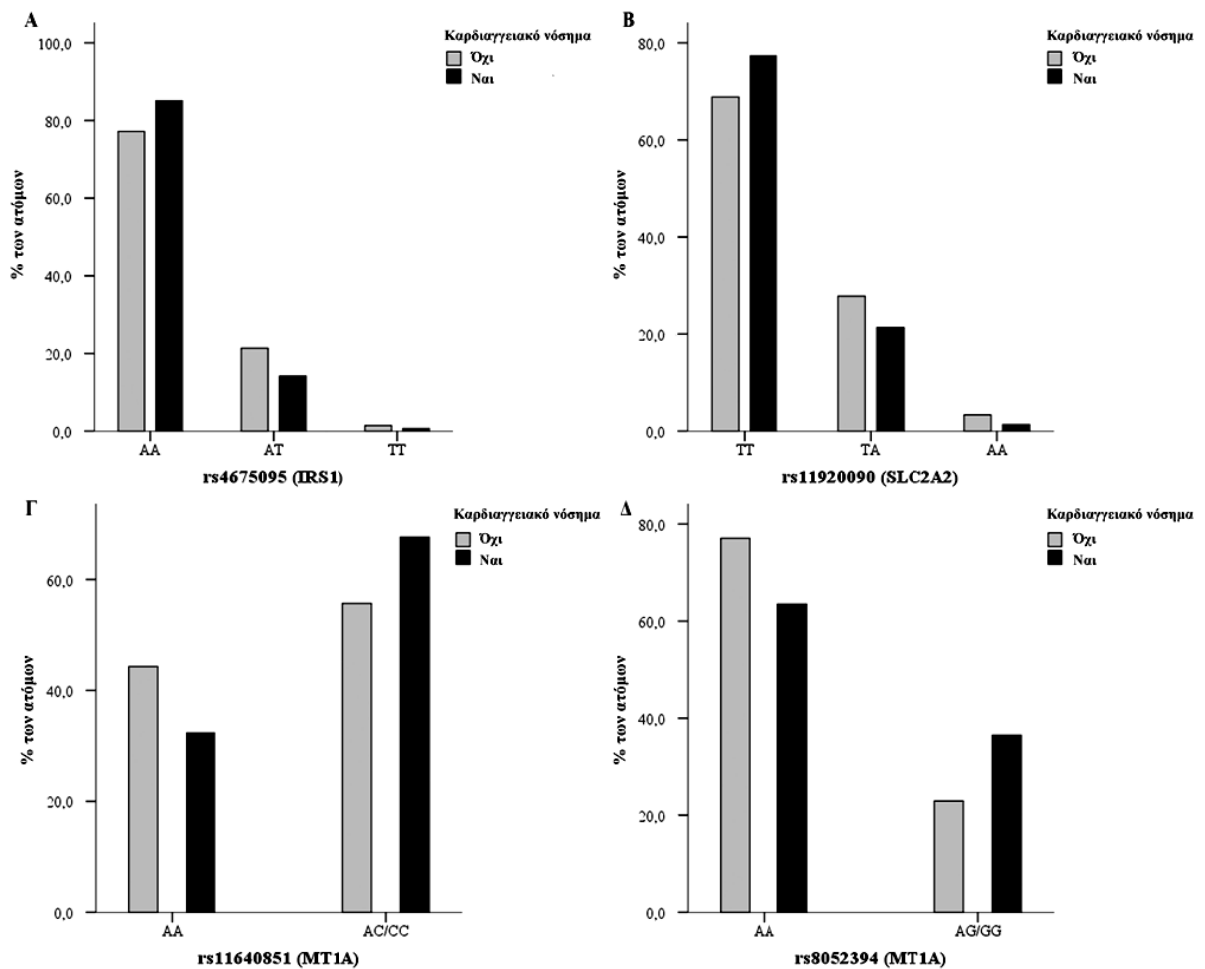
Στις **Εικόνες 3.26-3.29** παρουσιάζονται οι διαφορές στη συχνότητα εμφάνισης των γονοτύπων, για τους πολυμορφισμούς που βρέθηκαν να σχετίζονται με την πιθανότητα εμφάνισης νοσημάτων στο δείγμα των ηλικιωμένων εθελοντών.



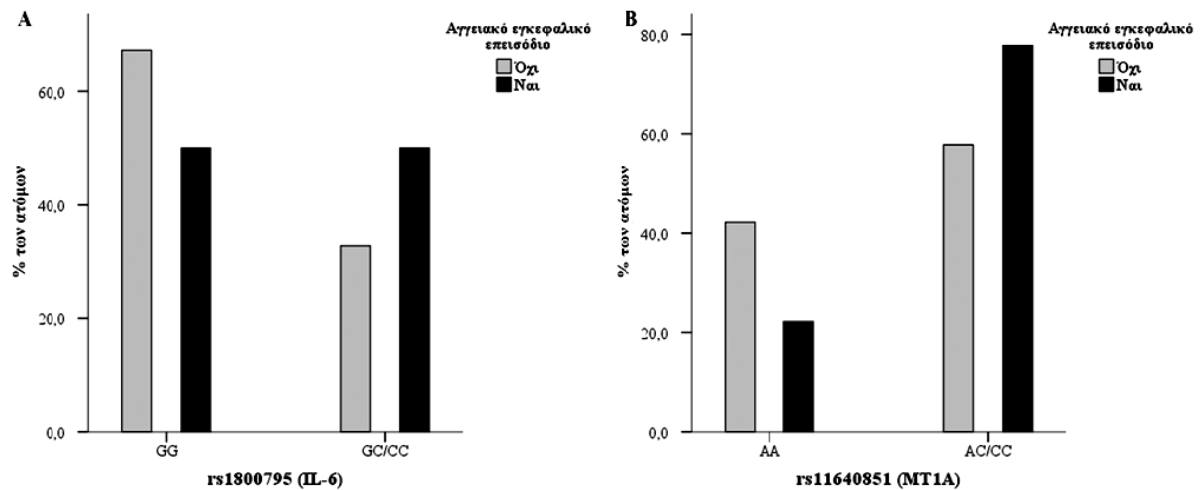
Εικόνα 3.26. Συχνότητα γονοτύπων των πολυμορφισμών **A)** rs780094 (*GCKR*) και **B)** rs8052394 (*MT1A*) σε υπέρτασικούς και μη υπέρτασικούς ηλικιωμένους.



Εικόνα 3.27. Συχνότητα γονοτύπων του πολυμορφισμού rs4880 (*SOD*) σε υπερχοληστερολαιμικούς και μη υπερχοληστερολαιμικούς ηλικιωμένους.



Εικόνα 3.28. Συχνότητα γονοτύπων των πολυμορφισμών **A)** rs4675095 (*IRS1*), **B)** rs11920090 (*SLC2A2*), **Γ)** rs11640851 (*MT1A*) και **Δ)** rs8052394 (*MT1A*) σε ασθενείς με καρδιαγγειακό νόσημα και υγιείς.



Εικόνα 3.29. Συχνότητα γονοτύπων των πολυμορφισμών **A)** rs1800795 (*IL-6*) και **B)** rs11640851 (*MT1A*) σε ηλικιωμένους απουσία και παρουσία ιστορικού αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου.

Αξιολόγηση της επίδρασης των γενετικών δεικτών σε σωματομετρικούς, κλινικούς, βιοχημικούς και αιματολογικούς δείκτες

Ο έλεγχος συσχέτισης των πολυμορφισμών με σωματομετρικούς, κλινικούς, γλυκαιμικούς και λιπιδαιμικούς δείκτες στο δείγμα των ηλικιωμένων εθελοντών, πραγματοποιήθηκε με μοντέλα γραμμικής παλινδρόμησης, διορθωμένα για το φύλο και την ηλικία (Μοντέλο 1) και επιπλέον για τον Δ.Μ.Σ. και τη λήψη φαρμακευτικής αγωγής (Μοντέλο 2), όπου ήταν απαραίτητο. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων με επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,10$ παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.23**.

Ο δείκτης μάζας σώματος (Δ.Μ.Σ.) σχετίστηκε αρνητικά με το T αλληλόμορφο για τον πολυμορφισμό rs457420 (*BRD3*) ($\beta = -0,084$, $P = 0,017$). Ερμηνεύοντας τη συσχέτιση, οι ηλικιωμένοι με CT γονότυπο είχαν κατά $0,084 \text{ kg/m}^2$ χαμηλότερο Δ.Μ.Σ. σε σχέση με τους CC και οι TT κατά $0,168$ σε σχέση με τους CC (προσθετικό μοντέλο).

Αντίστοιχα, οι πιο σημαντικές αρνητικές επιδράσεις στα επίπεδα της **συστολικής αρτηριακής πίεσης** καταγράφηκαν για το C αλληλόμορφο του πολυμορφισμού rs11717195 (*ADCY5*), το A αλληλόμορφο του πολυμορφισμού rs11605924 (*CRY2*) και το T αλληλόμορφο του πολυμορφισμού rs7944584 (*MADD*). Τα επίπεδα της **διαστολικής αρτηριακής πίεσης** σχετίστηκαν θετικά με την παρουσία του C αλληλομόρφου για τον

πολυμορφισμό rs10636 (*MT2A*), με τους φορείς του C αλληλομόρφου (GC και CC, επικρατές μοντέλο) να έχουν κατά 0,112 mm Hg χαμηλότερα επίπεδα πίεσης σε σχέση με τους GG ($P=0,012$, σταθμισμένο για το φύλο, την ηλικία, τον Δ.Μ.Σ. και τη λήψη αντιυπερτασικών φαρμάκων).

Το αλληλόμορφο G για τον πολυμορφισμό rs2191349 (*DGKB/THEM195*), σχετίστηκε σημαντικά με μειωμένα επίπεδα **γλυκόζης νηστείας, ινσουλίνης νηστείας και Homa-IR** ($P=0,001$, $P=0,032$ και $P=0,004$, αντίστοιχα). Οι τιμές **Homa-B** επηρεάζονταν αρνητικά ($P=0,035$) από το A αλληλόμορφο για τον πολυμορφισμό rs1800629 (*TNF-α*).

Αναφορικά με τους **λιπιδαιμικούς δείκτες**, το C αλληλόμορφο για τον πολυμορφισμό rs4880 (*SOD2*) είχε σημαντική επίδραση στα επίπεδα οξειδωμένης LDL-C ($\beta=-0,252$, $P=6,5 \times 10^{-4}$), τριγλυκεριδίων ($\beta=-0,237$, $P=3,9 \times 10^{-4}$), HDL-C ($\beta=0,147$, $P=0,029$) και ολικής χοληστερόλης ($\beta=-0,136$, $P=0,046$). Παράλληλα, το A αλληλόμορφο για τον πολυμορφισμό rs1800629 (*TNF-α*) σχετίστηκε με μειωμένα επίπεδα ολικής χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων. Τα επίπεδα οξειδωμένης LDL-C βρέθηκε να αυξάνονται παρουσία του T αλληλομόρφου για τον πολυμορφισμό rs340874 (*PROX1*) και το ίδιο ίσχυε και για το T αλληλόμορφο του πολυμορφισμού rs7944584 (*MADD*). Τέλος, το T αλληλόμορφο για τον πολυμορφισμό rs11167682 (*SAP30L*) σχετίστηκε με αυξημένα επίπεδα HDL-C.

Πίνακας 3.23. Συσχέτιση των πολυμορφισμών με σωματομετρικούς, κλινικούς, γλυκαιμικούς και λιπιδαιμικούς δείκτες στο σύνολο (N=843) των ηλικιωμένων εθελοντών.

			Μοντέλο 1 (συμμεταβλητές: φύλο, ηλικία)		Μοντέλο 2 (συμμεταβλητές: φύλο, ηλικία, Δ.Μ.Σ., αντιυπερτασικά φάρμακα)	
Εξαρτημένη μεταβλητή	SNP (γονίδιο)	Αλληλόμορφο αναφοράς (συχνότητα)	β*	P	β*	P
Σωματομετρικοί δείκτες						
Δ.Μ.Σ. (kg/m ²)	rs560887 (<i>G6PC2</i>)	T (0,29)	-0,060	0,09		
	rs11717195 (<i>ADCY5</i>)	C (0,20)	-0,071	0,050		
	rs457420 (<i>BRD3</i>)	T (0,42)	-0,084	0,017		
	rs35767 (<i>IGF1</i>)	A (0,21)	-0,063	0,08		
Κλινικοί δείκτες						
Συστολική αρτηριακή πίεση (mm Hg)	rs10493846 (<i>SEC63D1</i>)	T (0,18)	0,074	0,07	0,074	0,053
	rs780094 (<i>GCKR</i>)	T (0,46)	-0,075	0,046	-0,060	0,09
	rs11717195 (<i>ADCY5</i>)	C (0,20)	-0,085	0,028	-0,086	0,019
	rs11167682 (<i>SAP30L</i>)	T (0,23)	0,078	0,039	0,070	0,050
	rs4880 (<i>SOD2</i>)	C (0,47)	-0,138	0,054	-0,135	0,053
	rs1800795 ¹ (<i>IL-6</i>)	C (0,18)	0,117	0,08	0,127	0,048
	rs457420 (<i>BRD3</i>)	T (0,42)	-0,064	0,09	-0,045	0,21
	rs11605924 (<i>CRY2</i>)	A (0,41)	-0,088	0,018	-0,095	0,007
	rs7944584 (<i>MADD</i>)	T (0,36)	-0,077	0,041	-0,077	0,032
	rs11717195 (<i>ADCY5</i>)	C (0,20)	-0,071	0,07	-0,065	0,09
Διαστολική αρτηριακή πίεση (mm Hg)	rs1800629 ¹ (<i>TNF-α</i>)	A (0,08)	-0,080	0,035	-0,075	0,044
	rs2191349 (<i>DGKB/THEM195</i>)	G (0,44)	0,066	0,09	0,062	0,11
	rs8052394 (<i>MT1A</i>)	G (0,13)	0,076	0,09	0,082	0,06
	rs10636 ¹ (<i>MT2A</i>)	C (0,28)	-0,112	0,013	-0,111	0,012

*Τυποποιημένος συντελεστής β της επίδρασης του πολυμορφισμού ανά αλληλόμορφο αναφοράς. ¹Επικρατές γενετικό μοντέλο.

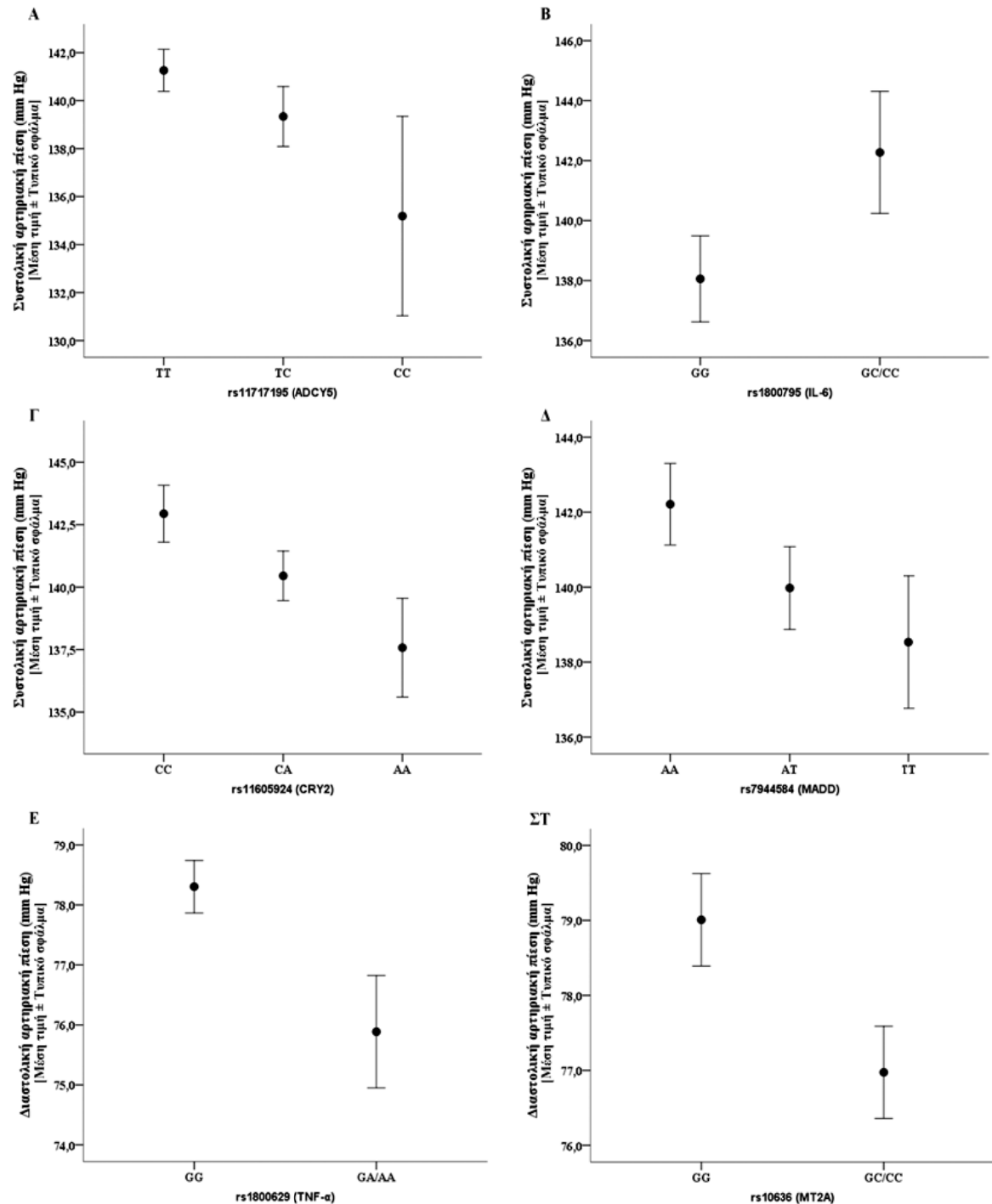
			Μοντέλο 1 (συμμεταβλητές: φύλο, ηλικία)		Μοντέλο 2 (συμμεταβλητές: φύλο, ηλικία, Δ.Μ.Σ., και ξαντιδιαβητικά φάρμακα)	
Εξαρτημένη μεταβλητή	SNP (γονίδιο)	Αλληλόμορφο αναφοράς (συχνότητα)	β*	P	β*	P
Γλυκαιμικοί δείκτες						
Γλυκόζη νηστείας (mg/dl)	rs2191349 (<i>DGKB/THEM195</i>)	G (0,44)	-0,107	0,003	-0,095	0,001§
	rs174550 (<i>FADSI</i>)	C (0,27)	-0,081	0,023	-0,057	0,052§
Ινσουλίνη νηστείας (pmol/L)	rs1800629 ¹ (<i>TNF-α</i>)	A (0,08)	-0,068	0,058	-0,064	0,07
	rs2191349 (<i>DGKB/THEM195</i>)	G (0,44)	-0,098	0,058	-0,101	0,032
	rs35767 (<i>IGF1</i>)	A (0,21)	-0,068	0,040	-0,052	0,10
Homa-B (%)	rs1800629 ¹ (<i>TNF-α</i>)	A (0,08)	-0,077	0,042	-0,075	0,035§
	rs6479526 (<i>PTPDC1</i>)	T (0,25)	0,066	0,09	0,050	0,17§
Homa-IR	rs1800629 ¹ (<i>TNF-α</i>)	A (0,08)	-0,068	0,07	-0,062	0,08
	rs2191349 (<i>DGKB/THEM195</i>)	G (0,44)	-0,102	0,009	-0,104	0,004
	rs35767 (<i>IGF1</i>)	A (0,21)	-0,081	0,034	-0,062	0,09

*Τυποποιημένος συντελεστής β της επίδρασης του πολυμορφισμού ανά αλληλόμορφο αναφοράς. ¹Επικρατές γενετικό μοντέλο.

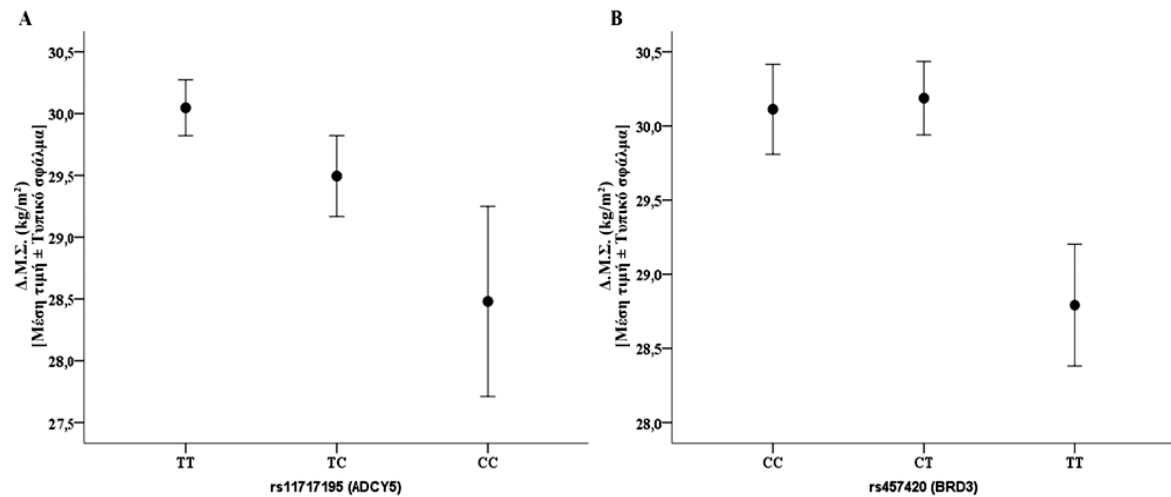
			Μοντέλο 1 (συμμεταβλητές: φύλο, ηλικία)		Μοντέλο 2 (συμμεταβλητές: φύλο, ηλικία, αντιλιπιδαιμικά φάρμακα, και †Δ.Μ.Σ.)	
Εξαρτημένη μεταβλητή	SNP (γονίδιο)	Αλληλόμορφο αναφοράς (συχνότητα)	β*	P	β*	P
Λιπιδαιμικοί δείκτες						
Ολική χοληστερόλη (mg/dl)	rs4880 (<i>SOD2</i>)	C (0,47)	-0,146	0,034	-0,136	0,046
	rs174550 (<i>FADS1</i>)	C (0,27)	0,061	0,08	0,052	0,13
	rs1800629 ¹ (<i>TNF-α</i>)	A (0,08)	-0,064	0,07	-0,067	0,045
LDL-C (mg/dl)	rs4880 (<i>SOD2</i>)	C (0,47)	-0,126	0,07	-0,112	0,09
	rs174550 (<i>FADS1</i>)	C (0,27)	0,071	0,044	0,061	0,07
HDL-C (mg/dl)	rs560887 (<i>G6PC2</i>)	T (0,29)	0,059	0,09	0,049	0,16†
	rs11167682 (<i>SAP30L</i>)	T (0,23)	0,087	0,013	0,083	0,016†
	rs4880 (<i>SOD2</i>)	C (0,47)	0,145	0,033	0,147	0,029†
Τριγλυκερίδια (mg/dl)	rs35767 (<i>IGF1</i>)	A (0,21)	0,078	0,025	0,069	0,047†
	rs560887 (<i>G6PC2</i>)	T (0,29)	-0,069	0,055	-0,059	0,09†
	rs11920090 (<i>SLC2A2</i>)	A (0,16)	0,070	0,052	0,072	0,043†
	rs4880 (<i>SOD2</i>)	C (0,47)	-0,227	9,7x10⁻⁴	-0,237	3,9x10⁻⁴†
	rs1800629 ¹ (<i>TNF-α</i>)	A (0,08)	-0,112	0,001	-0,106	0,002†
Οξειδωμένη LDL-C (mg/dl) ²	rs8052394 ¹ (<i>MT1A</i>)	G (0,13)	-0,086	0,047	-0,078	0,07†
	rs340874 (<i>PROX1</i>)	T (0,48)	0,211	0,005		
	rs4880 (<i>SOD2</i>)	C (0,47)	-0,252	6,5x10⁻⁴		
	rs7944584 (<i>MADD</i>)	T (0,36)	0,180	0,020		

*Τυποποιημένος συντελεστής β της επίδρασης του πολυμορφισμού ανά αλληλόμορφο αναφοράς. ¹Επικρατές γενετικό μοντέλο. ²N=175.

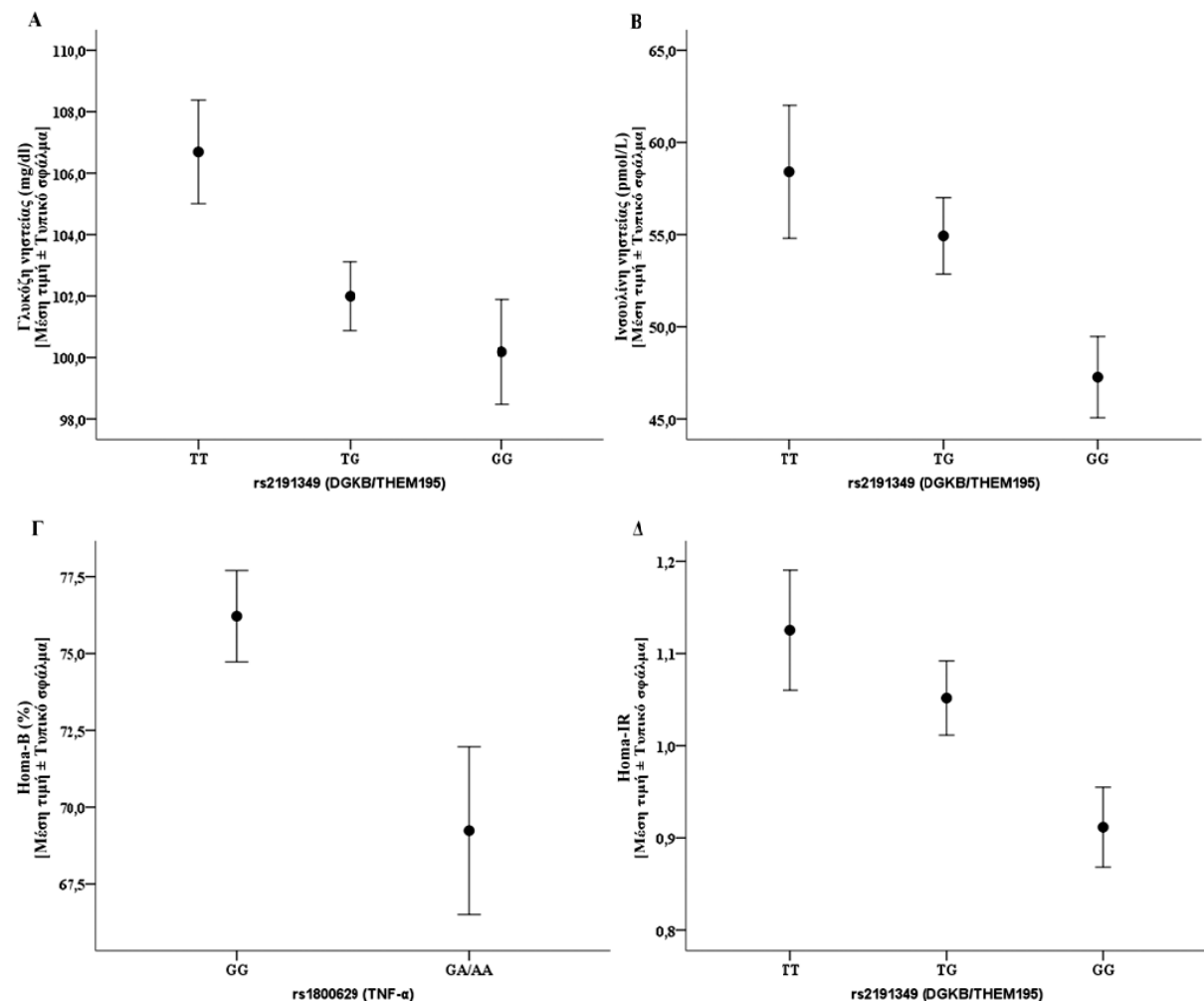
Στις **Εικόνες 3.30-3.34** παρουσιάζονται οι διαφορές στις μέσες τιμές των κλινικών, σωματομετρικών, γλυκαιμικών και λιπιδαιμικών δεικτών, ανάμεσα στους γονότυπους για τους πολυμορφισμούς με σημαντική επίδραση στους δείκτες.



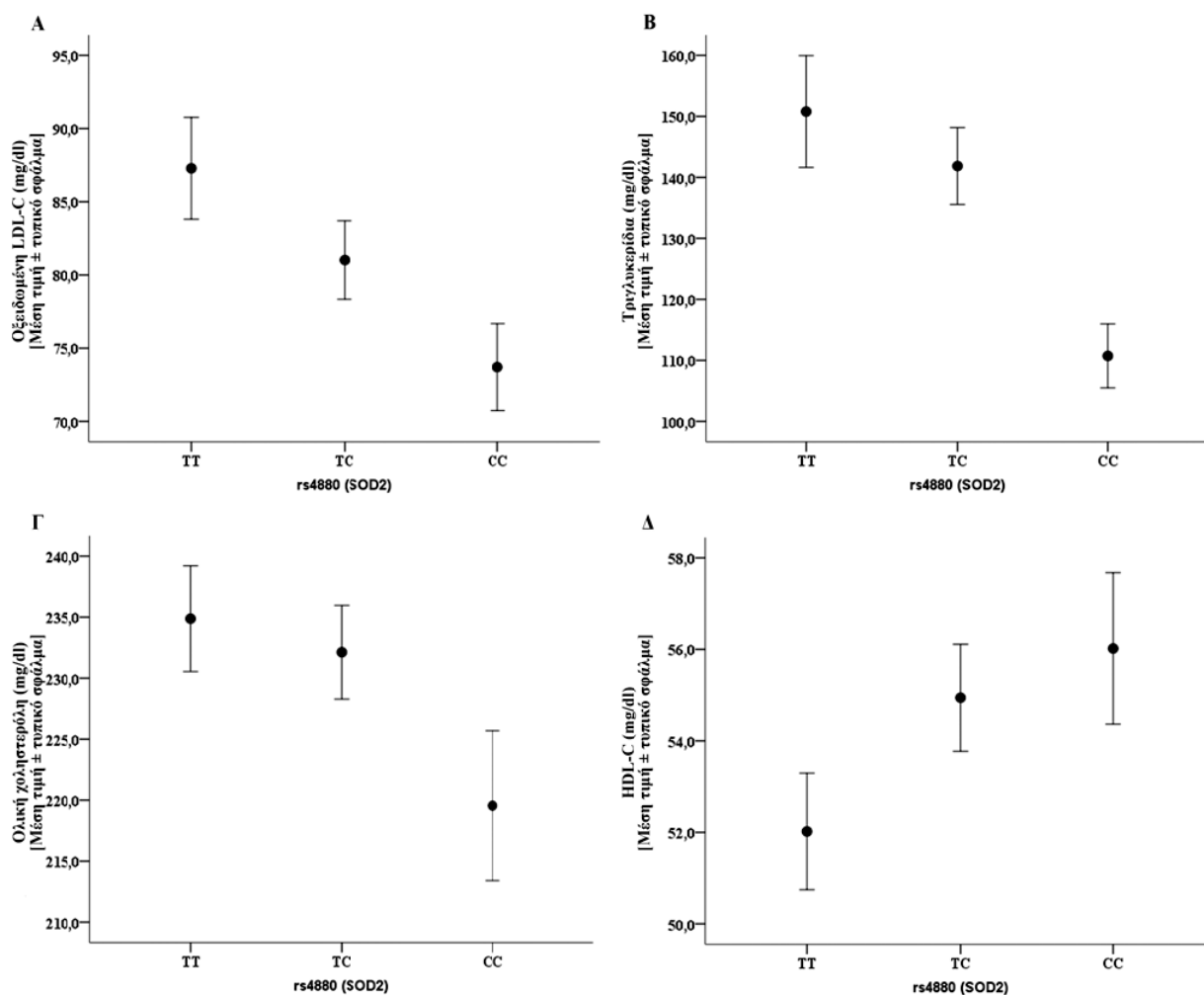
Εικόνα 3.30. Επίπεδα συστολικής (Α-Δ) και διαστολικής (Ε, ΣΤ) αρτηριακής πίεσης ανά γονότυπο για τους πολυμορφισμούς Α) rs11717195 (*ADCY5*), Β) rs1800795 (*IL-6*), Γ) rs11605924 (*CRY2*), Δ) rs7944584 (*MADD*), Ε) rs1800629 (*TNF-α*) και ΣΤ) rs10636 (*MT2A*).



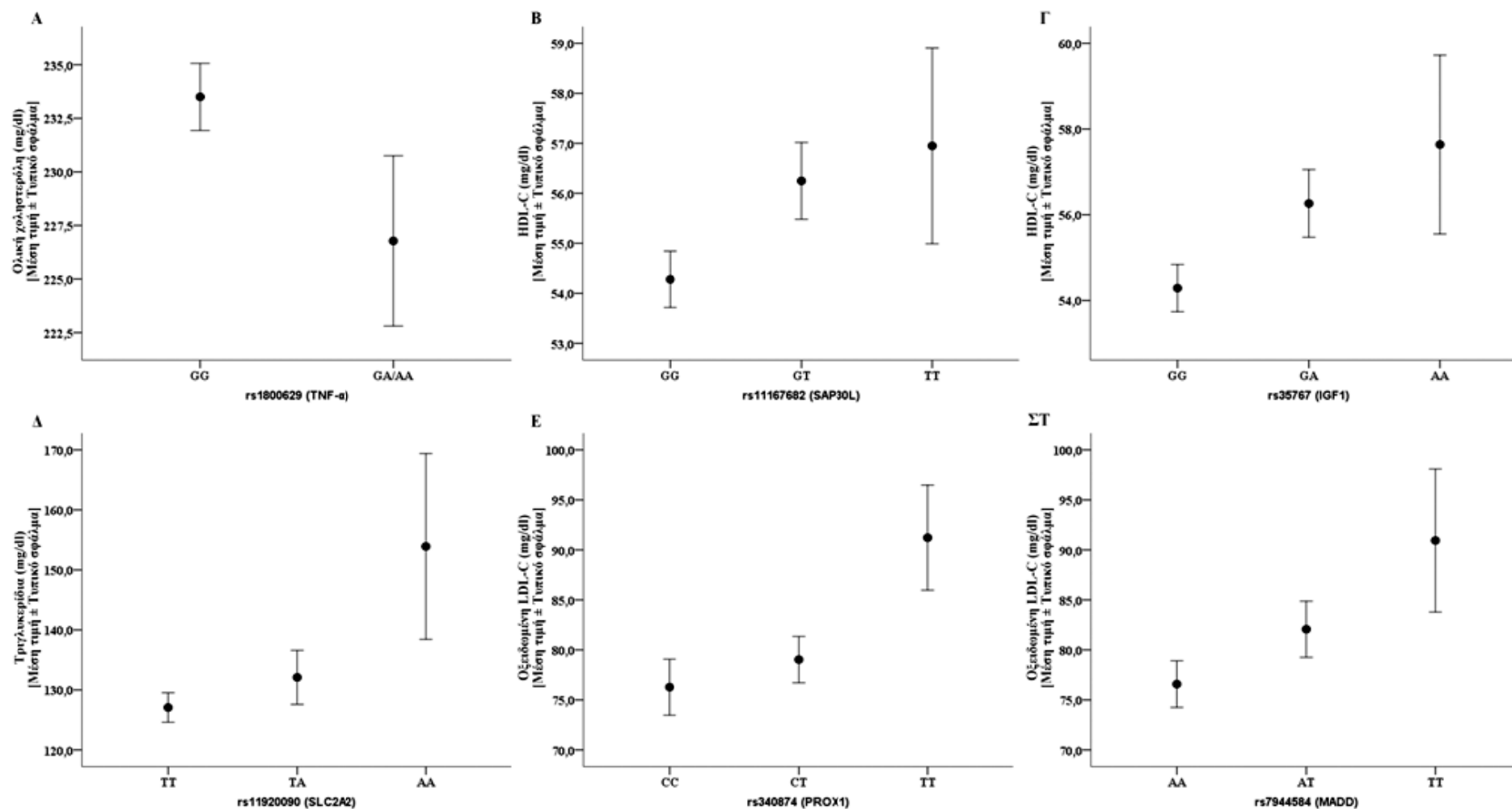
Εικόνα 3.31. Τιμές του δείκτη μάζας σώματος ανά γονότυπο για τους πολυμορφισμούς **A)** rs11717195 (*ADCY5*) και **B)** rs457420 (*BRD3*).



Εικόνα 3.32. Επίπεδα **A)** γλυκόζης νηστείας και **B)** ινσουλίνης νηστείας ανά γονότυπο για τον πολυμορφισμό rs2191349 (*DGKB/THEM195*), **Γ)** HOMA-B ανά γονότυπο για τον πολυμορφισμό rs1800629 (*TNF-α*) και **Δ)** HOMA-IR ανά γονότυπο για τον πολυμορφισμό rs2191349 (*DGKB/THEM195*).



Εικόνα 3.33. Επίπεδα **A)** οξειδωμένης LDL-C, **B)** τριγλυκεριδίων, **Γ)** ολικής χοληστερόλης και **Δ)** HDL-C ανά γονότυπο για τον πολυμορφισμό rs4880 (*SOD*).



Εικόνα 3.34. Επίπεδα **A)** ολικής χοληστερόλης ανά γονότυπο για τον πολυμορφισμό rs1800629 (*TNF-α*), **B-Γ)** HDL-C ανά γονότυπο για τους πολυμορφισμούς **B)** rs11167682 (*SAP30L*) και **Γ)** rs35767 (*IGF1*), **Δ)** τριγλυκεριδίων ανά γονότυπο για τον πολυμορφισμό rs11920090 (*SLC2A2*) και **Ε-ΣΤ)** οξειδωμένης LDL-C ανά γονότυπο για τους πολυμορφισμούς **Ε)** rs340874 (*PROX1*) και **ΣΤ)** rs7944584 (*MADD*).

Ο έλεγχος συσχέτισης των πολυμορφισμών με φλεγμονώδεις, βιοχημικούς και αιματολογικούς δείκτες των ηλικιωμένων εθελοντών, πραγματοποιήθηκε με μοντέλα γραμμικής παλινδρόμησης, διορθωμένα για το φύλο και την ηλικία (Μοντέλο 1) και επιπλέον για τον Δ.Μ.Σ. όπου ήταν απαραίτητο. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων με επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,10$ παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.24**. Οι πιο ισχυρές συσχετίσεις ήταν μεταξύ των επιπέδων **IL-6** και του T αλληλομόρφου για τον πολυμορφισμό **rs10493846 (SEC63D1)** ($\beta=0,262$, $P=4,1 \times 10^{-4}$), καθώς και μεταξύ των επιπέδων **ολικής χολερυθρίνης** και του T αλληλομόρφου για τον πολυμορφισμό **rs340874 (PROX1)** ($\beta=-0,227$, $P=8,7 \times 10^{-4}$).

Ανάμεσα στις υπόλοιπες συσχετίσεις, το C αλληλόμορφο για τον πολυμορφισμό rs7034200 (*GLIS3*) είχε σημαντική αρνητική επίδραση στα επίπεδα IL-8, MCP1 και MIP1a. Το A αλληλόμορφο για τον πολυμορφισμό rs11920090 (*SLC2A2*) είχε θετική επίδραση στα επίπεδα MCP1 και MIP1a, ενώ το C αλληλόμορφο για τον πολυμορφισμό rs10636 (*MT2A*) είχε αρνητική επίδραση στα επίπεδα των δεικτών. Παράλληλα, τα επίπεδα IL-6 σχετίστηκαν θετικά με την παρουσία του C αλληλομόρφου για τον πολυμορφισμό rs174550 (*FADS1*) και τα επίπεδα IL-8 αρνητικά με την παρουσία του A αλληλομόρφου για τον πολυμορφισμό rs4607517 (*GCK*). Οι φορείς του C αλληλομόρφου για τον πολυμορφισμό rs1800795 (*IL-6*) είχαν χαμηλότερα επίπεδα MIP1a σε σχέση με τους μη φορείς, ενώ το ίδιο ίσχυε για τα επίπεδα RANTES των φορέων του A αλληλομόρφου για τον πολυμορφισμό rs1800629 (*TNF-α*).

Τα επίπεδα ψευδαργύρου πλάσματος σχετίστηκαν αρνητικά με την παρουσία του T αλληλομόρφου για τον πολυμορφισμό rs780094 (*GCKR*) και θετικά με την παρουσία του C αλληλομόρφου για τον πολυμορφισμό rs11717195 (*ADCY5*). Το T αλληλόμορφο για τον πολυμορφισμό rs11167682 (*SAP30L*), καθώς και το G αλληλόμορφο για τον πολυμορφισμό rs1610216 (*MT2A*) σχετίστηκαν με μειωμένα επίπεδα SGOT και SGPT. Παράλληλα, τα επίπεδα SGPT επηρεάζονταν αρνητικά από την παρουσία των αλληλομόρφων: T για τον πολυμορφισμό rs340874 (*PROX1*), T για τον πολυμορφισμό rs780094 (*GCKR*) και T για τον πολυμορφισμό rs560887 (*G6PC2*). Οι σημαντικές συσχετίσεις των γενετικών δεικτών με τους **αιματολογικούς δείκτες** αφορούσαν την αρνητική επίδραση των αλληλομόρφων T του πολυμορφισμού rs780094 (*GCKR*) και A του πολυμορφισμού rs35767 (*IGF1*), καθώς και τη θετική επίδραση του T αλληλομόρφου του πολυμορφισμού rs457420 (*BRD3*), στα επίπεδα αιματοκρίτη και αιμοσφαιρίνης.

Πίνακας 3.24. Συσχέτιση των πολυμορφισμών με φλεγμονώδεις, βιοχημικούς και αιματολογικούς δείκτες σε υποομάδα (N=250) των ηλικιωμένων εθελοντών.

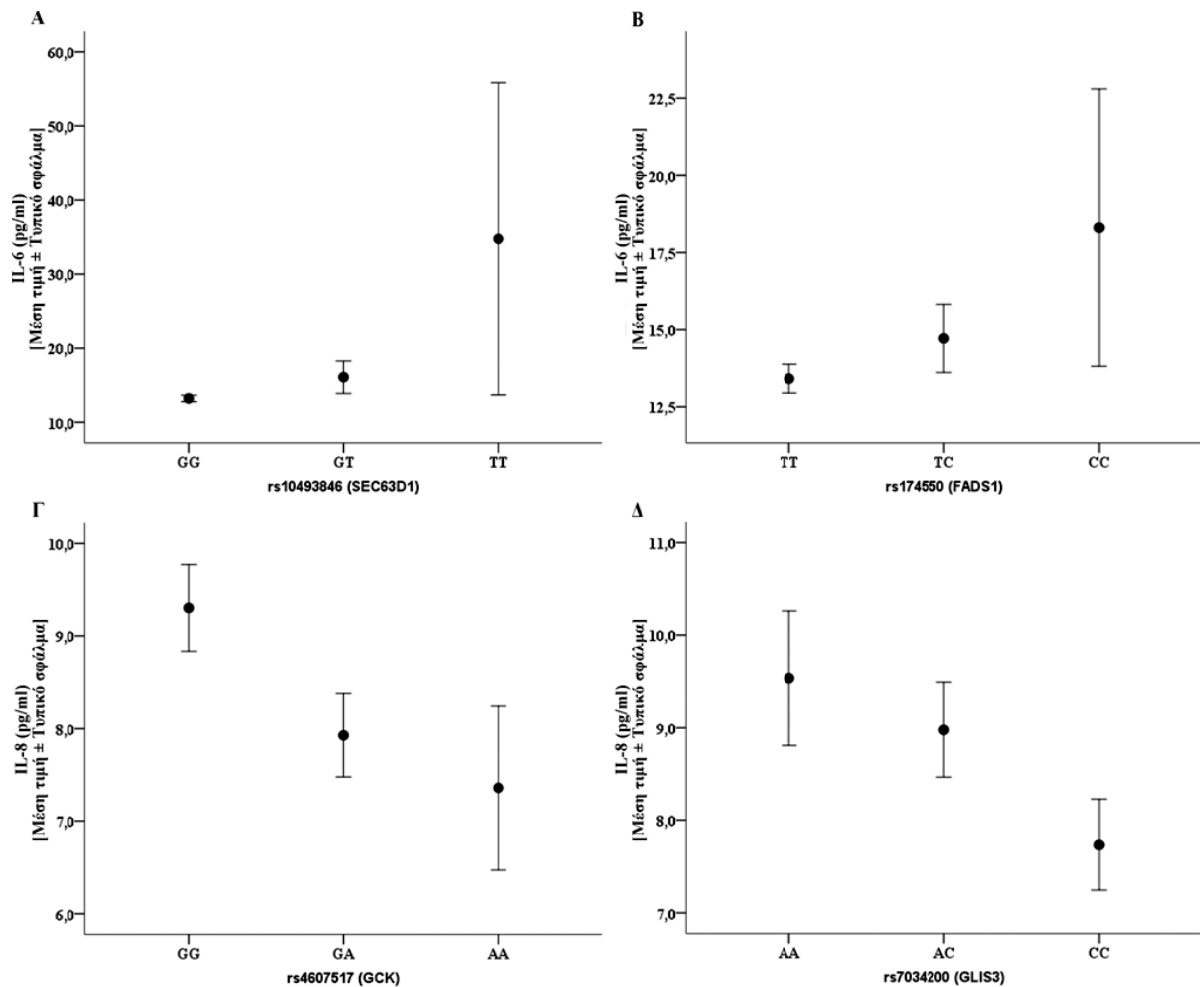
Μοντέλο 1 (συμμεταβλητές: φύλο, ηλικία)				
Εξαρτημένη μεταβλητή	SNP (γονίδιο)	Αλληλόμορφο αναφοράς (συχνότητα)	β*	P
Φλεγμονώδεις δείκτες				
IL-6 (pg/ml)	rs10493846 (<i>SEC63D1</i>)	T (0,18)	0,262	4,1x10 ⁻⁴
	rs174550 (<i>FADS1</i>)	C (0,27)	0,141	0,026
IL-8 (pg/ml)	rs2191349 (<i>DGKB/THEM195</i>)	G (0,44)	-0,130	0,053
	rs4607517 (<i>GCK</i>)	A (0,20)	-0,136	0,036
TNF-α (pg/ml)	rs7034200 (<i>GLIS3</i>)	C (0,48)	-0,132	0,043
	rs4607517 (<i>GCK</i>)	A (0,20)	-0,108	0,10
MCP1 (pg/ml)	rs1800795 ¹ (<i>IL-6</i>)	C (0,18)	-0,113	0,08
	rs11920090 (<i>SLC2A2</i>)	A (0,16)	0,154	0,018
MIP1a (pg/ml)	rs2191349 (<i>DGKB/THEM195</i>)	G (0,44)	0,122	0,07
	rs7034200 (<i>GLIS3</i>)	C (0,48)	-0,163	0,012
	rs7944584 (<i>MADD</i>)	T (0,36)	0,115	0,08
	rs1800795 ¹ (<i>IL-6</i>)	C (0,18)	-0,124	0,053
	rs10636 ¹ (<i>MT2A</i>)	C (0,28)	-2,249	0,025
	rs11717195 (<i>ADCY5</i>)	C (0,20)	-0,112	0,09
	rs11920090 (<i>SLC2A2</i>)	A (0,16)	0,149	0,022
	rs2191349 (<i>DGKB/THEM195</i>)	G (0,44)	0,114	0,09
RANTES (ng/ml)	rs7034200 (<i>GLIS3</i>)	C (0,48)	-0,151	0,021
	rs1800795 ¹ (<i>IL-6</i>)	C (0,18)	-0,128	0,046
	rs10636 ¹ (<i>MT2A</i>)	C (0,28)	-0,130	0,041
	rs4675095 (<i>IRS1</i>)	T (0,11)	-0,108	0,10
	rs1800629 ¹ (<i>TNF-α</i>)	A (0,08)	-0,143	0,027
Βιοχημικοί δείκτες				
Zn πλάσματος (μM)	rs780094 (<i>GCKR</i>)	T (0,46)	-0,1334	0,039
	rs11717195 (<i>ADCY5</i>)	C (0,20)	0,1368	0,041
Ολική χολερυθρίνη (mg/dl)	rs340874 (<i>PROX1</i>)	T (0,48)	-0,227	8,7x10 ⁻⁴
	rs11717195 (<i>ADCY5</i>)	C (0,20)	-0,118	0,09
SGOT (IU/L)	rs11167682 (<i>SAP30L</i>)	T (0,23)	-0,194	0,006§
	rs1610216 (<i>MT2A</i>)	G (0,20)	-0,175	0,010§
SGPT (IU/L)	rs340874 (<i>PROX1</i>)	T (0,48)	-0,169	0,014
	rs780094 (<i>GCKR</i>)	T (0,46)	-0,150	0,026
	rs560887 (<i>G6PC2</i>)	T (0,29)	-0,150	0,028
	rs11167682 (<i>SAP30L</i>)	T (0,23)	-0,140	0,042
	rs1800795 ¹ (<i>IL-6</i>)	C (0,18)	-0,136	0,043
	rs1610216 (<i>MT2A</i>)	G (0,20)	-0,144	0,028

¹Επικρατές γενετικό μοντέλο. *Τυποποιημένος συντελεστής β της επίδρασης του πολυμορφισμού ανά αλληλόμορφο αναφοράς. §Σταθμισμένο για το φύλο, την ηλικία και τον Δ.Μ.Σ.

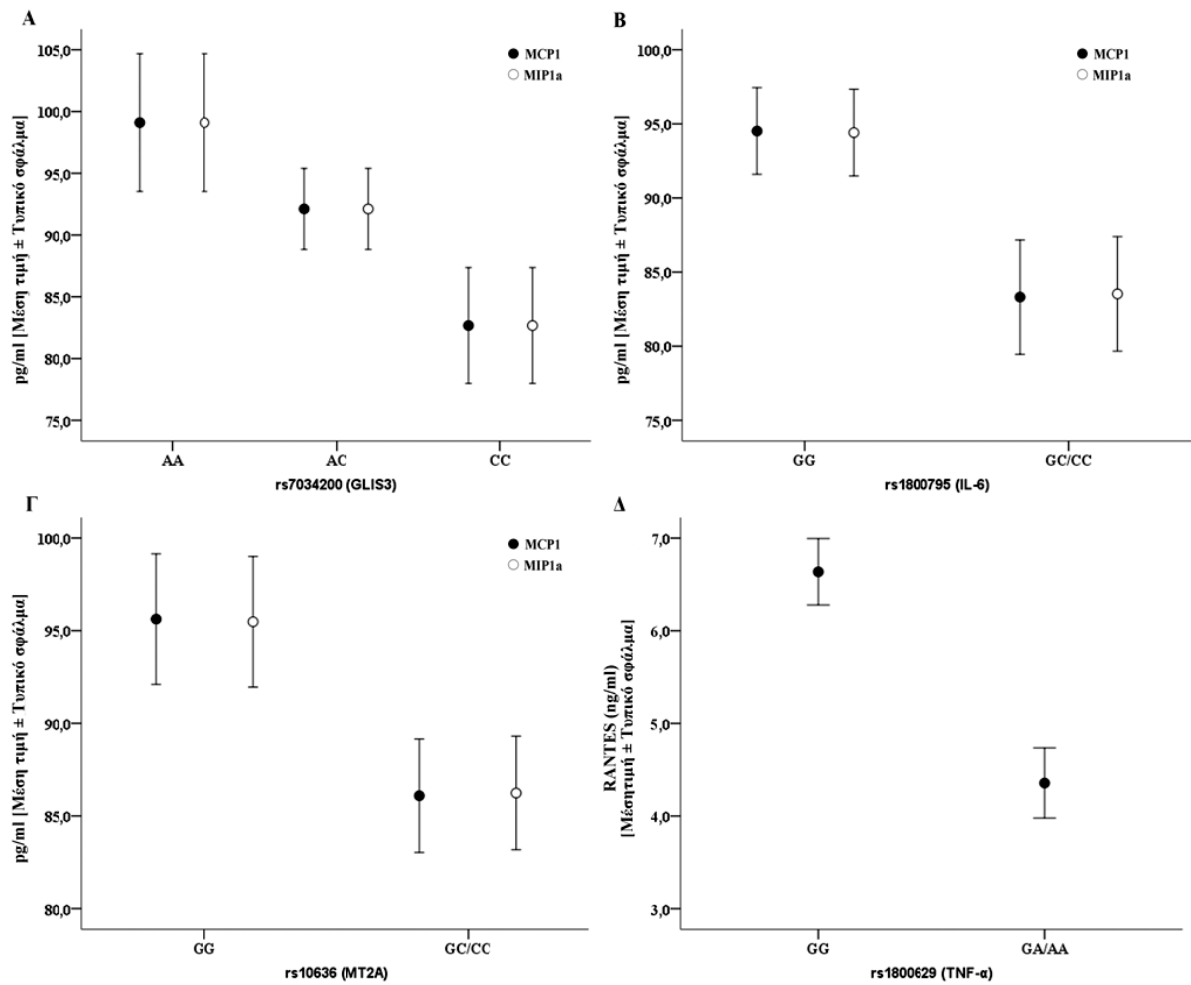
Εξαρτημένη μεταβλητή	SNP (γονίδιο)	Αλληλόμορφο αναφοράς (συχνότητα)	β^*	<i>P</i>
Κρεατινίνη (mg/dl)	rs780094 (<i>GCKR</i>)	T (0,46)	0,119	0,053
Αλβουμίνη (g/dl)	rs4880 (<i>SOD2</i>)	C (0,47)	-0,206	0,046
	rs10830963 (<i>MTNR1B</i>)	G (0,26)	-0,108	0,09
	rs35767 (<i>IGF1</i>)	A (0,21)	-0,123	0,050
Αιματολογικοί δείκτες				
Λευκοκύτταρα (10^3 /ml)	rs10493846 (<i>SEC63D1</i>)	T (0,18)	0,169	0,026
	rs10830963 (<i>MTNR1B</i>)	G (0,26)	-0,125	0,06
Λεμφοκύτταρα (%)	rs1610216 (<i>MT2A</i>)	G (0,20)	0,111	0,08
	rs7034200 (<i>GLIS3</i>)	C (0,48)	-0,108	0,09
	rs11640851 ¹ (<i>MT1A</i>)	C (0,33)	-0,107	0,09
	rs8052394 ¹ (<i>MT1A</i>)	G (0,13)	-0,108	0,08
Μονοπύρηνα (%)	rs10493846 (<i>SEC63D1</i>)	T (0,18)	-0,139	0,07
Ιωσινόφιλα (%)	rs10493846 (<i>SEC63D1</i>)	T (0,18)	0,147	0,052
	rs4607517 (<i>GCK</i>)	A (0,20)	-0,154	0,015
	rs174550 (<i>FADS1</i>)	C (0,27)	-0,121	0,06
	rs10636 ¹ (<i>MT2A</i>)	C (0,28)	0,111	0,08
	rs8052394 ¹ (<i>MT1A</i>)	G (0,13)	0,105	0,09
Βασεόφιλα (%)	rs11717195 (<i>ADCY5</i>)	C (0,20)	0,114	0,09
	rs1800795 ¹ (<i>IL-6</i>)	C (0,18)	-0,125	0,05
Ερυθροκύτταρα (10^6 /ml)	rs340874 (<i>PROX1</i>)	T (0,48)	-0,133	0,026
Αιμοπετάλια (10^3 /ml)	rs2191349 (<i>DGKB/THEM195</i>)	G (0,44)	0,169	0,009
Αιματοκρίτης (%)	rs780094 (<i>GCKR</i>)	T (0,46)	-0,127	0,028
	rs457420 (<i>BRD3</i>)	T (0,42)	0,135	0,020
	rs35767 (<i>IGF1</i>)	A (0,21)	-0,143	0,012
Αιμοσφαιρίνη (g/dl)	rs780094 (<i>GCKR</i>)	T (0,46)	-0,144	0,011
	rs457420 (<i>BRD3</i>)	T (0,42)	0,141	0,012
	rs35767 (<i>IGF1</i>)	A (0,21)	-0,141	0,012
TKE (mm/h)	rs4880 (<i>SOD2</i>)	C (0,47)	-0,262	0,010
	rs457420 (<i>BRD3</i>)	T (0,42)	-0,102	0,08

¹Επικρατές γενετικό μοντέλο. *Τυποποιημένος συντελεστής β της επίδρασης του πολυμορφισμού ανά αλληλόμορφο αναφοράς. §Σταθμισμένο για το φύλο, την ηλικία και τον Δ.Μ.Σ.

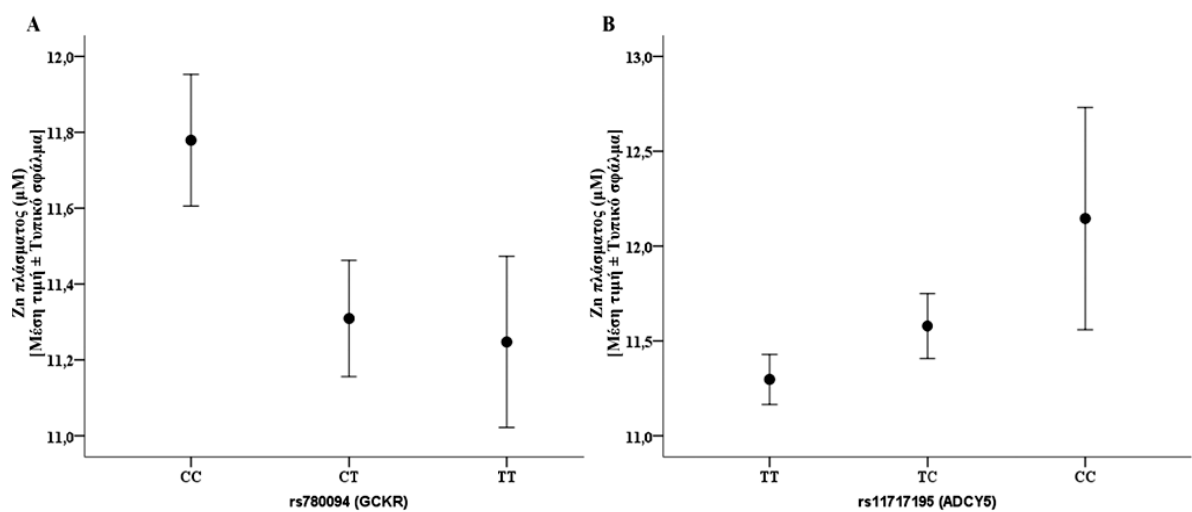
Στις **Εικόνες 3.35-3.40** παρουσιάζονται οι διαφορές στις μέσες τιμές των φλεγμονωδών, βιοχημικών και αιματολογικών δεικτών, ανάμεσα στους γονότυπους για τους πολυμορφισμούς με σημαντική επίδραση στους δείκτες.



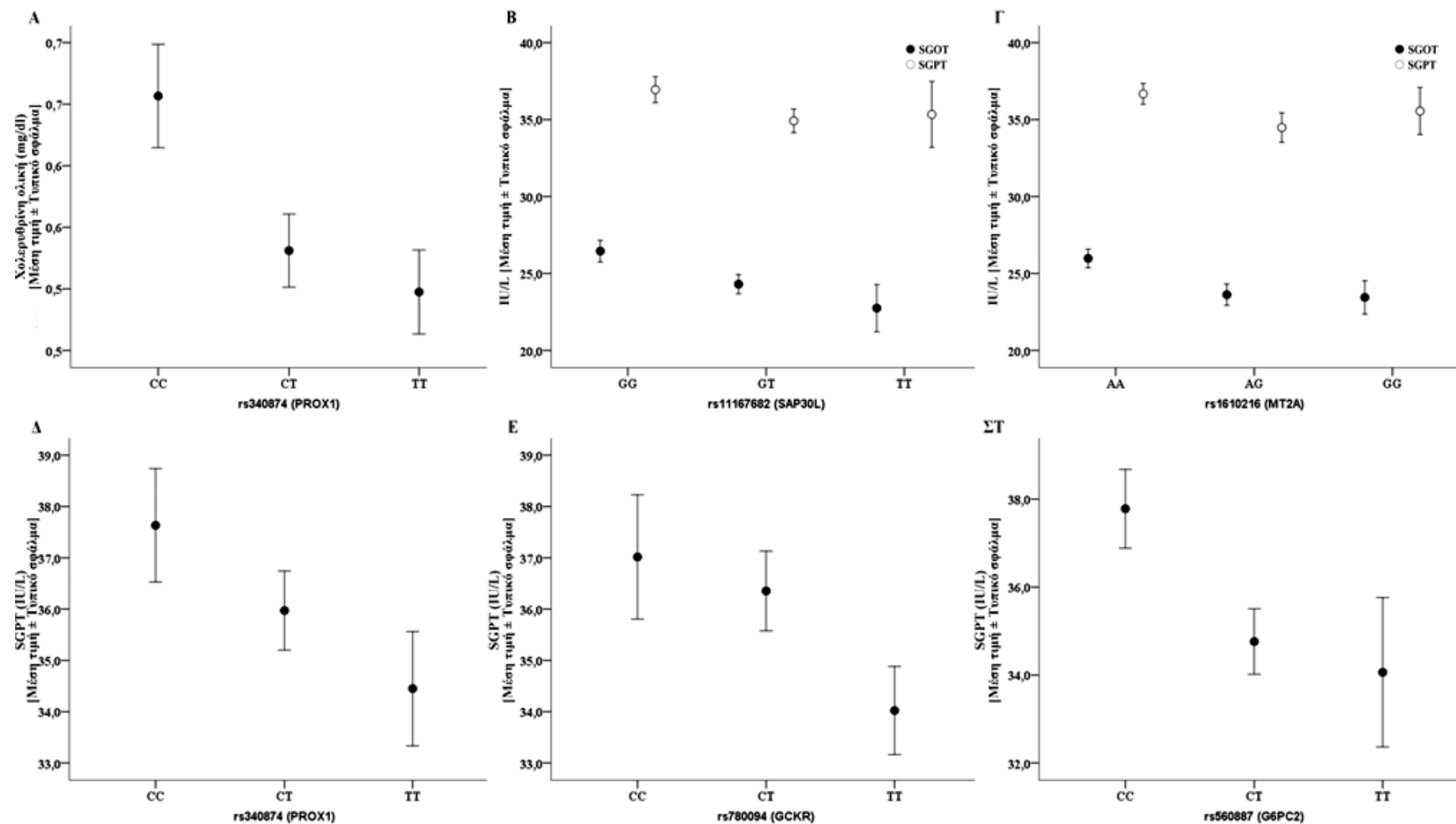
Εικόνα 3.35. Επίπεδα IL-6 ανά γονότυπο για τους πολυμορφισμούς **A)** rs10493846 (*SEC63D1*) και **B)** rs174550 (*FADS1*) και IL-8 ανά γονότυπο για τους πολυμορφισμούς **Γ)** rs4607517 (*GCK*) και **Δ)** rs7034200 (*GLIS3*).



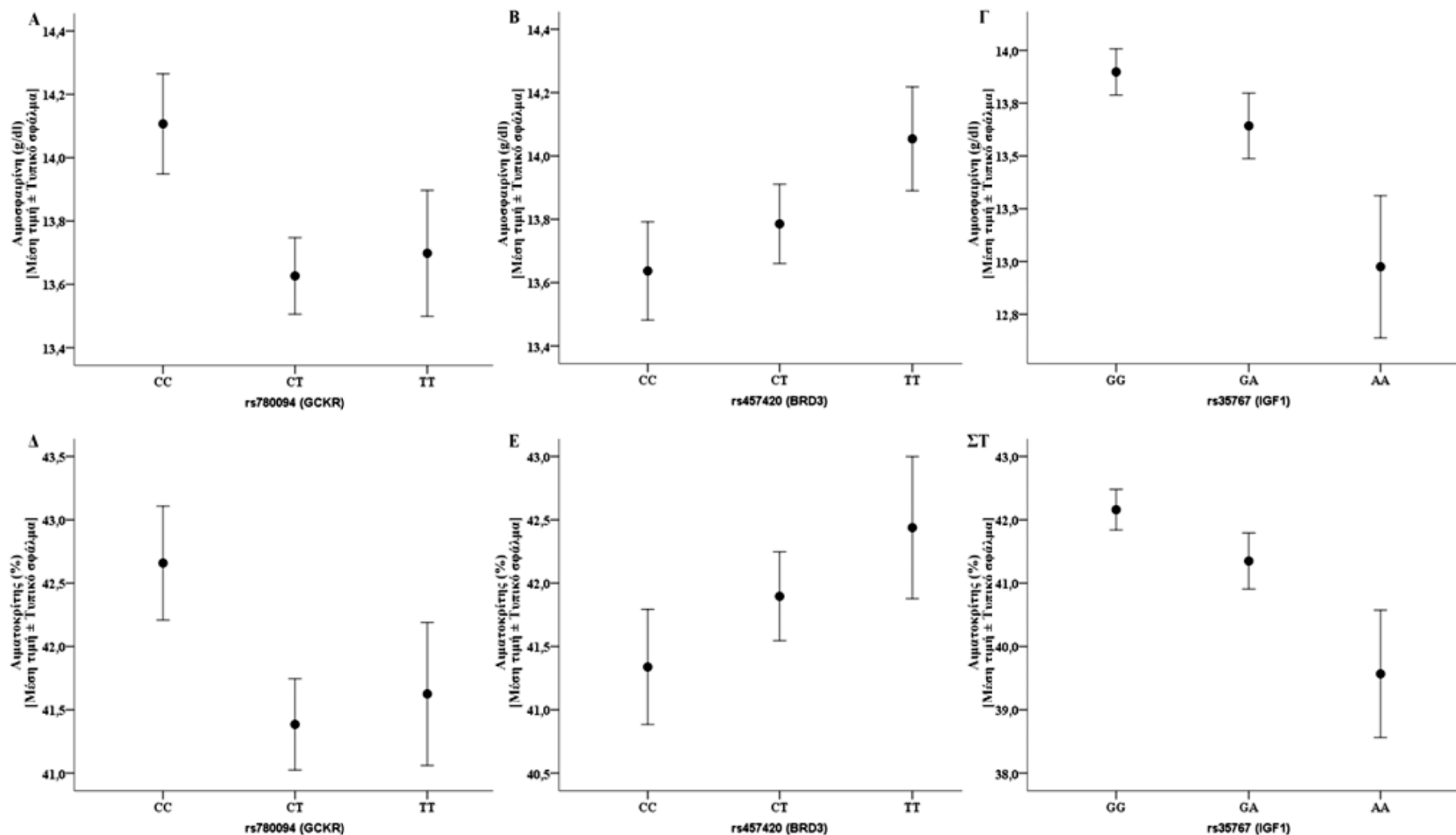
Εικόνα 3.36. Επίπεδα MCP1 και MIP1a (Α-Γ) και επίπεδα RANTES (Δ) ανά γονότυπο για τους πολυμορφισμούς **A)** rs7034200 (*GLIS3*), **B)** rs1800795 (*IL-6*), **Γ)** rs10636 (*MT2A*) και **Δ)** rs1800629 (*TNF-α*).



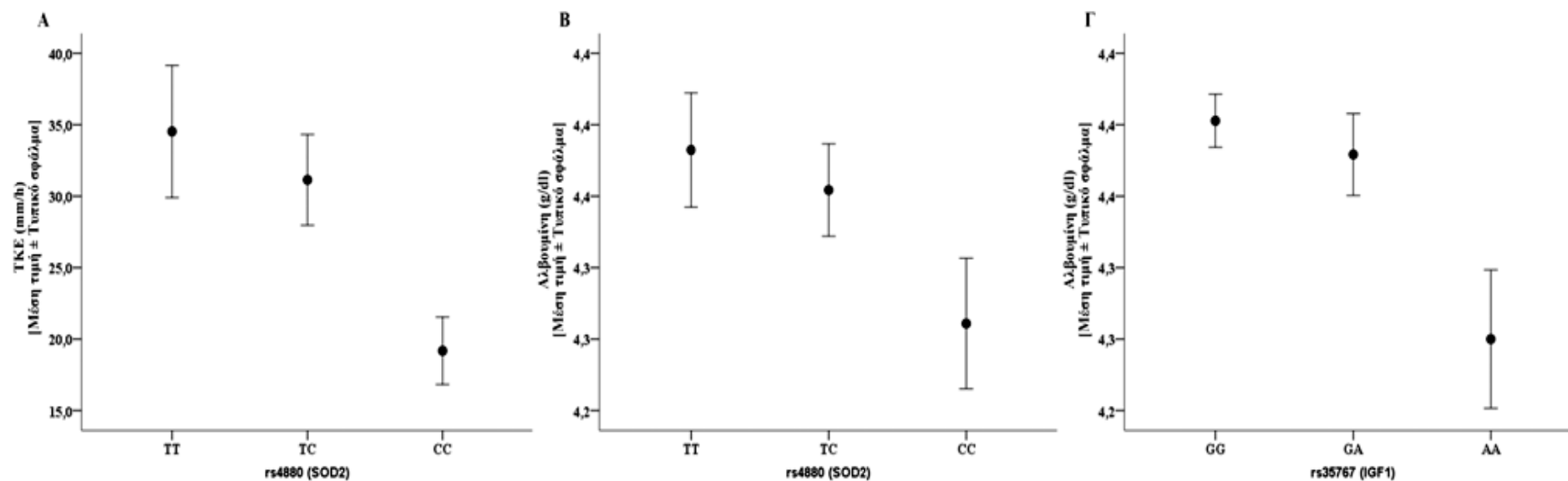
Εικόνα 3.37. Επίπεδα ψευδαργύρου πλάσματος ανά γονότυπο για τους πολυμορφισμούς **A)** rs780094 (*GCKR*) και **B)** rs11717195 (*ADCY5*).



Εικόνα 3.38. Επίπεδα **A)** ολικής χολερυθρίνης ανά γονότυπο για τον πολυμορφισμό rs340874 (*PROX1*), **Β-Γ)** SGOT και SGPT ανά γονότυπο για τους πολυμορφισμούς **Β)** rs11167682 (*SAP30L*) και **Γ)** rs1610216 (*MT2A*), **Δ-ΣΤ)** SGPT ανά γονότυπο για τους πολυμορφισμούς **Δ)** rs340874 (*PROX1*), **Ε)** rs780094 (*GCKR*) και **ΣΤ)** rs560887 (*G6PC2*).



Εικόνα 3.39. Επίπεδα αιμοσφαιρίνης **Α-Γ**) ανά γονότυπο για τους πολυμορφισμούς **Α)** rs780094 (*GCKR*), **Β)** rs457420 (*BRD3*) και **Γ)** rs35767 (*IGF1*) και τιμές αιματοκρίτη **Δ-ΣΤ**) ανά γονότυπο για τους πολυμορφισμούς **Δ)** rs780094 (*GCKR*), **Ε)** rs457420 (*BRD3*) και **ΣΤ)** rs35767 (*IGF1*).



Εικόνα 3.40. Τιμές **Α)** ταχύτητας καθίζησης ερυθροκυττάρων (ΤΚΕ) ανά γονότυπο για τον πολυμορφισμό rs4880 (*SOD2*), **Β)** επίπεδα αλβουμίνης ορού ανά γονότυπο για τον πολυμορφισμό rs4880 (*SOD2*) και **Γ)** επίπεδα αλβουμίνης ορού ανά γονότυπο για τον πολυμορφισμό rs35767 (*IGF1*).

Ανάλυση της συσχέτισης των γενετικών δεικτών με την παρουσία άνοιας και καταθλιπτικών συμπτωμάτων στους ηλικιωμένους

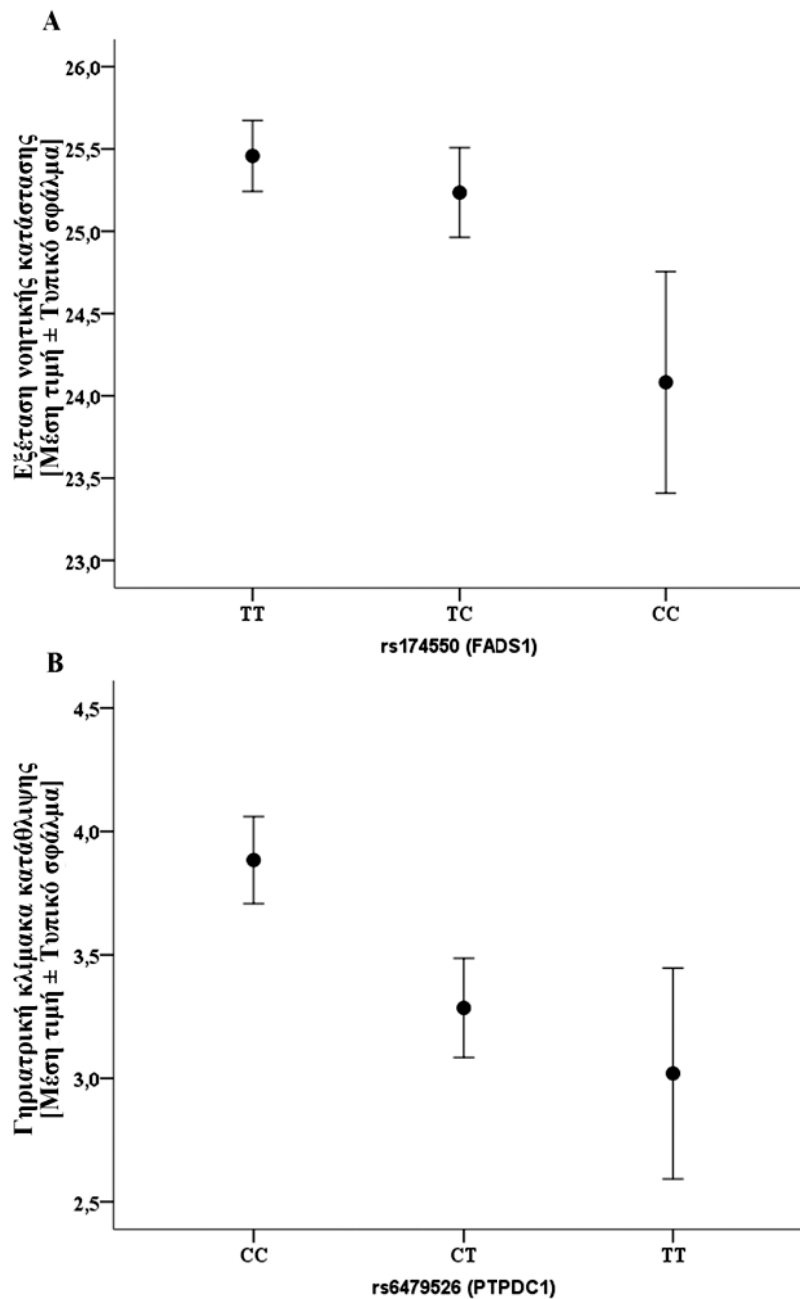
Στον Πίνακα 3.25 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των ελέγχων συσχέτισης των γενετικών δεικτών με τα σκορ εκτίμησης της γνωστικής λειτουργίας και της παρουσίας κατάθλιψης στους ηλικιωμένους.

Πίνακας 3.25. Συσχέτιση των πολυμορφισμών με ψυχοκοινωνικούς δείκτες στο σύνολο (N=843) των ηλικιωμένων εθελοντών.

			Μοντέλο 1	Μοντέλο 2		
			(συμμεταβλητές: φύλο, ηλικία)			
Εξαρτημένη μεταβλητή	SNP (γονίδιο)	Αλληλόμορφο αναφοράς (συχνότητα)	β*	P	β*	P
Ψυχοκοινωνικοί δείκτες						
Εξέταση νοητικής κατάστασης (0-30)	rs174550 (<i>FADSI</i>)	C (0,27)	-0,074	0,036	-0,075	0,020§
Γηριατρική κλίμακα κατάθλιψης (0-15)	rs35767 (<i>IGF1</i>)	A (0,21)	0,071	0,047	0,056	0,08§
	rs11167682 (<i>SAP30L</i>)	T (0,23)	-0,079	0,029	-0,080	0,025†
	rs1800795 ¹ (<i>IL-6</i>)	C (0,18)	0,118	0,054	0,114	0,06†
	rs6479526 (<i>PTPDC1</i>)	T (0,25)	-0,105	0,003	-0,104	0,003†
Εξαρτημένη μεταβλητή	SNP (γονίδιο)	Αλληλόμορφο αναφοράς (συχνότητα)	Λόγος πιθανοτήτων** (95% διαστήματα εμπιστοσύνης)	P	Λόγος πιθανοτήτων** (95% διαστήματα εμπιστοσύνης)	P
Καταθλιπτικά συμπτώματα ²	rs7034200 (<i>GLIS3</i>)	C (0,48)	1,285 (0,97; 1,68)	0,07	1,318 (1,00; 1,74)	0,049‡
	rs6479526 (<i>PTPDC1</i>)	C (0,75)	1,337 (0,96; 1,84)	0,08	1,317 (0,95; 1,82)	0,10‡

¹Επικρατές γενετικό μοντέλο. ²Απουσία έναντι παρουσίας. * Τυποποιημένος συντελεστής β της επίδρασης του πολυμορφισμού ανά αλληλόμορφο αναφοράς. §Σταθμισμένο για το μορφωτικό επίπεδο. †Σταθμισμένο για τον Δ.Μ.Σ. και την οικογενειακή κατάσταση. ‡Σταθμισμένο για την οικογενειακή κατάσταση. **Λόγος πιθανοτήτων της επίδρασης του πολυμορφισμού ανά αλληλόμορφο αναφοράς

Οι σημαντικότερες επιδράσεις ήταν του C αλληλομόρφου για τον πολυμορφισμό rs174550 (*FADS1*) στο σκορ γνωστικών λειτουργιών και του T αλληλομόρφου για τον πολυμορφισμό rs6479526 (*PTPDC1*) στο σκορ κατάθλιψης (**Εικόνα 3.41**).



Εικόνα 3.41. Διαφορές στο σκορ **A)** της εξέτασης νοητικής κατάστασης στους γονότυπους για τον πολυμορφισμό rs174550 (*FADS1*) και **B)** της κλίμακας γηριατρικής κατάθλιψης στους γονότυπους για τον πολυμορφισμό rs6479526 (*PTPDC1*).

3.5 Ανάλυση της αλληλεπίδρασης των γενετικών δεικτών με τη διατροφή και τα στοιχεία του τρόπου ζωής

Αξιολόγηση της αλληλεπίδρασης του βαθμού υιοθέτησης της Μεσογειακής διατροφής και των γενετικών δεικτών στην κατάσταση υγείας των ηλικιωμένων

Ο έλεγχος της αλληλεπίδρασης του βαθμού υιοθέτησης της Μεσογειακής διατροφής και των γενετικών δεικτών πραγματοποιήθηκε σε μοντέλα γραμμικής (για τις συνεχείς μεταβλητές) και λογιστικής (για τις κατηγορικές μεταβλητές) παλινδρόμησης. Ως ερμηνευτικές μεταβλητές συμπεριλήφθηκαν σε κάθε μοντέλο: το σκορ Μεσογειακής διατροφής, ο γενετικός δείκτης, η αλληλεπίδρασή τους (διατροφικό σκορ * γενετικός δείκτης), το φύλο, η ηλικία και άλλοι πιθανοί συμπαράγοντες. Οι έλεγχοι αλληλεπίδρασης περιορίστηκαν μόνο στους γενετικούς δείκτες με σημαντική επίδραση στα χαρακτηριστικά του δείγματος (**Πίνακες 3.22-3.25**), ενώ δεν βρέθηκε σημαντική διαφορά στο βαθμό υιοθέτησης της Μεσογειακής διατροφής μεταξύ των γονοτύπων για τους πολυμορφισμούς που ελέγχθηκαν. Τα αποτελέσματα των μοντέλων γραμμικής παλινδρόμησης για την εκτίμηση των αλληλεπιδράσεων σε επίπεδο σημαντικότητας $P < 0,10$ παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.26**.

Οι σημαντικότερες αλληλεπιδράσεις που βρέθηκαν ήταν μεταξύ της Μεσογειακής διατροφής και: του πολυμορφισμού rs560887 (*G6PC2*) στα επίπεδα δείκτη μάζας σώματος, του πολυμορφισμού rs7944584 (*MADD*) με τα επίπεδα συστολικής αρτηριακής πίεσης, του πολυμορφισμού rs1800629 (*TNF-α*) με τα επίπεδα διαστολικής αρτηριακής πίεσης, του πολυμορφισμού rs2191349 (*DGKB/THEM195*) με τα επίπεδα ινσουλίνης νηστείας και Homa-IR, του πολυμορφισμού rs340874 (*PROX1*) με τα επίπεδα ολικής χολερυθρίνης, του πολυμορφισμού rs560887 (*G6PC2*) για τα επίπεδα SGPT, του πολυμορφισμού rs457420 (*BRD3*) για τα επίπεδα αιματοκρίτη και αιμοσφαιρίνης και του πολυμορφισμού rs11167682 (*SAP30L*) για το σκορ στην γηριατρική κλίμακα κατάθλιψης.

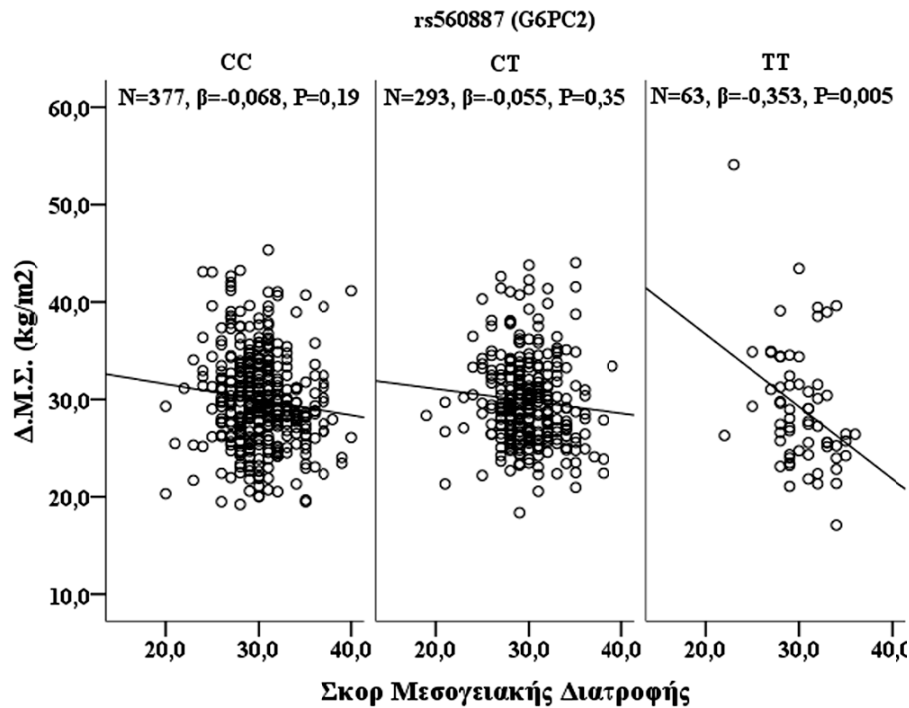
Πίνακας 3.26. Συσχέτιση της αλληλεπίδρασης του σκορ Μεσογειακής Διατροφής (0-55) και πολυμορφισμών με σωματομετρικούς, κλινικούς, γλυκαιμικούς λιπιδαιμικούς, βιοχημικούς αιματολογικούς και ψυχοκοινωνικούς δείκτες.

Εξαρτημένη μεταβλητή	SNP (γονίδιο)	Αλληλόμορφο αναφοράς (συχνότητα)	β^*	<i>P</i>
Σωματομετρικοί δείκτες				
Δ.Μ.Σ. (kg/m ²)	rs560887 (<i>G6PC2</i>)	T (0,29)	-0,684	0,056§
Κλινικοί δείκτες				
Συστολική αρτηριακή πίεση (mm Hg)	rs7944584 (<i>MADD</i>)	T (0,36)	-0,7082	0,041†
Διαστολική αρτηριακή πίεση (mm Hg)	rs1800629 ¹ (<i>TNF-α</i>)	A (0,08)	-0,888	0,018†
Γλυκαιμικοί δείκτες				
Ινσουλίνη νηστείας (pmol/L)	rs2191349 (<i>DGKB/THEM195</i>)	G (0,44)	-0,826	0,023‡
Homa-IR	rs2191349 (<i>DGKB/THEM195</i>)	G (0,44)	-0,838	0,019‡
Βιοχημικοί δείκτες²				
Ολική χολερυθρίνη (mg/dl)	rs340874 (<i>PROX1</i>)	T (0,48)	1,484	0,041**
SGPT (IU/L)	rs560887 (<i>G6PC2</i>)	T (0,29)	-1,491	0,019**
Αιματολογικοί δείκτες²				
Βασεόφιλα (%)	rs1800795 ¹ (<i>IL-6</i>)	C (0,18)	1,129	0,09**
Αιματοκρίτης (%)	rs457420 (<i>BRD3</i>)	T (0,42)	-1,599	0,011**
Αιμοσφαιρίνη (g/dl)	rs457420 (<i>BRD3</i>)	T (0,42)	-1,458	0,018**
TKE (mm/h)	rs4880 (<i>SOD2</i>)	C (0,47)	1,885	0,06**
Ψυχοκοινωνικοί δείκτες				
Γηριατρική κλίμακα κατάθλιψης (0-15)	rs11167682 (<i>SAP30L</i>)	T (0,23)	0,876	0,009§§

¹Επικρατές γενετικό μοντέλο. *Τυποποιημένος συντελεστής β της αλληλεπίδρασης του σκορ Μεσογειακής διατροφής ανά μονάδα και του πολυμορφισμού ανά αλληλόμορφο αναφοράς. §Σταθμισμένο για το φύλο, την ηλικία και τη φυσική δραστηριότητα. †Σταθμισμένο για το φύλο, την ηλικία, τον Δ.Μ.Σ. και τη λήψη αντιυπερτασικής θεραπείας. ‡Σταθμισμένο για το φύλο, την ηλικία και τον Δ.Μ.Σ. **Σταθμισμένο για το φύλο και την ηλικία. §§Σταθμισμένο για το φύλο, την ηλικία, τον Δ.Μ.Σ. και την οικογενειακή κατάσταση.

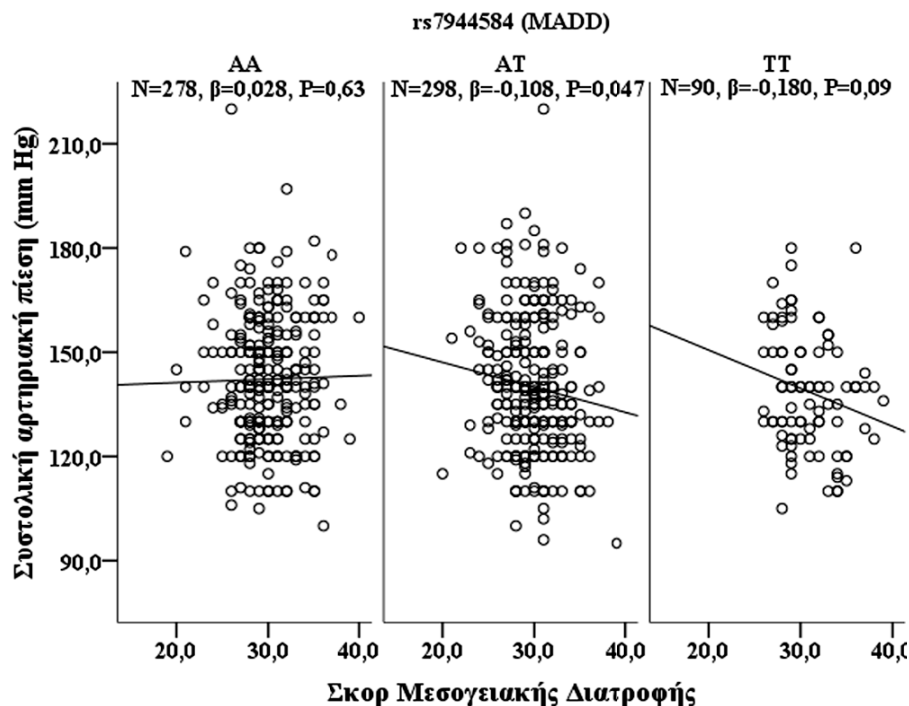
Οι σημαντικότερες αλληλεπιδράσεις διερευνήθηκαν με μοντέλα γραμμικής παλινδρόμησης ανά γονότυπο, συμπεριλαμβάνοντας ως ερμηνευτικές μεταβλητές: το σκορ Μεσογειακής διατροφής, το φύλο, την ηλικία και άλλους πιθανούς συμπαράγοντες. Τα αποτελέσματα αυτών των αναλύσεων παρουσιάζονται στις **Εικόνες 3.42-3.46**.

Διερευνώντας τη σημαντική αλληλεπίδραση του σκορ Μεσογειακής διατροφής με τον πολυμορφισμό rs560887 (*G6PC2*) στα επίπεδα του δείκτη μάζας σώματος (Δ.Μ.Σ.), βρέθηκε πως η μεγαλύτερου βαθμού υιοθέτηση της Μεσογειακής διατροφής στους ηλικιωμένους με γονότυπο TT είχε σημαντικά αρνητική επίδραση στα επίπεδα του Δ.Μ.Σ. ($\beta=-0,353$, $P=0,005$, σταθμισμένο για το φύλο και την ηλικία). Αντίθετα, η αντίστοιχη συσχέτιση δεν ήταν στατιστικά σημαντική για τους ηλικιωμένους με CC ή CT γονότυπο (**Εικόνα 3.42**).



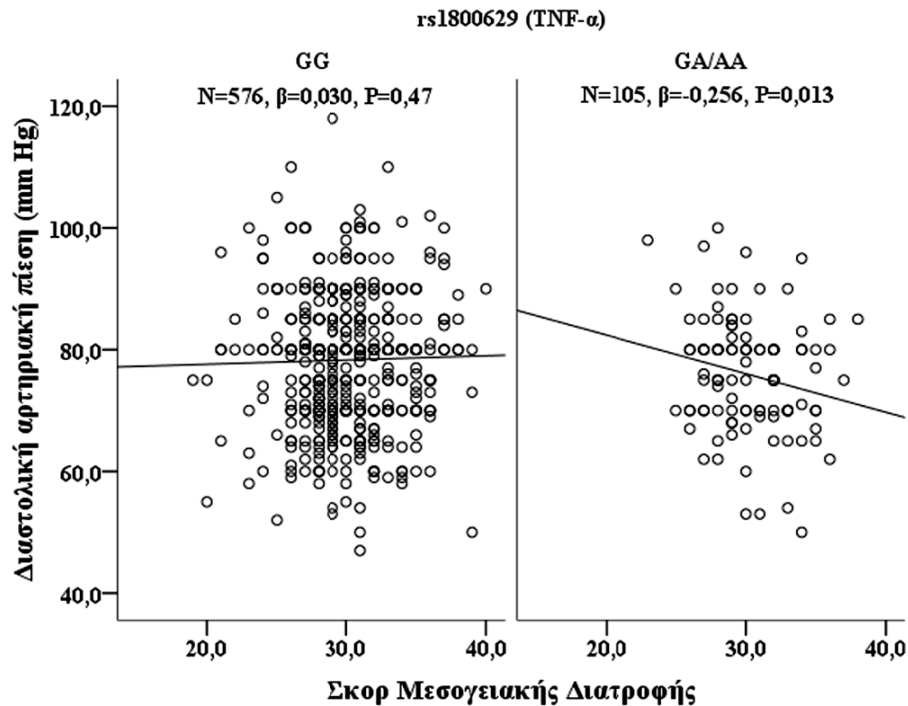
Εικόνα 3.42. Διαφορές στην επίδραση της Μεσογειακής διατροφής στα επίπεδα του δείκτη μάζας σώματος, ανά γονότυπο για τον πολυμορφισμό rs560887 (*G6PC2*).

Διερευνώντας τη σημαντική αλληλεπίδραση του σκορ Μεσογειακής διατροφής με τον πολυμορφισμό rs7944584 (*MADD*) στα επίπεδα της συστολικής αρτηριακής πίεσης, βρέθηκε πως η μεγαλύτερου βαθμού υιοθέτηση της Μεσογειακής διατροφής στους ηλικιωμένους με γονότυπο AT είχε σημαντικά αρνητική επίδραση στα επίπεδα της συστολικής αρτηριακής πίεσης ($\beta=-0,108$, $P=0,047$, σταθμισμένο για το φύλο, την ηλικία, τον Δ.Μ.Σ. και τη λήψη αντιυπερτασικής αγωγής). Η αντίστοιχη τάση καταγράφηκε και για τα άτομα με TT γονότυπο, ενώ αντίθετα η συσχέτιση ήταν θετική αλλά μη στατιστικά σημαντική για τους ηλικιωμένους με AA γονότυπο (**Εικόνα 3.43**).



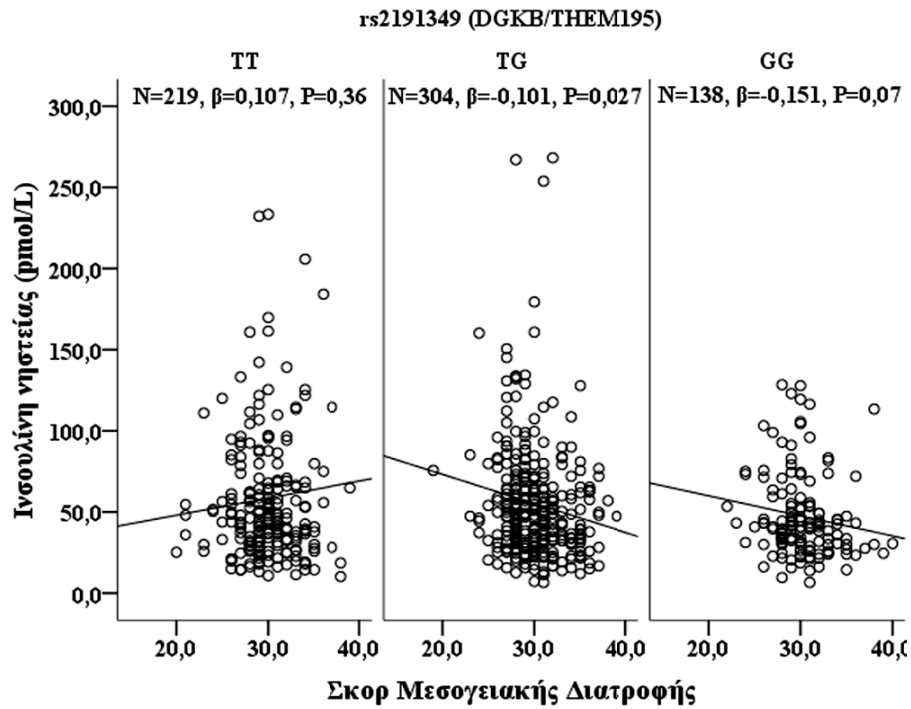
Εικόνα 3.43. Διαφορές στην επίδραση της Μεσογειακής διατροφής στα επίπεδα της συστολικής αρτηριακής πίεσης, ανά γονότυπο για τον πολυμορφισμό rs7944584 (*MADD*).

Διερευνώντας τη σημαντική αλληλεπίδραση του σκορ Μεσογειακής διατροφής με τον πολυμορφισμό rs1800629 (*TNF- α*) στα επίπεδα της διαστολικής αρτηριακής πίεσης, βρέθηκε πως η μεγαλύτερου βαθμού υιοθέτηση της Μεσογειακής διατροφής στους φορείς του A αλληλομόρφου είχε σημαντικά αρνητική επίδραση στα επίπεδα της διαστολικής αρτηριακής πίεσης ($\beta=-0,256$, $P=0,013$, σταθμισμένο για το φύλο, την ηλικία, τον Δ.Μ.Σ. και τη λήψη αντιυπερτασικής αγωγής). Αντίθετα, η συσχέτιση ήταν θετική αλλά μη στατιστικά σημαντική για τους ηλικιωμένους με GG γονότυπο (**Εικόνα 3.44**).

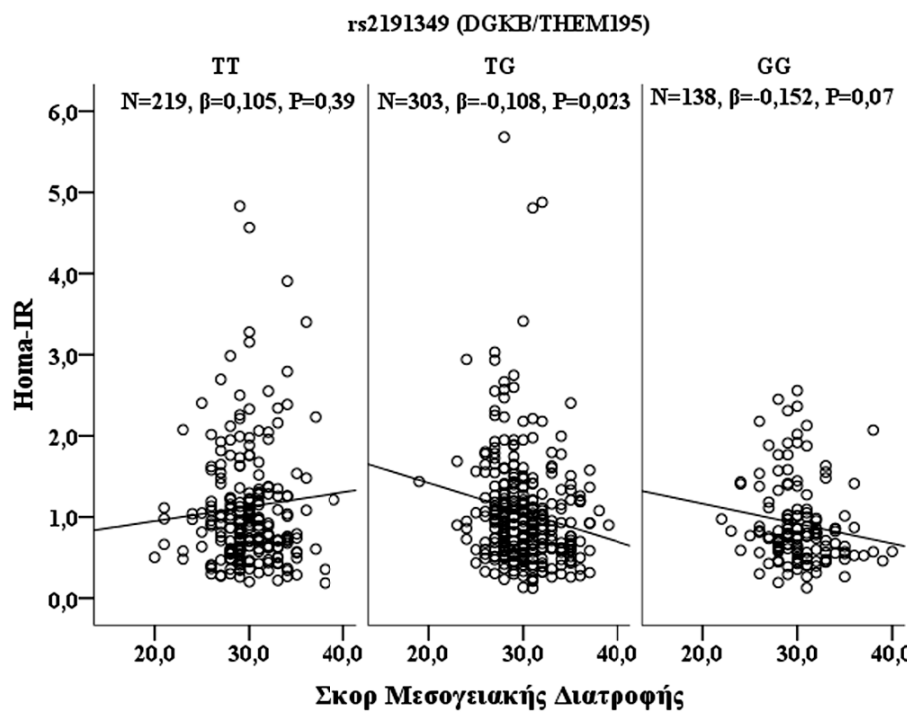


Εικόνα 3.44. Διαφορές στην επίδραση της Μεσογειακής διατροφής στα επίπεδα της διαστολικής αρτηριακής πίεσης, ανάμεσα στους φορείς και μη φορείς του A αλληλομόρφου για τον πολυμορφισμό rs1800629 (*TNF-α*).

Διερευνώντας τις σημαντικές αλληλεπιδράσεις του σκορ Μεσογειακής διατροφής με τον πολυμορφισμό rs2191349 (*DGKB/THEM195*) στα επίπεδα της ινσουλίνης νηστείας και Homa-IR, βρέθηκε πως η μεγαλύτερου βαθμού υιοθέτηση της Μεσογειακής διατροφής στους ηλικιωμένους με γονότυπο TG είχε σημαντικά αρνητική επίδραση στα επίπεδα της ινσουλίνης νηστείας και Homa-IR ($\beta=-0,101$, $P=0,027$, και $\beta=-0,108$, $P=0,023$, αντίστοιχα, σταθμισμένα για το φύλο, την ηλικία και τον Δ.Μ.Σ.). Η αντίστοιχη τάση καταγράφηκε και για τα άτομα με GG γονότυπο, ενώ αντίθετα η συσχέτιση ήταν θετική αλλά μη στατιστικά σημαντική για τους ηλικιωμένους με TT γονότυπο και για τα επίπεδα ινσουλίνης νηστείας (**Εικόνα 3.44**) και για τις τιμές Homa-IR (**Εικόνα 3.45**).



Εικόνα 3.45. Διαφορές στην επίδραση της Μεσογειακής διατροφής στα επίπεδα της ινσουλίνης νηστείας, ανά γονότυπο για τον πολυμορφισμό rs2191349 (DGKB/THEM195).



Εικόνα 3.46. Διαφορές στην επίδραση της Μεσογειακής διατροφής στις τιμές Homa-IR, ανά γονότυπο για τον πολυμορφισμό rs2191349 (DGKB/THEM195).

Σημαντικές αλληλεπιδράσεις βρέθηκαν επίσης ανάμεσα στο σκορ Μεσογειακής διατροφής και τον πολυμορφισμό rs4880 (*SOD*) με την πιθανότητα παρουσίας υπερχοληστερολαιμίας, καθώς και τον πολυμορφισμό rs780094 (*GCKR*) με την πιθανότητα παρουσίας ανεπάρκειας Zn στο πλάσμα (**Πίνακας 3.27**).

Πίνακας 3.27. Συσχέτιση της αλληλεπίδρασης του σκορ Μεσογειακής Διατροφής (0-55) και πολυμορφισμών με τον επιπολασμό υπερχοληστερολαιμίας και ανεπάρκειας ψευδαργύρου.

Εξαρτημένη μεταβλητή	SNP (γονίδιο)	Αλληλόμορφο αναφοράς (συχνότητα)	Λόγος πιθανοτήτων* (95% διαστήματα εμπιστοσύνης)	P§
Ιατρικό ιστορικό				
Υπερχοληστερολαιμία ¹	rs4880 (<i>SOD</i>)	T (0,53)	1,359 (1,13; 1,64)	0,001
Ανεπάρκεια Zn (≤10,5 μΜ) ^{1,2}	rs780094 (<i>GCKR</i>)	T (0,46)	0,836 (0,71; 0,98)	0,028

*Λόγος πιθανοτήτων της αλληλεπίδρασης του σκορ Μεσογειακής διατροφής ανά μονάδα και του πολυμορφισμού ανά αλληλόμορφο αναφοράς. §Σταθμισμένο για το φύλο και την ηλικία. ¹Απουσία έναντι παρουσίας. ²N=250.

Εκτίμηση της αλληλεπίδρασης της διατροφικής πρόσληψης ψευδαργύρου και των γενετικών δεικτών στον γηριατρικό πληθυσμό

Ο έλεγχος της αλληλεπίδρασης της διατροφικής πρόσληψης ψευδαργύρου και των γενετικών δεικτών πραγματοποιήθηκε σε μοντέλα γραμμικής (για τις συνεχείς μεταβλητές) και λογιστικής (για τις κατηγορικές μεταβλητές) παλινδρόμησης. Ως ερμηνευτικές μεταβλητές συμπεριλήφθηκαν σε κάθε μοντέλο: η διατροφική πρόσληψη ψευδαργύρου, ο γενετικός δείκτης, η αλληλεπίδρασή τους (διατροφικός ψευδαργύρος * γενετικός δείκτης), το φύλο, η ηλικία και άλλοι πιθανοί συμπαράγοντες. Οι έλεγχοι αλληλεπίδρασης περιορίστηκαν μόνο στους γενετικούς δείκτες με σημαντική επίδραση στα χαρακτηριστικά του δείγματος (**Πίνακες 3.22-3.25**), ενώ δεν βρέθηκε σημαντική διαφορά στη διατροφική πρόσληψη ψευδαργύρου μεταξύ των γονοτύπων για τους πολυμορφισμούς που ελέγχθηκαν.

Τα αποτελέσματα των μοντέλων γραμμικής παλινδρόμησης για την εκτίμηση των αλληλεπιδράσεων σε επίπεδο σημαντικότητας $P < 0,10$ παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.28**. Οι σημαντικότερες αλληλεπιδράσεις που βρέθηκαν ήταν μεταξύ της διατροφικής πρόσληψης ψευδαργύρου και: του πολυμορφισμού rs560887 (*G6PC2*) στα επίπεδα HDL-

C, των πολυμορφισμών rs340874 (*PROXI*) και rs7944584 (*MADD*) με τα επίπεδα οξειδωμένης LDL-C και του πολυμορφισμού rs340874 (*PROXI*) με τα επίπεδα ολικής χολερυθρίνης.

Τα αποτελέσματα των μοντέλων λογιστικής παλινδρόμησης για την εκτίμηση των αλληλεπιδράσεων σε επίπεδο σημαντικότητας $P < 0,10$ παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.29**. Οι σημαντικότερες αλληλεπιδράσεις που βρέθηκαν ήταν μεταξύ της διατροφικής πρόσληψης ψευδαργύρου και: του πολυμορφισμού rs8052394 (*MTIA*) για την πιθανότητα παρουσίας υπέρτασης, του πολυμορφισμού rs4675095 (*IRSI*) για την πιθανότητα παρουσίας καρδιαγγειακών νοσημάτων και του πολυμορφισμού rs7034200 (*GLIS3*) για την πιθανότητα παρουσίας καταθλιπτικών συμπτωμάτων.

Πίνακας 3.28. Συσχέτιση της αλληλεπίδρασης της διατροφικής πρόσληψης ψευδαργύρου (mg/ημέρα) και πολυμορφισμών με σωματομετρικούς, κλινικούς, γλυκαιμικούς, λιπιδαιμικούς, βιοχημικούς αιματολογικούς και ψυχοκοινωνικούς δείκτες.

Εξαρτημένη μεταβλητή	SNP (γονίδιο)	Αλληλόμορφο αναφοράς (συχνότητα)	β^*	P
Κλινικοί δείκτες				
Συστολική αρτηριακή πίεση (mm Hg)	rs11167682 (<i>SAP30L</i>)	T (0,23)	0,240	0,06§
	rs1800795 ¹ (<i>IL-6</i>)	C (0,18)	-0,322	0,10§
Γλυκαιμικοί δείκτες				
Γλυκόζη νηστείας (mg/dl)	rs174550 (<i>FADS1</i>)	C (0,27)	0,198	0,07†
Λιπιδαιμικοί δείκτες				
HDL-C (mg/dl)	rs560887 (<i>G6PC2</i>)	T (0,29)	0,323	0,013‡
Οξειδωμένη LDL-C (mg/dl) ²	rs340874 (<i>PROXI</i>)	T (0,48)	0,695	0,018**
	rs7944584 (<i>MADD</i>)	T (0,36)	0,671	0,028**
Φλεγμονώδεις δείκτες³				
MIP1a (pg/ml)	rs1800795 ¹ (<i>IL-6</i>)	C (0,18)	-0,329	0,09**
Βιοχημικοί δείκτες³				
Ολική χολερυθρίνη (mg/dl)	rs340874 (<i>PROXI</i>)	T (0,48)	-0,460	0,043**
Ψυχοκοινωνικοί δείκτες				
Γηριατρική κλίμακα κατάθλιψης (0-15)	rs11167682 (<i>SAP30L</i>)	T (0,23)	0,241	0,06§§

¹Επικρατές γενετικό μοντέλο. ²N=175. ³N=250. *Τυποποιημένος συντελεστής β της αλληλεπίδρασης της διατροφικής πρόσληψης Zn ανά mg/ημέρα και του πολυμορφισμού ανά αλληλόμορφο αναφοράς. §Σταθμισμένο για το φύλο, την ηλικία, τον Δ.Μ.Σ. και τη λήψη αντιυπερτασικής θεραπείας. †Σταθμισμένο για το φύλο, την ηλικία, τον Δ.Μ.Σ. και τη λήψη αντιδιαβητικής θεραπείας. ‡Σταθμισμένο για το φύλο, την ηλικία, τον Δ.Μ.Σ. και τη λήψη αντιλιπιδαιμικής θεραπείας. **Σταθμισμένο για το φύλο, την ηλικία και την θερμιδική πρόσληψη. §§Σταθμισμένο για το φύλο, την ηλικία, τον Δ.Μ.Σ. και την οικογενειακή κατάσταση.

Πίνακας 3.29. Συσχέτιση της αλληλεπίδρασης της διατροφικής πρόσληψης ψευδαργύρου (mg/ημέρα) και πολυμορφισμών με την πιθανότητα παρουσίας νοσημάτων στο σύνολο των ηλικιωμένων.

Εξαρτημένη μεταβλητή	SNP (γονίδιο)	Αλληλόμορφο αναφοράς (συχνότητα)	Λόγος πιθανοτήτων* (95% διαστήματα εμπιστοσύνης)	P
Ιατρικό ιστορικό				
Υπέρταση ¹	rs8052394 ² (<i>MTIA</i>)	A (0,87)	1,213 (1,01; 1,45)	0,037§
Καρδιαγγειακά νοσήματα ¹	rs4675095 (<i>IRS1</i>)	A (0,89)	0,768 (0,60; 0,99)	0,041§
Ψυχοκοινωνικοί δείκτες				
Καταθλιπτικά συμπτώματα ¹	rs7034200 (<i>GLIS3</i>)	C (0,48)	1,180 (1,05; 1,33)	0,005†

¹Απουσία έναντι παρουσίας. ²Επικρατές γενετικό μοντέλο. *Λόγος πιθανοτήτων της αλληλεπίδρασης της διατροφικής πρόσληψης Zn ανά mg/ημέρα και του πολυμορφισμού ανά αλληλόμορφο αναφοράς. §Σταθμισμένο για το φύλο, την ηλικία και τον Δ.Μ.Σ. †Σταθμισμένο για το φύλο, την ηλικία, την θερμιδική πρόσληψη και την οικογενειακή κατάσταση.

Έλεγχος της αλληλεπίδρασης της φυσικής δραστηριότητας και των γενετικών δεικτών στους ηλικιωμένους

Ο έλεγχος της αλληλεπίδρασης της φυσικής δραστηριότητας και των γενετικών δεικτών πραγματοποιήθηκε σε μοντέλα γραμμικής (για τις συνεχείς μεταβλητές) και λογιστικής (για τις κατηγορικές μεταβλητές) παλινδρόμησης. Ως ερμηνευτικές μεταβλητές συμπεριλήφθηκαν σε κάθε μοντέλο: η φυσική δραστηριότητα, ο γενετικός δείκτης, η αλληλεπίδρασή τους (φυσική δραστηριότητα * γενετικός δείκτης), το φύλο, η ηλικία και άλλοι πιθανοί συμπαράγοντες. Οι έλεγχοι αλληλεπίδρασης περιορίστηκαν μόνο στους γενετικούς δείκτες με σημαντική επίδραση στα χαρακτηριστικά του δείγματος (**Πίνακες 3.22-3.25**), ενώ δεν βρέθηκε σημαντική διαφορά στα επίπεδα φυσικής δραστηριότητας μεταξύ των γονοτύπων για τους πολυμορφισμούς που ελέγχθηκαν.

Τα αποτελέσματα των μοντέλων παλινδρόμησης για την εκτίμηση των αλληλεπιδράσεων σε επίπεδο σημαντικότητας $P < 0,10$ παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.30**. Οι σημαντικότερες αλληλεπιδράσεις που βρέθηκαν ήταν μεταξύ της φυσικής δραστηριότητας και: των πολυμορφισμών rs10493846 (*SEC63D1*) και rs11167682 (*SAP30L*) στα επίπεδα της συστολικής αρτηριακής πίεσης, του πολυμορφισμού rs2191349

(*DGKB/THEM195*) στα επίπεδα γλυκόζης νηστείας, του πολυμορφισμού rs10493846 (*SEC63D1*) στον αριθμό των λευκοκυττάρων, του πολυμορφισμού rs1800795 (*IL-6*) στο ποσοστό των ιωσινόφιλων, του πολυμορφισμού rs457420 (*BRD3*) στις τιμές αιματοκρίτη, αιμοσφαιρίνης και ταχύτητας καθίζησης ερυθροκυττάρων και του πολυμορφισμού rs6479526 (*PTPDC1*) για το σκορ στην κλίμακα γηριατρικής κατάθλιψης.

Πίνακας 3.30. Συσχέτιση της αλληλεπίδρασης της φυσικής δραστηριότητας (MET-λεπτά/εβδομάδα) και πολυμορφισμών με σωματομετρικούς, κλινικούς, γλυκαιμικούς, λιπιδαιμικούς, βιοχημικούς αιματολογικούς και ψυχοκοινωνικούς δείκτες.

Εξαρτημένη μεταβλητή	SNP (γονίδιο)	Αλληλόμορφο αναφοράς (συχνότητα)	β*	P
Κλινικοί δείκτες				
Συστολική αρτηριακή πίεση (mm Hg)	rs10493846 (<i>SEC63D1</i>)	T (0,18)	-0,231	0,029§
	rs11167682 (<i>SAP30L</i>)	T (0,23)	-0,258	0,016§
Γλυκαιμικοί δείκτες				
Γλυκόζη νηστείας (mg/dl)	rs2191349 (<i>DGKB/THEM195</i>)	G (0,44)	0,218	0,018†
Λιπιδαιμικοί δείκτες				
HDL-C (mg/dl)	rs35767 (<i>IGF1</i>)	A (0,21)	-0,215	0,051‡
Βιοχημικοί δείκτες¹				
Αλβουμίνη (g/dl)	rs35767 (<i>IGF1</i>)	A (0,21)	-0,284	0,10**
Αιματολογικοί δείκτες¹				
Λευκοκύτταρα (10 ³ /ml)	rs10493846 (<i>SEC63D1</i>)	T (0,18)	-0,502	0,006**
Ιωσινόφιλα (%)	rs1800795 ² (<i>IL-6</i>)	C (0,18)	0,385	0,022**
Αιματοκρίτης (%)	rs457420 (<i>BRD3</i>)	T (0,12)	-0,360	0,027**
Αιμοσφαιρίνη (g/dl)	rs780094 (<i>GCKR</i>)	T (0,46)	0,282	0,10**
	rs457420 (<i>BRD3</i>)	T (0,42)	-0,344	0,031**
TKE (mm/h)	rs457420 (<i>BRD3</i>)	T (0,42)	0,500	0,002**
Ψυχοκοινωνικοί δείκτες				
Εξέταση νοητικής κατάστασης (0-30)	rs174550 (<i>FADS1</i>)	C (0,27)	0,181	0,053§§
Γηριατρική κλίμακα κατάθλιψης (0-15)	rs6479526 (<i>PTPDC1</i>)	T (0,25)	0,220	0,033††

¹N=250. ²Επικρατές γενετικό μοντέλο. *Τυποποιημένος συντελεστής β της αλληλεπίδρασης της φυσικής δραστηριότητας ανά MET-λεπτά/εβδομάδα και του πολυμορφισμού ανά αλληλόμορφο αναφοράς. §Σταθμισμένο για το φύλο, την ηλικία, τον Δ.Μ.Σ. και τη λήψη αντιυπερτασικής θεραπείας. †Σταθμισμένο για το φύλο, την ηλικία, τον Δ.Μ.Σ. και τη λήψη αντιδιαβητικής θεραπείας. ‡Σταθμισμένο για το φύλο, την ηλικία, τον Δ.Μ.Σ. και τη λήψη αντιλιπιδαιμικής θεραπείας. **Σταθμισμένο για το φύλο και την ηλικία. §§Σταθμισμένο για το φύλο, την ηλικία και το μορφωτικό επίπεδο. ††Σταθμισμένο για το φύλο, την ηλικία, τον Δ.Μ.Σ. και την οικογενειακή κατάσταση.

3.6 Αξιολόγηση της επίδρασης της χορήγησης συμπληρώματος ψευδαργύρου σε δείκτες υγείας των ηλικιωμένων

Η παρεμβατική μελέτη περιελάμβανε τη χορήγηση 10 mg/ημέρα ασπαρτικού ψευδαργύρου (Zn) σε δισκία (Unizink 50, Köhler Pharma Corp., Alsbach-Hähnlein, Germany) για 6 εβδομάδες. Τα κριτήρια για την επιλογή των εθελοντών ήταν η ανεπάρκεια Zn ($\leq 10,5$ μM στο πλάσμα), κατά τη χρονική στιγμή της στρατολόγησης. Η μελέτη παρέμβασης πραγματοποιήθηκε περίπου έναν χρόνο μετά την αρχική στρατολόγηση των εθελοντών.

Στη μελέτη συμμετείχαν συνολικά 30 ηλικιωμένοι (16 γυναίκες και 14 άντρες) με μέση ηλικία $71,2 \pm 6,6$ έτη. Τα επίπεδα Zn πλάσματος τη στιγμή της στρατολόγησης ήταν $9,3 \pm 1,2$ μM . Η μέση διατροφική πρόσληψη Zn, όπως εκτιμήθηκε πριν την έναρξη της παρέμβασης από τις διατροφικές ανακλήσεις 24-ώρου, ήταν $7,0 \pm 3,2$ mg/ημέρα. Στον **Πίνακα 3.31** παρουσιάζονται τα επίπεδα των βιοχημικών, φλεγμονωδών, αιματολογικών και ψυχοκοινωνικών δεικτών, πριν και μετά τη χορήγηση του συμπληρώματος Zn.

Τα επίπεδα Zn στο πλάσμα ήταν $11,4 \pm 1,6$ μM πριν την έναρξη της χορήγησης, ενώ δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μετά τη λήψη του συμπληρώματος. Αντίθετα, παρατηρήθηκε σημαντική **μείωση στα επίπεδα γλυκόζης νηστείας** ($P=1,6 \times 10^{-4}$) και αύξηση στα επίπεδα τριγλυκεριδίων ($P=0,033$). Ανάμεσα στους δείκτες φλεγμονής, παρατηρήθηκε σημαντική **αύξηση των επιπέδων IL-6 και RANTES** ($P=0,009$ και $P=0,002$, αντίστοιχα), μετά τη λήψη του συμπληρώματος για 6 εβδομάδες. Παράλληλα, παρατηρήθηκε **αύξηση στο σκορ εξέτασης νοητικής κατάστασης** των ηλικιωμένων μετά τη λήψη του συμπληρώματος Zn ($P=0,008$).

Πίνακας 3.31. Σύγκριση των επιπέδων βιοχημικών, φλεγμονωδών, αιματολογικών και ψυχοκοινωνικών δεικτών πριν και μετά τη χορήγηση συμπληρώματος ψευδαργύρου.

Χαρακτηριστικό	Πριν τη χορήγηση	Μετά τη χορήγηση	P*
N (Γυναίκες/Άντρες)	30 (16/14)	30 (16/14)	
Βιοχημικοί δείκτες			
Zn πλάσματος (μM)	11,4 (1,6) ¹	11,0 (1,6)	0,44
Γλυκόζη νηστείας (mg/dl)	113,5 (26,9)	94,4 (22,2)	1,6x10⁻⁴
Ολική χοληστερόλη (mg/dl)	214,7 (45,8)	221,3 (35,6)	0,20
LDL-C (mg/dl)	142,4 (34,6)	149,0 (30,5)	0,18
HDL-C (mg/dl)	50,7 (18,3)	47,7 (9,9)	0,14
Τριγλυκερίδια (mg/dl)	108,3 (46,3)	123,0 (43,0)	0,033
Φλεγμονώδεις δείκτες			
IL-6 (pg/ml)	4,8 (4,0)	8,2 (5,4)	0,009
IL-8 (pg/ml)	13,1 (8,4)	17,4 (6,6)	0,31
MCP1 (pg/ml)	102,7 (47,3)	97,7 (24,7)	0,96
RANTES (ng/ml)	6,7 (4,5)	9,8 (5,1)	0,002
Αιματολογικοί δείκτες			
Λευκοκύτταρα (10 ³ /ml)	6,5 (2,0)	6,2 (1,7)	0,06
Λεμφοκύτταρα (%)	30,5 (7,3)	32,0 (6,7)	0,34
Μονοπύρηνα (%)	6,2 (1,5)	5,5 (1,0)	0,035
Πολυμορφοπύρηνα (%)	63,2 (7,8)	62,5 (7,0)	0,68
Ερυθροκύτταρα (10 ⁶ /ml)	4,8 (0,5)	4,9 (0,5)	0,33
Αιμοπετάλια (10 ³ /ml)	208,4 (50,8)	237,1 (52,0)	0,002
Αιματοκρίτης (%)	45,5 (4,9)	44,7 (4,5)	0,06
Αιμοσφαιρίνη (g/dl)	14,7 (1,7)	14,7 (1,5)	0,30
Ψυχοκοινωνικοί δείκτες			
Εξέταση νοητικής κατάστασης (0-30)	24,5 (4,0)	26,3 (2,8)	0,008
Γηριατρική κλίμακα κατάθλιψης (0-15)	2,1 (2,6)	1,9 (2,2)	0,77

¹Μέση τιμή (τυπική απόκλιση), ομοίως για όλες τις συνεχείς μεταβλητές. *Wilcoxon's paired test.

4. Συζήτηση

Στην παρούσα γηριατρική μελέτη (GHRAS Study – Greek Health Randomized Ageing Study) αξιολογήθηκαν βιομόρια (λιπίδια, γλυκόζη, ινσουλίνη, φλεγμονώδεις δείκτες και ψευδάργυρος), γενετικοί, ανθρωπομετρικοί και κλινικοί δείκτες, το ιατρικό ιστορικό, οι διατροφικές συνήθειες και άλλα στοιχεία του τρόπου ζωής (δημογραφικά στοιχεία, φυσική δραστηριότητα, κάπνισμα, παρουσία κατάθλιψης και έκπτωση γνωστικών λειτουργιών) σε δείγμα ηλικιωμένων Ελλήνων (253). Συνολικά, στρατολογήθηκαν 843 ηλικιωμένοι (71,8% γυναίκες και 28,2% άντρες), με μέση ηλικία τα $71,9 \pm 7,4$ έτη (ελάχιστη 60,0 και μέγιστη 94,5 έτη).

Δείκτες υγείας και παράγοντες νοσηρότητας στους ηλικιωμένους

Στην παρούσα μελέτη, καταγράφηκαν υψηλά ποσοστά υπέρτασης (70,9%) και υπερχοληστερολαιμίας (86,7%) στο σύνολο των ηλικιωμένων εθελοντών. Η υπέρταση είχε μεγαλύτερο επιπολασμό στους άντρες έναντι των γυναικών (81,1% έναντι 66,9% αντίστοιχα, $P=0,004$), ενώ η υπερχοληστερολαιμία ήταν πιο συχνή στις γυναίκες σε σχέση με τους άντρες (89,9% έναντι 78,6% αντίστοιχα, $P=2,9 \times 10^{-4}$). Αντίστοιχα αυξημένα ποσοστά υπέρτασης και υπερχοληστερολαιμίας σε γηριατρικούς πληθυσμούς έχουν καταγραφεί και σε άλλες μεγάλες μελέτες (184, 279, 280), ενώ παράλληλα φαίνεται πως οι ηλικιωμένες γυναίκες επανειλημμένα εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα λιπιδίων σε σχέση με τους άντρες (53, 54, 71). Η συχνότητα εμφάνισης σακχαρώδη διαβήτη 2 (ΣΔ 2) ήταν 15,4% και καρδιαγγειακών νοσημάτων 19,5%.

Η μέση τιμή του δείκτη μάζας σώματος (Δ.Μ.Σ.) στο σύνολο του δείγματος ήταν $29,9 \pm 4,9$ kg/m², ενώ η συχνότητα εμφάνισης υπέρβαρου ($25,0$ kg/m² ≤ Δ.Μ.Σ. < $29,9$ kg/m²) και παχυσαρκίας (Δ.Μ.Σ. ≥ $30,0$ kg/m²) ήταν 41,7% και 44,5%, αντίστοιχα. Οι ηλικιωμένες γυναίκες ήταν σε μεγαλύτερο ποσοστό παχύσαρκες σε σύγκριση με τους άντρες (48,4% έναντι 34,3%), ενώ οι άντρες εμφάνιζαν μεγαλύτερα ποσοστά υπέρβαρου (49,2% έναντι 38,8%). Συνολικά, το 87,2% των γυναικών και το 83,5% των αντρών ήταν υπέρβαροι ή παχύσαρκοι (Δ.Μ.Σ. ≥ $25,0$ kg/m²). Αντίστοιχα υψηλά επίπεδα παχυσαρκίας σε ελληνικό γηριατρικό πληθυσμό έχουν καταγραφεί και από την μελέτη MEDIS (281), ενώ υψηλότερα επίπεδα Δ.Μ.Σ. στις γυναίκες έναντι των αντρών έχουν βρεθεί και σε άλλη ελληνική μελέτη ηλικιωμένων (282). Στις Μεσογειακές χώρες η συχνότητα εμφάνισης της παχυσαρκίας στην τρίτη ηλικία είναι αρκετά υψηλή. Στην Ιταλία, εκτιμάται πως το 48,6%

των ηλικιωμένων αντρών και το 54,9% των γυναικών έχουν $\Delta.Μ.Σ. \geq 25 \text{ kg/m}^2$ (24), ενώ στη νότια Ιταλία τα ποσοστά είναι υψηλότερα (76% στους άντρες και 86% στις γυναίκες) (38). Στην Ισπανία, η συχνότητα εμφάνισης υπέρβαρου και παχυσαρκίας υπολογίζεται σε 49,0% και 31,5% αντίστοιχα στους άντρες και 39,8% και 40,8% αντίστοιχα στις γυναίκες (39).

Η ανεπάρκεια ψευδαργύρου πλάσματος ($\leq 10,5 \text{ μM}$) καταγράφηκε στο 27,7% του δείγματος των ηλικιωμένων (25,6% στις γυναίκες και 31,2% στους άντρες). Η συχνότητα εμφάνισης ανεπάρκειας ψευδαργύρου πλάσματος στο δείγμα ηλικιωμένων Ελλήνων, όπως καταγράφεται στην παρούσα μελέτη, είναι παρόμοια με τη συχνότητα που καταγράφηκε και σε άλλους Ευρωπαϊκούς πληθυσμούς ηλικιωμένων στα πλαίσια της μελέτης Zincage (283). Αντίθετα, παρόμοιες αλλά μικρότερες μελέτες στην Ευρώπη εκτιμούν χαμηλότερο επιπολασμό ($< 5\%$) της ανεπάρκειας ψευδαργύρου σε ηλικιωμένους Ευρωπαίους (227).

Η αύξηση της ηλικίας βρέθηκε να επηρεάζει αρνητικά τα επίπεδα ολικής χοληστερόλης, LDL-C και οξειδωμένης LDL-C και θετικά τα επίπεδα συστολικής αρτηριακής πίεσης, IL-6 και IL-8 ($P=0,039$, $P=0,003$, $P=0,005$, $P=2,3 \times 10^{-5}$, $P=0,015$, $P=0,032$, αντίστοιχα). Η επίδραση της ηλικίας σε κλινικούς και βιοχημικούς δείκτες, όπως καταγράφεται στην παρούσα μελέτη, επιβεβαιώνεται και από προοπτικές μελέτες (83, 259, 284, 285). Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης “Framingham”, η αύξηση της ηλικίας συνοδεύεται με σημαντική αύξηση των επιπέδων της συστολικής αρτηριακής πίεσης, ενώ αντίθετα η διαστολική σταθεροποιείται ή και μειώνεται μετά τα 60 έτη (83). Παράλληλα, η αύξηση της ηλικίας συνδέεται και με σταδιακή μείωση των επιπέδων ολικής χοληστερόλης ανεξάρτητα από τα αρχικά επίπεδα συστολικής αρτηριακής πίεσης, δείκτη μάζας σώματος, φυσικής δραστηριότητας, καπνίσματος ή/και λήψης αντι-υπερτασικής και αντιλιπιδαιμικής θεραπείας (284). Η θετική επίδραση της ηλικίας στα επίπεδα IL-6 και IL-8 είναι σε συμφωνία και με άλλες μελέτες, όπου παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα πλάσματος φλεγμονωδών κυτταροκινών σε ηλικιωμένους (259, 285, 286).

Επίδραση της διατροφής και της φυσικής δραστηριότητας στα επίπεδα βιομορίων σε γηριατρικούς πληθυσμούς

Η Μεσογειακή διατροφή σχετίστηκε αρνητικά με τα επίπεδα Δ.Μ.Σ., γλυκόζης νηστείας, τριγλυκεριδίων και IL-8 και θετικά με τα επίπεδα HDL-C ($P=0,008$, $P=0,003$, $P=0,018$, $P=0,005$, $P=0,001$, $P=0,038$, αντίστοιχα). Η διατροφική πρόσληψη ψευδαργύρου σχετίστηκε θετικά με τα επίπεδα ψευδαργύρου πλάσματος και αρνητικά με τα επίπεδα τριγλυκεριδίων ($P=0,045$, $P=0,002$, αντίστοιχα), ενώ η φυσική δραστηριότητα αρνητικά με τα επίπεδα Δ.Μ.Σ. ($P=0,025$). Παράλληλα, ύστερα από τη χορήγηση συμπληρώματος ψευδαργύρου (10 mg/ημέρα για 6 εβδομάδες) παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στα επίπεδα γλυκόζης νηστείας ($P=1,6 \times 10^{-4}$) και αύξηση στο σκορ εξέτασης νοητικής κατάστασης των ηλικιωμένων ($P=0,008$).

Αρκετές επιδημιολογικές (180-186) καθώς και παρεμβατικές μελέτες (187-190), έχουν συσχετίσει τη Μεσογειακή διατροφή με χαμηλά επίπεδα αρτηριακής πίεσης και ολικής χοληστερόλης, με χαμηλή συχνότητα εμφάνισης διαβήτη, με μειωμένη φλεγμονή και με βελτιωμένη πηκτική ικανότητα και ενδοθηλιακή λειτουργία σε γηριατρικούς πληθυσμούς. Πρόσφατα, σε μια μελέτη ηλικιωμένων στην Κύπρο, βρέθηκε πως η μεγαλύτερου βαθμού υιοθέτηση της Μεσογειακής διατροφής συνδέεται με χαμηλότερα επίπεδα ολικής χοληστερόλης, ακόμη και σε ηλικιωμένους που λάμβαναν αντιλιπιδαιμική αγωγή με στατίνες (184). Παράλληλα, τα αποτελέσματα της παρεμβατικής μελέτης “PREDIMED” σε ηλικιωμένους, έδειξαν σημαντική βελτίωση του λιπιδαιμικού προφίλ και μείωση των φλεγμονωδών παραγόντων, ύστερα από τρίμηνη υιοθέτηση της Μεσογειακής διατροφής (187, 196). Σε μια έρευνα με ηλικιωμένους εθελοντές από τις μελέτες “Framingham” και “SENECA”, βρέθηκε αρνητική συσχέτιση της Μεσογειακής διατροφής με την περιφέρεια μέσης και τον Δ.Μ.Σ. (199). Στη μελέτη “MEDIS” καταγράφηκε επίσης μειωμένη πιθανότητα εμφάνισης παχυσαρκίας με τη μεγαλύτερου βαθμού υιοθέτηση της Μεσογειακής διατροφής σε ηλικιωμένους από Ελληνικά νησιά και την Κύπρο (200).

Στην παρούσα μελέτη βρέθηκε θετική συσχέτιση της διατροφικής πρόσληψης ψευδαργύρου με τα επίπεδα του ιχνοστοιχείου στο πλάσμα. Αντίστοιχα αποτελέσματα άλλων μελετών είναι αντικρουόμενα, καθώς σε κάποιες μελέτες επιβεβαιώνεται η συσχέτιση της διατροφικής πρόσληψης ψευδαργύρου με τις τιμές του στο πλάσμα, ενώ σε άλλες μελέτες δεν αναδεικνύεται σημαντική συσχέτιση (227, 287-290). Αυτές οι διαφορές

θα μπορούσαν να οφείλονται σε αρκετούς λόγους, συμπεριλαμβανομένων των διαφορετικών εργαλείων διατροφικής αξιολόγησης, καθώς και των αλληλεπιδράσεων του ψευδαργύρου με άλλα θρεπτικά συστατικά και με ορισμένα φαρμακευτικά έκδοχα (231, 291, 292).

Παράλληλα, τα αποτελέσματα της παρούσας παρεμβατικής μελέτης χορήγησης συμπληρώματος ψευδαργύρου σε υποομάδα ηλικιωμένων έδειξαν σημαντική μείωση των επιπέδων γλυκόζης μετά τη λήψη 10 mg/ημέρα ασπαρτικού ψευδαργύρου για 6 εβδομάδες. Είναι γνωστό πως ο ψευδάργυρος είναι απαραίτητος στα β-κύτταρα για την κρυσταλλοποίηση της ινσουλίνης σε εξαμερή και την έκκρισή της από το πάγκρεας (293). Παράλληλα, ο ψευδάργυρος εκκρίνεται μαζί με την ινσουλίνη και ασκεί ινσουλινομιμητικές και αντιοξειδωτικές δράσεις, ενώ συμμετέχει και στη ρύθμιση της μάζας των β-κυττάρων (294, 295). Η διαταραγμένη ομοιόσταση του ψευδαργύρου είναι χαρακτηριστική σε πειραματόζωα αλλά και σε ανθρώπους με διαβήτη (296, 297). Συγκεκριμένα, δοκιμές με χορήγηση συμπληρώματος ψευδαργύρου σε πειραματόζωα επιβεβαιώνουν την προστατευτική δράση του ψευδαργύρου έναντι του ΣΔ2, ενώ στους ανθρώπους τα επίπεδα ψευδαργύρου πλάσματος σχετίζονται με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔ2 (297). Ωστόσο, η αιτιώδης σχέση ανάμεσα στον ψευδάργυρο και τον ΣΔ2 στους ανθρώπους δεν είναι πλήρως τεκμηριωμένη. Επιδημιολογικά δεδομένα από πληθυσμιακές μελέτες είναι ενδεικτικά της συσχέτισης του διατροφικού ψευδαργύρου (τροφές ή/και συμπληρώματα) με μειωμένο κίνδυνο ΣΔ2 (298-300). Αντίθετα, οι περιορισμένες παρεμβατικές μελέτες διερεύνησης της επίδρασης χορήγησης συμπληρώματος ψευδαργύρου στο μεταβολισμό της γλυκόζης, στην ομοιόσταση της ινσουλίνης και στον κίνδυνο ΣΔ2 καταλήγουν σε αντικρουόμενα αποτελέσματα (297, 301). Συνεπώς, αν και η χορήγηση συμπληρώματος ψευδαργύρου αποτελεί πιθανό θεραπευτικό στόχο για τον ΣΔ2, απαιτούνται περισσότερες μελέτες προκειμένου να στοιχειοθετηθούν επίσης συστάσεις.

Η γενετική επίδραση στους δείκτες υγείας

Οι σημαντικότερες συσχετίσεις που βρέθηκαν ανάμεσα στους γενετικούς δείκτες και τους μελετώμενους δείκτες υγείας στην παρούσα μελέτη ήταν για τους πολυμορφισμούς: rs11640851 και rs8052394 του γονιδίου *MT1A* με την εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων ($P=0,005$ και $P=0,002$), rs11605924 *CRY2* με τα επίπεδα συστολικής αρτηριακής πίεσης ($P=0,007$), rs2191349 *DGKB/THEM195* με τα επίπεδα

γλυκόζης νηστείας ($P=0,001$), rs4880 *SOD2* με τα επίπεδα τριγλυκεριδίων και οξειδωμένης LDL-C ($P=3,9 \times 10^{-4}$ και $P=6,5 \times 10^{-4}$, αντίστοιχα), rs10493846 *SEC63D1* με τα επίπεδα IL-6 ($P=4,1 \times 10^{-4}$) και rs340874 *PROX1* με τα επίπεδα ολικής χολερυθρίνης ($P=8,7 \times 10^{-4}$).

Το οξειδωτικό στρες καθώς και η έλλειψη ψευδαργύρου φαίνεται να εμπλέκονται στην εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων (302, 303). Οι μεταλλοθειονίνες εμφανίζουν καρδιοπροστατευτικό ρόλο κυρίως μέσω της αντιοξειδωτικής τους δράσης, ρυθμίζοντας την ομοιόσταση του ψευδαργύρου (304, 305). Πρόσφατα, βρέθηκε σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού rs8052394 του γονιδίου *MT1A* με τις καρδιαγγειακές επιπλοκές του ΣΔ2, σε συνδυασμό με αλλαγές στην ενδοκυτταρική ομοιόσταση του ψευδαργύρου (306). Παράλληλα, ο πολυμορφισμός rs11640851 του γονιδίου *MT1A* βρέθηκε να επηρεάζει τη δράση αντιοξειδωτικών ενζύμων σε ασθενείς με διαβήτη (307). Ωστόσο, η θετική συσχέτιση των δύο πολυμορφισμών του γονιδίου *MT1A* με τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων, όπως εκτιμήθηκε στην παρούσα μελέτη, δεν βρέθηκε να ισχύει σε δείγμα ηλικιωμένων από την Ιταλία, πιθανά λόγω των διαφορών στη διατροφική πρόσληψη ψευδαργύρου ανάμεσα στους δύο πληθυσμούς (308, 309).

Η εμπλοκή του γονιδίου *CRY2* στην υπέρταση δεν έχει ερευνηθεί ακόμη στους ανθρώπους, ωστόσο σε μια πρόσφατη μελέτη σχετίστηκε η έλλειψη του κρυπτοχρώματος 1 και 2 με υπέρταση σε πειραματόζωα (310).

Ο πολυμορφισμός rs2191349 *DGKB/THEM195* έχει συσχετιστεί σημαντικά με τα επίπεδα γλυκόζης νηστείας σε μια πρόσφατη μελέτη συσχέτισης γονιδιωματικής σάρωσης και μετα-ανάλυσης (311). Το γονίδιο *DGKB* κωδικοποιεί τον β ισότοπο του καταλυτικού τομέα της κινάσης διακυλογλυκερόλης, η οποία ρυθμίζει την ενδοκυτταρική συγκέντρωση διακυλογλυκερόλης. Στα παγκρεατικά κύτταρα πειραματόζωων, η γλυκόζη αυξάνει τα επίπεδα διακυλογλυκερόλης με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C και την έκκριση ινσουλίνης (311).

Ο πολυμορφισμός rs4880 (*SOD2*) προκαλεί την αλλαγή του αμινοξέος αλανίνης σε βαλίνη στη θέση 16 της μιτοχondριακής δισμουτάσης με αποτέλεσμα τη μειωμένη λειτουργία του ενζύμου (312). Στην παρούσα μελέτη βρέθηκε αρνητική συσχέτιση της παρουσίας βαλίνης (C αλληλόμορφο) με τα επίπεδα τριγλυκεριδίων και οξειδωμένης

LDL-C, ενώ φαίνεται πως αυτή η επίδραση είναι αντίθετη από την επίδραση που παρατηρείται σε νεότερους πληθυσμούς (313). Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, μια πρόσφατη έρευνα κατέληξε στη θετική συσχέτιση του T/T (αλανίνη/αλανίνη) γονότυπου με την πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου, προφίλ ανοσογήρανσης και αυξημένης καταστροφής του DNA στους ηλικιωμένους (314). Η προτεινόμενη υπόθεση από τους ερευνητές βασίζεται στην θεωρία των ελευθέρων ριζών, προτείνοντας ότι οι φορείς του T αλληλομόρφου παράγουν επαρκώς SOD και συνεπώς εμφανίζουν ισχυρή έμφυτη ανοσία στη μεσήλικη ζωή, αλλά αυξημένη ανοσογήρανση στην τρίτη ηλικία.

Παράλληλα, θετική συσχέτιση των τριγλυκεριδίων με τα επίπεδα οξειδωμένης LDL-C έχει παρατηρηθεί και σε μεσήλικες (315). Είναι γνωστό ότι τα αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων ευνοούν την παραγωγή μικρών και πυκνών μορίων LDL-C, ιδιαίτερα επιρρεπών σε οξείδωση (316). Αποτελέσματα από τη μελέτη MESA (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis) υποδηλώνουν ότι η δυσλιπιδαιμία, τα αυξημένα επίπεδα φλεγμονωδών δεικτών, το αρσενικό φύλο, η εθνικότητα και το κάπνισμα θα μπορούσαν να εξηγήσουν το μεγαλύτερο ποσοστό της διακύμανσης των επιπέδων της οξειδωμένης LDL-C (317).

Αλληλεπιδράσεις γενετικών δεικτών και διατροφής στους ηλικιωμένους

Οι σημαντικότερες αλληλεπιδράσεις καταγράφηκαν ανάμεσα στη Μεσογειακή διατροφή και: τον πολυμορφισμό rs7944584 (*MADD*) με τα επίπεδα συστολικής αρτηριακής πίεσης ($P=0,041$), τον πολυμορφισμό rs1800629 (*TNF- α*) με τα επίπεδα διαστολικής αρτηριακής πίεσης ($P=0,018$) και τον πολυμορφισμό rs2191349 (*DGKB/THEM195*) με τα επίπεδα ινσουλίνης νηστείας και Homa-IR ($P=0,023$ και $P=0,019$). Τα αποτελέσματα αυτά θα πρέπει να επαληθευτούν και σε άλλες μεγαλύτερες μελέτες.

Η διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων γονιδίων-διατροφής είναι σημαντική για την κατανόηση της αιτιολογίας και παθογένειας νοσημάτων, καθώς και για την ανάπτυξη εξατομικευμένων προληπτικών παρεμβάσεων. Ωστόσο, η δυσκολία στο σχεδιασμό τέτοιων μελετών για την εξασφάλιση ικανοποιητικής στατιστικής ισχύος περιορίζει το πλήθος των διαθέσιμων βιβλιογραφικών δεδομένων. Σε μια πρόσφατη μελέτη 3μηνιας παρέμβασης με Μεσογειακού τύπου δίαιτα βρέθηκαν σημαντικές αλληλεπιδράσεις για 23 πολυμορφισμούς με τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων (318). Παράλληλα, στα πλαίσια μια πρόσφατης μετα-ανάλυσης, συμπεριλαμβάνοντας και τον

ηλικιωμένο πληθυσμό της παρούσας μελέτης, βρέθηκε σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στον πολυμορφισμό rs780094 του γονιδίου *GCKR* και της κατανάλωσης δημητριακών ολικής άλεσης σε σχέση με τα επίπεδα ινσουλίνης νηστείας (319).

Στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος ZINCAGE, βρέθηκε σημαντική συσχέτιση του διατροφικού ψευδαργύρου με τον πολυμορφισμό rs1800795 του γονιδίου *IL-6* και τα επίπεδα της *IL-6* στο πλάσμα (309). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης, στην οποία συμπεριλήφθηκε και το παρόν δείγμα ηλικιωμένων εθελοντών, η διατροφική πρόσληψη ψευδαργύρου σχετιζόταν με υψηλότερα επίπεδα *IL-6* στους φορείς του GG γονότυπου, σε σχέση με τους φορείς του C αλληλομόρφου για τον πολυμορφισμό rs1800795. Το εύρημα αυτό είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρεμβατικής μελέτης χορήγησης συμπληρώματος ψευδαργύρου του ίδιου ερευνητικού προγράμματος, υποδηλώνοντας την ωφέλιμη επίδραση του ιχνοστοιχείου στο ανοσοποιητικό σύστημα των ηλικιωμένων (320).

Πλεονεκτήματα και αδυναμίες της παρούσας μελέτης

Τα κυριότερα πλεονεκτήματα της παρούσας μελέτης είναι η ολιστική αποτίμηση της κατάστασης υγείας σε ένα αρκετά μεγάλο δείγμα ηλικιωμένων, συνδυάζοντας γενετικούς, κλινικούς, βιοχημικούς, αιματολογικούς και ανθρωπομετρικούς δείκτες καθώς επίσης και διατροφικούς παράγοντες και στοιχεία του τρόπου ζωής. Ο σχεδιασμός της παρούσας μελέτης επιτρέπει τόσο την εκτίμηση της μεμονωμένης επίδρασης καθενός από αυτούς τους παράγοντες, όσο και την αλληλεπίδρασή τους στην κατάσταση υγείας των ηλικιωμένων.

Ωστόσο, παρά τη χρήση έγκυρων και σταθμισμένων εργαλείων εκτίμησης των παραγόντων του τρόπου ζωής (διατροφή, φυσική δραστηριότητα, ψυχοκοινωνικά χαρακτηριστικά), δεν μπορεί να αποκλειστεί η ύπαρξη συστηματικού σφάλματος μέτρησης στην παρούσα μελέτη. Παράλληλα, δεν μπορεί να αποκλειστεί η επίδραση και άλλων γενετικών δεικτών που δεν συμπεριλήφθησαν στο σχεδιασμό της μελέτης.

Συμπεράσματα

Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στη γήρανση δεν είναι πλήρως διευκρινισμένοι, ωστόσο περιλαμβάνουν πληθώρα παραγόντων. Η υιοθέτηση της Μεσογειακής διατροφής και η διατροφική πρόσληψη ψευδαργύρου φαίνεται να έχει ευεργετική επίδραση στην κατάσταση υγείας των ηλικιωμένων. Αρκετοί γενετικοί δείκτες βρέθηκαν να επηρεάζουν

τον κίνδυνο νοσηρότητας στον ηλικιωμένο πληθυσμό, ενώ η διατροφή θα μπορούσε να εξασθενίσει μέρος της δυσμενούς γενετικής προδιάθεσης.

Η ολιστική αποτίμηση της κατάστασης υγείας των ηλικιωμένων και η αξιολόγηση της συνδυασμένης επίδρασης των γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων μπορούν να συμβάλλουν στην πρόληψη της νοσηρότητας και στην προαγωγή της υγείας στην τρίτη ηλικία. Απαιτούνται περισσότερες μελέτες με μεγαλύτερο δείγμα ηλικιωμένων και με προοπτικό σχεδιασμό για την καλύτερη κατανόηση των εμπλεκόμενων μηχανισμών που καθορίζουν την κατάσταση υγείας στους γηριατρικούς πληθυσμούς και την στοιχειοθέτηση κατάλληλων οδηγιών για τη δημόσια υγεία.

Βιβλιογραφία

1. Report of the World Health Organization. Active ageing: a policy framework. *Aging Male* 2002;5:1-37.
2. Population Division. New York, USA: Department of Economic and Social Affairs, United Nations Secretariat, 2006.
3. General Secretariat of the National Statistical Service of Greece.
4. Harman D. The free radical theory of aging. *Antioxid Redox Signal* 2003;5:557-61.
5. Tosato M, Zamboni V, Ferrini A, Cesari M. The aging process and potential interventions to extend life expectancy. *Clin Interv Aging* 2007;2:401-12.
6. Weinert BT, Timiras PS. Invited review: Theories of aging. *J Appl Physiol* 2003;95:1706-16.
7. Carnes BA, Olshansky SJ, Grahn D. Biological evidence for limits to the duration of life. *Biogerontology* 2003;4:31-45.
8. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000;408:239-47.
9. Harman D. The biologic clock: the mitochondria? *J Am Geriatr Soc* 1972;20:145-7.
10. Mandavilli BS, Santos JH, Van Houten B. Mitochondrial DNA repair and aging. *Mutat Res* 2002;509:127-51.
11. Miquel J, Economos AC, Fleming J, Johnson JE, Jr. Mitochondrial role in cell aging. *Exp Gerontol* 1980;15:575-91.
12. Brand FN, Kiely DK, Kannel WB, Myers RH. Family patterns of coronary heart disease mortality: the Framingham Longevity Study. *J Clin Epidemiol* 1992;45:169-74.
13. Shringarpure R, Davies KJ. Protein turnover by the proteasome in aging and disease. *Free Radic Biol Med* 2002;32:1084-9.
14. Puca AA, Daly MJ, Brewster SJ, et al. A genome-wide scan for linkage to human exceptional longevity identifies a locus on chromosome 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:10505-8.
15. Campisi J. The biology of replicative senescence. *Eur J Cancer* 1997;33:703-9.
16. Ahmed A, Tollefsbol T. Telomeres and telomerase: basic science implications for aging. *J Am Geriatr Soc* 2001;49:1105-9.
17. Lingner J, Hughes TR, Shevchenko A, Mann M, Lundblad V, Cech TR. Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science* 1997;276:561-7.
18. de Lange T. Human telomeres are attached to the nuclear matrix. *EMBO J* 1992;11:717-24.
19. Artandi SE. Telomeres, telomerase, and human disease. *N Engl J Med* 2006;355:1195-7.
20. Blackburn EH. Telomere states and cell fates. *Nature* 2000;408:53-6.
21. Franceschi C, Bonafe M, Valensin S, et al. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci* 2000;908:244-54.
22. Franceschi C, Valensin S, Bonafe M, et al. The network and the remodeling theories of aging: historical background and new perspectives. *Exp Gerontol* 2000;35:879-96.

23. Fabris N. Neuroendocrine-immune interactions: a theoretical approach to aging. *Arch Gerontol Geriatr* 1991;12:219-30.
24. Perissinotto E, Pisent C, Sergi G, Grigoletto F. Anthropometric measurements in the elderly: age and gender differences. *Br J Nutr* 2002;87:177-86.
25. Hughes VA, Roubenoff R, Wood M, Frontera WR, Evans WJ, Fiatarone Singh MA. Anthropometric assessment of 10-y changes in body composition in the elderly. *Am J Clin Nutr* 2004;80:475-82.
26. Pierson RN, Jr. Body composition in aging: a biological perspective. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2003;6:15-20.
27. Villareal DT, Apovian CM, Kushner RF, 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;82:923-34.
28. Zamboni M, Mazzali G, Fantin F, Rossi A, Di Francesco V. Sarcopenic obesity: a new category of obesity in the elderly. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2008;18:388-95.
29. Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 2006;6:772-83.
30. Roubenoff R. Sarcopenic obesity: the confluence of two epidemics. *Obes Res* 2004;12:887-8.
31. Schrager MA, Metter EJ, Simonsick E, et al. Sarcopenic obesity and inflammation in the InCHIANTI study. *J Appl Physiol* 2007;102:919-25.
32. Inelmen EM, Sergi G, Coin A, Miotto F, Peruzza S, Enzi G. Can obesity be a risk factor in elderly people? *Obes Rev* 2003;4:147-55.
33. Flegal KM, Carroll MD, Kuczmarski RJ, Johnson CL. Overweight and obesity in the United States: prevalence and trends, 1960-1994. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1998;22:39-47.
34. Davison KK, Ford ES, Cogswell ME, Dietz WH. 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;50:1802-9.
35. Gofin J, Abramson JH, Kark JD, 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.
36. Chiu HC, Chang HY, Mau LW, Lee TK, Liu HW. Height, weight, and body mass index of elderly persons in Taiwan. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2000;55:M684-90.
37. Andreyeva T, Michaud PC, van Soest A. Obesity and health in Europeans aged 50 years and older. *Public Health* 2007;121:497-509.
38. Barbagallo CM, Cavera G, Sapienza M, et al. Prevalence of overweight and obesity in a rural southern Italy population and relationships with total and cardiovascular mortality: the Ventimiglia di Sicilia project. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001;25:185-90.
39. Gutierrez-Fisac JL, Lopez E, Banegas JR, Graciani A, Rodriguez-Artalejo F. Prevalence of overweight and obesity in elderly people in Spain. *Obes Res* 2004;12:710-5.
40. Kiss C, Poor G, Donath J, et al. Prevalence of obesity in an elderly Hungarian population. *Eur J Epidemiol* 2003;18:653-7.

41. Heiat A, Vaccarino V, Krumholz HM. An evidence-based assessment of federal guidelines for overweight and obesity as they apply to elderly persons. *Arch Intern Med* 2001;161:1194-203.
42. Cornoni-Huntley JC, Harris TB, Everett DF, et al. 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;44:743-53.
43. Engeland A, Bjorge T, Selmer RM, Tverdal A. Height and body mass index in relation to total mortality. *Epidemiology* 2003;14:293-9.
44. Harris T, Cook EF, Garrison R, Higgins M, Kannel W, Goldman L. Body mass index and mortality among nonsmoking older persons. The Framingham Heart Study. *JAMA* 1988;259:1520-4.
45. Menotti A, Kromhout D, Nissinen A, et al. Short-term all-cause mortality and its determinants in elderly male populations in Finland, The Netherlands, and Italy: the FINE Study. Finland, Italy, Netherlands Elderly Study. *Prev Med* 1996;25:319-26.
46. Stevens J, Cai J, Pamuk ER, Williamson DF, Thun MJ, Wood JL. The effect of age on the association between body-mass index and mortality. *N Engl J Med* 1998;338:1-7.
47. Diehr P, Bild DE, Harris TB, Duxbury A, Siscovick D, Rossi M. Body mass index and mortality in nonsmoking older adults: the Cardiovascular Health Study. *Am J Public Health* 1998;88:623-9.
48. Dey DK, Rothenberg E, Sundh V, Bosaeus I, Steen B. Body mass index, weight change and mortality in the elderly. A 15 y longitudinal population study of 70 y olds. *Eur J Clin Nutr* 2001;55:482-92.
49. Grabowski DC, Ellis JE. High body mass index does not predict mortality in older people: analysis of the Longitudinal Study of Aging. *J Am Geriatr Soc* 2001;49:968-79.
50. Blaum CS, Xue QL, Michelon E, Semba RD, Fried LP. The association between obesity and the frailty syndrome in older women: the Women's Health and Aging Studies. *J Am Geriatr Soc* 2005;53:927-34.
51. Villareal DT, Banks M, Siener C, Sinacore DR, Klein S. Physical frailty and body composition in obese elderly men and women. *Obes Res* 2004;12:913-20.
52. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001;285:2486-97.
53. LaRosa JC. Dyslipidemia and coronary artery disease in the elderly. *Clin Geriatr Med* 1996;12:33-40.
54. Schupf N, Costa R, Luchsinger J, Tang MX, Lee JH, Mayeux R. Relationship between plasma lipids and all-cause mortality in nondemented elderly. *J Am Geriatr Soc* 2005;53:219-26.
55. Anum EA, Adera T. Hypercholesterolemia and coronary heart disease in the elderly: a meta-analysis. *Ann Epidemiol* 2004;14:705-21.
56. Casiglia E, Mazza A, Tikhonoff V, Scarpa R, Schiavon L, Pessina AC. Total cholesterol and mortality in the elderly. *J Intern Med* 2003;254:353-62.

57. Chyou PH, Eaker ED. Serum cholesterol concentrations and all-cause mortality in older people. *Age Ageing* 2000;29:69-74.
58. Houterman S, Boshuizen HC, Verschuren WM, et al. Predicting cardiovascular risk in the elderly in different European countries. *Eur Heart J* 2002;23:294-300.
59. Lewington S, Whitlock G, Clarke R, et al. Blood cholesterol and vascular mortality by age, sex, and blood pressure: a meta-analysis of individual data from 61 prospective studies with 55,000 vascular deaths. *Lancet* 2007;370:1829-39.
60. Anderson KM, Castelli WP, Levy D. Cholesterol and mortality. 30 years of follow-up from the Framingham study. *JAMA* 1987;257:2176-80.
61. Schatz IJ, Masaki K, Yano K, Chen R, Rodriguez BL, Curb JD. Cholesterol and all-cause mortality in elderly people from the Honolulu Heart Program: a cohort study. *Lancet* 2001;358:351-5.
62. Schaefer EJ, Moussa PB, Wilson PW, McGee D, Dallal G, Castelli WP. Plasma lipoproteins in healthy octogenarians: lack of reduced high density lipoprotein cholesterol levels: results from the Framingham Heart Study. *Metabolism* 1989;38:293-6.
63. Rosenblat M, Coleman R, Aviram M. Increased macrophage glutathione content reduces cell-mediated oxidation of LDL and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 2002;163:17-28.
64. Ross R. Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol* 1995;57:791-804.
65. Schwenke DC. Aging, menopause, and free radicals. *Semin Reprod Endocrinol* 1998;16:281-308.
66. Holvoet P, Harris TB, Tracy RP, et al. Association of high coronary heart disease risk status with circulating oxidized LDL in the well-functioning elderly: findings from the Health, Aging, and Body Composition study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1444-8.
67. Holvoet P, Kritchevsky SB, Tracy RP, et al. The metabolic syndrome, circulating oxidized LDL, and risk of myocardial infarction in well-functioning elderly people in the health, aging, and body composition cohort. *Diabetes* 2004;53:1068-73.
68. Verhoye E, Langlois MR. Circulating oxidized low-density lipoprotein: a biomarker of atherosclerosis and cardiovascular risk? *Clin Chem Lab Med* 2009;47:128-37.
69. Barter P. HDL: a recipe for longevity. *Atheroscler Suppl* 2004;5:25-31.
70. Nikkila M, Heikkinen J. High-density lipoprotein cholesterol and longevity. *Age Ageing* 1990;19:119-24.
71. Abbott RD, Wilson PW, Kannel WB, Castelli WP. High density lipoprotein cholesterol, total cholesterol screening, and myocardial infarction. The Framingham Study. *Arteriosclerosis* 1988;8:207-11.
72. Curb JD, Abbott RD, Rodriguez BL, et al. High density lipoprotein cholesterol and the risk of stroke in elderly men: the Honolulu heart program. *Am J Epidemiol* 2004;160:150-7.
73. Despres JP, Lemieux I, Dagenais GR, Cantin B, Lamarche B. HDL-cholesterol as a marker of coronary heart disease risk: the Quebec cardiovascular study. *Atherosclerosis* 2000;153:263-72.

74. Shepherd J, Blauw GJ, Murphy MB, et al. Pravastatin in elderly individuals at risk of vascular disease (PROSPER): a randomised controlled trial. *Lancet* 2002;360:1623-30.
75. Weverling-Rijnsburger AW, Jonkers IJ, van Exel E, Gussekloo J, Westendorp RG. 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.
76. Aronow WS, 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;73:702-3.
77. Suryadevara V, Storey SG, Aronow WS, 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 A Biol Sci Med Sci* 2003;58:M859-61.
78. Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, et al. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2001;24:683-9.
79. Trevisan M, Liu J, Bahsas FB, Menotti A. Syndrome X and mortality: a population-based study. Risk Factor and Life Expectancy Research Group. *Am J Epidemiol* 1998;148:958-66.
80. Grundy SM, Cleeman JJ, Daniels SR, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* 2005;112:2735-52.
81. Kahn SE, Schwartz RS, Porte D, Jr., Abrass IB. The glucose intolerance of aging. Implications for intervention. *Hosp Pract (Off Ed)* 1991;26:29-38.
82. Cefalu WT, Wang ZQ, Werbel S, et al. Contribution of visceral fat mass to the insulin resistance of aging. *Metabolism* 1995;44:954-9.
83. Franklin SS, Gustin Wt, Wong ND, et al. Hemodynamic patterns of age-related changes in blood pressure. The Framingham Heart Study. *Circulation* 1997;96:308-15.
84. Ford ES, Giles WH, Dietz WH. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA* 2002;287:356-9.
85. Scuteri A, Najjar SS, Morrell CH, Lakatta EG. The metabolic syndrome in older individuals: prevalence and prediction of cardiovascular events: the Cardiovascular Health Study. *Diabetes Care* 2005;28:882-7.
86. Motta M, Bennati E, Cardillo E, Passamonte M, Ferlito L, Malaguarnera M. The metabolic syndrome (MS) in the elderly: considerations on the diagnostic criteria of the International Diabetes Federation (IDF) and some proposed modifications. *Arch Gerontol Geriatr* 2009;48:380-4.
87. Peel NM, McClure RJ, Bartlett HP. Behavioral determinants of healthy aging. *Am J Prev Med* 2005;28:298-304.
88. Ford AB, Haug MR, Stange KC, Gaines AD, Noelker LS, Jones PK. Sustained personal autonomy: a measure of successful aging. *J Aging Health* 2000;12:470-89.
89. Haveman-Nies A, de Groot LC, van Staveren WA. Dietary quality, lifestyle factors and healthy ageing in Europe: the SENECA study. *Age Ageing* 2003;32:427-34.

90. Newman AB, Arnold AM, Naydeck BL, et al. "Successful aging": effect of subclinical cardiovascular disease. *Arch Intern Med* 2003;163:2315-22.
91. Guralnik JM, Kaplan GA. Predictors of healthy aging: prospective evidence from the Alameda County study. *Am J Public Health* 1989;79:703-8.
92. 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;41:141-50.
93. Reuben DB, Judd-Hamilton L, Harris TB, Seeman TE. The associations between physical activity and inflammatory markers in high-functioning older persons: MacArthur Studies of Successful Aging. *J Am Geriatr Soc* 2003;51:1125-30.
94. Stewart KJ, Bacher AC, Turner K, et al. Exercise and risk factors associated with metabolic syndrome in older adults. *Am J Prev Med* 2005;28:9-18.
95. Colbert LH, Visser M, Simonsick EM, et al. Physical activity, exercise, and inflammatory markers in older adults: findings from the Health, Aging and Body Composition Study. *J Am Geriatr Soc* 2004;52:1098-104.
96. Herskind AM, McGue M, Holm NV, Sorensen TI, Harvald B, Vaupel JW. The heritability of human longevity: a population-based study of 2872 Danish twin pairs born 1870-1900. *Hum Genet* 1996;97:319-23.
97. McGue M, Vaupel JW, Holm N, Harvald B. Longevity is moderately heritable in a sample of Danish twins born 1870-1880. *J Gerontol* 1993;48:B237-44.
98. Capri M, Salvioli S, Sevini F, et al. The genetics of human longevity. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1067:252-63.
99. Martin GM, Bergman A, Barzilai N. Genetic determinants of human health span and life span: progress and new opportunities. *PLoS Genet* 2007;3:e125.
100. Browner WS, Kahn AJ, Ziv E, et al. The genetics of human longevity. *Am J Med* 2004;117:851-60.
101. Bruunsgaard H, Ladelund S, Pedersen AN, Schroll M, Jorgensen T, Pedersen BK. Predicting death from tumour necrosis factor-alpha and interleukin-6 in 80-year-old people. *Clin Exp Immunol* 2003;132:24-31.
102. Antonicelli R, Olivieri F, Bonafe M, et al. The interleukin-6 -174 G>C promoter polymorphism is associated with a higher risk of death after an acute coronary syndrome in male elderly patients. *Int J Cardiol* 2005;103:266-71.
103. Lio D, Scola L, Crivello A, et al. Gender-specific association between -1082 IL-10 promoter polymorphism and longevity. *Genes Immun* 2002;3:30-3.
104. Balistreri CR, Candore G, Colonna-Romano G, et al. Role of Toll-like receptor 4 in acute myocardial infarction and longevity. *JAMA* 2004;292:2339-40.
105. Lunetta KL, D'Agostino RB, Sr., Karasik D, et al. Genetic correlates of longevity and selected age-related phenotypes: a genome-wide association study in the Framingham Study. *BMC Med Genet* 2007;8 Suppl 1:S13.
106. Franceschi C, Bezrukov V, Blanche H, et al. Genetics of healthy aging in Europe: the EU-integrated project GEHA (GEnetics of Healthy Aging). *Ann N Y Acad Sci* 2007;1100:21-45.
107. de Magalhaes JP, Budovsky A, Lehmann G, et al. The Human Ageing Genomic Resources: online databases and tools for biogerontologists. *Aging Cell* 2009;8:65-72.

108. Katic M, Kahn CR. The role of insulin and IGF-1 signaling in longevity. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:320-43.
109. Yang J, Anzo M, Cohen P. Control of aging and longevity by IGF-I signaling. *Exp Gerontol* 2005;40:867-72.
110. Monzavi R, Cohen P. IGFs and IGFBPs: role in health and disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2002;16:433-47.
111. Van Der Heide LP, Hoekman MF, Smidt MP. The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. *Biochem J* 2004;380:297-309.
112. Imae M, Fu Z, Yoshida A, Noguchi T, Kato H. Nutritional and hormonal factors control the gene expression of FoxOs, the mammalian homologues of DAF-16. *J Mol Endocrinol* 2003;30:253-62.
113. Arden KC. FoxO: linking new signaling pathways. *Mol Cell* 2004;14:416-8.
114. Tran H, Brunet A, Grenier JM, et al. DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein. *Science* 2002;296:530-4.
115. Minamino T, Miyauchi H, Tateno K, Kunieda T, Komuro I. Akt-induced cellular senescence: implication for human disease. *Cell Cycle* 2004;3:449-51.
116. Miyauchi H, Minamino T, Tateno K, Kunieda T, Toko H, Komuro I. Akt negatively regulates the in vitro lifespan of human endothelial cells via a p53/p21-dependent pathway. *EMBO J* 2004;23:212-20.
117. Kimura KD, Tissenbaum HA, Liu Y, Ruvkun G. daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 1997;277:942-6.
118. Kenyon C. A conserved regulatory system for aging. *Cell* 2001;105:165-8.
119. Murphy CT, McCarroll SA, Bargmann CI, et al. Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2003;424:277-83.
120. Clancy DJ, Gems D, Harshman LG, et al. Extension of life-span by loss of CHICO, a *Drosophila* insulin receptor substrate protein. *Science* 2001;292:104-6.
121. Barbieri M, Bonafe M, Franceschi C, Paolisso G. Insulin/IGF-I-signaling pathway: an evolutionarily conserved mechanism of longevity from yeast to humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;285:E1064-71.
122. Holzenberger M. The GH/IGF-I axis and longevity. *Eur J Endocrinol* 2004;151 Suppl 1:S23-7.
123. Laughlin GA, Barrett-Connor E, Criqui MH, Kritz-Silverstein D. The prospective association of serum insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein-1 levels with all cause and cardiovascular disease mortality in older adults: the Rancho Bernardo Study. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:114-20.
124. Juul A. Serum levels of insulin-like growth factor I and its binding proteins in health and disease. *Growth Horm IGF Res* 2003;13:113-70.
125. Facchini FS, Hua N, Abbasi F, Reaven GM. Insulin resistance as a predictor of age-related diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3574-8.
126. Barbieri M, Gambardella A, Paolisso G, Varricchio M. Metabolic aspects of the extreme longevity. *Exp Gerontol* 2008;43:74-8.

127. Paolisso G, Barbieri M, Bonafe M, Franceschi C. Metabolic age modelling: the lesson from centenarians. *Eur J Clin Invest* 2000;30:888-94.
128. Paolisso G, Barbieri M, Rizzo MR, et al. Low insulin resistance and preserved beta-cell function contribute to human longevity but are not associated with TH-INS genes. *Exp Gerontol* 2001;37:149-56.
129. Mecocci P, Polidori MC, Troiano L, et al. Plasma antioxidants and longevity: a study on healthy centenarians. *Free Radic Biol Med* 2000;28:1243-8.
130. Tatar M, Bartke A, Antebi A. The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Science* 2003;299:1346-51.
131. De Luca M, Rose G, Bonafe M, et al. Sex-specific longevity associations defined by Tyrosine Hydroxylase-Insulin-Insulin Growth Factor 2 haplotypes on the 11p15.5 chromosomal region. *Exp Gerontol* 2001;36:1663-71.
132. van Heemst D, Beekman M, Mooijaart SP, et al. Reduced insulin/IGF-1 signalling and human longevity. *Aging Cell* 2005;4:79-85.
133. Kuningas M, Magi R, Westendorp RG, Slagboom PE, Remm M, van Heemst D. Haplotypes in the human Foxo1a and Foxo3a genes; impact on disease and mortality at old age. *Eur J Hum Genet* 2007;15:294-301.
134. Kojima T, Kamei H, Aizu T, et al. Association analysis between longevity in the Japanese population and polymorphic variants of genes involved in insulin and insulin-like growth factor 1 signaling pathways. *Exp Gerontol* 2004;39:1595-8.
135. Bonafe M, Barbieri M, Marchegiani F, et al. Polymorphic variants of insulin-like growth factor I (IGF-I) receptor and phosphoinositide 3-kinase genes affect IGF-I plasma levels and human longevity: cues for an evolutionarily conserved mechanism of life span control. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:3299-304.
136. Hu D, Pawlikowska L, Kanaya A, et al. Serum insulin-like growth factor-1 binding proteins 1 and 2 and mortality in older adults: the Health, Aging, and Body Composition Study. *J Am Geriatr Soc* 2009;57:1213-8.
137. McElwee JJ, Schuster E, Blanc E, et al. Evolutionary conservation of regulated longevity assurance mechanisms. *Genome Biol* 2007;8:R132.
138. Russell SJ, Kahn CR. Endocrine regulation of ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:681-91.
139. Stessman J, Maaravi Y, Hammerman-Rozenberg R, et al. Candidate genes associated with ageing and life expectancy in the Jerusalem longitudinal study. *Mech Ageing Dev* 2005;126:333-9.
140. Bonafe M, Olivieri F. Genetic polymorphism in long-lived people: cues for the presence of an insulin/IGF-pathway-dependent network affecting human longevity. *Mol Cell Endocrinol* 2009;299:118-23.
141. Taioli E, Mari D, Franceschi C, et al. Polymorphisms of drug-metabolizing enzymes in healthy nonagenarians and centenarians: difference at GSTT1 locus. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;280:1389-92.
142. Christiansen L, Brasch-Andersen C, Bathum L, Kruse TA, Christensen K. A longitudinal study of the effect of GSTT1 and GSTM1 gene copy number on survival. *Mech Ageing Dev* 2006;127:597-9.

143. Rea IM, McKeown PP, McMaster D, et al. Paraoxonase polymorphisms PON1 192 and 55 and longevity in Italian centenarians and Irish nonagenarians. A pooled analysis. *Exp Gerontol* 2004;39:629-35.
144. Franceschi C, Bonafe M, Valensin S. Human immunosenescence: the prevailing of innate immunity, the failing of clonotypic immunity, and the filling of immunological space. *Vaccine* 2000;18:1717-20.
145. Ginaldi L, De Martinis M, Monti D, Franceschi C. Chronic antigenic load and apoptosis in immunosenescence. *Trends Immunol* 2005;26:79-84.
146. Pawelec G, Akbar A, Caruso C, Solana R, Grubeck-Loebenstein B, Wikby A. Human immunosenescence: is it infectious? *Immunol Rev* 2005;205:257-68.
147. Bruunsgaard H, Pedersen M, Pedersen BK. Aging and proinflammatory cytokines. *Curr Opin Hematol* 2001;8:131-6.
148. Boren E, Gershwin ME. Inflamm-aging: autoimmunity, and the immune-risk phenotype. *Autoimmun Rev* 2004;3:401-6.
149. Cappola AR, Xue QL, Ferrucci L, Guralnik JM, Volpato S, Fried LP. Insulin-like growth factor I and interleukin-6 contribute synergistically to disability and mortality in older women. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:2019-25.
150. Licastro F, Grimaldi LM, Bonafe M, et al. Interleukin-6 gene alleles affect the risk of Alzheimer's disease and levels of the cytokine in blood and brain. *Neurobiol Aging* 2003;24:921-6.
151. Roubenoff R. Catabolism of aging: is it an inflammatory process? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2003;6:295-9.
152. Szmitko PE, Wang CH, Weisel RD, de Almeida JR, Anderson TJ, Verma S. New markers of inflammation and endothelial cell activation: Part I. *Circulation* 2003;108:1917-23.
153. Bruunsgaard H, Pedersen BK. Age-related inflammatory cytokines and disease. *Immunol Allergy Clin North Am* 2003;23:15-39.
154. Bo S, Gambino R, Uberti B, et al. Does C-reactive protein identify a subclinical metabolic disease in healthy subjects? *Eur J Clin Invest* 2005;35:265-70.
155. Tracy RP. Emerging relationships of inflammation, cardiovascular disease and chronic diseases of aging. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003;27 Suppl 3:S29-34.
156. Bruunsgaard H, Andersen-Ranberg K, Hjelmberg JB, Pedersen BK, Jeune B. Elevated levels of tumor necrosis factor alpha and mortality in centenarians. *Am J Med* 2003;115:278-83.
157. Bruunsgaard H, Andersen-Ranberg K, Jeune B, Pedersen AN, Skinhoj P, Pedersen BK. A high plasma concentration of TNF-alpha is associated with dementia in centenarians. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1999;54:M357-64.
158. Franceschi C, Valensin S, Lescai F, et al. Neuroinflammation and the genetics of Alzheimer's disease: the search for a pro-inflammatory phenotype. *Aging (Milano)* 2001;13:163-70.
159. Recasens M, Lopez-Bermejo A, Ricart W, Vendrell J, Casamitjana R, Fernandez-Real JM. An inflammation score is better associated with basal than stimulated surrogate indexes of insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:112-6.

160. Abbatecola AM, Ferrucci L, Grella R, et al. Diverse effect of inflammatory markers on insulin resistance and insulin-resistance syndrome in the elderly. *J Am Geriatr Soc* 2004;52:399-404.
161. Roubenoff R, Parise H, Payette HA, et al. Cytokines, insulin-like growth factor 1, sarcopenia, and mortality in very old community-dwelling men and women: the Framingham Heart Study. *Am J Med* 2003;115:429-35.
162. Cesari M, Penninx BW, Newman AB, et al. Inflammatory markers and onset of cardiovascular events: results from the Health ABC study. *Circulation* 2003;108:2317-22.
163. De Martinis M, Franceschi C, Monti D, Ginaldi L. Inflammation markers predicting frailty and mortality in the elderly. *Exp Mol Pathol* 2006;80:219-27.
164. Margolis KL, Manson JE, Greenland P, et al. Leukocyte count as a predictor of cardiovascular events and mortality in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Observational Study. *Arch Intern Med* 2005;165:500-8.
165. De Martinis M, Modesti M, Ginaldi L. Phenotypic and functional changes of circulating monocytes and polymorphonuclear leucocytes from elderly persons. *Immunol Cell Biol* 2004;82:415-20.
166. Ginaldi L, De Martinis M, Modesti M, Loreto F, Corsi MP, Quagliano D. Immunophenotypical changes of T lymphocytes in the elderly. *Gerontology* 2000;46:242-8.
167. Zhang X, Fujii H, Kishimoto H, LeRoy E, Surh CD, Sprent J. Aging leads to disturbed homeostasis of memory phenotype CD8(+) cells. *J Exp Med* 2002;195:283-93.
168. Franceschi C, Bonafe M. Centenarians as a model for healthy aging. *Biochem Soc Trans* 2003;31:457-61.
169. Zanni F, Vescovini R, Biasini C, et al. Marked increase with age of type 1 cytokines within memory and effector/cytotoxic CD8+ T cells in humans: a contribution to understand the relationship between inflammation and immunosenescence. *Exp Gerontol* 2003;38:981-7.
170. Semba RD, Margolick JB, Leng S, Walston J, Ricks MO, Fried LP. T cell subsets and mortality in older community-dwelling women. *Exp Gerontol* 2005;40:81-7.
171. Franceschi C, Valensin S, Fagnoni F, Barbi C, Bonafe M. Biomarkers of immunosenescence within an evolutionary perspective: the challenge of heterogeneity and the role of antigenic load. *Exp Gerontol* 1999;34:911-21.
172. Effros RB. Replicative senescence of CD8 T cells: effect on human ageing. *Exp Gerontol* 2004;39:517-24.
173. Pawelec G, Ouyang Q, Colonna-Romano G, Candore G, Lio D, Caruso C. Is human immunosenescence clinically relevant? Looking for 'immunological risk phenotypes'. *Trends Immunol* 2002;23:330-2.
174. Ferguson FG, Wikby A, Maxson P, Olsson J, Johansson B. Immune parameters in a longitudinal study of a very old population of Swedish people: a comparison between survivors and nonsurvivors. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1995;50:B378-82.
175. Wikby A, Johansson B, Olsson J, Lofgren S, Nilsson BO, Ferguson F. Expansions of peripheral blood CD8 T-lymphocyte subpopulations and an association with

- cytomegalovirus seropositivity in the elderly: the Swedish NONA immune study. *Exp Gerontol* 2002;37:445-53.
176. Gariballa SE, Sinclair AJ. Nutrition, ageing and ill health. *Br J Nutr* 1998;80:7-23.
177. Steen B. A "healthy" lifestyle in old age and its relation to health and disease. *Age Ageing* 2003;32:365-6.
178. Dontas AS, Zerefos NS, Panagiotakos DB, Vlachou C, Valis DA. Mediterranean diet and prevention of coronary heart disease in the elderly. *Clin Interv Aging* 2007;2:109-15.
179. Bach A, Serra-Majem L, Carrasco JL, et al. The use of indexes evaluating the adherence to the Mediterranean diet in epidemiological studies: a review. *Public Health Nutr* 2006;9:132-46.
180. Fung TT, McCullough ML, Newby PK, et al. Diet-quality scores and plasma concentrations of markers of inflammation and endothelial dysfunction. *Am J Clin Nutr* 2005;82:163-73.
181. Panagiotakos DB, Arapi S, Pitsavos C, et al. The relationship between adherence to the Mediterranean diet and the severity and short-term prognosis of acute coronary syndromes (ACS): The Greek Study of ACS (The GREECS). *Nutrition* 2006;22:722-30.
182. Panagiotakos DB, Pitsavos C, Chryschoou C, Stefanadis C. The epidemiology of Type 2 diabetes mellitus in Greek adults: the ATTICA study. *Diabet Med* 2005;22:1581-8.
183. Panagiotakos DB, Pitsavos C, Matalas AL, Chryschoou C, Stefanadis C. Geographical influences on the association between adherence to the Mediterranean diet and the prevalence of acute coronary syndromes, in Greece: the CARDIO2000 study. *Int J Cardiol* 2005;100:135-42.
184. Polychronopoulos E, Panagiotakos DB, Polystipioti A. Diet, lifestyle factors and hypercholesterolemia in elderly men and women from Cyprus. *Lipids Health Dis* 2005;4:17.
185. Serrano-Martinez M, Palacios M, Martinez-Losa E, et al. A Mediterranean dietary style influences TNF-alpha and VCAM-1 coronary blood levels in unstable angina patients. *Eur J Nutr* 2005;44:348-54.
186. Psaltopoulou T, Naska A, Orfanos P, Trichopoulos D, Mountokalakis T, Trichopoulou A. Olive oil, the Mediterranean diet, and arterial blood pressure: the Greek European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Am J Clin Nutr* 2004;80:1012-8.
187. Fito M, Guxens M, Corella D, et al. Effect of a traditional Mediterranean diet on lipoprotein oxidation: a randomized controlled trial. *Arch Intern Med* 2007;167:1195-203.
188. Salas-Salvado J, Garcia-Arellano A, Estruch R, et al. Components of the Mediterranean-type food pattern and serum inflammatory markers among patients at high risk for cardiovascular disease. *Eur J Clin Nutr* 2008;62:651-9.
189. Singh N, Graves J, Taylor PD, MacAllister RJ, Singer DR. Effects of a 'healthy' diet and of acute and long-term vitamin C on vascular function in healthy older subjects. *Cardiovasc Res* 2002;56:118-25.

190. Sondergaard E, Moller JE, Egstrup K. Effect of dietary intervention and lipid-lowering treatment on brachial vasoreactivity in patients with ischemic heart disease and hypercholesterolemia. *Am Heart J* 2003;145:E19.
191. Alvarez Leon EE, Henriquez P, Serra-Majem L. Mediterranean diet and metabolic syndrome: a cross-sectional study in the Canary Islands. *Public Health Nutr* 2006;9:1089-98.
192. Ciccarone E, Di Castelnuovo A, Salcuni M, et al. A high-score Mediterranean dietary pattern is associated with a reduced risk of peripheral arterial disease in Italian patients with Type 2 diabetes. *J Thromb Haemost* 2003;1:1744-52.
193. Pitsavos C, Panagiotakos DB, Chrysohooou C, et al. The adoption of Mediterranean diet attenuates the development of acute coronary syndromes in people with the metabolic syndrome. *Nutr J* 2003;2:1.
194. Barzi F, Woodward M, Marfisi RM, Tavazzi L, Valagussa F, Marchioli R. Mediterranean diet and all-causes mortality after myocardial infarction: results from the GISSI-Prevenzione trial. *Eur J Clin Nutr* 2003;57:604-11.
195. de Lorgeril M, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Delaye J, Mamelle N. Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation* 1999;99:779-85.
196. Estruch R, Martinez-Gonzalez MA, Corella D, et al. Effects of a Mediterranean-style diet on cardiovascular risk factors: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2006;145:1-11.
197. Sanchez-Villegas A, Bes-Rastrollo M, Martinez-Gonzalez MA, Serra-Majem L. Adherence to a Mediterranean dietary pattern and weight gain in a follow-up study: the SUN cohort. *Int J Obes (Lond)* 2006;30:350-8.
198. Trichopoulou A, Naska A, Orfanos P, Trichopoulos D. Mediterranean diet in relation to body mass index and waist-to-hip ratio: the Greek European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition Study. *Am J Clin Nutr* 2005;82:935-40.
199. Haveman-Nies A, Tucker KL, de Groot LC, Wilson PW, van Staveren WA. Evaluation of dietary quality in relationship to nutritional and lifestyle factors in elderly people of the US Framingham Heart Study and the European SENECA study. *Eur J Clin Nutr* 2001;55:870-80.
200. Tyrovolas S, Bountziouka V, Papairakleous N, et al. Adherence to the Mediterranean diet is associated with lower prevalence of obesity among elderly people living in Mediterranean islands: the MEDIS study. *Int J Food Sci Nutr* 2009;1-14.
201. Thanopoulou A, Karamanos B, Angelico F, et al. Epidemiological evidence for the non-random clustering of the components of the metabolic syndrome: multicentre study of the Mediterranean Group for the Study of Diabetes. *Eur J Clin Nutr* 2006;60:1376-83.
202. Esposito K, Marfella R, Ciotola M, et al. Effect of a mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomized trial. *JAMA* 2004;292:1440-6.
203. Michalsen A, Lehmann N, Pithan C, et al. Mediterranean diet has no effect on markers of inflammation and metabolic risk factors in patients with coronary artery disease. *Eur J Clin Nutr* 2006;60:478-85.

204. Bosetti C, Gallus S, Trichopoulou A, et al. Influence of the Mediterranean diet on the risk of cancers of the upper aerodigestive tract. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003;12:1091-4.
205. de Lorgeril M, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Boucher P, Mamelle N. Mediterranean dietary pattern in a randomized trial: prolonged survival and possible reduced cancer rate. *Arch Intern Med* 1998;158:1181-7.
206. Sofi F, Cesari F, Abbate R, Gensini GF, Casini A. Adherence to Mediterranean diet and health status: meta-analysis. *BMJ* 2008;337:a1344.
207. Lasheras C, Fernandez S, Patterson AM. Mediterranean diet and age with respect to overall survival in institutionalized, nonsmoking elderly people. *Am J Clin Nutr* 2000;71:987-92.
208. Trichopoulou A, Kouris-Blazos A, Wahlqvist ML, et al. Diet and overall survival in elderly people. *BMJ* 1995;311:1457-60.
209. Trichopoulou A, Costacou T, Bamia C, Trichopoulos D. Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *N Engl J Med* 2003;348:2599-608.
210. Kouris-Blazos A, Gnardellis C, Wahlqvist ML, Trichopoulos D, Lukito W, Trichopoulou A. Are the advantages of the Mediterranean diet transferable to other populations? A cohort study in Melbourne, Australia. *Br J Nutr* 1999;82:57-61.
211. Osler M, Schroll M. Diet and mortality in a cohort of elderly people in a north European community. *Int J Epidemiol* 1997;26:155-9.
212. Knoops KT, de Groot LC, Kromhout D, et al. Mediterranean diet, lifestyle factors, and 10-year mortality in elderly European men and women: the HALE project. *JAMA* 2004;292:1433-9.
213. Iestra J, Knoops K, Kromhout D, de Groot L, Grobbee D, van Staveren W. Lifestyle, Mediterranean diet and survival in European post-myocardial infarction patients. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2006;13:894-900.
214. Trichopoulou A, Orfanos P, Norat T, et al. Modified Mediterranean diet and survival: EPIC-elderly prospective cohort study. *BMJ* 2005;330:991.
215. Scarmeas N, Stern Y, Mayeux R, Luchsinger JA. Mediterranean diet, Alzheimer disease, and vascular mediation. *Arch Neurol* 2006;63:1709-17.
216. Scarmeas N, Stern Y, Tang MX, Mayeux R, Luchsinger JA. Mediterranean diet and risk for Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 2006;59:912-21.
217. Solfrizzi V, Colacicco AM, D'Introno A, et al. Dietary intake of unsaturated fatty acids and age-related cognitive decline: a 8.5-year follow-up of the Italian Longitudinal Study on Aging. *Neurobiol Aging* 2006;27:1694-704.
218. Bountziouka V, Polychronopoulos E, Zeimbekis A, et al. Long-term fish intake is associated with less severe depressive symptoms among elderly men and women: the MEDIS (MEDiterranean ISlands Elderly) epidemiological study. *J Aging Health* 2009;21:864-80.
219. Roman B, Carta L, Martinez-Gonzalez MA, Serra-Majem L. Effectiveness of the Mediterranean diet in the elderly. *Clin Interv Aging* 2008;3:97-109.

220. Kafatos A, Diacatou A, Voukiklaris G, et al. Heart disease risk-factor status and dietary changes in the Cretan population over the past 30 y: the Seven Countries Study. *Am J Clin Nutr* 1997;65:1882-6.
221. Vallee BL, Falchuk KH. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Rev* 1993;73:79-118.
222. Andreini C, Banci L, Bertini I, Rosato A. Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. *J Proteome Res* 2006;5:196-201.
223. Ibs KH, Rink L. Zinc-altered immune function. *J Nutr* 2003;133:1452S-6S.
224. McClain CJ, McClain M, Barve S, Boosalis MG. Trace metals and the elderly. *Clin Geriatr Med* 2002;18:801-18, vii-viii.
225. Ma J, Betts NM. 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;130:2838-43.
226. Briefel RR, Bialostosky K, Kennedy-Stephenson J, McDowell MA, Ervin RB, Wright JD. Zinc intake of the U.S. population: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *J Nutr* 2000;130:1367S-73S.
227. Andriollo-Sanchez M, Hininger-Favier I, Meunier N, et al. Zinc intake and status in middle-aged and older European subjects: the ZENITH study. *Eur J Clin Nutr* 2005;59 Suppl 2:S37-41.
228. Girodon F, Galan P, Monget AL, et al. Impact of trace elements and vitamin supplementation on immunity and infections in institutionalized elderly patients: a randomized controlled trial. MIN. VIT. AOX. geriatric network. *Arch Intern Med* 1999;159:748-54.
229. Mocchegiani E, Muzzioli M, Giacconi R. Zinc, metallothioneins, immune responses, survival and ageing. *Biogerontology* 2000;1:133-43.
230. Trumbo P, Yates AA, Schlicker S, Poos M. Dietary reference intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. *J Am Diet Assoc* 2001;101:294-301.
231. Lonnerdal B. Dietary factors influencing zinc absorption. *J Nutr* 2000;130:1378S-83S.
232. Lee HH, Prasad AS, Brewer GJ, Owyang C. Zinc absorption in human small intestine. *Am J Physiol* 1989;256:G87-91.
233. Liuzzi JP, Cousins RJ. Mammalian zinc transporters. *Annu Rev Nutr* 2004;24:151-72.
234. Tuerk MJ, Fazel N. Zinc deficiency. *Curr Opin Gastroenterol* 2009;25:136-43.
235. Liuzzi JP, Blanchard RK, Cousins RJ. Differential regulation of zinc transporter 1, 2, and 4 mRNA expression by dietary zinc in rats. *J Nutr* 2001;131:46-52.
236. Kelleher SL, Lonnerdal B. Zinc transporters in the rat mammary gland respond to marginal zinc and vitamin A intakes during lactation. *J Nutr* 2002;132:3280-5.
237. Wang K, Zhou B, Kuo YM, Zemansky J, Gitschier J. A novel member of a zinc transporter family is defective in acrodermatitis enteropathica. *Am J Hum Genet* 2002;71:66-73.
238. King JC, Shames DM, Woodhouse LR. Zinc homeostasis in humans. *J Nutr* 2000;130:1360S-6S.
239. Cousins RJ. Theoretical and practical aspects of zinc uptake and absorption. *Adv Exp Med Biol* 1989;249:3-12.

240. Sandstrom B, Cederblad A. Zinc absorption from composite meals. II. Influence of the main protein source. *Am J Clin Nutr* 1980;33:1778-83.
241. Mocchegiani E, Costarelli L, Giacconi R, et al. Nutrient-gene interaction in ageing and successful ageing. A single nutrient (zinc) and some target genes related to inflammatory/immune response. *Mech Ageing Dev* 2006;127:517-25.
242. Taylor CM, Bacon JR, Aggett PJ, Bremner I. Homeostatic regulation of zinc absorption and endogenous losses in zinc-deprived men. *Am J Clin Nutr* 1991;53:755-63.
243. Mocchegiani E, Giacconi R, Muzzioli M, Cipriano C. Zinc, infections and immunosenescence. *Mech Ageing Dev* 2000;121:21-35.
244. Mocchegiani E, Muzzioli M, Giacconi R. Zinc and immunoresistance to infection in aging: new biological tools. *Trends Pharmacol Sci* 2000;21:205-8.
245. Bogdan C, Rollinghoff M, Diefenbach A. The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol Rev* 2000;173:17-26.
246. Zangger K, Oz G, Haslinger E, Kunert O, Armitage IM. Nitric oxide selectively releases metals from the amino-terminal domain of metallothioneins: potential role at inflammatory sites. *FASEB J* 2001;15:1303-5.
247. Kagi JH, Schaffer A. Biochemistry of metallothionein. *Biochemistry* 1988;27:8509-15.
248. Maret W, Jacob C, Vallee BL, Fischer EH. Inhibitory sites in enzymes: zinc removal and reactivation by thionein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:1936-40.
249. Mocchegiani E, Muzzioli M, Cipriano C, Giacconi R. Zinc, T-cell pathways, aging: role of metallothioneins. *Mech Ageing Dev* 1998;106:183-204.
250. Mocchegiani E, Muzzioli M, Giacconi R, et al. 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 Dev* 2003;124:459-68.
251. Haase H, Rink L. The immune system and the impact of zinc during aging. *Immun Ageing* 2009;6:9.
252. Bao B, Prasad AS, Beck FW, Godmere M. Zinc modulates mRNA levels of cytokines. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;285:E1095-102.
253. Kanoni S, Dedoussis GV. Design and descriptive characteristics of the GHRAS: the Greek Health Randomized Aging Study. *Med Sci Monit* 2008;14:CR204-12.
254. Mocchegiani E, Marcellini F, Pawelec G. Nutritional zinc, oxidative stress and immunosenescence: biochemical, genetic, and lifestyle implications for healthy ageing. *Biogerontology* 2004;5:271-3.
255. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16:1215.
256. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499-502.
257. Genuth S, Alberti KG, Bennett P, et al. Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2003;26:3160-7.
258. Wallace TM, Levy JC, Matthews DR. Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care* 2004;27:1487-95.

259. Mariani E, Cattini L, Neri S, et al. Simultaneous evaluation of circulating chemokine and cytokine profiles in elderly subjects by multiplex technology: relationship with zinc status. *Biogerontology* 2006;7:449-59.
260. Cipriano C, Malavolta M, Costarelli L, et al. Polymorphisms in MT1a gene coding region are associated with longevity in Italian Central female population. *Biogerontology* 2006;7:357-65.
261. Pepersack T, Rotsaert P, Benoit F, et al. Prevalence of zinc deficiency and its clinical relevance among hospitalised elderly. *Arch Gerontol Geriatr* 2001;33:243-53.
262. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA* 2003;289:2560-72.
263. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. *World Health Organ Tech Rep Ser* 1995;854:1-452.
264. Ainsworth BE, Haskell WL, Whitt MC, et al. Compendium of physical activities: an update of activity codes and MET intensities. *Med Sci Sports Exerc* 2000;32:S498-504.
265. Panagiotakos DB, Pitsavos C, Arvaniti F, Stefanadis C. Adherence to the Mediterranean food pattern predicts the prevalence of hypertension, hypercholesterolemia, diabetes and obesity, among healthy adults; the accuracy of the MedDietScore. *Prev Med* 2007;44:335-40.
266. Yesavage JA, Brink TL, Rose TL, et al. Development and validation of a geriatric depression screening scale: a preliminary report. *J Psychiatr Res* 1982;17:37-49.
267. Fountoulakis KN, Tsolaki M, Iacovides A, et al. The validation of the short form of the Geriatric Depression Scale (GDS) in Greece. *Aging (Milano)* 1999;11:367-72.
268. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 1975;12:189-98.
269. 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.
270. Λεκανίδου Ρ, Τσιτήλου Σ, Ροδάκης Γ. Εισαγωγή στη μοριακή βιολογία: Πανεπιστήμιο Αθηνών-Τμήμα Βιολογίας., 1998.
271. Watson DE, Li B. TaqMan applications in genetic and molecular toxicology. *Int J Toxicol* 2005;24:139-45.
272. el-Masry TM, Zahra MA, el-Tawil MM, Khalifa RA. Manganese superoxide dismutase alanine to valine polymorphism and risk of neuropathy and nephropathy in Egyptian type 1 diabetic patients. *Rev Diabet Stud* 2005;2:70-4.
273. Giacconi R, Caruso C, Lio D, et al. 1267 HSP70-2 polymorphism as a risk factor for carotid plaque rupture and cerebral ischaemia in old type 2 diabetes-atherosclerotic patients. *Mech Ageing Dev* 2005;126:866-73.
274. Olomolaiye O, Wood NA, Bidwell JL. A novel NlaIII polymorphism in the human IL-6 promoter. *Eur J Immunogenet* 1998;25:267.

275. Giacconi R, Cipriano C, Muti E, et al. Novel -209A/G MT2A polymorphism in old patients with type 2 diabetes and atherosclerosis: relationship with inflammation (IL-6) and zinc. *Biogerontology* 2005;6:407-13.
276. Giacconi R, Muti E, Malavolta M, et al. The +838 C/G MT2A polymorphism, metals, and the inflammatory/immune response in carotid artery stenosis in elderly people. *Mol Med* 2007;13:388-95.
277. Gauderman WJ MJ. QUANTO 1.1: A computer program for power and sample size calculations for genetic-epidemiology studies, <http://hydra.usc.edu/gxe>. 2006.
278. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 2007;81:559-75.
279. Costa J, Borges M, Oliveira E, Gouveia M, Carneiro AV. Incidence and prevalence of hypercholesterolemia in Portugal: a systematic review. Part I. *Rev Port Cardiol* 2003;22:569-77.
280. 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. *Int J Epidemiol* 2004;33:1345-52.
281. Panagiotakos DB, Zeimbekis A, Boutziouka V, et al. Long-term fish intake is associated with better lipid profile, arterial blood pressure, and blood glucose levels in elderly people from Mediterranean islands (MEDIS epidemiological study). *Med Sci Monit* 2007;13:CR307-12.
282. 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;11:333-6.
283. Marcellini F, Giuli C, Papa R, et al. Zinc status, psychological and nutritional assessment in old people recruited in five European countries: Zincage study. *Biogerontology* 2006;7:339-45.
284. Abbott RD, Yano K, Hakim AA, et al. Changes in total and high-density lipoprotein cholesterol over 10- and 20-year periods (the Honolulu Heart Program). *Am J Cardiol* 1998;82:172-8.
285. Krabbe KS, Pedersen M, Bruunsgaard H. Inflammatory mediators in the elderly. *Exp Gerontol* 2004;39:687-99.
286. Pawelec G, Barnett Y, Forsey R, et al. T cells and aging, January 2002 update. *Front Biosci* 2002;7:d1056-183.
287. Artacho R, Ruiz-Lopez MD, Gamez C, Puerta A, Lopez MC. Serum concentration and dietary intake of Zn in healthy institutionalized elderly subjects. *Sci Total Environ* 1997;205:159-65.
288. Bailey AL, Maisey S, Southon S, Wright AJ, Finglas PM, Fulcher RA. Relationships between micronutrient intake and biochemical indicators of nutrient adequacy in a "free-living" elderly UK population. *Br J Nutr* 1997;77:225-42.
289. Hyun TH, Barrett-Connor E, Milne DB. Zinc intakes and plasma concentrations in men with osteoporosis: the Rancho Bernardo Study. *Am J Clin Nutr* 2004;80:715-21.
290. Jacques PF, Sulsky SI, Sadowski JA, Phillips JC, Rush D, Willett WC. Comparison of micronutrient intake measured by a dietary questionnaire and biochemical indicators of micronutrient status. *Am J Clin Nutr* 1993;57:182-9.

291. Ghayour-Mobarhan M, Taylor A, New SA, Lamb DJ, Ferns GA. Determinants of serum copper, zinc and selenium in healthy subjects. *Ann Clin Biochem* 2005;42:364-75.
292. Hambidge M. Biomarkers of trace mineral intake and status. *J Nutr* 2003;133 Suppl 3:948S-955S.
293. Scott DA. Crystalline insulin. *Biochem J* 1934;28:1592-1602 1.
294. Rungby J. Zinc, zinc transporters and diabetes. *Diabetologia* 2010.
295. Wijesekara N, Chimienti F, Wheeler MB. Zinc, a regulator of islet function and glucose homeostasis. *Diabetes Obes Metab* 2009;11 Suppl 4:202-14.
296. Wijesekara N, Dai FF, Hardy AB, et al. Beta cell-specific Znt8 deletion in mice causes marked defects in insulin processing, crystallisation and secretion. *Diabetologia*;53:1656-68.
297. Jansen J, Karges W, Rink L. Zinc and diabetes--clinical links and molecular mechanisms. *J Nutr Biochem* 2009;20:399-417.
298. Shi Z, Yuan B, Qi L, Dai Y, Zuo H, Zhou M. Zinc intake and the risk of hyperglycemia among Chinese adults: the prospective Jiangsu Nutrition Study (JIN). *J Nutr Health Aging* 2010;14:332-5.
299. Singh RB, Niaz MA, Rastogi SS, Bajaj S, Gaoli Z, Shoumin Z. Current zinc intake and risk of diabetes and coronary artery disease and factors associated with insulin resistance in rural and urban populations of North India. *J Am Coll Nutr* 1998;17:564-70.
300. Sun Q, van Dam RM, Willett WC, Hu FB. Prospective study of zinc intake and risk of type 2 diabetes in women. *Diabetes Care* 2009;32:629-34.
301. Haase H, Overbeck S, Rink L. Zinc supplementation for the treatment or prevention of disease: current status and future perspectives. *Exp Gerontol* 2008;43:394-408.
302. Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens* 2000;18:655-73.
303. Weber KT, Weglicki WB, Simpson RU. Macro- and micronutrient dyshomeostasis in the adverse structural remodelling of myocardium. *Cardiovasc Res* 2009;81:500-8.
304. Bell SG, Vallee BL. The metallothionein/thionein system: an oxidoreductive metabolic zinc link. *Chembiochem* 2009;10:55-62.
305. Maret W, Krezel A. Cellular zinc and redox buffering capacity of metallothionein/thionein in health and disease. *Mol Med* 2007;13:371-5.
306. Giacconi R, Bonfigli AR, Testa R, et al. +647 A/C and +1245 MT1A polymorphisms in the susceptibility of diabetes mellitus and cardiovascular complications. *Mol Genet Metab* 2008;94:98-104.
307. Yang L, Li H, Yu T, et al. Polymorphisms in metallothionein-1 and -2 genes associated with the risk of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008;294:E987-92.
308. Giacconi R, Kanoni S, Mecocci P, et al. Association of MT1A haplotype with cardiovascular disease and antioxidant enzyme defense in elderly Greek population: comparison with an Italian cohort. *J Nutr Biochem* 2009.

309. Kanoni S, Dedoussis GV, Herbein G, et al. Assessment of gene-nutrient interactions on inflammatory status of the elderly with the use of a zinc diet score - ZINCAGE study. *J Nutr Biochem* 2009.
310. Doi M, Takahashi Y, Komatsu R, et al. Salt-sensitive hypertension in circadian clock-deficient Cry-null mice involves dysregulated adrenal Hsd3b6. *Nat Med*;16:67-74.
311. Dupuis J, Langenberg C, Prokopenko I, et al. New genetic loci implicated in fasting glucose homeostasis and their impact on type 2 diabetes risk. *Nat Genet* 2010;42:105-16.
312. Rosenblum JS, Gilula NB, Lerner RA. On signal sequence polymorphisms and diseases of distribution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:4471-3.
313. Dedoussis GV, Kanoni S, Panagiotakos DB, et al. Age-dependent dichotomous effect of superoxide dismutase Ala16Val polymorphism on oxidized LDL levels. *Exp Mol Med* 2008;40:27-34.
314. Taufer M, Peres A, de Andrade VM, et al. Is the Val16Ala manganese superoxide dismutase polymorphism associated with the aging process? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2005;60:432-8.
315. Lapointe A, Couillard C, Piche ME, et al. Circulating oxidized LDL is associated with parameters of the metabolic syndrome in postmenopausal women. *Atherosclerosis* 2007;191:362-8.
316. Young IS, McFarlane C, McEneny J. Oxidative modification of triacylglycerol-rich lipoproteins. *Biochem Soc Trans* 2003;31:1062-5.
317. Holvoet P, Jenny NS, Schreiner PJ, Tracy RP, Jacobs DR. The relationship between oxidized LDL and other cardiovascular risk factors and subclinical CVD in different ethnic groups: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Atherosclerosis* 2007;194:245-52.
318. Lairon D, Defoort C, Martin JC, Amiot-Carlin MJ, Gastaldi M, Planells R. Nutrigenetics: links between genetic background and response to Mediterranean-type diets. *Public Health Nutr* 2009;12:1601-6.
319. Nettleton JA, McKeown NM, Kanoni S, et al. Interactions of dietary whole grain intake with fasting glucose- and insulin-related genetic loci in individuals of European descent: a meta-analysis of 14 cohort studies. *Diabetes Care* 2010.
320. Mocchegiani E, Giacconi R, Costarelli L, et al. Zinc deficiency and IL-6 -174G/C polymorphism in old people from different European countries: effect of zinc supplementation. ZINCAGE study. *Exp Gerontol* 2008;43:433-44.

Biogerontology (2006) 7:329–337
DOI 10.1007/s10522-006-9047-5

RESEARCH ARTICLE

Health status, blood and anthropometrical indices from Greek old and nonagenarian subjects

Stavroula Kanoni · George Dedoussis ·
Yannis Manios · Marco Malavolta ·
Eugenio Mocchegiani

Published online: 5 September 2006
© Springer Science+Business Media B.V. 2006

Abstract As the elderly population is increasing rapidly, there is a lot of scientific interest in clarifying the differential life-style, genetic, biochemical and molecular factors contributing to mortality or exceptional longevity. Within the framework of the ZINCAGE project, 249 old (60–85 years) and nonagenarian Greek subjects (≥ 85 years old) were recruited and anthropometrical, blood and biochemical indices as well as blood pressure measurements were obtained. Based upon the inclusion criteria, 214 of them were characterized as healthy (136 female, 78 male), while those characterized as non-healthy were excluded from the statistical analysis. The findings indicated an 88.4% prevalence of overweight and obesity in elderly (91.2% in women, 83.3% in men), while a significant decrease in body mass index with age

was recorded. Hypercholesterolemia was observed in 75.3% of elderly women and in 69.2% of men. Erythrocyte sedimentation rate value was increased in 27.6% of all healthy elderly, while zinc deficiency was observed in 18.7% of elderly. Over 85.0% of all healthy elderly were within normal range for all other hematological analysis. Blood analysis confirmed the good health status of the elderly recruited as healthy, except for the high prevalence of obesity and hypercholesterolemia.

Keywords Health status · Elderly · Body mass index · Blood indices · ZINC AGE study

Introduction

The elderly still represent one of the fastest growing segments of the population in developed countries. The growing number of elderly over the age of 65 years is mainly due to the increment of life expectancy in adults and the reduction of childhood mortality (Hazzard 1985). Among the European countries, Italy and Greece present the highest percentage of elderly (Eurodiet 2000). In 1995, 16.0% of the European population was over 65 years and 3.0% over 80 years (Eurodiet 2000). According to demographic projection, in 2050 the elderly population (>60 years of age) will reach 32.0% (11.0% over 80 years of age) (Eurodiet 2000).

Presented at the Zinc Age Conference, Madrid, February, 10–13, 2006.
Stavroula Kanoni and George Dedoussis contributed equally to the manuscript.

S. Kanoni · G. Dedoussis (✉) · Y. Manios
Laboratory of Molecular Genetics,
Department of Nutrition and Dietetics,
Harokopio University of Athens, 70 El. Venizelou str,
17671 Kallithea-Athens, Greece
e-mail: dedousi@hua.gr

M. Malavolta · E. Mocchegiani
Immunology Center, Section Nutrition,
Immunity and Ageing,
Research Department INRCA, Ancona, Italy

Ageing is a process that affects the performances of most physiological systems and increases susceptibility to disease and death. In particular, a dysregulation of the immune system with ageing is believed to contribute to morbidity and mortality, due to the greater incidence of infections and cancer, as well as autoimmune phenomena involved in major age related diseases, such as atherosclerosis (Wick et al. 1999). On the other hand, elderly demonstrating exceptional longevity have generally been spared major age-related diseases, such as cardiovascular disease, diabetes mellitus and cancer, which are diseases that are responsible for most deaths in the elderly (Barzilai and Shuldiner 2001). Efforts to identify risk factors for functional decline and mortality in older individuals have intensified in recent years, aiming to reduce the likelihood of subsequent adverse outcomes. Sociodemographic and lifestyle characteristics, nutritional parameters, physical examination findings, biological markers and genetic background are candidate factors to have predictive value for mortality or exceptional longevity in older adults. Trichopoulos and co-workers have studied the role of dietary habits regarding mortality and have concluded that adherence to a diet relying on plant foods and unsaturated lipids, as that resembles the Mediterranean diet, may be particularly appropriate for elderly people (Trichopoulou et al. 2003, 2005).

A new, large-scale European cohort, ZINCAGE project, is studying biochemical, genetic and lifestyle factors for healthy ageing (Mocchegiani et al. 2004). To meet the aims of the European project ZINCAGE, which focuses on dietary intake of zinc, oxidative stress, immunosenescence and longevity in elderly, we investigated the health status of a Greek elderly and nonagenarian cohort. For the needs of the current study 214 healthy elderly subjects were recruited and anthropometrical, hematological and biochemical indices were obtained. The hypothesis tested is whether old men and women recruited on basis of non-atherosclerotic, non-cancer and non-major diseases inclusion criteria, have normal clinical and anthropometrical indicators of health status.

Materials and methods

Subjects and study design

The study was carried out in a sample of non-institutionalized men and women older than 60 years of age from the county of Attica. A total of 249 subjects participated voluntarily and data were collected between April 2004 and January 2005. The Bioethics Committee of Harokopio University of Athens approved the study protocol and all subjects signed a volunteer consent form.

The study was part of “Nutritional zinc, oxidative stress and immunosenescence: biochemical, genetic and lifestyle implications for healthy ageing—ZINCAGE”. ZINCAGE project is a European Union 6th Framework project involving 17 European research groups, which studies biochemical, genetic and lifestyle factors for healthy ageing with a particular focus on nutritional zinc, oxidative stress and immunosenescence (Mocchegiani et al. 2004). ZINCAGE project involves the recruitment of about 800 healthy old subjects (60–85 years old), 120 healthy nonagenarians (≥ 85 years) and 120 old patients (infected, affected by cancer or atherosclerotics) belonging to five European geographic areas, namely, Germany, Poland, Greece, Italy and France. The upper goal is to clarify the role of nutritional zinc in healthy ageing and longevity through the maintenance of immune efficiency both at central and peripheral levels. The ZINCAGE project mainly focuses on the establishment of a comprehensive picture of the links among metallothioneins (MT), chaperones, nitric oxide production, telomere length, cell cycle kinetics, ApoJ, PARP-1 activity, signal transduction and DNA repair in lymphocytes obtained from old and nonagenarian subjects, thus providing potential novel biomarkers for immunosenescence and successful ageing.

Inclusion and exclusion criteria
for the recruitment of old and nonagenarian subjects

Healthy subjects included in the study had to be non-institutionalized and live independently (without requiring special daily care and/or

nursing support). In addition they should be free of any kind of medication such as steroid, diuretic, anticonvulsant, anti-depressive drug, antibiotic, antimetabolite, non-steroid anti-inflammatory drug intake, as well as non-integrator and/or vitamin supplementation. Subjects were excluded if they had diabetes, autoimmune diseases, neurodegenerative diseases, cardiovascular diseases, infections, cancer, Crohn's disease and acrodermatitis enteropathica, kidney disease, liver disease, sickle cell anemia, chronic skin ulcerations and endocrine disorders.

For the recruitment of patients inclusion criterion were respiratory and urinary infections in acute phase as to the infected patients, breast cancer as to women, prostate cancer as to men and pulmonary cancer as to cancer patients, bilateral and/or unilateral carotid stenosis, hypertension (systolic/diastolic blood pressure > 165/95 mm Hg), cardiovascular diseases (angina, arrhythmia), previous myocardial infarction as to atherosclerotic old subjects.

Blood analysis

Prior to blood collection, volunteers were subjected to 12 h fasting. Blood analysis included: blood cell count and indices [leukocytes, neutrophils, lymphocytes, monocytes, eosinophils, red blood cells (RBC), hemoglobin, hematocrit, mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), coefficient of variation of red cell distribution width (RDW-CV), platelets, mean platelet volume (MPV)], plasma zinc, biochemical indices [fasting glucose, total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), triglycerides (TG), total plasma proteins, albumin, globulin, albumin globulin ratio] and erythrocyte sedimentation rate (ESR). Low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) was calculated using the Friedewald equation (Friedewald et al. 1972). DNA and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were also obtained from each blood sample.

Based upon the TC, HDL-C, LDL-C and triglyceride levels, subjects were categorized in groups according to the National Cholesterol Educational Program (Expert Panel on

Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults 2001) as shown in Table 1.

Anthropometrical and blood pressure measurements

The anthropometrical measurements, including weight and height, were obtained by trained clinical dietitians using standardized techniques and equipment (World Health Organization 1995). Body weight was measured to the nearest 0.1 kg using calibrated electronic scales, with the subject barefoot and dressed in light clothing. Height was measured barefoot to the nearest 0.1 cm using portable stadiometer. Blood pressure was measured using a mercury sphygmomanometer, according to the proposed guidelines (Joint National Committee 2003). Body mass index (BMI) was calculated as weight (kg)/height (m) squared. Based upon the BMI values, subjects were categorized in groups: underweight (BMI < 18.5 kg/m²), normal weight (18.5 ≤ BMI ≤ 24.9 kg/m²), overweight (25.0 ≤ BMI ≤ 29.9 kg/m²), obese (30.0 ≤ BMI ≤ 34.9 kg/m²) and severely obese (BMI ≥ 35.0 kg/m²) (Table 1).

Table 1 Cut-off points for BMI and blood lipid values

Reference values	Classification
BMI (kg/m ²)	
< 18.5	Underweight
18.5–24.9	Normal weight
25.0–29.9	Overweight
30.0–34.9	Obesity
≥ 35	Severe obesity
Total cholesterol (mg/dl)	
< 200	Desirable
200–239	Borderline high
≥ 240	High
HDL-C (mg/dl)	
< 40	Low
≥ 40	Desirable
LDL-C (mg/dl)	
< 130	Optimal
130–159	Borderline high
160–189	High
≥ 190	Very high
Plasma zinc (μM)	
≤ 10	Deficiency
> 10	Normal

Statistical methods and analysis

Statistical analysis was performed with SPSS 11.5 edition. Continuous variables are presented as mean values $\pm$ standard deviation (SD). Differences in proportions of variables were assessed using chi square test. *T*-tests, Mann–Whitney tests, analyses of variance (ANOVA), analyses of covariance (ANCOVA) and Kruskal–Wallis tests were used to compare the variables among subgroups of the sample. Statistical significance was assessed at two-tailed $P = 0.05$ level.

Results

A total of 249 old and nonagenarian subjects entered the study. Thirty old subjects were characterized as atherosclerotic, three males had prostate cancer and two females had pulmonary infection, and were excluded from further statistical analysis. The remaining 214 elderly were healthy, 136 female (63.5%) and 78 male (36.5%). Among them, 29 elderly (7 male and 22 female) were marked with severe obesity (BMI ≥ 35 kg/m²) and were further categorized in a separate sample group. The mean age of the healthy and severely obese subjects was 73.3 years, ranging from 60 years to 94 years. The healthy nonagenarians subjects (age ≥ 85 years) were 20 (11 male and 9 female).

Regarding BMI, healthy women had significant higher BMI compared to healthy men ($P = 0.003$)

(Table 2). The average prevalence of overweight in all elderly was 37.9% (31.6% in women and 48.7% in men), while the average prevalence of obesity was 36.9% (43.4% in women and 25.6% in men) and the average prevalence of severe obesity was 13.6% (16.2% in women and 9.0% in men) (Table 3). All together, 91.2% of females and 83.3% of males were overweight or obese. When dividing healthy subjects into groups according to their age (60–70, 71–84 and ≥ 85 years), healthy nonagenarians had significant lower BMI compared to the other age groups ($P = 0.009$). Figure 1A presents the changes in BMI across the three age groups in all healthy subjects.

Within healthy, prevalence of obesity was 61.6% in elderly aged 60–70 years and 20.0% in nonagenarians. Nonagenarians had the highest prevalence of normal weight (30.0%) and the highest prevalence of overweight (50.0%) compared to the other age groups (Table 5).

As far as lipid profile concerns, healthy women had significantly higher TC, and HDL-C levels compared to healthy men ($P = 0.015$ and $P = 0.002$, respectively) (Table 2). A percentage of 41.0% in men occurred with TC levels borderline high, while in women the percentage was 34.3%. The opposite goes as to high TC levels, with 28.2% of men and 41.0% of women (Table 3). LDL-C levels were optimal for 48.7% of men and only for 34.3% of women, while 23.1% of men and 32.8% of women had LDL-C levels over 160 mg/dl (Table 3). TC/HDL-C ratio

Table 2 Comparison of selected variables within healthy subjects by sex and adjusted for age

	Males	Females	<i>P</i> value
Number of participants	78	136	
Age (years)	75.5 $\pm$ 7.9	72.0 $\pm$ 7.5	0.002
Systolic blood pressure (mm Hg)	143.3 $\pm$ 15.9	137.5 $\pm$ 17.9	0.055
Diastolic blood pressure (mm Hg)	81.2 $\pm$ 8.7	79.0 $\pm$ 8.8	0.036
BMI (kg/m ²)	28.8 $\pm$ 4.3	31.3 $\pm$ 5.2	0.003
Biochemical and blood indices			
Total cholesterol	215.7 $\pm$ 37.6	230.6 $\pm$ 38.0	0.015
HDL-C (mg/dl)	54.6 $\pm$ 12.1	60.5 $\pm$ 12.9	0.002
Triglycerides (mg/dl)	133.4 $\pm$ 83.8	128.1 $\pm$ 56.1	0.536
LDL-C (mg/dl)	134.3 $\pm$ 34.6	144.5 $\pm$ 34.0	0.069
LDL/HDL ratio	2.6 $\pm$ 0.8	2.5 $\pm$ 0.9	0.637
TC/HDL ratio	4.1 $\pm$ 1.1	4.0 $\pm$ 1.1	0.355
Fasting glucose (mg/dl)	97.3 $\pm$ 17.9	95.7 $\pm$ 28.9	0.854
ESR (mm/h)	15.7 $\pm$ 13.1	24.6 $\pm$ 16.7	<0.001
Plasma zinc (μ M)	11.2 $\pm$ 1.7	11.4 $\pm$ 1.5	0.634

Values are presented as mean $\pm$ SD

Table 3 Prevalence, expressed as percentage respect to cut-off points, of underweight, overweight, obesity and dyslipidemia in healthy male and female elderly

	Males % (<i>N</i> = 78)	Females % (<i>N</i> = 136)	<i>P</i> value
<i>BMI</i> (kg/m ²)			
Underweight	1.3 (1)	0.7 (1)	0.014
Normal weight	15.4 (12)	8.1 (11)	
Overweight	48.7 (38)	31.6 (43)	
Obesity	25.6 (20)	43.4 (59)	
Severe obesity	9.0 (7)	16.2 (22)	
<i>Total cholesterol</i> (mg/dl)			
Desirable	30.8 (24)	24.6 (33)	0.171
Borderline high	41.0 (32)	34.3 (46)	
High	28.2 (22)	41.0 (55)	
<i>HDL-C</i> (mg/dl)			
Low	7.7 (6)	2.2 (3)	0.078
Desirable	92.3 (72)	97.8 (131)	
<i>LDL-C</i> (mg/dl)			
Optimal	48.7 (38)	34.3 (46)	0.209
Borderline high	28.2 (22)	32.8 (44)	
High	16.7 (13)	23.1 (31)	
Very high	6.4 (5)	9.7 (13)	
<i>Plasma zinc</i>			
Deficiency	24.4 (19)	15.4 (21)	0.144
Normal	75.6 (59)	84.6 (115)	

and LDL-C/HDL-C ratio were similar for men and women, and for all age groups (Tables 2, 4). LDL-C/HDL-C ratio ranged from 0.8 to 5.5, with values below 3.5 for 85.8% of elderly, while TC/HDL-C ratio ranged from 1.95 to 8.31 with values below 4.0 for 57.5% of the subjects.

A trend for decline in TC levels with age was observed ($P = 0.149$), that was significant only for nonagenarians compared to the elderly aged 60–70 (Fig. 1B). All other blood lipid mean values were similar across all age groups and there was no significant age-dependent difference in the prevalence of dyslipidemia (Tables 4, 5). On the blood pressure levels, healthy men had significant higher diastolic blood pressure than women (Table 2).

Regarding other blood indices, 87.7% of elderly had normal fasting glucose levels (≤ 110 mg/dl). There was no significant difference in average fasting glucose levels between men and women (Table 2). Over 85.0% of all elderly were within normal range for total leukocyte count and components, while 100.0% had normal plasma protein levels. Over 85.0% of men and 88.0% of women were within normal range for all other hematological analyses on RBCs and platelets, except for the ESR. ESR value was increased in 27.6% of elderly, while women had higher ESR mean

levels than men ($P < 0.001$) (Table 2). In addition, there was a significant increase in ESR levels with age ($P < 0.001$) (Table 4).

As far as zinc plasma levels concerns, 81.3% of elderly (75.6% of men and 84.6% of women) occurred with normal values (Table 3), while there was no gender- or age dependent difference in zinc plasma levels (Tables 2, 4).

Discussion

In our sample of healthy Greek elderly (≥ 60 years of age) participating in ZINCAGE project, 88.4% (91.2% of women and 83.3% of men) were found to be overweight or obese, whereas only 0.9% was underweight. Healthy women demonstrated higher BMI levels compared to healthy men (31.3 ± 5.2 vs. 28.8 ± 4.3 kg/m², Table 2). This is in accordance with Trichopoulou and co-workers, giving 30.3 ± 5.0 kg/m² BMI value for Greek elderly women and 28.1 ± 3.9 kg/m² for Greek men of over 65 years of age (Trichopoulou et al. 2000). Prevalence of overweight and obesity in elderly populations is not well documented and ranges widely upon geographical location and study design. The Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III) showed that

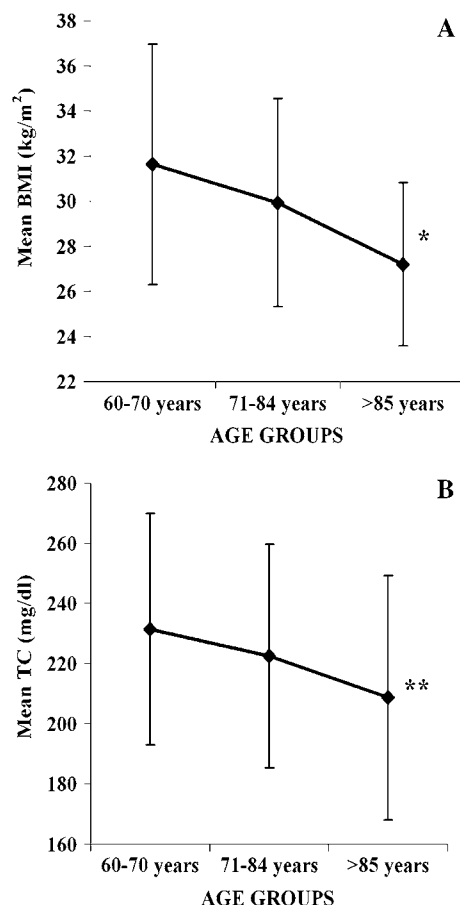


Fig. 1 Changes in BMI (**A**) and TC levels (**B**) in elderly by age group. * $P < 0.050$ for the comparisons with the other age groups, ** $P = 0.055$ for the comparisons with the 60–70 age group

64.0% of women and 70.0% of men aged 60–69 years were overweight or obese (Flegal et al. 1998), while the percentages were lower for

the age group beyond 70 years of age (56.1% for women and 61.1% for men) (Davison et al. 2002). Low prevalence of obesity was reported in elderly over 50 years of age (16.0% in men and 33.0% in women) in Jerusalem (Gofin et al. 1996) and in Taiwan, where 41.3% of women and 30.5% of men (≥ 65 years) were overweight or obese (Chiu et al. 2000). In the Mediterranean basin, the prevalence of overweight in elderly populations is higher. In a cross sectional study of 3,356 elderly Italians (65–84 years old), 48.6% of men and 54.9% of women were overweight or obese (Perissinotto et al. 2002), while in south Italy (Barbagallo et al. 2001) the prevalence was higher (76.0% for men and 86.0% for women). Similarly in a Spanish cohort older than 60 years of age, the prevalence of overweight and obesity was estimated at 49.0 and 31.5% for the men and 39.8 and 40.8% for the women, respectively (Gutierrez-Fisac et al. 2004). Factors favoring overweight and obesity in elderly populations are multifaceted and include positive energy balance, inactivity, economical and educational factors, increase in adipose tissue with significant reduction in fat-free mass, depression and gender (Inelmen et al. 2003). Old women have higher prevalence of obesity and lower prevalence of overweight compared to males, an observation that could be due to the fact that women have a greater tendency to increase weight and accumulate fat, especially at post-menopausal period (Inelmen et al. 2003).

In the present study, a decline in BMI was observed for all healthy subjects older than 71 years of age (Fig. 1A). Similar trend has been

Table 4 Comparison of selected variables within healthy subjects by age group and adjusted for gender

	60–70 years	71–84 years	≥ 85 years	<i>P</i> value
Number of participants	91	103	20	
Systolic blood pressure (mm Hg)	138.0 $\pm$ 16.8	140.0 $\pm$ 17.9	146.2 $\pm$ 16.6	0.349
Diastolic blood pressure (mm Hg)	80.8 $\pm$ 7.8	79.1 $\pm$ 8.9	79.0 $\pm$ 12.6	0.276
Biochemical and blood indices				
HDL-C (mg/dl)	59.9 $\pm$ 13.2	56.8 $\pm$ 12.7	59.0 $\pm$ 11.7	0.671
TG (mg/dl)	130.7 $\pm$ 73.1	131.6 $\pm$ 65.6	119.0 $\pm$ 49.0	0.616
LDL-C (mg/dl)	145.4 $\pm$ 34.9	139.4 $\pm$ 32.8	126.0 $\pm$ 38.1	0.153
LDL/HDL ratio	2.6 $\pm$ 0.8	2.6 $\pm$ 0.9	2.2 $\pm$ 0.8	0.138
TC/HDL ratio	4.0 $\pm$ 1.1	4.1 $\pm$ 1.1	3.6 $\pm$ 0.9	0.142
Fasting glucose (mg/dl)	96.5 $\pm$ 26.4	95.6 $\pm$ 25.3	99.4 $\pm$ 21.4	0.816
ESR (mm/h)	17.5 $\pm$ 13.1	23.5 $\pm$ 17.7	27.4 $\pm$ 15.7	<0.001
Plasma zinc (μ M)	11.7 $\pm$ 1.7	11.3 $\pm$ 1.5	10.8 $\pm$ 1.5	0.404

Values are presented as mean $\pm$ SD

Table 5 Prevalence, expressed as percentage respect to cut-off points, of underweight, overweight, obesity and dyslipidemia in healthy elderly by age group

	60–70 years % (N = 91)	71–84 years % (N = 103)	≥85 years % (N = 20)	P value
<i>BMI (kg/m²)</i>				
Underweight	1.1 (1)	1.0 (1)	0.0 (0)	0.022
Normal weight	6.6 (6)	10.7 (11)	30.0 (6)	
Overweight	30.8 (28)	41.7 (43)	50.0 (10)	
Obesity	44.0 (40)	34.0 (35)	20.0 (4)	
Severe obesity	17.6 (16)	12.6 (13)	0.0 (0)	
<i>Total cholesterol (mg/dl)</i>				
Desirable	24.2 (22)	24.5 (25)	52.6 (10)	0.075
Borderline high	34.1 (31)	41.2 (42)	26.3 (5)	
High	41.8 (38)	34.3 (35)	21.1 (4)	
<i>HDL-C (mg/dl)</i>				
Low	3.3 (3)	5.9 (6)	0.0 (0)	0.424
Desirable	96.7 (88)	94.1 (96)	100.0 (19)	
<i>LDL-C (mg/dl)</i>				
Optimal	38.5 (35)	36.3 (37)	63.2 (12)	0.322
Borderline high	28.6 (26)	36.3 (37)	15.8 (3)	
High	22.0 (20)	20.6 (21)	15.8 (3)	
Very high	11.0 (10)	6.9 (7)	5.3 (1)	
<i>Plasma zinc (μM)</i>				
Deficiency	17.6 (16)	17.5 (18)	30.0 (6)	0.395
Normal	82.4 (75)	82.5 (85)	70.0 (14)	

documented in large elderly cohorts (Perissinotto et al. 2002; Davison et al. 2002; Gutierrez-Fisac et al. 2004) and this has been attributed primarily to the reduction of lean mass and height occurring with increasing age. Alternatively that could be due to the selective long survival of non-obese elderly (Elia 2001). Nevertheless, the effect of overweight and obesity on mortality in elderly populations remains controversial. Most studies showed a lack of significant association between high BMI and increased mortality, whereas BMI values lower than 18.5 kg/m² were strongly associated with frailty and mortality in elderly (Grabowski and Ellis 2001). Only few studies showed a significant J or U-shaped association between mortality and BMI, with the right curve rising for BMI over 31 or 32 kg/m² (Heiat et al. 2001).

In the present study, the prevalence of hypercholesterolemia in elderly was found high, especially in women. High or borderline high TC levels were observed in 75.3% of elderly women and 69.2% of men, while 65.6% of women and 51.3% of men had LDL-C levels above 130 mg/dl. This is line with the findings of previously contacted studies, showing that elderly women consistently have higher TC levels than men of the same age (Schupf et al. 2005; LaRosa 1996).

Although, in middle-aged adults TC and LDL-C are well-established factors of coronary heart disease, in elderly the role of lipoproteins remains to be clarified. Some studies have shown that TC is an important predictor of coronary heart disease in elderly men (Anum and Adera 2004; Houterman et al. 2002; Po-Huang and Eaker 2000), among which, this of Annum, that it is an important predictor only for men aged up to 80 years old. Nevertheless, large prospective studies have found no statistically significant associations between elevated TC levels and all cause mortality risk in elderly populations (Schatz et al. 2001; Anderson et al. 1987). However, regarding elderly women, most of the studies agree on the lack of association between high TC levels and risk for cardiovascular mortality (Anum and Adera 2004; Po-Huang and Eaker 2000). It seems that low TC values constitute a risk for mortality similar to very high TC values. A U-shaped association between TC, LDL-C and mortality has been demonstrated (Curb et al. 2004b; Casiglia et al. 2003). Furthermore, it has been supported that low levels of TC and LDL-C are associated with higher all cause mortality in both elderly men and women (Schupf et al. 2005; Casiglia et al. 2003) and with higher neoplastic mortality in women (Casiglia et al. 2003).

In total, elderly women had higher levels of HDL-C compared to men. Only a small percentage of the elderly (7.7% of men and 2.2% of women) had HDL-C levels below 40 mg/dl, while all nonagenarians had optimal levels. It is well documented, that healthy elderly have higher levels of HDL-C than younger subjects (Schaefer et al. 1989), the vast majority of those over 70 years (~90.0%) occurring with HDL-C levels over 40 mg/dl (Nikkila and Heikkinen 1990). Elderly women have approx 10 mg/dl higher average HDL-C levels than men (Abbott et al. 1998). Large-scale studies (Curb et al. 2004a) identified the atheroprotective role of HDL-C in old age, as HDL-C levels were strongly and inversely related to risk for coronary death, myocardial infarction and stroke (Shepherd et al. 2002). Therefore, HDL-C levels are thought to represent a longevity factor, through mechanisms involving antioxidant and anti-inflammatory properties of HDL-C (Barter 2004).

Concerning ESR, the majority (~70.0%) of the elderly had average ESR levels above 30 mm/h. In all participants, the average ESR levels showed a significant rise with age, however in women ESR levels were higher than those in men. Our findings are in accordance with previous large cohort studies (Andresdottir et al. 2003; Natali et al. 2003). Choi and co-workers showed a significant correlation between TC levels and ESR in elderly (Choi and Pai 2004). The authors suggested that hypercholesterolemia could increase ESR levels in elderly. This could be an explanation for the high ESR levels observed in current study since equally high prevalence of hypercholesterolemia was also recorded.

Furthermore, the present study revealed 18.7% zinc deficiency in elderly, while average zinc plasma values were similar for both genders (11.2 ± 1.7 for men and 11.4 ± 1.5 for women, $P = 0.634$). There was no significant age-dependent decline in zinc plasma levels, even though nonagenarians occurred with 30.0% of zinc deficiency. Similar studies have demonstrated lower prevalence (<5%) of zinc deficiency in European elderly populations (Andriollo-Sanchez et al. 2005), however with different evaluation methods. Nevertheless, an increased zinc deficiency in Greek elderly could imply genetic and nutritional etiology.

Conclusively, our findings, consistently with findings outcoming from other studies, indicate a possible correlation between overweight, obesity or hypercholesterolemia and well-being of elderly. Since there is still an unmet need to define the anthropometrical and biochemical indices that contribute to longevity, these findings are to shed light upon these factors. However, further research as to evaluate life-style, biological and genetic factors, is needed to finally elucidate the determinants of longevity.

References

- Abbott RD, Wilson PW, Kannel WB, Castelli WP (1998) High-density lipoprotein cholesterol, total cholesterol screening and myocardial infarction. The Framingham study. *Arteriosclerosis* 8:207–211
- Anderson KM, Castelli WP, Levy D (1987) Cholesterol and mortality: 30 years of follow up from the Framingham study. *JAMA* 257:2176–2180
- Andresdottir MB, Sigfusson N, Sigvaldason H, Gudnason V (2003) Erythrocyte sedimentation rate, an independent predictor of coronary heart disease in men and women. *Am J Epidemiol* 158:844–851
- Andriollo-Sanchez M, Hininger-Favier I, Meunier N, Toti E, Zaccaria M (2005) Zinc intake and status in middle-aged and older European subjects: the ZENITH study. *Eur J Clin Nutr* 59:S37–S41
- Anum EA, Adera T (2004) Hypercholesterolemia and coronary heart disease in the elderly: a meta-analysis. *Ann Epidemiol* 14:705–721
- Barbagallo CM, Cavera G, Sapienza M, Noto D, Cefalu AB, Pagano M (2001) 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* 25:185–190
- Barter P (2004) HDL: a recipe for longevity. *Atherosclerosis Suppl* 5:25–31
- Barzilai N, Shuldiner AR (2001) Searching for human longevity genes. The future history of gerontology in the post-genomic era. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 56A:M83–M87
- Casiglia E, Mazza A, Tikhonoff V, Scarpa R, Schiavon L, Pessiva AC (2003) Total cholesterol and mortality in the elderly. *J Intern Med* 254:353–362
- Chiu H, Chang H, Mau L, Lee T, Liu H (2000) Height, weight and body mass index of elderly persons in Taiwan. *J Gerontol* 55A:M684–M690
- Choi JW, Pai SH (2004) Influences of hypercholesterolemia or red cell indices and erythrocyte sedimentation rate in elderly persons. *Clin Chim Acta* 341:117–121
- Curb DJ, Abbot RD, Rodriguez BL, Masaki K, Chen R, Popper J, Petrovitch H, Ross GW, Schatz I, Belleau GC, Yano K (2004a) High-density lipoprotein cholesterol

- and the risk of stroke in elderly men. The Honolulu Heart Program. *Am J Epidemiol* 160:150–157
- Curb DJ, Abbot RD, Rodriguez BL, Masaki K, Popper J, Chen R, Petrovitch H, Blanchette P, Schatz I, Yano K (2004b) Prospective association between low and high total and low-density lipoprotein cholesterol and coronary heart disease in elderly men. *J Am Geriatr Soc* 52:1975–1980
- Davison KK, Ford ES, Cogswell ME, Dietz WH (2002) 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* 50:1802–1809
- Elia M (2001) Obesity in the elderly. *Obes Res* 9:244S–248S
- EURODIET (2000) Nutrition and diet for healthy lifestyles in Europe. Working party 1. Draft report, Draft 7, 30.04.2000
- Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (2001) Summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III), NIH Publication No. 01-3670
- Flegal KM, Carroll MD, Kuczmarski RJ, Johnson CL (1998) Overweight and obesity in the United States: prevalence and trends, 1960–1994. *Int J Obes Relat Metab Disord* 22:39–47
- Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS (1972) Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 18:499–502
- Gofin J, Abramson JH, Kart JD, Epstein L (1996) 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* 20:260–266
- Grabowski DC, Ellis JE (2001) High body mass index does not predict mortality in older people: analysis of the longitudinal study of aging. *J Am Geriatr Soc* 49:968–979
- Gutierrez-Fisac JL, Lopez E, Banegas JR, Graciani A, Rodriguez-Artalejo F (2004) Prevalence of overweight and obesity in elderly people in Spain. *Obes Res* 12:710–715
- Hazzard WR (1985) The practice of geriatric medicine. In: Andres R, Bierman EL, Hazzard WR (eds) *Principles of geriatric medicine*. McGraw-Hill, New York, pp 3–5
- Heiat A, Vaccarino V, Krumholz HM (2001) An evidence-based assessment of federal guidelines for overweight and obesity as they apply to elderly persons. *Arch Intern Med* 161:1194–1203
- Houterman S, Boshuizen HC, Verschuren WMM, Giampaoli S, Nissinen A, Menotti A, Kromhout D (2002) Predicting cardiovascular risk in the elderly in different European countries. *Eur Heart J* 23:294–300
- Inelmen EM, Sergi G, Coin A, Miotto F, Peruzzi S, Enzi G (2003) Can obesity be a risk factor in elderly people? *Obes Rev* 4:147–155
- 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
- LaRosa JC (1996) Dyslipidemia and coronary artery disease in the elderly. *Clin Geriatr Med* 12:33–40
- Mocchegiani E, Marcellini F, Pawelec G (2004) Nutritional zinc, oxidative stress and immunosenescence: biochemical, genetic and lifestyle implications for healthy ageing. *Biogerontology* 5:271–273
- Natali A, L'Abbate A, Ferrannini E (2003) Erythrocyte sedimentation rate, coronary atherosclerosis, and cardiac mortality. *Eur Heart J* 24:639–648
- Nikkila M, Heikkinen J (1990) High-density lipoprotein cholesterol and longevity. *Age Ageing* 19:119–124
- Perissinotto E, Pisent C, Sergi G, Grigoletto F, Enzi G (2002) Anthropometric measurements in the elderly: age gender differences. *Br J Nutr* 87:1–11
- Po-Huang C, Eaker ED (2000) Serum cholesterol concentrations and all-cause mortality in older people. *Age Ageing* 29:69–74
- Schaefer EJ, Moussa PB, Wilson PW (1989) Plasma lipoproteins in healthy octogenarians: lack of reduced high density lipoprotein cholesterol levels: results from the Framingham Heart Study. *Metabolism* 38:293–296
- Schatz IJ, Masaki K, Yano K, Chen R, Rodriguez BL, Curb JD (2001) Cholesterol and all-cause mortality in elderly people from the Honolulu Heart Program: a cohort study. *Lancet* 358:351–355
- Schupf N, Costa R, Luchsinger J, Tang M-X, Lee JH, Mayeux R (2005) Relationship between plasma lipids and all-cause mortality in nondemented elderly. *J Am Geriatr Soc* 53:219–226
- Shepherd J, Blauw GJ, Murphy MB (2002) Pravastatin in elderly individuals at risk of vascular disease (PROSPER): a randomized controlled trial. *Lancet* 360:1623–1630
- Trichopoulou A, Gnardellis C, Lagiou A, Benetou V, Trichopoulos D (2000) Body mass index in relation to energy intake and expenditure among adults in Greece. *Epidemiology* 11(3):333–336
- Trichopoulou A, Costacou T, Barnia C, Trichopoulos D (2003) Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *New Engl J Med* 348(26):2599–2608
- Trichopoulou A, Orfanos P, Norat T, Bueno-de-Mesquita B, Ocké CM, Peeters P, van der Schouw YT, 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 EA, Key TJ, Bingham S, Khaw K-T, Kesse E, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault M-C, Berglund G, Wirfalt E, Hallmans G, Johansson I, Tjonneland A, Olsen A, Overvad K, Heidi H, Hundborg HH, Riboli E, Dimitrios Trichopoulos D (2005) Modified Mediterranean diet and survival: EPIC-elderly prospective cohort study. *BMJ* 330(30):991–997
- Wick G, Perschinka H, Xu Q (1999) Autoimmunity and atherosclerosis. *Am Heart J* 138:S444–S449
- World Health Organization (1995) Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. Technical Report Series 854, pp 1–452



Effect of zinc supplementation on plasma IL-6 and MCP-1 production and NK cell function in healthy elderly: Interactive influence of +647 MT1a and –174 IL-6 polymorphic alleles

Erminia Mariani ^{a,b,*}, Simona Neri ^a, Luca Cattini ^a, Eugenio Mocchegiani ^c, Marco Malavolta ^c, George V. Dedoussis ^d, Stavroula Kanoni ^d, Lothar Rink ^e, Jolanta Jajte ^f, Andrea Facchini ^{a,b}

^a Laboratory of Immunology and Genetics, Istituto di Ricerca Codivilla-Putti, IOR, Via di Barbiano 1/10, 40136 Bologna, Italy

^b Department of Internal Medicine and Gastroenterology, University of Bologna, Italy

^c Immunology Centre (Section: Nutrition, Immunity and Ageing), Research Department INRCA, Ancona, Italy

^d Department of Nutrition Science and Dietetics, Harokopio University of Athens, Greece

^e Institute of Immunology, RWTH-Aachen, Germany

^f Department of Toxicology Faculty of Pharmacy, Medical University of Lodz, Poland

Received 12 September 2007; received in revised form 28 November 2007; accepted 4 December 2007

Available online 14 December 2007

Abstract

Pro-inflammatory cytokine response and NK activity are controlled by the availability of zinc ion, whose intra-cellular transport is regulated by metallothioneins.

In order to closely examine the importance of circulating zinc in the modulation of immune response during ageing, in the balance of Th2/Th1 equilibrium and finally in the reversibility of systemic low grade inflammation, we evaluated the changes occurring in plasma IL-6 and MCP-1 concentrations and NK lytic activity in a healthy low grade inflamed elderly population, following zinc-aspartate supplementation. In addition, we aimed to highlight the potential interaction among circulating zinc increments, changes in immunological parameters and +647 MT1a and –174 IL-6 polymorphic alleles.

Thirty-nine healthy individuals (60–83 years) from the ZINCAGE cohort (previously typed for +647 MT1a and –174 IL-6 polymorphisms) were supplied with zinc-aspartate. Blood samples collected before and after supplementation underwent basal laboratory determinations (circulating zinc, albumin and C-reactive protein) and immunological studies (plasma IL-6 and MCP-1 and NK lytic activity). Zinc supplementation in subjects with low or borderline-normal circulating zinc increased the concentration of this ion and modulated plasmatic IL-6 and MCP-1 as well as NK lytic activity. An interactive effect of polymorphic alleles of MT1a and IL-6 genes on zinc, IL-6, MCP-1 and NK activity was evidenced following supplementation, indicating the genetic background as one of the determinants for identifying groups of subjects that can take advantage of therapeutic intervention.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Zinc; IL-6; MCP-1; NK lytic activity; +647 MT1a polymorphism; –174 IL-6 polymorphism; Elderly

1. Introduction

Inflammation, ageing and age-associated diseases are conditions possibly characterized by zinc deficiency.

* Corresponding author. Address: Laboratory of Immunology and Genetics, Istituto di Ricerca Codivilla-Putti, IOR, Via di Barbiano 1/10, 40136 Bologna, Italy. Tel.: +39 051 6366803; fax: +39 051 6366807.

E-mail address: marianie@alma.unibo.it (E. Mariani).

Among micronutrients, zinc is one of the most important trace elements required as a catalytic, structural and regulatory ion for the activities of more than 300 enzymes, proteins and transcriptional factors. Therefore, zinc is a key element in many homeostatic responses of the body, including oxidative stress and for many biological functions, including immune efficiency (Fraker and King, 2004; Ibs and Rink, 2003; Rink and Gabriel, 2000).

In particular, zinc deficiency may be related to the decreased functional activity of immune cells, associated with ageing, by reducing cell-mediated adaptive and innate immune responses (Dardenne, 2002; Shankar and Prasad, 1998) as well as adversely affecting the secretion and function of cytokines (Prasad, 2000) and possibly chemokines (Mariani et al., 2006), thus resulting in limited immunoresistance to infections.

A progressive age-related increase of plasma concentration of some chemokines has been observed in healthy elderly subjects (Inadera et al., 1999; Gerli et al., 2000; Antonelli et al., 2006; Wieczorowska-Tobis et al., 2006). In particular, MCP-1 chemokine levels appear closely associated with age (Deo et al., 2004; Mariani et al., 2006) and elevated in concomitance with low circulating levels of zinc (Mariani et al., 2006). Also acute phase protein increases are described to accompany the ageing process. The finding of these proteins mirrors a chronic low grade inflammatory state (as defined by a 2- to 4-fold increased level) (Vasto et al., 2007a), determined by different factors such as the chronic antigenic stress (probably the most prominent one). This progressive and prolonged activation of the immune system is evident in the elderly and, along with the genetic characteristics, is possibly related to several diseases of ageing with an inflammatory pathogenesis (such as atherosclerosis, type 2 diabetes, osteoarthritis and alzheimer's disease) (Mariani et al., 2007).

Pro-inflammatory cytokine response is largely controlled by the bio-availability of zinc ions and some zinc-dependent transcription factors are involved in the regulation of the gene expression of pro-inflammatory cytokines (e.g. IL-6, TNF- α) (Mocchegiani et al., 2006; Prasad et al., 2004). Furthermore, zinc-finger proteins are necessary for signal transduction from cytokine receptors to response genes. All these activities are carefully regulated inside the cells by metallothioneins (MT), a group of metal-binding proteins with high affinity for zinc, playing a central role as intracellular zinc transporters. Human MT genes, in turn, are up-regulated by zinc (Vandeghinste et al., 2000) and some polymorphisms of these genes have been correlated to chronic inflammation and may affect zinc release (MT1a sub-isoform, in particular) (Mocchegiani et al., 2006; Richards et al., 1984). Furthermore, MT induction and expression is under the control of IL-6, a multifunctional cytokine, major component of acute phase response, regulating differentiation and activity of different cell types (including lymphocytes), stress reactions and inflammatory responses (Vasto et al., 2007b).

As a consequence, high circulating levels of IL-6 related to the chronic inflammatory status (and possibly the -174 G/C polymorphism in the promoter region of the IL-6 gene), influence abnormally elevated levels of MT that, binding zinc, decrease the availability of this ion for biological processes and immune functions, particularly in ageing (Franceschi et al., 2000, 2005; Olivieri et al., 2006).

In order to closely examine the importance of circulating zinc in the modulation of immune response during ageing, in the balance of Th2/Th1 equilibrium (showing a prevalent Th2 profile in the elderly) and finally in the reversibility of systemic low grade inflammation, we evaluated the changes occurring in plasma IL-6 and MCP-1 (a Th2 chemokine) concentrations and NK cell functional activity in a healthy low grade inflamed elderly population, following zinc-aspartate supplementation. In addition, we aimed to highlight the potential interaction among circulating zinc increments, changes in immunological parameters and +647 MT1a and -174 IL-6 polymorphic alleles.

2. Materials and methods

2.1. Study population

A sample of 39 healthy individuals, (19 women and 20 men, aged 72.7 years $\pm$ 6.40, mean $\pm$ SD) (range 60–83 years) was taken from the cohort of the ZINCAGE project and underwent a zinc supplementation trial, that preferentially included carriers of +647 MT1a C+ and -174 IL-6 C- alleles. All subjects undergoing zinc supplementation had concentrations of plasma zinc below 11 μ mol/L at least at one check-up of two made within one year.

The sample, recruited by Mocchegiani in Italy, Rink in Germany, and Dedoussis in Greece, was supplied with 10 mg/day of zinc-aspartate (Unizink 50, KÖHLER PHARMA Corp., Alsbach-Hähnlein, Germany). Subjects recruited by Jaite in Poland were supplied with an identical form of zinc-aspartate, locally produced (Zincas, Zakład Chemiczno-Farmaceutyczny FARMAPOL, Poznań, Poland). All the subjects received the supplement for 48 $\pm$ 2 days.

All participants provided informed consent according to the procedures required by the local Research Ethics Committees, which also approved the study protocol.

Blood samples collected before and after supplementation from overnight fasting subjects underwent basal laboratory determinations. For immunological studies, plasma was separated by centrifugation at 4 °C, divided and appropriately stored at -80 °C until used for cytokine and chemokine determinations. Cellular pellets were diluted with PBS, stratified on density gradient and centrifuged. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) separated at the interface, resuspended in RPMI 1640 containing FCS and DMSO, were cryopreserved in liquid nitrogen. Laboratory data, plasma, PBMC and DNA samples were kept anonymous.

Briefly, the selection included healthy old people, still living independently (at their own home or in nursing homes) not needing special daily care and not taking any noteworthy drugs (steroids, diuretics, anti-convulsants, anti-depressants, chelating drugs, antibiotics and antimetabolites, or NSADs, in the last two months before the recruitment), nutritional integrators, or vitamin complexes.

2.2. Plasma albumin, C-reactive protein and zinc concentrations

Plasma albumin and C-reactive protein (Crp) concentrations, as indicators of nutritional status and of chronic diseases, respectively, were measured by nephelometry (albumin normal range: 3.5–5.3 g/dl and Crp normal range: <0.3 mg/dl). Concentration of zinc, as a micronutrient involved in the immune response, was determined with a Thermo XII Series induction coupled plasma mass spectrometer (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA) as previously reported (Malavolta et al., 2006) (normal range: 10–15 $\mu\text{mol/L}$). These data were kindly supplied by Mocchegiani's group.

2.3. Multiplex bead immunoassay

IL-6 and MCP-1 concentrations were simultaneously evaluated in duplicate plasma samples, using commercially available multiplex bead-based sandwich immunoassay kits (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), as previously described (Mariani et al., 2006). Briefly, distinct sets of fluorescently dyed beads (50 μl) loaded with capture monoclonal antibodies specific for each cytokine to be tested were incubated with a similar volume of plasma (1:4 diluted) or with standards in a 96-well plate. Subsequently, 25 μl of fluorescent detection antibody mixture were added and then the samples were washed and resuspended in assay buffer.

Low standard curves for each soluble factor were used, ranging from 3952.5 to 0.24 pg/ml for IL-6 and from 2280.2 to 0.14 pg/ml, for MCP-1.

The formation of different sandwich immunocomplexes on distinct bead sets was quantified using the Bio-Plex Protein Array System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), evaluating the fluorescent signal of a minimum of 100 beads per region (chemokine/cytokine).

Data were analysed using the Bio-Plex Manager software version 3.0 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). In general, at least six standards were accepted and used to establish standard curves following a five-parameter logistic regression model (5PL).

2.4. +647 A/C MT1a and –174 G/C IL-6 polymorphisms

The first polymorphism corresponded to an A/C transition at +647 nt position in the coding region of the human MT1a gene, the second one corresponded to a G/C transition at position –174 in the human IL-6 gene promoter.

Genotyping for each polymorphism was performed by Mocchegiani's group. Amplification conditions were reported elsewhere (Mocchegiani et al., 2006; Olomolaiye et al., 1998).

2.5. NK cell lytic activity

K562 tumor target cells (1×10^6) were labelled with 15 μM calcein-AM (Molecular Probe, Eugene, OR) for

30 min at 37 °C and washed 2 times with cold complete medium. Labelled target cells ($5 \times 10^3/50 \mu\text{l}$) and varying numbers of cryopreserved and thawed effector cells (from 5×10^6 to 5×10^3 PBMC/100 μl) were incubated in triplicate in V-bottom 96-well plates (Effector/Target E/T ratios from 50/1 to 1/1). After incubation at 37 °C in 5% CO_2 for 4 h, 75 μl of each supernatant were harvested, transferred into new plates and measured by a dual-scanning microplate spectrofluorimeter (Spectramax Gemini – Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Data were expressed as arbitrary fluorescent units (AFU). Percent lytic activity was calculated according to the formula $[(\text{test AFU} - \text{spontaneous AFU})/(\text{maximum AFU} - \text{spontaneous AFU})] \times 100$. Spontaneous AFU represents Calcein AM released from target cells in medium alone and maximum AFU is Calcein AM released from target cells lysed in medium plus 2% Triton X-100, each measured in at least six replicate wells (Neri et al., 2001).

2.6. Statistical analysis

Concentrations were expressed as $\mu\text{mol/L}$ for zinc, g/dl for albumin, mg/dl for Crp, pg/ml for IL-6 and MCP-1. NK cell function was expressed as % lytic activity. All values were presented as means $\pm$ SD and/or SEM and as medians and percentiles. Differences between men and women or C– and C+ alleles were evaluated by the Mann–Whitney *U*-test; differences before and after supplementation were evaluated by Wilcoxon's matched pairs test; differences among sub-groups were analysed by Analysis of variance followed by post-tests. Correlations among variables were assessed by Pearson's and Spearman correlation coefficients. All reported *p* values are based on two-sided tests and were compared with a significance level of 5%. "Statistica" (release 6, StatSoft Inc.) for Windows was used to perform statistical analysis.

3. Results

3.1. Zinc supplementation modulates circulating zinc, IL-6 and MCP-1 and NK cell activity

There were no significant differences between men and women regarding age, basal plasma zinc and albumin concentrations (Table 1), therefore they were analysed together. Both men and women had albumin concentrations within the normal range, indicating that none of the examined subjects had clinically evident malnutrition. In addition, all the subjects presented a systemic low grade inflammation but did not suffer from chronic diseases, as indicated by serum C-reactive protein, whose levels never exceeded a 4-fold increase. In particular, 8 subjects were Crp negative, the remaining group presented a median of 0.275 mg/dl before and of 0.31 mg/dl after supplementation (5th–95th percentiles: 0.1–1.06 mg/dl before and 0.1–1.01 mg/dl after supplementation) without differences between men and women and without modulation by zinc.

Table 1
Selected characteristics of healthy old subjects

	Total subjects (<i>n</i> = 39)	Women (<i>n</i> = 19)	Men (<i>n</i> = 20)
Age (years)	72.7 ± 6.40	71.9 ± 7.41	73.4 ± 5.46
Zinc (μmol/L)	10.5 ± 1.45 (10.00–15.00) ^a	10.8 ± 1.25	10.2 ± 1.58
Albumin (g/dl)	4.2 ± 0.40 (3.50–5.30) ^a	4.2 ± 0.47	4.2 ± 0.32

Values are expressed as means ± SD. Comparisons between women and men by Mann–Whitney *U*-test did not show significant differences.

^a Normal range values of serum concentrations from a normal young adult population are reported in parentheses and obtained from Trumbo et al. (2001).

Also IL-6 and MCP-1 plasma concentrations indicated a systemic low grade inflammatory status, being within a 4-fold increase, compared to normal values (Table 1).

Zinc-aspartate supplementation significantly increased circulating zinc concentrations up to 11.5 ± 1.85 μmol/L (mean ± SD; Wilcoxon matched pairs test, $p < 0.001$ compared to basal levels) mainly in women, allowing the subjects belonging to the first quartile before supplementation to upgrade to the second quartile after supplementation (not shown). Serum basal concentrations of zinc were directly correlated to the levels reached after supplementation (Pearson's correlation coefficient $r = 0.536$, $p = 0.0001$).

Concomitantly, also IL-6 and MCP-1 plasma concentrations (Table 2) were modified by zinc-aspartate supplementation (up- and down-modulated, respectively) as well as NK lytic activity that increased both in men and women (Table 3).

Basal plasma concentrations of IL-6 were proportional to the MCP-1 basal ones (Pearson's correlation coefficient $r = 0.367$, $p = 0.02$), whereas they showed a borderline negative correlation following supplementation (not shown).

In addition, the higher the concentration of IL-6 before supplementation, the lower the increment observed following supplementation was (Pearson's correlation coefficient $r = -0.847$, $p = 0.000$), suggesting that IL-6 could be modified in the plasma within a limited biological interval.

3.2. Influence of single +647 MT1a and −174 IL-6 polymorphic alleles

In the 39 examined subjects, the observed frequencies of MT1a genotypes for +647 A/C polymorphism were compared with the expected frequencies and did not deviate from the Hardy–Weinberg equilibrium (chi-square = 4.317632, $df = 2$, $p = 0.115463$), mirroring the whole population from

which the examined subjects were taken. On the contrary, IL-6 genotypes for −174 G/C polymorphism significantly deviated from Hardy–Weinberg equilibrium (chi-square = 7.693303, $df = 2$, $p = 0.021352$) for a lower presence of heterozygous subjects in favour of a higher number of the homozygous ones (mainly CC).

AC and CC genotype carriers for +647 MT1a polymorphism were grouped and referred to as MT1a C+ (25 subjects), whereas AA genotype carriers were referred to as MT1a C− (14 subjects). Likewise, GC and CC genotype carriers for −174 IL-6 polymorphism were grouped and referred to as IL-6 C+ (14 subjects), and GG genotype carriers were referred to as IL-6 C− (25 subjects).

Plasma zinc concentrations, both basal and after supplementation, were lower in C− than C+ MT1a carriers (Fig. 1a). However, both C− and C+ carriers tended to increase circulating zinc concentrations after supplementation, albeit not significantly, but maintained their differ-

Table 3
NK lytic activity in basal conditions and after zinc supplementation

E/T cell ratios	Women (<i>n</i> = 19) NK lytic activity (%)		Men (<i>n</i> = 20) NK lytic activity (%)	
	Basal	After Zn	Basal	After Zn
E/T 50	23.0 ± 1.53	29.0 ± 3.40 ^b	22.6 ± 1.91	28.0 ± 3.80
E/T 25	18.8 ± 4.12	25.8 ± 2.56 ^b	18.3 ± 1.79	26.1 ± 2.74 ^b
E/T 12	15.2 ± 1.74	22.1 ± 2.41 ^c	15.1 ± 1.80	22.6 ± 2.47 ^c
E/T 6	12.8 ± 1.68	19.7 ± 2.52 ^c	11.9 ± 1.65	20.2 ± 2.35 ^c
E/T 3	10.9 ± 1.56	18.3 ± 2.14 ^c	10.1 ± 1.47	17.9 ± 1.94 ^b
E/T 1	7.7 ± 1.11	16.0 ± 1.85 ^c	6.1 ± 0.89	15.4 ± 1.86 ^a

Values are expressed as means ± SEM. Comparisons between women and men by Mann–Whitney *U*-test did not show significant differences. Comparisons between basal and after zinc supplementation percentages of NK lytic activity by Wilcoxon's matched pairs test show significant differences: ^a $p < 0.01$; ^b $p < 0.001$; ^c $p < 0.0005$.

Table 2
Plasma IL-6 and MCP-1 concentrations in basal conditions and after zinc supplementation

Soluble factors	Conditions	Total subjects (<i>n</i> = 39)	Women (<i>n</i> = 19)	Men (<i>n</i> = 20)
IL-6 (pg/ml)	Basal	24.4 ± 2.79 (7.1 ± 5.7) ^c	23.4 ± 3.80	25.3 ± 4.15
	After zinc	33.3 ± 2.11 ^a	34.1 ± 3.24	32.7 ± 2.78
MCP-1 (pg/ml)	Basal	136.4 ± 8.82 (43.16 ± 4.92) ^c	146.5 ± 13.40	126.8 ± 11.53
	After zinc	116.4 ± 5.63 ^b	116.4 ± 9.02 ^b	116.4 ± 7.21

Values are expressed as means ± SEM.

Comparisons between women and men by Mann–Whitney *U*-test did not show significant differences. Comparisons between basal and after zinc supplementation concentrations by Wilcoxon's matched pairs test show significant differences: ^a $p < 0.05$; ^b $p < 0.01$.

^c Serum concentrations from 21 normal adult donors (age range 24–55 years) are reported in parentheses (personal unpublished data).

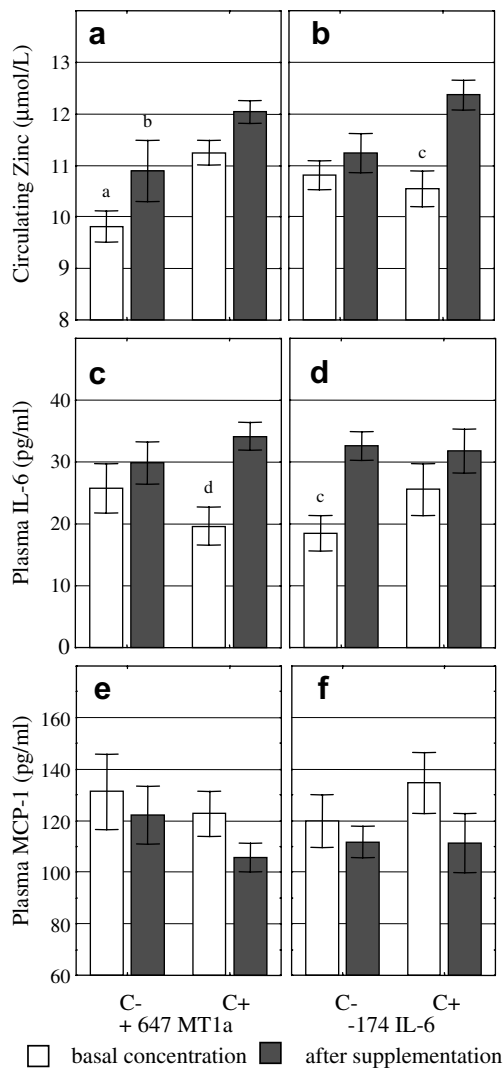


Fig. 1. Plasma zinc, IL-6 and MCP-1 concentrations according to +647 MT1a and -174 IL-6 polymorphic alleles: effect of zinc supplementation. Values are expressed as means $\pm$ SEM. Comparisons between C- and C+ alleles by Mann-Whitney *U*-test and between basal and after zinc supplementation concentrations by Wilcoxon matched pairs test show significant differences: C- vs. C+ ^a $p < 0.001$; ^b $p < 0.05$; basal vs. after supplementation ^c $p < 0.001$; ^d $p < 0.005$.

ences as in basal conditions (Fig. 1a). As concerning IL-6 polymorphism (Fig. 1b), C- and C+ carriers presented similar zinc concentrations in basal conditions, whereas, after zinc supplementation, C+ carriers displayed a borderline significant ($p = 0.06$) increase compared to C-, thus undergoing a significant up-regulation compared to their basal concentrations.

In general, subjects displaying relatively high basal concentrations of zinc (e.g. MT1a C+) presented on average a low increment after supplementation (Pearson's correlation coefficient $r = -0.5764$, $p = 0.005$).

Basal IL-6 plasma concentrations were slightly lower in MT1a C+ carriers than in C- ones (Fig. 1c). Plasma IL-6 increased after zinc supplementation, thus showing an evident up-regulation in MT1a C+ carriers (Fig. 1c), but, in general, without differences between C- and C+ carriers.

IL-6 C- and C+ carriers (Fig. 1d) showed trends opposite to MT1a polymorphism, with C- carriers presenting lower basal IL-6 concentrations and the most significant increments after supplementation, but, in general, C- and C+ carriers were almost similar.

Basal MCP-1 levels were similar before and after supplementation both in MT1a and IL-6 polymorphic allele carriers (Fig. 1e and f) and a down regulation of MCP-1 concentrations of about 10% was evident after zinc supplementation.

Lytic activity of NK cells was similar in C+ and C- carriers of both MT1a and IL-6 polymorphisms in basal conditions and was up-regulated by zinc supplementation (Fig. 2a-d).

The increments (differences between the values reached after and those before supplementation) of circulating zinc, plasma IL-6, plasma MCP-1 and NK lytic activity (at 1/1 E/T ratio, in order to evaluate activity on a per-cell-basis, thus avoiding the amplification effect due to cell recycling) were arranged according to circulating zinc increments. A positive trend (Spearman correlation $r = 0.272$, $p = 0.03$) of circulating zinc concentrations (Fig. 3a) from IL-6 C-, to MT1a C+ and C- carriers and finally to IL-6 C+ was observed (IL-6 C- vs C+, $p < 0.02$). In particular, IL-6 C- and MT1a C+ carriers shared low increments of zinc, (below 1 $\mu\text{mol/L}$), high increments of plasma IL-6 (Fig. 3b) (over 70% of basal concentrations; $p < 0.005$ at least, compared to IL-6 C+ and MT1a C-, respectively, not shown), and limited increments of NK lytic activity (Fig. 3c). The other two polymorphisms (e.g. MT1a C- and IL-6 C+), parallel to circulating zinc concentrations increments over 1 $\mu\text{mol/L}$ (Fig. 3a), showed a limited increase of plasma IL-6 (Fig. 3b) (lower than 25% of basal concentrations) and more evident increments of NK lytic activity (Fig. 3c), (over 80% of basal concentrations).

A general reduction in MCP-1 concentration was observed independently of polymorphic alleles, showing similarities between C- and C+ alleles of both polymorphisms (Fig. 3d).

3.3. Interactive effects of combined +647 MT1a and -174 IL-6 polymorphisms

The potential interactive effects of polymorphic alleles on serum zinc, plasma IL-6 and MCP-1 and on NK cell lytic activity is shown in Table 4, where NK lytic activity is reported at 1:1 Effector/Target ratio.

A significant interaction of MT1a C- allele with both C- and C+ alleles of IL-6 polymorphism was observed on serum zinc concentrations, that differed significantly before and after supplementation (analysis of variance $p = 0.05$ at least).

In particular, subjects presenting C- alleles for both polymorphisms (n.7) showed the lowest concentration of basal circulating zinc that was not modified by zinc-aspartate intake. Conversely, MT1a C-/IL-6 C+ carriers (n.7), although their basal concentrations overlapped those of

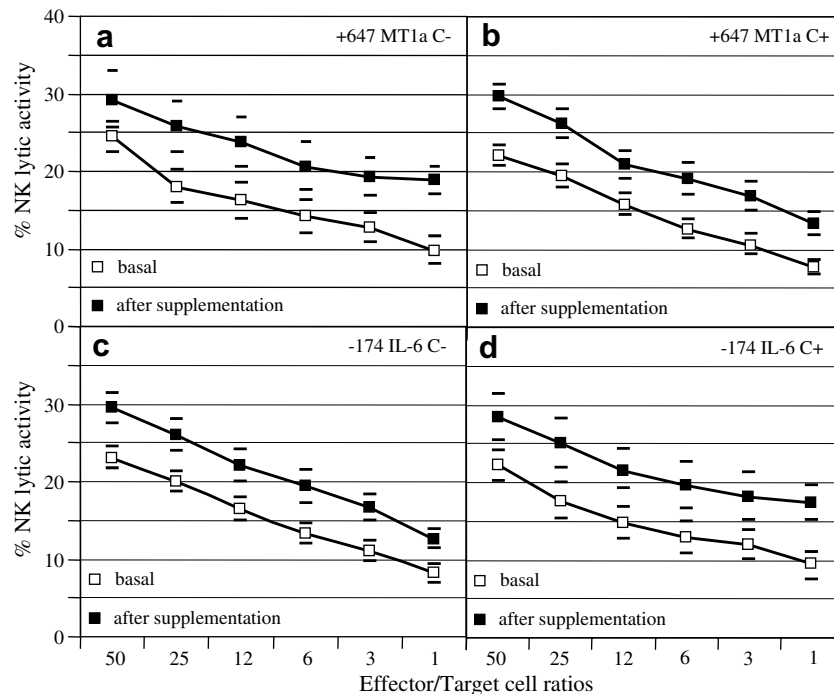


Fig. 2. Lytic activity of NK cells according to +647 MT1a and –174 IL-6 polymorphic alleles: effect of zinc supplementation. Values are expressed as means $\pm$ SEM for the different Effector/Target cell ratios; comparisons between basal and after supplementation percentages by Wilcoxon matched pairs test: $p < 0.05$ at least.

double C– carriers, were the only ones up-modulated by treatment ($p = 0.003$, average increase $2.59 \mu\text{mol/L}$).

MT1a C+/IL-6 C– (n.18) and MT1a C+/IL-6 C+ (n.7) carriers showed similar basal concentrations of zinc (over $11 \mu\text{mol/L}$) and similar increases after supplementation, very close to the values presented by single C+ polymorphism of MT1a (Fig. 1a) and IL-6 (Fig. 1b).

Regarding IL-6 plasma concentrations (Table 4), the effect of the two polymorphisms was particularly interesting in the MT1a C–/IL-6 C+ group, the only one showing a decrease (about 20%) in IL-6 plasmatic concentrations after zinc-aspartate supplementation. All the other polymorphic allele combinations showed similar basal and up-regulated IL-6 concentrations, which in C–C– and C+C+ were significantly increased after supplementation, compared to basal ones.

Concerning MCP-1 (Table 4), all combined polymorphisms showed similar MCP-1 basal concentrations and all, except MT1a C–/IL-6 C–, tended to down-regulate chemokine concentration after zinc-aspartate supplementation (MT1a C+/IL-6 C+ becoming the relatively lowest, with an approximate 25% decrement compared to basal plasma levels).

Donors with the combined MT 1a C–/IL-6 C+ and MT 1a C+/IL-6 C– polymorphisms showed the relatively lowest lytic activity in basal conditions (Table 4), but they underwent a significant increase after zinc supplementation ($p < 0.01$ at least for all the Effector/Target ratios examined, not shown). Conversely, C double negative and C double positive carriers showed only a slight increase in lytic activity (not shown). However, lytic activities after

zinc supplementation were generally comparable, with some differences between MT1a C+/IL-6 C– and MT1a C–/IL-6 C– or MT1a C+/IL-6 C+ at the lowest E/T ratio ($p < 0.05$, not shown).

The interactive effects of polymorphic alleles on circulating zinc concentrations suggested an overloading on pro-inflammatory phenotype due to the concomitant presence of C– alleles of MT1a and IL-6, as seen by the lack of increment in circulating zinc concentrations following zinc-aspartate treatment (Fig. 4a), the up-regulation of plasma IL-6 concentrations (Fig. 4b), (lower and higher than the single polymorphism ones, respectively, Fig. 3b) and the halved increments of NK lytic activity (Fig. 4c), compared to single IL-6 C– ones (Fig. 3c). Conversely, the pair of MT1a C+ with IL-6 C–, and especially with IL-6 C+, seemed to reduce the pro-inflammatory unbalance (Fig. 4b), improving lytic activity (Fig. 4c) with the progressive increase of circulating zinc (Fig. 4a). Finally, MT1a C–/IL-6 C+ carriers seemed to be the most favoured by zinc-aspartate treatment; in fact, parallel to the increment of more than $2 \mu\text{mol/L}$ circulating zinc (Fig. 4a), they showed a reversal between IL-6 plasma concentration (Fig. 4b) and NK lytic activity (Fig. 4c).

MCP-1 increments (Fig. 4d), despite being always negative in single polymorphism carriers, became positive in double negative C carriers and showed an additive decrement in double positive C carriers. In MT1a C+/IL-6 C– and MT1a C–/IL-6 C+, MCP-1 modifications resembled those of C+ allele of the corresponding single polymorphism (Fig. 1e and f).

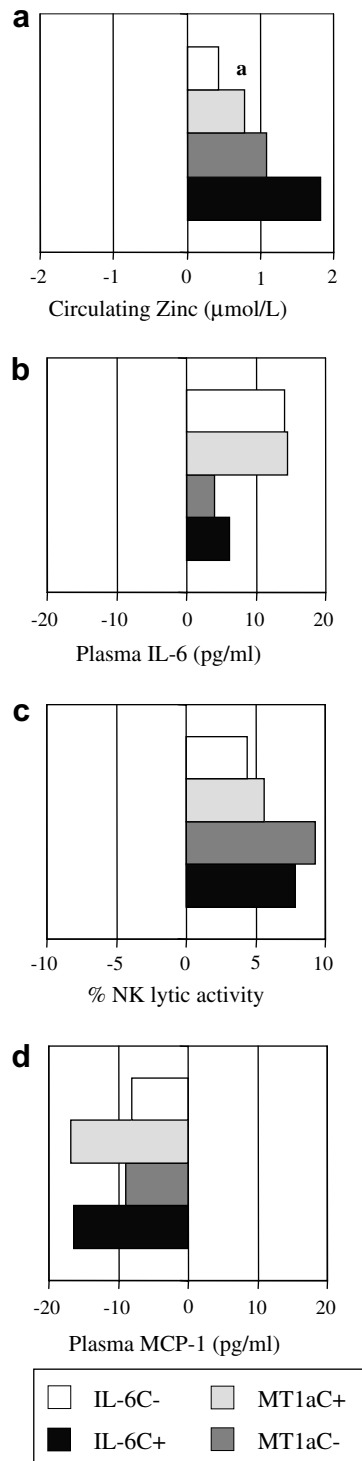


Fig. 3. Increments after supplementation of circulating zinc (a), plasma IL-6 (b) and MCP-1 (d) concentrations, and NK lytic activity (c) in single +647 MT1a and -174 IL-6 polymorphic allele carriers. ^aZinc concentration: IL-6 C- vs. IL-6 C+ $p = 0.02$.

4. Discussion

In this study we evaluated the effect of zinc aspartate supplementation on circulating zinc, IL-6 and MCP-1 plasma concentrations and on NK lytic activity in a

Table 4
Plasma zinc, IL-6 and MCP-1 concentrations according to polymorphic allele combinations: effect of zinc supplementation

Concentrations	+ 647 MT1a alleles	-174 IL-6 alleles	
		C-	C+
Basal circulating zinc (μmol/L) ^a	C-	9.59 ± 0.60	9.93 ± 0.37
	C+	11.09 ± 0.32	11.16 ± 0.56
Circulating zinc after supplementation (μmol/L) ^b	C-	9.50 ± 0.92	12.53 ± 0.38
	C+	11.88 ± 0.41	12.23 ± 0.46
Basal plasma IL-6 (pg/ml)	C-	18.92 ± 5.83	28.10 ± 5.68
	C+	22.61 ± 5.39	22.73 ± 7.49
Plasma IL-6 after supplementation ^c	C-	34.29 ± 4.14	22.75 ± 5.33
	C+	32.45 ± 2.95	39.66 ± 2.45
Basal plasma MCP-1 (pg/ml)	C-	111.93 ± 26.59	144.47 ± 20.59
	C+	122.17 ± 10.74	123.32 ± 15.84
Plasma MCP-1 after supplementation (pg/ml)	C-	118.29 ± 18.92	128.22 ± 16.25
	C+	108.09 ± 5.07	97.79 ± 15.72
Basal NK activity (%)	C-	13.69 ± 2.98	7.98 ± 2.19
	C+	6.49 ± 0.84	11.53 ± 2.2
NK activity after supplementation	C-	16.25 ± 2.77	15.80 ± 2.86
	C+	11.37 ± 1.27	19.03 ± 3.85

Values are expressed as means ± SEM. Analysis of variance: ^a $p < 0.05$; ^b $p < 0.006$; ^c $p < 0.06$.

Basal circulating zinc: MT1a C-/IL-6 C- vs. MT1a C+/IL-6 C- and vs. MT1a C+/IL-6 C+ $p < 0.05$.

Circulating zinc after supplementation: MT1a C-/IL-6 C- vs. MT1a C+/IL-6 C- $p < 0.003$; MT1a C-/IL-6 C- vs. MT1a C+/IL-6 C+ and vs. MT1a C-/IL-6 C+ $p < 0.02$.

Basal circulating zinc vs. zinc after supplementation: MT1a C-/IL-6 C+ $p < 0.003$.

Basal plasma IL-6 vs. plasma IL-6 after supplementation: MT1a C-/IL-6 C- and MT1a C+/IL-6 C+ $p < 0.05$.

Basal NK activity: MT1a C+/IL-6 C- vs. MT1a C-/IL-6 C- and MT1a C+/IL-6 C+ $p < 0.05$.

NK activity after supplementation: MT1a C+/IL-6 C- vs. MT1a C+/IL-6 C+ $p = 0.07$.

Basal NK activity vs. NK activity after supplementation: MT1a C+/IL-6 C- $p < 0.003$ and MT1a C-/IL-6 C+ $p < 0.01$.

healthy elderly population in relationship to some polymorphic allele variants.

The effect of zinc treatment on lytic activity could be due to a conversion from the pro-inflammatory status into a more balanced Th1/Th2 equilibrium, generally Th2 skewed by even mild zinc deficiency (Cakman et al., 1996; Prasad, 2000; Rink et al., 1998). NK lytic activity up-modulation after zinc supplementation was in agreement with previous data demonstrating that zinc deficiency affects NK cells that display decreased number and functional activity as well (Allen et al., 1983; Keen and Gershwin, 1990; Mocchegiani et al., 2003; Prasad, 2000; Ravaglia et al., 2000). Recently, it has been reported that an in vitro zinc stimulation mimicking doses and times of the in vivo supplementation used in this study, fostered a Th1 response probably not activating NK cell directly, but triggering IFN- γ synthesis by an increased number of CD56+ NK cells (Metz et al., 2007).

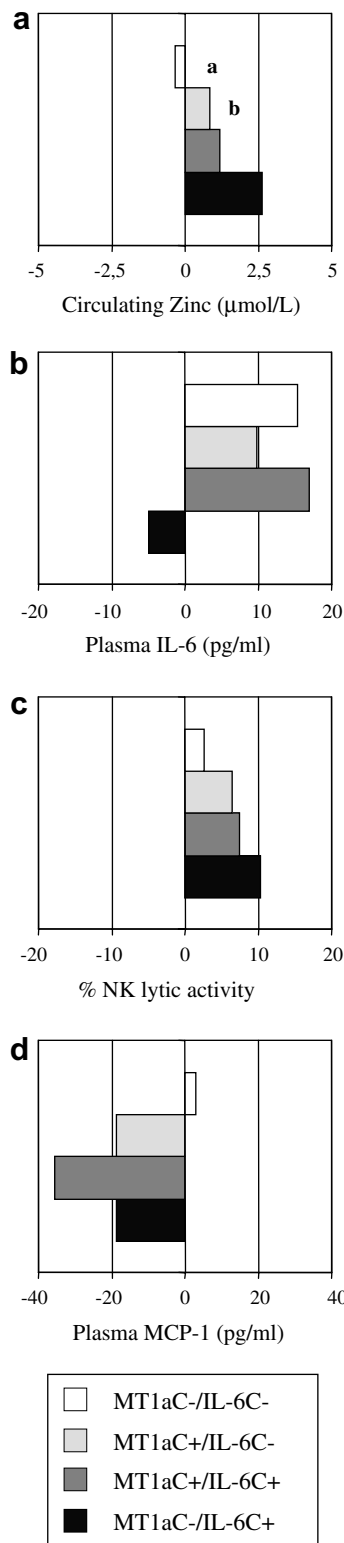


Fig. 4. Increments after supplementation of circulating zinc (a), plasma IL-6 (b) and MCP-1 (d) concentrations and NK lytic activity (c): interactive effects of combined +647 MT1a and -174 IL-6 polymorphisms. Analysis of variance for zinc concentrations: $p < 0.02$; post hoc: MT1a C-/IL-6 C+ vs. ^aMT1a C-/IL-6 C- $p = 0.002$ and vs. ^bMT1a C+/IL-6 C- $p = 0.02$.

The decrease in plasma concentrations of MCP-1, observed following treatment, agrees with the suggested remodelling to a Th1 prevailing immune response and with the indication that chemokines also participate in the Th2 profile (Mariani et al., 2006). This also indicates that MCP-1 level is influenced by zinc, as demonstrated on lung epithelial cells (Richter et al., 2003) and that zinc supplementation down modulates this chemokine.

Conversely, the effect on IL-6 was unexpected and opposite to that observed for MCP-1, since the treatment with zinc increased plasma concentrations of IL-6 in the overall survey, suggesting an up-regulation of the pro-inflammatory status, even if values remained below the ones observed in chronic diseases. In basal conditions plasma concentrations of IL-6 and MCP-1 were directly correlated, but following zinc supplementation they modulated in opposite ways, approaching a borderline inverse correlation, thus indicating that sensitivity to zinc was probably also dependent on other variables. In any case, the increment of IL-6 was restricted to a limited biological interval, as suggested by the poor increases observed in subjects with higher basal levels. This effect was not due to gender differences, because circulating zinc and IL-6 concentrations were similar in both sexes.

As concerning a possible reversibility of systemic “low grade inflammation”, as determined by Crp levels, we did not find any influence of zinc supplementation (in agreement with the Monica/Kora study, Scheurig et al., 2007) suggesting that, in our experimental conditions, zinc was able to modulate (positively or negatively) only peculiar pathways and not the overall inflammatory process.

Many recent studies have been given up to the analysis of possible associations among polymorphisms in genes encoding inflammatory mediators, circulating levels of these mediators and longevity. The -174 G > C polymorphism has been reported as functionally important since it influences the rate of IL-6 transcription and IL-6 plasma concentration (Brull et al., 2001; Terry et al., 2000). The numerous studies focusing on this polymorphism are very conflicting (see Krabbe et al., 2004, for a mini-review). Some authors suggested that C allele was a risk marker for all-cause mortality, associated with high plasma levels of IL-6 (Krabbe et al., 2004). Other studies, including one by our group on a large survey (Ravaglia et al., 2005), showed no association between this polymorphism and plasma levels of IL-6, which were increased in C- allele carriers only in the presence of concomitant clinical conditions. In agreement, in the present study we did not observe differences in plasma IL-6 concentration in C- or C+ allele carriers before and after zinc supplementation, the only difference being the up-modulation of C- carriers. Likewise, we did not observe different zinc concentrations between C+ and C-, but C+ carriers appeared to be up-modulated, suggesting that zinc responders were also able to limit plasma IL-6 increase.

Furthermore, also MT1a polymorphism seems to influence the observed modifications, in line with the MT role as

intracellular distrainers of zinc. In fact, the analysis of MT1a polymorphism showed essential circulating zinc differences between C– and C+ allele carriers, both before and after supplementation, C– allele carriers displaying the lowest levels of zinc without evident increases after supplementation joined to the lowest up-modulation of plasma IL-6. These data are partially in disagreement with a previous study performed on a female survey from central Italy, describing MT1a C+ carriers as characterized by a pro-inflammatory phenotype (high IL-6, low circulating zinc, high intracellular zinc, low zinc bioavailability) compared to C– (Cipriano et al., 2006). Excluding gender and numerosity of the sample, the main difference probably explaining the divergent results was represented by circulating zinc concentrations that were normal in the previous study (Cipriano et al., 2006) but markedly decreased in the present. Therefore, we suggest that important determinants are also the initial zinc concentration, the zinc/inflammation level and the increment necessary to recover normal basal levels. Some discrepancies might have also resulted from the complex interaction between life style and genetic factors together with cultural, dietetic and genetic differences across countries but also from the study of a single polymorphism rather than the association of more polymorphisms of proteins related to inflammation.

Indeed, the association of the two polymorphisms indicated the C– double carriers as unable to respond to the pharmacological treatment and, concomitantly, unable to limit the overproduction of IL-6 and to improve NK activity. On the other side, MT1a C–/IL-6 C+ and carriers were the best responders to zinc supplementation and the only ones able to down modulate IL-6, thus favouring the NK-mediated response, therefore showing a lower degree of inflammatory status, probably for a better zinc release from MT. Thus, the inflammatory response might be intense, long lasting or not modulated in subjects with a given genetic background, as our data suggest for MT1a C–/IL-6 C–, indicating the opportunity to avoid ineffective supplementation in particular patient groups.

In conclusion, in this paper we have shown that zinc-aspartate supplementation in subjects with low or borderline normal circulating zinc levels increases the concentration of this ion and modulates IL-6 and MCP-1 plasma concentrations and NK lytic activity that seem to be differently influenced by the interaction of some polymorphic alleles. Therefore, we suggest that, together with peak IL-6 plasma concentrations reached after an inflammatory response, also the reciprocal changes undergone by the different factors towards the Th1 profile, together with the genetic background, could be important determinants for evaluating the efficacy of zinc treatment and for identifying groups of subjects that can take advantage of therapeutic intervention.

Acknowledgments

Supported by EU ZINCAGE project (FOOD-CT-2004-506850), and partially supported by grants from Bologna

University (60% fund), Ricerca Corrente IOR, Italian Health Ministry and PRIN funds.

The authors thank Mrs. Patrizia Rappini and Graziella Salmi for typing assistance and Mr. Keith Smith for editing assistance.

References

- Allen, J.I., Perri, R.T., McClain, C.J., Kay, N.E., 1983. Alterations in human natural killer cell activity and monocyte cytotoxicity induced by zinc deficiency. *J. Lab Clin. Med.* 102, 577–589.
- Antonelli, A., Rotondi, M., Fallahi, P., Ferrari, S.M., Paolicchi, A., Romagnani, P., Serio, M., Ferrannini, E., 2006. Increase of CXC chemokine CXCL10 and CC chemokine CCL2 serum levels in normal ageing. *Cytokine* 34, 32–38.
- Brull, D.J., Montgomery, H.E., Sanders, J., Dhamrait, S., Luong, L., Rumley, A., Lowe, G.D., Humphries, S.E., 2001. Interleukin-6 gene –174 G > C and –572 G > C promoter polymorphisms are strong predictors of plasma interleukin-6 levels after coronary artery bypass surgery. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21, 1458–1463.
- Cakman, I., Rohwer, J., Schutz, R.M., Kirchner, H., Rink, L., 1996. Dysregulation between TH1 and TH2 T cell subpopulations in the elderly. *Mech. Ageing Dev.* 87, 197–209.
- Cipriano, C., Malavolta, M., Costarelli, L., Giacconi, R., Muti, E., Gasparini, N., Cardelli, M., Monti, D., Mariani, E., Mocchegiani, E., 2006. Polymorphisms in MT1a gene coding region are associated with longevity in Italian Central female population. *Biogerontology* 7, 357–365.
- Dardenne, M., 2002. Zinc and immune function. *Eur. J. Clin. Nutr.* 56 (Suppl. 3), S20–S23.
- Deo, R., Khera, A., McGuire, D.K., Murphy, S.A., Meo Neto Jde, P., Morrow, D.A., de Lemos, L.A., 2004. Association among plasma levels of monocyte chemoattractant protein-1, traditional cardiovascular risk factors, and subclinical atherosclerosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 44, 1812–1818.
- Fraker, P.J., King, L.E., 2004. Reprogramming of the immune system during zinc deficiency. *Annu. Rev. Nutr.* 24, 277–298.
- Franceschi, C., Bonafe, M., Valensin, S., Olivieri, F., De, L.M., Ottaviani, E., De, B.G., 2000. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 908, 244–254.
- Franceschi, C., Olivieri, F., Marchegiani, F., Cardelli, M., Cavallone, L., Capri, M., Salvioli, S., Valensin, S., De, B.G., Di, I.A., Caruso, C., Paolisso, G., Monti, D., 2005. Genes involved in immune response/inflammation, IGF1/insulin pathway and response to oxidative stress play a major role in the genetics of human longevity: the lesson of centenarians. *Mech. Ageing Dev.* 126, 351–361.
- Gerli, R., Monti, D., Bistoni, O., Mazzone, A.M., Peri, G., Cossarizza, A., Di Gioacchino, M., Cesarotti, M.E., Doni, A., Mantovani, A., Franceschi, C., Paganelli, R., 2000. Chemokines, sTNF-Rs and sCD30 serum levels in healthy aged people and centenarians. *Mech. Ageing Dev.* 121, 37–46.
- Ibs, K.H., Rink, L., 2003. Zinc-altered immune function. *J. Nutr.* 133, 1452S–1456S.
- Inadera, H., Egashira, K., Takemoto, M., Ouchi, Y., Matsushima, K., 1999. Increase in circulating levels of monocyte chemoattractant protein-1 with aging. *J. Interferon Cytokine Res.* 19, 1179–1182.
- Keen, C.L., Gershwin, M.E., 1990. Zinc deficiency and immune function. *Annu. Rev. Nutr.* 10, 415–431.
- Krabbe, K.S., Pedersen, M., Bruunsgaard, H., 2004. Inflammatory mediators in the elderly. *Exp. Gerontol.* 39, 687–699.
- Malavolta, M., Costarelli, L., Giacconi, R., Muti, E., Bernardini, G., Tesi, S., Cipriano, C., Mocchegiani, E., 2006. Single and three-color flow cytometry assay for intracellular zinc ion availability in human lymphocytes with Zinpyr-1 and double immunofluorescence: relationship with metallothioneins. *Cytometry A* 69, 1043–1053.

- Mariani, E., Cattini, L., Neri, S., Malavolta, M., Mocchegiani, E., Ravaglia, G., Facchini, A., 2006. Simultaneous evaluation of circulating chemokine and cytokine profiles in elderly subjects by multiplex technology: relationship with zinc status. *Biogerontology* 7, 449–459.
- Mariani, E., Mariani, A.R., Facchini, A., 2007. Role of chemokines and chemokine receptors in diseases of ageing. In: *Immunosenescence*, Pawelec, G. (Ed.), Landes Bioscience.
- Metz, C.H., Schroder, A.K., Overbeck, S., Kahmann, L., Plumakers, B., Rink, L., 2007. T-helper type 1 cytokine release is enhanced by in vitro zinc supplementation due to increased natural killer cells. *Nutrition* 23, 157–163.
- Mocchegiani, E., Costarelli, L., Giacconi, R., Cipriano, C., Muti, E., Tesi, S., Malavolta, M., 2006. Nutrient-gene interaction in ageing and successful ageing. A single nutrient (zinc) and some target genes related to inflammatory/immune response. *Mech. Ageing Dev.* 127, 517–525.
- Mocchegiani, E., Muzzioli, M., Giacconi, R., Cipriano, C., Gasparini, N., Franceschi, C., Gaetti, R., Cavalieri, E., Suzuki, H., 2003. 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 Dev.* 124, 459–468.
- Neri, S., Mariani, E., Meneghetti, A., Cattini, L., Facchini, A., 2001. Calcein-acetyoxymethyl cytotoxicity assay: standardization of a method allowing additional analysis on recovered effector cells and supernatants. *Clin. Diagn. Lab Immunol.* 8, 1131–1135.
- Olivieri, F., Antonicelli, R., Cardelli, M., Marchegiani, F., Cavallone, L., Mocchegiani, E., Franceschi, C., 2006. Genetic polymorphisms of inflammatory cytokines and myocardial infarction in the elderly. *Mech. Ageing Dev.* 127, 552–559.
- Olomolaiye, O., Wood, N.A., Bidwell, J.L., 1998. A novel NlaIII polymorphism in the human IL-6 promoter. *Eur. J. Immunogenet.* 25, 267.
- Prasad, A.S., 2000. Effects of zinc deficiency on Th1 and Th2 cytokine shifts. *J. Infect. Dis.* 182 (Suppl 1), S62–S68.
- Prasad, A.S., Bao, B., Beck, F.W., Kucuk, O., Sarkar, F.H., 2004. Antioxidant effect of zinc in humans. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 1182–1190.
- Ravaglia, G., Forti, P., Maioli, F., Bastagli, L., Facchini, A., Mariani, E., Savarino, L., Sassi, S., Cucinotta, D., Lenaz, G., 2000. Effect of micronutrient status on natural killer cell immune function in healthy free-living subjects aged ≥ 90 y. *Am. J. Clin. Nutr.* 71, 590–598.
- Ravaglia, G., Forti, P., Maioli, F., Chiappelli, M., Dolzani, P., Martelli, M., Bianchin, M., Mariani, E., Bolondi, L., Licastro, F., 2005. Associations of the -174 G/C interleukin-6 gene promoter polymorphism with serum interleukin 6 and mortality in the elderly. *Biogerontology* 6, 415–423.
- Richards, R.I., Heguy, A., Karin, M., 1984. Structural and functional analysis of the human metallothionein-IA gene: differential induction by metal ions and glucocorticoids. *Cell* 37, 263–272.
- Richter, M., Cantin, A.M., Beaulieu, C., Cloutier, A., Larivee, P., 2003. Zinc chelators inhibit eotaxin, RANTES, and MCP-1 production in stimulated human airway epithelium and fibroblasts. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 285, L719–L729.
- Rink, L., Cakman, I., Kirchner, H., 1998. Altered cytokine production in the elderly. *Mech. Ageing Dev.* 102, 199–209.
- Rink, L., Gabriel, P., 2000. Zinc and the immune system. *Proc. Nutr. Soc.* 59, 541–552.
- Shankar, A.H., Prasad, A.S., 1998. Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. *Am. J. Clin. Nutr.* 68, 447S–463S.
- Scheurig, A.C., Thorand, B., Fischer, B., Heier, M., Koenig, W., 2007. Association between the intake of vitamins and trace elements from supplements and C-reactive protein: results of the MONICA/KORA Augsburg study. *Eur. J. Clin. Nutr.* (Epub ahead of print).
- Terry, C.F., Loukaci, V., Green, F.R., 2000. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.* 275, 18138–18144.
- Trumbo, P., Yates, A.A., Schlicker, S., Poos, M., 2001. Dietary reference intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc. *J. Am. Diet. Assoc.* 101, 294–301.
- Vandeghinste, N., Proost, P., De, L.M., 2000. Metallothionein isoform gene expression in zinc-treated human peripheral blood lymphocytes. *Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 46, 419–433.
- Vasto, S., Candore, G., Balistreri, C.R., Caruso, M., Colonna-Romano, G., Grimaldi, M.P., Listi, F., Nuzzo, D., Lio, D., Caruso, C., 2007a. Inflammatory networks in ageing, age-related diseases and longevity. *Mech. Ageing Dev.* 128, 83–91.
- Vasto, S., Mocchegiani, E., Malavolta, M., Cuppari, I., Listi, F., Nuzzo, D., Ditta, V., Candore, G., Caruso, C., 2007b. Zinc and inflammatory/immune response in aging. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1100, 111–122.
- Wieczorowska-Tobis, K., Niemir, Z.I., Podkowka, R., Korybalska, K., Mossakowska, M., Breborowicz, A., 2006. Can an increased level of circulating IL-8 be a predictor of human longevity? *Med. Sci. Monit.* 12, CR118–CR121.



Zinc deficiency and IL-6 –174G/C polymorphism in old people from different European countries: Effect of zinc supplementation. ZINCAGE study

Eugenio Mocchegiani^{a,*}, Robertina Giacconi^a, Laura Costarelli^a, Elisa Muti^a, Catia Cipriano^a, Silvia Tesei^a, Sara Pierpaoli^a, Cinzia Giuli^b, Roberta Papa^b, Fiorella Marcellini^b, Nazzarena Gasparini^a, Romeo Pierandrei^a, Francesco Piacenza^a, Ermina Mariani^{c,d}, Daniela Monti^e, George Dedoussis^f, Stavroula Kanoni^g, Georges Herbein^g, Tamas Fulop^h, Lothar Rinkⁱ, Jolanta Jajte^j, Marco Malavolta^a

^a *Nutrigenomic and Immunosenescence Laboratory, Research Department, INRCA, Ancona, Italy*

^b *Gerontological and Psychological Center, Research Department, INRCA, Ancona, Italy*

^c *Laboratory of Immunology and Genetics, Istituto di Ricerca Codivilla Putti, IOR, Bologna, Department of Internal Medicine and Gastroenterology, University of Bologna, Italy*

^d *Department of Internal Medicine and Gastroenterology, University of Bologna, Italy*

^e *Experimental Pathology and Oncology, University of Florence, Florence, Italy*

^f *Department of Nutrition Science and Dietetics, Harokopio University of Athens, Greece*

^g *Department of Virology, Franche-Comte University, Besancon, France*

^h *Research Center on Aging, Immunology Program, Geriatric Division, University of Sherbrooke, Canada*

ⁱ *Institute of Immunology, RWTH-Aachen University Hospital, Aachen, Germany*

^j *Department of Toxicology, Faculty of Pharmacy, Medical University, Lodz, Poland*

Received 11 September 2007; received in revised form 21 November 2007; accepted 12 December 2007

Available online 15 January 2008

Abstract

IL-6 SNP at position –174 is associated with age-related diseases characterized by an impaired Zn status. This polymorphism seems also relevant in regulating the expression of proteins, such as Metallothioneins (MT), involved in the modulation of Zn homeostasis. Since high IL-6 levels in elderly induce hypozincemia, the IL-6–174 SNP may be useful to identify old subjects who are at risk for Zn deficiency. The objectives of this study are: (1) to choose old subjects who effectively need Zn supplementation and (2) to study the effect of Zn supplementation on Zn, immune and psychological status in genetically selected subjects. For this purpose, a baseline study comprising 895 healthy old subjects recruited in Central-Northern and Southern European Countries was carried out by evaluating their dietary intake, psychological and immune parameters as well as their Zn status. A Zn supplementation trial was performed in 110 old subjects selected on the basis of their plasma Zn levels and IL-6 SNP. After correcting for age and Zn intake, C– carriers displayed higher MT and lower levels of several parameters related to zinc status (plasma Zn, erythrocyte Zn and NO-induced release of Zn in PBMC) than C+ carriers. Better NK cell cytotoxicity and psychological functions (PSS, MMSE) were also found in C+ than C– carriers strictly related to the zinc status. However, independently by the polymorphism, all subjects with plasma zinc $\leq 10.5 \mu\text{M}$ showed the worst immune response and psychological functions. Supplementation was carried out in C+ and C– carriers with stable low plasma zinc levels ($\leq 10.5 \mu\text{M}$ at baseline and at 1 year follow-up) and in C– carriers with unstable plasma zinc ($\leq 10.5 \mu\text{M}$ at baseline and

Abbreviations: Zn/Alb, Plasma Zn/albumin (molar ratio); MT, Metallothionein (protein expression); RBC-Zn, Zinc in erythrocytes; $i\text{Zn}_L$, intracellular labile zinc; $i\text{Zn}_R$, intracellular NO-induced release of Zn by MT.

* Corresponding author. Tel.: +39 071 8004216; fax: +39 071 206791.

E-mail address: e.mocchegiani@inrca.it (E. Mocchegiani).

>10.5 μM at 1 year follow-up). C+ carriers with plasma zinc >10.5 μM were not supplemented because showing the best immune and psychological conditions. After 48 ± 2 days of supplementation with 10 mg/day of Zn-aspartate, the NO-induced release of Zn, erythrocyte Zn and NK cell cytotoxicity increased in all groups selected for supplementation, including C– with unstable plasma zinc. In conclusion, the sole assessment of plasma Zn level is not reliable to exclude C– carriers from Zn supplementation. A possible explanation for the conflicting data on the identification of IL-6–174G as a “risk allele” based on different dietary intake in the studied population is also suggested.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: IL-6 polymorphisms; Zinc status; Metallothioneins; Genetic screening; Ageing

1. Introduction

Elderly people are commonly considered at high nutritional risk for marginal zinc deficiency, which could contribute to the development and complications of age-related chronic diseases (Tudor et al., 2005). Normal physiological changes associated with ageing, some medications for chronic diseases, and relatively common disorders such as high blood pressure, obesity, malabsorption and diarrhoea can all contribute to the manifestations of zinc deficiency (Prasad, 1991; Das, 2001; Ozata et al., 2002; Sundaram et al., 2002).

Social and physiological factors such as loneliness, limited income, reduced interest in food, decreased sense of smell and taste, difficulty in chewing or swallowing as well as reduced vision may also contribute to worsen the overall zinc status (Ahluwalia, 2004).

However, the contribution of intrinsic genetic factors on the prevalence of zinc deficiency has been scarcely studied, especially in elderly, despite the fact that many single nucleotide polymorphisms, associated with increased risk of developing age-related diseases may affect zinc homeostasis by direct modulation of proteins involved in zinc buffering, or by an indirect pro-inflammatory cytokine mediated effect (Mocchegiani et al., 2006). In this context, interleukin-6 (IL-6) promoter gene single nucleotide polymorphism (SNP) at position –174 has been extensively studied in several age-related pathologies, such as cardiovascular diseases, Alzheimer disease and cancer (Licastro et al., 2003; Antonicelli et al., 2005; Koivisto et al., 2005; Garg et al., 2006). This seems also particularly important for modulating the intracellular zinc homeostasis, which is in turn affected by specific proteins named Metallothioneins (MT) (Maret, 2003). These proteins act as antioxidants since zinc–sulfur cluster is sensitive to changes of cellular redox state and oxidizing sites in MT (reduced thiol groups) induce the transfer of zinc from its MT binding sites to those of lower affinity in other proteins, such as antioxidant metallo-enzymes (Maret, 2000). Since IL-6 affects MT gene expression and production, the interplay between MT, IL-6 and intracellular zinc homeostasis is thus crucial during inflammation and ageing (Maret, 2000; Mocchegiani et al., 2006).

In this context, abnormal increase of IL-6 concentrations is a reliable marker for functional disability as well as a predictor for disability and mortality among elderly

people (Harris et al., 1999). Moreover, IL-6–174G/C locus variability modulates on one hand the individual susceptibility to common causes of morbidity and mortality among elderly people (Olivieri et al., 2006), and on the other hand the individual capacity to reach the extreme limits of the human life span (Bonafè et al., 2001). Therefore, the genetic variability at IL-6–174G/C locus is fundamental in the elderly population in order to better understand the intrinsic causes of the longevity. Indeed, the genetic variations of the IL-6–174G/C locus are involved in IL-6 production and in immune response. In particular, old subjects carrying GG genotypes (called C–) are disadvantaged for the longevity and are more prone to develop atherosclerosis because of the presence of higher IL-6 production, impaired NK cell cytotoxicity, increased MT gene expression and low zinc ion availability in comparison with C+ carriers (Giacconi et al., 2004). Since high IL-6 in elderly people induces abnormal increments of MT gene expression leading to low zinc ion availability (Mocchegiani et al., 2006), the determination of genetic variations of the IL-6–174G/C locus may be a useful tool for screening old subjects at risk for zinc deficiency and impaired immune response. This fact is especially pertinent considering the existence of contradictory data in the literature on the potential benefit of zinc supplementation in old people (Hininger-Favier et al., 2007; Maret and Sandstead, 2006). The discrepancies may be related to an incorrect screening of old people who effectively need zinc supplementation. Since the intracellular zinc status is also related to the nutritional status of each individual (Reddy and Love, 1999), the genetic screening of IL-6–174G/C locus may be of added value for a correct zinc supplementation in elderly subjects. On this basis, the aim of the present paper is to screen old subjects for IL-6–174G/C polymorphism from different Northern and Southern European countries with different dietary habits and to detect the differences between C+ and C– carriers in zinc status, in inflammatory/immune response and in some psychological parameters, because of a close correlation between these last parameters and zinc/immune response in elderly (Mocchegiani et al., 2005; Marcellini et al., 2006; Maylor et al., 2006). The effect of a zinc supplementation in old subjects with specific IL-6 genetic polymorphisms is reported and discussed.

2. Materials and methods

2.1. Subjects

Old subjects ($n = 895$ with the age range of 60–84 years) were recruited from five different European countries (Italy, France, Germany, Poland, Greece). The study was part of ZINCAGE Project (www.zincage.org) (Mocchegiani et al., 2004). The study design comprised two parts.

1. The first part consisted of a baseline centralized (INRCA Center) screening (genetic and zinc status parameters) performed in a sample of 895 (232 from Italy, 211 from France, 165 from Greece, 140 from Poland and 147 from Germany) healthy non-institutionalized men and women aged from 60 to 84 years (488 females and 407 males) selected on the basis of the SENIEUR protocol for immuno-gerontological studies. The participants of the study had to be free of medication such as steroids, diuretics, anticonvulsants, anti-depressive drugs, antibiotics, antimetabolites, non-steroid anti-inflammatory drugs and micronutrient supplementation. Subjects were excluded if they had autoimmune, neurodegenerative, cardiovascular, kidney or liver diseases, diabetes, infections, cancer, chronic inflammatory bowel disease or acrodermatitis enteropathica, sickle cell anaemia, chronic skin ulcerations and endocrine disorders. Medical history was recorded by the family doctor or through a medical examination when possible. Ethical approval was obtained by all centers performing the recruitment and all subjects signed an informed consent form.

2. The second part consisted of a zinc supplementation trial. Plasma zinc $\leq 10.5 \mu\text{M}$ was chosen as a cut-off for zinc deficiency, as suggested by Pepersack et al. (2001). All subjects with plasma zinc $\leq 10.5 \mu\text{M}$ at the baseline and after 1 year of follow-up were chosen for zinc supplementation and divided on the basis of IL-6 polymorphism. In particular, independently by the recruiter Center, the groups undergone zinc supplementation are: (1) Group A ($n = 38$) including C– carriers for IL-6–174 polymorphism and zinc $\leq 10.5 \mu\text{M}$; (2) Group B ($n = 32$) including C+ carriers for IL-6–174 polymorphism and zinc $\leq 10.5 \mu\text{M}$. (3) Group C ($n = 40$) including C– carriers with unstable plasma zinc ($\leq 10.5 \mu\text{M}$ at the baseline and $> 10.5 \mu\text{M}$ after one year of follow-up). For this reason, the number of old subjects undergoing to zinc supplementation is limited ($n = 110$) compared to the original recruitment number. This is in agreement with the fact that old subjects with a clear zinc deficiency are not more than 5–10% of the general European elderly population (Maylor et al., 2006). The effect of zinc supplementation was therefore evaluated in 110 old subjects (57 males and 53 females), aged 65–85 years (mean age 72 ± 6 years). The old volunteers selected for zinc supplementation were grouped together independently of their European country of origin as the selection of subjects was based on centralized biological and genetic parameters (INRCA Center). Zinc supplementation was performed with 10 mg/day of zinc-aspartate (Unizink 50,

KÖHLER PHARMA Corp., Alsbach-Hähnlein, Germany) in Italy, Germany, France and Greece. In Poland zinc supplementation was carried out with 10 mg/day of an identical form of zinc-aspartate (Zincas, Zakład Chemiczno-Farmaceutyczny FARMAPOL, Poznań, Poland) approved by the respective local Health Authorities. The supplementation period was 48 ± 2 days. PBMC were collected before and after supplementation according to the above the protocols.

2.2. PBMC recovery and storage

Individual blood samples were drawn in a plastic syringe containing heparin. The whole blood was collected and centrifuged at 450g for 10 min at 4 °C to separate plasma. The remaining blood was diluted 1:3 with phosphate buffered saline ($1 \times \text{PBS}$), pH 7.4, without Mg^{++} and Ca^{++} . Granulocytes were purified from red blood cells through sedimentation with 8–10% HAES (final concentration) and the remaining cells were carefully stratified with a pipette on the top of a Ficoll-Hypaque solution ($d = 1077 \text{ g/ml}$) at room temperature, in a 15 ml centrifuge tube. The solution was centrifuged at 450g for 30 min at 20 °C. The peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were recovered and washed two times with PBS. The cell pellet was recovered, cells counted and centrifuged (450g for 10 min) in 5 ml of PBS, and the tube was left on ice for 10–20 min. The supernatant was removed and cells resuspended at room temperature in Fetal Calf Serum containing 5% of sterile DMSO. After 5 min, further DMSO was added to reach a final concentration of 10%. Immediately after, lymphocytes were placed in freezer at -80 °C within a 1 °C freezing container (Nalgene) and left overnight before placing them in liquid nitrogen.

2.3. Dietary assessment (assessment of dietary zinc intake)

For the basal screening, a qualitative food frequency questionnaire, designed for the needs of ZINCAGE, was used for assessment of the dietary zinc intake (Marcellini et al., 2006). The consumption of 53 different food items was recorded and based on these data we determined a “zinc score” for each volunteer. To provide a continuous variable, representing zinc dietary habits, frequency, quantity estimation and zinc content of foods consumed were all considered for the “zinc score” calculation.

Individual food consumption was calculated as frequency (1 for never or less than 1 time/month, 2 for occasionally, 3 for sometimes and 4 for consumption every day) multiplied by quantity (0 for no consumption, 1 for small, 2 for medium and 3 for abundant). Taking into account the large variations of zinc content in foods, even within food groups, all food items were considered separately. European National and USDA food composition tables were used to define zinc content for all 53 food items included in the food frequency questionnaire. Consumption of each food was then multiplied by the correspondent zinc con-

tent. A “zinc score” was calculated for each old volunteer as the sum of all estimated zinc intakes derived from all listed food items. The general formula used for zinc score calculation was: Zinc score = Frequency $\times$ Quantity $\times$ Zinc content. The calculation of the zinc score provided with a continuous variable as a comparative estimate of dietary zinc intakes among recruited old subjects. Three 24 h recalls were collected from each participant chosen for the supplementation trial. Dietary data were assessed using the Nutritionist Pro software (Axxya Systems) and published national food composition tables, for the estimation of mean daily dietary zinc intake.

2.4. Determination of zinc status

2.4.1. Zinc in plasma and erythrocytes

Plasma and erythrocyte zinc were determined by a Thermo XII Series ICP-MS (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA) as previously described (Cipriano et al., 2006). Plasma samples were diluted 1:10, and erythrocytes were diluted 1:26, respectively, with a diluent containing 0.1% triton and 0.15% HNO₃, to ensure that trace elements are maintained in solution and to favor the washout of these elements between samples. External multielement calibration solutions containing Zn (blank to 2000 ppb) were prepared by serial dilution of a parent multi-element solution (VHG Labs, Manchester, USA), using the same diluent used for the samples. Rhodium (Rh), at 200 ng/ml was used as internal standard. Data were acquired for ⁶⁶Zn. The instrument was operated with a Peltier cooled impact bead spray chamber, single piece quartz torch (1.5 mm i.d. injector) together with Xi interface cones and a Cetac-ASX 100 autosampler (CETAC Technologies, Omaha, Nebraska, USA). A Burgener Trace nebuliser was used as this device does not block during aspiration of clinical samples. The instrument was operated in standard mode (non-CCT), using 1400 W RF power, 1.10 L min⁻¹ nebuliser gas flow, 0.70 L min⁻¹ auxiliary gas flow, 13.0 L min⁻¹ cool gas flow, 70 ms dwell time, 30 s sample uptake 35 s wash time (2 repeats per sample). The level of albumin was obtained by routine blood analysis.

2.4.2. Metallothioneins determination by flow cytometry

Thawed PBMC (2×10^5) were treated with 0.3% paraformaldehyde and stored at 4 °C for 2 days before processing. MT determination was performed as previously reported by Yurkow and Makhijani (1998) using the monoclonal mouse anti-horse Metallothionein clone E9 antibody (Dakocytomation, Denmark). Samples probed with an irrelevant (isotypic) antibody (clone MOPC21, IgG1k, Sigma–Aldrich, MI, Italy) in conjunction with the fluorescein-conjugated secondary antibody served as staining controls. The fluorescence intensity obtained with the isotypic antibody was subtracted to all data. Results are expressed as mean fluorescence intensity (MFI) (Malavolta et al., 2006).

2.4.3. Flow cytometric analysis of intracellular zinc ion availability and zinc release by MT

“Zinc free” RPMI medium was obtained by treatment of RPMI with 5% Chelex 100 (Sigma–Aldrich, MI, Italia). Thawed PBMC were divided into two equal aliquots of 2×10^5 cells, at least. One aliquot was incubated with 20 μ M Zinpyr-1 (ZP-1) (Neurobiotex, Galveston, Texas, USA) for 30' at 37 °C, 5% CO₂ in Hepes buffered “zinc free” RPMI medium containing 1 mM EDTA, as extra-cellular chelator, of free zinc eventually still present in the medium and/or adsorbed to the cell membrane.

The second aliquot was always incubated in the same conditions plus 50 μ M *N,N,N'*-tetrakis (2-pyridylmethyl) ethylenediamine (TPEN) (Sigma–Aldrich, Milan, Italy), in order to detect the autofluorescence of the zinc-free ZP-1 probe (Burdette et al., 2001).

After incubation, the aliquots were immediately analysed by flow cytometry (Coulter Epics XL). After selecting lymphocyte population according to the forward light and side scatters, the Mean Fluorescence Intensity for ZP-1 was detected (excitation wavelength 488 nm and detection at 525 ± 15) in the two aliquots. Data were reported as the ratio of ZP-1 fluorescence/ZP-1 autofluorescence and represented the intracellular labile Zn (iZn_L) (Malavolta et al., 2006).

To investigate the NO-induced release of Zn, another aliquot was incubated with 20 μ M ZP-1 plus 100 μ M dye-thilamine NOnoate acetoxymethylated (AcOM DEA/NO) (Calbiochem, VWR International s.r.l., MI, Italy) (Misra et al., 1996). In fact, AcOM-DEA/NO is a cell-permeable acetoxymethylated diazeniumdiolate compound that donates NO “intracellularly” following the action of intracellular esterases (Saavedra et al., 2000). Once the incubation period was terminated, all aliquots were immediately read by the Flow Cytometer. The difference between iZn_L in presence and absence of NO-donor was used to estimate the intracellular release of Zn (iZn_R), as previously reported (Malavolta et al., 2006).

2.5. Genotyping

DNA was extracted from blood lymphocytes by phenol chloroform according to standard procedures. Amplification of the -174C/G locus was performed, as previously described (Olomolaiye et al., 1998).

2.6. NK cell cytotoxicity

Lytic activity of cryopreserved PBMC was determined against K562 target cells as previously described (Neri et al., 2001). The evaluation was obtained at 12/1 Effector/Target (E/T) cell ratios. The assessment was performed in a subgroup of 96 samples due to high number of cells required for this assessment (5×10^6 cells/ml) and the necessity to distribute the cell samples to all ZINCAGE Partners. It is of note, that this number is representative of the original entire population because the distribution

of the IL-6 genotypes as well as for gender is similar in these 96 samples and in the original entire sample (data not shown).

2.7. Multiple immunoassay for chemokine and cytokine plasma profiles

Fourfold diluted plasma samples were assayed in duplicate using commercially available multiplex bead-based immunoassay kits. IL-6, IL-8, TNF- α , MCP-1, and RANTES concentrations were simultaneously evaluated using multiplex reagent kits (Bio-Rad Laboratories, USA) as previously described (Mariani et al., 2006).

Pre-mixed distinct dyed beads, loaded with specific capture antibodies, were incubated with plasma samples and subsequently with fluorescently labelled detection antibodies. The entire testing procedure was performed using 96-well plates, and the formation of different sandwich immunocomplexes on distinct bead sets was measured and quantified using the Bio-Plex Protein Array System (Bio-Rad Laboratories, USA). The low standard curves were used for IL-6, IL-8, TNF- α , and MCP-1 (ranging from 3952.5 to 0.24 pg/ml; from 3159.2 to 0.19 pg/ml; from 12,685.9 to 0.777 pg/ml, and from 2280.2 to 0.14 pg/ml, respectively) and the high standard curve for RANTES (ranging from 22,134 to 1.4 pg/ml).

Values presenting a coefficient of variation beyond 10% were discarded before the final data analysis. Data were analysed using the Bio-Plex Manager software version 3.0 (Bio-Rad Laboratories, USA). Values were expressed as pg or ng/ml.

2.8. Psychological parameters

For the assessment of cognitive status, the “Mini Mental State Examination” (MMSE), (Folstein et al., 1975) was used. It assesses many components of cognitive function. Score range is from 0 to 30 points: a score of 23 (the cut off value) or lower is suggestive for cognitive decline. Scores of 24–30 indicate no cognitive impairment; 18–23 indicate mild cognitive impairment whereas 0–17 indicates severe cognitive impairment. Depressive symptoms were measured using the “Geriatric Depression Scale” [GDS-reduced version of 15 items (Yesavage et al., 1983; Sheikh and Yesavage, 1986)], which identifies depressive symptoms in older adults using some questions related to the previous week. It represents a reliable and valid self-rating depression screening scale for elderly populations (Osborn et al., 2002). Score range is from 0 to 15. A score of 0–4 indicates a normal situation, a score of 5–9 indicates mild depression and a score of 10–15 indicates moderate to severe depression.

The perception of stress was measured by the Perceived Stress Scale (PSS) questionnaires (Cohen et al., 1983). It is a measure of the degree to which situations in one's life are appraised as stressful. It is a 14-items questionnaire, asking how often a person has felt or thought a certain way over

the last month. The score above mean indicates high stress level.

2.9. Statistical analysis

Statistical analysis was performed with SPSS edition 11.5. (SPSS Inc. Chicago, IL, USA). Continuous variables are presented as mean values $\pm$ standard deviation (SD). The normal distribution of the investigated variables was assessed through the Kolmogorov–Smirnov criterion. Due to skewed distribution, log transformed values of Zn score, plasma zinc, zinc/albumin (molar ratio), RBC zinc, GDS, PSS and MMSE were used for calculating partial correlation coefficients after controlling for age. Student's *t* test, Wilcoxon Rank test (for paired not normally distributed variables), Mann–Whitney *U* test (for unpaired not normally distributed variables), analyses of variance (ANOVA) and analyses of covariance were used to compare the variables among subgroups of the sample. IL-6 –174G/C genotype distribution and differences in allele distribution from Hardy–Weinberg's equilibrium in the studied population was evaluated by Pearson's χ^2 test. All reported *p* values are based on two-sided tests and were compared with a significance level of 5%.

3. Results

3.1. Genotype distribution in the participating European countries

Table 1 shows the genotype distribution for IL-6 –174 polymorphism in the five European recruiting centres. Large differences appear in its distribution comparing the Southern and the Central-Northern European centres ($\chi^2 = 128.141$, *df* = 8, *p* < 0.001). In particular, homozygotes for G allele (C– carriers) are more represented in Italy and Greece (about 68%) than in Poland (about 20%), France (about 40%) and Germany (about 34%). In contrast, CC homozygotes are more represented in Poland (about 22.7%) and quite rare in Greece (about 1%) when compared to the other European Countries.

Table 1
IL-6 –174G/C genotype distribution in the European Centres

	Italy (%)	Poland (%)	Germany (%)	Greece (%)	France (%)
<i>Genotype</i>					
CC	5.3	22.7	13.1	1.2	15.3
GC	26.5	57.4	53.1	31.1	44.6
GG	68.1	19.9	33.8	67.7	40.1

All populations were in Hardy–Weinberg's equilibrium (*p* > 0.05). A significant different distribution of IL-6 –174 genotype was observed among the European centres ($\chi^2 = 128.141$, *df* = 8, *p* < 0.001). A significant increment of GG genotype was observed in Greece and Italy when compared to France, Germany and Poland.

3.2. Zinc status, Metallothioneins, immune parameters and psychological conditions in old subjects from different European countries at the baseline of the recruitment in dependence of the zinc score

Taking into account that Greek and Italian populations display a different genotype distribution than French, German and Polish ones (Table 1), the sample was split into Southern (Italy and Greece) and North-Central (France, Germany and Poland) European populations.

Table 2 shows the subdivision of the old subjects on the basis of the zinc score, herein considered and calculated as an estimate of their daily dietary intake of zinc. Taking into account that the median value of zinc score in the whole sample is 134 at baseline, old subjects are divided into two groups (zinc score ≤ 134 and zinc score > 134).

In general, zinc status (plasma zinc, Zn/Alb, RBC-Zn, MT, iZn_R), immune and psychological parameters display a better condition in both Northern and Southern European populations in presence of higher zinc score. This condition is more evident in France, Poland and Germany, whereas in Italy and Greece, this condition is less evident with some unexpected data related to pro-inflammatory cytokines (IL-6 and TNF-alpha) and chemokines (Rantes) (Table 2).

In the whole sample, Zn score is significantly correlated with plasma Zn, Zn/Alb, and RBC-Zn after controlling for age (partial correlation coefficient are $r = 0.254$ ($p < 0.001$), $r = 0.246$ ($p < 0.001$) and $r = 0.358$ ($p < 0.001$), respec-

tively). A positive correlation was also found between iZn_R or MT and zinc score (partial correlation coefficients are: $r = 0.154$ ($p = 0.043$) and $r = 0.136$ ($p = 0.046$), respectively).

An opposite trend is instead found between Zn score and iZn_L. A quadratic regression model was the best fit ($b_0 = 1.3795$, $b_1 = -0.0011$, $b_2 = 1.9E-06$; $R^2 = 0.031$; $p < 0.006$) between Zn score and iZn_L, suggesting that this last parameter alone is not properly reliable for evaluating the nutritional zinc status because it can be up-regulated in the presence of either a low or a high dietary intake of zinc.

3.3. Zinc status, Metallothioneins, immune parameters and psychological conditions in old subjects at the baseline of the recruitment in dependence of the IL-6 -174G/C polymorphism

No differences exist in the zinc score between C+ and C- old subjects (167 ± 108 vs. 170 ± 102) (Table 3), suggesting that this subdivision for IL-6 polymorphism for the zinc status and immune parameters is not impugned by different dietary intakes of zinc. Following this subdivision, C- old subjects display some alterations related to the zinc status when compared to C+ subjects including: significant lower plasma zinc; higher MT production; less RBC-zinc; lower iZn_R; impaired NK cell cytotoxicity. By contrast, some crucial cytokines and chemokines related to the inflammatory status (IL-6, TNF-alpha, MCP-1, MIP-1 α) are quite similar between C- and C+ subjects

Table 2
Zinc status, immune parameters and psychological parameters in different European Countries in dependence of the zinc score

Parameters	Zinc score							
	Italy and Greece				Germany, Poland and France			
	≤ 134		> 134		≤ 134		> 134	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Zn Score	100	20	178 [§]	39	91	25	268	124
Plasma Zn (μ M)	11.5 [§]	1.8	11.7 [§]	1.7	12.6	2.2	13.6*	2.3
Zn/Alb	0.40 [§]	.07	0.46*	.09	0.45	.07	0.47*	.08
MT (MFI)	62.6	23.9	72.1*	28.3	65.6	34.6	75.0	26.0
RBC Zn (μ M)	79	37	109* [§]	38	127	44	173*	76
iZn _L	1.31	.21	1.24	.13	1.31	.20	1.25	.16
iZn _R	0.18	.08	0.21*	.08	0.20	.07	0.22	.09
NK activity ^a	19.1	8.7	19.7	10.1	17.4	7.9	23.1*	11.1
IL6 (pg/ml)	14.7 [§]	6.1	19.1* [§]	8.5	21.4	9.4	21.7	9.3
IL8 (pg/ml)	8.8 [§]	4.3	8.3 [§]	4.3	11.9	5.9	9.6*	5.3
MCP-1 (pg/ml)	93.3 [§]	36.2	89.1 [§]	39.6	120.6	45.9	115.7	44.3
MIP-1 α (pg/ml)	18.1 [§]	9.0	15.0* [§]	8.9	21.1	10.8	20.9	10.5
TNF- α (pg/ml)	61.3 [§]	28.3	68.5* [§]	38.4	82.1	44.5	102.9*	40.7
Rantes (ng/ml)	7.2 [§]	6.5	10.0* [§]	8.9	15.4	10.0	19.1*	14.4
GDS	4.0 [§]	3.5	3.3* [§]	2.6	3.1	3.2	2.0*	2.4
PSS	23.5 [§]	7.6	16.4* [§]	8.3	17.4	8.1	14.7*	6.6
MMSE	24.5 [§]	5.6	25.4 [§]	3.3	25.8	3.0	28.3*	1.9

Zn/Alb = plasma Zn/albumin (molar ratio), MT = Metallothionein (protein expression), RBC Zn = zinc in erythrocytes, iZn_L = intracellular labile zinc, iZn_R = intracellular NO-induced release of Zn.

* $p < 0.05$ at least, when compared to zinc score < 134 . Statistical analysis was performed by Student's t test for normally distributed variables and by Mann-Whitney U test for not normally distributed variables.

§ $p < 0.05$ at least, when compared to "Germany, Poland and Greece" within the same Zn score group.

^a Assessment performed in a subgroup of 96 samples.

Table 3

Zinc status, immune and psychological parameters in carriers of different alleles for IL-6 –174G/C polymorphism

Parameters	–174G/C IL6 carriers		C+	
	C–		C+	
	Adjusted Mean	SD	Adjusted Mean	SD
Zn score	170	102	167	108
Plasma Zn (μM)	12.3*	2.1	12.7	2.3
Zn/Alb	0.44 ^a	.083	0.45	.079
MT (MFI)	71.4*	28.4	62.1	22.3
RBC Zn (μM)	117*	57	136	67
iZn _L	1.27	.15	1.28	.18
iZn _R	0.19 ^b	.07	0.21	.08
MT/iZn _R	431*	250	337	176
NK activity	18.9*	8.0	24.4	9.9
IL6 (pg/ml)	19.5	9.2	19.5	8.6
IL8 (pg/ml)	9.2	4.8	10.2*	5.5
MCP-1 (pg/ml)	103.6	44.0	106.9	44.1
MIP-1α (pg/ml)	19.6	9.9	18.4	10.6
TNF-α (pg/ml)	80.8	40.1	80.7	44.0
Rantes (ng/ml)	11.7	10.6	15.2*	12.1
GDS	3.0	3.0	2.9	3.0
PSS	18.0 ^c	8.1	17.1	8.1
MMSE	25.7	4.4	26.3*	3.4

Zn/Alb = plasma Zn/albumin (molar ratio), MT = Metallothionein (protein expression), RBC Zn = zinc in erythrocytes, iZn_L = intracellular labile zinc, iZn_R = intracellular NO-induced release of Zn.

* $p < 0.05$ by univariate analysis with age and Zn score as covariate. Log transformed values were used to calculate significance for not normally distributed variables.

^a $p = 0.08$.

^b $p = 0.1$.

^c $p = 0.9$.

(Table 3). Of interest, despite the increase of MT in C– carriers, the MT/iZn_R ratio is higher, possibly reflecting a reduced capability to release zinc in these subjects. After controlling for age, a significant correlation is found between MT and iZn_R in C+ subjects (Partial Correlation coefficient $r = 0.339$, $p = 0.011$), whereas in C– subjects

only a trend towards a positive correlation exists (partial correlation coefficient $r = 0.169$, $p = 0.084$).

With respect to the psychological conditions, GDS and PSS are slightly, but not significantly, higher in C– subjects in comparison to C+ ones, whereas MMSE is significantly higher in C+ subjects when compared to C– ones (Table 3). Of interest, GDS and PSS are positively correlated with MT/iZn_R while negatively correlated with plasma zinc (Table 4), whereas MMSE score was negatively correlated with MT/iZn_R and positively correlated with plasma zinc. PSS is also negatively correlated with iZn_R (Table 4). However, when C– and C+ subjects are considered separately, it emerges that only the PSS score in C– subjects remains significantly correlated with all the three parameters related to the zinc status (Table 4), suggesting the existence of an interrelationship among IL-6 polymorphism, zinc status and psychological stress.

When C+ and C– carriers are subdivided on the basis of their plasma zinc, it emerges that only C+ carriers with plasma zinc $>10.5 \mu\text{M}$ display satisfactory zinc status, immune and psychological functions (Table 5). All subjects with plasma zinc $\leq 10.5 \mu\text{M}$, independently by IL-6 polymorphism, show the worst NK cell cytotoxicity and psychological functions. However, also C– subjects with plasma zinc $>10.5 \mu\text{M}$ display lower NK cell cytotoxicity and RBC-Zn as well as higher MT/iZn_R than C+ carriers (Table 5).

Therefore, the simple assessment of plasma zinc seems not enough to exclude C– carriers from a supplementation trial. It is also relevant to note that the majority of C– carriers with plasma zinc $\leq 10.5 \mu\text{M}$ (77%) is present in Italy and Greece. By contrast, C+ carriers with plasma zinc deficiency ($\leq 10.5 \mu\text{M}$) are equally distributed (50%) between Central-Northern and Southern European Countries. The differences in zinc status (plasma zinc, iZn_L and iZn_R) observed between C– and C+ carriers within the experimental groups are gender independent (data not shown).

Table 4

Correlations between psychological conditions and Zn status in relationship to IL-6 –174G/C polymorphism

	Log MT/iZn _R		iZn _R		Log plasma Zn	
	Coefficient ^a	Sig.	Coefficient ^a	Sig.	Coefficient ^a	Sig.
Whole sample						
Log GDS	0.197*	0.026	–0.143	0.096	–0.128*	0.001
Log PSS	0.225*	0.004	–0.248*	0.001	–0.090*	0.008
Log MMSE	–0.239*	0.003	0.107	0.184	0.168*	0.000
C–						
Log GDS	0.122	0.271	–0.222	0.040	–0.090	0.105
Log PSS	0.197*	0.048	–0.230*	0.017	–0.129*	0.010
Log MMSE	–0.252*	0.012	0.126	0.202	0.096	0.073
C+						
Log GDS	0.274	0.076	–0.034	0.821	–0.1522*	0.005
Log PSS	0.146	0.282	–0.234	0.072	–0.0621	0.193
Log MMSE	–0.104	0.489	0.005	0.973	0.243*	0.000

MT = Metallothionein (protein expression); iZn_R = intracellular NO-induced release of Zn.

* Correlation is significant at least at 0.05 level.

^a Partial correlation coefficients were computed after controlling for age.

Table 5
Influence of plasma zinc and IL-6 –174G/C polymorphism on zinc status, immune function and psychological parameters

Parameters	Plasma zinc							
	≤10.5 μM				>10.5 μM			
	IL-6 –174 carriers				IL-6 –174 carriers			
	C–		C+		C–		C+	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Plasma Zn (μM)	9.5	.9	9.5	.9	12.9**	1.8	13.2**	2.0
Zn/Alb	.35	.05	.35	.04	.46**	.07	.47**	.07
RBC Zn (μM)	106	51	109	38	120	58	142** ^a	70
MT (MFI)	77.8	25.3	62.0	20.6	69.3	29.0	63.7	25.7
iZn _L	1.23	.11	1.28	.23	1.28	.16	1.28	.19
iZn _R	.19	.07	.18	.09	.19	.07	.22	.08
MT/iZn _R	483	224	451	240	415	259	307 ^{b,c}	139
NK activity	17.5	8.3	13.6	7.5	19.1	9.7	25.1 ^{*,c}	11.2
IL6 (pg/ml)	19.2	9.5	18.5	9.5	19.6	9.2	19.7	8.4
IL8 (pg/ml)	9.8	5.3	10.0	4.9	9.0	4.7	10.1	5.6
MCP-1 (pg/ml)	96.7	45.6	99.9	48.1	105.3	43.5	108.3	43.2
MIP-1α (pg/ml)	19.3	9.8	15.5	10.4	21.5	19.4	23.5 ^d	26.2
TNF-α (pg/ml)	72.9	42.6	58.7	40.8	82.7**	39.3	85.2**	43.3
Rantes (ng/ml)	9.7	8.9	10.9	6.0	12.3	10.9	15.8 ^{c, b}	12.9
GDS	3.4	3.2	3.2	2.7	2.9	2.9	2.8	3.0
PSS	19.2	8.9	17.4	8.5	17.5	7.9	17.1	8.0
MMSE	24.6	4.6	24.4	4.5	26.0*	4.3	26.6*	3.0

Zn/Alb = plasma Zn/albumin (molar ratio), MT = Metallothionein (protein expression), RBC Zn = zinc in erythrocytes, iZn_L = intracellular labile zinc, iZn_R = intracellular NO-induced release of Zn. Significance was tested by ANOVA with Tukey's post-hoc comparison. Log transformed values were used for testing significance of variables not normally distributed.

* $p < 0.05$ with respect to C– and C+ carriers with plasma zinc ≤10.5.

** $p < 0.001$ with respect to C– and C+ carriers with plasma zinc ≤10.5.

^a $p < 0.001$ with respect to C– with plasma zinc >10.5.

^b $p < 0.05$ with respect to C– with plasma zinc ≤10.5.

^c $p < 0.05$ with respect to C– with plasma zinc >10.5.

^d $p < 0.05$ with respect to C+ with plasma zinc ≤10.5.

3.4. Effect of zinc supplementation in selected old people on the basis of IL-6 –174G/C polymorphism

The groups chosen for zinc supplementation are Groups A, B, C, as reported in Section 2, and divided in Before Supplementation (BS) and Post Supplementation (PS).

Table 6 shows the effect of zinc supplementation in the experimental groups cited above. The subdivision in groups A, B and C allows the evaluation of the effect of zinc supplementation in relationship to the genetic polymorphism of IL-6 and zinc status. Since there are no differences in dietary intake within the old subjects chosen for zinc supplementation, a bias due to different zinc intake is excluded (Table 6). All groups display a mean dietary intake of zinc (7.74, 8.56, and 8.62, respectively) that is well below the RDI (10–11 mg/day) (Food and Nutrition Board and Institute of Medicine, 2000). After 48 ± 2 days of zinc supplementation, an increment in the main following parameters is observed in all groups considered. These are: (a) RBC-Zn; (b) iZn_R; (c) NK cell cytotoxicity. For psychological parameters, a general trend to decrease is observed for GDS and PSS scores, and to increase for MMSE score (Table 6).

Zinc supplementation induces also a general increment of pro-inflammatory cytokines and chemokines in all experimental groups (Table 6). Moreover, it is noteworthy

that the values of some immune-psychological parameters after zinc supplementation in Groups A, B and C reach those ones present in C+ carriers with normal plasma zinc (>10.5 μM) (see Tables 5 and 6).

4. Discussion

Taking into account the association of IL-6 –174G/C polymorphism with some age-related disease and even with longevity (Antonicelli et al., 2005; Ravaglia et al., 2005; Bonafè et al., 2001), it is interesting to note a great difference in the genotype distribution between Central-Northern and Southern European Countries, with an increased frequency of GG genotypes (called C–) in Italy and Greece (Table 1). It has been reported that C– carriers seem more predisposed to develop type 2 diabetes (Libra et al., 2006), cardiovascular diseases (Olivieri et al., 2006) and obesity (Dedoussis et al., 2004), that are in turn associated with an altered zinc status (Fabris and Mocchegiani, 1995). However, it is of interest that different dietary habits exist between Northern and Southern Europe, largely due to a major consumption of characteristic foods of the Mediterranean Area (Southern Europe) (fish and vegetables) in contrast to those ones of Northern Europe (meat and soft cheese) (Bamia et al., 2005). The zinc content is different in these foods (USDA, 1976). This fact reflects the zinc score

Table 6
Effect of zinc supplementation on zinc status, immune and psychological parameters

	Groups											
	A(BS) ^a		A(PS) ^a		B(BS) ^a		B(PS) ^a		C(BS) ^a		C(PS) ^a	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Age (y)	74	7	–	–	71	7	–	–	71	6	–	–
Dietary intake of zinc (mg/day)	7.74	3.68	–	–	8.56	2.51	–	–	8.62	4.4	–	–
Plasma Zn (μM)	9.0	1.4	10.2*	1.8	8.7	1.5	10.5*	1.9	12.3	1.6	11.8	1.7
Zn/Alb	.34	.06	.38*	.07	.32	.05	.39*	.06	.45	.04	.45	.06
MT (MFI)	104	45	98	42	114	39	113	34	92	43	90	47
RBC Zn (μM)	80.1	28.2	112.6*	53.7	78.3	22.8	105.1*	33.5	77.7	31.9	118.1*	64.6
iZn _L	1.25	.10	1.31*	.11	1.27	.07	1.34*	.13	1.29	.13	1.33	.09
iZn _R	.18	.08	.23*	.10	.18	.05	.22*	.09	.17	.04	.24*	.09
MT/iZn _R	583	361	398*	159	541	221	485	303	672	344	506	358
NK activity	17.7	6.5	24.9*	4.5	9.8	7.9	15.0*	8.8	15.9	8.1	20.7*	11.9
IL6 (pg/ml)	26.7	17.2	37.6*	7.9	29.4	16.7	41.2*	7.3	19.1	16.2	38.8*	7.8
IL8 (pg/ml)	15.4	4.5	16.8	5.4	13.1	4.9	19.8*	6.0	12.6	5.5	17.6*	5.6
MCP-1 (pg/ml)	112.3	39.7	110.7	45.2	109.8	46.7	111.6	47.7	120.6	50.2	109.4	24.9
MIP-1α (pg/ml)	27.1	30.6	18.1	5.7	16.4	11.2	20.2	5.7	16.4	17.3	16.7	5.7
TNF-α(pg/ml)	64.6	41.2	62.2	15.1	69.8	43.3	67.6	17.2	53.7	51.0	64.5	11.9
Rantes (ng/ml)	11.3	6.4	9.4	4.8	12.8	6.1	11.5	5.1	10.2	7.0	11.5	5.1
GDS	2.8	2.8	2.5	2.5	3.7	3.2	2.7	2.3	2.3	2.3	2.0	2.2
PSS	17.5	7.5	14.8	7.8	14.1	6.1	13.0	6.7	18.5	8.6	17.3	7.6
MMSE	25.4	2.4	26.4	2.3	23.8	4.6	24.8	3.7	25.6	2.7	26.9*	2.2

The old subjects selected for zinc supplementation are:

Group A includes 38 old subjects.

Group B includes 32 old subjects.

Group C includes 40 old subjects.

The dietary intake of zinc was evaluated by the 24 h recall before zinc supplementation (see material and methods for details).

Zn/Alb = plasma Zn/albumin (molar ratio), MT = Metallothionein (protein expression), RBC Zn = zinc in erythrocytes, iZn_L = intracellular labile zinc, iZn_R = intracellular NO-induced release of Zn.

* $p < 0.05$, at least, with respect to the same group before supplementation by Student's t test for normally distributed variables and by Wilcoxon Rank test for not normally distributed variables.

^a BS = before supplementation; PS = post-supplementation.

that is obviously higher in presence of a dietary intake of foods rich of zinc. However, in presence of zinc score ≤ 134 (Table 2), plasma zinc, immune and psychological parameters are lower in Italy and Greece, suggesting a possible functional role of IL-6 –174G allele. This role is herein confirmed by univariate analysis correcting for two confounding factors (age and zinc score) (Table 3).

In addition, although both C+ and C– carriers with low plasma zinc levels display a generally impaired zinc status as well as innate immune response and psychological parameters, also C– carriers with satisfactory plasma zinc show ambiguity regarding to some parameters related to the zinc status (i. e. iZn_R and RBC-Zn) and immune response. With regard to the inflammatory profile, in agreement with other papers in which IL-6 plasma levels are more different between C+ and C– subjects in very old age than in old age (Bonafè et al., 2001), no differences exist between old C+ and C– carriers (Table 3). This fact means that on one hand our old subjects were in good health at the time of the recruitment and that on the other hand they follow the concept of “inflamm-aging”, in which the beneficial effects of inflammation devoted to the neutralization of dangerous/harmful agents in adulthood become detrimental later in life following the antagonistic pleiotropy theory of ageing (Franceschi et al., 2000).

Moreover, these findings are very important because they suggest that the determination of the plasma zinc alone is not enough to test zinc deficiency in elderly, especially in establishing a possible zinc supplementation. Only C+ carriers may be eventually supplemented with zinc considering only plasma zinc. Conversely, for C– carriers, the sole determination of plasma zinc is not enough to detect zinc deficiency and the consequent zinc supplementation. Such findings are also of importance because there are considerable evidences to show that an excess of dietary zinc associated with the addition of exogenous zinc may be dangerous (Fosmire, 1990; Sandstead, 1995; Shankar and Prasad, 1998). On the other hand, *in vitro* studies suggest that high doses of zinc are pro-apoptotic in immune cells, while physiological doses are protective both *in vivo* and *in vitro* models (Fraker and Lill-Elghanian, 2004). Indeed, a physiological dose of zinc increases INF- γ and decreases the production of pro-inflammatory cytokines (Cakman et al., 1997) with thus a role to keep the inflammation under control (Mocchegiani et al., 1998). Moreover, zinc has also a specific effect on innate immune response (Rink and Gabriel, 2000; Mocchegiani and Malavolta, 2004). Therefore, an adequate zinc status is crucial in elderly taking also into account that zinc deficiency in elderly is also due to intestinal malabsorption and use of certain drugs

(Maret and Sandstead, 2006). Moreover, an old person is a frail individual with a high risk to contract infections, cancer and cardiovascular diseases: all pathologies linked to a zinc deficiency (Fabris and Mocchegiani, 1995). Following these characteristics, some papers report the effect of zinc on nutritional/immune parameters in healthy old people in order to prevent some age-related diseases, with however contradictory data. Some authors report a beneficial effect of physiological zinc supplementation in ageing with restoration of the immune response (Prasad et al., 1993; Boukaïba et al., 1993; Fortes et al., 1998); other authors report in contrast no beneficial effect or even a toxic effect of zinc on the immune response (Bogden et al., 1990). These contradictory data might be due either to the zinc dose used or to the length of the treatment (Mocchegiani et al., 1998). However, from the findings of the present study, the cause might be instead due to an incorrect choice of old subjects who effectively need zinc supplementation. The genetic screening for IL-6 polymorphism associated with the zinc status and dietary habits are useful tools for the choice of people to be supplemented with zinc. Indeed, old C– subjects from all considered European Countries are more predisposed to zinc deficiency and consequently represent the best candidate for zinc supplementation. By contrast, C+ carriers are more prone to reach longevity (Bonafè et al., 2001) even though conflicting data for C+ carriers are reported from Northern European population (Sie et al., 2006; Hurme et al., 2005). A possible explanation to these conflicting data may be due to the different intake of zinc between Northern and Southern Europe. In other words, the C– allele in the papers of Sie et al. (2006) and Hurme et al. (2005) might not be any more the “risk allele” due to higher zinc intake in Northern Europe.

Anyway, IL-6 genetic screening associated to a dietary assessment or to a comprehensive evaluation of zinc status seems the best strategy to identify old subjects who effectively need zinc supplementation without risks. As a proof, the supplementation trial herein reported, other than improving NK cell activity and positively affecting psychosocial parameters, was safe in all subjects. Taking into account that these results were observed also in C– carriers with unstable plasma zinc, it could be suggested that this parameter alone is not a reliable test to detect the real zinc status, as already suggested in Down's syndrome subjects (Fabris et al., 1984).

These beneficial effects of zinc supplementation in ageing are in agreement with the proposal of the need of zinc to prolong the rate of survival in old mice (Mocchegiani et al., 2000), to improve the immune response (Haase et al., 2006) and to normalize psychosocial functions (Marcellini et al., 2006; Maylor et al., 2006). A further interesting point is the increment of some pro-inflammatory cytokines (IL-6) after zinc supplementation. This last point may be interpreted as a possible mechanism by zinc for a prompt immune response against antigens. On the other hand, increased IL-6 occurs from macrophages after LPS

stimulation in old zinc supplemented individuals (Lothar Rink, personal communication). Further studies are in progress to investigate this phenomenon.

The presence of a less significant correlation between MT and the capacity of zinc release by MT in C– subjects in comparison to C+ ones is another intriguing point which could be related to the existence of MT dysfunctions possibly linked to irreversible oxidative damage or homocysteinylation (Barbato et al., 2007). On the other hand, C– carriers display higher MT/iZn_R ratio than C+ ones, suggesting the possible presence of oxidized MT in C– with subsequent limited zinc release by MT.

In conclusion, the present paper shows for the first time the relevance of the IL-6 polymorphism for the screening of old subjects who effectively need zinc supplementation. Although a placebo group would be useful to compare the overall effect of zinc supplementation, the comparison between C+ and C– subjects remains valid without placebo group. Moreover, the IL-6 –174G/C polymorphism may be a useful tool to unmask the real zinc deficiency because the sole assessment of plasma zinc might be misleading, as shown by the effects of zinc supplementation in C– carriers with unstable plasma zinc (Group C). However, taking into account that all experimental groups included in the supplementation trial displayed a zinc intake well below the RDI, it emerges the problem to check for the dietary habits and zinc status of elderly people aimed to a possible zinc supplementation. The possible impact of zinc rich foods, such as red lean meat, on the health of elderly individuals should be therefore revised especially in view of the latest results regarding to the consumption of this source of zinc that does not elevate oxidative stress or inflammation in humans (Hodgson et al., 2007).

Acknowledgments

This paper supported by European Commission (ZIN-CAGE project, contract No. FOOD-CT-2003-506850, Coordinator Dr. Eugenio Mocchegiani) and INRCA. The Authors are indebted for their precious collaboration in the enrolment of old subjects from different European Centres the following people.

From INRCA and University of Florence Centres (Italy): Dr. F. Bravi, Dr. D. Cimini, Dr. M.L. DeMartis, Dr. P.L. Amici, Dr. A. BorgoForte Gradassi, Dr. M. Brecciaroli, Dr. M.V. Cannella, Dr. A. Cinti, Dr. F. Folt-rani, Dr. S. Giustizi, Dr. L. Ippoliti, Dr. P. Litargini, Dr. E. Montecchiesi, Dr. M.G. Pacetti, Dr. M.G. Paolucci, Dr. G.P. Petrini, Dr. L. Sbaifi, Dr. G.C. Ugolini, Dr. N. Vasile, Dr. G.C. Zingaretti, Dr. M. Quinti, Mr. G. Alcalini, Mr. E. Cerusico, Dr. R. Ostan, Dr. L. Bucci.

From University of Besancon Center (France): Dr. A. Varin.

From University Medical Lodtz Center (Poland): Dr. Grazyna Klupinska and Mr. Jerzy Jajte.

From RWTH-Aachen University Hospital Center (Germany): Dr. Dunker, Dr. Stäbler, Dr. Kranemann, Dr. Pasch, Dr. Hemmerich, Dr. Kroner, Dr. Heindl, Dr. Heinze, Dr. Duisberg, Dr. Herbst, Dr. Graff, Dr. Dohmen, Dr. Preim, Dr. Warmuth, Dr. Freund, Dr. Neufeind, Dr. Lang.

References

- Ahluwalia, N., 2004. Aging, nutrition and immune function. *J. Nutr. Health Aging* 8, 2–6.
- Antonicelli, R., Olivieri, F., Bonafè, M., Cavallone, L., Spazzafumo, L., Marchegiani, F., Cardelli, M., Recanatini, A., Testarmata, P., Boemi, M., Parati, G., Franceschi, C., 2005. The interleukin-6 –174G>C promoter polymorphism is associated with a higher risk of death after an acute coronary syndrome in male elderly patients. *Int. J. Cardiol.* 103, 266–271.
- 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., Ocké, M.C., Peeters, P.H., van Rossum, C.T., Quirós, J.R., Sánchez, M.J., Navarro, C., Barricarte, A., Dorronsoro, M., Berglund, G., Wirfält, E., Hallmans, G., Johansson, I., Bingham, S., Khaw, K.T., Spencer, E.A., Roddam, A.W., Riboli, E., Trichopoulou, A., 2005. Dietary patterns among older Europeans: the EPIC-Elderly study. *Br. J. Nutr.* 94, 100–113.
- Barbato, J.C., Catanescu, O., Murray, K., DiBello, P.M., Jacobsen, D.W., 2007. Targeting of metallothionein by L-homocysteine: a novel mechanism for disruption of zinc and redox homeostasis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 49–54.
- Bogden, J.D., Oleske, J.M., Lavenhar, M.A., Munves, E.M., Kemp, F.W., Bruening, K.S., Holding, K.J., Denny, T.N., Guarino, M.A., Holland, B.K., 1990. Effects of one year of supplementation with zinc and other micronutrients on cellular immunity in the elderly. *J. Am. Coll. Nutr.* 9, 214–225.
- Bonafè, M., Olivieri, F., Cavallone, L., Giovanetti, S., Marchegiani, F., Cardelli, M., Pieri, C., Marra, M., Antonicelli, R., Lisa, R., Rizzo, M.R., Prolisso, G., Monti, D., Franceschi, C., 2001. A gender-dependent genetic predisposition to produce high levels of IL-6 is detrimental for longevity. *Eur. J. Immunol.* 31, 2357–2361.
- Boukaïba, N., Flament, C., Acher, S., Chappuis, P., Piau, A., Fusselier, M., Dardenne, M., Lemonnier, D., 1993. A physiological amount of zinc supplementation: effects on nutritional, lipid, and thymic status in an elderly population. *Am. J. Clin. Nutr.* 57, 566–572.
- Burdette, S.C., Walkup, G.K., Spingler, B., Tsien, R.Y., Lippard, S.J., 2001. Fluorescent sensors for Zn(2+) based on a fluorescein platform: synthesis, properties and intracellular distribution. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 7831–7841.
- Cakman, I., Kirchner, H., Rink, L., 1997. Zinc supplementation reconstitutes the production of interferon-alpha by leukocytes from elderly persons. *J. Interferon Cytokine Res.* 17, 469–472.
- Cipriano, C., Malavolta, M., Costarelli, L., Giacconi, R., Muti, E., Gasparini, N., Cardelli, M., Monti, D., Mariani, E., Mocchegiani, E., 2006. Polymorphisms in MT1a gene coding region are associated with longevity in Italian Central female population. *Biogerontology* 7, 357–365.
- Cohen, S., Kamarck, T., Mermelstein, R., 1983. A global measure of perceived stress. *Journal of Health and Social Behavior* 24, 385–396.
- Das, U.N., 2001. Nutritional factors in the pathobiology of human essential hypertension. *Nutrition* 17, 337–346.
- Dedoussis, G.V., Manios, Y., Choumerianou, D.M., Yiannakouris, N., Panagiotakos, D.B., Skenderi, K., Zampelas, A., 2004. The IL-6 gene G–174C polymorphism related to health indices in Greek primary school children. *Obes. Res.* 12, 1037–1041.
- Fabris, N., Mocchegiani, E., 1995. Zinc, human diseases and aging. *Aging* 7, 77–93.
- Fabris, N., Mocchegiani, E., Amadio, L., Zannotti, M., Licastro, F., Franceschi, C., 1984. Thymic hormone deficiency in normal ageing and Down's syndrome: is there a primary failure of the thymus? *Lancet* 1, 983–986.
- Folstein, M.F., Folstein, S.E., McHugh, P.R., 1975. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J. Psychiatry Res.* 12, 189–198.
- Food and Nutrition Board and Institute of Medicine, 2000. Dietary References Intake for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc. National Academy Press, Washington, DC.
- Fortes, C., Forestiere, F., Agabiti, N., Fano, V., Pacifici, R., Virgili, F., Piras, G., Guidi, L., Bartoloni, C., Tricerri, A., Zuccaio, P., Ebrahim, S., Peducci, C.A., 1998. The effect of zinc and vitamin A supplementation on immune response in an older population. *J. Am. Geriatr. Soc.* 46, 19–26.
- Fosmire, G.J., 1990. Zinc toxicity. *Am. J. Clin. Nutr.* 51, 225–227.
- Fraker, P.J., Lill-Elghanian, D.A., 2004. The many roles of apoptosis in immunity as modified by aging and nutritional status. *J. Nutr. Health Aging* 8, 56–63.
- Franceschi, C. et al. Inflamm-aging, 2000. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann. NY Acad. Sci.* 908, 244–254.
- Garg, R., Wollan, M., Galic, V., Garcia, R., Goff, B.A., Gray, H.J., Swisher, E., 2006. Common polymorphism in interleukin 6 influences survival of women with ovarian and peritoneal carcinoma. *Gynecol. Oncol.* 103, 793–796.
- Giacconi, R., Cipriano, C., Albanese, F., Boccoli, G., Saba, V., Olivieri, F., Franceschi, C., Mocchegiani, E., 2004. The –174G/C polymorphism of IL-6 is useful to screen old subjects at risk for atherosclerosis or to reach successful ageing. *Exp. Gerontol.* 39, 621–628.
- Haase, H., Mocchegiani, E., Rink, L., 2006. Correlation between zinc status and immune function in the elderly. *Biogerontology* 7, 421–428.
- Harris, T.B., Ferrucci, L., Tracy, R.P., Corti, M.C., Wacholder, S., Ettinger, W.H., Heimovitz, H., Cohen, H.J., Wallace, R., 1999. Associations of elevated interleukin-6 and C-reactive protein levels with mortality in the elderly. *Am. J. Med.* 106, 506–512.
- Hininger-Favier, I., Andriollo-Sanchez, M., Arnaud, J., Meunier, N., Bord, S., Graham, C., Polito, A., Maiani, G., O'Connor, J.M., Coudray, C., Roussel, A.M., 2007. Age- and sex-dependent effects of long-term Zinc supplementation on essential trace element status and lipid metabolism in European subjects: the Zenith Study. *Br. J. Nutr.* 97, 569–578.
- Hodgson, J.M., Ward, N.C., Burke, V., Beilin, L.J., Puddey, I.B., 2007. Increased lean red meat intake does not elevate markers of oxidative stress and inflammation in humans. *J. Nutr.* 137, 363–367.
- Hurme, M., Lehtimäki, T., Jylhä, M., Karhunen, P.J., Hervonen, A., 2005. Interleukin-6 –174G/C polymorphism and longevity: a follow-up study. *Mech. Ageing Dev.* 126, 417–418.
- Koivisto, A.M., Helisalmi, S., Pihlajamäki, J., Moilanen, L., Kuusisto, J., Laakso, M., Hiltunen, M., Keijo, K., Hänninen, T., Helkala, E.L., Kervinen, K., Kesäniemi, Y.A., Soininen, H., 2005. Interleukin-6 promoter polymorphism and late-onset Alzheimer's disease in the Finnish population. *J. Neurogenet.* 19, 155–161.
- Libra, M., Signorelli, S.S., Bevelacqua, Y., Navolanic, P.M., Bevelacqua, V., Polesel, J., Talamini, R., Stivala, F., Mazzarino, M.C., Malaponte, G., 2006. Analysis of G(–174)C IL-6 polymorphism and plasma concentrations of inflammatory markers in patients with type 2 diabetes and peripheral arterial disease. *J. Clin. Pathol.* 59, 211–215.
- Licastro, F., Grimaldi, L.M., Bonafè, M., Martina, C., Olivieri, F., Cavallone, L., Giovanetti, S., Masliah, E., Franceschi, C., 2003. Interleukin-6 gene alleles affect the risk of Alzheimer's disease and levels of the cytokine in blood and brain. *Neurobiol. Aging* 24, 921–926.
- Malavolta, M., Costarelli, L., Giacconi, R., Muti, E., Bernardini, G., Tesi, S., Cipriano, C., Mocchegiani, E., 2006. Single and three-color

- flow cytometry assay for intracellular zinc ion availability in human lymphocytes with Zinpyr-1 and double immunofluorescence: relationship with metallothioneins. *Cytometry A* 69, 1043–1053.
- Marcellini, F., Giuli, C., Papa, R., Gagliardi, C., Dedoussis, G., Herbein, G., Fulop, T., Monti, D., Rink, L., Jajte, J., Mocchegiani, E., 2006. Zinc status, psychological and nutritional assessment in old people recruited in five European countries: Zincage study. *Biogerontology* 7, 339–345.
- Maret, W., 2000. The function of zinc metallothionein: a link between cellular zinc and redox state. *J. Nutr.* 130, 1455S–1458S.
- Maret, W., 2003. Cellular zinc and redox states converge in the metallothionein/thionein pair. *J. Nutr.* 133, 1460S–1462S.
- Maret, W., Sandstead, H.H., 2006. Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 20, 3–18.
- Mariani, E., Cattini, L., Neri, S., Malavolta, M., Mocchegiani, E., Ravaglia, G., Facchini, A., 2006. Simultaneous evaluation of circulating chemokine and cytokine profiles in elderly subjects by multiplex technology: relationship with zinc status. *Biogerontology* 7, 449–459.
- Maylor, E.A., Simpson, E.E., Secker, D.L., Meunier, N., Andriollo-Sanchez, M., Polito, A., Stewart-Knox, B., McConville, C., O'Connor, J.M., Coudray, C., 2006. Effects of zinc supplementation on cognitive function in healthy middle-aged and older adults: the ZENITH study. *Br. J. Nutr.* 96, 752–760.
- Misra, R.R., Hochadel, J.F., Smith, G.T., Cook, J.C., Waalkes, M.P., Wink, D.A., 1996. Evidence that nitric oxide enhances cadmium toxicity by displacing the metal from metallothionein. *Chem. Res. Toxicol.* 9, 326–332.
- Mocchegiani, E., Bertoni-Freddari, C., Marcellini, F., Malavolta, M., 2005. Brain, aging and neurodegeneration: role of zinc ion availability. *Prog. Neurobiol.* 75, 367–390.
- Mocchegiani, E., Costarelli, L., Giacconi, R., Cipriano, C., Muti, E., Tesi, S., Malavolta, M., 2006. Nutrient-gene interaction in ageing and successful ageing A single nutrient (zinc) and some target genes related to inflammatory/immune response. *Mech. Ageing Dev.* 127, 517–525.
- Mocchegiani, E., Malavolta, M., 2004. NK and NKT cell functions in immunosenescence. *Aging Cell* 3, 177–184.
- Mocchegiani, E., Marcellini, F., Pawelec, G., 2004. Nutritional zinc, oxidative stress and immunosenescence: biochemical, genetic, and lifestyle implications for healthy ageing. *Biogerontology* 5, 271–273.
- Mocchegiani, E., Muzzioli, M., Cipriano, C., Giacconi, R., 1998. Zinc, T-cell pathways, aging: role of metallothioneins. *Mech. Ageing Dev.* 106, 183–204.
- Mocchegiani, E., Muzzioli, M., Giacconi, R., 2000. Zinc, metallothioneins, immune responses, survival and ageing. *Biogerontology* 1, 133–143.
- Neri, S., Mariani, E., Meneghetti, A., Cattini, L., Facchini, A., 2001. Calcein-acetyoxymethyl cytotoxicity assay: standardization of a method allowing additional analyses on recovered effector cells and supernatants. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8, 1131–1135.
- Olivieri, F., Antonicelli, R., Cardelli, M., Marchegiani, F., Cavallone, L., Mocchegiani, E., Franceschi, C., 2006. Genetic polymorphisms of inflammatory cytokines and myocardial infarction in the elderly. *Mech. Ageing Dev.* 127, 552–559.
- Olomolaiye, O., Wood, N.A., Bidwell, J.L., 1998. A novel NlaIII polymorphism in the human IL-6 promoter. *Eur. J. Immunogenet.* 25, 267–268.
- Osborn, D.P., Fletcher, A.E., Smeeth, L., Stirling, S., Nunes, M., Breeze, E., Siu-Woon, Ng E., Bulpitt, C.J., Jones, D., Tulloch, A., 2002. Geriatric depression scale scores in a representative sample of 14 545 people aged 75 and over in the United Kingdom: results from the MRC Trial of Assessment and Management of Older People in the Community. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* 17, 375–382.
- Ozata, M., Mergen, M., Oktenli, C., Aydin, A., Sanisoglu, S.Y., Bolu, E., Yilmaz, M.I., Sayal, A., Isimer, A., Ozdemir, I.C., 2002. Increased oxidative stress and hypozincemia in male obesity. *Clin. Biochem.* 35, 627–631.
- Pepersack, T., Rotsaert, P., Benoit, F., Willems, D., Fuss, M., Bourdoux, P., Duchateau, J., 2001. Prevalence of zinc deficiency and its clinical relevance among hospitalised elderly. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 33, 243–253.
- Prasad, A.S., 1991. Discovery of human zinc deficiency and studies in an experimental human model. *Am. J. Clin. Nutr.* 53, 403–412.
- Prasad, A.S., Fitzgerald, J.T., Hess, J.W., Kaplan, J., Pelen, F., Dardenne, M., 1993. Zinc deficiency in elderly patients. *Nutrition* 9, 218–224.
- Ravaglia, G., Forti, P., Maioli, F., Chiappelli, M., Dolzani, P., Martelli, M., Bianchin, M., Mariani, E., Bolondi, L., Licastro, F., 2005. Associations of the –174G/C interleukin-6 gene promoter polymorphism with serum interleukin 6 and mortality in the elderly. *Biogerontology* 6, 415–423.
- Reddy, M.B., Love, M., 1999. The impact of food processing on the nutritional quality of vitamins and minerals. *Adv. Exp. Med. Biol.* 459, 99–106.
- Rink, L., Gabriel, P., 2000. Zinc and the immune system. *Proc. Nutr. Soc.* 59, 541–552.
- Saavedra, J.E., Shami, P.J., Wang, L.Y., Davies, K.M., Booth, M.N., Citro, M.L., Keefer, L.K., 2000. Esterase-sensitive nitric oxide donors of the diazeniumdiolate family: in vitro antileukemic activity. *J. Med. Chem.* 43, 261–269.
- Sandstead, H.H., 1995. Requirements and toxicity of essential trace elements, illustrated by zinc and copper. *Am. J. Clin. Nutr.* 61, 621S–624S.
- Shankar, A.H., Prasad, A.S., 1998. Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. *Am. J. Clin. Nutr.* 68, 447S–463S.
- Sheikh, J.I., Yesavage, J.A., 1986. Geriatric depression scale (GDS): recent evidences and development of shorter version. *Clin. Gerontol.* 5, 165–173.
- Sie, M.P., Sayed-Tabatabaei, F.A., Oei, H.H., Uitterlinden, A.G., Pols, H.A., Hofman, A., van Duijn, C.M., Witteman, J.C., 2006. Interleukin 6 –174g/c promoter polymorphism and risk of coronary heart disease: results from the Rotterdam study and a meta-analysis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 212–217.
- Sundaram, A., Koutkia, P., Apovian, C.M., 2002. Nutritional management of short bowel syndrome in adults. *J. Clin. Gastroenterol.* 34, 207–220.
- Tudor, R., Zalewski, P.D., Ratnaike, R.N., 2005. Zinc in health and chronic disease. *J. Nutr. Health Aging* 9, 45–51.
- US, 1976. Recommended daily allowance (USDA) for dietary intake of minerals. *Federal Register* 41, 46172–46176.
- Yesavage, J.A., Brink, T.L., Rose, T.L., Lum, O., Huang, V., Adey, M., Leirer, V.O., 1982–1983. Development and validation of a geriatric depression screening scale: a preliminary report. *J. Psychiatry Res.* 17, 37–49.
- Yurkow, E.J., Makhijani, P.R., 1998. Flow cytometric determination of metallothionein levels in human peripheral blood lymphocytes: utility in environmental exposure assessment. *J. Toxicol. Environ. Health A* 54, 445–457.

Age-dependent dichotomous effect of superoxide dismutase Ala16Val polymorphism on oxidized LDL levels

George V. Dedoussis^{1,3}, Stavroula Kanoni¹,
Demosthenes B. Panagiotakos¹, Eirini Louizou¹,
Efi Grigoriou¹, Christina Chrysohoou²,
Christos Pitsavos² and Christodoulos Stefanadis²

¹Department of Dietetics-Nutrition
Harokopio University, 70 El.Venizelou Avenue
17671 Athens, Greece

²First Cardiology Clinic
School of Medicine, University of Athens
Ippocraton Hospital, 114 Vas Sofias Avenue, 11527 Athens, Greece

³Corresponding author: Tel, 30-210-9549304;
Fax, 30-210-9577050; E-mail, dedousi@hua.gr

Accepted 21 November 2007

Abbreviations: BMI, body mass index; Cu/Zn SOD, copper- and zinc containing superoxide dismutase; GPX, glutathione peroxidase; Mn SOD, manganese superoxide dismutase; RNS, reactive nitrogen species; ROS, reactive oxygen species; SOD, superoxide dismutase

Abstract

We investigated the association between superoxide dismutase (SOD) Ala16Val polymorphism and the levels of oxidized LDL lipoprotein-C (ox-LDL-C) in two age-different Greek cohorts. Four hundred fifteen middle-aged ($n = 147$ females: 43.2 ± 13 years, $n = 268$ males: 43.3 ± 14 years) Caucasian Greek subjects consisted the middle aged cohort. One hundred seventy five elderly ($n = 88$ females: 79.9 ± 4 years; $n = 87$ males: 80.6 ± 4 years) were selected from the elderly cohort. Genotype data were obtained for all of them. Multiple linear regression analysis, stratified by gender and adjusted for age, smoking habits and body mass index as covariates, showed higher ox-LDL-C levels for the middle aged men with the Val/Val genotype, compared to the other allele (Ala/Ala and Ala/Val) carriers (65.9 ± 25.7 vs. 55.7 ± 20.5 mg/dl; standardized β coefficient = 0.192, $P = 0.012$). On the contrary, elderly women with the Val/Val genotype occurred with lower ox-LDL-C levels compared to the Ala/Ala or Ala/Val genotype (74.2 ± 22.1 vs. 86.5 ± 26.6 mg/dl; standardized β coefficient = -0.269, $P = 0.015$). The same trend was also recorded in elderly men, however without reaching statistical signifi-

cance (standardized β coefficient = -0.187, $P = 0.077$). Moreover, elderly men and women with the Ala/Ala or Ala/Val genotype presented higher triglycerides levels compared to Val/Val (women: 145.2 ± 68.7 vs. 114.3 ± 34.3 mg/dl, $P = 0.027$; men: 147.8 ± 72.4 vs. 103.7 ± 38.0 mg/dl, $P = 0.002$). Additionally, middle aged men with the Val/Val genotype had higher HDL-C levels compared to the Ala allele carriers. The results suggest that SOD Ala16Val polymorphism is an age-dependent modulator of ox-LDL-C levels in middle-aged men and elderly women.

Keywords: aging; aged, 80 and over; oxidized low density lipoprotein; polymorphism, genetic; superoxide dismutase

Introduction

Aging is an inevitable, heterogeneous but inducible process, characterized by a general decline in physiologic function with an increasing morbidity and mortality rate. Specific causes of aging are not completely elucidated, although various lines of evidence implicate random (stochastic) events as a fundamental driving force behind this process. The free radical theory of aging was postulated as early as 1956 by Harman (1956) and it may explain many of the physiologic changes associated with aging. According to this hypothesis, different types of free radicals are formed in aerobic organisms, particularly due to their metabolic activity. The most important free radicals are the reactive oxygen species (ROS), which have been shown to damage a whole spectrum of cellular key components, during the aging process (Gutteridge and Halliwell, 2000). Free radicals and reactive oxygen and nitrogen species (ROS, RNS) are mutagenic compounds, known to cause DNA damage, favor cell transformation, and contribute to the development of a variety of malignant diseases.

Atherosclerosis is one of the major health concerns in developed countries. It is also well-known, that atherosclerosis is closely related to lipoprotein metabolism. In particular, oxidative modification of LDL is involved in the early development of atherosclerotic lesions, through the formation of macrophage-derived foam cells. Subsequently, ROS formation and oxidative stress contribute to the atherogenetic process (Rosenblat *et al.*, 2002).

Several studies have demonstrated the presence of lipid peroxides and byproducts of lipid peroxidation in LDL-C particles and in arterial macrophages in atherosclerotic lesions (Mertens and Holvoet, 2001; Rosenblat *et al.*, 2002). Similarly, it is assumed that lipid peroxidation, subsequent to free-radical damage, is involved in the aging process (Schwenke, 1998).

Several enzymes with antioxidant activity [superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX), catalase] comprise a fundamental system, developed by aerobic organisms, to prevent oxidative damage. SODs are the only enzymes dismounting superoxide radicals. There are numerous mechanisms by which cells defend themselves against oxidants (Kinnula and Crapo, 2004). SODs decompose superoxide radicals into H₂O₂ and O₂ (Kinnula and Crapo, 2004). Mammalian cells, in particular, contain a manganese superoxide dismutase (Mn SOD/SOD2) localized within the mitochondrial matrix (Weisiger and Fridovich, 1973), a copper- and zinc-containing superoxide dismutase (Cu/Zn SOD/SOD1) localized predominantly in cytoplasmic and nuclear compartments (McCord and Fridovich, 1969), and a copper- and zinc containing SOD predominantly found in extracellular compartments (EC SOD/SOD3) (Marklund, 1982). MnSOD, a homotetramer containing one manganese ion per subunit (Beyer *et al.*, 1991; Wan *et al.*, 1994), is essential for the vitality of mammalian cells. The MnSOD gene is located on chromosome 6q25 (Wan *et al.*, 1994). Total knock-out of the MnSOD gene is perinatally lethal, leading to neurological manifestations and cardiotoxicity (Tsan, 2001; Van Remmen *et al.*, 2001). Heterozygous mice with decreased MnSOD activity present increased mitochondrial oxidative damage (Williams *et al.*, 1998). A polymorphic variant of MnSOD, with possible enhancing effect on the risk of cancer development, has been described. In this variant, a substitution of T to C base results in the replacement of alanine (Ala) with valine (Val) at position 16 of the mitochondrial targeting sequence (16th amino acid from the beginning of the signal sequence or 9th amino acid from the first amino acid of the mature protein) (Rosenblum *et al.*, 1996). This amino acid replacement has been suggested to change the mitochondrial targeting of the enzyme. It has recently been shown, that the Ala MnSOD/mitochondrial targeting sequence allows efficient targeting of MnSOD to the mitochondria, whereas the Val variant leads to a decreased formation of active MnSOD in the mitochondrial matrix (Sutton *et al.*, 2003).

To examine the influence of the SOD Ala16Val polymorphism on the levels of oxidized low-density

lipoprotein (ox-LDL) during the ageing process, we studied two age different Greek cohorts.

Materials and Methods

The gene symbols used in this article follow the recommendations of the HUGO Gene Nomenclature Committee (Povey *et al.*, 2001).

Healthy adults and very old people

Middle aged cohort: The middle aged cohort included 415 middle-aged subjects. This group was part of the "ATTICA" study (Pitsavos *et al.*, 2003), which is a health and nutrition survey, carried out in the province of Attica (including 78% urban and 22% rural areas), where Athens, is a major metropolis. The sampling was performed in the working or other public places; it was random, multistage and based on the age-sex distribution of the province of Attica provided by the National Statistical Service (census of 2001). The participation rate was 68%. From the sampling we excluded 10% of men and 7% of women with history of chronic disease (renal failure, liver and cardiovascular disease and chronic obstructive pulmonary disease), as well as individuals (< 2%) who were under current or chronic use of certain drugs that influence antioxidant status, like methotrexate, trimethoprin, cholestyramine and cyclosporine. Also, all people living in institutions were excluded from the study. All participants were interviewed by trained personnel (cardiologists, dieticians and nurses), using a standard questionnaire.

Elderly cohort: The elderly subjects included in the present study, were part of a large elderly cohort called GHRAS (Greek Health Randomized Aging Study), consisting of 800 healthy men and women older than 65 years of age (unpublished data). The elderly cohort selected for the present study is a sample of 175 subjects older than 75 years of age. The selection criteria was the equal representation all the Ala16Val SOD genotypes in both genders of elderly subjects. Furthermore, the oldest participants had to be free of medication such as anti-lipidemics, anticoagulants, steroids, diuretics, anti-convulsants, anti-depressive drugs, antibiotics, anti-metabolites, non-steroid anti-inflammatory drugs and micronutrient supplementation. Subjects were excluded if they had autoimmune, neurodegenerative, cardiovascular, kidney or liver disease, diabetes, infections, cancer, chronic inflammatory bowel disease or acrodermatitis enteropathica, sickle cell anaemia, chronic skin ulcerations and endocrine disorders. Medical history was recorded by the family doctor or

through a medical examination when possible.

Genotyping

Genomic DNA was extracted from whole blood leukocytes with a DNA extraction kit (Nucleospin Blood kit, Macherey-Nagel, Düren, Germany). Ala16Val SOD genotype was determined, as previously described (Masry *et al.*, 2005), for 415 subjects of the middle aged cohort and 212 of the elderly cohort.

Biochemical analysis

Blood samples were collected after 12 h fasting. The biochemical analysis included total cholesterol, HDL-C, triglycerides and glucose measurements. LDL-C was calculated using the Friedewald equation. Ox-LDL-C was measured in plasma samples using a commercial ELISA kit (Mercodia AB, Uppsala, Sweden), following the manufacturer's instructions.

Anthropometric, clinical, demographic and lifestyle characteristics

The anthropometric measurements included weight and height and were obtained using standardized techniques and equipment. Body mass index (BMI) was calculated as weight (kg) / height (m) squared. Arterial blood pressure was measured 3 times on the right arm with a sphygmomanometer and with the subject in a sitting position for 30 min. Demographic (age and gender) and lifestyle characteristics (smoking habits) of the middle-aged and the elderly participants were recorded using standardised questionnaires. Current smokers were defined as those who smoked at least one cigarette per day.

Statistical analysis

Continuous variables are presented as mean $\pm$ standard deviation, while categorical variables are presented as absolute and relative frequencies. Pearson's correlation coefficient was used in order to measure associations between normally distributed continuous variables. Contingency tables with the calculation of chi-squared test (with Yates correction) evaluated the associations between categorical variables. However, due to the small number of observations in some cases, Fisher's exact test, with the calculation of exact *P*-values, was applied to evaluate the association between the investigated polymorphism and group of study. The application of Student's *t*-test evaluated the

associations between categorical and normally distributed continuous variables. The distribution of the SOD polymorphism in both populations was compared with the expected frequency through the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE). Testing deviations from the HWE was performed by Pearson's chi-squared test, using the observed genotype frequencies obtained from the data and the expected genotype frequencies obtained using the HWE. The association of genotypes with ox-LDL-C concentrations were tested by using multiple linear regression models, after taking into account the effects of several potential confounders. All reported *P* values are based on two-sided tests and were compared with a significance level of 5%. Statistical analysis was performed with SPSS edition 13.0.

Results

We evaluated the prevalence of the SOD Ala16Val polymorphism and its effect on ox-LDL-C levels in two age different Greek cohorts, a middle aged one ($n = 147$ females: 43.2 ± 13 years, $n = 268$ males: 43.3 ± 14 years) and an oldest old cohort (females: 79.9 ± 4 years; males: 80.6 ± 4 years). The allele frequency observed in both populations of the current study was 0.54 for Ala and 0.46 for Val. Genotypes frequency was in HWE. Table 1 presents anthropometrical, clinical and biochemical variables of the two cohorts, according to the SOD Ala16Val genotype. Middle aged men with the Val/Val genotype had higher ox-LDL-C and HDL-C levels compared to the Ala carriers (Ala/Ala or Ala/Val) (65.9 ± 25.7 vs. 55.7 ± 20.5 mg/dl, $P = 0.011$ for the ox-LDL-C; 47.4 ± 12.7 vs. 43.5 ± 10 , $P = 0.020$ for the HDL-C). Furthermore, middle aged men with the Val/Val genotype had lower total cholesterol/ox-LDL ratio compared to the Ala carriers (Table 1). On the contrary, elderly women with the Ala/Ala or Ala/Val genotype presented higher ox-LDL-C levels and lower total cholesterol/ox-LDL ratio compared to the Val/Val genotype (86.5 ± 26.6 vs. 74.2 ± 22.1 mg/dl, $P = 0.042$ for the ox-LDL; 2.9 ± 0.7 vs. 3.2 ± 0.8 , $P = 0.029$ for the total cholesterol/ox-LDL ratio). Both elderly men and women with the Ala/Ala or Ala/Val genotype occurred with higher triglycerides levels compared to the Val/Val group (147.8 ± 72.4 vs. 103.7 ± 38.0 mg/dl, $P = 0.002$ and 145.2 ± 68.7 vs. 114.3 ± 34.3 mg/dl, $P = 0.027$, for men and women respectively). Multiple linear regression analysis (Table 2), stratified by gender and adjusted for age, body mass index and smoking habits as covariates, confirmed the dichotomous age effect of the

Table 1. Characteristics of the participants by genotype for the Ala16Val mutation of the SOD gene.

Middle aged cohort	Women			Men		
	Ala/Ala, Ala/Val	Val/Val	P	Ala/Ala, Ala/Val	Val/Val	P
<i>n</i>	124	23		216	52	
Age (y)	38.9 ± 11.5	38.7 ± 11.3	0.924	45.7 ± 9.8	46.0 ± 9.2	0.834
BMI (kg/m ²)	23.8 ± 4.4	25.7 ± 5.7	0.075	27.8 ± 4.1	27.3 ± 3.4	0.409
Systolic Blood Pressure (mmHg)	113.6 ± 16.4	113.3 ± 15.7	0.932	127.9 ± 17.3	128.7 ± 19.0	0.772
Diastolic Blood Pressure (mmHg)	76.7 ± 14.0	78.0 ± 13.6	0.661	84.7 ± 15.8	97.0 ± 94.8	0.365
Total Cholesterol (mg/dl)	179.6 ± 39.3	184.1 ± 37.5	0.612	197.4 ± 33.7	195.7 ± 36.6	0.749
HDL-C (mg/dl)	52.6 ± 10.9	51.3 ± 12.5	0.619	43.5 ± 10.0	47.4 ± 12.7	0.020
LDL-C (mg/dl)	110.4 ± 35.3	108.6 ± 35.8	0.828	127.5 ± 31.4	122.6 ± 34.1	0.329
Triglycerides (mg/dl)	84.6 ± 44.9	120.9 ± 111.0	0.136	130.2 ± 74.3	130.4 ± 61.8	0.986
Oxidized LDL-C (U/L)	61.3 ± 32.3	65.9 ± 29.0	0.532	55.7 ± 20.5	65.9 ± 25.7	0.011
Total Cholesterol/Oxidized LDL-C	3.7 ± 2.2	3.3 ± 1.3	0.207	4.0 ± 1.4	3.4 ± 1.5	0.029
Glucose (mg/dl)	87.2 ± 11.3	101.2 ± 57.8	0.260	97.0 ± 24.1	104.3 ± 35.9	0.169
Current smokers (%)	42.0	39.0	0.800	48	46	0.790

Elderly cohort	Women			Men		
	Ala/Ala, Ala/Val	Val/Val	P	Ala/Ala, Ala/Val	Val/Val	P
<i>n</i>	62	26		65	22	
Age (y)	80.5 ± 4.4	78.3 ± 3.5	0.023	80.7 ± 4.3	80.3 ± 5.3	0.750
BMI (kg/m ²)	29.3 ± 4.3	30.1 ± 4.6	0.454	28.1 ± 3.6	28.7 ± 4.0	0.553
Systolic Blood Pressure (mmHg)	147.0 ± 21.4	139.2 ± 20.9	0.147	150.6 ± 17.1	143.6 ± 18.0	0.128
Diastolic Blood Pressure (mmHg)	76.7 ± 10.8	79.1 ± 12.0	0.384	79.1 ± 10.7	77.5 ± 12.5	0.585
Total Cholesterol (mg/dl)	235.1 ± 34.5	226.5 ± 40.8	0.321	227.4 ± 36.4	210.8 ± 45.8	0.087
HDL-C (mg/dl)	55.5 ± 12.4	60.1 ± 12.3	0.112	52.3 ± 10.7	51.1 ± 9.0	0.646
LDL-C (mg/dl)	150.6 ± 32.5	143.5 ± 39.2	0.389	145.5 ± 32.4	138.9 ± 38.9	0.434
Triglycerides (mg/dl)	145.2 ± 68.7	114.3 ± 34.3	0.027	147.8 ± 72.4	103.7 ± 38.0	0.002
Oxidized LDL-C (U/L)	86.5 ± 26.6	74.2 ± 22.1	0.042	81.3 ± 21.8	73.1 ± 19.1	0.119
Total Cholesterol/Oxidized LDL-C	2.9 ± 0.7	3.2 ± 0.8	0.029	2.9 ± 0.7	3.0 ± 0.5	0.817
Glucose (mg/dl)	104.2 ± 29.0	95.0 ± 12.9	0.127	110.2 ± 33.6	102.0 ± 20.7	0.288
Current smokers (%)	8.1	11.5	0.689	15.4	4.5	0.277

Table 2. Results from multiple linear regression models that evaluated the association between oxidized LDL-C concentrations and SOD genotype stratified by gender*.

Middle-aged cohort	Women		Men	
	Standardized β coefficient	P	Standardized β coefficient	P
Val/Val vs. Ala/Ala, Ala/Val	0.071	0.410	0.192	0.012
Age (y)	-0.045	0.640	0.100	0.195
BMI (kg/m ²)	-0.094	0.341	-0.137	0.076
Non-smoking vs. current smoking	0.071	0.175	0.016	0.832
Adjusted R ²	0.3%	0.361	4.2%	0.025

Elderly cohort	Women		Men	
	Standardized β coefficient	P	Standardized β coefficient	P
Val/Val vs. Ala/Ala, Ala/Val	-0.269	0.015	-0.187	0.077
Age (y)	-0.186	0.093	-0.337	0.003
BMI (kg/m ²)	0.061	0.568	-0.099	0.364
Non-smoking vs. current smoking	-0.032	0.759	0.092	0.396
Adjusted R ²	4.4%	0.102	8.9%	0.020

*Significant genotype × sex interaction for both cohorts (P < 0.05).

Val/Val genotype on ox-LDL-C levels (standardized β coefficient = 0.192, $P = 0.012$ and standardized β coefficient = -0.269, $P = 0.015$, for middle aged men and oldest old women, respectively). Furthermore, a trend for lower ox-LDL-C levels in old men with the Val/Val genotype was also recorded, with a nominal significance (standardized β coefficient = -0.187, $P = 0.077$).

Discussion

In this study we evaluated the effect of SOD Ala16Val polymorphism on the ox-LDL-C levels in two age-different groups, a middle aged and an oldest old one. The allele frequency recorded in our populations was inversely distributed, comparing to Asians populations (current study: Ala 0.54 and Val 0.46; healthy Chinese: Ala 0.13 and Val 0.87, healthy Korean: Ala 0.12 and Val: 0.88) (Lee *et al.*, 2006; Mak *et al.*, 2006). On the other hand, the recorded prevalence of the Ala16Val polymorphism in the current study is similar to other Caucasian populations, like Turks (Akyol *et al.*, 2004) and Brazilian residents (Gottlieb *et al.*, 2005).

As oxidative stress is considered to play a critical role in senescence-associated changes, it is conceivable that antioxidant enzymes are important anti-aging agents. Surprisingly, the investigated polymorphism was found to have an inverse effect on ox-LDL-C levels in our two age-different populations. In middle age men, the presence of the Val allele, which according to the literature results to a less active SOD enzyme, was positively associated with ox-LDL-C and HDL-C levels. A possible explanation of the higher HDL-cholesterol levels observed in middle aged men with the Val/Val genotype could be a feed-back mechanism in these subjects where the anti-oxidant properties of HDL might compensate the high oxidative stress represented by the elevated ox-LDL levels (Lee *et al.*, 2005). Our finding of increased HDL cholesterol levels in middle-aged subjects with the Val/Val genotype is in accordance with the results of other studies (Kakko *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2006), where Val/Val subjects present higher HDL-C levels compared to the other genotypes, however without statistical significance. Evidence for the existence of a feed-back mechanism among HDL-C levels and antioxidant enzymes has been demonstrated in subjects with low HDL-C levels (Savor-Blat *et al.*, 2007), as well as in studies with Glutathione peroxidase-1 deficient mice (de Haan *et al.*, 2006). On the other hand, it is well documented, that healthy elderly have higher levels of

HDL-C than younger subjects (Schaefer *et al.*, 1989), the vast majority of those over 70 years (~90.0%) occurring with HDL-C levels over 40 mg/dl (Nikkila and Heikkinen, 1990). This increment in HDL-C levels in healthy oldest old subjects (survivors), also recorded by our previous study (Kanoni *et al.*, 2006), could have overshadowed the potential impact of the SOD genotype.

The opposite was recorded in elderly women, where the Val allele was associated with decreased ox-LDL-C, as well as triglycerides levels. A positive correlation of triglyceride with ox-LDL levels observed in elderly has been previously shown for middle aged people (Lapointe *et al.*, 2007). It is well established that higher TG levels in plasma enhance production of small, dense LDL particles, which are known to be more susceptible to oxidation (Young *et al.*, 2003). Data from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA) suggest that, dyslipidemia (adverse levels of cholesterol, HDL-cholesterol, triglycerides), inflammation markers (elevated fibrinogen), male gender, ethnicity (black) and current smoking, could explained the most variation in ox-LDL-C levels, in multivariate analysis model (Holvoet *et al.*, 2006b). The same investigators provide evidence, that ox-LDL-C is a proinflammatory stimulus, inhibiting the expression of the antioxidant SOD1 (Holvoet *et al.*, 2006a). Results (Mocchegiani, 2007) from the large European elderly study (Zincage) suggest that erythrocyte's SOD activity (eSOD) significantly and progressively increase with age, while women exhibit higher eSOD activity compared to men in all age groups. Previously reported results regarding the activity of red blood cell (RBC) SOD, plasma GPX, and, to a lesser extent, plasma SOD are contradictory. Some investigators claim an increase from the youngest to the oldest age groups, which has been correlated with a parallel increase of free radicals (Mecocci *et al.*, 2000; Cheynier, 2005). However, in a cross-sectional study (Andersen *et al.*, 1998) conducted in 41 Danish centenarians and 52 control subjects, Cu/Zn-SOD activity decreased in the centenarians group. In the area of endogenous antioxidant defenses, excess amount of ROS leads to the depletion of the protective GSH and SOD (Kaliora *et al.*, 2006). Very old people represent a highly selected group of successfully aged people. They have apparently escaped the major age-related diseases and exhibit special immunologic or metabolic features (Andersen *et al.*, 1998; Biesalski, 2002). In several studies involving young and elderly groups, some investigators have detected a positive association between age and increased LDL-C oxidation and decreased ox-LDL-C antibodies (Mertens and

Holvoet, 2001), while others (Nakamura *et al.*, 2006) not. These contradictory results could be attributed to the different population size.

The promoter of MnSOD gene contains binding sites for several transcription factors such as AP-1, AP-2, SP-1, and NF- κ B (Harris *et al.*, 1991; Das *et al.*, 1995). In line with this, MnSOD is induced by multiple stress conditions both *in vitro* and *in vivo*. MnSOD induction occurs after exposure to cytokines (TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-6) (Ono *et al.*, 1992), cigarette smoke (Gilks *et al.*, 1998), chronic hypoxia (Clerch *et al.*, 1998), asbestos fibers (Janssen *et al.*, 1992), radiation (Guo *et al.*, 2003) and modulators of intracellular redox and/or thiol state (Das *et al.*, 1995). Most of these parameters are age dependent factors and adding smoking as a cofactor in our model, the effect of SOD polymorphism on ox-LDL-C levels remained statistically significant.

Ox-LDL-C appears to be a stimulator of NF- κ B and AP-1, which are thought to play a predominant role in endothelial cell activation, resulting in atherogenesis. It has been recently shown (Lin *et al.*, 2007), that overexpression of Cu, Zn-SOD and/or catalase suppress the ox-LDL-induced increase in AP-1 and NF- κ B activity, providing information on a mechanism potentially explaining the antiatherogenic and antiproliferative activities of antioxidant enzymes. Overexpression of MnSOD inhibits, *in vitro*, the oxidation of LDL-C by endothelial cells (Fang *et al.*, 1998) and ox-LDL-C is able to induce the expression of MnSOD in macrophages (Kinscherf *et al.*, 1997).

Many SNPs have a significant effect only in the presence of heterozygosity of a second SNP. This type of interaction would not be detected using single-SNP analysis, because SNP genotypes could have a limited effect on a subset of the population, or even antagonistic effects when investigated in combination with a second SNP genotype. These observations are consistent with the hypothesis, that interactions between genetic variants and environmental exposure are the primary causes of phenotypic variability, and not the genetic variants alone (Dedoussis *et al.*, 2007).

An age-dependent effect of a single gene polymorphism was recently shown in a Finish study (Fan *et al.*, 2007). The results suggested that HL C-480T polymorphism is a strong age-dependent risk factor of sudden cardiac death in middle-aged men. We have no evidence of the underlying mechanism, which could explain the inverse effect of the SOD polymorphism on ox-LD-C levels in the oldest old women. If the decrease in SOD activity, as previously reported, is more evident in the SOD Ala carriers, then this could partially explain the

higher ox-LDL-C levels in these subjects. In line with our results and our hypothesis, a recently published study (Taufer *et al.*, 2005), demonstrated that in elderly, the Ala/Ala genotype was associated with increased risk for cancer, immunosenescence profile and DNA damage. The proposed hypothesis for these results by the investigators is based on the free radical theory of aging, concisely suggesting that Ala carriers effectively produce SOD and thus presenting strong innate immunity in their middle-age life, but increased immunosenescence in their latter life. An age related decline in gene expression was recently (Ling *et al.*, 2004) reported for a common Gly482Ser polymorphism in the transcriptional co-activator PGC-1 α in muscle biopsies. Insulin resistance in skeletal muscle increases with age, and since skeletal muscle is a major site of insulin stimulated glucose disposal, aging is a risk factor for type 2 diabetes (Petersen *et al.*, 2003).

The limitations of our study include the cross-sectional design, the absence of multiple antioxidant compounds measurements and the evaluation of other genetic markers related to antioxidant enzymes.

Longitudinal studies in both of our populations, as well as the study of other genes known to affect the levels of ox-LDL-C, will add new evidence on the age specific variation in ox-LDL-C levels and the predisposing genetic markers. To our knowledge this is the first report of a dual effect of a polymorphism on ox-LDL-C levels depending on age.

Acknowledgments

The authors would like to thank the field investigators of "ATTICA" study: Dr. John Skoumas (principal field investigator), Dr. Natasa Katinioti (physical examination), Dr. Spiros Vellas (physical examination), Dr. Efi Tsetsekou (physical/psychological evaluation), as well as the technical team: Dr. Marina Toutouza (senior investigator / biochemical analysis), Mr Manolis Kambaxis (nutritional evaluation), Ms Konstadina Paliou (nutritional evaluation), Ms Chrysoula Tselika (biochemical evaluation), Ms Sia Poulou (biochemical evaluation) and Ms Maria Toutouza (database management). We would also like to thank Mrs Margarita Christea for blood sampling and Dr. Katerina Skenderi for biochemical analysis of the elderly cohort.

References

Akyol O, Canatan H, Yilmaz HR, Yuce H, Ozyurt H, Sogut S, Gulec M, Elyas H. PCR/RFLP-based cost-effective identification of SOD2 signal (leader) sequence polymorphism (Ala-9Val) using NgoM IV: a detailed methodological approach. Clin Chim Acta 2004;345:151-9

- Andersen HR, Jeune B, Nybo H, Nielsen JB, Andersen-Ranberg K, Grandjean P. Low activity of superoxide dismutase and high activity of glutathione reductase in erythrocytes from centenarians. *Age Ageing* 1998;27:643-8
- Beyer W, Imlay J, Fridovich I. Superoxide dismutases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1991;40:221-53
- Biesalski HK. Free radical theory of aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002;5:5-10
- Cheyrier V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am J Clin Nutr* 2005;81:223S-9S
- Clerch LB, Massaro D, Berkovich A. Molecular mechanisms of antioxidant enzyme expression in lung during exposure to and recovery from hyperoxia. *Am J Physiol* 1998;274:L313-9
- Das KC, Lewis-Molock Y, White CW. Thiol modulation of TNF alpha and IL-1 induced MnSOD gene expression and activation of NF-kappa B. *Mol Cell Biochem* 1995;148:45-57
- Dedoussis GV, Kaliora AC, Panagiotakos DB. Genes, diet and type 2 diabetes mellitus: a review. *Rev Diabet Stud* 2007;4:13-24
- de Haan JB, Witting PK, Stefanovic N, Pete J, Daskalakis M, Kola I, Stocker R, Smolich JJ. Lack of the antioxidant glutathione peroxidase-1 does not increase atherosclerosis in C57BL/J6 mice fed a high-fat diet. *J Lipid Res* 2006;47:1157-67
- El Masry TM, Abou Zahra MA, El Tawil MM, Khalifa RA. Manganese superoxide dismutase alanine to valine polymorphism and risk of neuropathy and nephropathy in egyptian type 1 diabetic patients. *Rev Diabet Stud* 2005;2:70-4
- Fan YM, Lehtimäki T, Rontu R, Ilveskoski E, Goebeler S, Kajander O, Mikkelsson J, Perola M, Karhunen PJ. Age-dependent association between hepatic lipase gene C-480T polymorphism and the risk of pre-hospital sudden cardiac death: The Helsinki Sudden Death Study. *Atherosclerosis* 2007;192:421-7
- Fang X, Weintraub NL, Rios CD, Chappell DA, Zwacka RM, Engelhardt JF, Oberley LW, Yan T, Heistad DD, Spector AA. Overexpression of human superoxide dismutase inhibits oxidation of low-density lipoprotein by endothelial cells. *Circ Res* 1998;82:1289-97
- Gilks CB, Price K, Wright JL, Churg A. Antioxidant gene expression in rat lung after exposure to cigarette smoke. *Am J Pathol* 1998;152:269-78
- Gottlieb MG, Schwanke CH, Santos AF, Jobim PF, Mussel DP, da Cruz IB. Association among oxidized LDL levels, MnSOD, apolipoprotein E polymorphisms, and cardiovascular risk factors in a south Brazilian region population. *Genet Mol Res* 2005;4:691-703
- Guo G, Yan-Sanders Y, Lyn-Cook BD, Wang T, Tamae D, Ogi J, Khaletskiy A, Li Z, Weydert C, Longmate JA, Huang TT, Spitz DR, Oberley LW, Li JJ. Manganese superoxide dismutase-mediated gene expression in radiation-induced adaptive responses. *Mol Cell Biol* 2003;23:2362-78
- Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann NY Acad Sci* 2000;899:136-47
- Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956;11:298-300
- Harris CA, Derbin KS, Hunte-McDonough B, Krauss MR, Chen KT, Smith DM, Epstein LB. Manganese superoxide dismutase is induced by IFN-gamma in multiple cell types. Synergistic induction by IFN-gamma and tumor necrosis factor or IL-1. *J Immunol* 1991;147:149-54
- Holvoet P, Davey PC, De Keyser D, Doukouré M, Derudder E, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G, Beaufort E, Bishay K, Andrieux N, Benhabiles N, Marguerie G. Oxidized low-density lipoprotein correlates positively with toll-like receptor 2 and interferon regulatory factor-1 and inversely with superoxide dismutase-1 expression: studies in hypercholesterolemic swine and THP-1 cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006a;26:1558-65
- Holvoet P, Jenny NS, Schreiner PJ, Tracy RP, Jacobs DR. The relationship between oxidized LDL and other cardiovascular risk factors and subclinical CVD in different ethnic groups: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Atherosclerosis* 2007;194:245-52
- Janssen YM, Marsh JP, Absher MP, Hemenway D, Vacek PM, Leslie KO, Borm PJ, Mossman BT. Expression of antioxidant enzymes in rat lungs after inhalation of asbestos or silica. *J Biol Chem* 1992;267:10625-30
- Kakko S, Päivänsalo M, Koistinen P, Kesäniemi YA, Kinnula VL, Savolainen MJ. The signal sequence polymorphism of the MnSOD gene is associated with the degree of carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2003;168:147-52
- Kaliora AC, Dedoussis GV, Schmidt H. Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. *Atherosclerosis* 2006;187:1-17
- Kanoni S, Dedoussis G, Manios Y, Malavolta M, Mocchegiani E. Health status, blood and anthropometrical indices from Greek old and nonagenarian subjects. *Biogerontology* 2006;7:329-37
- Kinnula VL, Crapo JD. Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. *Free Radic Biol Med* 2004;36:718-44
- Kinscherf R, Deigner HP, Usinger C, Pill J, Wagner M, Kamencic H, Hou D, Chen M, Schmiedt W, Schrader M, Kovacs G, Kato K, Metz J. Induction of mitochondrial manganese superoxide dismutase in macrophages by oxidized LDL: its relevance in atherosclerosis of humans and heritable hyperlipidemic rabbits. *Faseb J* 1997;11:1317-28
- Lapointe A, Couillard C, Piche ME, Weisnagel SJ, Bergeron J, Nadeau A, Lemieux S. Circulating oxidized LDL is associated with parameters of the metabolic syndrome in postmenopausal women. *Atherosclerosis* 2007;191:362-8
- Lee CM, Chien CT, Chang PY, Hsieh MY, Jui HY, Liao CS, Hsu SM, Lee YT. High-density lipoprotein antagonizes oxidized low-density lipoprotein by suppressing oxygen free-radical formation and preserving nitric oxide bioactivity. *Atherosclerosis* 2005;183:251-8
- Lee SJ, Choi MG, Kim DS, Kim TW. Manganese superoxide dismutase gene polymorphism (V16A) is associated with stages of albuminuria in Korean type 2 diabetic patients.

34 *Exp. Mol. Med. Vol. 40(1), 27-34, 2008*

Metabolism 2006;55:1-7

Lin SJ, Shyue SK, Shih MC, Chu TH, Chen YH, Ku HH, Chen JW, Tam KB, Chen YL. Superoxide dismutase and catalase inhibit oxidized low-density lipoprotein-induced human aortic smooth muscle cell proliferation: role of cell-cycle regulation, mitogen-activated protein kinases, and transcription factors. *Atherosclerosis* 2007;190:124-34

Ling C, Poulsen P, Carlsson E, Ridderstrale M, Almgren P, Wojtaszewski J, Beck-Nielsen H, Groop L, Vaag A. Multiple environmental and genetic factors influence skeletal muscle PGC-1alpha and PGC-1beta gene expression in twins. *J Clin Invest* 2004;114:1518-26

Mak JC, Leung HC, Ho SP, Ko FW, Cheung AH, Ip MS, Chan-Yeung MM. Polymorphisms in manganese superoxide dismutase and catalase genes: functional study in Hong Kong Chinese asthma patients. *Clin Exp Allergy* 2006;36:440-7

Marklund SL. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:7634-8

Masry TM, Abou Zahra MA, El Tawil MM, Khalifa RA. Manganese superoxide dismutase alanine to valine polymorphism and risk of neuropathy and nephropathy in Egyptian type 1 diabetic patients. *Rev Diabet Stud* 2005;2:70-4

McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969;244:6049-55

Mecocci P, Polidori MC, Troiano L, Cherubini A, Cecchetti R, Pini G, Straatman M, Monti D, Stahl W, Sies H, Franceschi C, Senin U. Plasma antioxidants and longevity: a study on healthy centenarians. *Free Radic Biol Med* 2000;28:1243-8

Mertens A, Holvoet P. Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. *Faseb J* 2001;15:2073-84

Mocchegiani E. Zinc and ageing: third Zincage conference. *Immun Ageing* 2007;Sep:4-5

Nakamura YK, Read MH, Elias JW, Omaye ST. Oxidation of serum low-density lipoprotein (LDL) and antioxidant status in young and elderly humans. *Arch Gerontol Geriatr* 2006;42:265-76

Nikkila M, Heikkinen J. High-density lipoprotein cholesterol and longevity. *Age Ageing* 1990;19:119-24

Ono M, Kohda H, Kawaguchi T, Ohhira M, Sekiya C, Namiki M, Takeyasu A, Taniguchi N. Induction of Mn-superoxide dismutase by tumor necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-6 in human hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;182:1100-7

Petersen KF, Befroy D, Dufour S, Dziura J, Ariyan C, Rothman DL, DiPietro L, Cline GW, Shulman GI. Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. *Science* 2003;300:1140-2

Pitsavos C, Panagiotakos DB, Chrysohou C, Stefanadis C. Epidemiology of cardiovascular risk factors in Greece: aims, design and baseline characteristics of the ATTICA study.

BMC Public Health 2003;3:32

Povey S, Lovering R, Bruford E, Wright M, Lush M, Wain H. The HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC). *Hum Genet* 2001;109:678-80

Rosenblat M, Coleman R, Aviram M. Increased macrophage glutathione content reduces cell-mediated oxidation of LDL and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 2002;163:17-28

Rosenblum JS, Gilula NB, Lerner RA. On signal sequence polymorphisms and diseases of distribution. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:4471-3

Sarov-Blat L, Kiss RS, Haidar B, Kavaslar N, Jaye M, Bertiaux M, Steplewski K, Hurle MR, Sprecher D, McPherson R, Marcel YL. Predominance of a proinflammatory phenotype in monocyte-derived macrophages from subjects with low plasma HDL-cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:1115-22

Schaefer EJ, Moussa PB, Wilson PW. Plasma lipoproteins in healthy octogenarians: lack of reduced high density lipoprotein cholesterol levels: results from the Framingham Heart Study. *Metabolism* 1989;38:293-6

Schwenke DC. Aging, menopause, and free radicals. *Semin Reprod Endocrinol* 1998;16:281-308

Sutton A, Khoury H, Prip-Buus C, Cepanec C, Pessayre D, Degoul F. The Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria. *Pharmacogenetics* 2003;13:145-57

Taufer M, Peres A, de Andrade VM, de Oliveira G, Sá G, do Canto ME, dos Santos AR, Bauer ME, da Cruz IB. Is the Val16Ala manganese superoxide dismutase polymorphism associated with the aging process? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2005;60:432-8

Tsan MF. Superoxide dismutase and pulmonary oxygen toxicity: lessons from transgenic and knockout mice. *Int J Mol Med* 2001;7:13-9

Van Remmen H, Williams MD, Guo Z, Estlack L, Yang H, Carlson EJ, Epstein CJ, Huang TT, Richardson A. Knockout mice heterozygous for Sod2 show alterations in cardiac mitochondrial function and apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281:H1422-32

Wan XS, Devalaraja MN, St Clair DK. Molecular structure and organization of the human manganese superoxide dismutase gene. *DNA Cell Biol* 1994;13:1127-36

Weisiger RA, Fridovich I. Mitochondrial superoxide simutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J Biol Chem* 1973;248:4793-6

Williams MD, Van Remmen H, Conrad CC, Huang TT, Epstein CJ, Richardson A. Increased oxidative damage is correlated to altered mitochondrial function in heterozygous manganese superoxide dismutase knockout mice. *J Biol Chem* 1998;273:28510-5

Young IS, McFarlane C, McEneny J. Oxidative modification of triacylglycerol-rich lipoproteins. *Biochem Soc Trans* 2003;31:1062-5



THE DIFFERENTIAL EFFECT OF SOD ALA16VAL POLYMORPHISM ON OXIDIZED LDL-C LEVELS IN YOUNGER AND OLDER ADULTS

G.V Dedoussis¹, S. Kanoni¹, D.B. Panagiotakos¹, E. Louizou¹, E. Grigoriou¹, C. Chrysohoou², C. Pitsavos², C. Stefanadis²

¹ Department of Dietetics and Nutrition, Harokopio University;

² First Cardiology Clinic, School of Medicine, University of Athens, Ippocraton Hospital

Background and aims: Superoxide dismutase (SOD) is part of a fundamental system, developed to prevent oxidative damage, with potential impact on the atherosclerotic and the ageing process. We sought to examine the effect of superoxide dismutase (SOD) Ala16Val polymorphism on the levels of ox-LDL-C in two Greek cohorts of middle-aged and elderly participants.

Methods: We obtained sociodemographic, genotype and biochemical data from 495 middle-aged (n=127 females: 43.2±13 years, n=268 males: 43.3±14 years) Caucasian Greek subjects and 88 elderly (n=44 females: 81.7±5 years; n=44 males: 81.4±4 years).

Results: Multiple linear regression analysis, stratified by gender and adjusted for age, smoking habits and body mass index as covariates, showed higher ox-LDL-C levels for the middle aged men with the Val/Val genotype, compared to the other allele (Ala/Ala and Ala/Val) carriers (65.9±25.7 vs. 55.7±20.5 mg/dl; standardized β coefficient=0.192, P=0.012). On the contrary, elderly women with the Ala/Ala or Ala/Val genotype occurred with higher ox-LDL-C levels compared to the Val/Val genotype (77.3±16.1 vs. 66.4±15.8 mg/dl; standardized β coefficient=0.324, P=0.044). Additionally, middle aged men with the Val/Val genotype had higher HDL-C levels compared to the Ala allele carriers, while elderly men and women with the Ala/Ala or Ala/Val genotype presented higher triglycerides levels compared to Val/Val (women: 165.0±77.2 vs. 108.5±24.7 mg/dl, P=0.001; men: 143.2±65.7 vs. 101.9±36.8 mg/dl, P=0.015).

Conclusions: The results suggest that SOD Ala16Val polymorphism is an age-dependent modulator of ox-LDL-C levels in middle-aged men and elderly women.

Received: 2007.07.30
Accepted: 2007.12.17
Published: 2008.04.01

Authors' Contribution:

- A** Study Design
- B** Data Collection
- C** Statistical Analysis
- D** Data Interpretation
- E** Manuscript Preparation
- F** Literature Search
- G** Funds Collection

Design and descriptive characteristics of the GHRAS: the Greek Health Randomized Aging Study

Stavroula Kanoni^{BCEF}, George V. Dedoussis^{ADEG}

Department of Nutrition Science and Dietetics, Harokopio University of Athens, Greece

Source of support: Departmental sources

Summary

Background:

The "GHRAS" study is aimed at investigating the interactions among socioeconomic, lifestyle, dietary, psychological, and biochemical factors determining the health status of elderly Greeks. The design and baseline sociodemographic, clinical, and dietary characteristics of the participants are presented here.

Material/Methods:

A total of 782 elderly (>60 years of age) Greeks were randomly recruited in Athens. Standardized anthropometric, biochemical, and clinical procedures and extensive questionnaires were used to assess health parameters and lifestyle factors.

Results:

A high prevalence of hypercholesterolemia was found in both men and women (78.7% vs. 90.1%, $p<0.001$) as well as hypertension (81.3% vs. 71.8, $p=0.005$). Obesity was found in 43.6% of all participants and 42.7% was overweight. Elderly women demonstrated higher mean BMI values than the men (30.2 ± 5.0 vs. 28.7 ± 4.0 , $p<0.001$). Only 13.4% of all subjects reported current smoking. The majority of the women (77.5%) had never smoked, while most of the men (53.4%) were former smokers. The women appeared more physically active and less adherent to the Mediterranean diet than the men. 36.2% of the women and 21.0% of the men had mild to severe depressive symptoms ($p<0.001$), while 28.4% of the women and 25.4% of the men had cognitive decline ($p=0.430$). A history of cardiovascular disease was present in 19.9% and diabetes in 13.9% of all participants.

Conclusions:

The prevalence of morbidity risk factors in this population is high. Further investigation is required, including the interaction of compromising factors, to clarify their impact on the health status of the elderly.

key words:

elderly • cohort • health status • diet • GHRAS study

Full-text PDF:

<http://www.medscimonit.com/fulltxt.php?ICID=850298>

Word count:

3318

Tables:

3

Figures:

3

References:

34

Author's address:

George Dedoussis, Ph.D., Asst. Prof. of Biology, Laboratory of Molecular Genetics, Department of Nutrition and Dietetics, Harokopio University of Athens, 70 El. Venizelou str., 17671 Kallithea-Athens, Greece, e-mail: dedousi@hua.gr

BACKGROUND

The increase in life expectancy and decreases in birth rate and childhood mortality are enhancing the continuing growth of the elderly European population [1]. Greece, like other developing countries, is experiencing a marked change in the age structure of its population [1]. Consequent to these altering population demographics, the necessity for an assessment of the health status of the elderly is emerging.

Aging is a heterogeneous process characterized by a general decline in physiological functions, resulting in a growing risk of chronic diseases, cognitive impairments, and mortality. Although the exact mechanisms involved are not fully elucidated, the aging process appears to be largely susceptible to a wide range of factors. Genetic background is considered to account for 25% of the variability in human longevity [2]. The remaining 75% is attributed to environmental influences. Socioeconomic characteristics and lifestyle factors such as diet, physical, activity, smoking habit, and alcohol consumption have been associated with health status, morbidity, and mortality in older adults [3,4].

Healthy aging is described as a lifelong process optimizing opportunities for improving and preserving health, physical, social, and mental wellness, independence, and quality of life [5]. Therefore the recognition of clinical, genetic, and environmental risk factors for morbidity and mortality in the elderly is essential for a better understanding of the aging process. Moreover, modifiable risk factors could be subjected to positive interventions, promoting healthy aging. In order to assess the associations between sociodemographic, dietary, clinical, and genetic factors and the risk of morbidity in an elderly urban Greek population, we conducted a cross-sectional health and nutrition study, the GHRAS. Here we present the study design and the status of various characteristics of the participants.

MATERIAL AND METHODS

Aims and study design

The main objectives of the GHRAS are: 1) to record the prevalence of cardiovascular disease, diabetes, and cardiovascular disease risk factors such as hypercholesterolemia, obesity, and hypertension in old and very old subjects, 2) to record the dietary habits of the elderly, and 3) to investigate potential interactions among socioeconomic, lifestyle, dietary, psychological, biochemical, and genetic factors influencing the health status of the elderly. To meet these aims we randomly selected Centers of Open Protection for the Elderly in the Athens region and invited their members to participate in the study. Centers of Open Protection for the Elderly are public entities that provide assistance from social workers, first-degree medical care, and recreational activities for the elderly. The Bioethics Committee of Harokopio University of Athens approved the study protocol and all subjects signed a voluntary consent form. Between February 2005 and December 2006, 782 volunteers were recruited.

Blood sampling

Prior to blood collection, the volunteers were subjected to 12-hour fasting. Blood samples were collected from the antecubital

vein between 9 and 11 a.m. Serum and plasma samples were isolated and stored at -80°C for future measurement. The blood samples were also used for DNA and RNA isolation.

Clinical, anthropometrical, and biochemical measurements

Blood pressure was measured using a mercury sphygmomanometer according to the proposed guidelines [6]. Hypertension was defined as blood pressure levels $\geq 140/90$ mmHg or the use of antihypertensive medication. The anthropometrical measurements, including weight and height, were obtained by trained clinical dietitians using standardized techniques and equipment. Body weight was measured to the nearest 0.1 kg using calibrated electronic scales with the subject barefoot and dressed in light clothing. Height was measured barefoot to the nearest 0.1 cm using a portable stadiometer. Body mass index (BMI) was calculated as weight (kg)/height (m) squared. Based upon the BMI values, the subjects were categorized into groups of underweight ($\text{BMI} < 18.5 \text{ kg/m}^2$), normal weight ($18.5 \leq \text{BMI} < 24.9 \text{ kg/m}^2$), overweight ($25.0 \leq \text{BMI} < 29.9 \text{ kg/m}^2$), and obese ($\text{BMI} \geq 30.0 \text{ kg/m}^2$). Biochemical measurements included total cholesterol, HDL-C, triglycerides, and blood glucose. LDL-C levels were calculated using the Friedewald equation. Hypercholesterolemia was defined as total cholesterol levels greater than 200 mg/dl or the use of lipid-lowering agents, while diabetes was defined as blood glucose above 125 mg/dl or the use of antidiabetic medication.

Investigated parameters

All participants were interviewed by trained personnel using a standard questionnaire. The questionnaire included questions about demographic and lifestyle characteristics, detailed medical history, dietary habits, and psychological and cognitive status evaluation.

Sociodemographic and lifestyle variables

Information about the marital status of the participants (single, married, divorced, widowed) was recorded. Their educational level was measured by the years of schooling and was defined as no education, primary education (1–6 years), secondary education (7–12 years), and tertiary education (>12 years). Smoking habits were also recorded and the participants were accordingly characterized as current smokers, never smokers, and former smokers. Physical activity was evaluated using a questionnaire which included questions about the frequency and duration (hours/week) of household and recreational activities. To quantify the intensity of physical activity, each activity was assigned a value for metabolic equivalents (MET) using a published coding system [7]. The MET unit assigned for each activity was multiplied by the average number of minutes performing each activity in a seven-day period, providing a value of physical activity in MET-min/week. Tertiles of the MET-min/week values were calculated. The participants were then categorized in one of the following groups: low physical activity (first tertile), medium physical activity (second tertile), and high physical activity (third tertile).

Medical record

A complete medical and surgery record was obtained. All participants who reported a diagnosed history of angina,

heart failure, coronary heart disease, stroke, myocardial infarction, or surgeries such as heart bypass and angioplasty were characterized as cardiovascular patients. Subjects with acute illness, cancer, autoimmune diseases, inflammatory bowel disease, kidney and liver failure, or neurodegenerative disease were excluded from the study protocol.

Dietary assessment

A quantitative food-frequency questionnaire was used for the dietary assessment. All participants reported their daily, weekly, or monthly average intake of several food items that they consumed during the last year. Then the frequency of consumption was quantified approximately in terms of the number of times a week this food was consumed. Alcohol consumption was also assessed and calculated as ml per day.

A dietary pyramid has been developed to describe the Mediterranean dietary pattern [8]. According to this dietary pattern we calculated each participant's special diet score, which assessed adherence to the Mediterranean diet (range: 0–55), as described elsewhere [9]. In brief, for the consumption of items presumed to be close to this pattern (unrefined cereals, fruit, vegetables, potatoes, legumes, fish, and olive oil), we assigned a score of 0 for no consumption and scores of 1 to 5 for rare to daily consumption. On the other hand, for the consumption of foods presumed to be away from this diet (red meat and red meat products, poultry, and full-fat dairy products), we assigned the opposite scores (i.e. 0 when a participant reported daily consumption to 5 for rare or no consumption). For alcohol we assigned a score of 5 for consumption of <300 ml/day, a score of 0 for consumption of more than 700 ml/day, and scores of 4 to 1 for consumption of 300, 400, 500, and 600 ml/day (containing 12 g of ethanol per 100 ml). Additionally, participants reported the presence of mastication problems. Following a special diet (e.g. low salt, low fat, or other) was also recorded.

Psychological and cognitive status evaluation

Symptoms of depression were assessed with the use of the Geriatric Depression Scale (GDS) questionnaire [10], as it is translated and validated for the Greek population [11]. The Geriatric Depression Scale is a well-known and reliable method for the measurement of depression in the elderly. Furthermore, cognitive functioning was evaluated in all participants with the use of the Mini Mental State Examination (MMSE) [12], as it is translated and validated for the Greek population.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with SPSS ver. 11.5. Continuous variables are presented as mean values $\pm$ the standard deviation (SD), while qualitative variables are presented as absolute and relative frequencies. The normality of the distribution of the continuous variables was assessed by the Kolmogorov-Smirnov criterion. Differences in the proportions of categorical variables were assessed using chi-squared tests. *t*-tests, Mann-Whitney tests, analyses of variance (ANOVA), and analyses of covariance (ANCOVA) were used to compare the variables among subgroups of the sam-

ple. Because of multiple comparisons, Tukey's correction was used to control for overall type I error. Correlations were evaluated by calculating the Pearson coefficient (*r*). Multiple linear regression models were applied after controlling for several potential confounders. Statistical significance was assessed at a two-tailed $p=0.05$ level.

RESULTS

The sociodemographic and lifestyle characteristics of the elderly participants are presented in Table 1. In total, 782 elderly subjects were recruited (69.9% women and 30.1% men) with a mean age of 72.2 ± 7.2 years, ranging from 60 to 95 years of age. The oldest participants (over 80 years of age) comprised 15.7% of the overall elderly cohort. The majority of the men were married (76.5%), while a larger proportion of the women were widowed (49.3%) compared with the men (17.5%). In order to further elucidate differences in the demographic characteristics between genders, we divided our cohort into three age groups (60–69, 70–79, and 80–95 years of age). As shown in Figure 1A, larger proportions of men in all the age groups were married compared with their female counterparts, while the opposite was found for the widowers. The majority of the elderly subjects reported primary education (53.8%) and only a 7.7% of the participants were illiterate. There was no significant difference in educational level between men and women (Table 1). However, when the total years of schooling were considered, men had significantly more years of education than women (8.0 ± 4.5 vs. 7.4 ± 4.5 years, respectively, $p=0.001$ adjusted for age). Furthermore, when investigating the educational level of the participants per age group, we found a significant gender-specific difference within the 69–70 years age group. As presented in Figure 1B, more women reported primary education than men (58.7% vs. 47.8%), while more men reported tertiary education than women (16.5% vs. 8.5%).

Considering smoking, 13.4% of all subjects reported current smoking, equally distributed in both genders. However, the majority of women (77.5%) had never smoked, while the majority of men (53.4%) were former smokers. Women appeared more physically active than men. The majority of women reported medium (36.2%) and high (43.3%) physical activity level. In contrast, most of the men (63.1%) reported low physical activity. This difference was apparent between men and women in the age group of 60–69 years of age ($\chi^2=78.36$, $p<0.001$) and in the age group of 70–79 years of age ($\chi^2=85.21$, $p<0.001$), as illustrated in Figure 1C. Nevertheless, this difference was reduced among the oldest participants (80–95 years old) (Figure 1C).

High prevalences of hypercholesterolemia (86.7%) and hypertension (74.7%) were documented in our cohort. As presented in Table 2, hypercholesterolemia was more prevalent in women (90.1%) than in men (78.7%), while hypertension was more prevalent in men (81.3%) than in women (71.8%). Among the hypercholesterolemic subjects only 27.7% received antilipidemic medication and 39.2% reported following a low-fat diet. Both hypercholesterolemic men and women reported similar compliance to lipid-lowering medication (24.3% and 29.0%, respectively, $p=0.248$). However, more hypercholesterolemic women were on a low-fat diet than men (42.0% vs. 31.9%, respectively, $p=0.017$).

Table 1. Sociodemographic and lifestyle characteristics of the Greek old cohort.

Sociodemographic variables	Women		Men		p
N	547		235		
Age (years) (Mean ±SD)	71.2±6.9		74.6±7.3		<0.001
Oldest old (≥80 years) (n,%)	65	(11.9)	58	(24.5)	<0.001
Marital status					
Single (n,%)	15	(2.8)	5	(2.1)	<0.001
Married (n,%)	216	(39.5)	180	(76.5)	
Divorced (n,%)	46	(8.5)	9	(3.8)	
Widowed (n,%)	270	(49.3)	41	(17.5)	
Education					
No education (n,%)	49	(8.9)	12	(5.1)	0.070
Primary (n,%)	305	(55.8)	120	(50.9)	
Secondary (n,%)	136	(24.8)	74	(31.6)	
Tertiary (n,%)	57	(10.5)	29	(12.4)	
Smoking habits					
Current smokers (n,%)	68	(12.4)	37	(15.8)	<0.001
Former smokers (n,%)	55	(10.1)	126	(53.4)	
Non smokers (n,%)	424	(77.5)	72	(30.8)	
Physical activity					
Low (n,%)	112	(20.5)	148	(63.1)	<0.001
Medium (n,%)	198	(36.2)	63	(26.6)	
High (n,%)	237	(43.3)	24	(10.3)	

Among the hypertensive subjects, 76.5% used antihypertensive medication and 31.7% reported adherence to a low-salt diet, without significant differences between genders.

The women had higher mean plasma levels of total cholesterol, HDL-C, and LDL-C compared with the men (Table 2). However, after dividing our cohort into three age groups, differences in blood lipid levels between genders were significant only for the age groups of 60–69 and 70–79 years of age (Figure 2A–D). On the other hand, men had higher blood pressure and fasting plasma glucose levels than women (Table 2). Interestingly, when investigating blood pressure and plasma glucose levels within age groups, only diastolic blood pressure measurements were significantly higher in the men than in the women in the age groups of 70–79 and 80–95 years of age. These results are illustrated in Figure 2E–G. Diabetes was prevalent in 13.9% of all participants, but higher percentages of diabetics were recorded among men (20.0%) than among women (11.3%) (Table 2). A history of cardiovascular disease was reported by 19.9% of the participants, mostly men (31.1% of the men and 15.2% of the women) (Table 2).

Levels of total cholesterol negatively correlated with advancing age (standardized β =−0.083, p =0.018, after con-

trol for sex and antilipidemic medication), as illustrated in Figure 3A. In contrast, systolic blood pressure levels were significantly increased with age (standardized β =0.146, p <0.001, after control for sex and antihypertensive treatment) (Figure 3B).

Obesity was prevalent in 43.6% of all the elderly and 42.7% of the study population was overweight. Altogether, 86.3% of our cohort had BMI levels above 29.9 kg/m², while only 13.5% had normal weight and 0.3% was underweight. Elderly women demonstrated higher mean BMI values than the men (30.2 $\pm$ 5.0 vs. 28.7 $\pm$ 4.0, p <0.001). Obesity was more prevalent among elderly women than men (47.7% vs. 33.9%), while elderly men demonstrated higher percentages of overweight than women (49.8% vs. 39.7%) (Table 2). There was no significant correlation between BMI level and age in the overall cohort. However, the group of the oldest participants ($\geq$ 80 years of age) demonstrated significant lower BMI levels than participants aged 60–79 years (28.1 $\pm$ 4.0 vs. 30.1 $\pm$ 4.9 kg/m², p =0.001, after sex adjustment).

The weekly frequency of several food groups consumed by the participants is illustrated in Table 3. The elderly men had greater consumption than women of most of the food groups, except for similar consumption of unrefined grains, fruits, poultry, and dairy products. Furthermore,

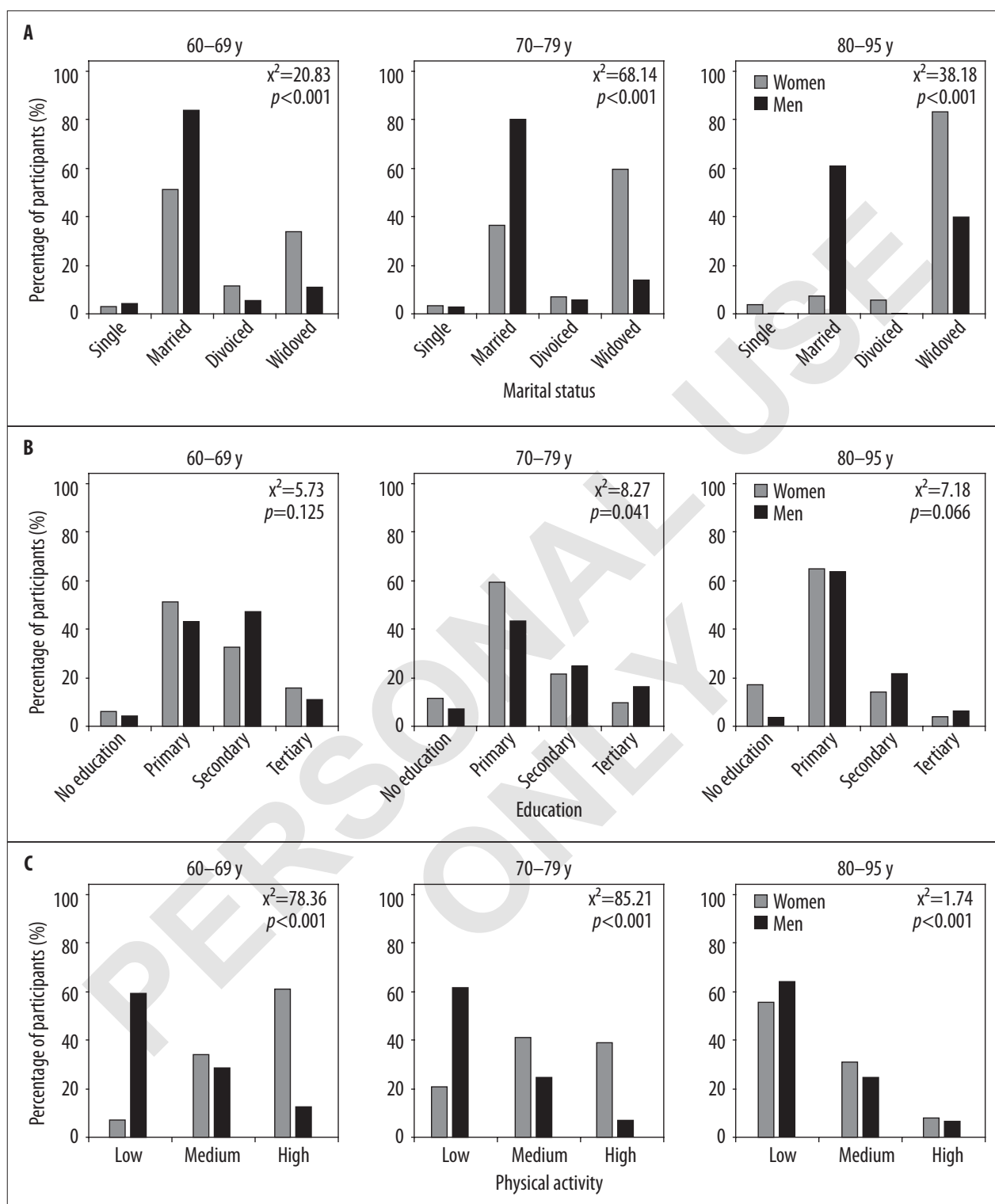


Figure 1. Differences in marital status (A), educational level (B), and physical activity (C) between women and men, stratified by age group.

96.1% of the participants used olive oil in their food. A total of 19.9% (20.8% of women and 17.9% of men, $p=0.379$) of the participants reported mastication problems. Adherence to the Mediterranean diet as assessed by the diet score was significantly greater among the men than the women (Table 3). Married participants had significantly higher mean Mediterranean diet scores than widowers (30.5 ± 3.2 vs. 29.4 ± 2.9 , $p=0.027$, after age and sex adjustments).

The elderly women had significant higher values of the geriatric depression scale than the men (4.0 ± 3.5 vs. 2.83 ± 3.0 , $p=0.040$, after age and marital status adjustment). Consequently, the distribution of the depression categories differed significantly between women (63.8% normal, 26.2% mild depression, and 10.0% moderate to severe depression) and men (79.0% normal, 15.0% mild depression, and 6.0% moderate to severe depression) ($p<0.001$). Depression (higher scores in the depression scale) was pos-

Table 2. Clinical characteristics of the participants stratified by gender*.

Clinical variables	Women (n=547)		Men (n=235)		p
BMI (kg/m ²)	30.2±5.0**		28.7±4.0		<0.001
Total cholesterol (mg/dl)	237.9±40.8		222.0±40.6		<0.001
HDL-C (mg/dl)	56.7±12.1		51.0±11.6		<0.001
LDL-C (mg/dl)	155.6±36.3		144.9±35.4		0.003
Triglycerides (mg/dl)	127.7±54.1		132.2±69.3		0.536
Glucose (mg/dl)	101.1±22.2		107.4±29.9		0.003
Systolic blood pressure (mmHg)	139.1±18.2		143.7±18.1		0.033
Diastolic blood pressure (mmHg)	77.2±10.0		79.3±11.0		0.006
Underweight (%)	1	(0.2)	1	(0.4)	0.005
Normal weight (%)	68	(12.4)	37	(15.9)	
Overweight (%)	217	(39.7)	117	(49.8)	
Obesity (%)	261	(47.7)	80	(33.9)	<0.001
Hypercholesterolemia (%)	493	(90.1)	185	(78.7)	
Diabetes (%)	62	(11.3)	47	(20.0)	
Hypertension (%)	393	(71.8)	191	(81.3)	0.005
Cardiovascular disease (%)	83	(15.2)	73	(31.1)	<0.001

* Age adjustment was performed for all comparisons between genders; ** Mean ±SD.

itively associated with advancing age ($\beta=0.097$, $p=0.010$, after control for gender and marital status). Referring to the MMSE questionnaire, there was no significant difference between men and women after adjusting for age and education level (25.6 ± 4.2 vs. 25.0 ± 4.8 , $p=0.078$). Scoring in the MMSE was indicative of normal cognition for 71.6% of the women and 74.6% of the men ($p=0.430$). Low scores in the MMSE (declined cognition) negatively associated with age ($\beta=-0.201$, $p<0.001$, after control for gender and education).

DISCUSSION

Here we presented the design and sociodemographic, life-style, dietary, clinical, and psychological characteristics of the Greek Health Randomized Aging Study (GHRAS). The majority of the men were married (76.5%), while a greater proportion of the women were widowed (49.3%) compared with the men (17.5%). The majority of the elderly subjects reported primary education (53.8%) and only a 7.7% of the participants were illiterate, while the men had significantly more years of education than the women. The sociodemographic characteristics of our elderly cohort are in accordance with previously published data [13,14]. Only 13.4% of all the subjects reported current smoking. The majority of the women (77.5%) had never smoked, while the majority of the men (53.4%) were former smokers. The women appeared more physically active and less adherent to the Mediterranean diet than the men. A history of cardiovascular disease was present in 19.9% of the participants (31.1% of men and 15.2% of women). Diabetes was prevalent in 13.9% of all participants, similar to previously published results [15].

We recorded a high prevalence of hypercholesterolemia (86.7%) in our elderly cohort, with only 27.7% of the participants being treated with lipid-lowering agents and 39.2% following a dietary treatment. A high prevalence of hypercholesterolemia in elderly populations has been well documented in other large-scale cohorts [16–18]. Furthermore, the elderly Greek women had higher total cholesterol and HDL-C levels than the men. This finding is in accordance with other studies, suggesting that elderly women consistently have higher total cholesterol and HDL-C levels than their male counterparts [19–21]. Additionally, we demonstrated an age-related decline in total cholesterol levels (Figure 1A), as has been previously shown [22,23].

A total of 74.7% of our elderly population was accounted as hypertensive. A higher prevalence of hypertension was found among the elderly men than the women (81.3% vs. 71.8%, respectively). The majority of the hypertensive participants received antihypertensive treatment (76.5%), while only 31.7% reported following a low-salt diet. Similar percentages of hypertensive elderly persons were reported in another Greek study [24]. We also demonstrated an increase in mean systolic blood pressure levels with advancing age (Figure 1B). Data from the Framingham Heart Study indicated that systolic blood pressure increases continuously with age [25]. The age-dependent rise in systolic blood pressure is largely determined by progressive stiffening of central elastic arteries, which reflects the biological aging of the arterial system [26].

Obesity was prevalent in 43.6% of all the GHRAS participants and 42.7% of the study population was overweight. Altogether, 86.3% of our cohort was overweight or obese, while only 13.5%

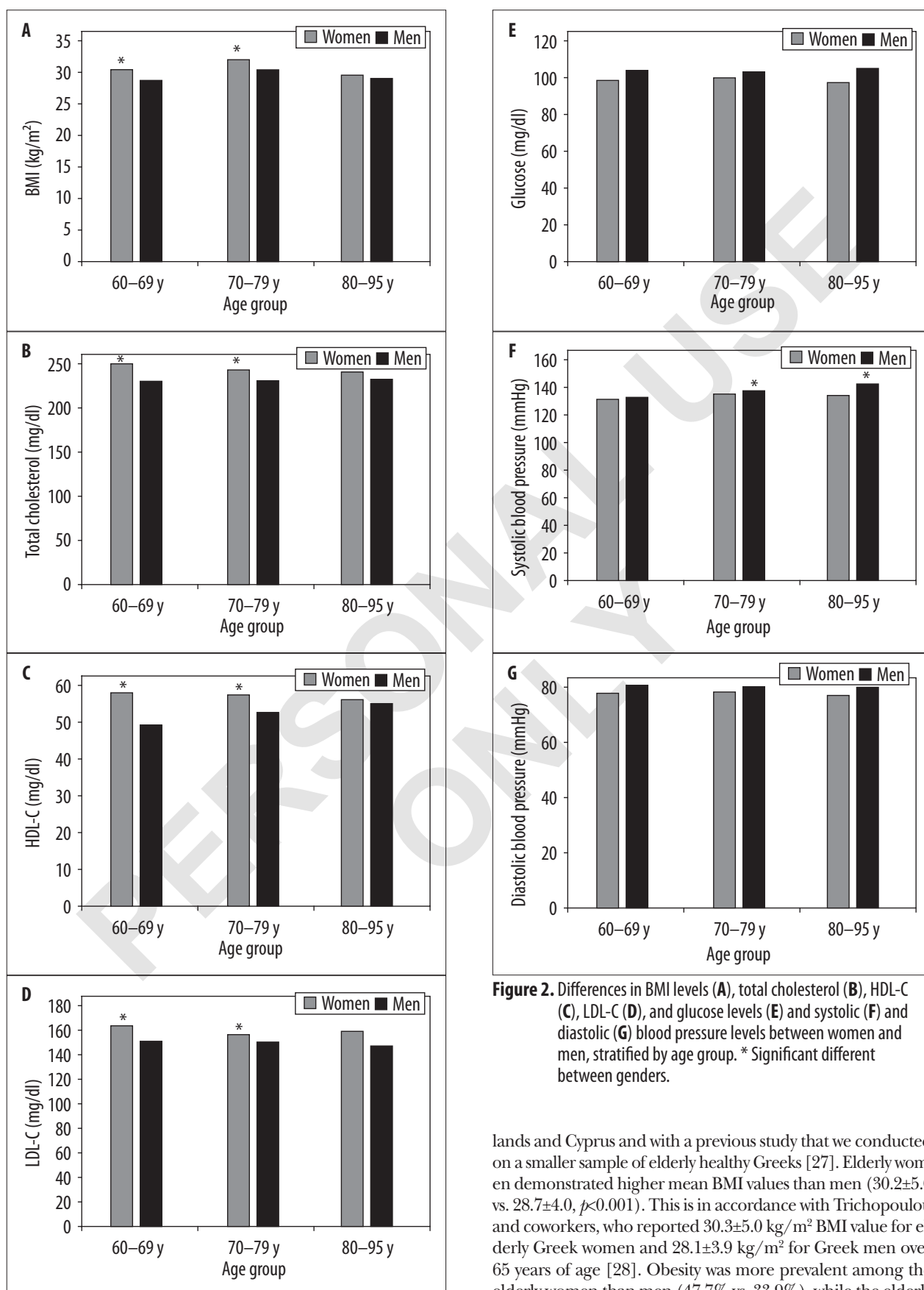


Figure 2. Differences in BMI levels (A), total cholesterol (B), HDL-C (C), LDL-C (D), and glucose levels (E) and systolic (F) and diastolic (G) blood pressure levels between women and men, stratified by age group. * Significant different between genders.

had normal weight and 0.3% was underweight. These results are in line with recently published data from the 'MEDIS' study [14], documenting 42% obesity among the elderly on Greek is-

lands and Cyprus and with a previous study that we conducted on a smaller sample of elderly healthy Greeks [27]. Elderly women demonstrated higher mean BMI values than men (30.2 ± 5.0 vs. 28.7 ± 4.0 , $p < 0.001$). This is in accordance with Trichopoulou and coworkers, who reported 30.3 ± 5.0 kg/m² BMI value for elderly Greek women and 28.1 ± 3.9 kg/m² for Greek men over 65 years of age [28]. Obesity was more prevalent among the elderly women than men (47.7% vs. 33.9%), while the elderly men demonstrated higher percentages of overweight than the women (49.8% vs. 39.7%). The prevalence of overweight and obesity in elderly populations varies widely with geographical location and study design. It has been recently documented

This copy is for personal use only - distribution prohibited.

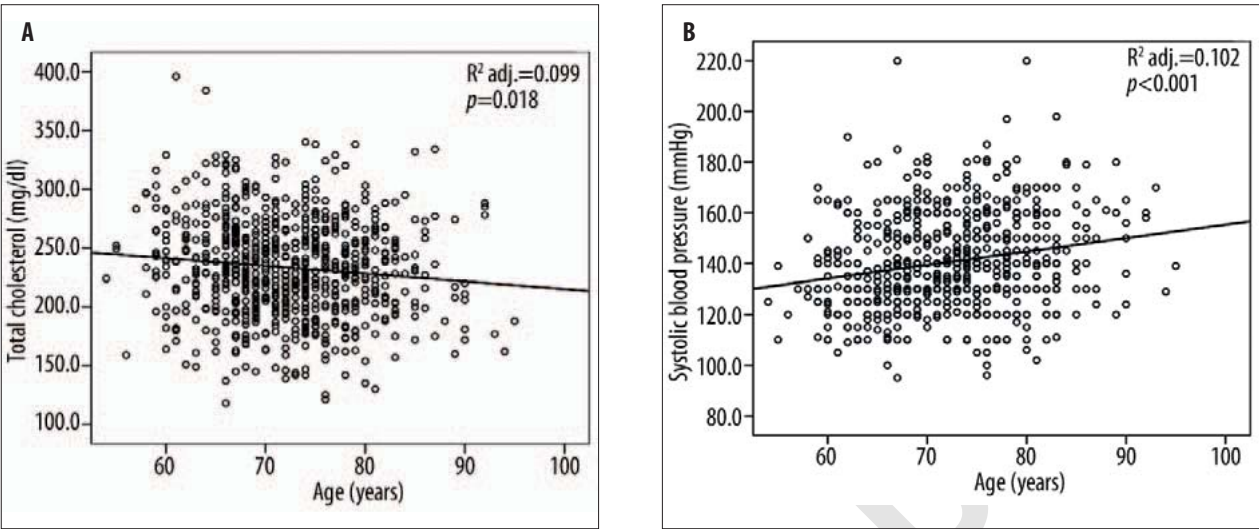


Figure 3. Negative correlation between age and total cholesterol levels (A) and positive correlation between age and systolic blood pressure levels (B) in the elderly participants.

Table 3. Weekly frequency of food groups consumed by the recruited elderly women and men.

Dietary variables	Women (n=547)	Men (n=235)	p
Refined grain (servings/week)	13.1±12.2*	17.4±13.0	<0.001
Unrefined grain (servings/week)	7.7±10.3	6.5±11.2	0.291
Fruits (servings/week)	17.1±10.2	16.7±10.8	0.711
Vegetables (servings/week)	9.8±3.8	10.3±4.2	0.005
Potatoes (servings/week)	1.8±1.3	2.2±1.4	0.003
Legumes (servings/week)	2.1±1.0	2.6±1.2	0.032
Fish (servings/week)	2.2±1.3	2.5±1.5	0.004
Poultry (servings/week)	1.7±1.0	1.7±1.2	0.367
Red meat and products (servings/week)	2.8±1.9	3.6±3.3	<0.001
Dairy products (servings/week)	22.2±10.2	23.1±10.5	0.388
Sweets (servings/week)	5.3±4.3	5.9±5.8	0.032
Alcohol (ml/day)	27.9±55.6	94.6±138.7	<0.001
Mediterranean diet score (1–55)	29.7±3.0	30.7±3.4	<0.001

* Mean ±SD.

that in Europe the prevalence of obesity in the elderly ranges from 12.8% in Sweden to 20.2% in Spain for men and from 12.3% in Switzerland to 25.6% in Spain for women [29]. In the Mediterranean basin, the prevalence of overweight and obesity in elderly populations is generally high. In a cross-sectional study of 3356 elderly Italians (65–84 years old), 48.6% of the men and 54.9% of the women were overweight or obese [30], while in southern Italy [31] the prevalence was higher (76.0% for men and 86.0% for women). Similarly, in a Spanish cohort older than 60 years of age, the prevalence of overweight and obesity was estimated at 49.0% and 31.5% for the men and 39.8% and 40.8% for the women, respectively [32].

Depression symptomatology was present in 36.2% of the elderly women and 21.0% of the men, while cognitive decline

was determined in 28.4% of the women 25.4% of the men. These findings are in accordance with a previous investigation in an elderly Greek population [33]. Furthermore, advancing age strongly correlated (after control for potential cofactors) with higher scoring on the Geriatric Depression Scale and lower on the MMSE in the present study. Age and female gender have already been documented as risk factors of depression in the elderly [34].

CONCLUSIONS

The GHRAS is aimed at investigating the interactions among genetic and environmental factors determining the health status of elderly Greeks. Here we presented the design and sociodemographic, lifestyle, dietary, clinical, and psycho-

CR

logical characteristics of the participants. Further investigation of possible interactions among these factors would reveal their impact on the health status and well-being of elderly Greeks.

REFERENCES:

1. EURODIET: Nutrition & Diet for Healthy Lifestyles in Europe. Working Party 1. Draft Report, Draft 7, 2000; 30.04.2000
2. Cournil A, Kirkwood TBL: If you would live long, choose your parents well. *Trends Genet*, 2001; 17: 233–35
3. Haveman-Nies A, De Groot LC, Van Staveren WA: Dietary quality, life-style factors and healthy ageing in Europe: the SENECA study. *Age Ageing*, 2003; 32: 427–34
4. Peel NM, McClure RJ, Bartlett HP: Behavioral determinants of healthy aging. *Am J Prev Med*, 2005; 28: 298–304
5. Health Canada. Workshop on healthy aging. Available at: www.hc-sc.gc.ca/seniors-aines/pubs/workshop_healthaging/pdf/workshop1_e.pdf. Accessed February 10, 2004
6. Joint National Committee: The seventh report of the Joint National Committee on detection, evaluation, and treatment of high blood pressure (JNC V), 2003, NIH Publication No. 03-5233
7. Ainsworth BE, Haskell WL, Whitt MC et al: Compendium of physical activities: an update of activity codes and MET intensities. *Med Sci Sports Exerc*, 2000; 32: S498–504
8. Willett WC, Sacks F, Trichopoulou A, Trichopoulos D: Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. *Am J Clin Nutr*, 1995; 6: 1402S–6S
9. Panagiotakos DB, Pitsavos C, Arvaniti F, Stefanadis C: Adherence to the Mediterranean food pattern predicts the prevalence of hypertension, hypercholesterolemia, diabetes and obesity, among healthy adults; the accuracy of the MedDietScore. *Prev Med*, 2007; 44: 335–40
10. Yesavage JA, Brink TL, Rose TL et al: Development and validation of a geriatric depression screening scale: A preliminary report. *J Psychiatr Res*, 1983; 17: 37–49
11. Fountoulakis KN, Tsolaki M, Iacovides A et al: The validation of the short form of Geriatric Depression Scale (GDS) in Greece. *Aging: Clin Exp Res*, 1999; 11: 367–72
12. Folstein MF, Folstein SE: "MINI-MENTAL STATE" a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res*, 1975; 12: 189–98
13. Slimani N, Kaaks R, Ferrari P et al: European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) calibration study: rationale, design and population characteristics. *Public Health Nutr*, 2002; 5: 1125–45
14. Panagiotakos DB, Zeimbekis A, Boutziouka V et al: Long-term fish intake is associated with better lipid profile, arterial blood pressure, and blood glucose levels in elderly people from Mediterranean islands (MEDIS epidemiological study). *Med Sci Monit*, 2007; 13(7): 307–12
15. Melidonis AM, Tournis SM, Kompoti MK et al: Increased prevalence of diabetes mellitus in a rural Greek population. *Rural Remote Health*, 2006; 6: 534
16. Polychronopoulos E, Panagiotakos DB, Polystiopi A: Diet, lifestyle factors and hypercholesterolemia in elderly men and women from Cyprus. *Lipids Health Dis*, 2005; 4: 17–23
17. Costa J, Borges M, Oliveira E et al: Incidence and prevalence of hypercholesterolemia in Portugal: a systematic review. Part I. *Rev Port Cardiol*, 2003; 22: 569–77
18. Gabriel R, Saiz C, Susi R et al: Epidemiology of lipid profile of the Spanish elderly population: the EPICARDIAN study. *Med Clin (Barc)*, 2004; 122: 605–9
19. Schupf N, Costa R, Luchsinger J et al: Relationship between plasma lipids and all-cause mortality in nondemented elderly. *J Am Geriatr Soc*, 2005; 53: 219–26
20. LaRosa JC: Dyslipidemia and coronary artery disease in the elderly. *Clin Geriatr Med*, 1996; 12: 33–40
21. Abbott RD, Wilson PW, Kannel WB, Castelli WP: High-density lipoprotein cholesterol, total cholesterol screening and myocardial infarction. The Framingham study. *Arteriosclerosis*, 1998; 8: 207–11
22. Weverling-Rijnsburger AWE, Blauw GJ, Lagaay AM et al: Total cholesterol and risk of mortality in the oldest old. *Lancet*, 1997; 350: 1119–23
23. Abbott RD, Yano K, Hakim AA: Changes in total and high-density lipoprotein cholesterol over 10- and 20-year periods (The Honolulu Heart Program). *Am J Cardiol*, 1998; 82: 172–78
24. Psaltopoulou T, Orfanos P, Naska A et al: Prevalence, awareness, treatment and control of hypertension in a general population sample of 26 913 adults in the Greek EPIC study. *Intern J Epidemiol*, 2004; 33: 1345–52
25. Franklin SS, Gustin W, Wong ND et al: Hemodynamic patterns of age-related changes in blood pressure: the Framingham Heart Study. *Circulation*, 1997; 96: 308–15
26. Aviv A: Pulse Pressure and Human Longevity. *Hypertension*, 2001; 37: 1060–66
27. Kanoni S, Dedoussis G, Manios Y et al: Health status, blood and anthropometrical indices from Greek old and nonagenarian subjects. *Biogerontology*, 2006; 7: 329–37
28. Trichopoulou A, Gnardellis C, Lagiou A et al: Body mass index in relation to energy intake and expenditure among adults in Greece. *Epidemiology*, 2000; 11: 333–36
29. Andreyeva T, Michaud PC, van Soest A: Obesity and health in Europeans aged 50 years and older. *Public Health*, 2007; 121: 497–509
30. Perissinotto E, Pisent C, Sergi G et al: Anthropometric measurements in the elderly: age gender differences. *Br J Nutr*, 2002; 87: 1–11
31. Barbagallo CM, Cavera G, Sapienza M et al: 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
32. Gutierrez-Fisac JL, Lopez E, Banegas JR et al: Prevalence of overweight and obesity in elderly people in Spain. *Obes Res*, 2004; 12: 710–15
33. Argyriadou S, Melissopoulou H, Krania E et al: Dementia and depression: two frequent disorders of the aged in primary health care in Greece. *Family Practice*, 2001; 18: 87–91
34. Heun R, Hein S: Risk factors of major depression in the elderly. *Eur Psychiatry*, 2005; 20: 199–204

Mediterranean diet and plasma concentration of inflammatory markers in old and very old subjects in the ZINCAGE population study

George V. Dedoussis^{1,a,*}, Stavroula Kanoni^{1,a}, Erminia Mariani^{2,3}, Luca Cattini^{2,3}, Georges Herbein⁴, Tamas Fulop⁵, Audrey Varin⁴, Lothar Rink⁶, Jolanta Jajte⁷, Daniela Monti⁸, Fiorela Marchellini⁹, Marco Malavolta⁹ and Eugenio Mocchegiani⁹

¹ Department of Nutrition Science and Dietetics, Harokopio University of Athens, Athens, Greece

² Laboratory of Immunology and Genetics, Istituto di Ricerca Codivilla-Putti, Bologna, Italy

³ Department of Internal Medicine and Gastroenterology, University of Bologna, Bologna, Italy

⁴ Department of Virology, Franche-Comte University, Besançon, France

⁵ Research Center on Aging, Immunology Program, Geriatric Division, Faculty of Medicine, University of Sherbrooke, Sherbrooke, Canada

⁶ Institute of Immunology, RWTH-Aachen, Aachen, Germany

⁷ Department of Toxicology, Faculty of Pharmacy, Medical University of Lodz, Lodz, Poland

⁸ Department of Pathology and Oncology, University of Florence, Florence, Italy

⁹ Immunology Centre (Section: Nutrition, Immunity and Ageing), Research Department INRCA, Ancona, Italy

Abstract

Background: Aging is associated with low-grade elevation of circulating inflammatory markers, leading to increased risk of morbidity and mortality. The Mediterranean diet has been suggested as a determinant of longevity. In the current study, we investigated the impact of the Mediterranean diet on inflammatory status in old subjects.

Methods: Within the ZINCAGE study, 957 healthy old subjects (≥ 60 years old) from five European countries were recruited. Plasma interleukin (IL)-6, IL-8, monocyte chemoattractant protein, tumor necrosis factor- α , high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and erythrocyte sedimentation rate (ESR) were measured. Dietary data were collected applying a food frequency

questionnaire and were used to estimate adherence to the Mediterranean diet.

Results: The Italians presented the greatest adherence to the Mediterranean diet, while the Polish the poorest. In females, higher diet score was significantly associated with lower body mass index and ESR and higher HDL-C levels ($\beta = -0.127$, $p = 0.003$; $\beta = -0.144$, $p = 0.001$; $\beta = 0.144$, $p = 0.029$, respectively). In males, diet score was negatively associated with IL-8 levels ($\beta = -0.101$, $p = 0.044$). The Mediterranean diet was associated with reduced IL-8 concentrations in Greeks ($\beta = -0.213$, $p = 0.007$).

Conclusions: There were significant effects of the components of the Mediterranean diet on inflammation markers. The Mediterranean diet score is useful in assessing nutritional influence on immune status. Clin Chem Lab Med 2008;46:990–6.

Keywords: elderly; inflammatory markers; Mediterranean diet; ZINCAGE study.

Introduction

Ageing is characterized by phenotypic and functional changes of the immune system, leading to increased systemic inflammation and thus to increased risk of infectious, autoimmune and neoplastic diseases and mortality. Moreover, a dysregulation of the acute phase response has been suggested as an important contributor to immunosenescence (1–3).

Age-related inflammation also involves elevation of circulating cytokines and chemokines (1). Among the cytokines, interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) have been positively associated with advancing age in several studies (4–9). Regarding chemokines, studies have shown that IL-8 and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) levels also increase with age (8, 10–13). Low-grade elevation of inflammatory mediators is associated with frailty, cardiovascular disease and all-cause mortality in the elderly (1, 6).

The association of nutrition with chronic diseases has gained large scientific interest. While several nutrients have been suggested to have anti-inflammatory effects (14), there is growing evidence that certain dietary patterns, such as the Mediterranean diet, may contribute to decreased inflammatory markers (15) and longevity (16–19). It is suggested that due to the interrelated effect of nutrients on health and disease, the overall dietary pattern evaluation would be more efficient in investigating associations between nutrition and health status (14, 20). The Mediterranean dietary pattern has been associated, in

^aGeorge V. Dedoussis and Stavroula Kanoni contributed equally to this work.

*Corresponding author: George V. Dedoussis, PhD, Assistant Professor of Biology, Department of Nutrition and Dietetics, Laboratory of Molecular Genetics, Harokopio University of Athens, 70 El. Venizelou str, 17671 Kallithea-Athens, Greece
Phone: +30-210-9549304, Fax: +30-210-9577050, E-mail: dedousi@hua.gr

Received December 12, 2007; accepted March 20, 2008; previously published online May 22, 2008

large cohorts, with reduced cardiovascular disease risk, incidence of cancer and overall mortality (16, 19, 21–24).

Within the ZINCAGE project, biochemical, genetic and lifestyle factors for healthy ageing are studied in a European cohort (25). For the purpose of the current study, healthy elderly subjects (≥ 60 years) were recruited, and dietary data and inflammatory markers were evaluated. We applied a Mediterranean diet score, representing adherence to the Mediterranean diet, to investigate its impact on inflammatory status in European old subjects.

Materials and methods

Subjects and study design

The study was carried out on a sample of 957 (209 from France, 163 from Greece, 143 from Germany, 301 from Italy and 141 from Poland) healthy non-institutionalized men and women > 60 years of age. Moreover, the participants of the study had to be free of medication, such as steroids, diuretics, anticonvulsants, anti-depressive drugs, antibiotics, antimetabolites, non-steroid anti-inflammatory drugs and micronutrient supplementation. Subjects were excluded if they had autoimmune, neurodegenerative, cardiovascular, kidney or liver disease, diabetes, infections, cancer, chronic inflammatory bowel disease or acrodermatitis enteropathica, sickle cell anemia, chronic skin ulcerations and endocrine disorders. Medical history was recorded by the family doctor or through a medical examination when possible. Smoking habits were also recorded using a standardized questionnaire. Current smokers were defined as those who smoked at least one cigarette per day. Ethical approval was obtained at all of the centers of recruitment and all subjects signed an informed consent form. The study was part of “Nutritional zinc, oxidative stress and immunosenescence: biochemical, genetic and lifestyle implications for healthy ageing – ZINCAGE” (25).

Anthropometric and biochemical measurements

The anthropometrical measurements, including weight and height, were obtained using standardized techniques and equipment. Body mass index (BMI) was calculated as weight/height squared (kg/m^2). Also, blood samples were collected after 12 h fasting. Plasma concentrations of IL-6, IL-8, MCP-1 and TNF- α were simultaneously evaluated using commercially available multiplex bead-based sandwich immunoassay kits (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), as described elsewhere (8). Additionally, erythrocyte sedimentation rate (ESR) and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) values were also measured.

The Mediterranean diet score

A food frequency questionnaire, designed for the needs of ZINCAGE, was used for the dietary assessment. The questionnaire included all major food groups and food items with high zinc content. All participants reported their daily, weekly or monthly average intake of several food items that they consumed during the last year. Then, the frequency of consumption was quantified approximately in terms of the number of times a week this food was consumed. Alcohol consumption was also assessed and calculated as mL/day.

A dietary pyramid has been developed to describe the Mediterranean dietary pattern (26). According to this dietary pattern we calculated each participant's special diet score, which assessed adherence to the Mediterranean diet (range 0–55), as described elsewhere (27). In brief, for the consumption of items presumed to be close to this pattern (non-refined cereals, fruit, vegetables, potatoes, legumes, fish and olive oil), we assigned a score of 0 for no consumption and scores 1–5 for rare to daily consumption. On the other hand, for the consumption of foods presumed to be away from this diet (red meat and red meat products, poultry and full-fat dairy products), we assigned the opposite scores (i.e., 0 when a participant reported daily consumption to 5 for rare or no consumption). For alcohol, we assigned a score of 5 for consumption of < 300 mL/day, a score of 0 for consumption of more than 700 mL/day, and scores of 1–4 for consumption of 300, 400, 500 and 600 mL/day (containing 12 g of ethanol per 100 mL).

Statistical methods and analysis

Statistical analysis was performed with SPSS version 11.5 (Leed Tools, Chicago, IL, USA). Continuous variables are presented as mean values $\pm$ standard deviation (SD). The normal distribution of the investigated variables was assessed through the Kolmogorov-Smirnov criterion. Due to a skewed distribution, log-transformed values of diet score, plasma IL-6, IL-8, MCP-1, TNF- α and ESR values were used. Correlations were evaluated by calculation of Pearson r coefficient. Student's t -test, analyses of variance and analyses of covariance were used to compare the variables among subgroups of the sample. Because of multiple comparisons, Tukey's correction was used to control for overall type I error. Multiple linear regression models were applied, after controlling for several potential confounders. All reported p -values are based on two-sided tests and were compared with a significance level of 5%.

Results

A total of 957 old and oldest old subjects (209 from France, 143 from Germany, 163 from Greece, 301 from Italy and 141 from Poland) participated in the study. Demographic, biochemical and diet characteristics of the participants are shown in Table 1. Current smoking was recorded only in 9.0% of all elderly subjects.

Among the groups examined, those in Italy had the highest Mediterranean diet score, followed by the German, the French, the Greek and lastly the Polish groups (Figure 1A). Multiple comparisons showed similar diet score values for Germany, France and Greece ($p=0.441$, adjusted for age and gender). Italy had the highest diet score values compared to all other centers ($p<0.020$, adjusted for age and gender), while Poland had the lowest diet score values ($p<0.015$, adjusted for age and gender).

The same order of magnitude was observed among males (Figure 1B). Italian males had the highest diet score compared to all others ($p<0.004$, adjusted for age), while German, French and Greek males had similar diet score values ($p>0.997$, adjusted for age). Polish males had the lowest diet score compared to all others ($p<0.020$, adjusted for age), except for Greek males ($p=0.061$, adjusted for age). Concerning

Table 1 Characteristics of the healthy old and oldest old participants of the ZINCAGE study.

		France	Germany	Greece	Italy	Poland
n	Male	98	100	60	115	52
	Female	111	43	103	186	89
Age, years	Male	68.4±6.2 ^a	69.7±4.8	73.3±6.2	77.2±9.1	72.7±6.2
	Female	68.4±6.1	70.3±4.9	71.0±6.3 ^b	79.9±10.0 ^b	71.0±7.2
BMI, kg/m ²	Male	25.7±2.8	25.3±2.5	28.2±3.5	25.5±3.3	25.8±3.1
	Female	23.6±3.3 ^b	23.9±3.2 ^b	30.1±3.4 ^c	24.2±3.9 ^c	27.2±3.7 ^b
IL-6, pg/mL	Male	118.2±396.9	21.2±17.2	12.8±4.6	21.3±13.1	27.8±24.4
	Female	74.3±159.8	22.0±20.9	13.6±4.6	20.7±10.9	23.9±14.0
IL-8, pg/mL	Male	129.8±286.8	8.7±4.8	8.2±3.6	9.2±7.0	23.5±37.7
	Female	196.2±485.9	8.8±5.5	8.4±4.2	13.3±18.5 ^d	37.5±142.0
MCP-1, pg/mL	Male	119.3±68.2	140.1±74.2	93.9±37.8	85.9±39.7	136.9±73.5
	Female	135.9±208.6	124.7±49.0	91.1±35.2	82.2±42.4	174.8±372.8
TNF-α, pg/mL	Male	119.8±70.2	92.5±48.0	57.0±24.0	64.3±40.1	80.2±66.8
	Female	119.0±43.9	93.5±44.7	60.6±25.2	56.9±42.5	72.9±44.1
HDL-C, mg/dL ^e	Male	59.2±12.2	59.9±13.0	54.7±12.3	56.6±12.8	47.8±9.8
	Female	70.9±13.4 ^b	75.8±17.3 ^b	61.0±13.4 ^c	57.4±17.5	57.0±11.7 ^b
ESR, mm/h	Male	9.6±8.4	5.6±4.5	14.1±12.0	14.3±12.1	12.1±13.7
	Female	16.1±9.6 ^d	8.8±6.0 ^d	24.5±17.1 ^d	18.0±12.5 ^d	20.5±11.1 ^d
Diet score	Male	29.1±4.4	29.3±4.8	29.0±4.2	31.3±3.2	26.9±3.1
	Female	29.1±4.0	28.8±5.7	27.7±3.4 ^c	29.6±4.0 ^c	26.6±3.0

^aMean±SD, all such values, ^bsignificant difference between genders, ^cafter age adjustment, ^dafter age and BMI adjustments, ^econversion factor: 0.026.

only females (Figure 1C), those in Italy and France had higher Mediterranean diet score values compared to Poland ($p<0.001$, adjusted for age), and similar to each other and to German females ($p>0.531$, adjusted for age). Females in Greece had significantly lower diet score values compared to Italian females ($p=0.002$, adjusted for age) and had similar score values to French, German and Polish females ($p>0.094$, adjusted for age).

Adherence to the Mediterranean diet, as estimated by the diet score, was significantly different between genders for Greece and Italy (Table 1). Greek and Italian old females had lower mean diet score values compared to their male counterparts ($p=0.002$ and $p<0.001$, respectively, adjusted for age).

The Mediterranean diet score was significantly associated with lower BMI values in females (standardized $\beta=-0.127$, $p=0.003$, after control for age, smoking habits and country of origin) (Figure 2A). Furthermore, the diet score was associated in female subjects with higher HDL-C levels (standardized $\beta=0.144$, $p=0.029$, after control for age, BMI, smoking habits and country of origin) and lower ESR values (standardized $\beta=-0.144$, $p=0.001$, after control for age, BMI, hematocrit, smoking habits and country of origin). These findings are illustrated in Figure 2B and C. As regards male subjects, diet score was negatively associated with IL-8 levels (standardized $\beta=-0.101$, $p=0.044$, after control for age, BMI, smoking habits and country of origin) (Figure 2D).

The Mediterranean diet score was significantly associated with lower plasma IL-8 levels in the Greek

subjects (standardized $\beta=-0.213$, $p=0.007$), after control for age, sex, BMI and smoking habits (Figure 2E). No other significant associations were found between inflammatory factors and the diet score in the other ethnicities. When we investigated potential correlations among the components of the Mediterranean diet score and the inflammatory markers, several associations were revealed. These results are presented in Table 2. Higher levels of all investigated inflammatory markers (IL-6, IL-8, MCP-1 and TNF-α) were negatively associated with olive oil use and positively with red meat and products consumption, for all European elderly, after control for age, gender, origin, BMI and smoking habits (Table 2). Interestingly, non-refined cereal consumption was positively associated with higher MCP-1 and TNF-α plasma levels (Table 2).

Discussion

The Mediterranean diet has been suggested to promote health and longevity; therefore, during the last years, a large number of diet scores have been created to assess adherence to the Mediterranean diet (28, 29). In the present study, we adopted a validated Mediterranean diet score (27), which had already been used in other cohorts (23, 27, 30–32). We investigated adherence to the Mediterranean diet within the ZINCAGE European elderly cohort and its impact on circulating inflammatory markers and other health parameters.

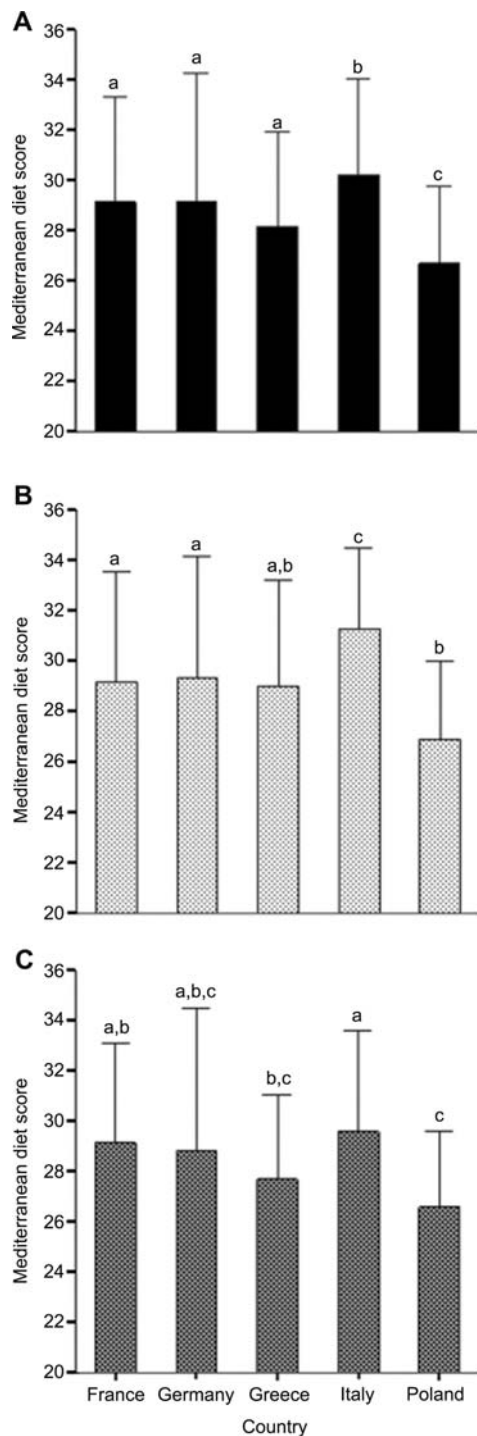


Figure 1 Mediterranean diet scores in different population groups.

(A) Mediterranean diet score mean values in healthy old and oldest old across European countries ($p < 0.001$, adjusted for age and gender). (B) Mediterranean diet score mean values in healthy males across European countries ($p < 0.001$, adjusted for age). (C) Mediterranean diet score mean values in healthy females across European countries ($p < 0.001$, adjusted for age). ^{a,b,c} Bars with different lower case letters are significantly different.

We demonstrated different degrees of adherence to the Mediterranean diet among the European centers examined. In particular, Italians had the highest scores for adherence to the Mediterranean dietary

pattern, while the Polish had the lowest scores, compared to all others. Old participants from France, Germany and Greece had similar adherence to the Mediterranean diet. On the contrary, data from other studies investigating dietary habits among European countries suggest higher compliance to the Mediterranean dietary pattern in elderly subjects residing in Greece and Italy, and to a lesser extent in elderly subjects in France (33, 34). In the same studies, elderly subjects from Germany appeared to adhere less to the Mediterranean diet (33, 34). However, in contrast to our study, no health criteria were used for the elderly recruitment in the above-mentioned studies. In accordance with our results, French elderly subjects are considered to be close to the Mediterranean diet, as assessed by a diet score (35). Additionally, data derived from a nutritional study conducted in 10 European countries, investigating dietary patterns, suggest a progressive narrowing of dietary differences between North and South European countries (36). Regional-related differences in dietary patterns within countries, as well as different diet score tools applied in the studies and different recruitment criteria could account for some of the contradictory data.

A significant finding of the current study is that greater adherence to the Mediterranean diet was associated with lower BMI values, higher HDL-C levels and lower ESR values in European old females (Figure 2A–C). It has been previously shown that the Mediterranean diet has been inversely associated with prevalence of overweight and obesity, as well as with BMI levels (27, 31, 37, 38). Taking into account the increasing prevalence of obesity in older adults and its clinical complications on health status (39), adherence to the Mediterranean diet could be beneficial for ageing populations. In accordance to our findings, previous studies have also underlined the association of the Mediterranean diet with a favorable lipid profile (27, 37), also in elderly populations (40). Considering HDL-C as an important factor of longevity (40, 41) with significant anti-inflammatory properties (42), the adoption of a healthy diet could augment its role in ageing. Furthermore, we demonstrated an inverse effect of the Mediterranean diet on ESR values of ageing females. ESR is suggested to reflect plasma concentration of acute phase response proteins, resulting in a compound index of both viscosity and inflammation. Furthermore, ESR has been associated with an increased risk of coronary heart disease (43).

In the present study, we demonstrated a significant association between adherence to the Mediterranean diet and lower IL-8 levels in overall ageing males (Figure 2D). This finding was confirmed only in ageing participants recruited from Greece (Figure 2E). Data from other studies support that adherence to the Mediterranean dietary pattern attenuates inflammatory markers production (23, 24, 44–46); however, there is no published data on diet and circulating IL-8. The lack of association between the Mediterranean diet score and the other inflammation markers investigated in our study could be attributed to a

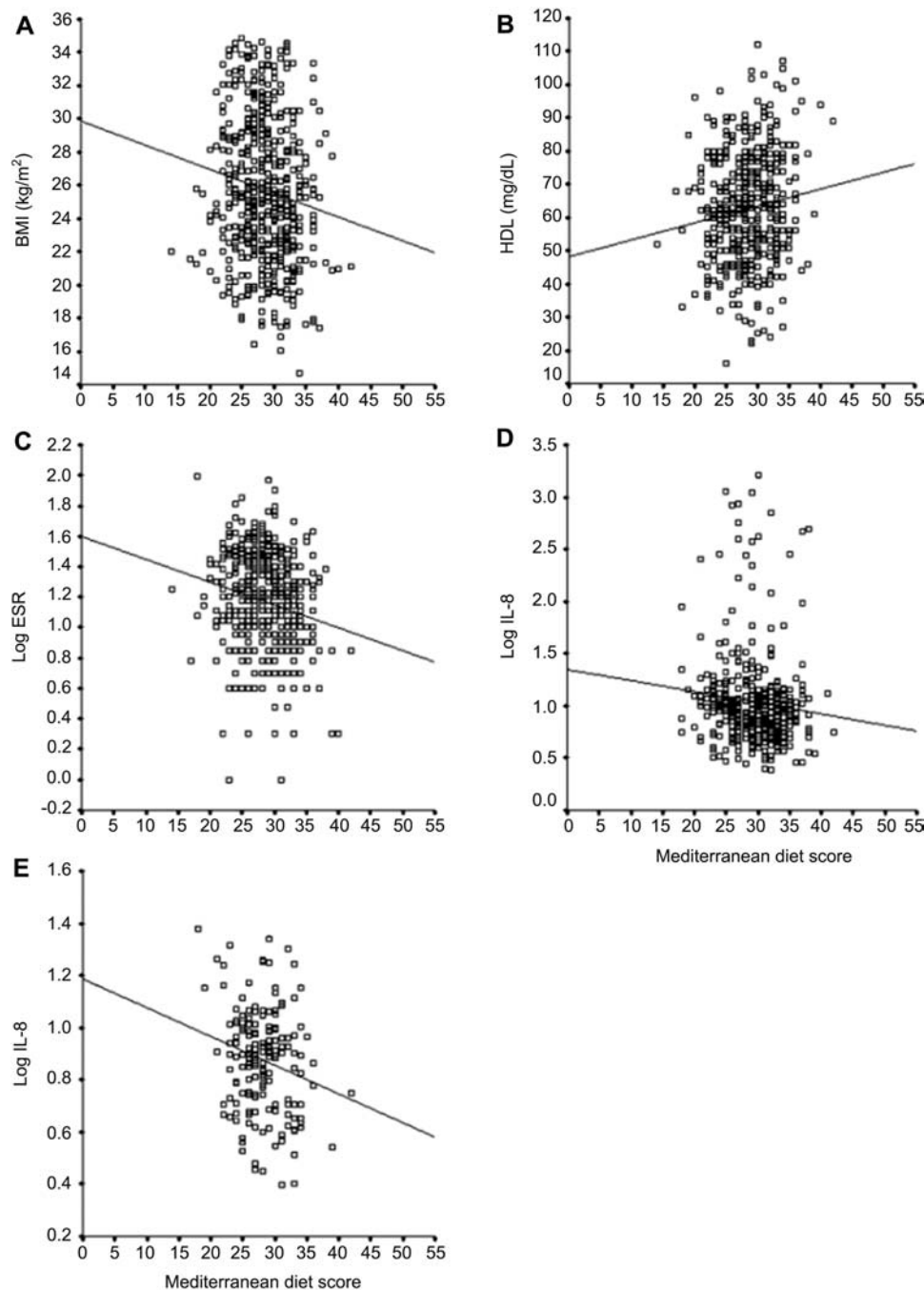


Figure 2 Associations of the Mediterranean diet score with biochemical markers.

(A) Mediterranean diet score and BMI values for females ($n=532$, standardized $\beta=-0.127$, $p=0.003$). (B) Mediterranean diet score and HDL-C levels for females ($n=532$, standardized $\beta=0.144$, $p=0.029$). (C) Mediterranean diet score and log-transformed ESR values for females ($n=532$, standardized $\beta=-0.144$, $p=0.001$). (D) Mediterranean diet score and log-transformed IL-8 levels for males ($n=425$, standardized $\beta=-0.101$, $p=0.044$). (E) Mediterranean diet score and log-transformed IL-8 levels for Greek elderly subjects ($n=163$, standardized $\beta=-0.213$, $p=0.007$). Conversion factor: 0.026.

number of reasons. It could be speculated that differential genetic background and lifestyle habits across European countries may influence diet-inflammation interactions. Another aspect to consider is that the Mediterranean dietary pattern may unevenly affect the widely ranged inflammatory markers of the ethnic groups examined.

Considering the other inflammatory markers evaluated in this study, we found several associations with some components of the Mediterranean diet. As

expected by previously published data (47–49), olive oil was associated with lower IL-6, IL-8, MCP-1 and TNF- α levels. Furthermore, all investigated inflammatory markers were positively associated with higher red meat consumption. This finding is in accordance with previously published data, suggesting that increased red meat consumption (46) and saturated fat intake (50, 51) are associated with elevated levels of inflammatory markers. Interestingly, we found a positive association of non-refined cereal consump-

Table 2 Correlations of inflammatory markers with the consumption of food groups and characteristics of the Mediterranean diet in healthy old subjects^a.

Dependent parameter	Predictors	Standardized β coefficient	p
IL-6, pg/mL	Red meat and products ^b	0.161	<0.001
	Olive oil use ^c	-0.113	0.001
	Alcohol ^d	0.065	0.059
IL-8, pg/mL	Red meat and products ^b	0.115	0.001
	Olive oil use ^c	-0.139	<0.001
	Alcohol ^d	0.045	0.187
MCP-1, pg/mL	Non-refined cereals ^b	0.194	<0.001
	Red meat and products ^b	0.079	0.020
	Olive oil use ^c	-0.170	<0.001
TNF- α , pg/mL	Alcohol ^d	0.041	0.212
	Non-refined cereals ^b	0.086	0.007
	Red meat and products ^b	0.154	<0.001
	Olive oil use ^c	-0.061	0.050
	Alcohol ^d	0.027	0.388

^aResults from separate multiple linear regression models after control for age, gender, BMI, country of origin and smoking habits. ^{b,c,d}Food groups are presented as ^bservings/week, ^ctimes/week and ^dmL/day. Data in bold: statistically significant.

tion with increased levels of MCP-1 and TNF- α in elderly subjects. Whole-grain consumption has been associated with decreased levels of homocysteine and C-reactive protein in previous studies (52, 53); however, there are no bibliographic data on MCP-1 and TNF- α status.

In conclusion, we assessed adherence to the Mediterranean diet in a European ageing population using a validated diet score. We demonstrated significant effects of the Mediterranean diet on BMI, HDL-C, ESR and IL-8 levels. Furthermore, several associations among components of the Mediterranean dietary pattern and inflammatory markers were revealed. The Mediterranean diet score is useful in assessing nutritional influence on immune status of older adults.

Acknowledgements

The study was supported by the European Commission (ZINCAGE project contract no. FOOD-CT-2004-506850).

References

- De Martinis M, Franceschi C, Monti D, Ginaldi L. Inflammation markers predicting frailty and mortality in the elderly. *Exp Mol Pathol* 2006;80:219–27.
- Licastro F, Candore G, Lio D, Porcellini E, Colonna-Romano G, Franceschi C, et al. Innate immunity and inflammation in ageing: a key for understanding age-related diseases. *Immun Ageing* 2005;2:8–21.
- Pawelec G, Barnett Y, Forsey R, Frasca D, Globerson A, McLeod J, et al. T cells and ageing, January 2002 update. *Front Biosci* 2002;7:d1056–183.
- Cesari M, Penninx BW, Newman AB, Kritchevsky SB, Nicklas BJ, Sutton-Tyrrell K, et al. Inflammatory markers and onset of cardiovascular events – results from the Health ABC study. *Circulation* 2003;108:2317–22.
- Ferrucci L, Corsi A, Lauretani F, Bandinelli S, Bartali B, Taub DD, et al. The origins of age-related proinflammatory state. *Blood* 2005;105:2294–9.
- Krabbe KS, Pedersen M, Bruunsgaard H. Inflammatory mediators in the elderly. *Exp Gerontol* 2004;39:687–99.
- Kritchevsky SB, Cesari M, Pahor M. Inflammatory markers and cardiovascular health in older adults. *Cardiovasc Res* 2005;66:265–75.
- Mariani E, Cattini L, Neri S, Malavolta M, Moccagiani E, Ravaglia G, et al. Simultaneous evaluation of circulating chemokines and cytokine profiles in elderly subjects by multiplex technology: relationship with zinc status. *Biogerontology* 2006;7:449–59.
- Rink L, Cakman I, Kirchner H. Altered cytokine production in the elderly. *Mech Ageing Dev* 1998;102:199–209.
- Deo R, Khera A, McGuire DK, Murphy SA, Meo Neto Jde P, Morrow DA, et al. Association among plasma levels of monocyte chemoattractant protein-1, traditional cardiovascular risk factors, and subclinical atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:1812–8.
- Gerli R, Monti D, Bistoni O, Mazzone AM, Peri G, Cosarizza A, et al. Chemokines, sTNF-Rs and sCD30 serum levels in healthy aged people and centenarians. *Mech Ageing Dev* 2000;121:37–46.
- Inadera H, Egashira K, Takemoto M, Ouchi Y, Matsushima K. Increase in circulating levels of monocyte chemoattractant protein-1 with aging. *J Interferon Cytokine Res* 1999;19:1179–82.
- McDermott DH, Yang Q, Kathiresan S, Cupples LA, Massaro JM, Keaney JF, et al. CCL2 polymorphisms are associated with serum monocyte chemoattractant protein-1 levels and myocardial infarction in the Framingham heart study. *Circulation* 2005;112:1113–20.
- Giugliano D, Ceriello A, Esposito K. The effects of diet on inflammation. Emphasis on the metabolic syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:677–85.
- Sánchez-Moreno C, Cano MP, de Ancos B, Plaza L, Olmedilla B, Granado F, et al. Mediterranean vegetable soup consumption increases plasma vitamin C and decreases F2-isoprostanes, prostaglandin E2, and monocyte chemoattractant protein-1 in healthy humans. *J Nutr Biochem* 2006;17:183–9.
- Knoops KT, de Groot LC, Kromhout D, Perrin AE, Moreiras-Varela O, Menotti A, et al. Mediterranean diet, lifestyle factors, and 10-year mortality in elderly European men and women: the HALE project. *J Am Med Assoc* 2004;292:1433–9.
- Trichopoulou A. Traditional Mediterranean diet and longevity in the elderly: a review. *Public Health Nutr* 2004;7:943–7.
- Trichopoulou A, Critselis E. Mediterranean diet and longevity. *Eur J Cancer Prev* 2004;13:453–6.
- Trichopoulou A, Orfanos P, Norat T, Bueno-de-Mesquita B, Ocke MC, Peeters PH, et al. Modified Mediterranean

- diet and survival: EPIC – Elderly Prospective Cohort Study. *Br Med J* 2005;330:991–7.
20. Trichopoulos D, Lagiou P. Mediterranean diet and cardiovascular epidemiology. *Eur J Epidemiol* 2004;19:7–8.
 21. Lasherras C, Fernandez S, Patterson AM. Mediterranean diet and age with respect to overall survival in institutionalized, nonsmoking elderly people. *Am J Clin Nutr* 2000;71:987–92.
 22. Martínez-González MA, Fernández-Jarne E, Serrano-Martínez M, Martí A, Martínez JA, Martín-Moreno JM. Mediterranean diet and reduction in the risk of a first acute myocardial infarction: an operational healthy dietary score. *Eur J Nutr* 2002;41:153–60.
 23. Panagiotakos DB, Pitsavos C, Stefanadis C. Dietary patterns: a Mediterranean diet score and its relation to cardiovascular disease risk, clinical and biological markers. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2006;16:559–68.
 24. Simopoulos AP. The traditional diet of Greece and cancer. *Eur J Canc Prev* 2003;13:219–30.
 25. Mocchegiani E, Marcellini F, Pawelec G. Nutritional zinc, oxidative stress and immunosenescence: biochemical, genetic, and lifestyle implications for healthy ageing. *Biogerontology* 2004;5:271–3.
 26. Willett WC, Sacks F, Trichopoulos A, Trichopoulos D. Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. *Am J Clin Nutr* 1995;6:1402S–6S.
 27. Panagiotakos DB, Pitsavos C, Arvaniti F, Stefanadis C. Adherence to the Mediterranean food pattern predicts the prevalence of hypertension, hypercholesterolemia, diabetes and obesity, among healthy adults; the accuracy of the MedDietScore. *Prev Med* 2007;44:335–40.
 28. Bach A, Serra-Majem L, Carrasco JL, Roman B, Ngo J, Bertomeu I, et al. The use of indexes evaluating the adherence to the Mediterranean diet in epidemiological studies: a review. *Public Health Nutr* 2006;9:132–46.
 29. Knuops KT, Groot de LC, Fidanza F, Alberti-Fidanza A, Kromhout D, van Staveren WA. Comparison of three different dietary scores in relation to 10-year mortality in elderly European subjects: the HALE project. *Eur J Clin Nutr* 2006;60:746–55.
 30. Dedoussis GV, Panagiotakos DB, Chrysoshoou C, Pitsavos C, Zampelas A, Choumerianou D, et al. Effect of interaction between adherence to a Mediterranean diet and the methylenetetrahydrofolate reductase 677C→T mutation on homocysteine concentrations in healthy adults: the ATTICA study. *Am J Clin Nutr* 2004;80:849–54.
 31. Panagiotakos DB, Chrysoshoou C, Pitsavos C, Stefanadis C. Association between the prevalence of obesity and adherence to the Mediterranean diet: the ATTICA study. *Nutrition* 2006;22:449–56.
 32. Pitsavos C, Panagiotakos DB, Tzima N, Chrysoshoou C, Economou M, Zampelas A, et al. Adherence to the Mediterranean diet is associated with total antioxidant capacity in healthy adults: the ATTICA study. *Am J Clin Nutr* 2005;82:694–9.
 33. Bamia C, Orfanos P, Ferrari P, Overvad K, Hundborg HH, Tjønneland A, et al. Dietary patterns among older Europeans: the EPIC-Elderly Study. *Br J Nutr* 2005;94:100–13.
 34. Bamia C, Trichopoulos D, Ferrari P, Overvad K, Bjerregaard L, Tjønneland A, et al. Dietary patterns and survival of older Europeans: The EPIC-Elderly Study. *Public Health Nutr* 2007;5:1–9.
 35. Scali J, Richard A, Gerber M. Diet profiles in a population sample from Mediterranean southern France. *Public Health Nutr* 2001;4:173–82.
 36. Naska A, Fouskakis D, Oikonomou E, Almeida MD, Berg MA, Gedrich K, et al. Dietary patterns and their socio-demographic determinants in 10 European countries: data from the DAFNE databank. *Eur J Clin Nutr* 2006;60:181–90.
 37. Mantzoros CS, Williams CJ, Manson JE, Meigs JB, Hu FB. Adherence to the Mediterranean dietary pattern is positively associated with plasma adiponectin concentrations in diabetic women. *Am J Clin Nutr* 2006;84:328–35.
 38. Schroder H, Marrugat J, Vila J, Covas MI, Elosua R. Adherence to the traditional Mediterranean diet is inversely associated with body mass index and obesity in a Spanish population. *J Nutr* 2004;134:3355–61.
 39. Villareal DT, Apovian CM, Kushner RF, Klein S. Obesity in older adults: technical review and position statement of the American Society for Nutrition and NAASO, The Obesity Society. *J Clin Nutr* 2005;82:923–34.
 40. Polychronopoulos E, Panagiotakos DB, Polystipioti A. Diet, lifestyle factors and hypercholesterolemia in elderly men and women from Cyprus. *Lipids Health Dis* 2005;4:17–23.
 41. Barter P. HDL: a recipe for longevity. *Atherosclerosis* 2004;5(Suppl 2):25–31.
 42. Chrysoshoou C, Pitsavos C, Skoumas J, Masoura C, Kati-nioti A, Panagiotakos D, et al. The emerging anti-inflammatory role of HDL-cholesterol, illustrated in cardiovascular disease free population; the ATTICA Study. *Int J Cardiol* 2006;122:29–33.
 43. Andresdottir MB, Sigfusson N, Sigvaldason H, Gudnason V. Erythrocyte sedimentation rate, an independent predictor of coronary heart disease in men and women. The Reykjavik Study. *Am J Epidemiol* 2003;158:844–81.
 44. Chrysoshoou C, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Das UN, Stefanadis C. Adherence to the Mediterranean diet attenuates inflammation and coagulation process in healthy adults. The ATTICA Study. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:152–8.
 45. Fung TT, McCullough ML, Newby PK, Manson JE, Meigs JB, Rifai N, et al. Diet-quality scores and plasma concentrations of markers of inflammation and endothelial dysfunction. *Am J Clin Nutr* 2005;82:163–73.
 46. Nettleton JA, Steffen LM, Mayer-Davis EJ, Jenny NS, Jiang R, Herrington DM, et al. Dietary patterns are associated with biochemical markers of inflammation and endothelial activation in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Am J Clin Nutr* 2006;83:1369–79.
 47. Salas-Salvadó J, García-Arellano A, Estruch R, Marquez-Sandoval F, Corella D, Fiol M, et al. Components of the Mediterranean-type food pattern and serum inflammatory markers among patients at high risk for cardiovascular disease. *Eur J Clin Nutr* 2007;in press.
 48. Covas M-I. Olive oil and the cardiovascular system. *Pharmacol Res* 2007;55:175–86.
 49. Santagelo C, Vari R, Scazzocchio B, Di Benedetto R, Filesi C, Masella R. Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Ann Ist Super Sanita* 2007;43:394–405.
 50. Han SN, Leka LS, Lichtenstein AH, Ausman LM, Schaefer EJ, Meydani SN. Effect of hydrogenated and saturated, relative to polyunsaturated, fat on immune and inflammatory responses of adults with moderate hypercholesterolemia. *J Lipid Res* 2002;43:445–52.
 51. Mozaffarian D, Pischon T, Hankinson SE, Rifai N, Joshipura K, Willett WC, et al. Dietary intake of trans fatty acids and systemic inflammation in women. *Am J Clin Nutr* 2004;79:606–12.
 52. Jensen MK, Koh-Banerjee P, Franz M, Sampson L, Grønbaek M, Rimm EB. Whole grains, bran, and germ in relation to homocysteine and markers of glycemic control, lipids, and inflammation. *Am J Clin Nutr* 2006;83:275–83.
 53. Lutsey PL, Jacobs DR Jr, Kori S, Mayer-Davis E, Shea S, Steffen LM, et al. Whole grain intake and its cross-sectional association with obesity, insulin resistance, inflammation, diabetes and subclinical CVD: The MESA study. *Br J Nutr* 2007;98:397–405.



Assessment of gene–nutrient interactions on inflammatory status[☆] of the elderly with the use of a zinc diet score – ZINCAGE study[☆]

Stavroula Kanoni^a, George V. Dedoussis^{a,*}, Georges Herbein^b, Tamas Fulop^c, Audrey Varin^b, Jolanta Jajte^d, Lothar Rink^e, Daniela Monti^f, Erminia Mariani^g, Marco Malavolta^h, Robertina Giacconi^h, Fiorella Marcellini^h, Eugenio Mocchegiani^h

^aDepartment of Nutrition Science and Dietetics, Harokopio University of Athens, 17671 Kallithea-Athens, Greece

^bDepartment of Virology, Franche-Comte University, Besancon, France

^cResearch Center on Aging, Immunology Program, Geriatric Division, Faculty of Medicine, University of Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada

^dDepartment of Toxicology, Faculty of Pharmacy, Medical University of Lodz, Lodz, Poland

^eInstitute of Immunology, RWTH-Aachen, Aachen, Germany

^fDepartment of Pathology and Oncology, University of Florence, Florence, Italy

^gLaboratory of Immunology and Genetics, Istituto di Ricerca Codivilla-Putti, IOR, Bologna, Italy

^hSection of Nutrition, Immunity and Ageing, Immunology Center, Research Department, INRCA, Italy

Received 14 November 2008; received in revised form 6 February 2009; accepted 16 February 2009

Abstract

Although zinc plays an important role in health status of the elderly, their dietary habits in relation to zinc intake are not well documented. The main objective of the current study was the assessment of dietary zinc intake in European old populations and the investigation of its impact on plasma zinc and inflammatory cytokines concentrations, in relation to genetic markers. Within the ZINCAGE study, 819 healthy old Europeans (≥60 years old) were recruited. Plasma zinc, interleukin-6 (IL-6) and interleukin-8 (IL-8) were measured. Genotype data were obtained for the −174G/C polymorphism in the IL-6 gene. Dietary data were collected with a food frequency questionnaire and were used to calculate a zinc diet score. Zinc score was validated using additional dietary data (24-h recalls), in a subsample of 105 subjects. Zinc score was different among most of the European centres ($P < 0.001$), while an age-dependent decline was documented ($P = 4.4 \times 10^{-12}$). Plasma zinc concentrations were significantly correlated with the zinc score (standardized $\beta = 0.144$, $P = 8.8 \times 10^{-5}$). The minor allele frequency for the −174G/C polymorphism was f(C) 0.31. There was a significant interaction of zinc diet score and GG (−174G/C) genotype on higher plasma IL-6 levels ($\beta \pm \text{S.E.} = 0.014 \pm 0.0$, $P = .008$). The main finding of our study was the detection of gene–nutrient and biochemical–nutrient interactions in a multiethnic cohort based on a common dietary assessment tool.

© 2009 Published by Elsevier Inc.

Keywords: Zinc diet score; Plasma zinc levels; Inflammation; Genes; Elderly; ZINCAGE study

1. Introduction

Ageing is a process that affects all physiological systems and increases susceptibility to disease and death. In particular, a dysregulation of the immune system with ageing is believed to contribute to morbidity and mortality, due to the greater incidence of infections and cancer, as well as to inflammatory phenomena involved in major age-related diseases, such as atherosclerosis [1].

Nutrition is a strong modulator of risk factors for chronic diseases. This is especially important for the elderly, as proper nutrition plays a crucial role in maintaining good health and functioning. Epidemiological studies suggest that nutrition influences longevity [2–5], cardiovascular events [6,7], neoplastic diseases [8,9] and cognitive function [10,11] in the elderly. Thus, dietary habits of the elderly, both in terms of dietary patterns and of single nutrient intake, need to be taken into account in order to clarify the relation between nutrition and health or disease in advanced age.

Zinc is an essential trace mineral for human health. It is a catalytic, structural and functional component of many proteins, enzymes, hormones and hormone receptors. Especially in elderly populations, zinc is of great importance due to its impact on immune functions [11,12], bone mass preservation [13,14], antioxidant defence [15], DNA repair [16] and cognitive function [17]. While the importance of zinc

[☆] The study was supported by the European Commission (Zincage project contract no. FOOD-CT-2004-506850).

* Corresponding author. Laboratory of Molecular Genetics, Department of Nutrition and Dietetics, Harokopio University of Athens, 17671 Kallithea-Athens, Greece. Tel.: +30 210 9549304; fax: +30 210 9577050.

E-mail address: dedousi@hua.gr (G.V. Dedoussis).

ion bioavailability in the elderly is well documented, there is limited data on the relationships between dietary zinc intake, zinc status and healthy ageing [18,19]. Providing information about dietary habits of the elderly and their possible impact on zinc and inflammatory status would be useful for the determination of specific needs and dietary guidelines in relation to zinc.

On the other hand, low-grade elevation of inflammatory mediators has been recognized as a risk factor for age-related inflammation, frailty, cardiovascular disease and all-cause mortality in the elderly [20,21]. Amongst the inflammatory markers, IL-6 and IL-8 have been positively associated with advancing age in several studies [21–24]. Nevertheless, genetic background also has an evident contribution to immunosenescence [25]. Among the potential genetic markers of inflammation, the -174G/C polymorphism in the promoter of the IL-6 gene has been shown to affect cytokine production, therefore modulating susceptibility to age-related diseases and mortality [26,27]. Several studies support that GG genotype is associated with elevated IL-6 levels, impaired innate immune response and high prevalence of inflammatory pathologies in the elderly [15,27,28].

Within the ZINCAGE project, biochemical, genetic and lifestyle factors for healthy ageing are studied in a European cohort [26]. For the purpose of the current study, healthy old subjects (≥60 years old) were recruited and dietary and genetic data, plasma zinc, IL-6 and IL-8 measurements were obtained. We designed and calculated a zinc score, representative of zinc dietary habits, in order to assess the differential dietary intake of zinc in European old populations and to investigate its impact on zinc and inflammatory markers concentrations, in relation to genetic background.

2. Materials and methods

2.1. Subjects and study design

The study was carried out in a sample of 819 (272 from Italy, 163 from Greece, 137 from Germany, 128 from France and 119 from Poland) healthy noninstitutionalized men and women older than 60 years. Moreover, the participants of the study had to be free of medication such as steroids, diuretics, anticonvulsants, antidepressive drugs, antibiotics, antimetabolites, non-steroidal anti-inflammatory drugs and micronutrient supplementation. Subjects were excluded if they had autoimmune, neurodegenerative, cardiovascular, kidney or liver disease, diabetes, infections, cancer, chronic inflammatory bowel disease or acrodermatitis enteropathica, sickle cell anaemia, chronic skin ulcerations and endocrine disorders. Medical history was recorded by the family doctor or through a medical examination when possible. Ethical approval was obtained at all of the centers of recruitment and all subjects signed an informed consent form. The study was part of the ZINCAGE study [26].

2.2. Anthropometric and biochemical measurements

The anthropometrical measurements included weight and height, and were obtained using standardized techniques and equipment. Body mass index (BMI) was calculated as weight (kg)/height (m) squared. Blood samples were collected after 12 h of fasting, using trace element-free vacutainers. Plasma zinc levels were analyzed by induction coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) according to the manufacturer's instructions (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA). Plasma concentrations of IL-6 and IL-8 were evaluated using commercially available multiplex bead-based sandwich immunoassay kits (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), as described previously [23].

2.3. Genotyping

Genomic DNA from peripheral blood was extracted with phenol/chloroform using standard protocols. IL-6 -174G/C (rs1800795) polymorphism was screened, as described elsewhere [27].

2.4. Assessment of dietary zinc intake

A qualitative food frequency questionnaire, designed for the needs of ZINCAGE, was used for the assessment of dietary zinc intake. The food frequency questionnaire included 53 food items, representative of the major food groups (red meat and poultry, fish and seafood, dairy products, refined and nonrefined grains, raw and cooked vegetables, fruits, eggs, sweets, beverages, and oil and added fat). The consumption of all food items was recorded in terms of frequency (never or less than once a month, occasionally, sometimes, daily consumption) and quantity (no, small, medium,

abundant consumption). Based upon these data, we determined a "zinc score" for each volunteer. To provide a continuous variable, representative of zinc dietary habits, frequency, quantity estimation and zinc content of foods consumed were all considered for the zinc score calculation.

Individual food consumption was calculated as frequency (1 for never or less than once a month, 2 for occasionally, 3 for sometimes and 4 for consumption everyday) multiplied by quantity (0 for no consumption, 1 for small, 2 for medium and 3 for abundant). Taking into account the large variations of zinc content in foods, even within food groups, all food items were considered separately. European National and USDA food composition tables were used to define zinc content for all 53 food items included in the food frequency questionnaire. Zinc content of all food items used for the zinc diet score calculation is presented in Table 1. Consumption of each food was then multiplied to the correspondent zinc content. A zinc score was calculated for each old volunteer as the sum of all estimated zinc intakes derived from all listed food items. The general formula used for zinc score calculation was: Zinc score=Frequency×Quantity×Zinc content. The calculation of the zinc score provided with a continuous variable as a comparative estimate of dietary zinc intakes among recruited old subjects.

A validation study of the developed zinc score was conducted in a subsample of 111 old subjects (51 males and 60 females), because of the high cost of complete dietary assessment in all subjects of the ZINCAGE study. Three 24-h recalls were collected from each old participant of the validation study. Dietary data were assessed using the Nutritionist Pro software (Axxya Systems) and published national food composition tables, for the estimation of mean daily dietary zinc intake.

2.5. Statistical methods and analysis

Statistical analysis was performed with SPSS edition 13.0. Continuous variables are presented as mean values±S.D. The normal distribution of the investigated variables was assessed through the Kolmogorov–Smirnov criterion. Due to skewed distribution, log-transformed values of zinc score, plasma IL-6, IL-8 and zinc levels were used. Correlations were evaluated by calculation of Pearson *r* coefficient. Student's *t* test, analyses of variance (ANOVA) and analyses of covariance (ANCOVA) were used to compare the variables among subgroups of the sample. Because of multiple comparisons, Tukey's correction was used to control for overall type I error. The distribution of the investigated polymorphism was compared with the expected frequency through the Hardy–Weinberg equilibrium (HWE), using Pearson's chi-squared test. Multiple linear regression and univariate analysis of variance models were applied, after taking into account the effect of potential cofounders. All reported *P* values are based on two-sided tests and were compared with a significance level of 5%.

Table 1
Zinc content of all food items used for the zinc diet score calculation

Food item (serving)	Zn content/ serving (mg)	Food item (serving)	Zn content/ serving (mg)
Oysters (3 oz)	74.00	Whole-wheat bread (1 slice)	0.50
Calf (3 oz)	5.50	Egg (1 item)	0.50
Liver (3 oz)	4.50	Tomatoes cooked (0.5 cup)	0.45
Shellfish (3 oz)	4.00	Potatoes cooked (1 cup)	0.40
Lamb (3 oz)	4.00	Other cooked vegetables (1 cup)	0.40
Horse (3 oz)	3.00	Fish ^a (3 oz)	0.40
Canned meat (3 oz)	3.00	Ice cream (0.5 cup)	0.40
Offal (3 oz)	3.00	Wheat bread (1 slice)	0.20
Turkey (3 oz)	2.80	Raw vegetables (1 cup)	0.20
Pork (3 oz)	2.50	Vegetable soup (1 cup)	0.20
Other meat (3 oz)	2.50	Fruit juice (1 cup)	0.20
Yoghurt (1 cup)	2.00	Cake/snack (1 piece)	0.13
Chicken (3 oz)	1.70	Fruits (1 medium)	0.10
Legumes cooked (0.5 cup)	1.30	Canned fruits (0.5 cup)	0.10
Peas cooked (1 cup)	1.10	Dried fruits (1 medium)	0.10
Canned fish (3 oz)	1.00	Chocolate (0.5 bar)	0.10
Milk ^b (1 cup)	1.00	Cola-type beverage (1 cup)	0.05
Hard matured cheese (1 oz)	0.90	Cookies (1 item)	0.02
Pizza (1 slice)	0.80	Tea (1 cup)	0.02
Cheese ^c (1 oz)	0.80	Butter, lard (1 tablespoon)	0.001
Pasta/rice (1 cup)	0.70	Sugar/honey (1 teaspoon)	0.00
Cold meat/salami (2 slices)	0.65	Oil ^d (1 teaspoon)	0.00

^a Includes codfish/bluefish, frozen fish and other fresh fish.

^b Includes full-cream, semi-skimmed and skimmed milk.

^c Includes fresh and soft cheese.

^d Includes extravirgin olive oil, olive oil, seed oil and margarine.

3. Results

A total of 819 subjects (128 from France, 137 from Germany, 163 from Greece, 272 from Italy and 119 from Poland) entered the study. Demographic, biochemical and diet characteristics of the recruited subjects are shown in Table 2.

In the subsample of 105 healthy older subjects, who enrolled in the validation study, the assessed mean daily dietary zinc intake was 8.2 ± 3.5 mg/day and the calculated mean zinc score was 126.9 ± 54.6 . Zinc score was significantly associated with daily dietary zinc intake (mg/day) (standardized $\beta=0.260$, $P=.007$, after controlling for age, sex and country of origin). This finding is illustrated in Fig. 1A. Plasma zinc values showed significant positive correlations with dietary zinc score in all elderly (standardized $\beta=0.144$, $P=8.8 \times 10^{-5}$, after controlling for age, sex, country of origin and BMI), as illustrated in Fig. 1B.

Amongst the overall healthy old populations examined, those in France had the highest zinc scores, followed by the Italian, German, Greek and, lastly, the Polish (Fig. 2). Multiple comparisons showed significant differences in mean zinc score for all countries ($P<.001$, adjusted for age and gender), except between Germany and Italy, occurring with the same zinc score values ($P=.408$, adjusted for age and sex). The same order of magnitude was observed when only females were considered, with all multiple comparisons statistically significant ($P<.027$, adjusted for age), except between German and Greece female populations ($P=.767$, adjusted for age). Among healthy male populations, the French had the highest zinc score, followed by the German and the Italian, who had the same zinc scores ($P=.111$, adjusted for age). Polish and Greek male populations presented with the lowest zinc scores and were not different from each other ($P=.287$, adjusted for age). Mean zinc score values were significantly different between males and females for Italy and Poland (Table 2). Italian and Polish old males had higher mean zinc scores compared to their female counterparts ($P=.012$ and $P=3.3 \times 10^{-4}$, respectively, adjusted for age and BMI).

There was a significant decline in zinc score with age in the majority of the healthy old volunteers. A significant negative correlation between zinc score and age was observed in the Italian, Polish, German and Greek old population ($P=5.3 \times 10^{-12}$, $P=9.4 \times 10^{-7}$, $P=.044$, $P=.004$, respectively, adjusted for gender). When all

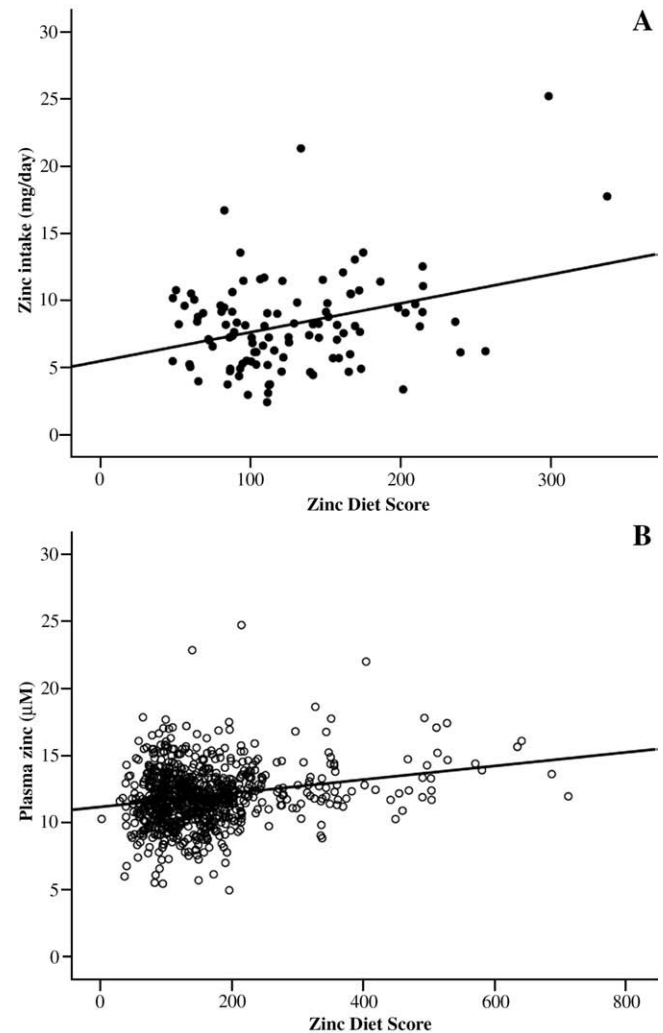


Fig. 1. Positive correlation between zinc diet score and dietary zinc intake (A) in healthy old subjects ($n=105$, standardized $\beta=0.260$, $P=.007$, after controlling for age, sex and country of origin), and plasma zinc values (B) in all old subjects ($N=819$, standardized $\beta=0.144$, $P=8.8 \times 10^{-5}$, after controlling for age, sex, country of origin and BMI).

Table 2
Characteristics of the ZINAGE study subjects, stratified by country of origin and gender

	France	Germany	Greece	Italy	Poland
<i>n</i>					
Male	62	96	60	107	41
Female	66	41	103	165	78
Age (years)					
Male	68.3 ± 5.9^a	69.7 ± 4.8	73.3 ± 6.2	77.4 ± 9.2	72.4 ± 6.1
Female	68.6 ± 6.0	70.2 ± 4.9	71.0 ± 6.3^b	79.7 ± 10.0	71.0 ± 7.3
BMI (kg/m^2)					
Male	26.0 ± 2.8	25.3 ± 2.5	28.2 ± 3.5	25.4 ± 3.3	25.6 ± 3.1
Female	23.5 ± 3.2^b	23.9 ± 3.3^b	30.1 ± 3.4^c	24.4 ± 4.0^b	27.5 ± 3.6^b
IL-6 (pg/ml)					
Male	22.1 ± 7.6	19.0 ± 11.2	12.8 ± 4.6	19.8 ± 8.9	22.8 ± 9.2
Female	21.8 ± 6.4	18.8 ± 11.0	13.6 ± 4.6	19.7 ± 9.1	22.1 ± 8.6
IL-8 (pg/ml)					
Male	9.7 ± 5.2	8.4 ± 4.4	8.2 ± 3.6	8.5 ± 4.2	14.6 ± 5.5
Female	10.5 ± 6.3	8.3 ± 4.3	8.4 ± 4.2	9.9 ± 4.3^d	14.1 ± 5.4
Plasma zinc (μM)					
Male	13.3 ± 4.0	12.4 ± 1.6	11.2 ± 1.7	11.4 ± 2.7	12.5 ± 2.4
Female	13.1 ± 1.9	12.1 ± 1.5	11.4 ± 1.6	11.4 ± 2.2	12.5 ± 2.3
Zinc diet score					
Male	296.8 ± 136.8	168.9 ± 96.9	109.9 ± 25.8	166.9 ± 54.0	104.8 ± 35.4
Female	251.8 ± 130.4	140.0 ± 94.0	104.3 ± 25.5	146.4 ± 45.5^b	87.1 ± 26.3^b

^aMean $\pm$ S.D., all such values. ^bSignificant difference between genders, ^cafter age adjustment, ^dafter age BMI adjustments.

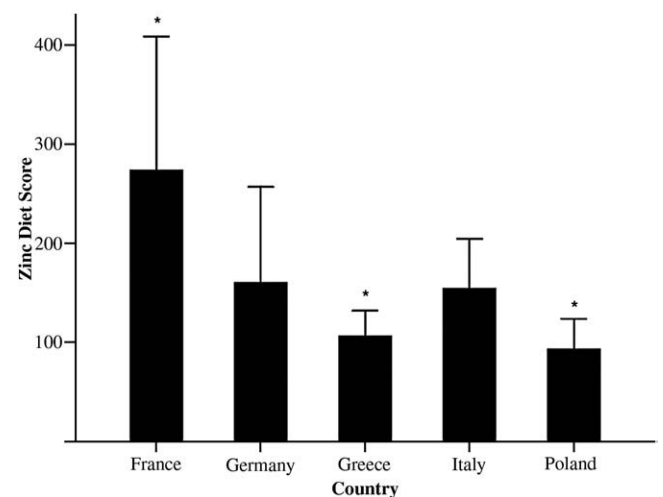


Fig. 2. Zinc score mean values in healthy old subjects across the European countries ($P<.001$, ANCOVA test adjusted for age and gender). *Significantly different from all other countries ($P<.001$, ANCOVA test adjusted for age and gender).

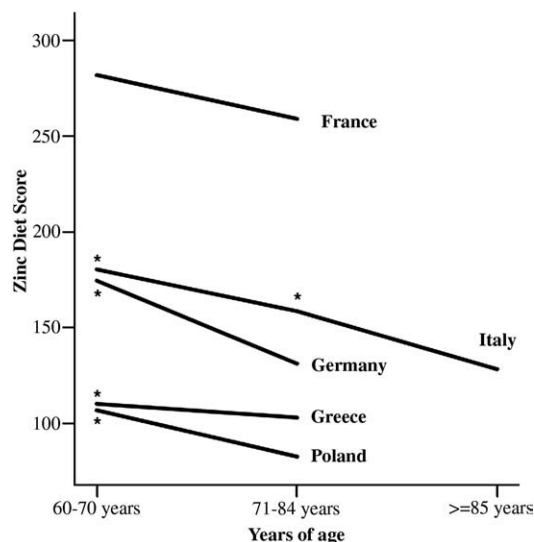


Fig. 3. Age dependent decline in zinc score in healthy old and very old subjects. *Significant different from all other age groups ($P<0.001$, ANCOVA test adjusted for gender).

healthy old subjects were divided into two age groups (60–70 and 71–84 years of age), there was a significant decline in zinc score throughout these age groups ($P=4.4\times 10^{-12}$, adjusted for gender and country of origin). A decline in mean zinc score values was significant in subjects aged 71–84 years compared to elders between 60 and 70 years in Germany, Greece and Poland ($P=.026$, $P=.042$ and $P=2.1\times 10^{-7}$ accordingly, adjusted for gender). In contrast, no significant decline in zinc score between the age groups was observed in the French ($P=.361$ adjusted for gender). A decline in zinc score was also significant across all Italian age groups, including the oldest ones ($P=6.4\times 10^{-10}$) (Fig. 3).

The minor allele frequency of the -174G/C polymorphism in the IL-6 gene was 0.31 for the C allele. Genotype frequency was in HWE. Demographic, biochemical and diet characteristics of the subjects, according to their genotypes, are presented in Table 3. Old subjects carrying the C allele for the -174G/C polymorphism in the IL-6 gene presented with significant higher plasma IL-8 levels ($P=.019$) compared to GG old subjects (Table 3).

In order to evaluate the impact of the -174G/C polymorphism and zinc diet score on plasma IL-6 and IL-8 levels, two models of univariate analysis of variance were applied (Table 4). Plasma IL-6 levels were negatively associated with the presence of the GG genotype ($\beta\pm\text{S.E.}=-2.371\pm 0.12$, $P=.006$), while the impact of the zinc diet score was only borderline significant (Table 4). However, the -174G/C genotype–zinc diet score interaction was significant, as GG genotype was associated

Table 3
Differences in biochemical and dietary factors of the old subjects, stratified by the -174G/C IL-6 genotypes

	IL-6 -174G/C		<i>P</i>
	GG	GC/CC	
<i>n</i>	405	414	
Male/female (%)	46.3/53.7	43.0/57.0	.354
Age (year)	73.6 $\pm$ 8.5 ^a	72.6 $\pm$ 8.2	.093
BMI (kg/m^2)	26.2 $\pm$ 4.2	25.9 $\pm$ 3.6	.236
IL-6 (pg/ml)	19.0 $\pm$ 9.0	19.2 $\pm$ 8.8	.520
IL-8 (pg/ml)	9.3 $\pm$ 4.7	10.3 $\pm$ 5.4	.019
Plasma zinc (μM)	11.9 $\pm$ 2.2	12.1 $\pm$ 2.5	.144
Zinc diet score	159.4 $\pm$ 94.2	152.6 $\pm$ 94.0	.065

^a Mean $\pm$ S.D., all such values. Values in italics represent statistically significant *P* value.

Table 4

Results from univariate analysis of variance models, which evaluated the association among plasma IL-6 and IL-8 levels, -176G/C polymorphism of the IL-6 gene and zinc diet score in the ZINCAGE cohort

Covariates	Plasma IL-6 (pg/ml)		Plasma IL-8 (pg/ml)	
	β coefficient $\pm$ S.E.	<i>P</i>	β coefficient $\pm$ S.E.	<i>P</i>
Age (year)	-0.075 ± 0.1	.107	0.042 ± 0.0	.013
BMI (kg/m^2)	-0.146 ± 0.1	.104	0.027 ± 0.1	.733
Female vs. male	0.229 ± 0.6	.034	0.820 ± 0.4	.029
Nonsmokers vs. current smokers	0.564 ± 1.1	.981	1.327 ± 0.7	.023
Country of origin	-0.915 ± 0.2	.001	-0.210 ± 0.1	.261
GG vs. GC/CC genotypes	-2.371 ± 1.2	.006	-1.751 ± 0.7	.488
Zinc diet score	0.007 ± 0.0	.067	-0.003 ± 0.0	.293
GG genotype $\times$ Zinc diet score vs. GC/CC genotypes $\times$ Zinc diet score	0.014 ± 0.0	.008	0.004 ± 0.0	.668

with higher plasma IL-6 levels compared to GC/CC genotypes, with increasing zinc diet score ($\beta\pm\text{S.E.}=0.014\pm 0.0$, $P=.008$) (Table 4).

Plasma IL-8 levels were positively associated with advancing age ($\beta\pm\text{S.E.}=0.042\pm 0.0$, $P=.013$), while the impact of either the -174G/C or the zinc diet score was statistically significant (Table 4).

4. Discussion

In order to assess the dietary zinc intake in old Europeans, we designed a zinc score based upon data collected by a qualitative food frequency questionnaire. To provide a continuous variable, representative of zinc-related dietary habits, frequency, quantity estimation and zinc content of foods consumed were all considered for the zinc score calculation. Delineating associations between nutrition and health status is quite challenging in elderly populations, since dietary behaviour is largely modified by age-related difficulties in mastication, gastrointestinal function and psychosocial factors [28]. Furthermore, basic difficulties in nutritional assessment of the elderly and the complex influence of dietary habits on health and disease justify the use of “diet” scores. Various diet scores are used in nutritional epidemiology, providing an overall view of dietary habits. Mediterranean diet score [5,29], dietary pattern analysis [30], healthy eating index scores [31] and nutrient density scores [32] have all been developed and used in large-scale elderly cohorts, in order to reveal risk factors of morbidity. Furthermore, dietary scores have been successfully applied on single nutrients, like folate, providing a valid estimate of dietary intake in the elderly [33].

In the present study, we found a positive association between plasma zinc levels and zinc score for the overall old cohort (Fig. 1B). Other studies, investigating relations between dietary zinc intake and plasma zinc levels, reported contradictory results [13,18,34–36]. These discrepancies could be attributed to the lack of their employment of a zinc-specific dietary assessment tool, as well as to the variety of factors influencing zinc bioavailability. It is well documented that dietary sources and other components of the diet [37,38], as well as physiological factors, medications [39] and genetic background [40], are strong modulators of zinc bioavailability and plasma zinc concentrations. In particular, a recent study has shown a significant effect of food phytate content on zinc absorption and bioavailability [41]. However, it was not feasible to consider dietary factors implicated in zinc absorption in our study design.

Our analysis revealed a significant gene–nutrient interaction concerning the -174G/C IL-6 polymorphism and IL-6 plasma levels. In particular, GG old subjects occurred with higher plasma IL-6 levels compared to C allele carriers, with increasing zinc diet score. This finding is in accordance with previously published data from a zinc supplementation trial within the ZINCAGE study [42]; nevertheless, it is contradictory to previously published data on zinc-regulated gene expression in cultured peripheral blood mononuclear cells with

a 50 μ M zinc dosage [27]. This last effect may be attributed to the pharmacological effect of large doses of zinc on pro-inflammatory cytokines production [43]. However, when supplementing with a physiological dose of zinc (10 mg/day), an increment in IL-6 levels of GG old individuals was observed [44]. This finding supports the hypothesis that zinc may have a role in stabilizing inflammation and modulating the immune response, especially in GG subjects, with subsequent prompt immune response against external noxiousness [44]. On the other hand, experiments in lymphocytes from aged donors, stimulated with LPS, have shown an increment of IL-6 levels after zinc addition (15 μ M) *in vitro* [45]. These data suggest the importance of zinc as an immunomodulatory agent, while underlining that increased dietary zinc intake in GG elderly could be beneficial against external noxiousness, with subsequent good healthy status. Such a consideration could be important, taking into account that the GG genotype is considered detrimental for longevity [40].

Additionally, we found significant country-dependent differences in zinc scores across Europe, with the French having the highest zinc intake, then the Italian, followed by the German, while the Greek and Polish old subjects had the lowest zinc intake. To our knowledge, there are no published data to compare the dietary zinc intake of the elderly among different European countries, applying a common nutritional assessment tool. However, differential dietary habits across Europe are well documented [31] and could account for this country-dependent difference in zinc score. Interestingly, we have also documented several differential consumptions in food groups, within the ZINCAGE cohort [46]. Higher consumption of oysters in France, as well as fish and red meat in France, Italy and Germany, compared to Greece and Poland, could explain the large differences in zinc score [46].

Furthermore, a decline in zinc score with age was recorded for the majority of the investigated European old populations, except for the French (Fig. 3). Results from other studies are contradictory, as some investigators demonstrate a decline in dietary zinc intake with advancing age [47], while others do not observe any age-related change [18]. Unfortunately, the difficulty in recruiting very old subjects from European countries other than Italy is inhibitory for further comparisons among several age groups. However, it is well documented that the elderly are at nutritional risk as a result of multiple physiological, social, psychological and economic factors, which adversely affect dietary choices and eating patterns [48]. On the other hand, previously published results from the ZINCAGE study indicate a progressive age-related increase of plasma IL-6, IL-8, MCP-1 and TNF- α concentrations in concomitance with low circulating levels of zinc [23].

To sum up, we used a zinc diet score to assess gene–nutrient interactions on the inflammatory status of the elderly. With the application of a zinc score, different zinc intake on a gender-, age- and country-dependent manner is revealed. A dietary assessment tool, like zinc diet score, would be useful for the evaluation of gene–nutrient and biochemical–nutrient interactions. Additional statistical analysis, also including more genetic, biochemical and lifestyle data along with the zinc score, would provide a substantial database for gender- and country-specific dietary guidelines for the elderly.

References

- [1] Licastro F, Candore G, Lio D, Porcellini E, Colonna-Romano G, Franceschi C, et al. Innate immunity and inflammation in ageing: a key for understanding age-related diseases. *Immun Ageing* 2005;2:8.
- [2] Knoop KT, de Groot LC, Kromhout D, Perrin AE, Moreiras-Varela O, Menotti A, et al. Mediterranean diet, lifestyle factors, and 10-year mortality in elderly European men and women: the HALE project. *JAMA* 2004;292:1433–9.
- [3] Lasheras C, Fernandez S, Patterson AM. Mediterranean diet and age with respect to overall survival in institutionalized, nonsmoking elderly people. *Am J Clin Nutr* 2000;71:987–92.
- [4] Trichopoulos A, Kouris-Blazos A, Wahlqvist ML, Gnardellis C, Lagiou P, Polychronopoulos E, et al. Diet and overall survival in elderly people. *BMJ* 1995;311:1457–60.
- [5] Trichopoulos A, Orfanos P, Norat T, Bueno-de-Mesquita B, Ocke MC, Peeters PH, et al. Modified Mediterranean diet and survival: EPIC-elderly prospective cohort study. *BMJ* 2005;330:991.
- [6] Liu S, Song Y, Ford ES, Manson JE, Buring JE, Ridker PM. Dietary calcium, vitamin D, and the prevalence of metabolic syndrome in middle-aged and older U.S. women. *Diabetes Care* 2005;28:2926–32.
- [7] Sahyoun NR, Jacques PF, Zhang XL, Juan W, McKeown NM. Whole-grain intake is inversely associated with the metabolic syndrome and mortality in older adults. *Am J Clin Nutr* 2006;83:124–31.
- [8] Cho E, Smith-Warner SA, Spiegelman D, Beeson WL, van den Brandt PA, Colditz GA, et al. Dairy foods, calcium, and colorectal cancer: a pooled analysis of 10 cohort studies. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:1015–22.
- [9] Wu K, Hu FB, Willett WC, Giovannucci E. Dietary patterns and risk of prostate cancer in U.S. men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:167–71.
- [10] Solfrizzi V, Colacicco AM, D'Introno A, Capurso C, Del Parigi A, Capurso SA, et al. Dietary fatty acids intakes and rate of mild cognitive impairment. The Italian Longitudinal Study on Aging. *Exp Gerontol* 2006;41:619–27.
- [11] Mocchegiani E, Muzzioli M, Giacconi R, Cipriano C, Gasparini N, Franceschi C, et al. 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 Dev* 2003;124:459–68.
- [12] Mocchegiani E, Muzzioli M, Giacconi R. Zinc, metallothioneins, immune responses, survival and ageing. *Biogerontology* 2000;1:133–43.
- [13] Hyun TH, Barrett-Connor E, Milne DB. Zinc intakes and plasma concentrations in men with osteoporosis: the Rancho Bernardo Study. *Am J Clin Nutr* 2004;80:715–21.
- [14] Lowe NM, Lowe NM, Fraser WD, Jackson MJ. Is there a potential therapeutic value of copper and zinc for osteoporosis? *Proc Nutr Soc* 2002;61:181–5.
- [15] Mocchegiani E, Muzzioli M, Giacconi R. Zinc and immunoresistance to infection in aging: new biological tools. *Trends Pharmacol Sci* 2000;21:205–8.
- [16] Tudor R, Zalewski PD, Ratnaik RN. Zinc in health and chronic disease. *J Nutr Health Aging* 2005;9:45–51.
- [17] Mocchegiani E, Bertoni-Freddari C, Marcellini F, Malavolta M. Brain, aging and neurodegeneration: role of zinc ion availability. *Prog Neurobiol* 2005;75:367–90.
- [18] Andriollo-Sanchez M, Hininger-Favier I, Meunier N, Toti E, Zaccaria M, Brandolini-Bunton M, et al. Zinc intake and status in middle-aged and older European subjects: the ZENITH study. *Eur J Clin Nutr* 2005;59(Suppl 2):S37–41.
- [19] Sibai AM, Zard C, Adra N, Baydoun M, Hwalla N. Variations in nutritional status of elderly men and women according to place of residence. *Gerontology* 2003;49:215–24.
- [20] De Martinis M, Franceschi C, Monti D, Ginaldi L. Inflammation markers predicting frailty and mortality in the elderly. *Exp Mol Pathol* 2006;80:219–27.
- [21] Krabbe KS, Pedersen M, Bruunsgaard H. Inflammatory mediators in the elderly. *Exp Gerontol* 2004;39:687–99.
- [22] Ferrucci L, Corsi A, Lauretani F, Bandinelli S, Bartali B, Taub DD, et al. The origins of age-related proinflammatory state. *Blood* 2005;105:2294–9.
- [23] Mariani E, Cattini L, Neri S, Malavolta M, Mocchegiani E, Ravaglia G, et al. Simultaneous evaluation of circulating chemokine and cytokine profiles in elderly subjects by multiplex technology: relationship with zinc status. *Biogerontology* 2006;7:449–59.
- [24] Rink L, Cakman I, Kirchner H. Altered cytokine production in the elderly. *Mech Ageing Dev* 1998;102:199–209.
- [25] Mocchegiani E, Costarelli L, Giacconi R, Cipriano C, Muti E, Tesi S, et al. Nutrient–gene interaction in ageing and successful ageing. A single nutrient (zinc) and some target genes related to inflammatory/immune response. *Mech Ageing Dev* 2006;127:517–25.
- [26] Mocchegiani E, Marcellini F, Pawelec G. Nutritional zinc, oxidative stress and immunosenescence: biochemical, genetic, and lifestyle implications for healthy ageing. *Biogerontology* 2004;5:271–3.
- [27] Mazzatti DJ, Malavolta M, White AJ, Costarelli L, Giacconi R, Muti E, et al. Effects of interleukin-6 –174C/G and metallothionein 1A +647A/C single-nucleotide polymorphisms on zinc-regulated gene expression in ageing. *Exp Gerontol* 2008;43:423–32.
- [28] Gariballa SE, Sinclair AJ. Nutrition, ageing and ill health. *Br J Nutr* 1998;80:7–23.
- [29] Panagiotakos DB, Pitsavos C, Arvaniti F, Stefanadis C. Adherence to the Mediterranean food pattern predicts the prevalence of hypertension, hypercholesterolemia, diabetes and obesity, among healthy adults; the accuracy of the MedDietScore. *Prev Med* 2007;44:335–40.
- [30] Lediakwe JH, Smicklas-Wright H, Mitchell DC, Miller CK, Jensen GL. Dietary patterns of rural older adults are associated with weight and nutritional status. *J Am Geriatr Soc* 2004;52:589–95.
- [31] Bamia C, Orfanos P, Ferrari P, Overvad K, Hundborg HH, Tjonneland A, et al. Dietary patterns among older Europeans: the EPIC-Elderly study. *Br J Nutr* 2005;94:100–13.
- [32] Drewnowski A. Concept of a nutritious food: toward a nutrient density score. *Am J Clin Nutr* 2005;82:721–32.
- [33] Hickling S, Knuiman M, Jamrozik K, Hung J. A rapid dietary assessment tool to determine intake of folate was developed and validated. *J Clin Epidemiol* 2005;58:802–8.
- [34] Artacho R, Ruiz-Lopez MD, Gamez C, Puerta A, Lopez MC. Serum concentration and dietary intake of Zn in healthy institutionalized elderly subjects. *Sci Total Environ* 1997;205:159–65.

- [35] Jacques PF, Sulsky SI, Sadowski JA, Phillips JC, Rush D, Willett WC. Comparison of micronutrient intake measured by a dietary questionnaire and biochemical indicators of micronutrient status. *Am J Clin Nutr* 1993;57: 182–9.
- [36] Bailey AL, Maisey S, Southon S, Wright AJ, Finglas PM, Fulcher RA. Relationships between micronutrient intake and biochemical indicators of nutrient adequacy in a “free-living” elderly UK population. *Br J Nutr* 1997;77:225–42.
- [37] Ghayour-Mobarhan M, Taylor A, New SA, Lamb DJ, Ferns GA. Determinants of serum copper, zinc and selenium in healthy subjects. *Ann Clin Biochem* 2005;42: 364–75.
- [38] Lonnerdal B. Dietary factors influencing zinc absorption. *J Nutr* 2000;130: 1378S–83S.
- [39] Hambidge M. Biomarkers of trace mineral intake and status. *J Nutr* 2003;133 (Suppl 3):948S–55S.
- [40] Giacconi R, Cipriano C, Albanese F, Boccoli G, Saba V, Olivieri F, et al. The –174G/C polymorphism of IL-6 is useful to screen old subjects at risk for atherosclerosis or to reach successful ageing. *Exp Gerontol* 2004;39:621–8.
- [41] Hunt JR, Beiseigel JM, Johnson LK. Adaptation in human zinc absorption as influenced by dietary zinc and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2008;87:1336–45.
- [42] Mariani E, Neri S, Cattini L, Mocchegiani E, Malavolta M, Dedoussis GV, et al. Effect of zinc supplementation on plasma IL-6 and MCP-1 production and NK cell function in healthy elderly: interactive influence of +647 MT1a and –174 IL-6 polymorphic alleles. *Exp Gerontol* 2008;43:462–71.
- [43] von Bulow V, Rink L, Haase H. Zinc-mediated inhibition of cyclic nucleotide phosphodiesterase activity and expression suppresses TNF-alpha and IL-1 beta production in monocytes by elevation of guanosine 3',5'-cyclic monophosphate. *J Immunol* 2005;175:4697–705.
- [44] Mocchegiani E, Giacconi R, Costarelli L, Muti E, Cipriano C, Tesei S, et al. Zinc deficiency and IL-6 –174G/C polymorphism in old people from different European countries: effect of zinc supplementation. ZINCAGE study. *Exp Gerontol* 2008;43: 433–44.
- [45] Kahmann L, Uciechowski P, Warmuth S, Plumakers B, Gressner AM, Malavolta M, et al. Zinc supplementation in the elderly reduces spontaneous inflammatory cytokine release and restores T cell functions. *Rejuvenation Res* 2008;11:227–37.
- [46] Marcellini F, Giuli C, Papa R, Gagliardi C, Dedoussis G, Herbein G, et al. Zinc status, psychological and nutritional assessment in old people recruited in five European countries: Zincage study. *Biogerontology* 2006;7:339–45.
- [47] Briefel RR, Bialostosky K, Kennedy-Stephenson J, McDowell MA, Ervin RB, Wright JD. Zinc intake of the U.S. population: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988–1994. *J Nutr* 2000;130:1367S–73S.
- [48] McClain CJ, McClain M, Barve S, Boosalis MG. Trace metals and the elderly. *Clin Geriatr Med* 2002;18:801–818, vii–viii.



Association of MT1A haplotype with cardiovascular disease and antioxidant enzyme defense in elderly Greek population: comparison with an Italian cohort

Robertina Giacconi^{a,*}, Stavroula Kanoni^b, Patrizia Mecocci^d, Marco Malavolta^a, Dimitris Richter^c, Sara Pierpaoli^a, Laura Costarelli^a, Catia Cipriano^a, Elisa Muti^a, Francesca Mangialasche^d, Francesco Piacenza^a, Silvia Tesei^a, Roberta Galeazzi^e, Eirini V. Theodoraki^b, Fabrizia Lattanzio^f, George Dedoussis^{b,1}, Eugenio Mocchegiani^{a,1}

^aNutrition and Aging, INRCA, Ancona, Italy

^bDepartment of Nutrition Science and Dietetics, Harokopio University, Athens, Greece

^cEuroclinics, Athens, Greece

^dInstitute of Gerontology and Geriatrics, University of Perugia, Italy

^eLaboratory Analysis INRCA Hospital, Ancona, Italy

^fScientific Direction, INRCA, Ancona, Italy

Received 20 February 2009; received in revised form 9 June 2009; accepted 20 August 2009

Abstract

Metallothioneins (MT), the antioxidant zinc-binding proteins, seem to mediate cardioprotection. It has been postulated that zinc homeostasis and MT function may be altered, as a consequence of oxidative stress, in cardiovascular disease (CVD), with a potential implication of MT genetic polymorphisms. The present study explores the role of +647A/C and +1245A/G MT1A polymorphisms on the susceptibility to CVD, zinc status and enzyme antioxidant activity, in the Greek and Italian populations. The country selection was based on the lower zinc status and the reduced zinc dietary intake in Greece than in Italy despite the similar Mediterranean dietary pattern. A total of 464 old, healthy control subjects and 369 old CVD patients more than 70 years of age were studied. Logistic regression model indicated that +1245 MT1A G+ genotype significantly increased the risk of CVD in Greece (34.4% vs. 23.2%; odds ratio=1.88, 95% confidence interval=1.14–3.08; $P=.013$) but not in Italy. Haplotype analysis showed an increment of CG haplotype frequency in CVD Greek patients (17.4% vs. 10.6%, $P<.05$). Differential country-related frequency distribution was also recorded. Applying a multivariate regression model, +647/+1245 MT1A haplotype was associated with a modulation of enzyme antioxidant activities in both countries. Decreased plasma zinc and reduced intracellular Zn release, as well as increased enzyme antioxidant activity, were more apparent in Greek healthy donors than in Italy. In conclusion, +1245 MT1A polymorphism and +647/+1245 MT1A haplotype are implicated in CVD in Greece but not in Italy, suggesting a role of gene–diet interaction in the disease predisposition.

© 2010 Published by Elsevier Inc.

Keywords: Metallothionein polymorphisms; Zinc; Cardiovascular disease; Enzyme antioxidant activity

1. Introduction

Experimental and clinical studies have suggested an implication of increased oxidative stress in the pathophysiology of atherosclerosis and cardiovascular disease (CVD) [1–4], and oxidative stress may also result from an imbalance between oxidant production and antioxidant defenses [5]. Metallothioneins (MTs), low molecular mass zinc-binding proteins, exert an antioxidant function by regulating intracellular zinc availability and protecting heart tissue from damages induced by reactive oxygen and nitrogen species [6,7].

Several investigators report hypozincemia in atherosclerosis and CVD [8,9] or a zinc dyshomeostasis during myocardial ischemia–reperfusion model [10]. In addition, longitudinal or nested case–control studies, within a prospective population, describe the general involvement of zinc deficiency in increased CVD mortality [11], especially in the presence of concomitant dysmetabolism of other trace elements [12]. Zinc is also an important cofactor of two isoforms of Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1 and SOD3 with cytoplasmatic and extracellular localization, respectively). Alterations in antioxidant defense mechanisms are correlated with CVD and atherosclerosis severity [13,14]. Furthermore, a dyshomeostasis of other micronutrients that are essential cofactors of SOD and glutathione peroxidase (GPx), such as copper and selenium [15], induces oxidative stress and modulates endogenous defenses that combat it [16]. Interestingly, zinc supplementation at physiological doses improves both zinc status [17] and plasma and erythrocyte superoxide dismutase (pSOD

* Corresponding author. Immunology Ctr. (Laboratory of Nutrigenomic and Immunesenescence) Res. Dept. INRCA, 60121 Ancona, Italy. Tel.: +39 071 8004214; fax: +39 071 206791.

E-mail address: r.giacconi@inrca.it (R. Giacconi).

¹ These authors contributed equally to this work.

and eSOD, respectively) levels, in a trial of healthy elderly participants from ZINCAGE study [18]. Supplementation with a high dose of zinc has also been suggested as a therapeutic strategy in terminating angina pectoris [19]. Moreover, the use of zinc ionophore pyrithione in ischemia–reperfusion model improves myocardial recovery, promoting the increment of intracellular labile zinc in response to oxidative stress [10]. Recent investigations suggest a strong association among +647A/C MT1A polymorphism (rs11640851) and zinc homeostasis in DM2 patients, affected by CVD complications [20], while +1245A/G MT1A polymorphism (rs 8052394) appears to influence serum SOD activity in diabetic Chinese patients [21]. The analysis of these two polymorphisms, characterized by an amino acid transition, may be useful to better elucidate the implication of MT1A isoform on CVD susceptibility. Hence, the aim of the present study is to investigate the potential impact of +647A/C and +1245A/G MT1A polymorphisms on CVD susceptibility, in a Greek and Italian population. The selection of these two countries was based upon the evidence of lower plasma zinc levels in Greek elderly donors than Italian ones (age range, 60–84 years) [22], despite the similar Mediterranean dietary pattern [23]. Antioxidant enzyme activity (pSOD, eSOD, CAT and GPx), zinc status and plasma levels of some trace elements were also assessed.

2. Materials and methods

2.1. Patients and controls

The study population consisted of four groups of subjects: 244 Italian and 220 Greek healthy control subjects (Groups A and B) and 215 Italian and 154 Greek CVD patients (Groups C and D).

Patients and controls recruited from Italy were born in Marche, a region in Central Italy. Patients ($n=215$) (mean age= 77 ± 10 years) were enrolled from the Department of Surgical Pathology, INRCA Geriatric Hospital during the 2005–2008 period, upon diagnosis of ischemic heart disease by clinical history and by resting electrocardiogram and/or carotid artery disease by Doppler ultrasonography period. The clinical features of the patients are summarized in Table 1. The control group consisted of 244 free-living individuals (mean age= 75 ± 10 years), characterized as healthy, on the basis of their clinical history and blood tests. In particular, they did not suffer from diabetes or any other clinical symptoms or history of cardiovascular and carotid artery disease.

Greek participants were randomly selected in the Athens region between February 2005 and December 2006 [24]. A complete medical and surgery record was obtained. All participants who reported a diagnosed history of angina, heart failure, coronary heart disease, stroke, myocardial infarction or surgeries such as heart bypass and angioplasty were characterized as cardiovascular patients ($n=154$, mean age= 74 ± 6 years). The control group consisted of 220 free-living healthy subjects (mean age= 72 ± 7 years), based on their clinical history and blood tests. The descriptive characteristics of the Greek subjects are summarized in Table 1.

The INRCA Hospital and Harokopio University Ethics Committees approved the project. Informed consent was obtained from each individual in compliance with Italian and Greek legislation.

2.2. Laboratory measurements

Venous peripheral blood samples, collected after an overnight fast, underwent basal biochemical laboratory determinations. Serum total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol and triglycerides were measured by automated enzymatic methods with reagents from Boehringer-Mannheim (Germany). Fasting glucose and serum C-reactive protein (CRP) levels were determined using standard laboratory methods. The erythrocyte sedimentation rate (ESR) was determined by the classical Westergren method. Plasma was collected and frozen at -80°C until used. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were separated by conventional density gradient centrifugation, collected, washed and immediately used and/or in part cryopreserved in liquid nitrogen aliquots of 2×10^6 cells in 1 ml of RPMI (GIBCO) with 10% of fetal calf serum. Genomic DNA of PBMC was extracted by the phenol chloroform method, according to the standard procedure.

2.3. Genotyping of +647A/C MT1A and +1245C/G MT1A polymorphisms

We screened for two single-nucleotide polymorphisms (SNPs) found in dbSNP database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) (PubMed Reference rs 8052394 and rs 11640851) corresponding to an A/C transition at +647 nt position and to an A/G transition at +1245 nt position, respectively, in the coding region of the human MT1A

Table 1

Clinical characteristics of CVD patients and controls

	Controls		CVD patients	
	Italy ($n=244$) (A)	Greece ($n=220$) (B)	Italy ($n=215$) (C)	Greece ($n=154$) (D)
Age (years)	75 ± 10	$72\pm 7^*$	77 ± 10	$74\pm 6^{\ddagger\ddagger}$
Male (%)	40.9	29.6	60 ^{***}	46.1 [†]
Hypertension (%)	51	70 ^{***}	72 ^{***}	84 ^{†††}
Diabetes mellitus (%)	0	0	25 ^{***}	20 ^{†††}
Fasting glucose (mg/dl)	92.3 ± 13.0	91.8 ± 9.1	$108.7\pm 38.5^*$	$105.1\pm 27.4^{\ddagger\ddagger}$
BMI (kg/m^2)	25.2 ± 3.6	$28.8\pm 4.1^*$	24.4 ± 4.1	$29.9\pm 4.8^{\ddagger\ddagger\ddagger}$
ESR (mm/h)	12.2 ± 10.0	$17.9\pm 11.7^*$	$16.7\pm 13.6^*$	$29.4\pm 22.9^{\ddagger\ddagger\ddagger}$
CRP plasma levels (mg/dl)	0.38 ± 0.48	0.32 ± 0.52	$0.78\pm 2.19^*$	$0.93\pm 2.24^{\ddagger\ddagger\ddagger}$
LDH (U/L)	168.8 ± 26.3	175.0 ± 25.3	164.4 ± 40.2	$232.9\pm 104.4^{\ddagger\ddagger\ddagger}$
Total cholesterol (mg/dl)	211.4 ± 38.3	220.3 ± 30.8	$200.1\pm 41.3^*$	$229.5\pm 42.6^{\ddagger\ddagger}$
HDL cholesterol (mg/dl)	56.1 ± 14.8	58.4 ± 12.5	59.7 ± 21.5	$53.5\pm 12.8^{\ddagger\ddagger\ddagger}$
LDL cholesterol (mg/dl)	135.1 ± 35.3	139.3 ± 28.5	130.3 ± 44.4	$149.1\pm 37.1^{\ddagger\ddagger}$
Triglycerides (mg/dl)	112.8 ± 80.5	112.4 ± 51.9	$130.7\pm 67.0^*$	$134.3\pm 60.6^{\ddagger}$

LDH, total serum lactic dehydrogenase.

Univariate analysis (using age and gender as covariates) or χ^2 test for categorical variables were reported.

* $P<.05$ versus Group A.

†† $P<.01$ versus Group C.

*** $P<.001$ versus Group A.

† $P<.05$ versus Group B.

††† $P<.001$ versus Group C.

gene. The first SNP results in the Asp27Thr amino acid substitution, while the second one corresponds to Lys51Arg amino acid change. PCR-restriction fragment length analysis was performed, as previously described [25].

2.4. Zinc, copper and selenium concentrations in plasma

Plasma zinc, copper and selenium concentrations from Greek and Italian samples were measured in the Laboratory of Nutrigenomic and Immunosenescence (Ancona, Italy) with Thermo XII Series ICP-MS (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA), following the manufacturer's instructions (AN_EO604) with slight modifications. Plasma samples were diluted 1:10 with a diluent, containing 0.1% Triton X-100, to maintain a stable emulsion with the diluted sample, and 0.15% HNO_3 , to ensure solubility of the trace elements, in order to achieve washout of these elements between samples. External calibration solutions containing Zn, Cu (blank to 2000 ppb) and Se (blank) were prepared by serial dilution of a parent multielement solution (1000 ppm for Zn, Cu and Se) (VHG Labs, Manchester, NH), using the same diluent as for the samples. Rhodium, at 200 ng/ml, was used as internal standard. Data were acquired for ^{66}Zn , ^{65}Cu and ^{82}Se . Quality of the analysis was assured by assessment of "quality standard samples" (SERONORM™ TRACE ELEMENT SERUM, Sero AS, Billingstad, Norway). Zinc levels of the quality standard samples were within 10% of the certified levels, as previously reported [17].

The instrument was operated with a Peltier cooled impact bead spray chamber, single piece quartz torch (1.5 mm i.d. injector) together with Xi interface cones and a Cetac-ASX 100 autosampler (CETAC Technologies, Omaha, NE). A Burgener Trace nebulizer was used as this device does not block during aspiration of clinical samples. The instrument was operated in standard mode (non-CCT), using 1400 W RF power, 1.10 L min^{-1} nebulizer gas flow, 0.70 L min^{-1} auxiliary gas flow, 13.0 L min^{-1} cool gas flow, 70 ms dwell time, 30 s sample uptake and 35 s wash time (2 repeats per sample).

2.5. Flow cytometric analysis of intracellular zinc ion availability, zinc release by MT and MT determination

Flow cytometry assessments were carried out in the Laboratory of Nutrigenomic and Immunosenescence. "Zinc-free" RPMI medium (zinc concentration less than 1 ppb) was obtained by treatment of RPMI with 5% Chelex 100 (Sigma-Aldrich, Milan, Italy), adding EDTA and HEPES buffer at the final concentrations of

1 and 25 mM, respectively (pH 7.4). Thawed or fresh PBMCs were divided into two equal aliquots of 2×10^5 cells, at least. One aliquot was incubated with 20 μM Zinpyr-1 (ZP-1) (Neurobiotex, Galveston, TX) for 30 min at 37°C and 5% CO_2 in HEPES buffered “zinc-free” RPMI medium containing 1 mM EDTA, as extracellular chelator, of free zinc eventually still present in the medium and/or adsorbed to the cell membrane.

The second aliquot was always incubated in the same conditions plus 50 μM N,N' , N' -tetrakis (2-pyridylmethyl)ethylenediamine (Sigma-Aldrich), in order to detect the autofluorescence of the zinc-free ZP-1 probe.

After incubation, the aliquots were immediately analyzed by flow cytometry (Coulter Epics XL). After selecting lymphocyte population according to the forward light and side scatters, the mean fluorescence intensity for ZP-1 was detected (excitation wavelength, 488 nm; detection at 525 ± 15) in the two aliquots. Data were recorded as the ratio of ZP-1 fluorescence/ZP-1 autofluorescence and represented the intracellular labile Zn ($i\text{Zn}_L$) [26].

To investigate the NO-induced release of Zn, an additional aliquot was incubated with 20 μM ZP-1 plus 100 μM diethylamine NONOate acetoxy-methylated (AcOM-DEA/NO) (Calbiochem, VWR International s.r.l., Milan, Italy). In fact, AcOM-DEA/NO is a cell-permeable acetoxy-methylated diazeniumdiolate compound that donates NO “intracellularly” following the action of intracellular esterases. Once the incubation period was terminated, all aliquots were immediately read by the flow cytometer. The difference between $i\text{Zn}_L$ in the presence and absence of NO donor was used to estimate the intracellular release of Zn ($i\text{Zn}_R$), as previously reported [20].

MT determination was performed as previously reported by Malavolta et al. [26], in thawed PBMC (2×10^5) treated with 0.3% paraformaldehyde and stored at 4°C for 2 days before processing using the monoclonal mouse anti-horse MT clone E9 antibody (Dakocytomation, Denmark). Results are expressed as mean fluorescence intensity.

2.6. Antioxidant enzyme activity determinations

The assessments of antioxidant enzyme activity in frozen samples from the Greek and Italian population were performed at the Institute of Gerontology and Geriatrics, University of Perugia (Italy). SOD3 (pSOD) (U/ml), CAT ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein) and GPx (nmol NADPH/min/ml) activities in plasma were measured, according to the methods of L'Abbé and Fisher [27], Beers and Sizer [28] and Flohé and Gunzler [29], respectively. To determine SOD1 activity in erythrocytes (eSOD), red blood cells were hemolyzed with cold distilled water. The enzymatic activity (U/g Hb) was measured in the supernatant, according to Winterbourn et al. [30], following the extraction with ethanol/chloroform mixture (1:1).

2.7. Assessment of dietary zinc intake

A qualitative food frequency questionnaire, designed for the needs of ZINCAGE project [31], was used for the assessment of dietary zinc intake in healthy elderly subjects. The consumption of 53 food items was recorded and, based upon these data, a “zinc score” for each volunteer was determined. To provide a continuous variable, representative of zinc dietary habits, frequency, quantity estimation and zinc content of foods consumed were all considered for the “zinc score” calculation (zinc score=frequency $\times$ quantity $\times$ zinc content). A validation study of the developed zinc score has been previously reported [32].

2.8. Statistical analysis

Data were analyzed with SPSS/Win program (version 15.0; SPSS Inc., Chicago, IL). Differences among groups were compared by univariate analysis using one-way analysis of variance for continuous variables and χ^2 test for categorical variables. Post hoc tests were performed when appropriate. The frequency distribution of +647A/C and +1245A/G MT1A polymorphisms and the differences in allele distribution from Hardy–Weinberg's equilibrium in control and patient groups were compared by χ^2 test.

Armitage's trend test and multiple logistic regression analysis were used to evaluate the association between +647A/C and +1245A/G MT1A polymorphisms and the study groups, after adjustment for potential cofounders, with the calculation of odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs). Haplotype frequencies were estimated by using an expectation maximization algorithm, implemented with Arlequin package.

Pairwise linkage disequilibrium (LD) between the two SNPs was also assessed. Bonferroni correction was used to adjust for multiple testing, with the single test significance level established as $\alpha=.05$, divided by the number of tests. Multiple regression analysis for cardiovascular biochemical markers was performed, according to the CG haplotype of the MT1A gene after controlling for age, gender, body mass index (BMI) and hypertension. The calculation of partial correlation coefficient, corrected for age, was performed after the log transformation of variables with skewed distribution. A probability value less than .05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Clinical characteristics and biochemical parameters

Table 1 presents the clinical profile of the participants. Hypertension was more prevalent in Greece than Italy, both in healthy subjects and in CVD patients ($P<.001$ and $P<.05$, respectively). Greek subjects had a higher mean BMI value than the Italian participants ($P<.05$). An increased inflammatory status (ESR) was observed in Greek healthy controls and CVD patients, when compared to the Italians ($P<.05$). With regard to CRP, a significant increment was observed exclusively in the CVD group for both countries, compared to healthy controls ($P<.05$). Total serum lactic dehydrogenase was enhanced in Greek CVD patients in relation to their Italian counterparts ($P<.01$). No country-dependent difference was recorded in the lipid profile of the healthy elders. Significant differences in total cholesterol, LDL and HDL cholesterol levels were observed between CVD patients from Italy and Greece ($P<.05$) (Table 1). CVD patients showed higher triglyceride and fasting glucose levels than healthy subjects in both countries ($P<.05$).

Table 2 reports the biochemical parameters of the subjects. A decrease in plasma zinc levels was observed in Greek healthy controls, as compared to the Italian ones ($P<.05$). A higher prevalence of subjects with a mild zinc deficiency (cutoff $\leq 11 \mu\text{M}$) was observed in Greek healthy subjects when compared to Italian ones (47.3% vs. 32.4%; $P<.01$). Moreover, a zinc deficiency was found in Italian CVD patients compared to the Italian healthy controls ($P<.05$). The determination of zinc ion availability ($i\text{Zn}_L$) and the *in vitro* NO-induced zinc release ($i\text{Zn}_R$) was performed in a subpopulation, including 40 CVD patients and 40 healthy subjects, randomly selected from each country using cryopreserved PBMCs. In order to verify if the methodology [26] could be applied in frozen samples, we have previously evaluated the correlations between $i\text{Zn}_L$ and $i\text{Zn}_R$ in fresh versus frozen PBMCs in 28 Italian elderly controls (13 males and 15 females). A significant correlation between frozen and fresh samples ($i\text{Zn}_L$ fresh and frozen PBMCs: $r=.661$, $P<.001$; $i\text{Zn}_R$ fresh and frozen PBMCs: $r=.4$, $P<.03$) was found. $i\text{Zn}_L$ values were lower in Italian CVD

Table 2
Metal trace elements, zinc status and antioxidant enzymes

	Controls		CVD patients	
	Italy (n=244) (A)	Greece (n=220) (B)	Italy (n=215) (C)	Greece (n=154) (D)
Zn plasma levels (μM)	11.8 ± 1.8	$11.2 \pm 1.4^*$	$10.7 \pm 2.5^*$	11.1 ± 2.2
Se plasma levels (μM)	1.21 ± 0.44	$1.45 \pm 0.50^*$	$1.22 \pm 0.53^\dagger$	$1.43 \pm 0.44^\ddagger$
Cu plasma levels (μM)	17.5 ± 3.4	18.0 ± 3.8	18.6 ± 5.0	18.8 ± 5.0
$i\text{Zn}_L^a$	1.34 ± 0.12	1.33 ± 0.22	$1.24 \pm 0.10^*$	$1.35 \pm 0.15^\ddagger$
$i\text{Zn}_R^a$	0.21 ± 0.07	$0.16 \pm 0.08^*$	0.18 ± 0.06	$0.14 \pm 0.1^\ddagger$
MT (pmol/mg prot)	21.7 ± 9.5	21.3 ± 8.1	23.7 ± 12.1	$26.5 \pm 8.9^\dagger$
MT/ $i\text{Zn}_R$	368 ± 202	365 ± 165	$468 \pm 160^*$	$480 \pm 90^\dagger$
pSOD (U/ml)	22.4 ± 4.3	22.5 ± 3.8	22.3 ± 4.0	$23.1 \pm 2.9^\ddagger$
eSOD (U/g Hb)	2970.3 ± 660.3	$3365.6 \pm 760.3^*$	3094.3 ± 716.3	3207.5 ± 780.6
GPx (nmol NADPH/ min/ml)	0.099 ± 0.014	$0.104 \pm 0.010^*$	0.100 ± 0.008	0.101 ± 0.011
CAT ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ prot)	19.2 ± 3.2	$22.9 \pm 2.9^*$	19.4 ± 2.6	$23.5 \pm 4.0^\ddagger$

Univariate analysis (using age as covariate) was performed.

* $P<.05$ versus Group A.

† $P<.05$ versus Group B.

‡ $P<.05$ versus Group C.

^a Tested in a subgroup of 40 CVD patients and 40 healthy controls randomly chosen.

Table 3
Correlations between antioxidant enzyme activity, zinc score and Zn status in Greek and Italian healthy controls

	LogMT/iZn _R		iZn _R		Plasma Zn	
	Coefficient ^a	Significance	Coefficient ^a	Significance	Coefficient ^a	Significance
<i>Italy</i>						
pSOD	0.027	0.8	−0.1	0.6	−0.16	0.4
eSOD	−0.24	0.1	0.4 *	0.045	−0.07	0.6
GPx	0.12	0.5	−0.16	0.4	0.15	0.4
CAT	0.08	0.9	−0.1	0.3	−0.27	0.1
Zn score	−0.1	0.6	0.1	0.09	0.17 **	0.002
<i>Greece</i>						
pSOD	−0.25	0.1	0.11	0.5	−0.11	0.6
eSOD	−0.38 *	0.021	0.32 *	0.009	0.21	0.3
GPx	0.02	0.6	−0.03	0.8	0.07	0.6
CAT	0.1	0.8	−0.12	0.5	−0.05	0.8
Zn score	−0.21	0.09	0.3 *	0.015	0.1	0.1

^a Partial correlation coefficients were computed after controlling for age.

* Correlation is significant at least at the .05 level.

** Correlation is significant at least at the .01 level.

than controls ($P<.05$), whereas no difference was observed in Greece, as well as between Greek and Italian healthy controls. iZn_R values decreased in the presence of disease in Greece ($P<.05$), while a slight downward trend was observed in Italy. In addition, iZn_R values were significantly lower in the Greek population than the Italian one ($P<.05$) (Table 2).

No country-related differences in MT levels were recorded. However, MT levels were significantly increased in CVD Greek patients, compared to their healthy counterparts ($P<.05$), while MT/iZn_R increased concomitantly to the pathology, in both populations ($P<.05$) (Table 2).

With regard to other trace elements, no significant disease-related differences were recorded in copper and selenium levels, although Greek subjects presented higher selenium plasma concentrations, compared to the Italians ($P<.05$).

Antioxidant enzyme activity was not affected by the disease state, but differences were observed in relation to country. In particular,

eSOD, GPx, and CAT activities were increased in Greek controls, as compared to the Italian ones ($P<.05$), while CAT and pSOD activities were higher in CVD Greek patients than Italians ($P<.05$).

Partial correlation coefficients, among enzyme antioxidant activity, zinc parameters and zinc score, are reported in Table 3. In Greek healthy controls, an inverse correlation between MT/iZn_R and eSOD was found ($r=-0.38$, $P<.05$). Positive correlations were observed between iZn_R and eSOD in Greece and in Italy ($r=.32$, $P<.01$ and $r=.4$, $P<.05$, respectively). Moreover, significant correlations were observed between zinc score and iZn_R in Greece ($r=.3$, $P<.05$) or plasma zinc levels and zinc score in Italy ($r=.17$, $P<.01$).

3.2. +647A/C and +1245A/G MT1A genotype distribution

The genotype frequency distributions for +1245A/G polymorphism were in Hardy–Weinberg's equilibrium, in cases and controls in both countries. The +647A/C MT1A polymorphism genotype

Table 4
Genotype distribution of +647A/C and +1245A/G MT1A polymorphisms in CVD and healthy controls

(A) Italy				
Controls (n=244)		CVD patients (n=215)	P value (Pearson χ^2 test) [Armitage's trend test]	OR (95% CI) [P value] (logistic regression model)
<i>+647A/C MT1A genotype</i>				
AA	47.5%	55.3%	.21	0.83 (0.39–1.75) [.62 ^a]
AC	45.5%	37.7%	[OR=0.851, χ^2 =1.80, P=.17969]	
CC	7.0%	7.0%		
<i>+1245A/G MT1A genotype</i>				
AA	75%	80%	.47	0.68 (0.31–1.48) [.34 ^b]
AG	22.9%	18.7%	[OR=0.775, χ^2 =1.67, P=.19683]	
GG	2.1%	1.3%		
(B) Greece				
Controls (n=220)		CVD patients (n=154)	P value (Pearson χ^2 test) [Armitage's trend test]	OR (95% CI) [P value] (logistic regression model)
<i>+647A/C MT1A genotype</i>				
AA	44.5%	34.2%	.12	1.25 (0.75–2.13) [.38 ^a]
AC	48.2%	58.6%	[OR=1.243, χ^2 =2.48, P=.11567]	
CC	7.3%	7.2%		
<i>+1245A/G MT1A genotype</i>				
AA	76.8%	65.6%	.021	1.88 (1.14–3.08) [.013 ^b]
AG	23.2%	33.1%	[OR=2.103, χ^2 =6.66, P=.00989]	
GG	0%	1.3%		

Logistic regression analysis was performed with adjustment for age, gender, hypertension, BMI and diabetes.

ORs for genotypes were calculated, grouping ^aA/C+C/C (C+ genotype) versus A/A (C− genotype) and ^bA/G+G/G (G+ genotype) versus A/A (G− genotype).

Table 5
Haplotypic frequencies in CVD and healthy controls

(A) Italy				
+647 MT1A allele	+1245 MT1A allele	Controls, frequency (%)	CVD patients, frequency (%)	P value
A	A	63.9	69.5	.085
C	A	22.7	20.3	.40
C	G	6.7	5.7	.51
A	G	6.7	4.5	.15
(B) Greece				
+647 MT1A allele	+1245 MT1A allele	Controls, frequency (%)	CVD patients, frequency (%)	P value
A	A	67.4	63.2	.26
C	A	21.1	19.0	.43
C	G	10.6	17.4	.007**
A	G	0.9	0.4	.33

For (A): likelihood ratio=3.9, $df=3$, $P=.27$ by Pearson χ^2 when comparing all groups. For (B): likelihood ratio=8.1, $df=3$, $P=.04$ by Pearson χ^2 when comparing all groups. Each P value is referred to the comparison between one haplotype versus all other ones.

** $P<.05$ after adjusting for multiple comparisons, using Bonferroni correction.

frequency was consistent with Hardy–Weinberg's equilibrium in the various groups, except for the CVD Greek patients.

No significant different genotypic distribution of +647A/C MT1A and +1245 MT1A polymorphisms was observed between CVD patients and healthy old controls in Italy (Table 4A).

Similarly, no differences were observed in +647A/C MT1A genotype distributions between healthy controls and CVD patients in Greece. However, a significant association was found in Greece between +1245A/G MT1A polymorphism and CVD, with increased G+ frequency (AG and GG genotypes) in the patient group, with respect to healthy controls ($P<.05$ by Pearson χ^2 test) (Table 4B). Multiple logistic regression analysis, corrected for age, gender, hypertension, BMI and diabetes, indicated, however, that the +1245 G+MT1A genotype was an independent risk factor for CVD ($P=.013$; OR=1.88, 95% CI=1.14–3.08) (Table 4B).

3.3. Haplotype determination

Two single nucleotide polymorphisms of MT1A cluster were determined, and the frequency of haplotypes was analyzed using the

Arlequin software package. The polymorphism of +647 MT1A was in strong LD with the +1245 MT1A one, as indicated by the D' value, which was estimated in all subjects for both countries ($D'=0.34$, $P<.00001$ and $D'=0.92$, $P<.00001$ for Italy and Greece, respectively). Moreover, a significant difference in haplotype frequency distribution between CVD patients and control subjects was evident in Greece (likelihood ratio=8.1, $df=3$, $P=.04$ by Pearson χ^2) (Table 5B), but not in Italy (likelihood ratio=3.9, $df=3$, $P=.27$ by Pearson χ^2) (Table 5A).

MT1A CG (Thr/Arg) haplotype was more prevalent in Greek CVD patients, as compared to old individuals (17.4% vs. 10.6%; $P=.007$), and these differences remained statistically significant after Bonferroni correction for four comparisons. Haplotype frequency distribution between Greek and Italian populations, within the same subject group, displayed significant differences in both controls and CVD patients (controls: likelihood ratio=13.4, $P<.01$; CVD patients: likelihood ratio=18.5, $P<.001$).

3.4. Phenotype assessment according to +1245A/G MT1A polymorphism and MT1A haplotypes in Greek and Italian participants

We evaluated the influence of MT1A haplotype on phenotype markers (antioxidant enzymes and zinc homeostasis) in Greek and Italian populations.

Multiple regression analysis of enzyme antioxidant activity and $iZnR$ according to the CG haplotype of the MT1A gene, including age, gender, BMI and hypertension, as covariates, was performed.

The Greek participants with CG haplotype (both CG+/CG+ and CG+/CG+, labeled as CG+) had higher GPx activity in healthy donors ($P<.001$) (Fig. 1B) and lower CAT activity (Fig. 1A) and $iZnR$ in CVD patients (Fig. 1C) than subjects without CG haplotypes (labeled as CG–/CG–) ($P<.05$). No differences in relation to CG haplotype were observed for CAT activity and $iZnR$ in the control group and for GPx activity in CVD patients. In Italy, CG haplotype was associated with higher pSOD in the control subjects and increased eSOD in CVD patients ($P<.01$ and $P<.05$, respectively) (Fig. 2A and B). No significant differences were found for GPx, CAT activity and $iZnR$. Using the same multiple regression model, we found that none of the other haplotypes was associated with

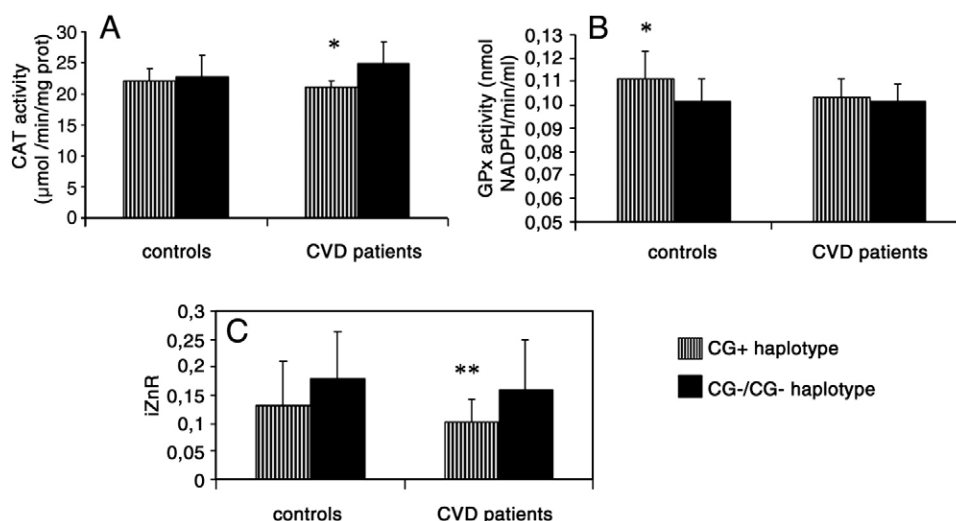


Fig. 1. Catalase, GPx activity and intracellular zinc release according to +647/+1245 MT1A haplotypes in the Greek cohort. ** $P<.001$ as compared to CG–/CG– haplotype; * $P<.05$ as compared to CG–/CG– haplotype, using multivariate regression analysis correcting for age, gender, BMI and hypertension. CG+ haplotype identifies heterozygous and homozygous subjects with CG haplotypes, while CG–/CG– represents subjects without CG haplotype.

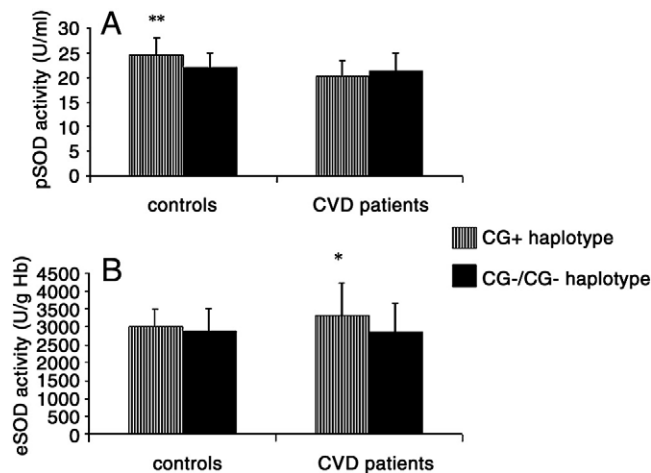


Fig. 2. ** $P < 0.01$ as compared to CG-/CG- haplotype; * $P < 0.05$ as compared to CG-/CG- haplotype, using multivariate regression analysis correcting for age, gender, BMI and hypertension. CG+ haplotype identifies heterozygous and homozygous subjects with CG haplotypes, while CG-/CG- represents subjects without CG haplotype.

antioxidant enzyme activity or other clinical and biochemical markers (data not shown).

4. Discussion

Oxidative stress and zinc dyshomeostasis have been implicated in CVDs [33,34]. A cardioprotective role has been suggested for MT [6,35], zinc-binding proteins regulating zinc homeostasis and antioxidant response [36,37]. Recently, an involvement of +647A/C MT1A polymorphism in DM2 CVD complications coupled with altered modulation of intracellular zinc homeostasis has been demonstrated [20], whereas +1245A/G MT1A polymorphism seems to influence the antioxidant enzyme activity in diabetic Chinese patients [21]. In the present study, a logistic regression model revealed an association of +1245 MT1A polymorphism with CVD in Greece, but not in Italy. The variable LD among the Italian and the Greek population, as well as the different lifestyle and environmental factors, including diet, could explain the lack of association between +1245 MT1A polymorphism with CVD in the Italian cohort. Several studies demonstrated that gene–environment combinations may modify the disease risk with a particular relevance for dietary habits [38–42].

No association between the +647A/C MT1A polymorphism and CVD was observed. However, haplotype analysis showed a significant association of the MT1A CG haplotype with CVD in the Greek sample, as well as a different country-related haplotype frequency distribution, suggesting heterogeneity in the frequencies of MT variants in different European populations (unpublished data from ZINCAGE study).

CG haplotype modulated enzyme antioxidant activity in Greece (CAT and GPx) and in Italy (eSOD and pSOD), and it was associated with decreased iZn_R in CVD Greek patients (Figs. 1 and 2). All these findings are relevant because they show for the first time the implication of MT1A gene variants in antioxidant efficiency and CVD susceptibility. In the Greek cohort, we have also observed a higher prevalence of healthy subjects with mild zinc deficiency (cutoff $\leq 11 \mu M$ in the plasma) than Italian ones (47.3% vs. 32.4%; $P < 0.01$). The choice of this cutoff has been previously suggested to identify subjects with a “potential zinc deficiency”, taking also into account a variability of 10% in plasma zinc concentrations [17,43]. The lower zinc status in Greece was also supported by impaired iZn_R , which, in turn, reflects a more reduced zinc intake in elderly Greek population than in Italy, as

previously reported [32]. The presence of a positive correlation between iZn_R and the dietary zinc intake in Greece confirms this assumption. A moderate zinc deficiency may predispose to CVD development or mortality, as also suggested by epidemiological studies in other countries [11,44,45]. Zinc plays an antiatherogenic role through the inhibition of both oxidative stress and endothelial cells apoptosis during inflammation [46,47]. Moreover, zinc enhances the activity and expression of antioxidant proteins, such as MTs [48] and SOD [18]. Therefore, chronic zinc deficiency affects the antioxidant response determining susceptibility to oxidative stress and modulation of inflammatory parameters [49,50], increasing, as such, the risk of CVDs. In addition, since one of the protective effects of MT on CVD may be attributed to their capacity to release zinc [51], Greek subjects with impaired iZn_R may be more vulnerable to the pathology occurrence or progression. On the other hand, the Greek cohort presents high prevalence of CVD risk factors, such as hypercholesterolemia and hypertension [24], and increased BMI and ESR levels than Italian ones (present study). The increment of enzyme antioxidant activity (pSOD, eSOD and CAT) in Greece might be, in part, promoted by a reduced zinc intake [52] or by the presence of atherogenic stimuli [53,54]. Finally, the decreased zinc dietary intake in Greek healthy elderly cohort [32] may be the main cause of the different results between Greece and Italy, further supporting the relevance of the gene–dietary habit interaction for CVD predisposition [41]. Interestingly, the Mediterranean diet is widespread in both countries and is associated with lower incidence of CVDs [55]. However, the Mediterranean diet score is lower in Greece than in Italy and is associated with increased circulating levels of pro-inflammatory cytokines [56].

In conclusion, our data support +1245A/G MT1A polymorphism and +647/ +1245 MT1A haplotype as susceptibility markers for CVD in the Greek population and suggest a possible influence of MT1A gene variants on antioxidant enzyme activity and intracellular zinc release.

However, a study with a large sample size is needed to validate or replicate our association results, especially from other ethnic populations.

Acknowledgments

Supported by INRCA and European Commission (ZINCAGE project no. FOOD-CT-2003-506850; coordinated by Dr. Eugenio Mocchegiani). We thank N. Gasparini for the excellent technical support and C. Sirolla for the statistical support.

References

- [1] Harrison D, Griendling KK, Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am J Cardiol* 2003;91:7A–11A.
- [2] Valgimigli M, Merli E, Malagutti P, Soukhomovskaia O, Cicchitelli G, Antelli A, et al. Hydroxyl radical generation, levels of tumor necrosis factor- α , and progression to heart failure after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:2000–8.
- [3] Li JM, Shah AM. Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;287:R1014–30.
- [4] Landmesser U, Spiekermann S, Dikalov S, Tatge H, Wilke R, Kohler C, et al. Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: role of xanthine-oxidase and extracellular superoxide dismutase. *Circulation* 2002;106:3073–8.
- [5] Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol* 2003;17:24–38.
- [6] Cai L, Wang Y, Zhou G, Chen T, Song Y, Li X, et al. Attenuation by metallothionein of early cardiac cell death via suppression of mitochondrial oxidative stress results in a prevention of diabetic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:1688–97.
- [7] Maret W. Zinc coordination environments in proteins as redox sensors and signal transducers. *Antioxid Redox Signal* 2006;8:1419–41.
- [8] Arroyo M, Laguardia SP, Bhattacharya SK, Nelson MD, Johnson PL, Carbone LD, et al. Micronutrients in African-Americans with decompensated and compensated heart failure. *Transl Res* 2006;148:301–8.

- [9] Giacconi R, Muti E, Malavolta M, Cipriano C, Costarelli L, Bernardini G, et al. The +838 C/G MT2A polymorphism, metals, and the inflammatory/immune response in carotid artery stenosis in elderly people. *Mol Med* 2007;13:388–95.
- [10] Karagulova G, Yue Y, Moreyra A, Boutjdir M, Korichneva. Protective role of intracellular zinc in myocardial ischemia/reperfusion is associated with preservation of protein kinase C isoforms. *I. J Pharmacol Exp Ther* 2007;321:517–25.
- [11] Reunanen A, Knekt P, Marniemi J, Maki J, Maatela J, Aromaa A. Serum calcium, magnesium, copper and zinc and risk of cardiovascular death. *Eur J Clin Nutr* 1996;50:431–7.
- [12] Leone N, Courbon D, Ducimetiere P, Zureik M. Zinc, copper, and magnesium and risks for all-cause, cancer, and cardiovascular mortality. *Epidemiology* 2006;17:308–14.
- [13] Zuo C, Qiu HY, Li Z, Xie XS, Fan JM. Relationship between cardiovascular complication and inflammation, oxidative stress of patient with maintenance hemodialysis. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2008;39:119–21.
- [14] Kerkeni M, Added F, Ben Farhat M, Miled A, Trivin F, Maaroufi K. Hyperhomocysteinaemia and parameters of antioxidative defence in Tunisian patients with coronary heart disease. *Ann Clin Biochem* 2008;45:193–8.
- [15] Ceballos-Picot I, Trivier JM, Nicole A, Sinet PM, Thevenin M. Age-correlated modifications of copper–zinc superoxide dismutase and glutathione-related enzyme activities in human erythrocytes. *Clin Chem* 1992;38:66–70.
- [16] Newman KP, Bhattacharya SK, Munir A, Davis RC, Soberman JE, Ramanathan KB. Macro- and micronutrients in patients with congestive heart failure, particularly African-Americans. *Vasc Health Risk Manag* 2007;3:743–7.
- [17] Mocchegiani E, Giacconi R, Costarelli L, Muti E, Cipriano C, Tesei S, et al. Zinc deficiency and IL-6 polymorphism in old people from different European countries: effect of zinc supplementation. *Zincage study. Exp Gerontol* 2008;43:433–44.
- [18] Mariani E, Mangialasche F, Feliziani FT, Cecchetti R, Malavolta M, Bastiani P, et al. Effects of zinc supplementation on antioxidant enzyme activities in healthy old subjects. *Exp Gerontol* 2008;43:445–51.
- [19] Eby GA, Halcomb WW. High-dose zinc to terminate angina pectoris: a review and hypothesis for action by ICAM inhibition. *Med Hypotheses* 2006;66:169–72.
- [20] Giacconi R, Bonfigli AR, Testa R, Sirolla C, Cipriano C, Muti E, et al. +647 A/C and +1245 MT1A polymorphisms in the susceptibility of diabetes mellitus and cardiovascular complications. *Mol Genet Metab* 2008;94:98–104.
- [21] Yang L, Li H, Yu T, Zhao H, Chierian MG, Cai L, et al. Polymorphisms in metallothionein-1 and -2 genes associated with the risk of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008;294:E987–92.
- [22] Marcellini F, Giuli C, Papa R, Gagliardi C, Dedoussis G, Herbein G, et al. Zinc status, psychological and nutritional assessment in old people recruited in five European countries: Zincage study. *Biogerontology* 2006;7:339–45.
- [23] Bamia C, Trichopoulos D, Ferrari P, Overvad K, Bjerregaard L, Tjønneland A, et al. Dietary patterns and survival of older Europeans: the EPIC-Elderly Study [European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition]. *Public Health Nutr* 2007;10:590–8.
- [24] Kanoni S, Dedoussis GV. Design and descriptive characteristics of the GHRAS: the Greek Health Randomized Aging Study. *Med Sci Monit* 2008;14:CR204–12.
- [25] Cipriano C, Malavolta M, Costarelli L, Giacconi R, Muti E, Gasparini N, et al. Polymorphisms in MT1a gene coding region are associated with longevity in Italian Central female population. *Biogerontology* 2006;7:357–65.
- [26] Malavolta M, Costarelli L, Giacconi R, Muti E, Bernardini G, Tesei S, et al. Single and three-color flow cytometry assay for intracellular zinc ion availability in human lymphocytes with Zinpyr-1 and double immunofluorescence: relationship with metallothioneins. *Cytometry A* 2006;69:1043–53.
- [27] L'Abbé MR, Fisher PWF. Automated assay of superoxide dismutase in blood. *Methods Enzymol* 1990;186:232–7.
- [28] Beers RF, Sizer IW. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem* 1952;195:133–40.
- [29] Flohé L, Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1984;105:114–21.
- [30] Winterbourn CC, Hawkins RE, Brian M, Carrell RW. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J Lab Clin Med* 1975;85:337–41.
- [31] ZINCAGE project, 2004–2007, www.Zincage.org.
- [32] Kanoni S, Dedoussis G, Herbein G, Fulop T, Audrey Varin A, Jajte J, et al. Assessment of gene–nutrient interactions on inflammatory status of the elderly with the use of a Zinc Diet Score—ZINCAGE study. *J Nutr Biochem* 2009.
- [33] Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens* 2000;18:655–73.
- [34] Weber KT, Weglicki WB, Simpson RU. Macro- and micronutrient dyshomeostasis in the adverse structural remodelling of myocardium. *Cardiovasc Res* 2009;81:500–8.
- [35] Guo R, Ma H, Gao F, Zhong L, Ren J. Metallothionein alleviates oxidative stress-induced endoplasmic reticulum stress and myocardial dysfunction. *J Mol Cell Cardiol* 2009.
- [36] Maret W, Krezel A. Cellular zinc and redox buffering capacity of metallothionein/thionein in health and disease. *Mol Med* 2007;13:315–71.
- [37] Bell SG, Vallee BL. The metallothionein/thionein system: an oxidoreductive metabolic zinc link. *ChemBioChem* 2009;10:55–62.
- [38] Nelson TL, Fingerlin TE, Moss LK, Barmada MM, Ferrell RE, Norris JM. Association of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene with type 2 diabetes mellitus varies by physical activity among non-Hispanic whites from Colorado. *Metabolism* 2007;56:388–93.
- [39] Gable DR, Matin J, Whittall R, Cakmak H, Li KW, Cooper J, et al. Common adiponectin gene variants show different effects on risk of cardiovascular disease and type 2 diabetes in European subjects. *Ann Hum Genet* 2007;71:453–66.
- [40] Santos JL, Boutin P, Verdich C, Holst C, Larsen LH, Toubro S, et al. Genotype-by-nutrient interactions assessed in European obese women. A case-only study. *Eur J Nutr* 2006;45:454–62.
- [41] Ordovas JM. Genetic influences on blood lipids and cardiovascular disease risk: tools for primary prevention. *Am J Clin Nutr* 2009.
- [42] Mocchegiani E, Costarelli L, Giacconi R, Cipriano C, Muti E, Tesei S, et al. Nutrient–gene interaction in ageing and successful ageing. A single nutrient (zinc) and some target genes related to inflammatory/immune response. *Mech Ageing Dev* 2006;127:517–25.
- [43] Peppersack T, Rotsaert P, Benoit F, Willems D, Fuss M, Bourdoux P, et al. Prevalence of zinc deficiency and its clinical relevance among hospitalised elderly. *Arch Gerontol Geriatr* 2001;33(3):243–53.
- [44] Alissa EM, Bahjri SM, Ahmed WH, Al-Ama N, Ferns GA. Trace element status in Saudi patients with established atherosclerosis. *J Trace Elem Med Biol* 2006;20:105–14.
- [45] Lee DH, Folsom AR, Jacobs Jr DR. Iron, zinc, and alcohol consumption and mortality from cardiovascular diseases: the Iowa Women's Health Study. *Am J Clin Nutr* 2005;81:787–91.
- [46] Hennig B, Meerarani P, Toborek M, McClain CJ. Antioxidant-like properties of zinc in activated endothelial cells. *J Am Coll Nutr* 1999;18:152–8.
- [47] Meerarani P, Ramadass P, Toborek M, Bauer HC, Bauer H, Hennig B. Zinc protects against apoptosis of endothelial cells induced by linoleic acid and tumor necrosis factor alpha. *Am J Clin Nutr* 2000;71:81–7.
- [48] Davis SR, Cousins RJ. Metallothionein expression in animals: a physiological perspective on function. *J Nutr* 2000;130:1085–8.
- [49] Gomez NN, Fernandez MR, Zhirulnik F, Gil E, Scardapane L, Ojeda MS, et al. Chronic zinc deficiency induces an antioxidant adaptive response in rat lung. *Exp Lung Res* 2003;29:485–502.
- [50] Shen H, Oesterling E, Stromberg A, Toborek M, MacDonald R, Hennig B. Zinc deficiency induces vascular pro-inflammatory parameters associated with NF-kappaB and PPAR signalling. *J Am Coll Nutr* 2008;27:577–87.
- [51] Cai L. Diabetic cardiomyopathy and its prevention by metallothionein: experimental evidence, possible mechanisms and clinical implications. *Curr Med Chem* 2007;14:2193–203.
- [52] Jing MY, Sun JY, Zi NT, Sun W, Qian LC, Weng XY. Effects of zinc on hepatic antioxidant systems and the mRNA expression levels assayed by cDNA microarrays in rats. *Ann Nutr Metab* 2007;51(4):345–51.
- [53] 't Hoen PA, Van der Lans CA, Van Eck M, Bijsterbosch MK, Van Berkel TJ, Twisk J. Aorta of ApoE-deficient mice responds to atherogenic stimuli by a prelesional increase and subsequent decrease in the expression of antioxidant enzymes. *Circ Res* 2003;93:262–9.
- [54] Yang H, Roberts LJ, Shi MJ, Zhou LC, Ballard BR, Richardson A, et al. Retardation of atherosclerosis by overexpression of catalase or both Cu/Zn-superoxide dismutase and catalase in mice lacking apolipoprotein E. *Circ Res* 2004;95:1075–81.
- [55] Trichopoulou A, Bamia C, Norat T, Overvad K, Schmidt EB, Tjønneland A, et al. Modified Mediterranean diet and survival after myocardial infarction: the EPIC-Elderly Study. *Eur J Epidemiol* 2007;22:871–81.
- [56] Dedoussis GV, Kanoni S, Mariani E, Cattini L, Herbein G, Fulop T, et al. Mediterranean diet and plasma concentration of inflammatory markers in old and very old subjects in the ZINCAGE population study. *Clin Chem Lab Med* 2008;46:990–6.

New genetic loci implicated in fasting glucose homeostasis and their impact on type 2 diabetes risk

Levels of circulating glucose are tightly regulated. To identify new loci influencing glycemic traits, we performed meta-analyses of 21 genome-wide association studies informative for fasting glucose, fasting insulin and indices of beta-cell function (HOMA-B) and insulin resistance (HOMA-IR) in up to 46,186 nondiabetic participants. Follow-up of 25 loci in up to 76,558 additional subjects identified 16 loci associated with fasting glucose and HOMA-B and two loci associated with fasting insulin and HOMA-IR. These include nine loci newly associated with fasting glucose (in or near *ADCY5*, *MADD*, *ADRA2A*, *CRY2*, *FADS1*, *GLIS3*, *SLC2A2*, *PROX1* and *C2CD4B*) and one influencing fasting insulin and HOMA-IR (near *IGF1*). We also demonstrated association of *ADCY5*, *PROX1*, *GCK*, *GCKR* and *DGKB-TMEM195* with type 2 diabetes. Within these loci, likely biological candidate genes influence signal transduction, cell proliferation, development, glucose-sensing and circadian regulation. Our results demonstrate that genetic studies of glycemic traits can identify type 2 diabetes risk loci, as well as loci containing gene variants that are associated with a modest elevation in glucose levels but are not associated with overt diabetes.

Impaired beta-cell function and insulin resistance are key determinants of type 2 diabetes (T2D). Hyperglycemia in the fasting state is one of the criteria that defines T2D¹, it can predict definitive clinical endpoints in nondiabetic individuals^{2,3} and, when corrected in subjects with T2D, may help prevent microvascular^{4,5} and long-term macrovascular^{6,7} complications. To date, there are nearly 20 published loci reproducibly associated with T2D⁸; most of these are also associated with decreased insulin secretion⁹ due to defective beta-cell function or beta-cell mass. Association studies for diabetes-related quantitative traits in participants without diabetes have also identified loci influencing fasting glucose levels, whose effects appear to be mediated by impairment of the glucose-sensing machinery in beta cells^{10–17}.

We recently formed the Meta-Analyses of Glucose and Insulin-related traits Consortium (MAGIC) to conduct large-scale meta-analyses of genome-wide data for continuous diabetes-related traits in participants without diabetes¹⁵. We aimed to identify additional loci that influence glycemic traits in individuals free of diabetes and investigate their impact on related metabolic phenotypes. We were also interested in understanding variation in the physiological range of glycemia and evaluating the extent to which the same variants influence pathological fasting glucose variation and T2D risk. The initial MAGIC collaboration identified the fasting glucose- and T2D-associated locus in *MTNR1B*¹⁵, which was also reported by others^{16,17}; this finding demonstrated that studies of continuous glycemic phenotypes in nondiabetic individuals can complement the genetic analyses of diabetes as a dichotomous trait and can improve our understanding of the mechanisms involved in beta-cell function and glucose homeostasis. Here, we extend our previous approach by performing meta-analyses of ~2.5 million directly genotyped or imputed autosomal SNPs from 21 genome-wide association studies (GWAS). These 21 cohorts include up to 46,186 nondiabetic participants of

European descent informative for fasting glucose and 20 GWAS including up to 38,238 nondiabetic individuals informative for fasting insulin, as well as the surrogate estimates of beta-cell function (HOMA-B) and insulin resistance (HOMA-IR) derived from fasting variables by homeostasis model assessment¹⁸. Follow-up of 25 lead SNPs in up to 76,558 additional individuals of European ancestry identified nine new genome-wide significant associations (empirically determined as $P < 5 \times 10^{-8}$)¹⁹ with fasting glucose and one with fasting insulin and HOMA-IR. Five of these loci also demonstrated genome-wide significant evidence for association between the glucose-raising allele and T2D risk in up to 40,655 cases and 87,022 nondiabetic controls.

The wealth of loci newly discovered to be associated with fasting glucose and HOMA-B contrasts with the single new locus identified for fasting insulin and HOMA-IR and suggests that there is a different genetic architecture for beta-cell function and insulin resistance. Furthermore, our data support the hypothesis that not all loci that influence glycemia within the physiological range are also associated with pathological levels of glucose and T2D risk.

RESULTS

Genome-wide association meta-analysis of glycemic traits

We conducted a two-stage association study in individuals of European descent (Online Methods, **Supplementary Fig. 1** and **Supplementary Tables 1a,b**). Because we sought to identify variants that influence fasting glucose in the unaffected population, hyperglycemia in the diabetic range exerts deleterious effects on beta-cell function^{20,21} and treatment can confound glucose and insulin measurements, we excluded individuals with known diabetes, those on anti-diabetic treatment, and those with fasting glucose ≥ 7 mmol/l. We combined data from 21 stage 1 discovery GWAS for fasting glucose ($n = 46,186$) and 20 GWAS for fasting insulin ($n = 38,238$), HOMA-B ($n = 36,466$)

*A full list of authors and affiliations appears at the end of the paper.

Table 1 SNPs associated with fasting glucose-related or insulin-related traits at genome-wide significance levels

Glucose/HOMA-B selected SNPs				Fasting glucose				HOMA-B			
SNP	Nearest gene(s)	Alleles (effect/other)	Freq	Discovery <i>P</i>	<i>I</i> ² estimate (<i>P</i>)	Global <i>P</i>	Joint analysis <i>n</i>	Discovery <i>P</i>	<i>I</i> ² estimate (<i>P</i>)	Global <i>P</i>	Joint analysis <i>n</i>
rs560887	<i>G6PC2</i>	C/T	0.70	4.4×10^{-75}	0.31 (0.18)	8.7×10^{-218}	119,169	2.0×10^{-28}	0.54 (0.01)	1.5×10^{-66}	94,839
rs10830963	<i>MTNR1B</i>	G/C	0.30	1.2×10^{-68}	0.00 (1.00)	5.8×10^{-175}	112,844	1.8×10^{-22}	0.45 (0.03)	2.7×10^{-43}	90,364
rs4607517	<i>GCK</i>	A/G	0.16	4.5×10^{-36}	0.19 (0.46)	6.5×10^{-92}	118,500	7.5×10^{-8}	0.36 (0.12)	1.8×10^{-16}	94,112
rs2191349	<i>DGKB-TMEM195</i>	T/G	0.52	7.8×10^{-17}	0.10 (0.68)	3.0×10^{-44}	122,743	5.4×10^{-11}	0.09 (0.71)	2.8×10^{-17}	98,372
rs780094	<i>GCKR</i>	C/T	0.62	2.5×10^{-12}	0.00 (1.00)	5.6×10^{-38}	118,032	0.25	0.32 (0.18)	3.2×10^{-4}	93,990
rs11708067	<i>ADCY5</i>	A/G	0.78	8.7×10^{-9}	0.04 (0.89)	7.1×10^{-22}	118,475	2.2×10^{-4}	0.37 (0.10)	2.5×10^{-12}	94,212
rs7944584	<i>MADD</i>	A/T	0.75	1.5×10^{-9}	0.00 (1.00)	2.0×10^{-18}	118,741	1.1×10^{-4}	0.16 (0.51)	3.5×10^{-5}	94,408
rs10885122	<i>ADRA2A</i>	G/T	0.87	8.4×10^{-11}	0.00 (1.00)	2.9×10^{-16}	118,410	3.7×10^{-6}	0.11 (0.66)	2.0×10^{-6}	94,128
rs174550	<i>FADS1</i>	T/C	0.64	1.5×10^{-8}	0.00 (1.00)	1.7×10^{-15}	118,908	4.5×10^{-5}	0.01 (0.99)	5.2×10^{-13}	94,536
rs11605924	<i>CRY2</i>	A/C	0.49	1.5×10^{-9}	0.00 (1.00)	1.0×10^{-14}	116,479	5.2×10^{-6}	0.03 (0.94)	3.2×10^{-5}	92,326
rs11920090	<i>SLC2A2</i>	T/A	0.87	1.9×10^{-6}	0.00 (1.00)	8.1×10^{-13}	119,024	1.4×10^{-4}	0.36 (0.11)	4.5×10^{-6}	94,629
rs7034200	<i>GLIS3</i>	A/C	0.49	1.2×10^{-4}	0.00 (1.00)	1.0×10^{-12}	106,250	1.9×10^{-6}	0.19 (0.46)	1.2×10^{-13}	83,759
rs340874	<i>PROX1</i>	C/T	0.52	7.1×10^{-8}	0.00 (1.00)	6.6×10^{-12}	116,882	3.7×10^{-5}	0.00 (1.00)	5.3×10^{-6}	92,942
rs11071657	<i>C2CD4B</i>	A/G	0.63	2.8×10^{-7}	0.00 (1.00)	3.6×10^{-8}	114,454	0.23	0.08 (0.73)	0.002	90,675
rs11558471	<i>SLC30A8</i>	A/G	0.68	2.6×10^{-11}	–	–	45,996	1.4×10^{-6}	–	–	36,283
rs4506565	<i>TCF7L2</i>	T/A	0.31	1.2×10^{-8}	–	–	46,181	1.4×10^{-6}	–	–	36,461

Insulin/HOMA-IR selected SNPs				Fasting insulin				HOMA-IR			
SNP	Nearest gene(s)	Alleles (effect/other)	Freq	Discovery <i>P</i>	<i>I</i> ² estimate (<i>P</i>)	Global <i>P</i>	Joint analysis <i>n</i>	Discovery <i>P</i>	<i>I</i> ² estimate (<i>P</i>)	Global <i>P</i>	Joint analysis <i>n</i>
rs780094	<i>GCKR</i>	C/T	0.62	1.1×10^{-4}	0.14 (0.57)	3.6×10^{-20}	96,126	9.9×10^{-7}	0.25 (0.32)	3.0×10^{-24}	94,636
rs35767	<i>IGF1</i>	G/A	0.85	1.0×10^{-7}	0.17 (0.50)	3.3×10^{-8}	94,590	7.8×10^{-8}	0.26 (0.28)	2.2×10^{-9}	93,141

Directly genotyped and imputed SNPs were tested for association with fasting glucose, fasting insulin and homeostasis model assessment of beta-cell function (HOMA-B) and insulin resistance (HOMA-IR). Twenty-one discovery cohorts with genome-wide data were meta-analyzed (stage 1 discovery), and 25 SNPs were promoted for replication of the same trait in a set of 33 additional cohorts with *in silico* ($n = 7$) or *de novo* ($n = 26$) genotype data ($n = 31$ for fasting insulin, HOMA-B and HOMA-IR; for stage 2 replication *P* values and effect sizes, see **Table 2**). A joint analysis was then performed (global). Heterogeneity in the discovery sample was assessed using the *I*² index⁴⁸. Replication was not attempted for SNPs in two known T2D-associated genes (*SLC30A8* and *TCF7L2*) that achieved genome-wide significance for fasting glucose in stage 1. Freq denotes the allele frequency of the glucose-raising allele. *n* = sample size. Note that the previously reported *GCKR* SNP has associations with glucose-related and insulin-related traits.

and HOMA-IR ($n = 37,037$) and analyzed associations for ~2.5 million autosomal SNPs directly genotyped and imputed^{22,23} from HapMap CEU sample data, assuming an additive genetic effect for each of the 4 traits.

Inverse variance-weighted meta-analyses revealed 12 independent loci associated with fasting glucose and/or HOMA-B at genome-wide significance levels (**Table 1**, **Supplementary Table 2** and **Supplementary Fig. 2a,b**). These included five newly discovered associations for loci in or near *ADCY5*, *MADD*, *ADRA2A*, *CRY2* and *FADS1* (**Table 1** and **Fig. 1a–j**), four previously reported fasting glucose-associated loci in or near *GCK*, *GCKR*, *G6PC2* and *MTNR1B*, the recently reported²⁴ locus in *DGKB-TMEM195*, and two loci in the T2D susceptibility genes *TCF7L2* (rs4506565, $r^2 = 0.92$ with the previously reported SNP rs7903146) and *SLC30A8* (rs11558471, $r^2 = 0.96$ with the previously reported SNP rs13266634). Seven additional loci had reproducible evidence for association with fasting glucose and/or HOMA-B across studies at the arbitrary summary threshold of $P < 2 \times 10^{-5}$, chosen to prioritize SNPs for follow-up (**Table 1** and **Supplementary Table 2**). After excluding SNPs within the four previously discovered genome-wide significant fasting glucose loci in *GCK*, *GCKR*, *G6PC2* and *MTNR1B*, we still observed an excess of small *P* values compared to the distribution expected under the null hypothesis (**Fig. 2a,b**), suggesting that some of these additional loci are likely to represent new fasting glucose- and/or HOMA-B-associated loci that merit additional investigation.

Stage 1 analyses of fasting insulin and HOMA-IR revealed no loci that reached genome-wide significance, but there were six loci with consistent evidence for association across study samples at $P < 2 \times 10^{-5}$ (**Table 1**, **Supplementary Table 2** and **Supplementary Fig. 2c,d**). Comparison of the observed *P* values with the distribution expected under the null hypothesis showed an excess of small *P* values that warrant further investigation (**Fig. 2c,d**).

Replication studies and global meta-analysis for 25 loci

We carried forward to stage 2 all independent loci with association to any of the four traits at $P < 2 \times 10^{-5}$; we did not include SNPs in the known T2D genes *TCF7L2* and *SLC30A8*, for which no further validation was sought (**Table 1** and **Supplementary Table 2**). We also included the nominally associated top SNP from a likely biological candidate (*IRS1*, $P = 10^{-4}$ for HOMA-IR) and a locus with *P* values that approached genome-wide significance in several stage 1 discovery cohorts (*PLXDC2-NEBL*), even though their overall stage 1 *P* values were $> 2 \times 10^{-5}$ (**Table 1** and **Supplementary Table 2**). In total, 25 loci were chosen for replication.

We directly genotyped 25 variants in 26 additional stage 2 studies with up to 63,850 nondiabetic participants of European ancestry for fasting glucose and 25 studies and up to 52,892 participants for fasting insulin, HOMA-IR and HOMA-B (**Supplementary Table 1b** and **Online Methods**). We also obtained *in silico* replication data for 12,708 additional individuals from 7 studies for fasting glucose (9,372 participants and 5 studies for fasting insulin, HOMA-IR and HOMA-B), for a total of up to 76,558 individuals for fasting glucose and 62,264 for fasting insulin, HOMA-IR and HOMA-B in stage 2 association analyses.

Our combined stage 1 and 2 meta-analysis, including a total of up to 122,743 participants for fasting glucose (98,372 for fasting insulin, HOMA-IR and HOMA-B), established genome-wide significant associations for nine new loci for fasting glucose and/or HOMA-B (in or near *ADCY5*, *MADD*, *CRY2*, *ADRA2A*, *FADS1*, *PROX1*, *SLC2A2*, *GLIS3* and *C2CD4B*) and one for fasting insulin and HOMA-IR (upstream of *IGF1*) (**Table 1** and **Fig. 1a–j**). Here, we replicate the recently reported associations of the loci *DGKB-TMEM195* (with fasting glucose)²⁴ and *GCKR* (with fasting glucose, fasting insulin and HOMA-IR)^{11,12,25} at levels that exceed the threshold for genome-wide significance. Loci that had previously achieved genome-wide significant associations with fasting glucose (*G6PC2*, *MTNR1B* and *GCK*) were also confirmed (**Table 1**).

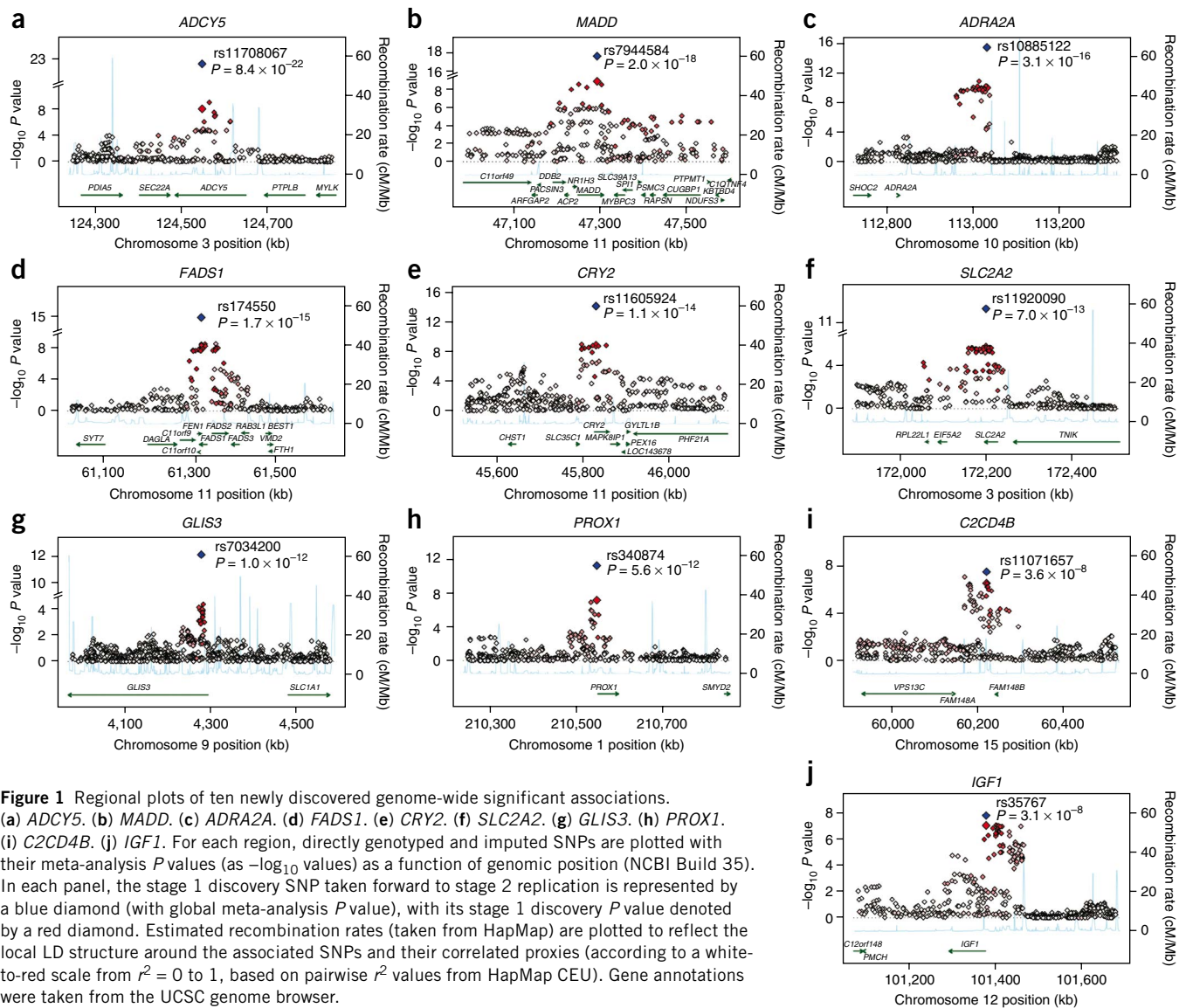


Figure 1 Regional plots of ten newly discovered genome-wide significant associations. (a) *ADCY5*. (b) *MADD*. (c) *ADRA2A*. (d) *FADS1*. (e) *CRY2*. (f) *SLC2A2*. (g) *GLIS3*. (h) *PROX1*. (i) *C2CD4B*. (j) *IGF1*. For each region, directly genotyped and imputed SNPs are plotted with their meta-analysis P values (as $-\log_{10}$ values) as a function of genomic position (NCBI Build 35). In each panel, the stage 1 discovery SNP taken forward to stage 2 replication is represented by a blue diamond (with global meta-analysis P value), with its stage 1 discovery P value denoted by a red diamond. Estimated recombination rates (taken from HapMap) are plotted to reflect the local LD structure around the associated SNPs and their correlated proxies (according to a white-to-red scale from $r^2 = 0$ to 1, based on pairwise r^2 values from HapMap CEU). Gene annotations were taken from the UCSC genome browser.

We further conducted a global meta-analysis of cohort results adjusted for body mass index (BMI) to test whether these diabetes-related quantitative trait associations may be mediated by associations with adiposity. The adjustment for BMI did not materially affect the strength of the associations with any of the traits (data not shown).

Effect size estimates for genome-wide significant loci

We restricted our effect size estimates (Table 2 and Supplementary Table 2) to the stage 2 replication samples (up to $n = 76,558$) to avoid inflation introduced by the discovery cohorts (the so-called 'winner's curse'²⁶). The previously identified loci in *G6PC2*, *MTNR1B* and *GCK* showed the largest effects on fasting glucose (0.075, 0.067 and 0.062 mmol/l per allele, respectively), with the remaining loci examined showing smaller effects (0.008 to 0.030 mmol/l per allele; Table 2). The proportion of variance in fasting glucose explained by the 14 fasting glucose-associated loci with replication data (that is, all fasting glucose loci except for those on *TCF7L2* and *SLC30A8*) ranged from 3.2%–4.4% in the six replication studies providing this information. Because results from our largest unselected community-based cohort (Framingham) were on the lower bound of these

estimates (3.2%), we felt reassured that the winner's curse was not a major concern in this instance and selected the Framingham cohort to estimate the proportion of heritability explained and the genotype score. With a heritability estimate of 30.4% in the Framingham cohort, these 14 loci explain a substantial proportion (~10%) of the inherited variation in fasting glucose. Given the possibility that these same loci harbor additional independent variants (for example, those due to low-frequency alleles not captured by this analysis) that also influence fasting glucose²⁷, this estimate of the heritability attributable to these loci is likely to be conservative.

We estimated the combined impact of the 16 loci associated with fasting glucose (the 14 loci included in the effect size estimates plus those on *TCF7L2* and *SLC30A8*) in some of the largest cohorts (Framingham, the Northern Finland Birth Cohort (NFBC) of 1966 and the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study) by constructing a genotype score equal to the sum of the expected number of risk alleles at each SNP weighted by their effect sizes (see Online Methods). Fasting glucose levels were higher in individuals with higher genotype scores (Fig. 3), with mean differences of ~0.4 mmol/l (5.93 versus 5.51 mmol/l in NFBC 1966; 5.36 versus 5.03 mmol/l in

Figure 2 Quantile-quantile plots. (a) Fasting glucose. (b) Beta-cell function by homeostasis model assessment (HOMA-B). (c) Fasting insulin. (d) Insulin resistance by homeostasis model assessment (HOMA-IR). In each plot, the expected null distribution is plotted along the red diagonal, the entire distribution of observed P values is plotted in black and a distribution that excludes the ten newly discovered loci shown in **Figure 1** is plotted in green. For fasting glucose and HOMA-B, the distribution that excludes the four genome-wide significant fasting glucose-associated loci reported previously (in *GCK*, *GCKR*, *G6PC2* and *MTNR1B*) is plotted in blue. A comparison of the observed P values for each trait shows that fasting glucose and HOMA-B associations are much more likely to be detected than fasting insulin and HOMA-IR associations.

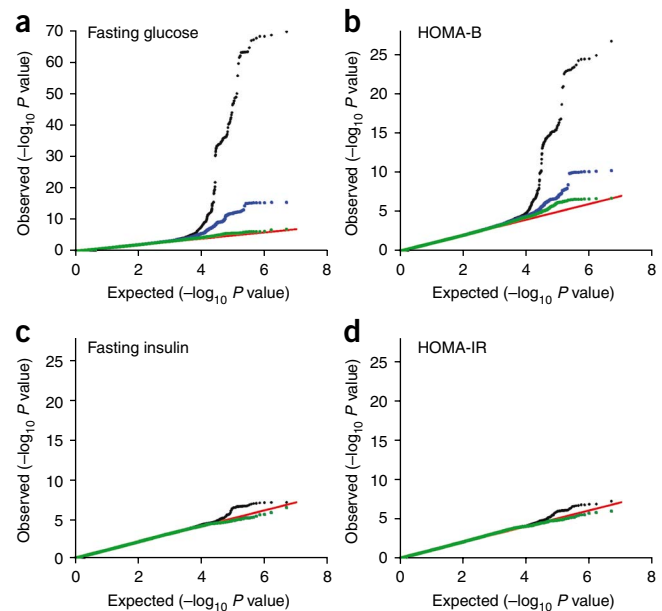
Framingham; 5.70 versus 5.29 mmol/l in ARIC) when comparing individuals with a score of 23 or higher (5.6% of the sample) to those with a score of 12 or lower (2.9% of the sample). The 0.4 mmol/l (7.2 mg/dl) difference between the two tails of the distribution of risk score in the population (top 5.6% compared to the bottom 2.9%) is of clinical relevance, as it represents a shift of approximately 25 centile points in the distribution of fasting glucose. Prospective evidence has shown that a difference of this magnitude in fasting glucose is associated with a relative risk of 1.54–1.73 for future T2D, accounting for other risk factors²⁸. The impact of individual SNPs on fasting glucose in the combined discovery and replication samples is shown in **Supplementary Figure 3**.

We also analyzed data from 1,602 self-reported white European children aged 5.9–17.2 from two studies. Though directionally consistent with observations in adults, some effect size estimates in these children were of smaller magnitude (data not shown). As in adults, the largest effect sizes were observed for risk alleles in *GCK* ($\beta = 0.085$, $P = 1.2 \times 10^{-5}$, $n = 1,602$), *G6PC2* ($\beta = 0.062$, $P = 1.9 \times 10^{-4}$, $n = 1,582$) and *MTNR1B* ($\beta = 0.033$, $P = 0.058$, $n = 1,309$).

Impact of reproducibly associated loci on additional glycemic traits

We sought to investigate all 17 loci associated with fasting glucose, HOMA-B, fasting insulin or HOMA-IR at genome-wide significance for their effects on other continuous glycemic traits. Whereas most of the 16 loci associated with fasting glucose are also strongly associated with HOMA-B (**Tables 1 and 2**), the associations between fasting glucose loci and fasting insulin were weak at best; *GCKR* is the only locus reaching genome-wide significant associations for both fasting glucose and fasting insulin or HOMA-IR, with the glucose-raising C allele being associated with increased fasting insulin (global $P = 3.6 \times 10^{-20}$) and HOMA-IR (global $P = 3.0 \times 10^{-24}$). These patterns are consistent with the gross trait correlations obtained in Framingham for fasting glucose and HOMA-B ($r = -0.43$) and for fasting glucose and fasting insulin ($r = 0.25$).

Impairment of glucose homeostasis may be characterized by elevated fasting glucose or fasting insulin, elevated glucose or insulin at 2 h after oral glucose tolerance test (OGTT), or elevated glycated hemoglobin (HbA_{1c}). We tested associations of each of the 17 loci of interest in a subset of MAGIC cohorts with GWAS data informative for these traits. Because HbA_{1c} is a measure of average glycemia over the preceding 2–3 months, we hypothesized that if an association of these loci with additional traits was present, it should be directionally consistent. The three loci with the largest effect sizes on fasting glucose—*G6PC2*, *MTNR1B* and *GCK*—all showed genome-wide significant and directionally consistent associations with HbA_{1c}; *DGKB-TMEM195*, *ADCY5*, *SLC2A2*, *PROX1*, *SLC30A8* and *TCF7L2* showed nominal ($P < 0.05$) evidence of directionally consistent association (**Table 2**). The fasting glucose-raising alleles at *TCF7L2*, *SLC30A8*, *GCK* and *ADCY5* were associated ($P < 0.0002$) with increased 2-h



glucose (**Table 2**); a parallel MAGIC project reports the genome-wide significant association with 2-h glucose of another *ADCY5* SNP in strong linkage disequilibrium (LD) with our lead SNP ($r^2 = 0.82$)²⁹. In contrast, and consistent with previous reports that the fasting glucose-raising allele of *GCKR* is associated with greater insulin release during OGTT^{11,12,30}, this allele was associated with lower 2-h glucose.

Testing of these loci for association with T2D as a dichotomous trait in up to 40,655 cases and 87,022 nondiabetic controls demonstrated that the fasting glucose-raising alleles at 7 loci (in or near *ADCY5*, *PROX1*, *GCK*, *GCKR* and *DGKB-TMEM195* and the known T2D genes *TCF7L2* and *SLC30A8*) are robustly associated ($P < 5 \times 10^{-8}$) with increased risk of T2D (**Table 2**). The association of a highly correlated SNP in *ADCY5* with T2D in partially overlapping samples is reported by our companion manuscript²⁹. We found less significant T2D associations ($P < 5 \times 10^{-3}$) for variants in or near *CRY2*, *FADS1*, *GLIS3* and *C2CD4B* (**Table 2**). These data clearly show that loci with similar fasting glucose effect sizes may have very different T2D risk effects (see, for example, *ADCY5* and *MADD* in **Table 2**).

Given that several alleles associated with higher fasting glucose levels were also associated with increased T2D risk and that the T2D-related genes *TCF7L2* and *SLC30A8* showed association with fasting glucose, we systematically investigated association of all established T2D loci with the same four fasting diabetes-related quantitative traits. We found directionally consistent nominal associations ($P < 0.05$) of T2D risk alleles with higher fasting glucose for 11 of 18 established T2D loci, including *MTNR1B* (**Supplementary Table 3**). These data demonstrate that a large T2D effect size does not always translate to an equivalently large fasting glucose effect in nondiabetic persons, as clearly highlighted when contrasting the remarkably small effects of *TCF7L2* on fasting glucose compared to *MTNR1B* (**Table 2**).

Impact of new glycemic loci on other metabolic traits

Next, we used available GWAS results for additional metabolic phenotypes (BMI from GIANT³¹, blood pressure from Global BPgen³² and lipids from ENGAGE³³) to assess the impact of the newly discovered glycemic loci on these traits. None of the newly discovered loci had significant ($P < 0.01$) associations with BMI or blood pressure (**Table 3**). Notably, the *FADS1* glucose-raising allele was associated with increased total cholesterol ($P = 2.5 \times 10^{-6}$),

Table 2 Association of newly discovered SNPs with glycemic traits in MAGIC and type 2 diabetes replication meta-analyses

SNP	Nearest gene(s)	Alleles (effect/other)		Fasting glucose (mmol/l)	HOMA-B	Fasting insulin (pmol/l)	HOMA-IR	HbA _{1c} (%)	2-h glucose (mmol/l)	2-h insulin (pmol/l)	Type 2 diabetes ^b
rs560887	<i>G6PC2</i>	C/T	Effect ^a	0.075 (0.003)	-0.042 (0.004)	-0.007 (0.004)	0.006 (0.004)	0.032 (0.004)	0.017 (0.020)	-0.031 (0.013)	0.97 (0.95–0.99)
			<i>P</i>	8.5×10^{-122}	7.6×10^{-29}	0.11	0.16	1.0×10^{-17}	0.41	0.01	0.012
rs10830963	<i>MTNR1B</i>	G/C	Effect ^a	0.067 (0.003)	-0.034 (0.004)	-0.006 (0.004)	0.004 (0.004)	0.024 (0.004)	0.056 (0.022)	0.034 (0.015)	1.09 (1.06–1.12)
			<i>P</i>	1.1×10^{-102}	1.1×10^{-22}	0.14	0.37	3.0×10^{-9}	0.01	0.02	8.0×10^{-13}
rs4607517	<i>GCK</i>	A/G	Effect ^a	0.062 (0.004)	-0.025 (0.005)	0.004 (0.006)	0.015 (0.006)	0.041 (0.005)	0.097 (0.026)	-0.012 (0.015)	1.07 (1.05–1.10)
			<i>P</i>	1.2×10^{-44}	1.2×10^{-6}	0.46	0.01	6.3×10^{-19}	2.0×10^{-4}	0.42	5.0×10^{-8}
rs2191349	<i>DGKB-TMEM195</i>	T/G	Effect ^a	0.030 (0.003)	-0.017 (0.003)	-0.002 (0.003)	0.002 (0.004)	0.008 (0.003)	0.000 (0.019)	-0.006 (0.012)	1.06 (1.04–1.08)
			<i>P</i>	5.3×10^{-29}	6.4×10^{-8}	0.48	0.61	0.01	0.98	0.60	1.1×10^{-8}
rs780094	<i>GCKR</i>	C/T	Effect ^a	0.029 (0.003)	0.014 (0.003)	0.032 (0.004)	0.035 (0.004)	0.004 (0.004)	-0.091 (0.019)	0.000 (0.011)	1.06 (1.04–1.08)
			<i>P</i>	1.7×10^{-24}	1.4×10^{-5}	3.6×10^{-19}	5.0×10^{-20}	0.32	1.4×10^{-6}	1.00	1.3×10^{-9}
rs11708067	<i>ADCY5</i>	A/G	Effect ^a	0.027 (0.003)	-0.023 (0.004)	-0.011 (0.004)	-0.006 (0.005)	0.015 (0.004)	0.094 (0.023)	0.008 (0.015)	1.12 (1.09–1.15)
			<i>P</i>	1.7×10^{-14}	3.6×10^{-8}	0.01	0.16	5.1×10^{-4}	6.6×10^{-5}	0.60	9.9×10^{-21}
rs7944584	<i>MADD</i>	A/T	Effect ^a	0.021 (0.003)	-0.007 (0.004)	0.002 (0.004)	0.005 (0.004)	0.001 (0.004)	-0.017 (0.022)	-0.019 (0.013)	1.01 (0.99–1.03)
			<i>P</i>	5.1×10^{-11}	0.07	0.60	0.26	0.84	0.44	0.15	0.30
rs10885122	<i>ADRA2A</i>	G/T	Effect ^a	0.022 (0.004)	-0.010 (0.005)	0.001 (0.005)	0.004 (0.005)	0.007 (0.005)	0.004 (0.030)	-0.051 (0.019)	1.04 (1.01–1.07)
			<i>P</i>	9.7×10^{-8}	0.03	0.90	0.47	0.21	0.89	0.007	0.020
rs174550	<i>FADS1</i>	T/C	Effect ^a	0.017 (0.003)	-0.020 (0.003)	-0.011 (0.004)	-0.008 (0.004)	0.007 (0.004)	0.013 (0.019)	-0.003 (0.012)	1.04 (1.02–1.06)
			<i>P</i>	8.3×10^{-9}	5.3×10^{-10}	2.7×10^{-3}	0.03	0.053	0.49	0.82	2.3×10^{-4}
rs11605924	<i>CRY2</i>	A/C	Effect ^a	0.015 (0.003)	-0.005 (0.003)	0.001 (0.004)	0.003 (0.004)	0.001 (0.003)	0.023 (0.018)	0.006 (0.011)	1.04 (1.02–1.06)
			<i>P</i>	8.1×10^{-8}	0.13	0.73	0.34	0.72	0.20	0.62	1.7×10^{-4}
rs11920090	<i>SLC2A2</i>	T/A	Effect ^a	0.020 (0.004)	-0.012 (0.005)	0.002 (0.005)	0.005 (0.005)	0.017 (0.005)	0.015 (0.027)	-0.022 (0.016)	1.01 (0.99–1.04)
			<i>P</i>	3.3×10^{-6}	0.02	0.77	0.37	5.8×10^{-4}	0.58	0.19	0.34
rs7034200	<i>GLIS3</i>	A/C	Effect ^a	0.018 (0.003)	-0.020 (0.004)	-0.014 (0.004)	-0.011 (0.004)	0.003 (0.003)	0.037 (0.018)	0.010 (0.011)	1.03 (1.01–1.05)
			<i>P</i>	1.2×10^{-9}	8.9×10^{-9}	2.7×10^{-4}	4.6×10^{-3}	0.32	0.04	0.36	1.3×10^{-3}
rs340874	<i>PROX1</i>	C/T	Effect ^a	0.013 (0.003)	-0.008 (0.003)	-0.002 (0.004)	0.001 (0.004)	0.009 (0.004)	0.030 (0.020)	-0.007 (0.012)	1.07 (1.05–1.09)
			<i>P</i>	6.6×10^{-6}	0.02	0.68	0.74	9.5×10^{-3}	0.13	0.56	7.2×10^{-10}
rs11071657	<i>C2CD4B</i>	A/G	Effect ^a	0.008 (0.003)	-0.013 (0.004)	-0.009 (0.004)	-0.008 (0.004)	0.001 (0.004)	-0.065 (0.020)	-0.006 (0.013)	1.03 (1.01–1.05)
			<i>P</i>	0.01	8.1×10^{-4}	0.03	0.07	0.79	0.001	0.65	2.9×10^{-3}
rs13266634	<i>SLC30A8</i>	C/T	Effect ^a	0.027 (0.004)	-0.016 (0.004)	-0.004 (0.005)	-0.0002 (0.005)	0.016 (0.004)	0.093 (0.022)	-0.011 (0.015)	1.15 (1.10–1.21) ^c
			<i>P</i>	5.5×10^{-10}	2.4×10^{-5}	0.44	0.97	3.3×10^{-5}	2.0×10^{-5}	0.47	1.5×10^{-8}
rs7903146	<i>TCF7L2</i>	T/C	Effect ^a	0.023 (0.004)	-0.020 (0.004)	-0.012 (0.004)	-0.010 (0.005)	0.013 (0.003)	0.118 (0.021)	0.010 (0.013)	1.40 (1.34–1.46) ^c
			<i>P</i>	2.8×10^{-8}	1.4×10^{-7}	0.004	0.03	1.8×10^{-4}	2.6×10^{-8}	0.42	2.2×10^{-51}
rs35767	<i>IGF1</i>	G/A	Effect ^a	0.012 (0.005)	0.009 (0.005)	0.010 (0.006)	0.013 (0.006)	0.010 (0.005)	0.027 (0.025)	0.015 (0.016)	1.04 (1.01–1.07)
			<i>P</i>	0.01	0.09	0.10	0.04	0.050	0.28	0.33	6.6×10^{-3}
Sample size for each trait				45,049–76,558	35,435–61,907	37,199–62,264	35,901–62,001	33,718–44,856	15,221–15,234	7,051–7,062	40,655 cases/87,022 controls

^aPer-allele effect (SE) for quantitative traits was estimated from stage 2 replication samples for fasting glucose, homeostasis model assessment of beta-cell function (HOMA-B), fasting insulin, and homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR), and from discovery meta-analyses of MAGIC GWAS for glycated hemoglobin (HbA_{1c}), 2-h glucose after an oral glucose tolerance test (BMI-adjusted) and 2-h insulin (BMI-adjusted). For the first four traits, the regression coefficients are obtained from the replication cohorts so as to avoid an overestimate of the effect size caused by the 'winner's curse'. Results from replication samples were unavailable for rs7903146 and rs13266634; thus, discovery meta-analysis results are shown for both SNPs for fasting glucose ($n = 45,049$ – $45,051$), HOMA-B ($n = 35,435$ – $35,437$), fasting insulin ($n = 37,199$ – $37,201$) and HOMA-IR ($n = 35,901$ – $35,903$). ^bReplication genotyping was undertaken in 27 independent type 2 diabetes (T2D) case/control samples for all except the *TCF7L2* and *SLC30A8* signals. ^cAssociation with T2D for SNPs in *TCF7L2* and *SLC30A8* loci was estimated from the DIAGRAM+ meta-analysis for a total of 8,130 cases/38,987 controls. For these loci, we have included data on the most commonly associated SNPs with T2D in previously published data.

low-density lipoprotein cholesterol ($P = 8.5 \times 10^{-6}$) and high-density lipoprotein cholesterol ($P = 2.9 \times 10^{-5}$), but was associated with lower triglyceride levels ($P = 1.9 \times 10^{-6}$) (Table 3); a consistent association of this locus with lipid levels has been previously reported³⁴. The fasting glucose-associated variant in *MADD* was

not associated with lipid levels and is not in LD ($r^2 < 0.1$) with a previously reported high-density lipoprotein cholesterol SNP (rs7395662)³³, suggesting two independent signals within the same locus, one affecting lipid levels and the other affecting fasting glucose levels (Table 3).

Potential functional roles of newly discovered loci

We investigated the likely functional role of genes mapping closest to the lead SNPs using several sources of data, including human disease

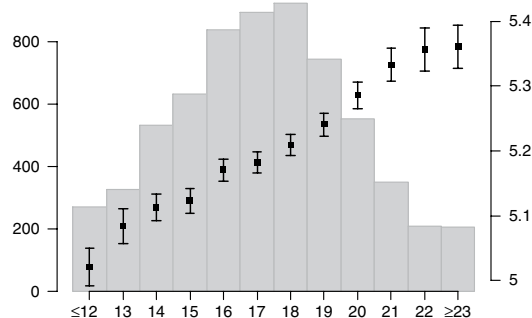


Figure 3 Variation in levels of fasting glucose depending on the number of risk alleles at newly identified loci, weighted by effect size in an aggregate genotype score for the Framingham Heart Study. The bar plots show the average and standard error of fasting glucose in mmol/l for each value of the genotype score based on the regression coefficient (right y axis), and the histogram denotes the number of individuals in each genotype score category (left y axis). Comparable results were obtained for the NFBC 1966 and ARIC cohorts. On average, the range spans ~0.4 mmol/l (~7.2 mg/dl) from low to high genotype score.

Table 3 Association of newly discovered SNPs with related metabolic traits in other GWAS datasets

SNP	Nearest gene(s)	Alleles (effect/other)		BMI (kg/m ²)	Diastolic blood pressure (mm Hg)	Systolic blood pressure (mm Hg)	Hypertension	HDL	LDL	Total cholesterol	Triglycerides
rs560887	<i>G6PC2</i>	C/T	Effect ^a	−0.013 (0.010)	−0.146 (0.091)	−0.105 (0.135)	−0.023 (0.028)	−0.004 (0.004)	0.01 (0.011)	0.019 (0.011)	0.004 (0.005)
			<i>P</i>	0.18	0.12	0.46	0.41	0.32	0.35	0.10	0.52
rs10830963	<i>MTNR1B</i>	G/C	Effect ^a	0.002 (0.010)	0.034 (0.098)	0.088 (0.146)	−0.003 (0.030)	0.005 (0.004)	−0.015 (0.013)	0.002 (0.014)	−0.004 (0.007)
			<i>P</i>	0.86	0.74	0.56	0.91	0.26	0.25	0.88	0.58
rs4607517	<i>GCK</i>	A/G	Effect ^a	0.004 (0.011)	−0.136 (0.111)	−0.128 (0.165)	−0.013 (0.033)	−0.006 (0.005)	0.012 (0.014)	−0.002 (0.015)	0.013 (0.007)
			<i>P</i>	0.75	0.23	0.45	0.70	0.21	0.38	0.87	0.054
rs2191349	<i>DGKB-TMEM195</i>	T/G	Effect ^a	0.001 (0.009)	−0.075 (0.082)	−0.046 (0.122)	0.007 (0.025)	0.002 (0.003)	0.009 (0.01)	0.015 (0.011)	0.004 (0.005)
			<i>P</i>	0.95	0.37	0.71	0.79	0.64	0.40	0.18	0.44
rs780094	<i>GCKR</i>	C/T	Effect ^a	0.012 (0.009)	0.052 (0.084)	0.006 (0.124)	0.020 (0.025)	0.009 (0.003)	0.007 (0.01)	−0.019 (0.011)	−0.055 (0.005)
			<i>P</i>	0.17	0.55	0.96	0.45	8.7×10 ^{−3}	0.51	0.08	9.6 × 10 ^{−27}
rs11708067	<i>ADCY5</i>	A/G	Effect ^a	−0.010 (0.011)	−0.056 (0.104)	0.047 (0.156)	0.028 (0.031)	0.0004(0.004)	−0.014 (0.013)	−0.013 (0.013)	−0.003 (0.006)
			<i>P</i>	0.35	0.60	0.77	0.37	0.92	0.26	0.32	0.62
rs7944584	<i>MADD</i>	A/T	Effect ^a	0.023 (0.010)	−0.208 (0.093)	−0.170 (0.140)	−0.038 (0.028)	0.007 (0.004)	−0.013 (0.012)	−0.016 (0.012)	−0.007 (0.006)
			<i>P</i>	0.02	0.03	0.24	0.18	0.06	0.27	0.18	0.26
rs10885122	<i>ADRA2A</i>	G/T	Effect ^a	−0.021 (0.014)	−0.079 (0.131)	0.168 (0.193)	0.073 (0.039)	0.01 (0.007)	−0.019 (0.02)	−0.02 (0.021)	−0.02 (0.01)
			<i>P</i>	0.14	0.56	0.40	0.07	0.15	0.34	0.33	0.04
rs174550	<i>FADS1</i>	T/C	Effect ^a	0.003 (0.009)	−0.208 (0.086)	−0.108 (0.128)	0.013 (0.026)	0.014 (0.003)	0.046 (0.010)	0.052 (0.011)	−0.025 (0.005)
			<i>P</i>	0.73	0.02	0.42	0.62	2.9 × 10 ^{−5}	8.5 × 10 ^{−6}	2.5 × 10 ^{−6}	1.9 × 10 ^{−6}
rs11605924	<i>CRY2</i>	A/C	Effect ^a	0.011 (0.009)	0.123 (0.082)	−0.003 (0.123)	0.004 (0.025)	0.005 (0.004)	0.005 (0.011)	0.008 (0.011)	−0.009 (0.005)
			<i>P</i>	0.21	0.15	0.98	0.87	0.13	0.62	0.46	0.10
rs11920090	<i>SLC2A2</i>	T/A	Effect ^a	0.010 (0.012)	−0.034 (0.117)	−0.023 (0.174)	−0.030 (0.036)	0.003 (0.005)	−0.004 (0.014)	−0.009 (0.015)	−0.015 (0.007)
			<i>P</i>	0.42	0.78	0.90	0.41	0.60	0.81	0.57	0.04
rs7034200	<i>GLIS3</i>	A/C	Effect ^a	−0.002 (0.009)	0.093 (0.082)	0.087 (0.122)	0.006 (0.025)	0.0002(0.003)	0.015 (0.01)	0.028 (0.011)	0.005 (0.005)
			<i>P</i>	0.86	0.27	0.49	0.80	0.94	0.15	8.3 × 10 ^{−3}	0.37
rs340874	<i>PROX1</i>	C/T	Effect ^a	−0.007 (0.009)	0.113 (0.085)	0.093 (0.127)	0.029 (0.026)	−0.007 (0.003)	0.009 (0.01)	0.003 (0.011)	0.007 (0.005)
			<i>P</i>	0.46	0.20	0.48	0.27	0.04	0.39	0.81	0.19
rs11071657	<i>C2CD4B</i>	A/G	Effect ^a	−0.006 (0.010)	0.132 (0.091)	−0.007 (0.135)	0.020 (0.028)	−0.004 (0.004)	0.012 (0.011)	0.002 (0.011)	0.006 (0.005)
			<i>P</i>	0.54	0.16	0.96	0.49	0.22	0.28	0.86	0.30
rs13266634	<i>SLC30A8</i>	C/T	Effect ^a	−0.026 (0.011)	−0.081 (0.094)	−0.072 (0.139)	0.010 (0.029)	0.003 (0.004)	0.016 (0.011)	0.013 (0.011)	0.005 (0.005)
			<i>P</i>	0.01	0.40	0.62	0.74	0.47	0.13	0.24	0.33
rs7903146	<i>TCF7L2</i>	T/C	Effect ^a	−0.033 (0.009)	0.026 (0.091)	0.025 (0.137)	0.003 (0.028)	0.005 (0.004)	0.007 (0.012)	0.007 (0.012)	−0.006 (0.006)
			<i>P</i>	4.4 × 10 ^{−4}	0.78	0.86	0.92	0.22	0.53	0.55	0.31
rs35767	<i>IGF1</i>	G/A	Effect ^a	0.003 (0.012)	−0.102 (0.113)	−0.078 (0.167)	−0.005 (0.034)	0.003 (0.005)	−0.009 (0.015)	−0.012 (0.015)	−0.002 (0.007)
			<i>P</i>	0.81	0.38	0.65	0.87	0.56	0.52	0.43	0.84
			<i>n</i>	28,225–	28,591–	28,557–	8,145–	21,045	17,521	17,529	21,104
				32,530	34,130	34,135	9,553 cases				
							8,175–9,749				
							controls				

^aPer-allele effect (s.e.m.). Results for BMI, blood pressure traits and lipid levels were kindly provided by the GIANT³¹, GlobalBPGen³² and ENGAGE³³ consortia, respectively.

databases, evidence from animal models and bioinformatic analyses (see Box 1, Online Methods and **Supplementary Table 4**). The newly discovered and previously established glycemic loci represent various biological functions: signal transduction (*DGKB-TMEM195*, *ADCY5*, *FADS1*, *ADRA2A*, *SLC2A2*, *GCK*, *GCKR*, *G6PC2* and *IGF1*), cell proliferation and development (*GLIS3*, *MADD* and *PROX1*), glucose transport and sensing (*SLC2A2*, *GCK*, *GCKR* and *G6PC2*) and circadian rhythm regulation (*MTNR1B* and *CRY2*). All of these pathways represent further avenues for physiological characterization and possible therapeutic intervention for T2D. However, we note that other genes could be causal (Box 1 and **Supplementary Table 4**), and further experimental evidence will be needed to unequivocally link specific genes with phenotypes.

Expression analyses

We measured expression of the genes mapping closest to our lead SNPs (in *DGKB-TMEM195*, *ADCY5*, *MADD*, its neighboring gene *SLC39A13* (a member of a family of zinc transporters mapping ~45 kb from the *MADD* lead SNP), *ADRA2A*, *FADS1*, *CRY2*, *SLC2A2*, *GLIS3*, *PROX1* and *C2CD4B*) in human pancreas and other metabolically relevant tissues (**Supplementary Fig. 4a**). Although there was evidence of expression in human islets for nearly all genes tested (with the sole exception of *TMEM195*), we found that *DGKB* and *MADD* were

most strongly expressed in brain, *SLC2A2*, *FADS1*, *TMEM195* and *PROX1* were most strongly expressed in liver and *ADCY5* was most strongly expressed in heart, whereas *SLC39A13*, *ADRA2A* and *CRY2* were broadly expressed. Notably, *C2CD4B* was highly expressed in the whole pancreas with lower levels in isolated islets, suggesting that it is also present in exocrine cells. A duplicate experiment in a different laboratory obtained similar results (**Supplementary Fig. 4b**). We further examined expression of these transcripts in flow-sorted human beta cells from two separate individuals and documented beta-cell expression for all but *TMEM195*, with *SLC39A13*, *CRY2*, *GLIS3* and *PROX1* being particularly highly expressed in these cells (**Supplementary Fig. 4c**). Expression levels in metabolically relevant tissues for *DGKB* (beta cells) and *TMEM195* (liver) provided equally credible evidence for their respective candidacies as the causal gene at these loci. Furthermore, based on its relatively high expression levels in beta cells, *SLC39A13* (neighboring gene to *MADD*) constitutes a possible candidate gene that may merit further investigation.

Potential causal variants, eQTLs and copy number variants

Our results interrogate only a fraction of the common variants in any given genomic region; we therefore expect that for the majority of the loci here described, the underlying causal variant has yet to be identified. Nevertheless, for some loci there are possible SNP

Box 1: Genes nearest to loci associated with fasting diabetes-related quantitative traits

The *DGKB-TMEM195* locus was recently reported to be associated with fasting glucose²⁴; here we report genome-wide significant replication of that finding and evaluate the genes mapping closest to the lead SNP in further detail. *DGKB* encodes the β (1 of 10) isotype of the catalytic domain of diacylglycerol kinase, which regulates the intracellular concentration of the second messenger diacylglycerol. In rat pancreatic islets, glucose increases diacylglycerol⁴⁹, which activates protein kinase C (PKC) and thus potentiates insulin secretion⁵⁰. *TMEM195* encodes transmembrane protein 195, an integral membrane phosphoprotein highly expressed in liver.

ADCY5 encodes adenylate cyclase 5, which catalyzes the generation of cAMP. Upon binding to its receptor in pancreatic beta cells, glucagon-like peptide 1 (GLP-1) induces cAMP-mediated activation of protein kinase A, transcription of the proinsulin gene and stimulation of insulin secretory processes⁵¹.

MADD encodes mitogen-activated protein kinase (MAPK) activating death domain, an adaptor protein that interacts with the tumor necrosis factor α receptor to activate MAPK. Both PKC and MAPK have been implicated in the proliferation of beta cells induced by GLP-1 (ref. 51), suggesting that *DGKB* and *MADD* may contribute to beta-cell mass and insulin secretion in this manner as well. Also in this region, *SLC39A13* encodes a putative zinc transporter required for connective tissue development and BMP/TGF- β signaling⁵². *NR1H3* encodes the liver X receptor alpha (LXRA) protein, which contains the retinoid response element. Glucose stimulates the transcriptional activity of LXR, which acts as a molecular switch that integrates hepatic glucose metabolism and fatty acid synthesis⁵³.

ADRA2A encodes the α_{2A} adrenergic receptor, which is expressed in beta cells and whose activation leads to an outward potassium current independent of the islet potassium-sensitive ATP (K_{ATP}) channel, thus possibly modifying insulin release⁵⁴. Mice with null mutations display abnormal glucose homeostasis in addition to cardiac hypertrophy and abnormal heart rate and blood pressure.

FADS1 encodes fatty acid desaturase 1, which catalyzes the biosynthesis of highly unsaturated fatty acids from precursor essential polyunsaturated fatty acids. One such product is arachidonic acid; in rodent beta cells, arachidonic acid liberated by phospholipase A_2 augments glucose-mediated insulin release⁵⁵. Two other members of the same family, *FADS2* and *FADS3*, also reside in this region. By directing fatty acids down this metabolic pathway, increased activity of these enzymes may lower circulating triglyceride concentrations.

CRY2 encodes cryptochrome 2, an integral component of the mammalian circadian pacemaker⁵⁶. Mice with null mutations in this gene present with abnormal circadian rhythmicity and several metabolic abnormalities including impaired glucose tolerance, increased insulin sensitivity, decreased body weight and adipose tissue, and abnormal heart rate. Together with *MTNR1B*^{15–17}, this is the second circadian gene associated with fasting glucose in humans, contributing further evidence to the emerging idea that this pathway regulates glucose homeostasis⁵⁷. In the same region, *MAPK8IP1* encodes the scaffolding protein JIP1. Cross-talk between JIP1 and JIP3 has been implicated in the regulation of ASK1-SEK1-JNK signaling during glucose deprivation⁵⁸. A missense mutation in this gene (leading to a S59N amino acid substitution) segregates with diabetes in one family affected with a Mendelian form of the disease⁵⁹.

SLC2A2 encodes the GLUT2 transporter responsible for transporting glucose into beta cells and triggering the glucose-mediated insulin secretion cascade. In humans, recessive mutations in this gene lead to Fanconi-Bickel syndrome, a rare disorder characterized by hepatorenal glycogen accumulation, proximal renal tubular dysfunction and impaired utilization of glucose and galactose⁶⁰; mouse mutants also show hyperglycemia and abnormal glucose homeostasis⁶¹.

GLIS3 encodes the transcription factor GLIS family zinc finger 3 isoform, a Krüppel-like zinc finger protein that both activates and represses transcription and participates in beta-cell ontogeny^{62,63}. Functional mutations in this gene cause a syndrome of neonatal diabetes and congenital hypothyroidism⁶³. Polymorphisms within this gene have recently been associated with type 1 diabetes risk (t1dgc.org).

PROX1 encodes the prospero homeobox protein 1, a novel co-repressor of hepatocyte nuclear factor 4 α ⁶⁴ that plays a crucial role in beta-cell development; mutations in its target gene *HNF4A* cause maturity-onset diabetes of the young, type 1 (ref. 65).

C2CD4B (formerly *FAM148B*) encodes the nuclear localized factor 2 (NLF2). It is expressed in endothelial cells and upregulated by proinflammatory cytokines⁶⁶. As shown here, it has a high level of expression in the pancreas, although its putative molecular connection with glucose homeostasis is presently unclear.

IGF1 encodes the insulin-like growth factor 1 and is the sole genome-wide significant locus associated with HOMA-IR in our study. Humans and mice null for IGF1 display abnormal glucose homeostasis, with insulin resistance, increased circulating insulin and insensitivity to growth hormone⁶⁷.

candidates; in *SLC2A2*, the lead SNP (rs11920090) is in perfect LD ($r^2 = 1.0$) with rs5400 (stage 1 discovery association $P = 5.9 \times 10^{-6}$), which codes for the amino acid substitution T110I, predicted to be “possibly damaging” by PolyPhen³⁵ and PANTHER (Pdel = 0.92)³⁶. In *GCKR*, the lead SNP is in strong LD ($r^2 = 0.93$) with rs1260326, encoding P446L, a nonsynonymous variant previously associated with fasting glucose and HOMA-IR^{11,12,30} and predicted by PolyPhen to be “probably damaging.” A recent functional study has demonstrated that this variant indirectly leads to increased GCK activity, resulting in the observed effects on fasting glucose and triglyceride levels³⁷. Both the *SLC2A2* T110I and *GCKR* P446L substitutions were predicted to be “tolerated” by SIFT³⁸, highlighting the difficulties in obtaining consensus functional predictions from different informatic approaches.

We used publicly available expression quantitative trait locus (eQTL) datasets for liver³⁹, cortex⁴⁰ and Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cell lines⁴¹ to explore additional possible causal mechanisms by testing for association between replicated loci and mRNA expression levels of nearby genes (Online Methods). The lead SNP in *FADS1*, rs174550, is in strong LD with ($r^2 = 0.80$) and is in close proximity (130 bp) to rs174548, a SNP highly associated with *FADS1*

mRNA expression levels in liver ($P = 1.7 \times 10^{-5}$) and with *FADS2* mRNA expression levels in lymphoblastoid cells ($P = 3.1 \times 10^{-4}$). The SNP rs174548 has also been associated (up to $P = 4.5 \times 10^{-8}$) with a number of serum glycerophospholipid concentrations in a GWAS investigating metabolomic profiles⁴², and rs174550 also showed strong associations ($P < 5.2 \times 10^{-7}$) with the same metabolites (data not shown). These results are substantiated by previous work associating SNPs in this region with the fatty acid composition of phospholipids⁴³. The latter data suggest that the minor allele variant of rs174550 results in a reduced efficiency of the fatty acid delta-5 desaturase reaction⁴². Finally, bioinformatic analysis identifies a perfect proxy, rs174545 ($r^2 = 1.0$ with rs174550), whose glucose-raising allele abolishes a predicted target site for the miR-124 microRNA (see Online Methods). Taken together, these data support the hypothesis that not only the abundance of fatty acids, but also their precise composition and degree of desaturation, may influence glucose homeostasis.

Although our study was not designed to explicitly investigate the impact of copy number variation on glycemic traits, we took advantage of existing data⁴⁴ to investigate whether any of our lead SNPs are

in LD with common, diallelic copy number polymorphisms (CNPs) mapping within a 1-Mb window. Of the fasting glucose loci, only *DGKB-TMEM195* has a validated, common CNP affecting sequence within 1 Mb of the index SNP⁴⁴. Despite the proximity of this CNP to the associated SNP (~25 kb), the CNP is essentially uncorrelated with the index SNP ($r^2 = 0.01$ in HapMap CEU) and is therefore unlikely to explain the observed association with fasting glucose level.

DISCUSSION

In this meta-analysis of 21 stage 1 discovery GWAS cohorts followed by targeted stage 2 replication of 25 loci in 33 additional cohorts (totaling up to 122,743 nondiabetic participants), we report new genome-wide significant associations of SNPs in or near *ADCY5*, *MADD*, *ADRA2A*, *CRY2*, *FADS1*, *GLIS3*, *SLC2A2*, *PROX1* and *C2CD4B* with fasting glucose and one SNP near *IGF1* associated with fasting insulin and HOMA-IR. We have also confirmed associations of variants in *GCK*, *GCKR*, *G6PC2* and *MTNR1B* with fasting glucose and achieved genome-wide significance for the recently reported *DGKB-TMEM195* locus²⁴ and for variants in the known T2D-associated genes *TCF7L2* and *SLC30A8*. All of the fasting glucose-associated SNPs showed consistent nominal associations with HOMA-B, and those in *GCK*, *G6PC2*, *MTNR1B*, *DGKB-TMEM195*, *ADCY5*, *FADS1* and *GLIS3* did so at genome-wide significant levels. As previously reported^{11,12,30}, *GCKR* is also associated with fasting insulin and HOMA-IR.

Notably, in addition to the established T2D-associated loci in *TCF7L2*, *SLC30A8* and *MTNR1B*, five of the loci that are associated with elevated fasting glucose levels in nondiabetic individuals (in *ADCY5*, *GCK*, *GCKR*, *PROX1* and *DGKB-TMEM195*) also increase the risk of T2D in separate T2D case-control studies. However, this overlap is incomplete and highlights the fact that the magnitude of the effect on fasting glucose is not predictive of the effect on T2D risk, as shown when comparing fasting glucose and T2D effect sizes for *MTNR1B* and *TCF7L2*, or for *ADCY5* and *MADD* (Table 2). Loci on the latter two genes have similar effect sizes on fasting glucose and have similar allele frequencies, and yet the former is robustly associated with T2D risk (OR 1.12, $P = 5.5 \times 10^{-21}$) whereas the latter is not (OR 1.01, $P = 0.3$) in the same samples. This suggests that not all loci associated with fasting glucose within the 'physiological' range are also associated with 'pathological' fasting glucose levels and T2D risk. Thus, variation in fasting glucose in healthy individuals is not necessarily an endophenotype for T2D, which posits the hypothesis that the mechanism by which glucose is raised, rather than a mere elevation in fasting glucose levels, is a key contributor to disease progression. On the other hand, we cannot rule out the existence of separate T2D-protective variants within loci for which elevated fasting glucose does not progress to manifest T2D; we also cannot rule out the effect of cohort selection in the detection of the loci with variable effects on fasting glucose and T2D risk. Nevertheless, this work shows that targeting quantitative traits in GWAS searches can help identify genetic determinants of overt disease.

With regard to insulin resistance, our analyses resulted in only one new genome-wide significant locus associated with fasting insulin and HOMA-IR. The associated SNP rs35767 is 1.2 kb upstream of *IGF1*, raising the possibility that it may influence *IGF1* expression levels (we have found no direct support for this notion in the limited eQTL data available). Although not reaching genome-wide significance, we note that SNP rs4675095 in *IRS1* (the insulin receptor substrate-1 gene) was also associated with HOMA-IR ($P = 4.6 \times 10^{-3}$), which, given *IRS1*'s excellent biological credentials, will warrant further investigation. This SNP is not in LD with the widely studied missense SNP substitution G972R (rs1801278), nor is it in LD with the newly discovered T2D SNP rs2943641 (ref. 45), whose C risk allele was only nominally

associated with increased fasting insulin ($P = 0.02$) and HOMA-IR ($P = 0.04$) in our discovery dataset. The previously reported associations of SNPs in *PANK1* with fasting insulin²⁴ did not receive strong support in our discovery cohorts ($P = 0.04$ and $P = 0.17$ for rs11185790 and rs1075374, respectively).

Notably, our large-scale meta-analyses produced more than a dozen robust associations with fasting glucose and only two with fasting insulin and HOMA-IR (*GCKR* and *IGF1*). Although the somewhat smaller sample size for the insulin analysis may have contributed to this discrepancy, a comparison of the similarly powered HOMA-B and HOMA-IR analyses reveals associations with HOMA-B several orders of magnitude more significant than those seen with HOMA-IR (Fig. 2). Because insulin itself is a component of the numerator in both measures, one cannot attribute this discrepancy to technical differences in insulin measurements across cohorts. Similarly, because the quantile-quantile plots are very similar for fasting insulin and HOMA-IR, we do not believe that the use of a mathematical formula (as was used with HOMA-IR) rather than a direct measurement (as was used with fasting insulin) has affected our analyses substantially. HOMA-B and HOMA-IR have comparable heritability estimates (0.26 and 0.27 in the Framingham Heart Study, respectively), and their correlation is substantial ($r = 0.55$ in the Framingham Heart Study). Thus, not only may there be a difference in the identity of specific genetic determinants for each trait⁴⁶, but the genetic architecture may be distinct for each trait, with more modest effects, fewer loci, rarer variants, or a stronger environmental modification underlying HOMA-IR. In addition, HOMA-IR (which is composed of fasting values) is an imperfect estimate of global insulin resistance, as it addresses mostly hepatic sensitivity to insulin and is partially affected by beta-cell function. The heritability of HOMA-IR is lower than the heritability for insulin sensitivity derived from the minimal model⁴⁷. Exploration of gene $\times$ environment interactions and analysis of datasets that include 2-h glucose and insulin values may reveal other genetic factors that increase insulin resistance in humans²⁹.

In conclusion, our large-scale meta-analysis of GWAS has identified ten new loci associated with glycemic traits whose in-depth physiological investigation should further our understanding of glucose homeostasis in humans and may reveal new pathways for diabetes therapeutics.

METHODS

Methods and any associated references are available in the online version of the paper at <http://www.nature.com/naturegenetics/>.

Note: Supplementary information is available on the Nature Genetics website.

ACKNOWLEDGMENTS

A full list of Acknowledgments appears in the Supplementary Note.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

A full list of Author Contributions appears in the Supplementary Note.

COMPETING INTERESTS STATEMENT

The authors declare competing financial interests: details accompany the full-text HTML version of the paper at <http://www.nature.com/naturegenetics/>.

Published online at <http://www.nature.com/naturegenetics/>.

Reprints and permissions information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>.

1. Genuth, S. *et al.* The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus: Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care* **26**, 3160–3167 (2003).
2. Coutinho, M., Gerstein, H.C., Wang, Y. & Yusuf, S. The relationship between glucose and incident cardiovascular events. A metaregression analysis of published data from 20 studies of 95,783 individuals followed for 12.4 years. *Diabetes Care* **22**, 233–240 (1999).

3. Meigs, J.B., Nathan, D.M., D'Agostino, R.B. Sr. & Wilson, P.W. Fasting and postchallenge glycemia and cardiovascular disease risk: the Framingham Offspring Study. *Diabetes Care* **25**, 1845–1850 (2002).
4. UKPDS. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* **352**, 837–853 (1998).
5. Patel, A. *et al.* Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* **358**, 2560–2572 (2008).
6. Holman, R.R., Paul, S.K., Bethel, M.A., Matthews, D.R. & Neil, H.A. 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* **359**, 1577–1589 (2008).
7. Ray, K.K. *et al.* Effect of intensive control of glucose on cardiovascular outcomes and death in patients with diabetes mellitus: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Lancet* **373**, 1765–1772 (2009).
8. Prokopenko, I., McCarthy, M.I. & Lindgren, C.M. Type 2 diabetes: new genes, new understanding. *Trends Genet.* **24**, 613–621 (2008).
9. Florez, J.C. Newly identified loci highlight beta cell dysfunction as a key cause of type 2 diabetes: Where are the insulin resistance genes? *Diabetologia* **51**, 1100–1110 (2008).
10. Weedon, M.N. *et al.* A common haplotype of the glucokinase gene alters fasting glucose and birth weight: association in six studies and population-genetics analyses. *Am. J. Hum. Genet.* **79**, 991–1001 (2006).
11. Sparsø, T. *et al.* The *GCKR* rs780094 polymorphism is associated with elevated fasting serum triacylglycerol, reduced fasting and OGTT-related insulinemia, and reduced risk of type 2 diabetes. *Diabetologia* **51**, 70–75 (2008).
12. Orho-Melander, M. *et al.* A common missense variant in the glucokinase regulatory protein gene (*GCKR*) is associated with increased plasma triglyceride and C-reactive protein but lower fasting glucose concentrations. *Diabetes* **57**, 3112–3121 (2008).
13. Bouatia-Naji, N. *et al.* A polymorphism within the *G6PC2* gene is associated with fasting plasma glucose levels. *Science* **320**, 1085–1088 (2008).
14. Chen, W.-M. *et al.* Association studies in Caucasians identify variants in the *G6PC2/ABCB11* region regulating fasting glucose levels. *J. Clin. Invest.* **118**, 2620–2628 (2008).
15. Prokopenko, I. *et al.* Variants in *MTNR1B* influence fasting glucose levels. *Nat. Genet.* **41**, 77–81 (2009).
16. Lyssenko, V. *et al.* Common variant in *MTNR1B* associated with increased risk of type 2 diabetes and impaired early insulin secretion. *Nat. Genet.* **41**, 82–88 (2009).
17. Bouatia-Naji, N. *et al.* A variant near *MTNR1B* is associated with increased fasting plasma glucose levels and type 2 diabetes risk. *Nat. Genet.* **41**, 89–94 (2009).
18. Matthews, D.R. *et al.* Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* **28**, 412–419 (1985).
19. Pe'er, I., Yelensky, R., Altshuler, D. & Daly, M.J. Estimation of the multiple testing burden for genomewide association studies of nearly all common variants. *Genet. Epidemiol.* **32**, 381–385 (2008).
20. Brunzell, J.D. *et al.* Relationships between fasting plasma glucose levels and insulin secretion during intravenous glucose tolerance tests. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **42**, 222–229 (1976).
21. Weir, G.C. & Bonner-Weir, S. Five stages of evolving β -cell dysfunction during progression to diabetes. *Diabetes* **53**, S16–S21 (2004).
22. Marchini, J., Howie, B., Myers, S., McVean, G. & Donnelly, P. A new multipoint method for genome-wide association studies by imputation of genotypes. *Nat. Genet.* **39**, 906–913 (2007).
23. Li, Y. & Mach Abecasis, G.R. 1.0: Rapid haplotype reconstruction and missing genotype inference. *Am. J. Hum. Genet.* **579**, 2290 (2006).
24. Sabatti, C. *et al.* Genome-wide association analysis of metabolic traits in a birth cohort from a founder population. *Nat. Genet.* **41**, 35–46 (2009).
25. Diabetes Genetics Initiative of Broad Institute of Harvard and MIT. Lund University and Novartis Institutes for BioMedical Research. Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science* **316**, 1331–1336 (2007).
26. Ioannidis, J.P., Ntzani, E.E., Trikalinos, T.A. & Contopoulos-Ioannidis, D.G. Replication validity of genetic association studies. *Nat. Genet.* **29**, 306–309 (2001).
27. Nejentsev, S., Walker, N., Riches, D., Egholm, M. & Todd, J.A. Rare variants of *IFIH1*, a gene implicated in antiviral responses, protect against type 1 diabetes. *Science* **324**, 387–389 (2009).
28. Tirosh, A. *et al.* Normal fasting plasma glucose levels and type 2 diabetes in young men. *N. Engl. J. Med.* **353**, 1454–1462 (2005).
29. Saxena, R. *et al.* Genetic variation in *GIPR* influences the glucose and insulin responses to an oral glucose challenge. *Nat. Genet.* advance online publication, doi:10.1038/ng.521 (17 January 2010).
30. Vaxillaire, M. *et al.* The common P446L polymorphism in *GCKR* inversely modulates fasting glucose and triglyceride levels and reduces type 2 diabetes risk in the DESIR prospective general French population. *Diabetes* **57**, 2253–2257 (2008).
31. Willer, C.J. *et al.* Six new loci associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation. *Nat. Genet.* **41**, 25–34 (2009).
32. Newton-Cheh, C. *et al.* Eight blood pressure loci identified by genomewide association study of 34,433 people of European ancestry. *Nat. Genet.* **41**, 666–676 (2009).
33. Aulchenko, Y.S. *et al.* Loci influencing lipid levels and coronary heart disease risk in 16 European population cohorts. *Nat. Genet.* **41**, 47–55 (2009).
34. Kathiresan, S. *et al.* Common variants at 30 loci contribute to polygenic dyslipidemia. *Nat. Genet.* **41**, 56–65 (2009).
35. Sunyaev, S. *et al.* Prediction of deleterious human alleles. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 591–597 (2001).
36. Thomas, P.D. *et al.* Applications for protein sequence-function evolution data: mRNA/protein expression analysis and coding SNP scoring tools. *Nucleic Acids Res.* **34**, W645–W650 (2006).
37. Beer, N.L. *et al.* The P446L variant in *GCKR* associated with fasting plasma glucose and triglyceride levels exerts its effect through increased glucokinase activity in liver. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 4081–4088 (2009).
38. Ng, P.C. & Henikoff, S. Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res.* **11**, 863–874 (2001).
39. Schadt, E.E. *et al.* Mapping the genetic architecture of gene expression in human liver. *PLoS Biol.* **6**, e107 (2008).
40. Myers, A.J. *et al.* A survey of genetic human cortical gene expression. *Nat. Genet.* **39**, 1494–1499 (2007).
41. Dixon, A.L. *et al.* A genome-wide association study of global gene expression. *Nat. Genet.* **39**, 1202–1207 (2007).
42. Gieger, C. *et al.* Genetics meets metabolomics: a genome-wide association study of metabolite profiles in human serum. *PLoS Genet.* **4**, e1000282 (2008).
43. Schaeffer, L. *et al.* Common genetic variants of the *FADS1 FADS2* gene cluster and their reconstructed haplotypes are associated with the fatty acid composition in phospholipids. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 1745–1756 (2006).
44. McCarroll, S.A. *et al.* Integrated detection and population-genetic analysis of SNPs and copy number variation. *Nat. Genet.* **40**, 1166–1174 (2008).
45. Rung, J. *et al.* Genetic variant near *IRS1* is associated with type 2 diabetes, insulin resistance and hyperinsulinemia. *Nat. Genet.* **41**, 1110–1115 (2009).
46. Doria, A., Patti, M.-E. & Kahn, C.R. The emerging genetic architecture of type 2 diabetes. *Cell Metab.* **8**, 186–200 (2008).
47. Bergman, R.N. *et al.* Minimal model-based insulin sensitivity has greater heritability and a different genetic basis than homeostasis model assessment or fasting insulin. *Diabetes* **52**, 2168–2174 (2003).
48. Higgins, J.P. & Thompson, S.G. Quantifying heterogeneity in a metaanalysis. *Stat. Med.* **21**, 1539–1558 (2002).
49. Peter-Riesch, B., Fathi, M., Schlegel, W. & Wollheim, C.B. Glucose and carbachol generate 1,2-diacylglycerols by different mechanisms in pancreatic islets. *J. Clin. Invest.* **81**, 1154–1161 (1988).
50. Prentki, M. & Matschinsky, F.M. Ca^{2+} , cAMP, and phospholipid-derived messengers in coupling mechanisms of insulin secretion. *Physiol. Rev.* **67**, 1185–1248 (1987).
51. Drucker, D.J. The role of gut hormones in glucose homeostasis. *J. Clin. Invest.* **117**, 24–32 (2007).
52. Fukada, T. *et al.* The zinc transporter SLC39A13/ZIP13 is required for connective tissue development; its involvement in BMP/TGF- β signaling pathways. *PLoS One* **3**, e3642 (2008).
53. Mitro, N. *et al.* The nuclear receptor LXR is a glucose sensor. *Nature* **445**, 219–223 (2007).
54. Rorsman, P. *et al.* Activation by adrenaline of a low-conductance G protein-dependent K^{+} channel in mouse pancreatic β cells. *Nature* **349**, 77–79 (1991).
55. Keane, D. & Newsholme, P. Saturated and unsaturated (including arachidonic acid) non-esterified fatty acid modulation of insulin secretion from pancreatic β -cells. *Biochem. Soc. Trans.* **36**, 955–958 (2008).
56. Kume, K. *et al.* mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell* **98**, 193–205 (1999).
57. Rudic, R.D. *et al.* BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis. *PLoS Biol.* **2**, e377 (2004).
58. Song, J.J. & Lee, Y.J. Cross-talk between JIP3 and JIP1 during glucose deprivation: SEK1–JNK2 and Akt1 act as mediators. *J. Biol. Chem.* **280**, 26845–26855 (2005).
59. Waerber, G. *et al.* The gene *MAPK8IP1*, encoding islet-brain-1, is a candidate for type 2 diabetes. *Nat. Genet.* **24**, 291–295 (2000).
60. Santer, R. *et al.* Mutations in *GLUT2*, the gene for the liver-type glucose transporter, in patients with Fanconi-Bickel syndrome. *Nat. Genet.* **17**, 324–326 (1997).
61. Guillam, M.T. *et al.* Early diabetes and abnormal postnatal pancreatic islet development in mice lacking Glut-2. *Nat. Genet.* **17**, 327–330 (1997).
62. Kim, Y.-S., Nakanishi, G., Lewandoski, M. & Jetten, A.M. GLIS3, a novel member of the GLIS subfamily of Kruppel-like zinc finger proteins with repressor and activation functions. *Nucleic Acids Res.* **31**, 5513–5525 (2003).
63. Senée, V. *et al.* Mutations in *GLIS3* are responsible for a rare syndrome with neonatal diabetes mellitus and congenital hypothyroidism. *Nat. Genet.* **38**, 682–687 (2006).
64. Song, K.-H., Li, T. & Chiang, J.Y.L. A prospero-related homeodomain protein is a novel co-regulator of hepatocyte nuclear factor 4 α that regulates the cholesterol 7 α -hydroxylase gene. *J. Biol. Chem.* **281**, 10081–10088 (2006).
65. Yamagata, K. *et al.* Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4 α gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1). *Nature* **384**, 458–460 (1996).
66. Warton, K., Foster, N.C., Gold, W.A. & Stanley, K.K. A novel gene family induced by acute inflammation in endothelial cells. *Gene* **342**, 85–95 (2004).
67. Clemmons, D.R. Role of insulin-like growth factor in maintaining normal glucose homeostasis. *Horm. Res.* **62** (Suppl. 1), 77–82 (2004).

Josée Dupuis^{1,2,177}, Claudia Langenberg^{3,177}, Inga Prokopenko^{4,5,177}, Richa Saxena^{6,7,177}, Nicole Soranzo^{8,9,177}, Anne U Jackson¹⁰, Eleanor Wheeler¹¹, Nicole L Glazer¹², Nabila Bouatia-Naji¹³, Anna L Gloyn⁴, Cecilia M Lindgren^{4,5}, Reedik Mägi^{4,5}, Andrew P Morris⁵, Joshua Randall⁵, Toby Johnson^{14–16}, Paul Elliott^{17,176}, Denis Rybin¹⁸, Gudmar Thorleifsson¹⁹, Valgerdur Steinthorsdottir¹⁹, Peter Henneman²⁰, Harald Grallert²¹, Abbas Dehghan²², Jouke Jan Hottenga²³, Christopher S Franklin²⁴, Pau Navarro²⁵, Kijoung Song²⁶, Anuj Goel^{5,27}, John R B Perry²⁸, Josephine M Egan²⁹, Taina Lajunen³⁰, Niels Grarup³¹, Thomas Sparsø³¹, Alex Doney³², Benjamin F Voight^{6,7}, Heather M Stringham¹⁰, Man Li³³, Stavroula Kanoni³⁴, Peter Shrader³⁵, Christine Cavalcanti-Proença¹³, Meena Kumari³⁶, Lu Qi³⁷, Nicholas J Timpson³⁸, Christian Gieger²¹, Carina Zabena³⁹, Ghislain Rocheleau^{40,41}, Erik Ingelsson^{42,43}, Ping An⁴⁴, Jeffrey O'Connell⁴⁵, Jian'an Luan³, Amanda Elliott^{6,7}, Steven A McCarroll^{6,7}, Felicity Payne¹¹, Rosa Maria Roccasecca¹¹, François Pattou⁴⁶, Praveen Sethupathy⁴⁷, Kristin Ardlie⁴⁸, Yavuz Ariyurek⁴⁹, Beverley Balkau⁵⁰, Philip Barter⁵¹, John P Beilby^{52,53}, Yoav Ben-Shlomo⁵⁴, Rafn Benediktsson^{55,56}, Amanda J Bennett⁴, Sven Bergmann^{14,16}, Murielle Bochud¹⁵, Eric Boerwinkle⁵⁷, Amélie Bonnefond¹³, Lori L Bonnycastle⁴⁷, Knut Borch-Johnsen^{58,59}, Yvonne Böttcher⁶⁰, Eric Brunner³⁶, Suzannah J Bumpstead⁸, Guillaume Charpentier⁶¹, Yii-Der Ida Chen⁶², Peter Chines⁴⁷, Robert Clarke⁶³, Lachlan J M Coin¹⁷, Matthew N Cooper⁶⁴, Marilyn Cornelis³⁷, Gabe Crawford⁶, Laura Crisponi⁶⁵, Ian N M Day³⁸, Eco J C de Geus²³, Jerome Delplanque¹³, Christian Dina¹³, Michael R Erdos⁴⁷, Annette C Fedson^{64,66}, Antje Fischer-Rosinsky^{67,68}, Nita G Forouhi³, Caroline S Fox^{2,69}, Rune Frants⁷⁰, Maria Grazia Franzosi⁷¹, Pilar Galan⁷², Mark O Goodarzi⁶², Jürgen Graessler⁷³, Christopher J Groves⁴, Scott Grundy⁷⁴, Rhian Gwilliam⁸, Ulf Gyllenstein⁷⁵, Samy Hadjadj⁷⁶, Göran Hallmans⁷⁷, Naomi Hammond⁸, Xijing Han¹⁰, Anna-Liisa Hartikainen⁷⁸, Neelam Hassanali⁴, Caroline Hayward²⁵, Simon C Heath⁷⁹, Serge Hercberg⁸⁰, Christian Herder⁸¹, Andrew A Hicks⁸², David R Hillman^{66,83}, Aroon D Hingorani³⁶, Albert Hofman²², Jennie Hui^{52,84}, Joe Hung^{85,86}, Bo Isomaa^{87,88}, Paul R V Johnson^{4,89}, Torben Jørgensen^{90,91}, Antti Jula⁹², Marika Kaakinen⁹³, Jaakko Kaprio^{94–96}, Y Antero Kesaniemi⁹⁷, Mika Kivimäki³⁶, Beatrice Knight⁹⁸, Seppo Koskinen⁹⁹, Peter Kovacs¹⁰⁰, Kirsten Ohm Kyvik¹⁰¹, G Mark Lathrop⁷⁹, Debbie A Lawlor³⁸, Olivier Le Bacquer¹³, Cécile Lecoeur¹³, Yun Li¹⁰, Valeriya Lyssenko¹⁰², Robert Mahley¹⁰³, Massimo Mangino⁹, Alisa K Manning¹, María Teresa Martínez-Larrad³⁹, Jarred B McAteer^{6,104,105}, Laura J McCulloch⁴, Ruth McPherson¹⁰⁶, Christa Meisinger²¹, David Melzer²⁸, David Meyre¹³, Braxton D Mitchell⁴⁵, Mario A Morken⁴⁷, Sutapa Mukherjee^{66,83}, Silvia Naitza⁶⁵, Narisu Narisu⁴⁷, Matthew J Neville^{4,107}, Ben A Oostra¹⁰⁸, Marco Orrù⁶⁵, Ruth Pakyz⁴⁵, Colin N A Palmer¹⁰⁹, Giuseppe Paolisso¹¹⁰, Cristian Pattaro⁸², Daniel Pearson⁴⁷, John F Peden^{5,27}, Nancy L Pedersen⁴², Markus Perola^{96,111,112}, Andreas F H Pfeiffer^{67,68}, Irene Pichler⁸², Ozren Polasek¹¹³, Danielle Posthuma^{23,114}, Simon C Potter⁸, Anneli Pouta¹¹⁵, Michael A Province⁴⁴, Bruce M Psaty^{116,117}, Wolfgang Rathmann¹¹⁸, Nigel W Rayner^{4,5}, Kenneth Rice¹¹⁹, Samuli Ripatti^{96,111}, Fernando Rivadeneira^{22,120}, Michael Roden^{81,121}, Olov Rolandsson¹²², Anneli Sandbaek¹²³, Manjinder Sandhu^{3,124}, Serena Sanna⁶⁵, Avan Aihie Sayer¹²⁵, Paul Scheet¹²⁶, Laura J Scott¹⁰, Udo Seedorf¹²⁷, Stephen J Sharp³, Beverley Shields⁹⁸, Gunnar Sigurðsson^{55,56}, Eric J G Sijbrands^{22,120}, Angela Silveira¹²⁸, Laila Simpson^{64,66}, Andrew Singleton¹²⁹, Nicholas L Smith^{130,131}, Ulla Sovio¹⁷, Amy Swift⁴⁷, Holly Syddall¹²⁵, Ann-Christine Syvänen¹³², Toshiko Tanaka^{133,134}, Barbara Thorand²¹, Jean Tichet¹³⁵, Anke Tönjes^{60,136}, Tiinamaija Tuomi^{87,137}, André G Uitterlinden^{22,120}, Ko Willems van Dijk^{70,138}, Mandy van Hoek¹²⁰, Dhiraj Varma⁸, Sophie Visvikis-Siest¹³⁹, Veronique Vitart²⁵, Nicole Vogelzangs¹⁴⁰, Gérard Waeber¹⁴¹, Peter J Wagner^{96,111}, Andrew Walley¹⁴², G Bragi Walters¹⁹, Kim L Ward^{64,66}, Hugh Watkins^{5,27}, Michael N Weedon²⁸, Sarah H Wild²⁴, Gonneke Willemsen²³, Jaqueline C M Witteman²², John W G Yarnell¹⁴³, Eleftheria Zeggini^{5,8}, Diana Zelenika⁷⁹, Björn Zethelius^{43,144}, Guangju Zhai⁹, Jing Hua Zhao³, M Carola Zillikens¹²⁰, DIAGRAM Consortium¹⁴⁵, GIANT Consortium¹⁴⁵, Global BPgen Consortium¹⁴⁵, Ingrid B Borecki⁴⁴, Ruth J F Loos³, Pierre Meneton⁸⁰, Patrik K E Magnusson⁴², David M Nathan^{104,105}, Gordon H Williams^{69,105}, Andrew T Hattersley⁹⁸, Kaisa Silander^{96,111}, Veikko Salomaa¹⁴⁶, George Davey Smith³⁸, Stefan R Bornstein⁷³, Peter Schwarz⁷³, Joachim Spranger^{67,68}, Fredrik Karpe^{4,107}, Alan R Shuldiner⁴⁵, Cyrus Cooper¹²⁵, George V Dedoussis³⁴, Manuel Serrano-Ríos³⁹, Andrew D Morris¹⁰⁹, Lars Lind¹³², Lyle J Palmer^{64,66,84}, Frank B Hu^{147,148}, Paul W Franks¹⁴⁹, Shah Ebrahim¹⁵⁰, Michael Marmot³⁶, W H Linda Kao^{33,151,152}, James S Pankow¹⁵³, Michael J Sampson¹⁵⁴, Johanna Kuusisto¹⁵⁵, Markku Laakso¹⁵⁵, Torben Hansen^{31,156}, Oluf Pedersen^{31,59,157}, Peter Paul Pramstaller^{82,158,159}, H Erich Wichmann^{21,160,161}, Thomas Illig²¹, Igor Rudan^{24,162,163}, Alan F Wright²⁵, Michael Stumvoll⁶⁰, Harry Campbell²⁴, James F Wilson²⁴, Anders Hamsten on behalf of Procardis Consortium¹²⁸, Richard N Bergman¹⁶⁴, Thomas A Buchanan^{164,165},

Francis S Collins⁴⁷, Karen L Mohlke¹⁶⁶, Jaakko Tuomilehto^{94,167}, Timo T Valle¹⁶⁷, David Altshuler^{6,7,104,105}, Jerome I Rotter⁶², David S Siscovick¹⁶⁸, Brenda W J H Penninx¹⁴⁰, Dorret I Boomsma²³, Panos Deloukas⁸, Timothy D Spector^{8,9}, Timothy M Frayling²⁸, Luigi Ferrucci¹⁶⁹, Augustine Kong¹⁹, Unnur Thorsteinsdottir^{19,170}, Kari Stefansson^{19,170}, Cornelia M van Duijn²², Yuri S Aulchenko²², Antonio Cao⁶⁵, Angelo Scuteri^{65,171}, David Schlessinger⁴⁷, Manuela Uda⁶⁵, Aimo Ruokonen¹⁷², Marjo-Riitta Jarvelin^{17,93,173}, Dawn M Waterworth²⁶, Peter Vollenweider¹⁴¹, Leena Peltonen^{8,48,96,111,112}, Vincent Mosser²⁶, Goncalo R Abecasis¹⁰, Nicholas J Wareham³, Robert Sladek^{40,41}, Philippe Froguel^{13,142}, Richard M Watanabe^{164,174}, James B Meigs^{35,105}, Leif Groop¹⁰², Michael Boehnke¹⁰, Mark I McCarthy^{4,5,107}, Jose C Florez^{6,7,104,105} & Inês Barroso¹¹ for the MAGIC investigators

¹Department of Biostatistics, Boston University School of Public Health, Boston, Massachusetts, USA. ²National Heart, Lung, and Blood Institute's Framingham Heart Study, Framingham, Massachusetts, USA. ³Medical Research Council (MRC), Epidemiology Unit, Institute of Metabolic Science, Addenbrooke's Hospital, Cambridge, UK. ⁴Oxford Centre for Diabetes, Endocrinology and Metabolism, University of Oxford, Oxford, UK. ⁵Wellcome Trust Centre for Human Genetics, University of Oxford, Oxford, UK. ⁶Program in Medical and Population Genetics, Broad Institute, Cambridge, Massachusetts, USA. ⁷Center for Human Genetic Research, Massachusetts General Hospital, Boston, Massachusetts, USA. ⁸Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, Cambridge, UK. ⁹Twin Research and Genetic Epidemiology Department, King's College London, St Thomas' Hospital Campus, London, UK. ¹⁰Center for Statistical Genetics, Department of Biostatistics, University of Michigan School of Public Health, Ann Arbor, Michigan, USA. ¹¹Metabolic Disease Group, Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, Cambridge, UK. ¹²Cardiovascular Health Research Unit and Department of Medicine, University of Washington, Seattle, Washington, USA. ¹³Centre National de la Recherche Scientifique–Unité Mixte de Recherche 8090, Pasteur Institute, Lille 2–Droit et Santé University, Lille, France. ¹⁴Department of Medical Genetics, University of Lausanne, Lausanne, Switzerland. ¹⁵University Institute of Social and Preventative Medicine, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV) and University of Lausanne, Lausanne, Switzerland. ¹⁶Swiss Institute of Bioinformatics, Lausanne, Switzerland. ¹⁷Department of Epidemiology and Public Health, Imperial College London, Faculty of Medicine, Norfolk Place, London, UK. ¹⁸Boston University Data Coordinating Center, Boston, Massachusetts, USA. ¹⁹deCODE Genetics, Reykjavik, Iceland. ²⁰Department of Human Genetics, Leiden University Medical Centre, Leiden, The Netherlands. ²¹Institute of Epidemiology, Helmholtz Zentrum Muenchen, German Research Center for Environmental Health, Neuherberg, Germany. ²²Department of Epidemiology, Erasmus Medical College, Rotterdam, The Netherlands. ²³Department of Biological Psychology, VU University Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands. ²⁴Centre for Population Health Sciences, University of Edinburgh, Edinburgh, UK. ²⁵MRC Human Genetics Unit, Institute of Genetics and Molecular Medicine, Edinburgh, UK. ²⁶Division of Genetics, Research and Development, GlaxoSmithKline, King of Prussia, Pennsylvania, USA. ²⁷Department of Cardiovascular Medicine, University of Oxford, Oxford, UK. ²⁸Genetics of Complex Traits, Institute of Biomedical and Clinical Sciences, Peninsula College of Medicine and Dentistry, University of Exeter, Exeter, UK. ²⁹National Institute of Aging, Baltimore, Maryland, USA. ³⁰Unit for Child and Adolescent Health and Welfare, National Institute for Health and Welfare, Biocenter Oulu, University of Oulu, Oulu, Finland. ³¹Hagedorn Research Institute, Gentofte, Denmark. ³²Department of Medicine and Therapeutics, Level 7, Ninewells Hospital and Medical School, Dundee, UK. ³³Department of Epidemiology, Bloomberg School of Public Health, Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland, USA. ³⁴Department of Nutrition–Dietetics, Harokopio University, Athens, Greece. ³⁵General Medicine Division, Massachusetts General Hospital, Boston, Massachusetts, USA. ³⁶Department of Epidemiology and Public Health, University College London, London, UK. ³⁷Departments of Nutrition and Epidemiology, Harvard School of Public Health, Boston, Massachusetts, USA. ³⁸MRC Centre for Causal Analyses in Translational Epidemiology, University of Bristol, Bristol, UK. ³⁹Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain. ⁴⁰Departments of Medicine and Human Genetics, McGill University, Montreal, Canada. ⁴¹Genome Quebec Innovation Centre, Montreal, Canada. ⁴²Department of Medical Epidemiology and Biostatistics, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden. ⁴³Department of Public Health and Caring Sciences, Uppsala University, Uppsala, Sweden. ⁴⁴Division of Statistical Genomics, Department of Genetics, Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri, USA. ⁴⁵Division of Endocrinology, Diabetes and Nutrition, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, Maryland, USA. ⁴⁶INSERM U859, Université de Lille–Nord de France, Lille, France. ⁴⁷Genome Technology Branch, National Human Genome Research Institute, Bethesda, Maryland, USA. ⁴⁸The Broad Institute, Cambridge, Massachusetts, USA. ⁴⁹Leiden Genome Technology Center, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands. ⁵⁰INSERM U780, Paris Sud University, Villejuif, France. ⁵¹The Heart Research Institute, Sydney, New South Wales, Australia. ⁵²PathWest Laboratory of Western Australia, Department of Molecular Genetics, J Block, QEII Medical Centre, Nedlands West Australia, Australia. ⁵³School of Surgery and Pathology, University of Western Australia, Nedlands West Australia, Australia. ⁵⁴Department of Social Medicine, University of Bristol, Bristol, UK. ⁵⁵Landspítali University Hospital, Reykjavik, Iceland. ⁵⁶Icelandic Heart Association, Kopavogur, Iceland. ⁵⁷The Human Genetics Center and Institute of Molecular Medicine, University of Texas Health Science Center, Houston, Texas, USA. ⁵⁸Steno Diabetes Center, Gentofte, Denmark. ⁵⁹Faculty of Health Science, University of Aarhus, Aarhus, Denmark. ⁶⁰Department of Medicine, University of Leipzig, Leipzig, Germany. ⁶¹Endocrinology–Diabetology Unit, Corbeil-Essonnes Hospital, Essonnes, France. ⁶²Medical Genetics Institute, Cedars-Sinai Medical Center, Los Angeles, California, USA. ⁶³Clinical Trial Service Unit and Epidemiological Studies Unit, University of Oxford, Oxford, UK. ⁶⁴Centre for Genetic Epidemiology and Biostatistics, University of Western Australia, Perth, Australia. ⁶⁵Istituto di Neurogenetica e Neurofarmacologia (INN), Consiglio Nazionale delle Ricerche, c/o Cittadella Universitaria di Monserrato, Monserrato, Cagliari, Italy. ⁶⁶Western Australian Sleep Disorders Research Institute, Queen Elizabeth Medical Centre II, Perth, Australia. ⁶⁷Department of Endocrinology, Diabetes and Nutrition, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany. ⁶⁸Department of Clinical Nutrition, German Institute of Human Nutrition Potsdam-Rehbruecke, Nuthetal, Germany. ⁶⁹Division of Endocrinology, Diabetes, and Hypertension, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA. ⁷⁰Department of Human Genetics, Leiden University Medical Centre, Leiden, The Netherlands. ⁷¹Department of Cardiovascular Research, Istituto di Ricerche Farmacologiche 'Mario Negri', Milan, Italy. ⁷²Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Institut National de la Recherche Agronomique, Université Paris 13, Bobigny Cedex, France. ⁷³Department of Medicine III, Division Prevention and Care of Diabetes, University of Dresden, Dresden, Germany. ⁷⁴Center for Human Nutrition, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, Texas, USA. ⁷⁵Department of Genetics and Pathology, Rudbeck Laboratory, Uppsala University, Uppsala, Sweden. ⁷⁶Centre Hospitalier Universitaire, de Poitiers, Endocrinologie Diabetologie, CIC INSERM 0802, INSERM U927, Université de Poitiers, Unité de Formation et de Recherche, Médecine Pharmacie, Poitiers, France. ⁷⁷Department of Public Health and Clinical Medicine, Section for Nutritional Research, Umeå University, Umeå, Sweden. ⁷⁸Department of Clinical Sciences, Obstetrics and Gynecology, University of Oulu, University of Oulu, Finland. ⁷⁹Centre National de Génotypage/Institut de génomique/Commissariat à l'énergie atomique, Evry Cedex, France. ⁸⁰INSERM U872, Faculté de Médecine Paris Descartes, Paris Cedex, France. ⁸¹Institute for Clinical Diabetology, German Diabetes Center, Leibniz Center for Diabetes Research at Heinrich Heine University Düsseldorf, Düsseldorf, Germany. ⁸²Institute of Genetic Medicine, European Academy Bozen/Bolzano (EURAC), Viale Druso, Bolzano, Italy, Affiliated Institute of the University Lübeck, Lübeck, Germany. ⁸³Department of Pulmonary Physiology, Sir Charles Gairdner Hospital, Perth, Australia. ⁸⁴Busseton Population Medical Research Foundation, Sir Charles Gairdner Hospital, Perth, Australia. ⁸⁵Heart Institute of Western Australia, Sir Charles Gairdner Hospital, Nedlands West Australia, Australia. ⁸⁶School of Medicine and Pharmacology, University of Western Australia, Nedlands West Australia, Australia. ⁸⁷Folkhalsan Research Centre, Helsinki, Finland. ⁸⁸Malmiska Municipal Health Care Center and Hospital, Jakobstad, Finland. ⁸⁹Nuffield Department of Surgery, University of Oxford, Oxford, UK. ⁹⁰Research Centre for Prevention and Health, Glostrup University Hospital, Glostrup, Denmark. ⁹¹Faculty of Health Science, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark. ⁹²National Institute for Health and Welfare, Unit of Population Studies, Turku, Finland. ⁹³Institute of Health Sciences and Biocenter Oulu, University of Oulu, Oulu, Finland. ⁹⁴Department of Public Health, Faculty of Medicine, University of Helsinki, Helsinki, Finland. ⁹⁵National Institute for Health and Welfare, Unit for Child and Adolescent Mental Health, Helsinki, Finland. ⁹⁶Institute for Molecular Medicine Finland (FIMM), University of Helsinki, Helsinki, Finland. ⁹⁷Department of Internal Medicine and Biocenter Oulu, Oulu, Finland. ⁹⁸Diabetes Genetics, Institute of Biomedical and Clinical Science, Peninsula College of Medicine and Dentistry, University of Exeter, Exeter, UK. ⁹⁹National Institute for Health and Welfare, Unit of Living Conditions, Health and Wellbeing, Helsinki, Finland. ¹⁰⁰Interdisciplinary Centre for Clinical Research, University of Leipzig, Leipzig, Germany. ¹⁰¹The Danish Twin

Registry, Epidemiology, Institute of Public Health, University of Southern Denmark, Odense, Denmark. ¹⁰²Department of Clinical Sciences, Diabetes and Endocrinology, Lund University, University Hospital Malmö, Malmö, Sweden. ¹⁰³Gladstone Institute of Cardiovascular Disease, University of California, San Francisco, California, USA. ¹⁰⁴Diabetes Research Center, Diabetes Unit, Massachusetts General Hospital, Boston, Massachusetts, USA. ¹⁰⁵Department of Medicine, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA. ¹⁰⁶Division of Cardiology, University of Ottawa Heart Institute, Ottawa, Ontario, Canada. ¹⁰⁷Oxford National Institute for Health Research, Biomedical Research Centre, Churchill Hospital, Oxford, UK. ¹⁰⁸Department of Clinical Genetics, Erasmus Medical College, Rotterdam, The Netherlands. ¹⁰⁹Biomedical Research Institute, University of Dundee, Ninewells Hospital and Medical School, Dundee, UK. ¹¹⁰Department of Geriatric Medicine and Metabolic Disease, Second University of Naples, Naples, Italy. ¹¹¹National Institute for Health and Welfare, Unit of Public Health Genomics, Helsinki, Finland. ¹¹²Department of Medical Genetics, University of Helsinki, Helsinki, Finland. ¹¹³Department of Medical Statistics, Epidemiology and Medical Informatics, Andrija Stampar School of Public Health, Medical School, University of Zagreb, Rockefellerova, Zagreb, Croatia. ¹¹⁴Department of Clinical Genetics, VU University and Medical Center, Amsterdam, The Netherlands. ¹¹⁵Department of Obstetrics and Gynaecology, Oulu University Hospital, Oulu, Finland. ¹¹⁶Departments of Medicine, Epidemiology and Health Services, University of Washington, Seattle, Washington, USA. ¹¹⁷Group Health Research Institute, Group Health Cooperative, Seattle, Washington, USA. ¹¹⁸Institute of Biometrics and Epidemiology, German Diabetes Centre, Leibniz Centre at Heinrich Heine University Düsseldorf, Düsseldorf, Germany. ¹¹⁹Department of Biostatistics, University of Washington, Seattle, Washington, USA. ¹²⁰Department of Internal Medicine, Erasmus Medical College, Rotterdam, The Netherlands. ¹²¹Department of Metabolic Diseases, Heinrich Heine University Düsseldorf, Düsseldorf, Germany. ¹²²Department of Public Health and Clinical Medicine, Section for Family Medicine, Umeå University, Umeå, Sweden. ¹²³School of Public Health, Department of General Practice, University of Aarhus, Aarhus, Denmark. ¹²⁴Department of Public Health and Primary Care, Strangeways Research Laboratory, University of Cambridge, Cambridge, UK. ¹²⁵MRC Epidemiology Resource Centre, University of Southampton, Southampton General Hospital, Southampton, UK. ¹²⁶Department of Epidemiology, University of Texas, M.D. Anderson Cancer Center, Houston, Texas, USA. ¹²⁷Leibniz-Institut für Arterioskleroseforschung an der Universität Münster, Münster, Germany. ¹²⁸Atherosclerosis Research Unit, Department of Medicine, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden. ¹²⁹Laboratory of Neurogenetics, National Institute on Aging, Bethesda, Maryland, USA. ¹³⁰Department of Epidemiology, University of Washington, Seattle, Washington, USA. ¹³¹Seattle Epidemiologic Research and Information Center, Department of Veterans Affairs Office of Research and Development, Seattle, Washington, USA. ¹³²Department of Medical Sciences, Uppsala University, Uppsala, Sweden. ¹³³Medstar Research Institute, Baltimore, Maryland, USA. ¹³⁴Clinical Research Branch, National Institute on Aging, Baltimore, Maryland, USA. ¹³⁵Institut interrégional pour la santé (IRSA), La Riche, France. ¹³⁶Coordination Centre for Clinical Trials, University of Leipzig, Leipzig, Germany. ¹³⁷Department of Medicine, Helsinki University Hospital, University of Helsinki, Helsinki, Finland. ¹³⁸Department of Internal Medicine, Leiden University Medical Centre, Leiden, The Netherlands. ¹³⁹Research Unit, Cardiovascular Genetics, Nancy University Henri Poincaré, Nancy, France. ¹⁴⁰EMGO Institute for Health and Care Research, Department of Psychiatry, VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands. ¹⁴¹Department of Internal Medicine, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Lausanne, Switzerland. ¹⁴²Genomic Medicine, Imperial College London, Hammersmith Hospital, London, UK. ¹⁴³Epidemiology and Public Health, Queen's University Belfast, Belfast, UK. ¹⁴⁴Medical Products Agency, Uppsala, Sweden. ¹⁴⁵See **Supplementary Note** for a full list of authors. ¹⁴⁶National Institute for Health and Welfare, Unit of Chronic Disease Epidemiology and Prevention, Helsinki, Finland. ¹⁴⁷Departments of Nutrition and Epidemiology, Harvard School of Public Health, Boston, Massachusetts, USA. ¹⁴⁸Channing Laboratory, Brigham and Women's Hospital and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA. ¹⁴⁹Genetic Epidemiology and Clinical Research Group, Department of Public Health and Clinical Medicine, Section for Medicine, Umeå University Hospital, Umeå, Sweden. ¹⁵⁰London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, UK. ¹⁵¹Department of Medicine, School of Medicine, Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland, USA. ¹⁵²The Welch Center for Prevention, Epidemiology, and Clinical Research, School of Medicine and Bloomberg School of Public Health, Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland, USA. ¹⁵³Division of Epidemiology and Community Health, School of Public Health, University of Minnesota, Minneapolis, Minnesota, USA. ¹⁵⁴Department of Endocrinology and Diabetes, Norfolk and Norwich University Hospital National Health Service Trust, Norwich, UK. ¹⁵⁵Department of Medicine, University of Kuopio and Kuopio University Hospital, Kuopio, Finland. ¹⁵⁶Faculty of Health Science, University of Southern Denmark, Odense, Denmark. ¹⁵⁷Institute of Biomedical Science, Faculty of Health Science, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark. ¹⁵⁸Department of Neurology, General Central Hospital, Bolzano, Italy. ¹⁵⁹Department of Neurology, University of Lübeck, Lübeck, Germany. ¹⁶⁰Institute of Medical Informatics, Biometry and Epidemiology, Ludwig-Maximilians-Universität, Munich, Germany. ¹⁶¹Klinikum Grosshadern, Munich, Germany. ¹⁶²School of Medicine, University of Split, Split, Croatia. ¹⁶³Gen-Info Ltd., Zagreb, Croatia. ¹⁶⁴Department of Physiology and Biophysics, Keck School of Medicine, University of Southern California, Los Angeles, California, USA. ¹⁶⁵Department of Medicine, Division of Endocrinology, Keck School of Medicine, University of Southern California, Los Angeles, California, USA. ¹⁶⁶Department of Genetics, University of North Carolina, Chapel Hill, North Carolina, USA. ¹⁶⁷National Institute for Health and Welfare, Unit of Diabetes Prevention, Helsinki, Finland. ¹⁶⁸South Ostrobothnia Central Hospital, Seinäjoki, Finland. ¹⁶⁹Departments of Medicine and Epidemiology, University of Washington, Seattle, Washington, USA. ¹⁷⁰Longitudinal Studies Section, Clinical Research Branch, National Institute on Aging, NIH, Baltimore, Maryland, USA. ¹⁷¹Faculty of Medicine, University of Iceland, Reykjavik, Iceland. ¹⁷²Lab of Cardiovascular Sciences, National Institute on Aging, National Institutes of Health, Baltimore, Maryland, USA. ¹⁷³Department of Clinical Sciences/Clinical Chemistry, University of Oulu, University of Oulu, Oulu, Finland. ¹⁷⁴National Institute of Health and Welfare, Oulu, Finland. ¹⁷⁵Department of Preventive Medicine, Keck School of Medicine, University of Southern California, Los Angeles, California, USA. ¹⁷⁶MRC–Health Protection Agency Centre for Environment and Health, Imperial College London, London, UK. ¹⁷⁷These authors contributed equally to this work. Correspondence should be addressed to M.B. (boehnke@umich.edu), M.I.M. (mark.mccarthy@dr1.oc.ac.uk), J.C.F. (jcflorez@partners.org) or I.B. (ib1@sanger.ac.uk).

ONLINE METHODS

Cohort description. The consortia participating in MAGIC contributed a maximum total of 122,743 individuals. The stage 1 discovery set included 36,466–46,186 individuals (depending on trait) from 17 population-based cohort studies and four case-control studies. The stage 2 replication set included up to 76,558 individuals from 33 sample collections, including 28 population-based and 5 case-control collections. Detailed information on all studies is provided in **Supplementary Tables 1a** (stage 1 discovery) and **1b** (stage 2 replication). All participants were adults of white European ancestry from the United States or Europe. Individuals were excluded from the analysis if they had a physician diagnosis of diabetes, were on diabetes treatment (oral or insulin) or had a fasting plasma glucose ≥ 7 mmol/l. Some individuals with fasting glucose < 7 mmol/l but who would have tested abnormally after an oral glucose challenge could have been included; we estimated this number to be as low as $< 1\%$ in the Framingham Heart Study and 1.6% in Inter99, two population cohorts in which all relevant data were available. Individual studies applied further sample exclusions, including pregnancy, non-fasting individuals, type 1 diabetes, or outliers ± 3 s.d. of distribution for either fasting glucose or fasting insulin, as detailed in **Supplementary Tables 1a** and **1b**. Individual stage 1 discovery cohort sizes ranged between 458 and 6,479 samples; stage 2 replication cohorts ranged between 554 and 8,010 samples. All studies were approved by local research ethic committees, and all participants gave informed consent.

Type 2 diabetes association. The association analysis of lead SNPs with T2D as a dichotomous trait was carried out under the additive genetic model in 27 case-control cohorts totaling 40,655 cases and 87,022 controls of European descent. These included 8,130 cases and 38,987 controls from eight DIAGRAM+ Consortium studies and 32,525 additional T2D cases and 48,035 additional controls from 19 cohorts genotyped *de novo*, listed as cohort (*n* cases/*n* controls): FUSION_stage2 (1,203/1,261), METSIM_CC (854/3,469), Addition/Ely (892/1,612), Cambridgeshire Case Control Study (541/527), Norfolk Diabetes Case Control Study (6,056/6,428), deCODE (1,465/23,194), DGDG (690/730), DGI (1,022/1,075), ERGO (1,178/4,761), EUROSPAN (268/3,710), FUSION (1,161/1,174), KORA S3 (433/1,438), T2D Wellcome Trust Case Control Consortium (1,924/2,938), HPFS (1,146/1,241), Nurses' Health Study (1,532/1,754), Danish (3,652/4,992), KORA_replication consisting of cases from KORAS1-S4 and the Augsburg Diabetes Family Study (ADFS) and controls from KORA S4 (1,047/1,491), OXGN_58BC (UKRS2) (612/1,596), UKT2DGC (4,979/6,454), Framingham Heart Study_CC (674/7,664), NHANES (289/1,219), Partners/Roche (534/649), Umeå (1,327/1,424), French_CC (2,155/1,862), GCI Poland_DGI_Stage2 (969/969), GCI_US_DGI_Stage2 (1,191/1,171) and MDC_MDR_DGI_Stage2 (2,814/3,234). According to the best sample-specific model, in some cohorts, age and BMI were used as covariates for adjustment of the case-control association. The meta-analysis of the cohort-specific summary statistics (odds ratios and 95% confidence intervals) was performed using a fixed effects inverse-variance approach with GWAMA (see URLs).

Quantitative trait measurements. Fasting glucose (in mmol/l) was measured from fasting whole blood, plasma or serum or a combination of these. Whole-blood fasting glucose levels were corrected to plasma fasting glucose using a correction factor of 1.13. Fasting insulin was measured as described in **Supplementary Tables 1a** and **1b** for each of the cohorts. Indices of beta-cell function (HOMA-B) and insulin resistance (HOMA-IR) were derived from paired fasting glucose and insulin measures using the homeostasis model assessment¹⁸.

Genotyping, imputation and quality control. Genotyping of individual cohorts was carried out using commercial genome-wide arrays as detailed in **Supplementary Tables 1a** and **1b**. For genome-wide SNP sets, different criteria were used to filter out poor-quality SNPs and samples before imputation. Criteria generally applied for exclusion of samples were (i) call-rate < 0.95 , (ii) individuals with heterozygosity outside the population-specific bounds and (iii) ethnic outliers. Criteria generally applied for exclusion of SNPs were (i) minor allele frequency (MAF) < 0.01 , (ii) Hardy-Weinberg equilibrium $P < 10^{-4}$ or 10^{-6} and (iii) call-rate < 0.95 . Imputation of additional autosomal SNPs from the HapMap CEU reference panel was performed using the software MACH²³, IMPUTE²² or BAMBAM⁶⁸ with parameters and

pre-imputation filters as specified in **Supplementary Tables 1a** and **1b**. SNPs were also excluded if the cohort-specific imputation quality as assessed by r^2 .hat was < 0.3 (MACH) or proper-info was < 0.4 (IMPUTE) or observed/expected dosage variance was < 0.3 (BAMBAM), or if their mapping and/or strand annotation was ambiguous. In total, up to 2.5 million genotyped or imputed autosomal SNPs were considered for meta-analysis. SNPs were considered for meta-analysis if they were available for at least 20% of maximum available sample size or if $\geq 10,000$ individuals were informative for each SNP.

Statistical analyses. We excluded from analysis people with diabetes (those on diabetes treatment or with fasting glucose ≥ 7 mmol/l), non-fasting participants and pregnant women. In each cohort, we used log-transformed trait values for fasting insulin, HOMA-IR and HOMA-B and untransformed fasting glucose as the dependent variable in linear regression models that included terms for sex, age (except NFBC 1966, where all subjects were 31 years old), study site (if applicable), geographical covariates (if applicable) and age squared (Framingham only) to assess the association of additively coded genotypes with trait values. Association testing was performed using software that takes genotype and imputation uncertainty into account, using a missing-data likelihood test implemented in SNPTEST²² or by using allele dosages in the linear regression model in MACH2QTL²³, GenABEL⁶⁹ or lme4 from the R kinship package⁷⁰. Regression estimates for the effect of the additively coded SNP were pooled across studies in a meta-analysis using a fixed effect inverse-variance approach⁷¹. The individual cohort results, but not the final meta-analysis results, were corrected for residual inflation of the test statistic using the genomic control method⁷². Final GC values were 1.05 for fasting glucose, 1.046 for HOMA-B, 1.04 for HOMA-IR and 1.041 for fasting insulin.

Replication SNP selection and analysis. Twenty-five lead SNPs from among the most significant association results in the stage 1 discovery meta-analyses were selected for replication. To account for the correlation between traits and to ensure independent signals, highly significant associations detected in two or more traits were selected only once. All selected loci had an $r^2 < 0.5$ with the nearest other selected loci. From each unique locus, the SNP with the smallest *P* value was chosen. All SNPs had a minimum sample size of at least 80% of the overall discovery sample. Variants known to be associated with T2D (in *SLC30A8* and *TCF7L2*) and reaching the genome-wide significance threshold ($P < 5 \times 10^{-8}$) were not included in the replication list. SNPs were also selected on the basis of low heterogeneity between studies, although loci with biologic plausibility were selected even if there was some evidence of heterogeneity. Seventeen SNPs from the glucose and HOMA-B analyses and eight SNPs from the insulin and HOMA-IR analyses were taken for stage 2 replication. Although previously described, variants in *G6PC2*, *GCK*, *GCKR* and *MTNR1B* were selected for replication to serve as 'positive controls' in all study samples. Up to four alternate proxy SNPs (maximizing LD with the index SNP) were selected for each locus to accommodate the capacities of different platforms. In the cases where index SNPs failed in the initial stage of genotyping, replication results were obtained for proxy SNPs in strong LD with the original index SNP whenever possible. SNPs with Hardy-Weinberg equilibrium *P* values ≤ 0.001 were excluded. In cases where more than one proxy SNP was genotyped but the index SNP was unavailable, the proxy SNP's LD with the index SNP and its call rate was used to select the SNP with the best-quality genotyping to be included in the meta-analysis.

Genotype data for 25 signals or proxies were obtained from 33 independent replication cohorts, including both *in silico* data from pre-existing GWAS (8) and *de novo* genotyping (25). Phenotype definition and association testing between fasting traits and these 25 SNPs was performed in the same manner in each cohort. The inverse variance method was then applied to derive pooled effect estimates from the stage 2 replication samples using METAL (see URLs) and GWAMA software. We then carried out a pooled analysis of the stage 1 discovery cohorts and stage 2 replication samples to determine which SNPs reached genome-wide significance, as determined by a $P < 5 \times 10^{-8}$. Heterogeneity was assessed using the I^2 index⁴⁸.

Notes on replication genotyping. *Amish.* The Amish trait data is reported for the Heredity and Phenotype Interaction Heart Study (HAPI), Amish Family Longevity Study (LS), Amish Family Diabetes Study (AFDS), Amish

Family Calcification Study (AFCS) and Pharmacogenomics of Anti-Platelet Intervention (PAPI) Study. All studies genotyped 15 SNPs (rs10830963, rs4607517, rs11605924, rs11708067, rs1416802, rs588262, rs4675095, rs6947696, rs4912494, rs11920090, rs174550, rs7034200, rs4243291, rs457420, rs1881413). Other SNPs were typed on different sample subsets: AFDS only (rs2191349, rs10493846); HAPI only (rs560887); HAPI, LS and Pharmacogenomics of Anti-Platelet Interaction study (PAPI) (rs780094, rs6479526, rs340835, rs11167682); HAPI, LS, AFDS, PAPI (rs4918635, rs855228); HAPI, LS and AFCS (rs11039149). The genotyping statistics in **Supplementary Table 1b** are reported for the AFDS + HAPI + LS cohorts.

FUSION stage 2. The FUSION stage 2 cohort includes some Health 2000 samples, none of which overlap with the Health 2000 cohort.

SNP score. For the 16 SNPs reaching genome-wide significance of association (either in the discovery stage alone or in the combined replication and discovery meta-analysis), we defined a risk score as the weighted sum of the number of expected risk alleles, where the sum of the weights was set to the number of SNPs (16) and the weights were proportional to the estimate of the effect size for each SNP. Mean fasting glucose levels according to the number of weighted risk alleles were computed in some of the largest cohorts (Framingham, ARIC, NFBC 1966) with all 16 SNPs available (genotyped or imputed).

Bioinformatic analysis and functional annotation. To perform a preliminary assessment of the underlying functionality at the associated loci, we first expanded the set of SNPs to include those in strong LD with the index SNP (defined as pairwise $r^2 > 0.8$ according to HapMap Phase II CEU data). We then mapped the genomic locations of all the SNPs in this expanded set to several non-mutually-exclusive genomic annotation sets: nonsynonymous sites, splice sites, intergenic regions, 5' UTR, 3' UTR and introns from dbSNP version 129 (see URLs section for URLs of this and other software mentioned in this paragraph); 1-kb and 5-kb regions upstream of transcription start sites from Ensembl version 49; intergenic predicted transcription factor binding sites, CpG islands, ORegAnno elements, Encode region ancestral repeats, EvoFold elements, multispecies conserved sequences and positively selected gene regions from the University of California Santa Cruz human table browser; predicted microRNA target sites from TargetScan 4.2; validated enhancers from the Vista Enhancer Browser; predicted *cis*-regulatory modules from the PreMod database; and validated noncoding RNAs from RNADB. The potential functional effect of nonsynonymous substitutions were evaluated using three prediction programs: SIFT, PolyPhen and PANTHER.

GRAIL. We used GRAIL (see URLs) to examine the putative relationship between candidate genes at validated loci based on concomitant appearance in published scientific text. GRAIL is a bioinformatic annotation tool that, given several genomic regions or SNPs associated with a particular phenotype or disease, searches for similarities in the published scientific text among the associated genes⁷³. It scores regions for functional relatedness by defining associated regions based on the interval between recombination hotspots flanking furthest neighboring SNPs with $r^2 > 0.5$ to the index SNP, and identifies overlapping genes in that region. Based on textual relationships between genes (as determined from a download of PubMed abstracts on 16 December 2006), GRAIL assigns a *P* value to each region suggesting its degree of functional connectivity, and picks the best candidate gene after taking into account multiple comparisons.

We considered the following SNPs and candidate genes: rs10830963 (*MTNR1B*), rs2191349 (*DGKB*), rs4607517 (*GCK*), rs11920090 (*SLC2A2*), rs11708067 (*ADCY5*), rs560887 (*G6PC2*), rs780094 (*GCKR*), rs11605924 (*CRY2*), rs7034200 (*GLIS3*), rs340874 (*PROX1*), rs10885122 (*ADRA2A*), rs7944584 (*NRIH3*), rs174550 (*FEN1*, *FADS1*, *C11orf9*, *C11orf10*, *FADS2*) and rs11071657 (*C2CD4B*). In addition, the following keywords describing functional connections were used: "glucose", "diabetes", "islet", "diacylglycerol", "circadian", "insulin", "drosophila", "liver", "clock", "cyclase", "pancreatic", "adenyl", "memory", "beta", "mice", "islets", "phosphatase", "camp", "light", "activity". A total of 7 genes (*MTNR1B*, *DGKB*, *GCK*, *SLC2A2*, *ADCY5*, *G6PC2* and *GCKR*) out of 14 had a significant association with functional connectivity (at $P < 0.1$) compared to 1.4 expected under the null, demonstrating that this gene set is enriched in relationships with each other.

eQTL analysis. The validated association signals were searched for previous evidence of expression quantitative trait loci (eQTLs) using several data sources. Liver eQTL association results were obtained from Schadt *et al.*³⁹. Cortex eQTL association results were obtained from Myers *et al.*⁴⁰. Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cell eQTLs from ref. 41 were retrieved using the mRNA by SNP browser (see URLs). For each region, we limited our analysis to *cis* eQTLs given the difficulty of reliably interpreting *trans* effects. Genes or SNPs within 1 Mb from the lead SNP were considered. The r^2 values between the lead SNPs and eQTL SNPs were retrieved from the HapMap Phase 2 data (CEU Panel), and only SNPs with $r^2 > 0.6$ were considered.

Of the 12 SNPs showing association with liver and located at < 1 Mb from the lead SNP, five had no r^2 data in HapMap and were located at large distances from the MAGIC lead SNP (mean 320 kb, range 48–725 kb). Of the remaining seven, rs174548 at the *FADS1* (fatty acid desaturase 1, $P_{\text{eQTL}} = 1.74 \times 10^{-5}$) locus was located 130 bp away from the lead SNP rs174550 and in strong LD (pairwise $r^2 = 0.8$). All the remaining SNPs did not fit our criteria for selection, although we note that a second lead SNP (rs780094 at *GCKR*) was also moderately associated ($r^2 = 0.49$, distance = 74 kb) with a strong effect eQTL (rs4665969 at *IFT172*, $P_{\text{eQTL}} = 3.97 \times 10^{-23}$). For circulating lymphoblastoid cells, the only *cis* effect fitting our criteria was observed for the MAGIC SNP rs174550 (*FADS1*), which was located 24 kb from a known eQTL centered on the *FADS2* gene ($P_{\text{eQTL}} = 3.1 \times 10^{-4}$). Finally, for cortex, the only eQTL was found at four SNPs within *LOC131076* (rs6769837, rs7648255, rs12636058, rs6438726), all located > 870 kb from the MAGIC lead SNP (rs11708067 at *ADCY5*, LD metrics not available).

Gene expression studies. Adult total RNA samples, except pancreatic islets and flow-sorted beta cells, were purchased from Clontech (Clontech-Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye, France). Adult human islets ($n = 2$) were available through existing collections at Oxford University and were obtained with full ethical consent. Flow-sorted beta cells were obtained from two brain-dead adult donors (preparations $> 92\%$ insulin-positive cells), in accordance with French legislation and the local ethical committee, as previously described⁷⁴.

Tissue panel (Oxford). Samples were treated with DNase I (Ambion) to ensure that residual genomic contamination was removed. For each tissue, 1 μ g of total RNA was used to generate cDNA by random primed first strand synthesis (Applied Biosystems) according to the manufacturer's protocol. Reverse transcription was also performed on all samples in the absence of the enzyme reverse transcriptase, and these samples were used as negative controls. Primers were designed to cover all RefSeq transcripts. Resulting cDNA for each tissue was diluted 1:100 and 4 μ l used in a 10 μ l qRT-PCR reaction with 5.5 μ l gene expression master mix (Applied Biosystems) and 0.5 μ l gene specific assay (Applied Biosystems). All samples were run in triplicate. A standard curve was generated by pooling 1 μ l of each cDNA and serially diluting (1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800) and running as above. Expression levels were determined with respect to the mean of four endogenous controls (β -actin, B2M, HPRT, TOP1) and normalizing to the mean of the 1:100 standard for the assay of interest. For ease of presentation, the maximum gene expression has been set to equal 1 and all other tissue expressions reported as a fraction of this.

Tissue panel (Cambridge). Adult human total RNA samples (cerebellum, cortex, spleen, pancreas, lung, kidney, liver, skeletal muscle, heart, testes, adipocyte and total brain) were obtained from Clontech. Random-primed first-strand cDNA synthesis was performed with 100 ng RNA using Super Script II (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. Primers were design to cover the majority of protein coding transcripts. For the standard curve, 200 ng of a pool of all RNA samples was amplified using the same protocol. The resulting cDNA for each tissue was diluted fivefold and 5 μ l of each sample were used in a 12 μ l SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystem). The cDNA for the standard curve was diluted twofold and used as above. Primers (SIGMA) were designed to anneal to all annotated isoforms of any given gene. Quantitative PCR reactions were done in triplicate on an ABI 7900HT (Applied Biosystems). Expression levels were calculated from their average crossing points, expressed relative to the control gene *Top1* (encoding topoisomerase 1), and normalized to gene-specific expression in pancreas. For the purpose of presentation, for each gene the maximal expression was set to equal one and the rest reported as fraction

of this number. The results of these duplicate experiments, which largely confirm those reported in the text, are shown in **Supplementary Fig. 3**.

Flow-sorted beta cells (Lille). Samples were treated with DNase I (Ambion) to ensure that residual genomic contamination was removed. For each tissue, 1 µg of total RNA was used to generate cDNA by random primed first strand synthesis (Applied Biosystems) according to the manufacturer's protocol. Reverse transcription was also performed on all samples in the absence of the enzyme reverse transcriptase, and these samples were used as negative controls. Total RNA was extracted using Nucleospin RNA II kit (Macherey Nagel) according to the manufacturer's instructions. Resulting cDNA for each tissue was diluted 1:10, and 4 µl was used in a 20-µl qRT-PCR reaction with 10 µl gene expression master mix (Applied Biosystems) and 1 µl gene-specific assay (Applied Biosystems). Data is presented with the most expressed gene (*GLIS3*) normalized to 1 and all other genes reported as a fraction of this number.

URLs. GWAMA, <http://www.well.ox.ac.uk/gwama/index.shtml>; METAL, <http://www.sph.umich.edu/csg/abecasis/Metal/index.html>; dbSNP version 129, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>; Ensembl version 49, <http://www.ensembl.org>; University of California Santa Cruz human table browser, <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTables>; TargetScan 4.2, <http://www.targetscan.org>; Vista Enhancer Browser, <http://enhancer.lbl.gov>; PreMod database, <http://genomequebec.mcgill.ca/PreMod>; RNAdB, [\[imb.uq.edu.au/rnadb/\]\(http://imb.uq.edu.au/rnadb/\); SIFT, <http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>; PolyPhen, <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>; PANTHER, <http://www.pantherdb.org/tools/csnpscoreForm.jsp>; GRAIL \(Gene Relationships Across Implicated Loci\), \[www.broad.mit.edu/mpg/grail/\]\(http://www.broad.mit.edu/mpg/grail/\); mRNA by SNP browser, <http://www.sph.umich.edu/csg/liang/asthma/>.](http://research.</p>
</div>
<div data-bbox=)

68. Servin, B. & Stephens, M. Imputation-based analysis of association studies: candidate regions and quantitative traits. *PLoS Genet.* **3**, e114 (2007).
69. Aulchenko, Y.S., Ripke, S., Isaacs, A. & van Duijn, C.M. GenABEL: an R library for genome-wide association analysis. *Bioinformatics* **23**, 1294–1296 (2007).
70. R Development Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing* (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, 2007).
71. Petitti, D.B. Statistical methods in meta-analysis. in *Meta-analysis, Decision Analysis, and Cost-effectiveness Analysis* (ed. Petitti, D.B.) 94–118 (Oxford University Press, New York, 2000).
72. Devlin, B. & Roeder, K. Genomic control for association studies. *Biometrics* **55**, 997–1004 (1999).
73. Raychaudhuri, S. *et al.* Identifying relationships among genomic disease regions: predicting genes at pathogenic SNP associations and rare deletions. *PLoS Genet.* **5**, e1000534 (2009).
74. Lukowiak, B. *et al.* Identification and purification of functional human β -cells by a new specific zinc-fluorescent probe. *J. Histochem. Cytochem.* **49**, 519–528 (2001).