



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ - ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΤΙΤΛΟΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:
ΑΛΛΗΛΕΠΔΡΑΣΗ ΠΡΟΣΗΛΩΣΗΣ
ΣΤΗ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΟΥ ΤΥΠΟΥ ΔΙΑΤΡΟΦΗ
ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ
ΣΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑΣ ΝΟΣΟΥ

ΧΑΤΖΗΠΕΡΗ ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΑΜ: 20541

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Γ. Δεδούσης, Επίκουρος Καθηγητής Χαροκοπείου Πανεπιστημίου

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Γ. Δεδούσης, Επίκουρος Καθηγητής Χαροκοπείου Πανεπιστημίου

Μ. Γιαννακούλια, Λέκτορας Χαροκοπείου Πανεπιστημίου

Δ. Παναγιωτάκος, Λέκτορας Χαροκοπείου Πανεπιστημίου

ΑΘΗΝΑ 2009

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου, Γεώργιο Δεδούση, που μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με τη συγκεκριμένη έρευνα, συνδυάζοντας τον τομέα της διατροφής με αυτόν της μοριακής γενετικής.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω την Ειρήνη Θεοδωράκη και τη Φίλη Παναγιώτα για την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφεραν καθ' όλη τη διάρκεια της χρονιάς, παρέχοντας μου όχι μόνο απαραίτητες γνώσεις αλλά και γενικότερη υποστήριξη και καθοδήγηση.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
I. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	7
1. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ	8
1.1 Διεθνή στοιχεία	8
1.2 Στοιχεία για τον ελληνικό πληθυσμό	11
2. ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ	14
2.1. Στοιχεία φυσιολογίας	14
2.2. Αιτιολογία	14
2.3. Παθοφυσιολογία της Αθηροσκλήρυνσης	15
3. ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑΣ ΝΟΣΟΥ	18
3.1. Στηθάγχη (angina pectoris)	18
3.2. Έμφραγμα μυοκαρδίου	19
4. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ	21
4.1 Μη τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου	21
4.1.1. Ηλικία	21
4.1.2. Φύλο	21
4.1.3. Οικογενειακό ιστορικό	22
4.2 Τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου	23
4.2.1. Υπερλιπιδαιμία	23
4.2.2. Σακχαρώδης Διαβήτης/ Δυσανεξία στη γλυκόζη	24
4.2.3. Υπέρταση	25
4.2.4. Παχυσαρκία	26
4.2.5. Κάπνισμα	27
4.3 Άλλοι τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου	28
5. ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΝΟΣΟΣ	32
5.1. Εισαγωγή	32
5.2. Μεσογειακή Διατροφή	32
5.2.1 Μεσογειακή διατροφή και υπέρταση	33
5.2.2. Επίδραση της Μεσογειακής Διατροφής στο λιπιδαιμικό προφίλ	35
5.2.3. Επίδραση της Μεσογειακής Διατροφής σε άλλους παράγοντες κινδύνου	36
5.2.4. Επίδραση της Μεσογειακής Διατροφής στην εμφάνιση στεφανιαίας νόσου	37
5.2.5. Η χρήση των Μεσογειακών σκορ στην εκτίμηση του καρδιαγγειακού κινδύνου	39
6. Ο ΜΕΤΑΤΡΕΠΤΙΚΟΣ ΑΥΞΗΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ β (TGF-β)	42
6.1 Η Υπεροικογένεια του Μετατρεπτικού Αυξητικού Παράγοντα β (Transforming Growth Factor β, TGF-β)	42
6.2 Ο Μετατρεπτικός Αυξητικός Παράγοντας β	43
6.3 Μονοπάτι μεταγωγής σήματος από τον TGF-β	44
6.4 Ο ρόλος του TGF-β στην αθηροσκλήρωση	46
6.5 Ο ρόλος του TGF-β στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία	48
6.6 Πολυμορφισμοί των γονιδίων TGF-β1, TGF-β2 ΚΑΙ TGF-β3 και αθηροσκλήρωση	49
7. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ και ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ	51
7.1. Nutrigenomics – Nutrigenetics	51
7.2. Αλληλεπίδραση μεταξύ πολυμορφισμών και μεσογειακής διατροφής	51
II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	53
8. ΣΚΟΠΟΣ	54
9. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	54
9.1 Δείγμα Μελέτης	54
9.2 Συλλογή Δεδομένων	55
9.3 Αποτίμηση σκορ μεσογειακής διατροφής	56
9.4 Αξιολόγηση παραγόντων κινδύνου	59

9.5 Απομόνωση DNA	59
9.6 Ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης DNA	61
9.7 Επιλογή των πολυμορφισμών - Ο αλγόριθμος του Carlson	62
9.8 Αντιδράσεις γονοτύπησης.....	63
9.9 Στατιστική Ανάλυση	68
9.10. Διαλύματα	69
10. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	72
10.1 Περιγραφικά χαρακτηριστικά δείγματος	72
10.2 Ο Έλεγχος Pearson χ^2	73
10.3. Μοντέλα λογαριθμιστικής παλινδρόμησης για την επίδραση των πολυμορφισμών στη στεφανιαία νόσο	75
10.4 Ο Ρόλος της Μεσογειακής Διατροφής στη στεφανιαία νόσο	77
10.5 Αλληλεπίδραση της Μεσογειακής Διατροφής και των πολυμορφισμών στο γονίδιο TGF- β 2	78
11. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	79
III. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	82

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα καρδιαγγειακά νοσήματα αποτελούν την πρώτη αιτία θανάτων παγκοσμίως, ευθυνόμενα για το 30% αυτών. Οι κυριότερες μορφές των νοσημάτων αυτών είναι η στεφανιαία νόσος, στην οποία οφείλεται το 43% των θανάτων από καρδιαγγειακά νοσήματα, και το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, που ευθύνεται για το 33% των θανάτων από καρδιαγγειακές ασθένειες. Υπολογίζεται ότι μέχρι το 2020, 20 εκατομμύρια άνθρωποι θα χάσουν τη ζωή τους εξαιτίας καρδιαγγειακών νοσημάτων.

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

Πολυάριθμες μελέτες έχουν ασχοληθεί με τη διερεύνηση των παραγόντων που αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου (π.χ. ηλικία, φύλο, οικογενειακό ιστορικό, υπέρταση, υπερλιπιδαιμία κ.ά.). Με την πάροδο των χρόνων εμφανίζονται ολοένα και περισσότεροι πιθανοί παράγοντες κινδύνου που εμπλέκονται στην εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων.

Η υπεροικογένεια του TGFβ περιλαμβάνει περισσότερα από 30 μέλη. Ο TGF-β απαντάται σε τρεις ισομορφές: TGF-β1, TGF-β2 και TGF-β3. Αν και κάθε ισομορφή προέρχεται από διαφορετικό γονίδιο, θεωρείται ότι έχουν παρόμοιες ιδιότητες. Ο TGF-β εμπλέκεται σε πολλές διαδικασίες του οργανισμού, μεταξύ των οποίων είναι και η αθηροσκλήρωση, ασκώντας κατά κύριο προστατευτικό ρόλο.

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η επίδραση 10 πολυμορφισμών του γονιδίου TGF-β στην παρουσία στεφανιαίας νόσου. Επίσης, με τη χρήση ενός σκορ Μεσογειακής Διατροφής, διερευνήθηκε η επίδραση της μεσογειακής διατροφής στην παρουσία στεφανιαίας νόσου, καθώς και η αλληλεπίδραση της Μεσογειακής Διατροφής με τους παραπάνω πολυμορφισμούς.

Παρατηρήθηκε ότι οι πολυμορφισμοί rs1342586 και rs1890995 ασκούν προστατευτική δράση, καθώς σχετίζονται με μείωση του σχετικού λόγου πιθανοτήτων, πριν και μετά τη διόρθωση με συγχυτικούς παράγοντες. Οι πολυμορφισμοί rs10863396 και rs2027567 φάνηκε να ασκούν, επίσης, προστατευτική δράση μόνο πριν τη διόρθωση με συγχυτικούς παράγοντες. Οι υπόλοιποι 6 πολυμορφισμοί δε φάνηκε να σχετίζονται με την παρουσία στεφανιαίας νόσου.

Επιπλέον, μελετήθηκε η επίδραση της μεσογειακής διατροφής, εκφρασμένη σε μεσογειακό σκορ, στην εμφάνιση στεφανιαίας νόσου. Τα άτομα χωρίστηκαν σε δύο ομάδες

σύμφωνα με τη διάμεσο του σκορ: στην ομάδα «Υψηλού» σκορ Μεσογειακής Διατροφής και στην ομάδα «Χαμηλού» σκορ Μεσογειακής Διατροφής. Το υψηλό σκορ Μεσογειακής διαίτας σχετίστηκε με μείωση του σχετικού λόγου πιθανοτήτων, πριν τη διόρθωση με συγχυτικούς παράγοντες, κατά 39,9% (odds ratio= 0,601, 95% ΔΕ= 0,403-0,897, P-value= 0,013) και, μετά τη διόρθωση, κατά 40,3%.

Τέλος, δεν παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση μεταξύ των πολυμορφισμών και της μεσογειακής διατροφής στην παρουσία στεφανιαίας νόσου.

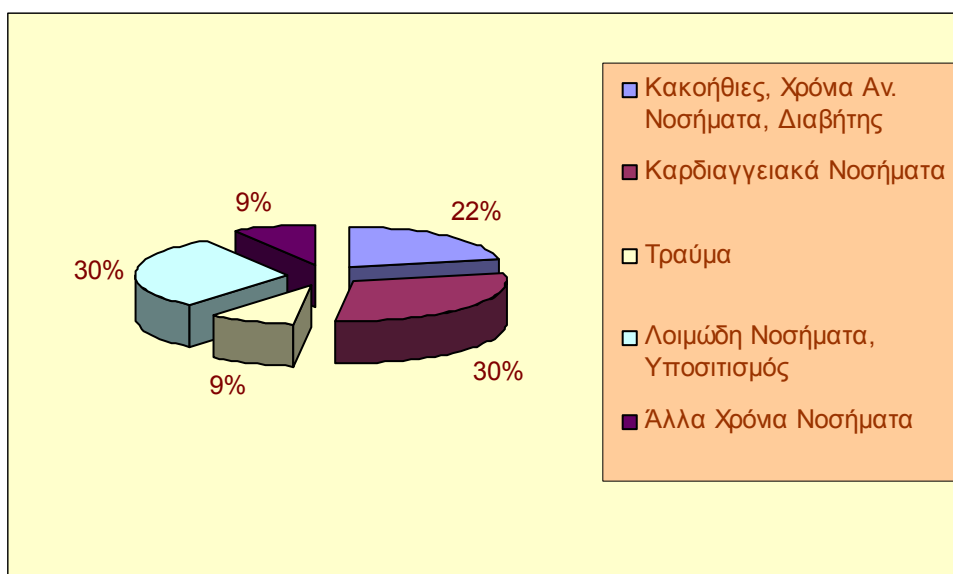
I. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

1.1 Διεθνή στοιχεία

Τα καρδιαγγειακά νοσήματα αποτελούν την πρώτη αιτία θανάτου παγκοσμίως. Ευθύνονται για το 30% των θανάτων, με τα λοιμώδη νοσήματα και τον υποσιτισμό να κατέχουν πλέον τη δεύτερη θέση (Γράφημα 1.1).

Γράφημα 1.1: Ποσοστό θανάτων που οφείλονται σε καρδιαγγειακά νοσήματα παγκοσμίως.



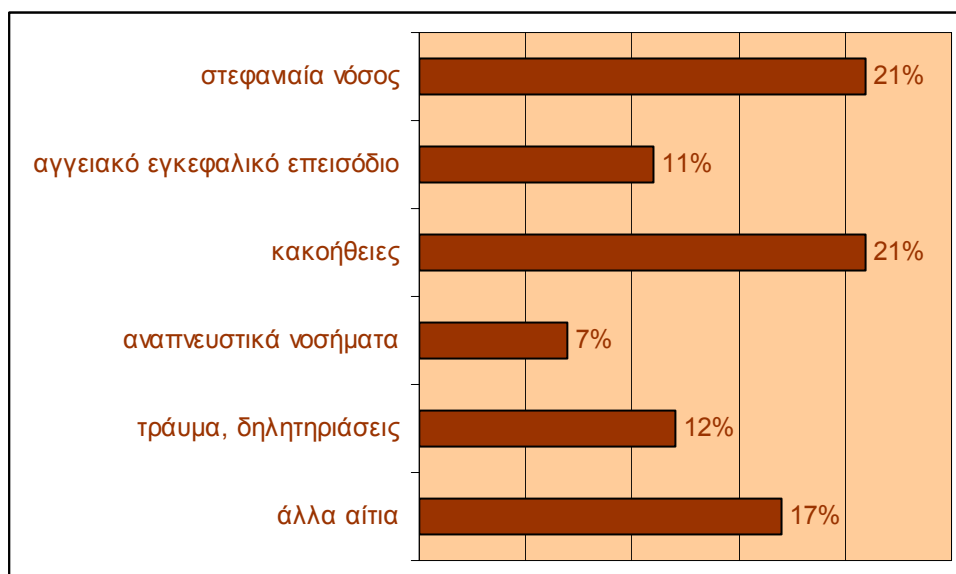
Πηγή : CVD Atlas WHO 2004.

Σύμφωνα με στοιχεία του Π.Ο.Υ., περίπου 17,5 εκατομμύρια άνθρωποι έχασαν τη ζωή τους από καρδιαγγειακά νοσήματα το 2005, (7,6 εκατομμύρια από στεφανιαία νόσο και 5,7 εκατομμύρια από αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο). Υπολογίζεται ότι μέχρι το 2020, 20 εκατομμύρια άνθρωποι θα χάσουν τη ζωή τους εξαιτίας καρδιαγγειακών νοσημάτων. Το 80% των καρδιαγγειακών θανάτων συμβαίνει σε χώρες μεσαίου ή χαμηλού εισοδήματος και με την ίδια αναλογία σε άνδρες και γυναίκες (Atlas of Heart Disease and Stroke 2004).

Στην ευρωπαϊκή ήπειρο τα καρδιαγγειακά νοσήματα αποτελούν τη σημαντικότερη αιτία νοσηρότητας και θνητότητας. Ευθύνονται σχεδόν για το 50% των θανάτων, προκαλώντας πάνω από 4,3 εκατομμύρια θανάτους κάθε έτος στα 52 κράτη μέλη της Ευρωπαϊκής περιοχής του Π.Ο.Υ. και περισσότερους από 2 εκατομμύρια θανάτους κάθε έτος στην Ε.Ε. Η στεφανιαία νόσος από μόνη της άλλωστε αποτελεί και το συχνότερο αίτιο θανάτου στην Ευρώπη.

Υπολογίζεται ότι ευθύνεται για 2 εκατομμύρια θανάτους κάθε χρόνο, ποσοστό που αντιστοιχεί στο 42% της συνολικής θνησιμότητας. Το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο είναι η δεύτερη συχνότερη αιτία θνητότητας στην Ευρωπαϊκή Ένωση. Ένας στους δέκα άνδρες (11%) και μία στις έξι γυναίκες (17%), χάνουν τη ζωή τους από αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο στην Ε.Ε. (Γράφημα 1.2) (British Heart Foundation and Health Economics Research Center 2008).

Γράφημα 1.2: Θνητότητα ανάλογα με τον αιτιολογικό παράγοντα στην Ε.Ε.



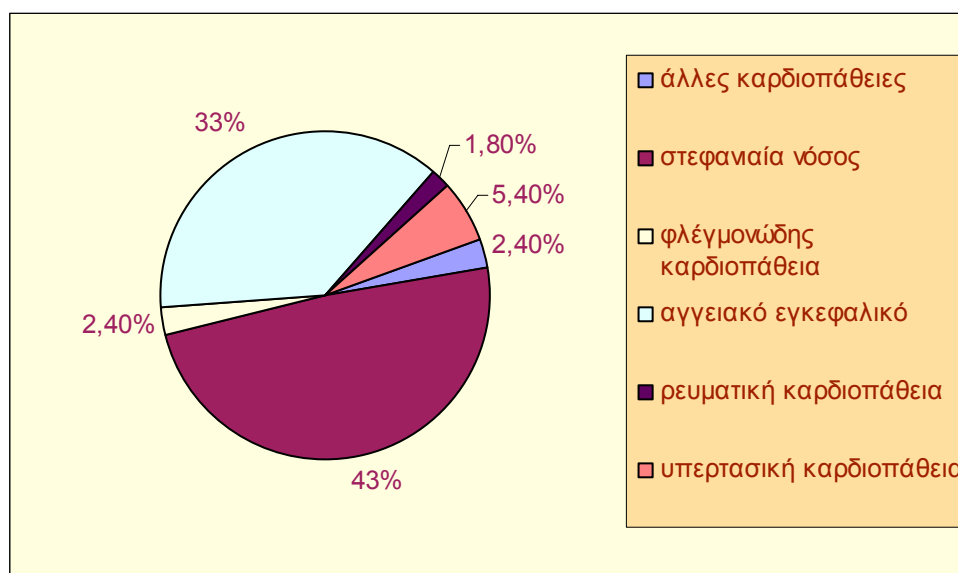
Πηγή : British Heart Foundation and Health Economics Research Center 2008.

Σύμφωνα με την Αμερικανική Καρδιολογική Εταιρία (NCHS/NHANES 2005–2006 data) στις ΗΠΑ το 2005 οι θάνατοι από την καρδιαγγειακή νόσο αντιπροσώπευαν το 35,3 % των ολικών θανάτων (περίπου 1 στους 2,8 θανάτους), ενώ το 2006, 80.000.000 ενήλικες (περίπου 1 στους 3) έπασχαν από έναν ή περισσότερους τύπους της καρδιαγγειακής νόσου, εκ των οποίων :

- ❖ 73.600.000 έχουν υπέρταση
- ❖ 16.800.000 πάσχουν από στεφανιαία νόσο
 - 7.900.000 πάσχουν από νέκρωση του μυοκαρδίου
 - 9.800.000 έχουν στηθάγχη
- ❖ 5.700.000 έχουν καρδιακή ανεπάρκεια
- ❖ 6.500.000 έχουν πάθει αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο
- ❖ 650 000-1.300.000 έχουν κάποια εκ γενετής καρδιαγγειακή ανωμαλία

Οι κυριότερες μορφές καρδιαγγειακών νοσημάτων είναι η στεφανιαία νόσος και το αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο. Περίπου το 50% των θανάτων από καρδιαγγειακά νοσήματα οφείλονται σε στεφανιαία νόσο και το 1/3 σε αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο (Γράφημα 1.3).

Γράφημα 1.3: Ποσοστό θανάτων από διάφορες μορφές καρδιαγγειακών νοσημάτων παγκοσμίως.



Πηγή: CVD Atlas WHO 2004

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

Αποτελέσματα μελέτης MONICA του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας δείχνουν τη διαφοροποίηση της επίπτωσης που υπάρχει από πληθυσμό σε πληθυσμό ανά 100.000 ηλικίας 35-64, με τους Φινλανδούς να παρουσιάζουν τον υψηλότερο αριθμό περιστατικών στεφανιαίας νόσου (Βόρεια Καρέλια, 835 ανά 100,000) και να ακολουθούν οι άνδρες από το Ηνωμένο Βασίλειο (Γλασκόβη 777/100.000, Μπέλφαστ 695/100.000), ενώ μικρότερη επίπτωση εμφανίζουν οι Ισπανοί (210/100.000) και ακόμη μικρότερη οι Κινέζοι (81/100.000). Όσον αφορά στις γυναίκες μεγαλύτερη επίπτωση εμφανίζουν οι γυναίκες από το Ηνωμένο Βασίλειο (Γλασκόβη 265/100.000, Μπέλφαστ 145/100.000), ενώ μικρότερη επίπτωση εμφανίζουν οι γυναίκες στην Ισπανία (35/100.000) και στην Κίνα (35/100.000) (www.who.int).

1.2 Στοιχεία για τον ελληνικό πληθυσμό

Σύμφωνα με στοιχεία του ΠΟΥ, οι δύο κυριότερες αιτίες θανάτου στον ελληνικό πληθυσμό είναι η εγκεφαλοαγγειακή νόσος και η στεφανιαία νόσος. Συνολικά προκαλούν το 34,7% των συνολικών θανάτων και το 17,4% των ετών ζωής προσαρμοσμένων στην αναπηρία (DALYs) (WHO 2002). Η στεφανιαία νόσος αποτελεί τη δεύτερη αιτία θανάτου, με επίπτωση 110 θανάτους ανά 100.000 άτομα (1998).

Η μελέτη των Επτά Χωρών, που άρχισε στις αρχές της δεκαετίας του 1960 και συμπεριέλαβε περίπου 13.000 άτομα από διαφορετικούς πληθυσμούς, κατέδειξε ύστερα από παρακολούθηση δεκαπέντε ετών ότι η Κρήτη είχε το χαμηλότερο ποσοστό θνησιμότητας ανεξάρτητα από την αιτία θανάτου. Τα χαμηλά ποσοστά στεφανιαίας νόσου που παρατηρήθηκαν στις νότιες Ευρωπαϊκές χώρες οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι οι συνήθειες διατροφής των μεσογειακών χωρών, και ιδιαίτερα της Κρήτης, ίσως εξηγούν τα παρατηρούμενα ωφέλη υγείας. Η μελέτη των Επτά Χωρών αποτέλεσε την πρώτη σημαντική συμμετοχή της Ελλάδας σε επιδημιολογική μελέτη και υπήρξε το έναυσμα για περαιτέρω διερεύνηση της επίδρασης της διατροφής στα καρδιαγγειακά νοσήματα (Παναγιωτάκος και συν., 2004; Liu S., 2001; Keys A., 1995).

Με βάση στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, το έτος 1980 η Ελλάδα βρισκόταν σε μία από τις χαμηλότερες θέσεις όσον αφορά τη θνησιμότητα από καρδιαγγειακές ασθένειες μέχρι την ηλικία των 64 ετών, συγκριτικά με 18 Ευρωπαϊκές χώρες. Το 1993 όμως, η εικόνα αυτή άλλαξε, με τη θνησιμότητα από εγκεφαλοαγγειακές ασθένειες να βρίσκεται στις υψηλότερες θέσεις, και τη θνησιμότητα από στεφανιαία νόσο να πλησιάζει το μέσο όρο. Υπάρχουν στοιχεία που υποδεικνύουν διαφοροποιήσεις στη θνησιμότητα μεταξύ αστικού και αγροτικού πληθυσμού. Τα στεφανιαία επεισόδια είναι συχνότερα στον αστικό πληθυσμό και είναι ιδιαίτερα συχνά στην Ήπειρο (Υπουργείο Υγείας, Πρόνοια και Κοινωνική Ασφάλιση, 1992). Μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Κρήτη, σε αγροτική περιοχή, παρουσίασε χαμηλότερη θνησιμότητα από στεφανιαία νόσο, συγκρινόμενη με την υπόλοιπη Ελλάδα. Αυτή η έστω και μικρή διαφοροποίηση, είναι μάλλον επακόλουθο της αλλαγής διαιτητικών συνηθειών και των γενικότερων αλλαγών στον τρόπο ζωής που παρατηρούνται σε αστικές περιοχές (www.who.int).

Πίνακας 1.1: Αιτίες θανάτου στην Ελλάδα για το έτος 2002

Αίτια	Θάνατοι		Χαμένα έτη ζωής
	(000)	(%)	(%)
Όλες οι αιτίες	113	100	100
Εγκεφαλοαγγειακή νόσος	22	20	13
Ισχαιμική καρδιακή νόσος	16	15	15
Καρκίνος τραχείας, βρόγχων και πνευμόνων	6	6	7
Ορθοκολικός καρκίνος	2	3	3
Λοίμωξη ανώτερου αναπνευστικού	2	2	1
Τροχαία ατυχήματα	2	2	7
Καρκίνος ήπατος	2	2	2
Καρκίνος στήθους	1	2	3
Καρκίνος στομάχου	1	2	2
Χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια	1	2	1

Πηγή : Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας

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

Άνδρες		Γυναίκες	
Αίτια	DALYs (%)	Αίτια	DALYs (%)
Καρδιαγγειακές ασθένειες	24,9	Νευροψυχιατρικές καταστάσεις	24,8
Νευροψυχιατρικές καταστάσεις	19,5	Καρδιαγγειακές ασθένειες	23,9
Κακοήθες νεόπλασμα	16,5	Κακοήθες νεόπλασμα	14,1
Ακούσια τραύματα	11,2	Αναπνευστικά νοσήματα	7,5
Αναπνευστικά νοσήματα	8,0	Μυοσκελετικές ασθένειες	5,5
Ασθένειες οργάνων	4,2	Ασθένειες οργάνων	5,5
Μυοσκελετικές ασθένειες	3,1	Ακούσια τραύματα	4,1
Νοσήματα πεπτικού συστήματος	2,6	Σακχαρώδης διαβήτης	3,4
Σακχαρώδης διαβήτης	2,2	Νοσήματα πεπτικού συστήματος	2,4
Αναπνευστικές λοιμώξεις	1,1	Αναπνευστικές λοιμώξεις	1,0

Background data from WHO (2003).

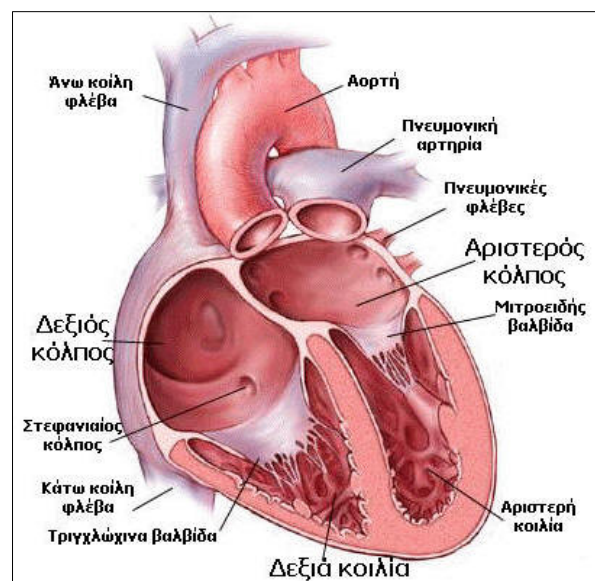
2. ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

2.1. Στοιχεία φυσιολογίας

Η λειτουργία της καρδιάς είναι η προώθηση του αίματος σε όλα τα όργανα και τους ιστούς του σώματος. Για να επιτελεί αυτό το έργο, ο καρδιακός μυς χρειάζεται πλούσια ροή αίματος (στεφανιαία αιμάτωση), που μπορεί να αυξάνεται κατάλληλα όταν αυτό απαιτείται. Τα στεφανιαία αγγεία μεταφέρουν οξυγόνο προς τα μυοκύτταρα και απομακρύνουν τα προϊόντα του μεταβολισμού (διοξείδιο του άνθρακα, γαλακτικό οξύ, ιόντα υδρογόνου, κ.ά.). Χαρακτηριστικό της στεφανιαίας κυκλοφορίας είναι ότι ακόμα και κατά τη συνηθισμένη δραστηριότητα, η καρδιά προσλαμβάνει το 75% του οξυγόνου του αρτηριακού αίματος, σε αντίθεση με άλλα όργανα που προσλαμβάνουν περίπου 25%. Όταν οι μυοκαρδιακές ανάγκες σε οξυγόνο είναι αυξημένες, απαιτείται η αύξηση της στεφανιαίας ροής αίματος. Εάν η στεφανιαία ροή αίματος δεν μπορεί να καλύψει τις ανάγκες σε οξυγόνο, προκαλείται ισχαιμία του μυοκαρδίου (Χανιώτης Φ και συν., 2000; Braunwald E et al, 1994; Pepine CJ et al., 2007).

2.2. Αιτιολογία

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



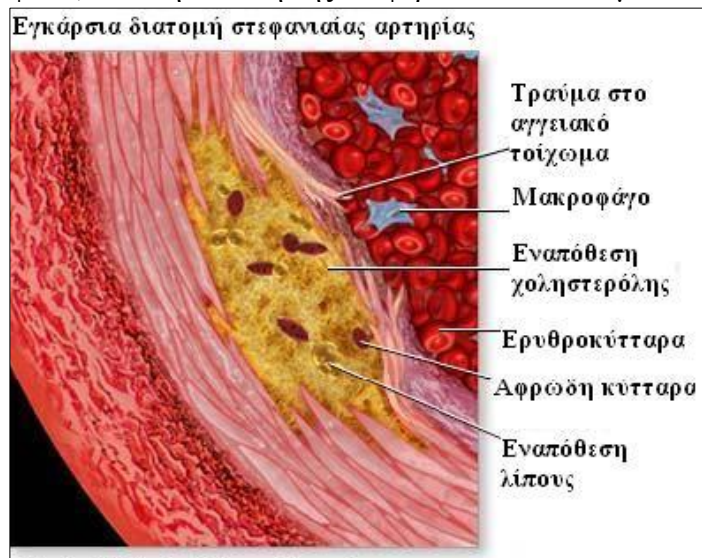
Αντίθετα, αν μία αρτηρία αποφραχθεί μερικώς, ενώ δεν έχει αναπτυχθεί παράπλευρη κυκλοφορία, η απόφραξη μπορεί να παραβιάσει την αιματική ροή κάτω από συνθήκες αυξημένων αναγκών. Κατά συνέπεια, μπορεί να συμβούν συμπτώματα διαλείπουσας αγγειακής ανεπάρκειας (στηθάγχη) (Σαχίνη – Καρδάση Α και συν., 2004; Kusumoto F et al., 2000).

Έχει, επίσης, περιγραφεί σπασμός των στεφανιαίων αγγείων από διάφορους μεσολαβητές, όπως είναι η σεροτονίνη και η ισταμίνη, φαίνεται όμως ότι το φαινόμενο αυτό είναι συχνότερο στους Ιάπωνες. Σπανίως, η στεφανιαία νόσος μπορεί να οφείλεται σε συγγενείς διαμαρτίες, με μικρό όμως ποσοστό των διαταραχών αυτών να οδηγεί σε ισχαιμία με κλινικές εκδηλώσεις (Χανιώτης Φ και συν., 2002).

2.3. Παθοφυσιολογία της Αθηροσκλήρυνσης

Παλιότερα, η αθηροσκλήρυνση είχε περιγραφεί ως εκφυλιστική νόσος που αποτελούσε αναπόφευκτη συνέπεια της γήρανσης. Η έρευνα τα τελευταία χρόνια έχει δείξει ότι κάτι τέτοιο δεν ισχύει, και η αθηροσκλήρυνση περιγράφεται πλέον ως χρόνια φλεγμονώδης κατάσταση που μπορεί να προληφθεί (Berliner JA et al., 1995).

Η αθηροσκληρωτική εξεργασία υπάρχει σε κάποιο βαθμό σε όλες τις ηλικίες και στα δύο φύλα, αλλά η έκτασή της διαφέρει σε κάθε άτομο και κατά ένα μέρος εξαρτάται από το γενετικό



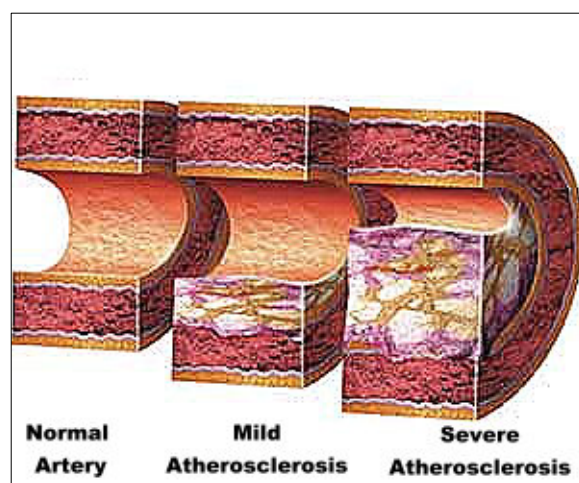
υπόστρωμα, τους παράγοντες κινδύνου και τις τοπικές αιμοδυναμικές συνθήκες. Λιπώδης ράβδωση έχει παρατηρηθεί ακόμα και σε βρέφη, ενώ η ινώδης πλάκα αρχίζει να εμφανίζεται νωρίς κατά την ενήλικη ζωή (Orford JL et al., 2000).

Εναρκτήριο γεγονός αποτελεί η βλάβη του αγγειακού ενδοθηλίου. Το υγιές ενδοθήλιο αποτελεί σημαντικό

ρυθμιστή του αγγειακού τόνου, παράγοντας αγγειοδραστικές ουσίες (προστακυκλίνη, ενδοθηλιογενής παράγοντας χάλασης), και εμπλέκεται κατά περίπλοκο τρόπο στον τοπικό έλεγχο της ενδαγγειακής θρόμβωσης (Awtry EH et al., 2003).

Όταν το ενδοθήλιο έρχεται σε επαφή με βακτηριακά προϊόντα, ή παράγοντες κινδύνου όπως η δυσλιπιδαιμία, οι αγγειοσυσταλτικές ορμόνες που εμπλέκονται στην υπέρταση, προϊόντα οξειδωσης που σχετίζονται με υπεργλυκαιμία ή προφλεγμονώδεις κυττοκίνες που εκκρίνονται

από το λιπώδη ιστό, προκαλείται βλάβη του ενδοθηλίου, η οποία οδηγεί σε ελάττωση της εξαρτώμενης από το ενδοθήλιο αγγειοδιαστολής και τοπική κατάσταση (δυσλειτουργία του ενδοθηλίου) που ευνοεί τη θρόμβωση (Libby P et al., 2005). Η αλλοίωση αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση μακροφάγων, που προέρχονται από μονοκύτταρα της κυκλοφορίας, και λιπιδίων (κυρίως λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας) στη θέση της αγγειακής βλάβης (Awtry EH et al., 2003). Οι λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας εισέρχονται στο αρτηριακό τοίχωμα, με μία διαδικασία που δεν απαιτεί τη μεσολάβηση υποδοχέα, αλλά εξαρτάται από τη συγκέντρωσή τους στο πλάσμα. Σε πρώτη φάση, η οξείδωσή τους πραγματοποιείται κυρίως από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, με αποτέλεσμα την παραγωγή μερικώς οξειδωμένων λιποπρωτεϊνών (Berliner JA et al., 1995). Τα μερικώς οξειδωμένα προϊόντα θεωρείται ότι επηρεάζουν την παραγωγή γλυκοπρωτεϊνών επιφανείας στα ενδοθηλιακά κύτταρα (E – σελεκτίνη, VCAM-1, ICAM-1), που ευνοούν με τη σειρά τους τη μετανάστευση και προσκόλληση των μονοκυττάρων στο αρτηριακό τοίχωμα. Τα μονοκύτταρα εισέρχονται στον υπενδοθηλιακό χώρο και διαφοροποιούνται σε μακροφάγα υπό την επίδραση συγκεκριμένων μορίων (π.χ. χημειοτακτική πρωτεΐνη 1 των μονοκυττάρων, παράγοντες διέγερσης σχηματισμού αποικιών, αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού-B (TGF-B)). Οι μερικώς οξειδωμένες λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας οξειδώνονται περαιτέρω από τα μακροφάγα, προσλαμβάνονται από ειδικούς υποδοχείς τους, τους υποδοχείς–εκκαθαριστές (scavenger receptors) και εισέρχονται σε αυτά, δημιουργώντας αφρώδη κύτταρα. Σωροί τέτοιων αφρωδών κυττάρων αποτελούν την πρώτη ορατή αλλοίωση της αθηροσκλήρυνσης, τη λιπώδη ράβδωση. Τα αφρώδη κύτταρα μπορούν να απελευθερώνουν ουσίες, όπως ιντερλευκίνες και παράγοντες νέκρωσης όγκων, που ενισχύουν την προσκόλληση και χημειοταξία επιπλέον μονοκυττάρων στο σημείο της βλάβης. Επιπλέον, τα μακροφάγα απελευθερώνουν ένζυμα, οξειδωμένη χοληστερόλη και ελεύθερες ρίζες που προάγουν την απόπτωση του ενδοθηλίου, η οποία συνεπάγεται την προσκόλληση αιμοπεταλίων στη θέση της βλάβης (Fuster V et al., 1994).

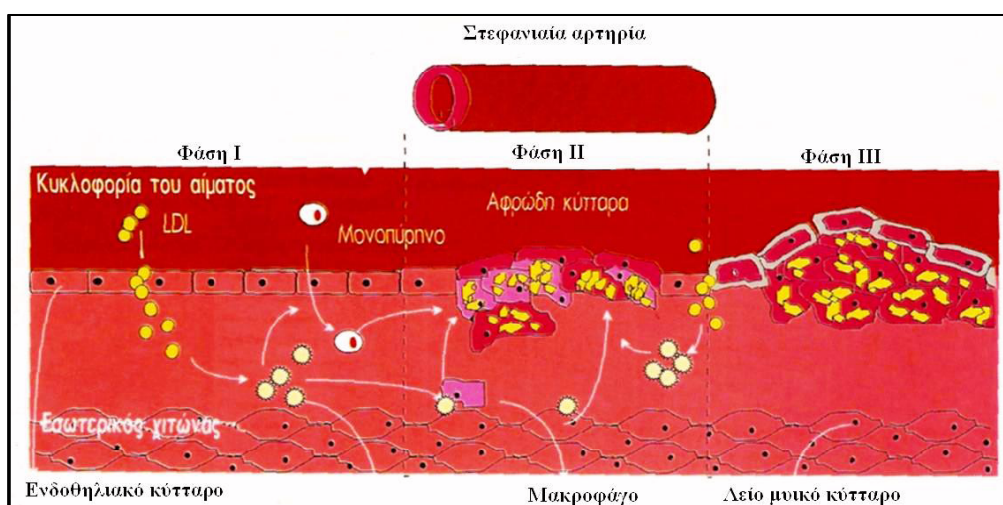


Καθώς η πλάκα ωριμάζει, αυξητικοί παράγοντες, (PDGF, bFGF, TGF-f, κ.α.) προερχόμενοι από τα αιμοπετάλια και τα μακροφάγα, διεγείρουν τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό λείων μυϊκών κυττάρων και ινοβλαστών, με αποτέλεσμα το σχηματισμό είτε μιας ινώδους αλλοίωσης του έσω χιτώνα είτε μιας ινώδους καλύπτρας επάνω από ένα πλούσιο σε λιπίδια πυρήνα. Με την περαιτέρω αύξηση της πλάκας ο αυλός του αγγείου γίνεται

στενότερος και η ροή του αίματος στο σημείο ελαττώνεται. Η αιμοδυναμική σημασία της πλάκας διαφέρει ανάλογα με το μήκος και τη μορφολογία της αλλοίωσης.

Η συσσώρευση λιπιδίων μέσα στα μακροφάγα συνεπάγεται νέκρωση των κυττάρων αυτών, με αποτέλεσμα να μένει ελεύθερη μια δεξαμενή λιπιδίων στον πυρήνα της πλάκας. Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και μαστοκύτταρα απελευθερώνουν μεταλλοπρωτεΐνες, που διασπούν τις πρωτεΐνες της μεσοκυττάριας ουσίας, ενώ T-λεμφοκύτταρα που βρίσκονται στην πλάκα, παράγουν κυτταροκίνες, οι οποίες αναστέλλουν το σχηματισμό κολλαγόνου από τα λεία μυϊκά κύτταρα. Έτσι, σχηματίζεται μια ευπρόσβλητη πλάκα με πυρήνα έμφορτο λιπιδίων και με εξασθενημένη ινώδη καλύπτρα. Οι πλάκες αυτού του είδους είναι επιρρεπείς σε σχηματισμό ρωγμών ή σε ρήξη, ιδιαίτερα όταν αυξάνονται οι δυνάμεις διάσχισης (πίεση μέσα στον αυλό). Τις πιθανότητες ρήξης της πλάκας αυξάνει επίσης η διακοπή των τροφοφόρων αγγείων του αγγειακού τοιχώματος (Awtry EH et al., 2003; Plutzky J et al., 1999).

Συχνά η ρήξη της πλάκας συμβαίνει στο κυρτό τμήμα της. Η δημιουργία ρωγμής στην περιοχή αυτή συνεπάγεται την αποκάλυψη και επαφή με την κυκλοφορία του κολλαγόνου και των λιπιδίων που έχουν έντονα θρομβογόνες ιδιότητες, με αποτέλεσμα το σχηματισμό θρόμβου μέσα στον αυλό. Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια μεσολαβούν στην πρόκληση αγγειοσπαστικής και περαιτέρω αύξησης του θρόμβου, διακυβεύοντας απότομα τη στεφανιαία ροή αίματος. Τη βαρύτητα της ρήξης της πλάκας και την έκταση της θρόμβωσης αντικατοπτρίζει κλινικά το φάσμα των οξέων στεφανιαίων συνδρόμων, όπως είναι η ασταθής στηθάγχη, το έμφραγμα του μυοκαρδίου χωρίς επάρματα Q και το έμφραγμα με επάρματα Q (Libby P et al., 2001; Buja LM et al., 1994).



Εικόνα 2.1: Στάδια αθηρογένεσης. Από: Κλινική Διαιτολογία και Διατροφή με στοιχεία Παθολογίας, Αντώνιος Ζαμπέλας, εκδόσεις Πασχαλίδης.

3. ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑΣ ΝΟΣΟΥ

3.1. Στηθάγχη (angina pectoris)

Τη συνηθέστερη εκδήλωση της στεφανιαίας νόσου αποτελεί η **στηθάγχη**. Εμφανίζεται ως πρώτη κλινική εκδήλωση περίπου στο ένα τρίτο των ατόμων με στεφανιαία νόσο. Τυπικά είναι παροξυσμός οπισθοστερνικού πόνου ήπιου ή ισχυρού, που περιγράφεται από τον ασθενή σαν σφίξιμο, κάψιμο, βάρος, μούδιασμα ή πνιγμονή με αγωνιώδη χαρακτήρα. Μπορεί επίσης να εντοπίζεται ή να αντανακλάται στην κάτω γνάθο, στο λαιμό, στον αριστερό ή και στους δύο βραχίονες, αγκώνες και καρπούς. Ο πόνος εμφανίζεται συνήθως κατά την προσπάθεια, υποχωρεί σύντομα με τη διακοπή της, ή καταστέλλεται με υπογλώσσια νιτρογλυκερίνη. Μερικές φορές ο πόνος εμφανίζεται παρουσία έντονης συγκίνησης ή θυμού, μετά από ευμεγέθες γεύμα ή κατά την απότομη έκθεση του οργανισμού σε ψυχρό περιβάλλον. (Braunwald E et al, 1994; Pepine CJ et al., 2007).

Η στηθάγχη οφείλεται σε παροδική ισχαιμία του μυοκαρδίου, η οποία συμβαίνει όταν οι ανάγκες του σε οξυγόνο είναι αυξημένες και η προσφορά οξυγόνου μειωμένη, λόγω σημαντικής στένωσης του αυλού στεφανιαίου αγγείου από αρτηριοσκληρυντικές βλάβες. Μπορεί επίσης να οφείλεται σε άλλες αιτίες, όπως αορτίτιδα ή στένωση της αορτικής βαλβίδας (Kusumoto F et al., 2000; Χανιώτης Φ και συν., 2002).

Όταν η κρίση στηθάγχης εμφανίζεται μόνο με τη συνύπαρξη ενός εκλυτικού παράγοντα και η κατάσταση αυτή είναι σταθερή τους τελευταίους 3-5 μήνες, τότε χαρακτηρίζεται ως **σταθερή** στηθάγχη και οφείλεται συνήθως σε στένωση άνω του 50%. Στην περίπτωση αυτή, ο ασθενής είναι συχνά σε θέση να προβλέψει την κρίση, διότι γνωρίζει το μέγεθος της προσπάθειας που την προκαλεί και λαμβάνει μέτρα. Ιδιαίτερες μορφές στηθάγχης, ανεξάρτητες από συγκεκριμένο εκλυτικό παράγοντα και στις οποίες ο ασθενής δεν μπορεί να προβλέψει την κρίση, είναι η **ασταθής στηθάγχη** (συχνά προεμφραγματική) και η **στηθάγχη Prinzmetal** (στηθάγχη από σπασμό των στεφανιαίων αρτηριών). Η ασταθής στηθάγχη χαρακτηρίζεται από συμπτώματα στηθάγχης, σε περίοδο ξεκούρασης ή κατά τη διάρκεια πολύ ελαφριάς φυσικής δραστηριότητας και οφείλεται συνήθως σε στένωση άνω του 90%. Κατά την κρίση ασταθούς στηθάγχης, η ρήξη της αθηρωματικής πλάκας προκαλεί τοπική συσσώρευση αιμοπεταλίων καθώς και παροδικά επεισόδια θρόμβωσης, διάρκειας 10-20 λεπτών. Επιπλέον, η απελευθέρωση από τα αιμοπετάλια αγγειοσυσπαστικών ουσιών, όπως η θρομβοξάνη A_2 και η σεροτονίνη, καθώς και οι αλλοιώσεις του ενδοθηλίου προκαλούν αγγειοσύσπαση και συμβάλλουν στην

μείωση της αιματικής ροής (Kusumoto F et al., 2000; Χανιώτης Φ και συν 2002; Braunwald E et al, 1994; Pepine CJ et al., 2007).

3.2. Έμφραγμα μυοκαρδίου

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

Η έναρξη των συμπτωμάτων οξέος εμφράγματος είναι συνήθως βαθμιαία και σπάνια ακαριαία (National Heart, Lung and Blood Institute). Στην πλειονότητα των περιπτώσεων οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου, ως πρώιμη κλινική εκδήλωση, εμφανίζεται χαρακτηριστικός ισχυρός πόνος, ο οποίος μοιάζει με το στηθαγχικό πόνο στο χαρακτήρα, στην εντόπιση και στην αντανάκλαση, αλλά διαφέρει από αυτόν στο ότι συνήθως εμφανίζεται στην ηρεμία, διαρκεί πολύ (πάνω από 15'-30'), δεν βελτιώνεται ούτε υποχωρεί με την ανάπαυση ή τη λήψη νιτρογλυκερίνης και συχνά συνδυάζεται με ωχρότητα, ψυχρό ιδρώτα, ζάλη, ναυτία ή ακόμα και έμετο, οπότε εκλαμβάνεται ως γαστρίτιδα. Ο πόνος πολλές φορές αντανακλά στον αριστερό βραχίονα, αλλά μπορεί επίσης να εντοπίζεται στην κάτω γνάθο, στο λαιμό, στον δεξιό βραχίονα, στην πλάτη και στο επιγάστριο. Ορισμένες φορές ο πόνος απουσιάζει, οπότε το οξύ έμφραγμα μπορεί να εκδηλωθεί ως απότομη αδιαθεσία με δύσπνοια, πνευμονικό οίδημα, shock, κοιλιακή ταχυκαρδία, περιφερικές εμβολές ή να περάσει απαρατήρητο. Μπορεί επίσης να συμβεί κατά τη διάρκεια χειρουργικής αναισθησίας, εγκεφαλικού κώματος ή κατά τον ύπνο (Σαχίνη-Καρδάση Α και συν., 2004; Awtry EH et al., 2003). Οι γυναίκες αρκετές φορές αναφέρουν διαφορετικά συμπτώματα, όπως δύσπνοια, αδυναμία και αίσθημα κόπωσης, τα οποία εκδηλώνονται σε διάρκεια έως και ένα μήνα πριν την εκδήλωση του εμφράγματος (McSweeney JC et al., 2003).

Η διάγνωση του οξέος εμφράγματος γίνεται μέσα από τη σύνθεση των πληροφοριών και ευρημάτων της κλινικής εξέτασης, του ιατρικού ιστορικού, του ηλεκτροκαρδιογραφήματος και του ελέγχου βιοχημικών δεικτών (Antman E et al., 2000).

Ιατρικό ιστορικό: Σημαντικότερες πληροφορίες που πρέπει να συλλεχθούν είναι η ύπαρξη ή όχι ιστορικού στεφανιαίας νόσου ή άλλης καρδιακής νόσου, ή φύση των συμπτωμάτων στηθάγχης, το φύλο, η ηλικία και η παρουσία παραγόντων κινδύνου, όπως σακχαρώδης διαβήτης και υπέρταση (ACC/AHA 2002).

Κλινική εξέταση: Στην κλινική εξέταση, ο ασθενής συνήθως εμφανίζεται με ψυχρό και ωχροό δέρμα και σημεία αγγειοσυστολής, σε αρκετές περιπτώσεις με πυρετό μεταξύ 38–39 °C, με αύξηση ή μείωση της πίεσης του αίματος και με αυξημένο ρυθμό αναπνοής. Πολλές φορές όμως όλα τα παραπάνω απουσιάζουν, και ο ασθενής εμφανίζεται ήρεμος, με κλινική εικόνα που δεν παραπέμπει εύκολα σε παθολογική κατάσταση, αλλά απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση (Awtry EH et al., 2003; Garas S et al., 2006).

Ηλεκτροκαρδιογράφημα (ECG): Στα αρχικά στάδια ενός εμφράγματος του μυοκαρδίου, το ηλεκτροκαρδιογράφημα μπορεί να είναι φυσιολογικό, με λιγότερο από το 50% των ασθενών να εμφανίζουν αλλαγές σε πρώιμη φάση. Αλλαγές στο σύμπλεγμα QRS (σχηματισμός στο ηλεκτροκαρδιογράφημα που αντικατοπτρίζει την εκπόλωση των κοιλιών) ενδέχεται να αντιπροσωπεύουν καρδιακή νέκρωση. Παθολογικά επάρματα Q αντιπροσωπεύουν έμφραγμα που οφείλεται σε πλήρη θρομβωτική απόφραξη της στεφανιαίας αρτηρίας και αρχικά είναι δυνατόν να εκδηλώνονται με συμμετρικά οξυκόρυφα επάρματα T, τα οποία υποχωρούν μετά από μερικά λεπτά, καθώς εμφανίζεται χαρακτηριστική ανύψωση του τμήματος ST. Τα εμφράγματα χωρίς επάρματα Q οφείλονται σε μεγάλου βαθμού αλλά μη αποφρακτικούς θρόμβους και αποτελούν ενδιάμεσο σύνδρομο μεταξύ της ασταθούς στηθάγχης και των εμφραγμάτων με επάρματα Q (Antman E et al., 2000; Morris F and Brady WJ, 2002; ACC/AHA 2002). Το ηλεκτροκαρδιογράφημα έχει όμως και ορισμένους περιορισμούς, καθώς αντιπροσωπεύει μικρή χρονική διάρκεια, γι' αυτό και πρέπει να λαμβάνονται περισσότερα του ενός ECG. Επιπλέον, ένα φυσιολογικό ηλεκτροκαρδιογράφημα δεν αποκλείει την παρουσία μυοκαρδιακής νέκρωσης και δεν πρέπει να αποτελεί κριτήριο για την απόρριψη παρουσίας εμφράγματος (Awtry EH et al., 2003; Somers MP et al., 2002).

Βιοχημικός έλεγχος: Σε βιοχημικό επίπεδο, διαγνωστική αξία έχει ο έλεγχος της τροπονίνης (κλάσματα I και T) και της κινάσης της κρεατίνης (ισοένζυμο MB), ως οι περισσότερο αντιπροσωπευτικοί δείκτες της καρδιακής νέκρωσης. Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν τα ισοένζυμα της γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH), η ασπαραγινική αμινοτρανσφεράση (AST) και η μυοσφαιρίνη, αλλά με μικρότερη διαγνωστική αξία από τον έλεγχο της τροπονίνης και της κινάσης της κρεατίνης (Awtry EH et al., 2003; Antman E et al., 2000; ACC/AHA 2002; Luepker RV et al., 2003).

4. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

4.1 Μη τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου

4.1.1. Ηλικία

Με την πρόοδο της ηλικίας ο επιπολασμός της στεφανιαίας νόσου αυξάνεται. Περίπου 85% των ανθρώπων που πεθαίνουν από στεφανιαία νόσο είναι άνω των 65 ετών (www.aha.org). Η αύξηση του κινδύνου με την πάροδο της ηλικίας αντανακλά την προοδευτική επιδείνωση της στεφανιαίας αθηροσκλήρυνσης και την εμφάνιση στεφανιαίων επεισοδίων. Ο κίνδυνος για αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο διπλασιάζεται κάθε δεκαετία μετά την ηλικία των 55 (Atlas of Heart Disease and Stroke 2004). Από τη μελέτη Framingham προκύπτει ότι σε μεγαλύτερες ηλικίες ο σχετικός κίνδυνος εμφάνισης στεφανιαίας νόσου που οφείλεται σε τροποποιήσιμους παράγοντες μειώνεται, αλλά ο απόλυτος κίνδυνος αυξάνεται σημαντικά, δηλαδή ο κίνδυνος λόγω ηλικίας είναι ανεξάρτητος των συνυπαρχόντων παραγόντων κινδύνου (Gordon T et al., 1977; Τριχόπουλος Δ και συν, 2000; Kannel WB et al., 2004; Dannenberg AL et al, 1989).

4.1.2. Φύλο

Η διαφορά των δύο φύλων στην εμφάνιση στεφανιαίας νόσου είναι γνωστή. Μεταξύ ατόμων μέσης ηλικίας, η στεφανιαία νόσος εμφανίζεται 2 με 5 φορές συχνότερα στους άνδρες απ' ότι στις γυναίκες, με την αναλογία αυτή να διαφέρει μεταξύ των πληθυσμών. Μετά την ηλικία των 60 όμως, φαίνεται ότι η θνησιμότητα της νόσου εξισώνεται στα δύο φύλα (Njolstad I et al., 1996; Rich-Edwards JW et al., 1995; Jousilahti P et al., 1999). Στις γυναίκες η νόσος τείνει να εκδηλώνεται κατά μέσο όρο 10 περίπου χρόνια αργότερα σε σχέση με τους άντρες, διαφορά η οποία εν μέρει οφείλεται στις προστατευτικές επιδράσεις των οιστρογόνων. Αυτό φαίνεται από τη σημαντική αύξηση της στεφανιαίας νόσου μετά την εμμηνόπαυση και από την άμβλυνση αυτής της αύξησης με τη χορήγηση οιστρογόνων κατά τη μετεμμηνοπαυσιακή περίοδο (Awtry EH et al., 2003; Τριχόπουλος Δ και συν, 2000; Castanho VS et al., 2001).

Σύμφωνα με δεδομένα της μελέτης Framingham φάνηκε ότι οι παράγοντες κινδύνου στεφανιαίας νόσου επιτόλαζαν σε μεγαλύτερο βαθμό στους άνδρες, αλλά το γεγονός αυτό δεν μπορούσε πλήρως να εξηγήσει τις παρατηρούμενες διαφορές στη θνησιμότητα μεταξύ των δύο φύλων. Οι ερευνητές των μελετών MONICA και ARIC ανέλυσαν τη συνεισφορά των διαφορών φύλου στους καρδιαγγειακούς παράγοντες κινδύνου καθώς και την καρδιαγγειακή θνητότητα σε 46 χώρες. Η επίδραση του φύλου φάνηκε να διαφέρει στους παρακάτω παράγοντες κινδύνου:

κάπνισμα, παχυσαρκία, υψηλή αρτηριακή πίεση, υψηλή ολική χοληστερόλη και χαμηλή HDL χοληστερόλη. Οι διαφορές αυτές φαίνεται να εξηγούν το 40% των διαφορών που παρατηρούνται στην καρδιαγγειακή θνητότητα μεταξύ των δύο φύλων (WHO MONICA, 1994).

Στην Ελλάδα, η μελέτη CARDIO2000 έδειξε ότι η χρονική υστέρηση στην εμφάνιση στεφανιαίας νόσου είναι 5 με 15 έτη αργότερα στις γυναίκες, επιβεβαιώνοντας την προστατευτική επίδραση του γυναικείου φύλου στην πρόωμη εκδήλωση της ασθένειας. Επίσης επιβεβαίωσε τη διαφορετική επίδραση των παραγόντων κινδύνου ανάλογα με το φύλο. Η παρουσία υπερχοληστερολαιμίας και οικογενειακού ιστορικού φάνηκε να επηρεάζει περισσότερο τον στεφανιαίο κίνδυνο στους άνδρες, ενώ η υπέρταση, η υιοθέτηση Μεσογειακής δίαιτας, το υψηλότερο μορφωτικό επίπεδο και η παρουσία βραχείας διάρκειας καταθλιπτικών συνδρόμων φαίνεται να επηρεάζουν περισσότερο τις γυναίκες (Παναγιωτάκος και συν, 2004; Chrysoshoou C et al., 2003).

4.1.3. Οικογενειακό ιστορικό

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει τη σημασία του οικογενειακού ιστορικού πρόωμης στεφανιαίας νόσου σαν παράγοντα καρδιαγγειακού κινδύνου. Ο κίνδυνος οικογενειακού ιστορικού (εάν ένας πρώτου βαθμού συγγενής άνδρας <55 και γυναίκα <65 πάσχει από καρδιαγγειακά νοσήματα) κυμαίνεται από 1,5 έως 1,7 και αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου (Myers R et al., 1990; Hawe E et al., 2003).

Οι μηχανισμοί με τους οποίους συμβαίνει αυτό δεν έχουν επαληθευτεί, αλλά πιστεύεται ότι συμπεριλαμβάνουν μια αυξημένη επιδεκτικότητα στην αθηροσκλήρυνση, μια αυξημένη τάση για θρόμβωση ή άλλους περιβαλλοντικούς και γενετικούς παράγοντες (Awtry EH et al., 2003; Gaeta G et al., 2000; O'Donnell CJ et al., 2001).

Σύμφωνα με τη μελέτη CARDIO2000 η παρουσία οικογενειακού ιστορικού πρόωμης εκδήλωσης στεφανιαίας νόσου σχετίζεται με τετραπλασιασμό του κινδύνου εκδήλωσης μη θανατηφόρου στεφανιαίου επεισοδίου στους άνδρες. Στις γυναίκες ο ίδιος κίνδυνος βρέθηκε ελαφρά μικρότερος. Η ίδια μελέτη έδειξε, ακόμα, ότι το οικογενειακό ιστορικό των κλασσικών παραγόντων κινδύνου, όπως η υπέρταση και η υπερχοληστερολαιμία, αυξάνει, επίσης, τον κίνδυνο εμφάνισης μη θανατηφόρου στεφανιαίου επεισοδίου σε άτομα ελεύθερα καρδιαγγειακών νοσημάτων (Παναγιωτάκος και συν, 2004).

4.2 Τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου

4.2.1. Υπερλιπιδαιμία

Τα υψηλά επίπεδα λιπιδίων στο αίμα είναι παράγοντας κινδύνου για καρδιαγγειακή νόσο, ενώ οι αυξημένες τιμές χοληστερόλης (κυρίως LDL) σχετίζονται με τη γρήγορη εξέλιξη της νόσου (Houslay et al., 2007). Τα υψηλά επίπεδα λιπιδίων στο αίμα ευθύνονται για το 1/3 του συνόλου των καρδιαγγειακών νοσημάτων παγκοσμίως (Atlas of Heart Disease and Stroke 2004).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η LDL διαδραματίζει κυρίαρχο ρόλο στην ανάπτυξη αθηροσκλήρυνσης. Το μεγαλύτερο ποσοστό χοληστερόλης που εναποτίθεται στο αρτηριακό τοίχωμα προέρχεται από την λιποπρωτεΐνη LDL, της οποίας η οξείδωση ευνοεί και επιταχύνει την εξέλιξη της αρτηριακής αλλοίωσης (Berliner JA et al., 1995). Η ικανότητα των αυξημένων επιπέδων LDL χοληστερόλης να προκαλεί στεφανιαία νόσο φαίνεται ξεκάθαρα σε άτομα με οικογενείς μορφές υπερχοληστερολαιμίας. Στα άτομα αυτά εμφανίζεται στεφανιαία αθηροσκλήρωση προχωρημένου σταδίου και πρόωρη στεφανιαία νόσος ακόμα και υπό την πλήρη απουσία άλλων παραγόντων κινδύνου (Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults, 2002).

Η υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (HDL) δεν προκαλεί αθηροσκλήρυνση, αντιθέτως έχει αντιαθηρογενείς ιδιότητες. Η προστατευτική της δράση ξεκινά από το βασικό της μηχανισμό, δηλαδή από τη μεταφορά των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας στο ήπαρ. Η ισορροπία μεταξύ LDL και HDL είναι καίριας σημασίας για το ρυθμό σχηματισμού της λιπώδους αλλοίωσης στο αρτηριακό τοίχωμα. Φαίνεται επίσης ότι η HDL μειώνει τον αριθμό μορίων προσκόλλησης, τα οποία αποτελούν σημείο εισόδου των μονοπύρηνων στο αρτηριακό τοίχωμα. Η προστατευτική δράση της όμως δεν σταματάει εδώ, καθώς οι αντιφλεγμονώδεις, αντιθρομβωτικές και αντιοξειδωτικές της ιδιότητες αποτελούν επιπλέον μηχανισμούς προστασίας του αρτηριακού ενδοθηλίου (Choi BG et al., 2006; Navab M et al., 2001; Navab M et al., 2000; Libby P et al., 2001)

Ένας ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου στεφανιαίας νόσου, ιδιαίτερα στις γυναίκες, μπορεί επίσης να είναι τα υψηλά τριγλυκερίδια. Μελέτες των τελευταίων χρόνων τονίζουν την σημασία των τριγλυκεριδίων και της HDL στην πρόγνωση της στεφανιαίας νόσου και υποστηρίζουν ότι αποτελούν εξίσου σημαντικούς παράγοντες κινδύνου με την LDL και την ολική χοληστερόλη (Awtry EH et al., 2003; Assmann G & Schulte H, 1992).

Η θετική συσχέτιση μεταξύ καρδιαγγειακού κινδύνου και υπερλιπιδαιμίας φαίνεται από το γεγονός ότι αύξηση κατά 10% της ολικής χοληστερόλης στον ορό του αίματος προκαλεί κατά 27% αύξηση στην επίπτωση της στεφανιαίας νόσου (Law et al. 1994). Αντιθέτως, 10% μείωση

της ολικής χοληστερόλης συνδέεται με 25% μείωση του κινδύνου εμφάνισης στεφανιαίας νόσου μετά από 5 έτη, ενώ η μείωση της LDL κατά 40mg/dl, συνοδεύεται από μείωση του κινδύνου εμφάνισης στεφανιαίας νόσου κατά 23%, αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου κατά 19% και συνολικά καρδιαγγειακής νόσου κατά 21% (Baigent et al. 2005).

Σύμφωνα με στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, το 11,6% των θανάτων στην Ελλάδα οφείλονται σε υψηλά επίπεδα χοληστερόλης (www.who.int). Ανάλυση δεδομένων της μελέτης CARDIO2000 έδειξε ότι η παρουσία υπερχοληστερολαιμίας σχετίζεται με τετραπλασιασμό του στεφανιαίου κινδύνου στους άνδρες, και με πενταπλασιασμό του κινδύνου στις γυναίκες της μελέτης (Παναγιωτάκος και συν., 2004), ενώ η μελέτη «ATTICA» (Pitsavos et al., 2003) υποστηρίζει ότι το 46% των ανδρών και 40% των γυναικών να έχουν τιμές ολικής χοληστερόλης άνω του 200mg/dl.

4.2.2. Σακχαρώδης Διαβήτης/ Δυσανεξία στη γλυκόζη

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι ένας από τους παράγοντες κινδύνου για στεφανιαία νόσο και αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, καθώς και το συχνότερο αίτιο ακρωτηριασμών μη τραυματικής αιτιολογίας. Σε παγκόσμιο επίπεδο, πάνω από 170 εκατομμύρια ανθρώπων πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη (Atlas of Heart Disease and Stroke 2004), ενώ περίπου το 75% των ατόμων με σακχαρώδη διαβήτη πεθαίνουν από κάποια μορφή καρδιακής νόσου (American Heart Association).

Ο σακχαρώδης διαβήτης και η αντίσταση στη δράση της ινσουλίνης σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης στεφανιαίας νόσου, ακόμα και σε άτομα με τιμές γλυκόζης και γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης μέσα στα αποδεκτά όρια. Η αύξηση του κινδύνου φαίνεται εντονότερα στις γυναίκες, καθώς η διαφορά στην επίπτωση μεταξύ των δύο φύλων παύει να υφίσταται (Lloyd CE et al., 1996; Adler AI, 2003).

Η θνησιμότητα λόγω οξέος στεφανιαίου συνδρόμου είναι μεγαλύτερη σε διαβητικά άτομα και η επιβίωση τους μετά από ένα μη θανατηφόρο επεισόδιο εμφανίζεται μικρότερη σε σύγκριση με μη διαβητικά. Εκτός από τους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στην αυξημένη θνησιμότητα, οι κλασσικοί παράγοντες κινδύνου, όπως η υπέρταση και η υπερλιπιδαιμία, επιπολάζουν σε υψηλότερα ποσοστά σε διαβητικά άτομα. (Kannel WB & McGee DL, 1979; Stamler J et al., 1993; Van der Horst IC et al., 2007; Agewall S et al., 1995).

Χωρίς έκδηλο διαβήτη, η αντίσταση στην ινσουλίνη και η υπερινσουλιναιμία προάγουν την αθηροσκληρωτική εξεργασία μέσα από μια ποικιλία μηχανισμών. Η κυριότερη πορεία που εμπλέκεται στην επιτάχυνση της αθηροσκλήρυνσης είναι πιθανότερα η αύξηση της μη

ενζυματικής γλυκοζυλίωσης των πρωτεϊνών και των λιπιδίων και η παραγωγή τελικών προϊόντων υψηλής γλυκοζυλίωσης. Η υπεργλυκαιμία προάγει την παραγωγή προθρομβωτικών πρωτεϊνών, αυξάνει το ρυθμό απόπτωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων, μειώνει το ρυθμό πολλαπλασιασμού τους, και αναστέλλει την ινωδόλυση, με αποτέλεσμα τη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου (Bansilal S et al., 2007; Getz GS, 1992).

Η επίπτωση του σακχαρώδους διαβήτη στην ευρωπαϊκή ήπειρο υπολογίζεται στο 7,8% και φαίνεται ότι αυξάνει σχεδόν σε όλες τις χώρες της Ευρώπης. Συγκεκριμένα το 2003, 48 εκατομμύρια άτομα ηλικίας 20-79 ετών έπασχαν από σακχαρώδη διαβήτη.

Ο επιπολασμός του σακχαρώδους διαβήτη υπολογίζεται στην Ελλάδα σε 6,1%, ενώ μέχρι το 2025 εκτιμάται ότι θα φτάσει το 7,3% (International Diabetes Foundation, Diabetes Atlas 2nd edition 2003). Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στη χώρα μας σχετικά με το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, αναφέρεται ότι το 31% των ατόμων που έχουν προσβληθεί από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου έπασχαν ήδη από σακχαρώδη διαβήτη (Andrikopoulos et al. 2007). Στην Ελλάδα, δεδομένα της μελέτης CARDIO2000 έδειξαν ότι η παρουσία σακχαρώδους διαβήτη σχετίζεται με τριπλασιασμό του στεφανιαίου κίνδυνου στους άνδρες και τετραπλασιασμό στις γυναίκες (Παναγιωτάκος και συν, 2004).

4.2.3. Υπέρταση

Η υπέρταση καθορίζεται ως συστολική πίεση (SBP) του αίματος υψηλότερη από 140 mm Hg ή ως διαστολική υψηλότερη (DPB) από 90 mm Hg και είναι μια από τις σημαντικότερες αποτρέψιμες αιτίες του πρόωρου θανάτου παγκοσμίως. Ακόμα και όταν η αρτηριακή πίεση παίρνει τις ανώτατες τιμές του φυσιολογικού, ο κίνδυνος αυξάνεται.

Στις περισσότερες χώρες, περίπου 30% των ενηλίκων πάσχουν από υπέρταση και ένα ποσοστό 50%-60% θα ήταν σε καλύτερη υγείας εάν μείωνε την αρτηριακή πίεση μόνο με άσκηση, υγιεινή διατροφή και ικανοποιητικό έλεγχο του σωματικού βάρους (WHO 2005; Lopez et al. 2006). Σε άτομα ηλικίας έως 50 ετών, η SBP και η DBP συνδέονται με τον καρδιαγγειακό κίνδυνο, ενώ πάνω από αυτήν την ηλικία, η SBP αποτελεί ακόμα σημαντικότερο παράγοντα. Ο καρδιαγγειακός κίνδυνος διπλασιάζεται για κάθε 10 mm Hg που αυξάνεται η DBP ή για κάθε 20 mm Hg που αυξάνεται η συστολική SBP (Atlas of Heart Disease and Stroke 2004).

Η υπέρταση ευθύνεται για αλλαγές του αρτηριακού τοιχώματος, παρόμοιες με αυτές που εμφανίζονται παρουσία υπερχοληστερολαιμίας. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρούνται αλλαγές στο ενδοθήλιο, προσκόλληση και είσοδος λευκοκυττάρων, συσσώρευση μακροφάγων, αυξημένη διαπερατότητα σε λιπίδια, μετανάστευση και πολλαπλασιασμός λείων μυϊκών κυττάρων.

Απουσία υπερχοληστερολαιμίας η υπέρταση συνήθως οδηγεί σε στένωση του αρτηριακού τοιχώματος. Ωστόσο, παρουσία υπερχοληστερολαιμίας η υπέρταση αποτελεί ακόμα σημαντικότερο προαγωγέα της αθηροσκληρωτικής εξεργασίας (Chobanian AV, 1992).

Μελέτες έχουν δείξει ότι η παρουσία υπέρτασης σχετίζεται με μειωμένη αγγειοδιαστολή και ενδέχεται να δρα ως ερέθισμα για την υπερτροφία των λείων μυϊκών κυττάρων του αρτηριακού τοιχώματος. Ευρήματα άλλων μελετών δείχνουν επίσης ότι παρουσία υπέρτασης παρατηρείται αυξημένη σύνθεση κολλαγόνου και μεγαλύτερη εναπόθεση ασβεστίου στις στεφανιαίες αρτηρίες. Επιπλέον, η αύξηση στο αίμα ορμονών, όπως η αλδοστερόνη και η αγγειοτενσίνη II, ευνοεί την ανάπτυξη των ινοβλαστών στο αρτηριακό τοίχωμα (Schwartzkopff B et al., 1993; Megnien JL et al., 1996).

Σύμφωνα με στοιχεία του ΠΟΥ, το 25% των θανάτων στην Ελλάδα οφείλονται στην υπέρταση (www.who.int). Η μελέτη ΑΤΤΙΚΗ έδειξε ότι ο επιπολασμός υπέρτασης σε αστικές και αγροτικές περιοχές της περιφέρειας Αττικής ήταν 37% στους άνδρες και 25% στις γυναίκες. Έτσι, υπολογίζεται ότι περίπου 2,8 εκατομμύρια Έλληνες ενήλικες έχουν αυξημένα επίπεδα αρτηριακής πίεσης (Pitsavos C et al., 2003).

Η μελέτη CARDIO2000 έδειξε ότι οι αυξημένες τιμές αρτηριακής πίεσης φαίνεται να σχετίζονται με διπλασιασμό του στεφανιαίου κινδύνου στους άνδρες και με τετραπλασιασμό στις γυναίκες (Παναγιωτάκος και συν, 2004). Η αντιμετώπισή της συνδέεται με μείωση κατά 35-40% του κινδύνου για αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο και κατά 16% μείωση του κινδύνου εμφράγματος του μυοκαρδίου (Collins R, 1990). Υπάρχει πληθώρα μελετών, οι οποίες επιβεβαιώνουν ότι η μείωση της συστολικής αρτηριακής πίεσης <160 mm Hg και της διαστολικής <90 mm Hg, έχει ως αποτέλεσμα την ελάττωση του κινδύνου εμφράγματος του μυοκαρδίου κατά 15% και του αγγειακού εγκεφαλικού κατά 40% (HOPE 2000).

4.2.4. Παχυσαρκία

Η σχέση μεταξύ παχυσαρκίας και αθηροσκλήρυνσης έχει αποτελέσει αντικείμενο έρευνας για πολλά χρόνια. Ευρήματα ερευνών, όπως η μελέτη των Επτά Χωρών, βρήκαν μικρή συσχέτιση μεταξύ παχυσαρκίας και στεφανιαίας αθηροσκλήρυνσης (Keys A et al., 1984). Η μελέτη Framingham αντίθετα, έδειξε ότι η παχυσαρκία σχετίζεται με μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης στεφανιαίας νόσου, φαίνεται όμως ότι η συσχέτιση αυτή οφείλεται στη συνύπαρξη των κλασικών παραγόντων κινδύνου (Hubert HB et al., 1983). Άλλες προοπτικές μελέτες όμως, έδειξαν ότι η παχυσαρκία, και ιδιαίτερα η κεντρικού τύπου, αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου στεφανιαίας νόσου, και η πρόσληψη βάρους αυξάνει το στεφανιαίο κίνδυνο

ανεξάρτητα με την συνύπαρξη άλλων παραγόντων κινδύνου (Eckel RH et al., 1998; Cassidy AE et al., 2005).

Η παχυσαρκία, καθώς το αυξημένο σωματικό βάρος μπορεί να προκαλέσει αύξηση του έργου της καρδιάς, της πίεσης του αίματος, του επιπέδου των τριγλυκεριδίων και χοληστερόλης (ολικής και LDL) και μείωση των επιπέδων HDL χοληστερόλης, καθώς επίσης αποτελεί παράγοντα κινδύνου για εμφάνιση ινσουλινοαντοχής και σακχαρώδους διαβήτη (Grundy SM, 2002; Wolk R et al., 2003). Αξιοσημείωτο είναι ότι η παχυσαρκία δρα συνεργικά και με τους υπόλοιπους παράγοντες καρδιαγγειακών νοσημάτων. Συγκεκριμένα οι παχύσαρκοι καπνιστές ζουν κατά μέσο όρο 14 έτη λιγότερα σε σχέση με τους καπνιστές που έχουν φυσιολογικό βάρος (Atlas of Heart Disease and Stroke 2004).

Περισσότεροι από 60% των ενηλίκων Αμερικανών είναι υπέρβαροι ή παχύσαρκοι (WHO 2002). Στην Ελλάδα, ο επιπολασμός της παχυσαρκίας στο γενικό πληθυσμό βρίσκεται πλέον στα υψηλότερα επίπεδα μεταξύ των χωρών της Δυτικής Ευρώπης. Στους άνδρες άνω των 15 ετών φθάνει το 26%, που αποτελεί την υψηλότερη τιμή, ενώ στις γυναίκες το 18,2%, που είναι η δεύτερη υψηλότερη μεταξύ των γυναικών (WHO 2008).

4.2.5. Κάπνισμα

Το κάπνισμα είναι ο σημαντικότερος τροποποιήσιμος παράγοντας κινδύνου για την καρδιαγγειακή νόσο. Ευθύνεται για το 1/5 των καρδιαγγειακών παθήσεων παγκοσμίως και για το 30-40% του συνόλου των θανάτων από καρδιαγγειακή νόσο (WHO 2008b). Ο κίνδυνος προσβολής από στεφανιαία νόσο στους καπνιστές είναι περίπου 2-3 φορές υψηλότερος από ότι στους μη καπνιστές. Ο σχετικός κίνδυνος είναι υψηλότερος στις ηλικίες κάτω των 55 ετών (US Department of Health and Human Services 2004).

Το κάπνισμα φαίνεται ότι σχετίζεται με ελαττωματική ανταπόκριση της στεφανιαίας αιματικής ροής κατά τη διάρκεια αυξημένων μυοκαρδιακών αναγκών και επομένως ενδέχεται να συμβάλλει στην μυοκαρδιακή ισχαιμία σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο (Jonas MA et al., 1992; Zeiher MA et al., 1995). Οι μηχανισμοί που φαίνεται να αιτιολογούν τον αυξημένο κίνδυνο στεφανιαίας νόσου σε καπνιστές συμπεριλαμβάνουν την αυξημένη αθηροσκληρωτική εξεργασία, την προαγωγή της συσσώρευσης αιμοπεταλίων και δημιουργίας θρόμβωσης και την μειωμένη ινωδολυτική δραστηριότητα στο αίμα (Hung J et al., 1995). Ακόμη, το κάπνισμα αυξάνει την LDL χοληστερόλη και μειώνει την HDL χοληστερόλη, ενώ η νικοτίνη επιταχύνει τον καρδιακό ρυθμό και αυξάνει την αρτηριακή πίεση (Atlas of Heart Disease and Stroke 2004). Τέλος, πρέπει να σημειωθεί, ότι η επίδραση του καπνίσματος στη δημιουργία αθηρωματικών

πλακών είναι μεγαλύτερη αν συνυπάρχει υπέρταση και σακχαρώδης διαβήτης (Howard et al. 1998).

Στην Ελλάδα, η μελέτη «ATTICA» (Pitsavos et al. 2003) εκτίμησε τον επιπολασμό του καπνίσματος σε 49% για τους άνδρες και 32% για τις γυναίκες. Παρόμοια ποσοστά προέκυψαν και από το πανευρωπαϊκό δίκτυο καταπολέμησης του καπνίσματος.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της διεθνούς μελέτης «INTERHEART» (Teo et al. 2006), υπολογίστηκε ότι το 29% των εμφραγμάτων στη Δυτική Ευρώπη και το 30% στην Κεντρική και Ανατολική Ευρώπη οφείλονται στο κάπνισμα. Στην Ευρώπη περίπου το 20% των θανάτων από καρδιαγγειακή νόσο στους άνδρες και το 3% στις γυναίκες οφείλεται στο κάπνισμα (European Cardiovascular Disease Statistics 2008).

Η χρήση καπνού αποτελεί αίτιο καρδιακής προσβολής σε οποιαδήποτε ηλικιακή ομάδα και όχι μόνο σε ηλικιωμένους. Σύμφωνα με τη διαχρονική μελέτη του P.O.Y., MONICA, περισσότερα από το 50% από τα μη θανατηφόρα καρδιολογικά επεισόδια σε νέους ανθρώπους ηλικίας 35-39 ετών, αποδίδονται στο κάπνισμα (Mähönen et al., 2004). Στις ηλικίες κάτω των 65 ετών, ευθύνεται για το 45% των θανάτων στους άνδρες και το 41% στις γυναίκες (US DHHS 1989). Στα άτομα άνω των 65 ετών, ευθύνεται για το 15-20% των θανάτων από τη νόσο.

Οι αρνητικές επιδράσεις του καπνίσματος φαίνονται ακόμη περισσότερο, στην περίπτωση διακοπής του σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο, στους οποίους ο κίνδυνος επεισοδίου μετά από διακοπή μειώνεται εντός 2-3 ετών σε επίπεδο ίδιο με αυτό των ατόμων με στεφανιαία νόσο και που δεν κάπνισαν ποτέ (Manson et al. 1992).

Το παθητικό κάπνισμα συμπεριλαμβάνεται στους παράγοντες κινδύνου καρδιαγγειακής νόσου. Στις ΗΠΑ, περίπου 62.000 άνθρωποι πεθαίνουν κάθε χρόνο από νοσήματα της καρδιάς εξαιτίας του παθητικού καπνίσματος (Atlas of Heart Disease and Stroke 2004). Στους παθητικούς καπνιστές ο κίνδυνος εκδήλωσης καρδιοπάθειας είναι 25-30% μεγαλύτερος σε σχέση με τους μη καπνιστές (US DHHS 2004). Υπολογίστηκε ότι το 2002 έχασαν τη ζωή τους εξαιτίας του παθητικού καπνίσματος 80.000 άνθρωποι, εκ των οποίων οι 32.000 εξαιτίας καρδιαγγειακής νόσου (European Cardiovascular Disease Statistics 2008).

4.3 Άλλοι τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου

➤ Υγιεινή Διατροφή

Πολλά στοιχεία και συστατικά της διατροφής σχετίζονται είτε θετικά είτε αρνητικά με τα καρδιαγγειακά νοσήματα. Η χαμηλή πρόσληψη φρούτων και λαχανικών έχει εκτιμηθεί ότι

προκαλεί το 31% της στεφανιαίας νόσου και το 11% των αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων. Αντίθετα, υψηλή πρόσληψη κορεσμένου λίπους αυξάνει τον κίνδυνο για αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο και για νοσήματα της καρδιάς μέσω της επίδρασης του στα λιπίδια του αίματος και στη θρόμβωση (Atlas of Heart Disease and Stroke 2004).

Σύμφωνα με τα πορίσματα των μελετών CARDIO2000 (Pitsavos C et al. 2002) και «ATTICA» (Pitsavos C et al. 2003), η μεσογειακή διαίτα δρα ευεργετικά ακόμη και στους βαρείς καπνιστές, στους διαβητικούς και στους υπέρτασικούς, ενώ η συστηματική κατανάλωση φρούτων και λαχανικών έχει αποδειχθεί ότι ευνοεί, τη συνολική υγεία του ανθρώπου.

➤ Έλλειψη Φυσικής Δραστηριότητας

Η βιομηχανοποίηση, η αστικοποίηση και η ευρεία χρήση των μηχανοκίνητων μέσων μεταφοράς έχουν οδηγήσει σε ελάττωση της φυσικής δραστηριότητας σε τέτοιο βαθμό ώστε πλέον το 60% του πληθυσμού παγκοσμίως να μην ασκείται επαρκώς. Σε παγκόσμια κλίμακα η έλλειψη φυσικής δραστηριότητας ευθύνεται για 1,9 εκατομμύρια θανάτους εκ των οποίων το 20% αποδίδονται σε καρδιαγγειακά νοσήματα. (Atlas of Heart Disease and Stroke 2004). Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι αυξημένα επίπεδα φυσικής δραστηριότητας σχετίζονται με χαμηλότερα επίπεδα νοσηρότητας και θνησιμότητας λόγω στεφανιαίας νόσου (Leon AS et al., 1987; Blair N et al., 1995; Lakka TA et al., 1994).

Τα οφέλη της άσκησης μπορεί να οφείλονται σε πολλούς μηχανισμούς που συμπεριλαμβάνουν αλλαγές στο λιπιδαιμικό προφίλ, στον μεταβολισμό των υδατανθράκων, στα επίπεδα ινωδογόνου και στην πίεση του αίματος (Wood PD et al., 1991; Helmrigh SP et al., 1991; Schuler G et al., 1992). Επιπλέον, η άσκηση, ακόμα και μικρής έντασης, αποτελεί σημαντικό κομμάτι της διατήρησης υγιούς σωματικού βάρους και της πρόληψης εμφάνισης παχυσαρκίας και διαβήτη (Awtry EH et al., 2003).

Είναι χαρακτηριστικό ότι με το να αφιερώνει κάποιος 150 λεπτά ήπιας φυσικής άσκησης ή 60 λεπτά έντονης φυσικής άσκησης εβδομαδιαίως, ο κίνδυνος εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου μειώνεται κατά 30% (WHO 2004).

➤ Αλκοόλ

Η αυξημένη κατανάλωση **αλκοόλ** συμβάλλει στα ψηλά επίπεδα τριγλυκεριδίων, στην εμφάνιση αρρυθμιών και στην εμφάνιση παχυσαρκίας (Awtry EH et al., 2003). Αντίθετα, η κατανάλωση σε μέτρια επίπεδα φαίνεται να σχετίζεται με μικρότερο στεφανιαίο κίνδυνο (Femia

R et al., 2006). Ο ρόλος της κατανάλωσης αλκοόλ στην εμφάνιση στεφανιαίας νόσου θα συζητηθεί εκτενέστερα στο επόμενο κεφάλαιο, καθώς επίσης και ο ρόλος της **διατροφής**.

➤ **Άγχος**

Σε μελέτες μεγάλων πληθυσμιακών ομάδων φαίνεται ότι η παρουσία επιθετικού και φιλόδοξου χαρακτήρα, άγχους και κατάθλιψης, σχετίζεται με αύξηση της στεφανιαίας νόσου έως και 350%, και συχνά αυξάνουν τη νοσηρότητα και θνησιμότητα, που σχετίζεται με αυτή (Rozanski A et al., 1999; Hallman T et al., 2001; Panagiotakos et al., 2003).

➤ **Ομοκυστεΐνη**

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι τα **υψηλά επίπεδα ομοκυστεΐνης** συνδέονται με μεγαλύτερο κίνδυνο αθηροσκλήρυνσης και εμφάνισης στεφανιαίας νόσου (Genest JJ et al., 1990; Sadeghian S et al., 2006; Virdis A et al., 2002). Σε άλλες μελέτες, η ομοκυστεΐνη έχει αποδειχθεί ανεξάρτητος παράγοντας καρδιαγγειακού κινδύνου (Danesh J et al., 1998; Poddar R et al., 2001).

Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι η ομοκυστεΐνη μειώνει την εξαρτώμενη από το ενδοθήλιο αγγειοδιαστολή, πιθανά μέσω μειώνοντας τη βιοδιαθεσιμότητα του οξειδίου του αζώτου είτε μειώνοντας τη σύνθεσή του, είτε αυξάνοντας την αποικοδόμησή του μέσω της παραγωγής ελευθέρων ριζών (Tawakol A et al., 1997).

Σε πολλές περιπτώσεις τα υψηλά επίπεδα ομοκυστεΐνης μπορούν να αντιμετωπισθούν αποτελεσματικά με συμπλήρωση του φυλλικού οξέος της διατροφής, μολονότι δεν έχει ακόμη καθορισθεί η επίδραση της αντιμετώπισης της υψηλής ομοκυστεΐνης στη συχνότητα των καρδιαγγειακών επεισοδίων (Awtry EH et al., 2003).

➤ **Λιποπρωτεΐνη (a) Lp(a)**

Η **λιποπρωτεΐνη(a) Lp(a)** είναι μια λιποπρωτεΐνη με άγνωστη λειτουργία, η οποία αποτελείται από την απολιποπρωτεΐνη B-100 στην οποία συνδέεται ομοιοπολικά ένα μόριο απολιποπρωτεΐνης a. Αυξημένα επίπεδα λιποπρωτεΐνης(a) Lp(a) σχετίζονται με την παρουσία στεφανιαίας νόσου, ιδιαίτερα σε ασθενείς με υπερχοληστερολαιμία (Danesh J et al., 2000). Φαίνεται ότι προφλεγμονώδη οξειδωμένα φωσφολιποειδή σχετίζονται ισχυρά με τα επίπεδα Lp(a) στο πλάσμα (Tsimikas S et al., 2003; Tsimikas S et al., 2004; Edelstein C et al., 2003). Επιπλέον, η Lp(a) είναι δομικά ομόλογη με το πλασμινογόνο και φαίνεται ότι παρεμβαίνει στην

παραγωγή της πλασμίνης προδιαθέτοντας έτσι σε θρομβωτικές επιπλοκές της αθηροσκλήρυνσης (Awtry EH et al., 2003). Έχει βραθεί ότι σε υπερχοληστερολαιμικούς ασθενείς με αυξημένα επίπεδα Lp(a), η επιθετική μείωση της LDL χοληστερόλης μπορεί να εξουδετερώσει την αθηρογόνο δράση της Lp(a) (Stein JH & Rosenson RS, 1997).

➤ **Ινωδογόνο**

Αρκετές προοπτικές μελέτες έχουν δείξει συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων **ινωδογόνου** πλάσματος και στεφανιαίας νόσου, αλλά δεν έχει αποδειχτεί σχέση αιτίου αποτελέσματος, καθώς το ινωδογόνο εμφανίζεται αυξημένο παρουσία άλλων παραγόντων κινδύνου. Το ινωδογόνο αποτελεί πρωτεΐνη οξείας φάσης, η οποία παράγεται στο ήπαρ, και είναι λογικό να αυξάνεται σε φλεγμονώδεις καταστάσεις, όμως, στατιστικές αναλύσεις μελετών δείχνουν ότι εκτός από το ότι αποτελεί δείκτη φλεγμονώδους κατάστασης, συμμετέχει άμεσα και στο σχηματισμό θρόμβων (Eriksson M et al., 1999; Stefanick M et al., 1995; Koenig W et al., 1999). Άλλες έρευνες έδειξαν ότι τα ανώτερα επίπεδα ινωδογόνου οδηγούσαν σε σχετικό κίνδυνο της τάξης του 1,8 για καρδιαγγειακά συμβάματα (Danesh et al., 1998).

➤ **C αντιδρώσα πρωτεΐνη**

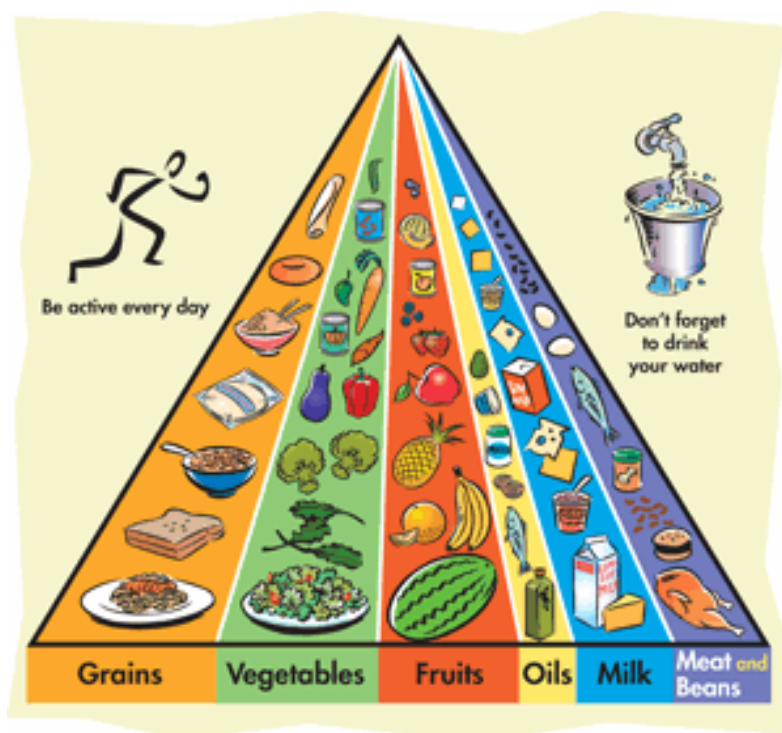
Από έρευνες προκύπτει συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων **C αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP)** και της στεφανιαίας νόσου, αλλά η αιτιώδης σχέση δεν έχει επαρκώς εξακριβωθεί (Gotto AM et al., 2007). Άλλες έρευνες δείχνουν ότι σχετική αύξηση της CRP σε άτομα χωρίς γνωστή στεφανιαία νόσο συνδέεται με 3-4 φορές αυξημένο κίνδυνο εμφράγματος του μυοκαρδίου σε υγιείς άνδρες και γυναίκες (Ridker PM et al., 1997).

5. ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΝΟΣΟΣ

5.1. Εισαγωγή

Οι επιδράσεις της διατροφής στην εμφάνιση στεφανιαίας νόσου έχουν αποτελέσει αντικείμενο ενδιαφέροντος για περισσότερο από 40 χρόνια, και τα ευρήματα στον τομέα αυτό ολοένα και πληθαίνουν. Τα αποτελέσματα της μελέτης των Επτά Χωρών υπήρξαν η αφορμή για μεγάλο αριθμό επόμενων μελετών που εξέτασαν τη σχέση της συνολικής ποσότητας λίπους, βαθμού κορεσμού των λιπαρών οξέων, χοληστερόλης και άλλων διατροφικών παραγόντων με τα επίπεδα λιπιδίων και λιποπρωτεϊνών του ορού (Ζαμπέλας Α, 2007; Stampfer MJ et al., 2000; Halton TL et al., 2006; Hu FB et al., 1997; Trichopoulou A et al., 2003).

Οι περισσότερες μελέτες έως τώρα έχουν εστιάσει στην επίδραση που έχουν τα λιπαρά οξέα της διατροφής στα επίπεδα χοληστερόλης, και ιδιαίτερα στα επίπεδα της LDL. Φαίνεται όμως ότι και άλλα θρεπτικά συστατικά μπορούν να επηρεάσουν το λιπιδαιμικό προφίλ ή και να μειώσουν τον κίνδυνο στεφανιαίας νόσου, μέσα από μηχανισμούς που δεν εμπλέκουν καν τις λιποπρωτεΐνες (Fraser GE, 1994).



Εικόνα 5.1: Η πυραμίδα της μεσογειακής διατροφής

5.2. Μεσογειακή Διατροφή

Ο όρος ‘Μεσογειακή διατροφή’ φαίνεται να έχει διαφορετική έννοια από χώρα σε χώρα, αλλά αναφέρεται κυρίως στην παραδοσιακή διατροφή της Κρήτης, που κατά τη διάρκεια της

μελέτης των Επτά Χωρών συσχετίστηκε με μικρότερη θνησιμότητα από στεφανιαία νόσο αλλά και από όλες τις αιτίες (Kok FJ & Kromhout D, 2004; Menotti A et al., 2000). Τα ευρήματα της μελέτης έδειξαν ότι η χαμηλότερη επίπτωση στεφανιαίας νόσου δεν σχετιζόταν με το επίπεδο λιπιδίων, καθώς οι μέσες τιμές χοληστερόλης δεν διέφεραν σημαντικά από τους άλλους μεσογειακούς πληθυσμούς (Παναγιωτάκος Δ και συν, 2004).

Η παραδοσιακή Μεσογειακή διατροφή χαρακτηρίζεται από αυξημένη πρόσληψη λαχανικών, οσπρίων, φρούτων, ξηρών καρπών και δημητριακών (στο παρελθόν ήταν κυρίως μη επεξεργασμένα) και από μία αυξημένη πρόσληψη ελαιολάδου. Χαμηλή είναι η πρόσληψη κρέατος, μέτρια η κατανάλωση ψαριών και πουλερικών και χαμηλή έως μέτρια η πρόσληψη γαλακτοκομικών προϊόντων. Τακτική αλλά μέτρια είναι και η κατανάλωση αιθανόλης, κυρίως με τη μορφή κρασιού και συνήθως κατά τη διάρκεια των γευμάτων (Ζαμπέλας Α, 2007; Kok FJ & Kromhout D, 2004; De Lorgeril M, 1998).

Νέα δεδομένα ενθαρρύνουν την άποψη ότι η Μεσογειακή Διατροφή σχετίζεται με μειωμένο στεφανιαίο κίνδυνο, καθώς δίαιτες πλούσιες σε φρούτα, λαχανικά, μη επεξεργασμένα δημητριακά και ψάρια φαίνεται ότι σχετίζονται με μικρότερη επίπτωση χρόνιων ασθενειών (Appel L et al., 1997; Price JF & Fowkes FG, 1997). Επιπλέον, μελέτες και στον ελληνικό πληθυσμό, όπως η CARDIO2000, επιβεβαιώνουν τα ευρήματα παλαιότερων ερευνών, εξακριβώνοντας και στο σύγχρονο κόσμο την προστατευτική δράση της Μεσογειακής διαίτας (Παναγιωτάκος Δ και συν, 2004).

Η πλειοψηφία των μελετών που αφορούν τη σχέση διατροφής και στεφανιαίας νόσου, έχουν εστιάσει κυρίως στην αποτίμηση της επίδρασης συγκεκριμένων θρεπτικών συστατικών, παρά διαιτητικών συνηθειών, αλλά τα τελευταία χρόνια η έρευνα έχει στραφεί και προς αυτόν τον τομέα (Panagiotakos D et al., 2006; Hu FB, 2002; Quatromoni PA et al., 2002).

5.2.1 Μεσογειακή διατροφή και υπέρταση

Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη ενότητα, η υψηλή αρτηριακή πίεση αποτελεί έναν από τους κύριους παράγοντες κινδύνου εμφάνισης στεφανιαίας νόσου. Ο ρόλος της διατροφής στην πρόληψη της υπέρτασης είναι ήδη τεκμηριωμένος (Hermansen K, 2002; Reddy KS &

Katan MB, 2004), και όσον αφορά μια Μεσογειακού τύπου διατροφή, νέα δεδομένα συνηγορούν ότι συμβάλλει στη μείωση της αρτηριακής πίεσης (Psaltopoulou T et al., 2004). Εντυπωσιακό είναι ότι η Μεσογειακή διατροφή, σύμφωνα με αποτελέσματα της μελέτης CARDIO2000, οδηγεί σε μείωση του κινδύνου εμφάνισης οξέος στεφανιαίου επεισοδίου ακόμα και σε υπερτασικά άτομα με μη ρυθμισμένη αρτηριακή πίεση (Παναγιωτάκος Δ και συν, 2004).

Από τα συστατικά της Μεσογειακής διατροφής, τα λαχανικά, τα φρούτα και το ελαιόλαδο φαίνεται να ασκούν την κύρια προστατευτική δράση έναντι της υπέρτασης (Psaltopoulou T et al., 2004) όμως μελέτες δείχνουν ότι το ευεργετικό αποτέλεσμα οφείλεται στο σύνολό της, και όχι σε συγκεκριμένα συστατικά (Panagiotakos D et al., 2006). Ένα κύριο χαρακτηριστικό της μεσογειακής διατροφής είναι η αυξημένη περιεκτικότητα σε μονοακόρεστα λιπαρά, κυρίως από το ελαιόλαδο. Αρκετές επιδημιολογικές μελέτες έχουν εξετάσει τη σχέση μεταξύ των λιπιδίων της διατροφής και της επίπτωσης της υπέρτασης, εκ των οποίων οι περισσότερες πραγματοποιήθηκαν στις ΗΠΑ (Nurses' Health Study, Health Professionals' Follow-up Study, Multiple Risk Factor Intervention Trial), όπου η πρόσληψη μονοακόρεστων λιπαρών προέρχεται κυρίως από το κρέας, και επομένως σχετίζεται επίσης με υψηλή πρόσληψη κορεσμένων λιπαρών. Ίσως αυτή είναι και η αιτία που οι μελέτες αυτές είτε δεν εμφάνισαν συσχέτιση μεταξύ μονοακόρεστων λιπαρών και υπέρτασης, είτε βρήκαν θετικές συσχετίσεις (Wittelman JCM et al., 1989; Stamler J et al., 1996; Ascherio A et al., 1992). Από την άλλη μεριά, οι λίγες επιδημιολογικές μελέτες στην περιοχή της Μεσογείου παρουσιάζουν τελείως διαφορετικά αποτελέσματα. Οι ερευνητές της μελέτης Italian Nine Communities Study βρήκαν στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ κατανάλωσης ελαιολάδου και αρτηριακής πίεσης, καθώς και μια αρνητική σχέση μεταξύ πολυακόρεστων λιπαρών και συστολικής πίεσης (Trevisan M et al., 1990). Στην Ελλάδα, η μελέτη EPIC κατέληξε σε παρόμοια αποτελέσματα, δείχνοντας επιπλέον ότι ο λόγος μονοακόρεστων προς κορεσμένα λιπαρά σχετίζεται αρνητικά με τα επίπεδα αρτηριακής πίεσης (Psaltopoulou T et al., 2004).



Η Μεσογειακή διατροφή είναι πλούσια σε φυτικά τρόφιμα, όπως φρούτα, λαχανικά και δημητριακά, η περιεκτικότητά των οποίων σε μέταλλα όπως κάλιο, μαγνήσιο και ασβέστιο ίσως αποτελεί επιπλέον μηχανισμό μείωσης της αρτηριακής πίεσης. Η αυξημένη περιεκτικότητά τους σε αντιοξειδωτικές ουσίες (όπως και στο ελαιόλαδο) μπορεί να συμβάλλει επίσης στη διατήρηση υγιούς αγγειακού συστήματος (Liu S et al., 2001; Pamnani MB et al., 2003; Herrera

MD et al., 2001). Η χαμηλή πρόσληψη κρέατος, η υψηλή πρόσληψη ψαριών, η μέτρια πρόσληψη γαλακτοκομικών και αλκοόλ συμβάλλουν επίσης στο ευεργετικό αποτέλεσμα της Μεσογειακής διατροφής στην αρτηριακή πίεση (Παναγιωτάκος Δ και συν, 2004; Fuchs FD et al., 2001; Thadhani R et al., 2002; Engler MM et al., 2003; Seppo L et al., 2003).

5.2.2. Επίδραση της Μεσογειακής Διατροφής στο λιπιδαιμικό προφίλ

Η συνολική πρόσληψη λίπους μέσω της Μεσογειακής διατροφής φτάνει έως και το 40% της συνολικά προσλαμβανόμενης ενέργειας. Παρά το υψηλό ποσοστό λίπους, η πρόσληψη κορεσμένων λιπαρών είναι μικρότερη του 10% της συνολικής ενέργειας. Τα trans λιπαρά οξέα είναι σχεδόν ανύπαρκτα, ενώ η πρόσληψη μονοακόρεστων λιπαρών που παρατηρήθηκε στην μελέτη των Επτά Χωρών έφτανε περίπου τα 80 γραμμάρια ημερησίως. Η πρόσληψη πολυακόρεστων λιπαρών υπολογίστηκε περίπου στα 15 γραμμάρια ημερησίως (Kok FJ & Kromhout D, 2004).

Προοπτικές επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει θετική συσχέτιση μεταξύ κορεσμένων λιπαρών και εμφάνισης στεφανιαίας νόσου, και η σχέση αυτή επηρεάζεται από μηχανισμούς πέρα της επίδρασης στο λιπιδαιμικό προφίλ (Mensink RP et al., 2003; McGee DL et al., 1984; Kushi LH et al., 1985; Ascherio A et al., 1996). Τα κορεσμένα λίπη αυξάνουν την ολική χοληστερόλη και την χοληστερόλη LDL, με το μυριστικό λιπαρό οξύ, το παλμιτικό και το λαυρικό να εμφανίζουν την μεγαλύτερη υπερχοληστερολαιμική δράση (Pedro M et al., 1997).

Η Μεσογειακή διατροφή είναι πλούσια σε μονοακόρεστα λιπαρά, με το συχνότερα εμφανιζόμενο λιπαρό οξύ το ελαϊκό, τα οποία όταν αντικαθιστούν τα κορεσμένα στη διατροφή, οδηγούν σε μείωση της ολικής και LDL χοληστερόλης, καθώς και των τριγλυκεριδίων. Επιπλέον, όταν το ποσοστό του προσλαμβανόμενου λίπους είναι μικρότερο του 30%, τα μονοακόρεστα λιπαρά συμβάλλουν στην αύξηση της HDL χοληστερόλης (Ζαμπέλας Α, 2007; Pedro M et al., 1997)

Η περιεκτικότητα της Μεσογειακής διατροφής σε πολυακόρεστα λιπαρά είναι επίσης υψηλή. Πρόσφατες μελέτες συμφωνούν ότι η αντικατάσταση κορεσμένων λιπαρών με πολυακόρεστα, εκτός από μονοακόρεστα λιπαρά, έχει θετική επίδραση στο λιπιδαιμικό προφίλ (Grundey SM & Denke MA, 1990; Kratz M et al., 2002).

Τα ω-6 λιπαρά οξέα (βρίσκονται κυρίως στα φυτικά έλαια), με κύριο το λινελαϊκό οξύ, οδηγούν σε μείωση της LDL και HDL χοληστερόλης όταν αντικαθιστούν τα κορεσμένα λιπαρά της δίαιτας, και σε μείωση της LDL όταν αντικαθιστούν υδατάνθρακες (Ζαμπέλας Α, 2007). Τα ω-3 λιπαρά οξέα έχουν συσχετιστεί με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου, καθώς

και με μείωση στη θνησιμότητα λόγω της ασθένειας (Hodson L et al., 2001; Kris-Etherton PM et al., 2002).

Αποτελέσματα της μελέτης δευτερογενούς πρόληψης Lyon Diet Heart Study συσχέτισαν την πρόσληψη α-λινολενικού οξέος με μικρότερο αριθμό στεφανιαίων επεισοδίων (He K et al., 2004), ενώ η μελέτη DART έδειξε ότι η κατανάλωση λιπαρών ψαριών σχετίζεται με μείωση της θνησιμότητας από όλες τις αιτίες (De Lorgeril M et al., 1999). Σε παρόμοια αποτελέσματα κατέληξε και η ιταλική μελέτη GISSI, η οποία χρησιμοποιώντας συμπλήρωμα ιχθυελαίων, έδειξε ότι η πρόσληψη ω-3 λιπαρών οδηγεί σε μείωση της ολικής και καρδιαγγειακής θνησιμότητας (Burr ML et al., 1989).

Ο μηχανισμός μέσω του οποίου τα ω-3 λιπαρά προστατεύουν έναντι καρδιαγγειακών νοσημάτων δεν έχει κατανοηθεί πλήρως, αλλά φαίνεται να περιλαμβάνει αντιθρομβωτικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις, καθυστερημένη ανάπτυξη της αθηροσκληρωτικής πλάκας και μειωμένη σύνθεση μορίων προσκόλλησης και αυξητικών παραγόντων που εμπλέκονται στην αθηροσκληρωτική εξεργασία (GISSI-Prevenzione Investigators, 1999).

Τα μακράς αλύσου ω-3 λιπαρά οξέα εικοσαπεντανοϊκό (EPA) και δοκοσαεξανοϊκό (DHA), τα οποία βρίσκονται κυρίως στα ψάρια και στα ιχθυέλαια, αυξάνουν την LDL χοληστερόλη αλλά μειώνουν τα τριγλυκερίδια, με την ολική χοληστερόλη να μην επηρεάζεται (Kris-Etherton PM et al., 2002; Harris WS et al., 1997). Μελέτες πάνω στο λινολενικό οξύ, το οποίο βρίσκεται σε φυτικής προέλευσης προϊόντα (λιναρόσπορος, λινέλαιο, κ.α.) έδειξαν επίσης θετικές επιδράσεις στο λιπιδαιμικό προφίλ, και μάλιστα σε κάποιες φάνηκε ότι έχει εξίσου σημαντική επίδραση στη μείωση της ολικής χοληστερόλης με το ελαϊκό οξύ (Chan J et al., 1991).

Τέλος, τα trans λιπαρά οξέα, που περιέχονται κυρίως σε υδρογονωμένα φυτικά έλαια, στο λίπος του γάλακτος και του μοσχαριού, προκαλούν παρόμοιες επιδράσεις με τα κορεσμένα λιπαρά οξέα, και σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο στεφανιαίας νόσου (Judd JT et al., 1994). Επιπλέον πλεονέκτημα επομένως της Μεσογειακής διατροφής, αποτελεί η σχεδόν μηδαμινή περιεκτικότητά της σε trans λιπαρά.

5.2.3. Επίδραση της Μεσογειακής Διατροφής σε άλλους παράγοντες κινδύνου

Λίγες μελέτες έχουν μελετήσει την ύπαρξη ή όχι ευνοϊκής επίδρασης της Μεσογειακής διατροφής στην πρόληψη της παχυσαρκίας και του διαβήτη. Πρόσφατα, σε έναν αντιπροσωπευτικό μεσογειακό πληθυσμό στην Ισπανία, φάνηκε αρνητική συσχέτιση μεταξύ μεσογειακής διατροφής και δείκτη μάζας σώματος (Schroder H et al., 2004), όμως αντίθετα, σε

έρευνα της Τριχοπούλου και συν. σε μεγάλο δείγμα του ελληνικού πληθυσμού, δεν προέκυψε τέτοια συσχέτιση. Άλλες μελέτες συμπέραναν ότι η Μεσογειακού τύπου διατροφή βελτιώνει την λειτουργία του ενδοθηλίου, βοηθά στην διατήρηση ευγλυκαιμίας, μειώνει τη συγκέντρωση ινσουλίνης στο πλάσμα και βελτιώνει το λιπιδαιμικό προφίλ. Επιπλέον, αποτελέσματα παρεμβάσεων συσχετίζουν την Μεσογειακή διατροφή με μικρότερες τιμές HbA_{1c}, χαμηλότερο δείκτη μάζας σώματος και βελτίωση του μεταβολισμού της γλυκόζης (Trichopoulou A et al., 2005; Perez-Jimenez F et al., 2001; Esposito K et al., 2004; Toobert DJ et al., 2003; Vincent-Baudry S et al., 2005; Ryan M et al., 2000). Στον ελληνικό πληθυσμό, η μελέτη ΑΤΤΙΚΗ κατέληξε σε αρνητική συσχέτιση μεταξύ Μεσογειακής διατροφής και παχυσαρκίας, και έδειξε ότι όσο πλησιέστερα στη Μεσογειακή είναι η διατροφή ενός ατόμου, τόσο μικρότερος είναι ο κίνδυνος αύξησης βάρους, ανεξάρτητα από άλλους παράγοντες, όπως η ηλικία και το επίπεδο φυσικής δραστηριότητας (Panagiotakos DB et al., 2006). Επίσης, η μελέτη CARDIO 2000 κατέληξε σε παρόμοια συμπεράσματα, συσχετίζοντας την Μεσογειακή διατροφή με μικρότερη συχνότητα εμφάνισης σακχαρώδους διαβήτη, καθώς και με χαμηλότερο δείκτη μάζας σώματος (Παναγιωτάκος Δ και συν, 2004).

5.2.4. Επίδραση της Μεσογειακής Διατροφής στην εμφάνιση στεφανιαίας νόσου

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

λιπιδαιμικού προφίλ (Carluccio MA et al., 2003; Bellido C et al., 2006; Pendurthi UR et al., 1999; Iijima K et al., 2002; Covas MI et al, 2006; Salas-Salvadó J et al., 2007).

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

Οι ερευνητές της μελέτης CARDIO 2000 μελέτησαν ένα δείγμα 661 ατόμων μέσης ηλικίας που εμφάνισαν πρώτη φορά επεισόδιο εμφράγματος ή ασταθούς στηθάγχης, καθώς και αντίστοιχο αριθμό υγιών ατόμων (ομάδα ελέγχου) από ποικίλες Ελληνικές περιοχές. Η υιοθέτηση μιας μεσογειακής δίαιτας συσχετίστηκε με 16% μείωση του κινδύνου πρώτης εμφάνισης οξέος στεφανιαίου συνδρόμου. Επιπλέον, σε μια υπο-μελέτη της CARDIO 2000, και αφού συνυπολογίστηκε η επίδραση αρκετών συγχυτικών παραγόντων, οι ερευνητές εκτίμησαν ότι η υιοθέτηση της μεσογειακής διατροφής οδήγησε σε μείωση του στεφανιαίου κινδύνου κατά 25% σε ρυθμισμένους υπερτασικούς σε συνδυασμό με φυσική δραστηριότητα, κατά 17% σε αρρυθμιστους υπερτασικούς ασθενείς και κατά 11% σε ασθενείς που δεν λάμβαναν φαρμακευτική αγωγή (Pitsavos et al., 2002). Τέλος, σε ασθενείς με μεταβολικό σύνδρομο, η μείωση του στεφανιαίου κινδύνου υπολογίστηκε στο 35%, αφού έγιναν οι απαραίτητες προσαρμογές ανάλογα με την ηλικία, το φύλο, το μορφωτικό και οικονομικό επίπεδο καθώς και με τους κλασικούς παράγοντες κινδύνου (Pitsavos et al., 2003).

Πρόσφατα, σε μία προοπτική μελέτη που συμπεριέλαβε 22.043 ενήλικες μέσης ή μεγαλύτερης ηλικίας από την Ελλάδα, η Τριχοπούλου και συν. κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι υπάρχει αρνητική συσχέτιση μεταξύ συμμόρφωσης με τη μεσογειακή διατροφή και στεφανιαίας θνησιμότητας. Συγκεκριμένα, αύξηση στο Μεσογειακό σκορ περίπου κατά 2/9, συσχετίστηκε με 25% μείωση στη στεφανιαία θνησιμότητα. Οι συσχετίσεις αυτές ήταν ανεξάρτητες του φύλου, των καπνιστικών συνηθειών, του δείκτη μάζας σώματος και του επιπέδου φυσικής δραστηριότητας (Trichopoulou A et al., 2003).

Οι Martinez-Gonzalez et al, σε μία μελέτη ασθενών-μαρτύρων που συμπεριλάμβανε 171 ασθενείς, και 171 υγιείς ως ομάδα ελέγχου, παρατήρησαν ότι όσο υψηλότερη η τιμή του μεσογειακού διατροφικού σκορ, τόσο μικρότερος ήταν ο κίνδυνος εμφάνισης εμφράγματος του μυοκαρδίου. Συγκεκριμένα, για κάθε αύξηση μιας μονάδας στο σκορ με εύρος 9-38, ο κίνδυνος για έμφραγμα του μυοκαρδίου μειωνόταν κατά 8% (OR=0,92, 95%ΔΕ=0,86-0,98), για κάθε αύξηση μίας μονάδας στο σκορ με εύρος 0-8, ο κίνδυνος για έμφραγμα του μυοκαρδίου μειωνόταν κατά 45% (OR=0,55, 95%ΔΕ=0,42-0,73) (Martinez-Gonzalez MA et al., 2002).

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

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

Ερευνητές	Πληθυσμός	Είδος μελέτης	Κύρια ευρήματα
Panagiotakos et al., 2002	661 με ΟΣΣ 661 ως δείγμα ελέγχου	Ασθενών – μαρτύρων	16% μείωση κινδύνου πρώτης εμφάνισης ΟΣΣ με υιοθέτηση Μ.Δ.
Pitsavos et al., 2002	534 με ΟΣΣ 399 με υπερχοληστερολαιμία ως δείγμα ελέγχου	Ασθενών – μαρτύρων	12% μείωση εμφάνισης ΟΣΣ με υιοθέτηση Μ.Δ.
Pitsavos et al., 2002	418 άτομα με ΟΣΣ 303 με υπέρταση ως δείγμα ελέγχου	Ασθενών – μαρτύρων	25% μείωση στεφανιαίου κινδύνου σε ρυθμισμένους υπερτασικούς με υιοθέτηση Μ.Δ. και φυσικής δραστηριότητας (p-value<0,01)
Pitsavos et al., 2003	307 με ΟΣΣ 118 με μεταβολικό σύνδρομο ως δείγμα ελέγχου	Ασθενών – μαρτύρων	35% μείωση στεφανιαίου κινδύνου σε ασθενείς με μεταβολικό σύνδρομο με υιοθέτηση Μ.Δ (p-value<0,01)
Trichopoulou et al., 2003	22.034 ενήλικες άντρες και γυναίκες	Προοπτική πληθυσμιακή	33% μείωση στη στεφανιαία θνησιμότητα με αύξηση του σκορ Μ.Δ. κατά 2/9 (p-value<0,001)
Martinez – Gonzalez et al., 2002	171 με OEM 171 ως δείγμα ελέγχου	Ασθενών – μαρτύρων	8% μείωση εμφάνισης OEM με αύξηση του σκορ κατά 1 μονάδα (p-value<0,05)

ΟΣΣ: οξύ στεφανιαίο σύνδρομο

OEM: οξύ έμφραγμα μυοκαρδίου

Μ.Δ.: Μεσογειακή διατροφή

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

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

Η χρήση των Μεσογειακών σκορ αποτελεί μια προσπάθεια αποτίμησης της ποιότητας της διατροφής σε σχέση με το πόσο πλησιάζει στις συστάσεις του Μεσογειακού προτύπου. Οι

συνήθειες διατροφής μεταφράζονται σε έναν αριθμό, μέσω κάποιας συνάρτησης που περιλαμβάνει τρόφιμα, ομάδες τροφίμων ή θρεπτικά συστατικά ή ακόμα και συνδυασμό αυτών. Τα διατροφικά σκορ έχουν αρκετές φορές χρησιμοποιηθεί για τη διερεύνηση της ύπαρξης συσχετίσεων μεταξύ της Μεσογειακής διατροφής και παραμέτρων υγείας, όπως το προσδόκιμο επιβίωσης, ο επιπολασμός της παχυσαρκίας, τα καρδιαγγειακά νοσήματα και ο καρκίνος. Επιπλέον, τα σκορ αποτελούν χρήσιμα εργαλεία στη μέτρηση διαιτητικών συνηθειών καθώς και στην ανάπτυξη συστάσεων κατανοητών στο γενικό πληθυσμό (Bach A et al., 2006).

Στην Ελλάδα η χρήση των Μεσογειακών σκορ ξεκίνησε σε μια προσπάθεια αποτίμησης της σχέσης μεταξύ Μεσογειακής διατροφής και μακροβιότητας. Η θετική συσχέτιση που προέκυψε αποτέλεσε κίνητρο για ολοένα και περισσότερους ερευνητές, οδηγώντας στην ευρύτερη χρησιμοποίηση των Μεσογειακών σκορ στην αναζήτηση συσχετίσεων διατροφής και υγείας (Trichopoulou A et al., 1995) (Πίνακας 5.2.).

Πίνακας 5.2. Η χρήση των Μεσογειακών σκορ στην Ελλάδα

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

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

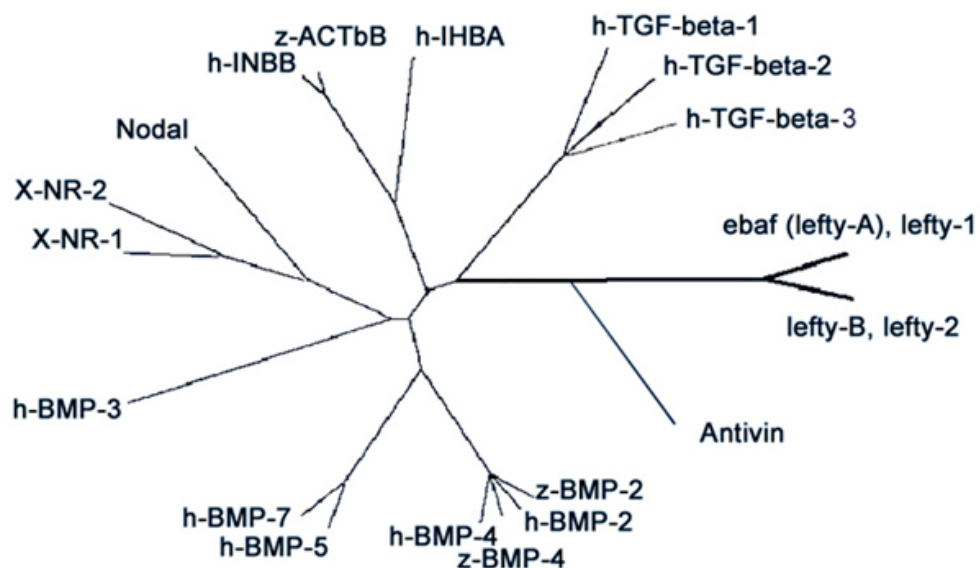
Πρόσφατα, όπως φαίνεται και στον παραπάνω πίνακα, δημιουργήθηκε ένα καινούργιο διατροφικό σκορ μεγάλης κλίμακας που ενσωματώνει τα χαρακτηριστικά της Μεσογειακής διατροφής και συσχετίζεται με τον καρδιαγγειακό κίνδυνο και βιολογικούς δείκτες. Το σκορ αυτό έχει εύρος τιμών από 0 έως 55 και συμπεριλαμβάνει την εβδομαδιαία κατανάλωση 9 ομάδων τροφίμων : μη επεξεργασμένα δημητριακά, φρούτα, λαχανικά, όσπρια, πατάτες, ψάρια, κρέας και προϊόντα τους, πουλερικά, πλήρη γαλακτοκομικά, καθώς και την πρόσληψη αλκοόλ και ελαιόλαδου. Η συχνότητα κατανάλωσης των φαγητών από αυτές τις ομάδες, μεταφράζεται μέσω συναρτήσεων σε ένα αριθμό. Για την κατανάλωση τροφίμων που θεωρούνται ‘κοντά’ στο μεσογειακό πρότυπο, το σκορ είναι 0 όταν κάποιος αναφέρει μηδενική πρόσληψή τους, και από 1 έως 5 από σπάνια έως καθημερινή κατανάλωση. Αντίθετη είναι η βαθμολογία για ομάδες τροφίμων που θεωρούνται ‘μακριά’ από το Μεσογειακό πρότυπο. Για το αλκοόλ χρησιμοποιείται διαφορετική βαθμολογία, με την μέτρια κατανάλωση (<300ml) να βαθμολογείται με 5, την υψηλή (>700ml) ή καθόλου με 0, και την κατανάλωση 600–700, 500–600, 400–500 και 300–400 ml με 1 έως 4 αντίστοιχα. Υψηλότερες τιμές του σκορ αντικατοπτρίζουν μεγαλύτερη συμμόρφωση με το Μεσογειακό πρότυπο (Panagiotakos DB et al., 2007).

6. Ο ΜΕΤΑΤΡΕΠΤΙΚΟΣ ΑΥΞΗΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ β (TGF- β)

6.1 Η Υπεροικογένεια του Μετατρεπτικού Αυξητικού Παράγοντα β (Transforming Growth Factor β , TGF- β)

Η υπεροικογένεια του TGF- β περιλαμβάνει περισσότερα από 30 μέλη συμπεριλαμβανομένου του ίδιου του TGF- β καθώς και άλλων σχετικών παραγόντων, όπως μορφογενετικές πρωτεΐνες οστών, activins, nodals και παράγοντες διαφοροποίησης (Εικόνα 6.1) (de Caestecker M, 2004). Οι ώριμες ενεργές μορφές της οικογένειας είναι διμερή αποτελούμενα από υπομονάδες μοριακού βάρους 12-15 kDa, οι οποίες συνδέονται με ένα μόνο δισουλφιδικό δεσμό.

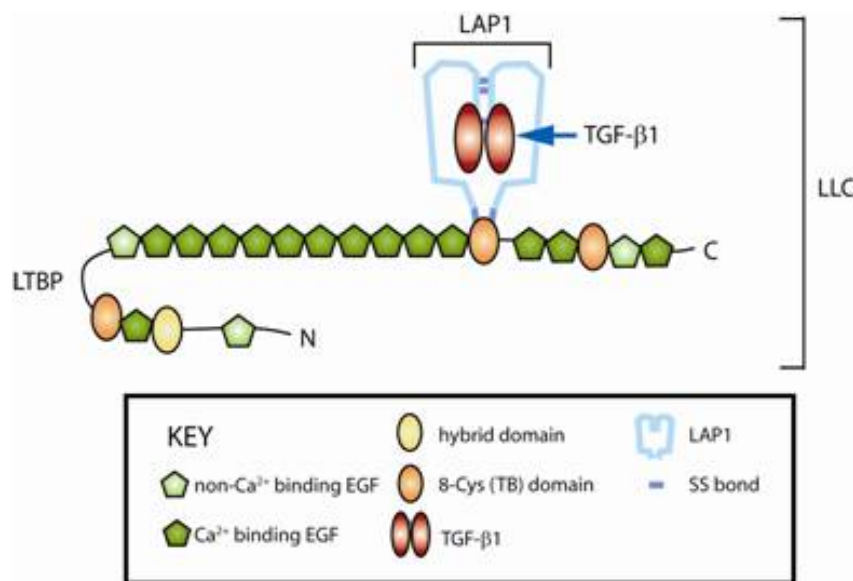
Ο TGF- β αρχικά αναγνωρίστηκε εξαιτίας της ικανότητας του να επιφέρει ανάπτυξη σε ινοβλάστες φυσιολογικών τρωκτικών σε μαλακό άγαρ, αλλά σήμερα είναι γνωστός σαν ισχυρός αναστολέας ανάπτυξης για πολλά είδη κυττάρων (Miyazono K & Heldin CH, 1992). Συγκεκριμένα, αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των περισσότερων κυτταρικών τύπων (Massague J, 1990), καθώς και διεγείρει τη βιοσύνθεση του εξωκυττάριου υγρού (Ignotz RA & Massague J, 1986; Roberts, AB et al., 1986). Επίσης, μπορεί να προκαλέσει μονοκυτταρική χημειοταξία (Wahl SM et al., 1987), να καταστείλει τη λεμφοκυτταρική λειτουργία (Wrann M et al., 1987) και να συντονίσει την αγγειογένεση (Roberts AB et al., 1986; Gohongi T et al., 1999; Parsons-Wingerter P et al., 2000) και το σχηματισμό των οστών (Bonewald LF & Dallas SL 1994). Τέλος, ο TGF- β εμπλέκεται και σε παθολογικές διαδικασίες όπως η φλεγμονή, η ινωμάτωση, η αγγειογένεση και η ογκογένεση (Javelaud D et al., 2004).



Εικόνα 6.1: Η υπεροικογένεια του TGF- β (Tabibzadeh S, 2002)

6.2 Ο Μετατρεπτικός Αυξητικός Παράγοντας β

Ο TGF-β απαντάται σε τρεις ισομορφές: TGF-β1, TGF-β2 και TGF-β3. Αν και καθένα από αυτά προέρχεται από διαφορετικά γονίδια που εντοπίζονται στις χρωμοσωμικές περιοχές 19q13, 1q14 και 14q24 αντίστοιχα, παρουσιάζουν περισσότερο από 70% ομολογία στην ακολουθία τους. Οι τρεις αυτές ισομορφές έχουν παρόμοιες ιδιότητες, τουλάχιστον, *in vitro*, και γι' αυτό στη συνέχεια θα αναφέρονται με το γενικό όρο TGF-β (Singh NN & Ramji DP, 2006).



Εικόνα 6.2: Ο TGFβ με τη μορφή συμπλόκου LLC (Large Latent Complex) (Todorovic V et al., 2005)

Η πρωτεΐνη συντίθεται σαν ομοδιμερής προ-πρωτεΐνη (pro-TGF-β με μοριακό βάρος 75 kDa) και στη συνέχεια μετατρέπεται σε ώριμο ομοδιμερές μοριακού βάρους 24 kDa στη συσκευή Golgi (Saharinen J et al., 1999; Annes JP et al., 2003). Εκκρίνεται από το κύτταρο με τη μορφή συμπλόκου LLC (Large Latent Complex), το οποίο δεν έχει βιολογική δραστηριότητα και αποτελείται από τρία συστατικά: ένα συνδεδεμένο με ομοιοπολικό δεσμό ομοδιμερές το οποίο ενώνεται μη ομοιοπολικά με την πρωτεΐνη LAP (Latency Associated Protein: ομοδιμερές από την αμινοτελική περιοχή του TGF-β) και ένα ομοιοπολικά συνδεδεμένο μόριο LTBP (Latent TGFb Binding Protein) (Εικόνα 6.2) (Olofsson A et al., 1992; Miyazono K et al., 1988; Wakefield LM et al., 1988; Kanzaki T et al., 1990; Okada F et al., 1989; Tsuji T et al., 1990). Η βιολογική δραστηριότητα του TGF-β απαιτεί το διαχωρισμό του από το σύμπλοκο και επιτυγχάνεται, τουλάχιστον *in vitro*, με διάφορες πρωτεάσες, με θέρμανση και με αλλαγές στο pH (Saharinen J et al., 1999; Annes JP et al., 2003). *In vivo*, η απελευθέρωση του TGF-β από το

σύμπλοκο μπορεί να πραγματοποιηθεί από τη γλυκοπρωτεΐνη θρομβοσπονδίνη-1 και από την πλασμίνη (Crawford SE et al., 1998).

Η σύνθεση του TGF- β ρυθμίζεται από μια σειρά παραγόντων στο επίπεδο της μεταγραφής ή/και της σταθερότητας του mRNA. Επίσης, υπάρχουν πολλοί μηχανισμοί που ελέγχουν την πρόσβαση των μελών του TGF- β στους υποδοχείς τους, την ενεργότητα και τα υποστρώματα των υποδοχέων, καθώς και τη λειτουργία των μεταγραφικών συμπλόκων στον πυρήνα (Massague J & Chen YG, 2000).

6.3 Μονοπάτι μεταγωγής σήματος από τον TGF- β

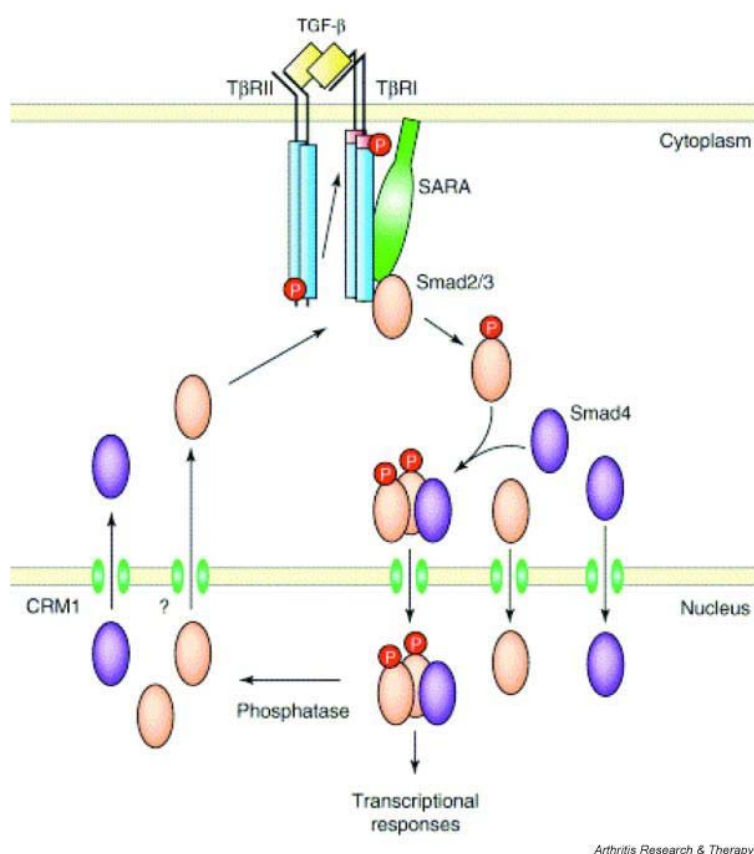
Το μονοπάτι μεταγωγής σήματος του TGF- β έχει μελετηθεί εκτενώς τα τελευταία χρόνια εξαιτίας του ρόλου του στην παθογένεια διαφόρων ασθενειών, όπως η αρθρίτιδα, ο διαβήτης, η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου, ο καρκίνος και η αθηροσκλήρωση (Blobe GC et al., 2000).

Η κυτοκίνη αλληλεπιδρά με διαμεμβρανικούς υποδοχείς, οι οποίοι έχουν δραστηριότητα κινάσης σερίνης/θρεονίνης. Οι υποδοχείς του TGF- β είναι ο υποδοχέας τύπου I (TGF- β RI), ο οποίος παρουσιάζει διαφορετικό προφίλ έκφρασης ανάλογα με τον τύπο κυττάρου, και ο συνεχώς ενεργοποιημένος υποδοχέας τύπου II (TGF- β RII), με τον οποίον παρουσιάζει μεγάλη συγγένεια. Οι υποδοχείς αυτοί αποτελούνται από τα εξής τμήματα: από ένα μικρό, πλούσιο σε κυστεΐνη εξωκυττάριο τμήμα, από μία μονή διαμεμβρανική περιοχή και από ένα ενδοκυττάριο τμήμα που περιέχει κατάλοιπα σερίνης/θρεονίνης (Wrana JL et al., 1994). Η δράση του TGF- β , επίσης, διαμορφώνεται και από την αλληλεπίδραση του με τον υποδοχέα τύπου III, ο οποίος δεν έχει κάποια ουσιαστική δραστηριότητα κινάσης (de Caestecker M, 2004; Massague J et al., 2000; Shi Y & Massague J, 2003; Lebrin F et al., 2005).

Η πρόσδεση του TGF- β στον υποδοχέα TGF- β RII οδηγεί στη δημιουργία ενός ετερομερούς συμπλόκου αποτελούμενο και από τους δύο τύπους υποδοχέων. Ο TGF- β RII έπειτα φωσφορυλιώνει τον TGF- β RI, ο οποίος προκαλεί μια δομική αλλαγή στην πρωτεΐνη, επιτρέποντάς της να φωσφορυλιώσει μόρια από την οικογένεια των πρωτεϊνών Smads, στην οποία ανήκουν μόρια σηματοδότησης και παράγοντες μεταγραφής. Υπάρχουν τρεις τύποι πρωτεϊνών Smads: receptor-regulated (Smad -1, -2, -3, -5 και -8), common Smads (Smad-4) και inhibitory Smads (Smad-6 και -7). Η πρόσδεση του TGF- β RI και των πρωτεϊνών Smads συχνά διευκολύνεται από την πρωτεΐνη Smad Anchor for Receptor Activation. Οι πρωτεΐνες Smad-2 και/ή -3 φωσφορυλιώνονται από τον TGF- β και στη συνέχεια αλληλεπιδρούν με την Smad-4 για να σχηματίσουν ένα ετεροδιμερές σύμπλοκο. Το σύμπλοκο αυτό μεταναστεύει στον πυρήνα και ρυθμίζει τη μεταγραφή άλλων γονιδίων αλληλεπιδρώντας με παράγοντες στις ρυθμιστικές

περιοχές των γονιδίων στόχων (Εικόνα 6.3) (de Caestecker M, 2004; Massague J et al., 2005; Feng XH & Derynck R, 2005).

Αν και η ενεργοποίηση των πρωτεϊνών Smads αντιπροσωπεύει τον κύριο μηχανισμό για τη μεταγωγή σήματος από τον TGF- β , υπάρχουν και άλλα μονοπάτια τα οποία ενεργοποιούνται από την κυτοκίνη, όπως το μονοπάτι των MAP (Mitogen Activated Protein) κινασών, το μονοπάτι της κινάσης του 3-φωσφοινοσιτιδίου και το μονοπάτι της πρωτεϊνικής κινάσης CK2) (Derynck R & Zhang YE 2003; Moustakas A & Heldin CH, 2005).



Εικόνα 6.3: Το μονοπάτι μεταγωγής σήματος του TGF β (Zvaifler NJ, 2006)

Γενικά, η ρύθμιση του μηχανισμού σηματοδότησης από τον TGF β είναι αρκετά πολύπλοκη και περιλαμβάνει, πέρα από τη ρύθμιση στο επίπεδο της απελευθέρωσης της ενεργούς μορφής, τη ρύθμιση στο επίπεδο του υποδοχέα και στο επίπεδο των πρωτεϊνών Smad. Ακόμα, διάφοροι αντιρροπιστικοί μηχανισμοί ενεργοποιούνται για τον τερματισμό του σήματος, ενώ εκκρίνονται από το κύτταρο και πρωτεΐνες ως απόκριση στην επίδραση του TGF β , οι οποίες διαμεσολαβούν και ρυθμίζουν τη σηματοδότηση. Η πολυπλοκότητα του μηχανισμού σηματοδότησης αλλά και της ρύθμισης του επιτρέπει στα μόρια της υπερικογένειας του να ασκούν διαφορετικές αλλά και εξαρτώμενες από το περιβάλλον κυτταρικές δράσεις,

συμβάλλοντας έτσι στη ρύθμιση της φυσιολογικής ομοιόστασης (Gordon KJ & Blobe GC, 2008). Συνεπώς, δυσλειτουργία των μηχανισμών σηματοδότησης μπορεί να οδηγήσει σε ασθένειες (Massague J et al., 2000).

6.4 Ο ρόλος του TGF-β στην αθηροσκλήρωση

Ο TGF-β και οι υποδοχείς του έχει φανεί ότι εκφράζονται σε ενδοθηλιακά κύτταρα, λεία μυϊκά κύτταρα, μακροφάγα και T-λεμφοκύτταρα σε αθηρωματικές πλάκες προερχόμενες από ανθρώπους. Παρά το γεγονός ότι ο ρόλος του TGF-β στην αθηρογένεση είναι αμφιλεγόμενος με κάποιες μελέτες να υποστηρίζουν ότι έχει προαθηρογόνο δράση (Bobik A et al., 1999; Cipollone F et al., 2004; Mangan PR et al., 2006), οι περισσότερες μελέτες υποστηρίζουν ότι πρόκειται για μια κυτταροκίνη που ασκεί προστατευτική δράση, τόσο στην έναρξη όσο και στην πρόοδο της αθηρωμάτωσης.

- Ο TGF-β αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των αγγειακών, λείων μυϊκών κυττάρων
- Ενεργοποιεί την απόπτωση των λείων μυϊκών κυττάρων και των ενδοθηλιακών κυττάρων (Bjorkerud S, 1991; Grainger DJ et al., 1994; Owens GK et al., 1988; Kojima S et al., 1991).
- Έρευνες τονίζουν το ρόλο του TGF-β σαν κυτοκίνη απενεργοποίησης των T-κυττάρων, καθώς δυσλειτουργία κατά τη διαδικασία σηματοδότησης από τον TGF-β, και συγκεκριμένα στον πληθυσμό των T-κυττάρων, προκαλεί αύξηση του αριθμού των T-κυττάρων και των μακροφάγων στην αθηρωματική πλάκα (Gojona A et al., 2003), γεγονός που την καθιστά πιο επιρρεπή σε ρήξη. Η επίδραση του TGF-β στη διαφοροποίηση των T-κυττάρων αποτελεί αναμφισβήτητο σημαντικό συστατικό της δράσης του στην αθηρογένεση (Mallat Z et al., 2002). Επίσης, προωθεί τη μετατροπή των T-βοηθητικών κυττάρων-1 (T-helper-1, Th1) σε T-βοηθητικά-2 (T-helper-2, Th2). Το γεγονός αυτό είναι σημαντικό καθώς χάνεται η ισορροπία μεταξύ των δύο τύπων κυττάρων και η δράση των Th1 θεωρείται προαθηρογόνος γιατί ευνοεί την αποσταθεροποίηση των αθηρωματικών πλακών, ενώ η δράση των Th2 θεωρείται προστατευτική (Nillson et al., 2005)
- μειώνει τη δραστηριότητα των μακροφάγων και το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων (Argmann CA et al., 2001), προωθεί τη NO συνθάση και αναστέλλει τις μεταλλοπρωτεϊνάσες (Mitani T et al., 2005).

- εντείνει τη σύνθεση κολλαγόνου, συμβάλλοντας στη σταθεροποίηση των αθηρωματικών πλακών (Verrecchia F et al., 2001)
- καταστέλλει την έκφραση των προφλεγμονώδων μορίων προσκόλλησης από το αγγειακό ενδοθήλιο (Gamble JR et al., 1993)
- μια αντίστροφη σχέση έχει βρεθεί μεταξύ των επιπέδων του TGF-β της κυκλοφορίας και της ανάπτυξης αθηροσκλήρωσης (Grainger DJ, 2004; Grainger DJ et al., 1995). Τα επίπεδα του TGF-β στον ορό είναι χαμηλά σε ασθενείς με αθηροσκλήρωση (McCaffrey TA et al., 1995; McDonald CC et al., 1995)
- οι περιοχές στην αορτή με μια υψηλή πιθανότητα ανάπτυξης αθηροσκλήρωσης συνδέονται με χαμηλή έκφραση TGF-β (Borkowski P, 1995)
- μελέτες σε ζώα έχουν δείξει ότι η παρεμπόδιση της μεταγωγής σήματος από τον TGF-β, χρησιμοποιώντας εξουδετερωτικά αντισώματα ή μέσω της έκφρασης ενός επικρατώς αρνητικού υποδοχέα, επιταχύνει την ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης (Mallat, Z et al., 2001; Lutgens E et al., 2002)
- ρυθμίζει την έκφραση διάφορων γονιδίων που εμπλέκονται στον έλεγχο της ομοιόστασης της χοληστερόλης. Συγκεκριμένα, διεγείρει την έκφραση των περισσότερων γονιδίων που εμπλέκονται στην εκροή χοληστερόλης και εμποδίζει, ταυτόχρονα, την έκφραση εκείνων που συμμετέχουν στην πρόσληψη αυτής της στερόλης (Ramji DP et al., 2006)
- μεταλλάξεις ή μειωμένη έκφραση του γονιδίου του υποδοχέα τύπου II έχουν ανιχνευθεί σε πληθυσμούς ανθρώπινων κυττάρων στις αθηρωματικές πλάκες. Αυτές οι αλλαγές στον υποδοχέα τύπου II καθιστούν τα κύτταρα ανθεκτικά στις αντιαθηρογόνες δράσεις του TGF-β (McCaffrey TA et al., 1997; McCaffrey TA et al., 1999).

Αν και αυτά τα στοιχεία υποστηρίζουν την αντιφλεγμονώδη και αντιαθηροσκληρωτική δράση του TGF-β, υπάρχουν και αρκετά δεδομένα που υποστηρίζουν την αντίθετη άποψη. Συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί ότι προωθεί την εκ νέου διαφοροποίηση και ιδιαίτερα τον πληθυσμό των T-λεμφοκυττάρων που παράγουν IL-17 (Th17) (Mangan PR et al., 2006). Βασιζόμενος σε αυτή τη θεωρία, οι Veldhoen et al. προτείνουν ότι η παρεμπόδιση TGF-β στην περιοχή της φλεγμονής μπορεί να καταργήσει τη διαδικασία λόγω του περιορισμού της δράσης της Th17 (Veldhoen M et al., 2006).

6.5 Ο ρόλος του TGF-β στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία

Η σύνθεση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας είναι μια από τις κύριες λειτουργίες των λείων μυικών κυττάρων και η ισορροπία μεταξύ των λευκοκυττάρων και του αριθμού των λείων μυικών κυττάρων στην αναπτυσσόμενη αθηρωματική πλάκα είναι σημαντικός παράγοντας για τη σταθερότητα αυτής (Robbie L & Libby P, 2001). Ο TGF-β διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη σταθερότητα της πλάκας με δύο τρόπους: 1) μέσω του ανοσορυθμιστικού του ρόλου καταστέλλει τη συσσώρευση των λευκοκυττάρων και 2) από τις κυτοκίνες που έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα, είναι μία από τις πιο ισχυρές ως προς την ικανότητα της να προωθή τη σύνθεση κολλαγόνου. Επομένως, ο TGF-β όχι μόνο προστατεύει από τον αρχικό σχηματισμό της λιπώδους γράμμωσης, διατηρώντας φυσιολογική τη δομή των αγγειακών τοιχωμάτων, αλλά και προστατεύει από τη δημιουργία ασταθών πλακών, αυξάνοντας την παραγωγή θεμέλιας ουσίας από τα λεία μυικά κύτταρα της ινώδους κάψας (Mallat Z et al., 2001; Lutgens E et al., 2002; Grainger DJ et al., 2000).

Ο McCaffrey et al. απέδειξε ότι τα λεία μυικά κύτταρα έχουν διαφορετικό προφίλ έκφρασης των υποδοχέων του TGF-β στην αθηρωματική πλάκα σε σύγκριση με φυσιολογικά κύτταρα. Τα κύτταρα των αθηρωματικών πλακών εκφράζουν κυρίως τον τύπου I υποδοχέα TGF-β, ενώ στα φυσιολογικά κύτταρα επικρατεί ο τύπου II υποδοχέας. Αυτή η αλλαγή είχε λειτουργικές συνέπειες, τουλάχιστον *in vitro*. Τα κύτταρα στα οποία υπερίσχυε ο υποδοχέας τύπου I ανταποκρίνονταν στον TGF-β αυξάνοντας την παραγωγή εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Αντίθετα, τα κύτταρα στα οποία υπήρχε κυρίως ο τύπου II υποδοχέας δεν προκαλούσαν αύξηση της παραγωγής εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας ως απάντηση στον TGF-β, αλλά αύξηση της έκφρασης συστατικών πρωτεϊνών. Σε συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας, ο TGF-β ευνοεί την έκφραση των υποδοχέων τύπου II. Μετά από κάποιους κυτταρικούς κύκλους, χωρίς να προστεθεί επιπλέον ποσότητα του TGF-β, η αναλογία του τύπου II υποδοχέα προς τον τύπου I μειώνεται, και τα κύτταρα αλλάζουν προφίλ έκφρασης, αυξάνοντας την παραγωγή εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και όχι την έκφραση συστατικών πρωτεϊνών. Αν η ποσότητα του TGF-β παρέμενε σταθερή στην καλλιέργεια, τα επίπεδα του υποδοχέα τύπου II θα διατηρούνταν υψηλά και, έτσι, η παραγωγή εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας θα ήταν σχετικά χαμηλή (Mc Caffrey TA et al., 1995).

6.6 Πολυμορφισμοί των γονιδίων TGF-β1, TGF-β2 ΚΑΙ TGF-β3 και αθηροσκλήρωση

Ελάχιστα δεδομένα υπάρχουν που να αναφέρονται σε πολυμορφισμούς στα γονίδια TGFβ2 και TGFβ3, Αντίθετα, διάφορες μελέτες έχουν γίνει πάνω σε πολυμορφισμούς που προκαλούν αλλαγή ενός νουκλεοτιδίου στο γονίδιο του TGFβ1.

Οι πολυμορφισμοί -509C>T και -800A>G στον υποκινητή του γονιδίου TGFβ1 έχει φανεί ότι τροποποιούν τα επίπεδά του στο αίμα (Grainger DJ et al., 2004), ενώ ο πολυμορφισμός 509C>T φαίνεται να οδηγεί σε αλλαγές στην πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων στον υποκινητή και σε διαφορετική μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου (Silverman ES et al., 2004; Luedeking EK et al., 1998; Yokota M et al., 2000). Δύο άλλοι πολυμορφισμοί που προκύπτουν από παρερμηνεύσιμες μεταλλαγές (Leu10Pro, Arg25Pro) έχουν συσχετισθεί με διαφορές στην έκκριση του TGFβ1 σε διάφορους τύπους κυττάρων (Awad MR et al., 1998; Suthanthiran M et al., 2000; Yamada Y et al., 1998; Yokota M et al., 2000). Τα τελευταία έτη, οι συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί, καθώς και κάποιοι ακόμη, έχουν μελετηθεί σε σχέση με τη στεφανιαία νόσο οδηγώντας σε ασαφή συμπεράσματα.

Η πρώτη γενετική μελέτη από τους Cambien et al. διερεύνησε το ρόλο 7 πολυμορφισμών στο γονίδιο του TGFβ1 σε σχέση με την εμφάνιση εμφραγμάτων μυοκαρδίου, καθώς και την ανάπτυξη στενώσεων στις στεφανιαίες αρτηρίες, η οποία αξιολογήθηκε με στεφανιογραφία. Στη μελέτη αυτή βρέθηκε συσχέτιση του πολυμορφισμού Arg25Pro με την εμφάνιση εμφραγμάτων, ενώ κανείς από τους πολυμορφισμούς που μελετήθηκαν δε συσχετίστηκε με το βαθμό και τη σοβαρότητα των στενώσεων των αρτηριών (Cambien F et al., 1996). Επόμενες μελέτες δεν επιβεβαίωσαν τη συσχέτιση του συγκεκριμένου πολυμορφισμού με τη νόσο, ενώ ο πολυμορφισμός -509C>T συσχετίστηκε αρνητικά με την εμφάνιση εμφράγματος σε μία μόνο γερμανική μελέτη (Koch W et al., 2006).

Αντίθετα, ο πολυμορφισμός Leu10Pro συσχετίστηκε με την εμφάνιση εμφράγματος σε Ιαπωνικό πληθυσμό (Yokota M et al., 2000), ενώ φάνηκε επίσης να σχετίζεται θετικά με αθηροσκλήρωση σε 2 από τις 10 αρτηρίες που μελετήθηκαν σε Ιάπωνες (Oda K et al., 2007). Ο ίδιος πολυμορφισμός συσχετίστηκε θετικά με αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο σε Ευρωπαίους, ενώ δε συσχετιζόταν με την εμφάνιση εμφράγματος (Sie MP et al., 2006).

Μελέτη	Πληθυσμός	Δείγμα	Πολυμορφισμοί που μελετήθηκαν	Συσχετίσεις
Cambien et al., 1996	Ευρωπαίοι	563 ασθενείς με OEM ή ΣΝ 629 υγιείς	TGFβ1: G-800A,C-509T, Leu10Pro, Arg25Pro, Thr263Ile, C988A, +72C	Arg25Pro: Συσχέτιση με OEM
Wang et al., 1998	Αυστραλοί	371 ασθενείς με ΣΝ	TGFβ1: C-509T	Καμία συσχέτιση με τη νόσο
Biggart et al., 1998	Ευρωπαίοι	101 ασθενείς μικρής ηλικίας με ΣΝ 100 ασθενείς με φυσιολογικά στεφανιαία αγγεία	TGFβ2	Καμία συσχέτιση με τη νόσο
Syrris et al., 1998	Ευρωπαίοι	655 ασθενείς με ΣΝ 244 ασθενείς με φυσιολογικά στεφανιαία αγγεία	TGFβ1: G-800A,C-509T, Leu10Pro, Arg25Pro, Thr263Ile	Καμία συσχέτιση με τη νόσο
Yokota et al., 2000	Ιάπωνες	315 ασθενείς με OEM 591 υγιείς	TGFβ1: Leu10Pro	Συσχέτιση με OEM
McGlinchey et al., 2004	Ευρωπαίοι	1012 ασθενείς από 386 οικογένειες με τουλάχιστον ένα μέλος προσβεβλημένο από ΣΝ	TGFβ1: C-509T	Καμία συσχέτιση με τη νόσο
Sie et al., 2006	Ευρωπαίοι	6456 άτομα που συμμετείχαν στην προοπτική μελέτη του Rotterdam	TGFβ1: C-509T, Leu10Pro	Καμία συσχέτιση με OEM Παράγοντες κινδύνου για αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια
Koch et al., 2006	Ευρωπαίοι	3657 ασθενείς με OEM 1211 υγιείς	TGFβ1: C-509T, T868C, G913C, C11929T	C-509T: προστατευτική δράση CTGC απλότυπος: προστατευτική δράση
Oda et al., 2007	Ιάπωνες	1503 αυτοψίες 10 αρτηριών ηλικιωμένων ατόμων	TGFβ1: C29T	Συσχέτιση με αθηροσκλήρωση στην υποκλείδια και στην ενδοκρανιακή αρτηρία
Crobu et al., 2008	Ευρωπαίοι	201 ασθενείς μικρής ηλικίας με OEM 201 υγιείς	TGFβ1: G-800A, C-509T, Leu10Pro	GCT απλότυπος: προστατευτική δράση GTC απλότυπος: παράγοντας κινδύνου

7. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ και ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ

7.1. Nutrigenomics – Nutrigenetics

Με τον όρο **διατροφογενωμική** εννοούμε την επιστήμη η οποία ερευνά το κατά πόσο η λειτουργία και έκφραση των γονιδίων του ανθρώπου επηρεάζεται από τα θρεπτικά συστατικά. Από την άλλη, με τον όρο **διατροφογενετική** νοείται η επιστήμη που ερευνά τον τρόπο με τον οποίο αντιδρά ο οργανισμός στα διάφορα θρεπτικά συστατικά ανάλογα με το γονιδιακό υπόβαθρο που διαθέτει. Απώτερος στόχος και των δύο επιστημών είναι να κατανοηθούν πλήρως οι συσχετισμοί μεταξύ διατροφής, γονιδίων και ασθενειών ώστε να επιτευχθεί η πολυπόθητη εξατομικευμένη διατροφή ανάλογα με το γενετικό υπόβαθρο του καθενός.

Η μελέτη της αλληλεπίδρασης γονιδίων και θρεπτικών συστατικών στην παθογένεια πολυπαραγοντικών νοσημάτων επεκτείνεται ολοένα και περισσότερο τα τελευταία χρόνια. Ωστόσο, η ταχύτερη ανάπτυξη εντοπίζεται στον τομέα των ασθενειών του καρδιαγγειακού συστήματος καθώς πάρα πολλές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για να διερευνηθεί το πώς η αλληλεπίδραση γονιδίων και θρεπτικών συστατικών σχετίζεται με την παθογένεια των καρδιαγγειακών νοσημάτων (Stover PJ, 2004).

7.2. Αλληλεπίδραση μεταξύ πολυμορφισμών και μεσογειακής διατροφής

Δεν υπάρχουν έρευνες που να μελετούν την αλληλεπίδραση μεταξύ πολυμορφισμών στο γονίδιο του TGF-β2 και θρεπτικών συστατικών. Ωστόσο, σε μελέτη που πραγματοποίησαν οι Τριχοπούλου και συν. εξετάστηκαν οι συνέπειες της ταυτόχρονης ύπαρξης ενός υψηλού σκορ γενετικής προδιάθεσης (Genetic Predisposition Score, GPS) και μη γενετικών παραγόντων κινδύνου στη στεφανιαία νόσο.

Το δείγμα της έρευνας ήταν 399 Έλληνες, 202 ασθενείς με ιατρικά επιβεβαιωμένο στεφανιαίο επεισόδιο και 197 υγιείς. Μελετήθηκαν συνολικά 11 πολυμορφισμών και το σκορ γενετικής προδιάθεσης που χρησιμοποιήθηκε έπαιρνε τιμές από 0 έως 11 και χαρακτηριζόταν ως υψηλό για τιμές $\geq 3,5$. οι πολυμορφισμοί ήταν οι εξής: *μεταβολισμός λιπιδίων*: απολιποπρωτεΐνη APO E ε2/ε3/ε4 πολυμορφισμοί (GenBank M10065: rs429358 και rs7412), απολιποπρωτεΐνη APOA5-1131T_C (GenBank AY422949: rs662799), απολιποπρωτεΐνη APOC3 3238C_G (GenBank AY422951: rs5128) και λιποπρωτεϊνική λιπάση (LPL) D9N, N291S και S447X (GenBank M15856: rs1801177, rs268 και rs328, αντίστοιχα). *Μεταβολισμός ομοκυστεΐνης*:

μεθυλεντετραϋδροφολική ρεδουκτάση (MTHFR) 677C_T (GenBank AY338232: rs1801133). *Ακεραιότητα ενδοθηλιακών κυττάρων*: ενδοθηλιακή συνθάση νιτρικών οξειδίων (NOS3) E298D (GenBank AF519768: rs1799983). *Φλεγμονή*: Ιντερλευκίνη (IL)-1_-511C_T (GenBank AY137079: rs16944) και IL6-174G_C (GenBank AF372214: rs1800795). *Παράγοντας νέκρωσης όγκου-α* (TNF-α)-308G_A (GenBank AB103618: rs1800629).

Αξιολογήθηκε η ταυτόχρονη δράση του GPS και κάποιων σημαντικών παραγόντων στεφανιαίου κινδύνου στο έμφραγμα του μυοκαρδίου. Αυτοί οι παράγοντες ήταν το κάπνισμα, η υπέρταση, η HDL-C, η non-HDL-C και η διατροφή. Η διατροφή αξιολογήθηκε με ένα σκορ μεσογειακής διατροφής που ενσωμάτωνε τα εμφανή χαρακτηριστικά αυτής, δηλαδή, την υψηλή πρόσληψη φρούτων, λαχανικών και ελαιολάδου, τη χαμηλή πρόσληψη κρέατος και γαλακτοκομικών προϊόντων και τη μέτρια κατανάλωση κρασιού. Το σκορ έπαιρνε τιμές από 0 έως 9 και χαρακτηριζόταν ως υψηλό για τιμές ≥ 5 (οι υψηλότερες τιμές δείχνουν μεγαλύτερη υιοθέτηση της μεσογειακής διατροφής). Το σκορ συνδέεται έντονα με το θάνατο από στεφανιαία νόσο, με τις χαμηλότερες τιμές του σκορ να συνδέονται με υψηλότερη συχνότητα θανάτου από στεφανιαίο νόσο.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ταυτόχρονη ύπαρξη υψηλού κινδύνου γενετικής προδιάθεσης και υψηλού κινδύνου από μη γενετικούς παράγοντες χαρακτηρίζεται από σχετικό λόγο για στεφανιαία νέκρωση που είναι αρκετά υψηλότερος σε σχέση με το σχετικό λόγο των ατόμων με χαμηλή γενετική προδιάθεση και έκθεση στους αντίστοιχους μη γενετικούς παράγοντες κινδύνου (κάπνισμα OR: 2,62 vs 1,20, υπέρταση OR: 2,88 vs 1,08, HDL-C OR: 3,50 vs 1,69, non-HDL-C OR: 3,05 vs 1,01, σκορ μεσογειακής διατροφής OR: 3,66 vs 1,74). Προέκυψαν, επίσης, στοιχεία για στατιστική αλληλεπίδραση με την υπέρταση και τα επίπεδα της non-HDL-C. Το συμπέρασμα, επομένως, είναι ότι η γενετική προδιάθεση μπορεί να αλληλεπιδράσει με την υπέρταση και ίσως με τη non-HDL-C στην πρόκληση στεφανιαίας νόσου, ενώ η ταυτόχρονη ύπαρξη γενετικής προδιάθεσης ή/ και χαμηλής υιοθέτησης της μεσογειακής διατροφής, καπνίσματος, χαμηλής HDL-C φαίνεται να έχουν παρόμοιες επιδράσεις (Trichopoulou A et al., 2008).

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

8. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της μελέτης είναι η διερεύνηση της επίδρασης της μεσογειακής διατροφής στην παρουσία στεφανιαίας νόσου. Επίσης, εξετάζεται η συμβολή 10 πολυμορφισμών στο γονίδιο TGF- β στην παρουσία στεφανιαίας νόσου, καθώς και η αλληλεπίδραση μεταξύ αυτών και του μεσογειακού σκορ στην παρουσία στεφανιαίας νόσου. Παράλληλα, εξετάζεται η επίδραση των κλασσικών παραγόντων κινδύνου.

9. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

9.1 Δείγμα Μελέτης

Συλλέχθηκε δείγμα 305 ασθενών με στεφανιαία νόσο και 305 ελέγχων. Τα χαρακτηριστικά των ομάδων φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 9.1. Χαρακτηριστικά δείγματος

ΟΜΑΔΑ ΑΣΘΕΝΩΝ (n=305)	
Γενικά χαρακτηριστικά	Ασθενείς με Στεφανιαία Νόσο
Κριτήριο επιλογής	• Στένωση $\geq 50\%$ σε ένα ή περισσότερα από τα 3 κύρια στεφανιαία αγγεία που προσδιορίστηκε με στεφανιογραφικό έλεγχο, απουσία οξέος στεφανιαίου συνδρόμου • Ασθενείς που έχουν υποστεί οξύ στεφανιαίο σύνδρομο
ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ (n=305)	
Γενικά χαρακτηριστικά	Υγιή άτομα αντίστοιχου φύλου και ηλικιακής ομάδας
Κριτήριο επιλογής	• Απουσία στένωσης των στεφανιαίων αγγείων μετά από στεφανιογραφικό έλεγχο, ή αρνητική δοκιμασία κόπωσης ή απουσία συμπτωμάτων στεφανιαίας νόσου • Απουσία άλλης καρδιαγγειακής νόσου, καρκίνου ή άλλης νόσου φλεγμονώδους αιτιολογίας • Κατανομή φύλου και ηλικιών αντίστοιχη με των ασθενών της μελέτης

Η συλλογή του δείγματος έγινε από το Ωνάσειο Καρδιοχειρουργικό Κέντρο. Όλοι οι ασθενείς αφού ενημερώθηκαν για τους σκοπούς της μελέτης έδωσαν ενυπόγραφη συγκατάθεση για τη συμμετοχή τους.

9.2 Συλλογή Δεδομένων

Ιατρικό ιστορικό: λήφθηκε από τους συμμετέχοντες αναλυτικό ιατρικό ιστορικό και έγινε αναλυτική καταγραφή της φαρμακευτικής αγωγής πριν και κατά τη διάρκεια της νοσηλείας, καθώς και το πόρισμα της στεφανιογραφίας εφόσον ήταν διαθέσιμο.

Οικογενειακό ιστορικό: λήφθηκε αναλυτικό οικογενειακό ιστορικό, για τους πρώτου βαθμού συγγενείς, για την στεφανιαία νόσο αλλά και για όλους τους παράγοντες κινδύνου.

Εργαστηριακές αναλύσεις: περιέλαβαν πλήρη εξέταση αίματος καθώς και εκτίμηση βιοχημικών δεικτών (γλυκόζη, ολική χοληστερόλη, LDL χοληστερόλη, HDL χοληστερόλη, τριγλυκερίδια). Οι αναλύσεις έγιναν από τα συνεργαζόμενα νοσοκομεία.

Δημογραφικά στοιχεία: ερωτηματολόγιο που αφορούσε σε δημογραφικούς παράγοντες (καταγωγή, ημερομηνία γέννησης, επίπεδο εκπαίδευσης, κάπνισμα, ετήσιο οικογενειακό εισόδημα) συμπληρώθηκε από όλους τους συμμετέχοντες.

Αξιολόγηση ανθρωπομετρικών δεικτών

Στους εθελοντές μετρήθηκε το ύψος, το βάρος και υπολογίστηκε ο δείκτης μάζας σώματος (Body Mass Index, BMI). Μετρήθηκαν επίσης οι περιφέρειες μέσης και γλουτών και υπολογίστηκε ο λόγος περιφέρειας μέσης/ περιφέρεια γλουτών.

Αναλυτική πορεία

Το σωματικό βάρος των εθελοντών μετρήθηκε με μηχανικό ζυγό ακριβείας με ολισθαίνον αντίβαρο (SECA) στο πλησιέστερο 0,5 kg με ελαφρύ ρουχισμό και χωρίς παπούτσια. Οι εξεταζόμενες τοποθετούνταν στο ζυγό όρθιες, ακίνητες στο κέντρο της πλατφόρμας του ζυγού και ζητήθηκε να κοιτάζουν μπροστά χωρίς να στηρίζονται κάπου. Ο ζυγός βαθμονομείται σε τακτά χρονικά διαστήματα (σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή) με τη χρήση πρότυπων βαρών με σκοπό την εξασφάλιση της αξιοπιστίας και της ακρίβειας.

Το ύψος μετρήθηκε στο πλησιέστερο 0,5 cm με σταθερό κατακόρυφο αναστημόμετρο (SECA). Το ύψος μετριέται από την κορυφή του κρανιακού θόλου μέχρι το επίπεδο των πελμάτων. Οι εξεταζόμενες τοποθετούνταν στο αναστημόμετρο όρθιες, χωρίς παπούτσια και κάλτσες, με τις πτέρνες ενωμένες, τα γόνατα ίσια, τους ώμους χαλαρούς και τις παλάμες να ακουμπούν στους μηρούς. Οι πτέρνες, οι γλουτοί, το θωρακικό κύρτωμα της σπονδυλικής στήλης και η οπίσθια επιφάνεια του κρανίου να εφάπτονται στον κατακόρυφο άξονα του οργάνου. Επίσης, ζητήθηκε από τις εξεταζόμενες να τοποθετούν το κεφάλι τους στη θέση

Frankfort horizontal plane, δηλαδή σε θέση ώστε η ευθεία γραμμή μεταξύ του χαμηλότερου σημείου του οφθαλμικού κόγχου και της χόνδρινης προβολής μπροστά από το εξωτερικό άνοιγμα του πτερυγίου του αυτιού να είναι οριζόντια. Σε αυτή τη θέση, οι εξεταζόμενες έπαιρναν μια αργή και βαθειά εισπνοή, ώστε να εκταθεί η σπονδυλική στήλη, και να την κρατούσαν μέχρι να ολοκληρωθεί η μέτρηση (National Health and Nutrition Examination Survey, 2000).

Ο δείκτης μάζας σώματος (Body Mass Index, BMI) υπολογίστηκε με τον τύπο $BMI = \text{ΒΑΡΟΣ (kg)} / \text{ΥΨΟΣ}^2 (\text{m}^2)$.

Οι περιφέρειες μέσης και γλουτών μετρήθηκαν με μη ελαστική βαθμονομημένη ταινία στο πλησιέστερο 0,1 cm. Οι εξεταζόμενοι τοποθετούνταν όρθιοι με τα πόδια ενωμένα. Η περιφέρεια μέσης μετρήθηκε στη πιο στενή περιοχή της μέσης, μεταξύ της τελευταίας πλευράς και του ομφαλού. Σε παχύσαρκα άτομα, η μέτρηση γίνεται στη περιοχή του ομφαλού. Η μέτρηση λαμβάνεται στο τέλος μια φυσιολογικής εκπνοής. Η περιφέρεια γλουτών μετρήθηκε στη μέγιστη περιφέρεια των ισχίων. Οι μετρήσεις λαμβάνονται με την ταινία σε παράλληλο επίπεδο. Λαμβάνονται 2 μετρήσεις και σε περίπτωση που διαφέρουν περισσότερο από 1 cm λαμβάνεται και τρίτη. Το αποτέλεσμα είναι ο μέσος όρος των μετρήσεων (Heyward VH & Stolarczyk LM, 1996).

Διατροφική αξιολόγηση

Διατροφική αξιολόγηση έγινε μόνο στους ασθενείς με πρώτη εμφάνιση εμφράγματος μυοκαρδίου ή πρώτη διάγνωση στεφανιαίας νόσου καθώς και στην ομάδα ελέγχου.

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

9.3 Αποτίμηση σκορ μεσογειακής διατροφής

Η αξιολόγηση της συμμόρφωσης των συμμετεχόντων στο πρότυπο της Μεσογειακής Διατροφής έγινε με τη χρήση σκορ που αναπτύχθηκε από τους Panagiotakos et al., 2007.

Σύμφωνα με τις Μεσογειακές διαιτητικές συνήθειες, το σκορ συμπεριλαμβάνει την εβδομαδιαία κατανάλωση των ακόλουθων 9 ομάδων τροφίμων: μη επεξεργασμένα δημητριακά

(ολικής αλέσεως ψωμί και ζυμαρικά, καστανό ρύζι, κτλ), φρούτα, λαχανικά, όσπρια, πατάτες, ψάρια, κρέας και προϊόντα κρέατος, πουλερικά, πλήρη γαλακτοκομικά προϊόντα (τυρί, γιαούρτι, γάλα), ελαιόλαδο και αλκοόλ. Έπειτα, με βάση την προτεινόμενη πρόσληψη χρησιμοποιήθηκαν από τους ερευνητές μονοτονικές συναρτήσεις (εκτός από το αλκοόλ) έτσι ώστε να μπορεί να αξιολογηθεί η συχνότητα κατανάλωσης των τροφίμων αυτών.

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

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

Πίνακας 9.2. Το Μεσογειακό Διατροφικό Σκορ

	Συχνότητα κατανάλωσης (μερίδες/ εβδομάδα)					
Μη επεξεργασμένα Δημητριακά	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
Ψάρια	Ποτέ	<1	1-2	3-4	5-6	>6
	0	1	2	3	4	5
Κόκκινο κρέας και προϊόντα του	≤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
Ελαιόλαδο στο μαγείρεμα (φορές/εβδομάδα)	Ποτέ	Σπάνια	<1	1-3	3-5	Καθημερινά
	0	1	2	3	4	5
Αλκοολούχα ροφήματα (ml/ημέρα, 100 ml = 12 gr αιθανόλης)	<300	300	400	500	600	>700 ή 0
	5	4	3	2	1	0

9.4 Αξιολόγηση παραγόντων κινδύνου

Υπερχοληστερολαιμία: Ολική χοληστερόλη >200 mg/dl ή/και LDL χοληστερόλη >130mg/dl ή/και χορήγηση υπολιπιδαιμικής αγωγής

Υπέρταση: Συστολική αρτηριακή πίεση>140mmHg ή/και διαστολική αρτηριακή πίεση >90mmHg ή/και χορήγηση αντιυπερτασικής αγωγής

Σακχαρώδης διαβήτης: Γλυκόζη νηστείας>126mg/dl ή/και σάκχαρο αίματος>200mg/dl, 2 ώρες μετά από χορήγηση 75gr γλυκόζης ή/και χορήγηση αντιδιαβητικής αγωγής

Ιστορικό καπνίσματος: οι νυν και πρώην καπνιστές συμπεριλήφθησαν στην ομάδα με θετικό ιστορικό καπνίσματος

Οικογενειακό ιστορικό στεφανιαίας νόσου: ιστορικό εμφράγματος μυοκαρδίου στον πατέρα σε ηλικία <55 έτη ή/ και στη μητέρα σε ηλικία <65 έτη

9.5 Απομόνωση DNA

Η απομόνωση DNA έγινε από λευκοκύτταρα περιφερικού αίματος από ολικό αίμα όγκου 3 ml με τη μέθοδο NaCl (Miller SA et al., 1988). Το δείγμα αίματος μετά την λήψη του τοποθετήθηκε σε φιαλίδιο που περιείχε Na₂EDTA ως αντιπηκτικό.

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος χρησιμοποιεί τα εμπύρηννα κύτταρα του αίματος ως πηγή DNA. Η εκχύλιση και ο καθαρισμός του DNA περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- Ωσμωτική λύση των ερυθροκυττάρων και συλλογή των εμπύρηνων λευκών αιμοσφαιρίων.
- Διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών των λευκοκυττάρων και συλλογή των πυρήνων με φυγοκέντρωση.
- Λύση των πυρηνικών μεμβρανών.
- Επώαση του πυρηνικού υλικού με πρωτεϊνάση για την άμεση καταστροφή των νουκλεασών.
- Απομάκρυνση της πρωτεϊνάσης και των πρωτεϊνών παρουσία κορεσμένου διαλύματος NaCl.
- Κατακρήμνιση του DNA που βρίσκεται στο διάλυμα αυτό με προσθήκη αλκοόλης.
- Διάλυση σε απεσταγμένο νερό.

Αναλυτική πορεία

Η μέθοδος ολοκληρώνεται σε διάστημα 2 ημερών. Τα βήματα που ακολουθούνται κάθε πειραματική ημέρα περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω:

HMEPA 1^η

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

HMEPA 2^η

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

4. Μεταφορά υπερκείμενου σε σωλήνα Falcon 50ml που περιέχει 12-15ml αιθανόλης 96% και ήπια ανάδευση. Σε αυτή τη φάση γίνεται ορατό το DNA. Συγκέντρωση DNA σε κουβάρι σε roller bench.
7. Απομάκρυνση DNA από το διάλυμα με πιπέτα με κίτρινο tip σε eppendorf 1.5ml στο οποίο έχουμε προηγουμένως τοποθετήσει 1ml αιθανόλης 70%.
8. Προσθήκη 4-5 σταγόνων οξικού αμμωνίου 10M.
9. Φυγοκέντρωση (15min, 14000g, 20°C) .
10. Άδειασμα υπερκείμενου και στέγνωμα για 20-30min έως ότου να μην υπάρχουν υπολείμματα αιθανόλης.
11. Προσθήκη 0,5ml απεσταγμένου νερού.
12. Διαλυτοποίηση DNA με παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 1 εβδομάδα.

9.6 Ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης DNA

Η ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης DNA σε κάθε δείγμα έγινε με τη χρήση του Quant-iT dsDNA BR Assay kit της εταιρείας Invitrogen και του Qubit fluorometer Q32857 της ίδιας εταιρείας.

Αρχή της μεθόδου

Μια φθορίζουσα χρωστική προστίθεται στα δείγματα DNA. Η ουσία αυτή έχει την ικανότητα να δεσμεύεται σε μόρια δίκλωνου DNA. Στη συνέχεια, τα δείγματα φωτομετρούνται σε φωτόμετρο φθορισμού και με βάση την απορρόφηση της φθορίζουσας ουσίας προσδιορίζεται η συγκέντρωσή τους. Πριν από τη μέτρηση των δειγμάτων, φωτομετρούνται 2 δείγματα γνωστής συγκέντρωσης DNA και βάση της μέτρησης αυτής δημιουργείται πρότυπη καμπύλη αναφοράς, η οποία χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των δειγμάτων. Οι διαδικασίες αυτές γίνονται αυτόματα από το φωτόμετρο, το οποίο δίνει τελική τιμή συγκέντρωσης ανά δείγμα σε $\mu\text{g/ml}$.

Αναλυτική πορεία

Το kit αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκε περιέχει έτοιμα διαλύματα που περιλαμβάνουν: 2 διαλύματα DNA γνωστής συγκέντρωσης (standards), 1 διάλυμα buffer και 1 διάλυμα με τη φθορίζουσα χρωστική. Η πορεία που ακολουθήθηκε έχει ως εξής:

- Παρασκευάζεται το διάλυμα εργασίας με την ανάμειξη 1μl*n διαλύματος της χρωστικής και 199μl*n διαλύματος buffer, όπου n=αριθμός δειγμάτων + 2 standards). Η αραίωση της ουσίας φθορισμού είναι 1:200.
- Στη συνέχεια προετοιμάζονται 2 νέα διαλύματα από τα αρχικά διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης DNA προσθέτοντας 10μl από κάθε ένα από τα αρχικά διαλύματα DNA και 190μl διαλύματος εργασίας. Αναδεύονται ήπια και παραμένουν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μετά προετοιμάζονται τα προς φωτομέτρηση δείγματα DNA τοποθετώντας 198μl διαλύματος εργασίας και 2 μl από το δείγμα DNA. Αναδεύονται ήπια και παραμένουν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Τέλος, φωτομετρούνται αρχικά τα διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης DNA για τη δημιουργία από το μηχάνημα της πρότυπης καμπύλης αναφοράς και στη συνέχεια τα δείγματα.

9.7 Επιλογή των πολυμορφισμών - Ο αλγόριθμος του Carlson

Ο αλγόριθμος του Carlson, που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη για την επιλογή των πολυμορφισμών στα γονίδια ενδιαφέροντος, εφαρμόζεται για την επιλογή ενός αριθμού πολυμορφισμών-δεικτών, μέσω των οποίων όλοι οι πολυμορφισμοί της περιοχής πάνω από μια δεδομένη συχνότητα σπάνιου αλληλομόρφου είτε ταυτοποιούνται άμεσα, είτε σχετίζονται με τους πολυμορφισμούς-δείκτες επειδή βρίσκονται πάνω από ένα ορισμένο επίπεδο του συντελεστή r^2 με αυτούς (Carlson S et al., 2004).

Για την επιλογή των πολυμορφισμών στα γονίδια ενδιαφέροντος χρησιμοποιήθηκε σαν πληθυσμός αναφοράς ο πληθυσμός CEU (Centre D' Etudes du Polymorphisme Humain) που μελετήθηκε στο International HapMap Project. Στον πληθυσμό αυτόν συμπεριλήφθησαν 90 άτομα (3 άτομα από 30 οικογένειες) από τις ΗΠΑ (με καταγωγή από τη βόρεια και δυτική Ευρώπη) που χρησιμοποιήθηκαν για τον εντοπισμό κοινών πολυμορφισμών (συχνότητα σπάνιου αλληλομόρφου >5%) στο γονιδίωμα, καθώς και του βαθμού ανισορροπίας σύνδεσης μεταξύ τους. Ο πληθυσμός αυτός χρησιμοποιείται ευρύτατα σαν πληθυσμός αναφοράς για την επιλογή πολυμορφισμών-δεικτών και τον εντοπισμό αλληλομόρφων που σχετίζονται με χρόνια νοσήματα σε Καυκάσιους πληθυσμούς (The International HapMap Consortium, 2005) .

Με βάση τον πληθυσμό αυτόν εφαρμόστηκε ο αλγόριθμος του Carlson με κατώφλι του συντελεστή $r^2 \geq 0.8$ και ελάχιστη συχνότητα αλληλομόρφου $\geq 10\%$. Στην επιλογή των

πολυμορφισμών συμπεριλήφθησαν και οι αλληλουχίες που βρίσκονται 10 kb πριν την αρχή και μετά το τέλος κάθε γονιδίου. Η εφαρμογή του αλγόριθμου έγινε με τη χρήση ειδικού προγράμματος που διατίθεται διαδικτυακά στη διεύθυνση <http://gvs.gs.washington.edu/GVS/>

9.8 Αντιδράσεις γονοτύπησης

Η γονοτύπηση των πολυμορφισμών έγινε σε συνεργασία με το τμήμα Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου του Tartu με τεχνική η οποία περιλαμβάνει επέκταση εκκινητών σε μικροσυστοιχία (Arrayed Primer Extension-2, APEX-2).

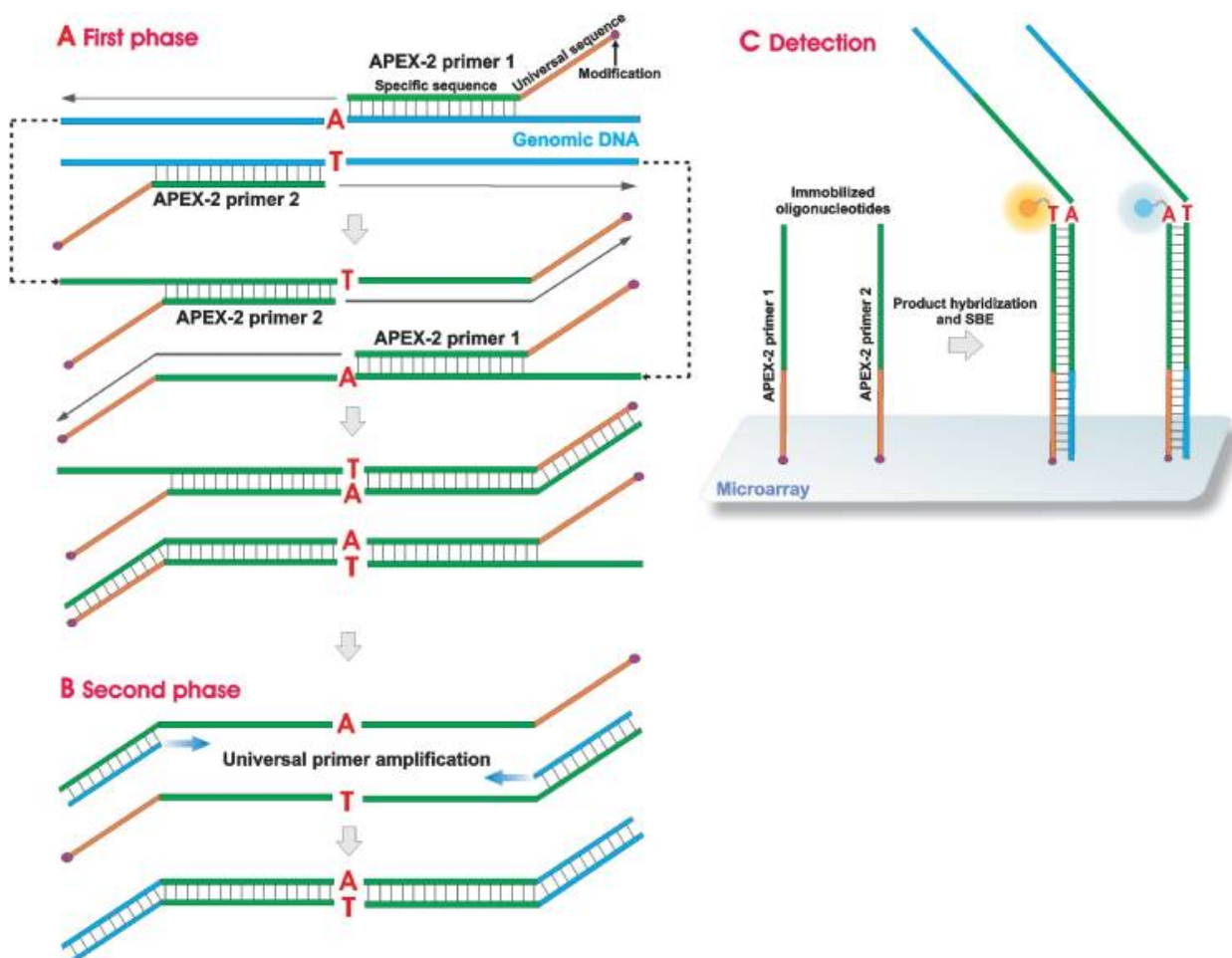
Αρχή της μεθόδου

Η επέκταση εκκινητών σε μικροσυστοιχίες αναφέρθηκε πρώτη φορά στη βιβλιογραφία πριν από μία δεκαετία και αποτελεί πια μέθοδο ρουτίνας στη ανίχνευση πολυμορφισμών. Αρχικά περιλάμβανε 4 στάδια: (1) πολλαπλασιασμό της περιοχής ενδιαφέροντος του DNA (2) κατακερματισμό (fragmentation) του DNA και υβριδοποίησή του στην μικροσυστοιχία (3) ενζυματική επέκταση κατά μια βάση και (4) ανίχνευση του σήματος. Με την τεχνική αυτή μέχρι πρόσφατα μπορούσαν να γονοτυπηθούν έως 48 πολυμορφισμοί στην ίδια αντίδραση. Η τεχνική APEX-2 αποτελεί μια βελτιωμένη εκδοχή της παραδοσιακής τεχνικής που επιτρέπει την ταυτόχρονη γονοτύπηση σε μια αντίδραση έως και 640 πολυμορφισμών με τη χρήση πολλαπλής αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (multiplex Polymerase Chain reaction, multiplex PCR) και στη συνέχεια με επέκταση κατά μια βάση πάνω στη μικροσυστοιχία. Η αρχή της μεθόδου APEX-2 φαίνεται στην εικόνα 9.1.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται στην μέθοδο αυτοί αποτελούνται από μια περιοχή συμπληρωματική της περιοχής ακριβώς πριν τη θέση του κάθε πολυμορφισμού και από μια κοινή αλληλουχία για όλους τους πολυμορφισμούς. Οι εκκινητές αυτοί φέρουν τροποποίηση στην αμινομάδα του 5' άκρου τους ώστε να είναι δυνατή η ακινητοποίησή τους πάνω στη μικροσυστοιχία με ομοιοπολικό δεσμό. Δυο τέτοια ολιγονουκλεοτίδια για κάθε πολυμορφισμό τοποθετούνται σε συγκεκριμένες θέσεις πάνω στη μικροσυστοιχία.

Τα ίδια ολιγονουκλεοτίδια χρησιμοποιούνται σε 2 αντιδράσεις PCR: (α) μια αντίδραση πολλαπλού PCR (multiplex) και (β) μια αντίδραση φωλεακού PCR (nested PCR). Στην πρώτη αντίδραση υβριδοποιούνται οι ειδικοί για κάθε πολυμορφισμό εκκινητές (specific primers) στο γενωμικό DNA, ενώ στη δεύτερη υβριδοποιούνται οι κοινοί εκκινητές (universal primers) στο προϊόν της πρώτης αντίδρασης. Το προϊόν που προκύπτει από τις αντιδράσεις αυτές (μεγέθους 79-130bp) αποδιατάσσεται και υβριδοποιείται στα ακινητοποιημένα στη μικροσυστοιχία

ολιγονουκλεοτίδια. Στη συνέχεια, γίνεται αντίδραση επέκτασης κατά μια βάση με χρήση δι-δεοξυνουκλεοτιδίων (4 χρωμάτων) και ανίχνευση του σήματος φθορισμού.



Εικόνα 9.1: Αρχή της μεθόδου. **A.** Στην πρώτη φάση (first phase), οι ειδικοί για κάθε πολυμορφισμό εκκινητές (APEX-2 primers) προσδένονται ακριβώς πριν το σημείο του πολυμορφισμού. Μετά την επιμήκυνση των εκκινητών, η συντιθέμενη αλληλουχία περιλαμβάνει μια περιοχή συμπληρωματική του αντίστοιχου εκκινητή, καθώς και μια περιοχή συμπληρωματική του σημείου που βρίσκεται ο πολυμορφισμός. Το δεύτερο στάδιο της επιμήκυνσης των εκκινητών δίνει αλληλουχία συμπληρωματική του κοινού (universal) εκκινητή. **B.** Στη δεύτερη φάση (second phase), ο κοινός εκκινητής υβριδοποιείται στο 3' άκρο του προϊόντος της προηγούμενης φάσης. **Γ.** Οι ειδικοί εκκινητές φέρουν τροποποίηση από αμινομάδα στο 5' άκρο τους γεγονός που καθιστά δυνατή την ακινητοποίησή τους πάνω στη μικροσυστοιχία (microarray). Τα προϊόντα της φάσης 2 που έχουν υποστεί καθαρισμό υβριδοποιούνται στους ακινητοποιημένους εκκινητές. Η ταυτοποίηση των γονοτύπων γίνεται στη συνέχεια με μια αντίδραση επέκτασης κατά μία βάση τεσσάρων χρωμάτων (4-colour single-base extension reaction, SBE).

Αναλυτική πορεία

1. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ

Οι ειδικοί για κάθε πολυμορφισμό εκκινητές σχεδιάστηκαν με βάση τις αλληλουχίες 50bp πριν και μετά τη θέση του κάθε πολυμορφισμού. Σαν αλληλουχία αναφοράς του ανθρώπινου

γονιδιώματος χρησιμοποιήθηκε η NCBI Build 36. Σχεδιάστηκε αλληλουχία συμπληρωματική της 3'→5' αλυσίδας. Με αποκοπή του 5' άκρο επετεύχθη βέλτιστη θερμοκρασία τήξεως για όλους τους εκκινητές 57-62°C η οποία υπολογίστηκε με το πρόγραμμα Primer 3. Η ειδικότητα των εκκινητών αξιολογήθηκε με το πρόγραμμα Genome Tester 1.3 για να εξασφαιστεί η δημιουργία μόνο του επιθυμητού προϊόντος από τους συγκεκριμένους εκκινητές. Οι εκκινητές αξιολογήθηκαν περαιτέρω για την τυχόν παρουσία πολυμορφισμών στην περιοχή υβριδοποίησης τους με το πρόγραμμα SNPmasker.

Η δημιουργία των εκκινητών ολοκληρώθηκε με προσθήκη της κοινής (universal) αλληλουχίας (5'-GATCAGGCGTCTGTCGTGCTC-3') στο 5' άκρο. Στη συνέχεια έγινε τροποποίηση στο 5' άκρο με την προσθήκη C6-aminolinker, ώστε να είναι δυνατή η ακινητοποίηση πάνω στη μικροσυστοιχία. Η προμήθεια των ολιγονουκλεοτιδίων έγινε από την Metabion International AG. Η αρχική συγκέντρωση ήταν 100pmol/μl.

2. ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΛΑΠΛΟΥ PCR (MULTIPLEX PCR)

Πριν από την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης τα δείγματα DNA (συγκέντρωσης 50-100μg/μl) αποδιατάχθηκαν για 5 λεπτά στους 98°C και μετά αποθηκεύτηκαν στους 4°C. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 15 μl. Το μίγμα της αντίδρασης περιείχε:

- Ισοτονικό διάλυμα PCR (60 mM Tris-HCl pH 8.3, 60 mM KCl, 15 mM (NH₄)₂SO₄)
- 5.75 mM MgCl₂
- 0.2 mM από κάθε δεόξυ-τριφωσφορικό νουκλεοτίδιο (dNTPs) (Fermentas, Lithuania)
- 2.5 U TrueStartTM *Taq* DNA πολυμεράσης (Fermentas)
- 30 nM από κάθε εκκινητή (Metabion Int. AG)
- ~300 ng αποδιαταγμένο γενωμικό DNA

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στον θερμικό κυκλοποιητή ABI GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) χρησιμοποιώντας τις παρακάτω συνθήκες:

- 95°C για 2 λεπτά (αρχική αποδιάταξη)
- 25 κύκλοι:
 - (1) 95°C για 30 δευτερόλεπτα (αποδιάταξη)
 - (2) 62°C για 1 λεπτό (σύνδεση εκκινητών)

(3) 72°C για 20 δευτερόλεπτα (επιμήκυνση)

- 72°C για 5 λεπτά (τελική επιμήκυνση)

3. ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΦΩΛΕΑΚΟΥ PCR (NESTED PCR)

Η αντίδραση του φωλεακού PCR (nested PCR) πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 150 μl. Το μίγμα της αντίδρασης περιείχε:

- 15 μl από το προϊόν της αντίδρασης της πρώτης φάσης
- Ρυθμιστικό διάλυμα PCR (80 mM Tris pH 9.5, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0.2% w/v Tween-20) (Solis Biodyne, Tartu Estonia)
- 0.3 mM από κάθε από κάθε δεόξυ-τριφωσφορικό νουκλεοτίδιο (dNTPs) (Fermentas, Lithuania)
- 3 mM MgCl₂
- 20 U HOT FIREPol[®] *Taq* DNA πολυμεράσης (Solis Biodyne)
- 7.5 μM από τον κοινό (universal) εκκινητή (5'-GATCAGGCGTCTGTCGTGCTC-3') (Metabion Int. AG)

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στον θερμικό κυκλοποιητή TProfessional Basic (Biometra, Göttingen, Germany) χρησιμοποιώντας τις παρακάτω συνθήκες:

- 95°C για 2 λεπτά (ενεργοποίηση ενζύμου και αρχική αποδιάταξη);
- 35 κύκλοι:
 - (1) στους 95°C για 20 δευτερόλεπτα (αποδιάταξη),
 - (2) στους 54°C για 20 δευτερόλεπτα (σύνδεση εκκινητών)
 - (3) στους 72°C για 5 δευτερόλεπτα (επιμήκυνση)
- 72°C για 5 λεπτά (τελική επιμήκυνση)

Για να διαπιστωθεί το μέγεθος του προϊόντος της αντίδρασης έγινε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης 1%. Στη συνέχεια, έγινε καθαρισμός (purification) στα προϊόντα της

αντίδρασης της δεύτερης φάσης με το kit αντιδραστηρίων NucleoSpin[®] Extract II (Macherey-Nagel, Düren, Germany) single columns σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή.

4. ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΑ ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ (OLIGONUCLEOTIDE MICROARRAY)

Η προμήθεια των slides των ολιγονουκλεοτιδικών μικροσυστοιχιών έγινε από την Asper Biotech, Ltd., Tartu, Estonia (<http://www.asperbio.com/>). Τα ολιγονουκλεοτίδια ακινητοποιήθηκαν πάνω στη μικροσυστοιχία σε προκαθορισμένες θέσεις με τη χρήση του προγράμματος Chip WriterTM Pro System.

5. ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΕΠΕΚΤΑΣΗΣ ΚΑΤΑ ΜΙΑ ΒΑΣΗ ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΣΗΜΑΤΟΣ

Πριν από την αντίδραση επέκτασης των εκκινητών με διδεόξυνουκλεοτίδια, έγινε χειρισμός των καθαρισμένων προϊόντων με αλκαλική φωσφατάση (Shrimp Alkaline Phosphatase) για να απομακρυνθούν τυχόν εναπομείναντα ενεργά δεόξυνουκλεοτίδια.

Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε έκλουση με 28 μl διαλύματος έκλουσης, και έγινε επίδραση με αλκαλική φωσφατάση (shrimp alkaline phosphatase-SAP). Συγκεκριμένα, έγινε επώαση 26 μl καθαρισμένου προϊόντος PCR στους 37°C για 15 min με:

- 3 μl ισοτονικού διαλύματος APEX PCR (500 mM Tris-HCl (pH 9.5)
- 85 mM MgCl₂, 100 mM KCl)
- 0.25 U SAP (Fermentas)

Ακολούθησε απενεργοποίηση του SAP στους 95°C για 5 λεπτά. Πριν από την αντίδραση επέκτασης κατά μια βάση, τα DNA-στόχοι (templates) αποδιατάχθηκαν στη μικροσυστοιχία στους 95°C για 5 λεπτά. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 30 μl και το μίγμα περιείχε:

- 1.5 mM από κάθε μείγμα διδεόξυνουκλεοτιδίων: Cy3-ddATP, Cy5-ddGTP, Texas Red-ddCTP (Perkin Elmer Life Science, Waltham, Massachusetts, USA) και Fluoresceine-12-ddUTP (ENZO Life Science, Farmingdale, NY, USA)
- 4.8 U ενζύμου ThermoSequenaseTM (GE Healthcare, Waukesha, WI, USA)

- 1 μl διαλύματος του ενζύμου (GE Healthcare).

Το μίγμα της αντίδρασης του SBE εφαρμόστηκε σε μικροσυστοιχίες που είχαν προθερμανθεί και καλυφθεί με LifterSlip™ (22 × 25 mm, Erie Scientific Company, Portsmouth, NH, USA). Ο υβριδισμός και οι αντιδράσεις APEX-2 πραγματοποιήθηκαν στους 58°C για 20 λεπτά και τερματίστηκαν ως εξής:

- πλύσιμο στους 95°C για 1 λεπτό με απεσταγμένο νερό,
- πλύσιμο για 3 λεπτά σε διάλυμα Alconox® 0.3% (Alconox, White Plains, NY, USA),
- πλύσιμο δύο φορές στους 95°C για 1 λεπτό με απεσταγμένο νερό (για να απομακρυνθεί το διάλυμα Alconox)

Τα σήματα υβριδισμού ανιχνεύτηκαν με το σύστημα Genorama™ Imaging System (Asper Biotech Ltd.) και οι περιοχές ενδιαφέροντος ταυτοποιήθηκαν με το λογισμικό Genorama™ Genotyping Software 4.2 (Asper Biotech Ltd.).

9.9 Στατιστική Ανάλυση

Οι συνεχείς μεταβλητές παρουσιάζονται ως μέσος $\pm$ τυπική απόκλιση, ενώ οι κατηγορικές μεταβλητές παρουσιάζονται ως απόλυτες και σχετικές συχνότητες. Η ανάλυση Student's t χρησιμοποιήθηκε για να αξιολογηθούν οι συσχετίσεις μεταξύ κατηγορικών και συνεχών μεταβλητών, ενώ ο έλεγχος χ^2 χρησιμοποιήθηκε για να αξιολογηθούν οι συσχετίσεις μεταξύ κατηγορικών μεταβλητών. Οι έλεγχοι αυτοί πραγματοποιήθηκαν με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 13.0.

Για τις γενετικές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα PLINK 1.2. Σε πρώτη φάση έγινε ποιοτικός έλεγχος για κάθε δείγμα, αλλά και για κάθε πολυμορφισμό, που αφορούσε στο ποσοστό επιτυχίας στην ταυτοποίηση των γονοτύπων.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε σύγκριση της κατανομής του πολυμορφισμού στο δείγμα με την αναμενόμενη κατανομή που προκύπτει από την ισορροπία Hardy-Weinberg. Στον έλεγχο αυτό συμπεριλήφθηκε μόνο η ομάδα ελέγχου.

Μοντέλα λογαριθμιστικής παλινδρόμησης χρησιμοποιήθηκαν για να υπολογιστεί ο σχετικός λόγος εμφάνισης στεφανιαίας νόσου, καθώς και το αντίστοιχο 95% διάστημα εμπιστοσύνης, πριν και μετά από διόρθωση για τη ηλικία, το φύλο, την παρουσία διαβήτη, υπέρτασης, υπερχοληστερολαιμίας και το ιστορικό καπνίσματος.

Η παρουσία αλληλεπίδρασης μεταξύ του βαθμού υιοθέτησης της Μεσογειακής Διατροφής και των πολυμορφισμών ελέγχθηκε με μοντέλα λογαριθμιστικής παλινδρόμησης πριν και μετά από διόρθωση για τους προαναφερθέντες συγχυτικούς παράγοντες. Για τον έλεγχο αυτό τα άτομα χωρίστηκαν σε 2 ομάδες, πάνω και κάτω από τη διάμεσο του δείγματος για το σκορ Μεσογειακής διατροφής. Στη συνέχεια, η επίδραση των πολυμορφισμών, για τους οποίους το γινόμενο της αλληλεπίδρασης ήταν στατιστικό σημαντικό (τόσο πριν όσο και μετά από τη διόρθωση για τους συγχυτικούς παράγοντες), μελετήθηκε χωριστά σε κάθε μια από τις δυο ομάδες του σκορ Μεσογειακής διατροφής.

Για όλες τις παραπάνω αναλύσεις ελέγχθηκε το ισοεπικρατές, το επικρατές, καθώς και το υπολειπόμενο μοντέλο κληρονόμησης. Όλοι οι έλεγχοι πραγματοποιήθηκαν σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $<0,05$.

9.10. Διαλύματα

❖ Lysis I (20x)

- ο 82,9gr NH_4CL (3,1M).
- ο 10,01gr KHCO_3 (200mM).
- ο 20ml EDTA (0,5M).
- ο Ανάδευση.
- ο Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι $V_{\text{τελ}}=500\text{ml}$.
- ο Έλεγχος και ρύθμιση pH στο 7,4.
- ο Αποστείρωση.

❖ Lysis I (1x)

- ο 25ml Lysis I 20x.
- ο Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι $V_{\text{τελ}}=500\text{ml}$.
- ο Ανάδευση.

❖ Lysis II

- ο 0,61gr TrisHCL (10mM).
- ο 11,69gr NaCL (400mM).
- ο 2ml EDTA (0,5M).
- ο Ανάδευση.

- ο Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι Vτελ=500ml.
 - ο Έλεγχος και ρύθμιση pH στο 8,4.
 - ο Αποστείρωση.
- ❖ Πρωτεΐνωση K (20mg/ml)
- ο 100mg πρωτεΐνωση K.
 - ο 5ml αποστειρωμένο νερό.
 - ο Ανάδευση σε Vortex.
 - ο Κατανομή σε eppendorfs των 1,5ml.
 - ο Αποθήκευση στους -20 °C.
- ❖ Tris Borate Acid 5x (TBE 5x)
- ο 54gr Tris Base.
 - ο 27,5gr Boric Acid.
 - ο 20ml EDTA 0,5M.
 - ο Προσθήκη ~800ml απεσταγμένου νερού.
 - ο Ανάδευση.
 - ο Έλεγχος και ρύθμιση pH στο 8,3.
 - ο Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι Vτελ=1lt.
- ❖ Tris Borate Acid 1x (TBE 1x)
- ο 200ml TBE 5x.
 - ο Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι Vτελ=1lt.
 - ο Ανάδευση.
- ❖ EDTA 0,5M
- ο 186,1gr EDTA $2\text{H}_2\text{O}$.
 - ο Προσθήκη ~700ml απεσταγμένου νερού.
 - ο Ρύθμιση pH με προσθήκη NaOH (pellets) υπό ανάδευση στο 8.
 - ο Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι Vτελ=1lt.
- ❖ SDS 20%
- ο 20gr SDS.

- ο 60ml απεσταγμένο νερό.
- ο Ανάδευση.

❖ Βρωμιούχο αιθίδιο (10mg/ml)

- ο 10mg EtBr.
- ο 1ml αποστειρωμένο νερό.
- ο Ανάδευση σε Vortex.
- ο Φύλαξη στους 4°C.

❖ Tris-EDTA (TE)

- ο 0,61gr Tris Base 10Mm.
- ο 1ml EDTA 0,05M.
- ο Προσθήκη $\approx$ 400ml απεσταγμένο νερό.
- ο Ανάδευση.
- ο Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι $V_{\text{τελ}}=500\text{ml}$.
- ο Έλεγχος και ρύθμιση pH στο 7,4
- ο Αποστείρωση.

❖ Οξικό αμμώνιο 10M

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

10. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

10.1 Περιγραφικά χαρακτηριστικά δείγματος

Στον Πίνακα 10.1 δίνονται τα περιγραφικά χαρακτηριστικά του δείγματος. Οι συνεχείς μεταβλητές (ηλικία, δείκτης μάζας σώματος, περιφέρεια μέσης/περιφέρεια γλουτών) παρουσιάζονται ως μέσες τιμές $\pm$ τυπικές αποκλίσεις, ενώ οι κατηγορικές μεταβλητές (φύλο, παρουσία υπερχοληστερολαιμίας, υπέρτασης, σακχαρώδη διαβήτη, σταθερή στεφανιαία νόσος, οξύ στεφανιαίο σύνδρομο) παρουσιάζονται ως σχετικές συχνότητες.

Για τον έλεγχο ύπαρξης συσχετίσεων μεταξύ των παραπάνω μεταβλητών και της παρουσίας στεφανιαίας νόσου ελέγχουμε την υπόθεση :

H_0 : Η χ μεταβλητή και η παρουσία στεφανιαίας νόσου είναι ανεξάρτητες.

H_1 : Η χ μεταβλητή και η παρουσία στεφανιαίας νόσου δεν είναι ανεξάρτητες

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

Ο έλεγχος των συσχετίσεων για τις κατηγορικές μεταβλητές πραγματοποιήθηκε με τον έλεγχο χ^2 του Pearson. Ο έλεγχος των συσχετίσεων μεταξύ συνεχών και κατηγορικής μεταβλητής (παρουσία στεφανιαίας νόσου) πραγματοποιήθηκε με τον έλεγχο T – test του Student. Αντίστοιχα με τις κατηγορικές μεταβλητές, και για τις συνεχείς για $p < 0,05$ απορρίπτεται η H_0 .

Το 37,4% των ασθενών αποτέλεσαν τα άτομα με σταθερή στεφανιαία νόσο. Στην ομάδα των ασθενών συμπεριλήφθησαν περισσότεροι άντρες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (81,6% vs 70,2%, p -value=0,001). Επιπλέον, ο μέσος όρος της ηλικίας ήταν μεγαλύτερος στην ομάδα αυτή ($63,14 \pm 11,41$ vs $60,37 \pm 14,86$, p -value=0,011). Στην ομάδα των ασθενών υπήρχαν περισσότεροι υπερχοληστερολαιμικοί σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (76,9% vs 59,0%, p -value<0,001). Ομοίως και με το διαβήτη (32,4% vs 15,1%, p -value<0,001) και την υπέρταση (71,7% vs 58,8%, p -value=0,001). Ο Δείκτης Μάζας Σώματος δε διέφερε ανάμεσα στις δύο ομάδες. Ο λόγος περιφέρεια μέσης/περιφέρεια γλουτών ήταν σημαντικά υψηλότερος στους ασθενείς ($0,976 \pm 0,083$ vs $0,917 \pm 0,112$, p -value<0,001).

Πίνακας 10.1 Περιγραφικά χαρακτηριστικά του δείγματος

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΟΜΑΔΑ ΑΣΘΕΝΩΝ (n=305)	ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ (n=305)	P-value
Σταθερή στεφανιαία νόσος (%)	37,4	-	-
Οξύ στεφανιαίο σύνδρομο (%)	62,6	-	-
Ηλικία (έτη)	63,14 ± 11,41	60,37 ± 14,86	0,011
Ανδρικό φύλο (%)	81,6	70,2	0,001
Δείκτης μάζας σώματος (kg/m ²)	27,9 ± 3,8	28,2 ± 4,6	0,403
Περιφέρεια μέσης/περιφέρεια γλουτών	0,976 ± 0,083	0,917 ± 0,112	<0,001
Υπερχοληστερολαιμία (%)	76,9	59,0	<0,001
Διαβήτης (%)	32,4	15,1	<0,001
Υπέρταση (%)	71,7	58,8	0,001

10.2 Ο Έλεγχος Pearson χ^2

Στον πίνακα 10.2.α δίνονται οι πολυμορφισμοί που μελετήθηκαν για το γονίδιο TGF- β 2, με τις συντεταγμένες τους κατά Build 35, την αλλαγή νουκλεοτιδίου που προκαλούν, τη θέση τους στο γονίδιο καθώς και την αλλαγή αμινοξέος όταν πρόκειται για παρερμηνεύσιμη μεταλλαγή.

Στον πίνακα 10.2.β δίνονται οι συχνότητες του σπάνιου αλληλομόρφου, η κατανομή των γονοτύπων στην ομάδα των ασθενών και στην ομάδα ελέγχου, καθώς και τα αποτελέσματα από τον έλεγχο Pearson χ^2 για τους πολυμορφισμούς στο γονίδιο TGF- β 2. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην κατανομή γονοτύπων της ομάδας των ασθενών και της ομάδας ελέγχου για τους πολυμορφισμούς rs1342586 (P-value= 0,001), rs1890995 (P-value=0,001) και rs2027567 (P-value=0,029) στο γονίδιο TGF- β 2.

Πίνακας 10.2.α. Οι πολυμορφισμοί που μελετήθηκαν για το γονίδιο TGF-β2, με τις συντεταγμένες τους κατά Build 35, την αλλαγή νουκλεοτιδίου που προκαλούν, τη θέση τους στο γονίδιο καθώς και την αλλαγή αμινοξέος όταν πρόκειται για παρερμηνεύσιμη μεταλλαγή.

ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ	ΣΥΝΤΕΤΑΓΜΕΝΕΣ	ΧΡΩΜΟΣΩΜΑ	ΑΛΛΑΓΗ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΟΥ	ΘΕΣΗ	ΑΛΛΑΓΗ ΑΜΙΝΟΞΕΟΣ
rs10495098	chr1:216582933	1q41	G/T	υποκινητής	-
rs10779329	chr1:216640364	1q41	C/T	εσώνιο	-
rs10863396	chr1:216625655	1q41	A/G	εσώνιο	-
rs12088448	chr1:216612793	1q41	A/C	εσώνιο	-
rs1342586	chr1:216664482	1q41	C/T	εσώνιο	-
rs1890995	chr1:216671301	1q41	C/T	εσώνιο	-
rs2009112	chr1:216620152	1q41	C/T	εσώνιο	-
rs2027567	chr1:216625211	1q41	A/G	εσώνιο	-
rs2796822	chr1:216652755	1q41	A/G	εσώνιο	-
rs2799083	chr1:216648240	1q41	A/G	εσώνιο	-
rs947712	chr1:216631504	1q41	A/G	εσώνιο	-

Πίνακας 10.2.β. Οι συχνότητες του σπάνιου αλληλομόρφου, η κατανομή γονοτύπων και τα αποτελέσματα από τον έλεγχο Pearson χ^2 για τους πολυμορφισμούς στο γονίδιο TGF-β2

ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΣΠΑΝΙΟΥ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΥ		ΑΡΙΘΜΟΣ ΓΟΝΟΤΥΠΩΝ		ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ PEARSON χ^2	P-value
	ΑΣΘΕΝΕΙΣ	ΕΛΕΓΧΟΙ	ΑΣΘΕΝΕΙΣ	ΕΛΕΓΧΟΙ		
rs10495098	0,353	0,325	43/144/145	28/148/136	1,058	0,304
rs10779329	0,256	0,279	21/132/179	23/131/158	0,821	0,365
rs10863396	0,330	0,375	39/144/149	40/151/121	2,816	0,093
rs12088448	0,366	0,348	46/148/138	43/135/134	0,432	0,511
rs1342586	0,193	0,273	14/109/209	22/127/162	10,790	0,001
rs1890995	0,272	0,357	30/127/175	36/153/123	10,280	0,001
rs2027567	0,271	0,328	25/131/174	28/145/139	4,749	0,029
rs2796822	0,400	0,426	49/174/109	57/154/101	0,866	0,352
rs2799083	0,275	0,261	18/149/165	16/131/165	0,338	0,561
rs947712	0,326	0,349	36/150/146	39/139/134	0,718	0,397

10.3. Μοντέλα λογαριθμιστικής παλινδρόμησης για την επίδραση των πολυμορφισμών στη στεφανιαία νόσο

Στους πίνακες 10.3 παρουσιάζεται ο σχετικός λόγος πιθανοτήτων εμφάνισης στεφανιαίας νόσου, καθώς και το αντίστοιχο 95% διάστημα εμπιστοσύνης, πριν και μετά από διόρθωση για την ηλικία, το φύλο, την παρουσία διαβήτη, υπέρτασης, υπερχοληστερολαιμίας και το ιστορικό καπνίσματος ανά ομάδα γονιδίων, για κάθε πολυμορφισμό ανά μοντέλο κληρονόμησης.

Παρατηρείται ότι ο πολυμορφισμός rs10863396, στο επικρατές μοντέλο κληρονόμησης, πριν από τη διόρθωση σχετίζεται με μείωση του σχετικού λόγου πιθανοτήτων κατά 27,7% (odds ratio= 0,723, 95% ΔΕ= 0,52-1,00, P-value= 0,049). Ωστόσο, μετά από τη διόρθωση δεν εμφανίζεται κάποια στατιστικά σημαντική επίδραση.

Επίσης, ο πολυμορφισμός rs1342586, στο ισοεπικρατές μοντέλο κληρονόμησης, σχετίζεται με μείωση του σχετικού λόγου πιθανοτήτων πριν από τη διόρθωση κατά 36,7% (odds ratio= 0,633, 95% ΔΕ= 0,48-0,83, P-value= 0,001) και μετά από τη διόρθωση κατά 33,3% (odds ratio= 0,667, 95% ΔΕ= 0,49-0,90, P-value= 0,009). Ο ίδιος πολυμορφισμός, στο επικρατές μοντέλο κληρονόμησης, σχετίζεται με μείωση του σχετικού λόγου πιθανοτήτων πριν από τη διόρθωση κατά 40,7% (odds ratio= 0,593, 95% ΔΕ= 0,43-0,82, P-value= 0,002) και μετά από τη διόρθωση κατά 39,9% (odds ratio= 0,601, 95% ΔΕ= 0,42-0,86, P-value= 0,006).

Ακόμα, ο πολυμορφισμός rs1890995, στο ισοεπικρατές μοντέλο κληρονόμησης, σχετίζεται με μείωση του σχετικού λόγου πιθανοτήτων πριν από τη διόρθωση κατά 32,9% (odds ratio= 0,671, 95% ΔΕ= 0,52-0,86, P-value= 0,001) και μετά από τη διόρθωση κατά 27,4% (odds ratio= 0,726, 95% ΔΕ= 0,55-0,95, P-value= 0,020). Ο ίδιος πολυμορφισμός, στο επικρατές μοντέλο κληρονόμησης, σχετίζεται με μείωση του σχετικού λόγου πιθανοτήτων πριν από τη διόρθωση κατά 43,4% (odds ratio= 0,566, 95% ΔΕ= 0,41-0,78, P-value= 0,001) και μετά από τη διόρθωση κατά 40,0% (odds ratio= 0,600, 95% ΔΕ= 0,42-0,85, P-value= 0,005).

Τέλος, ο πολυμορφισμός rs2027567, στο ισοεπικρατές μοντέλο κληρονόμησης, σχετίζεται με μείωση του σχετικού λόγου πιθανοτήτων πριν από τη διόρθωση κατά 24,4% (odds ratio= 0,756, 95% ΔΕ= 0,59-0,97, P-value= 0,028), ενώ μετά από τη διόρθωση δεν εμφανίζεται κάποια στατιστικά σημαντική επίδραση. Ο ίδιος πολυμορφισμός, στο επικρατές μοντέλο κληρονόμησης, σχετίζεται με μείωση του σχετικού λόγου πιθανοτήτων πριν από τη διόρθωση κατά 33,6% (odds ratio= 0,664, 95% ΔΕ= 0,48-0,91, P-value= 0,012), ενώ μετά τη διόρθωση δεν εμφανίζεται κάποια στατιστικά σημαντική επίδραση.

Πίνακας 10.3 Αποτελέσματα από την ανάλυση λογαριθμιστικής παλινδρόμησης για το ρόλο των πολυμορφισμών στο γονίδιο TGF-β2 στη στεφανιαία νόσο πριν και μετά από διόρθωση για την ηλικία, το φύλο, την παρουσία διαβήτη, υπέρτασης, υπερχοληστερολαιμίας και το ιστορικό καπνίσματος. (Δ.Ε.: Διάστημα Εμπιστοσύνης)

ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ	ΜΟΝΤΕΛΟ	ΠΡΙΝ ΑΠΟ ΔΙΟΡΘΩΣΗ			ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΔΙΟΡΘΩΣΗ		
		ΛΟΓΟΣ ΠΙΘΑΝΟΤΗΤΩΝ	95% Δ.Ε.	P-value	ΛΟΓΟΣ ΠΙΘΑΝΟΤΗΤΩΝ	95% Δ.Ε.	P-value
rs10495098	ΙΣΟΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	1,134	0,89 – 1,44	0,302	1,089	0,83 – 1,42	0,529
	ΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	1,027	0,75 – 1,41	0,870	0,957	0,67 – 1,36	0,808
	ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΟ	1,644	0,99 – 2,74	0,057	1,673	0,93 – 3,00	0,083
rs10779329	ΙΣΟΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	0,886	0,68 – 1,15	0,358	0,937	0,71 – 1,25	0,656
	ΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	0,854	0,62 – 1,17	0,330	0,881	0,62 – 1,25	0,481
	ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΟ	0,898	0,47 – 1,71	0,744	1,118	0,55 – 2,26	0,757
rs10863396	ΙΣΟΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	0,818	0,65 – 1,04	0,094	0,814	0,63 – 1,05	0,116
	ΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	0,723	0,52 – 1,00	0,049	0,712	0,50 – 1,02	0,062
	ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΟ	0,887	0,55 – 1,43	0,624	0,885	0,53 – 1,49	0,645
rs12088448	ΙΣΟΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	1,078	0,86 – 1,35	0,522	1,046	0,81 – 1,35	0,725
	ΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	1,084	0,79 – 1,49	0,623	1,049	0,74 – 1,50	0,790
	ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΟ	1,147	0,72 – 1,82	0,559	1,089	0,65 – 1,82	0,745
rs1342586	ΙΣΟΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	0,633	0,48 – 0,83	0,001	0,667	0,49 – 0,90	0,009
	ΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	0,593	0,43 – 0,82	0,002	0,601	0,42 – 0,86	0,006
	ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΟ	0,504	0,24 – 1,07	0,073	0,679	0,30 – 1,55	0,356
rs1890995	ΙΣΟΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	0,671	0,52 – 0,86	0,001	0,726	0,55 – 0,95	0,020
	ΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	0,566	0,41 – 0,78	0,001	0,600	0,42 – 0,86	0,005
	ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΟ	0,719	0,42 – 1,28	0,226	0,877	0,49 – 1,58	0,662
rs2027567	ΙΣΟΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	0,756	0,59 – 0,97	0,028	0,783	0,60 – 1,03	0,079
	ΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	0,664	0,48 – 0,91	0,012	0,716	0,50 – 1,02	0,063
	ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΟ	0,851	0,48 – 1,51	0,579	0,793	0,43 – 1,47	0,459
rs2796822	ΙΣΟΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	0,892	0,71 – 1,13	0,339	0,918	0,71 – 1,19	0,520
	ΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	0,943	0,67 – 1,32	0,731	0,960	0,66 – 1,39	0,829
	ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΟ	0,742	0,48 – 1,15	0,183	0,799	0,49 – 1,29	0,361
rs2799083	ΙΣΟΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	1,087	0,83 – 1,42	0,540	1,172	0,87 – 1,58	0,295
	ΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	1,125	0,82 – 1,55	0,466	1,214	0,85 – 1,73	0,279
	ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΟ	1,000	0,50 – 2,04	1,000	1,156	0,52 – 2,56	0,720
rs947712	ΙΣΟΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	0,901	0,71 – 1,15	0,394	0,918	0,71 – 1,19	0,522
	ΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	0,923	0,67 – 1,27	0,624	0,958	0,67 – 1,37	0,814
	ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΟ	0,767	0,46 – 1,27	0,304	0,759	0,44 – 1,32	0,329

10.4 Ο Ρόλος της Μεσογειακής Διατροφής στη στεφανιαία νόσο

Στον πίνακα 10.4 παρουσιάζεται ο μέσος όρος του σκορ Μεσογειακής διαίτας στην ομάδα των ασθενών ($26,05 \pm 4,73$) και στην ομάδα ελέγχου ($27,85 \pm 4,00$), καθώς και η κατανομή των ασθενών (33,9%) και των ελέγχων (60,1%) στην ομάδα του «υψηλού» σκορ. Η κατανομή έγινε σύμφωνα με τη διάμεσο του σκορ, η οποία είναι 26,10. Επίσης, στον ίδιο πίνακα φαίνονται τα αποτελέσματα από την ανάλυση λογαριθμιστικής παλινδρόμησης για το σκορ σαν συνεχή μεταβλητή, αλλά και για τη μετάβαση από την ομάδα «χαμηλού» (μέσος όρος σκορ $\pm$ τυπική απόκλιση: $23,3 \pm 2,7$) στην ομάδα «υψηλού» σκορ (μέσος όρος σκορ $\pm$ τυπική απόκλιση: $30,2 \pm 2,8$), πριν και μετά από διόρθωση για τους συγχυτικούς παράγοντες.

Παρατηρείται ότι αύξηση του μεσογειακό σκορ κατά μια μονάδα μειώνει το σχετικό λόγο πιθανοτήτων πριν τη διόρθωση κατά 9,1% (odds ratio= 0,909, 95% ΔΕ= 0,876-0,951, P-value<0,001) και μετά τη διόρθωση κατά 9,9% (odds ratio= 0,901, 95% ΔΕ= 0,851-0,954, P-value<0,001).

Το υψηλό σκορ Μεσογειακής διαίτας σχετίζεται με μείωση του σχετικού λόγου πιθανοτήτων, πριν τη διόρθωση, κατά 39,9% (odds ratio= 0,601, 95% ΔΕ= 0,403-0,897, P-value= 0,013) και μετά τη διόρθωση κατά 40,3% (odds ratio= 0,597, 95% ΔΕ= 0,367-0,969, P-value= 0,037).

Πίνακας 10.4 Αποτελέσματα από την ανάλυση λογαριθμιστικής παλινδρόμησης πριν και μετά από διόρθωση για την ηλικία, το φύλο, την παρουσία διαβήτη, υπέρτασης, υπερχοληστερολαιμίας και το ιστορικό καπνίσματος για το ρόλο της Μεσογειακής διαίτας στη στεφανιαία νόσο (Δ.Ε.: Διάστημα Εμπιστοσύνης)

			ΠΡΙΝ ΑΠΟ ΔΙΟΡΘΩΣΗ			ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΔΙΟΡΘΩΣΗ		
	ΑΣΘΕΝΕΙΣ (n=180)	ΕΛΕΓΧΟΙ (n=214)	ΛΟΓΟΣ ΠΙΘΑΝΟΤΗΤΩΝ	95% Δ.Ε.	P-value	ΛΟΓΟΣ ΠΙΘΑΝΟΤΗΤΩΝ	95% Δ.Ε.	P-value
Σκορ Μεσογειακής διαίτας (1/55)	26,05 $\pm$ 4,73	27,85 $\pm$ 4,00	0,909	0,876 – 0,951	<0,001	0,901	0,851 – 0,954	<0,001
«Υψηλό» σκορ Μεσογειακής διαίτας (%)	33,9	60,1	0,601	0,403 – 0,897	0,013	0,597	0,367 – 0,969	0,037

10.5 Αλληλεπίδραση της Μεσογειακής Διατροφής και των πολυμορφισμών στο γονίδιο TGF-β2

Στον πίνακα 10.5 παρατηρούμε ότι δεν υπάρχει αλληλεπίδραση ανάμεσα στη μεσογειακή διατροφή και σε κανέναν από τους πολυμορφισμούς που μελετήθηκαν, ούτε πριν ούτε μετά τη διόρθωση με συγχυτικούς παράγοντες. Δηλαδή, η αλληλεπίδραση πολυμορφισμού-μεσογειακού σκορ δε φαίνεται να σχετίζεται με την παρουσία στεφανιαίας νόσου.

ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ	ΜΟΝΤΕΛΟ	P-value ΠΡΙΝ ΑΠΟ ΔΙΟΡΘΩΣΗ	P-value ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΔΙΟΡΘΩΣΗ
rs10495098	ΙΣΟΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	0,205	0,260
	ΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	0,338	0,394
	ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΟ	0,213	0,284
rs10779329	ΙΣΟΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	0,720	0,699
	ΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	0,787	0,727
	ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΟ	0,363	0,456
rs10863396	ΙΣΟΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	0,892	0,783
	ΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	0,585	0,465
	ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΟ	0,671	0,663
rs12088448	ΙΣΟΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	0,640	0,829
	ΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	0,853	0,956
	ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΟ	0,472	0,705
rs1342586	ΙΣΟΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	0,464	0,311
	ΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	0,386	0,251
	ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΟ	0,984	0,963
rs1890995	ΙΣΟΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	0,590	0,504
	ΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	0,675	0,624
	ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΟ	0,725	0,627
rs2027567	ΙΣΟΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	0,813	0,869
	ΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	0,824	0,743
	ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΟ	0,382	0,359
rs2796822	ΙΣΟΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	0,593	0,299
	ΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	0,657	0,384
	ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΟ	0,756	0,489
rs2799083	ΙΣΟΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	0,501	0,295
	ΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	0,373	0,182
	ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΟ	0,782	0,770
rs947712	ΙΣΟΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	0,361	0,210
	ΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	0,488	0,400
	ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΟ	0,500	0,231

11. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη παρατηρείται ότι αύξηση του μεσογειακού σκορ κατά μια μονάδα μειώνει το σχετικό λόγο πιθανοτήτων πριν τη διόρθωση κατά 9,1% (odds ratio= 0,909, 95% ΔΕ= 0,876-0,951, P-value<0,001) και μετά τη διόρθωση κατά 9,9% (odds ratio= 0,901, 95% ΔΕ= 0,851-0,954, P-value<0,001). Ακόμα, το υψηλό σκορ Μεσογειακής δίαιτας σχετίζεται με μείωση του σχετικού λόγου πιθανοτήτων, πριν τη διόρθωση, κατά 39,9% (odds ratio= 0,601, 95% ΔΕ= 0,403-0,897, P-value= 0,013) και μετά τη διόρθωση κατά 40,3% (odds ratio= 0,597, 95% ΔΕ= 0,367-0,969, P-value= 0,037).

Τα παραπάνω ευρήματα έρχονται σε συμφωνία με τα ευρήματα άλλων ερευνών (Trichopoulou A et al., 2003; Martinez-Gonzalez et al., 2002; Panagiotakos et al., 2002; Pitsavos et al., 2002; Pitsavos et al., 2003).

Συγκεκριμένα, στην προοπτική μελέτη των Τριχοπούλου και συν. παρατηρήθηκε μείωση της στεφανιαίας θνησιμότητας κατά 33% (OR=0,67, 95%CI=0,47-0,94) με συμμόρφωση στη μεσογειακή διατροφή (Trichopoulou A et al., 2003).

Οι Martinez-Gonzalez et al, σε μια μελέτη ασθενών-μαρτύρων, παρατήρησαν ότι όσο υψηλότερη ήταν η τιμή του μεσογειακού διατροφικού σκορ, τόσο μικρότερος ήταν ο κίνδυνος εμφάνισης εμφράγματος του μυοκαρδίου (Martinez-Gonzalez et al., 2002). Συγκεκριμένα, για κάθε αύξηση μιας μονάδας στο σκορ με εύρος 9-38, ο κίνδυνος για έμφραγμα του μυοκαρδίου μειωνόταν κατά 8% (OR=0,92, 95%ΔΕ=0,86-0,98), για κάθε αύξηση μίας μονάδας στο σκορ με εύρος 0-8, ο κίνδυνος για έμφραγμα του μυοκαρδίου μειωνόταν κατά 45% (OR=0,55, 95%ΔΕ=0,42-0,73).

Η μελέτη CARDIO 2000 συμπέρανε ότι η υιοθέτηση της μεσογειακής δίαιτας συσχετίστηκε με 16% μείωση του κινδύνου πρώτης εμφάνισης οξέος στεφανιαίου συνδρόμου (Panagiotakos et al., 2002). Επιπλέον, σε μια υπο-μελέτη της CARDIO 2000, και αφού συνυπολογίστηκε η επίδραση αρκετών συγχυτικών παραγόντων, οι ερευνητές εκτίμησαν την μείωση του στεφανιαίου κινδύνου κατά 25% σε ρυθμισμένους υπερτασικούς σε συνδυασμό με φυσική δραστηριότητα, κατά 17% σε αρρύθμιστους υπερτασικούς ασθενείς και κατά 11% σε ασθενείς που δεν λάμβαναν φαρμακευτική αγωγή (Pitsavos et al., 2002). Τέλος, σε ασθενείς με μεταβολικό σύνδρομο, η μείωση του στεφανιαίου κινδύνου υπολογίστηκε στο 35%, αφού έγιναν οι απαραίτητες προσαρμογές ανάλογα με την ηλικία, το φύλο, το μορφωτικό και οικονομικό επίπεδο καθώς και με τους κλασικούς παράγοντες κινδύνου (Pitsavos et al., 2003).

Η μοναδική έρευνα που έχει μελετήσει την επίδραση πολυμορφισμούς του γονιδίου TGF-β2 με τη στεφανιαία νόσο πραγματοποιήθηκε από τους Biggart et al. σε 101 ασθενείς

μικρής ηλικίας με ΣΝ και σε 100 ασθενείς με φυσιολογικά στεφανιαία αγγεία. Ωστόσο η μελέτη αυτή δε βρήκε καμία συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών του γονιδίου TGF-β2 και της στεφανιαίας νόσου (Biggart et al., 1998).

Ελάχιστα δεδομένα υπάρχουν, επίσης, που να αναφέρονται σε πολυμορφισμούς στο γονίδιο TGF-β3. Αντίθετα, διάφορες μελέτες έχουν γίνει πάνω σε πολυμορφισμούς που προκαλούν αλλαγή ενός νουκλεοτιδίου στο γονίδιο του TGFβ1.

Η πρώτη γενετική μελέτη από τους Cambien et al. έδειξε συσχέτιση του πολυμορφισμού Arg25Pro με την εμφάνιση εμφραγμάτων, ενώ κανείς από τους πολυμορφισμούς που μελετήθηκαν δε συσχετίστηκε με το βαθμό και τη σοβαρότητα των στενώσεων των αρτηριών (Cambien F et al., 1996). Επόμενες μελέτες δεν επιβεβαίωσαν τη συσχέτιση του συγκεκριμένου πολυμορφισμού με τη νόσο, ενώ ο πολυμορφισμός -509C>T συσχετίστηκε αρνητικά με την εμφάνιση εμφράγματος σε μία μόνο γερμανική μελέτη (Koch W et al., 2006). Αντίθετα, ο πολυμορφισμός Leu10Pro συσχετίστηκε αρνητικά με την εμφάνιση εμφράγματος σε Ιαπωνικό πληθυσμό (Yokota M et al., 2000), ενώ φάνηκε να σχετίζεται θετικά με αθηροσκλήρωση σε 2 από τις 10 αρτηρίες που μελετήθηκαν σε Ιάπωνες (Oda K et al., 2007). Τέλος, ο ίδιος πολυμορφισμός συσχετίστηκε θετικά με αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο σε Ευρωπαίους, ενώ δε συσχετιζόταν με την εμφάνιση εμφράγματος (Sie MP et al., 2006).

Βασικός περιορισμός της παρούσας εργασίας είναι το μικρό μέγεθος του δείγματος που χρησιμοποιήθηκε. Αν και δεν πραγματοποιήθηκε υπολογισμός της ισχύος, η διερεύνηση της επίδρασης πολυμορφισμών γονιδίων στη στεφανιαία νόσο και ειδικά της αλληλεπίδρασης αυτών με περιβαλλοντικούς παράγοντες στα πλαίσια μιας μελέτης ασθενών-μαρτύρων, απαιτεί δείγμα πολύ μεγέθους (Donahue MP et al., 2005; Ioannidis J et al., 2001). Παρόλα αυτά, η συλλογή μεγαλύτερου δείγματος δεν ήταν εφικτή στα πλαίσια της συγκεκριμένης εργασίας. Ένα ακόμα μειονέκτημα είναι το γεγονός ότι στην ομάδα των ασθενών υπάρχουν στατιστικά σημαντικά περισσότεροι άνδρες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου και είναι γνωστό ότι το ανδρικό φύλο αποτελεί παράγοντα κινδύνου. Επίσης, στην ομάδα των ασθενών συμπεριλήφθηκαν και άτομα με γνωστή από ετών στεφανιαία νόσο ή με παλαιό οξύ στεφανιαίο σύνδρομο. Στα άτομα αυτά η αξιολόγηση των παραγόντων κινδύνου μπορεί να είναι προβληματική καθώς δεν είναι γνωστό αν οι παράγοντες κινδύνου προϋπήρχαν της διάγνωσης ή εμφανίστηκαν αργότερα.

Η ομάδα ελέγχου από την άλλη περιέλαβε άτομα με αρνητικά ευρήματα στη στεφανιογραφία, άτομα με αρνητικό τεστ κοπώσεως και άτομα με αρνητικό ιατρικό ιστορικό σε σχέση με τη στεφανιαία νόσο. Στην πρώτη περίπτωση, δεν αποκλείεται το ενδεχόμενο να συμπεριλαμβάνονται άτομα με μικρές στενώσεις, όμως δυνητικά επικίνδυνες, καθώς πρόκειται για άτομα με πολλούς παράγοντες κινδύνου. Στην περίπτωση των ατόμων με αρνητικό ιατρικό

ιστορικό ενδέχεται επίσης να συμπεριλαμβάνονται κάποιοι ασθενείς καθώς η νόσος μπορεί να υπάρχει απουσία συμπτωμάτων για πολλά έτη (Andreoli T et al, 2000).

Όσον αφορά στη χρήση σκορ για την αξιολόγηση του βαθμού υιοθέτησης της Μεσογειακής διατροφής, οι περιορισμοί αναφέρονται αναλυτικά στο αντίστοιχο κεφάλαιο της εισαγωγής. Στην παρούσα μελέτη, η κατηγοριοποίηση των ατόμων σε δύο μόνο ομάδες που έγινε εξαιτίας του μικρού μεγέθους του δείγματος αποτελεί περιορισμό αντίστοιχο εκείνου των σκορ με μικρό εύρος που αφενός μπορεί να υπερεκτιμούν τη μείωση του κινδύνου κι αφετέρου ίσως αποτυγχάνουν να απεικονίσουν τα ακραία χαρακτηριστικά και τα δομικά συστατικά ενός μοντέλου ή μιας συμπεριφοράς (Panagiotakos DB et al., 2006).

Τα αποτελέσματα της μελέτης θα πρέπει να ιδωθούν με επιφύλαξη, έχοντας υπόψη τους περιορισμούς που προαναφέρθηκαν. Σε κάθε περίπτωση, για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων, τόσο για το ρόλο των συγκεκριμένων πολυμορφισμών όσο και των αλληλεπιδράσεων τους με το βαθμό υιοθέτησης της Μεσογειακής διατροφής, απαιτείται η επαλήθευση των ευρημάτων σε άλλους πληθυσμούς και σε μεγαλύτερο δείγμα. Εξάλλου, η επαλήθευση των θετικών συσχετίσεων αποτελεί μείζον πρόβλημα στη μελέτη της συμβολής γενετικών παραγόντων στη στεφανιαία νόσο, καθώς η επαναληψιμότητα των ευρημάτων ανάμεσα στις μελέτες είναι μικρή (Donahue MP et al., 2005; Ioannidis J et al., 2001). Επιπλέον, η ανάλυση απλοτύπων με βάση τους πολυμορφισμούς αυτούς θα μπορούσε να είναι βοηθητική, καθώς κάποιοι πολυμορφισμοί ίσως ασκούν τις επιδράσεις τους στα πλαίσια κάποιου συγκεκριμένου απλότυπου.

Πέρα από τους περιορισμούς που αναφέρθηκαν, η παρούσα μελέτη παρουσιάζει και κάποια σημαντικά πλεονεκτήματα:

- (α) Η πλειοψηφία των πολυμορφισμών δεν έχει μελετηθεί στο παρελθόν από άλλους ερευνητές
- (β) Η διάγνωση της στεφανιαίας νόσου έγινε με στεφανιαία αγγειογραφία που αποτελεί την πιο αξιόπιστη διαγνωστική μέθοδο (Andreoli T et al., 2000)
- (δ) Τέλος, μελετήθηκε η αλληλεπίδραση των πολυμορφισμών αυτών με το βαθμό υιοθέτησης της Μεσογειακής διατροφής. Πολλοί ερευνητές υποστηρίζουν ότι η αλληλεπίδραση γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων είναι σημαντική στην κατανόηση της σχέσης μεταξύ υγείας και νόσου. Ανάμεσα στους περιβαλλοντικούς παράγοντες εξέχοντα ρόλο έχει η διατροφή καθώς η επιρροή της ασκείται σε καθημερινή βάση (Muller M & Kersten S, 2003; Ordovas J. M & Mooser V, 2004). Κατά συνέπεια η χρήση ενός δείκτη που αποτυπώνει τη συνισταμένη πολλών διατροφικών επιδράσεων, όπως το σκορ Μεσογειακής διατροφής, θα μπορούσε να είναι πολλά υποσχόμενη στην κατεύθυνση αυτή.

III. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ACC/AHA 2002 Guideline Update for the Management of Patients With Unstable Angina and Non-ST-Segment Elevation Myocardial Infarction A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on the Management of Patients With Unstable Angina), www.acc.org/clinical/guidelines/unstable/incorporated/index.htm
- ACC/AHA Guidelines for the Management of Patients With ST-Elevation Myocardial Infarction—Executive Summary, *Circulation*. 2004;110:588-636
- Adler Amanda I., Managing diabetes: what to do about cardiovascular disease, *Diabetes Research and Clinical Practice*, Volume 61, Supplement 1 , July 2003, Pages S3-S8
- Agewall S, Fagerberg B, Attvall S, Wendelhag I, Urbanavicius V, Wikstrand J., Carotid artery wall intima-media thickness is associated with insulin-mediated glucose disposal in men at high and low coronary risk, *Stroke*, 1995; 26: 956–960
- American Heart Association, Acute Coronary Syndrome, Retrieved November 25, 2006, www.americanheart.org
- American Heart Association, Heart Disease and Stroke Statistics — 2006 Update. Dallas, Texas; 2006, www.americanheart.org
- American Heart Association, Risk factors and coronary heart disease, AHA scientific position, www.americanheart.org
- Analysis of genetic polymorphisms in the transforming growth factor-beta1 gene and the risk of Alzheimer's disease. Luedeking EK, DeKosky ST, Mehdi H, Ganguli M, Kamboh MI. *Hum Genet*. 2000 May;106(5):565-9.
- Andreoli T, Bernett J Carpenter C, Plum F, Cecil Βασική Παθολογία, Χ. Μουτσόπουλος, σελ.68-84, Εκδόσεις Λίτσας 2000
- Andrikopoulos G., Pipilis A., Goudevenos J., Tzeis S., Kar talis A., Oikonomou K., Karvounis C., Mantas J., Kyrpizidis C., Gotsis A., Paschidi M., Tsaknakis T., Pyrgakis V., Manolis A.S., Boudoulas H., Vardas P.E., Stefanadis C.I. & Lekakis J. (2007) HELIOS Study Investigators: Epidemiological characteristics, management and early outcome of acute myocardial infarction in Greece: the Hellenic Infarction Observation Study. *Hellenic J Cardiol*. 4, pp. 27-30.
- Annes JP, Munger JS and Rifkin DB (2003) *J. Cell Sci*.116,217–224
- Antman Elliott, Jean-Pierre Bassand, Werner Klein, Magnus Ohman, Jose Luis Lopez Sendon, Lars Rydén, Maarten Simoons, Michal Tendera, Myocardial infarction

redefined-a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology committee for the redefinition of myocardial infarction, Journal of the American College of Cardiology, Volume 36, Issue 3, September 2000, Pages 959-969

- Appel L., T. Moore, E. Obarzanek, W. Vollmer, L. Svetkey and F. Sacks et al., A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure, New England Journal of Medicine, 336 (1997), pp. 1117–1124.
- Aram V. Chobanian, Pathophysiology of Atherosclerosis, The American Journal of Cardiology, 1992; 70: 3G-7G
- Argmann CA, Van Den Diepstraten CH, Sawyez CG, Edwards JY, Hegele RA, Wolfe BM, Huff MW: Transforming growth factor- β 1 inhibits macrophage cholesteryl ester accumulation induced by native and oxidized VLDL remnants. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001, 21, 2011–2018
- Ascherio A, Rimm EB, Giovannucci EL, Colditz GA, Rosner B, Willett WC, A prospective study of nutritional factors and hypertension among US men, Circulation, 1992; 86, 1475 – 84
- Ascherio A., Rimm EB, Giovannucci EL, Spiegelman D, Stampfer MJ, Willett WC., Dietary fat and risk of coronary heart disease in men: cohort follow-up study in the United States, British Medical Journal, 1996; 313: 84-90
- Assmann Gerd, Helmut Schulte, Relation of high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides to incidence of atherosclerotic coronary artery disease (the PROCAM experience), The American Journal of Cardiology, Volume 70, Issue 7, 15 September 1992, Pages 733-737
- Association of a polymorphism of the transforming growth factor-beta1 gene with genetic susceptibility to osteoporosis in postmenopausal Japanese women. Yamada Y, Miyauchi A, Goto J, Takagi Y, Okuizumi H, Kanematsu M, Hase M, Takai H, Harada A, Ikeda K. J Bone Miner Res. 1998 Oct; 13(10):1569-76.
- Association of a T29-->C polymorphism of the transforming growth factor-beta1 gene with genetic susceptibility to myocardial infarction in Japanese. Yokota M, Ichihara S, Lin TL, Nakashima N, Yamada Y. Circulation. 2000 Jun 20; 101(24):2783-7.
- Awtry Eric H., Joseph Loscalzo, Στεφανιαία Καρδιοπάθεια, Cecil Παθολογία, σελ. 99-116, Εκδόσεις Λίτσας, 2003

- Bach Anna, Lluís Serra-Majem, Josep L Carrasco, Blanca Roman, Joy Ngo, Isabel Bertomeu and Biel Obrador, The use of indexes evaluating the adherence to the Mediterranean diet in epidemiological studies: a review, *Public Health Nutrition*, 2006, 9(1A), 132–146
- Baigent C., Keech, A., Kearney, P.M., Blackwell, L., Buck, G., Pollicino, C., Kirby, A., Sourjina, T., Peto, R., Collins, R. & Simes, R. (2005) Cholesterol Treatment Trialists (CTT) Collaborators. Efficacy and safety of cholesterol lowering treatment: prospective analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet* 366, pp.1267-1278.
- Bansilal Sameer, Michael E. Farkouh, Valentin Fuster, Role of Insulin Resistance and Hyperglycemia in the Development of Atherosclerosis, *The American Journal of Cardiology*, 2007;99[suppl]:6B–14B
- Bellido Cecilia, José López-Miranda, Pablo Pérez-Martínez, Elier Paz, Carmen Marín, Purificación Gómez, Juan A. Moreno, Rafael Moreno and Francisco Pérez-Jiménez, The Mediterranean and CHO diets decrease VCAM-1 and E-selectin expression induced by modified low-density lipoprotein in HUVECs, *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, Volume 16, Issue 8, December 2006, Pages 524-530
- Berliner J. A, M. Navab, A. M. Fogelman, Joy S. Frank, L. L. Demer, P. A. Edwards, A. D. Watson, A. J. Lusis, Atherosclerosis: Basic Mechanisms: Oxidation, Inflammation, and Genetics, *Circulation*, 1995;91:2488-2496
- Bjorkerud S. Effects of transforming growth factor-beta 1 on human arterial smooth muscle cells in vitro. *Arterioscler Thromb.* 1991; 11: 892–902
- Blair N., H.W. Kohl, C.E. Barlow, R.S. Paffenbarger, L.W. Gibbons and C.A. Macera, Changes in physical fitness and all cause mortality. A prospective study of healthy and unhealthy men, *Journal of the American Medical Association*, 273(1995), 1093–1098
- Blobel GC, Schieman WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med.* 2000 May 4;342(18):1350-8
- Bobik A, Agrotis A, Kanellakis P, Dilley R, Krushinsky A, Smirnov V, Tararak E, Condon M, Kostolias G. Distinct patterns of transforming growth factor-beta isoform and receptor expression in human atherosclerotic lesions. Colocalization implicates TGF-beta in fibrofatty lesion development. *Circulation.* 1999 Jun 8;99(22):2883-91.

- Bonewald, L. F. and Dallas, S. L. (1994) Role of active and latent transforming growth-factor- β in bone-formation. *J. Cell. Biochem.* 55, 350–357]
- Borkowski, P., Robinson, M.J., Kusiak, J.W., Borkowski, A., Brathwaite, C. and Mergner, W.J. (1995) *Mod. Pathol.* 8, 478–482
- Braunwald Eugene et al, Unstable Angina, Diagnosis and Management, Clinical Practice Guideline, U.S. Department of Health and Human Services, AHCPR Publication, May 1994
- Brian G. Choi, Gemma Vilahur, Juan F. Viles-Gonzales and Juan J. Badimon, The Role of High-Density Lipoprotein Cholesterol in Atherothrombosis, *Mount Sinai Journal Of Medicine*, 2006, Vol 73; Numb 4, pages 690-701
- British Heart Foundation And Health Economics Research Center (2008). European cardiovascular disease statistics
- Buja L. Maximilian, James T. Willerson, Role of Inflammation in Coronary Plaque Disruption, *Circulation* 1994;89;503-505
- Burr ML, JF Gilbert and RM Holliday et al., Effects of changes in fat, fish and fibre intake on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART), *The Lancet*, 2 (1989), pp. 757–761[Abstract]
- Cambien F, Ricard S, Troesch A, Mallet C, Générénaz L, Evans A, Arveiler D, Luc G, Ruidavets JB, Poirier O. Polymorphisms of the transforming growth factor- β 1 gene in relation to myocardial infarction and blood pressure. The Etude Cas-Témoin de l'Infarctus du Myocarde (ECTIM) Study. [Hypertension](#). 1996 Nov;28(5):881-7
- Carlson S, Kennedy ET, Ohls J, Fleming K. The healthy eating index: design and applications, *J Am Diet Assoc* 1995; 95:1103-1108
- Carluccio M.A., L. Siculella, M.A. Ancora, M. Massaro, E. Scoditti and C. Storelli et al., Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals, *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 23 (2003), pp. 622–629
- Cassidy Andrea E., Lawrence F. Bielak, Yan Zhou, Patrick F. Sheedy, Stephen T. Turner, Jerome F. Breen, Philip A. Araoz, Iftikhar J. Kullo, Xihong Lin, Patricia A. Peyser, Progression of Subclinical Coronary Atherosclerosis Does Obesity Make a Difference?, *Circulation*, 2005;111:1877-1882

- Castanho Vera S, Letícia S Oliveira, Hildete P Pinheiro, Helena C F Oliveira, and Eliana C de Faria, Sex differences in risk factors for coronary heart disease: a study in a Brazilian population, BMC Public Health, 2001; 1: 3
- Chan Joanna K, Vivian M Bruce, Bruce E McDonald, Dietary α -linolenic acid is as effective as oleic and linoleic acid in lowering blood cholesterol in normolipidemic men, American Journal of Clinical Nutrition, 1991;53: 1230-4.
- Chrysohoou Christina, Demosthenes B. Panagiotakos, Christos Pitsavos, Peter Kokkinos, Nick Marinakis, Christodoulos Stefanadis, Pavlos K. Toutouzas, Gender Differences on the Risk Evaluation of Acute Coronary Syndromes: The CARDIO2000 Study, Preventive Cardiology, 6(2):71-77, 2003 [Abstract]
- Cipollone F, Fazia M, Mincione G, Iezzi A, Pini B, Cuccurullo C, Uchino S, Spigonardo F, Di Nisio M, Cuccurullo F, Mezzetti A, Porreca E. Increased expression of transforming growth factor- β 1 as a stabilizing factor in human atherosclerotic plaques. Stroke. 2004 Oct;35(10):2253-7. Epub 2004 Aug 5. Erratum in: Stroke. 2007 May;38(5):e21.
- Collins, R., Peto, R., MacMahon, S., Hebert, P., Fiebach, N.H., Eberlein, K.A., Godwin, J., Qizilbash, N., Taylor, J.O. & Hennekens, C.H. (1990) Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 2: Short-term reductions in blood pressure. Lancet. 335, pp. 827–838.
- Covas Maria-Isabel, Nyssönen K, Poulsen HE, Kaikkonen J, Zunft HJ, Kiesewetter H, Gaddi A, de la Torre R, Mursu J, Bäumler H, Nascetti S, Salonen JT, Fitó M, Virtanen J, Marrugat J, EUROLIVE Study Group., The Effect of Polyphenols in Olive Oil on Heart Disease Risk Factors A Randomized Trial, Annals of Internal Medicine, 2006, Volume 145, Issue 5, Pages 333-341
- Crawford SE, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE, et al. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF- β 1 in vivo. Cell 1998;93:1159-1170
- Danesh J, Collins R, Peto R., Lipoprotein(a) and coronary artery disease: meta-analysis of prospective studies, Circulation, 2000;102:1082-1085
- Danesh J. Collins R, Appleby P and Peto R. Association of fibrinogen, C-reactive protein, albumin, or leukocyte count with coronary heart disease: meta-analyses of prospective studies. Jama 279: 1477-1482, 1998.

- Dannenberg AL, Levy D, Garrison RJ, Impact of age on echocardiographic left ventricular mass in a healthy population (the Framingham Study), *The American Journal of Cardiology*, 1989; 64:1066–1068.
- De Caestecker M, (2004) *Cytokine Growth Factor Rev.* 15,1–11
- De Lorgeril Michel, MD, Mediterranean Diet and the Prevention of Coronary Heart Disease, *Nutrition*, Vol.14, No 1, 1998
- De Lorgeril Michel, Patricia Salen, Jean-Louis Martin, Isabelle Monjaud, Jacques Delaye, Nicole Mamelle, Mediterranean Diet, Traditional Risk Factors, and the Rate of Cardiovascular Complications After Myocardial Infarction Final Report of the Lyon Diet Heart Study, *Circulation*, 1999;99:779-785
- Derynck, R. and Zhang, Y.E. (2003) *Nature* 425, 577–584 Moustakas, A. and Heldin, C.H. (2005) *J. Cell Sci.* 118, 3573–3584].
- Doll R, Peto R, Wheatley K, Gray R, Sutherland I., Mortality in relation to smoking: 40 years' observations on male British doctors, *British Medical Journal*, 1994;309:901-911
- Donahue MP, Allen AS. Genetic association studies in cardiology. [Am Heart J.](#) 2005 Jun;149(6):964-70.
- Eckel RH, Krauss RM, American Heart Association call to action: obesity as a major risk factor for coronary heart disease: AHA Nutrition Committee, *Circulation*, 1998; 97: 2099–2100
- Edelstein C, Pfaffinger D, Hinman J, et al., Lysine-phosphatidylcholine adducts in Kringle V impart unique immunological and potential pro-inflammatory properties to human apolipoprotein(a), *Journal of Biological Chemistry*, 2003;278:52841-52847
- Engler MM, Engler MB, Pierson DM, Molteni LB, Molteni A., Effects of docosahexaenoic acid on vascular pathology and reactivity in hypertension, *Experimental Biology Medicine*, 2003;228(3):299–307
- Eriksson Margita; Nils Egberg; Sarah Wamala; Kristina Orth-Gomér; Murray A. Mittleman; Karin Schenck-Gustafsson, Relationship Between Plasma Fibrinogen and Coronary Heart Disease in Women, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1999;19:67-72
- Esposito K., R. Marfella, M. Ciotola, C. Di Palo, F. Giugliano and G. Giugliano et al., Effect of a Mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular

inflammation in the metabolic syndrome: a randomized trial, *Journal of the American Medical Association*, 292(2004) (12), pp.1440–1446.

- Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults, National Cholesterol Education Program, Second report of the Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III), *Circulation*, Dec 2002; 106: 3143
- Femia Romana, Andrea Natali, Antonio L'Abbate, Ele Ferrannini, Coronary Atherosclerosis and Alcohol Consumption Angiographic and Mortality Data, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2006;26:1607
- Feng, X.H. and Derynck, R. (2005) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 659–693
- Fraser Gary E., Diet and Coronary Heart disease: beyond dietary fats and low-density lipoprotein cholesterol, *American Journal of Clinical Nutrition*, 1994;59(suppl): 1117S-23S
- Fuchs FD, Chambless LE, Whelton PK, Nieto FJ, Heiss G., Alcohol consumption and the incidence of hypertension. The Atherosclerosis Risk in Communities Study, *Hypertension*, 2001;37(5):1242–50
- Fuster Valentin, Mechanisms Leading to Myocardial Infarction: Insights From Studies of Vascular Biology, *Circulation* Vol90,No4 October 1994
- Gaeta G, De Michele M, Cuomo S, et al., Arterial abnormalities in the offspring of patients with premature myocardial infarction, *New England Journal of Medicine*, 2000; 343: 840–846
- Gamble JR, Khew-Goodall Y, Vadas MA. Transforming growth factor-beta inhibits E-selectin expression on human endothelial cells. *J Immunol.* 1993;150:4494–4503
- Garas S. et al., Myocardial Infarction, *eMedicine*. Retrieved November 22, 2006
- Genest JJ Jr, McNamara JR, Salem DN, Wilson PW, Schaefer EJ, Malinow MR, Plasma homocyst(e)ine levels in men with premature coronary artery disease, *Journal of the American College of Cardiology*, 1990, 16:1114-1119
- Getz GS., Report on the Workshop on Diabetes and Mechanisms of Atherogenesis (September 17th and 18th, 1992, Bethesda, Maryland), *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 1993;13:459-464.

- GISSI-Prevenzione Investigators, Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial, *The Lancet*, Volume 354, Issue 9177 , 7 August 1999, Pages 447-455
- Gohongi, T., Fukumura, D., Boucher, Y., Yun, C. O., Soff, G. A., Compton, C., Todoroki, T. and Jain, R. K. (1999) Tumor-host interactions in the gallbladder suppress distal angiogenesis and tumor growth: involvement of transforming growth factor b1. *Nat. Med. (N.Y.)* 5, 1203–1208
- Gojova A, Brun V, Esposito B, Cottrez F, Gourdy P, Ardouin P, Tedgui A, Mallat Z, Groux H. Specific abrogation of transforming growth factor- β signaling in T cells alters atherosclerotic lesion size and composition in mice. *Blood*. 2003
- Gordon KJ, Blobe GC. Role of transforming growth factor-beta superfamily signaling pathways in human disease. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Apr;1782(4):197-228. Epub 2008 Feb 11
- Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR., Predicting coronary heart disease in middle-aged and older persons: the Framingham Study, *Journal of The American Medical Association*, 1977;238:497–499.[Abstract]
- Gotto Antonio M., Jr., Role of C-Reactive Protein in Coronary Risk Reduction: Focus on Primary Prevention, *The American Journal of Cardiology*, Volume 99, Issue 5 , March 2007, Pages 718-725
- Grainger DJ, Kemp PR, Witchell CM, Weissberg PL, Metcalfe JC. Transforming growth factor beta decreases the rate of proliferation of rat vascular smooth muscle cells by extending the G2 phase of the cell cycle and delays the rise in cyclic AMP before entry into M phase. *Biochem J*. 1994; 299(Pt 1): 227–35
- Grainger DJ, Mosedale DE, Metcalfe JC, Bottinger EP. Dietary fat and reduced levels of TGF β 1 act synergistically to promote activation of the vascular endothelium and formation of lipid lesions. *J Cell Sci*. 2000; 113: 2355–2361
- Grainger, D.J. (2004) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 399–404
- Grainger, D.J., Kemp, P.R., Metcalfe, J.C., Liu, A.C., Lawn, R.M., Williams, N.R., Grace, A.A., Schofield, P.M. and Chauhan, A. (1995) *Nat. Med.* 1, 74–79
- Grundy Scott M. and Denke Margo A., Dietary influences on serum lipids and lipoproteins, *Journal of Lipid Research*, Volume 31, 1990

- Grundy Scott M., Obesity, Metabolic Syndrome, and Coronary Atherosclerosis, *Circulation*, 2002;105:2696
- Hallman T, Burell G, Setterlind S, Oden A and Lisspers J. Psychological risks factors for coronary heart disease, their importance compared with other risk factors and gender differences in sensitivity. *J Cardiovasc Risk* 8: 39-49, 2001.
- Halton T. L., Willett W. C., Liu S., Manson J. E., Albert C. M., Rexrode K., Hu F. B, Low-Carbohydrate-Diet Score and the Risk of Coronary Heart Disease in Women, *The New England Journal of Medicine*, 2006; 355:1991-2002
- Harris WS, N-3 fatty acids and serum lipoproteins: human studies, *American Journal of Clinical Nutrition*. 1997; 65(suppl): 164S-54S
- Hawe E, Talmud PJ, Miller GJ, Humphries SE. Family history is a coronary heart disease risk factor in the Second Northwick Park Heart Study. *Ann Hum Genet* 2003;67:97-106.
- He K, Song Y, Daviglus ML, Liu K, Van Horn L, Dyer AR, Greenland P., Accumulated evidence on fish consumption and coronary heart disease mortality: a meta-analysis of cohort studies, *Circulation*, 2004; 109: 2705–2711
- Helmrich S.P., D.R. Ragland, R.W. Leung and R.S. Paffenbarger, Physical activity and reduced occurrence of non-insulin-dependent diabetes mellitus, *The New England Journal of Medicine*, Volume, 325 (1991), pp. 147–152
- Hermansen K, Diet, blood pressure and hypertension, *British Journal of Nutrition*, 2000, 83 S113 – 9
- Herrera MD, Perez-Guerrero C, Marhuenda E, Ruiz-Gutierrez V., Effects of dietary oleic-rich oils (virgin olive and high-oleic-acid sunflower) on vascular reactivity in Wistar- Kyoto and spontaneously hypertensive rats, *British Journal of Nutrition* 2001;86(3):349–57
- Heyward VH, Stolarczyk LM. *Applied body composition assessment*. Champaign: Human Kinetics, 1996
- Hodson L, Skeaff CM, Chisholm W-AH., The effect of replacing dietary saturated fat with polyunsaturated or monounsaturated fat on plasma lipids in free-living young adults, *European Journal of Clinical Nutrition*, 2001; 55:908-915
- HOPE- Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. (2000) Effects of an angiotensin-converting- enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. *N Engl J Med*.342(3), pp. 145–153.

- Houslay ES, Sarma J, Uren NG. The effect of intensive lipid lowering on coronary atheroma and clinical outcome. *Heart* 2007;93(2):149-51.
- Howard, G., Wagenknecht, L.E., Burke, G.L., Diez-Roux, A., Evans, G.W., McGovern, P., Nieto FJ. & Tell. G.S. (1998) Cigarette smoking and progression of atherosclerosis: the atherosclerotic risk in communities (ARIC) study. *JAMA* 279, pp. 119-124.
- Hu F. B., Stampfer M. J., Manson J. E., Rimm E., Colditz G. A., Rosner B. A., Hennekens C. H., Willett W. C, Dietary Fat Intake and the Risk of Coronary Heart Disease in Women, *The New England Journal of Medicine*, 1997; 337:1491-1499
- Hu F.B., Dietary pattern analysis: a new direction in nutritional epidemiology, *Current Opinion in Lipidology*, 13 (2002), pp. 3–9
- Hubert HB, Fenileib M, McNamara PM, et al., Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham heart study, *Circulation*, 1983; 67: 968–977
- Hung Joseph, Jules Y.T. Lam, Lucie Lacoste, Glaci Letchacovski, Cigarette Smoking Acutely Increases Platelet Thrombus Formation in Patients With Coronary Artery Disease Taking Aspirin, *Circulation*, 1995;
- IDF – International Diabetes Foundation (2003), *Diabetes Atlas Second Edition*. Brussels, Belgium, available at www.idf.org/e-atlas.
- Ignotz, R. A. and Massague, J. (1986) Transforming growth-factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular-matrix. *J. Biol. Chem.* 261, 4337–4345
- Iijima K, Yoshizumi M, Hashimoto M, Akishita M, Kozaki K, Ako J, Watanabe T, Ohike Y, Son B, Yu J, Nakahara K, Ouchi Y., Red wine polyphenols inhibit vascular smooth muscle cell migration through two distinct signaling pathways, *Circulation*, 2002; 105: 2404–2410
- Ioannidis JP, Ntzani EE, Trikalinos TA, Contopoulos-Ioannidis DG. Replication validity of genetic association studies. *Nat Genet.* 2001 Nov;29(3):306-9.
- Iwan CC van der Horst, Maarten WN Nijsten, Mathijs Vogelzang and Felix Zijlstra, Persistent hyperglycemia is an independent predictor of outcome in acute myocardial infarction, *Cardiovascular Diabetology*, 2007, 6:2
- Javelaud D, Mauviel A: Mammalian transforming growth factor-betas: smad signaling and physiopathological roles. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36, 1161–1165.]

- Jonas MA, Oates JA, Ockene JK, Hennekens CH., Statement on smoking and cardiovascular disease for health care professionals, *Circulation*, 1992;86:1664-1669
- Jousilahti P., Vartiainen E., Jaakko Tuomilehto, Pekka Puska, Sex, Age, Cardiovascular Risk Factors, and Coronary Heart Disease, *Circulation*, 1999;99:1165-1172
- Judd Joseph T, Beverly A Clevidence, Richard A Muesing, Janet Wittes, Matthew E Sunkin, and John J Podczasy, Dietary trans fatty acids: effects on plasma lipids and lipoproteins of healthy men and women, *American Journal of Clinical Nutrition*, 1994;59:861-8.
- Kannel WB, McGee DL., Diabetes and glucose tolerance as risk factors for cardiovascular disease: the Framingham Study, *Diabetes Care*, 1979;2:120-126.[Abstract]
- Kannel William B., Ralph B. D'Agostino, Lisa Sullivan, and Peter W. F. Wilson, Concept and usefulness of cardiovascular risk profiles, *American Heart Journal*, Volume 148, Issue 1, July 2004, Pages 16-26
- Kanzaki, T., Olofsson, A., Moren, A., Wernstedt, C., Hellman, U., Miyazono, K., Claesson-Welsh, L. and Heldin, C. H. (1990) TGFb1 binding protein – a component of the large latent complex of TGFb1 with multiple repeat sequences. *Cell* 61, 1051–1061
- Keys A, Menotti A, Aravanis C, et al., The seven countries study: 2289 deaths in 15 years, *Preventive Medicine*, 1984; 13: 141–154 [Abstract]
- Keys Ancel, Mediterranean diet and public health: personal reflections, *American Journal of Clinical Nutrition*, 1995, Vol 61, 1321S-1323S
- Koch W, Hoppmann P, Mueller JC, Schömig A, Kastrati A. Association of transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms with myocardial infarction in patients with angiographically proven coronary heart disease. [Arterioscler Thromb Vasc Biol.](#) 2006 May;26(5):1114-9. Epub 2006 Mar 16
- Koenig Wolfgang, Fibrinogen and Coronary Risk, *Current Cardiology Reports*, 1999, 1:112-118
- Kojima S, Harpel PC, Rifkin DB. Lipoprotein (a) inhibits the generation of transforming growth factor beta: an endogenous inhibitor of smooth muscle cell migration. *J Cell Biol.* 1991; 113: 1439–1445]

- Kok Frans J., Daan Kromhout, Atherosclerosis: Epidemiological studies on the health effects of a Mediterranean diet, *European Journal of Nutrition*, (2004) [Suppl 1] 43 : I/2–I/5
- Kratz M, Cullen P, Kannenberg F, et al., Effects of dietary fatty acids on the composition and oxidizability of low-density lipoprotein, *European Journal of Clinical Nutrition*, 2002; 56:72-81
- Kris-Etherton Penny M., William S. Harris, Lawrence J. Appel, Fish Consumption, Fish Oil, Omega-3 Fatty Acids, and Cardiovascular Disease, *Circulation*, 2002;106:2747
- Kris-Etherton PM, Harris WS, Appel LJ, for the Nutrition Committee. AHA Scientific Statement: Fish consumption, fish oil, ω -3 fatty acids, and CVD, *Circulation*, 2002; 106: 2747–2757
- Kushi LH, Lew RA, Stare FJ, et al, Diet and 20-year mortality from coronary heart disease: the Ireland-Boston Heart Study, *The New England Journal of Medicine*, 1985; 312:811-818
- Kusumoto Fred, Καρδιαγγειακές Διαταραχές: Νοσήματα της καρδιάς, Παθολογική Φυσιολογία, Stephen McPhee, Χαράλαμπος Μουτσόπουλος, σελ. 393 – 397, Εκδόσεις Λίτσας, 2000
- Lakka T.A., J.M. Venalainen, R. Rauramara, R. Salonen, J. Tuomilehto and J.T. Salonen, Relation of leisure-time physical activity and cardiorespiratory fitness to the risk of acute myocardial infarction in men, *New England Journal of Medicine*, 330 (1994),1549–1554.
- Law, M., Wald, N.U. & Thompson, S.G. (1994) By how much and how quickly does reduction in serum cholesterol concentration lower risk of ischemic heart disease? *BMJ* 308, pp. 367-372.
- Leal Jose', Ramo'n Luengo-Ferna'ndez¹, Alastair Gray¹, Sophie Petersen, Mike Rayner, Economic burden of cardiovascular diseases in the enlarged European Union, *European Heart Journal* (2006) 27, 1610–1619
- Lebrin, F., Deckers, M., Bertolino, P. and Ten Dijke, P. (2005) *Cardiovasc. Res.* 65, 599–608
- Leon A.S., J. Cornett, D.R. Jacobs and R. Rauramara, Leisure time physical activity levels and risk of coronary heart disease and death: the Multiple Risk Factor Intervention Study, *Journal of the American Medical Association*, 273(1987), 2388–2395.[Abstract]

- Libby Peter, Managing the Risk of Atherosclerosis: The Role of High-Density Lipoprotein, *The American Journal of Cardiology*, 2001;88(suppl):3N–8N
- Libby Peter, Pierre Theroux, Pathophysiology of Coronary Artery Disease, *Circulation*, 2005;111:3481-3488
- Libby Peter, What Have We Learned About the Biology of Atherosclerosis? The Role of Inflammation, *The American Journal of Cardiology* 2001;88(suppl):3J–6J
- Liu S, Lee IM, Ajani U, et al., Intake of vegetables rich in carotenoids and risk of coronary heart disease in men: The Physicians' Health Study, *International Journal of Epidemiology*, 2001;30(1):130–5.
- Liu Simin, Mediterranean Diets, *American Journal of Clinical Nutrition*, Vol. 73, No. 4, 847, April 2001
- Lloyd Cathy E.; Lewis H. Kuller; Demetrius Ellis; Dorothy J. Becker; Rena R. Wing; Trevor J. Orchard, Coronary Artery Disease in IDDM-Gender Differences in Risk Factors but Not Risk , *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1996;16:720-726
- Lopez, A.D., Mathers, C.D., Ezzati, M., Jamison, D.T. & Murray, C.J. (2006) Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet*.367(9524), pp. 1747–57.
- Luepker Russell V., Fred S. Apple, Robert H. Christenson, et al, Case Definitions for Acute Coronary Heart Disease in Epidemiology and Clinical Research Studies, A Statement From the AHA Council on Epidemiology and Prevention; AHA Statistics Committee; World Heart Federation Council on Epidemiology and Prevention; the European Society of Cardiology Working Group on Epidemiology and Prevention; Centers for Disease Control and Prevention; and the National Heart, Lung, and Blood Institute, *Circulation*, 2003;108:2543
- Lutgens E, Gijbels M, Smook M, Heeringa P, Gotwals P, Koteliensky VE, Daemen MJ. Transforming growth factor-beta mediates balance between inflammation and fibrosis during plaque progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002; 22: 975–982
- Lutgens, E., Gijbels, M., Smook, M., Heeringa, P., Gotwals, P., Koteliensky, V.E. and Daemen, M.J. (2002) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22, 975–982

- Mähönen, M., McElduff, P., Dobson, A.J., Kuulasmaa, K., Evans, A., (2004) WHO MONICA Project, Current smoking and the risk of nonfatal myocardial infarction in the WHO MONICA Project populations. *Tob Control* 13, pp. 244-250.
- Mallat Z, Gojova A, Marchiol-Fournigault C, Esposito B, Kamate C, Merval R, Fradelizi D, Tedgui A. Inhibition of transforming growth factor-beta signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice. *Circ Res.* 2001; 89: 930–934
- Mallat Z, Tedgui A. The role of transforming growth factor beta in atherosclerosis: novel insights and future perspectives. *Curr Opin Lipidol.* 2002; 13: 523–529].
- Mangan PR, Harrington LE, O’Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, Hatton RD et al.: Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature*, 2006, 441, 231–234.
- Manson, J., Tosteson, H., Ridker, P.M., Satterfield, S., Hebert, P., O’Connor, G.T., Buring, J.E. & Hennekens, C.H. (1992) The primary prevention of myocardial infarction. *N Engl J Med* 326, pp. 1406-1416.
- Martinez-Gonzalez MA, Fernandez-Jarne E, Serrano-Martinez M et al, Mediterranean diet and reduction in the risk of a first acute myocardial infarction: an operational healthy dietary score, *European Journal of Nutrition*, 2002;41: 153–60
- Massagué J, Chen YG. Controlling TGF-beta signalling. *Genes Dev.* 2000 Mar 15;14(6):627-44
- Massague, J. (1990) The transforming growth-factor-b family. *Annu. Rev. Cell Biol.* 6, 597–641
- Massague, J. (2000) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 169–178
- Massague, J., Seoane, J. and Wotton, D. (2005) *Genes Dev.* 19, 2783–2810
- McCaffrey TA, Consigli S, Du B, Falcone DJ, Sanborn TA, Spokojny AM, Bush HL, Jr. Decreased type II/type I TGF-beta receptor ratio in cells derived from human atherosclerotic lesions. Conversion from an antiproliferative to profibrotic response to TGF-β1. *J Clin Invest.* 1995; 96:2667–2675.
- McCaffrey TA, Du B, Consigli S, et al. Genomic instability in the type II TGF-β1 receptor gene in atherosclerotic and restenotic vascular cells. *J Clin Invest* 1997;100:2182-2188.

- McCaffrey TA, Du B, Fu C, et al. The expression of TGF- β receptors in human atherosclerosis: evidence for acquired resistance to apoptosis due to receptor imbalance. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31:627-642.
- McDonald CC, Alexander FE, Whyte BW, Forrest AP, Stewart HJ. Cardiac and vascular morbidity in women receiving adjuvant tamoxifen for breast cancer in a randomised trial. *BMJ* 1995;311:977-980.
- McGee DL, Reed DM, Yano K, Kagan A., Tillotson J., Ten year incidence of coronary heart disease in the Honolulu Heart Program: relationship to nutrient intake, *American Journal of Epidemiology*, 1984;119:667-676 [Abstract]
- McSweeney JC, Cody M, O'Sullivan P, Elberson K, Moser DK, Garvin BJ, Women's early warning symptoms of acute myocardial infarction, *Circulation*, 2003; 108 (21): 2619-23.
- Megnien Jean Louis; Alain Simon; Michel Lemarié; Marie Christine Plainfossé; Jaime Levenson, Hypertension Promotes Coronary Calcium Deposit in Asymptomatic Men, *Hypertension*, 1996;27:949-954
- Menotti A, M Lanti, P E Puddu, D Kromhout, Coronary heart disease incidence in northern and southern European populations: a reanalysis of the seven countries study for a European coronary risk chart, *Heart*, 2000;84:238-244
- Mensink Ronald P, Peter L. Zock, Arlond DM Kester and Martijn B Katan, Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials, *The American Journal Of Clinical Nutrition*, Vol.77, No 5, 1146-1155, 2003
- Mitani T, Terashima M, Yoshimura H, Nariai Y, Tanigawa Y: TGF- β enhances degradation of IFN- γ -induced iNOS protein via proteasomes in RAW264.7 cells. *Nitric Oxide*, 2005, 13, 78–87].
- Miyazono K, Heldin CH (1992) Structure, function and possible clinical application of transforming growth factor-beta. *J Dermatol.* 1992 Nov;19(11):644-7.
- Miyazono, K., Hellman, U., Wernstedt, C. and Heldin, C. H. (1988) Latent high molecular-weight complex of transforming growth factor-b1–purification from human-platelets and structural characterization. *J. Biol. Chem.* 263, 6407–6415

- Morris Francis and Brady William J, ABC of clinical electrocardiography - Acute myocardial infarction—Part I, British Medical Journal, 2002 April 6; 324(7341): 831–834
- Müller M, Kersten S. Nutrigenomics: goals and strategies. Nat Rev Genet. 2003 Apr;4(4):315-22. Review.
- Myers R, Kiely DK, Cupples LA, Kannel WB. Parental history is an independent risk factor for coronary artery disease: the Framingham study. Am Heart J 1990;120:963-969.
- National Health and Nutrition Examination Survey, Anthropometry procedures manual, 2000
- National Heart, Lung and Blood Institute, Heart Attack Warning Signs. Retrieved November 22, 2006, www.nhlbi.nih.gov
- Navab Mohamad, Judith A. Berliner et al, HDL and the Inflammatory Response Induced by LDL-Derived Oxidized Phospholipids, Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2001;21:481
- Navab Mohamad, Susan Y. Hama, G. M. Anantharamaiah, Kholood Hassan, Greg P. Hough, Andrew D. Watson, Srinivasa T. Reddy, Alex Sevanian, Gregg C. Fonarow, and Alan M. Fogelman, Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: steps 2 and 3, Journal of Lipid Research, Vol. 41, 1495-1508, September 2000
- Nilsson J, Hansson GK, Shah PK. Immunomodulation of atherosclerosis: implications for vaccine development. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005 Jan;25(1):18-28. Epub 2004 Oct 28. Review. Erratum in: Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005 Feb;25(2):472.
- Njolstad I, Arnesen E, Lund-Larsen PG., Smoking, serum lipids, blood pressure, and sex differences in myocardial infarction: a 12-year follow-up of the Finnmark Study, Circulation, 1996;93:450–456
- O'Donnell CJ, Larson MG, Feng D, et al., Genetic and environmental contributions to platelet aggregation: the Framingham heart study, Circulation, 2001; 103: 3051–3056
- Oda K, Tanaka N, Arai T, Araki J, Song Y, Zhang L, Kuchiba A, Hosoi T, Shirasawa T, Muramatsu M, Sawabe M. Polymorphisms in pro- and anti-inflammatory cytokine genes and susceptibility to atherosclerosis: a pathological study of 1503 consecutive autopsy cases. [Hum Mol Genet](http://hum.mol.genet.2007). 2007 Mar 15;16(6):592-9. Epub 2007 Jan 9

- Okada, F., Yamaguchi, K., Ichihara, A. and Nakamura, T. (1989) Purification and structural analysis of a latent form of transforming growth factor- β from rat platelets. *J. Biochem. (Tokyo)* 106, 304–310
- Olofsson, A., Miyazono, K., Kanzaki, T., Colosetti, P., Engstrom, U. and Heldin, C. H. (1992) Transforming growth factor- β 1, factor- β 2, and factor- β 3 secreted by a human glioblastoma cell-line – identification of small and different forms of large latent complexes. *J. Biol. Chem.* 267, 19482–19488
- Ordovas JM, Mooser V. Nutrigenomics and nutrigenetics. [Curr Opin Lipidol.](#) 2004 Apr;15(2):101-8,
- Orford J. L., A. P. Selwyn, P. Ganz, J. J. Popma, C. Rogers, The comparative pathobiology of atherosclerosis and restenosis, *The American Journal of Cardiology*, Volume 86, Issue 4, Supplement 2, 24 August 2000, Pages 6H-11H
- Owens GK, Geisterfer AA, Yang YW, Komoriya A. Transforming growth factor- β -induced growth inhibition and cellular hypertrophy in cultured vascular smooth muscle cells. *J Cell Biol.* 1988; 107: 771–780
- Pamnani MB, Bryant HJ, Clough DL, Schooley JF., Increased dietary potassium and magnesium attenuate experimental volume dependent hypertension possibly through endogenous sodium-potassium pump inhibitor, *Clinical and Experimental Hypertension*, 2003;25(2):103–15
- Panagiotakos D, Pitsavos C, Polychronopoulos E, Chryschoou C, Zampelas A, Trichopoulou A., Can a Mediterranean diet moderate the development and clinical progression of coronary heart disease? A systematic review, *Medical Science Monitor* 2004; 10: 193–8
- Panagiotakos DB, Pitsavos C, Chryschoou C et al, The role of traditional Mediterranean-type of diet and lifestyle, in the development of acute coronary syndromes: preliminary results from cardio2000 study, *European Journal of Public Health*, 2002; 1–2; 7–11
- Panagiotakos Demosthenes B, Pitsavos Christos, Arvaniti Fotini, Stefanadis Christodoulos, Adherence to the Mediterranean food pattern predicts the prevalence of hypertension, hypercholesterolemia, diabetes and obesity, among healthy adults; the accuracy of the MedDietScore, *Preventive Medicine*, 44 (2007) 335–340
- Panagiotakos Demosthenes B., Christina Chryschoou, Christos Pitsavos, Christodoulos Stefanadis, Association between the prevalence of obesity and adherence to the

Mediterranean diet: the ATTICA study, *Nutrition*, Volume 22, Issue 5, May 2006, Pages 449-456

- Panagiotakos Demosthenes B., Christos Pitsavos, Fotini Arvaniti, Christodoulos Stefanadis, Adherence to the Mediterranean food pattern predicts the prevalence of hypertension, hypercholesterolemia, diabetes and obesity, among healthy adults; the accuracy of the MedDietScore, *Preventive Medicine*, 44 (2007) 335–340
- Panagiotakos Demosthenes B., Christos Pitsavos and Christodoulos Stefanadis, Dietary patterns: A Mediterranean diet score and its relation to clinical and biological markers of cardiovascular disease risk, *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, Volume 16, Issue 8, December 2006, Pages 559-568
- Panagiotakos DB, Chrysohoou C, Pitsavos C, Antoniou S, Vavouranakis E, Stravopodis P, Moraiti AD, Stefanadis Ch I and Toutouzas PK. The association between occupation stress and the risk of developing acute coronary syndromes: the CARDIO2000 Study. *Cent Eur J Public Health* 11:25-30, 2003.
- Parsons-Wingerter, P., Elliott, K. E., Farr, A. G., Radhakrishnan, K., Clark, J. I. and Sage, E. H. (2000) Generational analysis reveals that TGF- β 1 inhibits the rate of angiogenesis in vivo by selective decrease in the number of new vessels. *Microvasc. Res.* 59, 221–232
- Pedro Mata, Odabella Varela, Rodrigo Alonso, Carlos Lahoz, Manuel de Oya, Lina Badimon, Monounsaturated and Polyunsaturated n-6 Fatty Acid–Enriched Diets Modify LDL Oxidation and Decrease Human Coronary Smooth Muscle Cell DNA Synthesis, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1997;17:2088-2095
- Pendurthi UR, Williams JT, Rao LV., Resveratrol, a polyphenolic compound found in wine, inhibits tissue factor expression in vascular cells: a possible mechanism for the cardiovascular benefits associated with moderate consumption of wine, *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 1999; 19: 419–426
- Pepine Carl J., Wilmer W. Nichols, The Pathophysiology of Chronic Ischemic Heart Disease, *Clinical Cardiology*, 30 (Suppl. I), I-4–I-9 (2007)
- Perez-Jimenez F., J. Lopez-Miranda, M.D. Pinillos, P. Gomez, E. Paz-Rojas and P. Montilla et al., A Mediterranean and a high-carbohydrate diet improve glucose metabolism in healthy young persons, *Diabetologia*, 44 (2001) (11), pp. 2038–2043.

- Pitsavos C, Panagiotakos DB, Chryschoou C et al, The adoption of Mediterranean diet attenuates the development of acute coronary syndromes in people with the metabolic syndrome, *Nutrition Journal*, 2003; 3: 9
- Pitsavos C, Panagiotakos DB, Chryschoou C et al, The benefits from Mediterranean diet on the risk of developing acute coronary syndromes in hypercholesterolemic subjects: a case-control study, (CARDIO2000), *Coronary Artery Disease*, 2002; 13: 295–300
- Pitsavos C, Panagiotakos DB, Chryschoou C et al, The effect of the combination of Mediterranean diet and leisure time physical activity on the risk of developing acute coronary syndromes, in hypertensive subjects, *Journal of Human Hypertension*, 2002; 16: 517–524
- Pitsavos Christos, Demosthenes B. Panagiotakos, Christina Chryschoou and Christodoulos Stefanadis, Epidemiology of cardiovascular risk factors in Greece: aims, design and baseline characteristics of the ATTICA study, *BMC Public Health*, 2003, 3:32
- Pitsavos, C., Panagiotakos, D.B., Chryschoou, C., Skoumas, J., Papaioannou, I., Stefanadis, C. & Toutouzas, P.K. (2002) The benefits from Mediterranean diet on the risk of developing acute coronary syndromes, in hypercholesterolemic subjects: a case-control study (CARDIO2000). *Coron Artery Dis* 13, pp. 295– 300.
- Pitsavos, C., Panagiotakos, D., Chryschoou, C. & Stefanadis, C. (2003) Epidemiology of Cardiovascular Risk Factors in Greece: aims, design and baseline characteristics of the ATTICA study. *BMC Public Health* 3, p. 32.
- Plutzky Jorge, Atherosclerotic plaque rupture: emerging insights and opportunities, *The American Journal of Cardiology*, Volume 84, Issue 1, Supplement 1, 8 July 1999, Pages 15-20
- Poddar R, Sivasubramanian N, DiBello PM, Robinson K and Jacobsen DW. Homocysteine induces expression and secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in human aortic endothelial cells: implications for vascular disease. *Circulation* 103: 2717-2723, 2001
- Price J.F. and Fowkes F.G., Antioxidant vitamins in the prevention of cardiovascular disease, *European Heart Journal*, 18 (1997), pp. 719–727
- Psaltopoulou T, Naska A, Orfanos P, Trichopoulos D, Mountokalakis T, Trichopoulou A, Olive oil, the Mediterranean diet, and arterial blood pressure: the Greek European

Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study, *American Journal of Clinical Nutrition*, 2004; 80 1012 – 8

- Quatromoni P.A., D.L. Copenhafer, S. Demissie, R.B. D'Agostino, C.E. O'Horo, B.H. Nam et al., The internal validity of a dietary pattern analysis. The Framingham nutrition studies, *Journal of Epidemiology and Community Health*, 56 (2002), pp. 381–388
- Ramji DP, Singh NN, Foka P, Irvine SA, Arnaoutakis K. Transforming growth factor- β -regulated expression of genes in macrophages implicated in the control of cholesterol homeostasis, *Biochem Soc Trans.* 2006 Dec;34(Pt 6):1141-4
- Reddy KS, Katan MB, Diet, nutrition and the prevention of hypertension and cardiovascular diseases, *Public Health Nutrition*, 2004; 7: 167 – 86
- Rich-Edwards JW, Manson JAE, Hennekens CH, Buring JE., The primary prevention of coronary heart disease in women, *New England Journal of Medicine*, 1995;332:1758–1766
- Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP and Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med* 336: 973-979, 1997
- Robbie L, Libby P. Inflammation and atherothrombosis. *Ann N Y Acad Sci.* 2001; 947: 167–180
- Roberts, A. B., Sporn, M. B., Assoian, R. K., Smith, J. M., Roche, N. S., Wakefield, L. M., Heine, U. I., Liotta, L. A., Falanga, V., Kehrl, J. H. et al. (1986) Transforming growth factor type b: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 4167–4171
- Roberts, A. B., Sporn, M. B., Assoian, R. K., Smith, J. M., Roche, N. S., Wakefield, L. M., Heine, U. I., Liotta, L. A., Falanga, V., Kehrl, J. H. et al. (1986) Transforming growth factor type b: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 4167–4171
- Rozanski A, Blumenthal JA and Kaplan J. Impact of psychological factors on the pathogenesis of cardiovascular disease and implications for therapy. *Circulation* 99:2192-2217, 1999.
- Ryan M, D. McInerney, D. Owens, P. Collins, A. Johnson and G.H. Tomkin, Diabetes and the Mediterranean diet: a beneficial effect of oleic acid on insulin sensitivity,

adipocyte glucose transport and endothelium-dependent vasoreactivity, *Quarterly Journal of Medicine*, 2000; 93: 85-91 2000

- Sadeghian Saeed, Faramarz Fallahi, Mojtaba Salarifar, Gholamreza Davoodi, Mehran Mahmoodian, Nader Fallah, Soodabeh Darvish, Abbasali Karimi and Tehran Heart Center, Homocysteine, vitamin B12 and folate levels in premature coronary artery disease, *BMC Cardiovascular Disorders*, 2006, 6:38
- Saharinen, J., Hyytiainen, M., Taipale, J. and Keski-Oja, J. (1999) Cytokine Growth Factor Rev. 10, 99–117
- Saharinen, J., Hyytiainen, M., Taipale, J. and Keski-Oja, J. (1999) Cytokine Growth Factor Rev. 10, 99–117
- Salas-Salvadó J, A Garcia-Arellano, R Estruch, F Marquez-Sandoval, D Corella, M Fiol, E Gómez-Gracia, E Viñoles, F Arós, C Herrera, C Lahoz, J Lapetra, J S Perona, D Muñoz-Aguado, M A Martínez-González and E Ros for the PREDIMED, Investigators Components of the mediterranean-type food pattern and serum inflammatory markers among patients at high risk for cardiovascular disease, *European Journal of Clinical Nutrition*, advance online publication 18 April 2007; doi: 10.1038/sj.ejcn.1602762
- Schroder H., J. Marrugat, J. Vila, M.I. Covas and R. Elosua, Adherence to the traditional Mediterranean diet is inversely associated with body mass index and obesity in a Spanish population, *Journal of Nutrition*, 134 (2004) (12), pp. 3355–3361.
- Schuler G., R. Hambrecht, G. Schlierf et al., Regular physical exercise and low fat diet: effects on progression of coronary artery disease, *Circulation*, 86 (1992), 1–11
- Schwartzkopff, Bodo; Motz, Wolfgang; Frenzel, Hartmut; Vogt, Martin; Knauer, Sabine; Strauer, Bodo Eckehard, Hypertension: Structural and Functional Alterations of the Intramyocardial Coronary Arterioles in Patients With Arterial Hypertension, *Circulation*, Volume 88(3), September 1993, pp 993-1003
- Seppo L, Jauhiainen T, Poussa T, Korpela R., A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects, *American Journal of Clinical Nutrition*, 2003;77(2):326–30
- Shi, Y. and Massague, J. (2003) *Cell* 113, 685–700
- Siamak Tabibzadeh. Homeostasis of extracellular matrix by TGF-beta and lefty. *Front Biosci.* 2002 May 1;7:d1231-46. Review

- Sie MP, Uitterlinden AG, Bos MJ, Arp PP, Breteler MM, Koudstaal PJ, Pols HA, Hofman A, van Duijn CM, Witteman JC. TGF-beta 1 polymorphisms and risk of myocardial infarction and stroke: the Rotterdam Study. [Stroke](#). 2006 Nov;37(11):2667-71. Epub 2006 Oct 5
- Singh NN & Ramji DP, (2006) The role of transforming growth factor-beta in atherosclerosis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2006 Dec;17(6):487-99. Epub 2006 Oct 23. Review.
- Somers Michael P., William J. Brady, Andrew D. Perron, Amal Mattu, The Prominant T Wave: Electrocardiographic Differential Diagnosis, *The American Journal of Emergency Medicine*, Volume 20, Issue 3 , May 2002, Pages 243-251
- Stamler J, Caggiula A, Grandits GA, Kjelsberg M, Cutler JA, Relationship to blood pressure of combinations of dietary macronutrients: findings of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT), *Circulation*, 1996; 94 2417 – 23
- Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D., Diabetes, other risk factors, and 12-year cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial, *Diabetes Care*, 1993;16:434-444.[Abstract]
- Stampfer M. J., Hu F. B., Manson J. E., Rimm E. B., Willett W. C, Primary Prevention of Coronary Heart Disease in Women through Diet and Lifestyle, *The New England Journal of Medicine*, 2000; 343:16-22
- Stefanick M, Legault C, Tracy R, Howard G, Kessler C, Lucas D, Bush T., Distribution and correlates of plasma fibrinogen in middle-aged women: initial findings of the Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Study, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1995;15:2085–2093
- Stein Jh, Rosenson RS. Lipoprotein LP(a) excess and coronary heart disease. *Arch Intern Med*. 1997;157:1170-6
- Stover Patrick J., Nutritional genomics, *Physiological Genomics*, 16: 161-165, 2004
- Tawakol Ahmed, Torbjørn Omland, MD, Marie Gerhard, James T. Wu, Mark A. Creager, Hyperhomocyst(e)inemia Is Associated With Impaired Endothelium-Dependent Vasodilation in Humans, *Circulation*, 1997;95:1119-1121
- Teo, K.K., Ounpuu, S., Hawken, S., Pandey, M.R., Valentin, V., Hunt, D., Diaz, R., Rashed, W., Freeman, R., Jiang, L., Zhang, X. & Yusuf, S. (2006) INTERHEART Study Investigators: Tobacco use and risk of myocardial infarction in 52 countries in the

INTERHEART study: a case-control study. *The Lancet* (0140-6736) 368 9536, pp. 647-658.

- Thadhani R, Camargo CA Jr, Stampfer MJ, Curhan GC, Willett WC, Rimm EB., Prospective study of moderate alcohol consumption and risk of hypertension in young women, *Archives of Internal Medicine*, 2002;162(5):569–74.
- Todorovic, V., Jurukovski, V., Chen, Y., Fontana, L., Dabovic, B., and Rifkin, D.B. (2005) Latent TGF- β binding proteins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 38-41.
- Toobert D.J., R.E. Glasgow, L.A. Strycker, M. Barrera Jr., J.L. Radcliffe and R.C. Wander et al., Biologic and quality-of-life outcomes from the Mediterranean Lifestyle Program: a randomized clinical trial, *Diabetes Care*, 26 (2003) (8), pp. 2288–2293.
- Transforming growth factor- β 1 promoter polymorphism C-509T is associated with asthma. Silverman ES, Palmer LJ, Subramaniam V, Hallock A, Mathew S, Vallone J, Faffe DS, Shikanai T, Raby BA, Weiss ST, Shore SA. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004 Jan 15;169(2):214-9. Epub 2003 Nov 3.
- Trevisan M, Krogh V, Freudenheim J, Blake A, Muti P, Panico S (1990), Consumption of olive oil, butter, and vegetable oils and coronary heart disease risk factors. The Research Group ATS-RF2 of the Italian National Research Council, *Journal of the American Medical Association*, 263 688 – 92
- Trichopoulou A, Bamia C, Trichopoulos D., Mediterranean diet and survival among patients with coronary heart disease in Greece, *Archives of Internal Medicine* 2005; 165: 929–35
- Trichopoulou A, Kouris-Blazos A, Wahlqvist M, Gnardellis D, Lagiou P, Polychronopoulos E, et al., Diet and overall survival in elderly people, *British Medical Journal* 1995;311: 1457–60.
- [Trichopoulou A](#), [Yiannakouris N](#), [Bamia C](#), [Benetou V](#), [Trichopoulos D](#), [Ordoas JM](#). Genetic predisposition, nongenetic risk factors, and coronary infarct. [Arch Intern Med](#). 2008 Apr 28;168(8):891-6
- Trichopoulou A., A. Naska, P. Orfanos and D. Trichopoulos, Mediterranean diet in relation to body mass index and waist-to-hip ratio: the Greek European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition Study, *American Journal of Clinical Nutrition*, 82 (2005) (5), pp. 935–940

- Trichopoulou Antonia, Tina Costacou, Christina Bamia, Dimitrios Trichopoulos, Adherence to a Mediterranean Diet and Survival in a Greek Population, *The New England Journal of Medicine*, 2003, Volume 348:2599-2608
- Tsimikas S, Bergmark C, Beyer RW, et al., Temporal increases in plasma markers of oxidized low-density lipoprotein strongly reflect the presence of acute coronary syndromes, *Journal of the American College of Cardiology*, 2003;41:360-370
- Tsimikas S, Witztum JL, Miller ER, et al., High-dose atorvastatin reduces total plasma levels of oxidized phospholipids and immune complexes present on apolipoprotein B-100 in patients with acute coronary syndromes in the MIRACL trial, *Circulation*, 2004;110:1406-1412
- Tsuji, T., Okada, F., Yamaguchi, K. and Nakamura, T. (1990) Molecular-cloning of the large subunit of transforming growth-factor type b masking protein and expression of the mRNA in various rat tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 8835–8839
- US Department of Health and Human Services. (2004) The health consequences of smoking: a report of the Surgeon general. (Internet), U.S.A.
- Veldhoen M, Stockinger B: TGFbeta1, a ‘Jack of all trades’: the link with pro-inflammatory IL-17-producing T cells. *Trends Immunol*, 2006, 27, 358–361.
- Verrecchia F, Chu ML, Mauviel A: Identification of novel TGF-beta /Smad gene targets in dermal fibroblasts using a combined cDNA microarray/promoter transactivation approach. *J Biol Chem*, 2001, 276, 17058–17062]
- Vincent-Baudry S., C. Defoort, M. Gerber, M.C. Bernard, P. Verger and O. Helal et al., The Medi-RIVAGE study: reduction of cardiovascular disease risk factors after a 3-months intervention with a Mediterranean-type diet or a low-fat diet, *American Journal of Clinical Nutrition*, 82 (2005) (5), pp. 964–971.
- Viridis A, Ghiadoni L, Salvetti G, Versari D, Taddei S, Salvetti A, Hyperhomocyst(e)inemia: Is a novel risk factor in hypertension?, *Journal of Nephrology* 2002, 15:414-421
- Wahl, S. M., Hunt, D. A., Wakefield, L. M., McCartney-Francis, N., Wahl, L. M., Roberts, A. B. and Sporn, M. B. (1987) Transforming growth-factor type b induces monocyte chemotaxis and growth-factor production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 5788–5792

- Wakefield, L. M., Smith, D. M., Flanders, K. C. and Sporn, M. B. (1988) Latent transforming growth factor- β from human-platelets—a high molecular-weight complex containing precursor sequences. *J. Biol. Chem.* 263, 7646–7654
- WHO (2003) The world health report 2003 – Shaping the future. Geneva, World Health Organization (<http://www.who.int/whr/2003/en/>, accessed 25 May 2004).
- WHO (2004) Global strategy on diet and physical activity. Geneva.
- WHO (2005) European Health Report 2005. Copenhagen.
- WHO (2008). WHO European Action Plan For Food And Nutrition Policy 2007-2012. WHO Regional office for Europe, Denmark.
- WHO (2008b) European Health for All Database.
- WHO MONICA Project (prepared by Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Amouyel P, Arveiler D, Rajakangas A-M, Pajak A), Myocardial infarction and coronary deaths in the World Health Organization MONICA Project: registration procedures, event rates, and case-fatality rates in 38 populations from 21 countries in four continents, *Circulation*, 1994;90:583–612
- Witztman JCM, Willett WC, Stampfer MJ, Colditz GA, Sacks FM, Speizer FE, A prospective study of nutritional factors and hypertension among US women, *Circulation*, 1989; 80 1320 – 7
- Wolk Robert, Peter Berger, Ryan J. Lennon, Emmanouil S. Brilakis, Virend K. Somers, Body Mass Index A Risk Factor for Unstable Angina and Myocardial Infarction in Patients With Angiographically Confirmed Coronary Artery Disease, *Circulation*, 2003; 108 :2206
- Wood P.D., M.L. Stefanick, P.T. Williams and W.L. Haskell, The effects on plasma lipoproteins of prudent weight reducing diet, with or without exercise in overweight men and women, *The New England Journal of Medicine*, Volume 325 (1991), pp. 461–466
- World Health Organisation, Deaths and DALYs attributable to the 10 leading causes in the WHO European Region 2002, www.who.int
- World Health Organisation, Shares of total deaths and DALYs attributable to 10 leading risk factors in the WHO European Region, 2002, www.who.int
- World Health Organisation, Highlights on health in Greece, www.who.int

- Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J. Mechanism of activation of the TGF-h receptor. *Nature* 1994;370:341–7
- Wrann, M., Bodmer, S., de Martin, R., Siepl, C., Hofer-Warbinek, R., Frei, K., Hofer, E. and Fontana, A. (1987) T-cell suppressor factor from human glioblastoma cells is a 12.5-kd protein closely related to transforming growth-factor-b. *EMBO J.* 6, 1633–1636
- Zeiher Andreas M., Volker Schächinger, Jan Minners, Long-term Cigarette Smoking Impairs Endothelium-Dependent Coronary Arterial Vasodilator Function, *Circulation*, 1995;92:1094-1100
- Zvaifler NJ, *Arthritis Research & Therapy*, 2006 8:210 doi:10.1186/ar1963
- Ζαμπέλας Αντώνιος, Καρδιαγγειακά νοσήματα και διατροφή, Κλινική Διαιτολογία και Διατροφή με στοιχεία Παθολογίας, σελ.239-279, εκδόσεις Πασχαλίδης, 2007
- Παναγιωτάκος Δ., Χ. Πίτσαβος, Χ. Στεφανίδης, Η επιδημιολογία της στεφανιαίας νόσου στην Ελλάδα, Εκδόσεις Κωστάκη, Αθήνα 2004.
- Σαχίνη-Καρδάση Άννα, Μαρία Πάνου, Παθολογική Και Χειρουργική Νοσηλευτική, σελ. 27–35, Εκδόσεις ΒΗΤΑ, 2004
- Τριχόπουλος Δ., Β. Καλαποθάκη, Ε. Πετρίδου, Προληπτική Ιατρική και Δημόσια Υγεία, Εκδόσεις ΖΗΤΑ, Αθήνα 2000.
- Χανιώτης Φραγκίσκος, Χανιώτης Δημήτριος, Νοσολογία – Παθολογία, σελ.629 - 673, Εκδόσεις Λίτσας, 2002