



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ- ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

***ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΡΟΔΙΑΘΕΣΗ & ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΟΣ ΚΙΝΔΥΝΟΣ.
Η ΥΙΟΘΕΤΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗΣ ΔΙΑΙΤΑΣ ΕΠΙΦΕΡΕΙ
ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ;***

ΦΙΛΗ ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

ΔΕΔΟΥΣΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

ΔΕΔΟΥΣΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΓΙΑΝΝΑΚΟΥΛΙΑ ΜΑΡΙΑ, ΛΕΚΤΟΡΑΣ

ΠΑΝΑΓΙΩΤΑΚΟΣ ΔΗΜΟΣΘΕΝΗΣ, ΛΕΚΤΟΡΑΣ

-ΑΘΗΝΑ 2009-

<u>ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ.....</u>	<u>1</u>
<u>ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ- ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ.....</u>	<u>1</u>
<u>ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ.....</u>	<u>1</u>
<u>Περίληψη.....</u>	<u>5</u>
<u>I. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</u>	<u>7</u>
<u>1. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ.....</u>	<u>8</u>
1.1. Διεθνή στοιχεία	8
1.2. Στοιχεία από τον ελληνικό πληθυσμό.....	11
<u>2. ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ.....</u>	<u>13</u>
2.1. Στοιχεία φυσιολογίας	13
2.2. Αιτιολογία.....	13
2.3. Παθοφυσιολογία της Αθηροσκλήρωσης	14
<u>3. ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ.....</u>	<u>20</u>
<u>ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑΣ ΝΟΣΟΥ.....</u>	<u>20</u>
3.1. Στηθάγχη (angina pectoris).....	20
3.2. Έμφραγμα μυοκαρδίου	21
<u>4. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ.....</u>	<u>23</u>
4.1. Μη τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου.....	23
4.1.1. Ηλικία.....	23
4.1.2. Φύλο	23
4.1.3. Οικογενειακό ιστορικό.....	24
4.1.4. Γενετικοί παράγοντες.....	25
4.2. Τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου.....	25
4.2.1. Υπέρταση.....	25
4.2.2. Υπερλιπιδαιμία.....	26
4.2.3. Σακχαρώδης διαβήτης / Δυσανεξία στη γλυκόζη.....	27
4.2.4. Κάπνισμα.....	27
4.2.5. Παχυσαρκία.....	29
4.3. Άλλοι τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου.....	29
<u>5. ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΑ ΠΡΟΤΥΠΑ & ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΝΟΣΟΣ.....</u>	<u>32</u>
5.1. Διατροφικά πρότυπα.....	32
5.2. Μεσογειακή διατροφή.....	33
5.3. Το σκορ Μεσογειακής διατροφής.....	36
5.4. Μεσογειακή διατροφή & εμφάνιση οξέων στεφανιαίων συνδρόμων.....	41
6.1. Ο ρόλος των αιμοπεταλίων στην αθηροσκλήρωση.....	43
6.2. Γλυκοπρωτεΐνες των αιμοπεταλίων	45
6.3. Δομή του υποδοχέα GPVI	47
6.4. Το μονοπάτι μεταγωγής σήματος που πυροδοτεί ο υποδοχέας GPVI	48
6.5. Το γονίδιο του υποδοχέα GPVI	50
6.6. GPVI και αθηροσκλήρωση.....	54
<u>II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</u>	<u>58</u>
<u>8. ΣΚΟΠΟΣ.....</u>	<u>59</u>
<u>9. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....</u>	<u>60</u>
9.1. Δείγμα Μελέτης.....	60
9.2. Συλλογή Δεδομένων.....	61
9.3. Απομόνωση DNA.....	65
9.4. Επιλογή των πολυμορφισμών – ο αλγόριθμος του Carlson.....	67
9.5. Αντιδράσεις γονοτύπησης.....	68
9.6. Στατιστική ανάλυση.....	73
9.7. Έλεγχος ανισορροπίας σύνδεσης μεταξύ των πολυμορφισμών.....	74
9.8. Ανάλυση ισχύος του δείγματος.....	74

9.9. Διαλύματα	74
10.1. Χαρακτηριστικά του δείγματος.....	78
10.2. Πολυμορφισμοί στο γονίδιο GPVI και στεφανιαία νόσος.....	79
10.3. Αλληλεπιδράσεις πολυμορφισμών του γονιδίου GPVI με το σκορ Μεσογειακής διατροφής στην στεφανιαία νόσο.....	82
10.4. Συχνότητες γονοτύπων σε διαφορετικούς πληθυσμούς.....	84
11.1. Γενικά.....	86
11.2. Πολυμορφισμοί στο γονίδιο GPVI και στεφανιαία νόσος-αλληλεπίδραση με τη Μεσογειακή διατροφή.....	87
11.3. Περιορισμοί και πλεονεκτήματα της μελέτης.....	89
III. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	92

Περίληψη

Η καρδιαγγειακή νόσος αποτελεί μια ομάδα διαταραχών της καρδιάς και των αιμοφόρων αγγείων και περιλαμβάνει την στεφανιαία νόσο, την εγκεφαλοαγγειακή νόσο, την υπέρταση, την περιφερική αρτηριακή νόσο, την ρευματική καρδιακή νόσο, τη συγγενή καρδιοπάθεια, την εν τω βάθει θρόμβωση, τον πνευμονικό εμβολισμό και την καρδιακή ανεπάρκεια.

Τα καρδιαγγειακά αποτελούν την πρώτη αιτία θανάτου παγκοσμίως και ευθύνονται για το 30% των θανάτων. Το 2005 ο αριθμός των θανάτων λόγω καρδιαγγειακής νόσου έφτασε τα 17,5 εκατομμύρια και υπολογίζεται ότι έως το 2015 θα ανέλθει σε 20 εκατομμύρια θανάτους, κυρίως λόγω στεφανιαίας νόσου και εγκεφαλικών επεισοδίων.

Η πιο συχνή αιτία στεφανιαίας νόσου είναι η απόφραξη των μεγάλων επικαρδιακών αγγείων λόγω αθηροσκλήρυνσης. Πολυάριθμες κλινικές και στατιστικές μελέτες έχουν συμβάλλει στην αναγνώριση ορισμένων παραγόντων που αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης οξέος στεφανιαίου συνδρόμου (ηλικία, φύλο, οικογενειακό ιστορικό, υπερλιπιδαιμία, υπέρταση, σακχαρώδης διαβήτης, κ.ά.). Με την αύξηση της γνώσης και την προσφορά της έρευνας, διαρκώς ανακαλύπτονται νέοι πιθανοί παράγοντες κινδύνου, συμβάλλοντας σημαντικά στην πρόληψη και θεραπεία της ασθένειας.

Ο υποδοχέας GPVI είναι μία γλυκοπρωτεΐνη των αιμοπεταλίων η οποία αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα μέλη της υπερ-οικογένειας των ανοσοσφαιρινών (Ig superfamily) και είναι ο κύριος ενεργοποιητής μέσω κολλαγόνου των αιμοπεταλίων.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση του ρόλου εννέα πολυμορφισμών του γονιδίου του υποδοχέα GPVI στην εμφάνιση στεφανιαίας νόσου και οξέος στεφανιαίου συνδρόμου, σε δείγμα 305 ασθενών και 305 υγιών ατόμων. Επίσης, η εξέταση της πιθανής αλληλεπίδρασης των πολυμορφισμών αυτών με το βαθμό υιοθέτησης της Μεσογειακής διατροφής. Παράλληλα, εξετάζεται η επίδραση των κλασικών παραγόντων κινδύνου.

Από τα αποτελέσματα προέκυψε οριακή συσχέτιση για την αλληλεπίδραση του πολυμορφισμού rs1613662 με την υιοθέτηση της Μεσογειακής διατροφής, και συγκεκριμένα ο πολυμορφισμός φαίνεται να ασκεί προστατευτική δράση, σε άτομα με ‘καλό’ διατροφικό σκορ ($OR=0,54$, $p=0,066$). Από την άλλη εμφανίζεται οριακή συσχέτιση για τον πολυμορφισμό με την ομάδα χαμηλού σκορ, ο οποίος φαίνεται να ασκεί επιβαρυντική δράση παρουσία ‘κακής’ διατροφής ($OR=2,371$, $p=0,059$). Επίσης, ο πολυμορφισμός rs2304167 δεν φάνηκε να συσχετίζεται με την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου αλλά προέκυψε αλληλεπίδραση με την υιοθέτηση του Μεσογειακού διατροφικού προτύπου. Ο πολυμορφισμός φαίνεται να είναι προστατευτικός σε

άτομα στην ομάδα του υψηλού διατροφικού σκορ ($OR=0,546$, $p=0,057$).

Επιπλέον, ο πολυμορφισμός rs 1654416 παρουσιάζει αλληλεπίδραση με την υιοθέτηση της Μεσογειακής διατροφής, και φαίνεται να είναι προστατευτικός σε άτομα στην ομάδα του υψηλού διατροφικού σκορ ($OR=0,548$, $p=0,06$).

Στατιστικά σημαντική συσχέτιση προέκυψε επίσης μεταξύ του πολυμορφισμού rs11669150 και της εμφάνισης στεφανιαίας νόσου, για το ισοεπικρατές ($p=0,053$) και το επικρατές μοντέλο ($p=0,022$).

Η αλληλεπίδραση των παραπάνω πολυμορφισμών με τη Μεσογειακή διατροφή δεν έχει διερευνηθεί σε άλλες μελέτες. Περαιτέρω έρευνες, σε διαφορετικούς πληθυσμούς είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθούν, ώστε να επιβεβαιωθεί ο ρόλος των πολυμορφισμών ως προστατευτικοί παράγοντες έναντι της εμφάνισης οξέος στεφανιαίου συνδρόμου.

I. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

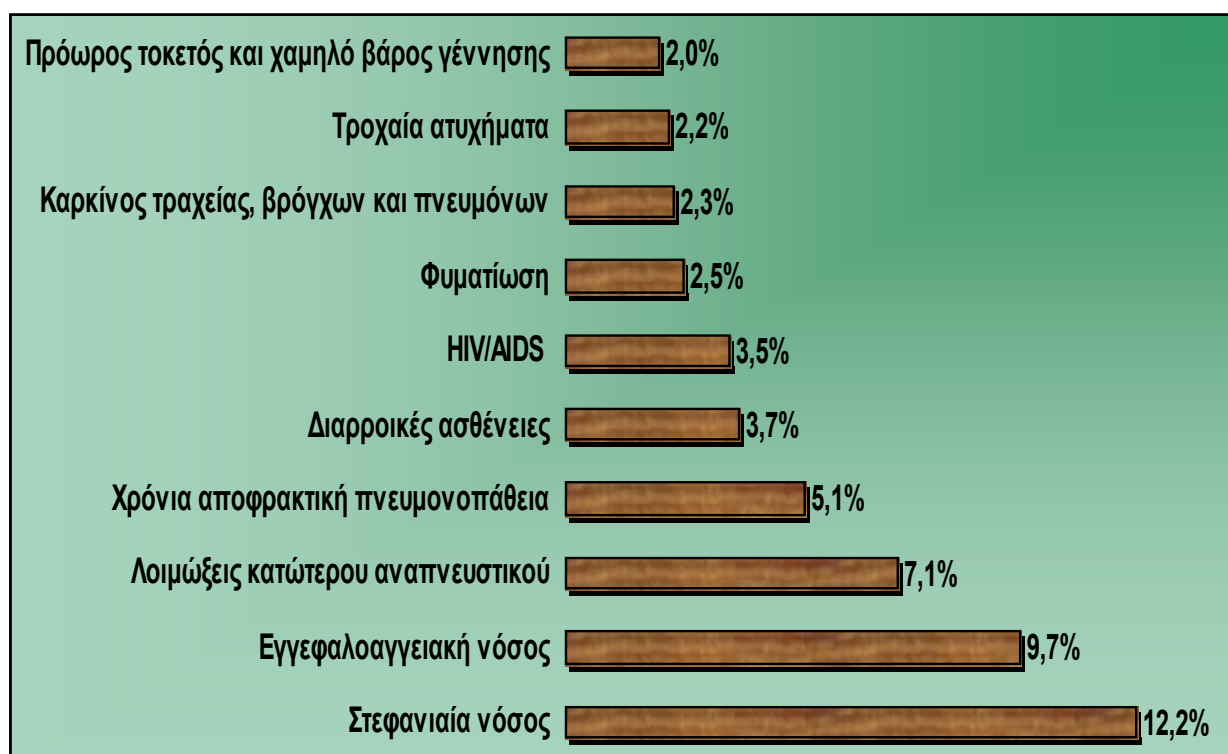
1.1. Διεθνή στοιχεία

Γενικά

Η καρδιαγγειακή νόσος αποτελεί μια ομάδα διαταραχών της καρδιάς και των αιμοφόρων αγγείων και περιλαμβάνει την στεφανιαία νόσο, την εγκεφαλοαγγειακή νόσο, την υπέρταση, την περιφερική αρτηριακή νόσο, την ρευματική καρδιακή νόσο, τη συγγενή καρδιοπάθεια, την εν τω βάθει θρόμβωση, τον πνευμονικό εμβολισμό και την καρδιακή ανεπάρκεια.

Τα καρδιαγγειακά αποτελούν την πρώτη αιτία θανάτου παγκοσμίως και ευθύνονται για το 30% των θανάτων. Το 2005 ο αριθμός των θανάτων λόγω καρδιαγγειακής νόσου έφτασε τα 17,5 εκατομμύρια και υπολογίζεται ότι έως το 2015 θα ανέλθει σε 20 εκατομμύρια θανάτους, κυρίως λόγω στεφανιαίας νόσου και εγκεφαλικών επεισοδίων.⁽¹⁾

Γράφημα 1.1. Οι κυριότερες αιτίες θανάτου στον κόσμο, 2004



Από : World Health Organization - The top 10 causes of death, Fact sheet N°310 Updated October 2008

Τα καρδιαγγειακά νοσήματα επηρεάζουν και την κοινωνικοοικονομική ανάπτυξη εθνών και κοινοτήτων, αφού προκαλούν μεγάλο κόστος, τόσο λόγω θεραπειών, φαρμάκων, κτλ αλλά και λόγω απώλειας παραγωγικότητας στο εργατικό δυναμικό.⁽¹⁾

Στην Αμερική 80.000.000 ενήλικες έχουν ένα ή περισσότερους τύπους καρδιαγγειακής νόσου, εκ των οποίων 38.100.000 υπολογίζεται ότι είναι ηλικίας 60 ετών και άνω. Αναλυτικότερα:

- 73.600.000 έχουν υπέρταση
- 16.800.000 πάσχουν από στεφανιαία νόσο
- 5.700.000 έχουν καρδιακή ανεπάρκεια
- 6.500.000 έχουν υποστεί εγκεφαλικό επεισόδιο
- Περίπου 1.000.000 πάσχουν από κάποια εκ γενετής καρδιαγγειακή ανωμαλία

Στις Η.Π.Α. η καρδιαγγειακή νόσος ευθύνεται για το 35,3% των συνολικών θανάτων, προκαλώντας ένα θάνατο κάθε 37 δευτερόλεπτα. Τα καρδιαγγειακά νοσήματα προκαλούν περισσότερους θανάτους από ότι προκαλούν οι επόμενες τέσσερις αιτίες θανάτου μαζί (καρκίνος, αναπνευστικά νοσήματα, ατυχήματα και σακχαρώδης διαβήτης). Πάνω από 152.000 άνθρωποι που χάνουν τη ζωή τους λόγω καρδιαγγειακής νόσου έχουν ηλικία μικρότερη των 65 ετών. Επιπλέον, το άμεσο και έμμεσο κόστος της νόσου ανήλθε το 2008 σε 475,3 δισεκατομμύρια δολάρια.⁽²⁾

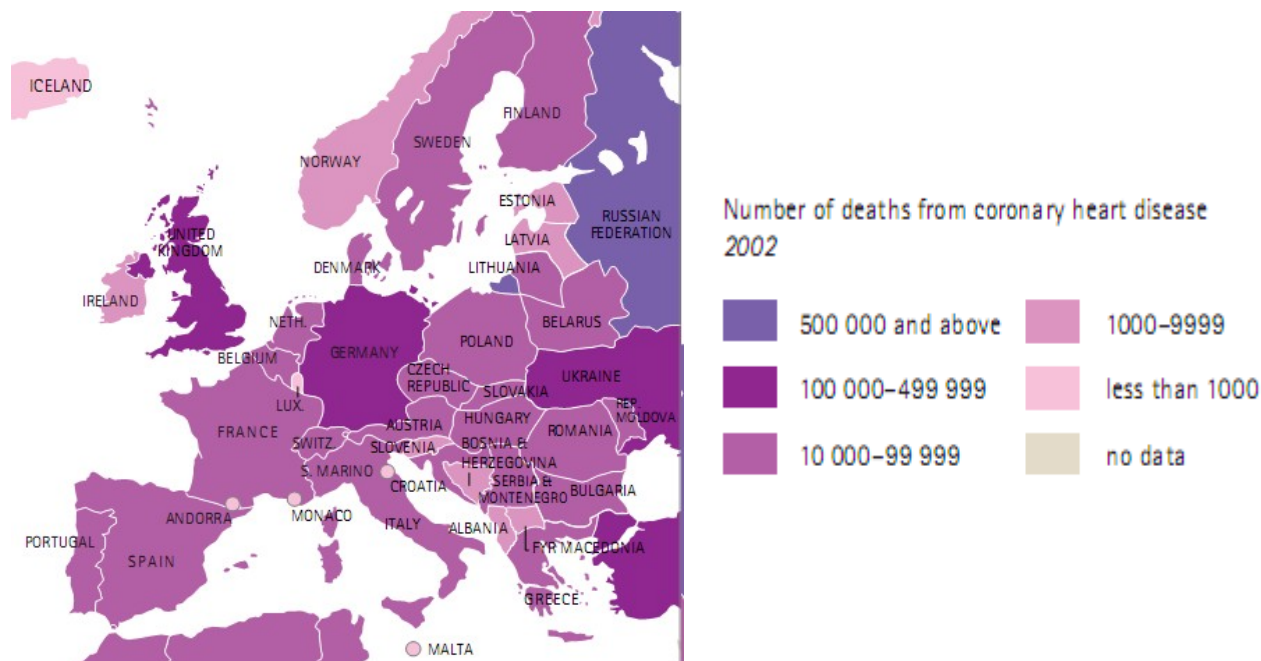
Στην Ευρώπη η καρδιαγγειακή νόσος αποτελεί επίσης την πρώτη αιτία θανάτου, προκαλώντας 4,3 εκατομμύρια θανάτους το χρόνο, δηλαδή ευθύνεται για το 48% της θνησιμότητας. Στην Ευρώπη οι κύριες μορφές καρδιαγγειακής νόσου είναι η στεφανιαία νόσος και τα εγκεφαλικά επεισόδια. Ο υψηλότερος ρυθμός θνησιμότητας εμφανίζεται στην ανατολική Ευρώπη και στις χώρες της πρώην Σοβιετικής Ένωσης. Ο αριθμός ετών ζωής προσαρμοσμένα στην αναπηρία που χάνονται στην Ουκρανία, τη Ρωσία και τη Λευκορωσία λόγω στεφανιαίας νόσου είναι τριπλάσιος από τον αντίστοιχο στην Ισπανία, τη Γαλλία και την Ιταλία. Παρόμοια κατάσταση επικρατεί επίσης και για τα εγκεφαλικά επεισόδια.

Στις ανεπτυγμένες χώρες της Ευρώπης η καρδιαγγειακή νόσος αποτελεί την δεύτερη αιτία ανικανότητας, μετά τις νευροψυχιατρικές διαταραχές, προκαλώντας το 17% των ετών προσαρμοσμένων στην αναπηρία (DALYs). Σε λιγότερο ανεπτυγμένες χώρες ωστόσο, οι καρδιαγγειακές ασθένειες αποτελούν την πρώτη αιτία ανικανότητας, ενώ συνολικά στην Ευρώπη ευθύνονται για το 23% των DALYs.⁽³⁾

Στεφανιαία νόσος

Η στεφανιαία νόσος αποτελεί ασθένεια των αγγείων που αιματώνουν την καρδιά. Κάθε χρόνο 3,8 εκατομμύρια άντρες και 3,4 εκατομμύρια γυναίκες πεθαίνουν λόγω στεφανιαίας νόσου.⁽⁴⁾ Στην Ευρώπη η στεφανιαία νόσος προκαλεί το 22% των θανάτων στις γυναίκες και το 21% στους άντρες.⁽³⁾

Εικόνα 1.1. Θάνατοι λόγω στεφανιαίας νόσου στην Ευρώπη



Από : World Health Organization, Deaths from Coronary Heart Disease. Atlas of heart disease and stroke 2004, www.who.int

Η μελέτη MONICA του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας διερεύνησε την επίπτωση των στεφανιαίων επεισοδίων σε 37 πληθυσμούς σε 21 χώρες, εκ των οποίων 16 ευρωπαϊκές. Γενικά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η επίπτωση στεφανιαίων επεισοδίων είναι υψηλότερη στη βόρεια, κεντρική και ανατολική Ευρώπη, σε σύγκριση με τη νότια και δυτική. Τα αποτελέσματα δείχνουν επίσης ότι η επίπτωση μειώνεται στη βόρεια και ανατολική Ευρώπη, αλλά όχι στον ίδιο βαθμό στις υπόλοιπες χώρες. Η μελέτη επίσης ανέδειξε τη διαφοροποίηση που υπάρχει από πληθυσμό σε πληθυσμό, με τη Φινλανδία να παρουσιάζει τον υψηλότερο αριθμό περιστατικών στεφανιαίας νόσου στους άντρες (Βόρεια Καρέλια, 835 ανά 100,000) και το Ηνωμένο Βασίλειο στις γυναίκες (Γλασκώβη, 265 ανά 100,000). Ο χαμηλότερος αριθμός περιστατικών παρατηρείται στην Κίνα για άντρες και γυναίκες (Πεκίνο, 81 ανά 100,000 για άντρες και 35 ανά 100,000 για τις γυναίκες), καθώς και στην Ισπανία για τις γυναίκες (Καταλονία, 35 ανά 100,000).⁽³⁾

Στοιχεία από τη μελέτη Interheart δείχνουν ότι τα ποσοστά στεφανιαίας νόσου αυξήθηκαν ιδιαίτερα σε χαμηλού και μεσαίου εισοδήματος χώρες. Από τους εννέα δυνητικά τροποποιήσιμους παράγοντες κινδύνου που συσχετίστηκαν με εμφάνιση εμφράγματος του μυοκαρδίου κατά τη διάρκεια της μελέτης, το κάπνισμα και οι διαταραχές των λιπιδίων φαίνεται να ευθύνονται για τα 2/3 των σχετιζόμενων με τροποποιήσιμους παράγοντες εμφράγματα.⁽⁵⁾

Η στεφανιαία νόσος εκτός από κόστος σε ανθρώπινες ζωές, προκαλεί και τεράστιο κόστος στην οικονομία της Ευρώπης. Το 2006 το ιατρικό κόστος (νοσηλεία, φάρμακα) της στεφανιαίας νόσου στην Ευρώπη ανήλθε σε 24 δισεκατομμύρια ευρώ, ενώ το κόστος λόγω απώλειας παραγωγικότητας σε 17 δισεκατομμύρια ευρώ.⁽³⁾

Στις Η.Π.Α. περίπου 1 στους 5 θανάτους προκαλείται λόγω στεφανιαίας νόσου, αριθμός που αντιστοιχεί σε ένα θάνατο το λεπτό. Η προβλεπόμενη ετήσια επίπτωση εμφράγματος του μυοκαρδίου για το 2009 είναι 610.000 νέα εμφράγματα, καθώς και 325.000 σε άτομα με ιστορικό εμφράγματος. Από το 1995 έως το 2005 ο ρυθμός θανάτων λόγω στεφανιαίας νόσου μειώθηκε κατά 34,3%, αλλά ο πραγματικός αριθμός μόνο κατά 19,4%. Το 47% της μείωσης οφείλεται στην βελτίωση της κλινικής αποτελεσματικότητας και το 44% σε αλλαγές στους παράγοντες κινδύνου. Ωστόσο η μείωση αυτή αντισταθμίζεται λόγω αυξήσεων στην επίπτωση της παχυσαρκίας και του σακχαρώδη διαβήτη.⁽²⁾

Μέσα στην ίδια χώρα υπάρχει άνιση κατανομή της επίπτωσης στεφανιαίας νόσου, η οποία εμφανίζεται υψηλότερη στις χαμηλότερες κοινωνικο-οικονομικές ομάδες. Ο κίνδυνος εμφάνισης στεφανιαίας νόσου καθώς και άλλων χρόνιων ασθενειών είναι δύο φορές υψηλότερος στις ομάδες αυτές, σε σύγκριση με ομάδες υψηλότερου κοινωνικο – οικονομικού επιπέδου. Ακόμα και όταν οι τεχνολογικές εξελίξεις εφαρμόζονται στον τομέα της πρόληψης και της θεραπείας, οι ανισότητες παραμένουν, καθώς η πρόσβαση των ομάδων στην υγειονομική περίθαλψη δεν είναι ισότιμη.⁽³⁾

1.2. Στοιχεία από τον ελληνικό πληθυσμό

Σύμφωνα με στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, οι δύο κυριότερες αιτίες θανάτου στον ελληνικό πληθυσμό είναι η εγκεφαλοαγγειακή νόσος και η στεφανιαία νόσος. Συνολικά προκαλούν το 35% των συνολικών θανάτων και το 28% των ετών ζωής προσαρμοσμένων στην αναπηρία (DALYs). Η στεφανιαία νόσος αποτελεί τη δεύτερη αιτία θανάτου, προκαλώντας το 15% των συνολικών θανάτων.⁽⁶⁾

Η μελέτη των Επτά Χωρών, που άρχισε στις αρχές της δεκαετίας του 1960 και συμπεριέλαβε περίπου 13.000 άτομα από διαφορετικούς πληθυσμούς, κατέδειξε ύστερα από παρακολούθηση δεκαπέντε ετών ότι η Κρήτη είχε το χαμηλότερο ποσοστό θνησιμότητας ανεξάρτητα από την αιτία θανάτου. Τα χαμηλά ποσοστά στεφανιαίας νόσου που παρατηρήθηκαν στις νότιες Ευρωπαϊκές χώρες οδήγησαν τον Ancel Keys στο συμπέρασμα ότι οι συνήθειες διατροφής των μεσογειακών χωρών, και ιδιαίτερα της Κρήτης, ίσως εξηγούν τα παρατηρούμενα ωφέλη υγείας. Η μελέτη των Επτά Χωρών αποτέλεσε την πρώτη σημαντική συμμετοχή της Ελλάδας σε επιδημιολογική μελέτη και υπήρξε το έναυσμα για περαιτέρω διερεύνηση της επίδρασης της διατροφής στα καρδιαγγειακά νοσήματα. ⁽⁷⁻⁹⁾

Η επίπτωση του οξέος εμφράγματος του μυοκάρδιου στην Ελλάδα, αυξήθηκε στους άντρες από 195 ανά 100.000 το 1981 σε 297 ανά 100.000 το 1988 και αντίστοιχα στις γυναίκες από 35/100.000 σε 52/100.000. ⁽¹⁰⁾ Πιο πρόσφατα δεδομένα για την επίπτωση του οξέος εμφράγματος στην Ελλάδα, προκύπτουν από τη μελέτη GREECs, από την οποία προκύπτει ετήσια επίπτωση οξέος στεφανιαίου συνδρόμου 34 ανά 10.000 άνδρες και 11 ανά 10.000 γυναίκες. ⁽¹¹⁾

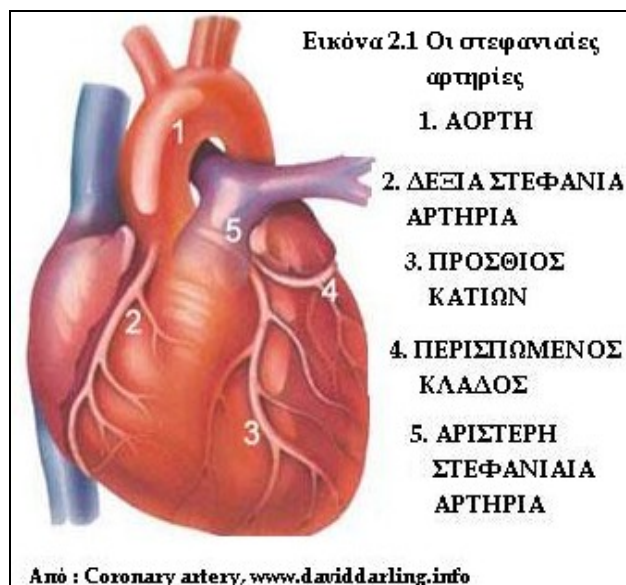
Με βάση στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, το έτος 1980 η Ελλάδα βρισκόταν σε μία από τις χαμηλότερες θέσεις όσον αφορά τη θνησιμότητα από καρδιαγγειακές ασθένειες μέχρι την ηλικία των 64 ετών, συγκριτικά με 18 Ευρωπαϊκές χώρες. Το 1993 όμως, η εικόνα αυτή άλλαξε, με τη θνησιμότητα από εγκεφαλοαγγειακές 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. ⁽¹²⁾

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, που μπορεί να αυξάνεται κατάλληλα όταν αυτό απαιτείται. Η στεφανιαία αιμάτωση επιτελείται από τις στεφανιαίες αρτηρίες που ξεκινούν από την βάση της αορτής. Η δεξιά στεφανιαία αρτηρία συνήθως παρέχει το μεγαλύτερο μέρος αιμάτωσης της δεξιάς κοιλίας, ενώ η αριστερή κοιλία αιματώνεται κυρίως από την αριστερή στεφανιαία αρτηρία. 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.^(13,14)



2.2. Αιτιολογία

Η πιο συχνή αιτία στεφανιαίας νόσου είναι η απόφραξη των μεγάλων επικαρδιακών αγγείων λόγω **αθηροσκλήρωσης**. 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 αθηροσκλήρωση αρχικά περιλαμβάνει παθολογικές αλλαγές στον έσω χιτώνα, με αντιδραστικές αλλαγές στον μέσο και στον εξωτερικό χιτώνα.

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).

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.^(13,15,16)

2.3. Παθοφυσιολογία της Αθηροσκλήρωσης

Παλιότερα, η αθηροσκλήρωση 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 αθηροσκλήρωση περιγράφεται πλέον ως χρόνια φλεγμονώδης κατάσταση που μπορεί να προληφθεί.⁽¹⁷⁾

Η αθηροσκληρωτική εξεργασία

Σχηματισμός λιπώδους ράβδωσης

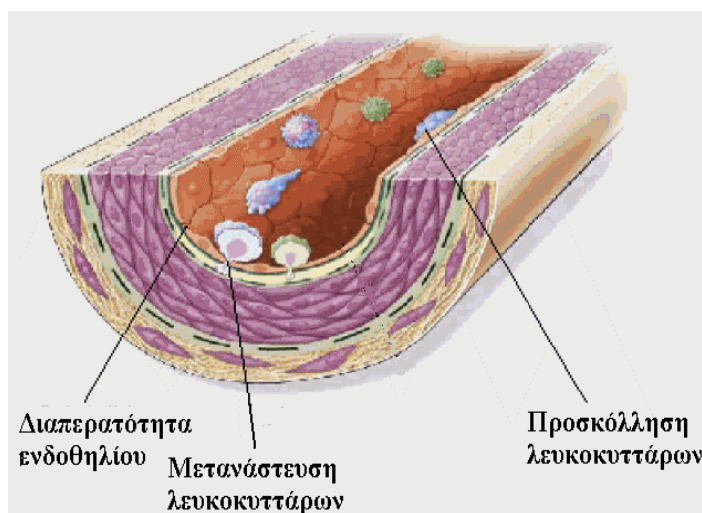
Πειραματικά δεδομένα τόσο σε ζώα αλλά και σε ανθρώπους δείχνουν ότι η λιπώδης ράβδωση αποτελεί την αρχική βλάβη της αθηροσκλήρωσης. Ο σχηματισμός αυτών των αρχικών βλαβών φαίνεται να προκαλείται από εστιακή αύξηση της περιεκτικότητας σε λιποπρωτεΐνες σε περιοχές του εσωτερικού χιτώνα. Αυτή η συσσώρευση λιποπρωτεϊνικών μορίων μπορεί να μην είναι απλό αποτέλεσμα αυξημένης διαπερατότητας του ενδοθηλίου, αλλά οφείλεται και σε σύνδεση των λιποπρωτεϊνών σε συστατικά της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (κυρίως πρωτεογλυκάνες), με αποτέλεσμα να παραμένουν για περισσότερο χρόνο στο αρτηριακό τοίχωμα και να μειώνεται ο βαθμός εκκαθάρισής τους από αυτό. Αυτές οι λιποπρωτεΐνες συχνά υφίστανται χημική τροποποίηση, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στον παθογένειά τους. Οι συνηθέστερες και σημαντικότερες χημικές τροποποιήσεις από παθοφυσιολογική σκοπιά είναι η οξείδωση και η μη ενζυματική γλυκοζυλίωση.

Οι λιποπρωτεΐνες στον εξωκυττάριο χώρο του έσω χιτώνα είναι επιρρεπείς σε οξειδωτική τροποποίηση καθώς έχουν απομακρυνθεί από τα αντιοξειδωτικά συστατικά του πλάσματος. Οι οξειδωμένες λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (LDL) αποτελούν ένα ετερογενές μίγμα σωματιδίων που αποτελείται από προϊόντα οξείδωσης λιπιδίων αλλά και προϊόντα οξείδωσης πρωτεϊνών. Η τροποποίηση των λιπιδίων έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό υδροϋπεροξειδίων, λυσοφωσfolιπιδίων, οξυστερολών και αλδεϋδικών προϊόντων αποικοδόμησης. Οι τροποποιήσεις των πρωτεϊνών περιλαμβάνουν διάσπαση της πεπτιδικής αλυσίδας καθώς και παραγωγή συγκεκριμένων καταλοίπων αμινοξέων. Μια ακόμα τροποποίηση μπορεί να οφείλεται στην παραγωγή υποχλωρικού οξέος από τα φλεγμονώδη κύτταρα της πλάκας που οδηγεί σε σχηματισμό χλωριωμένων προϊόντων.

Σε διαβητικούς ασθενείς με παρατεταμένη υπεργλυκαιμία παρατηρείται μη ενζυματική γλυκοζυλίωση των απολιποπρωτεϊνών και άλλων αρτηριακών πρωτεϊνών με αποτέλεσμα να αλλάζει η λειτουργία τους και να επιταχύνεται η αθηροσκληρωτική εξεργασία.⁽¹⁸⁾

Μετανάστευση λευκοκυττάρων

Μετά τη συσσώρευση λιπιδίων στον εξωκυττάριο χώρο, ακολουθεί η μετανάστευση λευκοκυττάρων στη λιπώδη ράβδωση, κυρίως μονοκυττάρων και λεμφοκυττάρων, με τη βοήθεια υποδοχέων και μορίων προσκόλλησης. Τα μερικώς οξειδωμένα προϊόντα των λιποπρωτεϊνών 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)).^(18, 19)



Εικόνα 2.2. Μετανάστευση λευκοκυττάρων στη λιπώδη ράβδωση

Σχηματισμός αφρωδών κυττάρων

Οι μερικώς οξειδωμένες λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας οξειδώνονται περαιτέρω από τα μακροφάγα, προσλαμβάνονται από ειδικούς υποδοχείς τους, τους υποδοχείς – εκκαθαριστές (scavenger receptors) και εισέρχονται σ' αυτά, δημιουργώντας αφρώδη κύτταρα. Σωροί τέτοιων αφρωδών κυττάρων αποτελούν την πρώτη ορατή αλλοίωση της αθηροσκλήρωσης, 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.^(18, 19)

Πληθώρα άλλων μορίων και μηχανισμών εμπλέκονται πιθανά στην έναρξη της αθηροσκλήρωσης, όπως βακτηριακά προϊόντα, αυτοάνοσες διεργασίες, ελεύθερες ρίζες, κτλ. Για παράδειγμα, οι ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS) μπορούν να ρυθμίζουν την ανάπτυξη λείων μυϊκών κυττάρων καθώς και να ενεργοποιούν την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη φλεγμονή, μέσω του μεταγραφικού συστήματος του NF-κΒ (nuclear factor kappa B). Επιπλέον, εκμηδενίζοντας τις ρίζες NO (φυσικός αγγειοδιαστολέας), δημιουργείται δυσλειτουργία του ενδοθηλίου και τοπική κατάσταση που ευνοεί τη θρόμβωση. Η εξιχνίαση του συνόλου των μηχανισμών και των μορίων που συμμετέχουν σ' αυτή την πολύπλοκη διαδικασία της δημιουργίας αθηρωματικής πλάκας δεν έχει ολοκληρωθεί και εξακολουθεί να αποτελεί πρόκληση για το μέλλον.⁽¹⁸⁾

Ανάπτυξη

Η λιπώδης ράβδωση δεν σχηματίζει πάντα πολύπλοκα αθηρώματα. Προκειμένου να αναπτυχθεί μια σύνθετη αθηρωματική πλάκα, απαιτείται μετανάστευση λείων μυϊκών κυττάρων και παραγωγή εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Οι λειτουργίες των λείων μυϊκών κυττάρων μπορούν να μεταβληθούν από κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες που παράγονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα λευκοκύτταρα. Για παράδειγμα ο PDGF (platelet derived growth factor) που παράγεται από ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα μπορεί να ενεργοποιήσει τη μετανάστευση λείων μυϊκών κυττάρων. Έτσι τα λεία μυϊκά κύτταρα μεταναστεύουν στον έσω χιτώνα και πολλαπλασιάζονται υπό την επίδραση ποικίλων αυξητικών παραγόντων. Ο TGF β (Transforming growth factor β), μεταξύ άλλων, διεγείρει την παραγωγή κολλαγόνου από τα λεία μυϊκά κύτταρα. Αυτοί οι αυξητικοί παράγοντες δεν παράγονται μόνο από τα ενδοθηλιακά και τα λευκοκύτταρα αλλά επίσης σε κάποιες περιπτώσεις από τα ίδια τα μυϊκά κύτταρα (αυτοκρινής επίδραση). Αυτές οι αλλαγές μπορούν να προκαλέσουν μετασχηματισμό της λιπώδους ράβδωσης σε μια πιο ινώδη αλλοίωση.

Σε συνδυασμό με τους μεσολαβητές που παράγονται τοπικά, στην ανάπτυξη της πλάκας συμμετέχουν μονοπάτια που σχετίζονται με την πήξη του αίματος και τη θρόμβωση. Σε προχωρημένες αθηρωματικές αλλοιώσεις παρατηρούνται μικροσκοπικοί τραυματισμοί στο ενδοθήλιο, με αποτέλεσμα την δημιουργία μικρο-θρόμβων πλούσιων σε αιμοπετάλια. Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια απελευθερώνουν παράγοντες που προωθούν την ινώδη απάντηση. Οι περισσότεροι από αυτούς τους μικρο-θρόμβους διαλύονται χωρίς κλινικές εκδηλώσεις μέσω τοπικής ινωδολύσης, απορρόφησης και ενδοθηλιακής επιδιόρθωσης. Ο ρόλος των αιμοπεταλίων στην αθηροσκλήρωση θα αναπτυχθεί περισσότερο παρακάτω.

Καθώς οι αθηροσκληρωτικές αλλοιώσεις αναπτύσσονται, αναπτύσσονται μικρο-αγγεία που συμβάλλουν στην πολυπλοκότητα της αλλοίωσης, παρέχοντας επιφάνεια για τη διακίνηση των λευκοκυττάρων. Επίσης αποτελούν εστίες για αιμορραγία στο εσωτερικό της πλάκας, οδηγώντας σε *in situ* θρόμβωση και παραγωγή θρομβίνης. Η θρομβίνη, εκτός από τον ρόλο της στην πήξη, διεγείρει επιπλέον τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων καθώς και την απελευθέρωση κυτταροκινών από αυτά.

Κατά την ανάπτυξη, οι αθηροσκληρωτικές πλάκες επίσης συσσωρεύουν ασβέστιο καθώς και πρωτεΐνες των οστών, όπως η οστεοκαλσίνη και η οστεοποντίνη.

Κατά την ανάπτυξη της πλάκας λοιπόν, πολυάριθμοι και πολλές φορές ανταγωνιστικοί μηχανισμοί λαμβάνουν χώρα και πυροδοτούν αντίστοιχες αποκρίσεις. Όμως τα αθηρώματα μπορεί να μην οδηγήσουν ποτέ σε κλινικές εκδηλώσεις. Τι καθορίζει λοιπόν την κλινική έκφραση της αθηροσκληρωτικής εξεργασίας; ^(18,20)

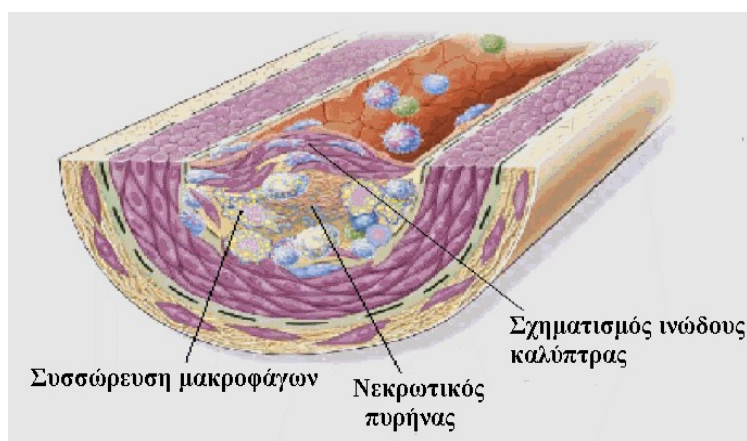
Αρτηριακός μετασχηματισμός

Ο αρτηριακός μετασχηματισμός (arterial remodeling) αποτελεί ένα σημαντικό κλινικά στοιχείο κατά την ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας. Κατά τις αρχικές φάσεις ανάπτυξης του αθηρώματος, η πλάκα συνήθως μεγαλώνει προς τα έξω. Τα αγγεία που προσβάλλονται από αθηροσκλήρωση έχουν την τάση να μεγαλώνουν σε διάμετρο, ένα φαινόμενο γνωστό ως **αντισταθμιστική διεύρυνση**, το οποίο αποτελεί ένα τύπο αγγειακού μετασχηματισμού. Το αθήρωμα δεν καταλαμβάνει τον αγγειακό αυλό, έως ότου να υπερβεί περίπου το 40% του αυλού που περικλείεται από το επιθήλιο. Έτσι, ένα αθήρωμα δεν προκαλεί συνήθως μεγάλη στένωση, αλλά περιορίζει την αγγειακή ροή. Οι στενώσεις που εμποδίζουν την ροή συνήθως προκαλούν σταθερά σύνδρομα, όπως στηθάγχη προσπάθειας, ενώ ακόμα και μια πλήρης στένωση δεν οδηγεί πάντα σε έμφραγμα. Το συνεχές ερέθισμα της υποξίας κατά την ανάπτυξη μιας τέτοιας στένωσης, διεγείρει την δημιουργία παράπλευρων αγγείων, μετριάζοντας έτσι την επίδραση της

πλήρους απόφραξης μιας στεφανιαίας αρτηρίας. Από την άλλη, φαίνεται ότι η αστάθεια της αθηροσκληρωτικής πλάκας είναι αυτή που οδηγεί συνήθως σε ασταθή στηθάγχη και έμφραγμα του μυοκαρδίου, και μάλιστα πολλές φορές χωρίς να προηγηθεί κάποιο σύμπτωμα.⁽¹⁸⁾

Αστάθεια της πλάκας και ρήξη

Μια επιφανειακή διάβρωση ή διάρρηξη του ενδοθηλίου συνήθως προκαλεί τη δημιουργία θρόμβου, ο οποίος προκαλεί ασταθή στεφανιαία σύνδρομο. Η ρήξη της ινώδους καλύπτρας της πλάκας επιτρέπει στους παράγοντες πήξης να έρθουν σε επαφή με τον ισχυρά θρομβογόνο ιστικό παράγοντα (tissue factor) που παράγεται από τα αφρώδη κύτταρα. Αν ο θρόμβος που δημιουργείται δεν προκαλεί απόφραξη ή είναι μεταβατικός, τότε το επεισόδιο ρήξης μπορεί να μην προκαλέσει συμπτώματα ή να προκαλέσει στηθάγχη. Αποφρακτικοί όμως θρόμβοι μπορούν να προκαλέσουν έμφραγμα του μυοκαρδίου, ιδιαίτερα σε απουσία παράπλευρης κυκλοφορίας. Επαναλαμβανόμενα επεισόδια ρήξης – επούλωσης πιθανόν να αποτελούν ένα μηχανισμό μέσω του οποίου η λιπώδης ράβδωση μεταπίπτει σε μια πιο περίπλοκη ινώδη διάβρωση, καθώς η διαδικασία επούλωσης περιλαμβάνει παραγωγή νέας εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και ίνωση.

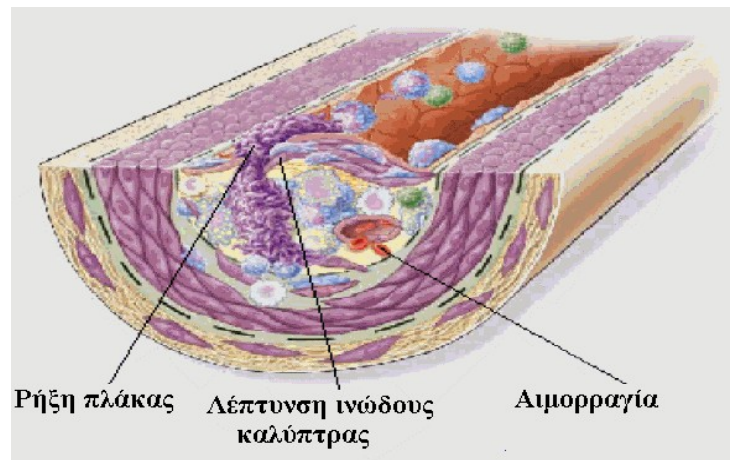


Εικόνα 2.3. Σχηματισμός ινώδους καλύπτρας κατά την ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας

Δεν έχουν όμως όλα τα αθηρώματα την ίδια τάση για ρήξη. Οι πλάκες που είναι επιρρεπείς σε ρήξη έχουν συνήθως λεπτές ινώδεις καλύπτρες, σχετικά μεγάλους λιπιδικούς πυρήνες και μεγάλη περιεκτικότητα σε μακροφάγα. Τα κύτταρα που συγκεντρώνονται στα σημεία ρήξης εκφράζουν φλεγμονώδεις μεσολαβητές, οι οποίοι ίσως ρυθμίζουν διεργασίες που καθορίζουν την ακεραιότητα της πλάκας, επομένως και την τάση της για ρήξη. Για παράδειγμα, η ιντερφερόνη γ (IFN-γ), η οποία παράγεται από τα Τ λεμφοκύτταρα, μπορεί να αναστέλλει την ανάπτυξη και την παραγωγή κολλαγόνου των λείων μυϊκών κυττάρων. Οι κυτοκίνες που προέρχονται από ενεργοποιημένα μακροφάγα, όπως ο TNF και η IL-6, διεγείρουν την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεολυτικά ένζυμα τα οποία αποικοδομούν την εξωκυττάρια

θεμέλια ουσία και την ινώδη καλύπτρα. Έτσι, οι φλεγμονώδεις μεσολαβητές μπορούν να εμποδίσουν τη σύνθεση κολλαγόνου και να πυροδοτήσουν την αποικοδόμηση, με αποτέλεσμα την εξασθένηση της ινώδους καλύπτρας και αύξηση της αστάθειας της πλάκας.

Εικόνα 2.4. Λέπτυνση της ινώδους καλύπτρας και ρήξη



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 αγγειοσυσπάσης 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.^(18,21,22)

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.^(15,23,24)

Η στηθάγχη οφείλεται σε παροδική ισχαιμία του μυοκαρδίου, η οποία συμβαίνει όταν οι ανάγκες του σε οξυγόνο είναι αυξημένες ενώ η προσφορά οξυγόνου μειωμένη, λόγω σημαντικής στένωσης του αυλού στεφανιαίου αγγείου από αθηροσκληρυντικές βλάβες. Μπορεί επίσης να οφείλεται σε άλλες αιτίες, όπως αορτίτιδα ή στένωση της αορτικής βαλβίδας.⁽¹⁵⁾

Όταν η κρίση στηθάγχης εμφανίζεται μόνο με τη συνύπαρξη ενός εκλυτικού παράγοντα και η κατάσταση αυτή είναι σταθερή τους τελευταίους 3-5 μήνες, τότε χαρακτηρίζεται ως **σταθερή** στηθάγχη και οφείλεται συνήθως σε στένωση άνω του 50%. Στην περίπτωση αυτή, ο ασθενής είναι συχνά σε θέση να προβλέψει την κρίση, διότι γνωρίζει το μέγεθος της προσπάθειας που την προκαλεί και λαμβάνει μέτρα. Ιδιαίτερες μορφές στηθάγχης, ανεξάρτητες από συγκεκριμένο εκλυτικό παράγοντα και στις οποίες ο ασθενής δεν μπορεί να προβλέψει την κρίση, είναι η **ασταθής στηθάγχη** (συχνά προεμφραγματική) και η **στηθάγχη Prinzmetal** (στηθάγχη από σπασμό των στεφανιαίων αρτηριών). Η ασταθής στηθάγχη χαρακτηρίζεται από συμπτώματα στηθάγχης, σε περίοδο ξεκούρασης ή κατά τη διάρκεια πολύ ελαφριάς φυσικής δραστηριότητας και οφείλεται συνήθως σε στένωση άνω του 90%. Κατά την κρίση ασταθούς στηθάγχης, η ρήξη της αθηρωματικής πλάκας προκαλεί τοπική συσσώρευση αιμοπεταλίων καθώς και παροδικά επεισόδια θρόμβωσης, διάρκειας 10-20 λεπτών. Επιπλέον, η απελευθέρωση από τα αιμοπετάλια αγγειοσυσπαστικών ουσιών, όπως η θρομβοξάνη A₂ και η σεροτονίνη, καθώς και οι αλλοιώσεις του ενδοθηλίου προκαλούν αγγειοσύσπαση και συμβάλλουν στην μείωση της αιματικής ροής.^(15,23,24)

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.^(25,26)

Η έναρξη των συμπτωμάτων οξέος εμφράγματος είναι συνήθως βαθμιαία και σπάνια ακαριαία.⁽²⁷⁾ 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.^(25,26) 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.⁽²⁸⁾

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.^(25,26)

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.⁽²⁹⁾

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.⁽³⁰⁾

Ιατρικό ιστορικό

Σημαντικότερες πληροφορίες που πρέπει να συλλεχθούν είναι ή ύπαρξη ή όχι ιστορικού στεφανιαίας νόσου ή άλλης καρδιακής νόσου, ή φύση των συμπτωμάτων στηθάγχης, το φύλο, η ηλικία και η παρουσία παραγόντων κινδύνου, όπως σακχαρώδης διαβήτης και υπέρταση.⁽³¹⁾

Κλινική εξέταση

Στην κλινική εξέταση, ο ασθενής συνήθως εμφανίζεται με ψυχρό κα ωχρο δέρμα και σημεία αγγειοσυστολής, σε αρκετές περιπτώσεις με πυρετό μεταξύ 38–39 °C, με αύξηση ή μείωση της πίεσης του αίματος και με αυξημένο ρυθμό αναπνοής. Πολλές φορές όμως όλα τα παραπάνω απουσιάζουν, και ο ασθενής εμφανίζεται ήρεμος, με κλινική εικόνα που δεν παραπέμπει εύκολα σε παθολογική κατάσταση, αλλά απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση.^(26,32)

Ηλεκτροκαρδιογράφημα(ECG)

Στα αρχικά στάδια ενός εμφράγματος του μυοκαρδίου, το ηλεκτροκαρδιογράφημα μπορεί να είναι φυσιολογικό, με λιγότερο από το 50% των ασθενών να εμφανίζουν αλλαγές σε πρώιμη φάση. Αλλαγές στο σύμπλεγμα QRS (σχηματισμός στο ηλεκτροκαρδιογράφημα που αντικατοπτρίζει την εκπόλωση των κοιλιών) ενδέχεται να αντιπροσωπεύουν καρδιακή νέκρωση. Παθολογικά επάρματα Q αντιπροσωπεύουν έμφραγμα που οφείλεται σε πλήρη θρομβωτική απόφραξη της στεφανιαίας αρτηρίας και αρχικά είναι δυνατόν να εκδηλώνονται με συμμετρικά οξυκόρυφα επάρματα T, τα οποία υποχωρούν μετά από μερικά λεπτά, καθώς εμφανίζεται χαρακτηριστική ανύψωση του τμήματος ST. Τα εμφράγματα χωρίς επάρματα Q οφείλονται σε μεγάλο βαθμού αλλά μη αποφρακτικούς θρόμβους και αποτελούν ενδιάμεσο σύνδρομο μεταξύ της ασταθούς στηθάγχης και των εμφραγμάτων με επάρματα Q.^(26,30,33,34) 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.^(26,35)

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.

^(26,30,31,36)

4. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

Πολυάριθμες κλινικές και στατιστικές μελέτες έχουν συμβάλλει στην αναγνώριση ορισμένων παραγόντων που αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου και εμφράγματος του μυοκαρδίου. Σημαντικότεροι παράγοντες κινδύνου θεωρούνται αυτοί που έχουν προκύψει από τα ευρήματα πολυάριθμων επιδημιολογικών ερευνών. Η αναζήτηση των παραγόντων κινδύνου όμως δεν σταματά εδώ, καθώς και άλλοι παράγοντες φαίνεται να σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου, παρόλο που η σημαντικότητα και η ισχύς τους δεν έχουν ακόμα καθοριστεί με ακρίβεια.⁽³⁷⁾

Οι κυριότεροι παράγοντες κινδύνου παρουσιάζονται στον πίνακα 4.1.

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

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.⁽³⁷⁾ Η αύξηση του κινδύνου με την πάροδο της ηλικίας αντανακλά την προοδευτική επιδείνωση της στεφανιαίας αθηροσκλήρωσης και την εμφάνιση στεφανιαίων επεισοδίων. Σε μεγαλύτερες ηλικίες ο σχετικός κίνδυνος εμφάνισης στεφανιαίας νόσου που οφείλεται σε τροποποιήσιμους παράγοντες μειώνεται, αλλά ο απόλυτος κίνδυνος αυξάνεται σημαντικά, δηλαδή ο κίνδυνος λόγω ηλικίας είναι ανεξάρτητος των συνυπαρχόντων παραγόντων κινδύνου (μελέτη Framingham).^(7,38-40)

4.1.2. Φύλο

Η διαφορά των δύο φύλων στην εμφάνιση στεφανιαίας νόσου είναι γνωστή. Μεταξύ ατόμων μέσης ηλικίας, η στεφανιαία νόσος εμφανίζεται 2 με 5 φορές συχνότερα στους άνδρες από ότι

στις γυναίκες, με την αναλογία αυτή να διαφέρει μεταξύ των πληθυσμών. Μετά την ηλικία των 60 όμως, φαίνεται ότι η θνησιμότητα της νόσου εξισώνεται στα δύο φύλα.⁽⁴¹⁻⁴³⁾ 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.^(26,44) Τη δεκαετία του '70, σύμφωνα με δεδομένα της μελέτης Framingham φάνηκε ότι οι παράγοντες κινδύνου στεφανιαίας νόσου επιπόλαζαν σε μεγαλύτερο βαθμό στους άνδρες, αλλά το γεγονός αυτό δεν μπορούσε πλήρως να εξηγήσει τις παρατηρούμενες διαφορές στη θνησιμότητα μεταξύ των δύο φύλων. Οι ερευνητές των μελετών MONICA και ARIC ανέλυσαν τη συνεισφορά των διαφορών φύλου στους καρδιαγγειακούς παράγοντες κινδύνου καθώς και την καρδιαγγειακή θνητότητα σε 46 χώρες. Η επίδραση του φύλου φάνηκε να διαφέρει στους παρακάτω παράγοντες κινδύνου: κάπνισμα, παχυσαρκία, υψηλή αρτηριακή πίεση, υψηλή ολική χοληστερόλη και χαμηλή HDL χοληστερόλη. Οι διαφορές αυτές φαίνεται να εξηγούν το 40% των διαφορών που παρατηρούνται στην καρδιαγγειακή θνητότητα μεταξύ των δύο φύλων.⁽⁴⁵⁾

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 πρόωπη 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 διαίτας, το υψηλότερο μορφωτικό επίπεδο και η παρουσία βραχείας διάρκειας καταθλιπτικών συνδρόμων φαίνεται να επηρεάζουν περισσότερο τις γυναίκες.^(7,46)

4.1.3. Οικογενειακό ιστορικό

Το οικογενειακό ιστορικό στεφανιαίας νόσου αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση στεφανιαίων επεισοδίων.^(47,48) Οι μηχανισμοί με τους οποίους συμβαίνει αυτό δεν έχουν επαληθευτεί, αλλά πιστεύεται ότι συμπεριλαμβάνουν μια αυξημένη επιδεκτικότητα στην αθηροσκλήρωση, μια αυξημένη τάση για θρόμβωση ή άλλους περιβαλλοντικούς και γενετικούς παράγοντες.^(49,50) Σύμφωνα με τη μελέτη CARDIO2000 η παρουσία οικογενειακού ιστορικού πρόωγης εκδήλωσης στεφανιαίας νόσου σχετίζεται με τετραπλασιασμό του κινδύνου εκδήλωσης μη θανατηφόρου στεφανιαίου επεισοδίου στους άνδρες. Στις γυναίκες ο ίδιος κίνδυνος βρέθηκε ελαφρά μικρότερος. Η ίδια μελέτη έδειξε επίσης ότι το οικογενειακό ιστορικό των κλασικών παραγόντων κινδύνου, όπως η υπέρταση και η υπερχοληστερολαιμία, αυξάνει

επίσης τον κίνδυνο εμφάνισης μη θανατηφόρου στεφανιαίου επεισοδίου σε άτομα ελεύθερα καρδιαγγειακών νοσημάτων.⁽⁷⁾

4.1.4. Γενετικοί παράγοντες

Οι γενετικοί παράγοντες μπορεί να σχετίζονται είτε με αύξηση του κινδύνου εμφάνισης στεφανιαίας νόσου, είτε με αύξηση της πιθανότητας ανάπτυξης ενός παράγοντα κινδύνου. Έχουν ανακαλυφθεί αρκετές μεταλλάξεις γονιδίων που σχετίζονται με αύξηση του κινδύνου εμφάνισης στεφανιαίας νόσου, καθώς και πολυμορφισμοί γονιδίων, με μικρή ή μέτρια επίδραση.⁽⁵¹⁾

Γενικά η κληρονομησιμότητα των επιπέδων λιπιδίων καθώς και των επιπέδων απολιποπρωτεϊνών είναι μεγαλύτερη του 50%⁽⁵²⁾, της υπέρτασης περίπου 30%⁽⁵³⁾, ενώ για την παχυσαρκία αναφέρεται κληρονομησιμότητα έως και 80%.⁽⁵⁴⁾ Γενικότερα, πολυάριθμοι γενετικοί παράγοντες συμβάλλουν στην εμφάνιση στεφανιαίας νόσου, άλλοι με ισχυρότερη και άλλοι μικρότερη επίδραση.

4.2. Τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου

4.2.1. Υπέρταση

Η υπέρταση, που καθορίζεται ως συστολική πίεση του αίματος υψηλότερη από 140 mm Hg ή ως διαστολική υψηλότερη από 90 mm Hg, αυξάνει σημαντικά τον κίνδυνο αθηροσκληρωτικής καρδιοπάθειας και αποτελεί μια από τις κυριότερες αιτίες θνησιμότητας και ανικανότητας παγκοσμίως.^(55,56)

Η υπέρταση ευθύνεται για αλλαγές του αρτηριακού τοιχώματος, παρόμοιες με αυτές που εμφανίζονται παρουσία υπερχοληστερολαιμίας. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρούνται αλλαγές στο ενδοθήλιο, προσκόλληση και είσοδος λευκοκυττάρων, συσσώρευση μακροφάγων, αυξημένη διαπερατότητα σε λιπίδια, μετανάστευση και πολλαπλασιασμός λείων μυϊκών κυττάρων. Απουσία υπερχοληστερολαιμίας η υπέρταση συνήθως οδηγεί σε στένωση του αρτηριακού τοιχώματος. Παρουσία υπερχοληστερολαιμίας όμως, η υπέρταση αποτελεί ακόμα σημαντικότερο προαγωγέα της αθηροσκληρωτικής εξεργασίας.⁽⁵⁷⁾ 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. ^(58,59)

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. ⁽⁶⁰⁾

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. ⁽⁷⁾

4.2.2. Υπερλιπιδαιμία

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα λιπίδια παίζουν κεντρικό ρόλο στην αθηροσκληρυντική διαδικασία και τα υψηλά επίπεδα χοληστερόλης (κυρίως χοληστερόλης χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών) συνδέονται με γρήγορη εξέλιξη της νόσου. ⁽⁶¹⁾ Η μελέτη Framingham, η MRFIT (Multiple Risk Factor Intervention Trial), και η LRC (Lipid Research Clinics) έδειξαν άμεση σχέση μεταξύ των επιπέδων ολικής και LDL χοληστερόλης και του ρυθμού νέων περιστατικών στεφανιαίας νόσου σε άνδρες και γυναίκες. ⁽⁶²⁻⁶⁴⁾

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. ⁽⁶⁵⁾

Ένας ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου στεφανιαίας νόσου, ιδιαίτερα στις γυναίκες, μπορεί επίσης να είναι τα υψηλά τριγλυκερίδια. Αντίθετα, οι υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες φαίνεται ότι ασκούν προστατευτική λειτουργία και έχουν αντίστροφη σχέση με τον κίνδυνο στεφανιαίας νόσου. Μελέτες των τελευταίων χρόνων τονίζουν την σημασία των τριγλυκεριδίων και της HDL στην πρόγνωση της στεφανιαίας νόσου και υποστηρίζουν ότι αποτελούν εξίσου σημαντικούς παράγοντες κινδύνου με την LDL και την ολική χοληστερόλη. ⁽⁶⁶⁾

Η προστατευτική δράση της HDL χοληστερόλης ξεκινά από το βασικό της μηχανισμό, δηλαδή από τη μεταφορά των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας στο ήπαρ. Η ισορροπία μεταξύ LDL και HDL είναι καίριας σημασίας για το ρυθμό σχηματισμού της λιπώδους αλλοίωσης στο αρτηριακό τοίχωμα. Φαίνεται επίσης ότι η HDL μειώνει τον αριθμό μορίων προσκόλλησης, τα οποία αποτελούν σημείο εισόδου των μονοπύρηνων στο αρτηριακό τοίχωμα. Η προστατευτική δράση της όμως δεν σταματάει εδώ, καθώς οι αντιφλεγμονώδεις, αντιθρομβωτικές και

αντιοξειδωτικές της ιδιότητες αποτελούν επιπλέον μηχανισμούς προστασίας του αρτηριακού ενδοθηλίου.⁽⁶⁷⁻⁶⁸⁾

4.2.3. Σακχαρώδης διαβήτης / Δυσανεξία στη γλυκόζη

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.⁽⁶⁹⁾

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 κλασικοί παράγοντες κινδύνου, όπως η υπέρταση και η υπερλιπιδαιμία, επιπολάζουν σε υψηλότερα ποσοστά σε διαβητικά άτομα.^(70,71)

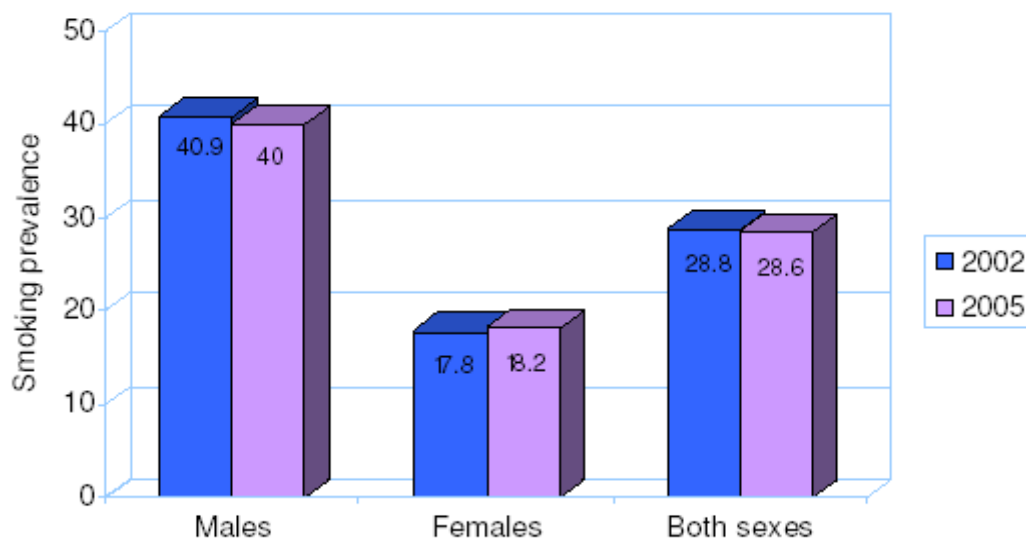
Χωρίς έκδηλο διαβήτη, η αντίσταση στην ινσουλίνη και η υπερινσουλιναίμία προάγουν την αθηροσκληρωτική εξεργασία μέσα από μια ποικιλία μηχανισμών. Η κυριότερη πορεία που εμπλέκεται στην επιτάχυνση της αθηροσκλήρωσης είναι πιθανότερα η αύξηση της μη ενζυματικής γλυκοζυλίωσης των πρωτεϊνών και των λιπιδίων 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.^(72,73)

Περίπου το 75% των ατόμων με σακχαρώδη διαβήτη πεθαίνουν από κάποια μορφή καρδιακής νόσου.⁽³⁷⁾ Στην Ελλάδα, δεδομένα της μελέτης CARDIO2000 έδειξαν ότι ο σακχαρώδης διαβήτης επιπόλαζε σε ποσοστό 31% στις γυναίκες και 25% στους άνδρες, και τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης έδειξαν ότι η παρουσία σακχαρώδους διαβήτη σχετίζεται με τριπλασιασμό του στεφανιαίου κινδύνου στους άνδρες και τετραπλασιασμό στις γυναίκες.⁽⁷⁾

4.2.4. Κάπνισμα

Το κάπνισμα αποτελεί έναν από τους κυριότερους παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου. Επηρεάζει τους παράγοντες πήξης και τη λειτουργία των αιμοπεταλίων, καθώς μετά το κάπνισμα αυξάνεται η συσώρευση αιμοπεταλίων, ο παράγοντας πήξης V και το ινωδογόνο πλάσματος. Το κάπνισμα μειώνει τη μεταφορά οξυγόνου, λόγω του μονοξειδίου του άνθρακα, και προκαλεί αγγειοσυστολή ως αποτέλεσμα διέγερσης α-αδρενεργικών υποδοχέων.⁽⁷⁴⁾

Γράφημα 4.1. Οι καπνιστικές συνήθειες στην Ευρώπη



Από: WHO Global Infobase

Πολλές επιδημιολογικές μελέτες έχουν επίσης ασχοληθεί με την επίδραση του παθητικού καπνίσματος στον κίνδυνο στεφανιαίας νόσου, με ευρήματα που δείχνουν ότι οι παθητικοί καπνιστές διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου σε σχέση με μη καπνιστές.⁽⁷⁵⁾

Στις ΗΠΑ υπολογίζεται ότι 30% των θανάτων από στεφανιαία νόσο οφείλονται στο κάπνισμα, με τον κίνδυνο να εμφανίζεται ισχυρά δόσοεξαρτώμενος. Το κάπνισμα δρα συνεργιστικά με άλλους παράγοντες κινδύνου, αυξάνοντας σημαντικά τον κίνδυνο στεφανιαίας νόσου. Αρκετές προοπτικές μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει ουσιαστική μείωση στην θνησιμότητα λόγω της ασθένειας σε πρώην καπνιστές, σε σύγκριση με καπνιστές.⁽⁷⁶⁾ Έρευνες έχουν επίσης παρουσιάσει πλεονεκτήματα από τη διακοπή του καπνίσματος, σε άτομα που έχουν ήδη αναπτύξει ασθένειες σχετιζόμενες με το κάπνισμα. Σε καπνιστές με ιστορικό στεφανιαίου επεισοδίου εμφανίζεται 50% μείωση του κινδύνου για δεύτερο επεισόδιο μετά τη διακοπή του καπνίσματος, καθώς και ανάλογη μείωση στη θνησιμότητα.⁽⁷⁷⁾

Στην Ελλάδα, η μελέτη ΑΤΤΙΚΗ εκτίμησε τον επιπολασμό του καπνίσματος σε 49% στους άνδρες και 32% στις γυναίκες. Στη μελέτη CARDIO2000 παρατηρήθηκαν παρόμοιες καπνιστικές συνήθειες και επιβεβαιώθηκε και στον ελληνικό πληθυσμό η αύξηση του κινδύνου ανάπτυξης στεφανιαίας νόσου σε καπνιστές. Τα ευρήματα για το παθητικό κάπνισμα έρχονται σε συμφωνία με άλλες επιδημιολογικές μελέτες, και συσχετίζουν επίσης το παθητικό κάπνισμα με αύξηση του στεφανιαίου κινδύνου.⁽⁷⁾

4.2.5. Παχυσαρκία

Η σχέση μεταξύ παχυσαρκίας και αθηροσκλήρωσης έχει αποτελέσει αντικείμενο έρευνας για πολλά χρόνια. Ευρήματα ερευνών, όπως η μελέτη των Επτά Χωρών, βρήκαν μικρή συσχέτιση μεταξύ παχυσαρκίας και στεφανιαίας αθηροσκλήρωσης.⁽⁷⁸⁾ 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.⁽⁷⁹⁾ Άλλες προοπτικές μελέτες όμως, έδειξαν ότι η παχυσαρκία, και ιδιαίτερα η κεντρικού τύπου, αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου στεφανιαίας νόσου, και η πρόσληψη βάρους αυξάνει τον στεφανιαίο κίνδυνο ανεξάρτητα με την συνύπαρξη άλλων παραγόντων κινδύνου.^(80,81)

Ανεξάρτητα με το τι ακριβώς ισχύει στην πραγματικότητα, η παχυσαρκία είτε άμεσα είτε έμμεσα αποτελεί παράγοντα κινδύνου, καθώς το αυξημένο σωματικό βάρος μπορεί να προκαλέσει αύξηση του έργου της καρδιάς, της πίεσης του αίματος, του επιπέδου των τριγλυκεριδίων και χοληστερόλης (ολικής και LDL) και μείωση των επιπέδων HDL χοληστερόλης, καθώς επίσης αποτελεί παράγοντα κινδύνου για εμφάνιση ινσουλινοαντοχής και σακχαρώδη διαβήτη.^(82,83)

4.3. Άλλοι τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου

Στον κίνδυνο ανάπτυξης αθηροσκλήρωσης συντελούν και μερικοί άλλοι παράγοντες :

- 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 α. Αυξημένα επίπεδα λιποπρωτεΐνης(a) Lp(a) σχετίζονται με την παρουσία στεφανιαίας νόσου, ιδιαίτερα σε ασθενείς με υπερχοληστερολαιμία. Φαίνεται ότι προφλεγμονώδη οξειδωμένα φωσφολιποειδή σχετίζονται ισχυρά με τα επίπεδα Lp(a) στο πλάσμα. Επιπλέον, η Lp(a) είναι δομικά ομόλογη με το πλασμινογόνο και φαίνεται ότι παρεμβαίνει στην παραγωγή της πλασμίνης προδιαθέτοντας, για το λόγο αυτό, σε θρομβωτικές επιπλοκές της αθηροσκλήρωσης.⁽⁷⁴⁾
- Η **ομοκυστεΐνη** είναι ένα μη απαραίτητο αμινοξύ που περιέχει θείο. Το ενδιαφέρον για την ομοκυστεΐνη προέκυψε από την παρατήρηση ότι περισσότερο από το 50% των παιδιών με ομοκυστινουρία πεθαίνουν από αγγειακή ασθένεια. Αρκετές μελέτες έχουν συνδέσει την υπερομοκυστεϊναιμία με αυξημένο κίνδυνο στεφανιαίας νόσου, όμως τα αποτελέσματα παραμένουν ασαφή. Φαίνεται ότι η ομοκυστεΐνη μειώνει την εξαρτώμενη από το ενδοθήλιο αγγειοδιαστολή, πιθανά μειώνοντας τη βιοδιαθεσιμότητα του οξειδίου του αζώτου είτε μειώνοντας τη σύνθεσή του, είτε αυξάνοντας την αποικοδόμησή του μέσω της παραγωγής

ελευθέρων ριζών.⁽⁸⁴⁻⁸⁶⁾

- Η **C-αντιδρώσα πρωτεΐνη** είναι δείκτης φλεγμονής και φαίνεται να αποτελεί ανεξάρτητο προβλεπτικό παράγοντα καρδιαγγειακών επεισοδίων σε υγιή άτομα. Πέρα όμως από την προβλεπτική της αξία, νεότερες μελέτες δείχνουν ότι συμβάλλει και ως αιτιολογικός παράγοντας στην ανάπτυξη στεφανιαίας νόσου, αλλά η αιτιώδης σχέση δεν έχει επαρκώς εξακριβωθεί.^(87,88)
- Το **ινωδογόνο** αποτελεί πρωτεΐνη οξείας φάσης και αυξάνεται σε φλεγμονώδεις καταστάσεις, όμως στατιστικές αναλύσεις μελετών δείχνουν ότι εκτός από το ότι αποτελεί δείκτη φλεγμονώδους κατάστασης, συμμετέχει άμεσα και στο σχηματισμό θρόμβων.⁽⁸⁹⁾
- Η σχετιζόμενη με λιποπρωτεΐνες **φωσφολιπάση A₂ (Lp-PLA₂)** ανήκει στην υπερ-οικογένεια ενζύμων των φωσφολιπασών A₂, παράγεται από τα μονοκύτταρα, τα T-λεμφοκύτταρα και τα μαστοκύτταρα. Στο πλάσμα, το 80% της Lp-PLA₂ προσδένεται στην LDL, και η υπόλοιπη στην HDL και VLDL. Η Lp-PLA₂ παίζει ρόλο στην υδρόλυση της οξειδωμένης LDL και στον σχηματισμό λυσοφωσφατιδυλοχολίνης, η οποία αποτελεί προαθηρογόνο και φλεγμονώδη μεσολαβητή. Η λυσοφωσφατιδυλοχολίνη αποτελεί χημειοτακτικό παράγοντα για τα μακροφάγα και τα T – λεμφοκύτταρα και αυξάνει τη μετανάστευση των λείων μυϊκών κυττάρων. Επίσης, αυξάνει την έκφραση μορίων προσκόλλησης και κυτοκινών. Αντίθετα, κάποιες μελέτες δείχνουν ότι η Lp-A₂ έχει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, καθώς διαδραματίζει ρόλο στην υδρόλυση του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF).⁽⁷⁴⁾
- Η **έλλειψη σωματικής δραστηριότητας** αποτελεί επίσης παράγοντα κινδύνου ανάπτυξης στεφανιαίας νόσου. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι αυξημένα επίπεδα φυσικής δραστηριότητας σχετίζονται με χαμηλότερα επίπεδα νοσηρότητας και θνησιμότητας λόγω στεφανιαίας νόσου.⁽⁹⁰⁻⁹¹⁾ Τα ωφέλη της άσκησης μπορεί να οφείλονται σε πολλούς μηχανισμούς που συμπεριλαμβάνουν αλλαγές στο λιπιδαιμικό προφίλ, στον μεταβολισμό των υδατανθράκων, στα επίπεδα ινωδογόνου και στην πίεση του αίματος.⁽⁹²⁻⁹⁴⁾ Επιπλέον, η άσκηση, ακόμα και μικρής έντασης, αποτελεί σημαντικό κομμάτι της διατήρησης υγιούς σωματικού βάρους και της πρόληψης εμφάνισης παχυσαρκίας και διαβήτη.⁽⁷⁾
- Η συσχέτιση μεταξύ **ψυχολογικών παραγόντων** και στεφανιαίας νόσου είναι γνωστή για δεκαετίες αλλά πρόσφατα εξακριβώθηκε εμπειρικά. Από την άλλη, υπάρχουν μελέτες που δεν βρήκαν τέτοια συσχέτιση, και τα αποτελέσματα παραμένουν αντικρουόμενα. Οι γυναίκες φαίνεται να επηρεάζονται περισσότερο από ψυχοκοινωνικούς παράγοντες από ότι οι άντρες.⁽⁹⁵⁻⁹⁷⁾

- Η *άπνοια ύπνου* πυροδοτεί μηχανισμούς ασθενείας που σχετίζονται με μυοκαρδιακή ισχαιμία και συμβάλλει πιθανά στην εμφάνιση νυχτερινής στηθάγχης. Μελέτες συσχέτισης της άπνοιας ύπνου με τη στεφανιαία νόσο προτείνουν αιτιολογική σχέση της άπνοιας με στεφανιαία σύνδρομο, καθώς φαίνεται ότι α) η παρουσία άπνοιας σχετίζεται με στεφανιαία νόσο β) η βαρύτητα της άπνοιας αποτελεί προβλεπτικό παράγοντα της στεφανιαίας νόσου γ) χρονικά η στεφανιαία νόσος ακολουθεί την εμφάνιση άπνοιας δ) με θεραπεία της άπνοιας μειώνεται ο στεφανιαίος κίνδυνος.⁽⁷⁴⁾
- Από επιδημιολογικές μελέτες και κλινικές δοκιμές φαίνεται ότι οι *διατροφικές συνήθειες* σχετίζονται με το ρυθμό εμφάνισης καρδιαγγειακών διαταραχών. Όσον αφορά τα διατροφικά συστατικά, τα λιπαρά οξέα ρυθμίζουν την ομοιόσταση της χοληστερόλης και επηρεάζουν γενικότερα τους καρδιαγγειακούς παράγοντες κινδύνου, όπως το σωματικό βάρος και την αρτηριακή πίεση. Το κορεσμένο λίπος συσχετίζεται με τις τιμές χοληστερόλης, ενώ τα ω-3 λιπαρά ασκούν προστατευτική δράση έναντι της εμφάνισης θανατηφόρου επεισοδίου σε στεφανιαίους ασθενείς.

Μελέτες παρέμβασης με βιταμινούχα σκευάσματα, δεν έχουν δείξει προστατευτική δράση κάποιου συστατικού, όμως η μελέτη διατροφικών προτύπων (που περιλαμβάνουν κατανάλωση φρούτων, λαχανικών, μονοακόρεστων λιπαρών και χαμηλών σε λιπαρά γαλακτοκομικών) αναδεικνύει συσχέτισή τους με μειωμένο κίνδυνο καρδιαγγειακών επεισοδίων. Ο ρόλος της διατροφής στην εμφάνιση οξέων στεφανιαίων συνδρόμων θα αναλυθεί εκτενέστερα στο επόμενο κεφάλαιο.⁽⁹⁸⁾

5. ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΑ ΠΡΟΤΥΠΑ & ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΝΟΣΟΣ

5.1. Διατροφικά πρότυπα

Η ανάλυση διατροφικών προτύπων αντικατοπτρίζει την πολυπλοκότητα της διαιτητικής πρόσληψης και έχει απασχολήσει ιδιαίτερα την διατροφική επιδημιολογία.

Η έρευνα για πολύ καιρό εστίαζε στη μελέτη μεμονωμένων θρεπτικών συστατικών, οδηγώντας σε αξιόλογα αποτελέσματα, όπως στην αναγνώριση και πρόληψη διατροφικών ανεπαρκειών καθώς και στην ανακάλυψη της επίδρασης του διαιτητικού λίπους στο λιπιδαιμικό προφίλ. Παρ'όλα αυτά, οι αλληλοσυσχετίσεις της ανθρώπινης φυσιολογίας και της βιολογικής ενεργότητας των τροφίμων είναι απίστευτα πολύπλοκες, με αποτέλεσμα η μελέτη μεμονωμένων θρεπτικών συστατικών να μην είναι ικανή να εξηγήσει το σύνολο των επιδράσεων ενός συστατικού στην ανθρώπινη φυσιολογία.⁽⁹⁹⁾

Η μελέτη μεμονωμένων θρεπτικών συστατικών και τροφίμων παρουσιάζει και κάποια μεθοδολογικά προβλήματα, καθώς οι άνθρωποι δεν καταναλώνουν μεμονωμένα θρεπτικά συστατικά, αλλά γεύματα που αποτελούνται από τρόφιμα, και αυτά με τη σειρά τους από θρεπτικά συστατικά.⁽¹⁰⁰⁾ Ο αλληλοσυσχετισμός των θρεπτικών συστατικών καθιστά δύσκολη τη μελέτη μιας μεμονωμένης επίδρασης, και επιπλέον κάθε μεμονωμένη επίδραση ίσως είναι μικρή και επομένως δύσκολο να εντοπιστεί. Επιπλέον, μελετώντας τις επιδράσεις ποικιλίας θρεπτικών συστατικών, είναι πιθανό να προκύψουν τυχαίες συσχετίσεις, χωρίς εμφανή αιτιολογική συσχέτιση.^(101,102)

Επειδή λοιπόν τα τρόφιμα και τα θρεπτικά συστατικά έχουν αθροιστικές ή γενικότερα συνδυαστικές επιδράσεις, μια καλύτερη προσέγγιση στη μελέτη της επιδράσεως της διατροφής στην υγεία είναι η μελέτη των διατροφικών προτύπων.⁽⁹⁹⁾

Η ανάλυση διατροφικών προτύπων εμφανίστηκε ως μια εναλλακτική και αποτελεσματικότερη προσέγγιση στη διερεύνηση της σχέσης της διατροφής με την εμφάνιση χρόνιων ασθενειών, καθώς διερευνά την επίδραση του συνόλου της δίαιτας στην υγεία.⁽¹⁰³⁾

Για τη μελέτη των διατροφικών προτύπων απαιτείται εφαρμογή συγκεκριμένων στατιστικών μεθόδων. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι:

α) **παραγοντική ανάλυση** (factor analysis): χρησιμοποιεί δεδομένα από ερωτηματολόγια συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων (FFQs) ή από ημερολόγια καταγραφής, για να εντοπίσει πρότυπα κατανάλωσης τροφίμων. Τα τρόφιμα ή οι ομάδες τροφίμων που αλληλοσυσχετίζονται

ομαδοποιούνται, και προκύπτει ένα συνολικό σκορ για κάθε πρότυπο. Ακολουθεί ανάλυση συσχέτισης ή παλινδρόμησης για να εξεταστεί η σχέση κάθε προτύπου με τον υπό μελέτη παράγοντα.

β) **ανάλυση κατά συστάδες** (cluster analysis): κατηγοριοποιεί τα άτομα της μελέτης σε ομοιογενείς ομάδες, ανάλογα με τη συχνότητα κατανάλωσης κάποιας ομάδας τροφίμων, ανάλογα με το ποσοστό της ενέργειας που παρέχεται από κάθε ομάδα τροφίμων ή σύμφωνα με κάποια άλλη κατηγοριοποίηση.⁽¹⁰⁴⁾

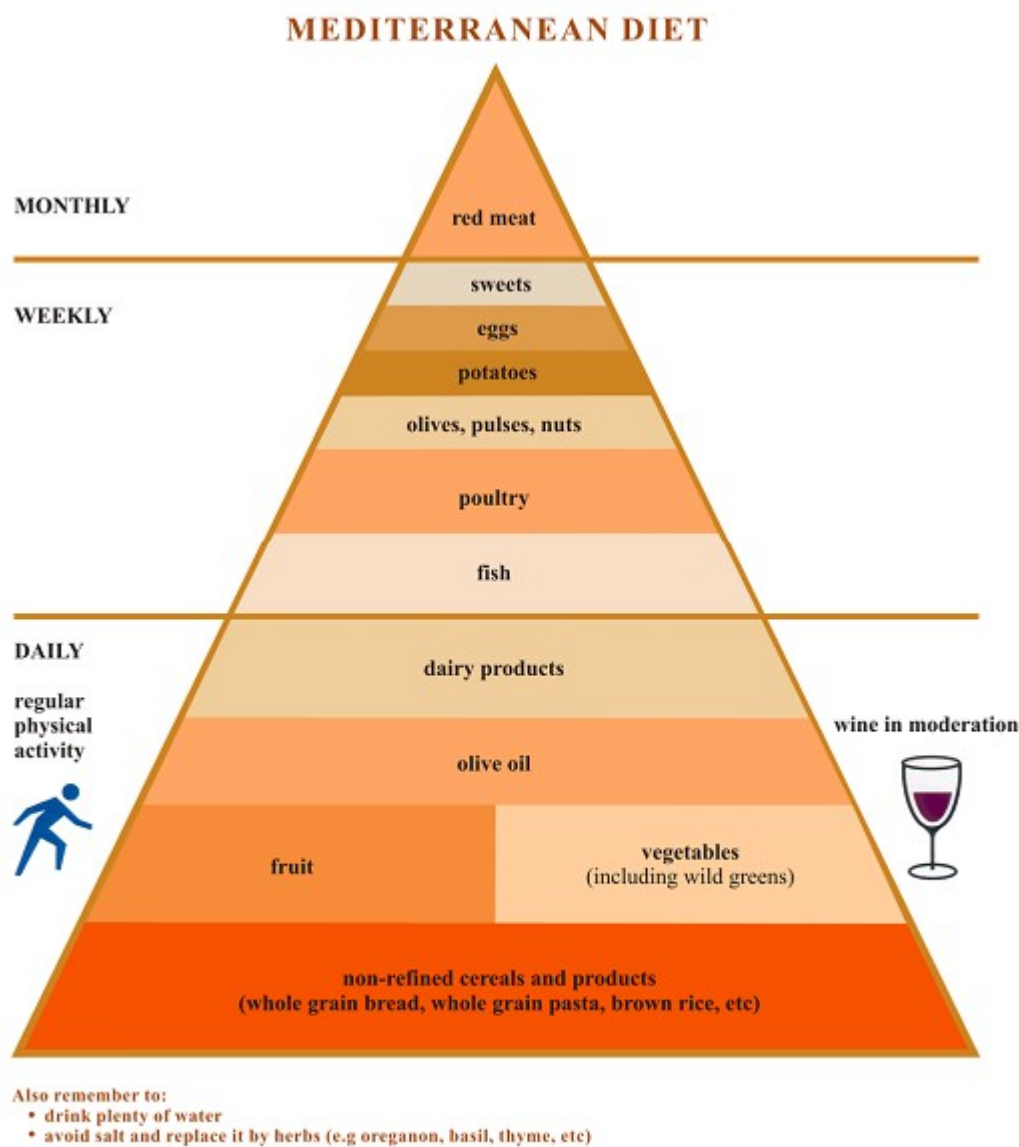
γ) **διατροφικοί δείκτες ή σκορ** : προκύπτουν από διατροφικές οδηγίες και ουσιαστικά μετράνε το βαθμό υιοθέτησης των συστάσεων, δεν στηρίζονται όμως πάντα σε επιστημονικές αποδείξεις.⁽¹⁰³⁾

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.⁽¹⁰⁵⁾

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.^(105,106)

Πολυάριθμες μελέτες έχουν διερευνήσει την επίδραση της Μεσογειακής διατροφής στην υγεία. Η Μεσογειακή διατροφή είναι πλούσια σε μονοακόρεστα λιπαρά, τα οποία 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.⁽¹⁰⁷⁾



Source: Supreme Scientific Health Council, Hellenic Ministry of Health

Εικόνα 5.1. Η πυραμίδα της Μεσογειακής διατροφής

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.⁽¹⁰⁸⁻¹⁰⁹⁾ Τα ω-3 λιπαρά οξέα έχουν συσχετιστεί με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου, καθώς και με μείωση στη θνησιμότητα λόγω της ασθένειας.^(110,111) Αποτελέσματα της μελέτης δευτερογενούς πρόληψης Lyon Diet Heart Study συσχέτισαν την πρόσληψη α-λινολενικού οξέος με μικρότερο αριθμό στεφανιαίων επεισοδίων⁽¹¹²⁾, ενώ η μελέτη DART έδειξε ότι η κατανάλωση λιπαρών ψαριών σχετίζεται με μείωση της θνησιμότητας από όλες τις αιτίες.⁽¹¹³⁾ 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.⁽¹¹⁴⁾

Νέα δεδομένα συνηγορούν ότι η Μεσογειακή διατροφή συμβάλλει στη μείωση της αρτηριακής πίεσης⁽¹¹⁵⁾. 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.⁽⁷⁾

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⁽¹¹⁶⁾. 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.⁽¹¹⁵⁾

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⁽¹¹⁷⁾, όμως αντίθετα, σε έρευνα της Τριχοπούλου και συν. σε μεγάλο δείγμα του ελληνικού πληθυσμού, δεν προέκυψε τέτοια συσχέτιση.⁽¹¹⁸⁾ 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⁽¹¹⁹⁻¹²³⁾. 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.⁽¹²⁴⁾ 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.⁽⁷⁾

Γενικότερα, η Μεσογειακή διατροφή φαίνεται να ασκεί προστατευτική δράση έναντι της αθηροσκληρωτικής εξεργασίας, ανεξάρτητα από την τροποποίηση των παραγόντων κινδύνου. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι ορισμένα συστατικά του ελαιολάδου μπορούν να μειώσουν την οξείδωση της LDL και τη συσσώρευση αιμοπεταλίων, να τροποποιήσουν την ενεργοποίηση του ενδοθηλίου και να μειώσουν την έκφραση μορίων προσκόλλησης (όπως VCAM-1). Επιπλέον, οι

πολυφαινόλες που περιέχει το ελαιόλαδο και το κόκκινο κρασί, φαίνεται να μειώνουν την προσκόλληση των μονοκύτταρων στο ενδοθήλιο, καθώς και την παραγωγή mRNA για την έκφραση του VCAM-1, παρεμποδίζουν τη μετανάστευση λείων μυϊκών κυττάρων και βελτιώνουν την έκφραση και δραστηριότητα της συνθάσης του οξειδίου του αζώτου. Παρόμοιες δράσεις εντοπίζονται, όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα, και στα ω-3 λιπαρά οξέα. Επίσης, μία υψηλή κατανάλωση φρούτων και δημητριακών φαίνεται να σχετίζεται με χαμηλότερες συγκεντρώσεις ιντερλευκίνης-6, ενώ υψηλή κατανάλωση ξηρών καρπών και ελαιολάδου σχετίζεται με χαμηλότερες συγκεντρώσεις VCAM-1, ICAM-1, IL-6 και CRP. Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων ασκούνται αυτές οι προστατευτικές δράσεις δεν έχουν διευκρινιστεί σε ικανοποιητικό βαθμό, αλλά είναι πλέον σαφές ότι η θετική επίδραση της Μεσογειακής διατροφής είναι πολυσύνθετη και δεν περιορίζεται μόνο στην τροποποίηση του λιπιδαιμικού προφίλ.⁽¹²⁵⁻¹³⁰⁾

5.3. Το σκορ Μεσογειακής διατροφής

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.⁽¹³¹⁾

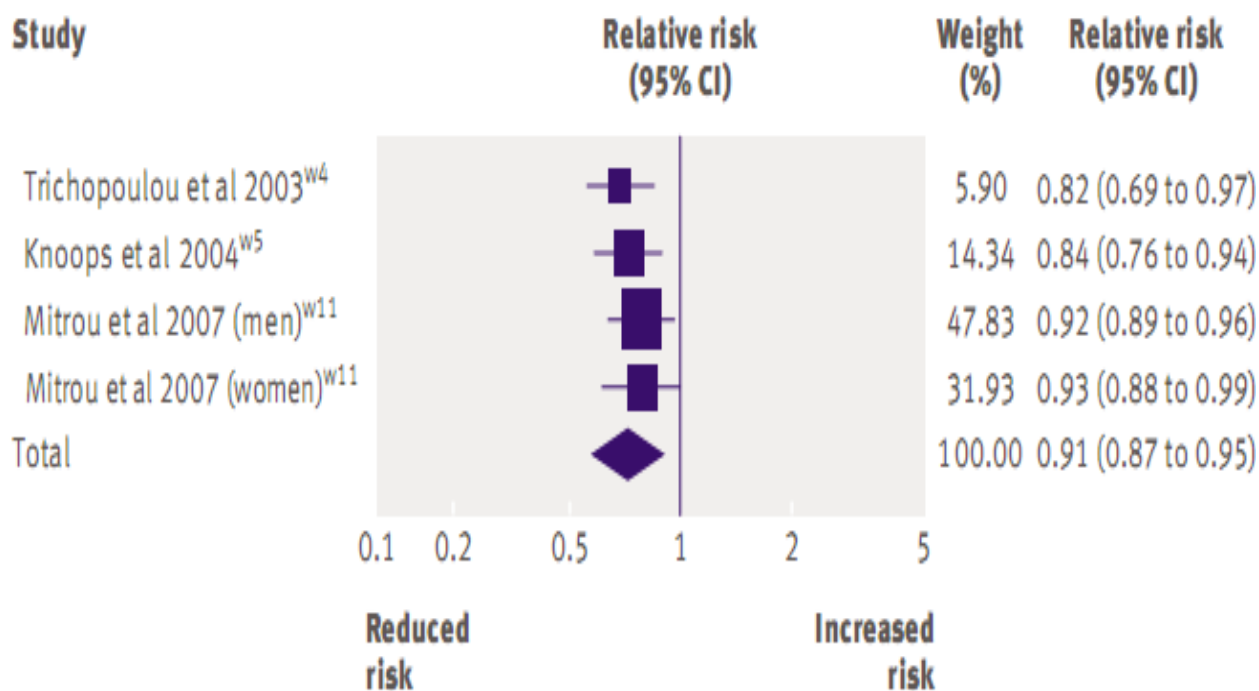
Στην Ελλάδα η χρήση των Μεσογειακών σκορ ξεκίνησε σε μια προσπάθεια αποτίμησης της σχέσης μεταξύ Μεσογειακής διατροφής και μακροβιότητας (Τριχοπούλου και συνεργάτες). Η θετική συσχέτιση που προέκυψε αποτέλεσε κίνητρο για ολόένα και περισσότερους ερευνητές, οδηγώντας στην ευρύτερη χρησιμοποίηση των Μεσογειακών σκορ στην αναζήτηση συσχετίσεων διατροφής και υγείας.⁽¹³²⁾ (πίνακας 5.1.)

Πίνακας 5.1. Η χρήση των μεσογειακών σκορ

Ερευνητές	Χώρα	Έκβαση	Follow-up	Ηλικία δείγματος	Φύλο	Συστατικά του score
Τριχοπούλου και συν. (1995) ⁽¹³²⁾	Ελλάδα	Ολική θνησιμότητα	4-5	>70	Γ/Α	Αυξημένη κατανάλωση λαχανικών, δημητριακών, φρούτων, οσπρίων. Υψηλός λόγος MUFA/SFA. Μέτρια κατανάλωση αλκοόλ, χαμηλή πρόσληψη κρέατος και προϊόντων κρέατος, χαμηλή πρόσληψη γαλακτοκομικών
Κουρής-Μπλαζός και συν. (1999) ⁽¹³³⁾	Αυστραλία	Ολική θνησιμότητα	4-6	>70	Γ/Α	
Lasheras et al (2000) ⁽¹³⁴⁾	Ισπανία	Ολική θνησιμότητα	9,5	65-80	Γ/Α	
Τριχοπούλου και συν. (2003) ⁽¹³⁵⁾	Ελλάδα	Ολική & στεφανιαία θνησιμότητα	3,7	20-86	Γ/Α	Αυξημένη κατανάλωση λαχανικών, δημητριακών, οσπρίων. Υψηλή κατανάλωση φρούτων και καρπών. Υψηλή κατανάλωση ψαριού. Υψηλός λόγος MUFA/SFA. Μέτρια κατανάλωση αλκοόλ, χαμηλή πρόσληψη κρέατος και πουλερικών, χαμηλή πρόσληψη γαλακτοκομικών
Knoops et al (2004) ⁽¹³⁶⁾	Βέλγιο, Δανία, Φινλανδία, Γαλλία, Ελλάδα, Ουγγαρία, Ιταλία, Ολλανδία, Πορτογαλία, Ισπανία, Ελβετία	Ολική θνησιμότητα, καρδιαγγειακή & στεφανιαία, θνησιμότητα καρκίνου	10	70-90	Γ/Α	Αυξημένη κατανάλωση οσπρίων, καρπών, σπόρων. Υψηλή κατανάλωση φρούτων, δημητριακών. Υψηλή κατανάλωση λαχανικών και πατάτας. Υψηλή κατανάλωση ψαριών. Υψηλός λόγος MUFA/SFA. Χαμηλή πρόσληψη κρέατος και προϊόντων, χαμηλή πρόσληψη γαλακτοκομικών
Τριχοπούλου και συν. (2005) ⁽¹³⁷⁾	Ελλάδα, Δανία, Γαλλία, Γερμανία, Ιταλία, Ολλανδία, Πορτογαλία, Ελβετία, Ισπανία	Ολική θνησιμότητα	7,4	>60	Γ/Α	Αυξημένη κατανάλωση λαχανικών, δημητριακών, οσπρίων. Υψηλή κατανάλωση φρούτων και καρπών. Υψηλή κατανάλωση ψαριού. Υψηλός λόγος MUFA+PUFA/SFA. Μέτρια κατανάλωση αλκοόλ, χαμηλή πρόσληψη κρέατος και πουλερικών, χαμηλή πρόσληψη γαλακτοκομικών
Λάγιου και συν. (2006) ⁽¹³⁸⁾	Σουηδία	Ολική θνησιμότητα, θνησιμότητα καρκίνου	12	30-49	Γ	Αυξημένη κατανάλωση λαχανικών, δημητριακών, οσπρίων. Υψηλή κατανάλωση φρούτων και καρπών. Υψηλή κατανάλωση ψαριού. Υψηλός λόγος MUFA/SFA. Μέτρια κατανάλωση αλκοόλ, χαμηλή πρόσληψη κρέατος και πουλερικών, χαμηλή πρόσληψη γαλακτοκομικών

Fung et al (2006) (139)	ΗΠΑ	Καρκίνος μαστού	18	30-55	Γ	Υψηλή πρόσληψη οσπρίων, ολικής αλέσεως προϊόντων, φρούτων, καρπών, λαχανικών, ψαριών. Υψηλός λόγος MUFA/SFA. Μέτρια κατανάλωση αλκοόλ, χαμηλή πρόσληψη κόκκινου κρέατος και επεξεργασμένων κρεάτων.
Scarmeas et al (2006) ⁽¹⁴⁰⁾	ΗΠΑ	Ασθένεια Alzheimer's	4	77,2	Γ/Α	Αυξημένη κατανάλωση λαχανικών, δημητριακών, οσπρίων, φρούτων, ψαριού. Υψηλός λόγος MUFA/SFA. Μέτρια κατανάλωση αλκοόλ, χαμηλή πρόσληψη κρέατος, χαμηλή πρόσληψη γαλακτοκομικών
Gao et al (2007) (141)	ΗΠΑ	Ασθένεια Parkinson's	16	40-75	A	Υψηλή πρόσληψη οσπρίων, ολικής αλέσεως προϊόντων, φρούτων, καρπών, λαχανικών, ψαριών. Υψηλός λόγος MUFA/SFA. Μέτρια κατανάλωση αλκοόλ, χαμηλή πρόσληψη κόκκινου κρέατος και επεξεργασμένων κρεάτων.
Gao et al (2007) (141)	ΗΠΑ	Ασθένεια Parkinson's	16	40-75	Γ	Υψηλή πρόσληψη οσπρίων, ολικής αλέσεως προϊόντων, φρούτων, καρπών, λαχανικών, ψαριών. Υψηλός λόγος MUFA/SFA. Μέτρια κατανάλωση αλκοόλ, χαμηλή πρόσληψη κόκκινου κρέατος και επεξεργασμένων κρεάτων.
Mitrou et al (2007) ⁽¹⁴²⁾	ΗΠΑ	Ολική θνησιμότητα	10	50-71	A	
Mitrou et al (2007) ⁽¹⁴²⁾	ΗΠΑ	Ολική και καρδιαγγειακή θνησιμότητα, θνησιμότητα καρκίνου	10	50-71	Γ	
Benetou et al (2008) ⁽¹⁴³⁾	Ελλάδα	Επίπτωση καρκίνου	7,9	20-86	Γ/Α	Αυξημένη κατανάλωση λαχανικών, δημητριακών, οσπρίων. Υψηλή κατανάλωση φρούτων και καρπών. Υψηλή κατανάλωση ψαριού. Υψηλός λόγος MUFA/SFA. Μέτρια κατανάλωση αλκοόλ, χαμηλή πρόσληψη κρέατος και πουλερικών, χαμηλή πρόσληψη γαλακτοκομικών

Πρόσφατη μετα-ανάλυση των παραπάνω μελετών έδειξε ότι η υιοθέτηση της μεσογειακής διατροφής σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων. Συγκεκριμένα, 2 βαθμοί αύξησης του σκορ μεσογειακής διατροφής σχετίζονται με 10% μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων ($p\text{-value}<0,0001$). (Εικόνα 5.1.)⁽¹⁴⁴⁾



Εικόνα 5.2. Υιοθέτηση μεσογειακής διατροφής και μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων

Στην Ελλάδα ένα νέο Μεσογειακό σκορ αναπτύχθηκε από τους Panagiotakos et al⁽¹⁴⁵⁾ και χρησιμοποιήθηκε κατά τη διεξαγωγή της έρευνας ΑΤΤΙΚΗ. Σύμφωνα με τις Μεσογειακές διαιτητικές συνήθειες, το σκορ συμπεριλαμβάνει την εβδομαδιαία κατανάλωση των ακόλουθων 11 ομάδων τροφίμων : μη επεξεργασμένα δημητριακά (ολικής αλέσεως ψωμί και ζυμαρικά, καστανό ρύζι, κτλ), φρούτα, λαχανικά, όσπρια, πατάτες, ψάρια, κρέας και προϊόντα κρέατος, πουλερικά, πλήρη γαλακτοκομικά προϊόντα (τυρί, γιαούρτι, γάλα), καθώς και ελαιόλαδο και αλκοόλ. Έπειτα, με βάση την προτεινόμενη πρόσληψη χρησιμοποιήθηκαν από τους ερευνητές μονοτονικές συναρτήσεις (εκτός από το αλκοόλ) έτσι ώστε να μπορεί να αξιολογηθεί η συχνότητα κατανάλωσης των τροφίμων αυτών.

Συγκεκριμένα, για κάθε ομάδα τροφίμων δίνεται ένας βαθμός (από 0 έως 5 ή αντίστροφα) σύμφωνα με τη θέση τους στη Μεσογειακή διατροφική πυραμίδα. Για την κατανάλωση τροφίμων που θεωρούνται ‘κοντά’ στο μεσογειακό πρότυπο (π.χ. αυτά που συστήνονται

καθημερινά ή σε ποσότητες μεγαλύτερες των τριών μερίδων την εβδομάδα) δίνεται σκορ μεταξύ 1 και 5 για σπάνια έως καθημερινή κατανάλωση, ενώ 0 για απουσία κατανάλωσης. Οι πατάτες, αν και δεν βρίσκονται στη βάση της πυραμίδας, συμπεριλήφθηκαν σε αυτή την ομάδα τροφίμων, καθώς αποτελούν καλή πηγή βιταμινών C, B1, B2, νιασίνης, υδατανθράκων, ινών, καλίου και μαγνησίου, συστατικά τα οποία έχουν συσχετιστεί με καρδιαγγειακούς δείκτες κινδύνου. Παρόλα αυτά πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ότι η κατανάλωση πατατών έχει συσχετιστεί με την 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 5.2. παρουσιάζει το σύστημα βαθμολόγησης σύμφωνα με το Μεσογειακό Διατροφικό Σκορ.

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

Πίνακας 5.2. Το Μεσογειακό Διατροφικό Σκορ

	Συχνότητα κατανάλωσης (μερίδες/ εβδομάδα)					
Μη – επεξεργασμένα	Ποτέ	1-6	7-12	13-18	19-31	>32
Δημητριακά	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	≤1	2-3	4-5	6-7	8-10	>10
προϊόντα του	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	4	5	0
Ελαιόλαδο στο μαγείρεμα	Ποτέ	Σπάνια	<1	1-3	3-5	Καθημερινά
(φορές/εβδομάδα)	0	1	2	3	4	5
Αλκοολούχα ροφήματα	<300	300	400	500	600	>700 ή 0
(ml/ημέρα, 100 ml = 12 gr	5	4	3	2	1	0
αιθανόλης)						

5.4. Μεσογειακή διατροφή & εμφάνιση οξέων στεφανιαίων συνδρόμων

Η μελέτη των 7 χωρών αποτελεί μία από τις σημαντικότερες έρευνες που συνέβαλαν στην κατανόηση της επίδρασης της Μεσογειακής διατροφής στην ολική και καρδιαγγειακή θνησιμότητα. Στο τέλος της 25-ετούς παρακολούθησης, οι ερευνητές της μελέτης ανακάλυψαν συσχετίσεις μεταξύ της μειωμένης στεφανιαίας θνησιμότητας και πληθυσμιακών διαφορών στην διαιτητική πρόσληψη κορεσμένων λιπαρών οξέων και φλαβονοειδών.⁽¹⁴⁶⁾

Στην Ελλάδα οι ερευνητές της μελέτης CARDIO 2000 μελέτησαν ένα δείγμα 661 ατόμων μέσης ηλικίας που εμφάνισαν πρώτη φορά επεισόδιο εμφράγματος ή ασταθούς στηθάγχης, καθώς και αντίστοιχο αριθμό υγιών ατόμων (ομάδα ελέγχου) από ποικίλες Ελληνικές περιοχές. Η υιοθέτηση μιας μεσογειακής δίαιτας συσχετίστηκε με 16% μείωση του κινδύνου πρώτης

εμφάνισης οξέος στεφανιαίου συνδρόμου. Επιπλέον, σε μια υπο-μελέτη της CARDIO 2000, και αφού συνυπολογίστηκε η επίδραση αρκετών συγχυτικών παραγόντων, οι ερευνητές εκτίμησαν την μείωση του κινδύνου σε 7-10% σε υπερτασικούς ασθενείς, υπό αγωγή, απουσία αγωγής και μη ρυθμισμένους. Επιπλέον, στην ομάδα των ασθενών με υπερχοληστερολαιμία, η μείωση του κινδύνου με υιοθέτηση μεσογειακής διαίτας υπολογίστηκε στο 12%, ανεξάρτητα από τα επίπεδα χοληστερόλης και άλλους καρδιαγγειακούς παράγοντες. Τέλος, σε ασθενείς με μεταβολικό σύνδρομο, η μείωση του κινδύνου υπολογίστηκε στο 35%, αφού έγιναν οι απαραίτητες προσαρμογές ανάλογα με την ηλικία, το φύλο, το μορφωτικό και οικονομικό επίπεδο καθώς και με τους κλασικούς παράγοντες κινδύνου. ^(13,146)

Οι Τριχοπούλου και συν από τα ευρήματα της μελέτης EPIC (προοπτική μελέτη που συμπεριέλαβε 22,043 ενήλικες μέσης ή μεγαλύτερης ηλικίας από την Ελλάδα), 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. ⁽¹³⁵⁾

Πρόσφατα δεδομένα από τη μελέτη ΑΤΤΙΚΗ έδειξαν επίσης ότι η αύξηση στο Μεσογειακό σκορ κατά 1 μονάδα (1-55) σχετίζεται με 6% μείωση του κινδύνου εμφάνισης στεφανιαίας νόσου. ⁽¹⁴⁷⁾

Μεσογειακά διατροφικά σκορ σε άλλους πληθυσμούς, έχουν δείξει παρόμοια αποτελέσματα. Οι Martinez-Gonzalez et al, σε 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, παρατηρήθηκε 8% μείωση του κινδύνου με αύξηση του σκορ κατά 1 μονάδα όταν χρησιμοποιήθηκε σκορ με εύρος 5-40, ή 45% μείωση του κινδύνου, με χρήση σκορ εύρους 0-8. ⁽¹⁴⁸⁾ Αντίστοιχα αποτελέσματα προκύπτουν και από άλλες μελέτες, με μια μέση μείωση του στεφανιαίου κινδύνου κατά 10-15%, για αύξηση του σκορ κατά 2 μονάδες, με εύρος σκορ 0-9. ^(136,142)

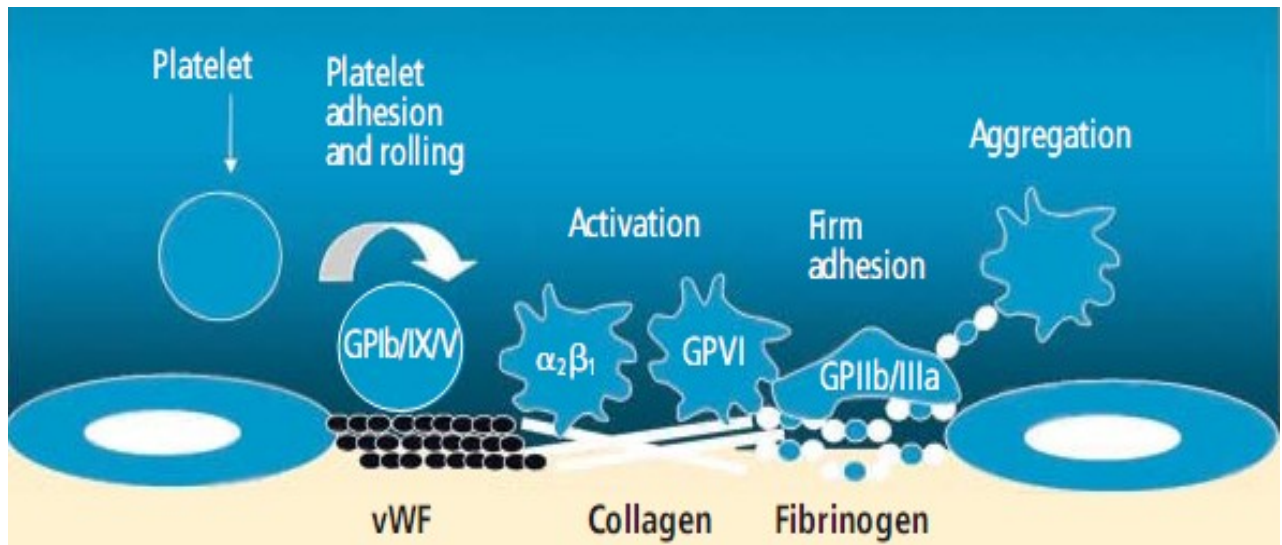
6. ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ

6.1. Ο ρόλος των αιμοπεταλίων στην αθηροσκλήρωση

Τα αιμοπετάλια είναι απύρηντα κύτταρα που παράγονται από τα μεγακαρυοκύτταρα που βρίσκονται στο μυελό των οστών. Δημιουργούνται στην εξωτερική μεμβράνη των μεγακαρυοκυττάρων, και από εκεί απελευθερώνονται στην κυκλοφορία, σε αριθμό περίπου 200.000 – 400.000 ανά ml αίματος. Τα αιμοπετάλια παίζουν σημαντικό ρόλο στην αγγειακή απόκριση σε τραυματισμό. Απελευθερώνουν κυστίδια που περιέχουν ADP, το οποίο ενεργοποιεί άλλα αιμοπετάλια. Έχουν επίσης κυστίδια που περιέχουν πρωτεΐνες και μεσολαβητές πρωτεϊνών (platelet derived growth factor, platelet factor 4) που εμπλέκονται σε φλεγμονώδεις διεργασίες. Η επιφάνεια των αιμοπεταλίων καλύπτεται από εκατοντάδες υποδοχείς, όπως υποδοχείς για τα ενεργοποιημένα κύτταρα του αγγειακού τοιχώματος, καθώς και για πρωτεΐνες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Τα αιμοπετάλια έχουν ικανότητα προσκόλλησης, ιδιαίτερα σε σημεία αγγειακού τραυματισμού, όπου συσσωρεύονται και απελευθερώνουν το περιεχόμενο των κυστιδίων τους.

Φυσιολογικά, τα αιμοπετάλια βρίσκονται σε μη ενεργοποιημένη κατάσταση και κατευθύνονται παθητικά σε σημεία αγγειακού τραυματισμού. Αρχικά, προσκολλώνται σε πρωτεΐνες όπως ο παράγοντας Von Willebrand, ο οποίος αποτελεί μια πρωτεΐνη της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας που παράγεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η γλυκοπρωτεΐνη Ib/IX/V των αιμοπεταλίων προσδένεται στον παράγοντα Von Willebrand, δημιουργώντας μία χαλαρή σύνδεση η οποία οδηγεί σε συσσώρευση αιμοπεταλίων στην επιφάνεια του αγγειακού τοιχώματος. Τότε τα αιμοπετάλια προσδένονται σε υποδοχείς κολλαγόνου και υποδοχείς της γλυκοπρωτεΐνης VI, οδηγώντας σε ενδοκυττάρια μεταγωγή σήματος και ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Μετά την ενεργοποίησή τους, τα αιμοπετάλια προσδένονται ισχυρά στο κολλαγόνο, μέσω του υποδοχέα της γλυκοπρωτεΐνης IIb/IIIa. Η γλυκοπρωτεΐνη αυτή εμπλέκεται επίσης σε αλληλεπιδράσεις αιμοπεταλίου-αιμοπεταλίου αλλά και σε σύνδεση των αιμοπεταλίων με το ινωδογόνο, οδηγώντας σε ενεργοποίηση, συσσώρευση και προσκόλληση αιμοπεταλίων. ⁽¹⁴⁹⁾

**Εικόνα 6.1. Ενεργοποίηση και συσσώρευση αιμοπεταλίων σε
θέσεις αγγειακού τραυματισμού**



Από: Kottke-Marchant K. Importance of platelets and platelet response in acute coronary syndromes. *Cleve Clin J Med.* 2009 Apr;76 Suppl 1:S2-7

Τα αιμοπετάλια διαδραματίζουν σημαντικές λειτουργίες σε τρεις φάσεις της αθηροσκλήρωσης: στην αθηρογένεση, στη φλεγμονή και στην αθηροθρόμβωση.

Αθηρογένεση

Τα αιμοπετάλια απελευθερώνουν μεταλλοπρωτεΐνάσες οι οποίες αποικοδομούν την θεμέλια ουσία σε αθηροσκληρωτικές πλάκες, και χημειοκίνες οι οποίες διεγείρουν τα μονοκύτταρα και τα T – λεμφοκύτταρα να αυξήσουν την παραγωγή φλεγμονωδών μεσολαβητών. Παράγουν επίσης αυξητικούς παράγοντες που διεγείρουν τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων. ⁽¹⁵⁰⁾

Μελέτες in vitro δείχνουν επιπλέον ότι τα αιμοπετάλια προσκολλώνται και σε ανέπαφες αθηροσκληρωτικές πλάκες, όπου υπάρχει στρώμα ενεργοποιημένων ενδοθηλιακών κυττάρων. Η προσκόλληση επιτυγχάνεται μέσω της γλυκοπρωτεΐνης IIb/IIIa, με μηχανισμό που περιλαμβάνει το ινωδογόνο, την φιβρονεκτίνη και τον παράγοντα von Willebrand. ⁽¹⁵¹⁾

Φλεγμονή

Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια απελευθερώνουν φλεγμονώδεις μεσολαβητές, αλλάζοντας τις χημειοτακτικές ιδιότητες των ενδοθηλιακών κυττάρων. Οι μεσολαβητές των αιμοπεταλίων περιλαμβάνουν:

- Προ – ιντερλευκίνη β (IL-β): πυροδοτεί τη σύνθεση της E-σελεκτίνης, η οποία καθιστά δυνατή την αλληλεπίδραση των ενδοθηλιακών κυττάρων με τα λευκοκύτταρα.
- Θρομβοξάνη A2: αυξάνει την προσκόλληση ουδετερόφιλων, διευκολύνοντας τη συσσώρευση αιμοπεταλίων.
- Αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων και αιμοπεταλιακός παράγοντας 4: αυξάνουν την χημειοταξία των ουδετερόφιλων, δηλαδή την ικανότητά τους να διεισδύουν στην αθηροσκληρωτική πλάκα.
- Υποδοχέας CD40: πρωτεΐνη των αιμοπεταλίων που προωθεί φλεγμονώδεις αποκρίσεις στο ενδοθήλιο.
- P-σελεκτίνη: μόριο προσκόλλησης που εκφράζεται στα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια και αυξάνει την προσκόλληση των μονοκυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα.⁽¹⁴⁹⁾

Αθηροθρόμβωση

Τα ένζυμα των αιμοπεταλίων που αποικοδομούν τη θεμέλια ουσία, πιθανόν συμβάλλουν στην λέπτυνση της ινώδους καλύπτρας, προκαλώντας την έκθεση των λιπιδίων και της θρομβοπλαστίνης του πυρήνα στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία. Η έκθεση αυτή οδηγεί σε επιπλέον προσκόλληση και συσσώρευση αιμοπεταλίων, η οποία μπορεί να ακολουθείται από ανάπτυξη θρόμβου, οδηγώντας έτσι σε οξεία στεφανιαία σύνδρομα.⁽¹⁵⁰⁾

6.2. Γλυκοπρωτεΐνες των αιμοπεταλίων

Προκειμένου τα αιμοπετάλια να επιτύχουν προσκόλληση και συσσώρευση, διαθέτουν διαμεμβρανικούς υποδοχείς που μπορούν να προσδένονται σε γλυκοπρωτεΐνες. Οι κυριότεροι υποδοχείς περιλαμβάνουν το σύμπλοκο της γλυκοπρωτεΐνης Ib/IX/V και τους υποδοχείς GPIIb/IIIa, GPIa/IIa και GPVI. Οι υποδοχείς αυτοί, εκτός της υπομονάδας GPIb από το σύμπλοκο GPIb/IX/V και τον υποδοχέα GPVI, είναι ιντεγκρίνες. Οι ιντεγκρίνες είναι ετεροδιμερείς γλυκοπρωτεΐνες που αποτελούνται από μια α-αλυσίδα η οποία είναι ομοιοπολικά ενωμένη με μια β-αλυσίδα.

Το σύμπλοκο GPIb/IX/V επιτυγχάνει την προσκόλληση των αιμοπεταλίων, μέσω πρόσδεσης στον παράγοντα Von Willebrand, ενώ ο υποδοχέας GPIIb/IIIa μεσολαβεί τη συσσώρευση

αιμοπεταλίων, μέσω πρόσδεσης στο ινωδογόνο, καθώς και στον παράγοντα Von Willebrand. Οι υποδοχείς GPIa/IIa και GPVI προσδένονται στο κολλαγόνο και συμβάλλουν επίσης στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων.⁽¹⁵²⁾

Το σύμπλοκο του υποδοχέα GPIb/IX/V αποτελείται από 4 διαφορετικές πρωτεΐνες τις GPIbα (143kDa), GPIbβ (22kDa), GPIX (20kDa) και GPV (83kDa). Η βασική δομική ομοιότητα μεταξύ αυτών των υπομονάδων είναι η παρουσία επαναλαμβανόμενων περιοχών πλούσιων σε κυστεΐνη. Πρόκειται για ένα επταμερές όπου ένα μόριο GPV είναι μη ομοιοπολικά ενωμένο με 2 μόρια GPIbα, 2 μόρια GPIbβ και 2 μόρια GPIX.⁽¹⁵³⁾

Ο φυσιολογικός ρόλος του συμπλόκου είναι η αρχική πρόσδεση των αιμοπεταλίων με τον παράγοντα Von Willebrand στον υπενδοθηλιακό χώρο. Η αρχική σύνδεση είναι χαλαρή και αναστρέψιμη, και γίνεται πιο ισχυρή μετά από αλληλεπίδραση του παράγοντα Von Willebrand με την ιντεγκρίνη GPIIb/IIIa. Ο υποδοχέας GPIb/IX/V είναι επίσης σημαντικός στην πρόσδεση των αιμοπεταλίων στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο, στην στρατολόγηση λευκοκυττάρων στα σημεία αρτηριακού τραυματισμού, στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων από τη θρομβίνη, καθώς και στη διαδικασία της πήξης.⁽¹⁵⁴⁾

Ο υποδοχέας GPIIb/IIIa είναι ένα ετεροδιμερές, το οποίο αποτελείται από μία α_{IIb} και μία β_3 αλυσίδα. Βρίσκεται μόνο στα αιμοπετάλια και τα μεγακαρυοκύτταρα, και βρίσκεται σε περίπου 80.000 αντίγραφα στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων. Οι κύριοι προσδέτες του υποδοχέα είναι το ινωδογόνο και ο παράγοντας Von Willebrand, αλλά συνδέεται επίσης στην φιβρονεκτίνη, τη βιτρονεκτίνη και τη θρομβοσπονδίνη. Για να επιτευχθεί η πρόσδεση του υποδοχέα, απαιτείται πρώτα η ενεργοποίησή του από ποικιλία αγωνιστών και πρωτεϊνών, η οποία και ακολουθείται από αύξηση της συγκέντρωσής του στην επιφάνεια έως και κατά 50%.⁽¹⁵⁵⁾

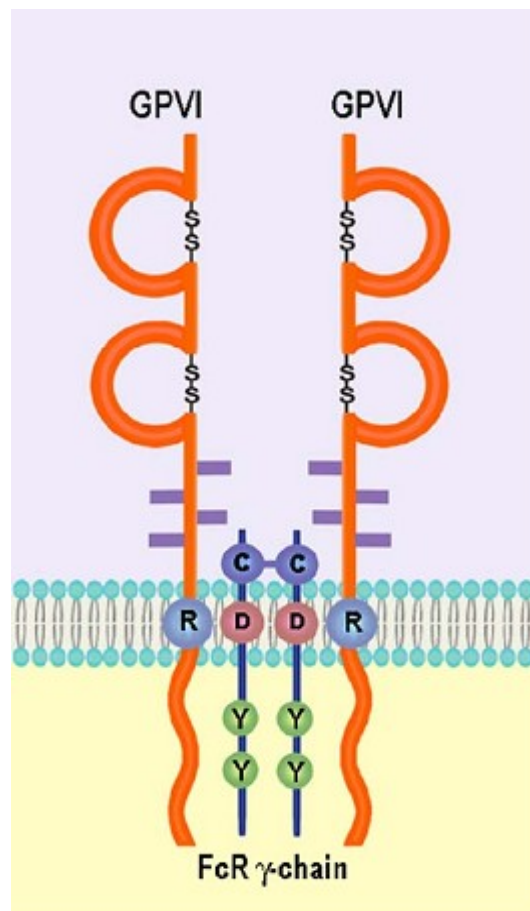
Η ιντεγκρίνη GPIa/IIa αποτελεί ένα ετεροδιμερές που αποτελείται από μια α_2 και μια β_1 αλυσίδα και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην πρόσδεση των αιμοπεταλίων στο κολλαγόνο. Η έκφραση της ιντεγκρίνης αυτής ποικίλει πολύ ανάμεσα σε υγιή άτομα και σχετίζεται με την παρουσία διαφορετικών αλληλομόρφων για το γονίδιο που κωδικοποιεί για την αλυσίδα α_2 .⁽¹⁵⁶⁾

Η GPVI είναι μια γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 62 kDa η οποία ανήκει στην ομάδα των ανοσοσφαιρινών και προσδένεται στο κολλαγόνο. Η ενεργοποιημένη GPVI ενεργοποιεί με τη σειρά της τις GPIa/IIa και GPIIb/IIIa με τις οποίες σταθεροποιείται περαιτέρω η πρόσδεση των αιμοπεταλίων στο αγγειακό τοίχωμα. Σε ποντίκια που δεν εκφράζουν τον υποδοχέα, παρατηρείται μειωμένη προσκόλληση αιμοπεταλίων και σχηματισμός θρόμβων.⁽¹⁵⁷⁾ Οι λειτουργίες του υποδοχέα GPVI θα αναλυθούν εκτενέστερα στην επόμενη ενότητα.

6.3. Δομή του υποδοχέα GPVI

Ο υποδοχέας GPVI είναι ένα από τα σημαντικότερα μέλη της υπερ-οικογένειας των ανοσοσφαιρινών (Ig superfamily) και είναι ο κύριος ενεργοποιητής μέσω κολλαγόνου των αιμοπεταλίων. Σημαντικό βήμα για την ανακάλυψη του υποδοχέα αποτέλεσε η ανίχνευση ατόμων με αντισώματα έναντι του GPVI, και η χρησιμοποίηση αντισωμάτων από τα άτομα αυτά για τον προσδιορισμό του υποδοχέα.

Ο GPVI είναι κυρίως μόριο μεταγωγής σήματος και επιτελεί το ρόλο του σε σύμπλοκο με τον υποδοχέα FcRγ¹, ο οποίος ανήκει επίσης στην υπερ-οικογένεια των ανοσοσφαιρινών. Αποτελείται από 339 αμινοξέα και διαθέτει δύο εξωκυττάριους βρόγχους C-2 (χαρακτηριστικοί των ανοσοσφαιρινών), οι οποίοι σχηματίζονται από δισουλφιδικούς δεσμούς και περικλείουν τη θέση πρόσδεσης με το κολλαγόνο, και ένα σημείο N-γλυκοζυλίωσης στο εξωτερικό των βρόγχων (ασπαραγίνη 93). Προκειμένου το τμήμα του υποδοχέα να επικοινωνεί με το αιμοπεταλιακό περιβάλλον, ένα έντονα γλυκοζυλιωμένο τμήμα, πλούσιο σε κατάλοιπα θρεονίνης και σερίνης, συνδέει τους βρόγχους με την διαμεμβρανική περιοχή. Το τρίτο αμινοξύ της διαμεμβρανικής περιοχής (αργινίνη) δημιουργεί δεσμό με ένα ασπαρτικό οξύ της διαμεμβρανικής περιοχής του υποδοχέα FcRγ, σταθεροποιώντας το σύμπλοκο. Ο υποδοχέας FcRγ αποτελεί την υπομονάδα μεταγωγής σήματος, καθώς διαθέτει χαρακτηριστικές περιοχές (ITAMs - immune receptor tyrosine-based activation motifs), στις οποίες επιδρούν μηνυματοφόρα μόρια. (Εικόνα 6.2.)^(152,154)



Εικόνα 6.2. Μοντέλο της δομής του υποδοχέα GPVI σε σύμπλοκο με τον υποδοχέα FcRγ

Η κυτοπλασματική περιοχή του υποδοχέα GPVI περιέχει 51 αμινοξέα και έχει δύο μοναδικές αλληλουχίες. Η μία, κοντά στο διαμεμβρανικό τμήμα, είναι πλούσια σε βασικά αμινοξέα και αποτελεί σημείο πρόσδεσης της καλμοδουλίνης. Η άλλη περιοχή, στο μέσο κυτοπλασματικό τμήμα, είναι πλούσια σε προλίνη και φαίνεται να προσδένεται επιλεκτικά στις κινάσες Fyn και Lyn (της οικογένειας Src homology 3 – SH3).⁽¹⁵⁸⁾

¹ Ο **FcRγ** αποτελεί πρωτεΐνη που εκφράζεται στην επιφάνεια ορισμένων κυττάρων (μακροφάγα, ουδετερόφιλα, κ.ά.) του ανοσοποιητικού συστήματος και διαθέτει ειδικότητα σύνδεσης με την Fc αλυσίδα των αντισωμάτων. Λόγω των ITAM που περιέχει, παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στην μεταγωγή σημάτων.

Η αλληλουχία της πρωτεΐνης παρουσιάζει περίπου 64% ομολογία με την αντίστοιχη των ποντικών. Η ομολογία είναι ελαφρά υψηλότερη στους βρόγχους C-2, ενώ παρουσιάζεται συντηρημένη η αλληλουχία του κουτιού WSXWS, το οποίο αποτελεί χαρακτηριστικό των αιμοποιητικών υποδοχέων τάξης I. Παρόμοιες αλληλουχίες βρίσκονται επίσης και σε όλους τους ανασταλτικούς υποδοχείς των κυττάρων φυσικών φονέων και φαίνεται ότι συμβάλλουν στην τριτοταγή αναδίπλωση των πρωτεϊνών. ⁽¹⁵⁹⁻¹⁶²⁾

6.4. Το μονοπάτι μεταγωγής σήματος που πυροδοτεί ο υποδοχέας GPVI

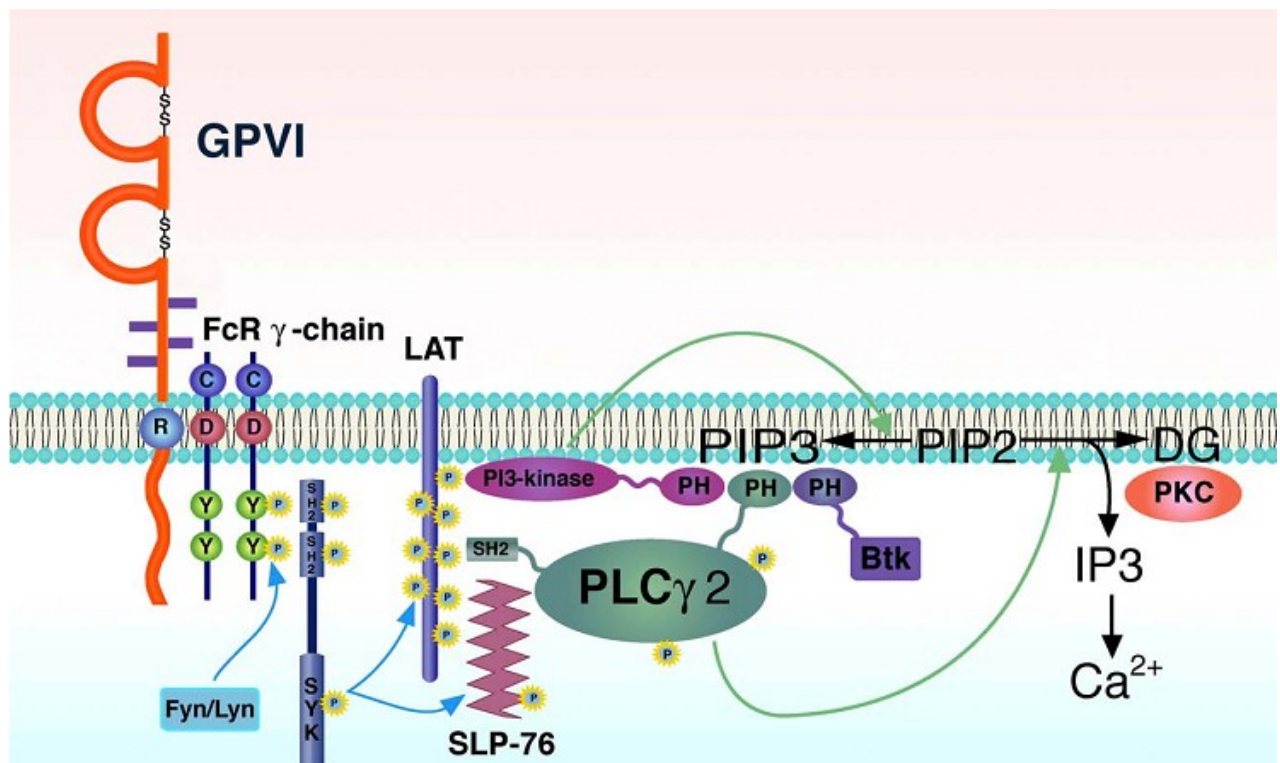
Η κυτοσολική ‘ουρά’ του υποδοχέα GPVI περιέχει μια περιοχή πλούσια σε προλίνη, η οποία προσδένεται ειδικά με την SH3 περιοχή των κινασών Fyn και Lyn, οι οποίες ανήκουν στην οικογένεια κινασών Src². Τότε οι κινάσες Fyn και Lyn έρχονται σε επαφή με τον υποδοχέα FcRγ, με αποτέλεσμα την φωσφορυλίωση των ITAM. Η τυροσινική κινάση Syk προσδένεται στην φωσφορυλιωμένη τυροσίνη μέσω της SH3³ περιοχής της, αυτοφωσφορυλιώνεται και ενεργοποιείται. Η ενεργοποιημένη Syk με τη σειρά της ξεκινά ένα καταρράκτη μεταγωγής σήματος, που φαίνεται να λαμβάνει χώρα στις πλούσιες σε χοληστερόλη μεμβρανικές περιοχές (lipid rafts), και περιλαμβάνει τη δημιουργία ενός ‘μηνυματοσώματος’. Το ‘μηνυματοσώμα’ περιέχει τους υποδοχείς LAT και SLP-76⁴, καθώς και άλλες πρωτεΐνες, με κυριότερες την φωσφολιπάση Cγ2, την PI-3 κινάση και μικρές G-πρωτεΐνες. Η PLCγ2 επάγει τη δημιουργία της 1,2-διακυλογλυκερόλης (DAG) και της 1,4,5 τριφωσφορικής ινοσιτόλης, οι οποίες δρουν ως δεύτερα μηνύματα. Η DAG ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση C, ενώ η τριφωσφορική ινοσιτόλη επάγει την απελευθέρωση ιόντων ασβεστίου από τις ενδοκυττάρειες αποθήκες, με αποτέλεσμα την αύξηση της κυτοσολικής συγκέντρωσης Ca²⁺. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η απελευθέρωση κυστιδίων, η ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης GPIIb/IIIa και η συσσώρευση αιμοπεταλίων. (Εικόνα 6.3.)^(161,163-166)

Εικόνα 6.3. Το μονοπάτι μεταγωγής σήματος που πυροδοτεί ο υποδοχέας GPVI

² Η Src είναι μια οικογένεια πρωτο-ογκογονικών κινασών που παίζουν σημαντικό ρόλο στην κυτταρική ανάπτυξη αλλά και στη μεταγωγή σήματος που σχετίζεται με μετανάστευση και κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

³ Η περιοχή SH3 έχει μια χαρακτηριστική δομή beta-barrel, που αποτελείται από 5 ή 6 β-αλυσίδες που οργανώνονται ως 2 αντιπαράλληλες β-πτυχώσεις. Η περιοχή αυτή απαντάται συνήθως σε ενδοκυττάρειες πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με άλλες πρωτεΐνες, και μεσολαβεί στη δημιουργία συμπλόκων πρωτεϊνών, συνήθως μέσω πρόσδεσης σε πλούσια σε προλίνη πεπτίδια.

⁴ Ο υποδοχέας LAT (linker of activated T cells) μετά από φωσφορυλίωση επάγει τη δημιουργία πολυμοριακών μηνυματοφόρων συμπλόκων. Ο υποδοχέας SLP-76 (SH2 domain-containing leukocyte phosphoprotein of 76 kDa) περιέχει πολλαπλές περιοχές πρόσδεσης πρωτεϊνών και αποτελεί απαραίτητο υποδοχέα σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος υποδοχέων που περιέχουν ITAMs.



Από: Jung SM, Moroi M. Platelet glycoprotein VI. In: Sigalov AB, Multichain Immune Recognition Receptor Signaling, pg 53-60, illustrated edition, Springer 2008

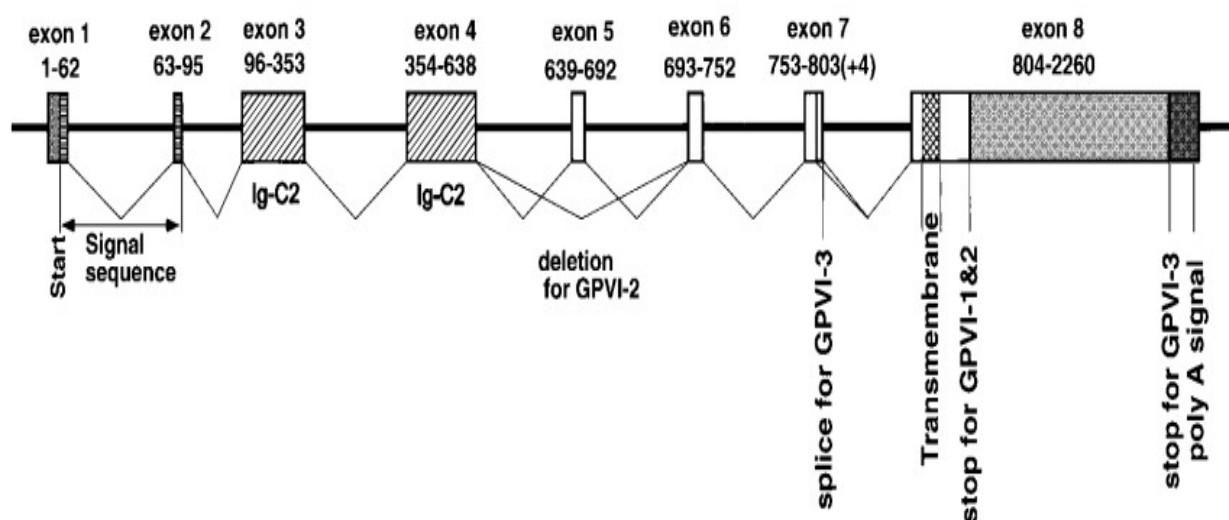
Σε αιμοπετάλια που απουσιάζει ο υποδοχέας GPVI, δεν πραγματοποιείται προσκόλληση και ενεργοποίηση από το κολλαγόνο. Η αρχική πρόσδεση πραγματοποιείται μέσω της αλληλεπίδρασης με τον παράγοντα Von Willebrand, αλλά η μετάβαση σε σταθερή προσκόλληση αποτυγχάνει. Άμεση ενεργοποίηση των ιντεγκρινών με αγωνιστές αποκαθιστά την προσκόλληση, επομένως προκύπτει η σημαντικότητα του GPVI ως μεταγωγέα σήματος στην ενεργοποίηση των ιντεγκρινών, παρά ως υποδοχέα σύνδεσης. Σε ποντίκια που δεν εκφράζουν τον υποδοχέα παρουσιάζεται δραματικά μειωμένη προσκόλληση αιμοπεταλίων και αδυναμία σχηματισμού θρόμβων, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Προκύπτει λοιπόν ότι ο GPVI αποτελεί απαραίτητο υποδοχέα στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων, όμως από την άλλη,

απαιτείται και η παρουσία των ιντεγκρινών για την επίτευξη πλήρους αποδοτικής προσκόλλησης.⁽¹⁶⁷⁻¹⁶⁹⁾

6.5. Το γονίδιο του υποδοχέα GPVI

Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα βρίσκεται στο χρωμόσωμα 19, στη θέση q13.42, περιοχή στην οποία βρίσκονται τα γονίδια και άλλων μελών της υπερ-οικογένειας των ανοσοσφαιρινών. Η έκφραση του υποδοχέα φαίνεται να περιορίζεται στα μεγακαρυοκύτταρα και τα αιμοπετάλια, αλλά αποτελεί τομέα που παραμένει προς διερεύνηση.⁽¹⁶¹⁾

Εικόνα 6.4. Το γονίδιο του υποδοχέα GPVI



Στην παραπάνω εικόνα φαίνεται το γονίδιο του GPVI. Περιέχει 8 εξόνια και 7 εσόνια. Τα εξόνια 1 και 2 κωδικοποιούν την αλληλουχία – σηματοδότη (20 αμινοξέα), και τα εξόνια 3 και 4 κωδικοποιούν τους βρόγχους Ig-C2. Τα εξόνια 5-7 κωδικοποιούν το πεπτίδιο που ενώνει το εξωκυττάριο με το ενδοκυττάριο τμήμα της πρωτεΐνης, και το εξόνιο 8 κωδικοποιεί την διαμεμβρανική περιοχή. Επίσης περιέχει την 3' αμετάφραστη περιοχή και ένα σημείο πολυαδενυλίωσης. Στην εικόνα 6.5. φαίνεται η νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου και στην εικόνα 6.6. η αλληλουχία των αμινοξέων στην πρωτεΐνη. Η έκφραση του γονιδίου οδηγεί σε τρεις πιθανές πρωτεΐνες, την GPVI-1 που περιέχει το σύνολο των αμινοξέων, την GPVI-2, στην οποία δεν εκφράζεται το εξόνιο 5, και την GPVI-3, στην οποία η εισαγωγή 4 νουκλεοτιδίων οδηγεί σε αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης, με αποτέλεσμα την απουσία της διαμεμβρανικής αλληλουχίας.⁽¹⁷⁰⁾

Εικόνα 6.5. Η αλληλουχία νουκλεοτιδίων στο γονίδιο του υποδοχέα GPVI

```

1   ACAGAGCTCAGGACAGGGCTGAGGAACCATGTCTCCATCCCCGACCGCCCTCTTCTGTCT
61  TGGGCTGTGTCTGGGGCGTGTGCCAGCGCAGAGTGGACCGCTCCCCAAGCCCTCCCTCCA
121 GGCTCTGCCCAGCTCCCTGGTGGCCCTGGAGAAGCCAGTGACCCTCCGGTGCCAGGGACC
181 TCCGGGCGTGACCTGTACCGCCTGGAGAAGCTGAGTTCCAGCAGGTACCAGGATCAGGC
241 AGTCTCTTCATCCCGGCCATGAAGAGAAGTCTGGCTGGACGCTACCGCTGCTCCTACCA
301 GAACGGAAGCCTCTGGTCCCTGCCAGCGACCAGCTGGAGCTCGTTGCCACGGGAGTTTT
361 TGCCAAACCTCGCTCTCAGCCAGCCCGGCCCGCGGTGTCGTCAGGAGGGGACGTAAC
421 CCTACAGTGTCACTCGGTATGGCTTTGACCAATTTGCTCTGTACAAGGAAGGGGACCC
481 TGCGCCCTACAAGAATCCCGAGAGATGGTACCGGGCTAGTTTCCCATCATCACGGTGAC
541 CGCCGCCACAGCGGAACCTACCGATGCTACAGCTTCTCCAGCAGGGACCCATACCTGTG
601 GTCGGCCCCCAGCGACCCCTGGAGCTTGTGGTCACAGGAACCTCTGTGACCCCAAGCCG
661 GTTACCAACAGAACCACCTTCCTCGGTAGCAGAATTCTCAGAAGCCACCGCTGAACTGAC
721 CGTCTCATTCAAAACAAAGTCTTCACAACTGAGACTTCTAGGAGTATCACCACCAGTCC
781 AAAGGAGTCAGACTCTCCAGCTGGTCTGCCCGCCAGTACTACACCAAGGCAACCTGGT
841 CCGGATATGCCTCGGGGCTGTGATCCTAATAATCCTGGCGGGGTTTCTGGCAGAGGACTG
901 GCACAGCCGGAGGAAGCGCTGCGGCACAGGGGCAGGGCTGTGCAGAGGCCGCTTCCGCC
961 CCTGCCGCCCTCCCGCAGACCCGAAATCACACGGGGGTCAGGATGGAGGCCGACAGGA
1021 TGTTCACAGCCGCGGGTTATGTTCATGACCGCTGAACCCCAGGCACGGTCGTATCCAAGG

1081 GAGGGATCATGGCATGGGAGGCGACTCAAAGACTGGCGTGTGTGGAGCGTGGAAGCAGGA
1141 GGGCAGAGGCTACAGCTGTGGAACGAGGCCATGCTGCCCTCCTCCTGGTGTTCATCAGG
1201 GAGCCGTTCCGGCCAGTGTCTGTCTGTCTGTCTGCCCTCTCTGTCTGAGGGCACCTCCATT
1261 TGGGATGGAAGGAATCTGTGGAGACCCATCCTCCTCCCTGCACACTGTGGATGACATGG
1321 TACCCTGGCTGGACCACATACTGGCCTCTTTCTTCAACCTCTCTAATATGGGCTCCAGAC
1381 GGATCTCTAAGTTCCAGCTCTCAGGGTTGACTCTGTTCCATCCTCTGTGCAAAATCCT
1441 CCTGTGCTTCCCTTTGGCCCTCTGTGCTCTTGTCTGGTTTTCCCAGAACTCTCACCT
1501 CACTCCATCTCCCACTGCGGTCTAACAAATCTCCTTTCGTCTCTCAGAACGGGTCTTGCA
1561 GGCAGTTTGGGTATGTCATTCAATTTCTTAGTGTAAACTAGCACGTTGCCCGCTTCCC
1621 TTACATTAGAAAACAAGATCAGCCTGTGCAACATGGTGAAACCTCATCTCTACCAACAA
1681 AACAAAAAACACAAAAATTAGCCAGGTGTGGTGGTGCATCCCTATACTCCAGCAACTC
1741 GGGGGGCTGAGGTGGGAGAATGGCTTGAGCCTGGGAGGCAGAGGTTGCAGTGAGCTGAGA
1801 TCACACCACTGCACTCTAGCTCGGGTGACGAAGCCTGACCTTGTCTCAAAAAATACAGGG
1861 ATGAATATGTCAATTACCCTGATTTGATCATAGCACGTTGTATACATGTACTGCAATATT
1921 GCTGTCCACCCCATAAATATGTACAATTATGTATACATTTTTAAATCATAAAAATAAGA
1981 TAATGCACCGTCTCCACCCCTCTCATATTTACTTTCTGAAGGAAATGTTAGGTCTTCTCA
2041 AGGTAAAGTTCTATATTTATTATAGCGTTTAGGCATTTCTTGACCATCTAATGAGTGTA
2101 AACTGTACCACTGGGCCAAGTGCACTGGATCATGTCTGTAATCCTAGCACTGTGGGAGGC
2161 CAAGGCAGGAGGATCGCTTGAGCCAGGAGTCAAGACCAGCCTGGGCAACATAGTGAGA
2221 CCCCATCTCTACTTAAATAAAGAAGATAAAAAATTGTTTTAAAA

```

Εικόνα 6.6. Η αλληλουχία αμινοξέων του υποδοχέα GPVI

```

MSPSP TALFC LGLC.LGRVP AQSGPLPKPS LQALPSSLVP LEKPVTLRQC 49
GPPGVDLYRL EKLSSSRYQD QAVLFIPAMK RSLAGRYRCS YQNGSLWSLP 99
SDQLELVATG VFAKPSLSAQ PGPAVSSGGD VTLQCQTRYG FDQFALYKEG 149
DPAPYKNPER WYRASFP IIT VTAAHSGTYR CYSFSSRDPY LWSAPSDPLE 199
LVVTGTSVTP SRLPTEFPSS VAEFSEATAE LTVSFTNKVF TTETSR SITT 249
SPKESDSPAG PARQYYTKGN LVRICLGAVI LIILAGFLAE DWHSRRKRLR 299
HRGRAVQRPL PPLPPLPQTR KSHGGQDGGR QDVHSRGLCS* 339

```

Ο υποκινητής και τα ρυθμιστικά του στοιχεία είναι παρόμοια με άλλα γονίδια πρωτεϊνών των μεγακαρυοκυττάρων. Ο υποκινητής δεν διαθέτει κουτί TATA αλλά έχει τις ακόλουθες αλληλουχίες:

- **Sp1** (*stimulatory protein 1*)⁽¹⁷¹⁾

Ο Sp1 αποτελεί μεταγραφικό παράγοντα ο οποίος έχει την ιδιότητα να προσδένεται σε περιοχές του DNA πλούσιες σε κατάλοιπα G και C. Η πρόσδεσή του στον υποκινητή απαιτείται για την ενεργοποίηση της μεταγραφής πολλών γονιδίων, και φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης κυτοκινών σε συνδυασμό με τους μεταγραφικούς παράγοντες της ομάδας NF-κB^(172,173). Η ύπαρξη θέσης πρόσδεσης του Sp1 στους υποκινητές γονιδίων έχει συσχετιστεί σε μελέτες με την παθοφυσιολογία των καρδιαγγειακών νοσημάτων^(174,175) και του καρκίνου⁽¹⁷⁶⁾, αλλά απαιτείται περαιτέρω έρευνα πάνω στο πεδίο αυτό.

Η οικογένεια Sp συμπεριλαμβάνει τους Sp1, Sp2, Sp3, και Sp4 μεταγραφικούς παράγοντες. Και τα τέσσερα μέλη περιέχουν αμινοξέα τα οποία ‘διπλώνονται’ σε μία δομική μονάδα γύρω από ένα άτομο ψευδαργύρου, το οποίο συνδέεται με δύο κυστεΐνες και δύο ιστιδίνες (δακτύλιος ψευδαργύρου). Κάθε δακτύλιος απαιτείται για την αναγνώριση μίας συγκεκριμένης αλληλουχίας περίπου 5 ζευγών βάσεων. Στους περισσότερους υποκινητές, οι Sp1 και Sp3 μεταγραφικοί παράγοντες αναγνωρίζουν το στοιχείο πρόσδεσης Sp1 με συγκρίσιμη συγγένεια και εξειδίκευση, συμβάλλοντας παρόλα αυτά με διαφορετικό τρόπο στη δραστηριότητα του υποκινητή.⁽¹⁷²⁾

- ***GATA-1*** (globin transcription factors 1)

Ο GATA-1 αποτελεί μέλος μιας οικογένειας πρωτεϊνών με δακτύλιο ψευδαργύρου, οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στην κυτταρική ανάπτυξη. Συμβάλλουν στη ρύθμιση των γονιδίων των γλοβινών αλλά παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στην ωρίμανση των μεγακαρυοκυττάρων και στην παραγωγή αιμοπεταλίων.⁽¹⁷¹⁾

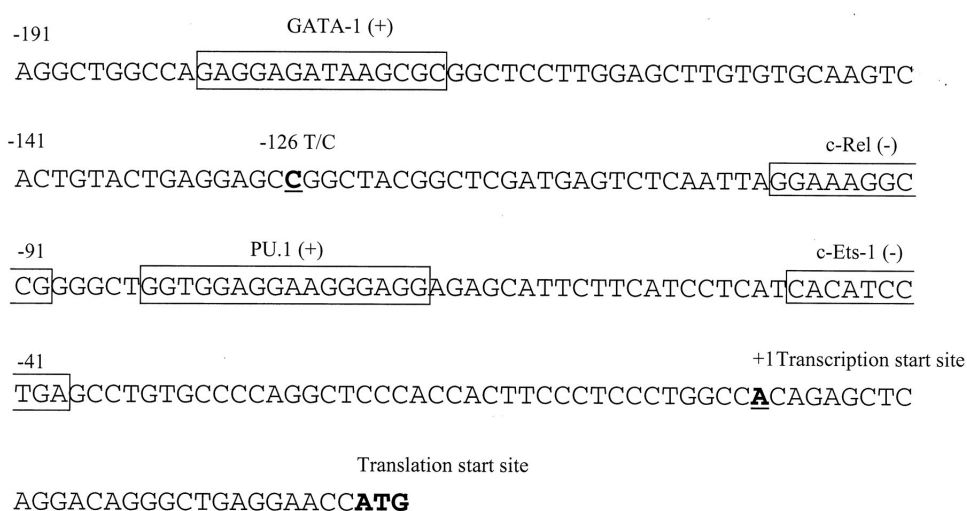
- *Ets* (ets transcription factors)

Οι μεταγραφικοί παράγοντες αυτοί σχετίζονται με κυτταρική ανάπτυξη, διαφοροποίηση και πολλαπλασιασμό. Στον υποκινητή του υποδοχέα GPVI φαίνεται να προσδένονται οι μεταγραφικοί παράγοντες Fli-1 και PU1. Ο μεταγραφικός παράγοντας Fli-1 έχει συσχετιστεί με την ομαλή ανάπτυξη των μεγακαρυοκυττάρων και πιθανά δρα συνεργιστικά με τους μεταγραφικούς παράγοντες GATA-1.^(171,177) Ο μεταγραφικός παράγοντας PU.1 σχετίζεται επίσης με την ανάπτυξη των αιμοποιητικών κυτταρικών σειρών.⁽¹⁷⁷⁾

- *c-Rel*

Η αλληλουχία αυτή προσδένει μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας NF-κB.⁽¹⁷⁷⁾

Εικόνα 6.7. Ο υποκινητής του γονιδίου του υποδοχέα GPVI



6.6. GPVI και αθηροσκλήρωση

Μέχρι πρόσφατα επικρατούσε η άποψη ότι τα αιμοπετάλια εμπλέκονται μόνο σε θρομβοεμβολικά επεισόδια προχωρημένων αθηροσκληρωτικών αλλοιώσεων, ωστόσο είναι πλέον γνωστό, ότι παίζουν σημαντικό ρόλο και στην έναρξη και προώθηση της αθηροσκλήρωσης.⁽¹⁷⁸⁾ Από την άλλη, σε στάδιο προχωρημένου σχηματισμού αθηροσκληρωτικής πλάκας, τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται από υπενδοθηλιακές δομές που εκτίθενται μετά από ρήξη της πλάκας, μία εκ των οποίων είναι το κολλαγόνο. Το κολλαγόνο αυξάνει την προσκόλληση και συσσώρευση αιμοπεταλίων, μέσω αλληλεπίδρασης με την αιμοπεταλιακή γλυκοπρωτεΐνη GPVI, όπως έχει ήδη αναφερθεί.

Μελέτες *in vitro* αλλά και σε μοντέλα με ποντίκια έδειξαν ότι η έλλειψη της GPVI προκαλεί παρεμπόδιση της αλληλεπίδρασης των αιμοπεταλίων με το αγγειακό τοίχωμα,^(169,179) και φαίνεται ότι η GPVI θα μπορούσε να αποτελέσει στόχο θεραπευτικών παρεμβάσεων έναντι του σχηματισμού θρόμβων.^(180,181)

Πρόσφατα, οι Schönberger et al, σε μοντέλα με ApoE -/- ποντίκια, χορήγησαν το υδατοδιαλυτό σύμπλοκο GPVI-Fc, με σκοπό να μελετήσουν την επίδραση του αποκλεισμού της GPVI στην αθηροσκληρωτική εξεργασία. Τα ApoE -/- ποντίκια αναπτύσσουν ταχέως αθηροσκληρωτικές αλλοιώσεις, και αποτελούν ελκυστικό μοντέλο για τη μελέτη της αθηροσκλήρωσης. Το σύμπλοκο GPVI-Fc αποτελείται από το εξωκυττάριο τμήμα της GPVI και το C-τελικό άκρο της αλυσίδας Fc και μειώνει την αλληλεπίδραση της GPVI με το κολλαγόνο. Η χορήγησή του μείωσε την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο κολλαγόνο, όπως και σε σημεία αγγειακού τραυματισμού, και μείωσε την εξέλιξη των αθηροσκληρωτικών αλλοιώσεων.⁽¹⁸²⁾

Τα παραπάνω ευρήματα προτείνουν ότι ο μηχανισμός αλληλεπίδρασης του υποδοχέα GPVI με το κολλαγόνο αποτελεί ένα σημαντικό βήμα στην προώθηση της αθηροσκλήρωσης και στην εμφάνιση οξέων στεφανιαίων συνδρόμων και μπορεί πιθανά να αποτελέσει ένα ακόμα στόχο θεραπευτικών παρεμβάσεων για την πρόληψη και θεραπεία. Η έρευνα όσον αφορά τον υποδοχέα, επεκτείνεται πλέον και σε γονιδιακό επίπεδο, με σκοπό να αναδειχτεί εάν πολυμορφισμοί του γονιδίου GPVI μπορούν να αλλάζουν τη λειτουργία του υποδοχέα, ή να αλληλεπιδρούν με άλλους πολυμορφισμούς ως προς το φαινότυπο.

Το γονίδιο GPVI παρουσιάζει πολυμορφικότητα, αλλά η μελέτη των πολυμορφισμών του προκάλεσε σχετικά πρόσφατα το ενδιαφέρον στον ερευνητικό κόσμο.⁽¹⁸³⁻¹⁸⁷⁾

Οι Croft et al πραγματοποίησαν μελέτη ασθενών-μαρτύρων (425 υγιείς-574 ασθενείς) και μελέτησαν ορισμένους πολυμορφισμούς του γονιδίου. Έδειξαν ότι η ομοζυγωτία για το C-

αλληλόμορφο του T13254C (rs1613662) πολυμορφισμού ήταν πιο συχνή σε άτομα που είχαν υποστεί έμφραγμα του μυοκαρδίου, ιδιαίτερα σε άτομα άνω των 60 ετών, και φαίνεται να παρουσιάζει αλληλεπίδραση με την ηλικία και το γονότυπο για τη β-αλυσίδα του ινωδογόνου ($p < 0,05$).⁽¹⁸³⁾ Παρόμοιο αποτέλεσμα βρήκαν οι ερευνητές Ollikainen et al, οι οποίοι πραγματοποίησαν 300 αυτοψίες σε Καυκάσιους άντρες, και παρατήρησαν ότι το C αλληλόμορφο σχετίζεται με αύξηση του κινδύνου στεφανιαίας θρόμβωσης ($OR=2,5$, $P = 0.02$). Παρατηρήθηκε επίσης μια τάση αύξησης του κινδύνου εμφάνισης οξέος εμφράγματος ($OR=2,2$, $P=0.07$), καθώς και υψηλότερη επιφάνεια αθηροσκληρωτικών αλλοιώσεων ($P=0.01$) στους φορείς του C αλληλομόρφου.⁽¹⁸⁶⁾ Το αποτέλεσμα αυτό δεν επιβεβαιώθηκε αργότερα σε μελέτη σε Ιάπωνες.⁽¹⁸⁷⁾ Έχει ενδιαφέρον, ότι ο πολυμορφισμός βρίσκεται σε ανισορροπία σύνδεσης με τον πολυμορφισμό με rs2304167, ο οποίος προκαλεί αλλαγή αμινοξέος στη θέση 249, της θρεονίνης από αλανίνη.

Σε άλλη μελέτη ασθενών – μαρτύρων σε Ιάπωνες (376 ασθενείς-1080 υγιείς), μελετήθηκαν 2 πολυμορφισμοί, από τους οποίους ο καθένας βρίσκεται σε ανισορροπία σύνδεσης με άλλους 4 και 3 πολυμορφισμούς αντίστοιχα. Βρέθηκε ότι ο πολυμορφισμός C645213T (rs2304167) σχετίζεται με την εμφάνιση εμφράγματος του μυοκαρδίου, και συγκεκριμένα η ομοζυγωτία για το C αλληλόμορφο ($OR=2,34$, $p=0,0166$). Ο πολυμορφισμός αυτός είναι σε ανισορροπία σύνδεσης με τους πολυμορφισμούς A669173C, C648167T και A644491T.⁽¹⁸⁴⁾

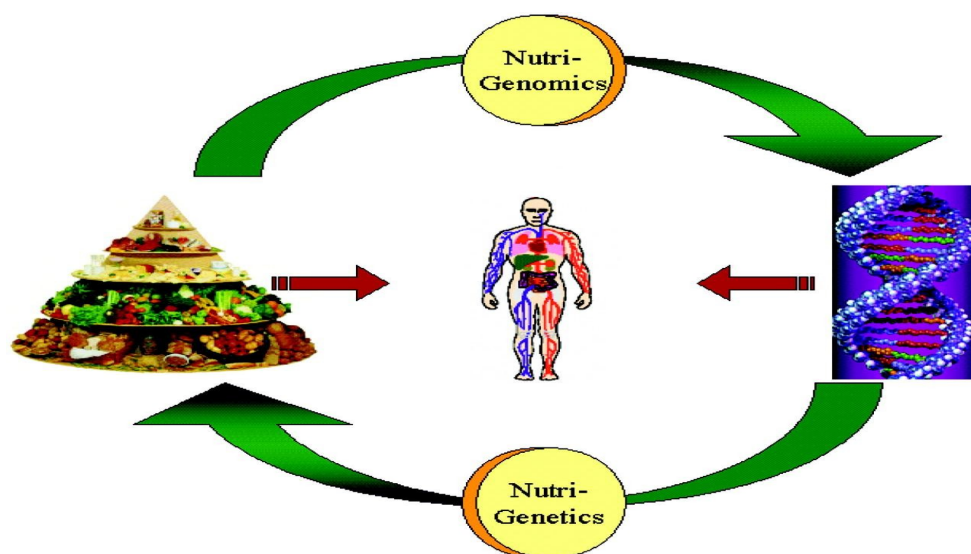
Οι Korhonen et al μελέτησαν το γονίδιο του GPVI και οδηγήθηκαν σε 5 πολυμορφισμούς σε ανισορροπία σύνδεσης: Ser199Pro (rs1613662), Lys217Glu (rs1654416), Thr229Ala (rs2304167), Gln297Leu και His302Asn. Το ‘συχνό αλληλόμορφο’ (α) κωδικοποιεί για τα αμινοξέα σερίνη, λυσίνη, θρεονίνη, γλουταμίνη και ιστιδίνη αντίστοιχα (SKTQH), ενώ το ‘σπάνιο αλληλόμορφο’ (β) κωδικοποιεί για τα αμινοξέα προλίνη, γλουταμικό οξύ, αλανίνη, λευκίνη και ασπαραγίνη (PEALN). Μελετώντας 8 άτομα ομόζυγα για το α αλληλόμορφο και 8 ομόζυγα για το β, βρέθηκε ότι η ομοζυγωτία για το σπάνιο, β αλληλόμορφο, σχετίζεται με μειωμένα επίπεδα GPVI και αντίστοιχα μειωμένη έκφραση του υποδοχέα στη μεμβράνη, καθώς και με μικρότερη πρόσδεση ινωδογόνου, επιπέδων θρομβίνης και απελευθέρωση α-κυστιδίων από τα αιμοπετάλια.⁽¹⁸⁵⁾ Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με τα ευρήματα των Croft et al και των Ollikainen et al.

Οι μελέτες είναι ελάχιστες για την εξαγωγή συμπερασμάτων, επομένως απαιτείται περαιτέρω έρευνα στον τομέα αυτό.

7. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ – ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ

Nutritigenomics – Nutrigenetics

Η ενσωμάτωση του όρου ‘genomics’ (δράσεις – αλληλεπιδράσεις μεταξύ γονιδίων, καθώς και αλληλεπιδράσεις γονιδίων με περιβαλλοντικούς παράγοντες) στις επιστήμες της διατροφής έριξε φως στην πολυπλοκότητα της γονιδιακής αντίδρασης στην έκθεση σε θρεπτικά συστατικά, ενώ συγχρόνως δίνει τη δυνατότητα πραγματοποίησης αποδοτικότερων διατροφικών παρεμβάσεων σε ατομικό και συλλογικό επίπεδο.⁽¹⁸⁸⁾ Τα θρεπτικά συστατικά προκαλούν την εκδήλωση φυσιολογικών αποκρίσεων που επηρεάζουν τη σταθερότητα των γονιδίων καθώς και την έκφρασή τους. Αυτές οι επιδράσεις επιφέρουν είτε ωφέλη στην υγεία είτε κινδύνους, με το αποτέλεσμα πολλές φορές να εμφανίζεται αργότερα στη ζωή.⁽¹⁸⁹⁾ Από την άλλη, το σύνολο των γονιδίων των ατόμων προκαλεί διαφορετική απόκριση στα θρεπτικά συστατικά.⁽¹⁹⁰⁾ Οι αλληλεπιδράσεις γονιδίων – θρεπτικών συστατικών, που εκφράζονται με τους όρους *nutrigenomics* και *nutrigenetics*, αναφέρονται στις αμοιβαίες και περίπλοκες αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στο ανθρώπινο γονιδίωμα και στα διαιτητικά συστατικά, και στο ρόλο τους στη φυσιολογία και παθοφυσιολογία.⁽¹⁹¹⁾ Η κατανόηση αυτών των αλληλεπιδράσεων μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία διαιτητικών συστάσεων με υψηλή προγνωστική αξία, να μειώσει τον κίνδυνο ανεπιθύμητων αποτελεσμάτων και να ερμηνεύσει τις σύνθετες επιδράσεις της γενετικής ποικιλομορφίας.⁽¹⁸⁹⁾



Εικόνα 7.1. Αλληλεπιδράσεις γονιδίων – θρεπτικών συστατικών

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

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

(192,193)

Οι περισσότερες μελέτες έχουν διερευνήσει το μηχανισμό με τον οποίο τα διαιτητικά λιπίδια ρυθμίζουν τα επίπεδα λιπιδίων νηστείας ή μεταγευματικά, καθώς και αρκετά γονίδια που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών (απολιποπρωτεΐνες A-I, A-IV, B, C-III και E, λιποπρωτεϊνική λιπάση, ηπατική λιπάση, κ.ά.).⁽¹⁹⁴⁻¹⁹⁷⁾ Οι μελέτες αυτές ανοίξει το δρόμο της έρευνας στον τομέα των αλληλεπιδράσεων γονιδίων - θρεπτικών συστατικών στα καρδιαγγειακά νοσήματα, αλλά ακόμα δεν έχουμε πλήρως τη δυνατότητα μετάφρασης αυτής της γνώσης σε πληροφορία με σημασία για την κλινική πρακτική και τη δημόσια υγεία.⁽¹⁹³⁾

Η αλληλεπίδραση πολυμορφισμών στο γονίδιο του υποδοχέα GPVI με διατροφικά συστατικά δεν έχει ακόμα μελετηθεί.

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

8. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση του ρόλου εννέα πολυμορφισμών του γονιδίου του υποδοχέα GPVI στην εμφάνιση στεφανιαίας νόσου και οξέος στεφανιαίου συνδρόμου, σε δείγμα 305 ασθενών και 305 υγιών ατόμων. Επίσης, η εξέταση της πιθανής αλληλεπίδρασης των πολυμορφισμών αυτών με το βαθμό υιοθέτησης της Μεσογειακής διατροφής. Παράλληλα, εξετάζεται η επίδραση των κλασικών 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 τα παρακάτω νοσηλευτικά ιδρύματα:

- Ωνάσειο Καρδιοχειρουργικό Κέντρο
- ΓΝΑ Αλεξάνδρα
- ΓΝΑ Σωτηρία

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 εξεταζόμενοι τοποθετούνταν στο ζυγό όρθιες, ακίνητοι 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 εξεταζόμενοι τοποθετούνταν στο αναστημόμετρο όρθιοι, 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 τους εξεταζόμενους 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 βαθεία εισπνοή ώστε να εκταθεί η σπονδυλική στήλη και να την κρατούσαν μέχρι να ολοκληρωθεί η μέτρηση. Ο δείκτης μάζας σώματος (Body Mass Index, BMI) υπολογίστηκε με τον τύπο $BMI = \frac{BAPOΣ\ (kg)}{ΥΨΟΣ^2\ (m^2)}$. 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. ⁽¹⁹⁸⁾

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.

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. ⁽¹⁴⁵⁾

Σύμφωνα με τις Μεσογειακές διαιτητικές συνήθειες, το σκορ συμπεριλαμβάνει την εβδομαδιαία κατανάλωση των ακόλουθων 9 ομάδων τροφίμων : μη επεξεργασμένα δημητριακά (ολικής αλέσεως ψωμί και ζυμαρικά, καστανό ρύζι, κτλ), φρούτα, λαχανικά, όσπρια, πατάτες, ψάρια, κρέας και προϊόντα κρέατος, πουλερικά, πλήρη γαλακτοκομικά προϊόντα (τυρί, γιαούρτι, γάλα), καθώς και ελαιόλαδο και αλκοόλ. Έπειτα, με βάση την προτεινόμενη πρόσληψη χρησιμοποιήθηκαν από τους ερευνητές μονοτονικές συναρτήσεις (εκτός από το αλκοόλ) έτσι ώστε να μπορεί να αξιολογηθεί η συχνότητα κατανάλωσης των τροφίμων αυτών.

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

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

Πίνακας 9.2. Το Μεσογειακό Διατροφικό Σκορ

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

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.

9.3. 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)⁽¹⁹⁹⁾. Το δείγμα αίματος μετά την λήψη του τοποθετήθηκε σε φιαλίδιο που περιείχε Na₂EDTA ως αντιπηκτικό.

Αρχή της μεθόδου

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

- Ωσμωτική λύση των ερυθροκυττάρων και συλλογή των εμπύρνηνων λευκών αιμοσφαιρίων.
- Διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών των λευκοκυττάρων και συλλογή των πυρήνων με φυγοκέντρηση.
- Λύση των πυρηνικών μεμβρανών.
- Επώαση του πυρηνικού υλικού με πρωτεΐνάση για την άμεση καταστροφή των νουκλεασών.
- Απομάκρυνση της πρωτεΐνάσης 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:

ΗΜΕΡΑ 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 2η

1. Προσθήκη 0,5ml NaCl 6M και ισχυρή ανακίνηση για 15-20sec.
2. Φυγοκέντρηση (10min, 3000rpm, 20°C). Με την φυγοκέντρηση, παρουσία της μεγάλης συγκέντρωσης άλατος που αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες, γίνεται κατακρήμνιση των πρωτεϊνών. Το DNA είναι διαλυτό σε διαλύματα αλάτων.
3. Ισχυρή ανακίνηση για διάλυση του ιζήματος και φυγοκέντρηση (10min, 3000rpm, 20°C).
4. Μεταφορά υπερκείμενου σε σωλήνα Falcon 50ml που περιέχει 12-15ml αιθανόλης 96% και ήπια ανάδευση. Σε αυτή τη φάση γίνεται ορατό το DNA. Συγκέντρωση DNA σε κουβάρι σε roller bench.
7. Απομάκρυνση DNA από το διάλυμα με πιπέτα με κίτρινο tip σε eppendorf 1.5ml στο οποίο έχουμε προηγουμένως τοποθετήσει 1ml αιθανόλης 70%.
8. Προσθήκη 4-5 σταγόνων οξικού αμμωνίου 10M.
9. Φυγοκέντρηση (15min, 14000g, 20°C) .
10. Άδειασμα υπερκείμενου και στέγνωμα για 20-30min έως ότου δεν υπάρχουν υπολείμματα αιθανόλης.
11. Προσθήκη 0,5ml απεσταγμένου νερού.
12. Διαλυτοποίηση DNA με παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 1 εβδομάδα.

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 $1\mu\text{l} \times n$ διαλύματος της χρωστικής και $199\mu\text{l} \times n$ διαλύματος buffer, όπου $n = \text{αριθμός δειγμάτων} + 2 \text{ standards}$). Η αραίωση της ουσίας φθορισμού είναι 1:200.
- Στη συνέχεια προετοιμάζονται 2 νέα διαλύματα από τα αρχικά διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης DNA προσθέτοντας $10\mu\text{l}$ από κάθε ένα από τα αρχικά διαλύματα DNA και $190\mu\text{l}$ διαλύματος εργασίας. Αναδεύονται ήπια και παραμένουν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μετά προετοιμάζονται τα προς φωτομέτρηση δείγματα DNA τοποθετώντας $198\mu\text{l}$ διαλύματος εργασίας και $2\mu\text{l}$ 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.

9.4. 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.⁽²⁰⁰⁾

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/>.

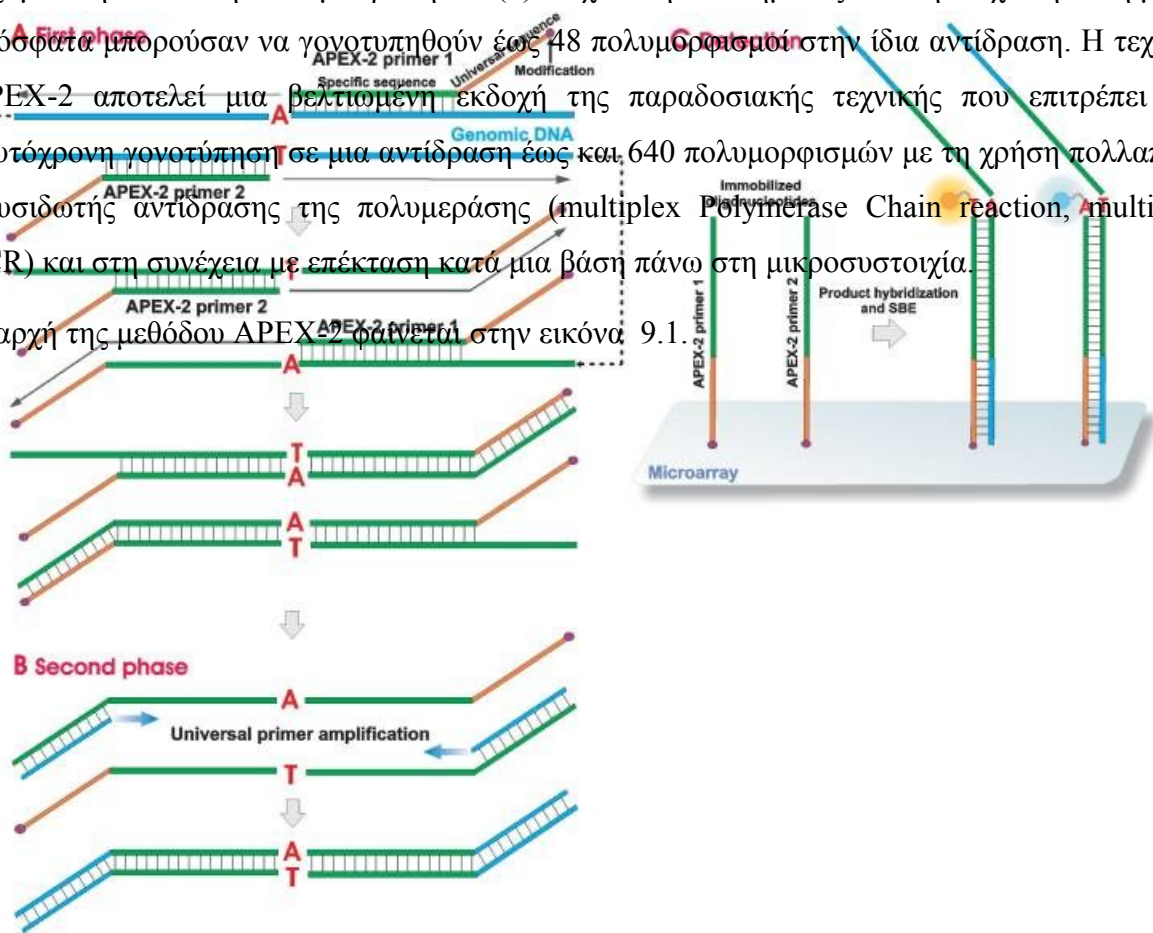
9.5. Αντιδράσεις γονοτύπησης

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 μια 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 έκδοχή 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.



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).

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.

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-τριφωφορικό νουκλεοτίδιο (dNTPs) (Fermentas, Lithuania)
- 2.5 U TrueStart™ *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 μ l. Το μίγμα της αντίδρασης περιείχε:

- 15 μ l από το προϊόν της αντίδρασης της πρώτης φάσης
- Ρυθμιστικό διάλυμα PCR (80 mM Tris pH 9.5, 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 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 MgCl_2
- 20 U HOT FIREPol® *Taq* DNA πολυμεράσης (Solis Biodyne)
- 7.5 μ M 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 MICRO-ARRAY)

Η προμήθεια των slides των ολιγονουκλεοτιδικών μικροσυστοιχιών έγινε από την Asper Biotech, Ltd., Tartu, Estonia (<http://www.asperbio.com/>).

Τα ολιγονουκλετίδια ακινητοποιήθηκαν πάνω στη μικροσυστοιχία σε προκαθορισμένες θέσεις με τη χρήση του προγράμματος Chip Writer™ 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 ThermoSequenase™ (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.).

9.6. 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 Pearson 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.⁽²⁰¹⁾ 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 προσθετικό, το επικρατές, καθώς και το υπολειπόμενο μοντέλο κληρονόμησης. Όλοι οι έλεγχοι πραγματοποιήθηκαν σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $<0,05$.

9.7. Έλεγχος ανισορροπίας σύνδεσης μεταξύ των πολυμορφισμών

Η τιμή του D' χρησιμοποιήθηκε για να εκτιμηθεί ο βαθμός ανισορροπίας σύνδεσης μεταξύ των πολυμορφισμών και υπολογίστηκε με τη χρήση με του προγράμματος Harpview .

9.8. Ανάλυση ισχύος του δείγματος

Για τον υπολογισμό της ισχύος του δείγματος χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Quanto. Συγκεκριμένα, υπολογίστηκε η ισχύς του δείγματος για τα στατιστικώς σημαντικά ευρήματα χρησιμοποιώντας κάθε φορά το μοντέλο κληρονόμησης στο οποίο φάνηκε η συσχέτιση, τη συχνότητα του σπάνιου αλληλομόρφου, καθώς και την τιμή του λόγου πιθανοτήτων εμφάνισης της νόσου.

9.9. Διαλύματα

➤ Lysis I (20x)

- 82,9gr NH_4CL (3,1M).
- 10,01gr KHCO_3 (200mM).

- 20ml EDTA (0,5M).
- Ανάδευση.
- Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι Vτελ=500ml.
- Έλεγχος και ρύθμιση pH στο 7,4.
- Αποστείρωση.

➤ Lysis I (1x)

- 25ml Lysis I 20x.
- Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι Vτελ=500ml.
- Ανάδευση.

➤ Lysis II

- 0,61gr TrisHCL (10mM).
- 11,69gr NaCL (400mM).
- 2ml EDTA (0,5M).
- Ανάδευση.
- Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι Vτελ=500ml.
- Έλεγχος και ρύθμιση pH στο 8,4.
- Αποστείρωση.

➤ Πρωτεΐνάση K (20mg/ml)

- 100mg πρωτεΐνάση K.
- 5ml αποστειρωμένο νερό.
- Ανάδευση σε Vortex.
- Κατανομή σε eppendorfs των 1,5ml.
- Αποθήκευση στους -20 °C.

➤ Tris Borate Acid 5x (TBE 5x)

- 54gr Tris Base.
- 27,5gr Boric Acid.
- 20ml EDTA 0,5M.
- Προσθήκη ~800ml απεσταγμένου νερού.
- Ανάδευση.

- Έλεγχος και ρύθμιση pH στο 8,3.
- Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι Vτελ=1lt.
- Tris Borate Acid 1x (TBE 1x)
 - 200ml TBE 5x.
 - Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι Vτελ=1lt.
 - Ανάδευση.
- EDTA 0,5M
 - 186,1gr EDTA2H₂O.
 - Προσθήκη ~700ml απεσταγμένου νερού.
 - Ρύθμιση pH με προσθήκη NaOH (pellets) υπό ανάδευση στο 8.
 - Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι Vτελ=1lt.
- SDS 20%
 - 20gr SDS.
 - 60ml απεσταγμένο νερό.
 - Ανάδευση.
- Βρωμιούχο αιθίδιο (10mg/ml)
 - 10mg EtBr.
 - 1ml αποστειρωμένο νερό.
 - Ανάδευση σε Vortex.
 - Φύλαξη στους 4°C.
- Tris-EDTA (TE)
 - 0,61gr Tris Base 10Mm.
 - 1ml EDTA 0,05M.
 - Προσθήκη ≈ 400ml απεσταγμένο νερό.
 - Ανάδευση.
 - Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι Vτελ=500ml.
 - Έλεγχος και ρύθμιση pH στο 7,4
 - Αποστείρωση.
- Οξικό αμμώνιο 10M
 - 77gr CH₃COONH₄ .

- Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι τελικού όγκου 100ml.
 - Ανάδευση.
-

10. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

10.1. Χαρακτηριστικά του δείγματος

Στον Πίνακα 10.1. δίνονται τα περιγραφικά χαρακτηριστικά του δείγματος. Οι συνεχείς μεταβλητές παρουσιάζονται στον πίνακα ως μέσες τιμές $\pm$ τυπικές αποκλίσεις ενώ οι κατηγορικές μεταβλητές παρουσιάζονται ως σχετικές συχνότητες.

Το 37.5% 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).

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 $\pm$ 11,41	60.37 $\pm$ 14.86	0.011
Ανδρικό φύλο (%)	81.6	70.2	0.001
Δείκτης μάζας σώματος (kg/m ²)	27,9 $\pm$ 3.8	28.2 $\pm$ 4.6	0.403
Περιφέρεια μέσης/περιφέρεια γλουτών	0.976 $\pm$ 0.083	0.917 $\pm$ 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
Οικογενειακό ιστορικό εμφράγματος μυοκαρδίου (%)	28.0	16.7	0.001
Κάπνισμα (%)	74.2	61.0	<0.001
Σκορ Μεσογειακής διαίτας	26.05 $\pm$ 4.73	27.85 $\pm$ 4.00	<0.001

Ο έλεγχος των συσχετίσεων για τις κατηγορικές μεταβλητές πραγματοποιήθηκε με τον έλεγχο χ^2 του Pearson και για τις συνεχείς μεταβλητές με τον έλεγχο T – test του Student.

Οι ασθενείς παρουσίαζαν σε υψηλότερο ποσοστό υπερχοληστερολαιμία (76,9% vs 59%, $p<0,001$) , διαβήτη (32,4% vs 15,1%, $p<0,001$), υπέρταση (71,7% vs 58,8%, $p=0,001$) και οικογενειακό ιστορικό εμφράγματος (28% vs 16,7%, $p=0,001$), ενώ ήταν επίσης σε υψηλότερο ποσοστό νυν ή πρώην καπνιστές (74,2% vs 61%, $p<0,001$). Δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ ασθενών και ελέγχων ως προς το δείκτη μάζας σώματος. Ο λόγος περιφέρεια μέσης/περιφέρεια γλουτών ήταν σημαντικά υψηλότερος στους ασθενείς (0.976 ± 0.083 vs 0.917 ± 0.112 , $p\text{-value}<0.001$). Επίσης, ο μέσος όρος του σκορ Μεσογειακής διαίτας ήταν σημαντικά υψηλότερος στην ομάδα ελέγχου σε σχέση με την ομάδα των ασθενών (27.85 ± 4.00 vs 26.05 ± 4.73 , $p\text{-value}<0.001$).

10.2. Πολυμορφισμοί στο γονίδιο GPVI και στεφανιαία νόσος

Στην παρούσα μελέτη, επιλέχθηκαν εννέα πολυμορφισμοί στο γονίδιο GPVI και μελετήθηκαν σε σχέση με την επίδρασή τους στην εμφάνιση οξέος στεφανιαίου συνδρόμου ή στεφανιαίας νόσου. Οι πολυμορφισμοί καθώς και η αλλαγή νουκλεοτιδίου που προκαλούν, και αμινοξέος αντίστοιχα, παρουσιάζονται στον πίνακα 10.2.

Πίνακας 10.2. Οι πολυμορφισμοί στο γονίδιο GPVI και τα χαρακτηριστικά τους

Πολυμορφισμός	Συντεταγμένες	Χρωμόσωμα	Αλλαγή νουκλεοτιδίου	Θέση	Αλλαγή αμινοξέος
rs12981732	chr19:60216187	19q13.42	C/T	3' περιοχή	-
rs1654410	chr19:60216625	19q13.42	C/T	3' περιοχή	-
rs2304167	chr19:60218893	19q13.42	C/T	εξώνιο	A/T
rs1654416	chr19:60221847	19q13.42	C/T	εξώνιο	E/K
rs11669150	chr19:60227784	19q13.42	C/T	εσώνιο	-
rs1613662	chr19:60228407	19q13.42	A/G	εξώνιο	P/S
rs892090	chr19:60230884	19q13.42	G/T	εξώνιο	R/R
rs1671214	chr19:60244635	19q13.42	A/G	υποκινητής	-
rs8113032	chr19:60245950	19q13.42	A/G	3' περιοχή	-

Οι πολυμορφισμοί που μελετήθηκαν βρίσκονται σε ισορροπία Hardy – Weinberg. Πραγματοποιήθηκε έλεγχος Pearson χ^2 για να μελετηθούν οι διαφορές στην κατανομή των γονοτύπων μεταξύ του συνόλου των ασθενών και της ομάδας ελέγχου (πίνακας 10.3.).

Πίνακας 10.3. Συχνότητα αλληλομόρφων και κατανομή γονοτύπων ανά πολυμορφισμό – έλεγχος χ^2

Πολυμορφισμός	Συχνότητα σπάνιου αλληλομόρφου		Κατανομή γονοτύπων		Συντελεστής Pearson χ^2	P-value
	ΑΣΘΕΝΕΙΣ	ΕΛΕΓΧΟΙ	ΑΣΘΕΝΕΙΣ	ΕΛΕΓΧΟΙ		
rs8113032	0,387	0,426	45/169/115*	57/151/104	1,894	0,169
rs11669150	0,332	0,272	36/148/147	26/118/168	5,217	0,022
rs12981732	0,112	0,112	2/75/254	1/67/244	0,000	0,984
rs1613662	0,138	0,165	3/79/242	11/78/212	1,666	0,197
rs1654410	0,408	0,424	57/160/109	61/142/108	0,319	0,573
rs1654416	0,151	0,172	4/87/241	8/91/213	1,023	0,312
rs1671214	0,393	0,367	41/173/118	40/151/121	0,890	0,345
rs2304167	0,156	0,175	4/90/238	8/93/211	0,854	0,355
rs892090	0,143	0,164	1/89/242	7/89/216	1,067	0,302

* Πρώτος αναφέρεται ο αριθμός ομόζυγων για το σπάνιο αλληλόμορφο, δεύτερος ο αριθμός των ετερόζυγων και τελευταίος ο αριθμός ομόζυγων για το συχνό αλληλόμορφο.

Παρατηρούμε ότι στατιστικά σημαντική διαφορά στη συχνότητα αλληλομόρφων – γονοτύπων υπάρχει μεταξύ ασθενών – ελέγχων για τον πολυμορφισμό rs11669150 (p-value = 0,022).

Εφαρμόστηκαν μοντέλα λογαριθμιστικής παλινδρόμησης για να μελετηθεί η επίδραση των πολυμορφισμών στη στεφανιαία νόσο, λαμβάνοντας υπόψιν ως πιθανούς συγχυτικούς παράγοντες την ηλικία, το φύλο, την παρουσία διαβήτη, υπέρτασης, υπερχοληστερολαιμίας και το ιστορικό καπνίσματος. (Πίνακας 10.4.)

Παρατηρούμε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού rs11669150 και της εμφάνισης στεφανιαίας νόσου, για το ισοεπικρατές (OR= 1,304, p=0,053) και το επικρατές μοντέλο (OR= 1,516, p=0,022). Φαίνεται δηλαδή ότι ο πολυμορφισμός αποτελεί επιβαρυντικό παράγοντα ως προς την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου.

Πίνακας 10.4. Αποτελέσματα από την ανάλυση λογαριθμιστικής παλινδρόμησης για την ομάδα πολυμορφισμών του γονιδίου GPVI, πριν και μετά από διόρθωση για πιθανούς συγχυτικούς παράγοντες. (Δ.Ε.: Διάστημα Εμπιστοσύνης)

Πολυμορφισμός	Μοντέλο	ΠΡΙΝ ΑΠΟ ΔΙΟΡΘΩΣΗ					ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΔΙΟΡΘΩΣΗ				
		ΛΟΓΟΣ ΠΙΘΑΝΟΤΗΤΩΝ	95% Δ.Ε.			P-value	ΛΟΓΟΣ ΠΙΘΑΝΟΤΗΤΩΝ	95% Δ.Ε.			P-value
rs8113032	ΙΣΟΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	0,847	0,67	-	1,07	0,163	0,894	0,69	-	1,16	0,391
	ΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	0,889	0,64	-	1,24	0,493	0,992	0,69	-	1,44	0,965
	ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΟ	0,679	0,44	-	1,06	0,085	0,684	0,42	-	1,11	0,123
rs11669150	ΙΣΟΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	1,325	1,04	-	1,69	0,024	1,304	1,00	-	1,71	0,053
	ΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	1,495	1,09	-	2,06	0,014	1,516	1,06	-	2,16	0,022
	ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΟ	1,262	0,73	-	2,18	0,401	1,144	0,63	-	2,06	0,655
rs12981732	ΙΣΟΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	1,004	0,69	-	1,46	0,983	0,948	0,63	-	1,44	0,799
	ΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	1,004	0,68	-	1,47	0,983	0,942	0,61	-	1,44	0,783
	ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΟ	1,003	0,06	-	16,11	0,998	1,145	0,07	-	19,96	0,926
rs1613662	ΙΣΟΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	0,811	0,59	-	1,12	0,199	0,838	0,59	-	1,20	0,329
	ΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	0,877	0,61	-	1,26	0,473	0,890	0,60	-	1,33	0,569
	ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΟ	0,263	0,07	-	0,96	0,042	0,348	0,09	-	1,35	0,127
rs1654410	ΙΣΟΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	0,937	0,75	-	1,18	0,576	0,966	0,75	-	1,24	0,787
	ΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	1,039	0,74	-	1,45	0,822	1,069	0,74	-	1,55	0,725
	ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΟ	0,756	0,50	-	1,15	0,191	0,800	0,50	-	1,28	0,347
rs1654416	ΙΣΟΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	0,847	0,62	-	1,16	0,301	0,877	0,62	-	1,24	0,459
	ΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	0,870	0,62	-	1,23	0,428	0,873	0,60	-	1,28	0,486
	ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΟ	0,493	0,15	-	1,66	0,253	0,765	0,21	-	2,80	0,686
rs1671214	ΙΣΟΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	1,125	0,89	-	1,43	0,331	1,143	0,88	-	1,48	0,312
	ΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	1,218	0,88	-	1,69	0,241	1,297	0,90	-	1,86	0,160
	ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΟ	1,059	0,66	-	1,70	0,810	1,002	0,61	-	1,66	0,993
rs2304167	ΙΣΟΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	0,860	0,63	-	1,17	0,342	0,893	0,63	-	1,26	0,521
	ΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	0,885	0,63	-	1,25	0,484	0,897	0,61	-	1,31	0,576
	ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΟ	0,493	0,15	-	1,70	0,253	0,720	0,20	-	2,63	0,619
rs892090	ΙΣΟΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	0,836	0,60	-	1,16	0,282	0,890	0,62	-	1,28	0,529
	ΕΠΙΚΡΑΤΕΣ	0,895	0,63	-	1,27	0,534	0,935	0,63	-	1,38	0,733
	ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΟ	0,140	0,02	-	1,15	0,067	0,250	0,03	-	2,15	0,207

10.3. Αλληλεπιδράσεις πολυμορφισμών του γονιδίου *GPVI* με το σκορ Μεσογειακής διατροφής στην στεφανιαία νόσο

Χρησιμοποιήθηκε η διάμεσος του σκορ Μεσογειακής διατροφής για κατηγοριοποίηση των ατόμων σε ομάδα “χαμηλού σκορ” και “υψηλού σκορ”, και εφαρμόστηκε ανάλυση λογαριθμιστικής παλινδρόμησης για να μελετηθεί η επίδραση του σκορ Μεσογειακής διατροφής στη στεφανιαία νόσο, λαμβάνοντας υπόψιν ως πιθανούς συγχυτικούς παράγοντες την ηλικία, το φύλο, την παρουσία διαβήτη, υπέρτασης, υπερχοληστερολαιμίας και το ιστορικό καπνίσματος. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 10.5. Επίδραση του σκορ Μεσογειακής διατροφής στην στεφανιαία νόσο – ανάλυση λογαριθμιστικής παλινδρόμησης

	Ασθενείς (n=180)	Έλεγχοι (n=214)	ΠΡΙΝ ΑΠΟ ΔΙΟΡΘΩΣΗ			ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΔΙΟΡΘΩΣΗ		
			Λόγος πιθανοτήτων	95% Δ.Ε.	P-value	Λόγος πιθανοτήτων	95% Δ.Ε.	P- value
Σκορ Μεσογειακής δίαιτας	26.05±4.73	27.85±4.00	0.909	0.876- 0.951	<0.001	0.901	0.851- 0.954	<0.001
«Υψηλό» σκορ Μεσογειακής δίαιτας (%)	33,9	60,1	0.601	0.403- 0.897	0.013	0.597	0.367- 0.969	0.037

Παρατηρούμε ότι το σκορ Μεσογειακής διατροφής διαφέρει στατιστικά σημαντικά μεταξύ ασθενών και ελέγχων (26.05±4.73 vs 27.85±4.00, $p<0.001$), αλλά διαφέρει επίσης και το ποσοστό ασθενών και ελέγχων στην ομάδα υψηλού σκορ (33,9% vs 60,1%, $p=0.037$). Φαίνεται ότι η αύξηση στο Μεσογειακό σκορ κατά μία μονάδα, μειώνει την πιθανότητα εμφάνισης στεφανιαίας νόσου κατά 9,9% (OR= 0,901, $p<0,001$), ενώ η μετάβαση από την ομάδα ‘χαμηλού σκορ’, στην ομάδα ‘υψηλού σκορ’ σχετίζεται με μείωση της πιθανότητας εμφάνισης στεφανιαίας νόσου κατά 40,3% (OR=0,597, $p=0,037$).

Εφαρμόστηκαν επίσης μοντέλα λογαριθμιστικής παλινδρόμησης για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ των πολυμορφισμών και το βαθμό υιοθέτησης της Μεσογειακής διατροφής (ομάδα χαμηλού σκορ vs ομάδα υψηλού σκορ) στην εμφάνιση στεφανιαίας νόσου. Λήφθηκαν υπόψιν οι ίδιοι πιθανοί συγχυτικοί παράγοντες. Οι πολυμορφισμοί για τους οποίους φάνηκε να υπάρχει αλληλεπίδραση παρουσιάζονται στον πίνακα 10.6.

Πίνακας 10.6. Αλληλεπίδραση του σκορ Μεσογειακής διατροφής με πολυμορφισμούς στο γονίδιο GPVI, στην εμφάνιση στεφανιαίας νόσου

Πολυμορφισμός	Μοντέλο	ΠΡΙΝ ΑΠΟ ΔΙΟΡΘΩΣΗ	ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΔΙΟΡΘΩΣΗ
		<i>P</i> -value ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ	<i>P</i> -value ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ
rs1613662	ΠΡΟΣΘΕΤΙΚΟ	0,014	0,008
rs1654416	ΠΡΟΣΘΕΤΙΚΟ	0,027	0,013
rs2304167	ΠΡΟΣΘΕΤΙΚΟ	0,027	0,013

Για τους πολυμορφισμούς που έδωσαν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα για το γινόμενο της αλληλεπίδρασης, διερευνήθηκε περαιτέρω η αλληλεπίδραση με κάθε ομάδα σκορ, ως προς την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου. Λήφθηκαν υπόψιν οι πιθανοί συγχυτικοί παράγοντες που έχουν προαναφερθεί και πραγματοποιήθηκε ανάλυση λογαριθμιστικής παλινδρόμησης. (Πίνακας 10.7)

Πίνακας 10.7 Αλληλεπίδραση πολυμορφισμών ανά ομάδα σκορ Μεσογειακής διατροφής σε σχέση με την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου

Πολυμορφισμός	Ομάδα σκορ	ΠΡΙΝ ΑΠΟ ΔΙΟΡΘΩΣΗ			ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΔΙΟΡΘΩΣΗ		
		Λόγος πιθανοτήτων	95% Δ.Ε.	<i>P</i> -value	Λόγος πιθανοτήτων	95% Δ.Ε.	<i>P</i> -value
rs1613662	1η	1,730	0,85-3,54	0,133	2,371	0,97-5,82	0,059
	2η	0,572	0,32-1,03	0,051	0,540	0,28-1,04	0,066
rs1654416	1η	1,629	0,84-3,16	0,149	1,963	0,87-4,42	0,103
	2η	0,582	0,34-1,03	0,051	0,548	0,29-1,03	0,060
rs2304167	1η	1,629	0,84-3,16	0,149	1,963	0,87-4,42	0,103
	2η	0,582	0,34-1,03	0,051	0,546	0,29-1,02	0,057

Φαίνεται λοιπόν ότι η παρουσία των παραπάνω πολυμορφισμών ασκεί προστατευτική επίδραση έναντι ανάπτυξης στεφανιαίας νόσου, μόνο σε άτομα που ακολουθούν το Μεσογειακό διατροφικό πρότυπο. Συγκεκριμένα, ο πολυμορφισμός rs1613662 ασκεί προστατευτική δράση σε άτομα με υψηλό σκορ, η παρουσία δηλαδή του πολυμορφισμού σε συνδυασμό με υψηλό Μεσογειακό σκορ σχετίζεται με 46% μείωση της πιθανότητας εμφάνισης στεφανιαίας νόσου (OR=0,540, p=0,066). Αντίστοιχα, ο πολυμορφισμός rs1654416 μειώνει την πιθανότητα κατά 45,2% (OR=0,548, p=0,6), και ο πολυμορφισμός rs 2304167 κατά 45,4% (OR=0,546, p=0,057), μόνο όμως σε άτομα στην ομάδα υψηλού διατροφικού σκορ. Τέλος, εμφανίζεται οριακή συσχέτιση για τον πολυμορφισμό rs 1613662, ο οποίος φαίνεται να ασκεί επιβαρυντική δράση στην ομάδα χαμηλού διατροφικού σκορ (OR=2,371, p=0,059).

10.4. Συχνότητες γονοτύπων σε διαφορετικούς πληθυσμούς

Οι συχνότητες των αλληλομόρφων στην παρούσα μελέτη δεν διαφέρουν σημαντικά σε σχέση με τις προαναφερθείσες μελέτες, αν και παρατηρούνται διαφορές. Οι συχνότητες φαίνονται στους πίνακες 10.8 και 10.9. Για τον πολυμορφισμό rs 1613662, σε Άγγλους (Croft et al) παρατηρείται μεγαλύτερο ποσοστό ετερόζυγων και αντίστοιχα μικρότερο ποσοστό ομόζυγων ως προς το συχνό T αλληλόμορφο, καθώς και μεγαλύτερο ποσοστό ομόζυγων ως προς το σπάνιο C αλληλόμορφο. Σε Φινλανδούς (Ollikainen et al) παρατηρείται υψηλότερο το ποσοστό των ομόζυγων ως προς το T αλληλόμορφο, μικρότερο των ετερόζυγων και ελαφρά υψηλότερο από την παρούσα μελέτη το ποσοστό των ομόζυγων ως προς το C αλληλόμορφο.

Πίνακας 10.8. Συχνότητα γονοτύπων για τον πολυμορφισμό rs1613662

	Ασθενείς (%)			Μάρτυρες (%)		
	CC	TC	TT	CC	TC	TT
Croft et al ⁽¹⁸³⁾	4	28,4	67,6	2,1	28,1	69,8
Ollikainen et al ⁽¹⁸⁶⁾	1,4	20,7	77,9	0	19,6	80,4
Παρούσα μελέτη	0,9	24,3	74,7	3,7	25,9	70,4

Για τον πολυμορφισμό rs2304167, οι συχνότητες των γονοτύπων στην παρούσα μελέτη δεν διαφέρουν σημαντικά στους υγιείς σε σχέση με τη μελέτη σε Ιάπωνες, όμως υπάρχουν διαφορές στους ασθενείς. Συγκεκριμένα το ποσοστό ομόζυγων ως προς το C αλληλόμορφο είναι 5,6% ενώ στην παρούσα μελέτη είναι 1,2%. Αντίστοιχες διαφορές παρατηρούνται αντίστοιχα και για τη συχνότητα ετερόζυγων και ομόζυγων ως προς το T αλληλόμορφο.(Πίνακας 10.9.)

Πίνακας 10.9. Συχνότητα γονοτύπων για τον πολυμορφισμό rs2304167

	Ασθενείς (%)			Μάρτυρες (%)		
	CC	TC	TT	CC	TC	TT
Ono et al ⁽¹⁸⁴⁾	5,6	34,3	60,1	2,9	32,1	65
Παρούσα μελέτη	1,2	27,1	71,7	2,6	29,8	67,6

11. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

11.1. Γενικά

Η καρδιαγγειακή νόσος αποτελεί μια ομάδα διαταραχών της καρδιάς και αποτελεί την πρώτη αιτία θανάτου παγκοσμίως.⁽¹⁾ Η στεφανιαία νόσος αποτελεί ασθένεια των αγγείων που αιματώνουν την καρδιά. Κάθε χρόνο 3,8 εκατομμύρια άντρες και 3,4 εκατομμύρια γυναίκες πεθαίνουν λόγω στεφανιαίας νόσου.⁽⁴⁾ Η πιο συχνή αιτία στεφανιαίας νόσου είναι η απόφραξη των μεγάλων επικαρδιακών αγγείων λόγω αθηροσκλήρωσης. Πειραματικά δεδομένα τόσο σε ζώα όσο και σε ανθρώπους, έχουν συμβάλλει στην κατανόηση της αθηροσκλήρωσης, όμως διαρκώς ανακαλύπτονται νέα μόρια και μηχανισμοί που εμπλέκονται σε όλα τα στάδια της ασθένειας.^(13,16,18)

Πολυάριθμες κλινικές και στατιστικές μελέτες έχουν συμβάλλει στην αναγνώριση ορισμένων παραγόντων που αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου και εμφράγματος του μυοκαρδίου, αλλά και σε αυτό το πεδίο εμφανίζονται νέοι παράγοντες, παρόλο που η σημαντικότητα και η ισχύς τους δεν έχουν ακόμα καθοριστεί με ακρίβεια.⁽³⁷⁾

Τα τελευταία χρόνια έχει καταστεί σαφές ότι τα αιμοπετάλια εκτός από το ρόλο τους στο σχηματισμό θρόμβων, διαδραματίζουν σημαντικές λειτουργίες και στις φάσεις της αθηρογένεσης και της φλεγμονής.⁽¹⁵⁰⁻¹⁵¹⁾ Οι γλυκοπρωτεΐνες των αιμοπεταλίων φαίνεται να είναι υπεύθυνες για αρκετές από τις δράσεις που εμπλέκουν τα αιμοπετάλια στην αθηρογένεση και την αθηροθρόμβωση. Ο υποδοχέας GPVI είναι μια αιμοπεταλιακή γλυκοπρωτεΐνη, η οποία μεσολαβεί την πρόσδεση των αιμοπεταλίων στο κολλαγόνο, και πυροδοτεί ένα καταρράκτη μεταγωγής σήματος που οδηγεί στην ενεργοποίηση και συσσώρευση αιμοπεταλίων στο αγγειακό τοίχωμα.^(149,163-169) Η μελέτη του γονιδίου του υποδοχέα αποτέλεσε σχετικά πρόσφατα το ερευνητικό ενδιαφέρον⁽¹⁷⁰⁾, και οδήγησε στην ανάδειξη ορισμένων πολυμορφισμών που ίσως επηρεάζουν τον κίνδυνο στεφανιαίας νόσου.^(183,188) Η επαλήθευση της παραπάνω υπόθεσης σε περισσότερες μελέτες, θα οδηγήσει σε άμεσες συνέπειες για την φαρμακογενετική της αθηροσκλήρωσης, καθώς φαίνεται ότι μειωμένη δραστηριότητα του υποδοχέα σχετίζεται με μείωση των αθηροσκληρωτικών αλλοιώσεων.⁽¹⁸²⁾

11.2. Πολυμορφισμοί στο γονίδιο GPVI και στεφανιαία νόσος-αλληλεπίδραση με τη Μεσογειακή διατροφή

Στην παρούσα μελέτη, διερευνήθηκε ο ρόλος 9 πολυμορφισμών του γονιδίου GPVI στην εμφάνιση στεφανιαίας νόσου και οξέος στεφανιαίου συνδρόμου. Επιπλέον μελετήθηκε η αλληλεπίδραση των πολυμορφισμών αυτών με την υιοθέτηση της Μεσογειακής διατροφής, όπως αυτή αξιολογήθηκε με τη βοήθεια του Σκορ Μεσογειακής Διατροφής.

Η επίδραση της μεσογειακής διατροφής στην εμφάνιση οξέος στεφανιαίου συνδρόμου έχει μελετηθεί τα τελευταία έτη, με άλλες μελέτες να υποστηρίζουν την προστατευτική της επίδραση και άλλες όχι.^(145,146,201)

Στην παρούσα μελέτη το σκορ Μεσογειακής διατροφής διαφέρει στατιστικά σημαντικά μεταξύ ασθενών και ελέγχων (26.05 ± 4.73 vs 27.85 ± 4.00 , $p < 0.001$), αλλά διαφέρει επίσης και το ποσοστό ασθενών και ελέγχων στην ομάδα υψηλού σκορ ($33,9\%$ vs $60,1\%$, $p = 0.037$). Φαίνεται ότι η αύξηση στο Μεσογειακό σκορ κατά μία μονάδα, μειώνει την πιθανότητα εμφάνισης στεφανιαίας νόσου κατά $9,9\%$ ($OR = 0,901$, $p < 0,001$), ενώ η μετάβαση από την ομάδα 'χαμηλού σκορ', στην ομάδα 'υψηλού σκορ' σχετίζεται με μείωση της πιθανότητας εμφάνισης στεφανιαίας νόσου κατά $40,3\%$ ($OR = 0,597$, $p = 0,037$).

Τα παραπάνω ευρήματα έρχονται σε συμφωνία με τα ευρήματα άλλων ερευνών στην Ελλάδα. Συγκεκριμένα, σε μελέτη της Τριχοπούλου και συν, η αύξηση του μεσογειακού σκορ (με κλίμακα 0 έως 9) κατά 2/9 συσχετίστηκε με μείωση της στεφανιαίας θνησιμότητας κατά 25% ($p\text{-value} < 0,001$).⁽¹³⁵⁾ Σε έρευνα των Παναγιωτάκος και συν, η υιοθέτηση μιας μεσογειακής δίαιτας συσχετίστηκε με 16% μείωση του κινδύνου πρώτης εμφάνισης οξέος στεφανιαίου συνδρόμου. Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και σε ασθενείς με υπέρταση, υπερχοληστερολαιμία, καθώς και με μεταβολικό σύνδρομο.⁽²⁰³⁻²⁰⁶⁾

Από τους πολυμορφισμούς που μελετήθηκαν, σε προηγούμενες μελέτες έχουν μελετηθεί οι πολυμορφισμοί rs1613662, rs2304167 και rs1654416. Ο πολυμορφισμός rs1613662 μελετήθηκε σε μελέτη ασθενών-μαρτύρων, σε 425 υγιείς και 574 ασθενείς Άγγλους (Croft et al, 2001). Ο πολυμορφισμός προκαλεί αλλαγή αμινοξέος στη θέση 219 της πεπτιδικής αλυσίδας, από σερίνη σε προλίνη. Φάνηκε ότι η ομοζυγωτία για το C-αλληλόμορφο ήταν πιο συχνή σε άτομα που είχαν υποστεί έμφραγμα του μυοκαρδίου, ιδιαίτερα σε άτομα άνω των 60 ετών, και φαίνεται να παρουσιάζει αλληλεπίδραση με την ηλικία και το γονότυπο για τη β-αλυσίδα του ινωδογόνου ($p < 0,05$).⁽¹⁸³⁾ Παρόμοιο αποτέλεσμα βρήκαν οι ερευνητές Ollikainen et al (2004), οι οποίοι πραγματοποίησαν 300 αυτοψίες σε Καυκάσιους άντρες, και παρατήρησαν ότι το C αλληλόμορφο σχετίζεται με αύξηση του κινδύνου στεφανιαίας θρόμβωσης ($OR = 2,5$, $P = 0.02$).

Παρατηρήθηκε επίσης μια τάση αύξησης του κινδύνου εμφάνισης οξέος εμφράγματος ($OR=2,2$, $P=0.07$), καθώς και υψηλότερη επιφάνεια αθηροσκληρωτικών αλλοιώσεων ($P=0.01$) στους φορείς του C αλληλομόρφου.⁽¹⁸⁶⁾ Το αποτέλεσμα αυτό δεν επιβεβαιώθηκε αργότερα σε μελέτη σε Ιάπωνες.⁽¹⁸⁷⁾ Στην παρούσα μελέτη δεν προέκυψε συσχέτιση του πολυμορφισμού με την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου, μετά από διόρθωση για πιθανούς συγχυτικούς παράγοντες. Προέκυψε όμως οριακή συσχέτιση για την αλληλεπίδραση του πολυμορφισμού με την υιοθέτηση της Μεσογειακής διατροφής, και συγκεκριμένα ο πολυμορφισμός φαίνεται να ασκεί προστατευτική δράση, αντίθετα με τα ευρήματα των προηγούμενων μελετών, σε άτομα με ‘καλό’ διατροφικό σκορ ($OR=0,54$, $p=0,066$). Από την άλλη εμφανίζεται οριακή συσχέτιση για τον πολυμορφισμό με την ομάδα χαμηλού σκορ, ο οποίος φαίνεται να ασκεί επιβαρυντική δράση παρουσία ‘κακής’ διατροφής ($R=2,371$, $p=0,059$).

Ο πολυμορφισμός rs2304167 προκαλεί αλλαγή αμινοξέος στη θέση 249 της αλυσίδας του υποδοχέα, από θρεονίνη σε αλανίνη. Η επίδραση του πολυμορφισμού μελετήθηκε σε μελέτη ασθενών – μαρτύρων σε Ιάπωνες (376 ασθενείς-1080 υγιείς), και φάνηκε να σχετίζεται με την εμφάνιση εμφράγματος του μυοκαρδίου, συγκεκριμένα η ομοζυγωτία για το C αλληλόμορφο ($OR=2,34$, $p=0,0166$).⁽¹⁸⁴⁾ Στην παρούσα μελέτη, ο πολυμορφισμός δεν φάνηκε να συσχετίζεται με την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου αλλά προέκυψε αλληλεπίδραση με την υιοθέτηση του Μεσογειακού διατροφικού προτύπου. Ο πολυμορφισμός φαίνεται να είναι προστατευτικός σε άτομα στην ομάδα του υψηλού διατροφικού σκορ ($OR=0,546$, $p=0,057$). Και αυτό το εύρημα έρχεται σε αντίθεση με την μελέτη που αναφέρεται παραπάνω (Ono K et al, 2002).

Η επίδραση των παραπάνω πολυμορφισμών του γονιδίου GPVI στην λειτουργία και έκφραση του υποδοχέα στην κυτταρική μεμβράνη έχει μελετηθεί μόνο από τους Korhonen et al σε Αγγλικό πληθυσμό (2003), οι οποίοι έδειξαν ότι η ομοζυγωτία για το σπάνιο, β αλληλόμορφο πέντε πολυμορφισμών (Ser199Pro (rs1613662), Lys217Glu (rs1654416), Thr229Ala (rs2304167), Gln297Leu και His302Asn – σε ανισορροπία σύνδεσης), σχετίζεται με μειωμένα επίπεδα GPVI και αντίστοιχα μειωμένη έκφραση του υποδοχέα στη μεμβράνη, καθώς και με μικρότερη πρόσδεση ινωδογόνου, επιπέδων θρομβίνης και απελευθέρωση α-κυστιδίων από τα αιμοπετάλια. Το β αλληλόμορφο κωδικοποιεί για τα αμινοξέα προλίνη, γλουταμικό οξύ, αλανίνη, λευκίνη και ασπαραγίνη (PEALN).⁽¹⁸⁵⁾ Οι τρεις πρώτοι πολυμορφισμοί μελετήθηκαν στην παρούσα μελέτη και όπως αναφέρθηκε παραπάνω, προέκυψαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις με την αλληλεπίδραση με το Μεσογειακό διατροφικό πρότυπο, για τους πολυμορφισμούς rs1613662 και rs2304167. Επιπλέον, ο πολυμορφισμός rs 1654416 στην παρούσα μελέτη παρουσιάζει αλληλεπίδραση με την υιοθέτηση της Μεσογειακής διατροφής, και φαίνεται να είναι προστατευτικός σε άτομα στην ομάδα του υψηλού διατροφικού σκορ

(OR=0,548, p=0,06). Η προστατευτική δράση που προέκυψε έρχεται σε συμφωνία με ευρήματα των Korhonen et al.

Στην παρούσα μελέτη φαίνεται λοιπόν, ότι η όποια επίδραση των πολυμορφισμών χάνεται σε άτομα που βρίσκονται ‘μακριά’ από το Μεσογειακό διατροφικό πρότυπο, ενώ η προστατευτική δράση ασκείται μόνο σε συνδυασμό με μια ‘καλή’ διατροφή. Το εύρημα αυτό πιθανά δείχνει ότι η διατροφή είναι σημαντικότερος παράγοντας από τους συγκεκριμένους πολυμορφισμούς, και η αρνητική επίδραση που έχει η ‘κακή’ διατροφή υπερνικά τα ωφέλη που πιθανά προσφέρουν οι πολυμορφισμοί.

Οι πολυμορφισμοί μεταβάλλουν αμινοξέα στο εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα, όμως παραμένει άγνωστο αν επηρεάζεται κάποια θέση με σημαντική λειτουργία, όπως μια θέση γλυκοζυλίωσης ή οι περιοχές IgC-2.

Στατιστικά σημαντική συσχέτιση στην παρούσα μελέτη προέκυψε επίσης μεταξύ του πολυμορφισμού rs11669150 και της εμφάνισης στεφανιαίας νόσου, για το ισοεπικρατές (p=0,053) και το επικρατές μοντέλο (p=0,022). Η επίδραση του πολυμορφισμού δεν έχει διερευνηθεί σε άλλες μελέτες.

Μελέτες αλληλεπίδρασης μεταξύ πολυμορφισμών στο γονίδιο GPVI και διατροφής δεν έχουν έως τώρα πραγματοποιηθεί, ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση των αποτελεσμάτων.

11.3.Περιορισμοί και πλεονεκτήματα της μελέτης

Η παρούσα μελέτη έχει ορισμένους περιορισμούς. Πρώτον, το υπό μελέτη δείγμα είναι σχετικά μικρό για την μελέτη γενετικών πολυμορφισμών, καθώς από τη βιβλιογραφία φαίνεται ότι η μελέτη της επίδρασης πολυμορφισμών στην έκβαση της στεφανιαίας νόσου, και η αλληλεπίδραση αυτών με περιβαλλοντικούς παράγοντες απαιτεί τη συλλογή μεγαλύτερου δείγματος, ειδικά σε πολυμορφισμούς με μικρή συχνότητα σπάνιου αλληλομόρφου. ^(207,208)

Όσον αφορά τη συλλογή του δείγματος, στην ομάδα ελέγχου συμπεριλήφθησαν άτομα με αρνητικά ευρήματα στη στεφανιογραφία, με αρνητικό τεστ κοπώσεως και με ελεύθερο ιατρικό ιστορικό. Στην περίπτωση της στεφανιογραφίας, συμπεριλαμβάνονται άτομα με πολλούς παράγοντες κινδύνου, καθώς η στεφανιογραφία δεν αποτελεί εξέταση ρουτίνας, αλλά συνιστάται σε άτομα με πολλούς παράγοντες κινδύνου στεφανιαίας νόσου. Έτσι, ο επιπολασμός παραγόντων κινδύνου στην ομάδα ελέγχου, πιθανά εμφανίζεται υψηλότερος και έτσι οι διαφορές με την ομάδα ασθενών πιθανόν να ήταν μεγαλύτερες.

Επιπλέον, τα αρνητικά ευρήματα στις παραπάνω εξετάσεις δεν αποκλείουν την ύπαρξη μικρών αλλά επικίνδυνων στενώσεων, αφού πλέον φαίνεται ότι εκτός από το βαθμό της στένωσης, η αστάθεια της πλάκας επηρεάζει σημαντικά τον κίνδυνο για ρήξη.⁽¹⁸⁾

Ένας ακόμα περιορισμός προκύπτει από την χρήση του Μεσογειακού διατροφικού σκορ. Το Μεσογειακό διατροφικό σκορ αποτελεί ‘a priori’ προσέγγιση στην αξιολόγηση της διατροφής, καθώς βασίζεται σε προϋπάρχουσα γνώση για το πώς ορίζεται η υγιεινή διατροφή. Επίσης, δεν λαμβάνεται υπόψη η συνολική ενέργεια των τροφίμων που καταναλώνονται, γεγονός που δεν διαχωρίζει την βαθμολογία ανάλογα με το αν προσλαμβάνονται πλεονάζουσες θερμίδες, και τα συστατικά του σκορ έχουν ισότιμη βαρύτητα, κάτι το οποίο ίσως να μην είναι ακριβές, καθώς δεν έχουν όλα τα τρόφιμα ή ομάδες τροφίμων την ίδια επίδραση στα υπό μελέτη αποτελέσματα υγείας. Τέλος, ο αδρός διαχωρισμός των ατόμων σε δύο ομάδες, οδηγεί σε πιθανά σφάλματα όσον αφορά τις τιμές κοντά στη διάμεσο.

Περιορισμοί προκύπτουν και από τον ίδιο τον σχεδιασμό μιας μελέτης ασθενών μαρτύρων, καθώς δεν μπορούν να εξαχθούν αιτιολογικές συσχετίσεις, αφού δεν ικανοποιείται η χρονική αλληλουχία της έκθεσης σε ένα παράγοντα με την έκβαση της νόσου. Για να ξεπεραστεί σε ένα βαθμό το πρόβλημα αυτό, στην παρούσα μελέτη η συλλογή των δεδομένων γινόταν σε σύντομο χρονικό διάστημα μετά την διάγνωση της ασθένειας, έτσι ώστε οι παράγοντες κινδύνου, οι διατροφικές συνήθειες, κτλ να μην έχουν ακόμα μεταβληθεί και να μπορούν να ανακληθούν.

Παρά τους περιορισμούς, η παρούσα μελέτη διαθέτει και αρκετά πλεονεκτήματα. Πρώτον, η συλλογή του δείγματος πραγματοποιήθηκε κυρίως σε νοσοκομειακό περιβάλλον, όπου η διάγνωση ή όχι της ασθένειας έγινε με αξιόπιστες εξετάσεις από ειδικευμένο προσωπικό, και η λήψη των δεδομένων σε σύντομο χρόνο από τη διάγνωση για να αντιμετωπιστεί το σφάλμα ανάκλησης. Αξιολογήθηκαν πολυάριθμοι παράγοντες κινδύνου και λήφθηκαν εκτενή στοιχεία που μπορεί να επηρεάζουν την έκβαση της ασθένειας, καθώς και αναλυτικό διατροφικό ιστορικό μέσω κατάλληλου ερωτηματολογίου.

Η πλειοψηφία των πολυμορφισμών που μελετήθηκαν δεν έχουν μελετηθεί, και γενικότερα η πολυμορφικότητα του γονιδίου GPVI αποτελεί νέο τομέα ερευνητικού ενδιαφέροντος. Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε έλεγχος αλληλεπίδρασης με το Μεσογειακό διατροφικό πρότυπο, κάτι που δεν έχει ελεγχθεί έως τώρα. Η μελέτη των πολυμορφισμών σε σχέση με περιβαλλοντικούς παράγοντες είναι πολύ σημαντική, καθώς ολοένα και περισσότερες μελέτες δείχνουν ότι αλληλεπιδράσεις γενετικών – περιβαλλοντικών παραγόντων μεταβάλλουν τον στεφανιαίο κίνδυνο.⁽¹⁹³⁾

Η χρήση του Μεσογειακού διατροφικού σκορ, παρά τους περιορισμούς, αποτελεί αξιόπιστη προσέγγιση στην αξιολόγηση της διατροφής, και οδηγεί σε παρόμοια αποτελέσματα ερευνών που έχουν χρησιμοποιήσει παρόμοια σκορ.

Τα ευρήματα που προέκυψαν δημιουργούν ερωτήματα σε σχέση με παλαιότερες μελέτες.^(183,186) Δεδομένου ότι η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων ερευνών πολυμορφισμών είναι μικρή, τα αποτελέσματα πρέπει να αξιολογούνται με επιφύλαξη έως ότου επαληθευτούν και σε άλλους πληθυσμούς αλλά και σε μεγαλύτερο μέγεθος δείγματος.

Συμπερασματικά απαιτείται η διεξαγωγή περισσότερων ερευνών, σε διαφορετικούς πληθυσμούς, ώστε να επιβεβαιωθεί η σχέση των πολυμορφισμών με την εμφάνιση οξέος στεφανιαίου συνδρόμου. Μια ακόμα προσέγγιση θα μπορούσε να συμπεριλαμβάνει μελέτες απόκρισης σε αντιθρομβωτική φαρμακευτική αγωγή, ώστε να διερευνηθούν πιθανές διαφορές ανάλογα με το γονότυπο, οι οποίες θα οδηγούσαν σε εξατομικευμένες θεραπευτικές παρεμβάσεις, πιθανά αποδοτικότερες.

III. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. World Health Organisation. Cardiovascular diseases. Fact sheet N° 317 February 2007, www.who.int
2. American Heart Association. Heart Disease and Stroke Statistics — 2009 Update. www.americanheart.org
3. British Heart foundation. European cardiovascular disease statistics, 2008 edition. www.bhf.org.uk
4. World Health Organisation. Atlas of heart disease and stroke 2004. www.who.int
5. Yusuf S, Hawken S et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *The Lancet* 2004;364(9438):937-52
6. World Health Organization. Mortality Country Fact Sheet 2006: Greece. www.who.int
7. Παναγιωτάκος Δ, Πίτσαβος Χ, Στεφανίδης Χ. Η επιδημιολογία της στεφανιαίας νόσου στην Ελλάδα. Εκδόσεις Κωστάκη, Αθήνα 2004
8. Keys A. Mediterranean diet and public health: personal reflections. *Am J Clin Nutr* 1995;61: 1321-23
9. Liu S. Mediterranean Diets. *Am J Clin Nutr* 2001;73(4):847
10. Chimonas ET. The treatment of coronary heart disease: an update. Part 2: Mortality trends and main causes of death in the Greek population. *Curr Med Res Opin* 2001; 17(1):27-33
11. Pitsavos C, Panagiotakos DB et al. Epidemiology of acute coronary syndromes in a Mediterranean country; aims, design and baseline characteristics of the Greek study of acute coronary syndromes (GREECS). *BMC Public Health* 2005; 5:23.
12. World Health Organisation. Highlights on health in Greece, 2004. www.who.int
13. Kusumoto F. Καρδιαγγειακές Διαταραχές: Νοσήματα της καρδιάς. Παθολογική Φυσιολογία, McPhee S, Χαράλαμπος Μουτσόπουλος, σελ. 393 – 97, Εκδόσεις Λίτσας, 2000
14. Despopoulos A. Cardiovascular System. Color Atlas of Physiology, σελ. 210, Thieme, 2003
15. Χανιώτης Φ, Χανιώτης Δ. Νοσολογία – Παθολογία, σελ.629 - 673, Εκδόσεις Λίτσας, 2002
16. Blackshear JL, Kantor B. Pathogenesis of atherosclerosis. Mayo Cardiology, Murphy JG, Lloyd MA, pg 699-700, third edition, 2007
17. Berliner JA, Navab M et al. Atherosclerosis: Basic Mechanisms: Oxidation, Inflammation, and Genetics. *Circulation* 1995;91:2488-96
18. Libby P. The pathogenesis of atherosclerosis. Harrison's Principles of Internal Medicine, Braunwald K, Longo H, pg 1425-30, 16th edition, McGraw-Hill, 2005
19. Fuster V. Mechanisms Leading to Myocardial Infarction: Insights from Studies of Vascular Biology. *Circulation* 1994; 90(4):2126-46

20. Libby P. Current Concepts of the Pathogenesis of the Acute Coronary Syndromes *Circulation* 2001;104:365
21. Buja ML, Willerson JT. Role of Inflammation in Coronary Plaque Disruption. *Circulation* 1994; 89:503-505
22. Plutsky J. Atherosclerotic plaque rupture: emerging insights and opportunities. *Am J Cardiol* 1999;84(1):15-20
23. Braunwald E et al. Unstable Angina, Diagnosis and Management, Clinical Practice Guideline, U.S. Department of Health and Human Services. AHCPR Publication, May 1994
24. Pepine CJ, Nichols WW. The Pathophysiology of Chronic Ischemic Heart Disease. *Clin Cardiol* 2007; 30:4-9
25. Σαχίνη – Καρδάση Α, Πάνου Μ. Παθολογική Και Χειρουργική Νοσηλευτική, σελ. 27 – 35, Εκδόσεις ΒΗΤΑ, 2004
26. Awtry EH, Loscalzo J. Στεφανιαία Καρδιοπάθεια. Cecil Παθολογία, σελ. 99-116, Εκδόσεις Λίτσας, 2003
27. National Heart, Lung and Blood Institute. Heart Attack Warning Signs. Retrieved November 22, 2006, www.nhlbi.nih.gov
28. American Heart Association. Acute Coronary Syndrome. Retrieved November 25, 2006, www.americanheart.org
29. McSweeney JC, Cody M et al. Women's early warning symptoms of acute myocardial infarction. *Circulation* 2003; 108 (21): 2619-23
30. Antman E, Bassand JP et al. Myocardial infarction redefined — a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology committee for the redefinition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36(3): 959-69
31. ACC/AHA Guidelines for the Management of Patients with ST-Elevation Myocardial Infarction—Executive Summary. *Circulation* 2004;110:588-636
32. Garas S et al. Myocardial Infarction. Retrieved November 22, 2006. www.eMedicine.medscape.com
33. Morris F, Brady WJ. ABC of clinical electrocardiography - Acute myocardial infarction—Part I. *Br Med J* 2002; 324(7341): 831-34
34. 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

35. Somers MP, Brady WJ et al. The Prominant T Wave: Electrocardiographic Differential Diagnosis. *Am J Emerg Med* 2002; 20(3):243-51
36. Luepker RV, Apple FS et al. Case Definitions for Acute Coronary Heart Disease in Epidemiology and Clinical Research Studies. *Circulation* 2003;108:2543
37. American Heart Association. Risk factors and coronary heart disease. AHA scientific position. www.americanheart.org
38. Gordon T, Castelli WP et al. Predicting coronary heart disease in middle-aged and older persons: the Framingham Study. *JAMA*, 1977;238:497–499.[Abstract]
39. Kannel WB, D'Agostino RB et al. Concept and usefulness of cardiovascular risk profiles. *Am Heart J* 2004;148(1):16-26
40. Dannenberg AL, Levy D et al. Impact of age on echocardiographic left ventricular mass in a healthy population (the Framingham Study). *Am J Cardiol* 1989; 64: 1066–68
41. Njolstad I, Arnesen E et al. Smoking, serum lipids, blood pressure, and sex differences in myocardial infarction: a 12-year follow-up of the Finnmark Study. *Circulation* 1996;93:450–56
42. Rich-Edwards JW, Manson JAE et al. The primary prevention of coronary heart disease in women. *N Engl J Med* 1995;332:1758–66
43. Jousilahti P, Vartiainen E et al. Sex, Age, Cardiovascular Risk Factors, and Coronary Heart Disease. *Circulation* 1999;99:1165-72
44. Castanho VS, Oliveira LS et al. Sex differences in risk factors for coronary heart disease: a study in a Brazilian population. *BMC Public Health* 2001; 1: 3
45. WHO MONICA Project. 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
46. Chrysoshoou C, Panagiotakos DB et al. Gender Differences on the Risk Evaluation of Acute Coronary Syndromes: The CARDIO2000 Study. *Prev Cardiol* 2003; 6(2):71-77 [Abstract]
47. Sesso HD, Lee IM et al. Maternal and paternal history of myocardial infarction and risk of cardiovascular disease in men and women. *Circulation* 2001; 104: 393–398
48. Wang TJ, Nam BH et al. Carotid Intima-Media Thickness Is Associated With Premature Parental Coronary Heart Disease The Framingham Heart Study. *Circulation* 2003;108:572
49. Gaeta G, De Michele M et al. Arterial abnormalities in the offspring of patients with premature myocardial infarction. *N Engl J Med* 2000; 343: 840–846
50. O'Donnell CJ, Larson MG et al. Genetic and environmental contributions to platelet aggregation: the Framingham heart study. *Circulation* 2001; 103: 3051–3056
51. Trichopoulou A, Yiannakouris N et al. Genetic predisposition, nongenetic risk factors and coronary infarct. *Arch Intern Med* 2008;168(8): 891-96

52. Beekman M, Heijmans BT et al. Heritabilities of apolipoprotein and lipid levels in three countries. *Twin Res* 2002 Apr; 5(2):87-97
53. Agarwal A, Williams GH et al. Genetics of human hypertension. *Trends Endocrinol Metab* 2005; 16(3):127-33
54. Lee YA. The role of genes in the current obesity epidemic. *Ann Acad Med Singapore* 2009; 38(1):45-3.
55. Moorman J, West D et al. Disease overview, Hypertension and coronary artery disease. *Drugs in Context* 2006;2(1):5-15
56. Sipahi I, Tuzcu EM et al. Effects of Normal, Pre-Hypertensive, and Hypertensive Blood Pressure Levels on Progression of Coronary Atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 2006;48(4): 833-38
57. Chobanian AV. Pathophysiology of Atherosclerosis. *Am J Cardiol* 1992;70:3G-7G
58. Schwartzkopff B; Motz W et al. Hypertension: Structural and Functional Alterations of the Intramyocardial Coronary Arterioles in Patients with Arterial Hypertension. *Circulation* 1993; 88(3): 993-1003
59. Megnien JL, Simon A et al. Hypertension Promotes Coronary Calcium Deposit in Asymptomatic Men. *Hypertension* 1996;27:949-54
60. Pitsavos C, Panagiotakos DB et al. Epidemiology of cardiovascular risk factors in Greece: aims, design and baseline characteristics of the ATTICA study. *BMC Public Health* 2003; 3:32
61. Houslay ES, Sarma J et al. The effect of intensive lipid lowering on coronary atheroma and clinical outcome. *Heart* 2007;93:149-151[Abstract]
62. Stamler J, Wentworth D et al. Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356,222 primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). *JAMA* 1986; 256:2823-28 [\[Abstract\]](#)
63. Zemel PC, Sowers JR. Relation between lipids and atherosclerosis: Epidemiologic evidence and clinical implications. *Am J Cardiol* 1990; 66(21): 7-12
64. LaRosa JC, Hunninghake D et al. The cholesterol facts. A summary of the evidence relating dietary fats, serum cholesterol, and coronary heart disease. *Circulation* 1990; 81: 1721-33
65. 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* 2002; 106: 3143

66. Assmann G, Schulte H. Relation of high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides to incidence of atherosclerotic coronary artery disease (the PROCAM experience). *Am J Cardiol* 1992; 70(7): 733-37
67. Choi BJ, Vilahur G et al. The Role of High-Density Lipoprotein Cholesterol in Atherothrombosis. *Mt Sinai J Med* 2006; 74(4): 690-701
68. Libby P. Managing the Risk of Atherosclerosis: The Role of High-Density Lipoprotein. *Am J Cardiol* 2001;88(suppl):3N–8N
69. Lloyd CE, Kuller LH et al. *Coronary Artery Disease in IDDM-Gender Differences in Risk Factors but Not Risk. Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16:720-26
70. Van der Horst ICC, Nijsten MWN et al. *Persistent hyperglycemia is an independent predictor of outcome in acute myocardial infarction. Cardiovasc Diabetol* 2007; 6:2
71. Agewall S, Fagerberg B et al. *Carotid artery wall intima-media thickness is associated with insulin-mediated glucose disposal in men at high and low coronary risk. Stroke* 1995; 26: 956–60
72. Bansilal S, Farkouh ME et al. Role of Insulin Resistance and Hyperglycemia in the Development of Atherosclerosis. *Am J Cardiol* 2007; 99[suppl]:6B–14B
73. Getz GS. Report on the Workshop on Diabetes and Mechanisms of Atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1993; 13: 459-64
74. Lopez- Jimenez F, Johnson JC. Coronary artery disease risk factors. Mayo cardiology, Murphy JG, Lloyd MA, pg: 715-24, third edition, 2007
75. La Vecchia C, D'Avanzo B et al. Passive smoking and the risk of acute myocardial infarction. *The Lancet* 1993;341:505-506
76. Ockene IS, Houston Miller N. For the American Heart Association Task Force on Risk Reduction, Cigarette Smoking, Cardiovascular Disease, and Stroke A Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association. *Circulation* 1997; 96:3243-47
77. Salonen JT. Stopping smoking and long-term mortality after acute myocardial infarction. *Brit Heart J* 1980; 43:463-69
78. Keys A, Menotti A et al. The seven countries study: 2289 deaths in 15 years. *Prev med* 1984; 13: 141–154 [Abstract]
79. Hubert HB, Fenileib M 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: 968–77
80. 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: 2099–100

81. Cassidy AE, Bielak LF et al. Progression of Subclinical Coronary Atherosclerosis Does Obesity Make a Difference? *Circulation* 2005;111:1877-82
82. Grundy SM. Obesity, Metabolic Syndrome, and Coronary Atherosclerosis. *Circulation* 2002;105:2696
83. Wolk R, Berger P et al. Body Mass Index A Risk Factor for Unstable Angina and Myocardial Infarction in Patients With Angiographically Confirmed Coronary Artery Disease. *Circulation* 2003; 108:2206
84. Humphrey LL, Fu R et al. Homocysteine level and coronary heart disease incidence: a systematic review and meta-analysis. *Mayo Clin Proc* 2008; 83(11):1203-12
85. Sadeghian S, Fallahi F et al. Homocysteine, vitamin B12 and folate levels in premature coronary artery disease. *BMC Cardiovasc Disord* 2006, 6:38
86. Tawakol A, Omland T et al. Hyperhomocysteinemia Is Associated With Impaired Endothelium-Dependent Vasodilation in Humans. *Circulation* 1997; 95:1119-21
87. Pai JK, Pischon T et al. Inflammatory markers and the risk of coronary heart disease in men and women. *N Engl J Med* 2004; 351:2599–2610
88. Gotto Am. Role of C - reactive protein in Coronary Risk Reduction: Focus on Primary Prevention. *Am J Cardiol* 2007; 99(5): 718-25
89. Koenig W. Fibrinogen and Coronary Risk. *Curr Cardiol Rep* 1999; 1:112-18
90. Leon AS, Cornett J et al. Leisure time physical activity levels and risk of coronary heart disease and death: the Multiple Risk Factor Intervention Study. *JAMA* 1987;273: 2388–95 [Abstract]
91. Blair N, Kohl HW et al. Changes in physical fitness and all cause mortality. A prospective study of healthy and unhealthy men. *JAMA* 1995; 273: 1093–98 [Abstract]
92. Wood PD, Stefanick ML et al. The effects on plasma lipoproteins of prudent weight reducing diet, with or without exercise in overweight men and women. *N Engl J Med* 1991; 325: 461–66
93. Helmrich SP, Ragland DR et al. Physical activity and reduced occurrence of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1991; 325: 147–152
94. Schuler G, Hambrecht R et al. Regular physical exercise and low fat diet: effects on progression of coronary artery disease. *Circulation* 1992; 86: 1–11
95. Hallman T, Burell G et al. Psychosocial risk factors for coronary heart disease, their importance compared with other risk factors and gender differences in sensitivity. *J Cardiovasc Risk* 2001;8(1):39-49
96. Hemingway H, Marmot M et al. Evidence based cardiology: psychosocial factors in the aetiology and prognosis of coronary heart disease: systematic review of prospective cohort studies. *Br Med J* 1999;318:1460-67

97. O'Malley PG, Jones DL et al. Lack of Correlation between Psychological Factors and Subclinical Coronary Artery Disease. *N Engl J Med* 2000; 343:1298
98. Graham I, Atar D et al. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: executive summary. *Eur Heart J* 2007;28(19):2375-14
99. Jacobs DR Jr, Steffen LM. Nutrients, foods, and dietary patterns as exposures in research: a framework for food synergy. *Am J Clin Nutr* 2003;78(suppl):508S-13S
100. Togo P, Osler M et al. Food intake patterns and body mass index in observational studies. *Int J Obes* 2001;25: 1741-51
101. Farchi G, Mariotti S et al. Diet and 20-year mortality in two rural population groups of middle-aged men in Italy. *Am J Clin Nutr* 1989;50:1095-103
102. Sacks FM, Obarzanek E et al. Rationale and design of the Dietary Approaches to Stop Hypertension Trial (DASH): a multicenter controlled-feeding study of dietary patterns to lower blood pressure. *Ann Epidemiol* 1994;5: 108-18
103. Hu FB. Dietary pattern analysis: a new direction in nutritional epidemiology. *Curr Opin Lipidol* 2002; 13(1):3-9
104. Jinlin F, Binyou W et al. A new approach to the study of diet and risk of type 2 diabetes. *J Postgrad Med* 2007; 53(2): 139-43
105. Menotti A, Lanti M et al. 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;84:238-44
106. Kok FJ, Kromhout D. Atherosclerosis: Epidemiological studies on the health effects of a Mediterranean diet. *Eur J Nutr* 2004;43 : 1/2–1/5
107. Mata P, Varela O et al. Monounsaturated and Polyunsaturated n-6 Fatty Acid–Enriched Diets Modify LDL Oxidation and Decrease Human Coronary Smooth Muscle Cell DNA Synthesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2088-95
108. Grundy SM, Denke MA. Dietary influences on serum lipids and lipoproteins. *J Lipid Res* 1990; 31(7):1149-72
109. Kratz M, Cullen P et al. Effects of dietary fatty acids on the composition and oxidizability of low-density lipoprotein. *Eur J Clin Nutr* 2002; 56:72-81
110. Hodson L, Skeaff CM et al. The effect of replacing dietary saturated fat with polyunsaturated or monounsaturated fat on plasma lipids in free-living young adults. *Eur J Clin Nutr* 2001; 55:908-915
111. Kris-Etherton PM, Harris WS et al for the Nutrition Committee. AHA Scientific Statement: Fish consumption, fish oil, ω -3 fatty acids, and CVD. *Circulation* 2002; 106: 2747–57

112. He K, Song Y et al. Accumulated evidence on fish consumption and coronary heart disease mortality: a meta-analysis of cohort studies. *Circulation* 2004; 109: 2705–11
113. De Lorgeril M, Salen P et al. Mediterranean Diet, Traditional Risk Factors, and the Rate of Cardiovascular Complications after Myocardial Infarction Final Report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation* 1999;99:779-85
114. Burr ML, Gilbert JF et al. Effects of changes in fat, fish and fibre intake on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART). *The Lancet* 1989; 2:757–61[Abstract]
115. Psaltopoulou T, Naska A et al. Olive oil, the Mediterranean diet, and arterial blood pressure: the Greek European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Am J Clin Nutr* 2004; 80: 1012 – 8
116. Krogh TM, Freudenheim V et al. 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. *JAMA* 1990; 263: 688 – 92 [Abstract]
117. Schroder H, Marrugat J et al. Adherence to the traditional Mediterranean diet is inversely associated with body mass index and obesity in a Spanish population. *J Nutr* 2004; 134 (12): 3355–61 [Abstract]
118. Trichopoulou A, Naska A et al. Mediterranean diet in relation to body mass index and waist-to-hip ratio: the Greek European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition Study. *Am J Clin Nutr* 2005; 82(5): 935–940
119. Perez-Jimenez F, Lopez-Miranda J et al. A Mediterranean and a high-carbohydrate diet improve glucose metabolism in healthy young persons. *Diabetologia* 2001; 44(11): 2038–43
120. Esposito K, Marfella R et al. Effect of a Mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomized trial. *JAMA* 2004; 292(12):1440–46
121. Toobert DJ, Glasgow RE et al. Biologic and quality-of-life outcomes from the Mediterranean Lifestyle Program: a randomized clinical trial. *Diabetes Care* 2003;26 (8): 2288–93
122. Vincent-Baudry S, Defoort C 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. *Am J Clin Nutr* 2005; 82 (5): 964–71 [Abstract]
123. Ryan M, McInerney D et al. Diabetes and the Mediterranean diet: a beneficial effect of oleic acid on insulin sensitivity, adipocyte glucose transport and endothelium-dependent vasoreactivity. *QJ Med* 2000; 93: 85-91

124. Panagiotakos DB, Chrysoshoou C et al. Association between the prevalence of obesity and adherence to the Mediterranean diet: the ATTICA study. *Nutrition* 2006; 22(5): 449-56
125. Carluccio MA, Siculella L et al. Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 622–29
126. Bellido C, López-Miranda J et al. Mediterranean and CHO diets decrease VCAM-1 and E-selectin expression induced by modified low-density lipoprotein in HUVECs. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2006;16(8): 524-30
127. Pendurthi UR, Williams JT et al. 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. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19: 419–26
128. Iijima K, Yoshizumi M et al. Red wine polyphenols inhibit vascular smooth muscle cell migration through two distinct signaling pathways. *Circulation* 2002; 105: 2404–10
129. Covas MI, Nyyssonen et al. The Effect of Polyphenols in Olive Oil on Heart Disease Risk Factors A Randomized Trial. *Ann Inter Med* 2006;145(5):333-41
130. Salas-Salvadó J, Garcia-Arellano A et al. Components of the Mediterranean-type food pattern and serum inflammatory markers among patients at high risk for cardiovascular disease. *Eur J Clin Nutr* 2008; 62(5):651-59
131. Bach A, Serra-Majem L et al. The use of indexes evaluating the adherence to the Mediterranean diet in epidemiological studies: a review. *Public Health Nutr* 2006; 9(1A): 132–146
132. Trichopoulou A, Kouris-Blazos A et al. Diet and overall survival in elderly people. *Br Med J* 1995; 311: 1457–60
133. Kouris-Blazos A, Gnardellis C et al. Are the advantages of the Mediterranean diet transferable to other populations? A cohort study in Melbourne, Australia. *Br J Nutr* 1999;82(1):57-61
134. Lasheras C, Fernandez S et al. Mediterranean diet and age with respect to overall survival in institutionalized, non-smoking elderly people. *Am J Clin Nutr* 2000; 71(4):987-92
135. Trichopoulou A, Costacou T et al. Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *N Engl J Med* 2003;348(26): 2599-608

136. Knoop KT, Groot de LC et al. Comparison of three different dietary scores in relation to 10-year mortality in elderly European subjects: the HALE project. *JAMA* 2004;292(12):1433-39
137. Trichopoulou A, Orfanos P et al. Modified Mediterranean diet: EPIC elderly prospective cohort study. *BMJ* 2005;330(7498):991
138. Lagiou P, Trichopoulos D et al. Mediterranean dietary pattern and mortality among young women: a cohort study in Sweden. *Br J Nutr* 2006;96(2):384-92
139. Fung TT, Hu FB et al. Diet quality is associated with the risk of estrogen receptor-negative breast cancer in postmenopausal women. *J Nutr* 2006;136(2):466-72
140. Scarmeas N, Stern Y et al. Mediterranean diet and risk for Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 2006;59(6):912-21
141. Gao X, Chen H et al. Prospective study of dietary pattern and risk of Parkinson disease. *Am J Clin Nutr* 2007; 86(5):1486-94
142. Mitrou PN, Kipnis V et al. Mediterranean dietary pattern and prediction of all-cause mortality in a US population: results from the NIH-AARP Diet and Health Study. *Arch Intern Med* 2007;167(22):2461-8
143. Benetou V, Trichopoulou A et al. Conformity to traditional Mediterranean diet and cancer incidence: the Greek EPIC cohort. *Br J Cancer* 2008 Jul 8;99(1):191-5.
144. Sofi F, Cecari F et al. Adherence to Mediterranean diet and health status: meta-analysis. *BMJ* 2008; 337 (a1344)
145. Panagiotakos DB, Pitsavos C et al. Adherence to the Mediterranean food pattern predicts the prevalence of hypertension, hypercholesterolemia, diabetes and obesity, among healthy adults; the accuracy of the MedDietScore. *Prev med* 2007; 44:335–340
146. Panagiotakos DB, Pitsavos C et al. Can a Mediterranean diet moderate the development and clinical progression of coronary heart disease? A systematic review. *Med Sci Monit* 2004; 10: 193–38
147. Panagiotakos DB, Pitsavos C et al. Five-year incidence of cardiovascular disease and its predictors in Greece: the ATTICA study. *Vasc Med* 2008;13(2):113-21
148. Martinez-Gonzalez MA, Fernandez-Jarne E et al. Mediterranean diet and reduction in the risk of a first acute myocardial infarction: an operational healthy dietary score. *Eur J Nutr* 2002;41: 153–60
149. Kottke-Marchant K. Importance of platelets and platelet response in acute coronary syndromes. *Cleve Clin J Med* 2009;76 (1):S2-7
150. Davi G, Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med* 2007; 357:2482-94

151. Bombeli T, Schwartz BR. Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), α v β 3 integrin, and GPIb α . *J Exp Med* 1998; 187(3):329-39
152. Clemetson KJ, Clemetson JM. Platelet receptors. In: Michelson AD. Platelets. Academic Press, 2nd edition, 2007
153. Modderman PW, Admiraal LG et al. Glycoproteins V and Ib-IX Form a Non-covalent Complex in the Platelet Membrane. *J Biol Chem* 1992;267(1): 364-69
154. Tomiyama Y, Shiraga M et al. Platelet Membrane Proteins as Adhesion Receptors. In : Gresele P, Page CV et al. Platelets in thrombotic and non-thrombotic disorders: pathophysiology, pharmacology and therapeutics. Illustrated edition, Cambridge University Press, 2002
155. Hartwick JH. Platelet Morphology and Shape Change. In: Loscalzo J, Schafer AI. Thrombosis and hemorrhage. 3rd edition, Lippincott Williams & Wilkins, 2002
156. Moll S, White GC. Coagulation disorders. In: McKusick VA, Runge MS et al. Principles Of Molecular Medicine, pg 878, Humana Press, 2006
157. Nieswandt B, Offermans S. Pharmacology of Platelet Adhesion and Aggregation. In: Berx G, Behrens J et al. Cell Adhesion, pg 438-70, illustrated edition, Springer 2004
158. Moroi M, Jung SM. Platelet glycoprotein VI: its structure and function. *Thromb Res* 2004; 114: 221—33
159. Clemetson JM, Polgar J et al. The platelet collagen receptor glycoprotein VI is a member of the immunoglobulin superfamily related to Fc α R and the natural killer receptors. *J Biol Chem* 1999;274:29019-24
160. Fan QR, Mosyak L et al. Structure of the inhibitory receptor for human natural killer cells resembles haematopoietic receptors. *Nature* 1997;389:96-100
161. Jandrot-Perrus M, Busfield S et al. Cloning, characterization and functional studies of human and mouse glycoprotein VI: a platelet-specific collagen receptor from the Immunoglobulin superfamily. *Blood* 2000; 96(5):1798-1807
162. Jung SM, Moroi M. Platelet glycoprotein VI. In: Sigalov AB, Multichain Immune Recognition Receptor Signaling, pg 53-60, illustrated edition, Springer 2008
163. Ezumi Y, Shindoh K et al. Physical and functional association of the Src family kinases Fyn and Lyn with the collagen receptor glycoprotein VI-Fc receptor gamma chain complex on human platelets. *J Exp Med* 1998; 188: 267–76
164. Briddon SJ, Watson SP. Evidence for the involvement of p59fyn and p53/56lyn in collagen receptor signalling in human platelets. *Biochem J* 1999; 338 (1): 203–9

165. Watson SP, Auger JM et al. GPVI and integrin α IIb β 3 signaling in platelets. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1752–62
166. Grosse J, Braun A et al. An EF hand mutation in Stim1 causes premature platelet activation and bleeding in mice. *J Clin Invest* 2007; 117: 3540–50
167. Nieswandt B, Watson SP. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood* 2003;102(2):449-61
168. Konishi H, Katoh Y. Platelets activated by collagen through immunoreceptor tyrosine-based activation motif play pivotal role in initiation and generation of neointimal hyperplasia after vascular injury. *Circulation* 2002;105(8):912-6
169. Massberg S, Konrad I et al. Soluble glycoprotein VI dimer inhibits platelet adhesion and aggregation to the injured vessel wall in vivo. *FASEB J* 2004; 18(2):397-99
170. Ezumi Y, Uchiyama T. Molecular Cloning, Genomic Structure, Chromosomal Localization, and Alternative Splice Forms of the Platelet Collagen receptor glycoprotein VI. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 277: 27-36
171. Holmes ML, Bartle N. Cloning and Analysis of the Thrombopoietin-induced Megakaryocyte-specific Glycoprotein VI Promoter and Its Regulation by GATA-1, Fli-1, and Sp1. *J Biol Chem* 2002; 277(50): 48333-41
172. Hirano F, Tanaka H et al. Functional Interference of Sp1 and NF- κ B through the Same DNA Binding Site. *Mol Cell Biol* 1998;18(3):1266-74
173. Karantzoulis-Fegaras F, Antoniou H et al. Characterization of the Human Endothelial Nitric-oxide Synthase Promoter. *J Biol Chem* 1999;274(5): 3076-93
174. Abumiya T, Sasaguri T et al. Stress Induces Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Flk-1/KDR Through the CT-Rich Sp1 Binding Site. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22(6): 907 – 13
175. Hata Y, Duh E et al. Transcription Factors Sp1 and Sp3 Alter Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Expression through a Novel Recognition Sequence. *J Biol Chem* 1998;273(30):19294-303
176. Wang L, Wei D et al. Transcription Factor Sp1 Expression Is a Significant Predictor of Survival in Human Gastric Cancer. *Clin Canc Res* 2003; 9(17): 6371 – 80
177. Furihata K, Kunicki J et al. Characterization of Human Glycoprotein VI Gene 5' Regulatory and Promoter Regions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1733
178. Calara F, Silvestre M et al. Spontaneous plaque rupture and secondary thrombosis in apolipoprotein E-deficient and LDL receptor-deficient mice. *J Pathol* 2001; 195:257–63
179. Gruner S, Prostredna M et al. Relative antithrombotic effect of soluble GPVI dimer compared with anti-GPVI antibodies in mice. *Blood* 2005;105:1492–99

180. Penz S, Reininger AJ et al. Human atheromatous plaques stimulate thrombus formation by activating platelet glycoprotein VI. *FASEB* 2005;19:898-909
181. Schulz C, Penz S et al. Platelet GPVI binds to collagenous structures in the core region of human atheromatous plaque and is critical for atheroprogession in vivo. *Basic Res Cardiol* 2008;103(4): 356-67
182. Schönberger T, Siegel-Axel D et al. The immunoadhesin glycoprotein VI-Fc regulates arterial remodelling after mechanical injury in ApoE^{-/-} mice. *Cardiovasc Res* 2008 80(1):131-37
183. Croft SA, Samani NJ et al. Novel Platelet Membrane Glycoprotein VI Dimorphism Is a Risk Factor for Myocardial Infarction *Circulation* 2001;104:1459
184. Ono K, Tanaka C et al. A GPVI polymorphism is a risk factor for myocardial infarction in Japanese. *Atherosclerosis* 2002;165:397-98
185. Korhonen LJ, Smethurst PA et al. The low-frequency allele of the platelet collagen signaling receptor glycoprotein VI is associated with reduced functional responses and expression. *Blood* 2003;101(11): 4372-79
186. Ollikainen E, Mikkelsen J et al. Platelet membrane collagen receptor glycoprotein VI polymorphism is associated with coronary thrombosis and fatal myocardial infarction in middle-aged men. *Atherosclerosis* 2004;176(1):95-99
187. Qin Q, Zhao BR et al. Association of matrix metalloproteinase-9 and platelet membrane glycoprotein VI polymorphisms with acute coronary syndrome. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi* 2005;33(7):622-26[Abstract]
188. Peltonen L, McKusick VA. Genomics and medicine, dissecting human disease in the postgenomic era. *Science* 2001;291: 1224–29
189. Stover PJ. Nutritional genomics. *Physiological Genomics* 2004;16:161-65
190. Mutch DM, Wahli W et al. Nutrigenomics and nutrigenetics: the emerging faces of nutrition. *FASEB* 2005;19:1602-16
191. Elliott R, Ong TJ. Nutritional genomics. *BMJ* 2002;324:1438–42
192. Ordovas JM. Genetic interactions with diet influence the risk of cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 2006;83(suppl):443S– 6S
193. Ordovas JM, Mooser V. Nutrigenomics and nutrigenetics. *Curr Opin Lipidol* 2004;15(2): 101-108
194. Couture P, Archer WR et al. Influences of apolipoprotein E polymorphism on the response of plasma lipids to the ad libitum consumption of a high-carbohydrate diet compared with a high-monounsaturated fatty acid diet. *Metabolism* 2003; 52:1454-59

195. Lottenberg AM, Nunes VS et al. The human cholesteryl ester transfer protein I405V polymorphism is associated with plasma cholesterol concentration and its reduction by dietary phytosterol esters. *J Nutr* 2003; 133:1800-1805 [Abstract]
196. Tai ES, Corella D et al. Dietary fat interacts with the -514C>T polymorphism in the hepatic lipase gene promoter on plasma lipid profiles in a multiethnic Asian population: the 1998 Singapore National Health Survey. *J Nutr* 2003; 133:3399-408[Abstract]
197. Marin C, Lopez-Miranda J et al. Effects of the human apolipoprotein A-I promoter G-A mutation on postprandial lipoprotein metabolism. *Am J Clin Nutr* 2002; 76: 319-25[Abstract]
198. Μανιός Γ. Διατροφική αξιολόγηση: Διαιτολογικό και ιατρικό ιστορικό. Σωματομετρικοί, κλινικοί και βιοχημικοί δείκτες. Ιατρικές εκδόσεις ΠΧ Πασχαλίδη. Αθήνα 2006
199. [Miller SA, Dykes DD et al.](#) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215
200. Carlson CS, Eberle MA et al. [Selecting a maximally informative set of single-nucleotide polymorphisms for association analyses using linkage disequilibrium.](#) *Am J Hum Genet* 2004;74(1):106-20
201. Purcell S, Neale B et al. [PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses.](#) *Am J Hum Genet* 2007
202. Trichopoulou A, Bamia C et al. Mediterranean diet and survival among patients with coronary heart disease in Greece. *Arch Int Med* 2005; 165: 929–35
203. Panagiotakos DB, Pitsavos 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. *Eur J Pub Health* 2002; 1: 7–11
204. Pitsavos C, Panagiotakos DB et al. The benefits from Mediterranean diet on the risk of developing acute coronary syndromes in hypercholesterolemic subjects: a case-control study, (CARDIO2000). *Coron Artery Dis* 2002; 13: 295–300
205. Pitsavos C, Panagiotakos DB 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. *J Hum Hypertens* 2002; 16: 517–24
206. Pitsavos C, Panagiotakos DB et al. The adoption of Mediterranean diet attenuates the development of acute coronary syndromes in people with the metabolic syndrome. *Nutr J* 2003; 3: 9
207. B-Rao C. Sample Size Considerations in Genetic Polymorphism Studies. *Hum Hered* 2001;52(4): 191-200

- 208.** Ioannidis JP, Ntzani EE et al. Replication validity of genetic association studies. *Nat Genet* 2001;29(3):306-9