



# **ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ**

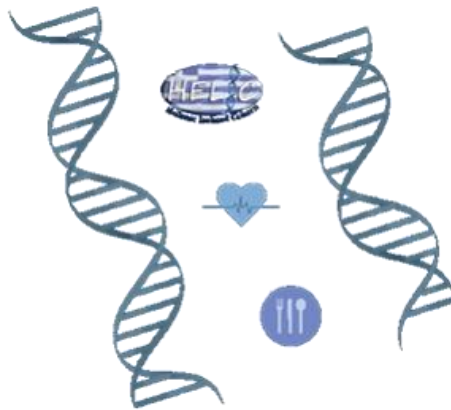
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ**

## **Καρδιομεταβολικοί δείκτες: Γενετική προδιάθεση και περιβαλλοντική επίδραση**

Διδακτορική Διατριβή

**Αλίκη-Ελένη Φαρμάκη**



Αθήνα, 2017



# **ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ**

Η Διδακτορική Διατριβή εξετάστηκε από την κάτωθι Επταμελή Επιτροπή:

**Γεώργιος Δεδούσης**

**Καθηγητής Κυτταρικής και Μοριακής Βιολογίας του Ανθρώπου, Τμήμα  
Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο (Επιβλέπων)**

**Εμμανουήλ Καναβάκης**

**Ομότιμος Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών**

**Φωτεινή Σκοπούλη**

**Ομότιμη Καθηγήτρια Παθολογίας-Ανοσολογίας, Τμήμα Επιστήμης  
Διαιτολογίας-Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο**

**Δημοσθένης Παναγιωτάκος**

**Καθηγητής Βιοστατιστικής - Επιδημιολογίας της Διατροφής, Τμήμα Επιστήμης  
Διαιτολογίας-Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο**

**Γιάννης Μανιός**

**Αναπληρωτής Καθηγητής Διατροφικής Αγωγής και Αξιολόγησης, Τμήμα  
Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο**

**Ανδριάννα Καλιώρα**

**Επίκουρη Καθηγήτρια στη Διατροφή του Ανθρώπου και Τρόφιμα, Τμήμα  
Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο**

**Γεώργιος Παπανικολάου**

**Λέκτορας στην Παθοφυσιολογία - Γενετική του Ανθρώπου, Τμήμα Επιστήμης  
Διαιτολογίας-Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο**

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το τμήμα Επιστήμης  
Διαιτολογίας-Διατροφής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου δεν  
υποδηλώνει και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα.



Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε με υποτροφία του Κοινοφελούς Ιδρύματος Αλέξανδρος Σ. Ωνάσης (GZI 049 /2012-2013)

Μέρος της παρούσας διδακτορικής διατριβής συγχρηματοδοτήθηκε μέσω του Έργου «Υποτροφίες ΙΚΥ» από πόρους του ΕΠ «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση», του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου (ΕΚΤ) του ΕΣΠΑ, 2007-2013-ΠΕ2-SHORT TERMS-18338



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ  
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

Η Αλίκη-Ελένη Φαρμάκη δηλώνω υπεύθυνα ότι:

- 1)** Είμαι ο κάτοχος των πνευματικών δικαιωμάτων της πρωτότυπης αυτής εργασίας και από όσο γνωρίζω η εργασία μου δε συκοφαντεί πρόσωπα, ούτε προσβάλει τα πνευματικά δικαιώματα τρίτων.
- 2)** Αποδέχομαι ότι η ΒΚΠ μπορεί, χωρίς να αλλάξει το περιεχόμενο της εργασίας μου, να τη διαθέσει σε ηλεκτρονική μορφή μέσα από τη ψηφιακή Βιβλιοθήκη της, να την αντιγράψει σε οποιοδήποτε μέσο ή/και σε οποιοδήποτε μορφότυπο καθώς και να κρατά περισσότερα από ένα αντίγραφα για λόγους συντήρησης και ασφάλειας.

Ἐν οἶδα ὅτι ουδέν οἶδα

**-Σωκράτης**

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα της διατριβής μου, Καθηγητή Γεώργιο Δεδούση, για την ευκαιρία που μου έδωσε και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε να αναλάβω την εκπόνηση αυτής της διδακτορικής διατριβής και να την φέρω εις πέρας υπό την συνεχή καθοδήγηση και υποστήριξή του όλα αυτά τα χρόνια.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Ομότιμη Καθηγήτρια Φ.Σκοπούλη για την συνεργασία και για τις χρήσιμες συμβουλές και παρατηρήσεις της, καθώς και τον Ομότιμο Καθηγητή Ε.Καναβάκη για την τιμή που μου έκανε, όπως και τα υπόλοιπα μέλη της Επταμελούς Επιτροπής Καθηγητή Δ.Παναγιωτάκο, Αναπληρωτή Καθηγητή Γ.Μανιό, Επίκουρη Καθηγήτρια Α.Καλιώρα και τον Λέκτορα Γ.Παπανικολάου.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στην Ελευθερία Ζεγγίνη, Group Leader of Analytical Genomics of Complex Traits Group, και στα μέλη της ομάδας της για την φιλοξενία και την εκπαίδευση στην διαχείριση και στατιστική ανάλυση γενετικών δεδομένων που μου παρείχαν στο Wellcome Trust Sanger Institute, καθώς και την συνεχή βοήθεια και καθοδήγησή της.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω τις Δρ Ιωάννα Ντάλλα και Δρ Μελίνα Δημητρίου και υποψήφιες διδάκτορες Έφη (Ευθυμία) Κατσαρέλη, Χαρά Αμερικάνου και Νάνα Καλαφάτη για την συνεργασία αλλά και την φιλία τους.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον σύντροφό μου Θάνο και τις φίλες μου Λένα και Στέλλα, με την τελευταία να επιμελείται το εξώφυλλο της παρούσας διατριβής, που ήταν δίπλα μου με υπομονή και συγκατάβαση, παρέχοντάς μου την αμέριστη συμπαράσταση και πολύτιμη υποστήριξή τους.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ αρμόζει στην οικογένειά μου, τους γονείς μου Βάγια και Κώστα και τον αδερφό μου Σταύρο, χωρίς την συνεχή και ανιδιοτελή τους υποστήριξη και ενίσχυση, τόσο ηθική όσο και οικονομική, η εκπόνηση αυτής της διατριβής θα ήταν κάτι ουτοπικό.

## α. Πίνακας περιεχομένων

|                                                                                     |          |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| α. Πίνακας περιεχομένων .....                                                       | ix       |
| β. Περίληψη .....                                                                   | xii      |
| γ. Abstract .....                                                                   | xiv      |
| δ. Κατάλογος εικόνων .....                                                          | xvi      |
| ε. Κατάλογος πινάκων .....                                                          | xxii     |
| στ. Συντομογραφίες .....                                                            | xxiv     |
| <b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....</b>                                                            | <b>1</b> |
| 1.1. ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ .....                                                   | 1        |
| 1.1.1. Επιδημιολογικά στοιχεία .....                                                | 2        |
| 1.1.2. Μεταβολικό Σύνδρομο .....                                                    | 3        |
| 1.1.2.1. Ορισμοί του Μεταβολικού Συνδρόμου .....                                    | 4        |
| 1.1.2.2. Επιπολασμός του Μεταβολικού Συνδρόμου .....                                | 6        |
| 1.1.2.3. Παθοφυσιολογία του Μεταβολικού Συνδρόμου .....                             | 7        |
| 1.1.2.4. Μεταβολικό Σύνδρομο και Καρδιαγγειακή Νόσος .....                          | 8        |
| 1.1.3. Καρδιομεταβολικοί παράγοντες κινδύνου .....                                  | 10       |
| 1.1.3.1. Κύριοι τροποποιησιμοι παράγοντες κινδύνου .....                            | 11       |
| 1.1.3.1.1. Αυξημένη αρτηριακή πίεση .....                                           | 11       |
| 1.1.3.1.2. Διαταραχή λιπιδίων: αθηρογόνος δυσλιπιδαιμία .....                       | 12       |
| 1.1.3.1.3. Παχυσαρκία .....                                                         | 14       |
| 1.1.3.1.3.1. Δείκτης Μάζας Σώματος .....                                            | 16       |
| 1.1.3.1.3.2. Περιφέρεια μέσης .....                                                 | 18       |
| 1.1.3.1.3.3. Λόγος περιφέρειας μέσης/περιφέρεια ισχίων .....                        | 20       |
| 1.1.3.1.3.4. Λόγος περιφέρειας μέσης/ ύψος .....                                    | 20       |
| 1.1.3.1.4. Σακχαρώδης Διαβήτης II .....                                             | 21       |
| 1.1.3.1.5. Χρήση καπνού .....                                                       | 22       |
| 1.1.3.1.6. Μη υγιεινή διατροφή .....                                                | 22       |
| 1.1.3.1.7. Μειωμένη φυσική δραστηριότητα .....                                      | 23       |
| 1.1.3.2. Άλλοι τροποποιησιμοι παράγοντες κινδύνου .....                             | 23       |
| 1.1.3.2.1. Χαμηλό κοινωνικό-οικονομικό επίπεδο .....                                | 23       |
| 1.1.3.2.2. Χρήση αλκοόλ .....                                                       | 23       |
| 1.1.3.3. Μη τροποποιησιμοι παράγοντες κινδύνου .....                                | 24       |
| 1.1.3.3.1. Αυξανόμενη ηλικία .....                                                  | 24       |
| 1.1.3.3.2. Οικογενειακό ιστορικό .....                                              | 24       |
| 1.1.3.3.3. Φύλο .....                                                               | 24       |
| 1.1.3.3.4. Εθνικότητα και φυλή .....                                                | 25       |
| 1.1.3.4. Νέοι παράγοντες κινδύνου .....                                             | 25       |
| 1.1.3.4.1. Φλεγμονή .....                                                           | 25       |
| 1.1.3.4.2. Διαταραχή πήξης αίματος .....                                            | 27       |
| 1.2. ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ: ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΤΡΟΠΟΣ ΖΩΗΣ .....                     | 28       |
| 1.2.1. Καρδιομεταβολικοί δείκτες και διατροφή .....                                 | 28       |
| 1.2.1.1. Διατροφικά πρότυπα .....                                                   | 32       |
| 1.2.1.1.1. Εκ των προτέρων διατροφικά πρότυπα .....                                 | 34       |
| 1.2.1.1.2. Εκ των υστέρων διατροφικά πρότυπα .....                                  | 37       |
| 1.3. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΡΟΔΙΑΘΕΣΗ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ .....                             | 39       |
| 1.3.1. Μελέτες υποψήφιων γονιδίων .....                                             | 40       |
| 1.3.2. Μελέτες σάρωσης του γονιδιώματος .....                                       | 41       |
| 1.4. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ-ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΗΝ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΗ ΝΟΣΟ ..... | 44       |
| 1.5. ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΟΙ ΠΛΗΘΥΣΜΟΙ .....                                          | 50       |
| 1.5.1. Νόμος Hardy-Weinberg .....                                                   | 50       |
| 1.5.2. Παράγοντες που διαφοροποιούν τις γονιδιακές συχνότητες .....                 | 51       |
| 1.5.2.1. Μη τυχαίες διασταυρώσεις .....                                             | 52       |

|                                                                                                                                   |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 1.5.2.2. Τυχαία γενετική παρέκκλιση .....                                                                                         | 52         |
| 1.5.2.3. Στρωμάτωση.....                                                                                                          | 53         |
| 1.5.2.4. Αρχή του ιδρυτή .....                                                                                                    | 53         |
| 1.5.2.5. Συγγένεια εξ αίματος .....                                                                                               | 54         |
| 1.5.3. Παραδείγματα απομονωμένων πληθυσμών .....                                                                                  | 54         |
| 1.5.4. Πλεονεκτήματα απομονωμένων πληθυσμών .....                                                                                 | 57         |
| 1.5.5. Ανισορροπία σύνδεσης.....                                                                                                  | 59         |
| 1.5.6. Μελέτες σάρωσης γονιδιώματος σε απομονωμένους πληθυσμούς.....                                                              | 61         |
| 1.6. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....                                                                                                      | 64         |
| <b>2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....</b>                                                                                                        | <b>66</b>  |
| 2.1. ΠΛΗΘΥΣΜΟΙ ΚΑΙ ΔΕΙΓΜΑ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ .....                                                                                       | 66         |
| 2.1.1. Ο πληθυσμός του Ορεινού Μυλοποτάμου.....                                                                                   | 66         |
| 2.1.1.1. Δήμος Ανωγείων.....                                                                                                      | 66         |
| 2.1.1.2. Δήμος Μυλοποτάμου.....                                                                                                   | 67         |
| 2.1.1.3. Κοινότητα Ζωνιανών .....                                                                                                 | 68         |
| 2.1.2. Ο πληθυσμός των Πομάκων .....                                                                                              | 68         |
| 2.1.2.1. Η προέλευση της λέξης «Πομάκος» .....                                                                                    | 68         |
| 2.1.2.2. Η καταγωγή και η γλώσσα των Πομάκων .....                                                                                | 69         |
| 2.1.3. Δείγμα της Μελέτης.....                                                                                                    | 69         |
| 2.2. ΑΝΘΡΩΠΟΜΕΤΡΙΑ .....                                                                                                          | 70         |
| 2.2.1. Βάρος, Ύψος και ΔΜΣ.....                                                                                                   | 71         |
| 2.2.2. Περιφέρειες .....                                                                                                          | 72         |
| 2.3. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΔΙΑΙΤΗΤΙΚΗΣ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ, ΦΥΣΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΤΡΟΠΟΥ ΖΩΗΣ.....                                                | 73         |
| 2.3.1. Διαιτητική πρόσληψη .....                                                                                                  | 73         |
| 2.3.2. Φυσική δραστηριότητα και τρόπος ζωής .....                                                                                 | 73         |
| 2.4. ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΚΑΙ ΙΑΤΡΙΚΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ .....                                                                              | 74         |
| 2.5. ΜΕΤΡΗΣΗ ΑΡΤΗΡΙΑΚΗΣ ΠΙΕΣΗΣ ΚΑΙ ΑΙΜΟΛΗΨΙΑ .....                                                                                | 74         |
| 2.6. ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ .....                                                                                                   | 75         |
| 2.7. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ .....                                                                                                 | 76         |
| 2.8. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΚΑΙ ΓΟΝΟΤΥΠΗΣΗ .....                                                                              | 76         |
| 2.8.1. Απομόνωση DNA με αυτοματοποιημένο σύστημα.....                                                                             | 76         |
| 2.8.2. Γονοτύπηση.....                                                                                                            | 77         |
| 2.8.3. Ποιοτικός έλεγχος γενετικών δεδομένων.....                                                                                 | 78         |
| 2.8.4. Μετασχηματισμοί φαινοτυπικών δεδομένων για γενετικές αναλύσεις .....                                                       | 79         |
| 2.9. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....                                                                                                      | 80         |
| <b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>                                                                                                       | <b>82</b>  |
| 3.1. ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ .....                                                                                   | 82         |
| 3.2. ΠΕΡΙΓΡΑΦΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΑ ΠΡΟΤΥΠΑ ΤΩΝ ΔΥΟ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΚΑΙ Η ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥΣ ΜΕ ΚΑΡΔΙΟΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΥΣ ΔΕΙΚΤΕΣ ..... | 87         |
| 3.2.1. Πληθυσμός της Ορεινής Κρήτης .....                                                                                         | 87         |
| 3.2.2. Πληθυσμός των Πομάκων.....                                                                                                 | 94         |
| 3.3. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ .....                                                                   | 104        |
| <b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>                                                                                                          | <b>173</b> |
| 4.1 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ .....                                                                                                      | 173        |
| 4.2 ΠΕΡΙΓΡΑΦΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΑ ΠΡΟΤΥΠΑ.....                                                                        | 175        |
| 4.2.1 Κρήτη.....                                                                                                                  | 175        |
| 4.2.2 Πομακοχώρια.....                                                                                                            | 179        |
| 4.3 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ.....                                                                                       | 184        |

|                                                     |            |
|-----------------------------------------------------|------------|
| 4.4 ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....                    | 188        |
| 4.5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΕΙΣ ..... | 190        |
| <b>5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....</b>              | <b>192</b> |
| <b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ .....</b>                              | <b>207</b> |

## β. Περίληψη

Τα Καρδιαγγειακά Νοσήματα αποτελούν την κύρια αιτία πρώιμης θνησιμότητας παγκοσμίως. Οι παράγοντες κινδύνου για καρδιαγγειακά νοσήματα περιλαμβάνουν την υπέρταση, την διαταραχή των λιπιδίων, την παχυσαρκία, την μειωμένη φυσική δραστηριότητα, την μη υγιεινή διατροφή, το κάπνισμα, το φύλο και το γενετικό υπόβαθρο. Οι μελέτες συσχέτισης του γονιδιώματος έχουν εντοπίσει περισσότερες από 100 περιοχές που συσχετίστηκαν με διάφορους καρδιομεταβολικούς δείκτες. Ωστόσο, η επίδραση του καθενός χωριστά ή/και αθροιστικά στον καρδιαγγειακό κίνδυνο είναι μικρή. Για θρησκευτικούς ή γεωγραφικούς λόγους, ένα υποσύνολο του πληθυσμού μπορεί να απομονωθεί, δημιουργώντας μια γενετικά απομονωμένη κοινωνία. Στους απομονωμένους πληθυσμούς μειώνεται η γενετική και η περιβαλλοντική ετερογένεια με αποτέλεσμα οι πληθυσμοί αυτοί να συμβάλλουν στη διερεύνηση του γενετικού υποβάθρου των πολυπαραγοντικών ασθενειών και το μέγεθος του δείγματος που απαιτείται για να επιτευχθούν ικανοποιητικά επίπεδα στατιστικής ισχύος είναι πολύ μικρότερο.

Σκοπός της παρούσας μελέτης που εκπονείται στα πλαίσια της μελέτης HELIC – Hellenic Isolated Cohorts, είναι η διερεύνηση της επίδρασης διατροφικών και γενετικών παραγόντων καθώς επίσης και των αλληλεπιδράσεών τους σε καρδιομεταβολικούς δείκτες σε δύο απομονωμένους πληθυσμούς.

Είναι μία συγχρονική μελέτη που περιλαμβάνει δύο Ελληνικούς πληθυσμούς: 1,553 άτομα (55.8% γυναίκες) από τα γεωγραφικά απομονωμένα χωριά του Μυλοποτάμου στο Όρος Ίδη, Κρήτη και 1,702 άτομα (69.9% γυναίκες) από τα Πομακοχώρια στις παρυφές της οροσειράς της Ροδόπης, Ξάνθη. Καταγράφηκαν ανθρωπομετρικά, βιοχημικά και κλινικά δεδομένα μαζί με την συμπλήρωση εκτεταμένου ερωτηματολογίου με παραμέτρους υγείας και τρόπου ζωής. Τα διατροφικά πρότυπα προέκυψαν από ανάλυση σε κύριες συνιστώσες με βάση ένα ερωτηματολόγιο συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων. Πραγματοποιήθηκε σάρωση του γονιδιώματος με τη χρήση των Illumina Human OmniExpress και Exome BeadChips στο ερευνητικό κέντρο Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, UK. Ακολούθησε διερεύνηση των επιδράσεων των διατροφικών προτύπων και οι αλληλεπιδράσεις τους με γενετικούς παράγοντες σε καρδιομεταβολικούς δείκτες.

Οι δύο πληθυσμοί ταυτοποιήθηκαν ως γενετικά απομονωμένοι. Το 82.5% του πληθυσμού των Κρητικών ήταν υπέρβαροι ή παχύσαρκοι με στατιστικά σημαντική διαφορά στα ποσοστά μεταξύ υπέρβαρων ανδρών και γυναικών (43.4% vs 34.7%,  $p=0.002$ ). Μεγαλύτερη συμμόρφωση στο τοπικό διατροφικό πρότυπο σχετιζόταν με υψηλότερα επίπεδα γλυκόζης ( $\beta=4.026$ ,  $p<0.001$ ), ενώ μεγαλύτερη συμμόρφωση στο πρότυπο του καφενείου σχετιζόταν με υψηλότερο λόγο περιφέρειας μέσης προς περιφέρεια ισχίου ( $\beta=0.012$ ,  $p<0.001$ ), αρτηριακή πίεση ( $\beta=1.015$ ,  $p=0.005$ ) και ολική χοληστερόλη ( $\beta=5.398$ ,  $p<0.001$ ).

Το 67% του πληθυσμού των Πομάκων ήταν υπέρβαροι ή παχύσαρκοι με στατιστικά σημαντική διαφορά στην επίπτωση της παχυσαρκίας μεταξύ ανδρών και γυναικών (17.5% vs 37.5%,

$p < 0.001$ ). Μεγαλύτερη συμμόρφωση στο πρότυπο υψηλής περιεκτικότητας σε απλά σάκχαρα σχετιζόταν με αυξημένο κίνδυνο για χαμηλή HDL (high density lipoprotein) (ΣΛ1.84,  $p = 0.003$ ), για συστολική και διαστολική υπέρταση (ΣΛ2.40,  $p = 0.002$  και ΣΛ2.61,  $p < 0.001$ , αντίστοιχα) και για υπεργλυκαιμία (ΣΛ1.85,  $p = 0.018$ ).

Η αλληλεπίδραση 9 πολυμορφισμών με τα διατροφικά πρότυπα ήταν σημαντική στους εκάστοτε καρδιομεταβολικούς δείκτες και επαληθεύτηκε και στους δύο πληθυσμούς. Η επίδραση του κάθε πολυμορφισμού στον εκάστοτε καρδιομεταβολικό φαινότυπο ήταν θετική στα άτομα που είχαν μεγαλύτερη προσκόλληση στο υπό διερεύνηση ανθυγιεινό πρότυπο και αρνητική στα άτομα που είχαν χαμηλότερη.

Η διαλεύκανση της σχέσης του γενετικού υποβάθρου με τους διατροφικούς και άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες μέσω της συνδυαστικής μελέτης των αλληλεπιδράσεων τους στον καρδιαγγειακό κίνδυνο ίσως συμβάλει στην καλύτερη κατανόηση και ως εκ τούτου την πρόληψη των καρδιαγγειακών νοσημάτων.

**Λέξεις κλειδιά:** Διατροφικά πρότυπα, Καρδιαγγειακός κίνδυνος, Απομονωμένοι πληθυσμοί, Αλληλεπιδράσεις γονιδίων-διατροφής, HELIC

## ***γ. Abstract***

Cardiovascular disease is the number one cause of death globally. Risk factors associated with cardiovascular disease include age, sex, ethnicity, family history, unhealthy diet, physical inactivity, smoking, alcohol consumption, obesity, hypertension, dyslipidaemia, impaired glucose and insulin metabolism. In addition to environmental effects, a strong genetic component has also been shown to contribute to cardiometabolic risk. Genome-wide association studies have identified more than 100 regions to be associated with several cardiometabolic indices, but with small effect size.

A subgroup of the population could be isolated for religious or geographical reasons. Isolated founder populations provide an attractive alternative for the study of complex traits due to their genetic and environmental homogeneity, simplifying the genetic background of any trait and the sample size required to achieve statistical power is lower.

The aim of this thesis which is taking place in the frames of HELIC Study – Hellenic Isolated Cohorts is the investigation of the effects of the genetic and dietary factors and their interaction on cardiometabolic indices in two isolated populations.

A cross-sectional study that includes two Greek populations: 1,553 subjects (55.8% women) from the geographically isolated Mylopotamos villages on Mount Idi, Crete and 1,702 subjects (69.9% women) from the Pomak villages on the selvages of Rhodope massif, Xanthi. Anthropometric, biochemical and clinical measurements were taken in addition to interview-based completion of an extensive questionnaire on health and lifestyle parameters. Dietary patterns were derived through principal component analysis based on a validated food-frequency questionnaire. Genotyping performed using Illumina Human OmniExpress and Exome BeadChips in Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, UK. The effects of the dietary patterns and their interactions with the genetic factors on cardiometabolic indices were studied.

Both populations established as genetic isolates. 82.5% of the Cretan population were overweight or obese with a significantly different prevalence between overweight men and women (43.4% vs 34.7%,  $p=0.002$ ). Subjects more adherent to the “local” dietary pattern presented higher levels of blood glucose ( $\beta=4.026$ ,  $p<0.001$ ) and subjects with higher compliance with the “Greek café-tavern” pattern found to have higher waist to hip ratio ( $\beta=0.012$ ,  $p<0.001$ ), blood pressure ( $\beta=1.015$ ,  $p=0.005$ ) and cholesterol ( $\beta=5.398$ ,  $p<0.001$ ) levels.

67% of the Pomak population were overweight or obese with a significantly different prevalence between obese men and women (17.5% vs 37.5%,  $p= p<0.001$ ). Higher compliance to “high in sugars” dietary pattern was associated with increased risk of low HDL (OR 1.84,  $p=0.003$ ), systolic and diastolic hypertension (OR 2.40,  $p=0.002$  and OR 2.61,  $p=3.1E-04$ , respectively) and hyperglycemia (OR 1.85,  $p=0.018$ ), compared to lower compliance.

The interaction of 9 polymorphisms with the unhealthy dietary patterns was significant on the corresponding cardiometabolic indices and replicated in both populations. The effect of each polymorphism on the corresponding cardiometabolic phenotype was positive in the high compliance to the unhealthy dietary pattern group and negative in the low compliance group.

Unravelling the relationship of the genetic background with dietary and other environmental factors via the study of their interactions could contribute to a better understanding and presumably to the prevention of cardiovascular disease.

**Keywords:** Dietary patterns, Cardiovascular risk, Isolated populations, Gene-diet interactions, HELIC

## δ. Κατάλογος εικόνων

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Εικόνα 1.1. Η παραδοσιακή πυραμίδα της Μεσογειακής διατροφής.....                                                                                                                                                                                                                                                                                | 35  |
| Εικόνα 1.2. Ευρήματα δημοσιευμένων μελετών σάρωσης του γονιδιώματος: περιοχές του γονιδιώματος που συσχετίστηκαν με 17 κατηγορίες φαινοτύπων σε επίπεδο σημαντικότητας $p \leq 5 * 10^{-8}$ (2012-2013) .....                                                                                                                                    | 42  |
| Εικόνα 3.1 Γράφημα πολυδιάστατης κλίμακας των HELIC-MANOLIS, HELIC-Pomak και TEENAGE σε συνδυασμό με τους πληθυσμούς από το 1000 Genomes Project .....                                                                                                                                                                                           | 82  |
| Εικόνα 3.10 Γραφήματα Manhattan των αποτελεσμάτων της αλληλεπίδρασης των πολυμορφισμών με τα διατροφικά πρότυπα πάνω-αριστερά: «καφενείου», πάνω-δεξιά: «τοπικό», κάτω-αριστερά: «ελαιόλαδο, φρούτα και λαχανικά», και κάτω-δεξιά: «υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος και απλά σάκχαρα», στην περιφέρεια μέσης στα άτομα της μελέτης MANOLIS. .... | 110 |
| Εικόνα 3.11 Γραφήματα Manhattan των αποτελεσμάτων της αλληλεπίδρασης των πολυμορφισμών με τα διατροφικά πρότυπα πάνω-αριστερά: «ισορροπημένο», πάνω-δεξιά: «σπιτικό», κάτω-αριστερά: «γρήγορο φαγητό» και κάτω-δεξιά: «υψηλής περιεκτικότητας σε απλά σάκχαρα», στον ΔΜΣ στα άτομα της μελέτης POMAK. ....                                       | 111 |
| Εικόνα 3.12 Γραφήματα Manhattan των αποτελεσμάτων της αλληλεπίδρασης των πολυμορφισμών με τα διατροφικά πρότυπα πάνω-αριστερά: «ισορροπημένο», πάνω-δεξιά: «σπιτικό», κάτω-αριστερά: «γρήγορο φαγητό» και κάτω-δεξιά: «υψηλής περιεκτικότητας σε απλά σάκχαρα», στην ολική χοληστερόλη άτομα της μελέτης POMAK. ....                             | 112 |
| Εικόνα 3.13 Γραφήματα Manhattan των αποτελεσμάτων της αλληλεπίδρασης των πολυμορφισμών με τα διατροφικά πρότυπα πάνω-αριστερά: «ισορροπημένο», πάνω-δεξιά: «σπιτικό», κάτω-αριστερά: «γρήγορο φαγητό» και κάτω-δεξιά: «υψηλής περιεκτικότητας σε απλά σάκχαρα», στην διαστολική πίεση στα άτομα της μελέτης POMAK. ....                          | 113 |
| Εικόνα 3.14 Γραφήματα Manhattan των αποτελεσμάτων της αλληλεπίδρασης των πολυμορφισμών με τα διατροφικά πρότυπα πάνω-αριστερά: «ισορροπημένο», πάνω-δεξιά: «σπιτικό», κάτω-αριστερά: «γρήγορο φαγητό» και κάτω-δεξιά: «υψηλής περιεκτικότητας σε απλά σάκχαρα», στην HDL χοληστερόλη στα άτομα της μελέτης POMAK.....                            | 114 |
| Εικόνα 3.15 Γραφήματα Manhattan των αποτελεσμάτων της αλληλεπίδρασης των πολυμορφισμών με τα διατροφικά πρότυπα πάνω-αριστερά: «ισορροπημένο», πάνω-δεξιά: «σπιτικό», κάτω-αριστερά: «γρήγορο φαγητό» και κάτω-δεξιά: «υψηλής περιεκτικότητας σε απλά σάκχαρα», στην συστολική πίεση στα άτομα της μελέτης POMAK. ....                           | 115 |
| Εικόνα 3.16 Γραφήματα Manhattan των αποτελεσμάτων της αλληλεπίδρασης των πολυμορφισμών με τα διατροφικά πρότυπα πάνω-αριστερά: «ισορροπημένο», πάνω-δεξιά: «σπιτικό», κάτω-αριστερά: «γρήγορο φαγητό» και κάτω-δεξιά: «υψηλής περιεκτικότητας σε απλά σάκχαρα», στην περιφέρεια μέσης στα άτομα της μελέτης POMAK.....                           | 116 |
| Εικόνα 3.17 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs407206 ΕΠΑΝΩ-με το τοπικό διατροφικό πρότυπο στην ΔΑΠ στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το σπιτικό διατροφικό πρότυπο στον ΔΜΣ στα άτομα του POMAK.....                                                                                                           | 120 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Εικόνα 3.18 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs1927595 ΕΠΑΝΩ-με το τοπικό διατροφικό πρότυπο στην ΣΑΠ στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το σπιτικό διατροφικό πρότυπο στον ΔΜΣ στα άτομα του POMAK.....                                                          | 121 |
| Εικόνα 3.19 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs9859538 ΕΠΑΝΩ-με το διατροφικό πρότυπο καφενείου στην ολική χοληστερόλη στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το σπιτικό διατροφικό πρότυπο στην ΣΑΠ στα άτομα του POMAK.....                                         | 122 |
| Εικόνα 3.2 Γράφημα πολυδιάστατης κλίμακας των χωριών HELIC-MANOLIS, χωριών HELIC-Pomak και TEENAGE. ....                                                                                                                                                                                         | 83  |
| Εικόνα 3.20 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs6874544 ΕΠΑΝΩ-με το τοπικό διατροφικό πρότυπο στην περιφέρεια μέσης στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το σπιτικό διατροφικό πρότυπο στην ΔΑΠ στα άτομα του POMAK. ....                                            | 124 |
| Εικόνα 3.21 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs7725672 ΕΠΑΝΩ-με το τοπικό διατροφικό πρότυπο στην περιφέρεια μέσης στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το σπιτικό διατροφικό πρότυπο στην ΔΑΠ στα άτομα του POMAK. ....                                            | 124 |
| Εικόνα 3.22 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs154055 ΕΠΑΝΩ-με το υψηλής περιεκτικότητας σε απλά σάκχαρα και λίπος διατροφικό πρότυπο στην ΣΑΠ στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το γρήγορο διατροφικό πρότυπο στον ΔΜΣ στα άτομα του POMAK. ....                | 125 |
| Εικόνα 3.23 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs2143682 ΕΠΑΝΩ-με το τοπικό διατροφικό πρότυπο στην περιφέρεια μέσης στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το σπιτικό διατροφικό πρότυπο στην ΔΑΠ στα άτομα του POMAK. ....                                            | 126 |
| Εικόνα 3.24 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs735072 ΕΠΑΝΩ-με το τοπικό διατροφικό πρότυπο στην περιφέρεια μέσης στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το σπιτικό διατροφικό πρότυπο στην ΔΑΠ στα άτομα του POMAK. ....                                             | 127 |
| Εικόνα 3.25 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs7991183 ΕΠΑΝΩ-με το τοπικό διατροφικό πρότυπο στην περιφέρεια μέσης στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το σπιτικό διατροφικό πρότυπο στην ολική χοληστερόλη στα άτομα του POMAK. ....                              | 128 |
| Εικόνα 3.26 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs11752174 ΕΠΑΝΩ-με το τοπικό διατροφικό πρότυπο στον ΔΜΣ στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το σπιτικό διατροφικό πρότυπο στην ολική χοληστερόλη στα άτομα του POMAK.....                                           | 129 |
| Εικόνα 3.27 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs5756168 ΕΠΑΝΩ-με το διατροφικό πρότυπο καφενείου στον ΔΜΣ στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το γρήγορο διατροφικό πρότυπο στην περιφέρεια μέσης στα άτομα του POMAK....                                           | 130 |
| Εικόνα 3.28 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs2496302 ΕΠΑΝΩ-με το διατροφικό πρότυπο καφενείου στην περιφέρεια μέσης στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το γρήγορο διατροφικό πρότυπο στην ολική χοληστερόλη στα άτομα του POMAK.....                            | 131 |
| Εικόνα 3.29 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs10502926 ΕΠΑΝΩ-με το υψηλής περιεκτικότητας σε απλά σάκχαρα και λίπος διατροφικό πρότυπο στην περιφέρεια μέσης στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το γρήγορο διατροφικό πρότυπο στην ΣΑΠ στα άτομα του POMAK. .... | 132 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Εικόνα 3.3 Ποσοστό των ατόμων με τουλάχιστον ένα κοινό πρόγονο σε κάθε πληθυσμό ...                                                                                                                                                                                                                                                                           | 84  |
| Εικόνα 3.30 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs323078 ΕΠΑΝΩ-με το υψηλής περιεκτικότητας σε απλά σάκχαρα και λίπος διατροφικό πρότυπο στην περιφέρεια μέσης στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το γρήγορο διατροφικό πρότυπο στην ΣΑΠ στα άτομα του POMAK. ....                                                                | 133 |
| Εικόνα 3.31 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs323081 ΕΠΑΝΩ-με το υψηλής περιεκτικότητας σε απλά σάκχαρα και λίπος διατροφικό πρότυπο στην περιφέρεια μέσης στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το γρήγορο διατροφικό πρότυπο στην ΣΑΠ στα άτομα του POMAK. ....                                                                | 134 |
| Εικόνα 3.32 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs274869 ΕΠΑΝΩ-με το διατροφικό πρότυπο καφενείου στην ολική χοληστερόλη στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το σπιτικό διατροφικό πρότυπο στην περιφέρεια μέσης στα άτομα του POMAK. ....                                                                                         | 135 |
| Εικόνα 3.33 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs10519931 ΕΠΑΝΩ-με το υψηλής περιεκτικότητας σε απλά σάκχαρα και λίπος διατροφικό πρότυπο στην ΣΑΠ στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το γρήγορο διατροφικό πρότυπο στην ΣΑΠ στα άτομα του POMAK. ....                                                                           | 136 |
| Εικόνα 3.34 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs11989290 ΕΠΑΝΩ-με το τοπικό διατροφικό πρότυπο στην ΣΑΠ στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το πλούσιο σε απλά σάκχαρα διατροφικό πρότυπο στην HDL στα άτομα του POMAK. ....                                                                                                     | 137 |
| Εικόνα 3.35 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs894932 ΕΠΑΝΩ-με το τοπικό διατροφικό πρότυπο στην ΔΑΠ στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το πλούσιο σε απλά σάκχαρα διατροφικό πρότυπο στην HDL στα άτομα του POMAK. ....                                                                                                       | 138 |
| Εικόνα 3.36 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs7417186 ΕΠΑΝΩ-με το τοπικό διατροφικό πρότυπο στον ΔΜΣ στα άτομα του MANOLIS, ΕΝΔΙΑΜΕΣΑ-με το τοπικό διατροφικό πρότυπο στην περιφέρεια μέσης στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το πλούσιο σε απλά σάκχαρα διατροφικό πρότυπο στην ολική χοληστερόλη στα άτομα του POMAK. .... | 140 |
| Εικόνα 3.37 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs1432963 ΕΠΑΝΩ-με το τοπικό διατροφικό πρότυπο στην ΔΑΠ στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το σπιτικό διατροφικό πρότυπο στην ΣΑΠ στα άτομα του POMAK. ....                                                                                                                      | 141 |
| Εικόνα 3.38 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs4271771 ΕΠΑΝΩ-με το υψηλής περιεκτικότητας σε απλά σάκχαρα και λίπος διατροφικό πρότυπο στην περιφέρεια μέσης στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το πλούσιο σε απλά σάκχαρα διατροφικό πρότυπο στην ολική χοληστερόλη στα άτομα του POMAK. ....                                 | 142 |
| Εικόνα 3.39 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs1998972 ΕΠΑΝΩ-με το διατροφικό πρότυπο καφενείου στον ΔΜΣ στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το γρήγορο διατροφικό πρότυπο στην ολική χοληστερόλη στα άτομα του POMAK. .                                                                                                        | 143 |
| Εικόνα 3.4 Τμήματα ομοζυγίας ανά μελέτη. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 86  |
| Εικόνα 3.40 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs7866466 ΕΠΑΝΩ-με το τοπικό διατροφικό πρότυπο στην ΔΑΠ στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το πλούσιο σε απλά σάκχαρα διατροφικό πρότυπο στην HDL στα άτομα του POMAK. ....                                                                                                      | 144 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Εικόνα 3.41 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs10022110 ΕΠΑΝΩ-με το υψηλής περιεκτικότητας σε απλά σάκχαρα και λίπος διατροφικό πρότυπο στην ΔΑΠ στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το γρήγορο διατροφικό πρότυπο στην ολική χοληστερόλη στα άτομα του POMAK. ....                                  | 145 |
| Εικόνα 3.42 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs12693204 ΕΠΑΝΩ-με το διατροφικό πρότυπο καφενείου στον ΔΜΣ στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το γρήγορο διατροφικό πρότυπο στην ολική χοληστερόλη στα άτομα του POMAK. ....                                                                         | 146 |
| Εικόνα 3.43 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs1534093 ΕΠΑΝΩ-με το υψηλής περιεκτικότητας σε απλά σάκχαρα και λίπος διατροφικό πρότυπο στην ΣΑΠ στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το γρήγορο διατροφικό πρότυπο στην HDL στα άτομα του POMAK. ....                                                 | 148 |
| Εικόνα 3.44 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs8062570 ΕΠΑΝΩ-με το υψηλής περιεκτικότητας σε απλά σάκχαρα και λίπος διατροφικό πρότυπο στον ΔΜΣ στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το σπιτικό διατροφικό πρότυπο στην ΔΑΠ στα άτομα του POMAK. ....                                                 | 149 |
| Εικόνα 3.45 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs2008255 ΕΠΑΝΩ-με το διατροφικό πρότυπο με φρούτα, λαχανικά και ελαιόλαδο στην HDL στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το σπιτικό διατροφικό πρότυπο στην HDL στα άτομα του POMAK. ....                                                                | 150 |
| Εικόνα 3.46 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs726916 ΕΠΑΝΩ-με το τοπικό διατροφικό πρότυπο στην HDL στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το ισορροπημένο διατροφικό πρότυπο στον ΔΜΣ στα άτομα του POMAK. ....                                                                                       | 151 |
| Εικόνα 3.47 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs17067137 ΕΠΑΝΩ-με το υψηλής περιεκτικότητας σε απλά σάκχαρα και λίπος διατροφικό πρότυπο στην περιφέρεια μέσης στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το πλούσιο σε απλά σάκχαρα διατροφικό πρότυπο στην ολική χοληστερόλη στα άτομα του POMAK. ....     | 152 |
| Εικόνα 3.48 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs1561322 ΕΠΑΝΩ-με το υψηλής περιεκτικότητας σε απλά σάκχαρα και λίπος διατροφικό πρότυπο στην ΔΑΠ στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το πλούσιο σε απλά σάκχαρα διατροφικό πρότυπο στην HDL στα άτομα του POMAK. ....                                 | 153 |
| Εικόνα 3.49 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs12928435 ΕΠΑΝΩ-με το υψηλής περιεκτικότητας σε απλά σάκχαρα και λίπος διατροφικό πρότυπο στην ΔΑΠ στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το πλούσιο σε απλά σάκχαρα διατροφικό πρότυπο στην HDL στα άτομα του POMAK. ....                                | 155 |
| Εικόνα 3.5 Γραφήματα Manhattan των αποτελεσμάτων της αλληλεπίδρασης των πολυμορφισμών με τα διατροφικά πρότυπα πάνω-αριστερά: «καφενείου», πάνω-δεξιά: «τοπικό», κάτω-αριστερά: «ελαιόλαδο, φρούτα και λαχανικά», και κάτω-δεξιά: «υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος και απλά σάκχαρα», στον ΔΜΣ στα άτομα της μελέτης MANOLIS. .... | 105 |
| Εικόνα 3.50 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs2235584 ΕΠΑΝΩ-με το υψηλής περιεκτικότητας σε απλά σάκχαρα και λίπος διατροφικό πρότυπο στην                                                                                                                                                        |     |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| ΔΑΠ στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το γρήγορο διατροφικό πρότυπο στην ΣΑΠ στα άτομα του POMAK. ....                                                                                                                                                                                                                                           | 155 |
| Εικόνα 3.51 Συσχέτιση της προσκόλλησης στο τοπικό διατροφικό πρότυπο με την ΣΑΠ ανά τρεις κατηγορίες (πάνω) και δύο κατηγορίες (κάτω) γονοτύπου για τον πολυμορφισμό rs407206 στα άτομα της μελέτης MANOLIS. ....                                                                                                                                | 156 |
| Εικόνα 3.52 Συσχέτιση της προσκόλλησης στο σπιτικό διατροφικό πρότυπο με τον ΔΜΣ ανά τρεις κατηγορίες (πάνω) και δύο κατηγορίες (κάτω) γονοτύπου για τον πολυμορφισμό rs407206 στα άτομα της μελέτης POMAK. ....                                                                                                                                 | 157 |
| Εικόνα 3.53 Συσχέτιση της προσκόλλησης στο τοπικό διατροφικό πρότυπο με την ΣΑΠ ανά τρεις κατηγορίες (πάνω) και δύο κατηγορίες (κάτω) γονοτύπου για τον πολυμορφισμό rs1927595 στα άτομα της μελέτης MANOLIS. ....                                                                                                                               | 158 |
| Εικόνα 3.54 Συσχέτιση της προσκόλλησης στο σπιτικό διατροφικό πρότυπο με τον ΔΜΣ ανά τρεις κατηγορίες (πάνω) και δύο κατηγορίες (κάτω) γονοτύπου για τον πολυμορφισμό rs1927595 στα άτομα της μελέτης POMAK. ....                                                                                                                                | 159 |
| Εικόνα 3.55 Συσχέτιση της προσκόλλησης στο διατροφικό πρότυπο καφενείου με την ολική χοληστερόλη ανά τρεις κατηγορίες (πάνω) και δύο κατηγορίες (κάτω) γονοτύπου για τον πολυμορφισμό rs9859538 στα άτομα της μελέτης MANOLIS. ....                                                                                                              | 160 |
| Εικόνα 3.56 Συσχέτιση της προσκόλλησης στο σπιτικό διατροφικό πρότυπο με την ΣΑΠ ανά τρεις κατηγορίες (πάνω) και δύο κατηγορίες (κάτω) γονοτύπου για τον πολυμορφισμό rs9859538 στα άτομα της μελέτης POMAK. ....                                                                                                                                | 161 |
| Εικόνα 3.57 Συσχέτιση της προσκόλλησης στο τοπικό διατροφικό πρότυπο με την περιφέρεια μέσης ανά κατηγορία γονοτύπου για τον πολυμορφισμό rs6874544 στα άτομα της μελέτης MANOLIS. ....                                                                                                                                                          | 162 |
| Εικόνα 3.58 Συσχέτιση της προσκόλλησης στο σπιτικό διατροφικό πρότυπο με την ΔΑΠ ανά κατηγορία γονοτύπου για τον πολυμορφισμό rs6874544 στα άτομα της μελέτης POMAK. ....                                                                                                                                                                        | 162 |
| Εικόνα 3.59 Συσχέτιση της προσκόλλησης στο τοπικό διατροφικό πρότυπο με την περιφέρεια μέσης ανά κατηγορία γονοτύπου για τον πολυμορφισμό rs7725672 στα άτομα της μελέτης MANOLIS. ....                                                                                                                                                          | 163 |
| Εικόνα 3.6 Γραφήματα Manhattan των αποτελεσμάτων της αλληλεπίδρασης των πολυμορφισμών με τα διατροφικά πρότυπα πάνω-αριστερά: «καφενείου», πάνω-δεξιά: «τοπικό», κάτω-αριστερά: «ελαιόλαδο, φρούτα και λαχανικά», και κάτω-δεξιά: «υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος και απλά σάκχαρα», στην ολική χοληστερόλη στα άτομα της μελέτης MANOLIS. .... | 106 |
| Εικόνα 3.60 Συσχέτιση της προσκόλλησης στο σπιτικό διατροφικό πρότυπο με την ΣΑΠ ανά κατηγορία γονοτύπου για τον πολυμορφισμό rs7725672 στα άτομα της μελέτης POMAK. ....                                                                                                                                                                        | 163 |
| Εικόνα 3.61 Συσχέτιση της προσκόλλησης στο τοπικό διατροφικό πρότυπο με την περιφέρεια μέσης ανά τρεις κατηγορίες (πάνω) και δύο κατηγορίες (κάτω) γονοτύπου για τον πολυμορφισμό rs2143682 στα άτομα της μελέτης MANOLIS. ....                                                                                                                  | 164 |
| Εικόνα 3.62 Συσχέτιση της προσκόλλησης στο σπιτικό διατροφικό πρότυπο με την ΔΑΠ ανά τρεις κατηγορίες (πάνω) και δύο κατηγορίες (κάτω) γονοτύπου για τον πολυμορφισμό rs2143682 στα άτομα της μελέτης POMAK. ....                                                                                                                                | 165 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Εικόνα 3.63 Συσχέτιση της προσκόλλησης στο τοπικό διατροφικό πρότυπο με την περιφέρεια μέσης ανά τρεις κατηγορίες (πάνω) και δύο κατηγορίες (κάτω) γονοτύπου για τον πολυμορφισμό rs735072 στα άτομα της μελέτης MANOLIS. ....                                                                                                                  | 166 |
| Εικόνα 3.64 Συσχέτιση της προσκόλλησης στο σπιτικό διατροφικό πρότυπο με την ΔΑΠ ανά τρεις κατηγορίες (πάνω) και δύο κατηγορίες (κάτω) γονοτύπου για τον πολυμορφισμό rs735072 στα άτομα της μελέτης POMAK. ....                                                                                                                                | 167 |
| Εικόνα 3.65 Συσχέτιση της προσκόλλησης στο τοπικό διατροφικό πρότυπο με την περιφέρεια μέσης ανά τρεις κατηγορίες (πάνω) και δύο κατηγορίες (κάτω) γονοτύπου για τον πολυμορφισμό rs7991183 στα άτομα της μελέτης MANOLIS. ....                                                                                                                 | 168 |
| Εικόνα 3.66 Συσχέτιση της προσκόλλησης στο σπιτικό διατροφικό πρότυπο με την ολική χοληστερόλη ανά τρεις κατηγορίες (πάνω) και δύο κατηγορίες (κάτω) γονοτύπου για τον πολυμορφισμό rs7991183 στα άτομα της μελέτης POMAK. ....                                                                                                                 | 169 |
| Εικόνα 3.67 Συσχέτιση της προσκόλλησης στο τοπικό διατροφικό πρότυπο με τον ΔΜΣ ανά τρεις κατηγορίες (πάνω) και δύο κατηγορίες (κάτω) γονοτύπου για τον πολυμορφισμό rs11752174 στα άτομα της μελέτης MANOLIS. ....                                                                                                                             | 170 |
| Εικόνα 3.68 Συσχέτιση της προσκόλλησης στο σπιτικό διατροφικό πρότυπο με την ολική χοληστερόλη ανά τρεις κατηγορίες (πάνω) και δύο κατηγορίες (κάτω) γονοτύπου για τον πολυμορφισμό rs11752174 στα άτομα της μελέτης POMAK. ....                                                                                                                | 171 |
| Εικόνα 3.7 Γραφήματα Manhattan των αποτελεσμάτων της αλληλεπίδρασης των πολυμορφισμών με τα διατροφικά πρότυπα πάνω-αριστερά: «καφενείου», πάνω-δεξιά: «τοπικό», κάτω-αριστερά: «ελαιόλαδο, φρούτα και λαχανικά», και κάτω-δεξιά: «υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος και απλά σάκχαρα», στην διαστολική πίεση στα άτομα της μελέτης MANOLIS. .... | 107 |
| Εικόνα 3.8 Γραφήματα Manhattan των αποτελεσμάτων της αλληλεπίδρασης των πολυμορφισμών με τα διατροφικά πρότυπα πάνω-αριστερά: «καφενείου», πάνω-δεξιά: «τοπικό», κάτω-αριστερά: «ελαιόλαδο, φρούτα και λαχανικά», και κάτω-δεξιά: «υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος και απλά σάκχαρα», στην HDL χοληστερόλη στα άτομα της μελέτης MANOLIS. ....  | 108 |
| Εικόνα 3.9 Γραφήματα Manhattan των αποτελεσμάτων της αλληλεπίδρασης των πολυμορφισμών με τα διατροφικά πρότυπα πάνω-αριστερά: «καφενείου», πάνω-δεξιά: «τοπικό», κάτω-αριστερά: «ελαιόλαδο, φρούτα και λαχανικά», και κάτω-δεξιά: «υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος και απλά σάκχαρα», στην συστολική πίεση στα άτομα της μελέτης MANOLIS. ....  | 109 |

## **ε. Κατάλογος πινάκων**

- Πίνακας 1.1. Κατηγοριοποίηση παραγόντων κινδύνου για καρδιαγγειακές παθήσεις., 11
- Πίνακας 1.2. Κατηγοριοποίηση των ενηλίκων ανάλογα με το Δείκτη Μάζας Σώματος και σχέση με τον κίνδυνο νοσηρότητας από χρόνια νοσήματα, 17
- Πίνακας 1.3. Όρια για μετρήσεις περιφέρειας μέσης και πηλίκου περιφέρειας μέσης προς περιφέρεια ισχίων που υποδηλώνουν κίνδυνο για την εμφάνιση μεταβολικών διαταραχών που σχετίζονται με την παχυσαρκία, 19
- Πίνακας 3.1. Ανθρωπομετρικά, κλινικά και διατροφικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού ανά φύλο, 87
- Πίνακας 3.10. Συντελεστές συσχέτισης που προέκυψαν από την ανάλυση σε κύριες συνιστώσες που διεξήχθη με διατροφικές μεταβλητές, 98
- Πίνακας 3.11. Βιοχημικές αναλύσεις ανά διατροφικό πρότυπο, 100
- Πίνακας 3.12. Αποτελέσματα της πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης για την αξιολόγηση της συσχέτισης των διατροφικών προτύπων με καρδιομεταβολικούς δείκτες, 101
- Πίνακας 3.13. Αποτελέσματα λογαριθμικής παλινδρόμησης για την διερεύνηση της συσχέτισης των τριτημορίων των διατροφικών προτύπων με τις παθολογικές ομάδες καρδιομεταβολικών δεικτών, 103
- Πίνακας 3.14. Συντελεστές συσχέτισης ( $r$ ) καρδιομεταβολικών δεικτών στον πληθυσμό MANOLIS, 117
- Πίνακας 3.15. Συντελεστές συσχέτισης ( $r$ ) καρδιομεταβολικών δεικτών στον πληθυσμό ΡΟΜΑΚ, 117
- Πίνακας 3.16. Οι πολυμορφισμοί που φάνηκαν να αλληλεπιδρούν με τα εκάστοτε διατροφικά πρότυπα στους αντίστοιχους καρδιομεταβολικούς φαινότυπους και στους δύο πληθυσμούς, 118
- Πίνακας 3.17. Αλληλεπιδράσεις των κοινών μεταξύ των δύο πληθυσμών πολυμορφισμών με τα εκάστοτε διατροφικά πρότυπα στους αντίστοιχους καρδιομεταβολικούς φαινότυπους, 119
- Πίνακας 3.18. Συσχέτιση των πολυμορφισμών με τους αντίστοιχους καρδιομεταβολικούς δείκτες ανά κατηγορία προσκόλλησης στο εκάστοτε διατροφικό πρότυπο για τους δύο πληθυσμούς της μελέτης, 172
- Πίνακας 3.2. Οι ασθένειες με τον μεγαλύτερο επιπολασμό στον πληθυσμό ανά φύλο, 88
- Πίνακας 3.3. Κοινωνικοδημογραφικά και χαρακτηριστικά του τρόπου ζωής του πληθυσμού ανά φύλο, 89
- Πίνακας 3.4. Συντελεστές συσχέτισης που προέκυψαν από την ανάλυση σε κύριες συνιστώσες που διεξήχθη με διατροφικές μεταβλητές, 90
- Πίνακας 3.5. Βιοχημικές αναλύσεις ανά διατροφικό πρότυπο, 92
- Πίνακας 3.6. Αποτελέσματα της πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης για την αξιολόγηση της συσχέτισης των διατροφικών προτύπων με καρδιομεταβολικούς δείκτες, 93
- Πίνακας 3.7. Ανθρωπομετρικά, κλινικά και διατροφικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού ανά φύλο, 95
- Πίνακας 3.8. Οι ασθένειες με τον μεγαλύτερο επιπολασμό στον πληθυσμό ανά φύλο, 96

Πίνακας 3.9. Κοινωνικοδημογραφικά και χαρακτηριστικά του τρόπου ζωής του πληθυσμού ανά φύλο, 97

## στ. Συντομογραφίες

|         |                                                              |
|---------|--------------------------------------------------------------|
| ΑΕΕ     | Αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο                                |
| ΑΠ      | Αρτηριακή πίεση                                              |
| ΔΑΠ     | Διαστολική αρτηριακή πίεση                                   |
| ΔΜΣ     | Δείκτης μάζας σώματος                                        |
| ΚΝ      | Καρδιαγγειακά Νοσήματα/Καρδιαγγειακή Νόσος                   |
| ΜΣ      | Μεταβολικό Σύνδρομο                                          |
| ΠΟΥ     | Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας                                 |
| ΣΑΠ     | Συστολική αρτηριακή πίεση                                    |
| ΣΔ      | Σακχαρώδης Διαβήτης                                          |
|         |                                                              |
| ADA     | American Diabetes Association                                |
| DASH    | Dietary Approaches to Stop Hypertension                      |
| EPIC    | European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition |
| FTO     | Fat Mass and Obesity gene                                    |
| GHRAS   | Greek Health Randomized Aging Study                          |
| GWAS    | Genome-Wide Association Studies                              |
| HDL     | High density lipoprotein                                     |
| HELIC   | Hellenic Isolated Cohorts                                    |
| IDF     | International Diabetes Federatiouv                           |
| LDL     | Low density lipoprotein                                      |
| MANOLIS | Minoan Isolates                                              |
| NCEP    | National Cholesterol Education Program                       |
| PCA     | Principal component analysis                                 |
| rNCEP   | revised NCEP                                                 |
| ROH     | Runs of homozygosity                                         |
| SNP     | Single nucleotide polymorphisms                              |

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι κύριες αιτίες θανάτου και νοσηρότητας σε παγκόσμιο επίπεδο είναι οι μη μεταδιδόμενες πολυπαραγοντικές ασθένειες, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται η καρδιαγγειακή νόσος, ο Σακχαρώδης Διαβήτης (ΣΔ), ο καρκίνος, οι ψυχικές νόσοι και οι χρόνιες αναπνευστικές ασθένειες. Το 2008 από τα συνολικά 57 εκατομμύρια θανάτων παγκοσμίως, οι μη μεταδιδόμενες ασθένειες ευθύνονταν σχεδόν για τα 36 εκατομμύρια, από τα οποία τα 17 εκατομμύρια θανάτων αποδίδονται στην ΚΝ. Επομένως, η πρόληψη των μη μεταδιδόμενων πολυπαραγοντικών ασθενειών αποτελεί μία σπουδαία πρόκληση για την παγκόσμια δημόσια υγεία ((WHO) 2008b).

## 1.1. Καρδιαγγειακά Νοσήματα

Τα Καρδιαγγειακά Νοσήματα (ΚΝ) αποτελούν την κύρια αιτία πρώιμης θνησιμότητας στους περισσότερους ευρωπαϊκούς πληθυσμούς και χαρακτηρίζονται από ένα ευρύ φάσμα διαταραχών, που προσβάλλουν την καρδιά και τα αιμοφόρα αγγεία, περιλαμβάνοντας ένα σύνολο παθήσεων όπως, η αθηροσκλήρωση, η στεφανιαία νόσος, τα αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια (ΑΕΕ), το έμφραγμα του μυοκαρδίου, η συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια, οι αρρυθμίες και η κολπική μαρμαρυγή. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι συχνότερες διαταραχές είναι η στεφανιαία νόσος και το ΑΕΕ. Η στεφανιαία νόσος προκαλείται από στένωση των στεφανιαίων αιμοφόρων αγγείων, που αιματώνουν τον καρδιακό μυ, με αποτέλεσμα τη δημιουργία αθηρωματικών πλακών. Το ΑΕΕ αποτελεί τη διαταραχή της εγκεφαλικής αιματικής κυκλοφορίας. Μπορεί να προκληθεί είτε από διακοπή της αιματικής ροής του εγκεφάλου (ισχαιμικό επεισόδιο), είτε από ρήξη των εγκεφαλικών αγγείων (αιμορραγικό επεισόδιο) ((WHO) 2004; (NIH) 2005).

### 1.1.1. Επιδημιολογικά στοιχεία

Τα ΚΝ αποτελούν την πρώτη αιτία θανάτου παγκοσμίως. Υπολογίζεται ότι περίπου 17,3 εκατομμύρια άνθρωποι πέθαναν από ΚΝ το 2008, που αποτελεί το 30% όλων των θανάτων παγκοσμίως, με τα λοιμώδη νοσήματα και τον υποσιτισμό να κατέχουν, πλέον, τη δεύτερη θέση.

Υπολογίζεται ότι μέχρι το 2030, η ΚΝ και το ΑΕΕ θα γίνουν οι κύριες αιτίες θανάτου και αναπηρίας σε όλο τον κόσμο, με τον αριθμό των θανάτων να προβλέπεται ότι θα αυξηθεί στα 25 εκατομμύρια ετησίως ((WHO) Updated January 2015).

Στην Ευρώπη, η ΚΝ είναι η κύρια αιτία θανάτου, καθώς ευθύνεται περίπου για 4,3 εκατομμύρια θανάτους ετησίως, δηλαδή το 48% όλων των θανάτων. Από αυτούς το 54% αφορά σε γυναίκες και το 43% σε άνδρες και παρουσιάζεται υψηλότερη θνησιμότητα μεταξύ ατόμων χαμηλότερου κοινωνικοοικονομικού επιπέδου.

Κάθε χρόνο, στη στεφανιαία νόσο αποδίδεται περίπου το 50% αυτών των θανάτων, (1,92 εκατομμύρια θάνατοι), ενώ σχεδόν το 1/3 αποδίδεται στα ΑΕΕ (1,24 εκατομμύρια θάνατοι).

Στην Ευρωπαϊκή Ένωση η ΚΝ ευθύνεται για 2 εκατομμύρια θανάτους ετησίως με τη στεφανιαία νόσο να αποτελεί τη συχνότερη αιτία θανάτου. Το ΑΕΕ είναι η δεύτερη συχνότερη αιτία θνησιμότητας στην Ευρωπαϊκή Ένωση. Ένας στους δέκα άνδρες (11%) και μία στις έξι γυναίκες (17%), χάνουν τη ζωή τους από ΑΕΕ στην Ευρωπαϊκή Ένωση (GROUP 2008 edition ).

Συγκριτικά με τα δεδομένα του 2005, γενικά παρατηρείται ότι η θνησιμότητα και η επίπτωση της ΚΝ παρουσιάζουν μείωση στις περισσότερες χώρες της Βόρειας, Νότιας και Δυτικής Ευρώπης, αλλά στις χώρες της Κεντρικής και Ανατολικής Ευρώπης είτε αυξάνονται, είτε μειώνονται αλλά με βραδύτερο ρυθμό. Στις χώρες αυτές είναι γενικά υψηλότερα και τα ποσοστά θνησιμότητας από στεφανιαία νόσο και ΑΕΕ. Επίσης, σε ορισμένες χώρες, μεταξύ των οποίων και η Ελλάδα, η ΚΝ ευθύνεται για περισσότερο από το 50% των θανάτων στο γυναικείο πληθυσμό (GROUP 2008 edition ).

Στην Ελλάδα, σύμφωνα με την Εθνική Στατιστική Υπηρεσία (Διαχρονικές σειρές (2000-2005)) το 2003 περίπου το 49% του συνόλου των θανάτων οφειλόταν σε καρδιαγγειακές παθήσεις με τα ΑΕΕ να αποτελούν την πρώτη αιτία θανάτου και να ευθύνονται για το 17,5% του συνόλου των

θανάτων και τη στεφανιαία νόσο να αποτελεί την τρίτη αιτία θανάτου και να ευθύνεται για το 13,3%.

### **1.1.2. Μεταβολικό Σύνδρομο**

Το Μεταβολικό Σύνδρομο (ΜΣ) αποτελείται από ένα σύνολο μεταβολικών διαταραχών όπως η κεντρικού τύπου παχυσαρκία, η δυσλιπιδαιμία, η αντίσταση στην ινσουλίνη, η δυσανοχή στην γλυκόζη και η υπέρταση, οι οποίες αυξάνουν τον κίνδυνο για ΚΝ (ALBERTI AND ZIMMET 1998; 2001; ALBERTI *et al.* 2005). Έτσι το ΜΣ χαρακτηρίζεται ως ένας πολυδιάστατος παράγοντας κινδύνου ΚΝ (GRUNDY 2007) με την υποκείμενη παθοφυσιολογία του να σχετίζεται κυρίως με την αντίσταση στην ινσουλίνη (ALBERTI AND ZIMMET 1998; KAHN *et al.* 2005; RITCHIE AND CONNELL 2007; MALITA *et al.* 2010).

Ήδη το 1923 ο Kylin περιέγραψε ένα σύνδρομο με χαρακτηριστικά την υπέρταση, την υπεργλυκαιμία και την υπερουριχαιμία. Το 1940, ο Vague επισήμανε ότι η «ανδρικού τύπου» παχυσαρκία ήταν ο τύπος παχυσαρκίας που σχετιζόταν ισχυρότερα με μεταβολικές ανωμαλίες συνδεδεμένες με τον ΣΔ ΙΙ και την ΚΝ. Στη συνέχεια, το 1965, κατά τη ετήσια συνάντηση της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τη μελέτη του ΣΔ, περιεγράφηκε ξανά ένα σύνδρομο που συνδύαζε την υπέρταση, την υπεργλυκαιμία και την παχυσαρκία (AVOGARO 1965).

Το 1988 ο Reaven εισήγαγε τον όρο «Σύνδρομο Χ» για να περιγράψει τη συνάθροιση παραγόντων κινδύνου για τον ΣΔ και την ΚΝ. Σύμφωνα με τον Reaven, η αντίσταση στην ινσουλίνη και η συνεπακόλουθη υπερινσουλιναιμία προδιαθέτουν τους ασθενείς για υπέρταση, υπερλιπιδαιμία και ΣΔ ΙΙ και έτσι η συσσώρευση αυτή συσχετίζεται με την ΚΝ. Αν και η παχυσαρκία δεν περιλαμβανόταν αρχικά στις διαταραχές που συνδέονταν με την αντίσταση στην ινσουλίνη, ο Reaven αναγνώρισε ότι και αυτή σχετιζόταν με την ινσουλινοαντίσταση ή την υπερινσουλιναιμία και πως η προφανής θεραπεία του συνδρόμου ήταν η διατήρηση φυσιολογικού βάρους ή η απώλεια βάρους και η αύξηση φυσικής δραστηριότητας (REAVEN 1988). Το 1989 ο Kaplan έδωσε στο σύνδρομο την ονομασία «The Deadly Quartet» (KAPLAN 1989).

Το 1998 ο Αμερικανικός Διαβητολογικός Σύλλογος (American Diabetes Association–ADA) ανέφερε ότι το σύνδρομο χαρακτηρίζεται από δυσανοχή στη γλυκόζη, κεντρική παχυσαρκία, δυσλιπιδαιμία, δηλαδή υψηλά επίπεδα τριγλυκεριδίων, μειωμένα επίπεδα λιποπρωτεΐνης υψηλής πυκνότητας (HDL) και αυξημένα επίπεδα των μικρών πυκνών LDL σωματιδίων (sdLDL), υπέρταση, αυξημένους προθρομβωτικούς και αντιϊνωδολυτικούς παράγοντες και κίνδυνο για αθηρωματική αγγειακή νόσο, χωρίς ωστόσο να προτείνει συγκεκριμένο ορισμό ή όρια για τις τιμές των διαταραχών αυτών.

Πλέον ο όρος ΜΣ έχει επικρατήσει ως ο πιο χρήσιμος και ευρέως αποδεκτός για την περιγραφή της συνάθροισης των μεταβολικών παραγόντων κινδύνου που σχετίζονται με την ΚΝ.

#### *1.1.2.1. Ορισμοί του Μεταβολικού Συνδρόμου*

Αρκετοί οργανισμοί έχουν προτείνει διαφορετικούς ορισμούς σε ότι αφορά τα κλινικά κριτήρια για τον προσδιορισμό του συνδρόμου, αν και υπάρχει ταύτιση για τα βασικά χαρακτηριστικά, δηλαδή την παχυσαρκία, την αντίσταση στην ινσουλίνη, τη δυσλιπιδαιμία και την υπέρταση. Οι ορισμοί αυτοί στοχεύουν στην αναγνώριση ατόμων που βρίσκονται σε υψηλό κίνδυνο για ΚΝ πέρα από τους παραδοσιακούς καρδιαγγειακούς παράγοντες κινδύνου.

Για παράδειγμα, κάποιοι από τους οργανισμούς που έχουν θεσπίσει κριτήρια για το σύνδρομο είναι ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ), το Εθνικό Πρόγραμμα Επιμόρφωσης για τη χοληστερόλη των ΗΠΑ (National Cholesterol Education Program, NCEP) και το Διεθνές Ίδρυμα για το Διαβήτη (International Diabetes Federation, IDF).

Ο ΠΟΥ δίνει ιδιαίτερη έμφαση στην αντίσταση στην ινσουλίνη για τον καθορισμό του συνδρόμου. Έτσι, απαραίτητο κριτήριο είναι η δυσανοχή στη γλυκόζη, η διαταραχή ανοχής γλυκόζης ή ο ΣΔ ΙΙ και/ ή η ινσουλινοαντίσταση και τουλάχιστον δύο από τα παρακάτω κριτήρια:

Λόγος περιφέρειας μέσης/ ισχίων : > 0.90 στους άνδρες και > 0.85 στις γυναίκες ή / και BMI > 30 kg/m<sup>2</sup>

Τριγλυκερίδια ορού : ≥ 150 mg/ dl ( ή ≥ 1.7 mmol/l) ή HDL χοληστερόλη < 0.9 mmol/l (35 mg/ dl) στους άνδρες και < 1.0 mmol/l (39 mg/ dl) στις γυναίκες

Αυξημένη αρτηριακή πίεση : ≥ 140/90 mmHg

Μικροαλβουμινουρία:  $\geq 20 \mu\text{g}/\text{min}$  ή λόγος αλβουμίνης/ κρεατινίνης  $\geq 30 \text{ mg}/\text{g}$

Το 2001 η τρίτη αναφορά της Αμερικανικής Επιτροπής Ειδικών (Adult Treatment Panel, ATP III) του Εθνικού Προγράμματος Επιμόρφωσης για τη χοληστερόλη (NCEP) όρισε ως κριτήρια για το ΜΣ την ύπαρξη τριών ή περισσότερων από τους ακόλουθους πέντε καρδιαγγειακούς παράγοντες κινδύνου:

Κεντρική παχυσαρκία: (περιφέρεια μέσης  $> 102 \text{ cm}$  στους άνδρες και  $> 88 \text{ cm}$  στις γυναίκες)

Αυξημένα τριγλυκερίδια: ( $\geq 150 \text{ mg}/\text{dl}$ )

Μειωμένη HDL χοληστερόλη: ( $< 40 \text{ mg}/\text{dl}$  στους άνδρες και  $< 50 \text{ mg}/\text{dl}$  στις γυναίκες)

Αυξημένη αρτηριακή πίεση: ( $\geq 130/85 \text{ mm Hg}$ )

Αυξημένη γλυκόζη νηστείας: ( $\geq 110 \text{ mg}/\text{dl}$ )

Το 2004 ο ορισμός του NCEP αναθεωρήθηκε (revised NCEP: rNCEP) χαμηλώνοντας το όριο για τη γλυκόζη νηστείας στα  $100 \text{ mg}/\text{dl}$  (δηλαδή σε  $5,6 \text{ mmol}/\text{l}$ ) σε συμφωνία με τα κριτήρια του Αμερικάνικου Διαβητολογικού Συλλόγου για την διαταραγμένη γλυκόζη νηστείας. Επίσης, στον αναθεωρημένο ορισμό του NCEP τα όρια για την κεντρική παχυσαρκία μειώθηκαν από  $>102 \text{ cm}$  στους άνδρες και  $>88 \text{ cm}$  στις γυναίκες σε μεγαλύτερα ή ίσα με αυτές τις τιμές. Τέλος, ο rNCEP ορισμός περιλαμβάνει ασθενείς που υποβάλλονται σε θεραπεία για δυσλιπιδαιμία, υπεργλυκαιμία ή υπέρταση.

Ο αρχικός ορισμός του Διεθνούς Ιδρύματος για το Διαβήτη είχε ως προ-απαιτούμενο την κεντρική παχυσαρκία. Από το 2009 όμως, η κεντρική παχυσαρκία αποτελεί ένα από τα κριτήρια κι έτσι για τον ορισμό του συνδρόμου θα πρέπει να ισχύουν τρία από τα πέντε παρακάτω κριτήρια:

Κεντρική παχυσαρκία: περιφέρεια μέσης ειδική ανάλογα με την εθνικότητα

Αυξημένα τριγλυκερίδια:  $\geq 1.7 \text{ mmol}/\text{l}$  ( $150 \text{ mg}/\text{dl}$ ) ή ειδική φαρμακευτική αγωγή για αυτήν την λιπιδαιμική διαταραχή

Μειωμένη HDL χοληστερόλη:  $< 1.03 \text{ mmol}/\text{l}$  ( $40 \text{ mg}/\text{dl}$ ) στους άνδρες  $< 1.29 \text{ mmol}/\text{l}$  ( $50 \text{ mg}/\text{dl}$ ) στις γυναίκες ή ειδική φαρμακευτική αγωγή για αυτήν την λιπιδαιμική διαταραχή

Αυξημένη αρτηριακή πίεση: συστολική  $\geq 130$  mm Hg ή διαστολική  $\geq 85$  mm Hg ή θεραπευτική αγωγή για προηγούμενα διαγνωσμένη υπέρταση

Αυξημένη γλυκόζη νηστείας: γλυκόζη νηστείας :  $\geq 5.6$  mmol/l (100 mg/dl) ή προηγούμενα διαγνωσμένος ΣΔ τύπου II

Στην περίπτωση που η γλυκόζη νηστείας είναι  $>5.6$  mmol/l ή 100 mg/dl, συστήνεται η Δοκιμασία Ανοχής στη Γλυκόζη, χωρίς να είναι απαραίτητο για να καθοριστεί η παρουσία του συνδρόμου.

Οι κυριότερες δυσκολίες σχετικά με τον ορισμό του συνδρόμου είναι από τη μια εάν θα θεωρείται προαπαιτούμενο η αντίσταση στην ινσουλίνη ή εάν θα είναι απλά ένα από όλα τα κριτήρια και από την άλλη εάν θα πρέπει να χρησιμοποιείται ο λόγος περιφέρειας μέσης/ισχίου που προτείνει ο ΠΟΥ ως τρόπο υπολογισμού της σχετικής συγκέντρωσης λιπώδους ιστού.

Παρόλα αυτά, είναι αναγκαία η επικράτηση ενός απλού ορισμού που θα αποτελέσει διαγνωστικό εργαλείο για την κλινική πρακτική και θα μπορεί να χρησιμοποιηθεί εύκολα σε κάθε χώρα από οποιονδήποτε ειδικό, ώστε να αναγνωριστούν οι ασθενείς που βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο για να αναπτύξουν ΚΝ ή ΣΔ τύπου II. Ένας τέτοιος ορισμός θα επιτρέψει επίσης να συγκριθεί ο επιπολασμός του ΜΣ σε διαφορετικούς πληθυσμούς αλλά και να διερευνηθεί περισσότερο η σχέση του με διάφορες κλινικές καταστάσεις.

#### **1.1.2.2. Επιπολασμός του Μεταβολικού Συνδρόμου**

Ο επιπολασμός του ΜΣ στον ενήλικο πληθυσμό διαφέρει ανάλογα με τα διαγνωστικά κριτήρια που επιλέγονται κάθε φορά, ενώ εξαρτάται από τη σύνθεση του εκάστοτε υπό μελέτη πληθυσμού, δηλαδή από το φύλο, την ηλικία και την εθνικότητα, αλλά και από συνήθειες του τρόπου ζωής και την κοινωνικο-οικονομική κατάσταση. Ο επιπολασμός του ΜΣ αυξάνεται παράλληλα με την αύξηση της παχυσαρκίας (CORNIER *et al.* 2008).

Στις ΗΠΑ, σύμφωνα με τον ορισμό του NCEP-ATP III, έχει υπολογιστεί πως περίπου το 30% του πληθυσμού πληροί τα κριτήρια για ΜΣ (ERVIN 2009), ενώ στην Ευρώπη φτάνει το 15% (HU *et al.* 2004). Ο επιπολασμός του ΜΣ αυξάνεται επίσης ραγδαία στον αναπτυσσόμενο κόσμο, όπως στην Ανατολική Ασία και την Κίνα (MISRA AND KHURANA 2008). Στις χώρες της Μεσογείου ο επιπολασμός του ΜΣ υπολογίζεται στο 25% στην Ιταλία (MAGI *et al.* 2005) και 17% στην Ισπανία (MARTINEZ-LARRAD *et al.* 2005). Στην Ελλάδα, η μελέτη ΑΤΤΙΚΗ αναφέρει επίπτωση του ΜΣ 25%

μεταξύ των ανδρών και 15% μεταξύ των γυναικών (PANAGIOTAKOS *et al.* 2004b) και η μελέτη MeS-Greece, 24% και 23%, αντίστοιχα (ATHYROS *et al.* 2005).

### 1.1.2.3. Παθοφυσιολογία του Μεταβολικού Συνδρόμου

Η αιτιολογία του ΜΣ είναι σύνθετη και καθορίζεται από την αλληλεπίδραση τόσο γενετικών όσο και περιβαλλοντικών παραγόντων. Σύμφωνα με τον Reaven, η παθογένεση του συνδρόμου, συνυφασμένη με τον υποκείμενο μηχανισμό της ινσουλινοαντίστασης, συνδεόταν με την αλληλεπίδραση ανάμεσα στην καθιστική ζωή, τη διατροφή και τους γενετικούς παράγοντες.

Οι ορισμοί του ΠΟΥ και της Ευρωπαϊκής Ομάδας για τη μελέτη της Ινσουλινοαντίστασης (BALKAU AND CHARLES 1999) δίνουν έμφαση στην ινσουλινοαντίσταση ως υποκείμενο μηχανισμό. Η αντίσταση στην ινσουλίνη εξελίσσεται προοδευτικά σε υπερινσουλιναίμια και υπεργλυκαιμία, προκαλώντας με αυτόν τον τρόπο περιφερική αγγειοσυστολή και κατακράτηση νατρίου. Επίσης, αυξάνεται η ηπατική έκκριση των λιποπρωτεϊνών πολύ χαμηλής πυκνότητας οδηγώντας σε υπερτριγλυκεριδαιμία, χαμηλά επίπεδα HDL χοληστερόλης, αυξημένη απολιποπρωτεΐνη Β, αυξημένα μικρά LDL σωματίδια και κατά συνέπεια αθηροσκλήρωση. Ως αποτέλεσμα αυτής της λιπιδαιμικής ανισορροπίας, τα άτομα με ΜΣ βρίσκονται σε μια προ-θρομβωτική και προ-φλεγμονώδη κατάσταση (ONAT *et al.* 2007; ALBERTI *et al.* 2009).

Η παχυσαρκία είναι ένας κυρίαρχος παράγοντας που εμπλέκεται στο σύνδρομο. Η αυξημένη απελευθέρωση μη εστεροποιημένων λιπαρών οξέων προδιαθέτει στην έκτοπη συγκέντρωση λίπους στο ήπαρ, τους μυς και τις αποθήκες του σπλαχνικού λιπώδους ιστού. Σε παχύσαρκα άτομα, ο πλεονάζων λιπώδης ιστός απελευθερώνει μια ποικιλία παραγόντων που οδηγούν στο σύνδρομο, όπως είναι η αντιπονεκτίνη, η λεπτίνη, οι κυτταροκίνες φλεγμονής, ο αναστολέας του ενεργοποιητή πλασμινογόνου (Plasminogen Activator Inhibitor-1, PAI-1), ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων-άλφα (TNF-α), η ρεζιστίνη και το αγγειοτενσινογόνο. Με εξαίρεση την αντιπονεκτίνη, η οποία είναι εξαιρετικά χαμηλή όταν υπάρχει παχυσαρκία, οι υπόλοιποι παράγοντες αυξάνονται. Έρευνες αποδίδουν τις αλλαγές στους παράγοντες αυτούς στην αντίσταση στην ινσουλίνη και τις συσχετίζουν με την εμφάνιση των παραγόντων κινδύνου (SCHERER 2006).

Αν και με τα μέχρι σήμερα δεδομένα δεν είναι εξακριβωμένη η παθοφυσιολογία του συνδρόμου, φαίνεται πως η συνάθροιση των παραγόντων που οδηγούν στην εμφάνισή του

εξαρτάται από την παχυσαρκία και την μεταβολική ευαισθησία του κάθε ατόμου να αναπτύξει το σύνδρομο. Έτσι, όταν ένα άτομο ευαίσθητο αποκτήσει περίσσεια σωματικού λίπους αναπτύσσεται το σύνδρομο. Παράγοντες που προδιαθέτουν στη μεταβολική αυτή ευαισθησία είναι γενετικές ανωμαλίες στο σήμα της ινσουλίνης, διάφορες διαταραχές στο λιπώδη ιστό, μειωμένη φυσική δραστηριότητα, μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, γενετική ποικιλότητα στα άτομα και στα διαφορετικά έθνη, αυξανόμενη ηλικία, ενδοκρινική δυσλειτουργία και κάποια φάρμακα. Πολλοί άνθρωποι με μεταβολική ευαισθησία χαρακτηρίζονται από αντίσταση στην ινσουλίνη. Κάποιοι ασθενείς είναι περισσότερο ευάλωτοι για να αναπτύξουν δυσλιπιδαιμία, άλλοι υπέρταση και άλλοι ΣΔ (GRUNDY 2007).

Άλλοι σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη του ΜΣ είναι η έλλειψη φυσικής δραστηριότητας που μπορεί να οδηγήσει στην παχυσαρκία και έτσι να τροποποιήσει την ευαισθησία των μυών στην ινσουλίνη. Επίσης, η αύξηση της ηλικίας συνοδεύεται συνήθως από απώλεια μυϊκής μάζας και αύξηση σωματικού λίπους, κυρίως στην περιοχή της κοιλιάς, αλλαγές οι οποίες μπορούν να αυξήσουν την αντίσταση στην ινσουλίνη.

Συμπερασματικά, αν και η παθοφυσιολογία του συνδρόμου δεν έχει ακόμη εξακριβωθεί, ανεξάρτητα από τον ορισμό που επιλέγεται κάθε φορά, η αντίσταση στην ινσουλίνη και η παχυσαρκία προβάλλονται ως τα χαρακτηριστικά-κλειδιά του ΜΣ καθώς και τα δύο οδηγούν στην δυσανοχή στη γλυκόζη και στη δυσγλυκαιμία.

#### **1.1.2.4. Μεταβολικό Σύνδρομο και Καρδιαγγειακή Νόσος**

Έρευνες δείχνουν ότι οι ασθενείς με διαγνωσμένο ΜΣ εμφανίζουν αυξημένο επιπολασμό Στεφανιαίας νόσου ή αυξημένο κίνδυνο να αναπτύξουν Στεφανιαία νόσο.

Αρκετές μελέτες υποστηρίζουν ότι το ΜΣ σχετίζεται με σημαντικά αυξημένο κίνδυνο για θνησιμότητα από κάθε αιτία και για θνησιμότητα και νοσηρότητα από ΚΝ, όπως για παράδειγμα η μελέτη Botnia (ISOMAA *et al.* 2001), η μελέτη ARIC (McNEILL *et al.* 2005) και η μελέτη Kuopio Ischemic Heart Disease (LAKKA *et al.* 2002).

Σε πρόσφατη μετα-ανάλυση (MOTTILLO *et al.* 2010) το ΜΣ συσχετίστηκε με δυο φορές αύξηση του κινδύνου για ΚΝ, θνησιμότητα από ΚΝ και ΑΕΕ. Έτσι, οι ασθενείς με ΜΣ βρίσκονταν σε

υψηλότερο κίνδυνο για καρδιαγγειακά συμβάματα. Επίσης, το ΜΣ εξακολούθησε να έχει την προγνωστική του αξία για καρδιαγγειακά συμβάματα απουσία του ΣΔ ΙΙ.

Το ΜΣ εκτός από το ότι προβλέπει την ΚΝ, τη νοσηρότητα και την θνησιμότητα, συσχετίζεται σημαντικά και με την ανάπτυξη του ΣΔ, που αποτελεί από μόνος του έναν ισχυρό παράγοντα κινδύνου για την ΚΝ (FORD 2005). Μελέτες δείχνουν ότι το ΜΣ αυξάνει τον κίνδυνο για ΣΔ ανεξάρτητα από άλλους παράγοντες κινδύνου, όπως η διαταραχή ανοχής γλυκόζης και η γλυκόζη νηστείας (LORENZO *et al.* 2003). Η συσχέτιση αυτή ίσως να οφείλεται στο ότι το ΜΣ πιθανά μέσω της λιπο-τοξικότητας οδηγεί σε δυσλειτουργία των β-κυττάρων του παγκρέατος (CUSI 2010). Ο κίνδυνος για την ανάπτυξη ΣΔ ΙΙ βρέθηκε σημαντικά αυξημένος σε όσους είχαν ΜΣ σε σύγκριση με άτομα που δεν παρουσίαζαν καρδιομεταβολικές ανωμαλίες (FORD *et al.* 2008). Αντίστροφα, σε ασθενείς με ΣΔ ΙΙ το ΜΣ είναι αυξημένο και προβλέπει τόσο τις μικρο-όσο και τις μακρο-αγγειακές επιπλοκές (BIANCHI *et al.* 2008).

Το ΜΣ και συνεπώς η ΚΝ έχει λάβει διαστάσεις επιδημίας ακολουθώντας την παγκόσμια έκρηξη του ΣΔ και της παχυσαρκίας (ZIMMET *et al.* 2001). Ο ΣΔ σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο θανάτου από ΚΝ και υψηλότερη επίπτωση των καρδιαγγειακών (CHIH *et al.* 2012). Το ΜΣ φαίνεται να είναι σπάνιο απουσία πλεονάζοντος σωματικού λίπους (GRUNDY 2007) γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η παχυσαρκία μπορεί να χαρακτηριστεί ως η κυρίαρχη κινητήριος δύναμή του. Η παχυσαρκία σχετίζεται με την συνολική λιπώδη μάζα ενός ατόμου και συνήθως εκτιμάται με μετρήσεις όπως ο δείκτης μάζας σώματος (ΔΜΣ), η περιφέρεια μέσης και ο λόγος της περιφέρειας μέσης προς την περιφέρεια ισχίου. Τα τελευταία σχετίζονται ισχυρότερα με την ποσότητα σπλαχνικού λίπους (κεντρική παχυσαρκία) απ' ό,τι ο ΔΜΣ και θεωρούνται σημαντικοί παράγοντες κινδύνου για ΣΔ (KAMEL *et al.* 2000) και ΚΝ (CAN *et al.* 2009; PALACIOS *et al.* 2011; ASHWELL *et al.* 2012; LI *et al.* 2013). Το ΜΣ ως οντότητα μπορεί να βοηθήσει στην αναγνώριση ατόμων σε κίνδυνο για ΣΔ και ΚΝ (ALBERTI *et al.* 2005; WANNAMETHEE *et al.* 2005; WANNAMETHEE 2008). Για τον λόγο αυτό ο Αμερικανικός Διαβητολογικός Σύλλογος και η Ευρωπαϊκή Ένωση για την Μελέτη του ΣΔ (European Association for the Study of Diabetes–EASD) προσπάθησαν να θέσουν διαγνωστικά κριτήρια και αλγορίθμους όπως το Framingham σκορ ως εργαλεία προσυμπτωματικού ελέγχου για καρδιαγγειακό κίνδυνο (CONROY *et al.* 2003; KAHN *et al.* 2005).

Αν και το ΜΣ απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση σχετικά με τον ορισμό του, την υποκείμενη παθοφυσιολογία, τη διαγνωστική του αξία και την θεραπεία του, υπάρχουν αρκετοί λόγοι που ενισχύουν την κλινική χρησιμότητα του ΜΣ, καθώς αποτελεί έναν απλό τρόπο για να

επιστήσουμε την προσοχή σε ασθενείς που έχουν τον διπλάσιο κίνδυνο για ΚΝ και τον πενταπλάσιο για ΣΔ ΙΙ. Η αναγνώριση ενός παράγοντα σε έναν ασθενή θα πρέπει να τον παρακινήσει στην αναζήτηση κι άλλων παραγόντων. Οι ασθενείς αυτοί αξίζουν ιδιαίτερης προσοχής στην κλινική διαχείριση και παρακολούθηση (GRUNDY *et al.* 2005).

Λαμβάνοντας υπ' όψη όλα τα παραπάνω, οι παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με την ΚΝ και μέρος τους απαρτίζει και το ΜΣ είναι η ηλικία, το φύλο, η εθνικότητα, το οικογενειακό ιστορικό, η ανθυγιεινή διατροφή, η έλλειψη φυσικής δραστηριότητας, το κάπνισμα, η κατανάλωση αλκοόλ, η παχυσαρκία, η υπέρταση, η δυσλιπιδαιμία, ο διαταραγμένος μεταβολισμός γλυκόζης και ινσουλίνης, η προθρομβωτική και προφλεγμονώδης κατάσταση, οι ψυχολογικοί και οι κοινωνικο-οικονομικοί παράγοντες (KAHN *et al.* 2005; GRUNDY 2007).

### **1.1.3. Καρδιομεταβολικοί παράγοντες κινδύνου**

Για να προληφθεί μια ασθένεια είναι απαραίτητο να αναγνωριστούν και να αντιμετωπιστούν οι αιτίες που την προκαλούν. Κάθε παράγοντας κινδύνου έχει κι αυτός τις δικές του αιτίες και έτσι προκύπτει πολύπλοκη αλυσίδα γεγονότων, που αποτελείται από κοινωνικο-οικονομικούς παράγοντες, περιβαλλοντικές και κοινωνικές συνθήκες και ατομικές συμπεριφορές. Επομένως, έχουμε τη δυνατότητα να παρέμβουμε σε πολλά σημεία αυτής της αιτιολογικής αλυσίδας, ώστε να προληφθεί μια ασθένεια.

Οι κύριοι καρδιαγγειακοί παράγοντες κινδύνου πληρούν τρία κριτήρια: εμφανίζουν υψηλό επιπολασμό σε πολλούς πληθυσμούς, έχουν σημαντική ανεξάρτητη επίδραση στον κίνδυνο της νόσου ενώ η θεραπεία και ο έλεγχός τους έχουν ως αποτέλεσμα τη μείωση του κινδύνου. Σύμφωνα με τα στοιχεία του ΠΟΥ, οκτώ παράγοντες κινδύνου ευθύνονται για το 61% των θανάτων από ΚΝ. Οι παράγοντες αυτοί είναι η υψηλή αρτηριακή πίεση, η υψηλή χοληστερόλη, τα υψηλά επίπεδα γλυκόζης, ο υψηλός ΔΜΣ, η χρήση καπνού, η κατανάλωση αλκοόλ, η χαμηλή πρόσληψη φρούτων και λαχανικών και η μειωμένη φυσική δραστηριότητα. Οι παράγοντες αυτοί συνδυασμένοι ευθύνονται για περισσότερο από το 75% της ισχαιμικής καρδιακής νόσου, που αποτελεί την κυρίαρχη αιτία θανάτου παγκοσμίως ((WHO) 2009).

Οι παράγοντες κινδύνου μπορούν να ενταχθούν σε τέσσερις γενικές κατηγορίες με κύριο κριτήριο το κατά πόσο μπορούμε να επέμβουμε στην εκδήλωσή και πρόληψή τους. Έτσι προκύπτουν οι τροποποιήσιμοι παράγοντες, κύριοι και δευτερεύοντες, και οι μη τροποποιήσιμοι παράγοντες, ενώ έχει αναγνωριστεί και μία ομάδα με νέους παράγοντες κινδύνου. Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται μια κατηγοριοποίηση των παραγόντων κινδύνου.

Πίνακας 1.1. Κατηγοριοποίηση παραγόντων κινδύνου για καρδιαγγειακές παθήσεις.

| ΚΥΡΙΟΙ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΙΜΟΙ         | ΑΛΛΟΙ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΙΜΟΙ         | ΜΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΙΜΟΙ     | ΝΕΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ |
|-------------------------------|------------------------------|-----------------------|-----------------|
| Αρτηριακή υπέρταση            | Κοινωνικο-οικονομικό επίπεδο | Αυξανόμενη ηλικία     | Φλεγμονή        |
| Διαταραχή λιπιδίων            | Ψυχική υγεία                 | Οικογενειακό ιστορικό | Πήξη αίματος    |
| Παχυσαρκία                    | Ψυχολογικό στρες             | Φύλο                  | Ομοκυστεΐνη     |
| ΣΔ II                         | Χρήση αλκοόλ                 | Εθνικότητα            |                 |
| Χρήση καπνού                  | Φαρμακευτική αγωγή           |                       |                 |
| Μη υγιεινή διατροφή           | Λιποπρωτεΐνη α               |                       |                 |
| Μειωμένη φυσική δραστηριότητα | Υπέρτροφία αριστερής κοιλίας |                       |                 |

### 1.1.3.1. Κύριοι τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου

#### 1.1.3.1.1. Αυξημένη αρτηριακή πίεση

Αρτηριακή πίεση (ΑΠ) είναι η πίεση που ασκείται από το αίμα στα τοιχώματα των αιμοφόρων αγγείων και είναι μια από τις κύριες ζωτικές λειτουργίες του οργανισμού. Κατά τη διάρκεια κάθε χτύπου της καρδιάς, η ΑΠ κυμαίνεται μεταξύ ενός ανώτατου (συστολική αρτηριακή πίεση-ΣΑΠ) και ενός ελάχιστου ορίου (διαστολική αρτηριακή πίεση-ΔΑΠ). Φυσιολογικά επίπεδα ΑΠ ορίζονται ως ΣΑΠ  $\leq 120$  mm Hg και ΔΑΠ  $\leq 80$  mm Hg. Η υπέρταση αποτελεί έναν σύνθετο φαινότυπο που προκύπτει από διάφορους γενετικούς, περιβαλλοντικούς, συμπεριφοριστικούς ακόμη και κοινωνικούς παράγοντες. Αποτελεί σημαντικό παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη όλων των εκδηλώσεων της ΚΝ, συμπεριλαμβανοντας τη Στεφανιαία νόσο, το ΑΕΕ, την καρδιακή ανεπάρκεια, την αορτική και περιφερική αρτηριακή νόσο και την βαλβιδική καρδιακή νόσο. Η αυξημένη πίεση αίματος συσχετίζεται με την παχυσαρκία και τη δυσανοχή στη γλυκόζη και συνήθως παρατηρείται σε άτομα με ινσουλινοαντίσταση. Η σημασία της σχέσης αυτής διαφέρει σημαντικά ανάλογα με τον πληθυσμό (LANDSBERG *et al.* 2013). Σύμφωνα με στοιχεία του Π.Ο.Υ., υπολογίζεται ότι περισσότερα από το 50% των καρδιαγγειακών επεισοδίων και περίπου το 75% των ΑΕΕ προκαλούνται εξαιτίας αρτηριακής υπέρτασης (SERVICES 2004). Πληθυσμιακές μελέτες στον ευρωπαϊκό χώρο καταδεικνύουν ότι ασθενείς με υπέρταση διατρέχουν διπλάσιο κίνδυνο εμφάνισης ΚΝ, σε σχέση με τους νορμοτασικούς (YUSUF *et al.*

2004). Υπάρχουν αρκετοί παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί που οδηγούν στη σύνδεση αυτή, με την υπέρταση να προκαλεί δυσλειτουργία του ενδοθηλίου, να επιτείνει την αθηρωματική διαδικασία και να συμβάλλει στο να καταστεί η αθηροσκληρωτική πλάκα πιο ασταθής (ESCOBAR 2002).

Στοιχεία υποδηλώνουν μια ισχυρή σχέση μεταξύ της ΑΠ και της στεφανιαίας νόσου, καθώς και της θνησιμότητας από ΚΝ, η οποία είναι γραμμική από επίπεδα 115/75 mm Hg. Συνολικά, για τις ηλικίες 60 - 69 ετών, χαμηλότερη ΣΑΠ, κατά 10 mm Hg, συνδέεται με περίπου ένα πέμπτο χαμηλότερο κίνδυνο εκδήλωσης στεφανιαίας νόσου (LEWINGTON *et al.* 2002). Για τους περισσότερους ενήλικες με υπέρταση, ο στόχος για την ΑΠ θα πρέπει να είναι <140/90 mm Hg, αλλά συνίσταται να είναι σε χαμηλότερα επίπεδα, της τάξεως των 130/80 mm Hg, στους ασθενείς με ΣΔ, χρόνια νεφρική νόσο, γνωστή στεφανιαία αρτηριακή νόσο και ισοδύναμα γνωστής στεφανιαίας νόσου (ROSENDORFF 2007).

#### **1.1.3.1.2. Διαταραχή λιπιδίων: αθηρογόνος δυσλιπιδαιμία**

Το λιπιδαιμικό προφίλ αποτελούν τα τριγλυκερίδια (triglycerides-TG), η ολική χοληστερόλη (total cholesterol-TC), η LDL χοληστερόλη (low density lipoprotein- LDL) και η HDL χοληστερόλη. Η χοληστερόλη μεταφέρεται στον οργανισμό με τη μορφή δύο ειδών λιποπρωτεϊνών, την υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη ή HDL και χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη ή LDL. Η HDL χοληστερόλη δεν προκαλεί αθηροσκλήρωση, αλλά έχει αντιαθηρογόνες ιδιότητες. Αντιθέτως η LDL χοληστερόλη, προκαλεί το σχηματισμό αθηρωματικών πλακών στο εσωτερικό τοίχωμα των αγγείων, κυρίως στεφανιαίων και ΑΕΕ, με αποτέλεσμα την παρακώλυση της αιματικής ροής στην καρδιά και στον εγκέφαλο, αυξάνοντας με αυτόν τον τρόπο τον κίνδυνο εμφάνισης εμφράγματος του μυοκαρδίου και ισχαιμικού ΑΕΕ (NEATON *et al.* 1992). Όπως διατυπώνεται σε πολλές επιδημιολογικές μελέτες, το πρόβλημα αφορά τόσο άνδρες όσο και γυναίκες, παρόλο που οι γυναίκες, προεμμηνοπαυσιακά, έχουν συνολικά μικρότερο κίνδυνο εμφάνισης ΚΝ, διότι προστατεύονται από τα οιστρογόνα τα οποία προκαλούν αύξηση της HDL χοληστερόλης.

Οι ασθενείς με ΜΣ ή ΣΔ II βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο για ΚΝ και μία κύρια αιτία για αυτό είναι η αθηρογόνος δυσλιπιδαιμία. Η δυσλιπιδαιμία αυτή χαρακτηρίζεται από αυξημένα τριγλυκερίδια και μειωμένα επίπεδα της HDL χοληστερόλης. Χαρακτηρίζεται επίσης από

αυξημένη απολιποπρωτεΐνη B (Apo B) και από αύξηση των μικρών και πυκνών LDL σωματιδίων (sdLDL). Όλες αυτές οι διαταραχές είναι αθηρογόνες (CARR AND BRUNZELL 2004).

Τα διαφορετικά επίπεδα λιπιδίων που σχετίζονται με την αθηρογόνο δυσλιπιδαιμία αποτελούν ξεχωριστά και συνολικά παράγοντες κινδύνου για ΚΝ.

Η σχέση μεταξύ των αυξημένων επιπέδων χοληστερόλης του πλάσματος και του καρδιαγγειακού κινδύνου είναι καλά τεκμηριωμένη, με συγκλίνουσες ενδείξεις, συνδέοντας τη μείωση της LDL χοληστερόλης, με μείωση των καρδιαγγειακών επεισοδίων (HOUSLAY *et al.* 2007). Μείωση της ολικής χοληστερόλης του αίματος σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο στεφανιαίας καρδιακής νόσου (coronary heart disease-CHD). Μελέτες παρατήρησης υποδεικνύουν ότι μια μείωση στην ολική χοληστερόλη, κατά 1 mmol/L περίπου, σχετίζεται με ένα τρίτο λιγότερους θανάτους στεφανιαίας νόσου, στη μέση ηλικία, ενώ μείωση της LDL χοληστερόλης, κατά 1 mmol/L, είναι πιθανό να συνδέεται με 40 έως 50% χαμηλότερο κίνδυνο στεφανιαίας νόσου (HUXLEY *et al.* 2002). Η θετική συσχέτιση μεταξύ καρδιαγγειακού κινδύνου και υπερλιπιδαιμίας φαίνεται από το γεγονός ότι αύξηση κατά 10% της ολικής χοληστερόλης στον ορό του αίματος προκαλεί 27% αύξηση στην επίπτωση της στεφανιαίας νόσου (LAW *et al.* 1994). Αντιθέτως, 10% μείωση της ολικής χοληστερόλης συνδέεται με 25% μείωση του κινδύνου εμφάνισης στεφανιαίας νόσου μετά από 5 έτη, ενώ η μείωση της LDL κατά 40mg/dl, συνοδεύεται από μείωση του κινδύνου εμφάνισης στεφανιαίας νόσου κατά 23%, ΑΕΕ κατά 19% και συνολικά ΚΝ κατά 21% (BAIGENT *et al.* 2005). Σημαντική συσχέτιση σημειώνεται μεταξύ της συχνότητας εμφάνισης αθηρωμάτωσης, της HDL χοληστερόλης, καθώς και των επιπέδων των τριγλυκεριδίων. Φάνηκε, μάλιστα, ότι τα τριγλυκερίδια και η HDL χοληστερόλη αποτελούν παράγοντες εξίσου σημαντικούς με την ολική και την LDL χοληστερόλη, όσον αφορά τον στεφανιαίο κίνδυνο (ASSMANN AND SCHULTE 1992). Επιδημιολογικές μελέτες παρέχουν ενδείξεις συσχέτισης των τριγλυκεριδίων και της ανάπτυξης στεφανιαίας νόσου, ανεξάρτητα από την HDL χοληστερόλη (MORRISON AND HOKANSON 2009). Επίσης, υπάρχουν συντριπτικά στοιχεία που αποδεικνύουν ότι τα χαμηλά επίπεδα στο πλάσμα της HDL χοληστερόλης, αποτελούν ένα σημαντικό ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για στεφανιαία νόσο, καθώς μεγάλο ποσοστό των ασθενών, που διατρέχουν κίνδυνο να αναπτύξουν τη νόσο, συνήθως, εμφανίζουν λιπιδαιμικές διαταραχές συμπεριλαμβανομένης και της χαμηλής HDL χοληστερόλης (CHAPMAN *et al.* 2004).

Επιδημιολογικές και κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα χαμηλά επίπεδα της HDL χοληστερόλης αποτελούν ισχυρό ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για ΚΝ και εκτιμάται ότι για κάθε 1mg/dL

αύξησης της HDL χοληστερόλης ο κίνδυνος για ΚΝ μειώνεται κατά 2-3% (GORDON *et al.* 1989). Επίσης, έρευνες δείχνουν ότι τα χαμηλά επίπεδα HDL χοληστερόλης είναι σημαντικός παράγοντας κινδύνου για μελλοντική ΚΝ σε διαβητικούς ασθενείς (TURNER *et al.* 1998).

Παρά κάποιες διαφωνίες που υπάρχουν, τα αυξημένα τριγλυκερίδια, τόσο νηστείας όσο και τα μεταγευματικά, φαίνεται να αποτελούν ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για Στεφανιαία νόσο (NORDESTGAARD *et al.* 2007). Τα στοιχεία δείχνουν πως η συνύπαρξη της χαμηλής HDL χοληστερόλης μαζί με τα αυξημένα τριγλυκερίδια αποτελούν ισχυρό παράγοντα κινδύνου για ΚΝ (JEPPESEN *et al.* 1997).

Αν και ο ρόλος των αυξημένων μικρών πυκνών LDL σωματιδίων ως ανεξάρτητου παράγοντα κινδύνου παραμένει υπό συζήτηση, εν τούτοις σχετίζεται με αύξηση της Στεφανιαίας νόσου (SACKS AND CAMPOS 2003). Τα μικρά και πυκνά LDL σωματίδια είναι περισσότερο αθηρογόνα σε σύγκριση με τα μεγαλύτερα LDL σωματίδια λόγω μεγαλύτερης δυνατότητας εισόδου στον υποενδοθηλιακό χώρο του αρτηριακού τοιχώματος και αυξημένης ικανότητας σύνδεσης με τις πρωτεογλυκάνες του έσω χιτώνα του τοιχώματος των αγγείων. Επιπρόσθετα, τα μικρά και πυκνά LDL σωματίδια υφίστανται ευκολότερα οξείδωση και προσλαμβάνονται με μεγαλύτερο ρυθμό από τα μακροφάγα και συνεπώς επιταχύνουν το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων.

Υπάρχουν επίσης στοιχεία που δείχνουν ότι οι μικρότερες από-B λιποπρωτεΐνες μπορούν να διαπερνούν τα ενδοθηλιακά τοιχώματα πιο εύκολα από τις μεγαλύτερες απολιποπρωτεΐνες της αθηρογόνου αυτής ομάδας. Ωστόσο, όλες οι από-B λιποπρωτεΐνες με πιθανή εξαίρεση τα ενδογενή χυλομικρά είναι αθηρογόνες.

Η θεραπεία της αθηρογόνου δυσλιπιδαιμίας ίσως μπορεί να βοηθήσει στη μείωση του καρδιαγγειακού κινδύνου που συνδέεται με τον αυξημένο επιπολασμό του ΜΣ και του ΣΔ ΙΙ.

#### **1.1.3.1.3. Παχυσαρκία**

Η παχυσαρκία είναι μια σύνθετη κατάσταση με σοβαρές κοινωνικές και ψυχολογικές διαστάσεις, που επηρεάζει ουσιαστικά όλες τις ηλικίες και τις κοινωνικο-οικονομικές ομάδες και απειλεί να κυριεύσει και τις ανεπτυγμένες και τις αναπτυσσόμενες χώρες. Το 2000, ο αριθμός των ενήλικων παχύσαρκων υπολογίστηκε σε πάνω από 300 εκατομμύρια ενώ στις αναπτυσσόμενες χώρες εκτιμάται ότι πάνω από 115 εκατομμύρια άτομα υποφέρουν από

προβλήματα που σχετίζονται με την παχυσαρκία. Η παχυσαρκία θέτει τον πληθυσμό σε μεγάλο κίνδυνο για σοβαρές μη μεταδοτικές ασθένειες σχετικές με τη διατροφή, όπως ο ΣΔ, η ΚΝ, η υπέρταση και κάποιους τύπους καρκίνου. Οι συνέπειες αυτές ποικίλουν από αυξημένο κίνδυνο για πρόωρο θάνατο έως σοβαρές χρόνιες καταστάσεις που μειώνουν την ποιότητα της ζωής ((WHO) 2008a).

Επειδή η παχυσαρκία αποτελεί παράγοντα κινδύνου για τον ΣΔ II και το ΜΣ, η αύξηση στον επιπολασμό της οδηγεί παράλληλα και σε αύξηση των ατόμων που πάσχουν από ΣΔ II και ΜΣ. Δηλαδή, η αυξανόμενη παχυσαρκία οδηγεί αναπόφευκτα σε αύξηση του ΜΣ και του ΣΔ και έτσι καταλήγει σε αύξηση της ΚΝ (GINSBERG AND MACCALLUM 2009).

Η κεντρική παχυσαρκία αποτελεί σημαντικό παράγοντα κινδύνου για ΣΔ II, ΜΣ και ΚΝ (BRAY 2004), καθώς επιδρά ως εξής στις μεταβολικές διαδικασίες:

Το ήπαρ εκτίθεται σε υψηλές συγκεντρώσεις ελεύθερων λιπαρών οξέων, που επηρεάζουν διάφορες ηπατικές μεταβολικές διαδικασίες οδηγώντας σε υπερινσουλιναίμια, δυσανοχή στη γλυκόζη και υπερτριγλυκεριδαιμία.

Αυξάνεται η παραγωγή λιποκυτταροκινών και κυτταροκινών φλεγμονής, οι οποίες συμβάλλουν επίσης στην αντίσταση στην ινσουλίνη, όπως και στην κατάσταση φλεγμονής.

Διαταράσσεται η απομάκρυνση και η αποθήκευση των λιπιδίων, τα οποία συγκεντρώνονται σε συγκεκριμένα όργανα, όπως το ήπαρ, η καρδιά και το πάγκρεας.

Η υπολογιστική και η μαγνητική τομογραφία θεωρούνται οι πιο αξιόπιστες μετρήσεις για τον υπολογισμό της κεντρικής παχυσαρκίας ενώ η διπλής ενέργειας απορροφησιομετρία με ακτίνες Χ (dual-energy X-ray absorptiometry, DEXA) είναι μια αξιόπιστη εναλλακτική. Παρόλα αυτά, σε μεγάλες επιδημιολογικές μελέτες η χρήση τους είναι δύσκολη και έτσι χρησιμοποιούνται πιο απλοί και εύχρηστοι δείκτες, όπως ο ΔΜΣ, η Περιφέρεια Μέσης, ο Λόγος περιφέρειας Μέσης προς περιφέρεια Ισχίου και ο Λόγος περιφέρειας Μέσης προς Ύψος.

Αρκετή συζήτηση γίνεται σχετικά με το ποιος δείκτης παχυσαρκίας είναι ο ισχυρότερος για την πρόβλεψη των καρδιομεταβολικών παραγόντων κινδύνου, η χρήση του οποίου στην κλινική πρακτική και στη δημόσια υγεία θα συμβάλλει στο να αναγνωρίζονται εύκολα όσοι βρίσκονται σε κίνδυνο.

Έχει φανεί ότι σε άτομα εξίσου παχύσαρκα ή υπέρβαρα, εκείνοι που χαρακτηρίζονται από αύξηση κοιλιακού λίπους (όπως υπολογίζεται από την περιφέρεια μέσης) βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο για ΣΔ II και ΚΝ, ανεξάρτητα από τον κίνδυνο που προβλέπεται από τον αυξημένο ΔΜΣ. Ο υπολογισμός της σπλαχνικής παχυσαρκίας με υπολογιστική τομογραφία δείχνει ότι τα άτομα με επιπλέον σπλαχνικό λιπώδη ιστό χαρακτηρίζονται από περισσότερο οξείες αλλαγές στο μεταβολικό τους προφίλ (ΡΟΥΛΙΟΤ *et al.* 1994). Για το λόγο αυτό, οι δείκτες της κεντρικής παχυσαρκίας, δηλαδή η Περιφέρεια Μέσης (Waist Circumference, WC) και ο Λόγος περιφέρειας Μέσης/ περιφέρειας Ισχίων (Waist-to-Hip Ratio, WHR), θεωρούνται πιο ακριβείς συγκριτικά με τον ΔΜΣ για την πρόγνωση του καρδιαγγειακού κινδύνου που σχετίζεται με την παχυσαρκία και έχουν αντικαταστήσει τον ΔΜΣ σε πολλούς ορισμούς για την διάγνωση του ΜΣ (ZIMMET *et al.* 2005).

Σύμφωνα με μια μετα-ανάλυση οι δείκτες κεντρικής παχυσαρκίας και συγκεκριμένα ο Λόγος περιφέρειας Μέσης/Ύψος παρέχει ένα ανώτερο εργαλείο για τη διάκριση του σχετικού με την παχυσαρκία καρδιαγγειακού κινδύνου συγκριτικά με τον ΔΜΣ. Ωστόσο, οι διαφορές στην ικανότητα διάκρισης που παρατηρήθηκαν ανάμεσα στο ΔΜΣ και σε κάθε έναν από τους δείκτες της κεντρικής παχυσαρκίας ήταν μικρές και σε γενικές γραμμές μη στατιστικά σημαντικές (LEE *et al.* 2008).

#### 1.1.3.1.3.1. Δείκτης Μάζας Σώματος

Η ραγδαία αύξηση του επιπολασμού της παχυσαρκίας τις τελευταίες δεκαετίες στην πλειοψηφία των χωρών δυτικού τύπου αλλά και σε αναπτυσσόμενες χώρες σχετίζεται με την αύξηση της εμφάνισης ΚΝ, ΣΔ τύπου 2 και διαφόρων άλλων παθήσεων. Για το λόγο αυτό έχει αναδειχθεί η ανάγκη καθιέρωσης ενός διεθνούς δείκτη που να βασίζεται σε εύκολες και γρήγορες ανθρωπομετρήσεις και να δίνει τη δυνατότητα αξιολόγησης του σωματικού βάρους και των κινδύνων υγείας που εγκυμονεί η αύξησή του ή αντίθετα η πέραν του φυσιολογικού μείωσή του. Τα τελευταία χρόνια έχουν διαμορφωθεί αρκετοί δείκτες βάρους-ύψους (ΜΑΝΙΟΣ).

Ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος δείκτης βάρους-ύψους είναι ο ΔΜΣ και οι αυξημένες τιμές του συσχετίζονται με την εμφάνιση νοσηρότητας και θνησιμότητας (GALLAGHER *et al.* 2000). Ο ΔΜΣ χρησιμοποιείται από τον ΠΟΥ για να ορίσει το βαθμό του υπέρβαρου και της παχυσαρκίας στους πληθυσμούς (2004). Είναι ο δείκτης που έχει χρησιμοποιηθεί περισσότερο στην κλινική

πρακτική και στις επιδημιολογικές μελέτες για να αναγνωριστούν τα άτομα και οι πληθυσμοί που βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο για ΚΝ και άλλες χρόνιες ασθένειες (1998). Υπολογίζεται από τον τύπο  $\text{βάρος(kg)} / [\text{ύψος(m)}]^2$  και εκφράζει την γενική παχυσαρκία. Αν και οι επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν ότι υπάρχει αυξημένος επιπολασμός και επίπτωση του ΣΔ ΙΙ, της δυσλιπιδαιμίας και της ΚΝ όσο αυξάνεται ο ΔΜΣ, υπάρχει αξιοσημείωτη ετερογένεια ανάμεσα σε άτομα με παρόμοιες τιμές του δείκτη.

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα προτεινόμενα όρια από τον ΠΟΥ για την κατηγοριοποίηση των ατόμων σε ελλειποβαρή, φυσιολογικά, υπέρβαρα και παχύσαρκα ανάλογα με το ΔΜΣ. Επίσης στον ίδιο πίνακα φαίνεται και ο κίνδυνος νοσηρότητας για τα διαφορετικά επίπεδα του ΔΜΣ.

Πίνακας 1.2. Κατηγοριοποίηση των ενηλίκων ανάλογα με το Δείκτη Μάζας Σώματος και σχέση με τον κίνδυνο νοσηρότητας από χρόνια νοσήματα (2000)

| ΔΜΣ (kg/m <sup>2</sup> ) | Κατάταξη                          | Κίνδυνος νοσηρότητας  |
|--------------------------|-----------------------------------|-----------------------|
| <18,5                    | Ελλειποβαρές                      | Αυξημένος             |
| 18,5-24,9                | Φυσιολογικό                       | Φυσιολογικός          |
| 25-29,9                  | Υπέρβαρο                          | Αυξημένος             |
| 30-34,9                  | Παχυσαρκία 1 <sup>ου</sup> βαθμού | Πολύ αυξημένος        |
| 35-39,9                  | Παχυσαρκία 2 <sup>ου</sup> βαθμού | Σοβαρά αυξημένος      |
| ≥40                      | Παχυσαρκία 3 <sup>ου</sup> βαθμού | Πολύ σοβαρά αυξημένος |

Ο ΔΜΣ παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα ως δείκτης. Οι μετρήσεις βάρους και ύψους είναι απλές και ο εξοπλισμός που απαιτείται δεν είναι σύνθετος και ακριβός. Οι εξεταστές δε χρειάζονται μεγάλη εκπαίδευση για να παρέχουν έγκυρα αποτελέσματα γι' αυτό και οι μετρήσεις του ΔΜΣ έχουν γενικά μεγάλη ακρίβεια. Επίσης εξαιτίας της διαδεδομένης και ευρύτατης χρήσης του ως δείκτη αξιολόγησης του σωματικού βάρους, καταγράφεται και αξιολογείται πολύ συχνά σε επιδημιολογικές μελέτες, επιτρέποντας έτσι τη σύγκριση των δεδομένων των προς μελέτη ομάδων ή πληθυσμών με τιμές αναφοράς (ΜΑΝΙΟΣ).

Ένα μειονέκτημα της χρήσης του ΔΜΣ ως δείκτη παχυσαρκίας είναι ότι αποτελεί δείκτη αξιολόγησης του αυξημένου ή μειωμένου σωματικού βάρους σε σχέση με το ύψος και όχι ένα δείκτη προσδιορισμού της λιπώδους μάζας σώματος. Για παράδειγμα, με τη χρησιμοποίηση του ΔΜΣ δεν μπορεί να διακριθεί αν κάποιος έχει αυξημένο σωματικό βάρος εξαιτίας της αυξημένης λιπώδους μάζας ή της αυξημένης μυϊκής μάζας. Έτσι θα μπορούσε εύκολα ένας αθλητής body building να χαρακτηριστεί ως υπέρβαρος ή ακόμα και παχύσαρκος εξαιτίας του αυξημένου ΔΜΣ του (ΜΑΝΙΟΣ).

Σύμφωνα όμως με τον ΠΟΥ, η παχυσαρκία ορίζεται ως η υπερβάλλουσα συσσώρευση λίπους στον οργανισμό σε βαθμό που επηρεάζεται η υγεία και η ευεξία του ατόμου (2000). Με τον ορισμό αυτό καθίσταται σαφές ότι ο αυξημένος κίνδυνος νοσηρότητας από μεταβολικές διαταραχές στα παχύσαρκα άτομα δεν οφείλεται στο αυξημένο σωματικό βάρος, αλλά ουσιαστικά στην αυξημένη λιπώδη μάζα σώματος. Ωστόσο τα όρια του ποσοστού λίπους σώματος για τους άνδρες και τις γυναίκες πέρα από τα οποία χαρακτηρίζεται κανείς υπέρβαρος ή παχύσαρκος δεν έχουν προσδιοριστεί ακόμα με ακρίβεια και βεβαιότητα. Για να θεσπιστούν νέα επίσημα όρια παχυσαρκίας βασισμένα στο ποσοστό λίπους σώματος, χρειάζονται προοπτικές μελέτες που να συσχετίζουν το ποσοστό λίπους σώματος με την εμφάνιση χρόνιων νοσημάτων.

Υπάρχουν ωστόσο κάποια δεδομένα από μελέτες σε Καυκάσιους κυρίως πληθυσμούς που ερευνούσαν τη σχέση μεταξύ ποσοστού λίπους σώματος και παραγόντων κινδύνου για την εμφάνιση ΚΝ, όπως η συστολική και η διαστολική αρτηριακή πίεση, τα επίπεδα της LDL και της HDL χοληστερόλης, των τριγλυκεριδίων και της γλυκόζης νηστείας. Τα αποτελέσματα από τις μελέτες αυτές δείχνουν ότι όταν το ποσοστό λίπους σώματος υπερβαίνει το 25% στους άνδρες και το 35% στις γυναίκες, ο κίνδυνος εμφάνισης ΚΝ, όπως αξιολογείται από τα επίπεδα των βιοχημικών παραμέτρων, είναι αυξημένος. Έχοντας ως βάση λοιπόν τις μελέτες αυτές, μπορεί να υποστηριχθεί ότι όταν το ποσοστό λίπους σώματος υπερβαίνει το 25% στους άνδρες και το 35% στις γυναίκες, τα άτομα αυτά χαρακτηρίζονται παχύσαρκα (DEURENBERG *et al.* 1998; GALLAGHER *et al.* 2000).

#### 1.1.3.1.3.2. Περιφέρεια μέσης

Ο υπολογισμός της περιφέρειας μέσης είναι μια απλή μέτρηση για ενδο-κοιλιακό λίπος με υψηλή επαναληψιμότητα. Κρίνεται όμως απαραίτητο να καθιερωθούν κριτήρια για τα διάφορα έθνη, καθώς υπάρχουν διαφορές σχετικά με τη συνολική παχυσαρκία, την κεντρική παχυσαρκία και τη συγκέντρωση σπλαχνικού λίπους αναλόγως με την εθνικότητα (ALBERTI *et al.* 2006).

Οι μετρήσεις των περιφερειών του ανθρώπινου σώματος, όπως η περιφέρεια μέσης και η περιφέρεια ισχίου, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να εκτιμηθεί η κατανομή λίπους στο σώμα και ο κίνδυνος εμφάνισης παθήσεων που σχετίζονται με την κεντρικού τύπου παχυσαρκία. Χρησιμοποιούνται συχνά ως γρήγορες μέθοδοι ελέγχου για την αναγνώριση

ατόμων που βρίσκονται σε κίνδυνο για υποσιτισμό ή υπερσιτισμό και είναι χρήσιμες μετρήσεις στις περιπτώσεις όπου το βάρος και το ύψος δεν μπορούν να υπολογιστούν (ΖΑΜΠΕΛΑΣ).

Συγκεκριμένα, η μέτρηση της περιφέρειας μέσης σχετίζεται ισχυρά με τις αποθήκες ενδοκοιλιακού λίπους στο σώμα. Δεδομένα μάλιστα από επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν ότι η αυξημένη περιφέρεια μέσης σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΚΝ και ΣΔ τύπου ΙΙ.

Αν και η ποσότητα του ενδοκοιλιακού λίπους μπορεί να μετρηθεί με μεγάλη ακρίβεια με σύγχρονες μεθόδους όπως η μαγνητική και η αξονική τομογραφία, η εφαρμογή τους για την εκτίμηση της κεντρικής παχυσαρκίας στην καθημερινή πρακτική των επιστημόνων υγείας είναι εξαιρετικά δύσκολη και δαπανηρή (CATERSON AND GILL 2002). Ωστόσο, αποτελέσματα μελετών δείχνουν ότι οι μετρήσεις της περιφέρειας μέσης συσχετίζονται ισχυρά με τα αποτελέσματα μέτρησης με μαγνητική και αξονική τομογραφία και αποτελούν έγκυρες ενδείξεις για τον τρόπο κατανομής του σωματικού λίπους.

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα όρια προσδιορισμού της κεντρικής παχυσαρκίας για άνδρες και γυναίκες Καυκάσιας φυλής με βάση τις μετρήσεις της περιφέρειας μέσης.

Πίνακας 1.3. Όρια για μετρήσεις περιφέρειας μέσης και πηλίκου περιφέρειας μέσης προς περιφέρεια ισχίων που υποδηλώνουν κίνδυνο για την εμφάνιση μεταβολικών διαταραχών που σχετίζονται με την παχυσαρκία (2000).

|          | Κίνδυνος         |                     |                         |
|----------|------------------|---------------------|-------------------------|
|          | Περιφέρεια μέσης |                     | Περιφέρεια μέσης/ισχίων |
| Φύλο     | Αυξημένος        | Ιδιαίτερα αυξημένος | Αυξημένος               |
| Άνδρες   | >94cm            | ≥102cm              | >1,0                    |
| Γυναίκες | ≥80cm            | ≥88cm               | >0,8                    |

Μειονέκτημα της μέτρησης αυτής είναι πως υποθέτει ότι άτομα με ίδια περιφέρεια μέσης θα έχουν τον ίδιο καρδιαγγειακό κίνδυνο χωρίς να λαμβάνει υπ' όψη το ύψος. Όμως, το ποσοστό σωματικού λίπους και ο λόγος περιφέρειας μέσης/περιφέρεια ισχίων είναι υψηλότεροι για τους πιο κοντούς ανθρώπους συγκριτικά με υψηλότερα άτομα, με το ίδιο ΔΜΣ καθώς άτομα χαμηλού αναστήματος φαίνεται να έχουν περισσότερο σωματικό λίπος συγκρινόμενα με υψηλότερα άτομα (LOPEZ-ALVARENGA *et al.* 2003).

#### *1.1.3.1.3.3. Λόγος περιφέρειας μέσης/περιφέρεια ισχίων*

Ο δείκτης περιφέρεια μέσης/περιφέρεια ισχίων είναι επίσης ένας καλός δείκτης των καρδιομεταβολικών διαταραχών, αν και η μέτρηση δεν είναι πάντα ακριβής επειδή είναι δύσκολο να προσδιοριστεί το σωστό σημείο μέτρησης.

Η παχυσαρκία ανδροειδούς τύπου ή όπως αλλιώς ονομάζεται κεντρική παχυσαρκία, μπορεί να παρατηρηθεί και στα δύο φύλα αν και είναι συχνότερη στους άνδρες. Χαρακτηρίζεται από αυξημένο κοιλιακό λίπος, δηλαδή από αυξημένη συσσώρευση υποδόριου και σπλαχνικού λίπους στην κοιλιακή χώρα και σύμφωνα με αποτελέσματα επιδημιολογικών και κλινικών μελετών αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για νοσηρότητα και πρόωρο θάνατο. Επιπλέον η κεντρική παχυσαρκία σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για καρδιαγγειακές παθήσεις, ΑΕΕ, ΣΔ τύπου 2, υπέρταση και κάποιους τύπους καρκίνου, παθήσεις δηλαδή με τις οποίες σχετίζεται η παχυσαρκία γενικότερα. Επίσης φαίνεται ότι σχετίζεται με υπερλιπιδαιμίες, αυξημένους δείκτες φλεγμονής και αγγειακές δυσλειτουργίες.

Εκτός από τη συνολική λιπώδη μάζα σώματος, που όταν είναι αυξημένη αποτελεί παράγοντα κινδύνου για παθήσεις που σχετίζονται με την παχυσαρκία, η κατανομή του λίπους στο σώμα φαίνεται ότι είναι εξίσου σημαντική για την αξιολόγηση των κινδύνων υγείας που διατρέχει ένα άτομο. Ανάλογα με την κατανομή του σωματικού λίπους η παχυσαρκία διακρίνεται σε ανδροειδούς και γυναικοειδούς τύπου. Η πρώτη περίπτωση χαρακτηρίζεται από αυξημένη εναπόθεση λίπους στην περιοχή του κορμού και συγκεκριμένα στην κοιλιακή χώρα, ενώ αντίθετα η γυναικοειδούς τύπου παχυσαρκία χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση λίπους στους γλουτούς και τους μηρούς.

#### *1.1.3.1.3.4. Λόγος περιφέρειας μέσης/ ύψος*

Ο δείκτης περιφέρειας μέσης /ύψος (Weight Height Ratio, WHtR) έχει προταθεί ως πιο ευαίσθητος δείκτης για την καλύτερη πρόβλεψη των καρδιομεταβολικών ασθενειών επειδή σχετίζεται περισσότερο με την κεντρική παχυσαρκία και συνυπολογίζει την προσαρμογή σε διαφορετικούς σωματότυπους (ASHWELL AND HSIEH 2005). Παρόλα αυτά, δεν χρησιμοποιείται ευρέως στις μελέτες και στην κλινική πρακτική, ίσως λόγω της μικρής διαφοράς που προσφέρει στην ικανότητα διάκρισης των καρδιομεταβολικών παραγόντων κινδύνου.

#### 1.1.3.1.4. Σακχαρώδης Διαβήτης II

Ο ΣΔ II αποτελεί κύριο παράγοντα κινδύνου Στεφανιαίας νόσου και ΑΕΕ. Σε κάποιες ηλικιακές ομάδες, τα άτομα με ΣΔ έχουν δύο φορές μεγαλύτερο κίνδυνο για ΑΕΕ. Έρευνες έχουν δείξει ότι ο ΣΔ τύπου II, το ΜΣ και η ινσουλινοαντίσταση αποτελούν ανεξάρτητους παράγοντες πρόγνωσης της ΚΝ (SAELY *et al.* 2005).

Το γλυκαιμικό προφίλ αποτελούν η γλυκόζη νηστείας και η ινσουλίνη. Ως νηστεία προσδιορίζεται η μη πρόσληψη θερμίδων για τουλάχιστον 8 ώρες. Γλυκόζη πλάσματος νηστείας πάνω από 126 mg/dl αποτελεί κριτήριο για τη διάγνωση του ΣΔ (2009). Όσον αφορά την ινσουλίνη, είναι ορμόνη που παράγεται σε ειδική μοίρα του παγκρέατος, συγκεκριμένα από ομάδες κυττάρων που ονομάζονται “νησίδια του Langerhans” και παίζει πρωτεύοντα ρόλο στον μεταβολισμό των υδατανθράκων (σακχάρων) του οργανισμού. Η ινσουλίνη δρα σε όλους τους ιστούς του σώματος, ιδιαίτερα, όμως, στο ήπαρ, στους μύες και στο λιπώδη ιστό, βοηθώντας στην πρόσληψη της γλυκόζης από τα κύτταρα. Η ανεπάρκεια της ινσουλίνης προκαλεί την νόσο του ΣΔ. Περίπου το 50% των ατόμων με ΣΔ δε γνωρίζουν ότι πάσχουν. Η επίπτωση της νόσου είναι μεγαλύτερη στις ανεπτυγμένες χώρες. Με την αλλαγή, όμως, του τρόπου ζωής, τη βιομηχανοποίηση και την αστικοποίηση, έχει αρχίσει να παίρνει μορφή επιδημίας και στον αναπτυσσόμενο κόσμο. Ο ΣΔ όχι μόνο αποτελεί παράγοντα κινδύνου για ΚΝ, αλλά δρα συνεργιστικά και μεγεθύνει την επίδραση των υπολοίπων παραγόντων κινδύνου ΚΝ, όπως υπερλιπιδαιμία, αρτηριακή υπέρταση, κάπνισμα, παχυσαρκία.

Η θνησιμότητα λόγω στεφανιαίας νόσου φαίνεται να είναι μεγαλύτερη στα διαβητικά άτομα (VAN DER HORST *et al.* 2007). Πληθυσμιακές μελέτες έχουν δείξει ότι τα άτομα που πάσχουν από ΣΔ διατρέχουν τριπλάσιο κίνδυνο να προσβληθούν από ισχαιμική καρδιοπάθεια, σε σχέση με τους υγιείς (YUSUF *et al.* 2001). Η αντίσταση στην ινσουλίνη (insulin resistance-IR) συναντάται σε μεγαλύτερο ποσοστό από το 90% των ασθενών με ΣΔ II και είναι ο κύριος παθολογικός μηχανισμός που συμμετέχει στη εκδήλωση πρόωρης ΚΝ. Η εξέλιξη της ινσουλινοαντίστασης στο ΣΔ είναι παράλληλη με την εξέλιξη της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης (BANSILAL *et al.* 2007). Παρά το γεγονός ότι ο ΣΔ είναι ένας ισχυρός ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για καρδιαγγειακά επεισόδια, ο κίνδυνος αυτός δεν σχετίζεται υποχρεωτικά με επίπεδα γλυκόζης στα όρια διάγνωσης του ΣΔ. Αντιθέτως, μελέτες έχουν δείξει ότι ο κίνδυνος καρδιαγγειακών επεισοδίων αυξάνεται σταδιακά, καθώς η γλυκόζη νηστείας και τα μεταγευματικά επίπεδα γλυκόζης αυξάνουν προοδευτικά πάνω από το

φυσιολογικό εύρος. Ως εκ τούτου, η δυσγλυκαιμία (δηλαδή, οποιοδήποτε αυξημένο επίπεδο γλυκόζης ή γλυκόζης νηστείας) είναι ένας προοδευτικός, συνεχής παράγοντας κινδύνου για καρδιαγγειακά επεισόδια (GERSTEIN AND CAPES 2002).

#### **1.1.3.1.5. Χρήση καπνού**

Το κάπνισμα αυξάνει τον κίνδυνο της ΚΝ ειδικά σε όσους ξεκίνησαν να καπνίζουν από νεαρή ηλικία και σε όσους θεωρούνται μανιώδεις καπνιστές. Το παθητικό κάπνισμα προσθέτει επιπλέον κίνδυνο. Στην Ευρώπη το κάπνισμα προκαλεί πάνω από 1,2 εκατομμύρια θανάτους κάθε χρόνο (450.000 από ΚΝ) και σχεδόν 650.000 θανάτους στην Ευρωπαϊκή Ένωση (185.000 από ΚΝ). Από το 1990 έως το 2000, αυξήθηκε ο αριθμός ατόμων που πεθαίνουν από ΚΝ λόγω του καπνίσματος κατά 13%. Αν και φαίνεται πως το κάπνισμα μειώνεται σε πολλές ευρωπαϊκές χώρες, ο ρυθμός μείωσης είναι μικρός. Φαίνεται επίσης πως οι γυναίκες καπνίζουν πλέον όσο και οι άντρες σε κάποιες χώρες, ενώ συχνά τα κορίτσια καπνίζουν περισσότερο από τα αγόρια (GROUP 2008 edition ).

Σύμφωνα με επιδημιολογικές μελέτες το κάπνισμα αυξάνει τον κίνδυνο για ΚΝ (Iso *et al.* 2005), ενώ οι καπνιστές βρίσκονται σε μεγαλύτερο κίνδυνο για να αναπτύξουν αντίσταση στην ινσουλίνη (FACCHINI *et al.* 1992) και ΣΔ σε σύγκριση με μη καπνιστές (Foy *et al.* 2005). Η σχέση ανάμεσα στο μακροχρόνιο κάπνισμα και την υπέρταση δεν έχει ακόμα εξακριβωθεί. Όμως, τα αυξημένα τριγλυκερίδια και η μειωμένη HDL χοληστερόλη που προκαλείται από το κάπνισμα μπορούν να εξηγήσουν εν μέρει την αθηρογόνο αλλαγή των αγγείων και τα συνεπακόλουθα καρδιαγγειακά συμβάματα που παρατηρούνται στους νυν καπνιστές (CORELLA *et al.* 2002).

#### **1.1.3.1.6. Μη υγιεινή διατροφή**

Η μειωμένη κατανάλωση φρούτων και λαχανικών εκτιμάται ότι σχετίζεται με περίπου το 31% της Στεφανιαίας νόσου και το 11% των ΑΕΕ παγκοσμίως. Η υψηλή πρόσληψη κορεσμένων λιπαρών αυξάνει τον κίνδυνο για ΚΝ και ΑΕΕ μέσω της επίδρασής τους στα λιπίδια του αίματος και στη θρόμβωση ((WHO) 2004).

#### **1.1.3.1.7. Μειωμένη φυσική δραστηριότητα**

Η μειωμένη φυσική δραστηριότητα αυξάνει τον κίνδυνο για ΚΝ και ΑΕΕ κατά 50%. Η φυσική δραστηριότητα είναι καθοριστικός παράγοντας της ενεργειακής δαπάνης και έτσι είναι θεμελιώδης ο ρόλος της στο ενεργειακό ισοζύγιο και στον έλεγχο του βάρους. Η φυσική δραστηριότητα μειώνει τον κίνδυνο για ΚΝ και ΣΔ και έχει ευεργετική επίδραση σε πολλές διαδικασίες. Η ευεργετική επίδραση της φυσικής δραστηριότητας στο ΜΣ διαμεσολαβείται από μηχανισμούς πέρα από τον έλεγχο του πλεονάζοντος σωματικού βάρους. Για παράδειγμα, η αύξηση της φυσικής δραστηριότητας μειώνει την πίεση του αίματος, βελτιώνει τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης, βελτιώνει τον έλεγχο της γλυκόζης αίματος σε υπέρβαρα άτομα ακόμα και χωρίς σημαντική απώλεια βάρους ((WHO) 2004).

#### **1.1.3.2. Άλλοι τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου**

##### **1.1.3.2.1. Χαμηλό κοινωνικό-οικονομικό επίπεδο**

Παρατηρείται αντίστροφη σχέση ανάμεσα στο κοινωνικο-οικονομικό επίπεδο και τον καρδιαγγειακό κίνδυνο. Για παράδειγμα, η ΚΝ εμφανίζει υψηλότερη θνητότητα μεταξύ ανδρών και γυναικών χαμηλότερης κοινωνικοοικονομικής τάξης, καθώς οι περισσότεροι θάνατοι συμβαίνουν σε χώρες χαμηλού έως μέτριου εισοδήματος, όπως οι Ινδίες και η Κίνα.

##### **1.1.3.2.2. Χρήση αλκοόλ**

Ένα με δύο ποτά την ημέρα οδηγούν σε μείωση κατά 30 % της καρδιακής νόσου, αλλά η υπερβολική κατανάλωση επιβαρύνει τον καρδιακό μυ. Έτσι, ενώ η χαμηλή έως μέτρια κατανάλωση αλκοόλ έχει θετική επίδραση στο μεταβολισμό των λιπιδίων, την κεντρική παχυσαρκία και τη ρύθμιση της γλυκόζης (KOPPEL *et al.* 2005), από την άλλη, η υπερκατανάλωση αλκοόλ προκαλεί υπέρταση (XIN *et al.* 2001) και υπερτριγλυκεριδαιμία (ΚΑΤΟ *et al.* 2003). Για τον λόγο αυτό, σε κάποιες μελέτες η μέτρια κατανάλωση αλκοόλ συσχετίζεται με χαμηλό επιπολασμό του ΜΣ ανεξάρτητα από τον τύπο του ποτού (DJOUSSE *et al.* 2004), αντίθετα η υπερβολική και από μικρή ηλικία κατανάλωση αλκοόλ αυξάνει τον κίνδυνο για ΜΣ (FAN *et al.* 2006).

### **1.1.3.3. Μη τροποποιησιμοι παράγοντες κινδύνου**

#### **1.1.3.3.1. Αυξανόμενη ηλικία**

Η ηλικία αποτελεί τον πιο ισχυρό ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την ΚΝ ενώ ο κίνδυνος για ΑΕΕ διπλασιάζεται για κάθε δεκαετία μετά την ηλικία των 55 ετών ((WHO) 2004).

#### **1.1.3.3.2. Οικογενειακό ιστορικό**

Ο κίνδυνος αυξάνεται εάν ένας συγγενής πρώτου βαθμού είχε στεφανιαία νόσο ή ΑΕΕ πριν την ηλικία των 55 ετών (για συγγενή ανδρικού φύλου) ή 65 ετών (για συγγενή θηλυκού φύλου).

#### **1.1.3.3.3. Φύλο**

Γενικά, παρατηρούνται υψηλότεροι ρυθμοί για Στεφανιαία νόσο στους άνδρες συγκριτικά με τις γυναίκες (προ-εμμηνοπαυσιακή ηλικία), ενώ ο κίνδυνος για ΑΕΕ είναι παρόμοιος και για τα δύο φύλα.

Σε μεγάλη προοπτική μελέτη με συμμετέχοντες ηλικιωμένους άνδρες και γυναίκες 65 ετών και άνω, το ΜΣ, σύμφωνα με τον ορισμό του rNCEP, ήταν ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για καρδιαγγειακά συμβάματα ειδικά στις γυναίκες. Συγκεκριμένα, συσχετίστηκε με 80% αυξημένο κίνδυνο για συνολικά καρδιαγγειακά συμβάματα ανεξάρτητα από συγχυτικούς παράγοντες αναφοράς, με ισχυρότερη συσχέτιση στις γυναίκες συγκριτικά με τους άνδρες (RACHAS *et al.* 2012).

Επίσης, σύμφωνα με τα στοιχεία δύο μετα-αναλύσεων το ΜΣ συσχετίζεται με υψηλότερο κίνδυνο για ΚΝ στις γυναίκες συγκριτικά με τους άνδρες (GAMI *et al.* 2007).

Οι πιθανοί μηχανισμοί δεν έχουν ακόμα διασαφηνιστεί, αν και υπάρχουν αρκετές ερμηνείες. Η κεντρική παχυσαρκία τείνει να είναι πιο έντονη στις μετα-εμμηνοπαυσιακές γυναίκες απ' ότι στους άνδρες. Επίσης, το προφίλ της χοληστερόλης είναι διαφορετικό στις γυναίκες απ' ότι στους άνδρες, καθώς μετά την εμμηνοπαυση η HDL χοληστερόλη μειώνεται και η LDL χοληστερόλη αυξάνεται, ενώ τα σωματίδια της LDL γίνονται πυκνότερα και επομένως πιο

αθηρογόνα. Υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι τα αυξημένα τριγλυκερίδια συσχετίζονται ισχυρότερα με τη στεφανιαία νόσο στις γυναίκες συγκριτικά με τους άνδρες. Μετα-ανάλυση έχει δείξει ότι μια αύξηση στα τριγλυκερίδια κατά 18mg/dl σχετίζεται με 76% αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο στις γυναίκες και 32% αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο στους άνδρες (HOKANSON AND AUSTIN 1996). Άλλοι παράγοντες κινδύνου που μπορεί να ευθύνονται για τη συσχέτιση αυτή είναι το Σύνδρομο Πολυκυστικών Ωοθηκών, η χρήση αντισυλληπτικών και ο ΣΔ κύησης.

#### **1.1.3.3.4. Εθνικότητα και φυλή**

Έχουν παρατηρηθεί αυξημένα ΑΕΕ σε μαύρους, Ισπανόφωνους Αμερικάνους, Κινέζους και Ιάπωνες. Επίσης, αυξημένη θνησιμότητα από ΚΝ παρατηρείται σε πληθυσμούς της νότιας Ασίας και Αφροαμερικάνους, συγκριτικά με λευκούς ((WHO) 2004).

#### **1.1.3.4. Νέοι παράγοντες κινδύνου**

##### **1.1.3.4.1. Φλεγμονή**

Πολλοί δείκτες φλεγμονής σχετίζονται με αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο, όπως για παράδειγμα η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη. Επίσης, η αντίσταση στην ινσουλίνη και το ΜΣ σχετίζονται με την φλεγμονώδη απόκριση (SUTHERLAND *et al.* 2004). Η σχέση ανάμεσα στην ινσουλινοαντίσταση και στη φλεγμονή φαίνεται να είναι αμφίδρομη: η αντίσταση στην ινσουλίνη προκαλεί την φλεγμονώδη απόκριση και αντίστροφα, καταλήγοντας σε έναν φαύλο κύκλο που αυξάνει την επίπτωση του ΜΣ. Η οξεία φάση της φλεγμονώδους απόκρισης δεν συνδέεται μόνο με την αντίσταση στην ινσουλίνη αλλά και με τον ΣΔ II, την παχυσαρκία και γενικά με το ΜΣ.

Στους καρδιομεταβολικούς δείκτες κατατάσσονται, ακόμη, η αντιπονεκτίνη, η λεπτίνη και η ιντελευκίνη-6 . Όσον αφορά την πρώτη, είναι μια μεταβολικά ενεργή κυτταροκίνη, που εκκρίνεται από το λιπώδη ιστό, σχετίζεται αρνητικά με την παχυσαρκία και φαίνεται να βελτιώνει την ευαισθησία στην ινσουλίνη, να ρυθμίζει τη γλυκόζη και το μεταβολισμό των λιπιδίων και να έχει προληπτική δράση έναντι της αθηροσκλήρωσης (FARGNOLI *et al.* 2008).

Η έκτοπη έκφραση αντιπονεκτίνης ελαττώνει την ανάπτυξη παχυσαρκίας που σχετίζεται με τη διατροφή και βελτιώνει την ινσουλινοευαισθησία. Τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα υποδεικνύουν την καθοριστική θέση της αντιπονεκτίνης στη ρύθμιση της ινσουλινοευαισθησίας (BERG *et al.* 2002; SHKLYAEV *et al.* 2003).

Η λεπτίνη είναι μια πρωτεΐνη που συντίθεται και εκκρίνεται από λιποκύτταρα ως απάντηση σε μεταβολές των αποθηκών λίπους του σώματος. Επομένως, η λεπτίνη διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στον έλεγχο των αποθηκών λίπους, μέσω της συντονισμένης ρύθμισης της πρόσληψης τροφής, του μεταβολισμού, του αυτόνομου νευρικού συστήματος και της ενεργειακής ισορροπίας του σώματος (KOERNER *et al.* 2005; CAMMISOTTO AND BENDAYAN 2007). Ο ρόλος της λεπτίνης είναι πλειοτροπικός σημαντικότερη, όμως, θεωρείται η δράση της ως μηχανισμού ανατροφοδότησης που δίνει το σήμα σε καίρια ρυθμιστικά κέντρα του εγκεφάλου για την αναστολή της πρόσληψης τροφής και τη ρύθμιση του σωματικού βάρους και της ενεργειακής ομοιόστασης (KLOK *et al.* 2007).

Επιπλέον, η λεπτίνη συμμετέχει στη ρύθμιση της ΑΠ. Αφενός, η κεντρική δράση της λεπτίνης διεγείρει το συμπαθητικό νευρικό σύστημα και αυξάνει την ΑΠ. Είναι αξιοσημείωτο ότι ο μεγαλύτερος αριθμός υπέρβαρων εμφανίζει υψηλά επίπεδα λεπτίνης, τα οποία δεν επιτυγχάνουν το επιθυμητό αποτέλεσμα, δηλαδή την καταστολή της όρεξης και τον έλεγχο του σωματικού βάρους. Η κατάσταση αυτή ονομάζεται αντίσταση στη λεπτίνη και κατέχει σημαντικό ρόλο στην παθολογία της παχυσαρκίας. Η μοριακή βάση της αντίστασης δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί. Έχει παρατηρηθεί ότι μη λειτουργικοί υποδοχείς (π.χ. λόγω μεταλλάξεων) συχνά ευθύνονται για το φαινόμενο. Επιπλέον, ενδέχεται να συμμετέχει η ελαττωμένη μεταφορά της λεπτίνης στον εγκέφαλο, σε συνδυασμό με την ελάττωση της σηματοδότησης μέσω του υποδοχέα της (HUTLEY AND PRINS 2005; AHIMA 2006).

Η ιντερλευκίνη 6 είναι μια πρωτεΐνη που δρα σαν ανοσοτροποποιητική κυτταροκίνη. Εκφράζεται στο λιπώδη ιστό, αλλά και σε υποθαλαμικούς πυρήνες. Ο ρόλος της IL-6 στην ανάπτυξη παχυσαρκίας και αγγειακών παθήσεων είναι αμφιλεγόμενος. Ορισμένες μελέτες δείχνουν ότι η IL-6 συσχετίζεται ισχυρά με την παχυσαρκία και είναι προγνωστικός παράγοντας της ανάπτυξης στεφανιαίας νόσου και ΣΔ τύπου 2, πιθανόν λόγω της διέγερσης της ηπατικής έκφρασης CRP, ινωδογόνου και πρωτεϊνών οξείας φάσης. Επίσης, η IL-6 αναστέλλει τη δράση της ινσουλίνης *in vitro* και *in vivo* σε μυϊκό ιστό, ήπαρ και λιποκύτταρα και συνεισφέρει σημαντικά στη χρόνια φλεγμονώδη κατάσταση και ηπατική ινσουλινοαντίσταση στην

παχυσαρκία (KIM *et al.* 2004; KLOVER *et al.* 2005). Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν στοιχεία πως η IL-6 ασκώντας κεντρική δράση ελαττώνει την όρεξη και αυξάνει την απώλεια βάρους. Γενικά, η IL-6 είναι πιθανό να εμπλέκεται στη συστηματική φλεγμονή που σχετίζεται με την παχυσαρκία και επομένως στρατηγικές που στοχεύουν σε ελάττωση των κυκλοφορούντων επιπέδων του παράγοντα αυτού ενδέχεται να προλαμβάνουν την ανάπτυξη ινσουλινοαντίστασης και αγγειοπαθειών που επάγονται από τη φλεγμονή (BERG AND SCHERER 2005).

#### **1.1.3.4.2. Διαταραχή πήξης αίματος**

Τα αυξημένα επίπεδα παραγόντων θρόμβωσης στο αίμα αυξάνουν τον κίνδυνο των καρδιαγγειακών επιπλοκών. Πιο συγκεκριμένα, αναφέρονται παράγοντες του μηχανισμού της ινωδόλυσης, που αποτελεί έναν από τους βασικούς φυσιολογικούς μηχανισμούς, κατά τον οποίο αποδομείται το ινώδες, μετά την εκπλήρωση του βασικού αιμοστατικού του ρόλου. Στους παράγοντες του μηχανισμού της ινωδόλυσης συμπεριλαμβάνονται ο ιστικός παράγοντας ενεργοποίησης πλασμινογόνου (tissue Plasminogen Activator – tPA) και ο αναστολέας ενεργοποίησης του πλασμινογόνου (Plasminogen Activator Inhibitor 1 - PAI 1) (KLAUS *et al.* 2009). Τα χαρακτηριστικά του ΜΣ σχετίζονται με πρωτεΐνες πήξης και θρόμβωσης και έχει παρατηρηθεί αύξηση του αναστολέα του ενεργοποιητή πλασμινογόνου (Plasminogen Activator Inhibitor, PAI-1) (DEVARAJ *et al.* 2004).

Εκτός από τους παραπάνω δείκτες, μελέτες αναφέρουν την ύπαρξη κι άλλων δεικτών της καρδιομεταβολικής λειτουργίας. Σε αυτούς συμπεριλαμβάνονται το μεσοκυττάριο μόριο προσκόλλησης 1 (Inter-Cellular Adhesion Molecule 1 – ICAM 1), το αγγειακού κυττάρου μόριο προσκόλλησης 1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1 – VCAM 1), το ινωδογόνο και άλλοι (FUNG *et al.* 2005).

## 1.2. Περιβαλλοντικές επιδράσεις: Διατροφή και τρόπος ζωής

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω, οι περισσότεροι καρδιομεταβολικοί δείκτες σχετίζονται με τον τρόπο ζωής και μπορούν να τροποποιηθούν. Πρόσφατη μετα-ανάλυση παρέχει ισχυρές ενδείξεις ότι μακροχρόνιες αλλαγές στον τρόπο ζωής μπορούν να βελτιώσουν σημαντικά πολλούς από τους ενδιάμεσους καρδιομεταβολικούς παράγοντες κινδύνου (YAMAOKA AND TANGO 2012).

### 1.2.1. Καρδιομεταβολικοί δείκτες και διατροφή

Πολλοί ερευνητές προσπάθησαν να διερευνήσουν την σχέση των διατροφικών παραγόντων με την ΚΝ τα τελευταία 50 χρόνια. Πολυάριθμες μελέτες έχουν εξετάσει τις επιδράσεις πολλών θρεπτικών συστατικών, τροφίμων και διατροφικών προτύπων στον καρδιαγγειακό κίνδυνο. Η σημασία της δίαιτας ως παράγοντα κινδύνου για ΚΝ διαπιστώθηκε για πρώτη φορά στην Μελέτη των Επτά Χωρών (KEYS *et al.* 1966; KEYS *et al.* 1984; ΜΕΝΟΤΤΙ *et al.* 1989). Πιο συγκεκριμένα, η Μεσογειακού τύπου δίαιτα συσχετίστηκε αντίστροφα με την επίπτωση της στεφανιαίας νόσου στην νότια Ευρώπη σε σχέση με τις Η.Π.Α. και την βόρεια Ευρώπη, έχοντας λάβει υπ' όψη συγχυτικούς παράγοντες.

Η Μελέτη των Επτά Χωρών υπήρξε ο πρόδρομος για μεγάλης κλίμακας μελέτες που εξέτασαν την σχέση της διατροφής με τον καρδιαγγειακό κίνδυνο.

Η μελέτη THISEAS, μία μελέτη ασθενών-μαρτύρων, έδειξε ότι η αποκλειστική κατανάλωση ελαιολάδου συνδέονταν με 37% μικρότερη πιθανότητα για στεφανιαία νόσο (DIMITRIΟΥ *et al.* 2016). Μία άλλη μελέτη ασθενών-μαρτύρων INTERHEART, κατέδειξε ότι ένα υγιεινό διατροφικό πρότυπο το οποίο χαρακτηρίζονταν από υψηλή κατανάλωση φρούτων και λαχανικών, είχε προστατευτικό ρόλο ενάντια στο έμφραγμα του μυοκαρδίου (IQBAL *et al.* 2008). Η προστατευτική επίδραση της πρόσληψης λαχανικών στην στεφανιαία νόσο βρέθηκε και από την μελέτη Physicians Health Study σε άντρες. Συγκεκριμένα, οι άντρες που κατανάλωναν τουλάχιστον 2,5 μερίδες λαχανικών την ημέρα είχαν σχετικό κίνδυνο 0.77 (95%Δ.Ε. 0,60-0.98) για στεφανιαία νόσο, σε σύγκριση με άντρες που κατανάλωναν λιγότερο από 1 μερίδα

λαχανικών την ημέρα (Liu *et al.* 2001). Ο ΠΟΥ αποδίδει το 11% των θανάτων από ισχαιμική καρδιακή νόσο σε ανεπαρκή πρόσληψη φρούτων και λαχανικών ((WHO) 2009).

Επίσης, προοπτικές μελέτες έχουν εξετάσει τον ρόλο των διατροφικών προτύπων στον κίνδυνο για στεφανιαία νόσο. Η Multi-Ethnic Study (MESA) έδειξε αρνητική συσχέτιση μεταξύ των ΚΝ με την κατανάλωση φρούτων, λαχανικών, δημητριακών ολικής αλέσεως και γαλακτοκομικών χαμηλών σε λιπαρά μετά από τετραετή παρακολούθηση. Αντίθετα, η υψηλή κατανάλωση κόκκινου κρέατος, τηγανιτών και γλυκών αύξησαν τα ποσοστά στεφανιαίας νόσου (NETTLETON *et al.* 2009). Κατά αντιστοιχία, η μελέτη ATTICA επεσήμανε τον προστατευτικό ρόλο των φρούτων, των λαχανικών και του ελαιολάδου καθώς και τον επιβαρυντικό ρόλο του κόκκινου κρέατος, της μαργαρίνης, των γλυκών, του τυριού και του αλκοόλ στην στεφανιαία νόσο (PANAGIOTAKOS *et al.* 2008a).

Σε ότι αφορά τα μικροθρεπτικά συστατικά, η κατανάλωση τροφίμων πλούσιων σε αντιοξειδωτικά έχει συσχετισθεί με μειωμένους δείκτες εμφράγματος του μυοκαρδίου ασκώντας προστατευτική δράση ενάντια στην οξείδωση της LDL χοληστερόλης και της δυσλειτουργίας του ενδοθηλίου των αγγείων. Ωστόσο, τα κλινικά οφέλη τους χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης.

Στοιχεία μελετών υποστηρίζουν ισχυρά ότι πολλοί διαιτητικοί παράγοντες επηρεάζουν και την ΑΠ. Καθιερωμένες διαιτητικές τροποποιήσεις, που μειώνουν την ΑΠ, είναι η μειωμένη πρόσληψη αλατιού, η απώλεια βάρους, καθώς και η μειωμένη κατανάλωση αλκοόλ (μεταξύ αυτών που πίνουν). Κατά την τελευταία δεκαετία, η αυξημένη πρόσληψη καλίου και η προσκόλληση σε διατροφικά πρότυπα, που βασίζονται στη δίαιτα DASH (Dietary Approaches to Stop Hypertension), έχουν προκύψει ως αποτελεσματικές στρατηγικές, που συμβάλλουν, επίσης, στη μείωση της ΑΠ. Σε μη υπερτασικά άτομα, διατροφικές αλλαγές μπορεί να μειώσουν την ΑΠ και να συμβάλλουν στην πρόληψη της υπέρτασης. Σε υπερτασικά άτομα που η ΣΑΠ κυμαίνεται από 140 έως 159 mm Hg ή η διαστολική ΑΠ από 90 έως 99 mm Hg, διατροφικές αλλαγές χρησιμεύουν ως αρχική παρέμβαση, πριν από τη φαρμακευτική αγωγή. Σε υπερτασικούς ασθενείς, που βρίσκονται ήδη σε φαρμακευτική αγωγή, αλλαγές στον τρόπο ζωής, ιδιαίτερα η μειωμένη κατανάλωση αλατιού, μπορεί να μειώσει περαιτέρω την ΑΠ (ARPEL *et al.* 2006). Η δίαιτα DASH (δίαιτα πλούσια σε φρούτα, λαχανικά και γαλακτοκομικά προϊόντα χαμηλά σε λίπος, μειωμένης περιεκτικότητας σε κορεσμένα λιπαρά, ολικό λίπος και χοληστερόλη και με μέτρια αυξημένη πρωτεΐνη) φαίνεται να είναι μια αποτελεσματική

στρατηγική για την πρόληψη και θεραπεία της υπέρτασης, σε μεγάλο εύρος του πληθυσμού, συμπεριλαμβανομένων των τμημάτων του πληθυσμού που βρίσκονται σε υψηλότερο κίνδυνο για αρτηριακή πίεση και τις επιπλοκές της (SVETKEY *et al.* 1999). Ωστόσο, ακόμη και μια δίαιτα με αυξημένα επίπεδα λίπους (κοντά στο 37%), αλλά και αυξημένα επίπεδα φρούτων και λαχανικών, φαίνεται να σχετίζεται αντίστροφα με την ΑΠ (ALONSO *et al.* 2004). Τα αποδεικτικά στοιχεία για την μείωση του αλατιού είναι ισχυρά, καθώς μια μείωση του αλατιού από την πρόσληψη των 10-12 g την ημέρα στο συνιστώμενο επίπεδο των 5-6 g την ημέρα, φαίνεται να έχει μια σημαντική επίδραση στη μείωση της ΑΠ και την καρδιαγγειακή θνησιμότητα (HE AND MACGREGOR 2007).

Επίσης φαίνεται ότι η συνδυασμένη επίδραση μιας δίαιτας πλούσιας σε φρούτα, λαχανικά και γαλακτοκομικά προϊόντα και χαμηλής περιεκτικότητας σε λίπος, ήταν περισσότερο αποτελεσματική σε βραχυπρόθεσμο ορίζοντα, για τη μείωση της ΣΑΠ, από ότι η υψηλή κατανάλωση φρούτων και λαχανικών και μόνο (DAUCHET *et al.* 2007).

Η δίαιτα DASH, χωρίς ελάττωση του νατρίου ή απώλεια βάρους, μείωσε αισθητά την ΑΠ σε όλες, σχεδόν, τις υποομάδες που εξετάστηκαν, ενώ ήταν, ιδιαίτερα, αποτελεσματική σε άτομα με υπέρταση (SVETKEY *et al.* 1999).

Επιπρόσθετα, έχει φανεί ότι η προσκόλληση σε όσο το δυνατόν περισσότερους διαιτητικούς παράγοντες και χαρακτηριστικά του τρόπου ζωής, που μειώνουν τον κίνδυνο για υπέρταση (ΔΜΣ κάτω των 25, μέση ημερήσια έντονη άσκηση 30 λεπτών, υψηλό σκορ της δίαιτας DASH, μέτρια πρόσληψη αλκοόλ μέχρι και 10 g/d, χρήση αναλγητικών λιγότερο από μια φορά την εβδομάδα, και πρόσληψη 400 μg/d ή και περισσότερο συμπληρώματος φυλλικού οξέος) σχετίζεται με σημαντικά μικρότερη συχνότητα εμφάνισης υπέρτασης και πρόληψη νέων περιστατικών υπέρτασης μεταξύ νεαρών γυναικών (FORMAN *et al.* 2009).

Τα διαιτητικά πρότυπα φαίνεται να σχετίζονται και με τα λιπίδια του ορού και να συμβάλλουν στην πρόβλεψη του κινδύνου για στεφανιαία νόσο (McNAUGHTON *et al.* 2009). Πλήθος αναλύσεων επιβεβαιώνουν ότι μια δίαιτα πλούσια σε κορεσμένα λιπαρά οξέα αυξάνει, ενώ μια δίαιτα πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μειώνει την ολική και την LDL χοληστερόλη. Διαιτητικά πρότυπα που χαρακτηρίζονται από αυξημένη κατανάλωση λίπους, επεξεργασμένων δημητριακών, ζάχαρης, κόκκινου κρέατος και “πρόχειρου” φαγητού και μειωμένη κατανάλωση φρούτων και λαχανικών, φαίνεται να μειώνουν την HDL χοληστερόλη και να αυξάνουν τα

τριγλυκερίδια (McNAUGHTON *et al.* 2009). Και οι τρεις κατηγορίες λιπαρών οξέων (κορεσμένα, μονοακόρεστα και πολυακόρεστα) φαίνεται να ανυψώνουν HDL χοληστερόλη, όταν αντικαθιστούν υδατάνθρακες στην διατροφή, και αυτό το αποτέλεσμα είναι ελαφρώς μεγαλύτερο με τα κορεσμένα λιπαρά οξέα. Επίσης, τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων αυξάνουν όταν τα διαιτητικά λιπαρά οξέα αντικαθίστανται από υδατάνθρακες. Επειδή η αντικατάσταση του κορεσμένου λίπους από υδατάνθρακες, αναλογικά, μειώνει τόσο την LDL-C όσο και την HDL-C, και ως εκ τούτου, έχει μικρή επίδραση στον λόγο LDL/HDL χοληστερόλη και αυξάνει τα τριγλυκερίδια, αυτή η αλλαγή στη διατροφή αναμένεται ότι θα έχει ελάχιστο όφελος για τη στεφανιαία νόσο. Σημειώνεται, ακόμη, ότι όταν μονοακόρεστα ή πολυακόρεστα λιπαρά αντικαθιστούν τα κορεσμένα λιπαρά, η LDL-C υφίσταται μείωση (HU AND WILLETT 2002).

Μια υψηλή σε επεξεργασμένα τρόφιμα και πυκνή σε θερμίδες δίαιτα οδηγεί, συχνά, σε υπερβολικά αυξημένες μεταγευματικές τιμές της γλυκόζης του αίματος. Ωστόσο, μια διατροφή πλούσια σε ίνες και φυτικές τροφές, όπως τα λαχανικά και τα φρούτα, τα δημητριακά ολικής αλέσεως, τα όσπρια και τους ξηρούς καρπούς, με ελάχιστα επεξεργασμένα τρόφιμα, φαίνεται να αμβλύνει σημαντικά την αύξηση του μεταγευματικού σακχάρου (O'KEEFE *et al.* 2008). Αυτό που είναι σαφές από την έρευνα μέχρι στιγμής, είναι ότι η διαιτητική πρόσληψη λίπους επηρεάζει τη δράση της ινσουλίνης. Ωστόσο, αν το αποτέλεσμα είναι θετικό, αρνητικό ή αδιάφορο έχει άμεση σχέση με το προφίλ των λιπαρών οξέων του διατροφικού λίπους. Επιδημιολογικά στοιχεία συνδέουν, ιδιαίτερα, την υψηλή πρόσληψη κορεσμένου λίπους με την υπερινσουλιναμία και με αυξημένο κίνδυνο για ΣΔ. Από την άλλη πλευρά, η αύξηση της διαιτητικής πρόσληψης ω-3 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (κυρίως από λιπαρά ψάρια), φαίνεται να είναι προστατευτική ενάντια στην ανάπτυξη της δυσανεξίας στη γλυκόζη (STORLIEN *et al.* 1997). Είναι γεγονός ότι τόσο η διαιτητική πρόσληψη λίπους όσο και τα επίπεδά του στο πλάσμα, καθορίζουν τη σύνθεση των λιπαρών οξέων των μεμβρανών των κυττάρων. Τα υψηλότερα επίπεδα των κορεσμένων λιπαρών οξέων στη μεμβράνη των κυττάρων φαίνεται να αναστέλλουν σε μεγάλο βαθμό τη δράση της ινσουλίνης, ενώ η παρουσία πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, ιδίως των ω-3 και ω-6 λιπαρών οξέων, βελτιώνει την ευαισθησία στην ινσουλίνη (HAAG AND DIPPEAAR 2005). Σημειώνεται, ακόμη, ότι ένας χαμηλός γλυκαιμικός δείκτης σε σύγκριση με έναν υψηλό γλυκαιμικό δείκτη διατροφής, οδηγεί σε χαμηλότερες τιμές γλυκόζης νηστείας του πλάσματος (ANDERSON *et al.* 2004).

Ακόμη μια έρευνα με αντικείμενο τον χαρακτηρισμό διατροφικών προτύπων και τη μελέτη της σχέσης τους με τη συχνότητα του ΣΔ τύπου II κατέληξε στο συμπέρασμα ότι πολλαπλές ομάδες τροφίμων, συλλογικά, επηρεάζουν τον κίνδυνο για ΣΔ τύπου 2, πέραν από τις ίδιες τις μεμονωμένες ομάδες τροφίμων (NETTLETON *et al.* 2008b). Οι Hodge και συν., δημοσίευσαν ότι αποφυγή ενός διατροφικού προτύπου που συμπεριλαμβάνει κρέατα και λιπαρά τρόφιμα, καθώς και προσκόλληση σε ένα πρότυπο, που περιλαμβάνει σαλάτες και μαγειρευτά λαχανικά, συνιστάται για τη μείωση του κινδύνου εκδήλωσης ΣΔ τύπου 2 (HODGE *et al.* 2007). Επιπλέον, μια ακόμη μελέτη από τους Fung και συν., οδήγησε στο συμπέρασμα ότι ένα Δυτικού τύπου πρότυπο (κατανάλωση κόκκινου και επεξεργασμένου κρέατος, γλυκών και επιδόρπιων, τηγανιτών πατατών, επεξεργασμένων δημητριακών) και ειδικά μια δίαιτα υψηλή σε επεξεργασμένα κρέατα, μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο ΣΔ τύπου 2 στις γυναίκες (FUNG *et al.* 2004).

Αξίζει να αναφέρουμε την μελέτη η οποία έγινε από τους Lopez-Garcia και συν., η οποία έδειξε ότι ένα πρότυπο, που χαρακτηρίζεται από υψηλότερη πρόσληψη φρούτων, λαχανικών, οσπρίων, ψαριού, πουλερικών και δημητριακών ολικής αλέσεως, σχετίζεται αντιστρόφως ανάλογα με συγκεντρώσεις πλάσματος της CRP και E-σελεκτίνης, ενώ ένα Δυτικού τύπου διατροφικό πρότυπο, το οποίο χαρακτηρίζεται από υψηλότερη κατανάλωση κόκκινου και επεξεργασμένου κρέατος, γλυκών, επιδορπίων, τηγανιτών πατατών και επεξεργασμένων δημητριακών, έδειξε μια θετική σχέση με την CRP, την ιντερλευκίνη 6, την E-σελεκτίνη, το sICAM-1 και το sVCAM-1 (οι συσχετίσεις φαίνεται να είναι σημαντικές για την CRP, την E-σελεκτίνη, το sICAM-1 και το sVCAM-1) (LOPEZ-GARCIA *et al.* 2004).

Όπως φαίνεται στις προαναφερόμενες μελέτες, τόσο η διατροφή όσο και γενικότερα ο τρόπος ζωής δρουν συνεργιστικά και πιθανώς αθροιστικά, αυξάνοντας την αποτελεσματικότητά τους στην βελτίωση ή/και αντιμετώπιση καρδιομεταβολικών παραγόντων κινδύνου και τείνουν πλέον να προσεγγίζονται πιο ολιστικά.

#### **1.2.1.1. Διατροφικά πρότυπα**

Υπάρχουν αρκετοί λόγοι για τους οποίους εξετάζονται συνολικά διατροφικά πρότυπα και όχι μόνο τους τα διάφορα θρεπτικά συστατικά.

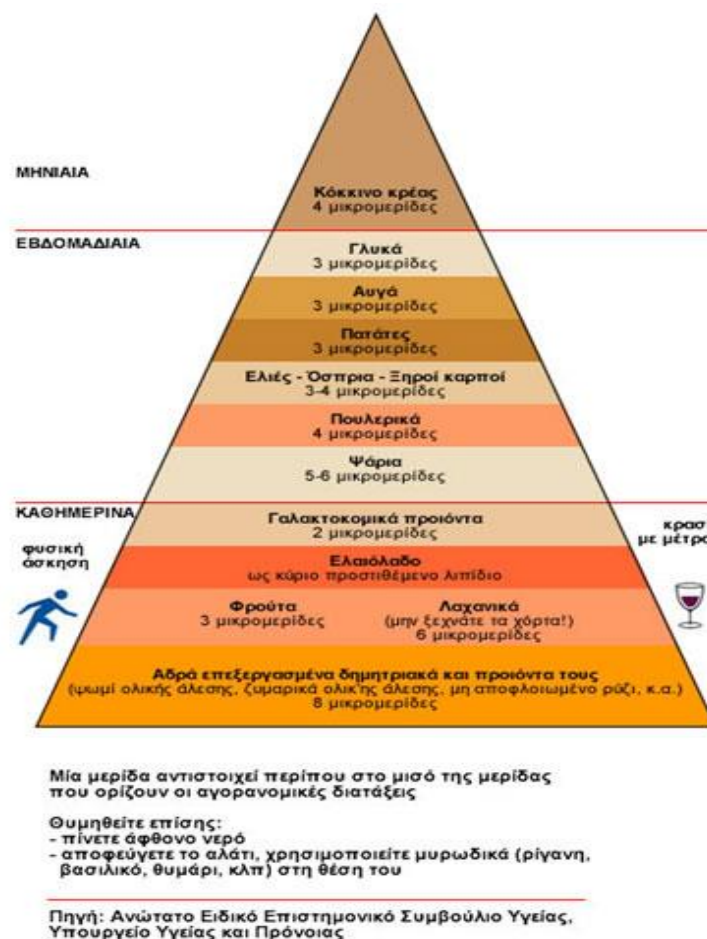
Καταρχήν, μια τέτοια προσέγγιση είναι πιο περιεκτική, καθώς δεν εστιάζει σε ένα μόνο θρεπτικό συστατικό, αλλά σε ολόκληρη τη δίαιτα, πετυχαίνοντας μια ολιστική αποτίμηση της διατροφής. Εξάλλου, κανείς δεν καταναλώνει ένα μόνο θρεπτικό συστατικό, αλλά γεύματα που αποτελούνται από τρόφιμα, τα οποία περιέχουν πολύπλοκους συνδυασμούς θρεπτικών συστατικών με συνεργιστική ή ανταγωνιστική δράση. Για παράδειγμα, τα οξαλικά οξέα μειώνουν την απορρόφηση του ασβεστίου, ενώ η πρόσληψη σακχάρων ευοδώνει την απορρόφηση του ασβεστίου. Έτσι, η μελέτη μεμονωμένων θρεπτικών συστατικών, πιθανά, δεν μπορεί να λάβει υπόψη το ρόλο τέτοιου είδους αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στα θρεπτικά συστατικά. Με άλλα λόγια, με τα διατροφικά πρότυπα αποφεύγεται η εστίαση σε φαγητά ή συστατικά μόνα τους αλλά γίνεται αξιολόγηση συνδυασμών (HODGE *et al.* 2007). Τα διατροφικά πρότυπα μπορούν να προτείνουν μια πιο ολοκληρωμένη προσέγγιση για την πρόληψη ασθενειών ή τη θεραπεία, γιατί η εστίαση είναι στο σύνολο της διατροφής και όχι σε ένα μόνο τρόφιμο ή θρεπτικό συστατικό (FUNG *et al.* 2001). Σε κλινικές δοκιμές, οι παρεμβάσεις, που στόχο έχουν την τροποποίηση διατροφικών προτύπων, είναι περισσότερο αποτελεσματικές στη μείωση της ΑΠ απ' ό,τι η χορήγηση συμπληρωμάτων θρεπτικών συστατικών (APPEL *et al.* 1997). Σημειώνεται ότι η εξέταση συνδυασμού θρεπτικών συστατικών αποτελεί ισχυρότερο προγνωστικό για ορθά συμπεράσματα (GAO *et al.* 2003) και κάνει πιο πιθανό να σκεφτούμε πιθανά αθροιστικά αποτελέσματα λόγω έκθεσης σε ένα συνδυασμό τροφίμων και θρεπτικών συστατικών της δίαιτας (BERG *et al.* 2008). Τα αποτελέσματα μεμονωμένων θρεπτικών συστατικών, πιθανόν, να μην είναι ισοδύναμα, όταν καταναλώνονται τρόφιμα με πληθώρα θρεπτικών συστατικών ή όταν τρόφιμα καταναλώνονται ως μέρος ενός μεγαλύτερου διαιτητικού προτύπου με πολλά τρόφιμα. Επιπρόσθετα, το μέγεθος της επιρροής των μεμονωμένων θρεπτικών συστατικών, ίσως, είναι μικρό, προκειμένου να ξεπεράσει τις συγχυτικές και ασαφείς μετρήσεις, ενώ η συνολική επίδραση πολλών τροφίμων μπορεί να είναι μεγάλη (NETTLETON *et al.* 2008a). Δεν πρέπει να ξεχνάμε και το γεγονός ότι υπάρχουν συσχετίσεις μεταξύ της κατανάλωσης διαφόρων ομάδων τροφίμων (π.χ. αυξημένη κατανάλωση φρούτων και αυξημένη κατανάλωση λαχανικών. Επιπλέον, τα θρεπτικά συστατικά συνδέονται με κάποια διατροφικά σχήματα (KANT *et al.* 1991). Για παράδειγμα, έχει φανεί ότι η χαμηλή πρόσληψη λίπους σχετίζεται με αυξημένη πρόσληψη λαχανικών, φρούτων, προϊόντων ολικής άλεσης, φυλλικού οξέος και φυτικών ινών (URSIN *et al.* 1993). Τέλος, η τεχνική αυτή, της εξέτασης διατροφικών προτύπων, αποτελεί μια προσέγγιση για την καλύτερη κατανόηση της

πολυπλοκότητας των διατροφικών συμπεριφορών και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για να αναπτύξουμε στρατηγικές διατροφικής παρέμβασης σε ομάδες (GAO *et al.* 2003).

Οι δύο κύριες προσεγγίσεις διατροφικών προτύπων που χρησιμοποιούνται, συνήθως, για να χαρακτηρίσουν τις διατροφικές συνήθειες, είναι αυτές που καθορίζονται εκ των προτέρων (*priori*) και εκείνες που δημιουργούνται εκ των υστέρων (*posteriori*).

#### **1.2.1.1.1. Εκ των προτέρων διατροφικά πρότυπα**

Όσον αφορά την εκ των προτέρων ανάλυση, είναι βασισμένη σε προσχεδιασμένους δείκτες, με βάση τις υπάρχουσες γνώσεις για το ρόλο των τροφίμων και των θρεπτικών συστατικών, σύμφωνα με πυραμίδες ή συστάσεις. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η πυραμίδα της μεσογειακής διατροφής, με βάση την οποία συστήνεται μηνιαία κατανάλωση κρέατος, εβδομαδιαία κατανάλωση πουλερικών, ψαριών, αυγών, ξηρών καρπών, οσπρίων και γλυκών και καθημερινή πρόσληψη γαλακτοκομικών, ελαιολάδου ως κύριο προστιθέμενο λίπος, φρούτων, λαχανικών, μη επεξεργασμένων δημητριακών και προϊόντων τους, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.1.



Εικόνα 1.1. Η παραδοσιακή πυραμίδα της Μεσογειακής διατροφής

Ο κάθε δείκτης χρησιμοποιεί ορισμένα κριτήρια (ομάδες τροφίμων, συμπεριφορά, ισορροπία, μέτρο, ποικιλία, επάρκεια) προκειμένου να πραγματοποιηθεί εκτίμηση της ποιότητας της διατροφής. Στη συνέχεια ακολουθεί βαθμολογία, με εύρος που ποικίλει ανάλογα με τον δείκτη και, τέλος, εκτιμάται το αντίκτυπο της ποιότητας της διατροφής στην ανθρώπινη υγεία (ARVANITI AND PANAGIOTAKOS 2008). Οι ομάδες τροφίμων που χρησιμοποιούνται στις βαθμολογίες, είναι ευρέως ορισμένες και δε λαμβάνουν υπόψη τις λεπτές διαφορές στα θρεπτικά συστατικά και τα φυτοχημικά στα ατομικά τρόφιμα (π.χ. όλα τα λαχανικά συγκρινόμενα με τα σταυρανθή λαχανικά, τα πράσινα φυλλώδη λαχανικά, τα σκούρα κίτρινα λαχανικά ή τις πατάτες) (NETTLETON *et al.* 2008a). Τα εκ των προτέρων διατροφικά πρότυπα διαφοροποιούνται μεταξύ τους, καθώς, αρχικά, γίνεται η επιλογή των βαθμολογούμενων παραμέτρων (συνήθως 9-10 παράμετροι), δηλαδή ομάδες ή συστατικά τροφίμων ή συνδυασμοί, έπειτα, καθορίζονται οι διαβαθμίσεις και η βαθμολογία π.χ. 2,4,5 διαβαθμίσεις και, τέλος, υπολογίζεται η σχετική βαρύτητα των μεταβλητών και η σχετική βαθμολογία (KOURLABA AND PANAGIOTAKOS 2009). Παραδείγματα του

προτύπου αυτού αποτελούν το Healthy Eating Index, το οποίο χρησιμοποιεί 10 κριτήρια για την εκτίμηση της ποιότητας της διατροφής και οδηγεί σε μικρή ή καθόλου σχέση με τον κίνδυνο εμφάνισης χρόνιων παθήσεων, το Diet Quality Index που χρησιμοποιεί 8 κριτήρια για την εκτίμηση της ποιότητας της διατροφής και αντανakλά τη συνολική ποιότητα της διατροφής, το Mediterranean Diet Score, το οποίο χρησιμοποιεί 11 κριτήρια για την εκτίμηση της ποιότητας της διατροφής, με εύρος βαθμολόγησης (σκορ) από 0 έως 55, και δείχνει τη σχέση της διατροφής με το οξύ στεφανιαίο σύνδρομο και άλλα (ARVANITI AND PANAGIOTAKOS 2008).

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 της διατροφής μεταφράζονται σε έναν αριθμό, μέσω κάποιας συνάρτησης που περιλαμβάνει τρόφιμα, ομάδες τροφίμων ή θρεπτικά συστατικά ή ακόμη και συνδυασμό αυτών. Τα διατροφικά σκορ έχουν χρησιμοποιηθεί με σκοπό τη διερεύνηση της ύπαρξης συσχετίσεων μεταξύ της Μεσογειακής διατροφής και παραμέτρων υγείας, όπως το προσδόκιμο επιβίωσης, ο επιπολασμός της παχυσαρκίας, τα ΚΝ και ο καρκίνος. Επιπλέον, τα σκορ αποτελούν χρήσιμα εργαλεία στη μέτρηση διαιτητικών συνηθειών, καθώς και στην ανάπτυξη συστάσεων κατανοητών στον πληθυσμό (BACH *et al.* 2006). Στην Ελλάδα, η χρήση των Μεσογειακών σκορ ξεκίνησε σαν μια προσπάθεια αποτίμησης της σχέσης μεταξύ Μεσογειακής διατροφής και μακροβιότητας.

Ήδη από το 1995, ξεκίνησε η χρησιμοποίηση των Μεσογειακών σκορ από τους Τριχοπούλου και τους συν., με τη δημιουργία του δείκτη (TRICHOPOULOU *et al.* 1995), ο οποίος χρησιμοποιεί 9 κριτήρια για την εκτίμηση της ποιότητας της διατροφής, με εύρος βαθμολόγησης από 0 έως 9, και δείχνει την αντίστροφη σχέση της Μεσογειακής διατροφής με την ολική θνησιμότητα. Η έρευνα των Τριχοπούλου και συν. έδειξε ότι υψηλότερο Mediterranean Diet Scale (MDS-1) κατά ένα βαθμό σχετίζεται με 17% μείωση της θνησιμότητας.

Πρόσφατα δημιουργήθηκε ένα νέο διατροφικό σκορ μεγάλης κλίμακας, που ενσωματώνει χαρακτηριστικά της Μεσογειακής διατροφής και σχετίζεται με τον καρδιαγγειακό κίνδυνο και βιολογικούς δείκτες. Το σκορ, το οποίο αναπτύχθηκε από τον Δ. Παναγιωτάκο και τους συνεργάτες του (PANAGIOTAKOS *et al.* 2007a), σύμφωνα με τις Μεσογειακές διαιτητικές συνήθειες, συμπεριλαμβάνει εβδομαδιαία κατανάλωση των ακόλουθων εννέα ομάδων τροφίμων: μη επεξεργασμένα δημητριακά (ολικής άλεσης ψωμί και ζυμαρικά, καστανό ρύζι κτλ.), φρούτα, λαχανικά, όσπρια, πατάτες, ψάρι, κρέας και προϊόντα του, πουλερικά, πλήρη

γαλακτοκομικά προϊόντα (τυρί, γιαούρτι, γάλα), ελαιόλαδο και αλκοόλ. 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 διατροφικό πρότυπο (π.χ. αυτά που συστήνονται καθημερινά ή σε ποσότητες μεγαλύτερες των τριών μερίδων την εβδομάδα) δίνεται σκορ 1 και 5 για σπάνια έως καθημερινή κατανάλωση, ενώ δίνεται 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 ληφθεί υπόψη ότι η κατανάλωση πατάτας έχει συσχετιστεί με τον ΣΔ, λόγω του υψηλού γλυκαιμικού της δείκτη. Από την άλλη πλευρά, 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 300 mL ανά ημέρα, σκορ 0 για μηδενική κατανάλωση ή μεγαλύτερη των 700 mL 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 0-55. Υψηλότερες τιμές του σκορ υποδεικνύουν μεγαλύτερη συμμόρφωση στο Μεσογειακό πρότυπο.

#### **1.2.1.1.2. Εκ των υστέρων διατροφικά πρότυπα**

Το εκ των υστέρων διατροφικό πρότυπο δεν έχει βασιστεί σε προηγούμενη έρευνα και, συνεπώς, δεν αξιολογεί πρόσφατα παραδείγματα συσχετίσεων δίαιτας και ασθένειας, ενώ, παράλληλα, λαμβάνει υπόψη πολλές πτυχές της δίαιτας, αντί να επικεντρώνεται σε λίγες υποθετικές ομάδες τροφίμων (NETTLETON *et al.* 2008a). Στην ανάλυση αυτή, τα πρότυπα προκύπτουν από τα διαθέσιμα ερευνητικά δεδομένα, ύστερα από κατάλληλη στατιστική επεξεργασία. Παραδείγματα μιας τέτοιας ανάλυσης αποτελούν η ανάλυση σε κύριες συνιστώσες (principal component analysis - PCA), η παραγοντική ανάλυση (factor analysis), η συσταδική ανάλυση (cluster analysis) κ.τ.λ.

Όσον αφορά την ανάλυση σε κύριες συνιστώσες, αποτελεί ένα εμπειρικό διατροφικό πρότυπο, που ερευνά τυχόν συσχετίσεις μεταξύ των αρχικών μεταβλητών και τις εκμεταλλεύεται

προκειμένου να δημιουργήσει νέες μεταβλητές (πρότυπα). Η μέθοδος των κυρίων συνιστωσών έχει σκοπό να δημιουργήσει γραμμικούς συνδυασμούς των αρχικών μεταβλητών, έτσι ώστε οι γραμμικοί αυτοί συνδυασμοί να είναι ασυσχέτιστοι μεταξύ τους, αλλά να περιέχουν όσο γίνεται μεγαλύτερο μέρος της διακύμανσης των αρχικών μεταβλητών. Το κέρδος από μια τέτοια διαδικασία είναι ότι από ένα σύνολο συσχετισμένων μεταβλητών καταλήγουμε σε ένα σύνολο ασυσχέτιστων μεταβλητών κι έτσι ξεπερνιέται το πρόβλημα της πολυσυγγραμμικότητας. Επιπλέον, έχουμε λιγότερες μεταβλητές από όσες αρχικά είχαμε, με κόστος, φυσικά, την απώλεια πληροφορίας, ενώ μπορούμε να εξετάσουμε τις συσχετίσεις ανάμεσα στις μεταβλητές και να διαπιστώσουμε πόσο οι μεταβλητές μοιάζουν ή όχι.

### 1.3. Γενετική προδιάθεση Καρδιαγγειακών Νοσημάτων

Οι πολυπαραγοντικές ασθένειες καθορίζονται από έναν αριθμό γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Οι ασθένειες αυτές, όπως για παράδειγμα η ΚΝ, ο ΣΔ ΙΙ, ο καρκίνος και διάφορες ψυχικές νόσοι, βρίσκονται στο επίκεντρο επιδημιολόγων και γενετιστών, λόγω της επίδρασής τους στην δημόσια υγεία σε παγκόσμιο επίπεδο.

Η προδιάθεση για ΚΝ διαφέρει μεταξύ των ατόμων και οι γενετικοί πολυμορφισμοί διαθέτουν ρόλο κλειδί σε αυτή την διαδικασία. Ενδεικτικά, σε μελέτη διδύμων φάνηκε ότι υπάρχει 57% και 38% κληρονομικότητα για στεφανιαία νόσο σε άντρες και γυναίκες, αντίστοιχα (ZDRAVONIC *et al.* 2002). Σε νεότερες ηλικίες έχει φανεί ότι οι γενετικοί πολυμορφισμοί συμβάλλουν σε μία 20-60% αύξηση του κινδύνου για στεφανιαία νόσο (CHAER *et al.* 2004). Το ΜΣ είναι μια σύνθετη διαταραχή με ισχυρή γενετική προδιάθεση, καθώς οι μεταβολικές διαταραχές που σχετίζονται με το σύνδρομο αθροίζονται σε οικογένειες, κάτι που δείχνει ένα κοινό γενετικό υπόβαθρο (ZABANEH AND BALDING 2010). Είναι πολύ πιθανόν οι επιμέρους μονο-νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (single nucleotide polymorphisms, SNP) να συμβάλλουν στην έναρξη και την εξέλιξη του συνδρόμου αλλά ο συνδυασμός πολλαπλών γενετικών πολυμορφισμών να έχει ισχυρότερη επίδραση (LESNICK *et al.* 2007). Συνεπώς, η έρευνα για την διερεύνηση και ταυτοποίησή τους είναι εκτεταμένη τις τελευταίες δύο δεκαετίες (CAMBIEN *et al.* 1992; LEE *et al.* 2006).

Για την αναζήτηση κοινών γενετικών πολυμορφισμών, οι οποίοι συμβάλουν στην αιτιολογία της πολυπαραγοντικής ΚΝ, χρησιμοποιήθηκαν δύο προσεγγίσεις. Η πρώτη, η οποία περιλαμβάνει τις μελέτες υποψήφιων γονιδίων (Candidate Gene Studies), είναι καθοδηγούμενη από την ερευνητική υπόθεση, ενώ η δεύτερη περιλαμβάνει τις μελέτες σάρωσης του γονιδιώματος (Genome-Wide Association Studies, GWAS)- και δεν βασίζεται σε κάποια εκ των προτέρων ερευνητική υπόθεση (Loos 2012a).

### 1.3.1. Μελέτες υποψήφιων γονιδίων

Οι μελέτες υποψήφιων γονιδίων βασίζονται στην τρέχουσα γνώση της βιολογίας και της παθοφυσιολογίας της προς εξέταση νόσου. Οι γενετικοί παράγοντες που διερευνήθηκαν κυρίως σε αυτού του τύπου τις μελέτες, είναι μονο-νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) που εντοπίζονταν στα γονίδια αυτά (Loos 2012a).

Ιστορικά, η επιτυχία της πρώτης μελέτης υποψήφιου γονιδίου στην ταυτοποίηση ενός γενετικού πολυμορφισμού που συνέβαλε στην προδιάθεση για ΚΝ δημοσιεύτηκε στο Nature το 1992. Ειδικότερα, η μελέτη διερευνούσε έναν πολυμορφισμό που εντοπίζονταν στο γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο μετατροπής της αγγειοτενσίνης ( angiotensin-converting enzyme-ACE) και έδειξε ότι οι ομοζυγώτες μίας διαγραφής στο ACE γονίδιο βρισκόταν σε υψηλότερο κίνδυνο για έμφραγμα του μυοκαρδίου (CAMBIEN *et al.* 1992). Ένα άλλο παράδειγμα που αντανάκλα την επιτυχία αυτής της προσέγγισης είναι η ταυτοποίηση ενός πολυμορφισμού στο γονίδιο της απολιποπρωτεΐνης E (APOE), το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό της χοληστερόλης (SONG *et al.* 2004). Από την άλλη πλευρά, μελέτες σε ανθρώπους και ζώα αποδεικνύουν τους προ- και αντι-αθηρογόνους ρόλους του γονιδίου της πρωτεΐνης μεταφορέα των εστέρων χοληστερόλης (cholesterol ester transfer protein -CETP) παίζοντας ρόλο κλειδί στην αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης (VOURVOUHAKI AND DEDOUSSIS 2008).

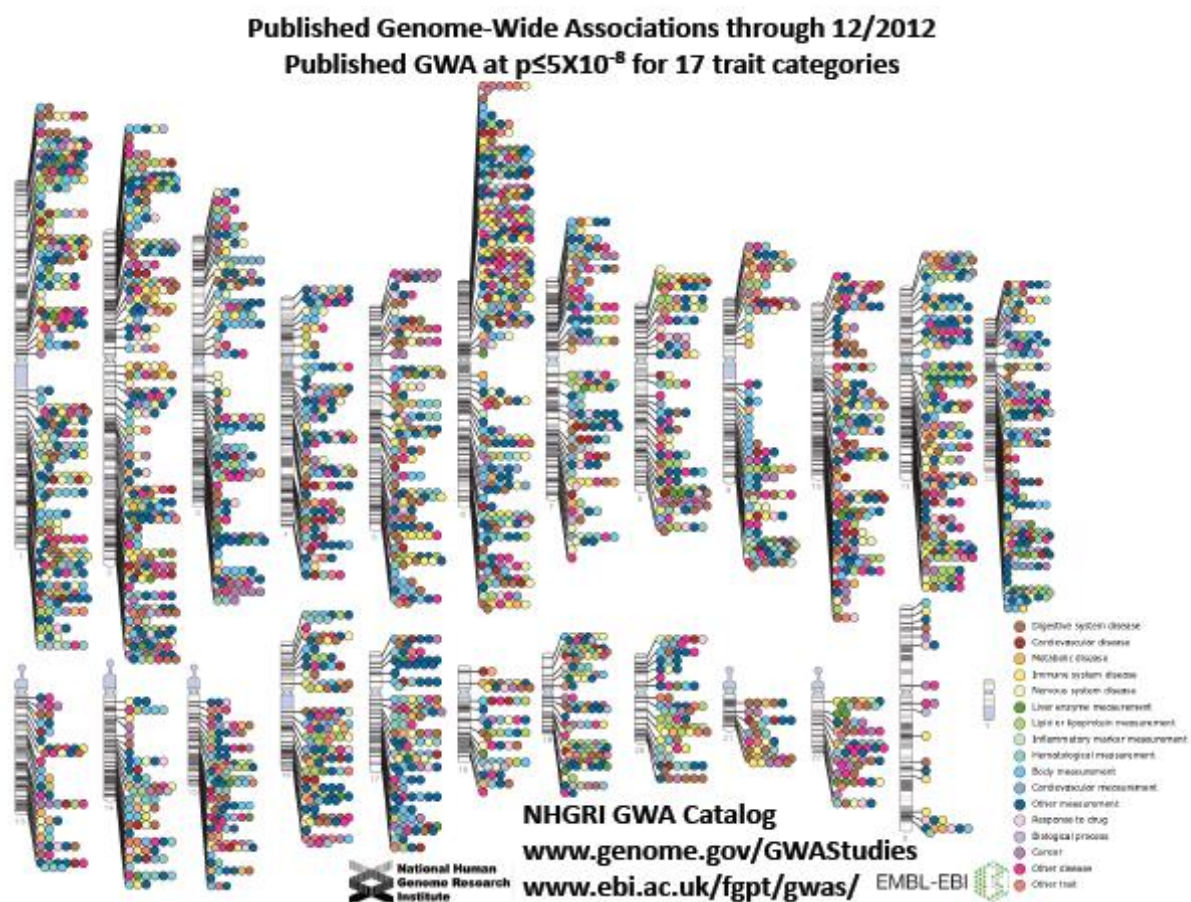
Η γνώση που αποκτήθηκε σε σχέση με την παθογένεση και την θεραπεία των ΚΝ αποτέλεσε την επανάσταση των μελετών των υποψήφιων γονιδίων μέσω της ταυτοποίησης πολυμορφισμών σε γονίδια που σχετίζονται με σπάνιες και μονογονιδιακές μορφές της ΚΝ. Ωστόσο, οι μελέτες αυτές αποδείχθηκαν ανεπαρκείς στην ταυτοποίηση του γενετικού υποβάθρου των πολυγονιδιακών μορφών ΚΝ, συμπεριλαμβανομένης της στεφανιαίας κυρίως λόγω 1) του περιορισμένου αριθμού πολυμορφισμών που διερευνήθηκε, 2) των μικρών μεγεθών δείγματος, άρα και της περιορισμένης ισχύος τους για τον εντοπισμό πολυμορφισμών με μέτρια μεγέθη επίδρασης, 3) του ότι η γενετική ποικιλομορφία του υποψήφιου γονιδίου δεν διερευνήθηκε διεξοδικά καθώς και 4) του ότι η υποψηφιότητα του γονιδίου βασίστηκε σε περιορισμένα βιολογικά δεδομένα (Loos 2012a). Ωστόσο, πρόσφατες μετα-αναλύσεις των ευρημάτων μελετών υποψήφιων γονιδίων, οι οποίες χαρακτηρίζονταν και από μεγαλύτερη ισχύ, είχαν ως αποτέλεσμα τον εντοπισμό πολυμορφισμών που εντοπίζονται για παράδειγμα στο γονίδιο που σχετίζεται με τη λιπώδη μάζα και την παχυσαρκία (Fat Mass and Obesity gene,

FTO) οι οποίοι σχετίζονται με την παχυσαρκία και τον ΣΔ II. Η μετα-ανάλυση επιβεβαίωσε την σχέση τριών πολυμορφισμών στο γονίδιο FTO (rs9939609, rs8050136 και rs10421085) με το ΜΣ. Η γενετική ανάλυση έδειξε ότι το FTO σχετίζεται σημαντικά με το ΜΣ και η σχέση αυτή δεν καθορίζεται από τους πολυμορφισμούς rs9939609 και rs1558902, γεγονός που δείχνει ότι η γενετική ανάλυση συλλαμβάνει επιτυχώς τη συσσωρευτική επίδραση που προσδίδουν τα επιμέρους SNPs. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά, το γονίδιο FTO ίσως διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο ΜΣ και πιθανά στοχεύοντας σε αυτό το γονίδιο να οδηγηθούμε σε στρατηγικές για την πρόληψη και τη θεραπεία του ΜΣ (WANG *et al.* 2012).

### **1.3.2. Μελέτες σάρωσης του γονιδιώματος**

Οι μελέτες σάρωσης του γονιδιώματος δεν βασίζονται σε κάποια ερευνητική υπόθεση εκ των προτέρων και αποσκοπούν στον εντοπισμό νέων, μη αναμενόμενων γενετικών περιοχών, οι οποίες συσχετίζονται με τον φαινότυπο προς διερεύνηση. Η πρόοδος που συντελέστηκε τα τελευταία χρόνια στον εντοπισμό γενετικών παραγόντων που σχετίζονται με κοινές ασθένειες συμπεριλαμβανομένης και της ΚΝ οφείλεται σε μεγάλο ποσοστό στην τεχνολογική ανάπτυξη, η οποία συνέβαλε αφενός στην γρήγορη κατανόηση της αρχιτεκτονικής του ανθρώπινου γονιδιώματος [όπως καταγράφεται και στους χάρτες των προγραμμάτων Human Genome Project, International HapMap (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>) και 1000 Genomes Project (<http://www.1000genomes.org/>)] και αφετέρου στην γρήγορη γονοτύπηση περισσότερων του ενός εκατομμυρίου πολυμορφισμών (Loos 2012a). Μέχρι στιγμής έχουν εντοπιστεί πολυάριθμες γενετικές περιοχές, οι οποίες συσχετίστηκαν με περισσότερες από 160 ασθένειες (Εικόνα 1.2.) (HINDORFF *et al.*). Η επιτυχία των μελετών αυτού του τύπου έγκειται 1) στην μεγαλύτερη ανάλυση του γονιδιώματος με αποτέλεσμα να αυξάνονται και οι πιθανότητες εντοπισμού τις γενετικής περιοχής που συσχετίζεται με τον φαινότυπο, 2) στο γεγονός ότι η συσχέτιση διερευνάται σε μη συγγενικά άτομα εξασφαλίζοντας έτσι ευκολότερα μεγαλύτερη μεγέθη δείγματος, άρα και μεγαλύτερη ισχύ και 3) στον εύρωστο σχεδιασμό τους, ο οποίος αποτελείται από δύο στάδια, το στάδιο εντοπισμού και το στάδιο επαλήθευσης (Loos 2012a).

Σε πρόσφατη μελέτη σάρωσης γονιδιώματος συσχετίστηκε η διάγνωση του ΜΣ και ενός ήδη γνωστού λιπιδαιμικού γενετικού τύπου (APOA1/C3/A4/A5) στο χρωμόσωμα 11, αν και στη μελέτη αυτή συμμετείχαν 650 άτομα με κριτήρια μόνο την αυξημένη γλυκόζη αίματος και την υπέρταση σε σύγκριση με 169 άτομα που είχαν μόνο διαταραγμένα επίπεδα τριγλυκεριδίων και HDL χοληστερόλης. Σε συμφωνία με τα παραπάνω, 5 πολυμορφισμοί που πρόσφατα βρέθηκε να σχετίζονται με το ΜΣ από το STAMPEED Consortium (KRAJA *et al.* 2011) συσχετίστηκαν επίσης με διάφορους λιπιδαιμικούς μεταβολίτες και όχι με τη γλυκόζη. Τα ευρήματα αυτά προτείνουν ότι γονίδια που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των λιπιδίων πιθανά να έχουν ρόλο κλειδί στο γενετικό υπόβαθρο του ΜΣ (KRISTIANSSON *et al.* 2012).



Εικόνα 1.2. Ευρήματα δημοσιευμένων μελετών σάρωσης του γονιδιώματος: περιοχές του γονιδιώματος που συσχετίστηκαν με 17 κατηγορίες φαινοτύπων σε επίπεδο σημαντικότητας  $p \leq 5 \times 10^{-8}$  (2012-2013) [National Human Genome Research Institute, NHGRI catalog [www.genome.gov/GWASStudies](http://www.genome.gov/GWASStudies); EMBL-EBI, [www.ebi.ac.uk/fgpt/gwas/](http://www.ebi.ac.uk/fgpt/gwas/)] (HINDORFF *et al.*)

Οι μελέτες σάρωσης του γονιδιώματος με τα ΚΝ έχουν ταυτοποιήσει SNPs στον 9p21.3 γενετικό τόπο που σχετίζονται με την στεφανιαία νόσο (2007; HELGADOTTIR *et al.* 2007; MCPHERSON *et al.*

2007; SAMANI *et al.* 2007). Μέχρι το 2011 είχαν αναφερθεί 35 πολυμορφισμοί που σχετίζονταν με την στεφανιαία νόσο (PEDEN AND FARRALL 2011). Η μετα-ανάλυση που διεξήχθη στα πλαίσια του CARDIoGRAM Consortium έδειξε ότι το rs1333049 στην 9p21 περιοχή προσδίδει 29% αύξηση ανά αλληλόμορφο στον κίνδυνο εμφράγματος του μυοκαρδίου (PREUSS *et al.* 2010). Επίσης, 13 νέοι πολυμορφισμοί βρέθηκε να σχετίζονται με την στεφανιαία νόσο και συγκεκριμένα με αύξηση του κινδύνου κατά 6-17% ανά αλληλόμορφο (SCHUNKERT *et al.* 2011). Το C4D Consortium ταυτοποίησε 5 νέους γενετικούς τόπους συμπεριλαμβανομένου του γονιδίου της λιπάσης (LIPA) (KATHIRESAN *et al.* 2009). Το CARDIoGRAMplusC4D Consortium αύξησε τον αριθμό των πολυμορφισμών που σχετίζονται με την στεφανιαία νόσο σε 46 στους Καυκάσιους. Συνολικά, όλοι οι γενετικοί πολυμορφισμοί που έχουν ανιχνευθεί ως τώρα ερμηνεύουν περίπου το 10% του καρδιαγγειακού κινδύνου (DELOUKAS *et al.* 2013). Αν και οι μελέτες συσχέτισης του γονιδιώματος έχουν οδηγήσει στην ανακάλυψη πολλών SNPs που σχετίζονται με την ΚΝ, οι μηχανισμοί που συνδέουν την γονιδιακή με την φαινοτυπική έκφραση παραμένουν αδιευκρίνιστοι. Η διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων γονιδίων-περιβάλλοντος θα βοηθήσει στην απόκτηση γνώσης και περαιτέρω κατανόησης των μοριακών μονοπατιών της νόσου, εξηγώντας μέρος της ενδοατομικής μεταβλητότητας.

## 1.4. Αλληλεπιδράσεις γενετικών-διατροφικών παραγόντων στην καρδιαγγειακή νόσο

Οι πολυπαραγοντικές ασθένειες, όπως η ΚΝ, είναι το αποτέλεσμα της επίδρασης πληθώρας γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων (SCHWARTZ AND COLLINS 2007). Οι μελέτες σάρωσης του γονιδιώματος έχουν εντοπίσει πολυάριθμους κοινούς πολυμορφισμούς οι οποίοι συσχετίζονται με αρκετές ασθένειες (HINDORFF *et al.*). Ωστόσο, τόσο η επίδραση του κάθε πολυμορφισμού χωριστά όσο και η αθροιστική τους επίδραση στον κίνδυνο των ασθενειών είναι μικρή έως μέτρια και εξηγούν μόνο ένα μικρό μέρος της κληρονομικότητας (MANOLIO *et al.* 2009). Ενώ και η προγνωστική τους ικανότητα είναι επίσης μικρή (LOOS 2012b). Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι ακόμη και η διαθεσιμότητα ολόκληρου του γονιδιώματος ίσως να είναι περιορισμένης κλινικής σημασίας (ROBERTS *et al.* 2012). Οι αλληλεπιδράσεις γενετικών-περιβαλλοντικών παραγόντων αποτελούν μία σημαντική έννοια στην εξελικτική βιολογία. Για παράδειγμα, οι αλληλεπιδράσεις οδηγούν στην φαινοτυπική πλαστικότητα, όπου ένας συγκεκριμένος γονότυπος οδηγεί σε διαφορετικούς φαινοτύπους σε απάντηση των περιβαλλοντικών συνθηκών. Αυτό το φάσμα των πιθανών φαινοτύπων, όπως η ποικιλομορφία στον κίνδυνο μιας ασθένειας, έχει περιγραφεί ως ‘κανόνας αντίδρασης’ (‘reaction norm’) (PIGLIUCCI). Συνεπώς, οι αλληλεπιδράσεις ίσως εξηγούν ένα μέρος του κινδύνου των ασθενειών ή/και ίσως συμβάλουν στην καλύτερη κατανόηση της γενετικής βάσης των ασθενειών (THOMAS 2010).

Επιπρόσθετα, ένα μέρος του κινδύνου των πολυπαραγοντικών ασθενειών ενδεχομένως να οφείλεται στις αλληλεπιδράσεις γενετικών-περιβαλλοντικών παραγόντων. Η διερεύνηση τους μπορεί να συμβάλει στον εντοπισμό νέων περιοχών του γονιδιώματος, οι οποίες επηρεάζουν τον κίνδυνο μίας ασθένειας μόνο μέσω της συνεργιστικής τους δράσης με ορισμένους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Ή αντίστροφα, ορισμένοι περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορεί να επηρεάζουν μόνο ένα μέρος του πληθυσμού με αυξημένη γενετική προδιάθεση για μία ασθένεια. Επιπλέον, η μελέτη τους μπορεί να οδηγήσει στον εντοπισμό πραγματικών αιτιών ετερογένειας, η οποία προκαλείται από διαφορές στην έκθεση σε κάποιο περιβαλλοντικό παράγοντα (THOMAS 2010). Η αδυναμία επαλήθευσης των ευρημάτων των μελετών σάρωσης του γονιδιώματος πιθανολογείται ότι οφείλεται και στην παρατηρούμενη ετερογένεια μεταξύ των μελετών (IOANNIDIS 2007; GREENE *et al.* 2009). Τέλος, σημαντικές θα μπορούσαν να είναι οι

συνέπειες και στην δημόσια υγεία και την εξατομικευμένη παροχή φροντίδας μέσα από τη δημιουργία μοντέλων πρόβλεψης κινδύνου ασθενειών, στα οποία λαμβάνονται υπόψη και οι αλληλεπιδράσεις γενετικών- περιβαλλοντικών παραγόντων (THOMAS 2010).

Αν και οι αλληλεπιδράσεις γενετικών-περιβαλλοντικών παραγόντων θα μπορούσαν να δώσουν απαντήσεις στα προαναφερθέντα θέματα, η διερεύνηση για τον εντοπισμό τους δεν ήταν επιτυχής κατά τις προηγούμενες δεκαετίες, αφού τα περισσότερα ευρήματα δεν μπόρεσαν να επαληθευθούν. Ωστόσο, με την έλευση των μελετών σάρωσης του γονιδιώματος, μία διαφορετική μεθοδολογία, η οποία δεν βασίζεται σε κάποια ερευνητική υπόθεση εκ των προτέρων, κέρδισε έδαφος και στην μελέτη αλληλεπιδράσεων γενετικών-περιβαλλοντικών παραγόντων (THOMAS 2010).

Χαρακτηριστικό παράδειγμα μίας τέτοιας προσπάθειας αποτελεί η μελέτη των Surakka και συν. (SURAKKA *et al.* 2011), στην οποία πραγματοποιήθηκε σάρωση του γονιδιώματος για τον εντοπισμό αλληλεπιδράσεων μεταξύ γενετικών παραγόντων (~2,5 εκατομμύρια HarMap κοινοί πολυμορφισμοί) και τροποποιήσιμων παραγόντων κινδύνου (φύλο, ΔΜΣ, λόγος περιφέρειας μέσης/περιφέρεια ισχίων, κάπνισμα και κατανάλωση αλκοόλ) στις συγκεντρώσεις λιπιδίων ορού. Στο πρώτο στάδιο, πραγματοποιήθηκε σάρωση του γονιδιώματος για τον εντοπισμό πολυμορφισμών, οι οποίοι τροποποιούν τη σχέση μεταξύ των παραγόντων κινδύνου και των συγκεντρώσεων των λιπιδίων σε 18 μελέτες ατόμων Ευρωπαϊκής καταγωγής (N = 32.225). Στη συνέχεια, 18 πολυμορφισμοί με ενδείξεις αλληλεπίδρασης επιλέχθηκαν για διερεύνηση στο στάδιο της επαλήθευσης (N = 14.889). Η τελική μετα-ανάλυση είχε ως αποτέλεσμα τον εντοπισμό της αλληλεπίδρασης μεταξύ του πολυμορφισμού rs6448771 στο χρωμόσωμα 4 με τον λόγο περιφέρειας μέσης/περιφέρεια ισχίων στη συγκέντρωση ολικής χοληστερόλης. Η συσχέτιση μεταξύ του λόγου περιφέρειας μέσης/περιφέρεια ισχίων και των συγκεντρώσεων χοληστερόλης ήταν ισχυρότερη κατά 64% στα άτομα με δύο G αλληλόμορφα για τον πολυμορφισμό rs6448771 και εξηγούσε το 0,5% και 0,2% της συνολικής διακύμανσης των συγκεντρώσεων χοληστερόλης των νεαρότερων (μέση ηλικία: 37,6 έτη) και γηραιότερων (μέση ηλικία: 61,5 έτη) ατόμων. Στις στρωματοποιημένες αναλύσεις σύμφωνα με τον λόγο περιφέρειας μέσης/περιφέρεια ισχίων (τριτημόρια), παρατηρήθηκε αύξηση του μεγέθους της επίδρασης του πολυμορφισμού στη συγκέντρωση χοληστερόλης κατά την μετάβαση από το χαμηλότερο τριτημόριο στο μεγαλύτερο. Η επίδραση του πολυμορφισμού τόσο στη

συγκέντρωση χοληστερόλης όσο και στον λόγο περιφέρειας μέσης/περιφέρεια ισχίων ήταν μη σημαντική.

Μία πρόκληση για τις μελέτες αλληλεπιδράσεων γονιδιώματος-περιβάλλοντος είναι τα εξαιρετικά μεγάλα μεγέθη δείγματος που απαιτούνται για την εξασφάλιση της απαραίτητης ισχύος.

Επιπλέον, η επιλογή των παραγόντων που θα επιλεγθούν προς διερεύνηση αποτελεί μία ακόμη πρόκληση, αφού η ανάλυση όλων δεν είναι εφικτή με την τρέχουσα τεχνολογική υποδομή (THOMAS 2010).

Οι Patel *et al.* (PATEL *et al.* 2013) για τον εντοπισμό αλληλεπιδράσεων γονιδιώματος-περιβάλλοντος στον ΣΔ τύπου 2, επέλεξαν προς διερεύνηση 18 κοινούς πολυμορφισμούς που αντιστοιχούν στις περιοχές του γονιδιώματος που συσχετίστηκαν με τον ΣΔ τύπου 2. Για την επιλογή των περιβαλλοντικών παραγόντων, διεξήγαγαν μία μελέτη σάρωσης του περιβάλλοντος (Environment-Wide Association Study, EWAS) – ανάλογη με τις μελέτες σάρωσης του γονιδιώματος (GWAS) – κατά την οποία εντοπίστηκαν 5 περιβαλλοντικοί παράγοντες, οι οποίοι συσχετίστηκαν σημαντικά με τον ΣΔ τύπου 2 (PATEL *et al.* 2010). Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου έγκειται στο γεγονός ότι εξακολουθεί να επιτρέπει την δημιουργία ερευνητικών υποθέσεων, ενώ παράλληλα περιορίζει και τον αριθμό των ελέγχων που διεξάγονται (PATEL *et al.* 2013).

Μία πρόσφατη μελέτη στον 9p21 γενετικό τόπο, την χρωμοσωμική περιοχή που έχει διερευνηθεί εκτεταμένα, ταυτοποίησε αλληλεπιδράσεις μεταξύ διατροφικών προτύπων και του rs2383206 στον καρδιαγγειακό κίνδυνο. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι άτομα ομόζυγα για το αλληλόμορφο κινδύνου (από την μελέτη INTERHEART) που ακολουθούσαν λιγότερο υγιεινή διαίτα 1,6- 2,0 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο για έμφραγμα του μυοκαρδίου (Do *et al.* 2011).

Σε ότι αφορά τις αλληλεπιδράσεις γονιδίων-διατροφής στις κλινικές εκδηλώσεις της αθηροσκληρωτικής διαδικασίας υπάρχει μόνο μία μελέτη σε ανθρώπους που εξετάζει την επίδραση μεταξύ του γονιδίου του εκκινητή της 5-λιποξυγενάσης (5-lipoxygenase promoter ALOX5) και της διατροφικής πρόσληψης στο πάχος του μέσου χιτώνα της καρωτιδικής αρτηρίας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι αυξημένη πρόσληψη ω-6 λιπαρών οξέων σχετίζονταν με αυξημένο πάχος του μέσου χιτώνα της καρωτιδικής αρτηρίας μόνο μεταξύ των ατόμων με δύο σπάνια αλληλόμορφα του ALOX5 gene. Από την άλλη η πρόσληψη ω-3 λιπαρών οξέων

σχετίζονταν αντίστροφα με το πάχος του μέσου χιτώνα της καρωτιδικής αρτηρίας μόνο μεταξύ των ατόμων με δύο σπάνια αλληλόμορφα του. Τα αποτελέσματα αυτά προτείνουν για πρώτη φορά ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ γονιδίων φλεγμονωδών διαδικασιών και δίαιτας μπορεί να οδηγήσουν στην έναρξη της αθηροσκλήρωσης στους ανθρώπους, ευρήματα που χρήζουν επαλήθευσης (Dwyer *et al.* 2004).

Σημαντικές αλληλεπιδράσεις γενετικών-διατροφικών παραγόντων έχουν αναφερθεί για το APOE γονίδιο. Συχνή κατανάλωση ελαιολάδου και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων συσχετίστηκε με αύξηση των τριγλυκεριδίων και της LDL-χοληστερόλης στους φορείς του E4 αλληλομόρφου. Αντίθετα, όταν η ανάλυση διεξήχθη μόνο σε άντρες φάνηκε ότι η υψηλή πρόσληψη ελαιολάδου σχετίζονταν με χαμηλά επίπεδα LDL-χοληστερόλης στους φορείς του E2 αλληλομόρφου. Επίσης, υψηλή πρόσληψη πολυακόρεστων λιπαρών οξέων σχετίστηκε με μειωμένα τριγλυκερίδια σε άντρες και γυναίκες φορείς του E2 αλληλομόρφου (de Andrade *et al.* 2010). Σε ότι αφορά τα κορεσμένα λιπαρά οξέα τα άτομα φορείς του E4 αλληλομόρφου βρισκόταν σε υψηλότερο κίνδυνο για στεφανιαία νόσο για πρόσληψη κορεσμένων λιπαρών οξέων μεγαλύτερη του 10% της ενεργειακής πρόσληψης σε σχέση με τα άτομα του E2 αλληλομόρφου (Corella *et al.* 2011).

Συνοψίζοντας, οι προαναφερθείσες μελέτες αποτελούν παραδείγματα μεθοδολογιών, οι οποίες θα μπορούσαν να ακολουθηθούν για την διερεύνηση αλληλεπιδράσεων γενετικών-περιβαλλοντικών παραγόντων χωρίς να βασίζονται σε κάποια ερευνητική υπόθεση (πχ βιολογική συσχέτιση του γονιδίου). Αν και πολλές μελέτες σάρωσης του γονιδιώματος στερούνται περιβαλλοντικών δεδομένων, πολλές από αυτές βασίζονται σε επιδημιολογικές μελέτες ή μελέτες ασθενών μαρτύρων, στις οποίες έχει γίνει και καταγραφή των περιβαλλοντικών δεδομένων και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την εύρεση αλληλεπιδράσεων γενετικών – περιβαλλοντικών παραγόντων (Thomas 2010). Οι περισσότερες προσπάθειες, ωστόσο, μέχρι στιγμής βασίζονται κυρίως στη διερεύνηση αλληλεπιδράσεων μεταξύ γνωστών περιοχών του γονιδιώματος για κάποιο φαινότυπο, όπως αυτές έχουν προκύψει από μετα- αναλύσεις μελετών σάρωσης του γονιδιώματος, με διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες – συνήθως περιβαλλοντικούς παράγοντες κινδύνου για τον εκάστοτε φαινότυπο.

Ο ανθρώπινος πληθυσμός είναι αρκετά μεγάλος και σχετικά παλαιός, έχει υποστεί έναν αριθμό διαστρωματώσεων και διαιρέσεων, ενώ ταυτόχρονα τα άτομα στις υποδιαιρέσεις αυτές είναι

αναμεμιγμένα και έχουν εγκατασταθεί σε περιβάλλοντα που διαφέρουν πολύ μεταξύ τους. Εάν γενετικά διαφορετικοί μεταξύ τους μηχανισμοί έχουν ως αποτέλεσμα σχετικά όμοιες κλινικές εκδηλώσεις της ασθένειας, τότε διαφορετικές γενετικές παραλλαγές, καθεμία από τις οποίες επιδρά στους διαφορετικούς αυτούς μηχανισμούς, πιθανά να είναι διανεμημένες σε ολόκληρο τον ανθρώπινο πληθυσμό. Κάποιες από αυτές τις παραλλαγές θα έχουν επιβλαβείς επιδράσεις στα άτομα (πιθανά μόνο σε κάποιους υπό-πληθυσμούς), είτε επειδή συνυπάρχουν στα άτομα αυτά με άλλα γονίδια που προδιαθέτουν στην ασθένεια, είτε επειδή τα άτομα αυτά εκτίθενται σε περιβάλλοντα που επιδεινώνουν ή ενισχύουν την επιβλαβή επίδραση του γονιδίου. Η μίξη αυτή των γονιδίων μπορεί να δημιουργήσει τόσο μεγάλη γενετική ετερογένεια, ώστε άτομα με παρόμοιες κλινικές εκφράσεις της ασθένειας να έχουν διαφορετικά δυσλειτουργικά γονίδια ως αιτία για τα κοινά αυτά κλινικά χαρακτηριστικά.

Η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός των γονιδίων που επηρεάζουν τις σύνθετες ασθένειες αποτελεί μια δύσκολη διαδικασία, αφού η συμβολή ενός μόνο γονιδίου στην ασθένεια μπορεί να επισκιάζεται από άλλα γονίδια. Επιπρόσθετα, κάθε παράγοντας που συμβάλλει στην ασθένεια πιθανά να παρουσιάζει εξάρτηση από το πλαίσιο μέσα στο οποίο βρίσκεται, καθώς η επιβλαβής του επίδραση μπορεί να είναι ορατή μόνο παρουσία άλλων παραγόντων.

Οι σύνθετες διαταραχές δεν ακολουθούν ακριβώς τους μεντελικούς νόμους λόγω πολύπλοκων παραγόντων, όπως τα φαινοαντίγραφα, η γενετική ετερογένεια, η ποικιλία στην κλινική έκφραση, νέες μεταλλάξεις, η ατελής διεισδυτικότητα, η πολυγονιδιακή κληρονομικότητα και οι περιβαλλοντικοί κίνδυνοι. Μόνο ένας συνδυασμός των γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων κινδύνου οδηγούν στην εμφάνιση του φαινοτύπου, ενώ δεν είναι ξεκάθαρο πόσοι και πόσο ισχυροί είναι οι επιμέρους παράγοντες αυτοί.

Όμως, όλοι αυτοί οι πιθανοί συνδυασμοί περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων στον κάθε υπό μελέτη πληθυσμό συμβάλλουν στον θόρυβο. Ο θόρυβος αυτός μειώνει τη στατιστική ισχύ που απαιτείται για την ανίχνευση πραγματικών συσχετίσεων ή αναλύσεων σύνδεσης στον υπό μελέτη πληθυσμό

Επομένως, σε ετερογενείς πληθυσμούς απαιτούνται μεγάλα δείγματα για να επιτευχθεί η απαιτούμενη στατιστική ισχύς για την ανίχνευση γενετικών παραγόντων κινδύνου. Αντίθετα, σε περισσότερο ομοιογενείς πληθυσμούς όπως οι απομονωμένοι, στους οποίους η περιβαλλοντική ποικιλότητα είναι χαμηλότερη και η γενετική σύνθεση αναμένεται να είναι

λιγότερο πολύπλοκη λόγω του φαινομένου της αρχής του ιδρυτή, βελτιώνεται ο λόγος του σήματος προς το θόρυβο. Επιπλέον, το φαινόμενο της ανισορροπίας σύνδεσης στους πληθυσμούς αυτούς αποτελεί ένα πολύτιμο εργαλείο για τη χαρτογράφηση γονιδίων. Για τους παραπάνω λόγους, το δείγμα από έναν απομονωμένο πληθυσμό που απαιτείται για την επίτευξη στατιστικής ισχύος είναι πολύ μικρότερο (HEUTINK AND OOSTRA 2002).

## 1.5. Γενετικά απομονωμένοι πληθυσμοί

Ο πληθυσμός στην Γη αριθμεί περίπου 7.5 δισεκατομμύρια άτομα και υποδιαιρείται σε πολλούς διακριτούς υποπληθυσμούς, οι μεγαλύτεροι από τους οποίους ονομάζονται κοινών φυλές. Ως φυλή ορίζεται μία μεγάλη πληθυσμιακή ομάδα, η δεξαμενή γονιδίων της οποίας διαφέρει από εκείνη των άλλων ομάδων. Υπάρχουν τρεις μείζονες φυλετικές υποδιαιρέσεις, η καυκάσια φυλή, η μαύρη φυλή και η ασιατική φυλή, κάθε μία από τις οποίες αποτελείται από αναρίθμητες γενετικά διαφορετικές υποομάδες. Παρόλο που τα χρωμοσώματα και οι γενετικοί τύποι είναι ταυτόσημα σε όλα τα μέλη του ανθρώπινου είδους, οι συχνότητες των αλληλομόρφων σε πολλούς γενετικούς τόπους ποικίλουν σημαντικά ανάμεσα στις διάφορες πληθυσμιακές ομάδες. Συνηθέστερο είναι τα διάφορα αλληλόμορφα να έχουν διαφορετικές συχνότητες σε διαφορετικούς πληθυσμούς.

Βάση των γενετικών διαφορών μεταξύ των φυλών και των υποπληθυσμών τους είναι οι μεταλλάξεις. Την εγκαθίδρυση γενετικών διαφορών μεταξύ πληθυσμιακών ομάδων επέτρεψαν η επιλογή ευνοϊκών μεταλλάξεων, ως απόκριση σε συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες, ή η τυχαία επιβίωση ορισμένων ουδέτερων ή και επιβλαβών μεταλλάξεων σε συνδυασμό με έναν βαθμό αναπαραγωγικής απομόνωσης μεταξύ των ομάδων. Η μετανάστευση των πληθυσμών και τα γεωγραφικά εμπόδια που διαχώριζαν τις περιοχές όπου κατοικούσαν οδήγησαν σε γεωγραφική απομόνωση και δημιουργία περισσότερων διακριτών φυλών, με ιδιαίτερα σύνολα γονιδιακών συχνοτήτων η κάθε μία. Συχνά υφίστανται τεράστιες διαφορές στις συχνότητες των αλληλομόρφων ανάμεσα στις πληθυσμιακές ομάδες. Οι διαφορές αυτές εντοπίζονται τόσο σε αλληλόμορφα που προκαλούν γενετικές ασθένειες όσο και σε επιλεκτικά ουδέτερους γενετικούς δείκτες, όπως είναι ορισμένες ομάδες αίματος, πολυμορφισμοί πρωτεϊνών και πολυμορφισμοί του DNA (THOMPSON 1991).

### 1.5.1. Νόμος Hardy-Weinberg

Η θεμελιώδης αρχή Hardy-Weinberg αναφέρει πως οι γονότυποι κατανέμονται ανάλογα με τις συχνότητες των ατομικών αλληλομόρφων στον πληθυσμό και παραμένουν σταθεροί από γενεά σε γενεά και αποτελεί ακρογωνιαίο λίθο της πληθυσμιακής γενετικής. Ο νόμος αυτός πήρε το

όνομά του προς τιμήν του George Hardy, ενός Άγγλου μαθηματικού, και του Wilhelm Weinberg, ενός Γερμανού γιατρού, οι οποίοι διατύπωσαν τη συγκεκριμένη θεωρία ανεξάρτητα ο ένας από τον άλλο, το 1908. Πιο συγκεκριμένα, εάν  $p$  είναι η συχνότητα του ενός αλληλομόρφου και  $q$  η συχνότητα του άλλου, τότε οι συχνότητες των τριών συνδυασμών των αλληλομόρφων είναι  $p^2 + 2pq + q^2$ , αναλογίες που δεν μεταβάλλονται από γενεά σε γενεά. Στην γενεά που θα προέλθει από τυχαίες διασταυρώσεις σε έναν πληθυσμό στον οποίο οι γονότυποι βρίσκονται σε αναλογίες  $p^2 : 2pq : q^2$ , οι γονότυποι εμφανίζονται με τις ίδιες σχετικές αναλογίες. Εκείνη την εποχή θεωρήθηκε από ορισμένους παράξενο το ότι ένα επικρατές αλληλόμορφο δεν αυξάνει αυτομάτως τη συχνότητά του έως ότου αντικαταστήσει τον αντίστοιχο υπολειπόμενο, ή το ότι ένα επιβλαβές υπολειπόμενο αλληλόμορφο, δε μειώνει αυτόματα τη συχνότητά του μέχρι να εξαλειφθεί τελείως από τον πληθυσμό. Ο νόμος Hardy-Weinberg ερμήνευσε τα αίτια της σταθερότητας των γονιδιακών συχνοτήτων (ΑΛΑΧΙΩΤΗΣ 1992).

### **1.5.2. Παράγοντες που διαφοροποιούν τις γονιδιακές συχνότητες**

Ένας πληθυσμός που διέπεται από τα βασικά χαρακτηριστικά του νόμου, θεωρείται ότι βρίσκεται σε ισορροπία Hardy-Weinberg. Η αρχή των Hardy-Weinberg αποτελεί μία μόνο απλή προσέγγιση, επειδή ισχύει απόλυτα μόνο κάτω από ορισμένες ειδικές καταστάσεις που σπάνια συναντώνται στους ανθρώπινους πληθυσμούς. Ο νόμος ισχύει επακριβώς μόνο για μεγάλους πληθυσμούς, στους οποίους υπάρχει τυχαία σύζευξη και στους οποίους δεν υπάρχει επιλογή, μετάλλαξη ή μετανάστευση (THOMAS AND GELEHRTER 2003). Συγκεκριμένα, οι παραδοχές που πρέπει να ισχύουν ώστε να ισχύει και η αρχή Hardy-Weinberg είναι οι εξής:

1. Ο πληθυσμός χαρακτηρίζεται από τυχαίες διασταυρώσεις, με μικρή ή καθόλου ομοιοτυπική σύζευξη ή ενδογαμία.
2. Ο υπό μελέτη γενετικός τύπος εμφανίζει σταθερό ρυθμό μετάλλαξης, και όσα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα χάνονται λόγω θανάτου, αντικαθίστανται από νέες μεταλλάξεις.
3. Δεν υπάρχει επιλογή υπέρ ή κατά ενός συγκεκριμένου φαινοτύπου. Όλοι οι γονότυποι ενός γενετικού τύπου είναι εξίσου βιώσιμοι.

4. Ο πληθυσμός είναι αρκετά μεγάλος ώστε να μην λαμβάνει χώρα τυχαία διακύμανση των συχνοτήτων λόγω τυχαίας μεταβίβασης κάποιου γονοτύπου.

5. Δεν έχει αλλάξει τίποτα στη δομή του πληθυσμού λόγω μετανάστευσης, η οποία μπορεί βαθμιαία να μεταβάλλει τις γονιδιακές συχνότητες, αυξάνοντας ή μειώνοντας τον αριθμό των ατόμων με κάποιο συγκεκριμένο γονότυπο.

Απόκλιση από οποιαδήποτε από τις συνθήκες αυτές μπορεί να μεταβάλει τη συχνότητα των αλληλομόρφων σε ένα πληθυσμό και να οδηγήσει σε αύξηση ή μείωση των συχνοτήτων των αλληλομόρφων από τη μία γενεά στην άλλη.

#### *1.5.2.1. Μη τυχαίες διασταυρώσεις*

Στους ανθρώπινους πληθυσμούς η σύζευξη είναι σπάνια τυχαία. Είναι συνήθως επιλεκτική, επειδή τα μέλη ενός ειδικού υποπληθυσμού επιλέγουν να ζευγαρώσουν με μέλη του ίδιου πληθυσμού, λόγω φυλετικών, εθνικών, θρησκευτικών ή άλλων κριτηρίων. Πιο συγκεκριμένα, παράγοντες που υπεισέρχονται στην επιλογή συντρόφου είναι η στρωμάτωση, η ομοιοτυπική σύζευξη, η συνεκτική διασταύρωση και η συγγένεια εξ αίματος.

#### *1.5.2.2. Τυχαία γενετική παρέκκλιση*

Επειδή ο αριθμός των ατόμων (ομοζυγωτικών ή ετεροζυγωτικών) ενός πληθυσμού μπορεί να ποικίλει από γενιά σε γενιά, οι γονιδιακές συχνότητες θα κυμαίνονται γύρω από μια μέση τιμή. Αν ο πληθυσμός είναι πολύ μεγάλος η εκτροπή (παρέκκλιση) στην επόμενη γενιά (που δημιουργείται συνήθως με πολλά άτομα) θα είναι μικρή. Αν όμως ο πληθυσμός είναι μικρός τότε κάποια αλλαγή στο μέγεθος των γαμετών της επόμενης γενιάς θα επηρεάσει δραστικά τις γονιδιακές του συχνότητες με αποτέλεσμα να εξαφανιστεί τελικά στις επόμενες γενιές (που θα δημιουργούνται με μικρό αριθμό ατόμων) ένα από τα αλληλόμορφα ενός γενετικού τόπου και να σταθεροποιηθεί το άλλο. Η διαδικασία αυτή δε γίνεται μέσα σε μία γενιά αλλά εάν σε κάθε γενιά υπάρχει αλλαγή του μεγέθους του πληθυσμού είναι επόμενο να συνοδεύεται και από αλλαγή των γονιδιακών συχνοτήτων ενός ή πολλών πολυμορφικών γενετικών τόπων. Τέτοιες τυχαίες αλλαγές στις γονιδιακές συχνότητες με πληθυσμούς με περιορισμένο μέγεθος αποτελούν το φαινόμενο της γενετικής εκτροπής και συνεχίζονται και στις επόμενες γενεές. Έτσι

σε μικρούς πληθυσμούς όλα τα γονίδια τείνουν προς τον ομοαλληλισμό, με αποτέλεσμα να μειώνεται η ετεροζυγωτία και η ποικιλότητα.

Ένα παράδειγμα τροποποίησης των γονιδιακών συχνοτήτων λόγω γενετικής εκτροπής παρατηρείται σε έναν απομονωμένο πληθυσμό της Πενσυλβανίας που δημιουργήθηκε τον 18ο αι. όταν μια θρησκευτική ομάδα Γερμανών μετανάστευσε στην Αμερική και παραμένει αναπαραγωγικά απομονωμένη από τότε. Η συχνότητα του Α γονιδίου του ΑΒΟ συστήματος είναι περίπου 60% στον πληθυσμό αυτό ενώ οι συχνότητες σε Αμερική και Γερμανία είναι 45% και 40%, αντίστοιχα.

#### *1.5.2.3. Στρωμάτωση*

Στρωματοποιημένος πληθυσμός είναι εκείνος που περιέχει έναν αριθμό υποομάδων, οι οποίες έχουν παραμείνει διακριτές σε μεγάλο βαθμό κατά τη διάρκεια της εξέλιξης. Για παράδειγμα, ο πληθυσμός των ΗΠΑ είναι στρωματοποιημένος σε δύο μεγάλες υποομάδες, αυτή των Καυκάσιων και των Μαύρων. Στην Ελλάδα η στρωμάτωση αυτή μπορεί να ευθύνεται στις θρησκευτικές πεποιθήσεις. Για παράδειγμα σπάνια συμβαίνουν γάμοι μεταξύ Χριστιανών και Μουσουλμάνων, γεγονός που διαχωρίζει τους δύο πληθυσμούς.

#### *1.5.2.4. Αρχή του ιδρυτή*

Όταν ένας πληθυσμός δημιουργείται από πολύ λίγα μόνο άτομα ενός μεγάλου πληθυσμού τότε βρισκόμαστε σε μια ακραία περίπτωση δράσης της γενετικής εκτροπής. Η περίπτωση αυτή ονομάστηκε από τον Mayr, ιδρυτική αρχή (founder principle). Το αν τα γονίδια που μεταφέρονται με αυτόν τον τρόπο στον καινούριο πληθυσμό είναι βλαβερά ή ωφέλιμα είναι θέμα τύχης. Έτσι η διάσπαση ενός πληθυσμού σε πολύ μικρούς έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μεγαλύτερων γενετικών διαφορών μεταξύ τους παρά αν από τον αρχικό πληθυσμό δημιουργούνταν μεγάλοι πληθυσμοί.

Ένα αξιοσημείωτο παράδειγμα είναι μια φυλή Ινδιάνων του Μεξικού, οι Ramah Navaho, οι οποίοι πιστεύεται ότι είναι απόγονοι 29 μόνο ιδρυτικών μελών. Αλλά και από αυτή τη μικρή ομάδα ιδρυτικών μελών η γενετική συμβολή στο σημερινό πληθυσμό δεν είναι ίση. Δηλαδή, 6

ιδρυτικά μέλη συνέβαλαν γενετικά για παραπάνω από το 50% των απογόνων, από τα οποία τα 3 για το 35% και το 1 για το 14%.

#### **1.5.2.5. Συγγένεια εξ αίματος**

Η προϋπόθεση για την ισχύ του νόμου Hardy-Weinberg που αναφέρεται στο ότι οι διασταυρώσεις γίνονται τυχαία σε ένα μεγάλο πληθυσμό αφορά μια ιδανική κατάσταση. Στην πραγματικότητα συνήθως τα μέλη του πληθυσμού διασταυρώνονται με άλλα κοντινά τους. Αυτό βέβαια εξαρτάται από το πόσο μεγάλη είναι η περιοχή που κατέχει ο πληθυσμός και από την κινητικότητα των ατόμων. Με αυτή την έννοια ένας μεγάλος πληθυσμός υποδιαιρείται σε μικρότερους υποπληθυσμούς. Οι γονιδιακές συχνότητες σε μικρούς πληθυσμούς τείνουν να εκτραπούν λόγω γαμετικής δειγματοληπτικής απόκλισης με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση του ενός ή του άλλου αλληλομόρφου ενός γενετικού τύπου. Έτσι μειώνεται η γενετική διασπορά στους μικρούς πληθυσμούς καθώς και η ολική ετεροζυγωτία. Επειδή σε ενδιάμεσες γονιδιακές συχνότητες οι ετεροζυγώτες βρίσκονται σε μεγαλύτερη αναλογία, επηρεάζονται περισσότερο από τη γενετική εκτροπή. Κάτι ανάλογο μπορεί να συμβεί εξαιτίας του περιορισμένου μεγέθους του πληθυσμού ή της περιοχής επειδή γίνονται διασταυρώσεις μεταξύ συγγενικών ατόμων. Τέτοιες διασταυρώσεις μπορεί να μην αλλάζουν δραστικά τις ολικές γονιδιακές συχνότητες, αλλά αυξάνουν τις συχνότητες των ομοζυγωτών. Όταν οι διασταυρώσεις γίνονται μεταξύ συγγενικών ατόμων έχουμε ενδογαμία. Επειδή τα συγγενικά άτομα έχουν έναν ή περισσότερους κοινούς προγόνους, ο βαθμός συγγένειας ενός ατόμου καθορίζεται από το ποσοστό των γονιδίων που είναι κοινά στους γονείς του. Η γενετική σπουδαιότητα της ενδογαμίας οφείλεται στο ότι αυξάνει την ομοζυγωτία, με αποτέλεσμα υπολειπόμενα γονίδια να υπάρχουν σε ομοζυγωτία σε μεγαλύτερη συχνότητα στους πληθυσμούς αυτούς παρά στους μεγάλους παμμικτικούς, μια κατάσταση που μπορεί να μεταβάλλει τη γενετική δομή των πληθυσμών οδηγώντας σε εξελικτικές διαδικασίες (ΑΛΑΧΙΩΤΗΣ 1992).

#### **1.5.3. Παραδείγματα απομονωμένων πληθυσμών**

Για πολιτικούς, θρησκευτικούς ή γεωγραφικούς λόγους, ένα υποσύνολο του πληθυσμού μπορεί να απομονωθεί φυσικά ή/και γεωγραφικά από τον υπόλοιπο πληθυσμό, δημιουργώντας μια

γενετικά απομονωμένη κοινωνία. Τα ιδρυτικά μέλη μίας τέτοιας απομονωμένης κοινωνίας μπορεί τυχαία να είναι φορείς μεταλλαγμένων αλληλομόρφων για ορισμένα υπολειπόμενα χαρακτηριστικά, οπότε η συχνότητα των αλληλομόρφων στον μικρό αυτό πληθυσμό είναι πολύ υψηλότερη εάν συγκριθεί με το γενικό πληθυσμό. Τέτοιου είδους απομονωμένοι πληθυσμοί συνηθίζουν να έχουν παρόμοιο τρόπο ζωής, πανομοιότυπες διατροφικές συνήθειες και ζουν στο ίδιο φυσικό περιβάλλον με αποτέλεσμα να μειώνεται η περιβαλλοντική ποικιλότητα. Συχνά οι πληθυσμοί αυτοί προέρχονται από ένα μικρό αριθμό ιδρυτών, ενώ ακολουθεί μία περίοδος γενετικής απομόνωσης, κατά την οποία το φαινόμενο της γενετικής παρέκκλισης μπορεί να λαμβάνει χώρα. Επίσης, η αύξηση στο μέγεθος του πληθυσμού συνέβη κυρίως με αύξηση του ίδιου πληθυσμού και όχι λόγω μετανάστευσης.

Κάθε γενετικά απομονωμένος πληθυσμός έχει τη δική του δημογραφική ιστορία, με διαφορετικά μειονεκτήματα και πλεονεκτήματα (HEUTINK AND OOSTRA 2002). Για παράδειγμα, πολύ γηραιοί πληθυσμοί (>100 γενιές) με περιορισμένη αύξηση του μεγέθους του πληθυσμού, όπως είναι οι Saami στη βόρεια Σκανδιναβία φέρουν πολύ παλιές (γενικές) μεταλλάξεις ή νέες, ειδικές για τον πληθυσμό αυτό μεταλλάξεις. Λόγω της μακράς περιόδου απομόνωσης, έχει συμβεί γενετική παρέκκλιση σε σημαντικό βαθμό. Από τη χαρτογράφηση γονιδίων στους πληθυσμούς αυτούς γενικά αναμένονται μικρές περιοχές ανισορροπίας σύνδεσης επειδή έχουν συμβεί πολλές μειωτικές διαιρέσεις στα χρωμοσώματα των ιδρυτών. Ωστόσο, εάν στους πληθυσμούς αυτούς συμβαίνει ενδογαμία σε σημαντικό βαθμό και μόνο ένας περιορισμένος αριθμός χρωμοσωμάτων ιδρυτών ήταν παρών, ίσως είναι δύσκολο να διαχωριστούν οι απλότυποι που συνδέονται με την ασθένεια.

Σε νεότερους απομονωμένους πληθυσμούς ( $\leq 100$  γενιές) όπως αυτοί που υπάρχουν στην Φινλανδία, την Ισλανδία, τη Σαρδηνία και την Ιαπωνία με μειωμένη μετανάστευση και ανάπτυξη, η ετερογένεια μπορεί να είναι ακόμα πιο μειωμένη λόγω γενετικής παρέκκλισης πριν από μια πιο πρόσφατη αύξηση του πληθυσμού, αλλά η μείωση αυτή είναι λιγότερο ισχυρή από τους γηραιότερα απομονωμένους πληθυσμούς. Επιπλέον, η ανισορροπία σύνδεσης θα είναι παρούσα σε ελαφρώς πιο εκτεταμένες περιοχές του γονιδιώματος. Οι πληθυσμοί αυτοί έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη σπάνιων μεντελικών διαταραχών, αλλά για τις συχνές διαταραχές ο αριθμός των ιδρυτών μάλλον είναι σχετικά μεγάλος με αποτέλεσμα την παρουσία πολλών διαφορετικών αλληλομόρφων στον πληθυσμό. Το πρόβλημα αυτό μπορεί να παρακαμφθεί με τη χρήση εκτεταμένων γενεαλογικών μελετών, κάτι που είναι ιδιαίτερα εφικτό για παράδειγμα

στην Ισλανδία, όπου είναι διαθέσιμα τα γενεαλογικά αρχεία από την αρχική εγκατάσταση. Με τον τρόπο αυτό γενετικοί τόποι για ασθένειες όπως το AEE (GREYARSDOTTIR *et al.* 2002) και η αρτηριοσκληρίωση (GUDMUNDSSON *et al.* 2002) έχουν αναγνωριστεί.

Η φυλή των Amish είναι μία ομάδα Ελβετών Χριστιανών που μετανάστευσαν στην Πενσυλβανία πριν 150-200 χρόνια, γνωστή για τον ιδιαίτερο τρόπο ζωής τους όσον αφορά στο ντύσιμο, τις συνήθειες αλλά και την αποποίηση των διευκολύνσεων που προσφέρει η μοντέρνα τεχνολογία. Παρατηρείται σε σημαντικό βαθμό η ενδογαμία, καθώς τα μέλη της κοινότητας επιλέγουν συντρόφους αποκλειστικά μέσα από αυτήν. Κρατούν με μεγάλη αυστηρότητα αρχεία των γενεαλογικών τους δέντρων και τείνουν να δημιουργούν μεγάλες οικογένειες (ARCOS-BURGOS AND MUENKE 2002). Στον πληθυσμό των Amish εμφανίζονται σε μεγαλύτερη συχνότητα ορισμένες γενετικές και μεταβολικές διαταραχές. Ένα παράδειγμα είναι το αυτοσωμικό υπολειπόμενο σύνδρομο Ellis-van Creveld, που χαρακτηρίζεται από νανισμό και κοντά άκρα, πολυδακτυλία και συγγενή καρδιοπάθεια. Η συχνότητα του αλληλομόρφου του συνδρόμου αυτού στον πληθυσμό των Amish είναι 0.07 αλλά είναι εξαιρετικά χαμηλή στον γενικό πληθυσμό (McKUSICK 2000). Έχουν ανιχνευτεί περίπου 39 κληρονομήσιμες διαταραχές στον πληθυσμό αυτό (MORTON *et al.* 2003).

Ακόμη ένα παράδειγμα πιθανού αποτελέσματος της αρχής του ιδρυτή εμφανίζεται στη φυλή των Afrikaner στη Νότιο Αφρική, και είναι η υψηλή συχνότητα της ποικιλόχρου πορφυρίας, μιας αυτοσωμικής επικρατούς νόσου, που χαρακτηρίζεται από οξείς κοιλιακούς πόνους, αδυναμία και δερματικά προβλήματα που προκαλούνται από τον ήλιο. Η ασθένεια εμφανίζεται σε 1 άτομο ανά 400 (THOMAS AND GELEHRTER 2003).

Ασθένειες όπως η Tay-Sachs, Canavan, Niemann-Pick, Gaucher, Familiar Sydaautonomia, σύνδρομο Boom, κυστική ίνωση, αναιμία Fanconi είναι κάποια από τα γενετικά νοσήματα που εμφανίζονται στον Εβραϊκό πληθυσμό των Ashkenazi σε μεγαλύτερη συχνότητα από ότι στον γενικό πληθυσμό, που αποτελεί άλλο ένα παράδειγμα του αποτελέσματος της «αρχής του ιδρυτή» (CHARROW 2004).

Τέλος, σχετικά πρόσφατα απομονωμένοι πληθυσμοί (<20 γενιές), όπως ο πληθυσμός της Κεντρικής Κοιλιάδας της Κόστα Ρίκα, τα απομονωμένα νησιά του Ατλαντικού Ωκεανού Τριστάν ντα Κούνια, ο πληθυσμός των Hutterites στη Βόρεια Αμερική, μικροί απομονωμένοι πληθυσμοί στην Ολλανδία και στον Καναδά έχουν αναγνωριστεί με εκθετική αύξηση πληθυσμού κατά τις

τελευταίες γενεές. Στους πληθυσμούς αυτούς ο αριθμός των μεταλλάξεων περιορίζεται στον σημερινό πληθυσμό. Μεγάλες περιοχές ανισορροπίας σύνδεσης έχουν εντοπιστεί για τη διπολική διαταραχή και για τον ΣΔ II στους πληθυσμούς αυτούς.

#### **1.5.4. Πλεονεκτήματα απομονωμένων πληθυσμών**

Το Πρόγραμμα Χαρτογράφησης του Ανθρώπινου Γονιδιώματος ολοκληρώθηκε το 2003. Στόχος ήταν να ανακαλυφθεί η ύπαρξη και η θέση 20000-25000 γονιδίων και να διερευνηθεί η αλληλουχία 3 δισεκατομμυρίων βάσεων που συνθέτουν το ανθρώπινο γονιδίωμα. Βέβαια η βιολογική λειτουργία ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων παραμένει ακόμα άγνωστη. Οι περισσότερες σημαντικές ασθένειες που ακολουθούν τη Μεντελική κληρονομικότητα έχουν διερευνηθεί. Είναι βέβαια σημαντική η συνεχής ανίχνευση νέων γονιδίων που συνδέονται με μονογονιδιακές διαταραχές ώστε να υπάρξει κατανόηση των βιοχημικών μονοπατιών που οδηγούν στην εμφάνιση μιας νόσου (HEUTINK AND OOSTRA 2002). Σε διαταραχές που ακολουθούν τη Μεντελική κληρονομικότητα, οι μεταλλάξεις των γονιδίων είναι κατά κανόνα απλές και μονογονιδιακές και η μελέτη τους μπορεί να γίνει σε οικογενειακές μελέτες. Για πιο σύνθετες διαταραχές, οι γενετικές επιδράσεις είναι λιγότερο ξεκάθαρες και μέχρι στιγμής, η πρόοδος στην αναγνώριση των πολυμορφισμών που ευθύνονται γι' αυτές είναι απογοητευτική. Λίγοι μόνο γενετικοί παράγοντες κινδύνου έχουν ανιχνευθεί.

Ο κύριος λόγος γι' αυτή την περιορισμένη επιτυχία είναι ότι δεν είναι γνωστός ο τρόπος περιγραφής της γενετικής των σύνθετων διαταραχών (TERWILLIGER AND WEISS 1998). Προσεγγίσεις που έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για τις Μεντελικές διαταραχές δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πιο πολύπλοκες νόσους, που δεν ακολουθούν ακριβώς τους νόμους του Μέντελ, καθώς παράγοντες όπως η γενετική ετερογένεια, νέες μεταλλάξεις, πολυγονιδιακή κληρονομικότητα, ελλιπής διεισδυτικότητα και περιβαλλοντικοί παράγοντες κινδύνου υπεισέρχονται και καθορίζουν την έκφραση του γονότυπου, με αποτέλεσμα να είναι πολύ δύσκολος ο καθορισμός της θέσης και της λειτουργίας ενός γενετικού τόπου.

Ο βαθμός στον οποίο οι γενετικοί παράγοντες κινδύνου συμβάλλουν στην έναρξη των κοινών ασθενειών είναι σε μεγάλο ποσοστό άγνωστη. Οι μετρήσεις της κληρονομικότητας και του σχετικού αποδοτέου κινδύνου μετρούν την επίδραση του συνόλου των γενετικών παραγόντων

κινδύνου, και επίσης περιλαμβάνουν τα αποτελέσματα των περιβαλλοντικών παραγόντων κινδύνου και των αλληλεπιδράσεών τους. Δεδομένου ότι οι μετρήσεις αυτές φανερώνουν το αποτέλεσμα όλων των γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων δεν είναι σαφές το πόσο ισχυρή είναι η επίδραση των επιμέρους παραγόντων κινδύνου (OBER *et al.* 2000).

Σε γενικές γραμμές, η στατιστική ισχύς για την ανίχνευση μίας συσχέτισης μειώνεται από τον «θόρυβο» που δημιουργεί το σύνολο των άλλων παραγόντων και χαρακτηριστικών του πληθυσμού υπό μελέτη. Ο «θόρυβος» αυτός προκαλείται από το συνδυασμό γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων που χαρακτηρίζουν τον πληθυσμό. Επομένως, σε ετερογενείς πληθυσμούς, λήψη πληροφοριών από μεγάλο αριθμό δείγματος είναι αναγκαία ώστε να εξασφαλισθεί ικανοποιητική στατιστική ισχύς για την ανίχνευση των γενετικών παραγόντων που ευθύνονται για τους διάφορους φαινότυπους. Πληθυσμοί με μεγαλύτερη ομοιογένεια είναι οι γενετικά απομονωμένοι πληθυσμοί και έχουν προταθεί ως μία πιθανή εναλλακτική λύση που επιτρέπει τη λήψη μικρότερου δείγματος για την εξαγωγή συσχετίσεων, καθώς οι διακυμάνσεις των περιβαλλοντικών παραγόντων είναι πολύ μικρότερες όπως επίσης και του γενετικού υπόβαθρου, δεδομένης της ύπαρξης της αρχής του ιδρυτή. Αποτέλεσμα είναι η μείωση του «θορύβου» που προκαλούν οι πολλαπλές αλληλεπιδράσεις και η εξαγωγή αποτελεσμάτων με μεγαλύτερη στατιστική σημαντικότητα, χρησιμοποιώντας πολύ μικρότερο αριθμό δείγματος (HEUTINK AND OOSTRA 2002).

Η χρήση γενετικά απομονωμένων πληθυσμών δεν είναι πρόσφατη. Η μελέτη απομονωμένων πληθυσμών είναι πολύ χρήσιμη στην χαρτογράφηση σπάνιων νόσων με υπολειπόμενο χαρακτήρα. Βέβαια πολλοί ερευνητές πιστεύουν πως θα μπορούσε να είναι λύση και για τη μελέτη σύνθετων διαταραχών. Απομονωμένοι πληθυσμοί έχουν σχετικά ομοιόμορφο γενετικό υπόβαθρο. Ακόμη, τα άτομα τέτοιων πληθυσμών έχουν έναν παρόμοιο τρόπο που ζουν και τρέφονται καθώς όλοι δέχονται τις ίδιες περιβαλλοντικές επιδράσεις και έχουν ίδια κουλτούρα και συνήθειες. Συχνά, οι πληθυσμοί αυτοί έχουν ιδρυθεί από μικρό αριθμό ατόμων που απομονώθηκαν γεωγραφικά, πολιτισμικά και γενετικά, με αποτέλεσμα να συμβεί γενετική παρέκκλιση και η αύξηση του πληθυσμού να γίνει λόγω ανάπτυξης του ίδιου του πληθυσμού χωρίς τη συνεισφορά της μετανάστευσης. Επιπρόσθετα, φαίνεται και από αρχεία γενεαλογικών δέντρων με τα οποία μπορεί να καθοριστεί ο συντελεστής συγγένειας, πως σε γενετικά απομονωμένους πληθυσμούς ο συντελεστής αυτός είναι υψηλότερος, σε σύγκριση με

ετερογενείς πληθυσμούς. Η μεγάλη συγγένεια βοηθάει επίσης στην ανίχνευση κοινών παραγόντων κινδύνου με υπολειπόμενο χαρακτήρα.

Η χρήση των απομονωμένων πληθυσμών για τη μελέτη Μεντελικών και σύνθετων νόσων είναι μακρά στην ιστορία της χαρτογράφησης του γονιδιώματος. Τα οφέλη είναι πολλά. Μεταξύ αυτών συμπεριλαμβάνεται (PELTONEN *et al.* 2000; BOURGAIN AND GENIN 2005; LOWE *et al.* 2009):

- Ομοιογένεια των περιβαλλοντικών παραγόντων κινδύνου σε σύγκριση με πληθυσμούς που έχουν εξαπλωθεί με αποτέλεσμα να είναι πιο εμφανής η επίδραση του γενετικού υπόβαθρου και
- Το αποτέλεσμα της αρχής του ιδρυτή αλλά και της περιορισμένης μετανάστευσης, με αποτέλεσμα να είναι μικρότερη η «δεξαμενή γονιδίων» και να εμφανίζεται μικρή γενετική ποικιλομορφία,
- Η δυνατότητα συλλογής δεδομένων και μελέτης μεγάλων γενεαλογικών δέντρων, γεγονός που διευκολύνει τη ανάλυση των γενετικών συσχετίσεων,
- Το φαινόμενο της ενδογαμίας είναι πολύ συχνό σε απομονωμένους πληθυσμούς και η έλλειψη τυχαίας σύζευξης, με αποτέλεσμα να μην ισχύει η ισορροπία Hardy-Weinberg.
- Εμφανίζεται σε μεγάλο ποσοστό ανισορροπία σύνδεσης, σε μεγαλύτερες περιοχές του γονιδιώματος σε σχέση με άλλους πληθυσμούς, αυξάνοντας τη στατιστική δύναμη των συσχετίσεων για την ανίχνευση γονιδίων.

#### **1.5.5. Ανισορροπία σύνδεσης**

Ανισορροπία σύνδεσης σημαίνει ότι η συχνότητα εμφάνισης μαζί κάποιων μεταλλάξεων ή πολυμορφισμών δεν ακολουθεί την αναμενόμενη συχνότητα, υπάρχει δηλαδή διαφορά σε αυτό που θεωρητικά υπολογίζεται και σε αυτό που παρατηρείται. Για παράδειγμα, όταν συγκεκριμένες μεταλλάξεις σε γονίδια από διαφορετικά χρωμοσώματα βρίσκονται μαζί με μεγάλη συχνότητα σε μια ομάδα ασθενών, αυτό σημαίνει ότι ο συνδυασμός τους παρέχει κάποια γενετική επιβάρυνση που εκφράζεται και στο φαινότυπο. Η ανισορροπία σύνδεσης διακόπτεται από τον ανασυνδυασμό και την μετατροπή γονιδίων και εξαρτάται από την ηλικία και την ιστορία της μετάλλαξης καθώς και από το μέγεθος και τη δομή του πληθυσμού.

Η Ανισορροπία σύνδεσης είναι ένα πολύ ισχυρό εργαλείο στη χαρτογράφηση γονιδίων όταν ο πληθυσμός που μελετάται καλύπτει δύο προϋποθέσεις. Πρώτον, ο πληθυσμός πρέπει να προέρχεται από ένα σχετικά μικρό αριθμό ιδρυτών και δεύτερον, η αύξηση του πληθυσμού θα πρέπει να μην έχει προκύψει από μετανάστευση. Πολλοί ανθρώπινοι πληθυσμοί πληρούν τις προϋποθέσεις αυτές, αλλά είναι επιθυμητά και τα εξής χαρακτηριστικά:

Ο πληθυσμός θα πρέπει να είναι αρκετά μεγάλος, ώστε να μπορούν να βρεθούν τα απαιτούμενα άτομα για τη μελέτη. Για χαρτογράφηση ακόμα μεγαλύτερης ανάλυσης, θα πρέπει να έχει περάσει αρκετός χρόνος από την ίδρυση του πληθυσμού, ώστε να έχουν πραγματοποιηθεί σημαντικές διασταυρώσεις. Αντίστροφα, για χαρτογράφηση χαμηλότερης ανάλυσης για μεγαλύτερες γενετικές αποστάσεις θα πρέπει να έχουν μεσολαβήσει λίγες γενιές από την ίδρυση του πληθυσμού. Ιδανικό θα ήταν αν υπήρχαν γενεαλογικά αρχεία, ώστε να επιτρέπεται η εύρεση της καταγωγής των ατόμων που ζουν σήμερα. Επίσης, θα ήταν χρήσιμο να υπάρχουν αρχεία που να δείχνουν τη γενέτειρα των προγόνων, ώστε να μειωθούν πιθανές ομοιότητες και ανομοιότητες της καταγωγής. Οι προϋποθέσεις αυτές καλύπτονται σε ικανοποιητικό βαθμό από ορισμένους απομονωμένους πληθυσμούς (DE LA CHAPELLE AND WRIGHT 1998).

Μία από τις σημαντικότερες εφαρμογές του μηχανισμού της Ανισορροπίας σύνδεσης είναι η μελέτη σπάνιων ασθενειών σε απομονωμένους πληθυσμούς, καθώς με τον τρόπο αυτό έχουν εντοπιστεί γονίδια που προκαλούν σοβαρές ασθένειες, όπως η κυστική ίνωση, η νόσος του Huntington, η νόσος Wilson και η αιμοχρωμάτωση. Επίσης, δεδομένα που προκύπτουν μέσω του μηχανισμού της Ανισορροπίας σύνδεσης χρησιμεύουν σε μελέτες για τον προσδιορισμό της προέλευσης γενετικών τόπων ή αλληλομόρφων σε έναν πληθυσμό ή τον καθορισμό αλληλομόρφων που βρίσκονται κάτω από θετική επιλογή. Για παράδειγμα, έχουν εντοπιστεί αλληλόμορφα που προσδίδουν αντίσταση στο AIDS και στη μαλάρια, καθώς και στις δύο περιπτώσεις υπάρχουν εκτεταμένοι συντηρημένοι απλότυποι γύρω από τα αλληλόμορφα που προσδίδουν αντίσταση στις ασθένειες αυτές (ABECASIS *et al.* 2005).

Πέρα από τις σημαντικές αυτές εφαρμογές, όπως η μελέτη του ρυθμού του ανασυνδυασμού, η αναγνώριση γονιδίων σε απομονωμένους πληθυσμούς και η επίδειξη της φυσικής επιλογής, το σημαντικότερο όφελος από τη μελέτη της ανισορροπίας σύνδεσης είναι η ανίχνευση της σχέσης ανάμεσα σε συνήθεις πολυμορφισμούς και κοινές ασθένειες.

### 1.5.6. Μελέτες σάρωσης γονιδιώματος σε απομονωμένους πληθυσμούς

Το μοντέλο της ανισορροπίας σύνδεσης για τις περισσότερες περιοχές του γονιδιώματος είναι γνωστό και οι πλατφόρμες γονοτύπησης των μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs) έχουν σχεδιαστεί για να ανιχνεύουν έναν περιορισμένο αριθμό απλοτύπων, υποθέτοντας ότι θα πρέπει να εντοπίζουν τις περισσότερες από τις πιο συχνές παραλλαγές ανάμεσα στις περιοχές του γονιδιώματος. Έτσι, η δομή της ανισορροπίας σύνδεσης του κάθε προς μελέτη πληθυσμού καθορίζει τον αριθμό των SNPs που απαιτούνται για πλήρη κάλυψη σε μια μελέτη σάρωσης γονιδιώματος.

Σε μελέτες σάρωσης γονιδιώματος με απομονωμένους πληθυσμούς απαιτούνται λιγότεροι δείκτες σε σχέση με το γενικό πληθυσμό, όπως φάνηκε για παράδειγμα σε μελέτες σε Φιλανδούς ή στην Κόστα Ρίκα, όπου απαιτούνται 30% λιγότεροι δείκτες. Σε έναν απομονωμένο πληθυσμό υπάρχει μικρότερος αριθμός απλοτύπων που διαμοιράζονται στον πληθυσμό και αναμένεται να ανιχνεύονται οι απλότυποι αυτοί που φέρουν περισσότερα σπάνια αλληλόμορφα. Αντίθετα, στο γενικό πληθυσμό με σημαντικά μεγαλύτερο αριθμό απλοτύπων για ένα συγκεκριμένο γενετικό τόπο, το αιτιολογικό αλληλόμορφο είναι πιο πιθανό να βρίσκεται σε πολλούς απλότυπους, εξασθενίζοντας το σήμα σε τέτοιο βαθμό που αποκλείει την αναγνώρισή του.

Η ανίχνευση γονιδίων που ευθύνονται για συχνές σύνθετες ασθένειες δεν απαιτεί πάντα μεγάλο αριθμό δείγματος από τον παγκόσμιο πληθυσμό. Δείγματά ατόμων από γενετικά απομονωμένους πληθυσμούς έχει αποδειχθεί πως είναι εξαιρετικά χρήσιμα στην ταυτοποίηση σπάνιων υπολειπόμενων γονιδίων. Σημαντικά ευρήματα γενετικών τόπων έχουν προέλθει από την σάρωση του γονιδιώματος μικρού αριθμού ατόμων από τέτοιους πληθυσμούς και γίνεται πια ξεκάθαρο πως η μελέτη απομονωμένων πληθυσμών που προέρχονται από περιορισμένο αριθμό ιδρυτών είναι πολύ ωφέλιμη (KRISTIANSSON *et al.* 2008).

Ένα από τα πιο εντυπωσιακά παραδείγματα από τη χρήση της γενεαλογίας αποτελεί η μελέτη deCODE στην Ισλανδία, όπου μελετήθηκε το γενετικό και ιατρικό ιστορικό άνω του 50% ενός πληθυσμού. Παρόλο που ο πληθυσμός της Ισλανδίας δεν πληροί τα κριτήρια των απομονωμένων πληθυσμών παρατηρείται σημαντική γενετική παρέκκλιση με αποτέλεσμα να

έχει μειωθεί σημαντικά η γενετική ποικιλομορφία σε σύγκριση με την υπόλοιπη Ευρώπη (HELGASON *et al.* 2003).

Με την πραγματοποίηση μελετών σάρωσης του γονιδιώματος έχει προκύψει ένας εντυπωσιακός αριθμός μεταβλητών που συνεισφέρουν στην εξέλιξη σύνθετων ασθενειών. Ανάμεσα σε αυτές συμπεριλαμβάνονται γενετικοί τόποι που σχετίζονται με το έμφραγμα μυοκαρδίου και το ΑΕΕ (ALOX5AP και η χρωμοσωμική περιοχή 9p21), ο ΣΔ τύπου 2 (TCF7L2 και CDKAL1), η κολπική μαρμαρυγή (4q25) και ο καρκίνος του προστάτη (2p15 και Χρ11.22). Εκτός από τα γονίδια που σχετίζονται με ασθένειες, ο πληθυσμός της Ισλανδίας έχει αποκαλύψει γονίδια που συνεισφέρουν σε έναν αριθμό σύνθετων χαρακτηριστικών, όπως το ενήλικο ανάστημα (αριθμός γενετικών τόπων συμπεριλαμβανομένου και του ZBTB28) όπως επίσης το χρώμα του δέρματος και των μαλλιών (SLC24A4, KITLG, TYR, OCA2, MC1R και 6p25.3). Η έρευνα deCODE συνεχίζεται ώστε να ανιχνευτούν περισσότερα γονίδια που συνεισφέρουν στην προδιάθεση για περισσότερες από 50 ασθένειες.

Ένας ακόμη απομονωμένος πληθυσμός με αποδεδειγμένη αξία στη χαρτογράφηση γονιδίων είναι ο πληθυσμός της Φινλανδίας, όπου γονίδια για 35 μονογονιδιακές ασθένειες εμφανίζονται σε μεγαλύτερη συχνότητα σε σύγκριση με άλλους πληθυσμούς (PELTONEN *et al.* 1999). Χαρακτηριστικά του πληθυσμού της Φινλανδίας έχουν ωφελήσει στη μελέτη της σχιζοφρένειας (1;11)(q42.1;q14.3). Να σημειωθεί ότι η πρώτη μετατόπιση που σχετίστηκε με τη σχιζοφρένεια βρέθηκε σε μία μεγάλη οικογένεια Σκοτσέζων (NIMGAONKAR *et al.* 1992) και η απόδειξη πως ευθύνεται το γονίδιο DISC1 βρέθηκε σε οικογένειες Φιλανδών με διαγνωσμένη σχιζοφρένεια (EKELUND *et al.* 2001). Μεγάλα γενεαλογικά δένδρα από οικογένειες Φιλανδών επίσης χρησιμοποιήθηκαν επιτυχώς στη μελέτη της οικογενούς υπερχοληστερολαιμίας και ανιχνεύθηκε το γονίδιο USF1 ως παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση της νόσου (PAJUKANTA *et al.* 2004). Η συσχέτιση αυτή επιβεβαιώθηκε και από μελέτες σε άλλους πληθυσμούς.

Μελέτες για τον ΣΔ τύπου 2 και την παχυσαρκία έχουν χρησιμοποιήσει τον πληθυσμό των Pima Indians (BAIER AND HANSON 2004). Μελέτες για το άσθμα έγιναν στον πληθυσμό των Hutterites, στις βόρειες Ηνωμένες Πολιτείες και τον δυτικό Καναδά (OBER *et al.* 2008). Γονίδια που συμβάλλουν σε νευροψυχιατρικές διαταραχές βρέθηκαν σε μελέτες σε απομονωμένους πληθυσμούς στην Κολομβία και την Κοιλιάδα της Κόστα Ρίκα, τους Basques στην Ισπανία, τον πληθυσμό των νησιών Kosrae, και Palau, των Bulgarian gypsies και μικρών απομονωμένων πληθυσμών στη Σουηδία και το Ισραήλ. Άλλοι ξεχωριστοί πληθυσμοί που χρησιμοποιήθηκαν σε

πρόσφατες μελέτες σύνθετων ασθενειών συμπεριλαμβάνουν τους Γάλλους Καναδούς, τους Εβραίους Εσκενάζυ, τους Μενονίτες, τους Άμις και πληθυσμούς από την Ολλανδία (KRISTIANSSON *et al.* 2008).

Το σημαντικό εύρημα όλων αυτών των μελετών είναι πως οι γενετικοί πολυμορφισμοί που αναγνωρίζονται σε απομονωμένους πληθυσμούς, εμφανίζονται και σε μεγάλης κλίμακας δείγματα πληθυσμού αποκαλύπτοντας νέα μονοπάτια στη διαδικασία των ασθενειών αυτών (KRISTIANSSON *et al.* 2008).

Το πρόβλημα που προκύπτει από τις μελέτες GWA που γίνονται σε απομονωμένους πληθυσμούς είναι ότι το ισχυρό LD που αρχικά βοήθησε στην ταυτοποίηση του γενετικού τύπου της ασθένειας τελικά δυσκολεύει τις προσπάθειες να ανιχνευτεί ο ακριβής γενετικός τύπος που ευθύνεται μέσα σε ένα σύνολο πολυμορφισμών που σχετίζονται με αυτόν λόγω LD. Η σύγκριση των δεδομένων από μελέτες GWA μεταξύ διαφορετικών απομονωμένων πληθυσμών θα μπορούσε να βοηθήσει στον ακριβή προσδιορισμό των μεταβλητών (KRISTIANSSON *et al.* 2008).

Συμπερασματικά, η μελέτη σάρωσης του γονιδιώματος (GWA) απομονωμένων πληθυσμών είναι κατά 30% λιγότερο σύνθετη και επιτρέπει την κάλυψη ολόκληρου το γονιδιώματος με μεγαλύτερη ευκολία και μικρότερο αριθμό κενών. Σε έναν απομονωμένο πληθυσμό υπάρχουν πιθανώς λιγότεροι απλότυποι διασκορπισμένοι στον πληθυσμό και σε συνδυασμό με το υψηλό LD μειώνει ακόμη περισσότερο την ποικιλομορφία στο γονιδιώμα τους, μειώνοντας ακόμη περισσότερο τον αριθμό των μεταβλητών που χρειάζεται να μελετηθούν για τη διερεύνηση της αιτιολογίας των σύνθετων ασθενειών καθώς και το μέγεθος του δείγματος που απαιτείται για να επιτευχθούν ικανοποιητικά επίπεδα στατιστικής ισχύος μιας και ούτως ή άλλως οι πληθυσμοί αυτοί είναι σχετικά μικροί οπότε μόνο δείγματα μέτριου μεγέθους μπορούν να ληφθούν (CIULLO *et al.* 2006).

## 1.6. Σκοπός της μελέτης

Συνοψίζοντας, η ΚΝ είναι το αποτέλεσμα της συνδυαστικής επίδρασης πολλαπλών γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Αν και η αύξηση του επιπολασμού της οφείλεται αναμφισβήτητα στην επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων, οι γενετικοί παράγοντες φαίνεται να είναι υπεύθυνοι για την 'αντίδραση' του κάθε ατόμου σε αυτούς τους περιβαλλοντικούς παράγοντες (Loos 2012a). Οι μελέτες σάρωσης του γονιδιώματος έχουν εντοπίσει περισσότερους από 100 κοινούς πολυμορφισμούς οι οποίοι συσχετίζονται με την ΚΝ (HINDORFF *et al.*). Ωστόσο, τόσο η επίδραση του κάθε πολυμορφισμού χωριστά όσο και η αθροιστική τους επίδραση στον κίνδυνο των ασθενειών είναι μέτρια έως μικρή. Οι αλληλεπιδράσεις γενετικών-περιβαλλοντικών παραγόντων ίσως εξηγούν ένα μέρος του καρδιαγγειακού κινδύνου και ίσως συμβάλουν στην καλύτερη κατανόηση της γενετικής του βάσης.

Όμως, όλοι αυτοί οι πιθανοί συνδυασμοί περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων στον κάθε υπό μελέτη πληθυσμό συμβάλλουν στον θόρυβο. Ο θόρυβος αυτός μειώνει τη στατιστική ισχύ που απαιτείται για την ανίχνευση πραγματικών συσχετίσεων στον υπό μελέτη πληθυσμό

Επομένως, σε ετερογενείς πληθυσμούς απαιτούνται μεγάλα δείγματα για να επιτευχθεί η απαιτούμενη στατιστική ισχύς για την ανίχνευση γενετικών παραγόντων κινδύνου. Αντίθετα, σε περισσότερο ομοιογενείς πληθυσμούς όπως οι απομονωμένοι, στους οποίους η περιβαλλοντική ποικιλότητα είναι χαμηλότερη και η γενετική σύνθεση αναμένεται να είναι λιγότερο πολύπλοκη λόγω του φαινομένου της αρχής του ιδρυτή, βελτιώνεται ο λόγος του σήματος προς το θόρυβο. Επιπλέον, το φαινόμενο της ανισορροπίας σύνδεσης στους πληθυσμούς αυτούς αποτελεί ένα πολύτιμο εργαλείο για τη χαρτογράφηση γονιδίων. Για τους παραπάνω λόγους, το δείγμα από έναν απομονωμένο πληθυσμό που απαιτείται για την επίτευξη στατιστικής ισχύος είναι πολύ μικρότερο

Για τους λόγους αυτούς, η παρούσα μελέτη αποσκοπεί να διερευνήσει αν η έκθεση σε συγκεκριμένους διατροφικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες, που έχουν μελετηθεί για την επίδρασή τους στην ΚΝ, τροποποιεί την επίδραση ήδη γνωστών ή/και νέων κοινών πολυμορφισμών σε καρδιομεταβολικούς δείκτες και στον εντοπισμό αλληλεπιδράσεων

γενετικών-διατροφικών παραγόντων σε καρδιομεταβολικούς δείκτες σε απομονωμένους πληθυσμούς. Πιο αναλυτικά, οι επιμέρους ερευνητικοί στόχοι περιλαμβάνουν:

1. την αποτύπωση του επιπολασμού υπέρβαρου/παχυσαρκίας και άλλων παραγόντων καρδιαγγειακού κινδύνου στους πληθυσμούς της μελέτης,
2. την διερεύνηση της επίδρασης διατροφικών παραγόντων σε καρδιομεταβολικούς δείκτες,
3. τη διερεύνηση για διατροφικά πρότυπα που συσχετίζονται με καρδιομεταβολικούς δείκτες σε κάθε πληθυσμό,
4. την ανίχνευση νέων περιοχών του γονιδιώματος που συσχετίζονται με καρδιομεταβολικούς φαινοτύπους καθώς και την εκτίμηση της επίδρασης ήδη γνωστών πολυμορφισμών σε καρδιομεταβολικούς δείκτες
5. την διερεύνηση αλληλεπιδράσεων γενετικών – περιβαλλοντικών παραγόντων σε καρδιομεταβολικούς δείκτες

## **2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ**

### **2.1. Πληθυσμοί και δείγμα της μελέτης**

Η συγκεκριμένη έρευνα διεξάγεται στα πλαίσια της μελέτης HELIC- (<http://www.helic.org/>), αντικείμενο της οποίας αποτελεί ο πληθυσμός του Ορεινού Μυλοποτάμου της Κρήτης και ο πληθυσμός των Πομάκων στην Ροδόπη.

#### **2.1.1. Ο πληθυσμός του Ορεινού Μυλοπόταμου**

Οι κάτοικοι του ορεινού Μυλοπόταμου κατοικούν από τα πανάρχαια χρόνια, σχεδόν απομονωμένοι, στις ψηλές και δυσπρόσιτες κορφές του Ψηλορείτη. Έχουν καταφέρει να διατηρήσουν στο πέρασμα των αιώνων αδιάφθορα τα ήθη, τα έθιμα, τις παραδόσεις και τον ανθρωπολογικό τους χαρακτήρα. Η γλώσσα τους παραμένει αναλλοίωτη στην πάροδο του χρόνου, καθώς στην ιδιότυπη διάλεκτό τους περιλαμβάνονται έως και σήμερα, ατόφιες λέξεις της αρχαίας ελληνικής. Η ιδιαίτερη δωρική προφορά, βαρέα και ευθεία, παρουσιάζεται χαρακτηριστική ειδικότερα στα "λάμδα" και "ρο", διατηρώντας αρχαίες ελληνικές λέξεις, κυρίως ποιμενικές, όρκους κτλ. Οι περισσότεροι κάτοικοι, διατηρούν τα επώνυμά τους χωρίς την κατάληξη -ακης η οποία απαντάται στο υπόλοιπο νησί. Ασχολούνται κυρίως με την κτηνοτροφία, διατηρώντας σημαντικό αριθμό αιγοπροβάτων ενώ χαρακτηριστική παρουσιάζεται επίσης η βιοτεχνία και η παραδοσιακή υφαντουργία της, στην οποία απαντάται, έως και στις μέρες μας, η χρήση αργαλειού. Η απομόνωση τους πάνω στα βουνά ήταν ο σοβαρότερος λόγος μη ανανέωσης του γονιδιώματός τους.

##### **2.1.1.1. Δήμος Ανωγείων**

Ο Δήμος Ανωγείων βρίσκεται στα ανατολικά του νομού Ρεθύμνης και έχει σαν έδρα τα Ανώγεια. Πρόκειται για ορεινό δήμο στους πρόποδες του Ψηλορείτη. Σύμφωνα με την απογραφή του 2011 έχει συνολικά 3.105 κατοίκους. Τα Ανώγεια απέχουν 52 χλμ. από το Ρέθυμνο, 36 χλμ. από

το Ηράκλειο και βρίσκονται σε υψόμετρο 700-790 μ. στη ράχη του υψώματος που ονομάζεται Αρμί (Κορυφογραμμή). Στο δήμο Ανωγείων υπάγεται επίσης και το χωριό Σίσαρχα.

Το όνομά τους οφείλεται στην τοποθεσία που είναι χτισμένα δηλ. σε ανώγειο μέρος (άνω+γαία). Είναι επίσης γνωστά ως Αξικανώγεια (Ξικανώγεια) ή Μεγάλα Ανώγεια. Η κωμόπολη των Ανωγείων αποτελείται από τους οικισμούς Αρμί, Μεσοχωριό ή Μεσοχωριά, Περαχώρι, Μετόχι και Συνοικισμό.

Τα Ανώγεια πρωτοκατοικήθηκαν ήδη πριν το 1182, οπότε μοιράστηκε η Κρήτη στα δώδεκα αρχοντόπουλα του Βυζαντίου και παραχωρήθηκαν ως φέουδο στην οικογένεια των Φωκάδων - αργότερα Καλλέργηδων. Τότε απέκτησαν και την ονομασία "Βασιλικά Ανώγεια", καθώς ανήκαν στους βασιλικούς άρχοντες. Έτσι, διαφαίνεται ότι τα Ανώγεια, υπήρχαν και κατά την Β' βυζαντινή περίοδο, πριν τη Βενετοκρατία.

Η συνολική έκταση του Δήμου είναι 102.632 στρέμματα τα οποία στο μεγαλύτερο μέρος χαρακτηρίζονται ως δασικές εκτάσεις, διαθέτοντας ορισμένα από τα μεγαλύτερα δασικά συμπλέγματα (κυρίως από πρίνους) της Κρήτης. Οι φυσικές και πολιτιστικές ιδιαιτερότητες του Δήμου Ανωγείων αποτελούν τη βάση για την ισόρροπη και αειφόρο ανάπτυξη που επιχειρείται, σε συνδυασμό με την εκμετάλλευση των παραδοσιακών παραγωγικών δραστηριοτήτων της περιοχής.

#### *2.1.1.2. Δήμος Μυλοποτάμου*

Ο Δήμος Μυλοποτάμου προέκυψε από την συνένωση των προϋπαρχόντων δήμων Γεροποτάμου και Κουλούκωνα και της κοινότητας Ζωνιανών. Η έκταση του νέου Δήμου είναι 360,703 τ.χλμ και ο πληθυσμός του 15.886 κάτοικοι σύμφωνα με την απογραφή του 2011. Έδρα του δήμου είναι το Πέραμα. Ο δήμος Μυλοποτάμου βρίσκεται στο Βορειοανατολικό τμήμα του Νομού Ρεθύμνης και στη βόρεια πλευρά του βρέχεται από το Κρητικό Πέλαγος. Το μεγαλύτερο βουνό της Κρήτης ο Ψηλορείτης δεσπόζει στη νοτιοανατολική πλευρά της επαρχίας ενώ στη νότια πλευρά βρίσκεται το βουνό Κουλούκωνας.

Το σπήλαιο Ιδαίον Άντρο όπου γεννήθηκε, σύμφωνα με τη μυθολογία, ο πατέρας των θεών Δίας, βρίσκεται στην επαρχία αυτή. Η καλλιέργεια της ελιάς και τα αμπέλια είναι η κύρια ενασχόληση των κατοίκων της περιοχής ενώ είναι ιδιαίτερα αναπτυγμένη η κτηνοτροφία. Η

ονομασία της επαρχίας της προέρχεται από τον ποταμό Μυλοπόταμο που τη διαπερνά από ανατολικά προς δυτικά. Την ονομασία αυτή την πήρε σχετικά πρόσφατα εξαιτίας της παρουσίας πολλών νερόμυλων οι οποίοι δούλευαν με την ροή του.

### *2.1.1.3. Κοινότητα Ζωνιανών*

Τα Ζωνιανά είναι ορεινό χωριό και μοναδικός οικισμός της ομώνυμης Κοινότητας του δήμου Μυλοπόταμου στην ανατολική πλευρά του νομού Ρεθύμνης. Το χωριό απέχει 43 χιλιόμετρα από το Ηράκλειο και 52 από το Ρέθυμνο. Βρίσκονται στον Ψηλορείτη (όρος Ίδη) σε υψόμετρο 630 μέτρα και σε κοντινή απόσταση από τα γνωστά Ανώγεια. Κατά την απογραφή του 2011 το χωριό είχε 1.358 κατοίκους, οι οποίοι ασχολούνται κυρίως με την κτηνοτροφία και τη γεωργία. Οι θρύλοι και οι παραδόσεις που το συνοδεύουν χάνονται στα βάθη των αιώνων.

### **2.1.2. Ο πληθυσμός των Πομάκων**

Οι Πομάκοι είναι μία πληθυσμιακή ομάδα της παραμεθορίου της Ελλάδας, που κατοικεί στη Θράκη, στον ορεινό όγκο της Ροδόπης εδώ και χιλιάδες χρόνια. Η οροσειρά της Ροδόπης βρίσκεται στο μεγαλύτερο μέρος της μέσα στη Βουλγαρία και οι περισσότεροι Πομάκοι ζουν εκεί ενώ η πλειοψηφία τους στην Ελλάδα βρίσκεται στο νομό Ξάνθης. Ο πληθυσμός των Πομάκων υπολογίζεται γύρω στις 350.000, από αυτούς όμως μόνο οι 36.000 (απογραφή 1991) κατοικούν στην Ελλάδα (GHODSEE 2009). Πιο συγκεκριμένα, το 63%, δηλαδή 23.000 κατοικούν στο νομό Ξάνθης, το 30,6%, δηλαδή 11.000 στο νομό Ροδόπης, και 5,6%, δηλαδή 2.000 στο νομό Έβρου. Οι υπόλοιποι βρίσκονται στη Βουλγαρία (ΘΕΟΦΑΝΗΣ).

#### *2.1.2.1. Η προέλευση της λέξης «Πομάκος»*

Πολλοί προσπάθησαν να ερμηνεύσουν ετυμολογικά τη λέξη «Πομάκοι» με επικρατέστερη άποψη αυτή των Βουλγάρων, σύμφωνα με την οποία η προέλευση της λέξης οφείλεται στο ρήμα *romagam* που σημαίνει βοηθώ. Οι Βούλγαροι αποκαλούσαν τους Πομάκους «πομαγκάστ» δηλαδή βοηθούς, υποτελείς, βασανισμένους, δούλους, χωρίς δική τους ατομική και συλλογική οντότητα. Κατά μία ελληνική εκδοχή, προέρχεται από το αρχαιοελληνικό

ιππομάχος. Ήταν αυτοί που απάρτιζαν το φοβερό ιππικό του Μ. Αλεξάνδρου. Κατά μία άλλη ελληνική ερμηνεία, η λέξη προέρχεται από το ελληνικό Πομάξ (πότης) εξαιτίας της παλιάς συνήθειας των Θρακών να πίνουν πολύ. Οι ίδιοι όμως οι Πομάκοι τη θεωρούν προσβλητική και υβριστική ονομασία και θέλουν να αυτοαποκαλούνται «Αχριάν», δηλαδή «Αγριάνες», όνομα αρχαίας θρακικής φυλής, που κατοικούσε στα άγονα κι ορεινά μέρη του όρους Σκόμιο και στη Βορειοδυτική Ροδόπη και που λέγονταν κι αλλιώς «Αγρίες», «Αγραίοι» κι «Αγριείς» (ΕΘΝΟΛΟΓΙΑ 1997).

#### *2.1.2.2. Η καταγωγή και η γλώσσα των Πομάκων*

Η καταγωγή των Πομάκων παραμένει αμφιλεγόμενη. Τόσο η Βουλγαρία όσο και η Ελλάδα αλλά και η Τουρκία την έχουν διεκδικήσει, παρουσιάζοντας διαφορετικά ιστορικά στοιχεία. Για την προέλευση των Πομάκων έχουν διατυπωθεί οι παρακάτω θεωρίες:

1. Είναι απόγονοι του Παιονικού φύλου των Αγριάνων. Η άποψη αυτή είναι η επικρατέστερη μεταξύ των Ελλήνων ιστορικών.
2. Είναι αρχαίο θρακικό φύλο, το οποίο διαδοχικά εκρωμαΐστηκε, εκσλαβίστηκε και εξισλαμίστηκε.
3. Είναι εξισλαμισμένοι Βούλγαροι. Η άποψη αυτή είναι η επικρατέστερη μεταξύ των Βουλγάρων ιστορικών. Υποστηρίζεται η άποψη ότι λόγω της Ελληνικής πολιτικής οι Πομάκοι τα τελευταία 50 χρόνια αποκτήσει την Τουρκική συνείδηση ενώ η Βουλγάρικη συνείδηση έχει χαθεί.
4. Είναι Τούρκοι που λόγω της γειννίας με Σλάβους έμαθαν τη Βουλγαρική γλώσσα. Η άποψη αυτή είναι η επικρατέστερη μεταξύ των τούρκων ιστορικών.

#### **2.1.3. Δείγμα της Μελέτης**

Το δείγμα της μελέτης μας προέρχεται από δύο πληθυσμούς γεωγραφικά και γενετικά απομονωμένους στην περιοχή της Ελλάδας. Ο ένας βρίσκεται στα χωριά του Ορεινού Μυλοπόταμου στην Κρήτη και ο άλλος είναι ο πληθυσμός των Πομάκων στα χωριά της Ροδόπης,

στη Θράκη. Η συλλογή δειγματος εδράζονταν στα Κέντρα Υγείας Ανωγείων και Εχίνου, αντίστοιχα.

Έγκριση για την πραγματοποίηση της συγκεκριμένης μελέτης λήφθηκε από την Επιτροπή Βιοηθικής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, από τη Διοίκηση του Γενικού Νοσοκομείου Ρεθύμνου στην οποία υπάγεται το Κέντρο Υγείας Ανωγείων και από την Διοίκηση του Γενικού Νοσοκομείου Ξάνθης, στην οποία υπάγεται το Κέντρο Υγείας Εχίνου.

Προϋπόθεση για να συμμετέχει κάποιος στη μελέτη ήταν να είναι άνω των 18 ετών και να έχει τουλάχιστον έναν γονέα με καταγωγή από τον Ορεινό Μυλοπόταμο Όλοι οι συμμετέχοντες έχουν υπογράψει συμφωνητικό εθελοντικής συμμετοχής στην έρευνα.

Για κάθε εθελοντή υπάρχει ένας κωδικός. Στο πρώτο μέρος του κωδικού αναγράφονται τα αρχικά γράμματα της μελέτης: HELIC ANOGIA και HELIC POMAKOCHORIA, δηλαδή HA και HP, αντίστοιχα, και ακολουθεί ένας τετραψήφιος αριθμός, ξεκινώντας από 0001. Έτσι σχηματίζονται οι κωδικοί HA-0001, HA-0002, κ.λπ. και HP-0001, HP-0002, κ.λπ. Οι κωδικοί αυτοί χρησιμοποιούνται για την εισαγωγή των δεδομένων και σε όλα τα δοχεία και μικροδοχεία για τις βιοχημικές εξετάσεις, αιματολογικές εξετάσεις, δείγματα ορού, πλάσματος, λευκών αιμοσφαιρίων και DNA έφεραν την ίδια κωδικοποίηση. Όλα τα ηλεκτρονικά αρχεία περιέχουν τον κωδικό του κάθε εθελοντή και όχι το όνομά του και τα προσωπικά του στοιχεία. Το αρχείο όπου αναγράφεται η πλήρης ταυτότητα των εθελοντών υπάρχει αποθηκευμένο μόνο σε ηλεκτρονικό υπολογιστή του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, το άνοιγμα του οποίου απαιτεί ειδικό κωδικό, ώστε να προστατευτεί η ταυτότητα των εθελοντών.

## **2.2. Ανθρωπομετρία**

Η ανθρωπομετρία είναι μία τεχνική στην οποία χρησιμοποιούνται απλά όργανα μέτρησης για να περιγράψουν την ανθρώπινη μορφή. Η παρακολούθηση των αλλαγών στη σύσταση του σώματος είναι απαραίτητη για την κατανόηση και τον καθορισμό μηχανισμών με τους οποίους οι περιβαλλοντικοί παράγοντες επηρεάζουν τη σύσταση των επιμέρους συστατικών του σώματος. Υπάρχουν πολλά είδη ανθρωπομετρικών δεικτών όπως το Βάρος, το Ύψος, ο ΔΜΣ, η Περιφέρεια Μέσης, ο Λόγος του Δείκτη προς τον Παράμεσο και άλλοι. Μέσα από τους

κατάλληλους δείκτες μπορεί να εκτιμηθεί για παράδειγμα η διατροφική κατάσταση ή ακόμη και ο κίνδυνος που διατρέχει ένα άτομο ή ένας πληθυσμός για την εμφάνιση συγκεκριμένων χρόνιων νοσημάτων.

Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκαν ακριβή όργανα, τα οποία ήταν φορητά, ώστε να μπορούν να μεταφέρονται στα διαφορετικά σημεία συλλογής των δειγμάτων. Ο εξεταζόμενος καλείται να αφαιρέσει τα υποδήματα και τυχόν βαρύ ρουχισμό, ώστε οι μετρήσεις να είναι πιο ακριβείς.

### **2.2.1. Βάρος, Ύψος και ΔΜΣ**

Για τη μέτρηση του βάρους χρησιμοποιήθηκε αναλογικός ζυγός, ο οποίος βρισκόταν σε οριζόντια επιφάνεια και πριν τη μέτρηση η ένδειξη ήταν ίση με το μηδέν. Ο εθελοντής ανεβαίνει στο ζυγό, με ελαφρύ ρουχισμό και χωρίς παπούτσια και παραμένει ακίνητος.

Η μέτρηση του όρθιου ύψους γίνεται μετά από τοποθέτηση του εθελοντή σε οριζόντια πλατφόρμα, με την πλάτη να βρίσκεται σε κάθετη θέση, χωρίς παπούτσια, 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 εφάπτονταν στον κατακόρυφο άξονα του αναστημόμετρου. Επίσης, ζητείται από τους εξεταζόμενους να τοποθετήσουν το κεφάλι τους στη θέση Frankfort Horizontal Plane, δηλαδή σε θέση ώστε η ευθεία γραμμή μεταξύ του χαμηλότερου σημείου του οφθαλμικού κόγχου και της χονδρικής προβολής μπροστά από το εξωτερικό άνοιγμα του πτερυγίου του αυτιού να είναι οριζόντια. Σε αυτή τη θέση οι εξεταζόμενοι έπαιρναν μία αργή και βαθιά εισπνοή ώστε να εκταθεί η σπονδυλική στήλη. Τέλος, γίνεται η μέτρηση του ύψους σε εκατοστά (cm).

Σύμφωνα με τις τιμές του βάρους και του όρθιου ύψους που μετρήθηκαν σε κάθε εθελοντή, υπολογίστηκε ο ΔΜΣ, ο οποίος ορίζεται ως εξής:  $\Delta\text{Μ}\Sigma = \text{Σωματικό βάρος (kg)} / \text{Υψος}^2 (\text{m}^2)$ .

Ο ΔΜΣ αποτελεί έναν εύχρηστο δείκτη αξιολόγησης του σωματικού βάρους ανάλογα με το ύψος και κατάταξης του κάθε εθελοντή στην κατηγορία λιποβαρών, ατόμων με φυσιολογικό βάρος, υπέρβαρων και παχύσαρκων. Το καθημένο ύψος είναι η μέγιστη απόσταση από την κορυφή του κεφαλιού έως την επιφάνεια της καρέκλας στην οποία κάθετε ο εξεταζόμενος. Ο

εθελοντής κάθεται σε οριζόντια καρέκλα γνωστού ύψους, με τα χέρια ακουμπισμένα πάνω στους μηρούς και την πλάτη σε όρθια, ευθεία στάση. Ζητείται από τον εθελοντή να πάρει μία βαθιά αναπνοή και τη στιγμή της μέγιστης εισπνοής μετράται το ύψος με τη χρήση ενός οργάνου με γωνιακό σχήμα που τοποθετείται στην κορυφή του κεφαλιού το εξεταζόμενου.

### **2.2.2. Περιφέρειες**

Για την μέτρηση της περιφέρειας κεφαλής χρησιμοποιείται μία μεζούρα. Το σημείο που επιλέγεται για τη σωστή μέτρηση είναι η περιοχή πάνω από τα αυτιά, στο ύψος των φρυδιών, στην κορυφή της ινιακής περιοχής.

Για την μέτρηση της περιφέρειας καρπού ο εθελοντής σηκώνει ελαφρώς το χέρι του, αφαιρεί τυχόν ρουχισμό στην περιοχή του καρπού και με τη χρήση μεζούρας μετράται η περιφέρεια του καρπού.

Για την μέτρηση της περιφέρειας μέσης ο εξεταζόμενος καλείται να απαλλαγεί από τον ρουχισμό στην περιοχή της κοιλιάς, βρίσκεται σε όρθια θέση με τα πόδια του σε ευθεία γραμμή απέχοντας μεταξύ τους περίπου 25 έως 30 εκατοστά. Το βάρος του θα πρέπει να ισοκατανέμεται. Κατά τη μέτρηση, ο εθελοντής εκπνέει ελαφρά. Η μέτρηση πραγματοποιείται με τη χρήση μη ελαστικής μεζούρας στο μέσο της απόστασης μεταξύ της τελευταίας νόθας πλευράς και της υπερλαγώνιας ακρολοφίας.

Και για την περιφέρεια του ισχίου ο εθελοντής παραμένει σε όρθια στάση και στην ίδια θέση, ενώ ο εξεταστής μετρά την περιφέρεια στο ύψος όπου παρατηρείται η μέγιστη περιφέρεια των γλουτών. Για τη μέτρηση αυτή χρησιμοποιείται και πάλι η ανελαστική μεζούρα.

## **2.3. Αξιολόγηση διαιτητικής πρόσληψης, φυσικής δραστηριότητας και τρόπου ζωής**

### **2.3.1. Διαιτητική πρόσληψη**

Η διαιτητική πρόσληψη αποτιμήθηκε με ένα ημιποσοτικό ερωτηματολόγιο συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων πιστοποιημένης επαναληψιμότητας κι εγκυρότητας (TYROVOLAS *et al.* 2010) που περιλαμβάνει πληροφορίες για τη συχνότητα κατανάλωσης των περισσότερων κατηγοριών τροφίμων κατά τον τελευταίο χρόνο και τα διατροφικά πρότυπα του κάθε πληθυσμού προέκυψαν ύστερα από στατιστική επεξεργασία των διατροφικών ομάδων, με την μέθοδο της ανάλυσης σε κύριες συνιστώσες.

### **2.3.2. Φυσική δραστηριότητα και τρόπος ζωής**

Η φυσική δραστηριότητα αξιολογήθηκε με ένα ερωτηματολόγιο φυσικής δραστηριότητας το οποίο περιέχει πληροφορίες για τις ώρες εργασίας, ύπνου, ανάπαυσης, διαβάσματος, αναψυχής, φυσικής άσκησης και άλλων δραστηριοτήτων του εθελοντή. Καταγράφεται επίσης το μέσο μεταφοράς που χρησιμοποιεί ο εθελοντής κατά κύριο λόγο. Η ποσοτικοποίηση της έντασης της φυσικής δραστηριότητας πραγματοποιήθηκε με τη μετατροπή σε μεταβολικά ισοδύναμα (Metabolic Equivalent of Task-MET). Η μονάδα MET που αποδόθηκε σε κάθε τύπο φυσικής δραστηριότητας πολλαπλασιάστηκε με την αντίστοιχη συχνότητα και διάρκεια της φυσικής δραστηριότητας και ακολούθως υπολογίστηκε το άθροισμα όλων των τύπων φυσικής δραστηριότητας.

Σε ότι αφορά τον τρόπο ζωής, συμπληρώνονται στοιχεία σχετικά με τις καπνιστικές συνήθειες των εθελοντών.

## 2.4. Δημογραφικά στοιχεία και ιατρικό ιστορικό

Στο ερωτηματολόγιο που χρησιμοποιείται στην παρούσα μελέτη καταγράφονται τα στοιχεία του συμμετέχοντα, η ημερομηνία γέννησης, τα στοιχεία επικοινωνίας (διεύθυνση, τηλέφωνο) και ο τόπος καταγωγής των γονέων του. Επίσης, περιλαμβάνει πληροφορίες σχετικές με την οικογενειακή κατάσταση, το επάγγελμα και το μορφωτικό τους επίπεδο.

Το ιατρικό ιστορικό περιέχει πληροφορίες που αφορούν την φαρμακευτική αγωγή, το ιστορικό ασθενειών και χειρουργικών επεμβάσεων.

## 2.5. Μέτρηση αρτηριακής πίεσης και αιμοληψία

Για την μέτρηση της πίεσης ο εθελοντής κάθεται σε χώρο με ήπια θερμοκρασία και ήσυχο περιβάλλον. Αφαιρείται ο ρουχισμός από το δεξί χέρι το οποίο στηρίζεται σε οριζόντια επιφάνεια στο επίπεδο της καρδιάς (4<sup>ο</sup> μεσοπλεύριο διάστημα στο στήθος), σε γωνία μεταξύ 0<sup>ο</sup> και 45<sup>ο</sup> από τον κορμό. Ο εξεταζόμενος καλό είναι να διατηρήσει τη στάση αυτή για 5' πριν τη μέτρηση. Η αρτηριακή πίεση και ο σφυγμός μετράται με τη χρήση ηλεκτρονικού σφυγμομανομέτρου. Η μέτρηση επαναλαμβάνεται δύο φορές και ο μέσος όρος των δύο μετρήσεων καταγράφεται. Η μέτρηση επαναλαμβάνεται δύο φορές και ο μέσος όρος των δύο μετρήσεων καταγράφεται. Εάν υπάρχει σημαντική απόκλιση μεταξύ των 2, γίνεται τρίτη μέτρηση και υπολογίζεται ο μέσος όρος της 2<sup>ης</sup> και 3<sup>ης</sup> μέτρησης.

Πριν την αιμοληψία οι εθελοντές είχαν κληθεί να τελέσουν νηστεία 10-12 ώρες. Οι αιμοληψίες έγιναν αποκλειστικά από εξειδικευμένο προσωπικό. Ο εθελοντής καλείται να καθίσει σε αναπαυτική καρέκλα και να τοποθετήσει το χέρι που θα φλεβοκεντηθεί στο ειδικό στήριγμα της καρέκλας αιμοληψιών. Εφαρμόζεται το λάστιχο περίδεσης 7-8cm πάνω από την περιοχή που θα φλεβοκεντηθεί και ακολουθεί ψηλάφηση για να εντοπιστεί ο κερκιδικός σφυγμός. Ζητείται από τον εθελοντή να ανοιγοκλείσει την παλάμη του και στη συνέχεια να παραμείνει με την παλάμη σε γροθιά. Επιλέγεται η κατάλληλη φλέβα και με τη χρήση σύριγγας και πεταλούδας γίνεται λήψη της απαιτούμενης ποσότητας αίματος. Το αίμα τοποθετείται σε 3 περιέκτες: 2 K3E K3 EDTA και 1 SST Gel vacutainer. Ένας από τους EDTA περιέκτες χρησιμοποιείται για την γενική

ανάλυση αίματος, που στη συνέχεια φυγοκεντρείται για την απομόνωση του πλάσματος και των λευκοκυττάρων.

Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία αυτή για όλους τους εθελοντές μιας συγκεκριμένης ημέρας, ακολουθεί η διαχείριση του αίματος, που περιλαμβάνει την απομόνωση ορού, πλάσματος και της στοιβάδας των λευκοκυττάρων. Το πρώτο βήμα είναι η φυγοκέντρηση των περιεκτών σε θερμοκρασία 4°C στις 3000 στροφές (rpm) για 10 λεπτά.

Γίνεται φυγοκέντρηση του φιαλιδίου χωρίς το αντιπηκτικό και αφού είναι πλέον φανερός ο διαχωρισμός του ορού από τα υπόλοιπα συστατικά του αίματος, ο ορός απομακρύνεται με τη χρήση πιπέττας Pasteur και μοιράζεται σε 3 erpendorfs.

Μετά την φυγοκέντρηση των φιαλιδίων (τα οποία περιέχουν αντιπηκτικό EDTA) παρατηρείται διαχωρισμός των συστατικών του αίματος στις εξής φάσεις: στο κάτω μέρος παρατηρούνται τα ερυθροκύτταρα, ακολουθεί η πολύ λεπτή στοιβάδα των λευκοκυττάρων και στο πάνω μέρος βρίσκεται το πλάσμα με τα αιωρούμενα αιμοπετάλια. Χρησιμοποιώντας πιπέττες Pasteur, απομακρύνεται αρχικά το πλάσμα που βρίσκεται υψηλότερα σε δύο erpendorfs και στη συνέχεια απομακρύνεται η στοιβάδα των λευκοκυττάρων και μεταφέρεται σε άλλα δύο erpendorfs.

Μετά από αυτές τις διαδικασίες, τα erpendorfs τοποθετούνται σε πλαστικά κουτιά 100 θέσεων και τοποθετούνται στην κατάψυξη στους -20°C. Στη συνέχεια, μέσα σε διάστημα ενός μήνα μεταφέρονται με τη χρήση ξηρού πάγου στους καταψύκτες του εργαστηρίου Βιολογίας στο Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, όπου διατηρούνται στους -80°C.

## **2.6. Βιοχημικές αναλύσεις**

Ένα μικροδοχείο ορού αποστέλλεται σε διαγνωστικό εργαστήριο όπου γίνονται οι βιοχημικές εξετάσεις. Οι βιοχημικοί παράγοντες μετρήθηκαν με ενζυματικές χρωματογραφικές δοκιμασίες και περιλαμβάνουν γλυκόζη νηστείας (μέθοδος εξοκινάσης), ολική χοληστερόλη (cholesterol oxidase - phenol aminophenazone method), HDL-χοληστερόλη, τριγλυκερίδια (glycerol-3-phosphate oxidase -phenol aminophenazone) και σίδηρο. Η ινσουλίνη μετρήθηκε με

χημειοφωταύγεια τα επίπεδα της LDL-χοληστερόλης υπολογίστηκαν σύμφωνα με την εξίσωση του Friedewald (FRIEDEWALD *et al.* 1972).

Τα αποτελέσματα των βιοχημικών αναλύσεων εξάγονται αυτόματα, αποθηκεύονται σε ηλεκτρονική μορφή, εκτυπώνονται και αποστέλλονται μέσα σε διάστημα ενός μήνα στους εθελοντές, ώστε να ενημερωθούν για τις αντίστοιχες τιμές.

## **2.7. Εισαγωγή των δεδομένων**

Η εισαγωγή δεδομένων ολοκληρώθηκε δύο φορές, από δύο διαφορετικά άτομα. Σκοπός της διπλής εισαγωγής είναι η ελαχιστοποίηση του ανθρώπινου σφάλματος και η επίτευξη μίας βάσης δεδομένων όσο το δυνατόν πιο κοντά στην πραγματικότητα. Πρακτικά, στη μελέτη HELIC οι 2 βάσεις δεδομένων εισήχθησαν σε λογισμικό σύγκρισης (<http://www.perl.org/>) και προέκυψε 2<sup>ο</sup> αρχείο με όλες τις διαφοροποιήσεις. Μετά τη διόρθωση, τα δεδομένα ενσωματώθηκαν στις αρχικές βάσεις δεδομένων και στη συνέχεια έγινε έλεγχος για ακραίες τιμές. Αποτέλεσμα, να προκύψει μία πιο καλής ποιότητας βάση δεδομένων, απαλλαγμένη από λάθη που οφείλονται στον ανθρώπινο παράγοντα, όσο το δυνατόν πλησιέστερη στις αληθείς παρατηρήσεις που προέκυψαν από το δείγμα.

## **2.8. Απομόνωση γενετικού υλικού και γονοτύπηση**

### **2.8.1. Απομόνωση DNA με αυτοματοποιημένο σύστημα**

Η απομόνωση του γενετικού υλικού γίνεται με τη χρήση του iPrep PureLink gDNA Blood Kit, που επιτρέπει γρήγορη και αυτοματοποιημένη απομόνωση γενομικού DNA (gDNA) από δείγματα λευκοκυττάρων ή ολικού αίματος. Ο εξοπλισμός «iPrep Purification Instrument» έχει τη δυνατότητα ταυτόχρονης απομόνωσης γενετικού υλικού από 13 δείγματα. Μία προ-προγραμματισμένη κάρτα ρυθμίζει τις παραμέτρους και το πρωτόκολλο, όπως τον όγκο των διαλυμάτων που θα χρησιμοποιηθούν, τα βήματα και τον χρόνο επώασης. Στην πλειονότητα

των δειγμάτων έγινε χρήση της στιβάδας των λευκοκυττάρων για την απομόνωση του γενετικού υλικού. Η διάρκεια διαδικασίας είναι 45 λεπτά

### Σύντομο πρωτόκολλο

Ο όγκος του δείγματος που απαιτείται είναι τουλάχιστον 150μL. Χρήση μικρότερης ποσότητας έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία αφρισμού, με αποτέλεσμα την μείωση της ποσότητας και ποιότητας του DNA που αποδίδεται τελικά. Το πρωτόκολλο έχει σχεδιαστεί για να απομονώνει γενετικό υλικό από 350μL ολικού αίματος ή 300μL στιβάδας των λευκοκυττάρων το μέγιστο.

Για την προετοιμασία των δειγμάτων:

Λαμβάνεται η στιβάδα των λευκοκυττάρων από φυγοκεντρημένο αίμα, μετά την απομάκρυνση του πλάσματος. Στην περίπτωση που η στιβάδα των λευκοκυττάρων έχει ήδη διαχωριστεί και καταψυχθεί, τα δείγματα αποψύχονται.

Λαμβάνεται με αποστειρωμένη πιπέττα ποσότητα στιβάδας των λευκοκυττάρων 300μL. Το δείγμα αναμιγνύεται για τη λύση της γέλης που μπορεί να έχει δημιουργηθεί, και τοποθετείται σε ειδικό μικροδοχείο του iPrep PureLink gDNA Blood Kit.

Το δείγμα της στιβάδας των λευκοκυττάρων αλλά και τα υπόλοιπα μέρη του Kit τοποθετούνται στον εξτράκτορα, με την αλληλουχία που αναφέρεται σε ειδική ψηφιακή οθόνη.

Μετά το πέρας της διαδικασίας λαμβάνεται διάλυμα DNA όγκου 200μL, το οποίο καταψύχεται στους -20°C.

### **2.8.2. Γονοτύπηση**

Στα δείγματα του DNA πραγματοποιήθηκε σάρωση του γονιδιώματος στο Wellcome Trust Sanger Institute (ποσότητα 100μl) σε πλακίδια 12\*8 θέσεων).

Συγκεκριμένα, για την γονοτύπηση χρησιμοποιήθηκαν δυο διαφορετικές πλατφόρμες με χρήση μικροσυστοιχιών:

OmniExpress: HumanOmniExpress-12v1 (Αλγόριθμος Illuminus για την αντιστοίχιση των γονοτύπων των ατόμων) για κοινούς πολυμορφισμούς και

Exome: HumanExome-12v1\_A (Αλγόριθμοι GenCall και zCall για την αντιστοίχιση των γονοτύπων των ατόμων) για σπάνιους πολυμορφισμούς

### 2.8.3. Ποιοτικός έλεγχος γενετικών δεδομένων

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος ποιότητας των γενετικών δεδομένων τόσο σε επίπεδο ατόμων όσο και σε επίπεδο πολυμορφισμών.

Συγκεκριμένα, περιελάμβανε των αποκλεισμό των ατόμων με ποσοστά καλέσματος γονοτύπων για το Exome chip: Gencall <98% και zCall <99% και για το OmniExpress <98%. Επίσης αποκλείστηκαν διπλότυπα δείγματα, άτομα αποκλίνουσας γενετικής καταγωγής και άτομα με ασυμφωνία μεταξύ του φύλου όπως αυτό είχε καταγραφεί κατά την συλλογή του δείγματος και του φύλου όπως αυτό προέκυψε από τον έλεγχο ετεροζυγωτίας του φυλετικού χρωμοσώματος Χ.

Σε επίπεδο πολυμορφισμών, ο ποιοτικός έλεγχος περιλάμβανε των αποκλεισμό των πολυμορφισμών που πληρούσαν τα ακόλουθα κριτήρια:

- Στο OmniExpress
  - για τους κοινούς πολυμορφισμούς, οι πολυμορφισμοί με ποσοστό καλέσματος γονοτύπων < 95%
  - για τους σπάνιους πολυμορφισμούς, οι πολυμορφισμοί με ποσοστό καλέσματος γονοτύπων < 99%
- Στο Exomechip
  - Gencall οι πολυμορφισμοί με ποσοστό καλέσματος γονοτύπων <95%
  - zCall οι πολυμορφισμοί με ποσοστό καλέσματος γονοτύπων <99%
- οι πολυμορφισμοί με  $p < 0,0001$  για τον έλεγχο ισορροπίας Hardy-Weinberg

Μετά τον ποιοτικό έλεγχο το δείγμα της μελέτης με διαθέσιμα γενετικά δεδομένα αποτελούνταν για τον πληθυσμό MANOLIS (Minoan Isolates) από 1267 άτομα (N γυναικών = 725) και 702.284 πολυμορφισμούς και για τον πληθυσμό POMAK από 1007 άτομα (N γυναικών = 735) και 683.466 πολυμορφισμούς.

#### 2.8.4. Μετασχηματισμοί φαινοτυπικών δεδομένων για γενετικές αναλύσεις

Οι καρδιομεταβολικοί δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν ως εξαρτημένες μεταβλητές ήταν οι εξής: **ΔΜΣ, περιφέρεια μέσης, συστολική και διαστολική αρτηριακή πίεση, ολική χοληστερόλη και HDL-χοληστερόλη**. Οι μεταβλητές αυτές προσαρμόστηκαν με βάση την πιθανή φαρμακευτική αγωγή σύμφωνα με τις οδηγίες της κοινοπραξίας CHARGE (<http://www.chargeconsortium.com/>). Συγκεκριμένα, στα άτομα που λάμβαναν αντιυπερτασική αγωγή προστέθηκαν 15 mmHg στην τιμή της συστολικής τους πίεσης και 10 mmHg στην τιμή της διαστολικής τους πίεσης. Στα άτομα που λάμβαναν αντιλιπιδαιμική αγωγή, οι τιμές της ολικής χοληστερόλης υπολογίστηκαν με βάση τον τύπο:

$$\text{Προσαρμοσμένη ολική χοληστερόλη} = \text{Ολική χοληστερόλη} / 0.8$$

Οι τιμές των εξαρτημένων μεταβλητών προσαρμόστηκαν με βάση την συγγένεια μεταξύ των ατόμων με ειδικό σύνολο εντολών προγραμματισμού (script). Η συγγένεια μεταξύ των ατόμων αποτελεί έναν σημαντικό συγχυτικό παράγοντα κατά την διερεύνηση συσχετίσεων μεταξύ της γενετικής ποικιλομορφίας και του φαινοτύπου προς διερεύνηση και μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση ψευδώς-θετικών συσχετίσεων.

Οι περιβαλλοντικές μεταβλητές που συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση αλληλεπίδρασης ήταν τα τέσσερα (4) διατροφικά πρότυπα όπως προέκυψαν από την ανάλυση σε κύριες συνιστώσες από τα διατροφικά δεδομένα του εκάστοτε πληθυσμού, οι καπνιστικές συνήθειες, η κατανάλωση αλκοόλ και η φυσική δραστηριότητα.

Τα σκορ των διατροφικών προτύπων μετατράπηκαν σε δίτιμες κατηγορικές μεταβλητές χαμηλή - υψηλή συμμόρφωση σύμφωνα με την διάμεσο.

Ανάλογα με τις καπνιστικές συνήθειες δημιουργήθηκαν δύο δίτιμες μεταβλητές:

- Τρέχοντες Καπνιστές – Μη τρέχοντες καπνιστές και
- Τρέχοντες/Πρώην Καπνιστές – Δεν έχω καπνίσει ποτέ.

Ανάλογα με την κατανάλωση αλκοόλ δημιουργήθηκαν τρεις δίτιμες μεταβλητές:

- **Τρέχουσα** κατανάλωση αλκοόλ-Μη τρέχουσα κατανάλωση αλκοόλ,

- **Συστηματική** κατανάλωση  $\geq 2$  αλκοολούχων ποτών την εβδομάδα – Ποτέ / Πρώην κατανάλωση / Τρέχουσα κατανάλωση  $< 2$  αλκοολούχων ποτών την εβδομάδα
- **Τρέχουσα υψηλή** κατανάλωση  $> 8$  αλκοολούχων ποτών ( $> 100$  g αιθανόλης) την εβδομάδα – Τρέχουσα Κατανάλωση 1-7 αλκοολούχων ποτών ( $< 100$  g αιθανόλης) την εβδομάδα

Ανάλογα με την φυσική δραστηριότητα δημιουργήθηκε η δίτιμη μεταβλητή: Φυσικά δραστήριος – Φυσικά μη δραστήριος. Ως φυσική αδράνεια ορίστηκαν  $< 3.75$  MET-ώρες μέτριας ή έντονης φυσικής δραστηριότητας την εβδομάδα (MOORE *et al.* 2012; KUWAHARA *et al.* 2015).

## 2.9. Στατιστική ανάλυση

Τα διατροφικά πρότυπα διαμορφώθηκαν μέσω της ανάλυσης σε κύριες συνιστώσες, η οποία αποτελεί ένα εμπειρικό διατροφικό πρότυπο, που ερευνά τυχόν συσχετίσεις μεταξύ των αρχικών μεταβλητών και τις εκμεταλλεύεται προκειμένου να δημιουργήσει νέες μεταβλητές (πρότυπα). Η μέθοδος των κυρίων συνιστωσών έχει σκοπό να δημιουργήσει γραμμικούς συνδυασμούς των αρχικών μεταβλητών, έτσι ώστε οι γραμμικοί αυτοί συνδυασμοί να είναι ασυσχέτιστοι μεταξύ τους, αλλά να περιέχουν όσο γίνεται μεγαλύτερο μέρος της διακύμανσης των αρχικών μεταβλητών. Το κέρδος από μια τέτοια διαδικασία είναι ότι από ένα σύνολο συσχετισμένων μεταβλητών καταλήγουμε σε ένα σύνολο ασυσχέτιστων μεταβλητών κι έτσι ξεπερνάται το πρόβλημα της πολυσυγγραμικότητας. Επιπλέον, έχουμε λιγότερες μεταβλητές από όσες αρχικά είχαμε, με κόστος, φυσικά, την απώλεια πληροφορίας, ενώ μπορούμε να εξετάσουμε τις συσχετίσεις ανάμεσα στις μεταβλητές και να διαπιστώσουμε πόσο οι μεταβλητές μοιάζουν ή όχι.

Ο έλεγχος υποθέσεων διεξήχθη με το  $\chi^2$  για τις κατηγορικές μεταβλητές και με το Student's T-test ή Mann-Whitney για τις συνεχείς μεταβλητές σε δύο διαφορετικές ομάδες. Χρησιμοποιήθηκε η πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση για την διερεύνηση των συσχετίσεων μεταξύ των καρδιομεταβολικών δεικτών και των διατροφικών προτύπων. Η στατιστική επεξεργασία των φαινοτυπικών δεδομένων έγινε με IBM SPSS 19.0 και γλώσσα προγραμματισμού R (<http://www.r-project.org/>) ορίζοντας επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας το 5%.

Σε ότι αφορά τα γενετικά δεδομένα, ο ποιοτικός έλεγχος και η διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων των πολυμορφισμών με τους περιβαλλοντικούς παράγοντες στους φαινότυπους πραγματοποιήθηκαν με

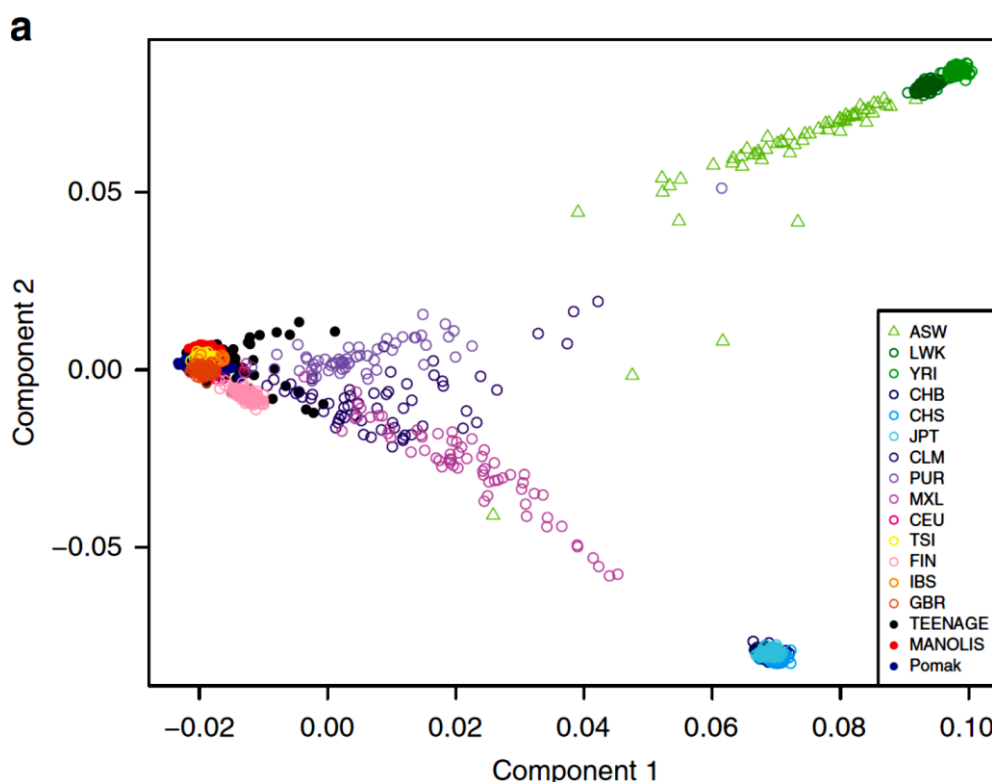
Plink (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>), R και GenABEL (AULCHENKO *et al.* 2007) χρησιμοποιώντας σύνολο ειδικών εντολών προγραμματισμού (scripts).

Η ηλικία και το φύλο προστέθηκαν ως συγχυτικοί παράγοντες στα μοντέλα γραμμικής παλινδρόμησης και η στατιστική σημαντικότητα εκτιμήθηκε σε επίπεδο διορθωμένο για το πλήθος των ελέγχων που πραγματοποιούνται στις μελέτες σάρωσης του γονιδιώματος [ $p = 0,05 / N$  ανεξάρτητων πολυμορφισμών ( $\sim 700.000$ ),  $p < 5 * 10^{-8}$ ].

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

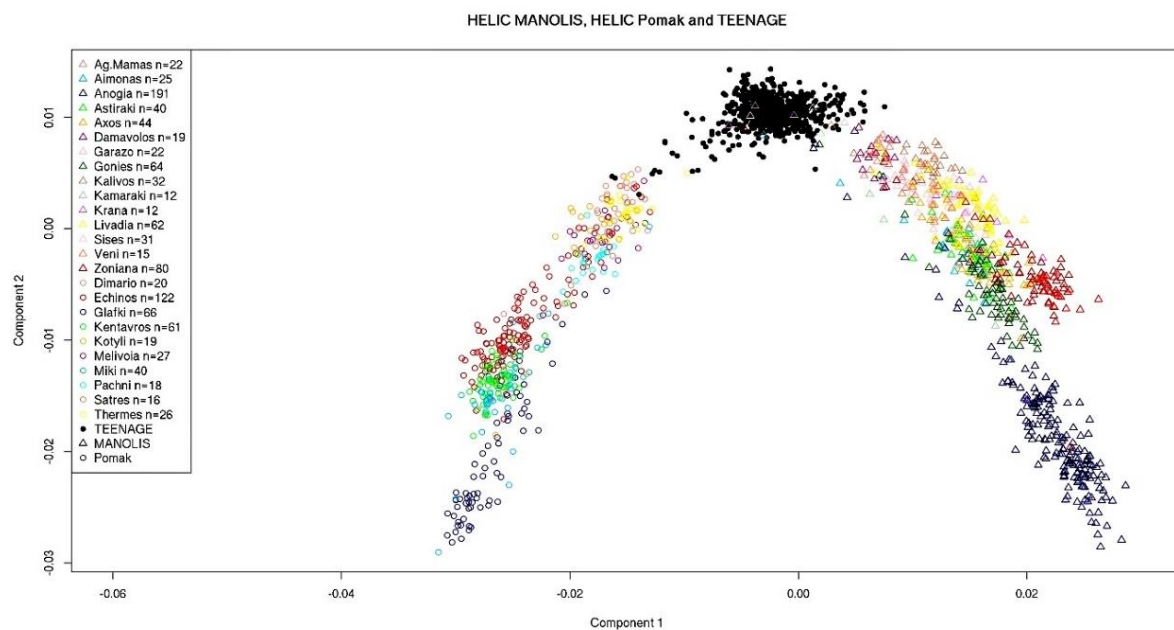
#### 3.1. Επιβεβαίωση της γενετικής απομόνωσης

Προκειμένου να χαρακτηρίσουμε τους πληθυσμούς στα πλαίσια της ευρύτερης παγκόσμιας ποικιλομορφίας, δημιουργήθηκαν γραφήματα πολυδιάστατης κλίμακας (multidimensional scaling -MDS) με δεδομένα από τον γενικό Ελληνικό πληθυσμό και από το 1000 Genomes Project (<http://www.1000genomes.org/>). Όπως ήταν αναμενόμενο, οι δύο πληθυσμοί φαίνεται να δημιουργούν καλά ορισμένες ομάδες κοντά στις πληθυσμιακές ομάδες που αποτελούνται από τον γενικό Ελληνικό πληθυσμό (TEENAGE), τους κατοίκους της Utah με Βορειο- και Δυτικο-Ευρωπαϊκή προέλευση (CEU) και τους κατοίκους της Τοσκάνης στην Ιταλία (TSI) (Εικόνα 3.1). Όπως παρατηρούμε υπάρχει ένα διακριτό μοτίβο ομαδοποίησης των δύο πληθυσμών εκατέρωθεν του γενικού Ελληνικού πληθυσμού (Εικόνα 3.2).



Εικόνα 3.1 Γράφημα πολυδιάστατης κλίμακας των HELIC-MANOLIS, HELIC-Pomak και TEENAGE σε συνδυασμό με τους πληθυσμούς από το 1000 Genomes Project (ΠΑΝΟΥΤΣΟΠΟΥΛΟΥ *et al.* 2014) .

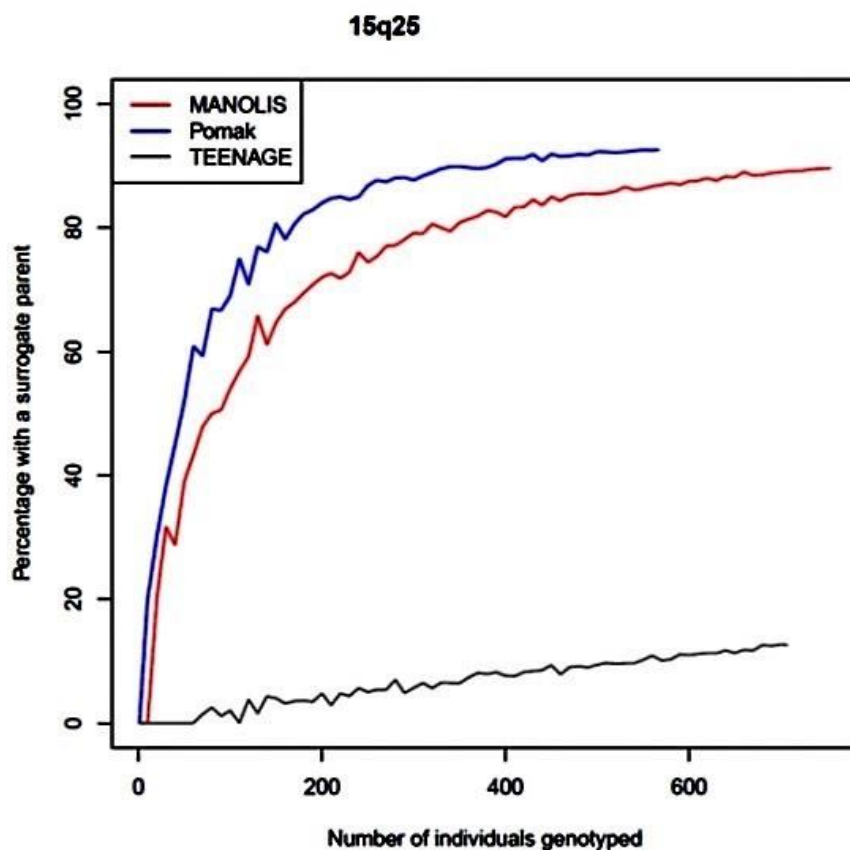
Σύμφωνα με τα παραπάνω, είναι εμφανής η πληθυσμιακή διαστρωμάτωση και στους δύο υπό μελέτη πληθυσμούς (MANOLIS και POMAK). Η πληθυσμιακή διαστρωμάτωση μπορεί να αποτελέσει έναν σημαντικό συγχυτικό παράγοντα κατά την διερεύνηση συσχετίσεων μεταξύ της γενετικής ποικιλομορφίας και του φαινοτύπου προς διερεύνηση και να οδηγήσει στην εμφάνιση ψευδώς-θετικών συσχετίσεων (ELEFTHERIA ZEGGINI 2011). Για τον λόγο αυτό οι τρεις πρώτες κύριες συνιστώσες θα χρησιμοποιηθούν ως συγχυτικοί παράγοντες κατά την διερεύνηση συσχετίσεων μεταξύ των γενετικών δεδομένων και του φαινοτύπου στις αναλύσεις αλληλεπίδρασης γενετικών-περιβαλλοντικών παραγόντων που ακολουθούν.



Εικόνα 3.2 Γράφημα πολυδιάστατης κλίμακας των χωριών HELIC-MANOLIS, χωριών HELIC-Pomak και TEENAGE. Οι μαύρες κουκκίδες απεικονίζουν τα άτομα από την μελέτη TEENAGE που αντιπροσωπεύουν τον γενικό Ελληνικό πληθυσμό. Τα άτομα της μελέτης MANOLIS απεικονίζονται με διαφορετικού χρώματος τρίγωνα με το κάθε χρώμα να απεικονίζει το χωριό καταγωγής. Τα άτομα της μελέτης POMAK απεικονίζονται με διαφορετικού χρώματος κύκλους με το κάθε χρώμα να απεικονίζει το χωριό καταγωγής -Μετάφραση από (ΠΑΝΟΥΤΣΟΡΟΥΛΟΥ *et al.* 2014).

Η μελέτη HELIC βασίστηκε στην υπόθεση ότι η γεωγραφική απομόνωση των ορεινών χωριών του Μυλοποτάμου Κρήτης που απαρτίζουν την υπομελέτη MANOLIS και η πολιτισμική, θρησκευτική και γεωγραφική απομόνωση των Πομακοχωριών της Ξάνθης που απαρτίζουν την υπομελέτη POMAK, θα μεταφραζόταν και σε γενετική ομοιογένεια και απομόνωση.

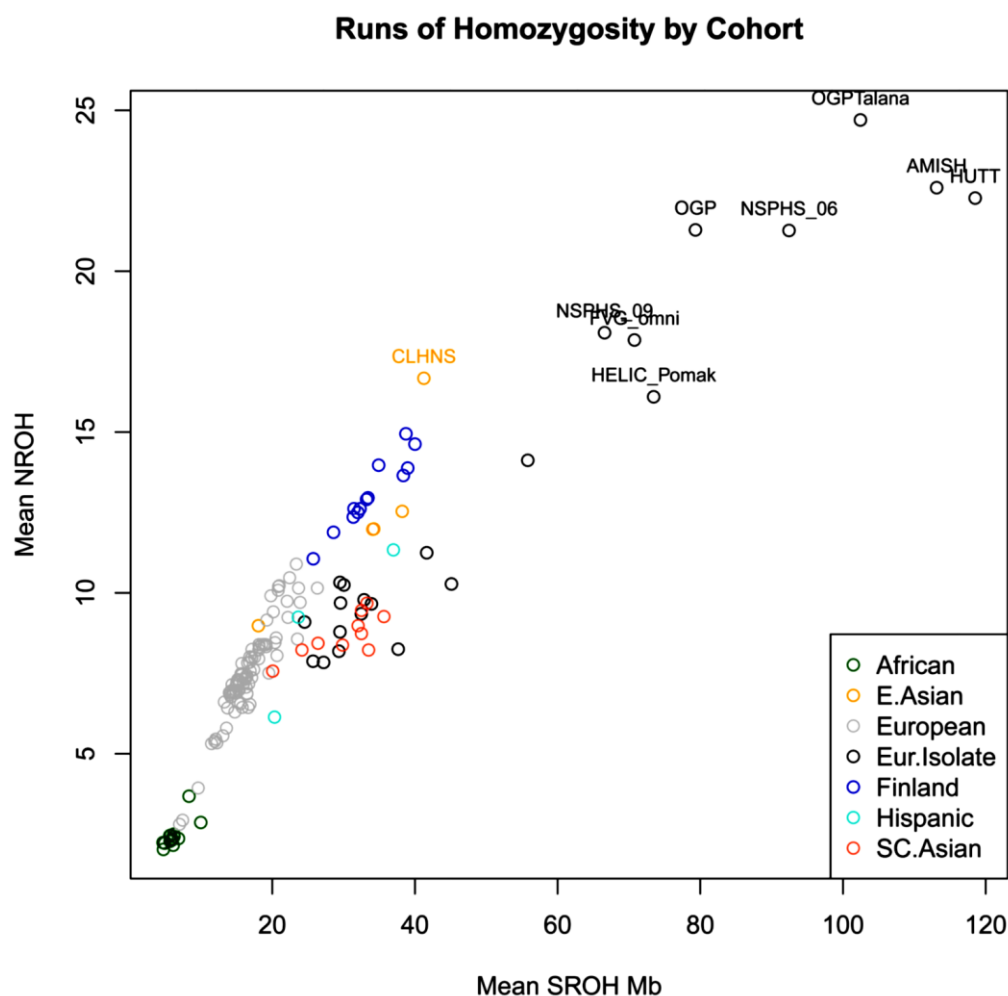
Για τον λόγο αυτό συγκρίθηκε ο βαθμός συγγένειας κάθε απομονωμένου πληθυσμού με τον γενικό πληθυσμό (707 δείγματα, μελέτη TEENAGE) διεξάγοντας στατιστική ανάλυση ταυτότητας κατάστασης (genome-wide identity-by-state, IBS). Υπολογίστηκε η αναλογία ατόμων με τουλάχιστον έναν κοινό πρόγονο, ώστε να επιτευχθεί ακριβής προσδιορισμός απλοτύπων και προσομοίωση γονοτύπων. Αυτή η μέθοδος αναφέρεται στα άτομα του ίδιου πληθυσμού που μοιράζονται τοπικούς απλότυπους με το άτομο αναφοράς. Τα άτομα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον γονοτυπικό προσδιορισμό του ατόμου αναφοράς σαν να επρόκειτο για γονείς (KONG *et al.* 2008). Για μία περιοχή στο 15q25 (781 πολυμορφισμοί) παρατηρήσαμε ότι με μόλις 300 άτομα ανά πληθυσμό, 79% από τα δείγματα MANOLIS και 88% από τα POMAK είχαν τουλάχιστον έναν κοινό πρόγονο, συγκριτικά με 6% του γενικού πληθυσμού και έτσι οι πληθυσμοί MANOLIS και POMAK ταυτοποιήθηκαν ως γενετικά απομονωμένοι (Εικόνα 3.3).



Εικόνα 3.3 Ποσοστό των ατόμων με τουλάχιστον ένα κοινό πρόγονο σε κάθε πληθυσμό (ΠΑΝΟΥΤΣΟΠΟΥΛΟΥ *et al.* 2014).

Η ενδογαμία επηρεάζει πολυπαραγοντικά μονοπάτια αυξάνοντας την ομοζυγωτία και κατά συνέπεια μειώνοντας την ετεροζυγωτία, πιθανώς ως απόρροια της δράσης επιβλαβών υπολειπόμενων μεταλλάξεων (Joshi *et al.* 2015). Μελέτες ομοζυγωτίας σάρωσης του γονιδιώματος έχουν την δυνατότητα να αποκαλύψουν την μη-προσθετικού τύπου αρχιτεκτονική των αλληλομόρφων ενός χαρακτηριστικού καθώς και την εξελικτική του πορεία. Πολυμορφισμοί από δεδομένα υψηλής πυκνότητας μικροσυστοιχιών σάρωσης του γονιδιώματος μπορούν πλέον να χρησιμοποιηθούν προκειμένου να αξιολογήσουν άμεσα την ομοζυγωτία, χρησιμοποιώντας γενομικά συνεχόμενα τμήματα ομοζυγωτίας (runs of homozygosity -ROH). Αυτά τα τμήματα έχει φανεί ότι είναι ομόζυγα καταγωγής και κοινά σε ανθρώπινους πληθυσμούς (Broman and Weber 1999; Gibson *et al.* 2006). SROH είναι το συνολικό μήκος των ROH σε μεγαβάσεις του DNA. Βρέθηκαν αξιοσημείωτες διαφορές ανά γεωγραφική περιοχή και δημογραφική ιστορία τόσο στον πληθυσμιακό μέσο όρο του SROH όσο και στην σχέση μεταξύ SROH και NROH (αριθμός των διαφορετικών ROH) (Εικόνα 3.4).

Μεταξύ των 10 μελετών με την μεγαλύτερη ομοζυγωτία ήταν και ο πληθυσμός της δική μας μελέτης HELIC-POMAK και μεταξύ των 20 μελετών με την μεγαλύτερη ομοζυγωτία και ο πληθυσμός HELIC-MANOLIS. Όπως έχει φανεί, οι απομονωμένοι πληθυσμοί έχουν περισσότερο ROH ενώ οι πληθυσμοί Αφρικανικής καταγωγής παρουσιάζουν την μικρότερη ομοζυγωτία (McQuillan *et al.* 2008; Kirin *et al.* 2010; Pemberton and Rosenberg 2014).



Εικόνα 3.4 Τμήματα ομοζυγίας ανά μελέτη. Το συνολικό μήκος των τμημάτων ομοζυγίας (SROH) και ο αριθμός των τμημάτων ομοζυγίας (NROH) φαίνονται ανά μελέτη. Υπάρχουν σημαντικές διαφορές ανα ήπειρο και είδος πληθυσμού τόσο στον μέσο όρο SROH όσο και στην σχέση μεταξύ SROH και NROH. SC.Asian είναι από Νότια και Κεντρική Ασία, E.Asian είναι από Ανατολική Ασία, Eur.Isolate είναι Ευρωπαϊκοί απομονωμένοι πληθυσμοί. Οι δέκα μελέτες με την μεγαλύτερη ομοζυγωτία είναι η AMISH από την Πενσυλβανία, η HUTT από την Νότια Ντακότα, η NSPHS (North Swedish Population Health Study) από την Βόρεια Σουηδία, με τα 06 και 09 να αντανakλούν διαφορετικά χρονιές δειγματοληψίας, η OGP (Ogliastra Genetic Park) από την Σαρδηνία, Ιταλία, και η Talana είναι ένα χωριό της περιοχής, η FVG (Friuli-Venezia-Giulia Genetic Park) στην Ιταλία, με τα omni και 370 να αναφέρονται σε υποσύνολα γονοτύπησης με Illumina OmniX και 370CNV μικροσυστοιχίες, η HELIC-POMAK από τα Πομακοχώρια της Θράκης στην Ελλάδα, και CLHNS (Cebu Longitudinal Health and Nutrition Study) στις Φιλιππίνες-Μετάφραση από (Joshi *et al.* 2015).

## 3.2. Περιγραφικά χαρακτηριστικά και διατροφικά πρότυπα των δύο πληθυσμών και η συσχέτισή τους με καρδιομεταβολικούς δείκτες

### 3.2.1. Πληθυσμός της Ορεινής Κρήτης

Τα ανθρωπομετρικά και κλινικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού φαίνονται στον Πίνακα 3.1. συμμετείχαν συνολικά 1,553 άτομα (55.8% γυναίκες και 44.2% άντρες) με μέσο όρο ηλικίας τα 61.6 έτη. Οι άντρες είχαν μεγαλύτερη περιφέρεια μέσης (103.6 vs 97 cm) και λόγο περιφέρειας μέσης προς περιφέρεια ισχίου (0.98 vs 0.89) σε σχέση με τις γυναίκες. Η μέση τιμή της ΣΑΠ ήταν 138mmHg, με τους άντρες να παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα επίπεδα σε σύγκριση με τις γυναίκες (140.1 vs 136.7 mmHg). Μόνο το 17.3% των συμμετεχόντων είχαν φυσιολογικό βάρος ενώ η συντριπτική πλειοψηφία (82.5%) ήταν υπέρβαροι ή παχύσαρκοι. Τα λαχανικά, τα επεξεργασμένα δημητριακά, τα φρούτα, το κρέας και τα γαλακτοκομικά προϊόντα ήταν οι ομάδες τροφίμων με την υψηλότερη εβδομαδιαία κατανάλωση.

| Πίνακας 3.1. Ανθρωπομετρικά, κλινικά και διατροφικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού ανά φύλο |        |                |        |                |          |                |                  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|--------|----------------|--------|----------------|----------|----------------|------------------|
|                                                                                           | Σύνολο |                | Άντρες |                | Γυναίκες |                | P                |
|                                                                                           | n      | MO (TA)        | n      | MO (TA)        | n        | MO (TA)        |                  |
| %                                                                                         | 1553   | 100            | 687    | 44.20          | 866      | 55.80          |                  |
| Ηλικία (έτη)                                                                              | 1520   | 61.6 (19.3)    | 671    | 59.0 (20.5)    | 838      | 63.7 (18.0)    | <b>&lt;0.001</b> |
| Παρόν βάρος (kg)                                                                          | 1344   | 77.9 (15.1)    | 596    | 84.8 (13.8)    | 737      | 72.3 (13.5)    | <b>&lt;0.001</b> |
| ΔΜΣ (kg/m <sup>2</sup> )                                                                  | 1304   | 29.52 (4.97)   | 585    | 29.45 (4.40)   | 709      | 29.60 (5.39)   | 0.877            |
| Ύψος (cm)                                                                                 | 1337   | 162.5 (10.0)   | 598    | 169.9 (7.6)    | 728      | 156.4 (7.2)    | <b>&lt;0.001</b> |
| Περιφέρεια μέσης (cm)                                                                     | 1350   | 100.0 (13.6)   | 594    | 103.6 (11.8)   | 745      | 97.0 (14.1)    | <b>&lt;0.001</b> |
| Περιφέρεια ισχίου (cm)                                                                    | 1337   | 107.6 (9.8)    | 591    | 105.9 (8.2)    | 735      | 109.0 (10.7)   | <b>&lt;0.001</b> |
| Περιφέρεια μέσης/<br>περιφέρεια ισχίου                                                    | 1343   | 0.93 (0.10)    | 592    | 0.98 (0.08)    | 740      | 0.89 (0.10)    | <b>&lt;0.001</b> |
| ΣΑΠ (mmHg)                                                                                | 1259   | 138.16 (19.33) | 552    | 140.05 (18.44) | 697      | 136.71 (19.93) | <b>1.1E-03</b>   |
| ΔΑΠ (mmHg)                                                                                | 1263   | 78.55 (10.97)  | 553    | 79.65 (11.28)  | 700      | 77.68 (10.63)  | <b>2.0E-03</b>   |
| Ημερήσια ενεργειακή<br>πρόσληψη (kcal)                                                    | 1445   | 2413 (854)     | 645    | 2643 (894)     | 800      | 2227 (773)     | <b>&lt;0.001</b> |
| Κατανάλωση τροφίμων<br>(μερίδες/εβδομάδα)                                                 |        |                |        |                |          |                |                  |
| Λαχανικά                                                                                  | 1444   | 27.1 (14.2)    | 644    | 26.7 (14.0)    | 800      | 27.5 (14.3)    | 0.260            |
| Επεξεργασμένα<br>δημητριακά                                                               | 1432   | 24.4 (11.0)    | 639    | 26.0 (11.7)    | 791      | 23.2 (10.3)    | <b>&lt;0.001</b> |
| Φρούτα                                                                                    | 1445   | 22.4 (12.6)    | 645    | 22.2 (13.0)    | 800      | 22.5 (12.3)    | 0.737            |
| Κόκκινο κρέας                                                                             | 1414   | 19.6 (11.8)    | 633    | 22.8 (13.1)    | 781      | 17.0 (9.8)     | <b>&lt;0.001</b> |
| Γαλακτοκομικά προϊόντα                                                                    | 1444   | 12.2 (7.1)     | 644    | 13.0 (7.6)     | 800      | 11.4 (6.7)     | <b>&lt;0.001</b> |
| Γλυκά                                                                                     | 1431   | 10.0 (7.4)     | 636    | 11.2 (7.8)     | 795      | 9.1 (6.9)      | <b>&lt;0.001</b> |

|                                                                                                |      |           |     |             |     |           |        |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|------|-----------|-----|-------------|-----|-----------|--------|
| Καφές                                                                                          | 1445 | 8.1 (4.9) | 645 | 9.3 (4.8)   | 800 | 7.1 (4.7) | <0.001 |
| Ψάρι                                                                                           | 1441 | 5.1 (4.6) | 644 | 5.1 (4.8)   | 797 | 5.2 (4.5) | 0.763  |
| Αλκοολούχα ποτά                                                                                | 1443 | 4.2 (7.4) | 645 | 22.2 (13.0) | 798 | 0.6 (1.3) | <0.001 |
| Πατάτες                                                                                        | 1435 | 2.8 (1.9) | 640 | 2.9 (1.9)   | 795 | 2.8 (1.8) | 0.430  |
| Όσπρια                                                                                         | 1437 | 2.0 (1.6) | 642 | 1.9 (1.6)   | 795 | 2.0 (1.6) | 0.798  |
|                                                                                                | n    | (%)       | n   | (%)         | n   | (%)       |        |
| Κατηγορία ΔΜΣ                                                                                  | 1291 |           | 583 |             | 708 |           |        |
| Φυσιολογικού βάρους                                                                            | 223  | (17.3)    | 83  | (14.2)      | 140 | (19.8)    | 0.002  |
| Υπέρβαροι                                                                                      | 500  | (38.7)    | 254 | (43.6)      | 246 | (34.7)    |        |
| Παχύσαρκοι                                                                                     | 568  | (44.0)    | 246 | (42.2)      | 322 | (45.5)    |        |
| ΤΑ: τυπική απόκλιση, P: p-value<0.05, Student's t-test για συνεχείς μεταβλητές, χ² για τον ΔΜΣ |      |           |     |             |     |           |        |

Η παχυσαρκία, η υπέρταση και η υπερλιπιδαιμία ήταν οι ασθένειες με τον υψηλότερο επιπολασμό σε αυτό τον πληθυσμό, με τις γυναίκες να παρουσιάζουν μεγαλύτερη νοσηρότητα σε σχέση με τους άντρες (Πίνακας 3.2).

| Πίνακας 3.2. Οι ασθένειες με τον μεγαλύτερο επιπολασμό στον πληθυσμό ανά φύλο |                      |                        |                          |                  |
|-------------------------------------------------------------------------------|----------------------|------------------------|--------------------------|------------------|
| Ασθένεια                                                                      | Σύνολο<br>N=1352 (%) | Άντρες<br>n=566<br>(%) | Γυναίκες<br>n=786<br>(%) | P                |
| Παχυσαρκία                                                                    | 568 (42.0)           | 246 (43.5)             | 322 (41.0)               | 0.23             |
| Υπέρταση                                                                      | 669 (49.5)           | 256 (45.2)             | 412 (52.4)               | <b>&lt;0.001</b> |
| Υπερλιπιδαιμία                                                                | 509 (37.7)           | 171 (30.2)             | 338 (43.0)               | <b>&lt;0.001</b> |
| Αρθρίτιδα                                                                     | 448 (33.1)           | 119 (21.0)             | 329 (41.9)               | <b>&lt;0.001</b> |
| Πρεσβυωπία                                                                    | 415 (30.7)           | 154 (27.2)             | 261 (33.2)               | <b>0.0034</b>    |
| Οστεοπόρωση                                                                   | 275 (20.3)           | 7 (1.2)                | 268 (34.1)               | <b>&lt;0.001</b> |
| ΣΔ τύπου 2                                                                    | 166 (12.3)           | 67 (11.8)              | 99 (12.6)                | 0.28             |
| Βαρηκοΐα                                                                      | 203 (15.0)           | 90 (15.9)              | 113 (14.4)               | 0.69             |
| Καταρράκτης                                                                   | 199 (14.7)           | 74 (13.1)              | 125 (15.9)               | 0.12             |
| Χρόνιο άγχος/κατάθλιψη                                                        | 195 (14.4)           | 31 (5.5)               | 164 (20.9)               | <b>&lt;0.001</b> |
| Αλλεργία                                                                      | 182 (13.5)           | 60 (10.6)              | 122 (15.5)               | <b>0.015</b>     |
| P: <b>p-value</b> <0.05 έλεγχος $\chi^2$                                      |                      |                        |                          |                  |

Τα κοινωνικοδημογραφικά και τα χαρακτηριστικά του τρόπου ζωής των ατόμων του πληθυσμού παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.3. Οι πλειοψηφία των εθελοντών (70.6%) ήταν παντρεμένοι ενώ μεγαλύτερο ποσοστό γυναικών ήταν χήρες (27.8%) σε σχέση με το αντίστοιχο των αντρών (3.5%). Οι περισσότεροι συμμετέχοντες είχαν πρωτοβάθμια εκπαίδευση (63%), και το 10.6% δεν είχε καμία μόρφωση. Οι άντρες είχαν στατιστικά σημαντικά περισσότερα συνολικά χρόνια εκπαίδευσης από τις γυναίκες (6.7 vs 5.5 years). Βρέθηκε διαφορά μεταξύ των δύο φύλων στα ποσοστά τόσο των παρόντων όσο και των πρώην καπνιστών με αυτά τω αντρών να είναι 4 και

10 φορές υψηλότερα, αντίστοιχα. Επίσης φάνηκε ότι οι άντρες κάπνιζαν για στατιστικά σημαντικά περισσότερα χρόνια, παρουσιάζοντας νεαρότερη ηλικία έναρξης και μεγαλύτερη ηλικία διακοπής καθώς και περισσότερα πακετοέτη σε σύγκριση με τις γυναίκες. Το 60% του πληθυσμού δεν είχε καπνίσει ποτέ, η πλειοψηφία των οποίων (81.6%) ήταν γυναίκες.

| Πίνακας 3.3. Κοινωνικοδημογραφικά και χαρακτηριστικά του τρόπου ζωής του πληθυσμού ανά φύλο                                                                                  |        |             |        |             |          |             |                  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|-------------|--------|-------------|----------|-------------|------------------|
|                                                                                                                                                                              | Σύνολο |             | Άντρες |             | Γυναίκες |             | p                |
|                                                                                                                                                                              | n      | (%)         | n      | (%)         | n        | (%)         |                  |
| <b>Συζυγική κατάσταση</b>                                                                                                                                                    | 1433   |             | 637    | (44.5)      | 796      | (55.5)      |                  |
| Παντρεμένοι                                                                                                                                                                  | 1011   | (70.6)      | 503    | (79.0)      | 508      | (63.8)      | <b>&lt;0.001</b> |
| Σε σχέση                                                                                                                                                                     | 17     | (1.2)       | 13     | (2.0)       | 4        | (0.5)       |                  |
| Ελεύθεροι                                                                                                                                                                    | 153    | (10.7)      | 93     | (14.6)      | 60       | (7.5)       |                  |
| Χήροι                                                                                                                                                                        | 243    | (17)        | 22     | (3.5)       | 221      | (27.8)      |                  |
| <b>Εκπαίδευση</b>                                                                                                                                                            | 1443   |             | 645    | (44.7)      | 798      | (55.3)      |                  |
| Καμία μόρφωση                                                                                                                                                                | 153    | (10.6)      | 30     | (4.7)       | 123      | (15.4)      | <b>&lt;0.001</b> |
| Πρωτοβάθμια                                                                                                                                                                  | 909    | (63)        | 416    | (64.5)      | 493      | (61.8)      |                  |
| Δευτεροβάθμια                                                                                                                                                                | 314    | (21.8)      | 165    | (25.6)      | 149      | (18.7)      |                  |
| Τριτοβάθμια                                                                                                                                                                  | 57     | (4)         | 28     | (4.3)       | 29       | (3.6)       |                  |
| <b>Καπνιστικές συνήθειες</b>                                                                                                                                                 | 1440   |             | 644    | (44.7)      | 796      | (55.3)      |                  |
| Παρόντες καπνιστές                                                                                                                                                           | 314    | (21.8)      | 249    | (38.7)      | 65       | (8.2)       | <b>&lt;0.001</b> |
| Πρώην καπνιστές                                                                                                                                                              | 259    | (18)        | 235    | (36.5)      | 24       | (3)         |                  |
| Ποτέ καπνιστές                                                                                                                                                               | 867    | (60)        | 160    | (24.8)      | 707      | (88.8)      |                  |
|                                                                                                                                                                              |        | MO (TA)     |        | MO (TA)     |          | MO (TA)     |                  |
| <b>Ηλικία έναρξης του καπνίσματος*</b>                                                                                                                                       | 502    | 18.9 (7.0)  | 425    | 18.2 (6.5)  | 72       | 23.1 (8.5)  | <b>&lt;0.001</b> |
| <b>Ηλικία διακοπής του καπνίσματος*</b>                                                                                                                                      | 231    | 51.7 (14.5) | 214    | 52.3 (14.2) | 17       | 43.5 (15.7) | <b>0.028</b>     |
| <b>Συνολικά χρόνια καπνίσματος*</b>                                                                                                                                          | 317    | 30.2 (16.3) | 277    | 31.8 (16.3) | 38       | 19.7 (12.7) | <b>&lt;0.001</b> |
| <b>Συνολικά χρόνια εκπαίδευσης*</b>                                                                                                                                          | 1025   | 6.1 (3.5)   | 463    | 6.7 (3.2)   | 555      | 5.5 (3.7)   | <b>&lt;0.001</b> |
| MO: μέσος όρος, TA: τυπική απόκλιση, P: <b>p-value</b> <0.05<br>Έλεγχος $\chi^2$ για κατηγορικές μεταβλητές, Student's t-test για συνεχείς μεταβλητές, *έλεγχος Mann-Whitney |        |             |        |             |          |             |                  |

Από τα αρχικά 50 τρόφιμα και ομάδες τροφίμων, 15 συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση σε κύριες συνιστώσες, λόγω του υψηλού βαθμού συσχέτισής τους. Το κριτήριο KMO ήταν ίσο με 0.76 και οι τέσσερις διατροφικές συνιστώσες εξηγούν 51.5% της συνολικής διακύμανσης των υπό μελέτη μεταβλητών (Πίνακας 3.4). Τα πρότυπα που προέκυψαν ήταν τα εξής: η τοπική δίαιτα (συνιστώσα 1) που περιελάμβανε σπιτικές πίττες, όσπρια, κόκκινο κρέας, τυρί και επεξεργασμένα δημητριακά, η υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος και απλά σάκχαρα δίαιτα (συνιστώσα 2), που αποτελούνταν από σοκολάτα, απλά σάκχαρα, γλυκά με γάλα και άμυλο,

| Πίνακας 3.4. Συντελεστές συσχέτισης που προέκυψαν από την ανάλυση σε κύριες συνιστώσες που διεξήχθη με διατροφικές μεταβλητές (N=1183). |              |              |              |              |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|                                                                                                                                         | Συνιστώσες   |              |              |              |
| Ερμηνευτικές μεταβλητές                                                                                                                 | 1            | 2            | 3            | 4            |
| Σπιτικές πίττες                                                                                                                         | <b>0.825</b> | 0.060        | -0.110       | 0.085        |
| Όσπρια                                                                                                                                  | <b>0.668</b> | -0.188       | -0.174       | 0.079        |
| Επεξεργασμένα δημητριακά <sup>α</sup>                                                                                                   | <b>0.586</b> | 0.401        | 0.083        | 0.062        |
| Κόκκινο κρέας                                                                                                                           | <b>0.542</b> | 0.346        | 0.276        | -0.057       |
| Τυρί                                                                                                                                    | <b>0.535</b> | 0.331        | 0.290        | 0.223        |
| Γλυκά με λίπος <sup>β</sup>                                                                                                             | 0.045        | <b>0.738</b> | -0.011       | 0.122        |
| Πατατάκια/γαριδάκια                                                                                                                     | 0.037        | <b>0.664</b> | -0.040       | -0.125       |
| Πίττες εμπορίου                                                                                                                         | 0.173        | <b>0.560</b> | 0.141        | 0.010        |
| Γυκά με άμυλο <sup>γ</sup>                                                                                                              | 0.147        | <b>0.412</b> | 0.245        | 0.359        |
| Ακοολούχα ποτά                                                                                                                          | 0.072        | 0.154        | <b>0.718</b> | -0.065       |
| Ελιές                                                                                                                                   | 0.084        | -0.172       | <b>0.694</b> | -0.127       |
| Καφές                                                                                                                                   | -0.163       | 0.131        | <b>0.617</b> | 0.310        |
| Τηγανιτές πατάτες                                                                                                                       | -0.125       | 0.453        | <b>0.484</b> | -0.068       |
| Ελαιόλαδο                                                                                                                               | -0.033       | 0.071        | -0.114       | <b>0.757</b> |
| Φρέσκα φρούτα και λαχανικά <sup>δ</sup>                                                                                                 | 0.305        | -0.152       | 0.022        | <b>0.655</b> |
| Ερμηνεύσιμη μεταβλητότητα (%)                                                                                                           | 15.03        | 14.69        | 12.78        | 9.02         |
| <sup>α</sup> Επεξεργασμένο ψωμί, μακαρόνια, δημητριακά πρωινού και λευκό ρύζι                                                           |              |              |              |              |
| <sup>β</sup> Σοκολάτα και γλυκά με βάση το γάλα                                                                                         |              |              |              |              |
| <sup>γ</sup> Απλά σάκχαρα και γλυκά με άμυλο                                                                                            |              |              |              |              |
| <sup>δ</sup> Λαχανικά φυλλώδη και άλλα, ωμά ή βρασμένα                                                                                  |              |              |              |              |

έτοιμες πίττες του εμπορίου και πατατάκια/γαριδάκια, το πρότυπο του καφεινείου (συνιστώσα 3), που χαρακτηριζόταν από την κατανάλωση καφέ και αλκοόλ, ελιές και τηγανιτές πατάτες, και την πλούσια σε ελαιόλαδο, φρούτα και λαχανικά δίαιτα (συνιστώσα 4).

Τα δεδομένα των βιοχημικών αναλύσεων δείχνουν ότι οι γυναίκες είχαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα επίπεδα HDL χοληστερόλης σε σχέση με τους άντρες, ενώ οι άντρες είχαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα επίπεδα γλυκόζης, LDL χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων σε σύγκριση με τις γυναίκες. Αξίζει να σημειωθεί ότι η μέση χοληστερόλη αυτού του πληθυσμού ήταν πάνω από το φυσιολογικό (>200mg/dl) (Πίνακας 3.5). Η ομάδα με τα υψηλότερα σκορ στο τοπικό πρότυπο είχε υψηλότερη μέση τιμή γλυκόζης ενώ οι ομάδες με τα υψηλότερα σκορ στα υπόλοιπα πρότυπα είχαν χαμηλότερα επίπεδα γλυκόζης. Η μέση τιμή της HDL χοληστερόλης ήταν χαμηλότερη στην ομάδα με τα υψηλότερα σκορ στο πρότυπο του καφεινείου, ενώ τα επίπεδα της LDL και ολικής χοληστερόλης φάνηκαν να είναι υψηλότερα στην ομάδα με τα υψηλότερα σκορ στα πρότυπα του καφεινείου και του υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος και

απλά σάκχαρα προτύπου. Η ομάδα με τα υψηλότερα σκορ στο πρότυπο του καφενείου παρουσίασε υψηλότερα επίπεδα τριγλυκεριδίων σε σύγκριση με την ομάδα με τα χαμηλότερα σκορ του ίδιου προτύπου, και η ομάδα με τα υψηλότερα σκορ στο πρότυπο με ελαιόλαδο, φρούτα και λαχανικά είχε υψηλότερα επίπεδα ινσουλίνης.

Τα αποτελέσματα της πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης (Πίνακας 3.6) δείχνουν ότι το τοπικό πρότυπο αρχικά συσχετιζόταν με το ΔΜΣ, τον λόγο περιφέρειας μέσης προς περιφέρεια ισχίου, την ΣΑΠ και την ΔΑΠ, αλλά οι συσχετίσεις αυτές έπαψαν να είναι στατιστικά σημαντικές μετά την διόρθωση για συγχυτικούς παράγοντες. Το τοπικό πρότυπο βρέθηκε να σχετίζεται με τα επίπεδα γλυκόζης ( $\beta=4.861$ ,  $p<0.001$ ,  $\beta=4.618$ ,  $p<0.001$  μετά την διόρθωση για συγχυτικούς παράγοντες και  $\beta=4.026$ ,  $p<0.001$  μετά την διόρθωση για συγχυτικούς παράγοντες και τα υπόλοιπα διατροφικά πρότυπα). Το υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος και απλά σάκχαρα πρότυπο, φάνηκε να συσχετίζεται αρνητικά με τον ΔΜΣ, τον λόγο περιφέρειας μέσης προς περιφέρεια ισχίου, την HDL χοληστερόλη και την ΣΑΠ, αλλά όλες αυτές οι συσχετίσεις έπαψαν να είναι στατιστικά σημαντικές μετά την διόρθωση για συγχυτικούς παράγοντες. Επίσης, το υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος και απλά σάκχαρα πρότυπο σχετιζόταν με μειωμένα επίπεδα γλυκόζης ακόμα και μετά την διόρθωση για συγχυτικούς παράγοντες αλλά όχι όταν η υπόλοιπη δίαιτα λήφθηκε υπόψη.

Το πρότυπο του καφενείου συσχετιζόταν με μειωμένα επίπεδα HDL χοληστερόλης αλλά η επίδραση έπαψε να είναι στατιστικά σημαντική μετά την διόρθωση για συγχυτικούς παράγοντες. Βρέθηκε συστηματική συσχέτιση του προτύπου του καφενείου με αυξημένο λόγο περιφέρειας μέσης προς περιφέρεια ισχίου ( $\beta=0.020$ ,  $p<0.001$ ,  $\beta=0.012$ ,  $p<0.001$  μετά την διόρθωση για συγχυτικούς παράγοντες και  $\beta=0.012$ ,  $p<0.001$  μετά την διόρθωση για συγχυτικούς παράγοντες και τα υπόλοιπα διατροφικά πρότυπα), ΔΑΠ ( $\beta=0.903$ ,  $p=0.002$ ,  $\beta=0.846$ ,  $p=0.014$  μετά την διόρθωση για συγχυτικούς παράγοντες και  $\beta=1.015$ ,  $p=0.005$  μετά την διόρθωση για συγχυτικούς παράγοντες και τα υπόλοιπα διατροφικά πρότυπα), ολική χοληστερόλη ( $\beta=3.078$ ,  $p=0.010$ ,  $\beta=4.883$ ,  $p=0.001$  μετά την διόρθωση για συγχυτικούς παράγοντες και  $\beta=5.398$ ,  $p<0.001$  μετά την διόρθωση για συγχυτικούς παράγοντες και τα υπόλοιπα διατροφικά πρότυπα) και LDL χοληστερόλη ( $\beta=3.977$ ,  $p<0.001$ ,  $\beta=3.933$ ,  $p=0.001$

**Πίνακας 3.5. Βιοχημικές αναλύσεις ανά διατροφικό πρότυπο.**

|                                                                                |        |       |        | ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗ    |      |       |      |             |                                           |      |       |      |                  |                       |      |       |      |                  |                                           |      |       |      |              |
|--------------------------------------------------------------------------------|--------|-------|--------|----------------|------|-------|------|-------------|-------------------------------------------|------|-------|------|------------------|-----------------------|------|-------|------|------------------|-------------------------------------------|------|-------|------|--------------|
|                                                                                |        |       |        | Τοπικό πρότυπο |      |       |      |             | Πλούσιο σε λίπος και απλά σάκχαρα πρότυπο |      |       |      |                  | Πρότυπο του καφενείου |      |       |      |                  | Πρότυπο με ελαιόλαδο, φρούτα και λαχανικά |      |       |      |              |
|                                                                                | Σύνολο |       |        | Χαμηλή         |      | Υψηλή |      | P           | Χαμηλή                                    |      | Υψηλή |      | P                | Χαμηλή                |      | Υψηλή |      | P                | Χαμηλή                                    |      | Υψηλή |      | P            |
|                                                                                | n      | MO    | (TA)   | MO             | (TA) | MO    | (TA) |             | MO                                        | (TA) | MO    | (TA) |                  | MO                    | (TA) | MO    | (TA) |                  | MO                                        | (TA) | MO    | (TA) |              |
| Γλυκόζη (mg/dl)                                                                | 1521   | 99.4  | (25.9) | 97.8           | 26.3 | 101.2 | 25.5 | <b>0.01</b> | 104.1                                     | 28.4 | 95.0  | 22.3 | <b>&lt;0.001</b> | 101.0                 | 26.6 | 98.0  | 25.1 | <b>0.024</b>     | 100.5                                     | 26.0 | 98.5  | 25.8 | 0.14         |
| HDL Χοληστερόλη (mg/dl)                                                        | 1541   | 48.4  | (13.2) | 48.3           | 13.1 | 48.5  | 13.3 | 0.78        | 48.5                                      | 13.1 | 48.2  | 13.2 | 0.64             | 50.3                  | 13.3 | 46.5  | 12.7 | <b>&lt;0.001</b> | 48.2                                      | 13.5 | 48.6  | 12.9 | 0.58         |
| LDL Χοληστερόλη (mg/dl)                                                        | 1540   | 125.1 | (35.8) | 126.7          | 35.3 | 123.6 | 36.3 | 0.88        | 122.3                                     | 35.3 | 128.0 | 36.1 | <b>0.002</b>     | 121.5                 | 34.6 | 128.7 | 36.6 | <b>&lt;0.001</b> | 124.3                                     | 35.0 | 126.0 | 36.6 | 0.35         |
| Τριγλυκερίδια (mg/dl)                                                          | 1525   | 135.6 | (67.4) | 134.4          | 64.2 | 137.0 | 70.6 | 0.45        | 137.6                                     | 65.0 | 133.8 | 69.8 | 0.27             | 129.5                 | 61.8 | 141.9 | 72.2 | <b>&lt;0.001</b> | 135.2                                     | 66.9 | 136.2 | 68.1 | 0.78         |
| Ινσουλίνη (uIU/ml)                                                             | 1515   | 14.6  | (13.5) | 14.6           | 13.5 | 14.5  | 13.4 | 0.82        | 14.6                                      | 13.4 | 14.5  | 13.6 | 0.88             | 14.3                  | 13.1 | 14.8  | 13.8 | 0.49             | 13.9                                      | 12.9 | 15.3  | 14.1 | <b>0.044</b> |
| Ολική Χοληστερόλη (mg/dl)                                                      | 1544   | 202.2 | (41.1) | 203.3          | 40.3 | 201.2 | 41.8 | 0.33        | 200.2                                     | 41.1 | 204.4 | 40.9 | <b>0.048</b>     | 199.4                 | 40.7 | 205.1 | 41.3 | <b>0.007</b>     | 201.1                                     | 39.8 | 203.6 | 42.4 | 0.23         |
| MO: μέσος όρος, TA: τυπική απόκλιση, P: <b>p-value</b> <0.05 Student' s t-test |        |       |        |                |      |       |      |             |                                           |      |       |      |                  |                       |      |       |      |                  |                                           |      |       |      |              |

μετά την διόρθωση για συγχυτικούς παράγοντες και  $\beta=4.401$ ,  $p=0.001$  μετά την διόρθωση για συγχυτικούς παράγοντες και τα υπόλοιπα διατροφικά πρότυπα).

Το πρότυπο με το ελαιόλαδο, τα φρούτα και τα λαχανικά, φάνηκε να σχετίζεται με υψηλότερο ΔΜΣ ( $\beta=0.625$ ,  $p<0.001$ ,  $\beta=0.350$ ,  $p=0.009$  μετά την διόρθωση για συγχυτικούς παράγοντες και  $\beta=0.362$ ,  $p=0.010$  μετά την διόρθωση για συγχυτικούς παράγοντες και τα υπόλοιπα διατροφικά πρότυπα), λόγο περιφέρειας μέσης προς περιφέρεια ισχίου ( $\beta=0.013$ ,  $p<0.001$ ,  $\beta=0.011$ ,  $p<0.001$  μετά την διόρθωση για συγχυτικούς παράγοντες και  $\beta=0.011$ ,  $p<0.001$  μετά την διόρθωση για συγχυτικούς παράγοντες και τα υπόλοιπα διατροφικά πρότυπα) και επίπεδα ινσουλίνης χωρίς η τελευταία συσχέτιση να παραμένει στατιστικά σημαντική μετά την διόρθωση για συγχυτικούς παράγοντες. Επίσης, το πρότυπο με το ελαιόλαδο, τα φρούτα και τα λαχανικά βρέθηκε να σχετίζεται με μειωμένα επίπεδα ΣΑΠ μόνο μετά την διόρθωση για συγχυτικούς παράγοντες ( $\beta=-1.252$ ,  $p=0.010$ ) και μετά την διόρθωση για συγχυτικούς παράγοντες και τα υπόλοιπα διατροφικά πρότυπα ( $\beta=-1.146$ ,  $p=0.025$ ).

| Πίνακας 3.6. Αποτελέσματα της πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης για την αξιολόγηση της συσχέτισης των διατροφικών προτύπων με καρδιομεταβολικούς δείκτες. (N=1,183) |           |               |                  |           |               |                  |           |               |                  |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|---------------|------------------|-----------|---------------|------------------|-----------|---------------|------------------|
|                                                                                                                                                                     | Μοντέλο 1 |               |                  | Μοντέλο 2 |               |                  | Μοντέλο 3 |               |                  |
| ΔΜΣ (kg/m <sup>2</sup> )                                                                                                                                            | β         | ΔΕ            | P                | β         | CI            | P                | β         | CI            | P                |
| Τοπικό πρότυπο                                                                                                                                                      | 0.529     | 0.272,0.786   | <b>&lt;0.001</b> | 0.004     | -0.330,0.338  | 0.980            | 0.099     | -0.270,0.468  | 0.598            |
| Πλούσιο σε λίπος και απλά σάκχαρα πρότυπο                                                                                                                           | -0.461    | -0.718,-0.203 | <b>&lt;0.001</b> | -0.289    | -0.594,0.015  | 0.063            | -0.193    | -0.526,0.141  | 0.257            |
| Πρότυπο του καφενείου                                                                                                                                               | -0.016    | -0.275,0.243  | 0.905            | 0.241     | -0.056,0.538  | 0.112            | 0.202     | -0.111,0.515  | 0.205            |
| Πρότυπο με ελαιόλαδο, φρούτα και λαχανικά                                                                                                                           | 0.625     | 0.368,0.882   | <b>&lt;0.001</b> | 0.350     | 0.088,0.613   | <b>0.009</b>     | 0.362     | 0.087,0.637   | <b>0.010</b>     |
| Περιφέρεια μέσης/ περιφέρεια ισχίου                                                                                                                                 |           |               |                  |           |               |                  |           |               |                  |
| Τοπικό πρότυπο                                                                                                                                                      | 0.006     | 0.000,0.011   | <b>0.047</b>     | -0.005    | -0.011,0.001  | 0.078            | 1.04E-5   | -0.006,0.006  | 0.997            |
| Πλούσιο σε λίπος και απλά σάκχαρα πρότυπο                                                                                                                           | -0.018    | -0.024,-0.013 | <b>&lt;0.001</b> | -0.004    | -0.009,0.002  | 0.171            | 1.4E-4    | -0.006,0.006  | 0.962            |
| Πρότυπο του καφενείου                                                                                                                                               | 0.020     | 0.015,0.026   | <b>&lt;0.001</b> | 0.012     | 0.007,0.017   | <b>&lt;0.001</b> | 0.012     | 0.006,0.017   | <b>&lt;0.001</b> |
| Πρότυπο με ελαιόλαδο, φρούτα και λαχανικά                                                                                                                           | 0.013     | 0.008,0.019   | <b>&lt;0.001</b> | 0.011     | 0.007,0.016   | <b>&lt;0.001</b> | 0.011     | 0.006,0.016   | <b>&lt;0.001</b> |
| HDL (mg/dl)                                                                                                                                                         |           |               |                  |           |               |                  |           |               |                  |
| Τοπικό πρότυπο                                                                                                                                                      | -0.247    | -0.992,0.498  | 0.516            | 0.918     | -0.005,1.840  | 0.051            | 0.670     | -0.354,1.694  | 0.199            |
| Πλούσιο σε λίπος και απλά σάκχαρα πρότυπο                                                                                                                           | -0.882    | -1.626,-0.139 | <b>0.02</b>      | -0.709    | -1.555,0.136  | 0.100            | -0.616    | -1.542,0.310  | 0.192            |
| Πρότυπο του καφενείου                                                                                                                                               | -2.383    | -3.116,-1.650 | <b>&lt;0.001</b> | -0.173    | -0.996,0.651  | 0.681            | -0.248    | -1.117,0.621  | 0.576            |
| Πρότυπο με ελαιόλαδο, φρούτα και λαχανικά                                                                                                                           | -0.442    | -1.187,0.303  | 0.245            | -0.224    | -0.955,0.506  | 0.547            | -0.106    | -0.872,0.660  | 0.786            |
| ΣΑΠ (mmHg)                                                                                                                                                          |           |               |                  |           |               |                  |           |               |                  |
| Τοπικό πρότυπο                                                                                                                                                      | 1.726     | 0.708,2.744   | <b>0.001</b>     | 1.108     | -0.099,2.315  | 0.072            | 0.598     | -0.740,1.935  | 0.381            |
| Πλούσιο σε λίπος και απλά σάκχαρα πρότυπο                                                                                                                           | -3.946    | -4.944,-2.948 | <b>&lt;0.001</b> | -0.608    | -1.714,0.499  | 0.282            | -0.490    | -1.699,0.720  | 0.427            |
| Πρότυπο του καφενείου                                                                                                                                               | -0.873    | -1.894,0.149  | 0.094            | 0.186     | -0.891,1.264  | 0.734            | 0.136     | -0.999,1.271  | 0.814            |
| Πρότυπο με ελαιόλαδο, φρούτα και λαχανικά                                                                                                                           | -0.340    | -1.362,0.683  | 0.515            | -1.252    | -2.206,-0.299 | <b>0.010</b>     | -1.146    | -2.147,-0.145 | <b>0.025</b>     |

| ΔΑΠ (mmHg)                                                                                                                                                                                                                                                                     |        |               |                  |        |               |                  |        |              |                  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|---------------|------------------|--------|---------------|------------------|--------|--------------|------------------|
| Τοπικό πρότυπο                                                                                                                                                                                                                                                                 | 0.612  | 0.038,1.186   | <b>0.037</b>     | 0.329  | -0.431,1.089  | 0.396            | 0.596  | -0.245,1.437 | 0.165            |
| Πλούσιο σε λίπος και απλά σάκχαρα πρότυπο                                                                                                                                                                                                                                      | 0.062  | -0.513,0.637  | 0.832            | 0.026  | -0.671,0.722  | 0.942            | 0.429  | -0.332,1.190 | 0.269            |
| Πρότυπο του καφενείου                                                                                                                                                                                                                                                          | 0.903  | 0.330,1.475   | <b>0.002</b>     | 0.846  | 0.171,1.522   | <b>0.014</b>     | 1.015  | 0.301,1.729  | <b>0.005</b>     |
| Πρότυπο με ελαιόλαδο, φρούτα και λαχανικά                                                                                                                                                                                                                                      | 0.132  | -0.443,0.707  | 0.653            | -0.130 | -0.731,0.472  | 0.672            | 0.012  | -0.681,0.641 | 0.970            |
| <b>Ολική χοληστερόλη (mg/dl)</b>                                                                                                                                                                                                                                               |        |               |                  |        |               |                  |        |              |                  |
| Τοπικό πρότυπο                                                                                                                                                                                                                                                                 | 2.067  | -0.27,4.405   | 0.083            | 1.946  | -1.161,5.053  | 0.219            | 3.239  | -0.191,6.669 | 0.064            |
| Πλούσιο σε λίπος και απλά σάκχαρα πρότυπο                                                                                                                                                                                                                                      | -1.232 | -3.572,1.107  | 0.302            | -1.535 | -4.382,1.313  | 0.291            | 0.673  | -2.429,3.776 | 0.670            |
| Πρότυπο του καφενείου                                                                                                                                                                                                                                                          | 3.078  | 0.744,5.411   | <b>0.010</b>     | 4.883  | 2.128,7.638   | <b>0.001</b>     | 5.398  | 2.488,8.308  | <b>&lt;0.001</b> |
| Πρότυπο με ελαιόλαδο, φρούτα και λαχανικά                                                                                                                                                                                                                                      | 1.001  | -1.338,3.341  | 0.401            | 0.330  | -2.128,2.788  | 0.792            | 1.036  | -1.530,3.601 | 0.428            |
| <b>LDL (mg/dl)</b>                                                                                                                                                                                                                                                             |        |               |                  |        |               |                  |        |              |                  |
| Τοπικό πρότυπο                                                                                                                                                                                                                                                                 | 1.090  | -0.937,3.116  | 0.292            | 0.746  | -1.937,3.429  | 0.585            | 2.111  | -0.853,5.074 | 0.163            |
| Πλούσιο σε λίπος και απλά σάκχαρα πρότυπο                                                                                                                                                                                                                                      | 0.038  | -1.989,2.065  | 0.971            | -0.692 | -3.151,1.767  | 0.581            | 1.007  | -1.673,3.688 | 0.461            |
| Πρότυπο του καφενείου                                                                                                                                                                                                                                                          | 3.977  | 1.962,5.991   | <b>&lt;0.001</b> | 3.933  | 1.550,6.310   | <b>0.001</b>     | 4.401  | 1.886,6.916  | <b>0.001</b>     |
| Πρότυπο με ελαιόλαδο, φρούτα και λαχανικά                                                                                                                                                                                                                                      | 1.136  | -0.891,3.162  | 0.272            | 0.888  | -1.233,3.009  | 0.411            | 1.368  | -0.848,3.585 | 0.226            |
| <b>Γλυκόζη (mg/dl)</b>                                                                                                                                                                                                                                                         |        |               |                  |        |               |                  |        |              |                  |
| Τοπικό πρότυπο                                                                                                                                                                                                                                                                 | 4.861  | 3.466,6.256   | <b>&lt;0.001</b> | 4.618  | 3.025,6.212   | <b>&lt;0.001</b> | 4.026  | 2.259,5.794  | <b>&lt;0.001</b> |
| Πλούσιο σε λίπος και απλά σάκχαρα πρότυπο                                                                                                                                                                                                                                      | -4.780 | -6.176,-3.384 | <b>&lt;0.001</b> | -1.660 | -3.144,-0.176 | <b>0.028</b>     | -0.987 | -2.595,0.621 | 0.229            |
| Πρότυπο του καφενείου                                                                                                                                                                                                                                                          | -1.027 | -2.448,0.394  | 0.157            | -1.254 | -2.691,0.183  | 0.087            | -1.053 | -2.553,0.448 | 0.169            |
| Πρότυπο με ελαιόλαδο, φρούτα και λαχανικά                                                                                                                                                                                                                                      | -0.208 | -1.631,1.214  | 0.774            | -1.303 | -2.578,-0.027 | <b>0.045</b>     | -0.490 | -1.813,0.833 | 0.467            |
| <b>Ινσουλίνη (μIU/ml)</b>                                                                                                                                                                                                                                                      |        |               |                  |        |               |                  |        |              |                  |
| Τοπικό πρότυπο                                                                                                                                                                                                                                                                 | 0.389  | -0.364,1.142  | 0.311            | -0.619 | -1.602,0.3636 | 0.216            | -0.141 | -1.230,0.948 | 0.800            |
| Πλούσιο σε λίπος και απλά σάκχαρα πρότυπο                                                                                                                                                                                                                                      | 0.433  | -0.321,1.186  | 0.360            | 0.678  | -0.226,1.582  | 0.141            | 0.765  | -0.226,1.756 | 0.130            |
| Πρότυπο του καφενείου                                                                                                                                                                                                                                                          | 0.631  | -0.121,1.384  | 0.100            | 0.156  | -0.719,1.032  | 0.726            | 0.324  | -0.600,1.249 | 0.491            |
| Πρότυπο με ελαιόλαδο, φρούτα και λαχανικά                                                                                                                                                                                                                                      | 0.997  | 0.245,1.748   | <b>0.009</b>     | 0.635  | -0.142,1.411  | 0.109            | 0.637  | -0.178,1.452 | 0.125            |
| ΔΕ:διάστημα εμπιστοσύνης<br>P: <b>p-value</b> <0.05<br>Μοντέλο 1: μη διορθωμένο<br>Μοντέλο 2: διορθωμένο για ηλικία, φύλο, ΔΜΣ, φαρμακευτική αγωγή, επίπεδο φυσικής δραστηριότητας, κάπνισμα και ενεργειακή πρόσληψη<br>Μοντέλο 3: Μοντέλο2 και τα υπόλοιπα διατροφικά πρότυπα |        |               |                  |        |               |                  |        |              |                  |

### 3.2.2. Πληθυσμός των Πομάκων

Τα ανθρωπομετρικά και κλινικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού φαίνονται στον Πίνακα 3.7. Από το σύνολο των 1,702 συμμετεχόντων το 30.7% ήταν άντρες και το 69.3% γυναίκες. Ο μέσος όρος ηλικίας ήταν τα 44.9 έτη και οι άντρες ήταν κατά 5.5 χρόνια μεγαλύτεροι από τις γυναίκες ( $p=7.1E-12$ ). Επιπλέον, οι άντρες είχαν μεγαλύτερη περιφέρεια μέσης (96.1 vs 90.4cm,  $p=8.6E-15$ ) και λόγο περιφέρειας μέσης προς περιφέρεια ισχίου (0.94 vs 0.84,  $p=3.0E-80$ ). Ωστόσο, οι

| Πίνακας 3.7. Ανθρωπομετρικά, κλινικά και διατροφικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού ανά φύλο |        |                 |        |                 |          |                 |                 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|--------|-----------------|--------|-----------------|----------|-----------------|-----------------|
|                                                                                           | Σύνολο |                 | Άντρες |                 | Γυναίκες |                 | P               |
|                                                                                           | n      | Μέσος όρος (TA) | n      | Μέσος όρος (TA) | n        | Μέσος όρος (TA) |                 |
| %                                                                                         | 1702   |                 | 522    | (30.7)          | 1180     | (69.3)          |                 |
| Ηλικία (έτη)                                                                              | 1664   | 44.87 (15.48)   | 519    | 48.71 (15.89)   | 1145     | 43.13 (14.97)   | <b>7.1E-12</b>  |
| Παρόν βάρος (kg)                                                                          | 1638   | 72.8 (14.35)    | 510    | 78.63 (13.42)   | 1128     | 70.16 (13.98)   | <b>1.8E-29</b>  |
| Ύψος(cm)                                                                                  | 1635   | 162.97 (9.62)   | 508    | 172.62 (7.89)   | 1127     | 158.61 (6.73)   | <b>2.5E-165</b> |
| Περιφέρεια μέσης (cm)                                                                     | 1588   | 92.17 (15.1)    | 496    | 96.14 (12.35)   | 1092     | 90.37 (15.87)   | <b>8.6E-15</b>  |
| Περιφέρεια μέσης/περιφέρεια ισχίου                                                        | 1586   | 0.87 (0.1)      | 494    | 0.94 (0.08)     | 1092     | 0.84 (0.1)      | <b>3.0E-80</b>  |
| ΔΜΣ (kg/m <sup>2</sup> )                                                                  | 1632   | 27.52 (5.42)    | 508    | 26.37 (4.14)    | 1124     | 28.03 (5.83)    | <b>7.8E-11</b>  |
| Κατηγορία ΔΜΣ                                                                             | 1632   |                 | 508    | (31.1)          | 1124     | (68.9)          |                 |
| Ελλειποβαρεις                                                                             | 52     | (3.2)           | 7      | (1.4)           | 45       | (4.0)           | <b>3.3E-17</b>  |
| Φυσιολογικού βάρους                                                                       | 486    | (29.8)          | 185    | (36.4)          | 301      | (26.8)          |                 |
| Υπέρβαροι                                                                                 | 583    | (35.7)          | 227    | (44.7)          | 356      | (31.7)          |                 |
| Παχύσαρκοι                                                                                | 511    | (31.3)          | 89     | (17.5)          | 422      | (37.5)          |                 |
| ΣΑΠ (mmHg)                                                                                | 1265   | 131.21 (16.63)  | 433    | 133.27 (15.73)  | 832      | 130.14 (16.98)  | <b>0.001</b>    |
| ΔΑΠ(mmHg)                                                                                 | 1272   | 83.12 (11.01)   | 436    | 83.47 (10.38)   | 836      | 82.94 (11.32)   | 0.398           |
| Κατανάλωση τροφίμων (μερίδες/εβδομάδα)                                                    |        |                 |        |                 |          |                 |                 |
| Επεξεργασμένα δημητριακά                                                                  | 1607   | 29.6 (9.2)      | 500    | 30.2 (9.2)      | 1107     | 29.3 (9.2)      | 0.090           |
| Γαλακτοκομικά προϊόντα                                                                    | 1625   | 18.2 (7.3)      | 504    | 18.8 (7.9)      | 1121     | 17.9 (7.0)      | <b>0.026</b>    |
| Λαχανικά                                                                                  | 1624   | 16.5 (6.3)      | 504    | 16.8 (6.4)      | 1120     | 16.4 (6.3)      | 0.310           |
| Γλυκά                                                                                     | 1610   | 14.2 (6.2)      | 497    | 14.7 (5.8)      | 1113     | 14.0 (6.4)      | <b>0.031</b>    |
| Καφές                                                                                     | 1626   | 10.7 (4.9)      | 504    | 11.5 (4.3)      | 1122     | 10.3 (5.1)      | <b>8.8E-07</b>  |
| Φρούτα                                                                                    | 1626   | 9.5 (8.5)       | 504    | 9.4 (8.6)       | 1122     | 9.5 (8.5)       | 0.784           |
| Κόκκινο κρέας                                                                             | 1624   | 7.5 (3.6)       | 503    | 7.7 (4.0)       | 1121     | 7.5 (3.3)       | 0.190           |
| Ψάρια                                                                                     | 1621   | 2.7 (1.8)       | 499    | 2.7 (1.8)       | 1122     | 2.7 (1.8)       | 0.456           |
| Πατάτες                                                                                   | 1626   | 2.6 (1.5)       | 504    | 2.7 (1.6)       | 1122     | 2.6 (1.5)       | 0.292           |
| Όσπρια                                                                                    | 1626   | 1.8 (1.1)       | 504    | 1.8 (1.1)       | 1122     | 1.8 (1.1)       | 0.975           |

γυναίκες είχαν υψηλότερο ΔΜΣ σε σχέση με τους άντρες (28 vs 26.4kg/m<sup>2</sup>, p=7.8E-11).

Μεγαλύτερο ποσοστό των αντρών ήταν υπέρβαροι (44.7%

vs 31.7%), ενώ το ποσοστό των παχύσαρκων γυναικών στον πληθυσμό ήταν πολύ μεγαλύτερο από το αντίστοιχο των αντρών (25.9% vs 5.5%, p=3.3E-17). Η μέση τιμή της ΣΑΠ ήταν 131.2mmHg, με τους άντρες να εμφανίζουν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα επίπεδα από τις γυναίκες (133.3 vs 130.1mmHg, p=0.001). Τα επεξεργασμένα δημητριακά, τα γαλακτοκομικά προϊόντα, τα λαχανικά και τα γλυκά ήταν οι ομάδες τροφίμων με την μεγαλύτερη εβδομαδιαία κατανάλωση.

Η υπέρταση και η υπερλιπιδαιμία ήταν οι ασθενείς με τον μεγαλύτερο επιπολασμό στον πληθυσμό (Πίνακας 3.8). Μεγαλύτερο ποσοστό των αντρών είχαν υπερλιπιδαιμία (19.5% vs 15.4%, p=0.036), πρεσβυωπία (11.1% vs 6.2%, p=4.4E-04), ΣΔ τύπου 2 (10.2% vs 6.1%, p=0.003) και στεφανιαία νόσο (11.7% vs 4.6%, p=7.1E-08) σε σύγκριση με τις γυναίκες, ενώ η κατάθλιψη

(11.7% vs 7.5%,  $p=0.008$ ), ο υποθυρεοειδισμός (11.5% vs 2.1%,  $p=1.8E-10$ ) και οι ημικρανίες (8.8% vs 4.8%,  $p=0.004$ ) ήταν πιο συχνές στις γυναίκες.

| Πίνακας 3.8. Οι ασθένειες με τον μεγαλύτερο επιπολασμό στον πληθυσμό ανά φύλο |                |                      |                         |                |
|-------------------------------------------------------------------------------|----------------|----------------------|-------------------------|----------------|
| Ασθένεια<br>N (%)                                                             | Σύνολο<br>1702 | Άντρες<br>522 (30.7) | Γυναίκες<br>1180 (69.3) | P              |
| Υπέρταση                                                                      | 444 (26.1)     | 139 (26.6)           | 305 (25.8)              | 0.735          |
| Υπερλιπιδαιμία                                                                | 284 (16.7)     | 102 (19.5)           | 182 (15.4)              | <b>0.036</b>   |
| Κατάθλιψη                                                                     | 177 (10.4)     | 39 (7.5)             | 138 (11.7)              | <b>0.008</b>   |
| Υποθυρεοειδισμός                                                              | 147 (8.6)      | 11 (2.1)             | 136 (11.5)              | <b>1.8E-10</b> |
| Πρεσβυωπία                                                                    | 131 (7.7)      | 58 (11.1)            | 73 (6.2)                | <b>4.4E-04</b> |
| Ημικρανίες                                                                    | 129 (7.6)      | 25 (4.8)             | 104 (8.8)               | <b>0.004</b>   |
| Αρθρίτιδα                                                                     | 127 (7.5)      | 39 (7.5)             | 88 (7.5)                | 0.992          |
| ΣΔ τύπου 2                                                                    | 125 (7.3)      | 53 (10.2)            | 72 (6.1)                | <b>0.003</b>   |
| Στεφανιαία νόσος                                                              | 115 (6.8)      | 61 (11.7)            | 54 (4.6)                | <b>7.1E-08</b> |
| Καρδιακή ανεπάρκεια                                                           | 112 (6.6)      | 41 (7.9)             | 71 (6.0)                | 0.159          |
| P:p-value<0.05                                                                |                |                      |                         |                |

Ο Πίνακας 3.9 παρουσιάζει τα κοινωνικοδημογραφικά και τα χαρακτηριστικά του τρόπου ζωής του πληθυσμού ΡΟΜΑΚ-HELIC. Στην πλειοψηφία τους τα άτομα ήταν παντρεμένα (86.7%) και είχαν πρωτοβάθμια εκπαίδευση (72.2%). Το ποσοστό του αναλφαριθμητισμού ήταν υψηλότερο στις γυναίκες σε σχέση με τους άντρες (9.2% vs 1.8%,  $p=6.8E-10$ ). Τα ποσοστά τόσο των παρόντων όσο και των πρώην καπνιστών ήταν 20 και 40 φορές υψηλότερα στους άντρες σε σύγκριση με τις, η συντριπτική πλειοψηφία των γυναικών (97.3%) και το ένα τρίτο των αντρών (35%) δεν είχε καπνίσει ποτέ ( $p=6.2E-172$ ).

| Πίνακας 3.9. Κοινωνικοδημογραφικά και χαρακτηριστικά του τρόπου ζωής του πληθυσμού ανά φύλο |        |                 |        |                 |          |                 |                 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|--------|-----------------|--------|-----------------|----------|-----------------|-----------------|
|                                                                                             | Σύνολο |                 | Άντρες |                 | Γυναίκες |                 | P               |
|                                                                                             | n      | (%)             | n      | (%)             | n        | (%)             |                 |
| <b>Συζυγική κατάσταση</b>                                                                   | 1629   |                 | 506    | (31.1)          | 1123     | (68.9)          |                 |
| Παντρεμένοι                                                                                 | 1413   | (86.7)          | 439    | (86.8)          | 974      | (86.7)          | <b>6.8E-5</b>   |
| Ελεύθεροι                                                                                   | 153    | (9.4)           | 61     | (12.1)          | 92       | (8.2)           |                 |
| Χήροι                                                                                       | 63     | (3.9)           | 6      | (1.2)           | 57       | (5.1)           |                 |
| <b>Εκπαίδευση</b>                                                                           | 1625   |                 | 499    | (30.7)          | 1126     | (69.3)          |                 |
| Καμία μόρφωση                                                                               | 178    | (10.9)          | 29     | (5.8)           | 149      | (13.2)          | <b>1.8E-10</b>  |
| Πρωτοβάθμια                                                                                 | 1174   | (72.2)          | 348    | (69.6)          | 826      | (73.3)          |                 |
| Δευτεροβάθμια                                                                               | 237    | (14.6)          | 100    | (20.0)          | 137      | (12.2)          |                 |
| Τριτοβάθμια                                                                                 | 36     | (2.2)           | 22     | (4.4)           | 14       | (1.2)           |                 |
|                                                                                             |        | Μέσος όρος (TA) |        | Μέσος όρος (TA) |          | Μέσος όρος (TA) |                 |
| <b>Συνολικά χρόνια εκπαίδευσης*</b>                                                         | 967    | 6.86 (2.42)     | 303    | 7.45 (2.99)     | 664      | 6.59 (2.06)     | <b>9.0E-05</b>  |
| <b>Καπνιστικές συνήθειες</b>                                                                | 1621   |                 | 506    | (31.2)          | 1115     | (68.8)          |                 |
| Παρόντες καπνιστές                                                                          | 257    | (15.9)          | 232    | (45.8)          | 25       | (2.2)           | <b>6.2E-172</b> |
| Πρώην καπνιστές                                                                             | 103    | (6.4)           | 98     | (19.4)          | 5        | (0.5)           |                 |
| Ποτέ καπνιστές                                                                              | 1261   | (77.8)          | 176    | (34.8)          | 1085     | (97.3)          |                 |
| <b>Ηλικία έναρξης του καπνίσματος</b>                                                       | 340    | 16.72(3.79)     | 315    | 16.61 (3.72)    | 25       | 18.08 (4.45)    | 0.062           |
| <b>Ηλικία διακοπής του καπνίσματος</b>                                                      | 109    | 41.5 (12.44)    | 105    | 41.87 (12.25)   | 4        | 32 (15.6)       | 0.120           |
| <b>Συνολικά χρόνια καπνίσματος</b>                                                          | 304    | 25 (14.07)      | 280    | 25.8 (14.02)    | 24       | 15.67 (11.25)   | <b>0.001</b>    |
| <b>Πακετοέτη*</b>                                                                           | 274    | 30.5 (24.7)     | 251    | 31.9 (24.8)     | 23       | 15.5 (18.3)     | <b>1.7E-04</b>  |

P: p-value<0.05  
TA: τυπική απόκλιση  
\*Έλεγχος Mann-Whitney

Από την ανάλυση σε κύριες συνιστώσες προέκυψαν τέσσερα διαφορετικά διατροφικά πρότυπα. Η κατανάλωση αλκοόλ και χοιρινού στον πληθυσμό των Πομάκων ήταν αμελητέες για θρησκευτικούς λόγους και για αυτό εξαιρέθηκαν. Δεκαπέντε από τα 48 εναπομείναντα τρόφιμα ή ομάδες τροφίμων συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση λόγω του υψηλού βαθμού συσχέτισής τους. Το κριτήριο KMO ήταν 0.72 και οι τέσσερις διατροφικές συνιστώσες εξηγούν 52% της συνολικής διακύμανσης των υπό μελέτη μεταβλητών (Πίνακας 3.10). Τα διατροφικά πρότυπα που προέκυψαν ήταν τα εξής: το υψηλής περιεκτικότητας σε απλά σάκχαρα πρότυπο (συνιστώσα 1), το οποίο περιελάμβανε φρούτα, γλυκά με βάση το γάλα, σοκολάτα, χυμούς αναψυκτικά και αμυλούχα γλυκά, το πρότυπο του γρήγορου φαγητού (συνιστώσα 2), που χαρακτηριζόταν από την κατανάλωση επεξεργασμένου κρέατος, πίττες του εμπορίου, άσπρο ψωμί και τηγανιτές πατάτες, το ισορροπημένο πρότυπο (συνιστώσα 3) που περιείχε μακαρόνια,

ρύζι, λαχανικά, όσπρια και κόκκινο κρέας και το σπιτικό πρότυπο (συνιστώσα 4) που περιελάμβανε σπιτικές πίττες, τυρί και πατάτες.

| Πίνακας 3.10. Συντελεστές συσχέτισης που προέκυψαν από την ανάλυση σε κύριες συνιστώσες που διεξήχθη με διατροφικές μεταβλητές (N=1,513). |              |              |              |              |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|                                                                                                                                           | Συνιστώσες   |              |              |              |
| Ερμηνευτικές μεταβλητές                                                                                                                   | 1            | 2            | 3            | 4            |
| Φρούτα                                                                                                                                    | <b>0.768</b> | -0.074       | 0.192        | -0.143       |
| Γλυκά με λίπος/γάλα                                                                                                                       | <b>0.722</b> | 0.027        | -0.065       | -0.059       |
| Αναψυκτικά και χυμοί                                                                                                                      | <b>0.694</b> | 0.147        | -0.047       | -0.154       |
| Γλυκά με άμυλο                                                                                                                            | <b>0.589</b> | 0.165        | 0.037        | 0.142        |
| Επεξεργασμένο κρέας                                                                                                                       | 0.049        | <b>0.739</b> | 0.002        | 0.002        |
| Πίττες εμπορίου                                                                                                                           | -0.065       | <b>0.678</b> | -0.048       | 0.123        |
| Άσπρο ψωμί                                                                                                                                | 0.167        | <b>0.678</b> | 0.041        | 0.391        |
| Τηγανιτές πατάτες                                                                                                                         | 0.190        | <b>0.490</b> | 0.128        | -0.278       |
| Μακαρόνια και ρύζι                                                                                                                        | -0.052       | -0.106       | <b>0.716</b> | 0.133        |
| Λαχανικά                                                                                                                                  | 0.206        | 0.024        | <b>0.639</b> | 0.247        |
| Όσπρια                                                                                                                                    | -0.405       | 0.073        | <b>0.571</b> | 0.014        |
| Κόκκινο κρέας                                                                                                                             | 0.350        | 0.278        | <b>0.533</b> | -0.192       |
| Σπιτικές πίττες                                                                                                                           | -0.277       | -0.030       | 0.219        | <b>0.706</b> |
| Τυρί                                                                                                                                      | 0.155        | 0.493        | 0.042        | <b>0.597</b> |
| Πατάτες                                                                                                                                   | -0.041       | 0.057        | 0.056        | <b>0.569</b> |
| Ερμηνεύσιμη μεταβλητότητα (%)                                                                                                             | 16.3         | 14.0         | 11.0         | 10.7         |

Σε ότι αφορά τα βιοχημικά δεδομένα (Πίνακας 3.11), οι γυναίκες φάνηκε να έχουν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα επίπεδα HDL χοληστερόλης ( $p=1.1E-33$ ) και χαμηλότερα επίπεδα τριγλυκεριδίων ( $p=4.8E-05$ ) σε σχέση με τους άντρες. Η ομάδα με τα υψηλότερα σκορ στην υψηλής περιεκτικότητας σε απλά σάκχαρα δίαιτα και στο ισορροπημένο πρότυπο είχε υψηλότερη μέση τιμή γλυκόζης. Η μέση HDL χοληστερόλη ήταν χαμηλότερη στην ομάδα με τα υψηλότερα σκορ στην υψηλής περιεκτικότητας σε απλά σάκχαρα δίαιτα, ενώ η LDL και η ολική χοληστερόλη φάνηκε να είναι υψηλότερες στην ομάδα με τα χαμηλότερα σκορ στο πρότυπο του γρήγορου φαγητού. Η ομάδα με τα υψηλότερα σκορ στην υψηλής περιεκτικότητας σε απλά σάκχαρα δίαιτα παρουσίασε χαμηλότερα επίπεδα τριγλυκεριδίων σε σύγκριση με την ομάδα με τα χαμηλότερα σκορ του ίδιου προτύπου.

Τα αποτελέσματα της πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης φαίνονται στον Πίνακα 3.12. Το υψηλής περιεκτικότητας σε απλά σάκχαρα πρότυπο, βρέθηκε να συσχετίζεται θετικά με την ΣΑΠ ( $\beta=2.47$ ,  $p=2.4E-07$ ), την ΔΑΠ ( $\beta=1.46$ ,  $p=3.3E-04$ ) και τα επίπεδα γλυκόζης ( $\beta=3.44$ ,  $p=2.5E-07$ ) και αρνητικά με την HDL χοληστερόλη ( $\beta=-1.18$ ,  $p=0.005$ ), μετά την διόρθωση για συγχυτικούς παράγοντες και τα υπόλοιπα διατροφικά πρότυπα. Επιπλέον, το υψηλής

περιεκτικότητας σε απλά σάκχαρα πρότυπο συσχετιζόταν με τα επίπεδα LDL χοληστερόλης αλλά όχι μετά την διόρθωση για την υπόλοιπη διατροφή.



Το πρότυπο του γρήγορου φαγητού φάνηκε να συσχετίζεται συστηματικά με τα επίπεδα ινσουλίνης ( $\beta=0.73$ ,  $p=0.025$ ).

Το ισορροπημένο πρότυπο σχετιζόταν στατιστικά σημαντικά με μειωμένη ΣΑΠ ( $\beta=-1.59$ ,  $p=0.001$ ), ΔΑΠ ( $\beta=-0.85$ ,  $p=0.017$ ) και LDL χοληστερόλη ( $\beta=-2.15$ ,  $p=0.047$ ), αποτελώντας το αντίβαρο του υψηλής περιεκτικότητας σε απλά σάκχαρα προτύπου.

Το σπιτικό πρότυπο βρέθηκε να συσχετίζεται με την HDL χοληστερόλη μετά την διόρθωση για συγχυτικούς παράγοντες αλλά η επίδραση έπαψε να είναι στατιστικά σημαντική μετά την διόρθωση για τα υπόλοιπα διατροφικά πρότυπα.

Οι αναλύσεις της λογιστικής παλινδρόμησης, που συνοψίζονται στον Πίνακα 3.13, έδειξαν ότι μεγαλύτερη συμμόρφωση στο υψηλής περιεκτικότητας σε απλά σάκχαρα πρότυπο συσχετιζόταν με αυξημένο κίνδυνο για χαμηλή HDL (OR[95%CI] 1.84[1.24,2.75],  $p=0.003$ ), συστολική και διαστολική υπέρταση (OR[95%CI] 2.40[1.38,4.17],  $p=0.002$  και OR[95%CI] 2.61[1.55,4.39],  $p=3.1E-04$ , αντίστοιχα) και υπεργλυκαιμία (OR[95%CI] 1.85[1.11,3.08],  $p=0.018$ ), σε σύγκριση με την χαμηλότερη συμμόρφωση.

Αντίθετα, η προσκόλληση στο ισορροπημένο πρότυπο φάνηκε να σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο για LDL υπερλιπιδαιμία (OR[95%CI] 0.62[0.43,0.89],  $p=0.010$ ).

Πίνακας 3.12. Αποτελέσματα της πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης για την αξιολόγηση της συσχέτισης των διατροφικών προτύπων με καρδιομεταβολικούς δείκτες (N=1,513).

|                         | Μοντέλο1 |             |                | Μοντέλο2 |             |                | Μοντέλο3 |             |                | Μοντέλο4 |             |                |
|-------------------------|----------|-------------|----------------|----------|-------------|----------------|----------|-------------|----------------|----------|-------------|----------------|
| HDL (mg/dl)             | $\beta$  | $\Delta E$  | P              | $\beta$  | $\Delta E$  | P              | $\beta$  | $\Delta E$  | P              | $\beta$  | $\Delta E$  | P              |
| Πλούσιο σε απλά σάκχαρα | -1.39    | -2.03,-0.75 | <b>2.2E-05</b> | -1.03    | -1.64,-0.42 | <b>0.001</b>   | -1.28    | -2.02,-0.55 | <b>0.001</b>   | -1.18    | -1.99,-0.36 | <b>0.005</b>   |
| Γρήγορο φαγητό          | -0.43    | -1.07,0.21  | 0.190          | 0.16     | -0.46,0.78  | 0.604          | 0.23     | -0.45,0.91  | 0.508          | -0.02    | -0.75,0.70  | 0.949          |
| Ισορροπημένο            | -0.23    | -0.87,0.41  | 0.485          | 0.35     | -0.26,0.95  | 0.262          | 0.40     | -0.27,1.07  | 0.244          | 0.19     | -0.52,0.90  | 0.597          |
| Σπιτικό                 | 0.35     | -0.30,0.99  | 0.289          | 0.68     | 0.08,1.28   | <b>0.026</b>   | 0.69     | 0.07,1.31   | <b>0.030</b>   | 0.62     | -0.01,1.25  | 0.054          |
| <b>ΣΑΠ (mmHg)</b>       |          |             |                |          |             |                |          |             |                |          |             |                |
| Πλούσιο σε απλά σάκχαρα | 2.87     | 1.84,3.89   | <b>5.2E-08</b> | 3.63     | 2.85,4.41   | <b>4.7E-19</b> | 3.36     | 2.42,4.30   | <b>4.4E-12</b> | 2.74     | 1.71,3.77   | <b>2.4E-07</b> |
| Γρήγορο φαγητό          | -1.10    | -2.14,-0.06 | <b>0.037</b>   | -0.11    | -0.93,0.71  | 0.791          | -1.02    | -1.90,-0.14 | <b>0.023</b>   | -0.53    | -1.45,0.39  | 0.260          |
| Ισορροπημένο            | 0.74     | -0.30,1.78  | 0.163          | -1.00    | -1.80,-0.20 | <b>0.014</b>   | -2.10    | -2.96,-1.24 | <b>2.2E-06</b> | -1.59    | -2.50,-0.69 | <b>0.001</b>   |
| Σπιτικό                 | 1.06     | 0.02,2.10   | <b>0.045</b>   | -0.02    | -0.81,0.78  | 0.968          | -0.31    | -1.12,0.51  | 0.459          | -0.26    | -1.06,0.54  | 0.527          |
| <b>ΔΑΠ (mmHg)</b>       |          |             |                |          |             |                |          |             |                |          |             |                |
| Πλούσιο σε απλά σάκχαρα | 1.65     | 0.99,2.32   | <b>1.4E-06</b> | 1.94     | 1.35,2.54   | <b>2.3E-10</b> | 1.56     | 0.84,2.28   | <b>2.5E-05</b> | 1.46     | 0.67,2.26   | <b>3.3E-04</b> |
| Γρήγορο φαγητό          | 0.20     | -0.48,0.87  | 0.569          | 0.71     | 0.10,1.32   | <b>0.023</b>   | 0.20     | -0.47,0.86  | 0.562          | 0.46     | -0.25,1.17  | 0.208          |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                    |       |             |                |       |            |                |       |             |                |       |             |                |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------------|----------------|-------|------------|----------------|-------|-------------|----------------|-------|-------------|----------------|
| Ισορροπημένο                                                                                                                                                                                                                                                                       | 0.37  | -0.30,1.05  | 0.278          | -0.48 | -1.08,0.11 | 0.112          | -1.22 | -1.87,-0.56 | <b>3.0E-04</b> | -0.85 | -1.54,-0.15 | <b>0.017</b>   |
| Σπιτικό                                                                                                                                                                                                                                                                            | 0.51  | -0.17,1.18  | 0.141          | -0.01 | -0.61,0.58 | 0.965          | -0.23 | -0.84,0.38  | 0.463          | -0.17 | -0.79,0.45  | 0.587          |
| <b>Χοληστερόλη (mg/dl)</b>                                                                                                                                                                                                                                                         |       |             |                |       |            |                |       |             |                |       |             |                |
| Πλούσιο σε απλά σακχαρά                                                                                                                                                                                                                                                            | 0.06  | -2.03,2.15  | 0.956          | 0.51  | -1.56,2.57 | 0.629          | 0.76  | -1.72,3.23  | 0.550          | -0.43 | -3.17,2.30  | 0.756          |
| Γρήγορο φαγητό                                                                                                                                                                                                                                                                     | -2.63 | -4.71,-0.54 | <b>0.014</b>   | -1.29 | -3.37,0.79 | 0.224          | -1.65 | -3.91,0.62  | 0.153          | -2.05 | -4.49,0.39  | 0.100          |
| Ισορροπημένο                                                                                                                                                                                                                                                                       | 0.31  | -1.78,2.40  | 0.771          | -1.41 | -3.44,0.62 | 0.173          | -1.46 | -3.71,0.78  | 0.201          | -1.88 | -4.27,0.52  | 0.124          |
| Σπιτικό                                                                                                                                                                                                                                                                            | 0.61  | -1.48,2.71  | 0.565          | -0.41 | -2.42,1.61 | 0.691          | -0.14 | -2.22,1.95  | 0.897          | -1.40 | -2.52,1.71  | 0.710          |
| <b>LDL (mg/dl)</b>                                                                                                                                                                                                                                                                 |       |             |                |       |            |                |       |             |                |       |             |                |
| Πλούσιο σε απλά σακχαρά                                                                                                                                                                                                                                                            | 2.10  | 0.25,3.95   | <b>0.026</b>   | 2.21  | 0.37,4.06  | <b>0.019</b>   | 2.70  | 0.50,4.90   | <b>0.016</b>   | 1.45  | -0.97,3.89  | 0.240          |
| Γρήγορο φαγητό                                                                                                                                                                                                                                                                     | -1.92 | -3.78,-0.07 | <b>0.042</b>   | -1.47 | -3.34,0.40 | 0.122          | -2.10 | -4.12,-0.09 | <b>0.041</b>   | -2.04 | -4.20,0.13  | 0.065          |
| Ισορροπημένο                                                                                                                                                                                                                                                                       | -0.37 | -2.22,1.48  | 0.695          | -1.80 | -3.61,0.02 | 0.053          | -2.16 | -4.16,-0.17 | <b>0.033</b>   | -2.15 | -4.28,-0.03 | <b>0.047</b>   |
| Σπιτικό                                                                                                                                                                                                                                                                            | 0.46  | -1.39,2.31  | 0.627          | -0.36 | -2.17,1.44 | 0.693          | -0.16 | -2.02,1.70  | 0.169          | -0.31 | -2.18,1.57  | 0.748          |
| <b>Γλυκόζη (mg/dl)</b>                                                                                                                                                                                                                                                             |       |             |                |       |            |                |       |             |                |       |             |                |
| Πλούσιο σε απλά σακχαρά                                                                                                                                                                                                                                                            | 3.11  | 2.00,4.22   | <b>5.1E-08</b> | 3.37  | 2.30,4.43  | <b>6.8E-10</b> | 3.38  | 2.20,4.57   | <b>2.4E-08</b> | 3.44  | 2.14,4.75   | <b>2.5E-07</b> |
| Γρήγορο φαγητό                                                                                                                                                                                                                                                                     | -1.09 | -2.21,0.04  | 0.058          | -0.72 | -1.81,0.36 | 0.192          | -1.35 | -2.44,-0.26 | <b>0.015</b>   | -0.35 | -1.51,0.81  | 0.557          |
| Ισορροπημένο                                                                                                                                                                                                                                                                       | 2.17  | 1.06,3.29   | <b>1.5E-04</b> | 0.98  | -0.08,2.04 | 0.070          | 0.36  | -0.72,1.45  | 0.511          | 0.99  | -0.15,2.13  | 0.090          |
| Σπιτικό                                                                                                                                                                                                                                                                            | -0.06 | -1.18,1.07  | 0.922          | -0.80 | -1.85,0.25 | 0.134          | -1.25 | -2.26,-0.24 | <b>0.015</b>   | -0.95 | -1.95,0.06  | 0.066          |
| <b>Ινσουλίνη (μIU/ml)</b>                                                                                                                                                                                                                                                          |       |             |                |       |            |                |       |             |                |       |             |                |
| Πλούσιο σε απλά σακχαρά                                                                                                                                                                                                                                                            | 0.11  | -0.42,0.64  | 0.675          | -0.19 | -0.73,0.34 | 0.479          | -0.19 | -0.84,0.46  | 0.566          | 0.09  | -0.62,0.81  | 0.799          |
| Γρήγορο φαγητό                                                                                                                                                                                                                                                                     | 0.58  | 0.05,1.11   | <b>0.032</b>   | 0.55  | 0.01,1.09  | <b>0.044</b>   | 0.68  | 0.09,1.27   | <b>0.025</b>   | 0.73  | 0.09,1.37   | <b>0.025</b>   |
| Ισορροπημένο                                                                                                                                                                                                                                                                       | 0.29  | -0.24,0.82  | 0.288          | 0.04  | -0.48,0.57 | 0.877          | 0.12  | -0.46,0.71  | 0.679          | 0.24  | -0.39,0.86  | 0.461          |
| Σπιτικό                                                                                                                                                                                                                                                                            | -0.07 | -0.60,0.46  | 0.790          | -0.19 | -0.71,0.33 | 0.473          | -0.17 | -0.71,0.38  | 0.550          | -0.11 | -0.66,0.44  | 0.697          |
| ΔΕ:διάστημα εμπιστοσύνης<br>Μοντέλο1: μη διορθωμένο<br>Μοντέλο2: διορθωμένο για ηλικία, φύλο, ΔΜΣ<br>Μοντέλο3: Μοντέλο2, φαρμακευτική αγωγή, κάπνισμα, ενεργειακή πρόσληψη/ενεργειακή δαπάνη<br>Μοντέλο4: Μοντέλο3 και τα υπόλοιπα διατροφικά πρότυπα<br><b>P: p-value&lt;0.05</b> |       |             |                |       |            |                |       |             |                |       |             |                |

Πίνακας 3.13. Αποτελέσματα λογαριθμικής παλινδρόμησης για την διερεύνηση της συσχέτισης των τριτημορίων των διατροφικών προτύπων με τις παθολογικές ομάδες καρδιομεταβολικών δεικτών (N=1,513).

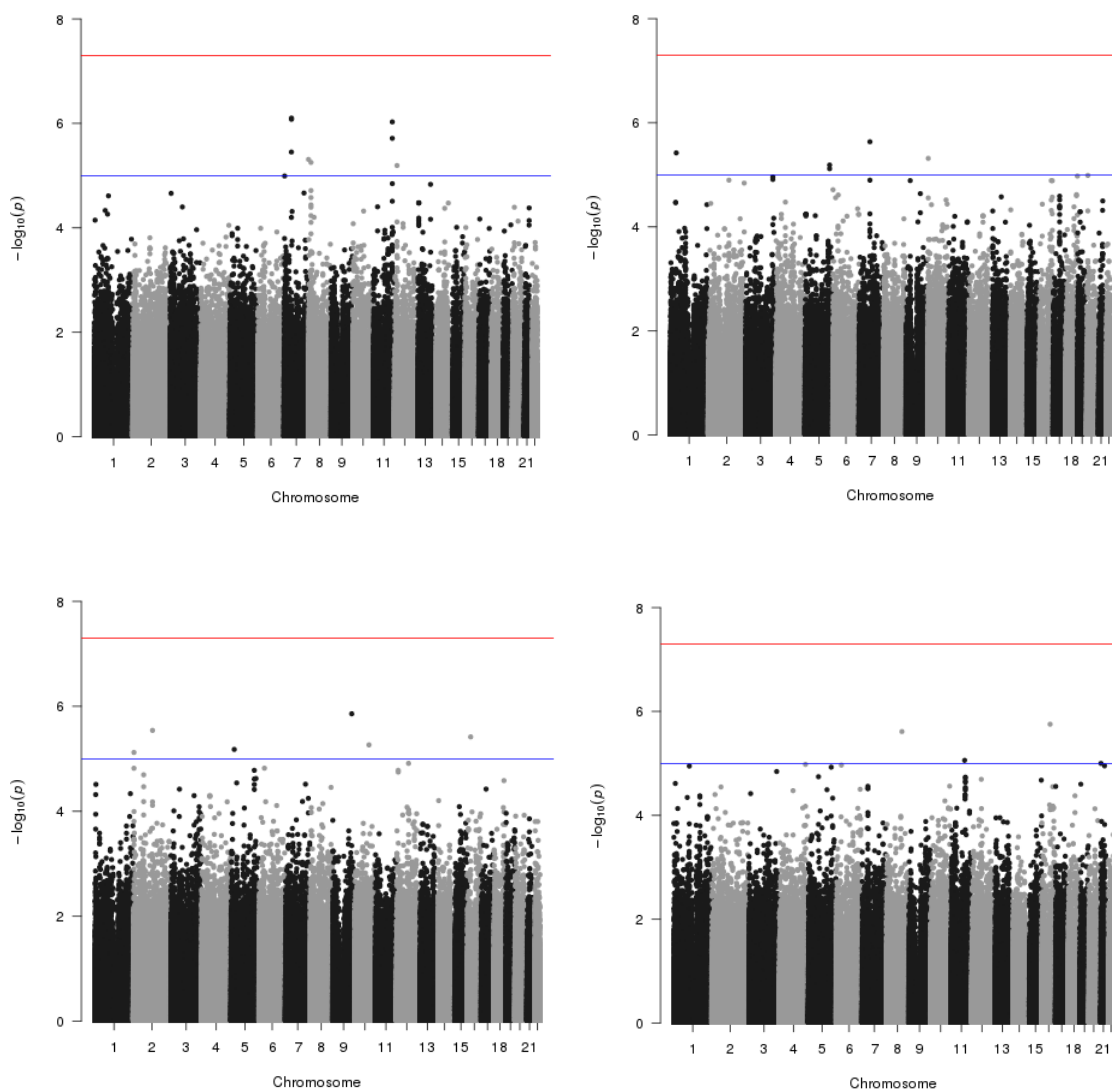
|                 | Τριτημόρια σκορ του υψηλής περιεκτικότητας σε απλά σάκχαρα προτύπου |                                  |                                  |                                |                                  |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
|                 |                                                                     | ΜΟΝΤΕΛΟ 1                        |                                  | ΜΟΝΤΕΛΟ 2                      |                                  |
|                 | 1ο                                                                  | 2ο                               | 3ο                               | 2ο                             | 3ο                               |
|                 | Αναφ.                                                               | ΣΛ (95%ΔΕ)- P                    |                                  | ΣΛ (95%ΔΕ)- P                  |                                  |
| Χαμηλή HDL      | 1.00                                                                | <b>1.51 (1.09,2.09)- 0.013</b>   | <b>2.00 (1.38,2.90)- 2.4E-04</b> | <b>1.42 (1.01,2.00)- 0.043</b> | <b>1.84 (1.24,2.75)- 0.003</b>   |
| Ομάδες ΣΑΠ      | 1.00                                                                | <b>2.27 (1.50,3.44)- 1.1E-04</b> | <b>2.87 (1.74,4.72)- 3.5E-05</b> | <b>2.07 (1.32,3.23)- 0.001</b> | <b>2.40 (1.38,4.17)- 0.002</b>   |
| Ομάδες ΔΑΠ      | 1.00                                                                | 1.85 (1.25,2.73)- 0.002          | <b>2.55 (1.60,4.07)- 8.8E-05</b> | <b>1.87 (1.23,2.84)- 0.003</b> | <b>2.61 (1.55,4.39)- 3.1E-04</b> |
| Ομάδες LDL      | 1.00                                                                | 1.19 (0.85,1.66)- 0.321          | <b>1.71 (1.14,2.55)- 0.009</b>   | 1.06 (0.74,1.54)- 0.757        | 1.47 (0.96,2.27)- 0.079          |
| Ομάδες γλυκόζης | 1.00                                                                | 1.50 (1.00,2.25)- 0.052          | <b>1.64 (1.03,2.62)- 0.037</b>   | <b>1.64 (1.06,2.55)- 0.025</b> | <b>1.85 (1.11,3.08)- 0.018</b>   |
|                 | Τριτημόρια σκορ του ισορροπημένου προτύπου                          |                                  |                                  |                                |                                  |
|                 |                                                                     | ΜΟΝΤΕΛΟ 1                        |                                  | ΜΟΝΤΕΛΟ 2                      |                                  |
|                 | 1ο                                                                  | 2ο                               | 3ο                               | 2ο                             | 3ο                               |
|                 | Αναφ.                                                               | ΣΛ (95%ΔΕ)- P                    |                                  | ΣΛ (95%ΔΕ)- P                  |                                  |
| Ομάδες ΣΑΠ      | 1.00                                                                | <b>0.57 (0.38,0.85)- 0.006</b>   | <b>0.63 (0.42,0.97)- 0.035</b>   | <b>0.56 (0.37,0.86)- 0.007</b> | 0.72 (0.46,1.13)- 0.153          |
| Ομάδες ΔΑΠ      | 1.00                                                                | 0.84 (0.57,1.22)- 0.350          | 0.84 (0.56,1.25)- 0.387          | 0.86 (0.58,1.27)- 0.433        | 0.96 (0.63,1.48)- 0.857          |
| Ομάδες LDL      | 1.00                                                                | 0.82 (0.59,1.15)- 0.259          | <b>0.62 (0.43,0.88)- 0.008</b>   | 0.81 (0.58,1.15)- 0.240        | <b>0.62 (0.43,0.89)- 0.010</b>   |

P: **p-value**<0.05  
 ΣΛ: σχετικός λόγος, ΔΕ: διάστημα εμπιστοσύνης  
 Αναφ. Ομάδα αναφοράς  
 Μοντέλο1: : διορθωμένο για ηλικία, φύλο, ΔΜΣ, φαρμακευτική αγωγή, κάπνισμα, ενεργειακή πρόσληψη/ενεργειακή δαπάνη  
 Μοντέλο2: Μοντέλο2 και τα υπόλοιπα διατροφικά πρότυπα

### **3.3. Αλληλεπιδράσεις γενετικών και διατροφικών παραγόντων**

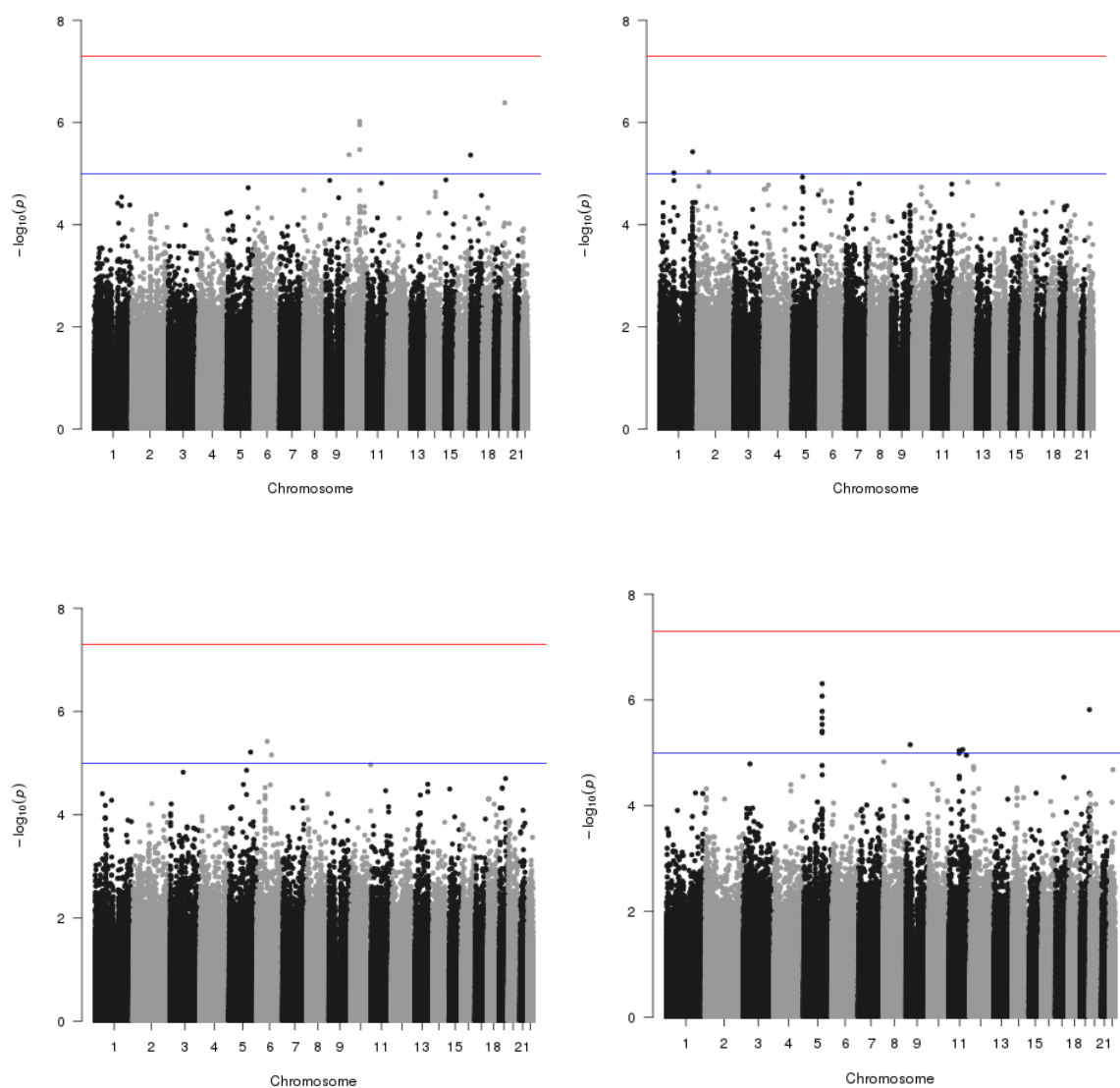
Στους δύο πληθυσμούς MANOLIS και POMAK της μελέτης HELIC, πραγματοποιήθηκε ανάλυση σάρωσης του γονιδιώματος σε 702,284 και 683,466 πολυμορφισμούς, αντίστοιχα, για τον ΔΜΣ, την περιφέρεια μέσης, την διαστολική και συστολική πίεση, την HDL και ολική χοληστερόλη. Στην συνέχεια διερευνήθηκαν οι αλληλεπιδράσεις σε επίπεδο σάρωσης του γονιδιώματος για τους παραπάνω δείκτες καρδιαγγειακού κινδύνου με παράγοντες του τρόπου ζωής. Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής θα παρουσιαστούν και θα αναλυθούν ως περιβαλλοντικοί παράγοντες τα διατροφικά πρότυπα που προέκυψαν από την ανάλυση σε κύριες συνιστώσες από τα δεδομένα του κάθε πληθυσμού. Το γενετικό μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το προσθετικό λαμβάνοντας υπόψιν συγχυτικούς παράγοντες (το φύλο, την ηλικία και τις τρεις πρώτες συνιστώσες για στάθμιση της πληθυσμιακής διαστρωμάτωσης).

Τα αποτελέσματα της συσχέτισης όλων των πολυμορφισμών με τους παραπάνω φαινότυπους και για τους δυο πληθυσμούς παρουσιάζονται στις Εικόνες 3.5-3.16.



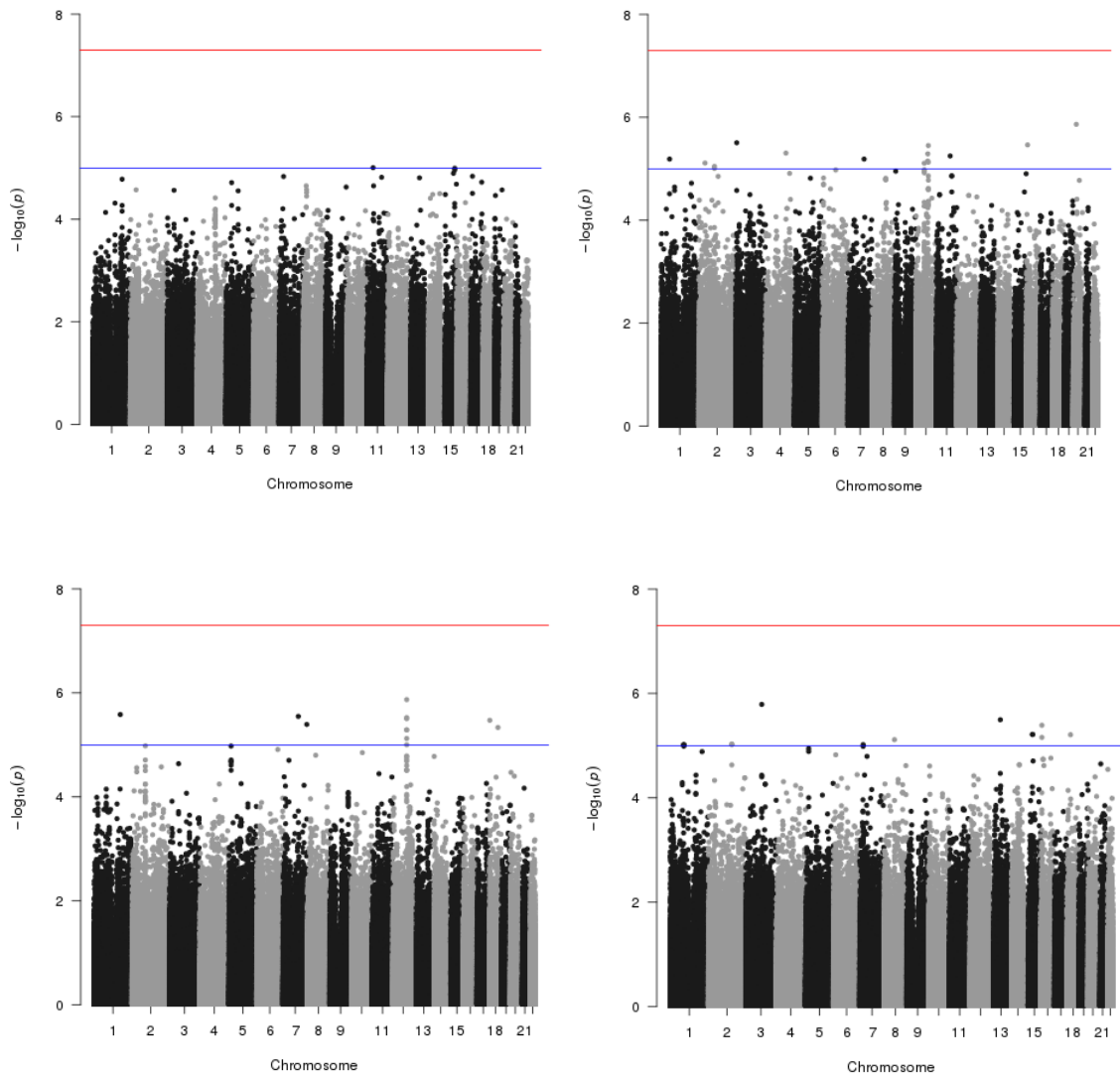
Εικόνα 3.5 Γραφήματα Manhattan των αποτελεσμάτων της αλληλεπίδρασης των πολυμορφισμών με τα διατροφικά πρότυπα πάνω-αριστερά: «καφενείου», πάνω-δεξιά: «τοπικό», κάτω-αριστερά: «ελαιόλαδο, φρούτα και λαχανικά», και κάτω-δεξιά: «υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος και απλά σάκχαρα», στον ΔΜΣ στα άτομα της μελέτης MANOLIS.

## Ολική χοληστερόλη-MANOLIS



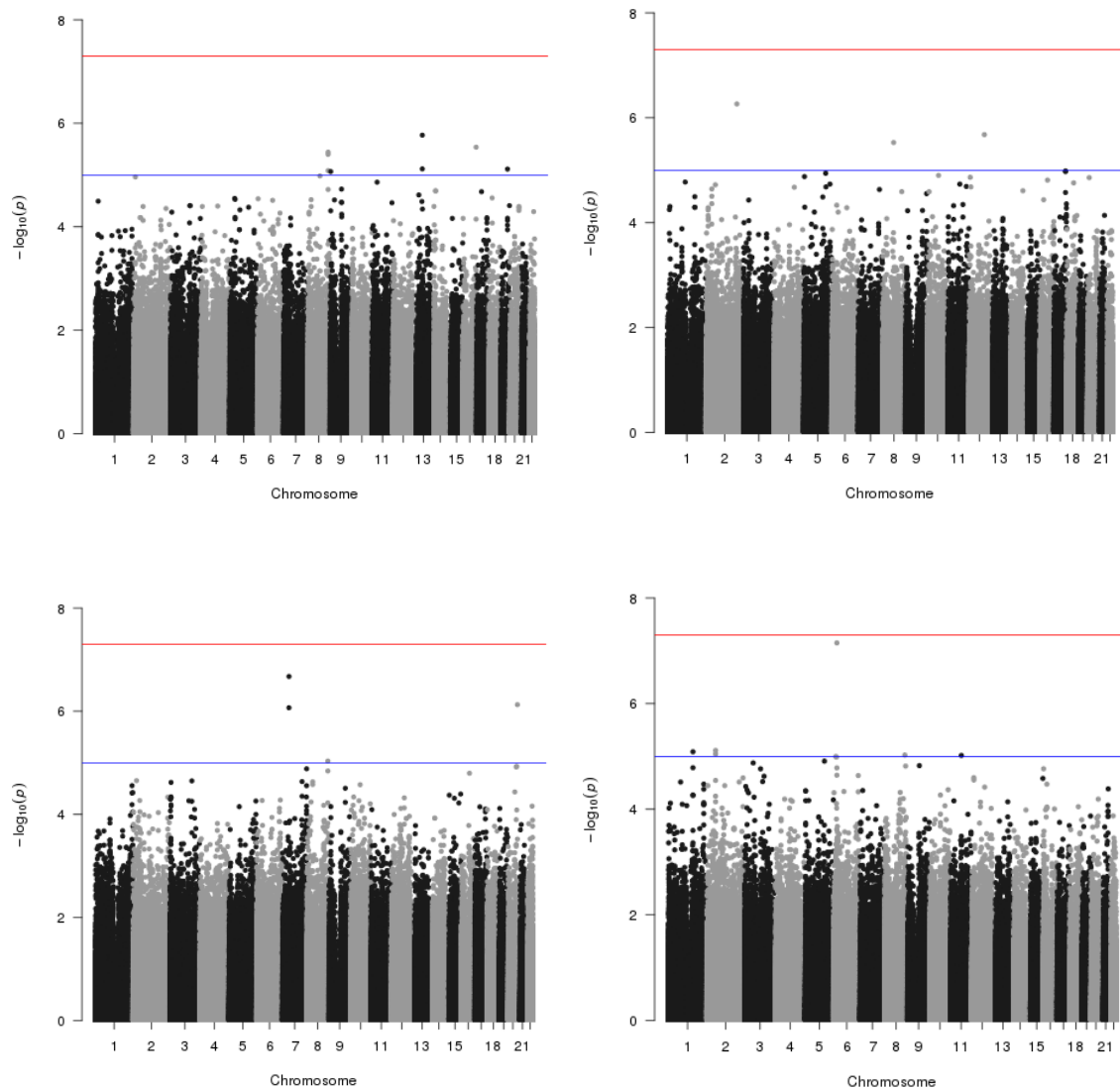
Εικόνα 3.6 Γραφήματα Manhattan των αποτελεσμάτων της αλληλεπίδρασης των πολυμορφισμών με τα διατροφικά πρότυπα πάνω-αριστερά: «καφενείου», πάνω-δεξιά: «τοπικό», κάτω-αριστερά: «ελαιόλαδο, φρούτα και λαχανικά», και κάτω-δεξιά: «υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος και απλά σάκχαρα», στην ολική χοληστερόλη στα άτομα της μελέτης MANOLIS.

### Διαστολική πίεση-MANOLIS



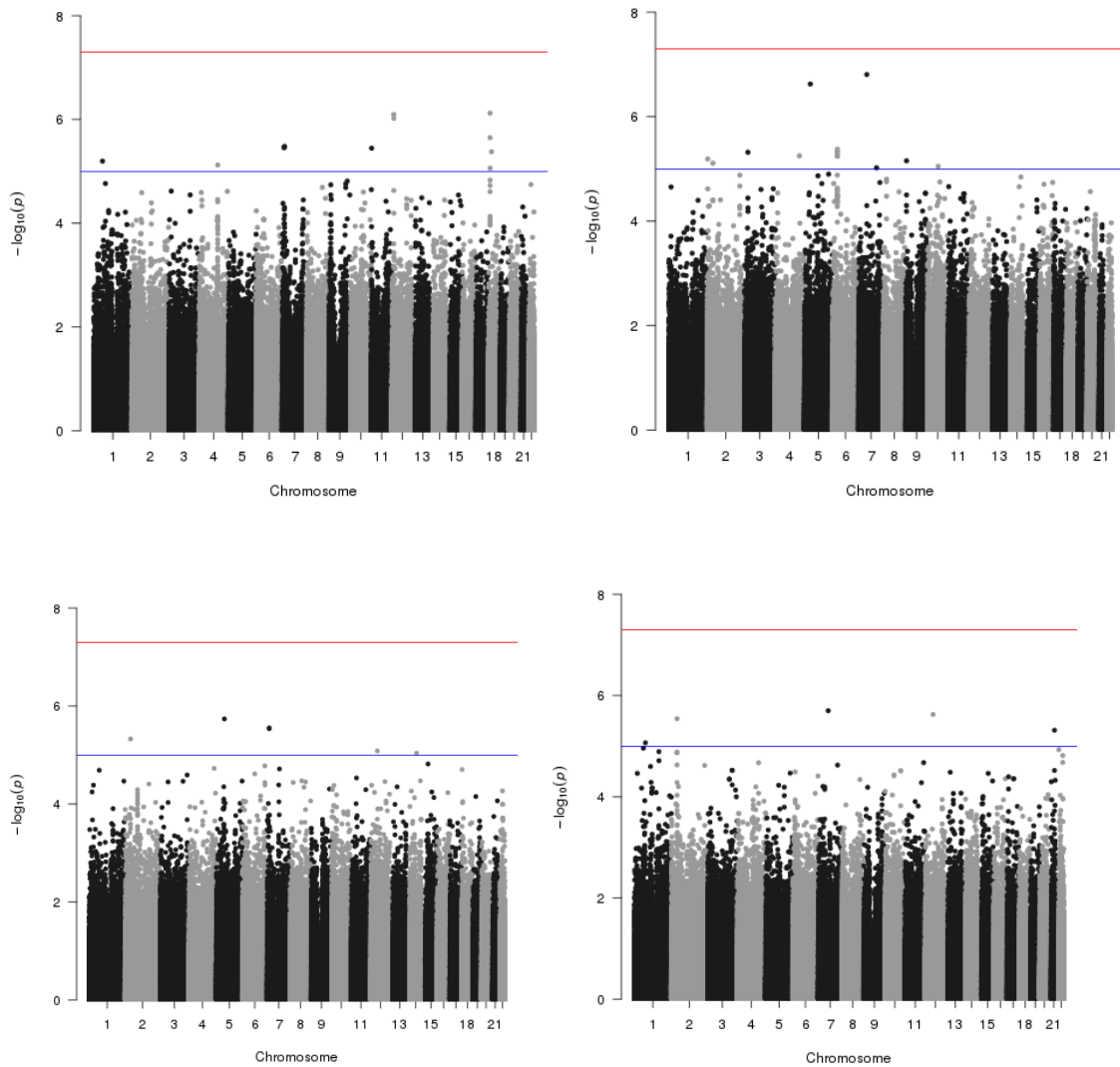
Εικόνα 3.7 Γραφήματα Manhattan των αποτελεσμάτων της αλληλεπίδρασης των πολυμορφισμών με τα διατροφικά πρότυπα πάνω-αριστερά: «καφενείου», πάνω-δεξιά: «τοπικό», κάτω-αριστερά: «ελαιόλαδο, φρούτα και λαχανικά», και κάτω-δεξιά: «υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος και απλά σάκχαρα», στην διαστολική πίεση στα άτομα της μελέτης MANOLIS.

### HDL χοληστερόλη-MANOLIS



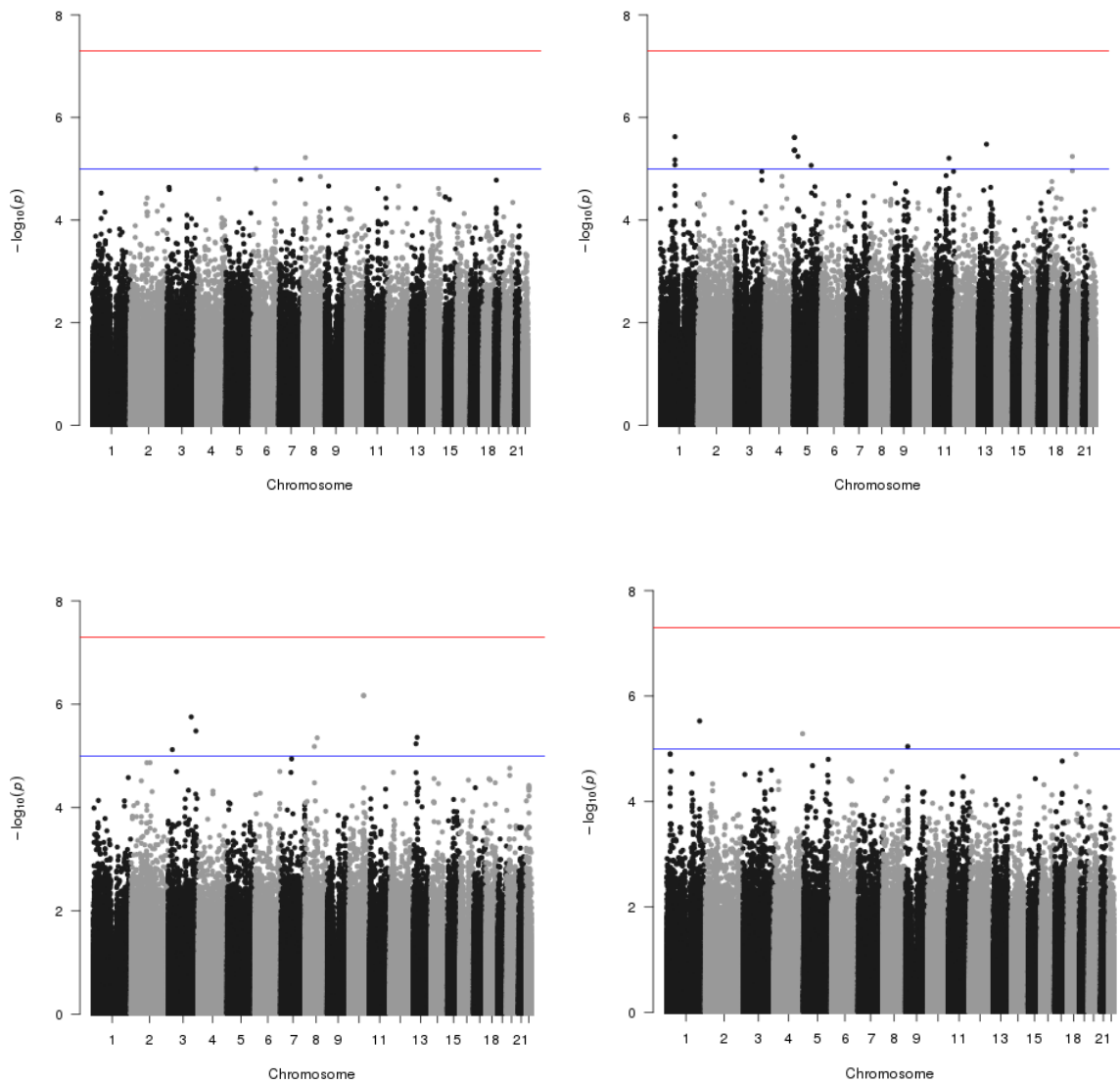
Εικόνα 3.8 Γραφήματα Manhattan των αποτελεσμάτων της αλληλεπίδρασης των πολυμορφισμών με τα διατροφικά πρότυπα πάνω-αριστερά: «καφενείου», πάνω-δεξιά: «τοπικό», κάτω-αριστερά: «ελαιόλαδο, φρούτα και λαχανικά», και κάτω-δεξιά: «υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος και απλά σάκχαρα», στην HDL χοληστερόλη στα άτομα της μελέτης MANOLIS.

### Συστολική πίεση-MANOLIS

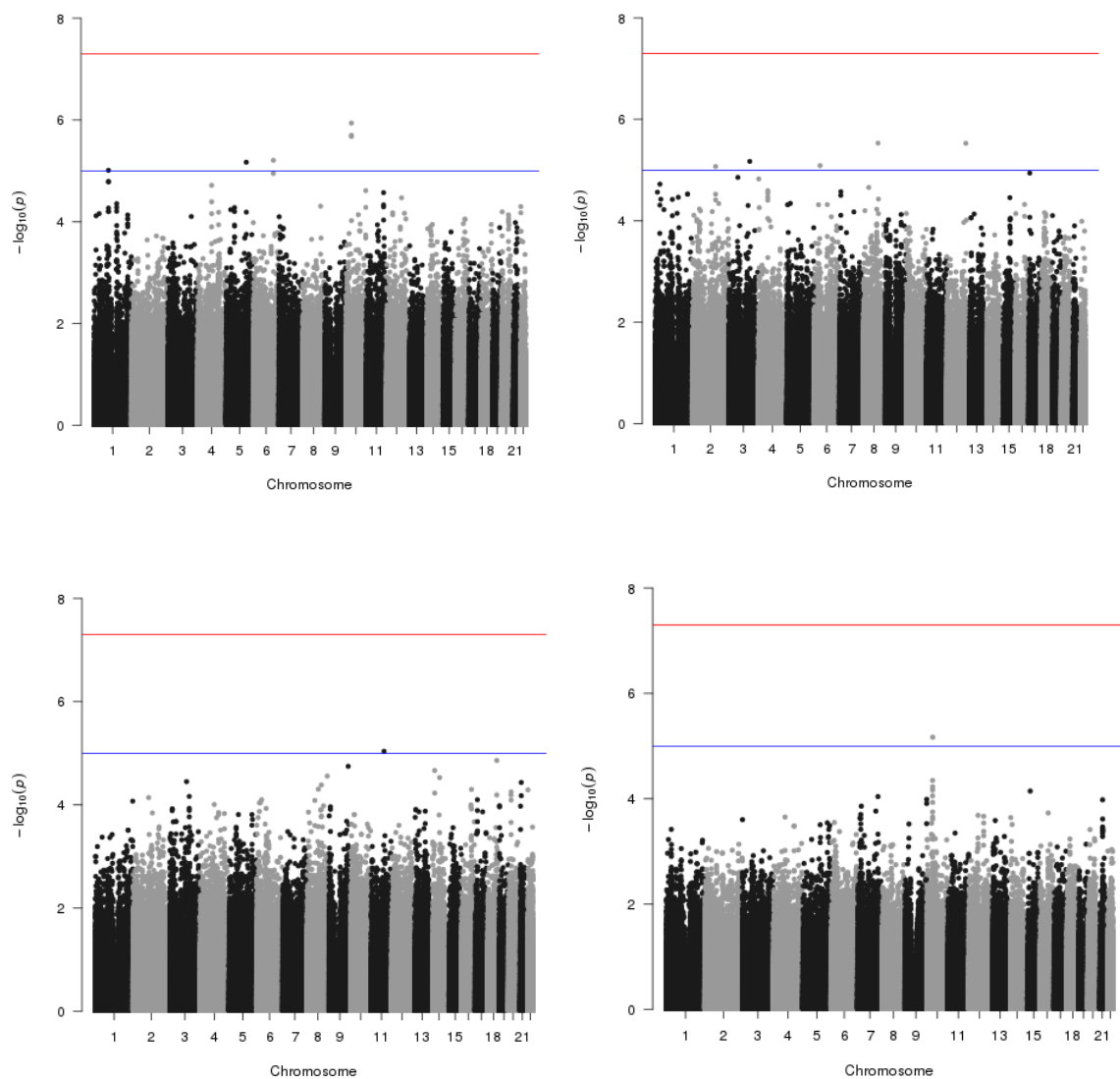


Εικόνα 3.9 Γραφήματα Manhattan των αποτελεσμάτων της αλληλεπίδρασης των πολυμορφισμών με τα διατροφικά πρότυπα πάνω-αριστερά: «καφενείου», πάνω-δεξιά: «τοπικό», κάτω-αριστερά: «ελαιόλαδο, φρούτα και λαχανικά», και κάτω-δεξιά: «υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος και απλά σάκχαρα», στην συστολική πίεση στα άτομα της μελέτης MANOLIS.

### Περιφέρεια μέσης-MANOLIS

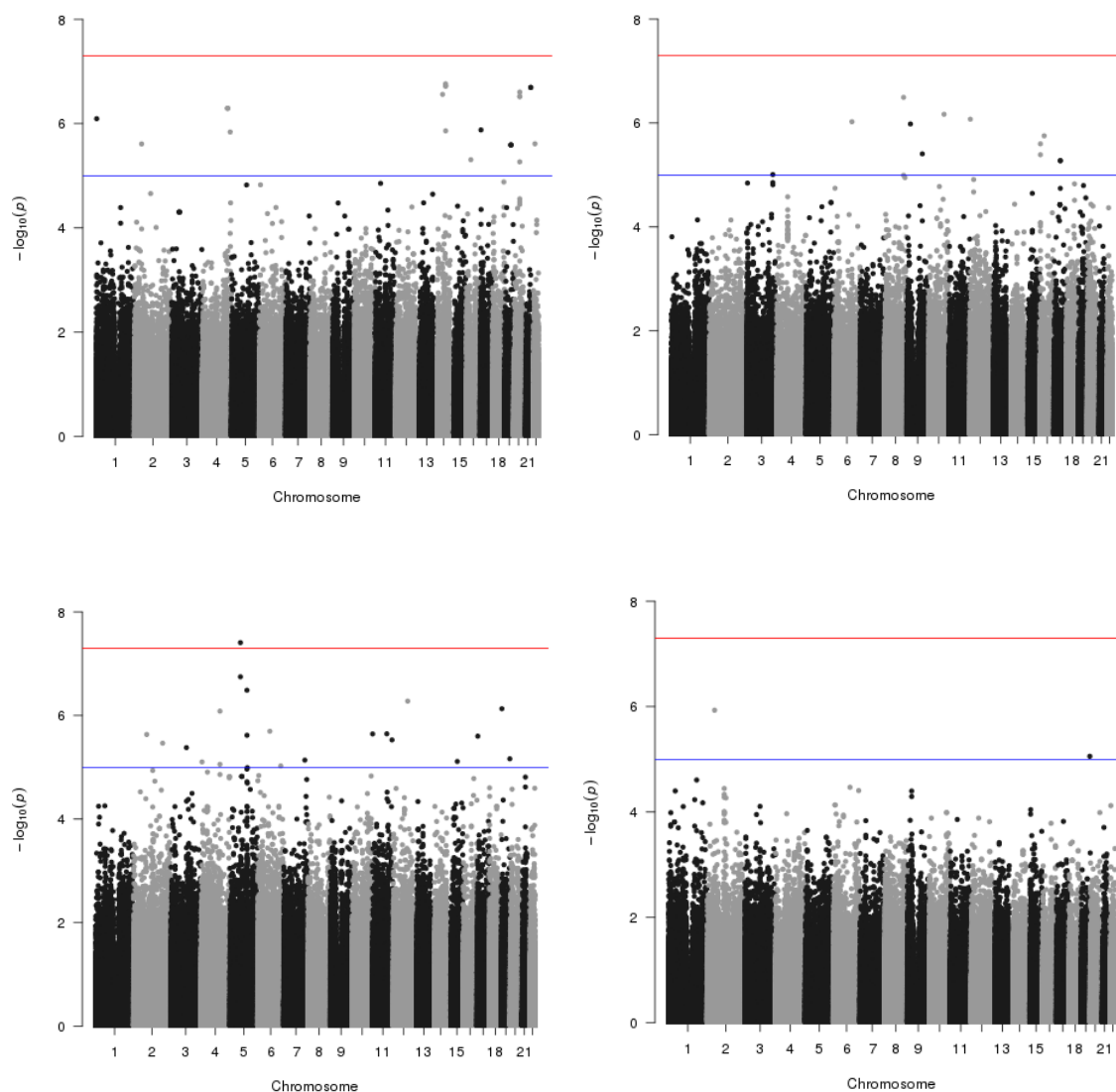


Εικόνα 3.10 Γραφήματα Manhattan των αποτελεσμάτων της αλληλεπίδρασης των πολυμορφισμών με τα διατροφικά πρότυπα πάνω-αριστερά: «καφενείου», πάνω-δεξιά: «τοπικό», κάτω-αριστερά: «ελαιόλαδο, φρούτα και λαχανικά», και κάτω-δεξιά: «υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος και απλά σάκχαρα», στην περιφέρεια μέσης στα άτομα της μελέτης MANOLIS.



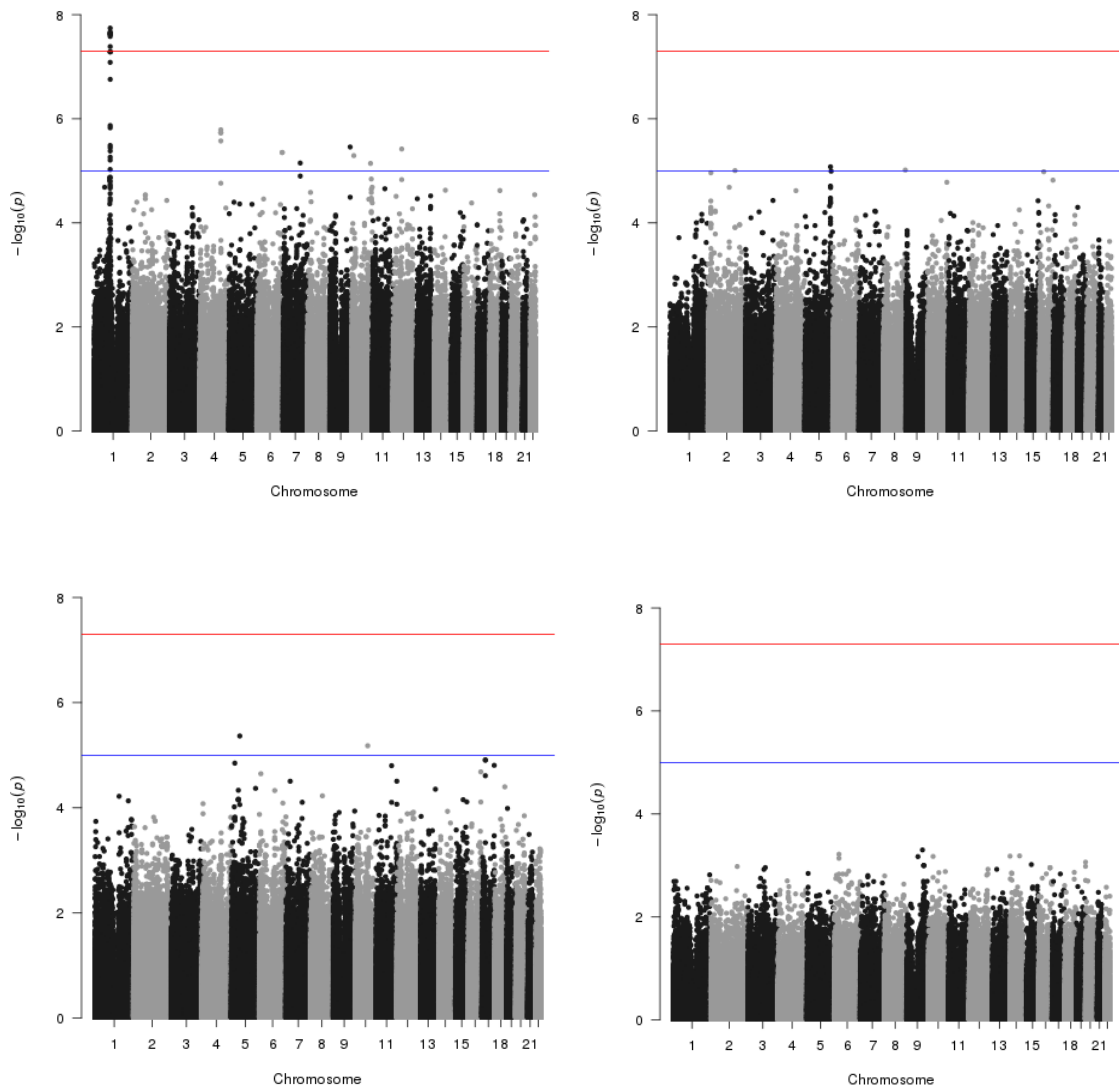
Εικόνα 3.11 Γραφήματα Manhattan των αποτελεσμάτων της αλληλεπίδρασης των πολυμορφισμών με τα διατροφικά πρότυπα πάνω-αριστερά: «ισορροπημένο», πάνω-δεξιά: «σπιτικό», κάτω-αριστερά: «γρήγορο φαγητό» και κάτω-δεξιά: «υψηλής περιεκτικότητας σε απλά σάκχαρα», στον ΔΜΣ στα άτομα της μελέτης POMAK.

### Ολική χοληστερόλη-POMAK



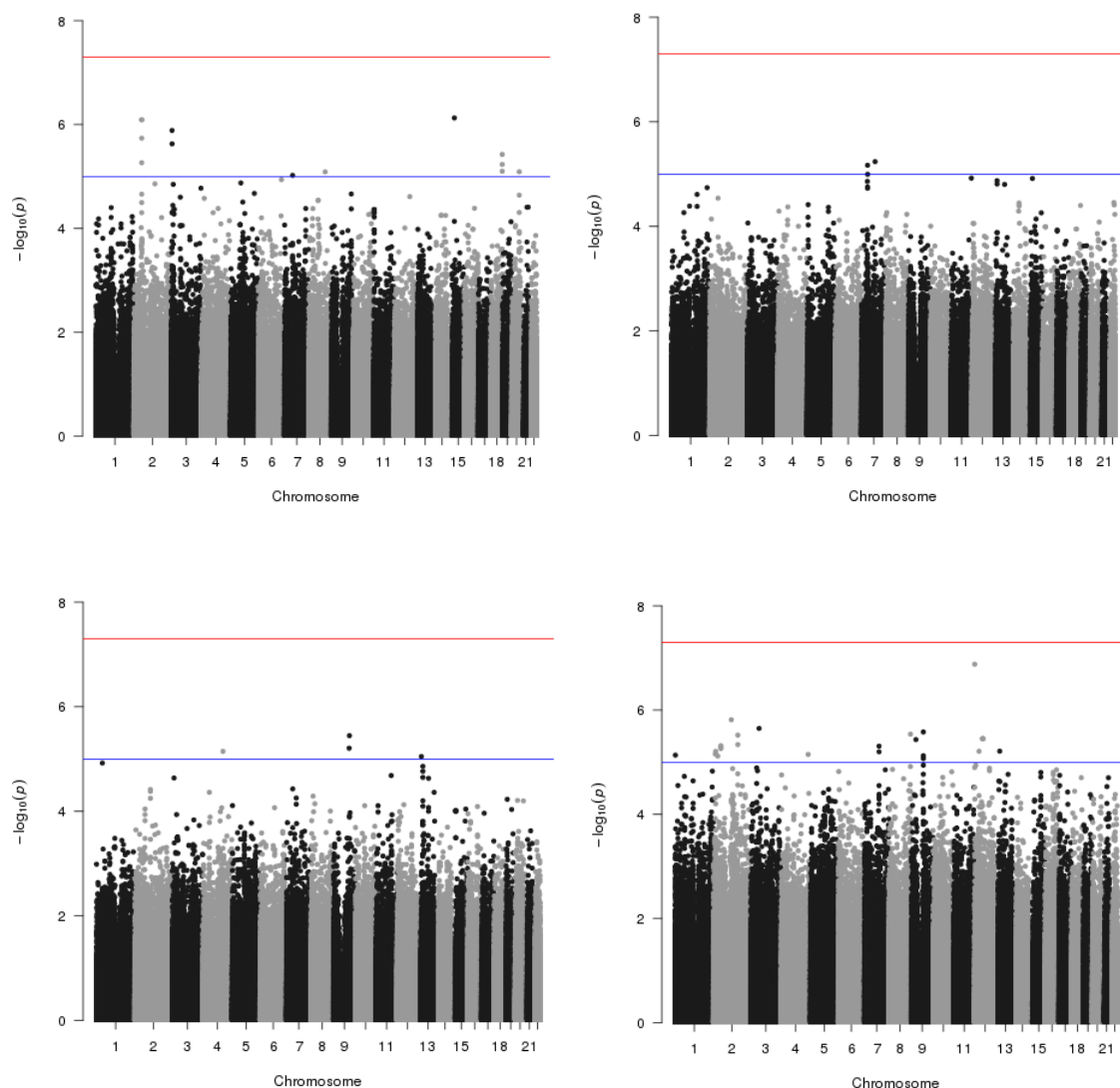
Εικόνα 3.12 Γραφήματα Manhattan των αποτελεσμάτων της αλληλεπίδρασης των πολυμορφισμών με τα διατροφικά πρότυπα πάνω-αριστερά: «ισορροπημένο», πάνω-δεξιά: «σπιτικό», κάτω-αριστερά: «γρήγορο φαγητό» και κάτω-δεξιά: «υψηλής περιεκτικότητας σε απλά σάκχαρα», στην ολική χοληστερόλη άτομα της μελέτης POMAK.

### Διαστολική πίεση-POMAK



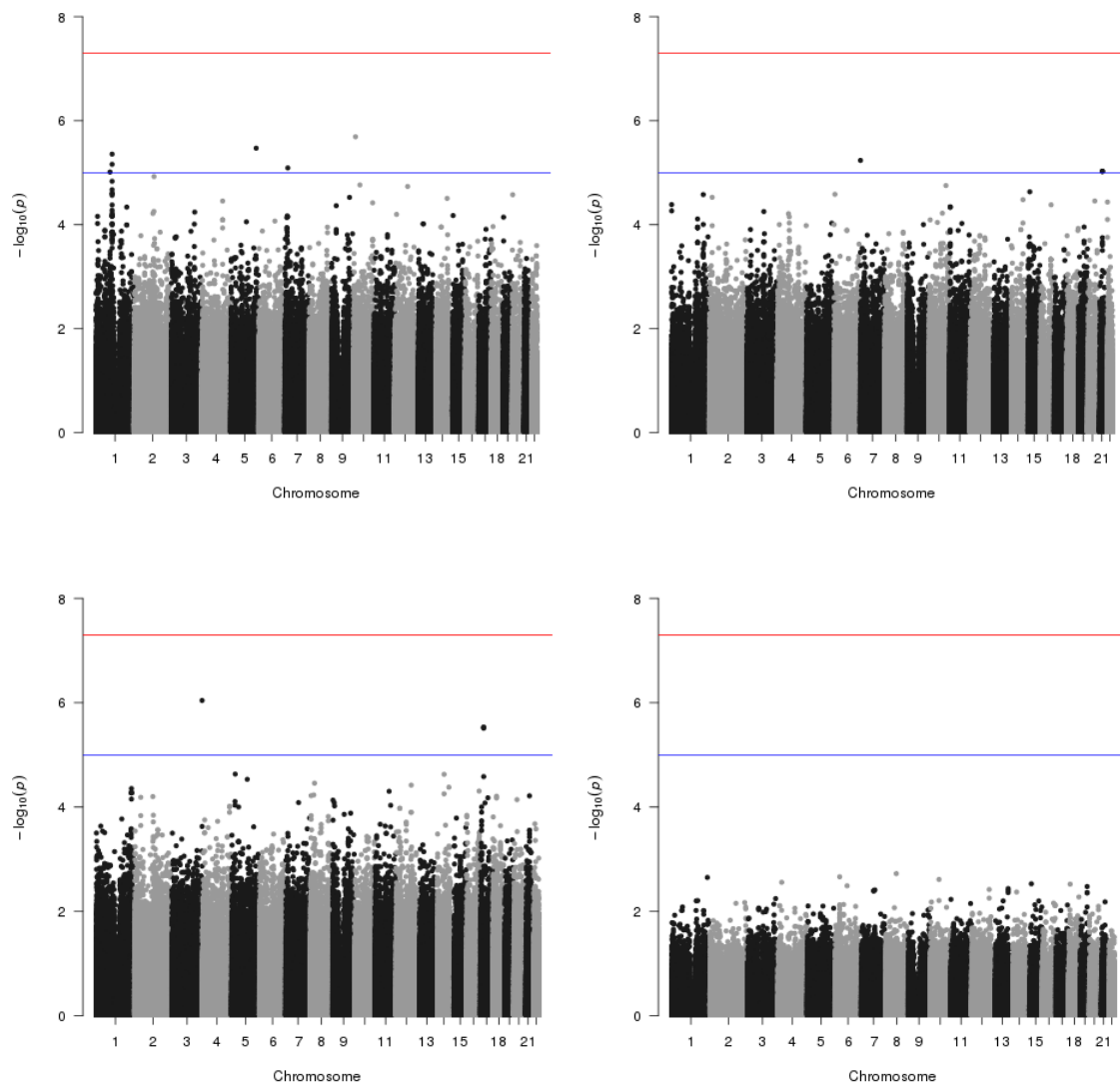
Εικόνα 3.13 Γραφήματα Manhattan των αποτελεσμάτων της αλληλεπίδρασης των πολυμορφισμών με τα διατροφικά πρότυπα πάνω-αριστερά: «ισορροπημένο», πάνω-δεξιά: «σπιτικό», κάτω-αριστερά: «γρήγορο φαγητό» και κάτω-δεξιά: «υψηλής περιεκτικότητας σε απλά σάκχαρα», στην διαστολική πίεση στα άτομα της μελέτης POMAK.

## HDL χοληστερόλη-POMAK



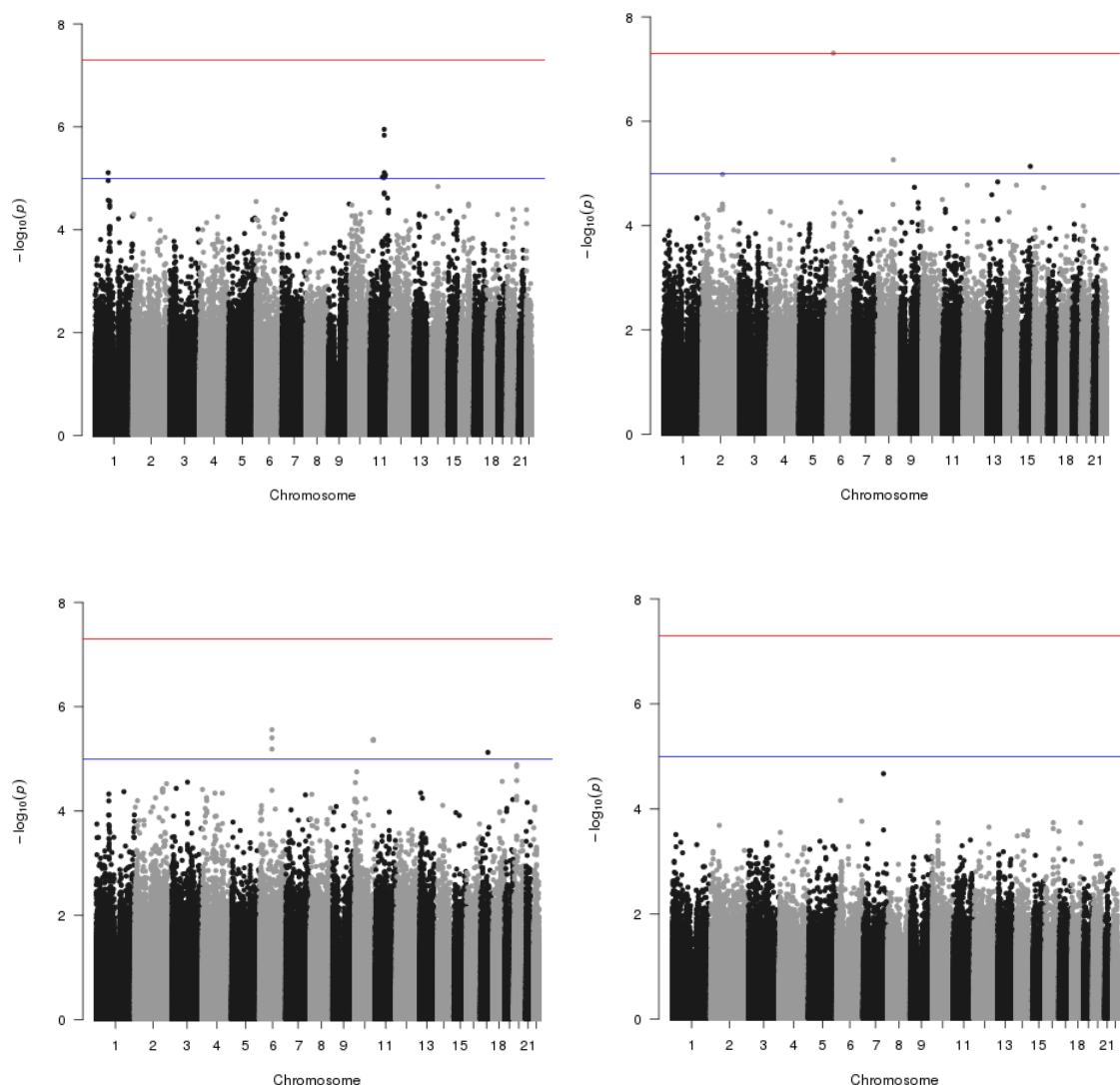
Εικόνα 3.14 Γραφήματα Manhattan των αποτελεσμάτων της αλληλεπίδρασης των πολυμορφισμών με τα διατροφικά πρότυπα πάνω-αριστερά: «ισορροπημένο», πάνω-δεξιά: «σπιτικό», κάτω-αριστερά: «γρήγορο φαγητό» και κάτω-δεξιά: «υψηλής περιεκτικότητας σε απλά σάκχαρα», στην HDL χοληστερόλη στα άτομα της μελέτης POMAK.

### Συστολική πίεση-POMAK



Εικόνα 3.15 Γραφήματα Manhattan των αποτελεσμάτων της αλληλεπίδρασης των πολυμορφισμών με τα διατροφικά πρότυπα πάνω-αριστερά: «ισορροπημένο», πάνω-δεξιά: «σπιτικό», κάτω-αριστερά: «γρήγορο φαγητό» και κάτω-δεξιά: «υψηλής περιεκτικότητας σε απλά σάκχαρα», στην συστολική πίεση στα άτομα της μελέτης POMAK.

### Περιφέρεια μέσης-POMAK



Εικόνα 3.16 Γραφήματα Manhattan των αποτελεσμάτων της αλληλεπίδρασης των πολυμορφισμών με τα διατροφικά πρότυπα πάνω-αριστερά: «ισορροπημένο», πάνω-δεξιά: «σπιτικό», κάτω-αριστερά: «γρήγορο φαγητό» και κάτω-δεξιά: «υψηλής περιεκτικότητας σε απλά σάκχαρα», στην περιφέρεια μέσης στα άτομα της μελέτης POMAK.

Δεδομένης της ύπαρξης δύο διαφορετικών πληθυσμών και ως εκ τούτου μελετών, με ίδιο πρωτόκολλο συλλογής δειγμάτων και ανάλυσης των δεδομένων και μάλιστα από το ίδιο άτομο (σε ότι αφορά την ανάλυση), έγινε επαλήθευση των ευρημάτων για νέους πολυμορφισμούς που αλληλεπιδρούν με παρόμοιο διατροφικό πρότυπο στον ίδιο ή σχετικό ( $|r| \geq 0.25$ ) φαινότυπο σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας της τάξεως του  $10^{-4}$ . Οι συσχετίσεις των φαινοτύπων για κάθε πληθυσμό φαίνονται στους Πίνακες 3.14 και 3.15.

| Πίνακας 3.14. Συντελεστές συσχέτισης (r) καρδιομεταβολικών δεικτών στον πληθυσμό MANOLIS |                  |             |             |              |                   |
|------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------------|-------------|--------------|-------------------|
|                                                                                          | Περιφέρεια μέσης | ΣΑΠ         | ΔΑΠ         | HDL          | Ολική χοληστερόλη |
| ΔΜΣ                                                                                      | <b>0.77</b>      | <b>0.27</b> | <b>0.23</b> | <b>-0.14</b> | <b>0.15</b>       |
| Περιφέρεια μέσης                                                                         |                  | <b>0.37</b> | <b>0.25</b> | <b>-0.25</b> | <b>0.11</b>       |
| ΣΑΠ                                                                                      |                  |             | <b>0.60</b> | <b>-0.01</b> | <b>0.11</b>       |
| ΔΑΠ                                                                                      |                  |             |             | <b>-0.02</b> | <b>0.13</b>       |
| HDL                                                                                      |                  |             |             |              | <b>0.15</b>       |
| Με έντονο χρώμα σημαίνονται οι στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις με $p < 0.01$           |                  |             |             |              |                   |

| Πίνακας 3.15. Συντελεστές συσχέτισης (r) καρδιομεταβολικών δεικτών στον πληθυσμό POMAK |                  |             |             |              |                   |
|----------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------------|-------------|--------------|-------------------|
|                                                                                        | Περιφέρεια μέσης | ΣΑΠ         | ΔΑΠ         | HDL          | Ολική χοληστερόλη |
| ΔΜΣ                                                                                    | <b>0.83</b>      | <b>0.41</b> | <b>0.34</b> | <b>-0.27</b> | <b>0.24</b>       |
| Περιφέρεια μέσης                                                                       |                  | <b>0.47</b> | <b>0.40</b> | <b>-0.35</b> | <b>0.29</b>       |
| ΣΑΠ                                                                                    |                  |             | <b>0.75</b> | <b>-0.13</b> | <b>0.20</b>       |
| ΔΑΠ                                                                                    |                  |             |             | <b>-0.12</b> | <b>0.13</b>       |
| HDL                                                                                    |                  |             |             |              | <b>-0.01</b>      |
| Με έντονο χρώμα σημαίνονται οι στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις με $p < 0.01$         |                  |             |             |              |                   |

Τα αποτελέσματα των αναλύσεων αλληλεπίδρασης των κοινών μεταξύ των δύο πληθυσμών (MANOLIS και POMAK) πολυμορφισμών με τα διατροφικά πρότυπα σε καρδιομεταβολικούς δείκτες, φαίνονται στους Πίνακες 3.16 και 3.17.

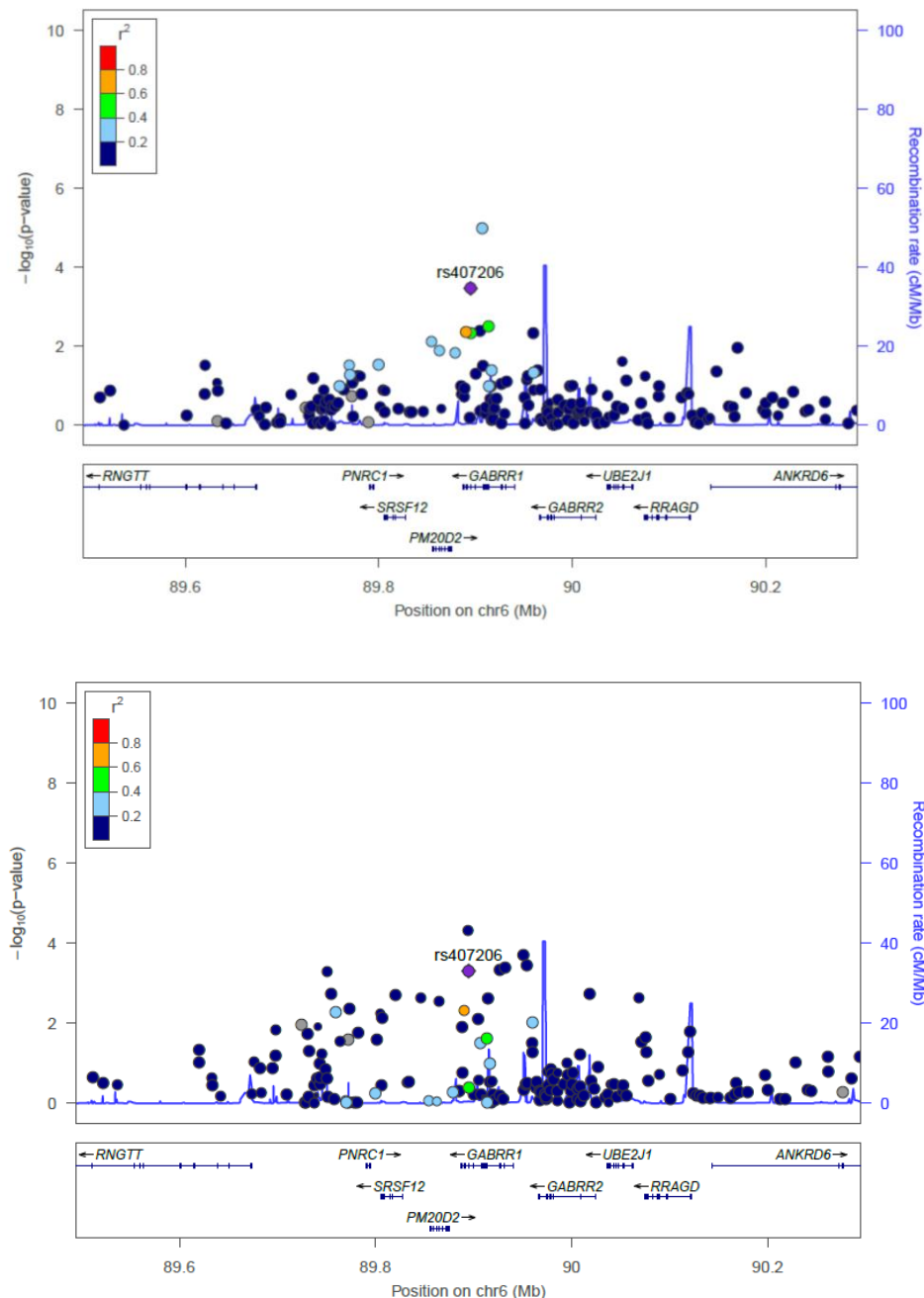
Ακολουθεί σύντομη περιγραφή του κάθε πολυμορφισμού και απεικόνιση των αποτελεσμάτων συσχέτισης στον γενετικό του τόπο μαζί με χρήσιμες πληροφορίες για τον συγκεκριμένο γενετικό τόπο, όπως η τοποθεσία και ο προσανατολισμός των γονιδίων που περιλαμβάνει, οι συντελεστές ανισορροπίας σύνδεσης καθώς και εκτιμήσεις των ρυθμών ανασυνδυασμού, στις Εικόνες 3.17-3.50, που έγιναν με χρήση του προγράμματος Locus Zoom (<http://locuszoom.org/>) (PRUIM *et al.* 2010).

Πίνακας 3.16. Οι πολυμορφισμοί που φάνηκαν να αλληλεπιδρούν με τα εκάστοτε διατροφικά πρότυπα στους αντίστοιχους καρδιομεταβολικούς φαινότυπους και στους δύο πληθυσμούς

| Πολυμορφισμός | Γονίδιο                  | Γονίδιο 2     | Χρωμόσωμα | Γενετική θέση |
|---------------|--------------------------|---------------|-----------|---------------|
| rs407206      | GABRR1                   |               | 6         | 89894968      |
| rs1927595     | OFCC1                    |               | 6         | 9674607       |
| rs9859538     | MED12L                   |               | 3         | 151090963     |
| rs6874544     | MTRR                     |               | 5         | 7897061       |
| rs7725672     | MTRR                     |               | 5         | 7871490       |
| rs154055      | FAM81B                   | MCTP1         | 5         | 94637098      |
| rs2143682     | AL035610.1,<br>LINC00314 | LINC00161     | 21        | 29632506      |
| rs735072      | LINC00314                | LINC00161     | 21        | 29615155      |
| rs7991183     | PCCA                     |               | 13        | 100913883     |
| rs11752174    | FAM120B                  |               | 6         | 170658521     |
| rs5756168     | MYH9                     |               | 22        | 36774812      |
| rs2496302     | FOXQ1                    | FOXF2         | 6         | 1281814       |
| rs10502926    | RP11                     | LOC100287225  | 18        | 49242723      |
| rs323078      | RP11                     | LOC100287225  | 18        | 49249996      |
| rs323081      | RP11                     | LOC100287225  | 18        | 49243635      |
| rs274869      | C19orf68,<br>ZFP114,LIG1 |               | 19        | 48678148      |
| rs10519931    | ARHGAP10                 |               | 4         | 148983376     |
| rs11989290    | SYBU                     |               | 8         | 110630664     |
| rs894932      | ALCAM                    | CBLB          | 3         | 105338346     |
| rs7417186     | TMEM56                   | ALG14         | 1         | 95546430      |
| rs7417186     | TMEM56                   | ALG14         | 1         | 95546430      |
| rs1432963     | FGF18                    |               | 5         | 170993900     |
| rs4271771     | TFCP2L1                  | GLI2          | 2         | 121909486     |
| rs1998972     | MAMDC2                   |               | 9         | 72741312      |
| rs7866466     | CHCHD2P9                 | LOC101927450  | 9         | 81709503      |
| rs10022110    | CCDC110, C4orf47         | UFSP2, PDLIM3 | 4         | 186375488     |
| rs12693204    | ZNF385B                  |               | 2         | 180554288     |
| rs1534093     | ANK2                     | CAMK2D        | 4         | 114307861     |
| rs8062570     | CYLD                     | NOD2          | 16        | 50856842      |
| rs2008255     | RASGRP3                  |               | 2         | 33679231      |
| rs726916      | RPL21P75                 |               | 7         | 20124384      |
| rs17067137    | MC4R                     |               | 18        | 58258830      |
| rs1561322     | KLHL29                   |               | 2         | 23602298      |
| rs12928435    | HMG2P3                   | HS3ST4        | 16        | 26391894      |
| rs2235584     | EPPIN, WFDC6             |               | 20        | 44172436      |

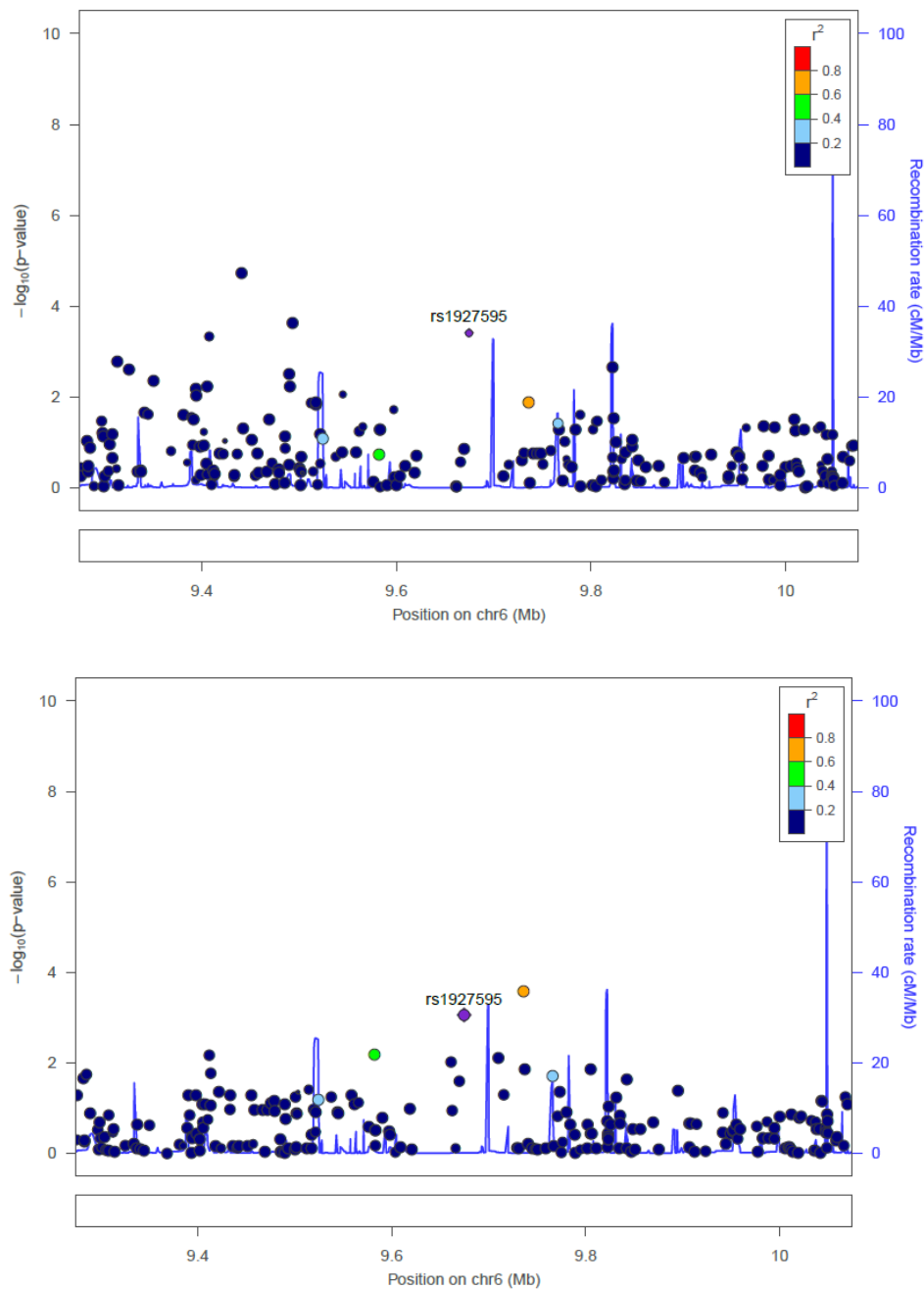
| Πίνακας 3.17. Αλληλεπιδράσεις των κοινών μεταξύ των δύο πληθυσμών πολυμορφισμών με τα εκάστοτε διατροφικά πρότυπα στους αντίστοιχους καρδιομεταβολικούς φαινότυπους |                |                    |         |        |       |        |            |                |                    |         |        |        |        |            |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|--------------------|---------|--------|-------|--------|------------|----------------|--------------------|---------|--------|--------|--------|------------|
| Πολυμορφισμός                                                                                                                                                       | M A N O L I S  |                    |         |        |       |        |            | P O M A K      |                    |         |        |        |        |            |
|                                                                                                                                                                     | Αλληλόμ. κινδ. | Διατροφικό πρότυπο | Δείκτης | Δείγμα | β     | se     | p          | Αλληλόμ. κινδ. | Διατροφικό πρότυπο | Δείκτης | Δείγμα | β      | se     | p          |
| rs407206                                                                                                                                                            | A              | Τοπικό             | ΔΑΠ     | 794    | 3.103 | 0.8624 | 0.0003412  | A              | Σπιτικό            | ΔΜΣ     | 700    | 1.176  | 0.336  | 0.0004963  |
| rs1927595                                                                                                                                                           | A              | Τοπικό             | ΣΑΠ     | 788    | 8.165 | 2.291  | 0.0003878  | A              | Σπιτικό            | ΔΜΣ     | 700    | 1.439  | 0.4306 | 0.0008805  |
| rs9859538                                                                                                                                                           | G              | Καφενείου          | Ολ.χολ. | 905    | 11.09 | 3.15   | 0.0004519  | G              | Σπιτικό            | ΣΑΠ     | 421    | 6.128  | 1.828  | 0.0008768  |
| rs6874544                                                                                                                                                           | C              | Τοπικό             | Π.μέσης | 828    | 10.16 | 2.999  | 0.0007384  | C              | Σπιτικό            | ΔΑΠ     | 427    | 14.16  | 3.932  | 0.0003529  |
| rs7725672                                                                                                                                                           | A              | Τοπικό             | Π.μέσης | 827    | 10.19 | 2.999  | 0.0007161  | A              | Σπιτικό            | ΔΑΠ     | 424    | 16.15  | 4.155  | 0.0001185  |
| rs154055                                                                                                                                                            | C              | Λίπος-Ζαχ.         | ΣΑΠ     | 792    | 6.254 | 1.72   | 0.000294   | C              | Γρήγορο            | ΔΜΣ     | 696    | 1.321  | 0.3815 | 0.0005694  |
| rs2143682                                                                                                                                                           | A              | Τοπικό             | Π.μέσης | 828    | 2.714 | 0.8088 | 0.0008292  | A              | Σπιτικό            | ΔΑΠ     | 427    | 3.878  | 1.148  | 0.0007972  |
| rs735072                                                                                                                                                            | A              | Τοπικό             | Π.μέσης | 827    | 2.827 | 0.8128 | 0.0005311  | A              | Σπιτικό            | ΔΑΠ     | 427    | 3.878  | 1.148  | 0.0007972  |
| rs7991183                                                                                                                                                           | C              | Τοπικό             | Π.μέσης | 828    | 3.985 | 0.9359 | 0.00002298 | C              | Σπιτικό            | Ολ.χολ. | 702    | 11.96  | 3.281  | 0.0002893  |
| rs11752174                                                                                                                                                          | A              | Τοπικό             | ΔΜΣ     | 783    | 1.593 | 0.4569 | 0.0005183  | A              | Σπιτικό            | Ολ.χολ. | 700    | 13.75  | 4.005  | 0.0006341  |
| rs5756168                                                                                                                                                           | C              | Καφενείου          | ΔΜΣ     | 787    | 2.063 | 0.5503 | 0.0001907  | C              | Γρήγορο            | Π.μέσης | 658    | 3.945  | 1.157  | 0.0006914  |
| rs2496302                                                                                                                                                           | C              | Καφενείου          | Π.μέσης | 828    | 3.135 | 0.8361 | 0.0001896  | C              | Γρήγορο            | Ολ.χολ. | 703    | 12.68  | 2.937  | 0.00001823 |
| rs10502926                                                                                                                                                          | A              | Λίπος-Ζαχ.         | Π.μέσης | 828    | 3.733 | 1.106  | 0.0007685  | A              | Γρήγορο            | ΣΑΠ     | 421    | 8.136  | 2.332  | 0.000538   |
| rs323078                                                                                                                                                            | C              | Λίπος-Ζαχ.         | Π.μέσης | 828    | 3.733 | 1.106  | 0.0007685  | C              | Γρήγορο            | ΣΑΠ     | 421    | 8.126  | 2.309  | 0.0004796  |
| rs323081                                                                                                                                                            | T              | Λίπος-Ζαχ.         | Π.μέσης | 828    | 3.733 | 1.106  | 0.0007685  | T              | Γρήγορο            | ΣΑΠ     | 421    | 8.136  | 2.332  | 0.000538   |
| rs274869                                                                                                                                                            | G              | Καφενείου          | Ολ.χολ. | 903    | 10.5  | 3.095  | 0.0007195  | A              | Σπιτικό            | Π.μέσης | 656    | 2.902  | 0.8638 | 0.0008275  |
| rs10519931                                                                                                                                                          | G              | Λίπος-Ζαχ.         | ΣΑΠ     | 788    | 6.515 | 1.827  | 0.000384   | G              | Γρήγορο            | ΣΑΠ     | 701    | 3.607  | 1.091  | 0.0009945  |
| rs11989290                                                                                                                                                          | G              | Τοπικό             | ΣΑΠ     | 791    | 7.071 | 2.121  | 0.0008975  | G              | Ζάχαρη             | HDL     | 705    | -9.367 | 2.463  | 0.0001552  |
| rs894932                                                                                                                                                            | A              | Τοπικό             | ΔΑΠ     | 793    | 4.579 | 1.299  | 0.0004496  | A              | Ζάχαρη             | HDL     | 705    | -7.741 | 2.059  | 0.000185   |
| rs7417186                                                                                                                                                           | T              | Τοπικό             | ΔΜΣ     | 824    | 3.728 | 0.9581 | 0.0001079  | T              | Ζάχαρη             | Ολ.χολ. | 703    | 21.61  | 6.382  | 0.0007503  |
| rs7417186                                                                                                                                                           | T              | Τοπικό             | Π.μέσης | 783    | 1.493 | 0.3833 | 0.0001064  | T              | Ζάχαρη             | Ολ.χολ. | 703    | 21.61  | 6.382  | 0.0007503  |
| rs1432963                                                                                                                                                           | T              | Τοπικό             | ΔΑΠ     | 794    | 3.585 | 0.981  | 0.0002747  | T              | Σπιτικό            | ΣΑΠ     | 705    | 3.88   | 1.13   | 0.0006305  |
| rs4271771                                                                                                                                                           | A              | Λίπος-Ζαχ.         | Π.μέσης | 828    | 2.742 | 0.8234 | 0.0009077  | A              | Ζάχαρη             | Ολ.χολ. | 703    | 15.34  | 4.311  | 0.0003969  |
| rs1998972                                                                                                                                                           | G              | Καφενείου          | ΔΜΣ     | 787    | 4.615 | 1.335  | 0.0005757  | G              | Γρήγορο            | Ολ.χολ. | 703    | 18.52  | 5.42   | 0.000672   |
| rs7866466                                                                                                                                                           | A              | Τοπικό             | ΔΑΠ     | 793    | 3.24  | 0.9282 | 0.0005095  | A              | Ζάχαρη             | HDL     | 704    | -5.195 | 1.478  | 0.000467   |
| rs10022110                                                                                                                                                          | G              | Λίπος-Ζαχ.         | ΔΑΠ     | 790    | 3.22  | 0.902  | 0.0003792  | G              | Γρήγορο            | Ολ.χολ. | 696    | 11.75  | 3.119  | 0.0001803  |
| rs12693204                                                                                                                                                          | T              | Καφενείου          | ΔΜΣ     | 787    | 1.079 | 0.3201 | 0.0007891  | C              | Γρήγορο            | Ολ.χολ. | 703    | -10.08 | 2.868  | 0.0004676  |
| rs1534093                                                                                                                                                           | C              | Λίπος-Ζαχ.         | ΣΑΠ     | 792    | 10.62 | 3.209  | 0.0009759  | C              | Γρήγορο            | HDL     | 705    | -5.318 | 1.533  | 0.0005535  |
| rs8062570                                                                                                                                                           | C              | Λίπος-Ζαχ.         | ΔΜΣ     | 787    | 1.473 | 0.366  | 0.00006288 | C              | Σπιτικό            | ΔΑΠ     | 427    | 5.487  | 1.623  | 0.0007901  |
| rs2008255                                                                                                                                                           | C              | Ελ.-Φρ.-Λαχ        | HDL     | 899    | 3.277 | 0.9814 | 0.0008746  | C              | Σπιτικό            | HDL     | 705    | 4.224  | 1.224  | 0.0005923  |
| rs726916                                                                                                                                                            | T              | Τοπικό             | HDL     | 897    | 3.078 | 0.7993 | 0.0001265  | T              | Ισορροπημ.         | ΔΜΣ     | 700    | -1.299 | 0.3469 | 0.0001958  |
| rs17067137                                                                                                                                                          | T              | Λίπος-Ζαχ.         | Π.μέσης | 828    | 3.714 | 1.002  | 0.0002232  | T              | Ζάχαρη             | Ολ.χολ. | 703    | 17.78  | 5.122  | 0.0005504  |
| rs1561322                                                                                                                                                           | A              | Λίπος-Ζαχ.         | ΔΑΠ     | 794    | 3.098 | 0.8982 | 0.0005928  | A              | Ζάχαρη             | HDL     | 705    | -4.823 | 1.364  | 0.0004349  |
| rs12928435                                                                                                                                                          | A              | Λίπος-Ζαχ.         | ΔΑΠ     | 794    | 4.048 | 1.164  | 0.0005332  | A              | Ζάχαρη             | HDL     | 705    | -5.703 | 1.594  | 0.0003704  |
| rs2235584                                                                                                                                                           | T              | Λίπος-Ζαχ.         | ΔΑΠ     | 794    | 3.544 | 1.028  | 0.000596   | T              | Γρήγορο            | ΣΑΠ     | 421    | 7.019  | 2.039  | 0.0006371  |
| Για το MANOLIS: το «υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος και απλά σάκχαρα» ως «λίπ.-ζάχ.» και το «ελαιόλαδο, φρούτα και λαχανικά» ως «ελ.- φρ.-λαχ.».                    |                |                    |         |        |       |        |            |                |                    |         |        |        |        |            |
| Για το POMAK: το «υψηλής περιεκτικότητας σε απλά σάκχαρα» ως «ζάχαρη», το «γρήγορο φαγητό» ως «γρήγορο και το «ισορροπημένο» ως «ισορροπημ.»                        |                |                    |         |        |       |        |            |                |                    |         |        |        |        |            |

Ο κοινός (συχνότητα αλληλομόρφου κινδύνου 0.17) πολυμορφισμός rs407206 βρίσκεται στην περιοχή των εσόνίων του γονιδίου *GABRR1* που κωδικοποιεί τον υποδοχέα P1 του γάμμα-αμινοβουτιρικού οξέος. Το GABA γάμμα-αμινοβουτιρικό οξύ είναι ο κύριος ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής στον εγκέφαλο των θηλαστικών και δρα σε υποδοχείς που είναι κανάλια χλωρίου. Πολυμορφισμοί σε αυτό το γονίδιο έχει βρεθεί να σχετίζονται με τον καρδιακό παλμό.



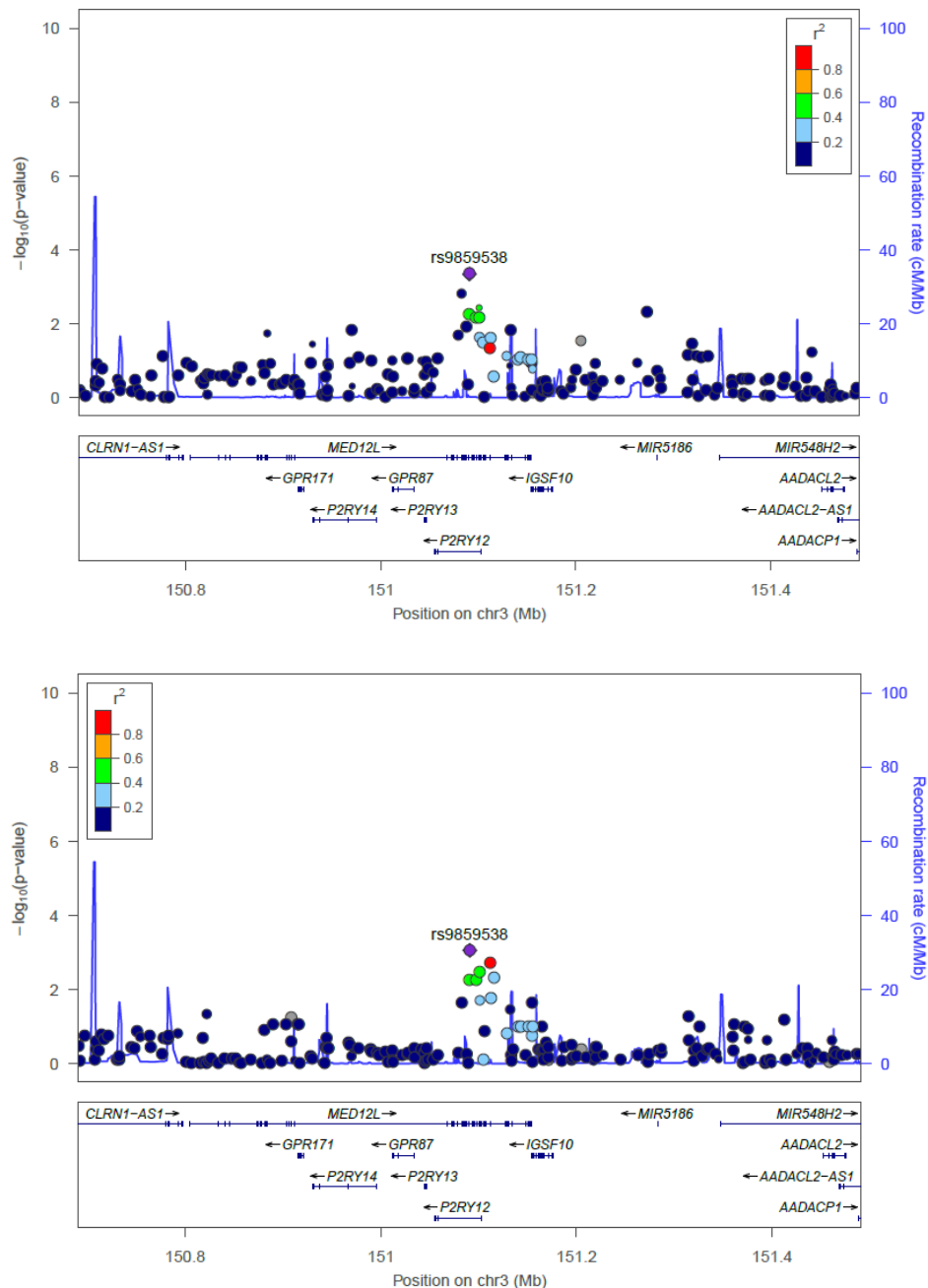
Εικόνα 3.17 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs407206 ΕΠΑΝΩ-με το τοπικό διατροφικό πρότυπο στην ΔΑΠ στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το σπιτικό διατροφικό πρότυπο στον ΔΜΣ στα άτομα του ΡΟΜΑΚ.

Ο κοινός (συχνότητα αλληλομόρφου κινδύνου 0.07) πολυμορφισμός rs1927595 βρίσκεται στην περιοχή των εσονίων του γονιδίου OFCC1 (orofacial cleft 1 candidate 1) που κωδικοποιεί την υποψήφια στοματοπροσωπική σχιστία. Πολυμορφισμοί σε αυτό το γονίδιο έχει βρεθεί να σχετίζονται με την ΑΠ.



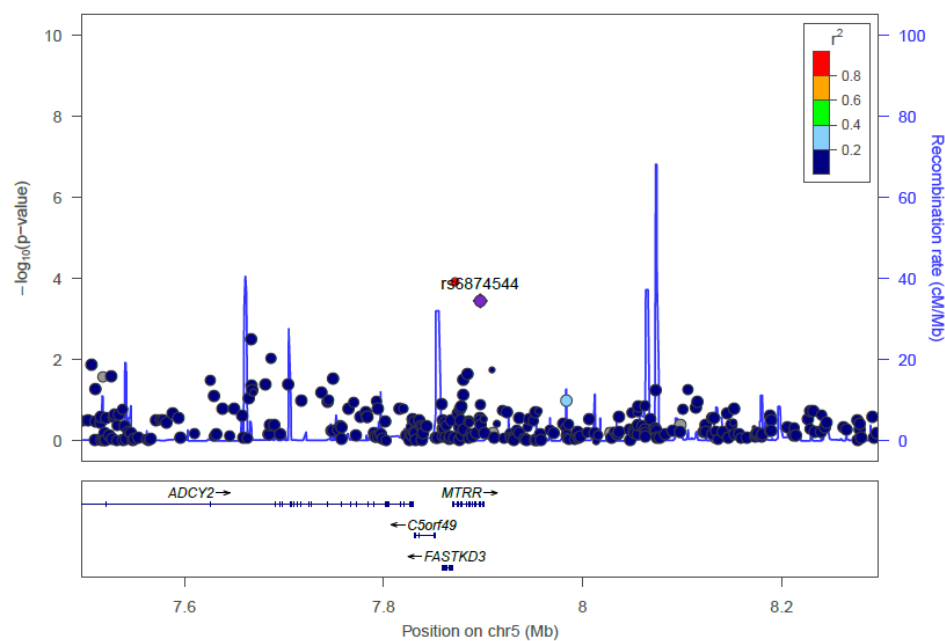
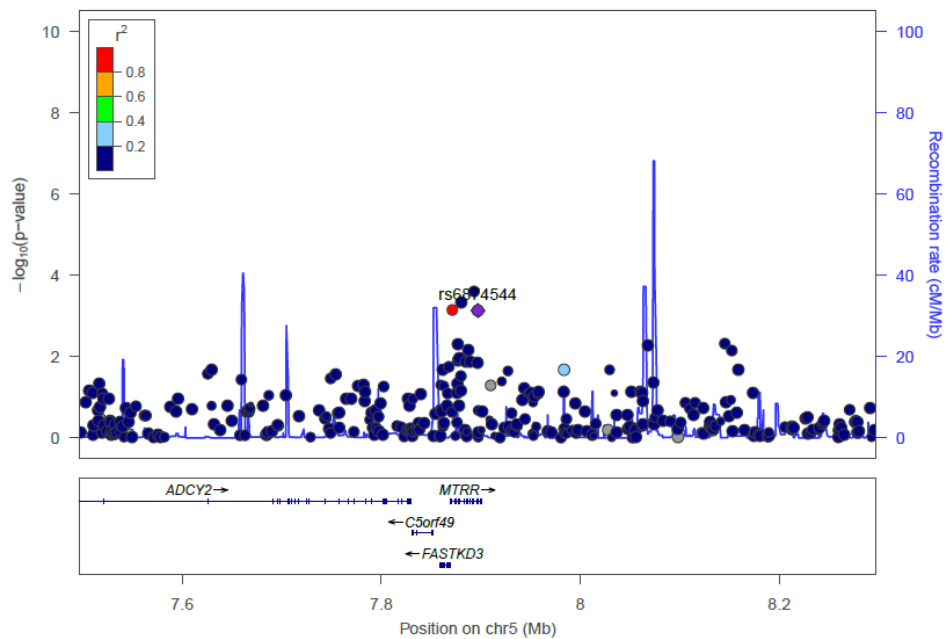
Εικόνα 3.18 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs1927595 ΕΠΑΝΩ-με το τοπικό διατροφικό πρότυπο στην ΣΑΠ στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το σπιτικό διατροφικό πρότυπο στον ΔΜΣ στα άτομα του ROMAK.

Ο κοινός (συχνότητα αλληλομόρφου κινδύνου 0.29) πολυμορφισμός rs9859538 βρίσκεται στην περιοχή των εσονίων του γονιδίου MED12L (mediator complex subunit 12-like) που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη που είναι μέρος του συμπλόκου διαμεσολάβησης και εμπλέκεται στην μεταγραφική ενεργοποίηση σχεδόν όλων των γονιδίων που εξαρτώνται από την RNA πολυμεράση II. Πολυμορφισμοί σε αυτό το γονίδιο έχει βρεθεί να σχετίζονται με την ΑΠ/υπέρταση, την HDL, LDL και την ολική χοληστερόλη.

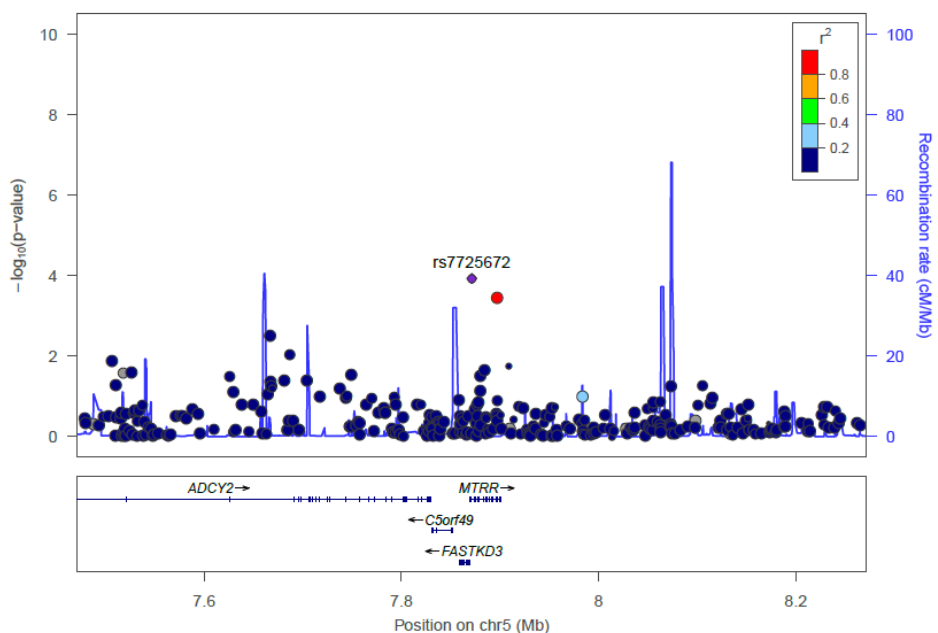
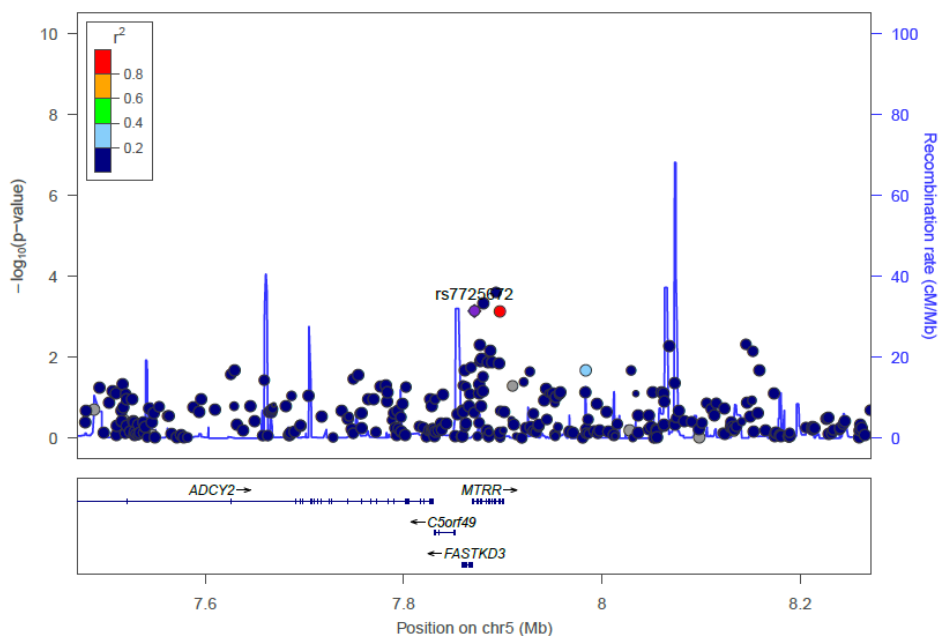


Εικόνα 3.19 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs9859538 ΕΠΑΝΩ-με το διατροφικό πρότυπο καφενείου στην ολική χοληστερόλη στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το σπιτικό διατροφικό πρότυπο στην ΣΑΠ στα άτομα του POMAK.

Οι σπάνιοι (συχνότητα αλληλομόρφου κινδύνου 0.01) πολυμορφισμοί rs6874544 και rs7725672 είναι συνώνυμοι πολυμορφισμοί στο γονίδιο MTRR (5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase reductase) που κωδικοποιεί ένζυμο που είναι σημαντικό στον μεταβολισμό του φυλλικού οξέος και την κυτταρική μεθυλίωση. Πολυμορφισμοί σε αυτό το γονίδιο έχει βρεθεί να σχετίζονται με τον ΔΜΣ, την ΑΠ, την HDL, LDL και την ολική χοληστερόλη, καθώς και το έμφραγμα του μυοκαρδίου.



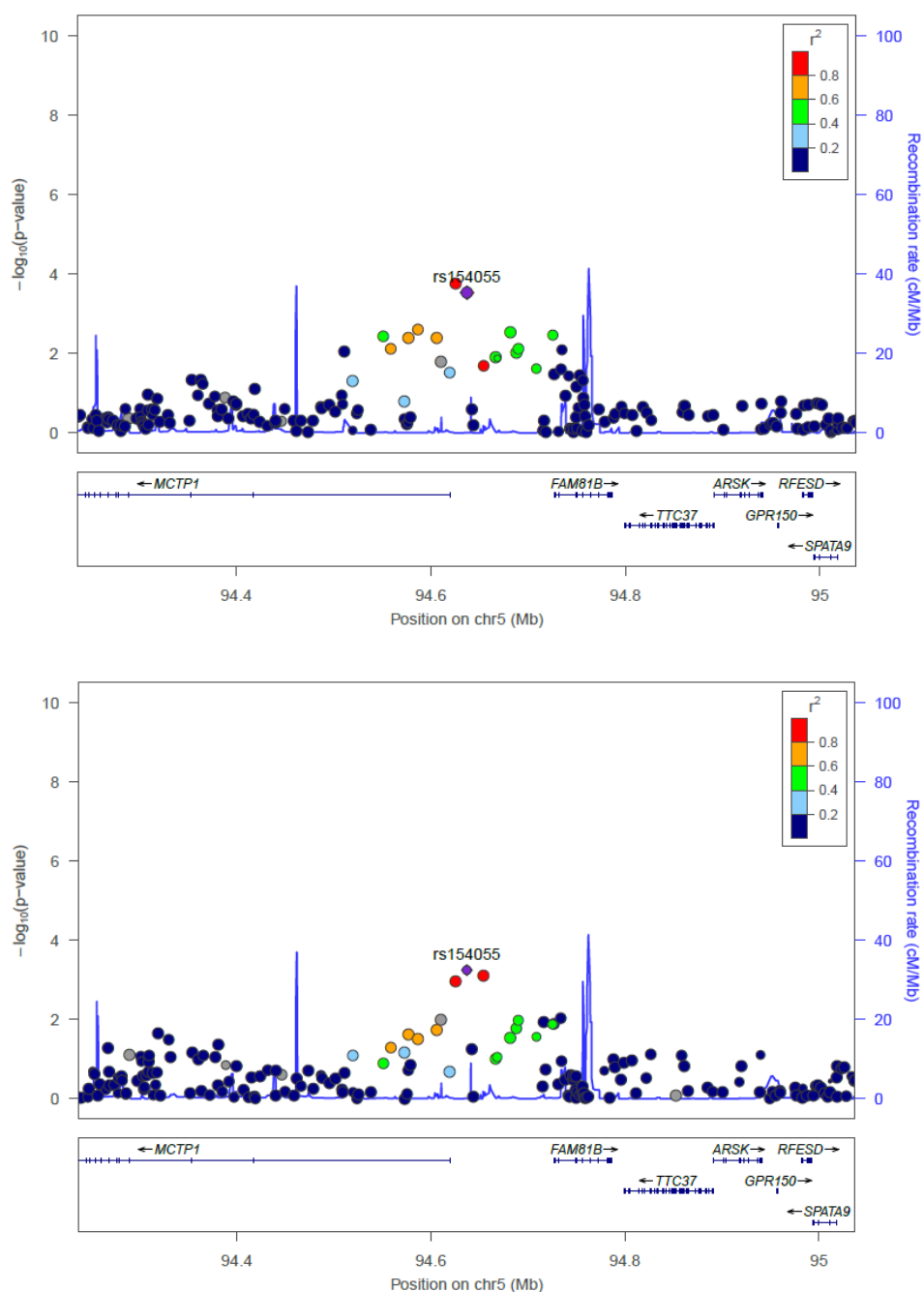
Εικόνα 3.20 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs6874544 ΕΠΑΝΩ- με το τοπικό διατροφικό πρότυπο στην περιφέρεια μέσης στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το σπιτικό διατροφικό πρότυπο στην ΔΑΠ στα άτομα του ΡΟΜΑΚ.



Εικόνα 3.21 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs7725672 ΕΠΑΝΩ- με το τοπικό διατροφικό πρότυπο στην περιφέρεια μέσης στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το σπιτικό διατροφικό πρότυπο στην ΔΑΠ στα άτομα του ΡΟΜΑΚ.

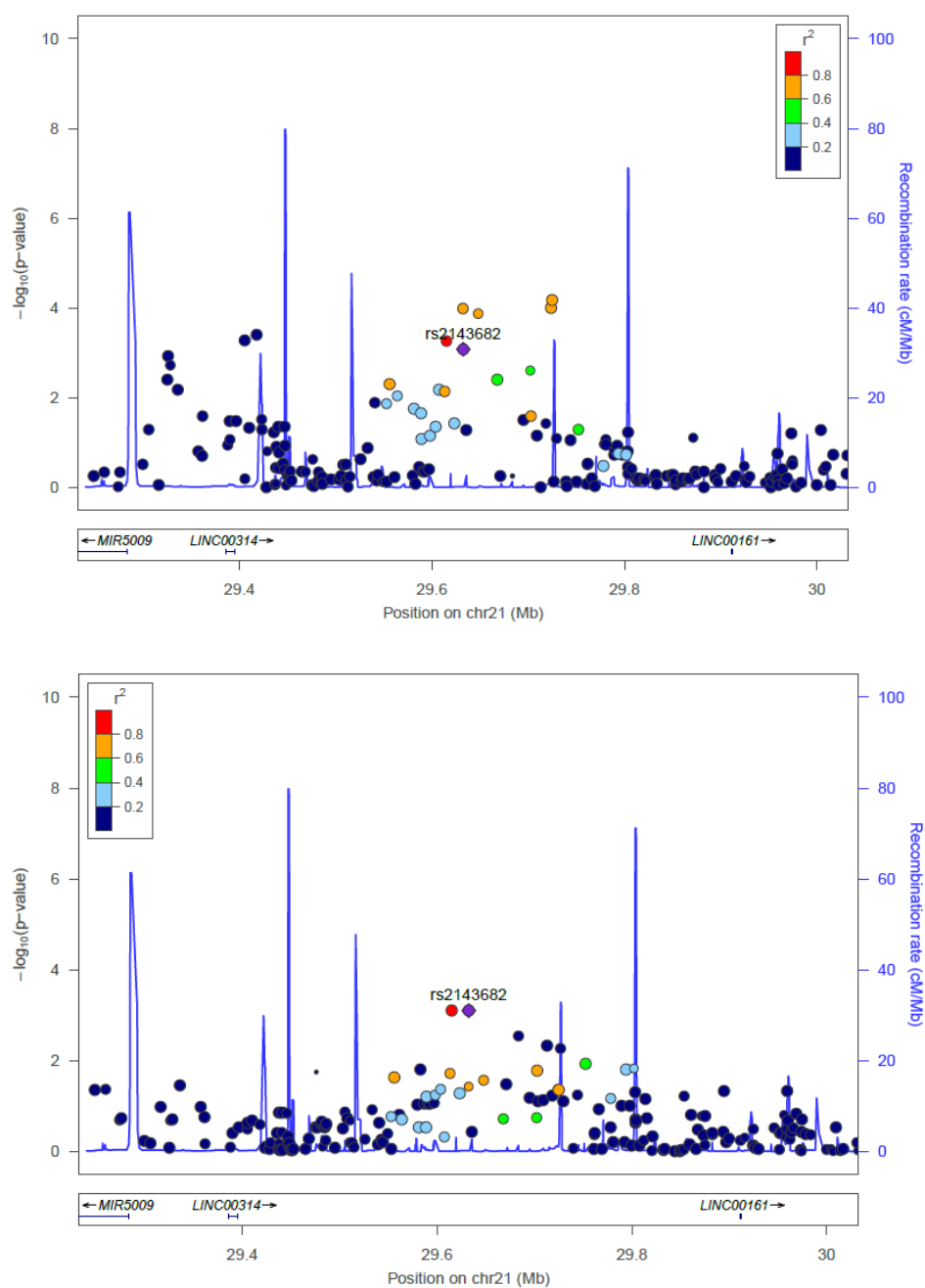
Ο κοινός (συχνότητα αλληλομόρφου κινδύνου 0.17) πολυμορφισμός rs154055 βρίσκεται στην διαγονιδιακή περιοχή μεταξύ των γονιδίων MCTP1 (multiple C2 and transmembrane domain containing 1) και FAM81B (family with sequence similarity 81 member B). Πολυμορφισμοί στο

MCTP1 γονίδιο έχει βρεθεί να σχετίζονται με τον ΔΜΣ, το σωματικό βάρος, την σύσταση σώματος και το έμφραγμα του μυοκαρδίου. Πολυμορφισμοί στο FAM81B γονίδιο έχει βρεθεί να σχετίζονται με την υπέρταση.

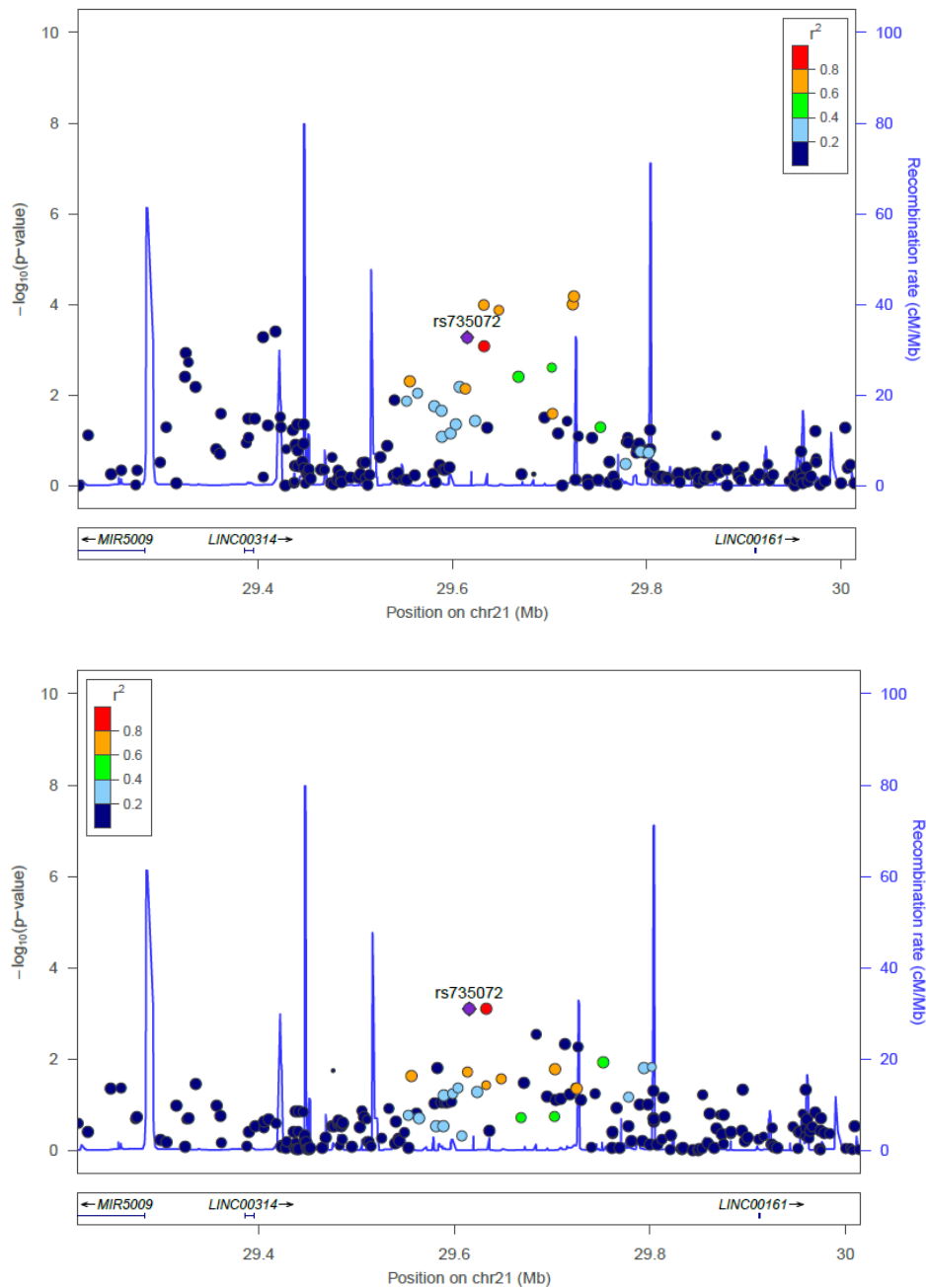


Εικόνα 3.22 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs154055 ΕΠΑΝΩ- με το υψηλής περιεκτικότητας σε απλά σάκχαρα και λίπος διατροφικό πρότυπο στην ΣΑΠ στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το γρήγορο διατροφικό πρότυπο στον ΔΜΣ στα άτομα του POMAK.

Οι κοινοί (συχνότητα αλληλομόρφου κινδύνου 0.30) πολυμορφισμοί rs2143682 και rs735072 βρίσκονται στην διαγονιδιακή περιοχή μεταξύ των γονιδίων LINC00314 και LINC00161.



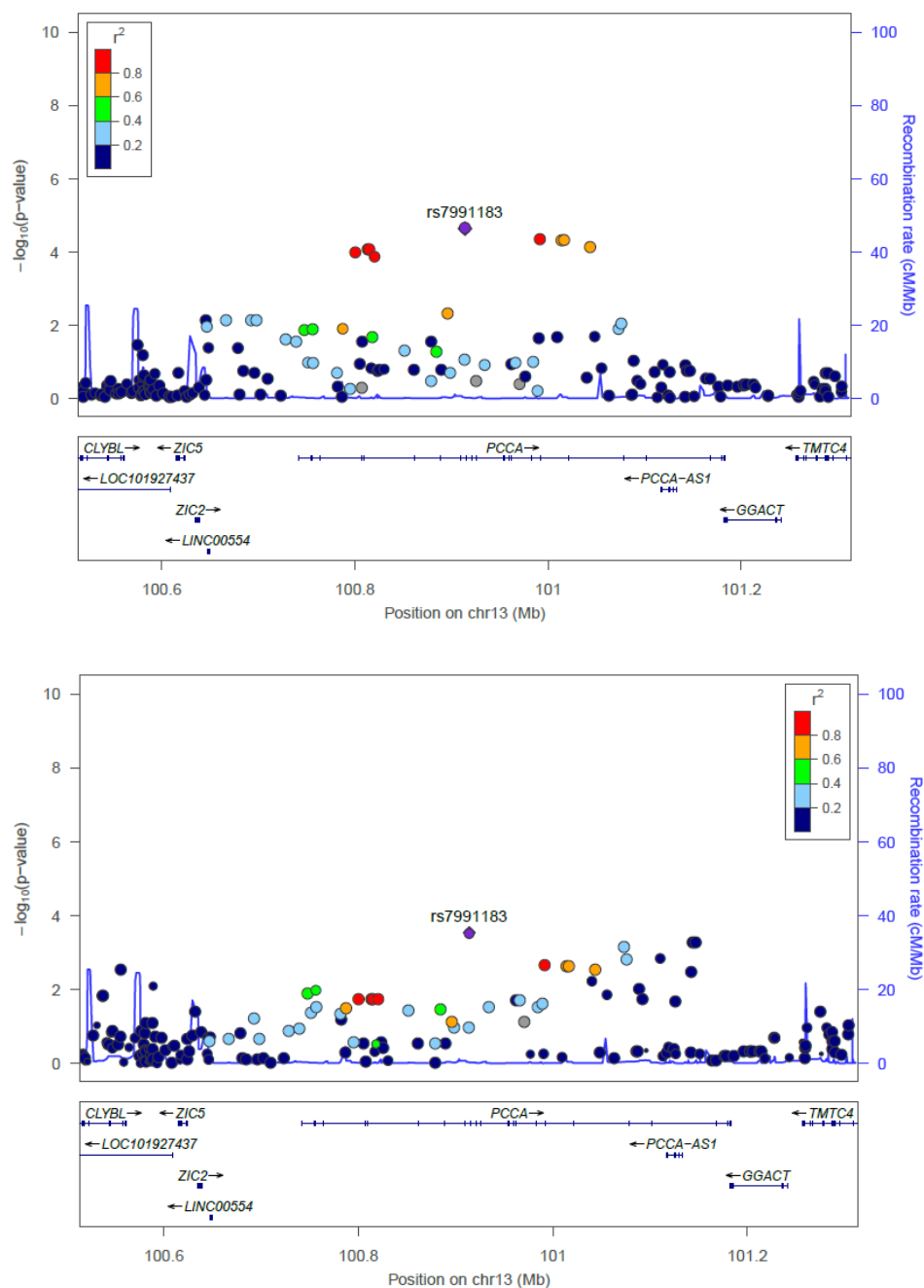
Εικόνα 3.23 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs2143682 ΕΠΑΝΩ- με το τοπικό διατροφικό πρότυπο στην περιφέρεια μέσης στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το σπιτικό διατροφικό πρότυπο στην ΔΑΠ στα άτομα του ΡΟΜΑΚ.



Εικόνα 3.24 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs735072 ΕΠΑΝΩ-με το τοπικό διατροφικό πρότυπο στην περιφέρεια μέσης στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το σπιτικό διατροφικό πρότυπο στην ΔΑΠ στα άτομα του ΡΟΜΑΚ.

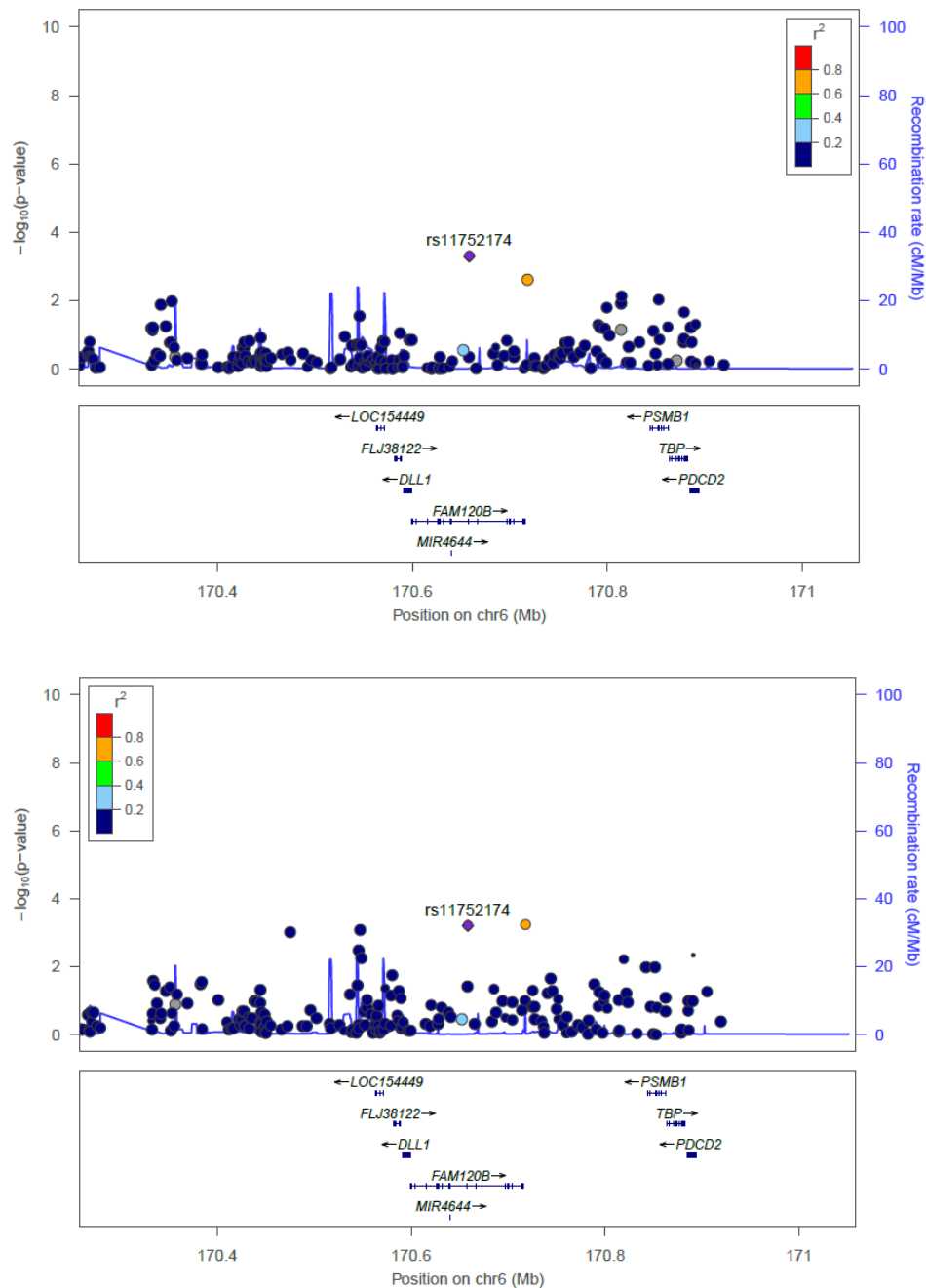
Ο κοινός (συχνότητα αλληλομόρφου κινδύνου 0.41) πολυμορφισμός rs7991183 βρίσκεται στην περιοχή των εσονίων του γονιδίου PCCA (propionyl CoA carboxylase, alpha polypeptide) που κωδικοποιεί την άλφα υποομάδα του ενζύμου καρβοξυλάση του προπιονυλ-συνενζύμου Α. Το PCCA κωδικοποιεί την περιοχή πρόσδεσης της βιοτίνης και η έλλειψη του ενζύμου μπορεί να

οδηγήσει σε προπιονική οξυαιμία. Πολυμορφισμοί σε αυτό το γονίδιο έχει βρεθεί να σχετίζονται με την στεφανιαία νόσο και το ΑΕΕ.



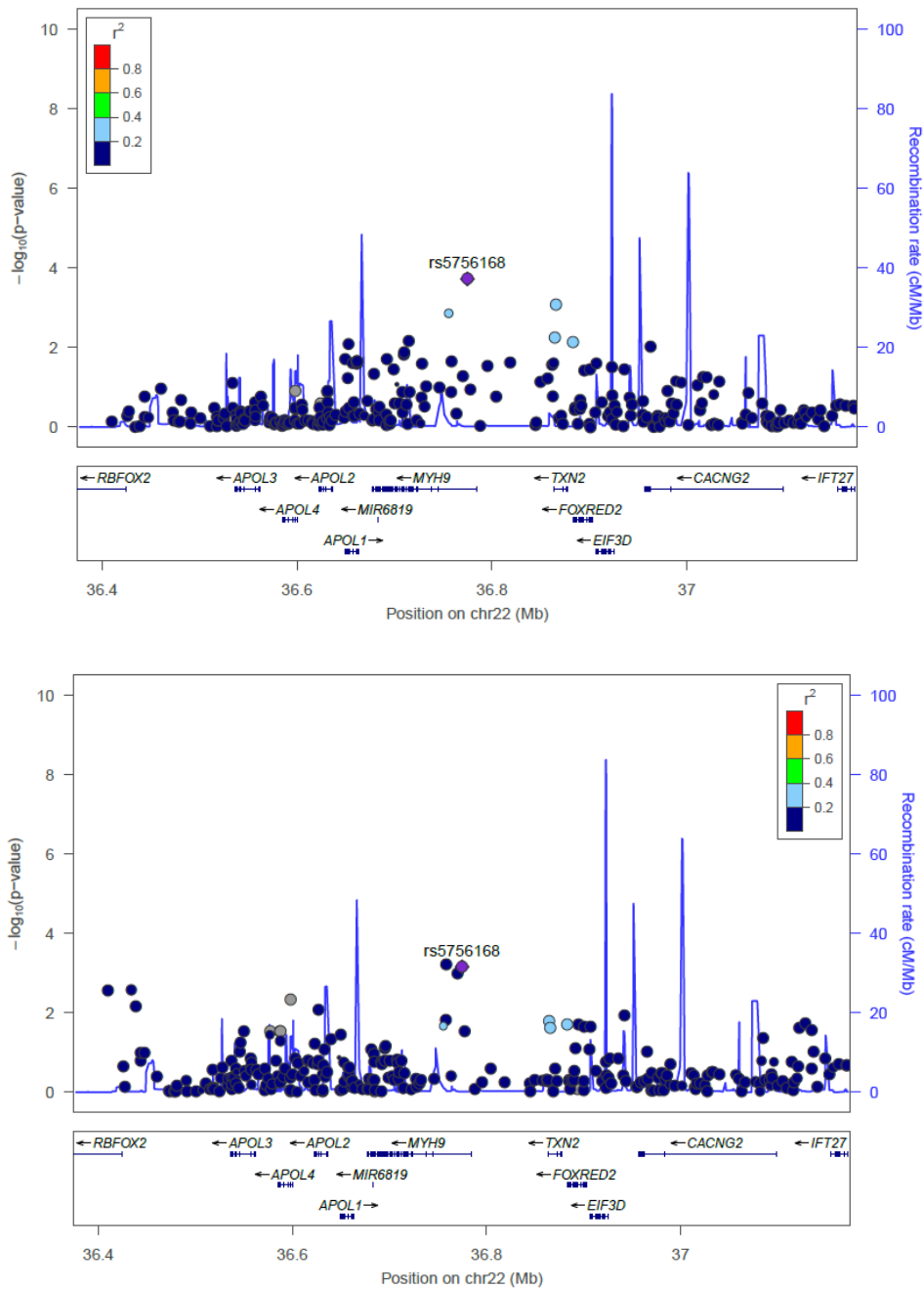
Εικόνα 3.25 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs7991183 ΕΠΑΝΩ-με το τοπικό διατροφικό πρότυπο στην περιφέρεια μέσης στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το σπιτικό διατροφικό πρότυπο στην ολική χοληστερόλη στα άτομα του POMAK.

Ο κοινός (συχνότητα αλληλομόρφου κινδύνου 0.10) πολυμορφισμός rs11752174 βρίσκεται στην περιοχή των εσόνίων του γονιδίου FAM120B (family with sequence similarity 120B). Πολυμορφισμοί σε αυτό το γονίδιο έχει βρεθεί να σχετίζονται με τον ΣΔ τύπου Ι.



Εικόνα 3.26 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs11752174 ΕΠΑΝΩ- με το τοπικό διατροφικό πρότυπο στον ΔΜΣ στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το σπιτικό διατροφικό πρότυπο στην ολική χοληστερόλη στα άτομα του POMAK.

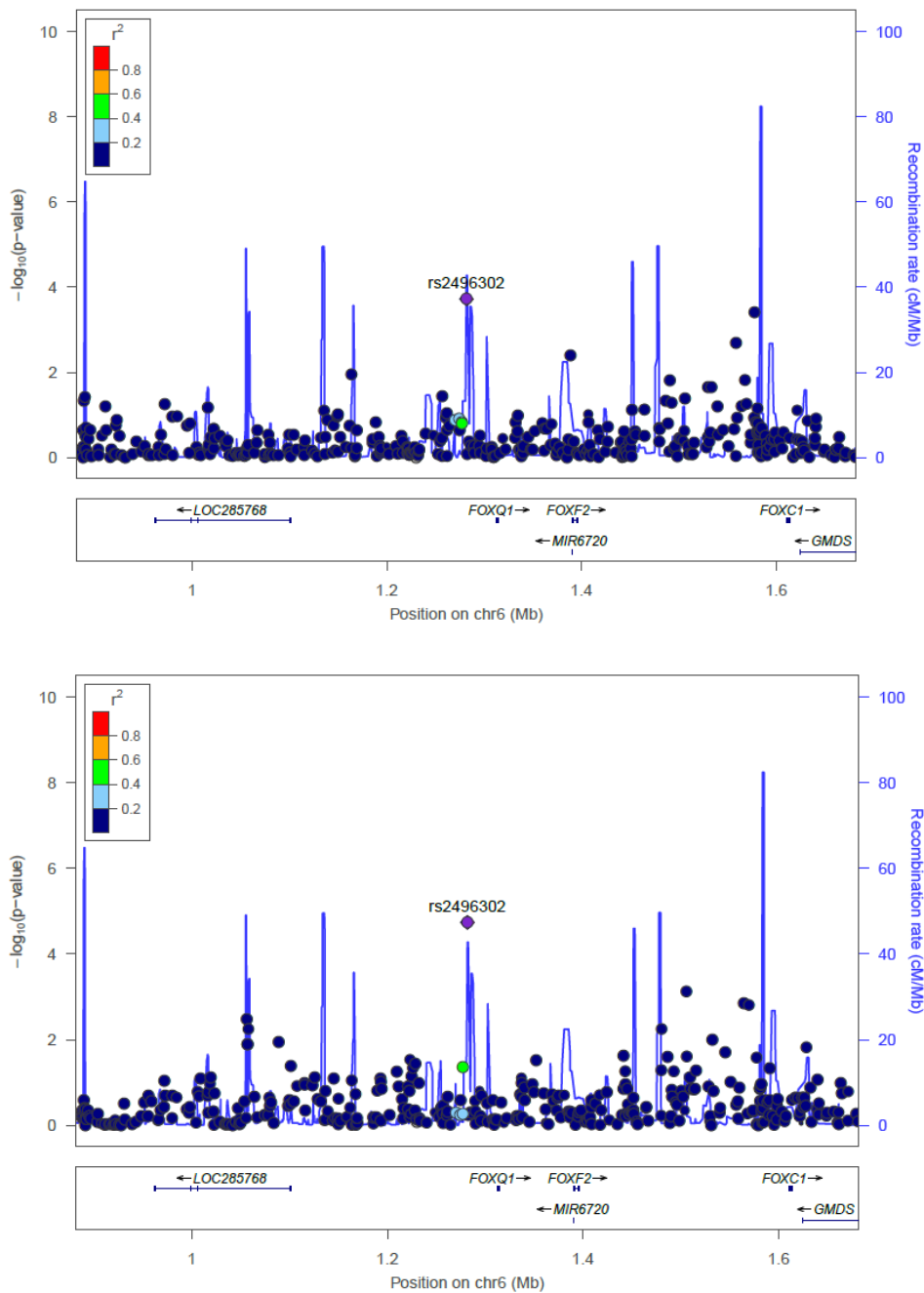
Ο κοινός (συχνότητα αλληλομόρφου κινδύνου 0.10) πολυμορφισμός rs5756168 βρίσκεται στην περιοχή των εσονίων του γονιδίου MYH9 (myosin, heavy chain 9, non-muscle) που κωδικοποιεί μία τυπική μη-μυϊκή μυοσίνη. Διαταραχές σε αυτό το γονίδιο προκαλούν νευροαισθητηριακή κώφωση και διάφορα σχετικά σύνδρομα.



Εικόνα 3.27 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs5756168 ΕΠΑΝΩ-με το διατροφικό πρότυπο καφενείου στον ΔΜΣ στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το γρήγορο διατροφικό πρότυπο στην περιφέρεια μέσης στα άτομα του POMAK.

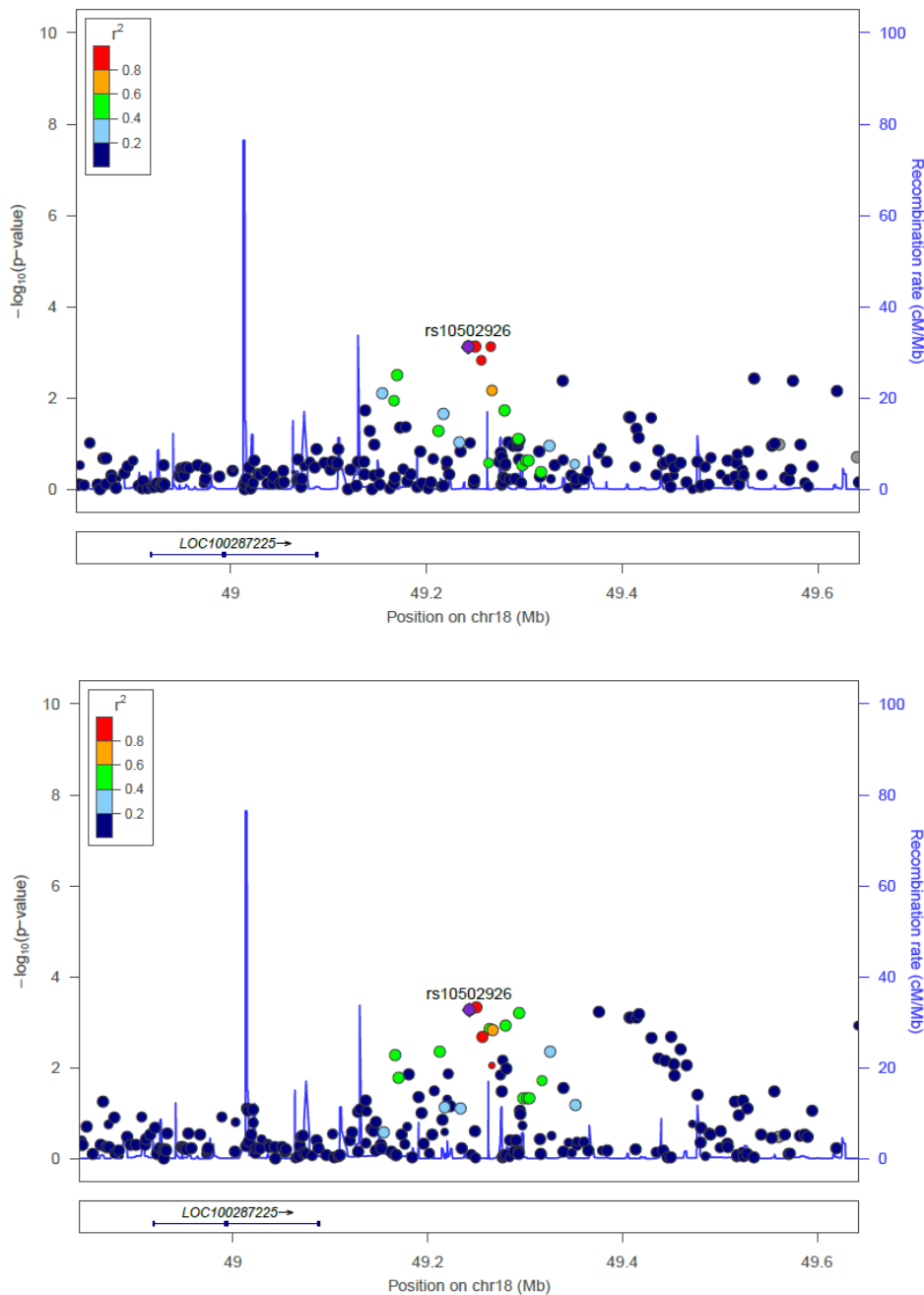
Ο κοινός (συχνότητα αλληλομόρφου κινδύνου 0.32) πολυμορφισμός rs2496302 βρίσκεται στην ευρύτερη διαγονιδιακή περιοχή των γονιδίων FOXQ1 (forkhead box Q1) και FOXF2 (forkhead box F2). Το FOXF2 εκφράζεται στους πνεύμονες και τον πλακούντα και εμπλέκεται στην

εμβρυική ανάπτυξη, την ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, την μετάδοση σήματος στα κύτταρα και την ογκογένεση. Πολυμορφισμοί στο FOXF2 γονίδιο έχει βρεθεί να σχετίζονται με υπέρταση.



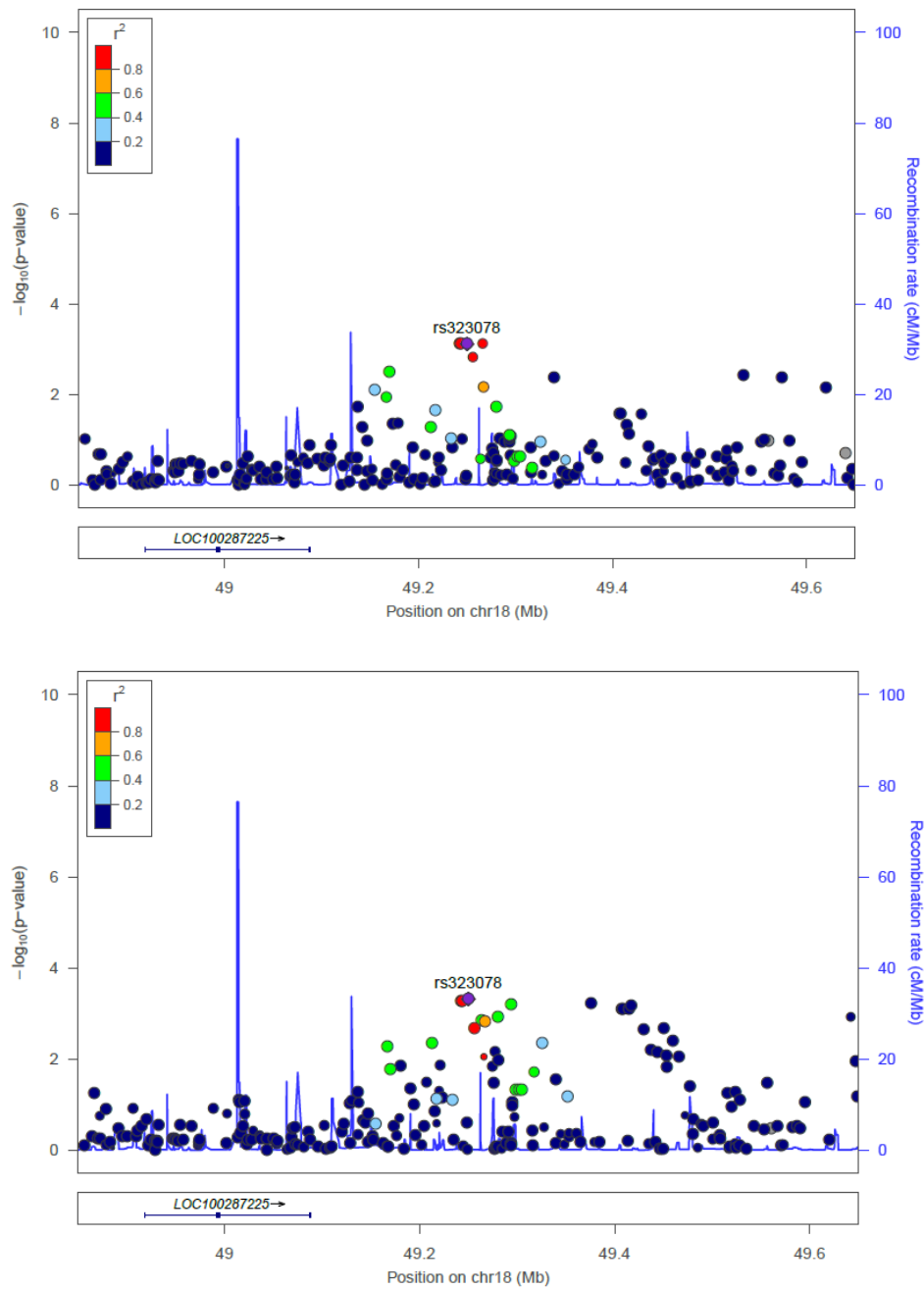
Εικόνα 3.28 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs2496302 ΕΠΑΝΩ- με το διατροφικό πρότυπο καφενείου στην περιφέρεια μέσης στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το γρήγορο διατροφικό πρότυπο στην ολική χοληστερόλη στα άτομα του POMAK.

Ο κοινός (συχνότητα αλληλομόρφου κινδύνου 0.11) πολυμορφισμός rs10502926 βρίσκεται στην ευρύτερη διαγονιδιακή περιοχή των γονιδίων RP11 και LOC100287225 (long intergenic non-protein coding RNA 1630).

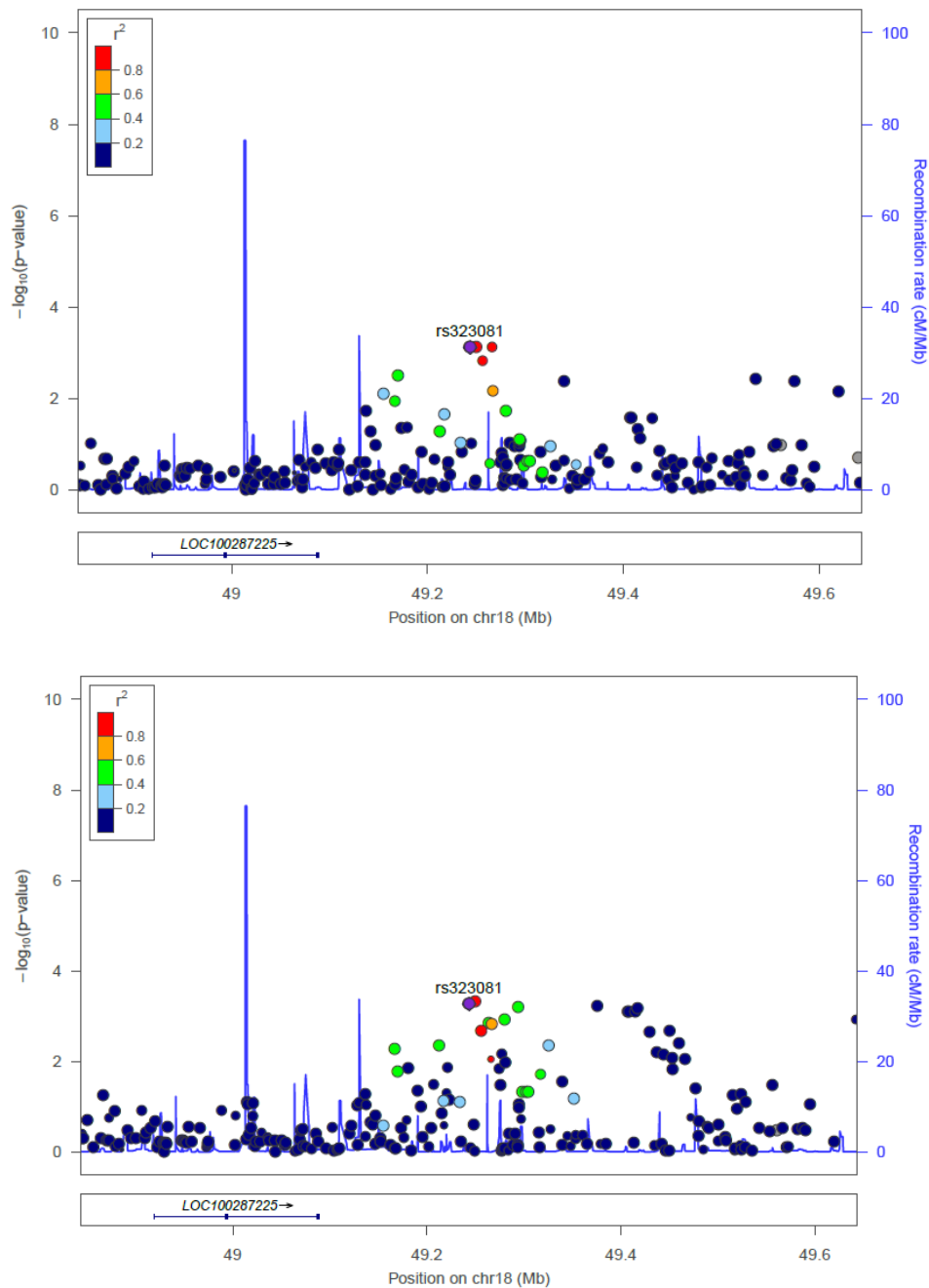


Εικόνα 3.29 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs10502926 ΕΠΑΝΩ- με το υψηλής περιεκτικότητας σε απλά σάκχαρα και λίπος διατροφικό πρότυπο στην περιφέρεια μέσης στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το γρήγορο διατροφικό πρότυπο στην ΣΑΠ στα άτομα του POMAK.

Οι κοινοί (συχνότητα αλληλομόρφου κινδύνου 0.10) πολυμορφισμοί rs323078 και rs323081 βρίσκονται στην ευρύτερη διαγονιδιακή περιοχή των γονιδίων RP11 και LOC100287225 (long intergenic non-protein coding RNA 1630).

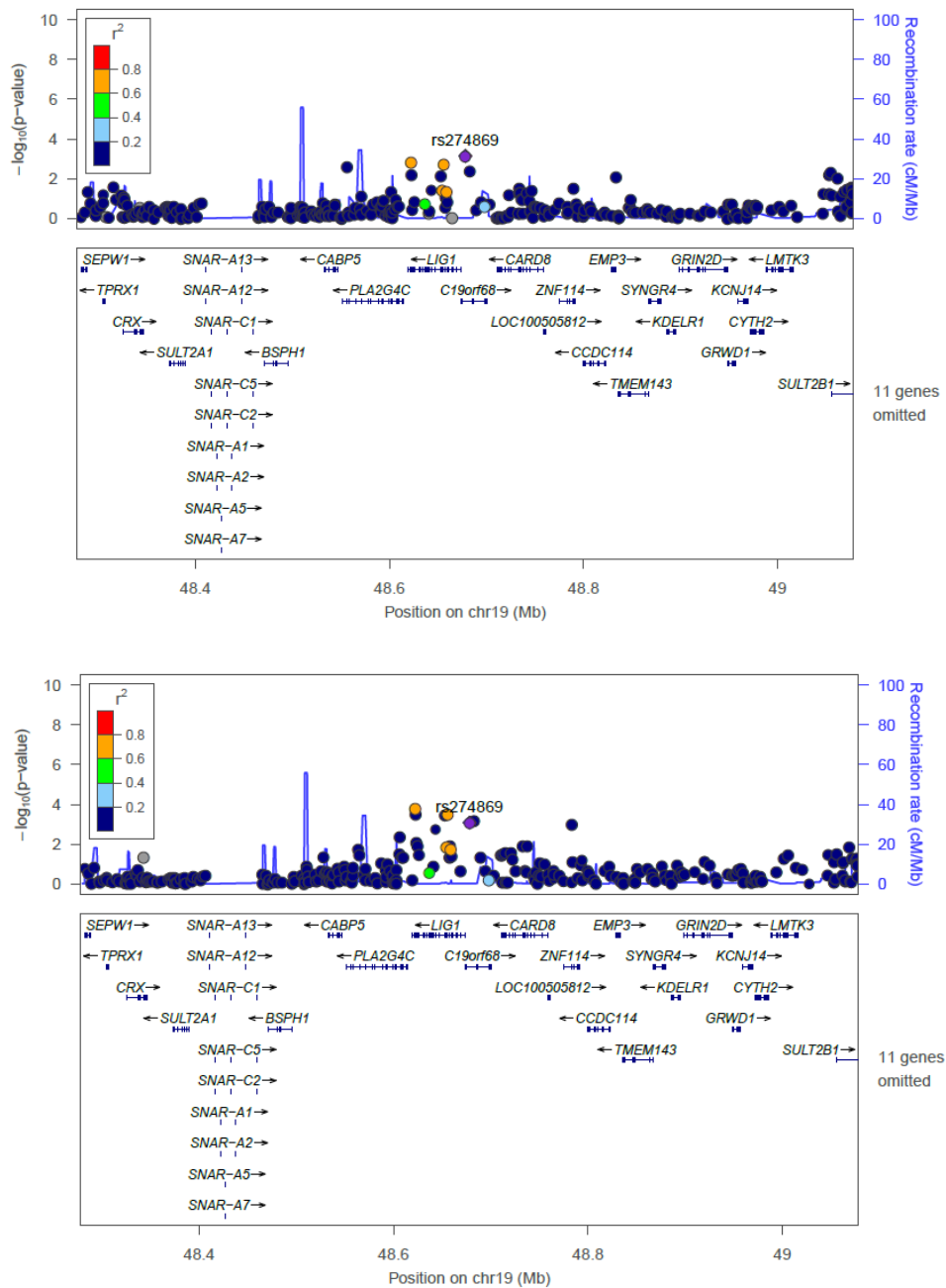


Εικόνα 3.30 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs323078 ΕΠΑΝΩ- με το υψηλής περιεκτικότητας σε απλά σάκχαρα και λίπος διατροφικό πρότυπο στην περιφέρεια μέσης στα άτομα του ΜΑΝΟΛΙΣ και ΚΑΤΩ- με το γρήγορο διατροφικό πρότυπο στην ΣΑΠ στα άτομα του ΡΟΜΑΚ.



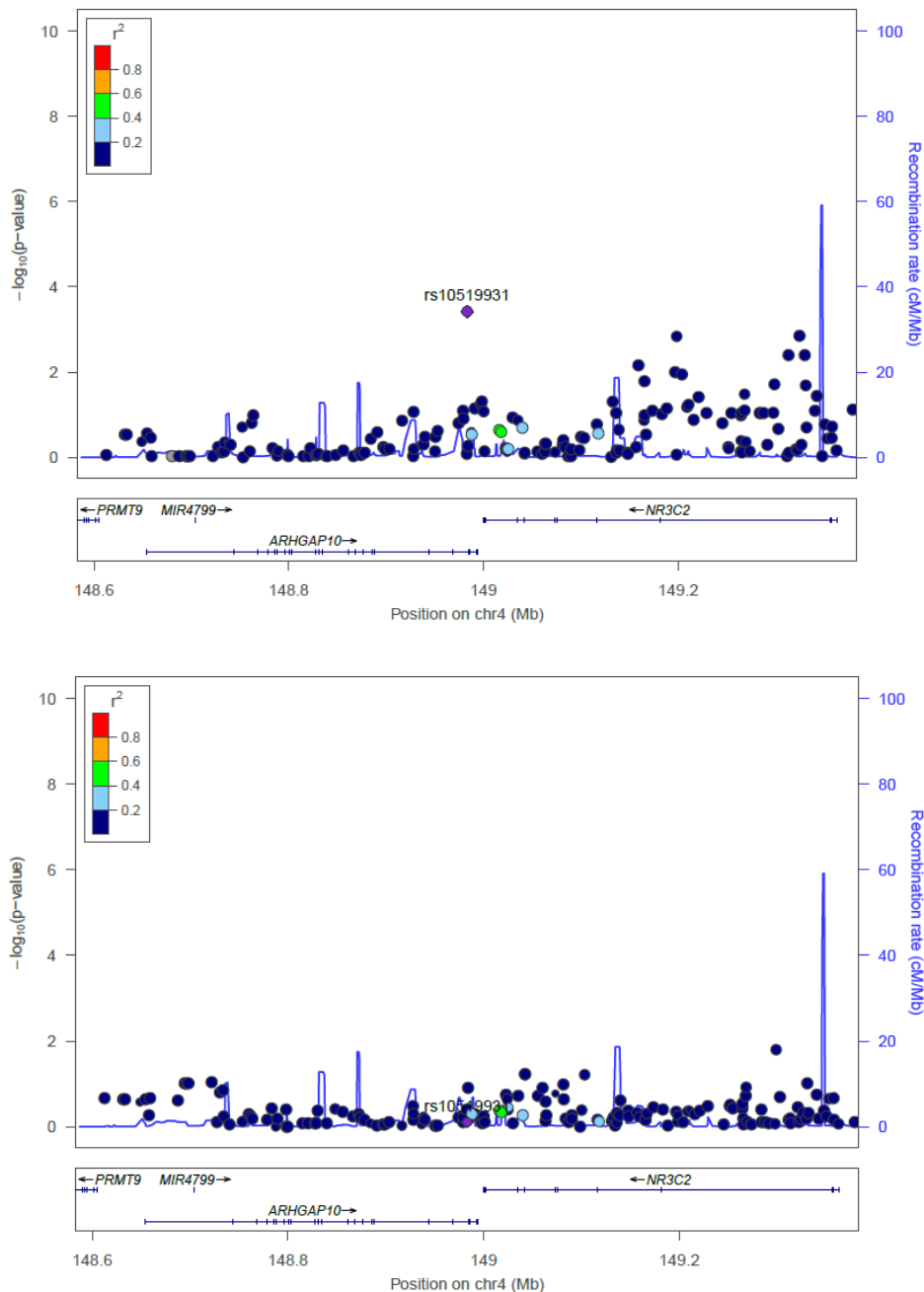
Εικόνα 3.31 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs323081 ΕΠΑΝΩ-με το υψηλής περιεκτικότητας σε απλά σάκχαρα και λίπος διατροφικό πρότυπο στην περιφέρεια μέσης στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το γρήγορο διατροφικό πρότυπο στην ΣΑΠ στα άτομα του POMAK.

Ο κοινός (συχνότητα αλληλομόρφου κινδύνου 0.32) πολυμορφισμός rs274869 βρίσκεται στην περιοχή των εσονίων των γονιδίων C19orf68 (chromosome 19 open reading frame 68), ZFP114 (zinc finger protein 114), LIG1 (ligase I, DNA, ATP-dependent). Στον πληθυσμό POMAK το αλληλόμορφο κινδύνου είναι το αντίστροφο από αυτού του παγκόσμιου γενικού πληθυσμού και του MANOLIS.



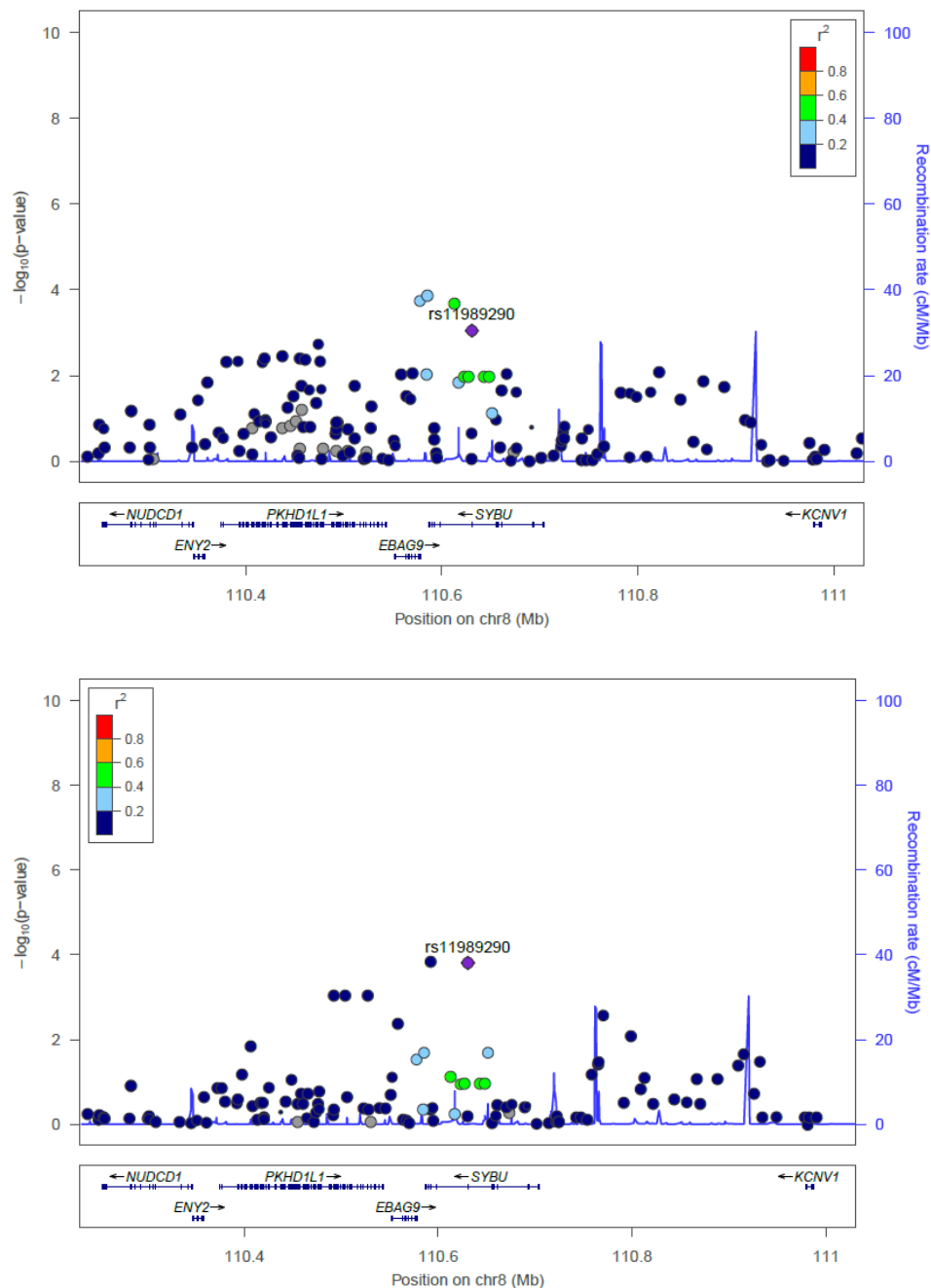
Εικόνα 3.32 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs274869 ΕΠΑΝΩ- με το διατροφικό πρότυπο καφενείου στην ολική χοληστερόλη στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ- με το σπιτικό διατροφικό πρότυπο στην περιφέρεια μέσης στα άτομα του POMAK.

Ο κοινός (συχνότητα αλληλομόρφου κινδύνου 0.07) πολυμορφισμός rs10519931 βρίσκεται στην περιοχή των εσονίων του γονιδίου ARHGAP10 (Rho GTPase activating protein 10). Πολυμορφισμοί σε αυτό το γονίδιο έχει βρεθεί να σχετίζονται με την ΑΠ και την χοληστερόλη.



Εικόνα 3.33 Απεικόνιση του γενετικού τόπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs10519931 ΕΠΑΝΩ- με το υψηλής περιεκτικότητας σε απλά σάκχαρα και λίπος διατροφικό πρότυπο στην ΣΑΠ στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το γρήγορο διατροφικό πρότυπο στην ΣΑΠ στα άτομα του POMAK.

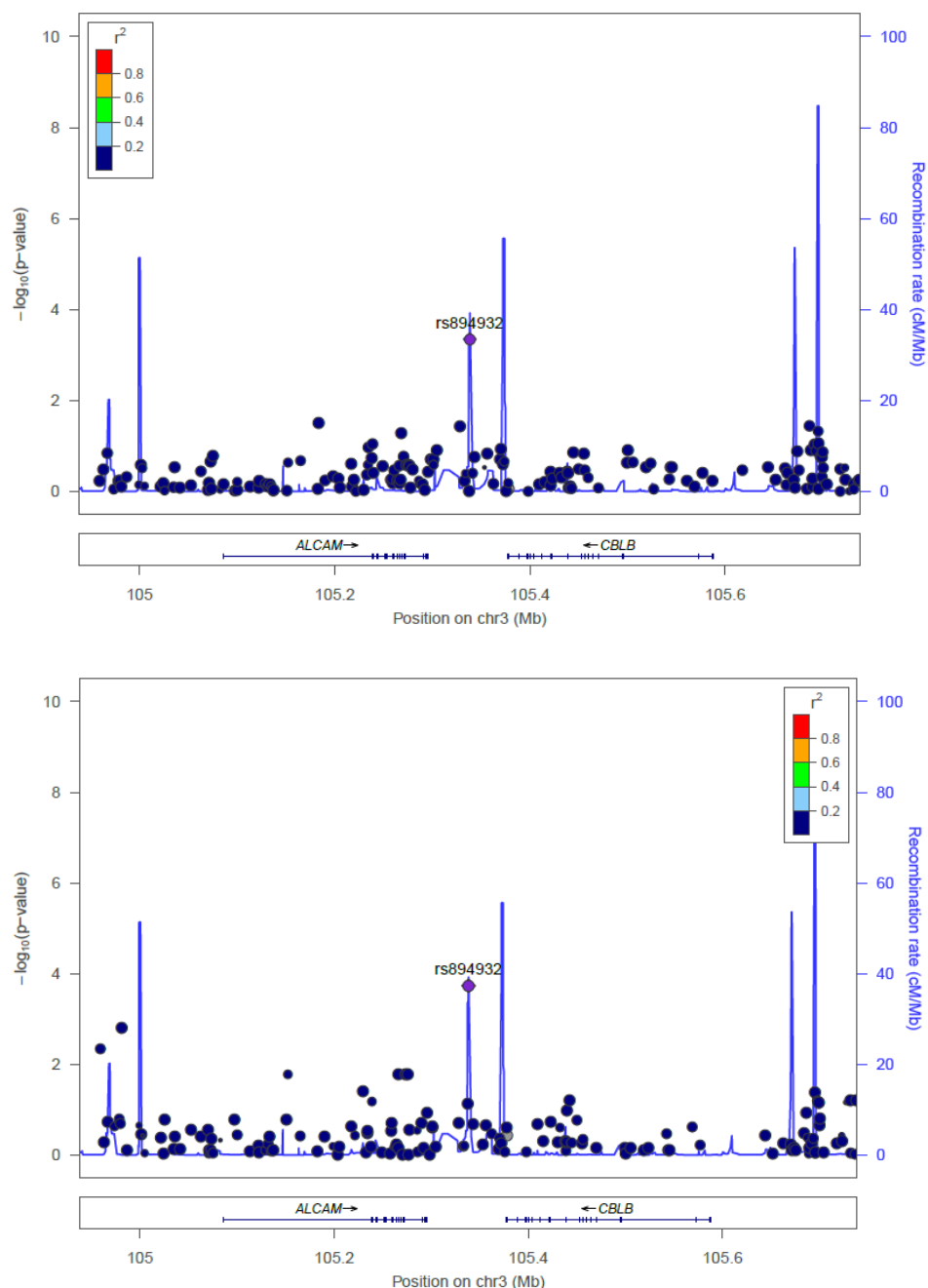
Ο κοινός (συχνότητα αλληλομόρφου κινδύνου 0.10) πολυμορφισμός rs11989290 βρίσκεται στην περιοχή των εσόνίων του γονιδίου SYBU (syntabulin). Η σινταβουλίνη συμβάλλει στην προσυναπτική συγκρότηση κατά την ανάπτυξη των νευρώνων. Πολυμορφισμοί σε αυτό το γονίδιο έχει βρεθεί να σχετίζονται με την LDL και την χοληστερόλη.



Εικόνα 3.34 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs11989290 ΕΠΑΝΩ-με το τοπικό διατροφικό πρότυπο στην ΣΑΠ στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το πλούσιο σε απλά σάκχαρα διατροφικό πρότυπο στην HDL στα άτομα του POMAK.

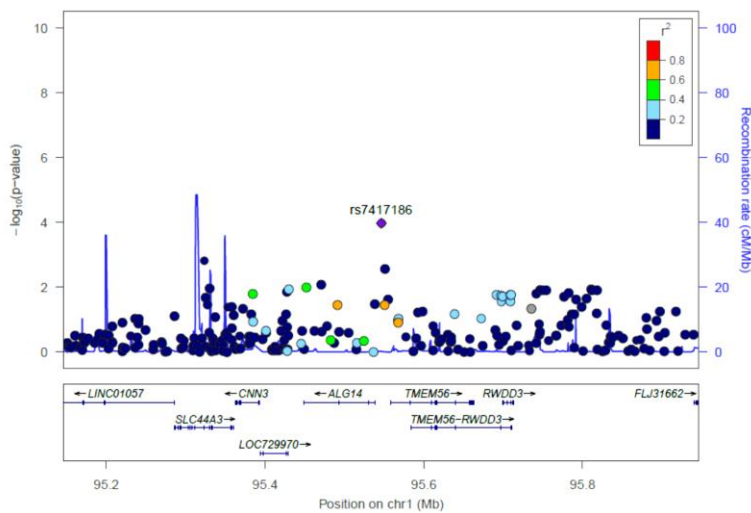
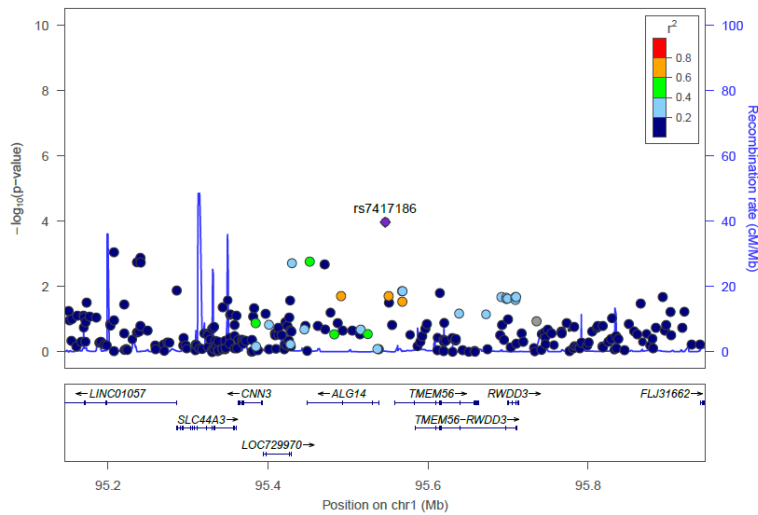
Ο κοινός (συχνότητα αλληλομόρφου κινδύνου 0.22) πολυμορφισμός rs894932 βρίσκεται στην διαγονιδιακή περιοχή μεταξύ των γονιδίων ALCAM (activated leukocyte cell adhesion molecule) και CBLB (Cbl proto-oncogene B, E3 ubiquitin protein ligase). Το ALCAM γονίδιο κωδικοποιεί το μόριο κυτταρικής προσκόλλησης των ενεργοποιημένων λευκοκυττάρων CD166 που είναι μέλος της οικογένειας των υποδοχέων των ανοσοσφαιρινών και εμπλέκεται στην κυτταρική

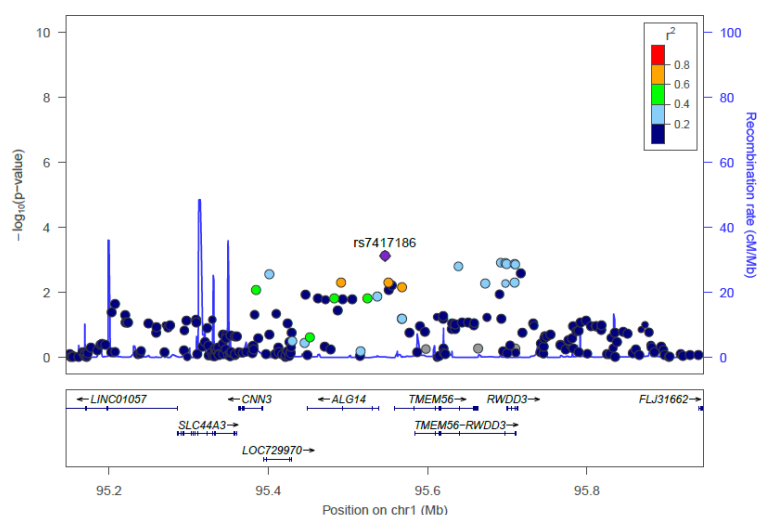
προσκόλληση και μετανάστευση. Πολυμορφισμοί στο ALCAM γονίδιο έχει βρεθεί να σχετίζονται με τον ΔΜΣ, την ΑΠ, τις λιποπρωτεΐνες και το έμφραγμα του μυοκαρδίου. Το γονίδιο CBLB σχετίζεται με διάφορους τύπους καρκίνου και πολυμορφισμοί εντός αυτού του γονιδίου με την περιφέρεια ισχίου.



Εικόνα 3.35 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs894932 ΕΠΑΝΩ- με το τοπικό διατροφικό πρότυπο στην ΔΑΠ στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το πλούσιο σε απλά σάκχαρα διατροφικό πρότυπο στην HDL στα άτομα του POMAK.

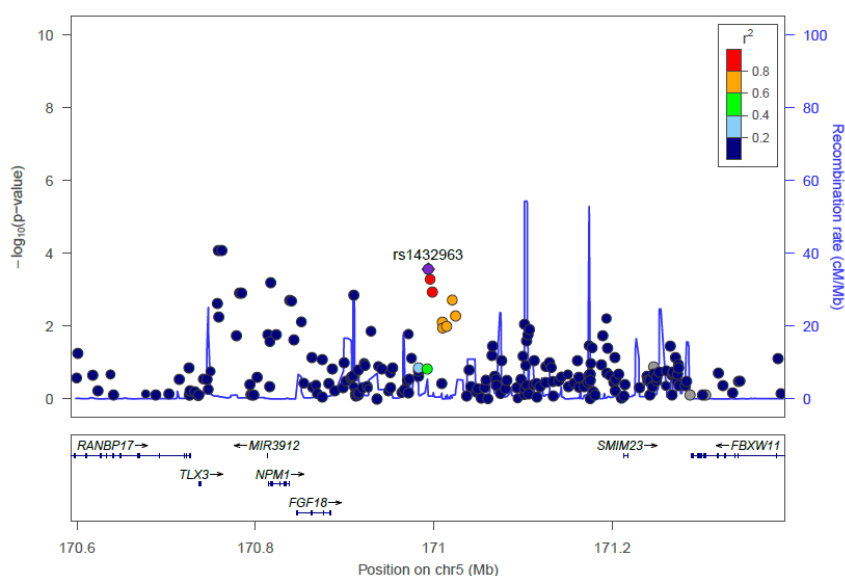
Ο κοινός (συχνότητα αλληλομόρφου κινδύνου 0.20) πολυμορφισμός rs7417186 βρίσκεται στην διαγονιδιακή περιοχή μεταξύ των γονιδίων TMEM56 (transmembrane protein 56) και ALG14 (UDP-N-acetylglucosaminyltransferase subunit). Οι υπομονάδες ALG14 μαζί με την ALG13 της τρανσφεράσης καταλύουν τα δυο πρώτα βήματα της γλυκοζυλίωσης στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Μεταλλάξεις στο ALG14 γονίδιο σχετίζονται με σύνδρομα μυασθένειας.

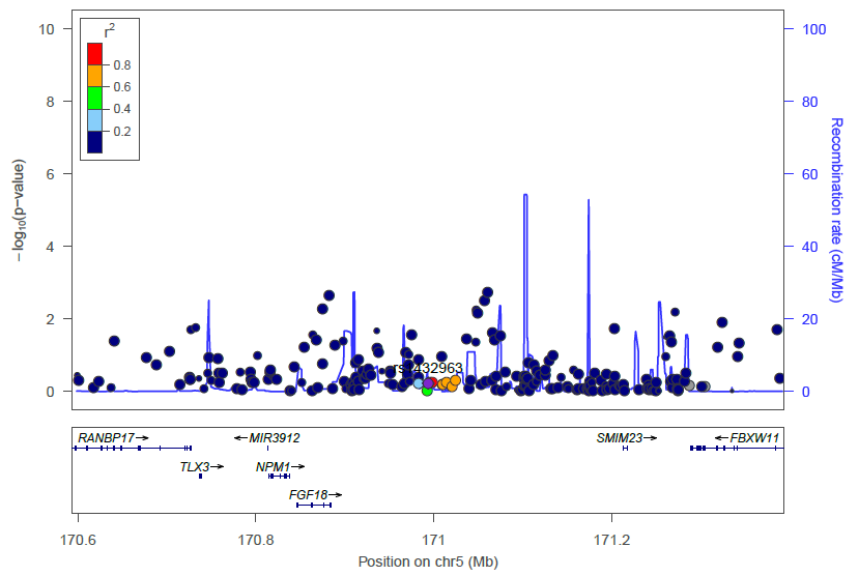




Εικόνα 3.36 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs7417186 ΕΠΑΝΩ- με το τοπικό διατροφικό πρότυπο στον ΔΜΣ στα άτομα του MANOLIS, ΕΝΔΙΑΜΕΣΑ- με το τοπικό διατροφικό πρότυπο στην περιφέρεια μέσης στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το πλούσιο σε απλά σάκχαρα διατροφικό πρότυπο στην ολική χοληστερόλη στα άτομα του POMAK.

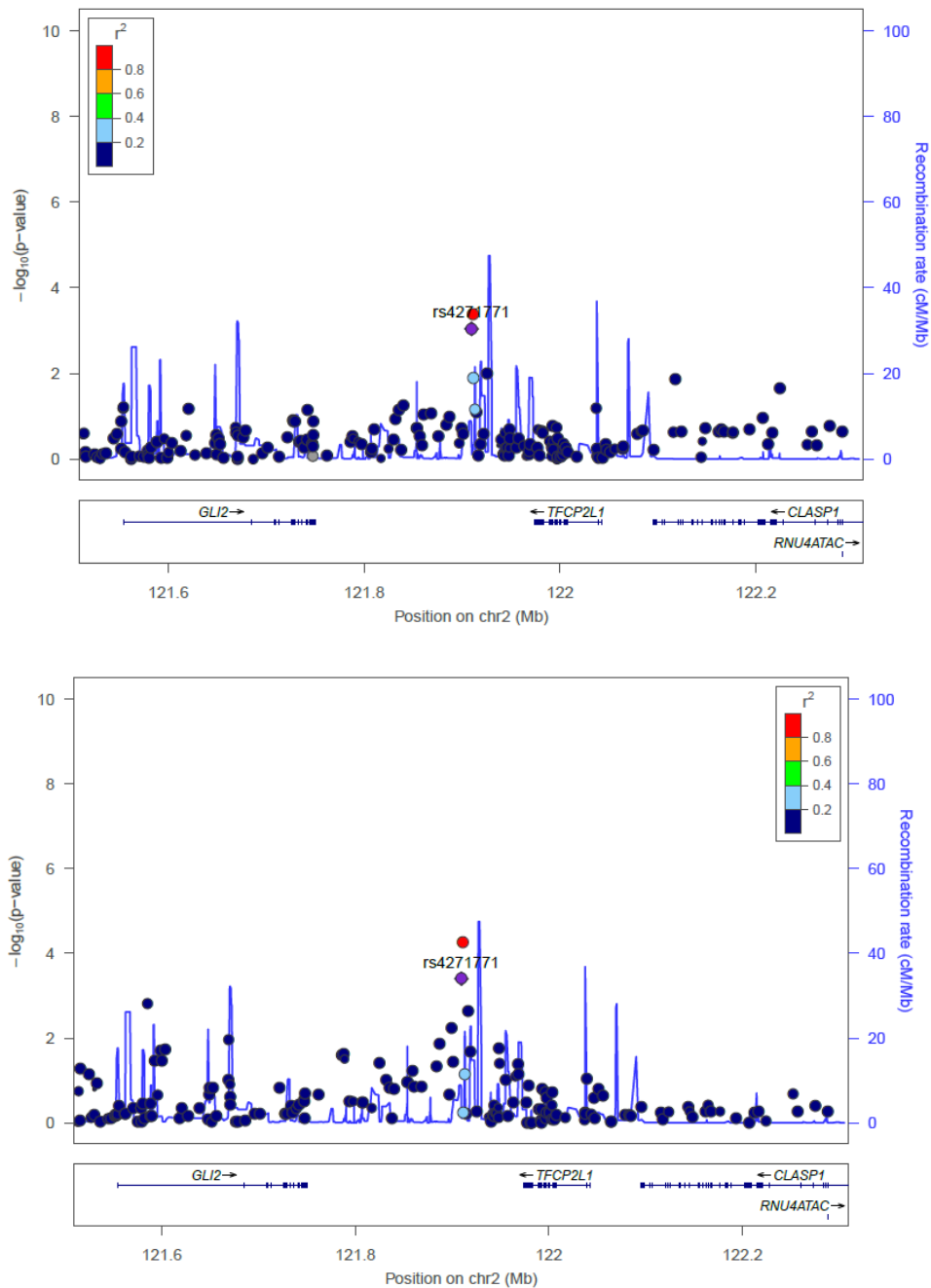
Ο κοινός (συχνότητα αλληλομόρφου κινδύνου 0.33) πολυμορφισμός rs1432963 βρίσκεται στην ευρύτερη διαγονιδιακή περιοχή του γονιδίου FGF18 (fibroblast growth factor 18) που κωδικοποιεί ένα μέλος της οικογένειας του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών. Ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών έχει ευρεία μιτογόνο δράση και εμπλέκεται στην κυτταρική επιβίωση συμμετέχοντας σε πολλές βιολογικές διαδικασίες όπως την εμβρυική ανάπτυξη, την κυτταρική αύξηση, την επιδιόρθωση ιστικών βλαβών και την ανάπτυξη όγκων. Πολυμορφισμοί σε αυτό το γονίδιο έχει βρεθεί να σχετίζονται με τον ΔΜΣ, την σύσταση σώματος και το σωματικό ύψος.





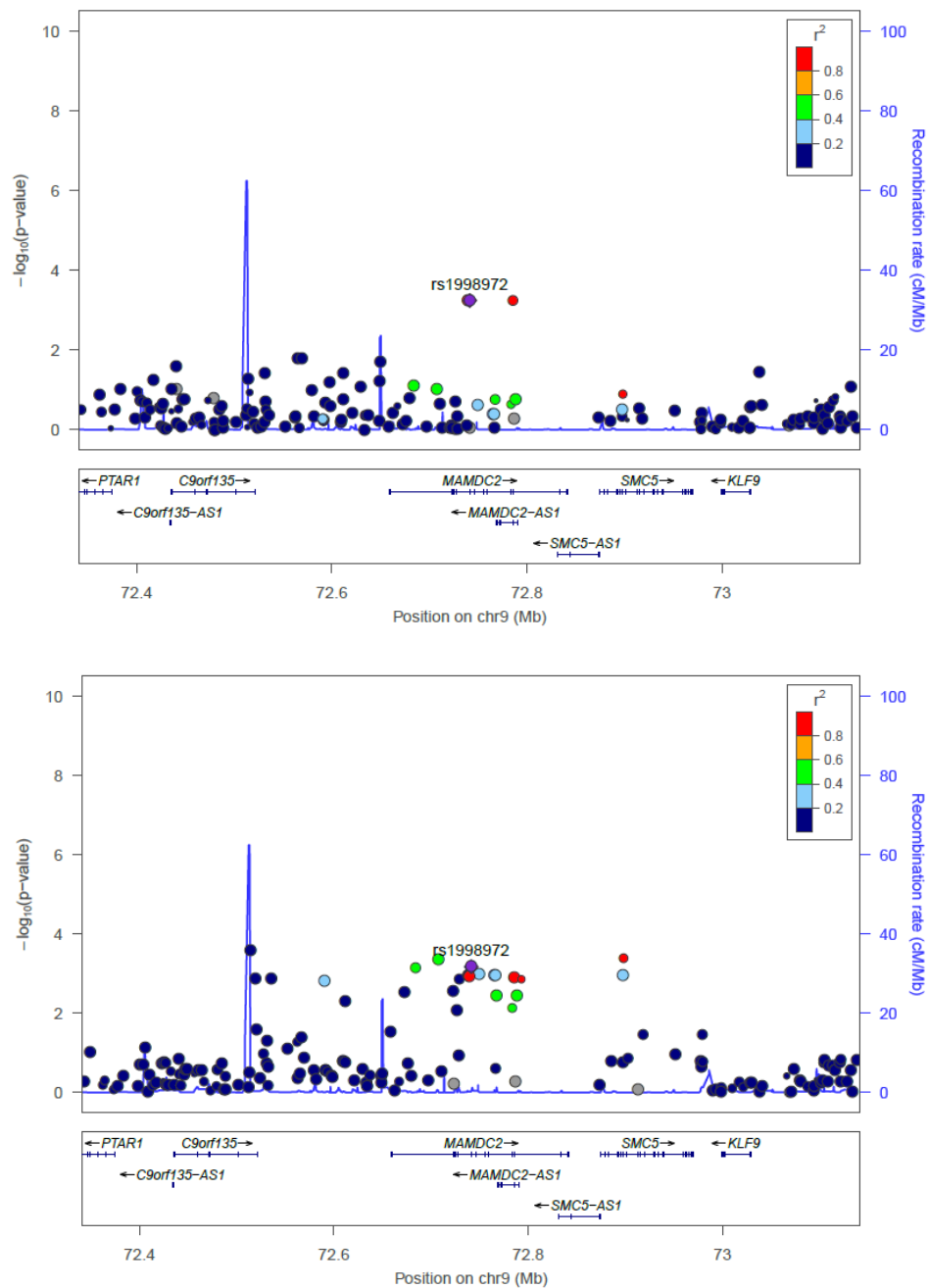
Εικόνα 3.37 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs1432963 ΕΠΑΝΩ- με το τοπικό διατροφικό πρότυπο στην ΔΑΠ στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το σπιτικό διατροφικό πρότυπο στην ΣΑΠ στα άτομα του POMAK.

Ο κοινός (συχνότητα αλληλομόρφου κινδύνου 0.48) πολυμορφισμός rs4271771 βρίσκεται στην διαγονιδιακή περιοχή μεταξύ των γονιδίων GLI2 (GLI family zinc finger 2) και TFCP2L1 (transcription factor CP2-like 1). Το GLI2 κωδικοποιεί την πρωτεΐνη που ανήκει στην υποκατηγορία πρωτεΐνης C2H2-τυπου δακτύλων ψευδαργύρου. Τα μέλη αυτής της υποκατηγορίας είναι μεταγραφικοί παράγοντες που προσδένονται στο DNA και παίζουν ρόλο στον εμβρυογένεση και την ογκογένεση. Πολυμορφισμοί στο GLI2 γονίδιο έχει βρεθεί να σχετίζονται με τον ΔΜΣ, την ΑΠ και πολυμορφισμοί στο TFCP2L1 γονίδιο έχει βρεθεί να σχετίζονται με την ΑΠ.



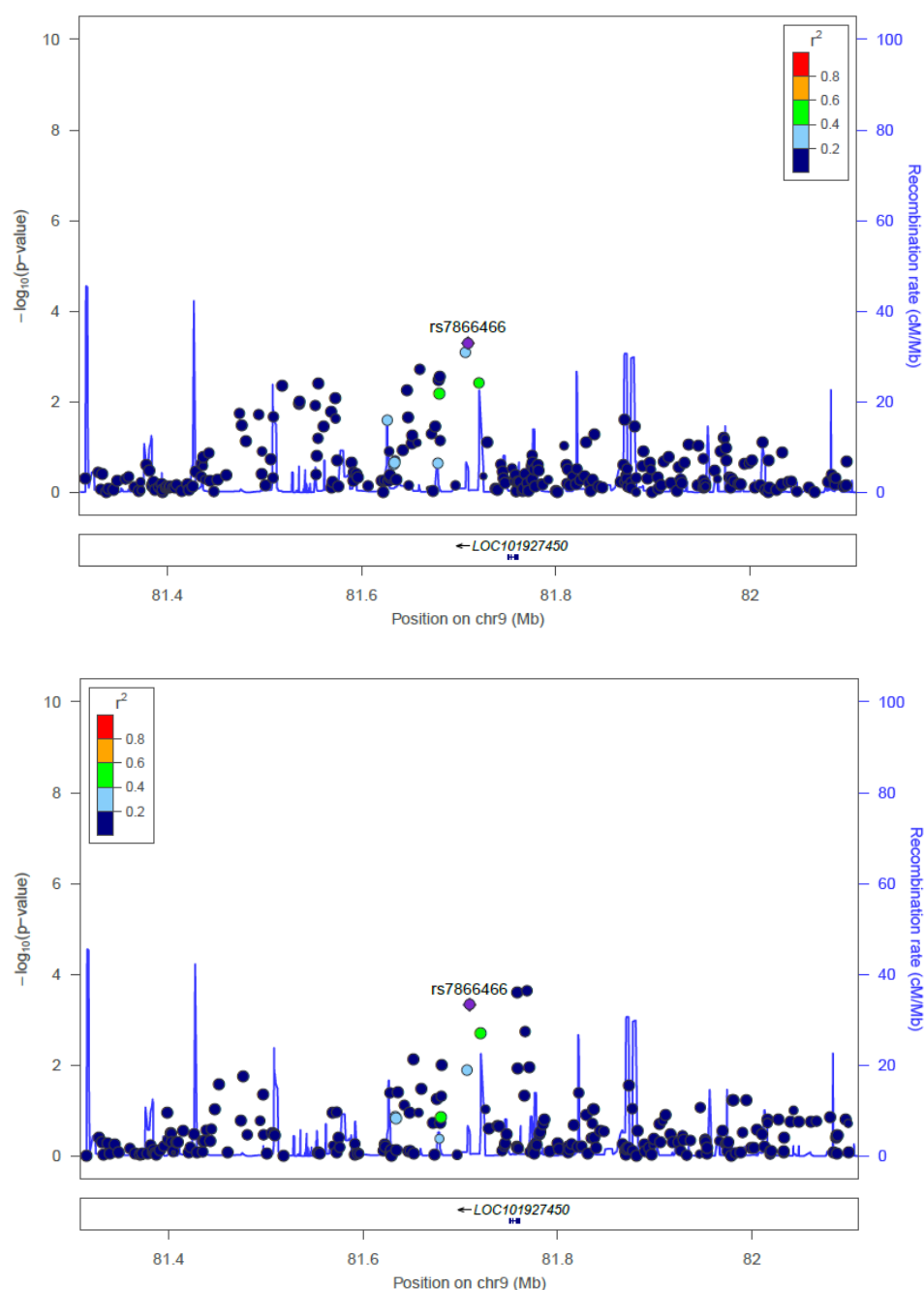
Εικόνα 3.38 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs4271771 ΕΠΑΝΩ-με το υψηλής περιεκτικότητας σε απλά σάκχαρα και λίπος διατροφικό πρότυπο στην περιφέρεια μέσης στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το πλούσιο σε απλά σάκχαρα διατροφικό πρότυπο στην ολική χοληστερόλη στα άτομα του POMAK.

Ο κοινός (συχνότητα αλληλομόρφου κινδύνου 0.13) πολυμορφισμός rs1998972 βρίσκεται στην μη κωδική περιοχή των εξονίων του γονιδίου MAMDC2 (MAM domain containing 2).



Εικόνα 3.39 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs1998972 ΕΠΑΝΩ- με το διατροφικό πρότυπο καφενείου στον ΔΜΣ στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το γρήγορο διατροφικό πρότυπο στην ολική χοληστερόλη στα άτομα του POMAK.

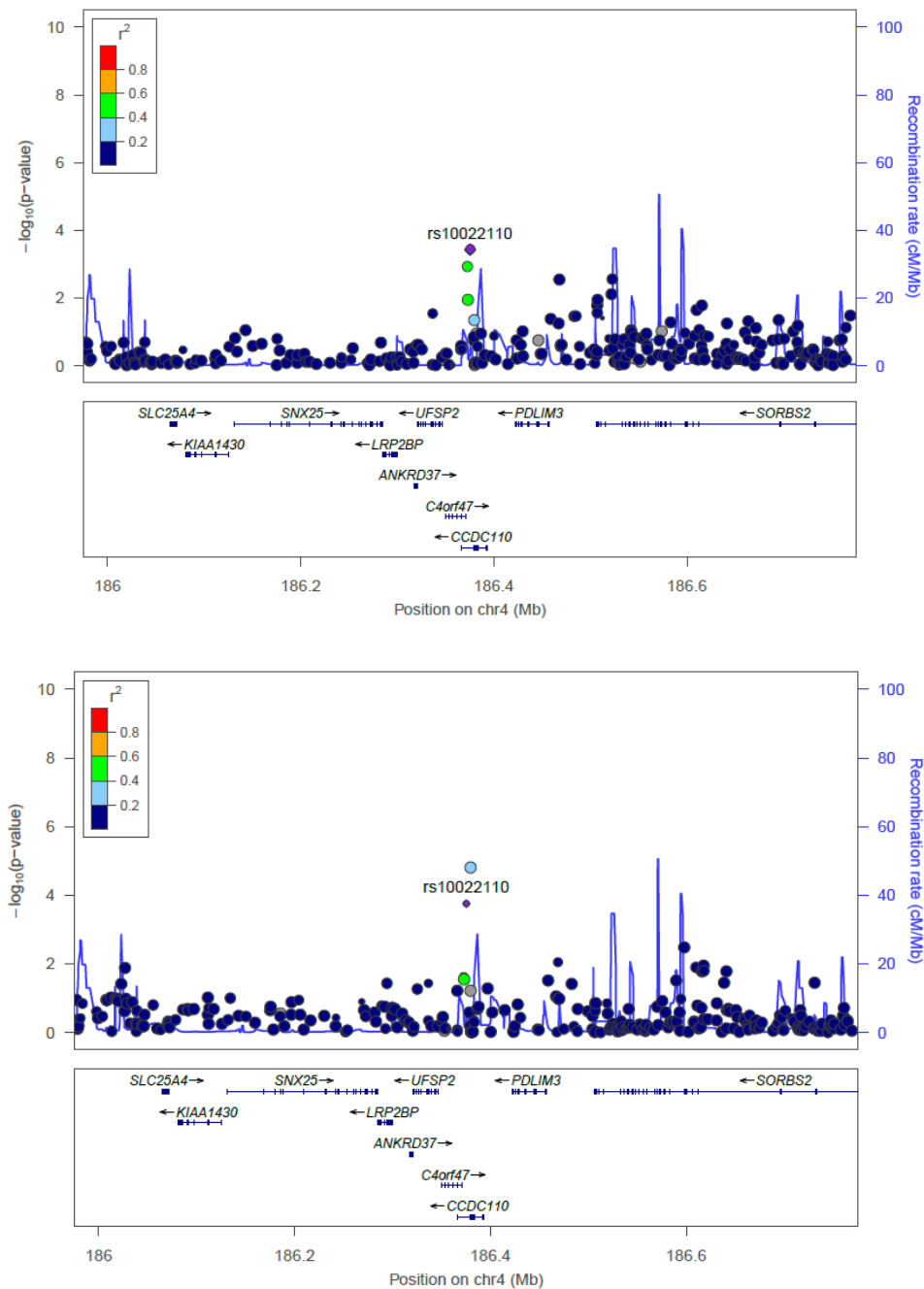
Ο κοινός (συχνότητα αλληλομόρφου κινδύνου 0.39) πολυμορφισμός rs7866466 βρίσκεται στην ευρύτερη διαγονιδιακή περιοχή των γονιδίων CHCHD2P9 (coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 2 pseudogene 9) και LOC101927450.



Εικόνα 3.40 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs7866466 ΕΠΑΝΩ- με το τοπικό διατροφικό πρότυπο στην ΔΑΠ στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το πλούσιο σε απλά σάκχαρα διατροφικό πρότυπο στην HDL στα άτομα του ΡΟΜΑΚ.

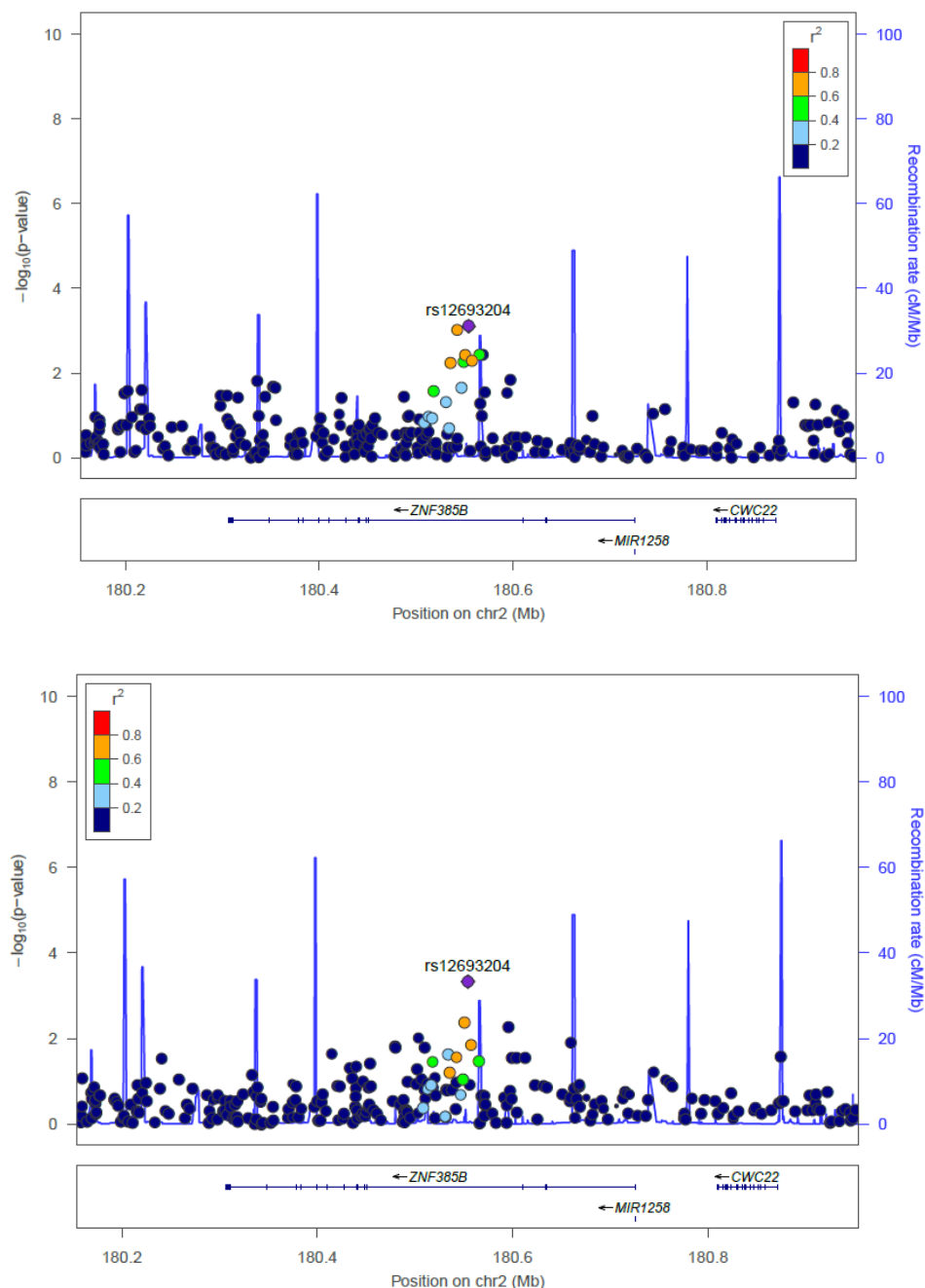
Ο κοινός (συχνότητα αλληλομόρφου κινδύνου 0.31) πολυμορφισμός rs10022110 βρίσκεται στην περιοχή των εσονίων των γονιδίων CCDC110 (coiled-coil domain containing 110) και C4orf47 (chromosome 4 open reading frame 47) και στην ευρύτερη διαγονιδιακή περιοχή των γονιδίων UFSP2 (UFM1-specific peptidase 2) και PDLIM3. Το γονίδιο UFSP2 κωδικοποιεί μία πρωτεάση της κυστεΐνης που συμβάλλει στην μεταφορά και αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών και

το γονίδιο PDLIM3 κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη που πιθανώς να εμπλέκεται στην διαμόρφωση του κυτταροσκελετού. Πολυμορφισμοί στο γονίδιο PDLIM3 έχει βρεθεί να σχετίζονται με την περιφέρεια μέσης.



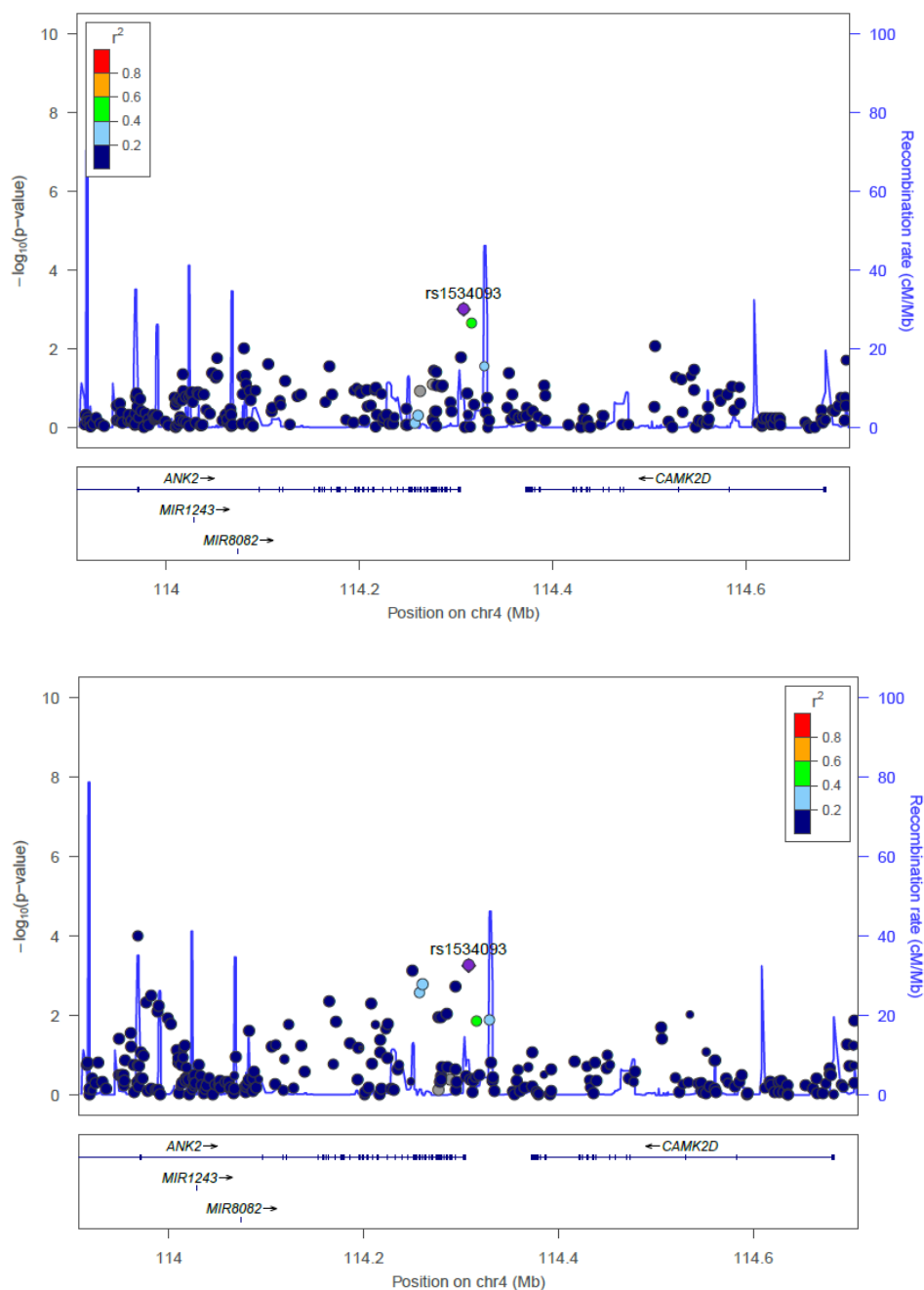
Εικόνα 3.41 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs10022110 ΕΠΑΝΩ- με το υψηλής περιεκτικότητας σε απλά σάκχαρα και λίπος διατροφικό πρότυπο στην ΔΑΠ στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το γρήγορο διατροφικό πρότυπο στην ολική χοληστερόλη στα άτομα του POMAK.

Ο κοινός (συχνότητα αλληλομόρφου κινδύνου 0.40) πολυμορφισμός rs12693204 βρίσκεται στην περιοχή των εσονίων του γονιδίου ZNF385B (zinc finger protein 385B) που κωδικοποιεί τον υποδοχέα P1 του γάμμα-αμινοβουτιρικού οξέος. Πολυμορφισμοί σε αυτό το γονίδιο έχει βρεθεί να σχετίζονται με τις λιποπρωτεΐνες. Στον πληθυσμό MANOLIS το αλληλόμορφο κινδύνου είναι το αντίστροφο από αυτό του παγκόσμιου γενικού πληθυσμού και του ΡΟΜΑΚ.



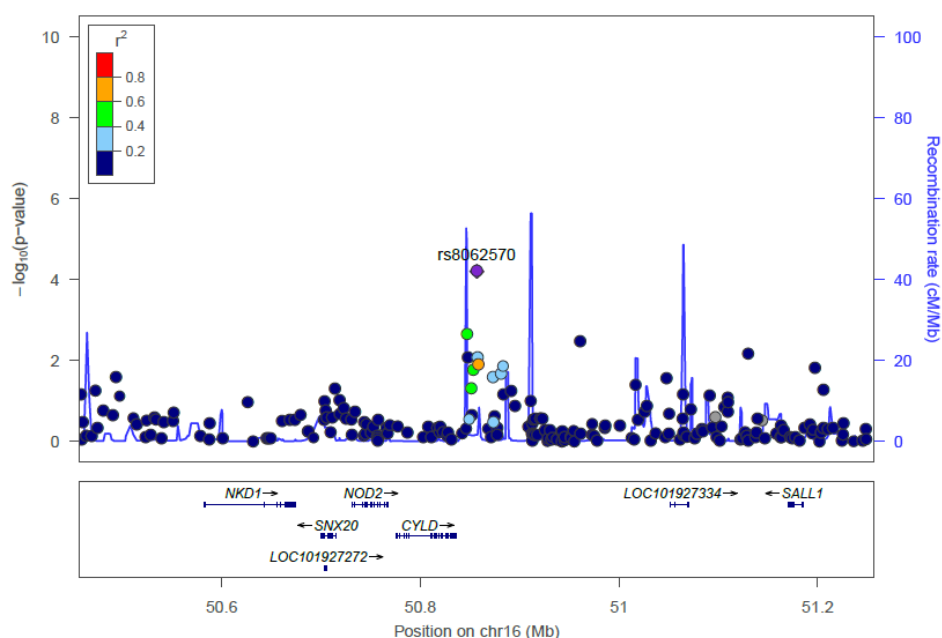
Εικόνα 3.42 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs12693204 ΕΠΑΝΩ-με το διατροφικό πρότυπο καφενείου στον ΔΜΣ στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το γρήγορο διατροφικό πρότυπο στην ολική χοληστερόλη στα άτομα του ΡΟΜΑΚ.

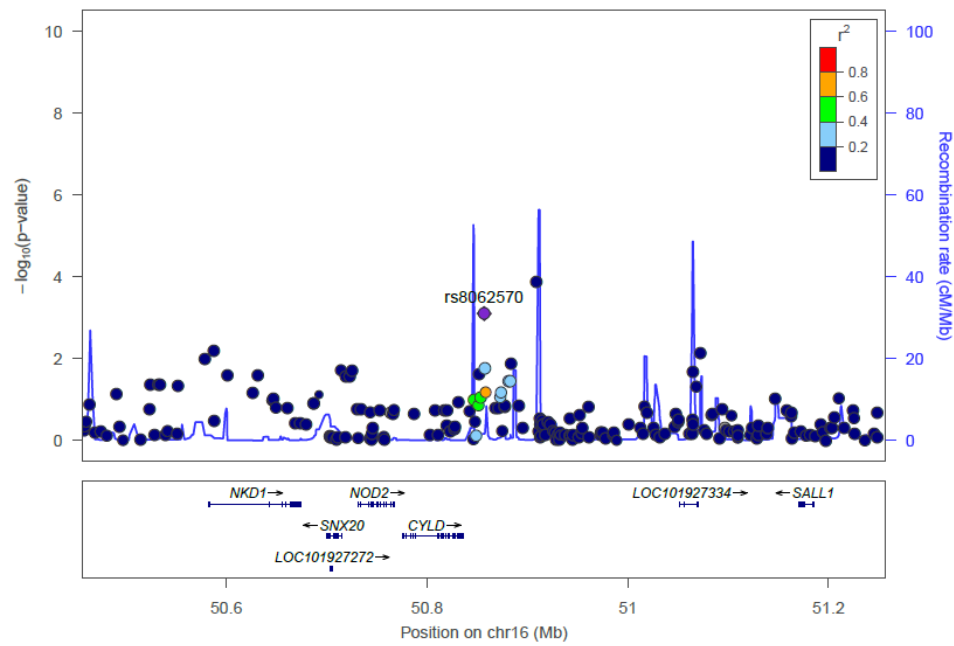
Ο κοινός (συχνότητα αλληλομόρφου κινδύνου 0.12) πολυμορφισμός rs1534093 βρίσκεται στην διαγονιδιακή περιοχή μεταξύ των γονιδίων ANK2 (ankyrin 2, neuronal) και CAMK2D (calcium/calmodulin-dependent protein kinase II delta). Το ANK2 γονίδιο κωδικοποιεί την ανκυρίνη που παίζει ρόλο κλειδί στην κυτταρική κινητικότητα, ενεργοποίηση και επικοινωνία μέσω των μεμβρανών διασφαλίζοντας σταθερότητα της αντλίας νατρίου/καλίου στα καρδιομυοκύτταρα. Το προϊόν του γονιδίου CAMK2D ανήκει στην ευρύτερη οικογένεια των πρωτεϊνικών κινάσων. Πολυμορφισμοί στο ANK2 γονίδιο έχει βρεθεί να σχετίζονται με την ΑΠ, την χοληστερόλη και την LDL και πολυμορφισμοί στο CAMK2D γονίδιο έχει βρεθεί να σχετίζονται με τον ΔΜΣ και το σωματικό ύψος.



Εικόνα 3.43 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs1534093 ΕΠΑΝΩ-με το υψηλής περιεκτικότητας σε απλά σάκχαρα και λίπος διατροφικό πρότυπο στην ΣΑΠ στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το γρήγορο διατροφικό πρότυπο στην HDL στα άτομα του POMAK.

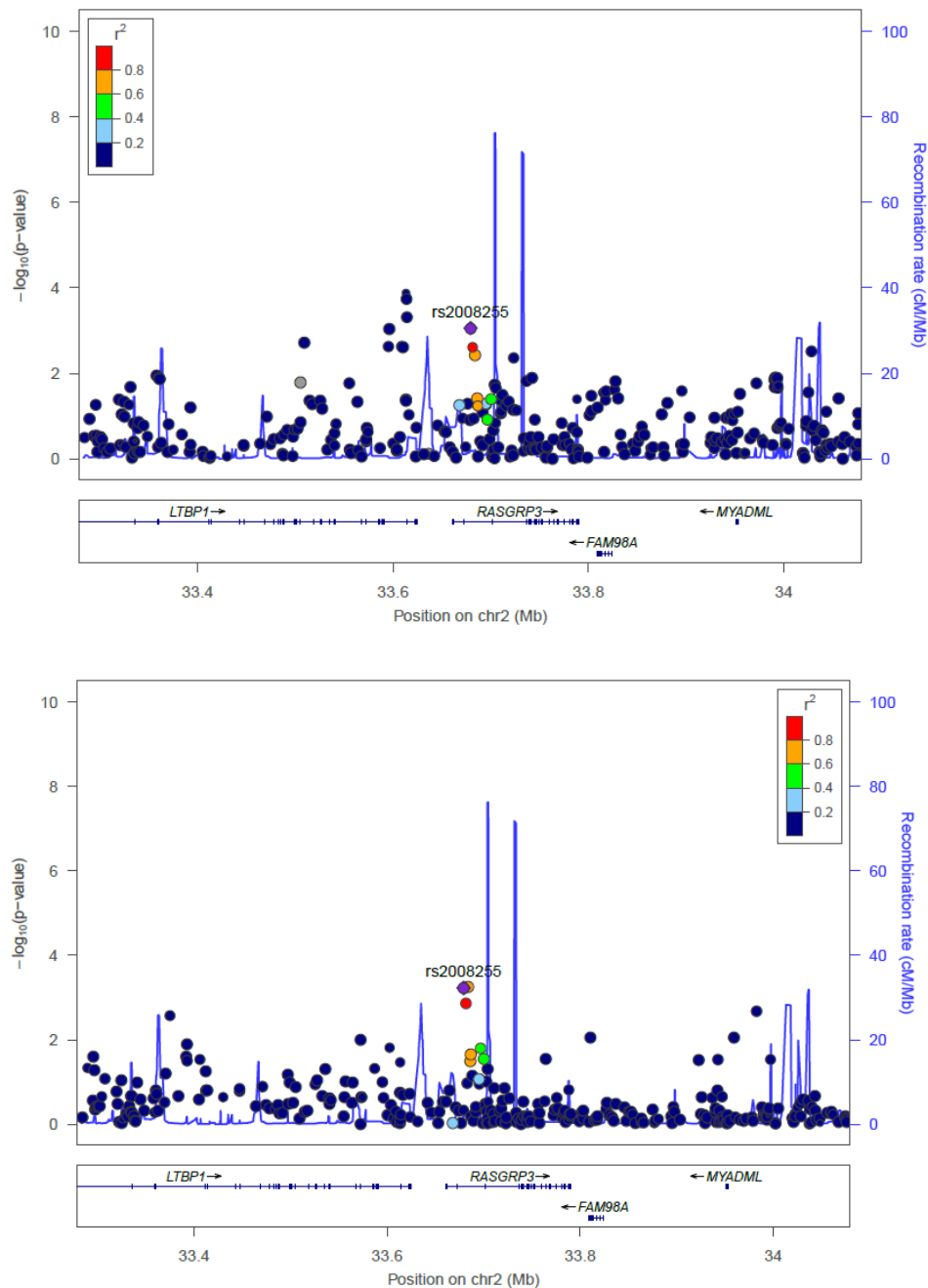
Ο κοινός (συχνότητα αλληλομόρφου κινδύνου 0.43) πολυμορφισμός rs8062570 βρίσκεται στην ευρύτερη διαγονιδιακή περιοχή των γονιδίων (cylindromatosis) και NOD2 (nucleotide-binding oligomerization domain containing 2). Το γονίδιο CYLD κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη τον κυτταροπλάσματος και το γονίδιο NOD2 κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη που εκφράζεται κυρίως στα λευκοκύτταρα και παίζει ρόλο στην ανοσολογική απόκριση. Πολυμορφισμοί στο CYLD γονίδιο έχει βρεθεί να σχετίζονται με την στεφανιαία νόσο.





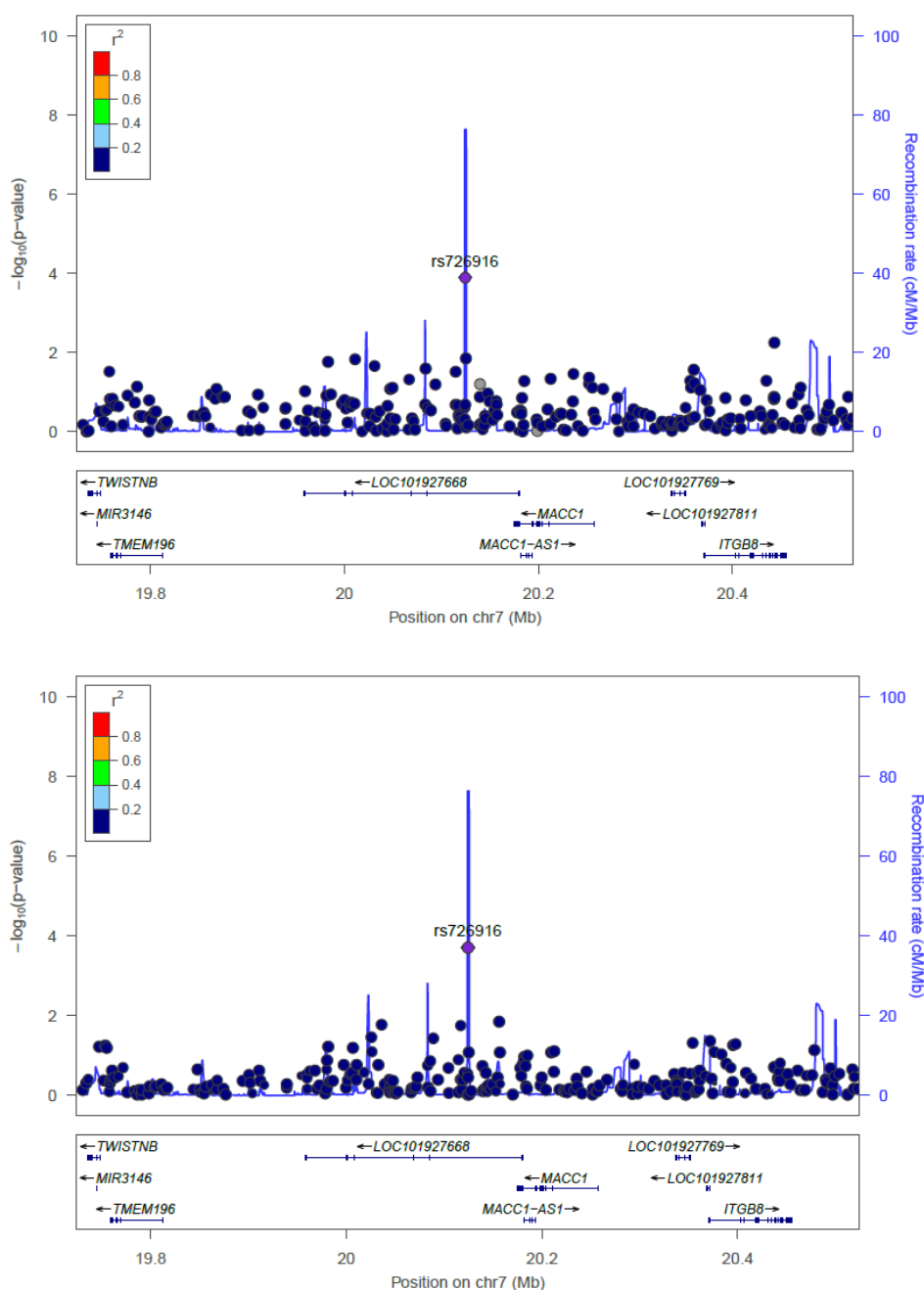
Εικόνα 3.44 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs8062570 ΕΠΑΝΩ- με το υψηλής περιεκτικότητας σε απλά σάκχαρα και λίπος διατροφικό πρότυπο στον ΔΜΣ στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το σπιτικό διατροφικό πρότυπο στην ΔΑΠ στα άτομα του ΡΟΜΑΚ.

Ο κοινός (συχνότητα αλληλομόρφου κινδύνου 0.22) πολυμορφισμός rs2008255 βρίσκεται στην περιοχή των εσονίων του γονιδίου RASGRP3 (RAS guanyl releasing protein 3 -calcium and DAG-regulated) που κωδικοποιεί μέλη της οικογένειας GTPασών που συμμετέχουν στην μετάδοση σήματος. Πολυμορφισμοί σε αυτό το γονίδιο έχει βρεθεί να σχετίζονται με την ΑΠ και υπέρταση.



Εικόνα 3.45 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs2008255 ΕΠΑΝΩ-με το διατροφικό πρότυπο με φρούτα, λαχανικά και ελαιόλαδο στην HDL στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το σπιτικό διατροφικό πρότυπο στην HDL στα άτομα του POMAK.

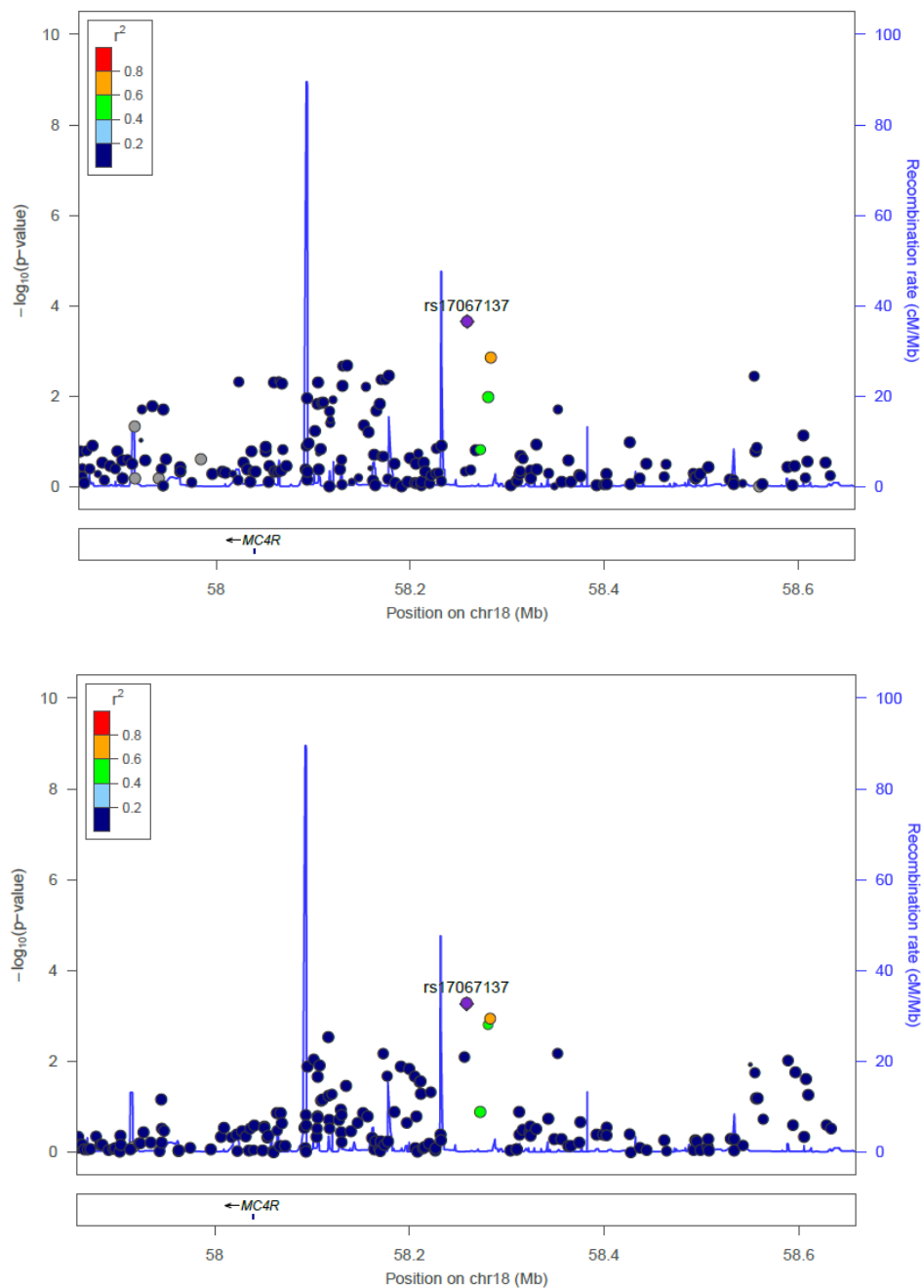
Ο κοινός (συχνότητα αλληλομόρφου κινδύνου 0.33) πολυμορφισμός rs726916 βρίσκεται στην ευρύτερη περιοχή του γονιδίου RPL21P75 (ribosomal protein L21 pseudogene 75). Πολυμορφισμοί σε αυτό το γονίδιο έχει βρεθεί να σχετίζονται με την χοληστερόλη.



Εικόνα 3.46 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs726916 ΕΠΑΝΩ-με το τοπικό διατροφικό πρότυπο στην HDL στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το ισορροπημένο διατροφικό πρότυπο στον ΔΜΣ στα άτομα του POMAK.

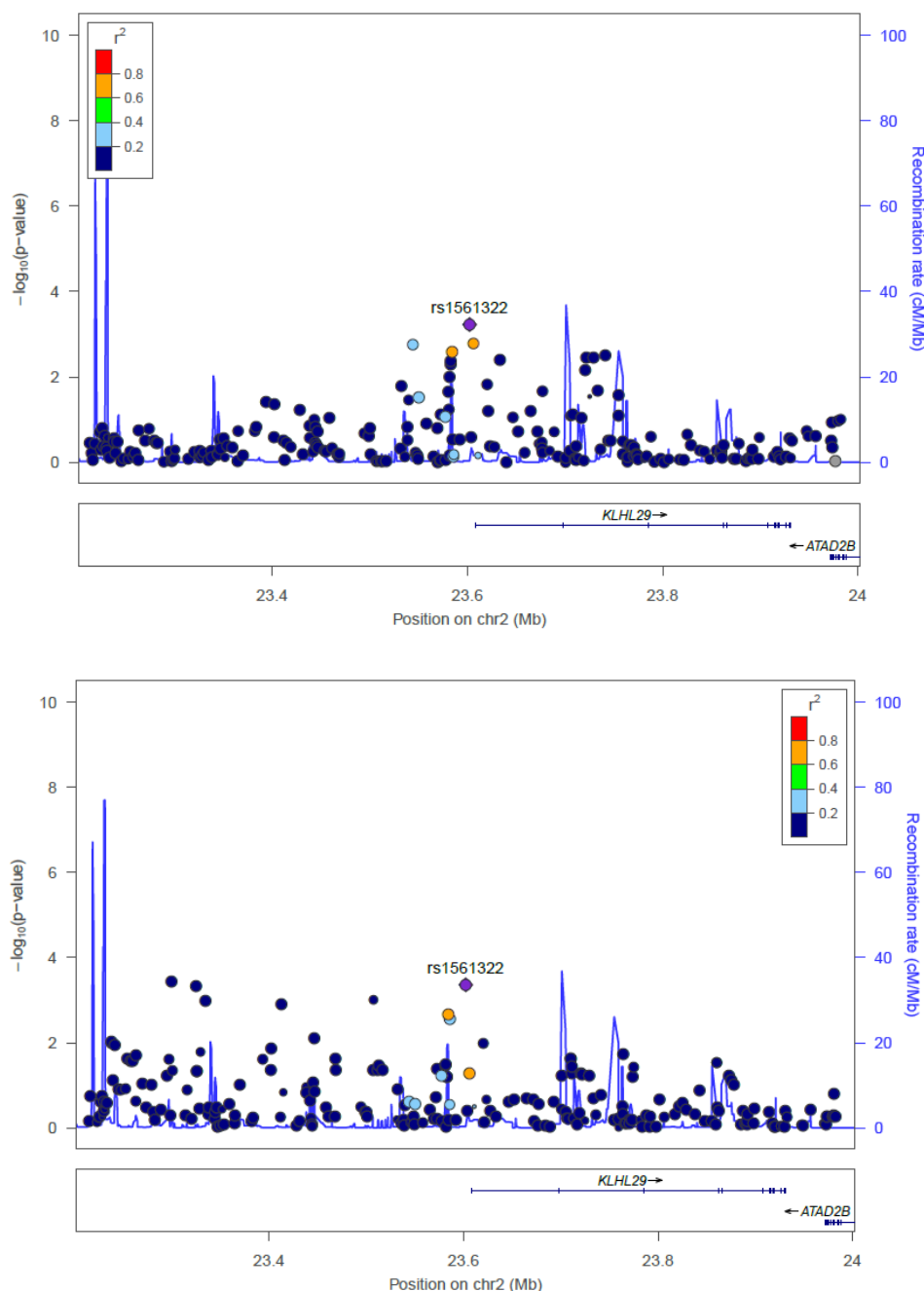
Ο κοινός (συχνότητα αλληλομόρφου κινδύνου 0.25) πολυμορφισμός rs17067137 βρίσκεται στην ευρύτερη διαγονιδιακή περιοχή του γονιδίου MC4R (melanocortin 4 receptor) που

κωδικοποιεί τον υποδοχέα τον υποδοχέα της μελανοκορτίνης. Μεταλλάξεις σε αυτό το γονίδιο έχει βρεθεί να σχετίζονται με την παχυσαρκία και πολυμορφισμοί σε αυτό το γονίδιο έχει βρεθεί να σχετίζονται με τον ΔΜΣ, την HDL, τον ΣΔ τύπου II και την περιφέρεια μέσης.



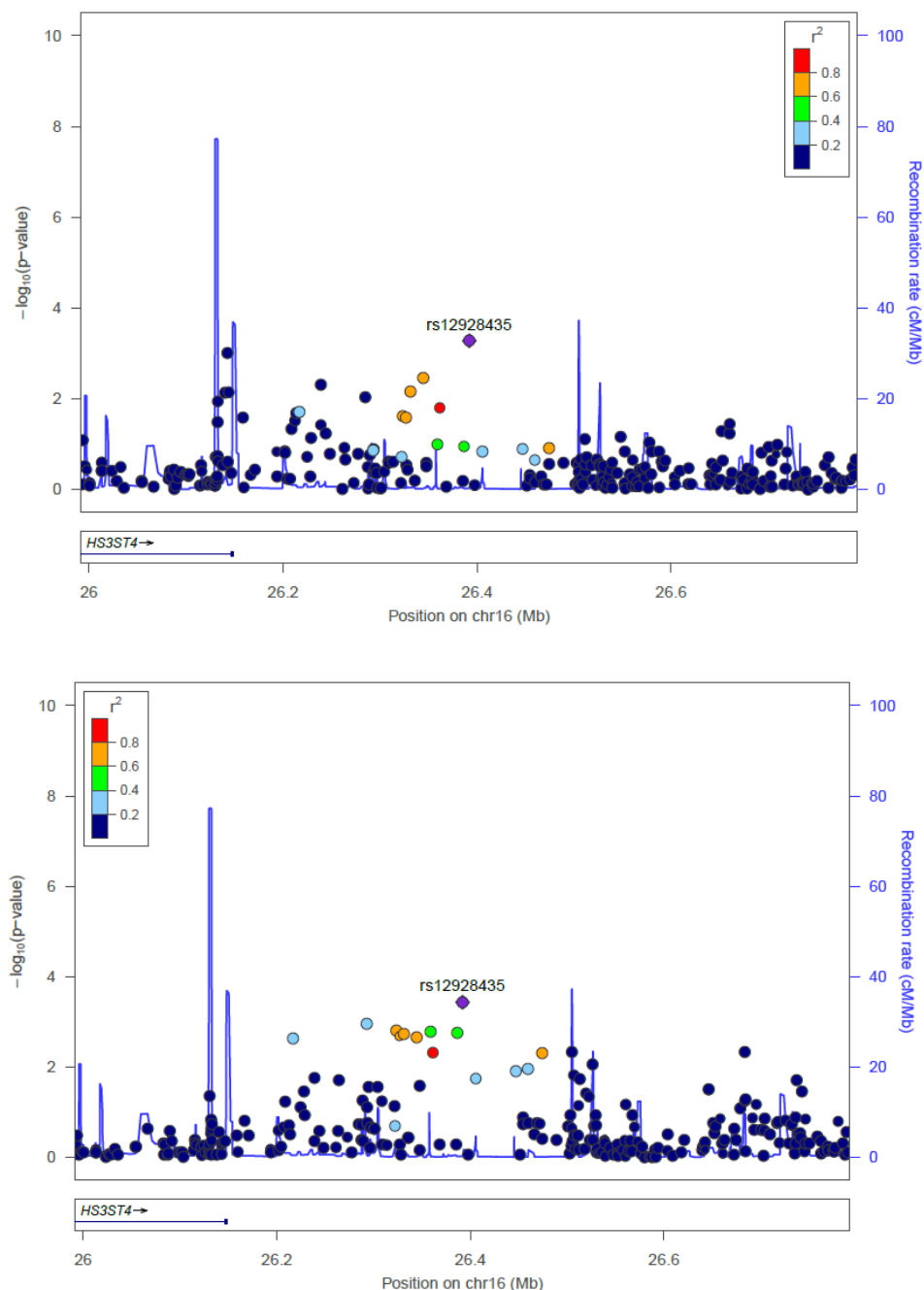
Εικόνα 3.47 Απεικόνιση του γενετικού τόπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs17067137 ΕΠΑΝΩ-με το υψηλής περιεκτικότητας σε απλά σάκχαρα και λίπος διατροφικό πρότυπο στην περιφέρεια μέσης στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το πλούσιο σε απλά σάκχαρα διατροφικό πρότυπο στην ολική χοληστερόλη στα άτομα του POMAK.

Ο κοινός (συχνότητα αλληλομόρφου κινδύνου 0.41) πολυμορφισμός rs1561322 βρίσκεται στην περιοχή των εσονίων του γονιδίου KLHL29 (kelch like family member 29). Πολυμορφισμοί σε αυτό το γονίδιο έχει βρεθεί να σχετίζονται με τον ΔΜΣ, την ΑΠ, το σωματικό βάρος, την HDL, την LDL, την χοληστερόλη, τα τριγλυκερίδια και την στεφανιαία νόσο.



Εικόνα 3.48 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs1561322 ΕΠΑΝΩ-με το υψηλής περιεκτικότητας σε απλά σάκχαρα και λίπος διατροφικό πρότυπο στην ΔΑΠ στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το πλούσιο σε απλά σάκχαρα διατροφικό πρότυπο στην HDL στα άτομα του ΡΟΜΑΚ.

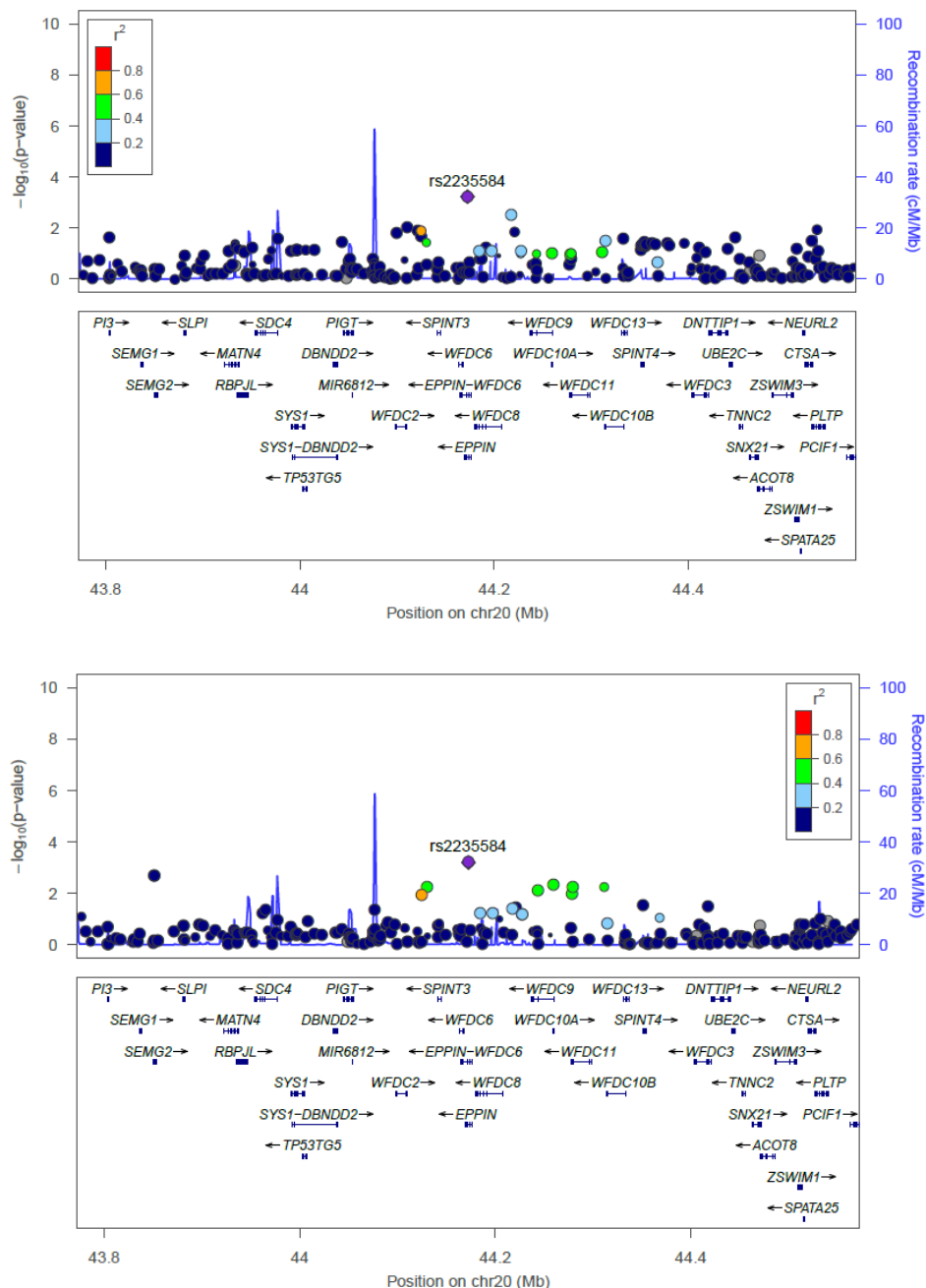
Ο κοινός (συχνότητα αλληλομόρφου κινδύνου 0.09) πολυμορφισμός rs12928435 βρίσκεται στην ευρύτερη διαγονιδιακή περιοχή των HMGN2P3 (high mobility group nucleosomal binding domain 2 pseudogene 3) και HS3ST4 (heparan sulfate-glucosamine 3-sulfotransferase 4), η έκφραση του οποίου φαίνεται να παίζει ρόλο στην παθογένεση του ιού του απλού έρπητα. Πολυμορφισμοί στο γονίδιο HS3ST4 έχει βρεθεί να σχετίζονται με τον ΔΜΣ, το σωματικό βάρος και ύψος, την LDL, την χοληστερόλη, την περιφέρεια μέσης και άλλα χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την παχυσαρκία.



Εικόνα 3.49 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs12928435 ΕΠΑΝΩ- με το υψηλής περιεκτικότητας σε απλά σάκχαρα και λίπος διατροφικό πρότυπο στην ΔΑΠ στα άτομα

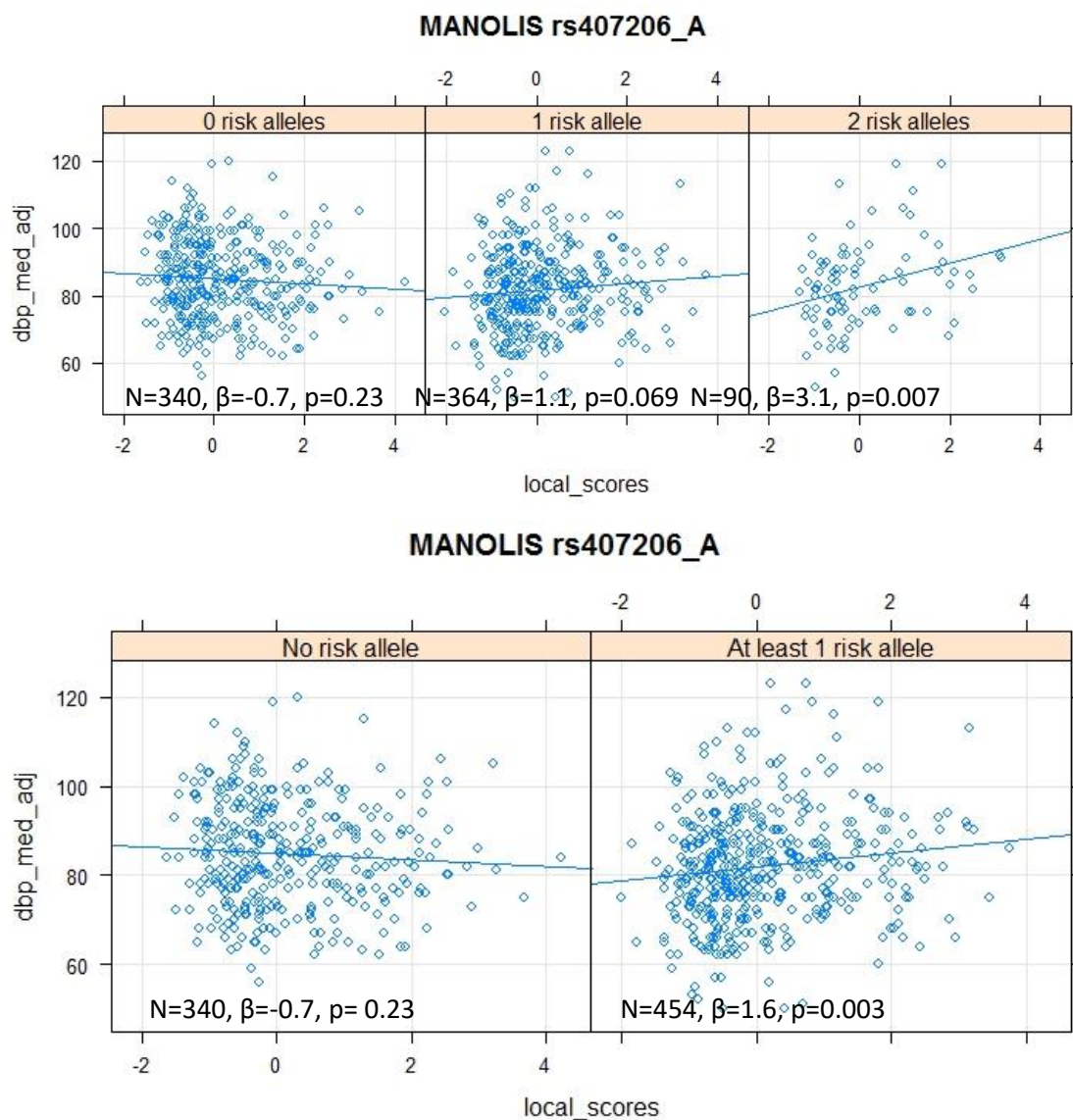
του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το πλούσιο σε απλά σάκχαρα διατροφικό πρότυπο στην HDL στα άτομα του POMAK.

Ο κοινός (συχνότητα αλληλομόρφου κινδύνου 0.30) πολυμορφισμός rs2235584 βρίσκεται στην μη κωδική περιοχή των εξονίων των γονιδίων EPPIN (epididymal peptidase inhibitor) που συνδέεται με την αντρική υπογονιμότητα και WFDC6 (WAP four-disulfide core domain 6).



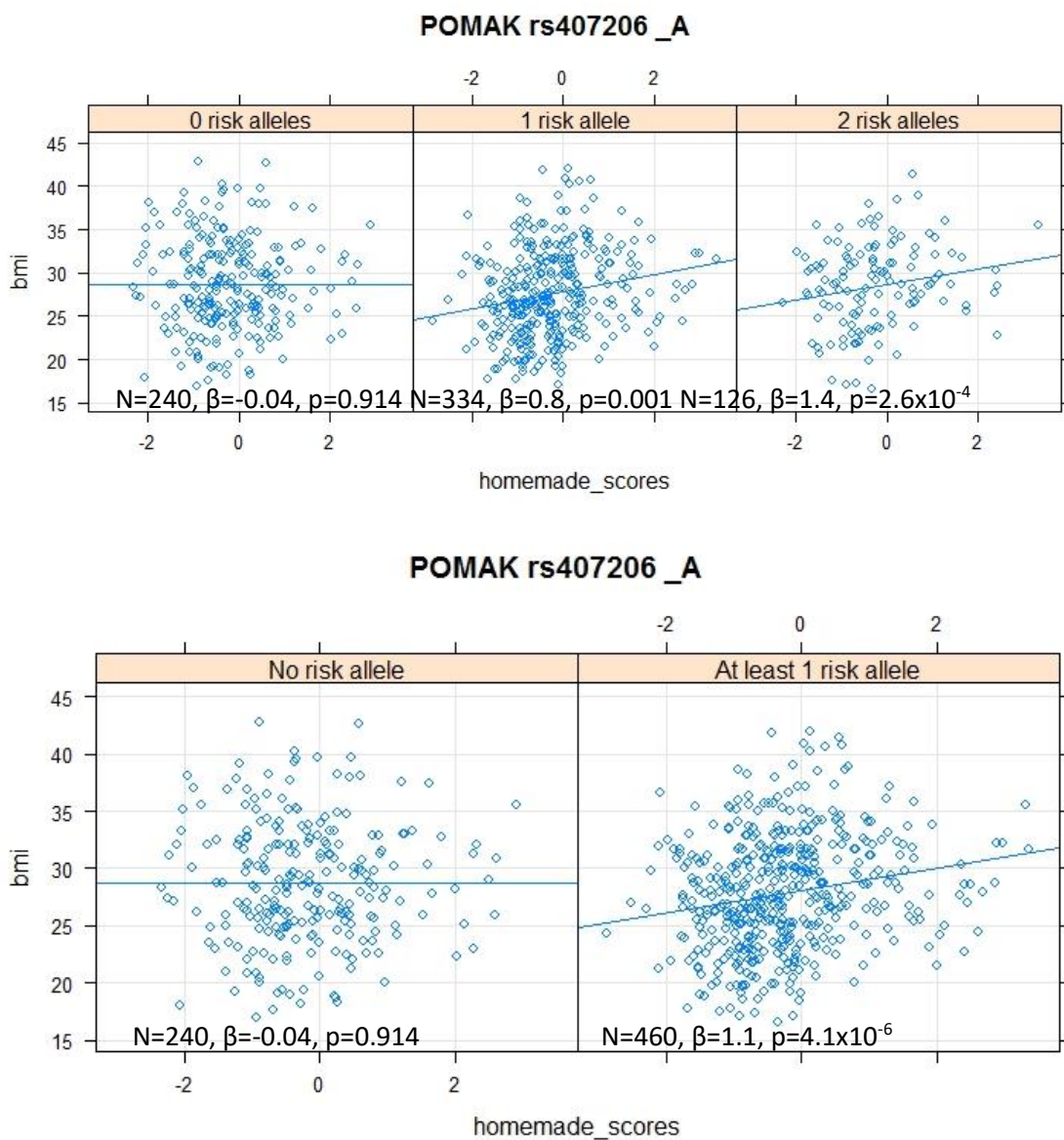
Εικόνα 3.50 Απεικόνιση του γενετικού τύπου των συσχετίσεων του πολυμορφισμού rs2235584 ΕΠΑΝΩ-με το υψηλής περιεκτικότητας σε απλά σάκχαρα και λίπος διατροφικό πρότυπο στην ΔΑΠ στα άτομα του MANOLIS και ΚΑΤΩ-με το γρήγορο διατροφικό πρότυπο στην ΣΑΠ στα άτομα του POMAK.

Στο επόμενο στάδιο διερευνήθηκε η συσχέτιση του διατροφικού προτύπου με τον εκάστοτε καρδιομεταβολικό δείκτη ανά γονότυπο για κάθε πολυμορφισμό μετά από έλεγχο για την ηλικία και το φύλο και παρουσιάζονται οι πολυμορφισμοί εκείνοι των οποίων τα αποτελέσματα ήταν στατιστικά σημαντικά και στους δύο πληθυσμούς (Εικόνες 3.51-3.68)

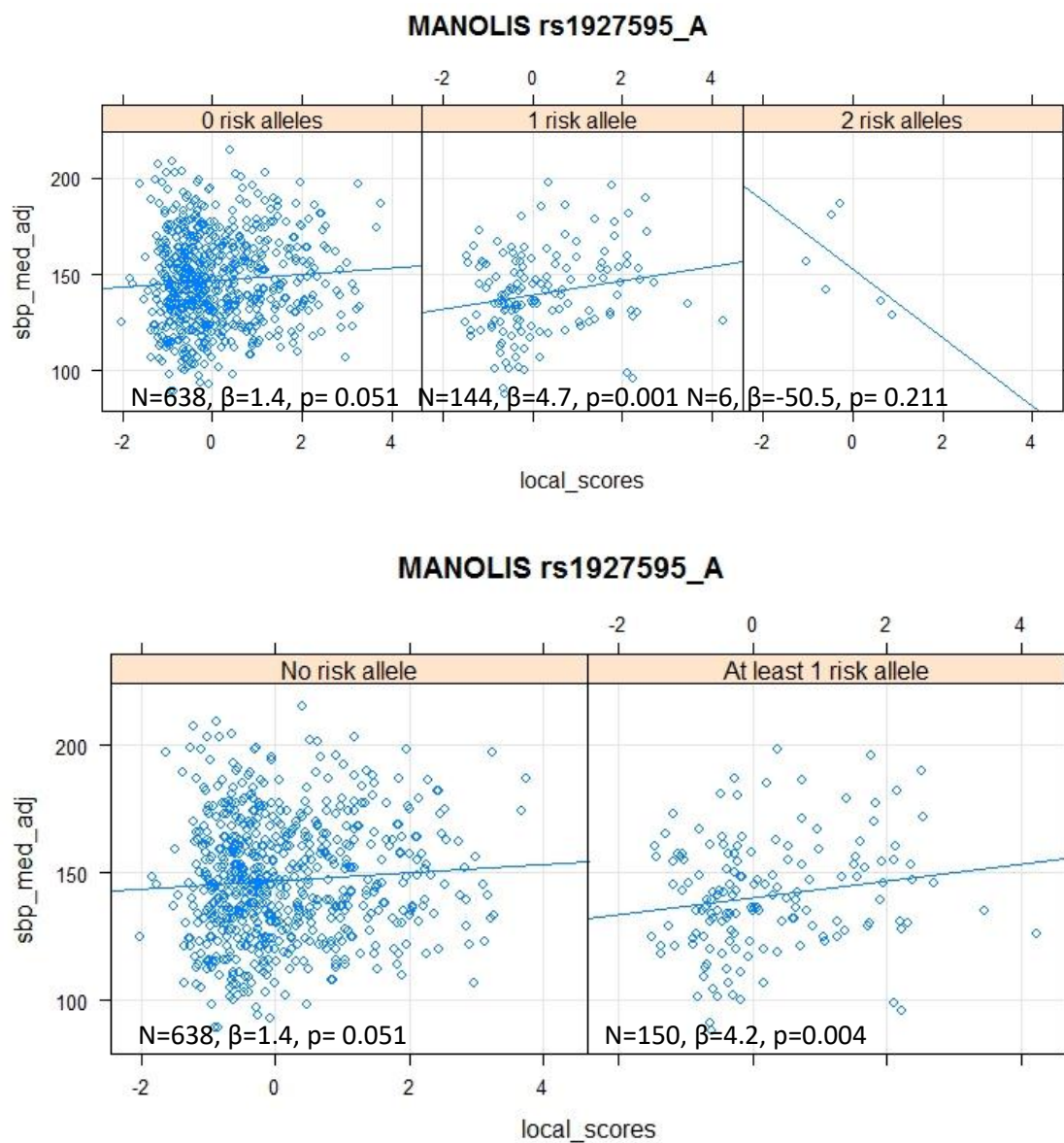


Εικόνα

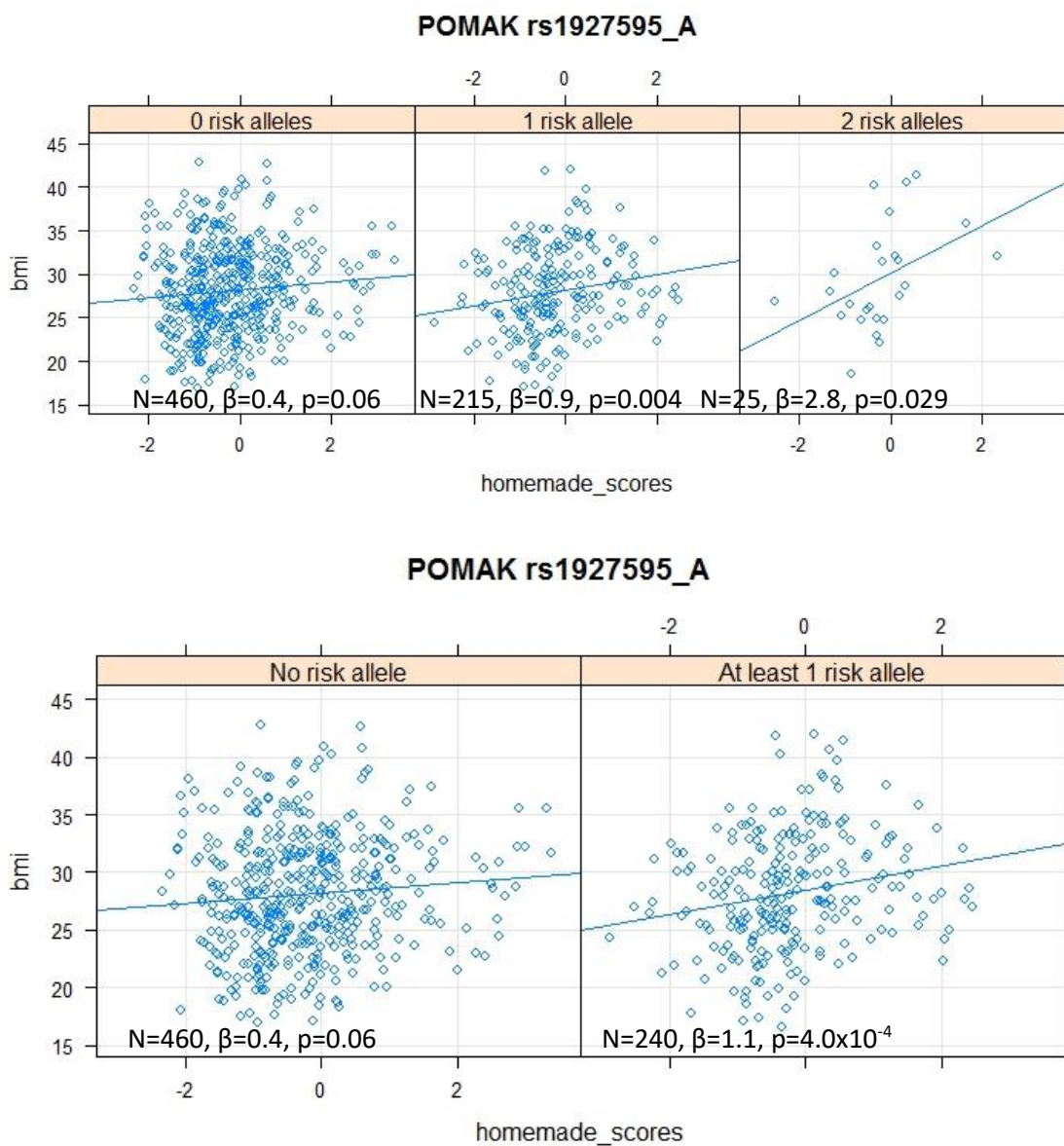
3.51 Συσχέτιση της προσκόλλησης στο τοπικό διατροφικό πρότυπο με την ΣΑΠ ανά τρεις κατηγορίες (πάνω) και δύο κατηγορίες (κάτω) γονοτύπου για τον πολυμορφισμό rs407206 στα άτομα της μελέτης MANOLIS.



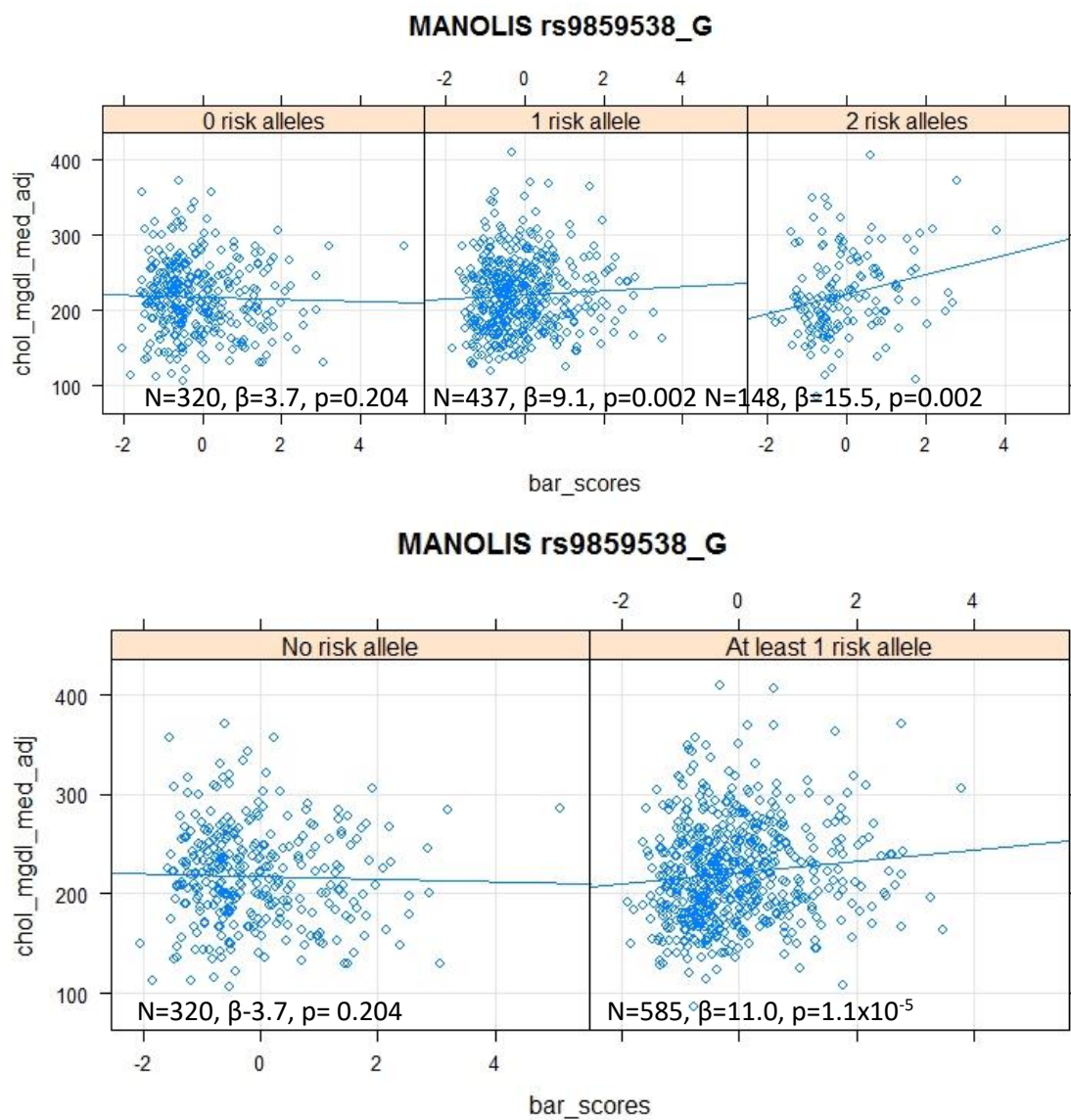
Εικόνα 3.52 Συσχέτιση της προσκόλλησης στο σπιτικό διατροφικό πρότυπο με τον ΔΜΣ ανά τρεις κατηγορίες (πάνω) και δύο κατηγορίες (κάτω)γονοτύπου για τον πολυμορφισμό rs407206 στα άτομα της μελέτης POMAK.



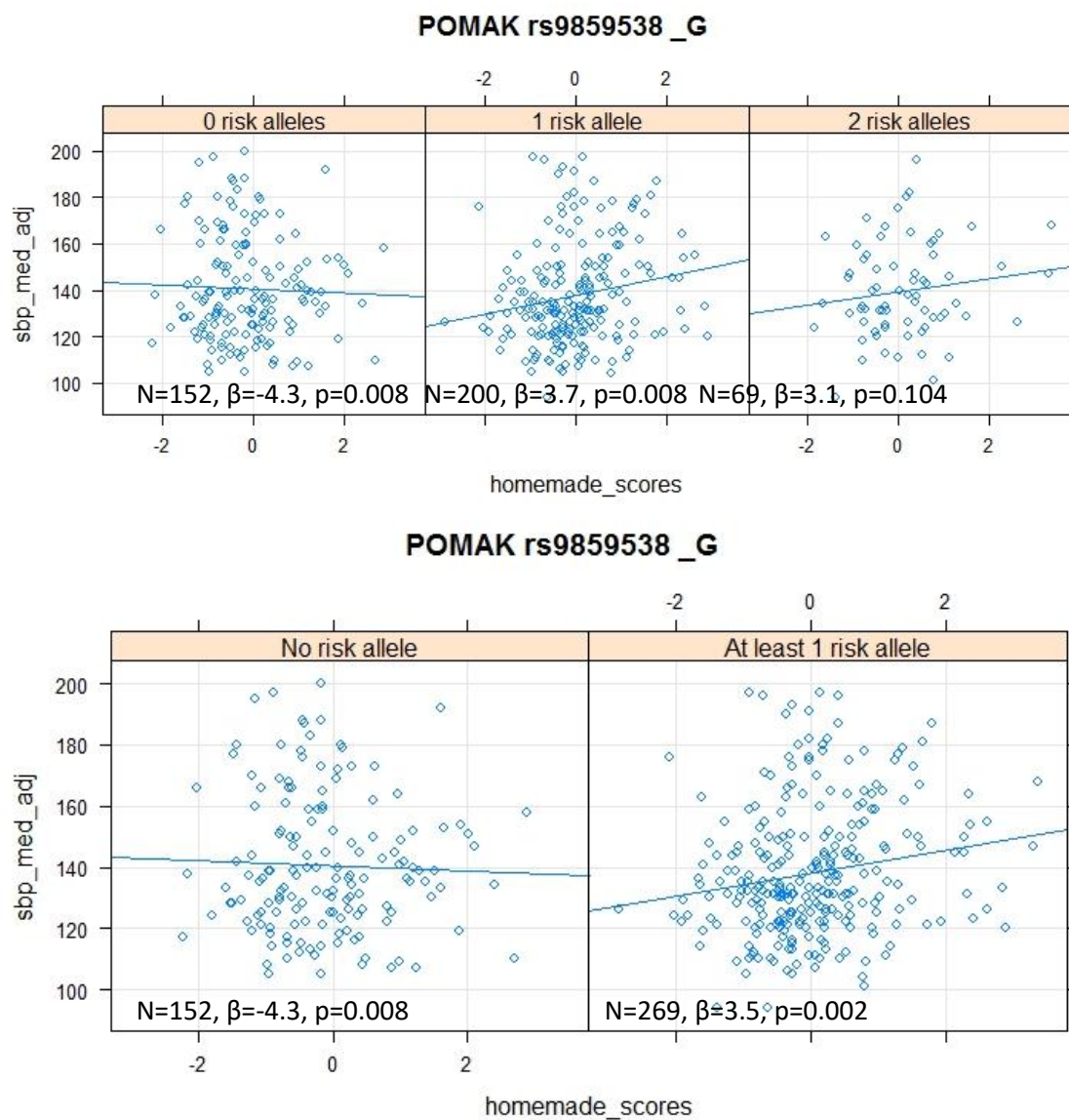
Εικόνα 3.53 Συσχέτιση της προσκόλλησης στο τοπικό διατροφικό πρότυπο με την ΣΑΠ ανά τρεις κατηγορίες (πάνω) και δύο κατηγορίες (κάτω) γονοτύπου για τον πολυμορφισμό rs1927595 στα άτομα της μελέτης MANOLIS.



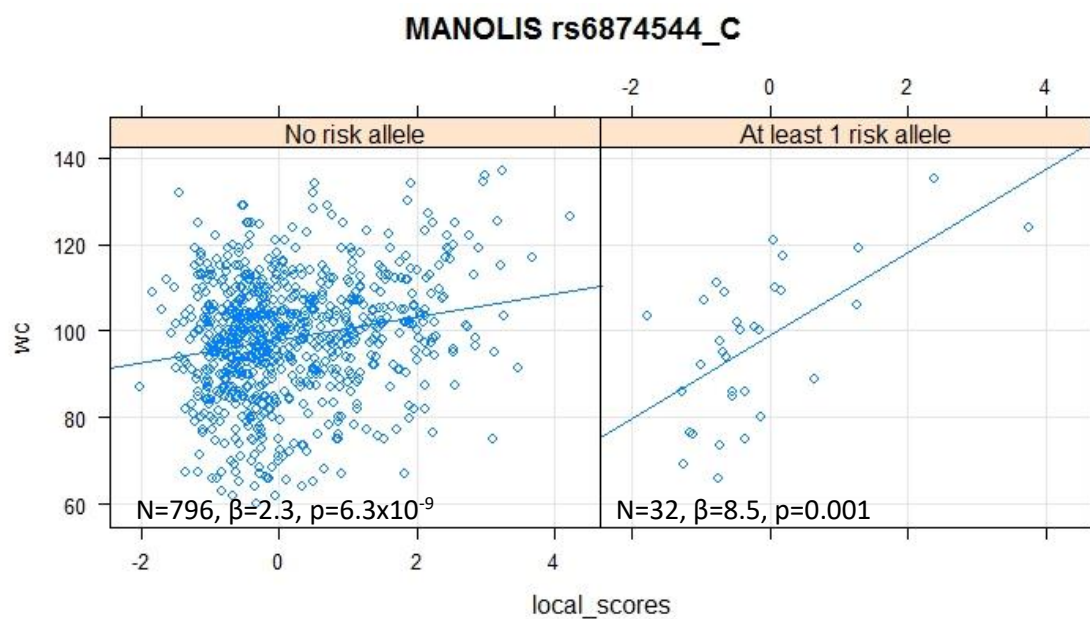
Εικόνα 3.54 Συσχέτιση της προσκόλλησης στο σπιτικό διατροφικό πρότυπο με τον ΔΜΣ ανά τρεις κατηγορίες (πάνω) και δύο κατηγορίες (κάτω) γονοτύπου για τον πολυμορφισμό rs1927595 στα άτομα της μελέτης POMAK.



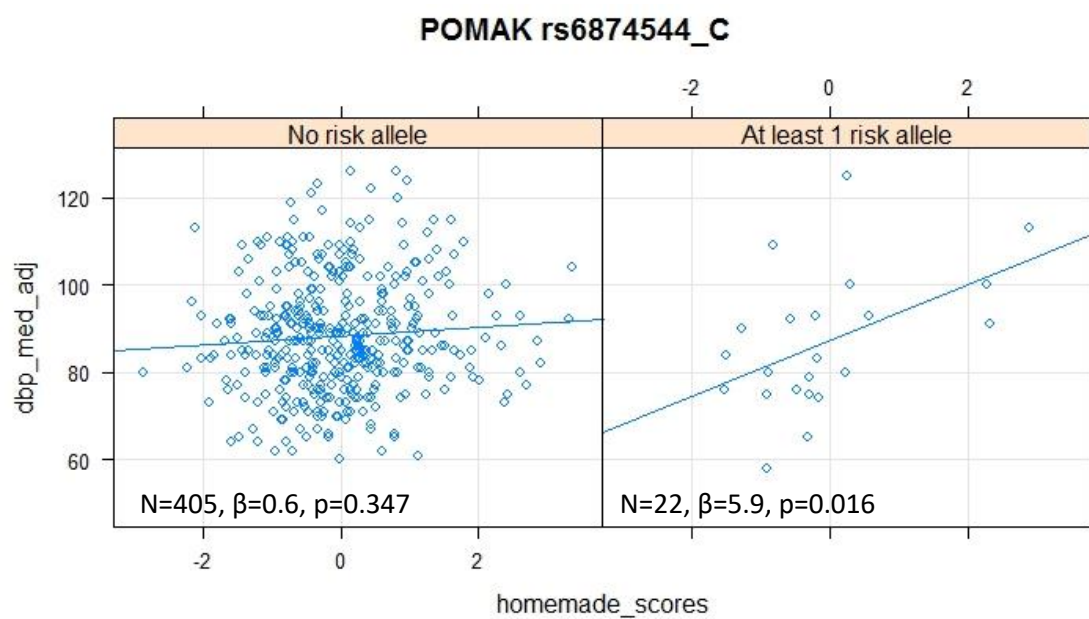
Εικόνα 3.55 Συσχέτιση της προσκόλλησης στο διατροφικό πρότυπο καφενείου με την ολική χοληστερόλη ανά τρεις κατηγορίες (πάνω) και δύο κατηγορίες (κάτω) γονοτύπου για τον πολυμορφισμό rs9859538 στα άτομα της μελέτης MANOLIS.



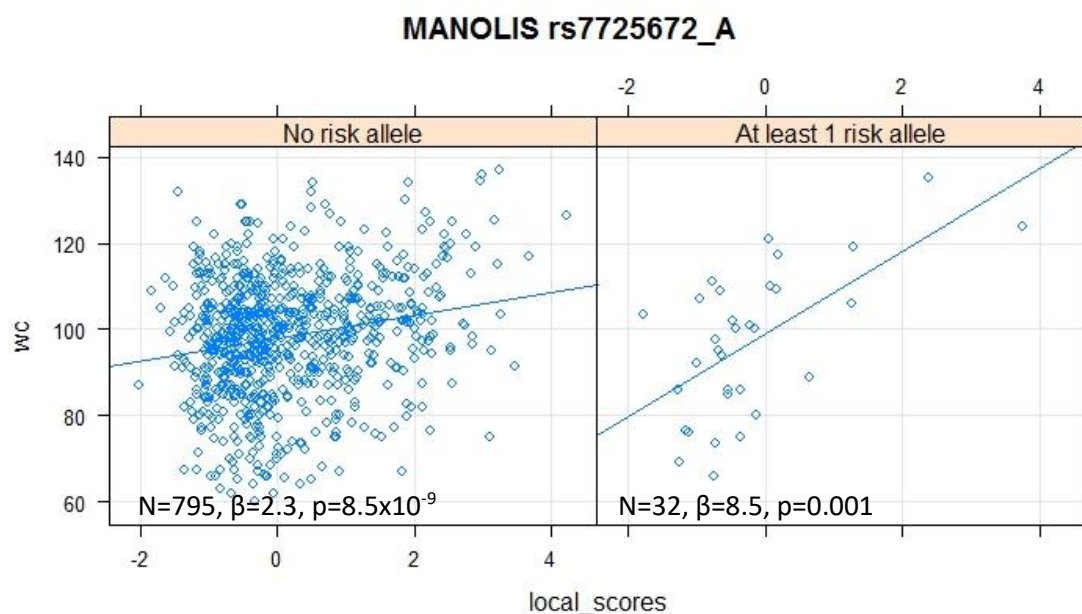
Εικόνα 3.56 Συσχέτιση της προσκόλλησης στο σπιτικό διατροφικό πρότυπο με την ΣΑΠ ανά τρεις κατηγορίες (πάνω) και δύο κατηγορίες (κάτω) γονοτύπου για τον πολυμορφισμό rs9859538 στα άτομα της μελέτης POMAK.



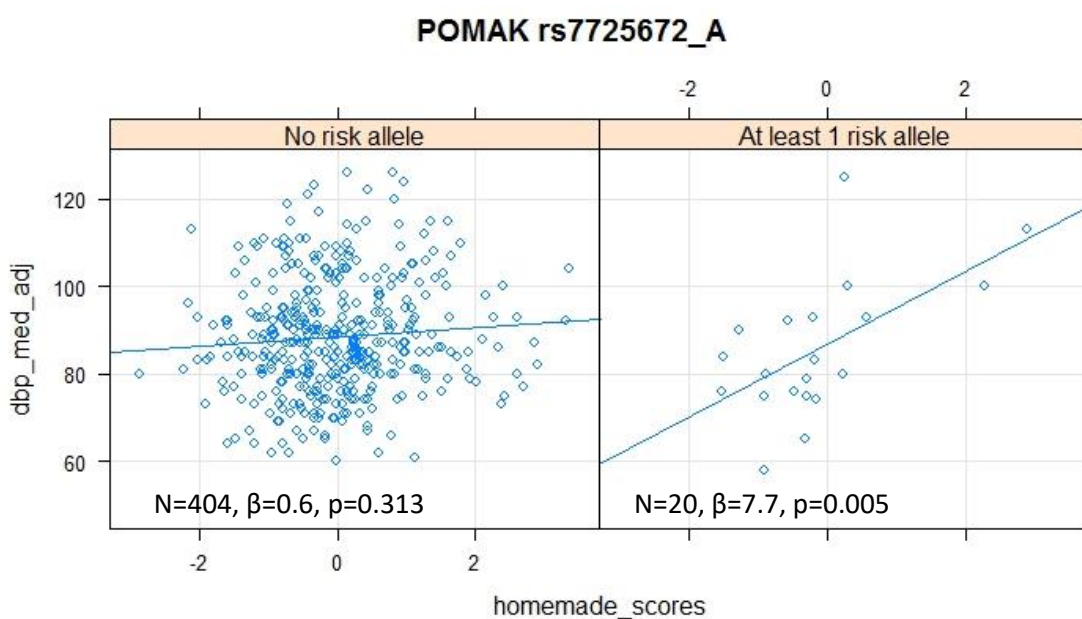
Εικόνα 3.57 Συσχέτιση της προσκόλλησης στο τοπικό διατροφικό πρότυπο με την περιφέρεια μέσης ανά κατηγορία γονοτύπου για τον πολυμορφισμό rs6874544 στα άτομα της μελέτης MANOLIS.



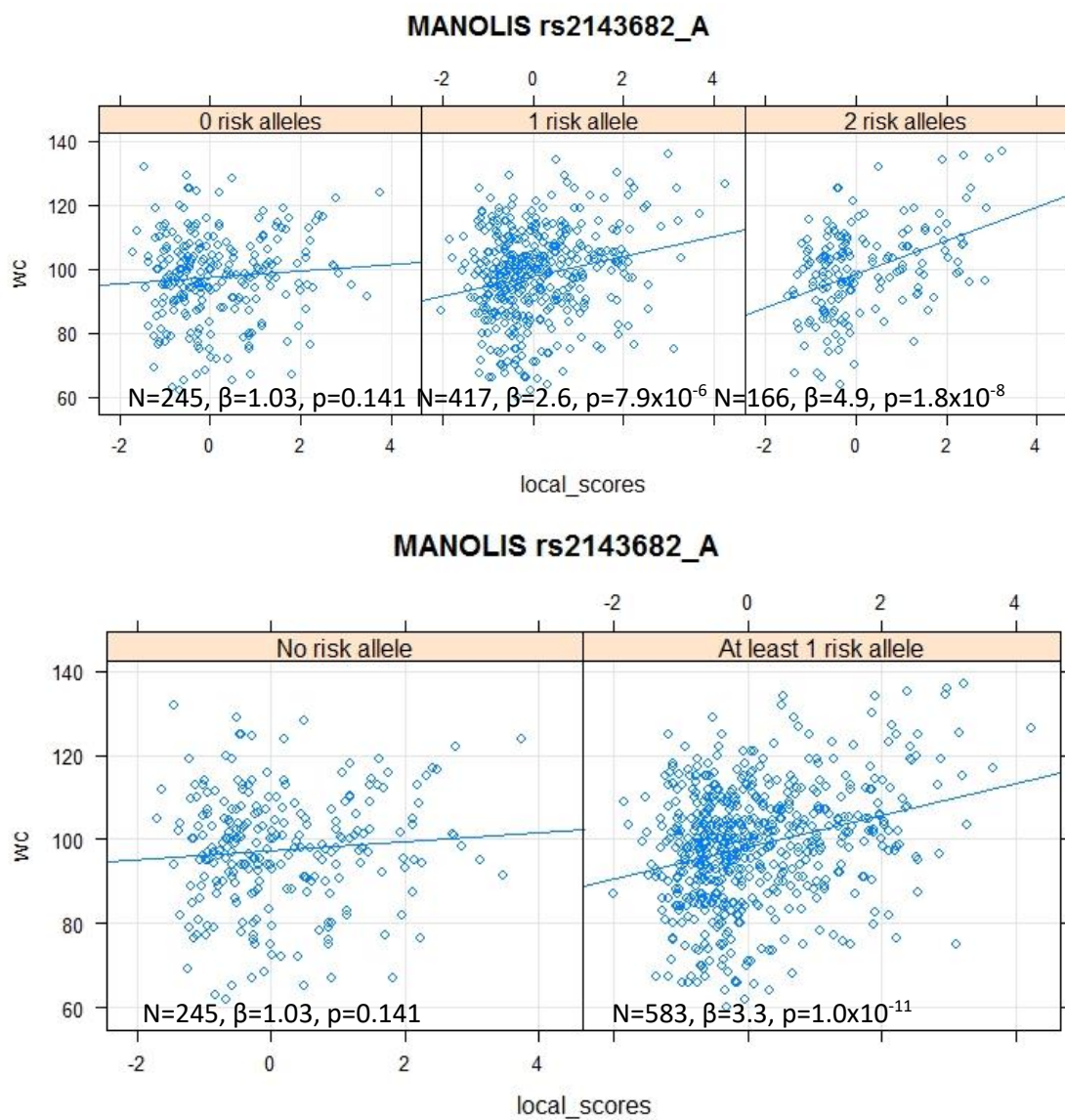
Εικόνα 3.58 Συσχέτιση της προσκόλλησης στο σπιτικό διατροφικό πρότυπο με την ΔΑΠ ανά κατηγορία γονοτύπου για τον πολυμορφισμό rs6874544 στα άτομα της μελέτης POMAK.



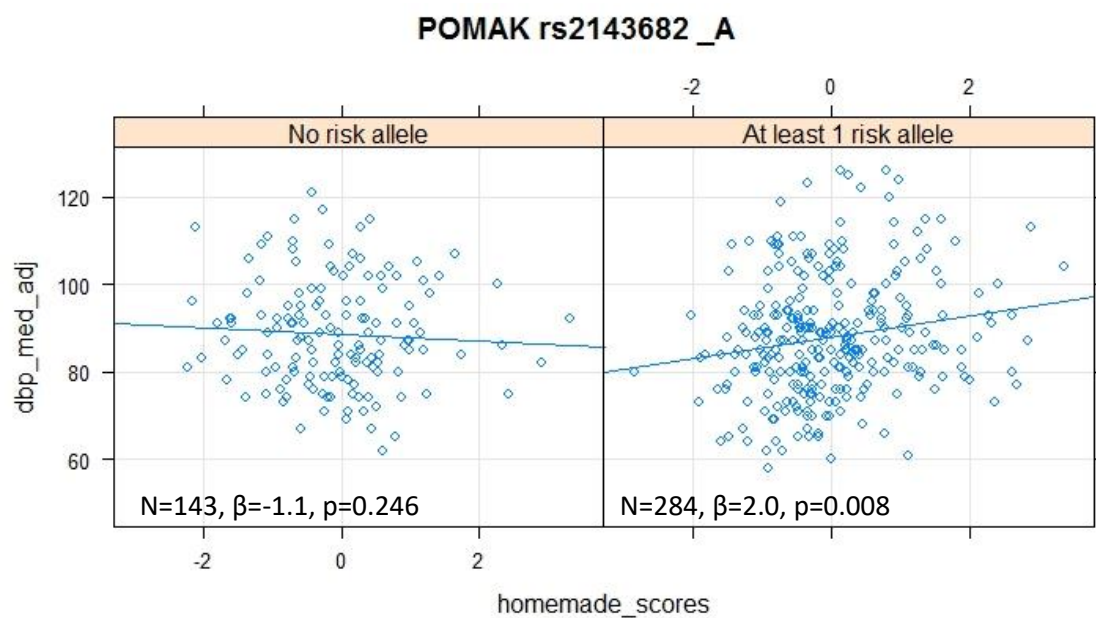
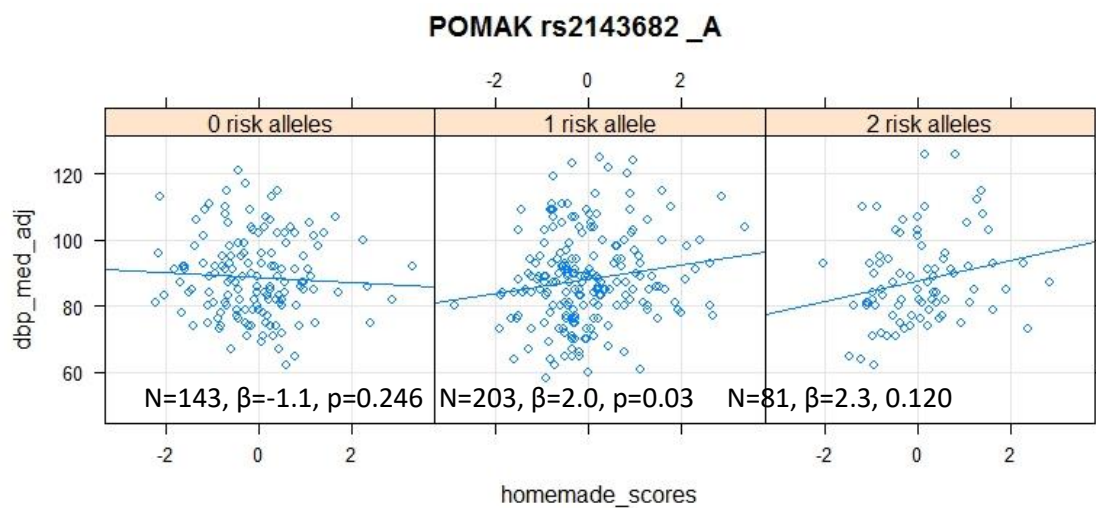
Εικόνα 3.59 Συσχέτιση της προσκόλλησης στο τοπικό διατροφικό πρότυπο με την περιφέρεια μέσης ανά κατηγορία γονοτύπου για τον πολυμορφισμό rs7725672 στα άτομα της μελέτης MANOLIS.



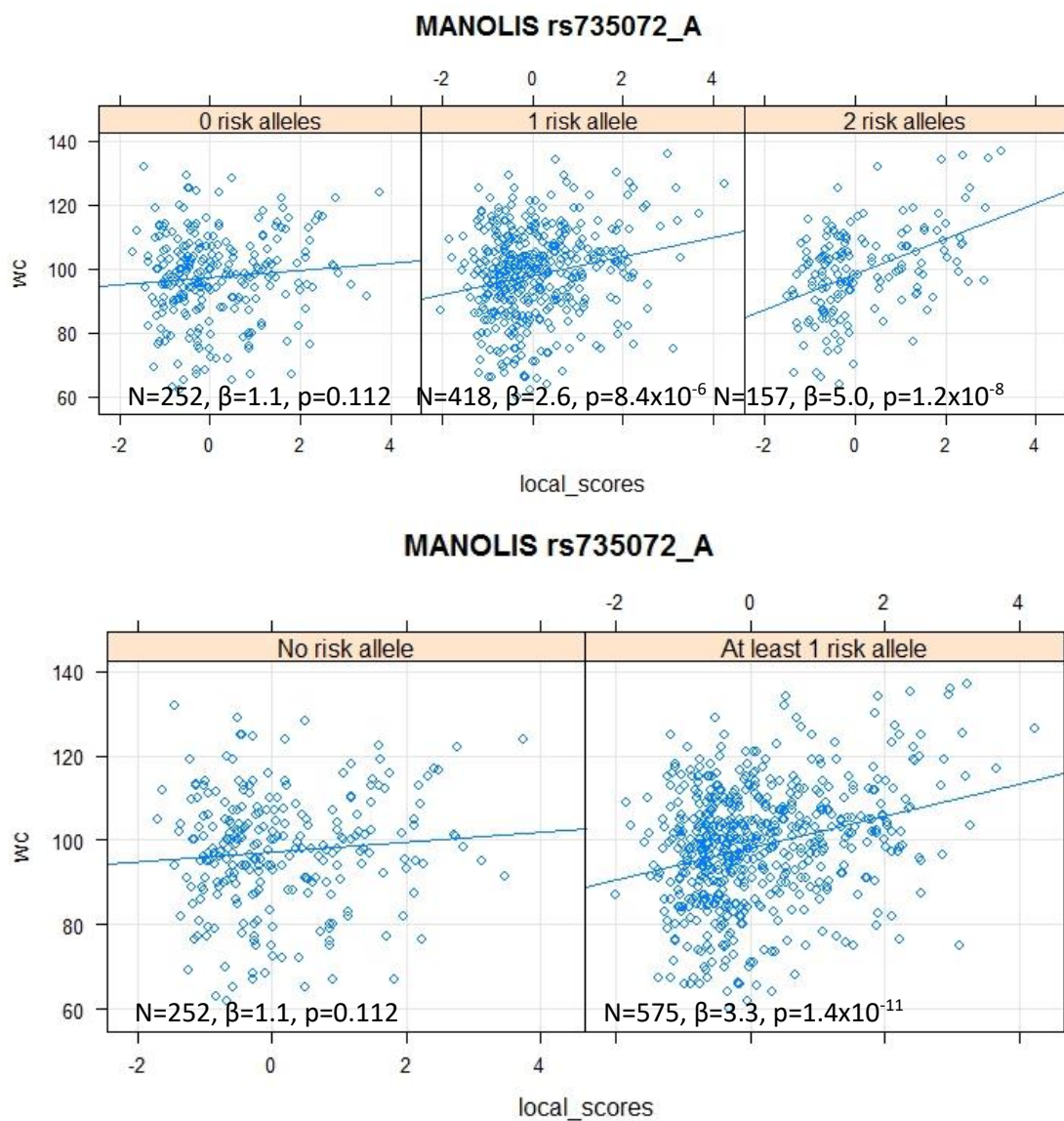
Εικόνα 3.60 Συσχέτιση της προσκόλλησης στο σπιτικό διατροφικό πρότυπο με την ΣΑΠ ανά κατηγορία γονοτύπου για τον πολυμορφισμό rs7725672 στα άτομα της μελέτης POMAK.



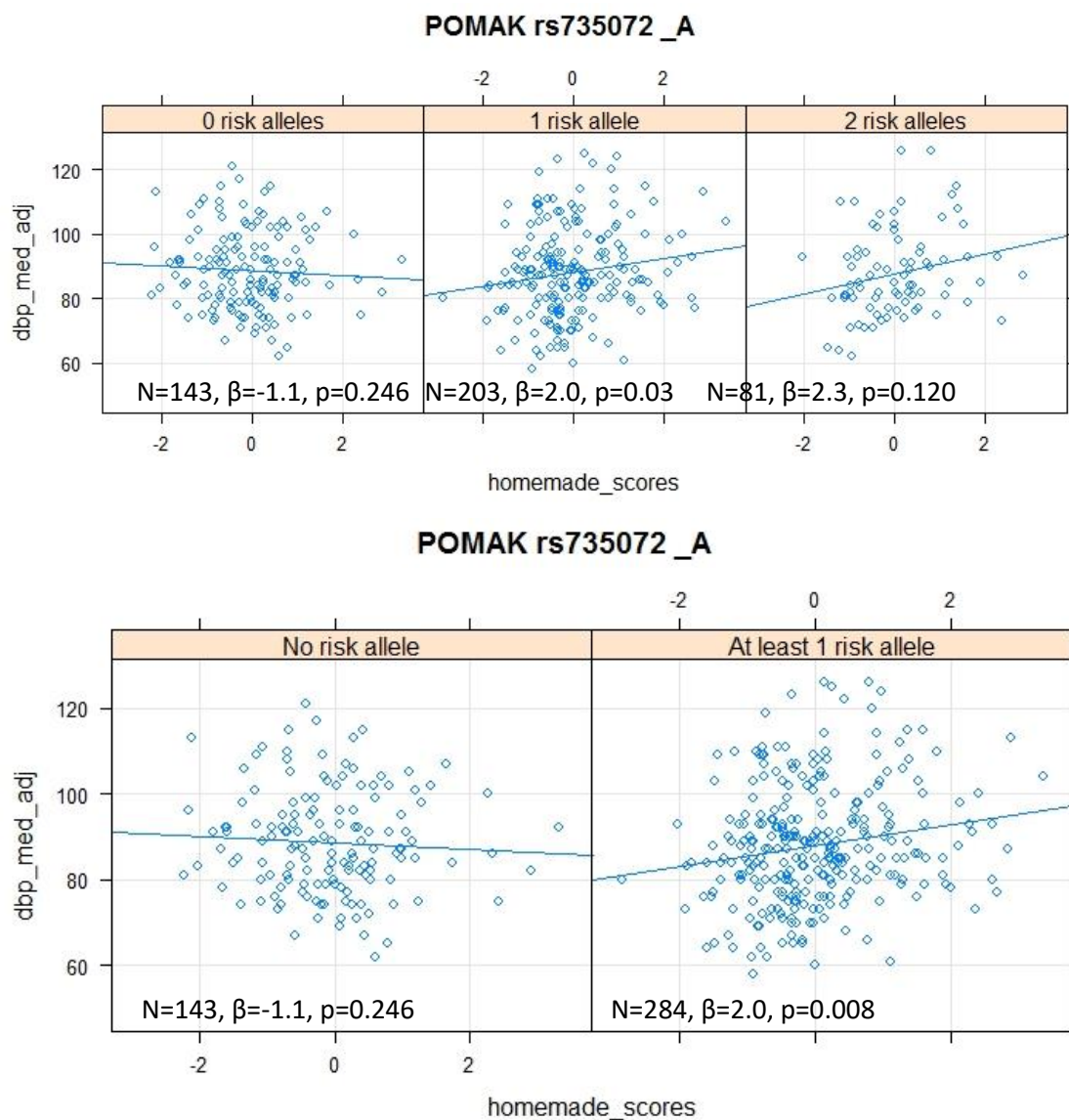
Εικόνα 3.61 Συσχέτιση της προσκόλλησης στο τοπικό διατροφικό πρότυπο με την περιφέρεια μέσης ανά τρεις κατηγορίες (πάνω) και δύο κατηγορίες (κάτω) γονοτύπου για τον πολυμορφισμό rs2143682 στα άτομα της μελέτης MANOLIS.



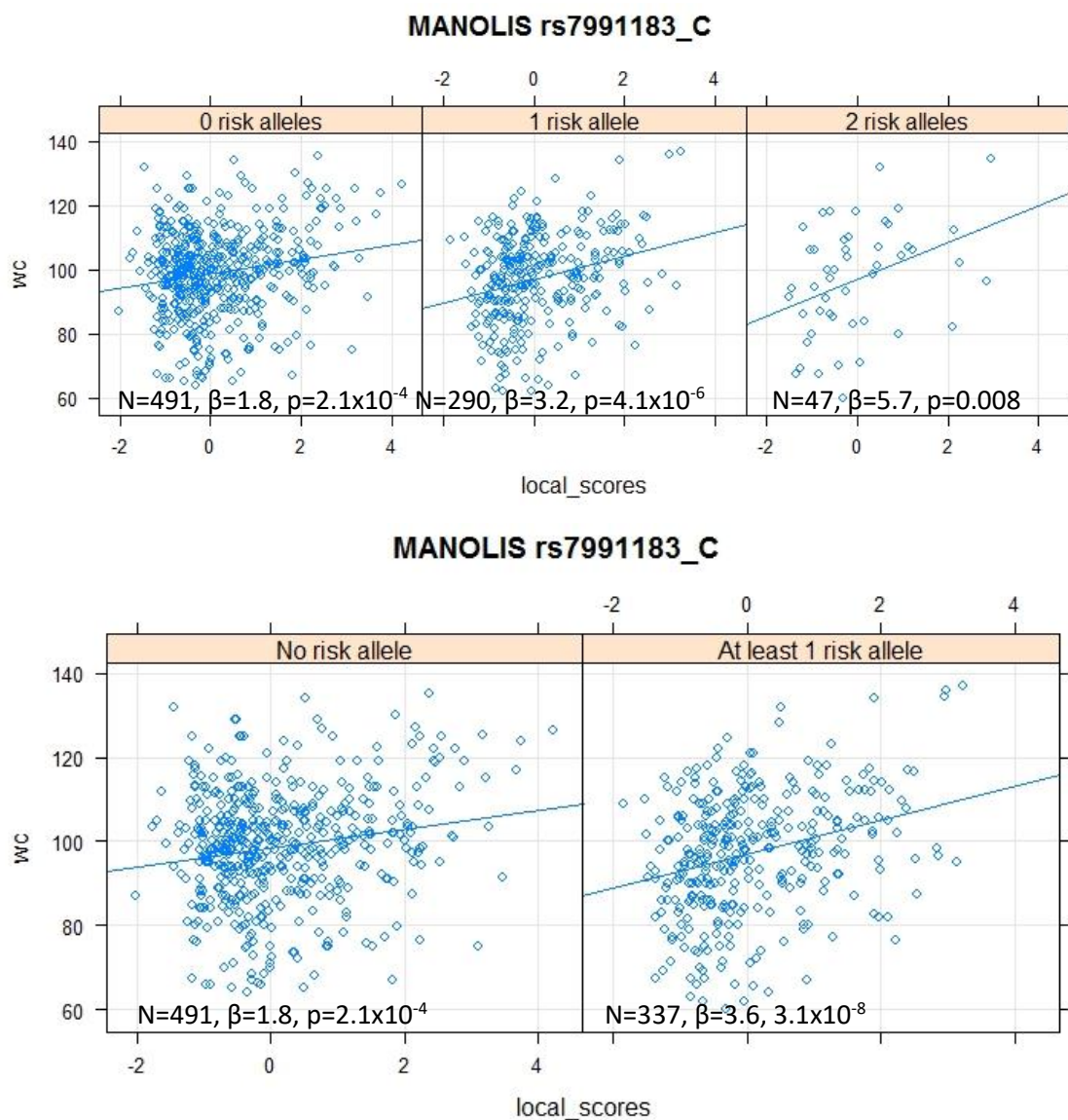
Εικόνα 3.62 Συσχέτιση της προσκόλλησης στο σπιτικό διατροφικό πρότυπο με την ΔΑΠ ανά τρεις κατηγορίες (πάνω) και δύο κατηγορίες (κάτω) γονοτύπου για τον πολυμορφισμό rs2143682 στα άτομα της μελέτης POMAK.



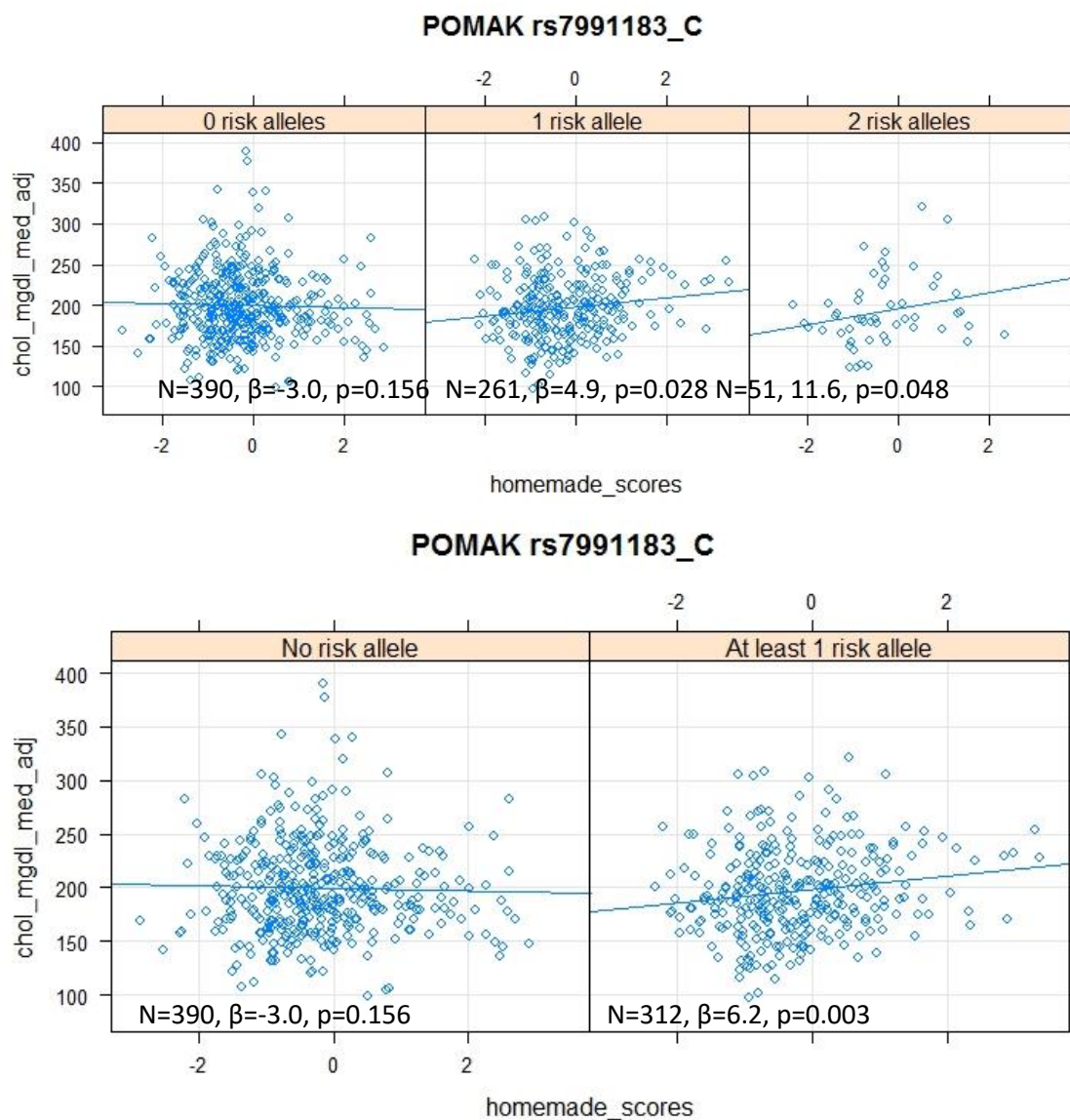
Εικόνα 3.63 Συσχέτιση της προσκόλλησης στο τοπικό διατροφικό πρότυπο με την περιφέρεια μέσης ανά τρεις κατηγορίες (πάνω) και δύο κατηγορίες (κάτω) γονοτύπου για τον πολυμορφισμό rs735072 στα άτομα της μελέτης MANOLIS.



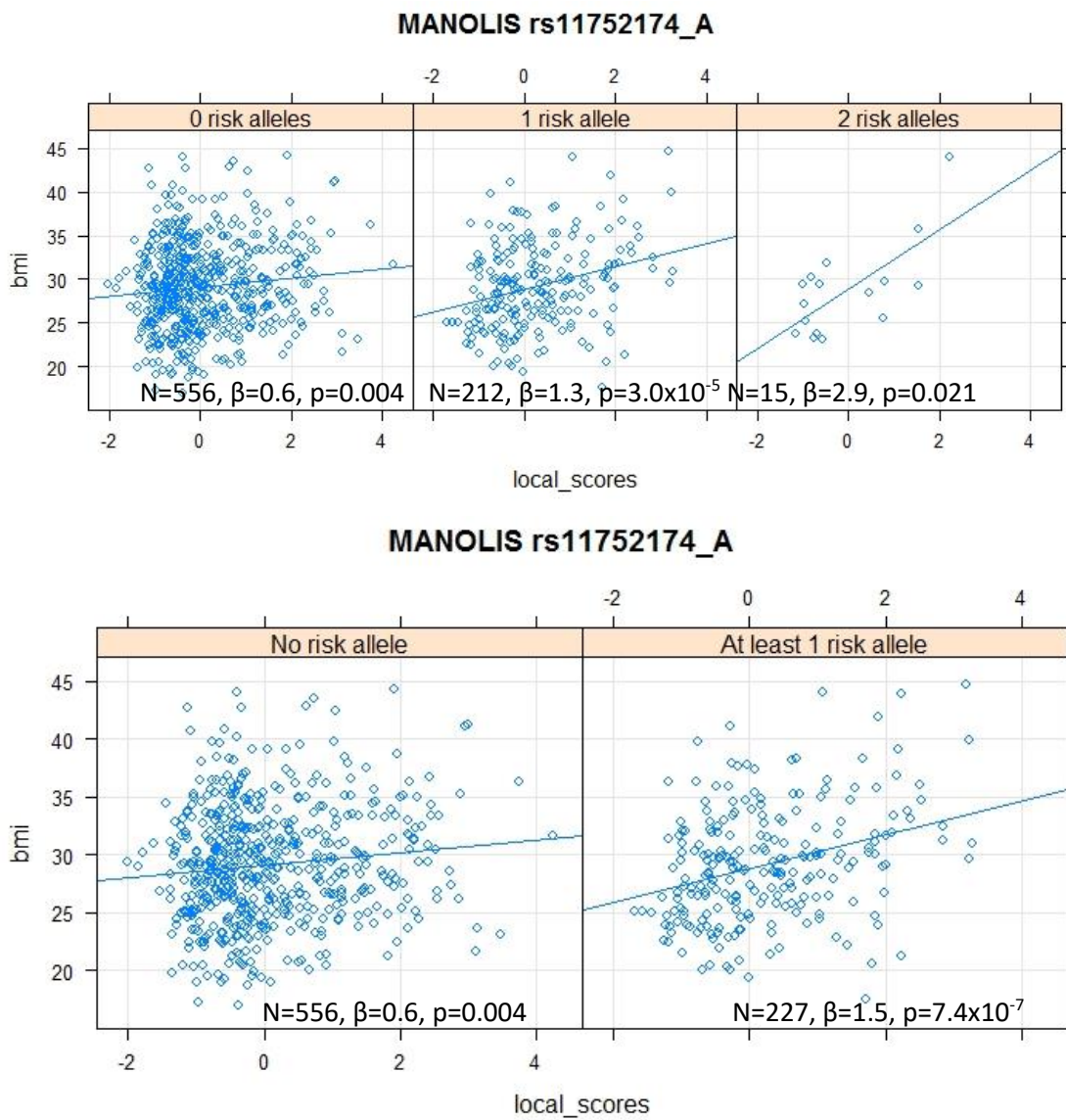
Εικόνα 3.64 Συσχέτιση της προσκόλλησης στο σπιτικό διατροφικό πρότυπο με την ΔΑΠ ανά τρεις κατηγορίες (πάνω) και δύο κατηγορίες (κάτω) γονοτύπου για τον πολυμορφισμό rs735072 στα άτομα της μελέτης POMAK



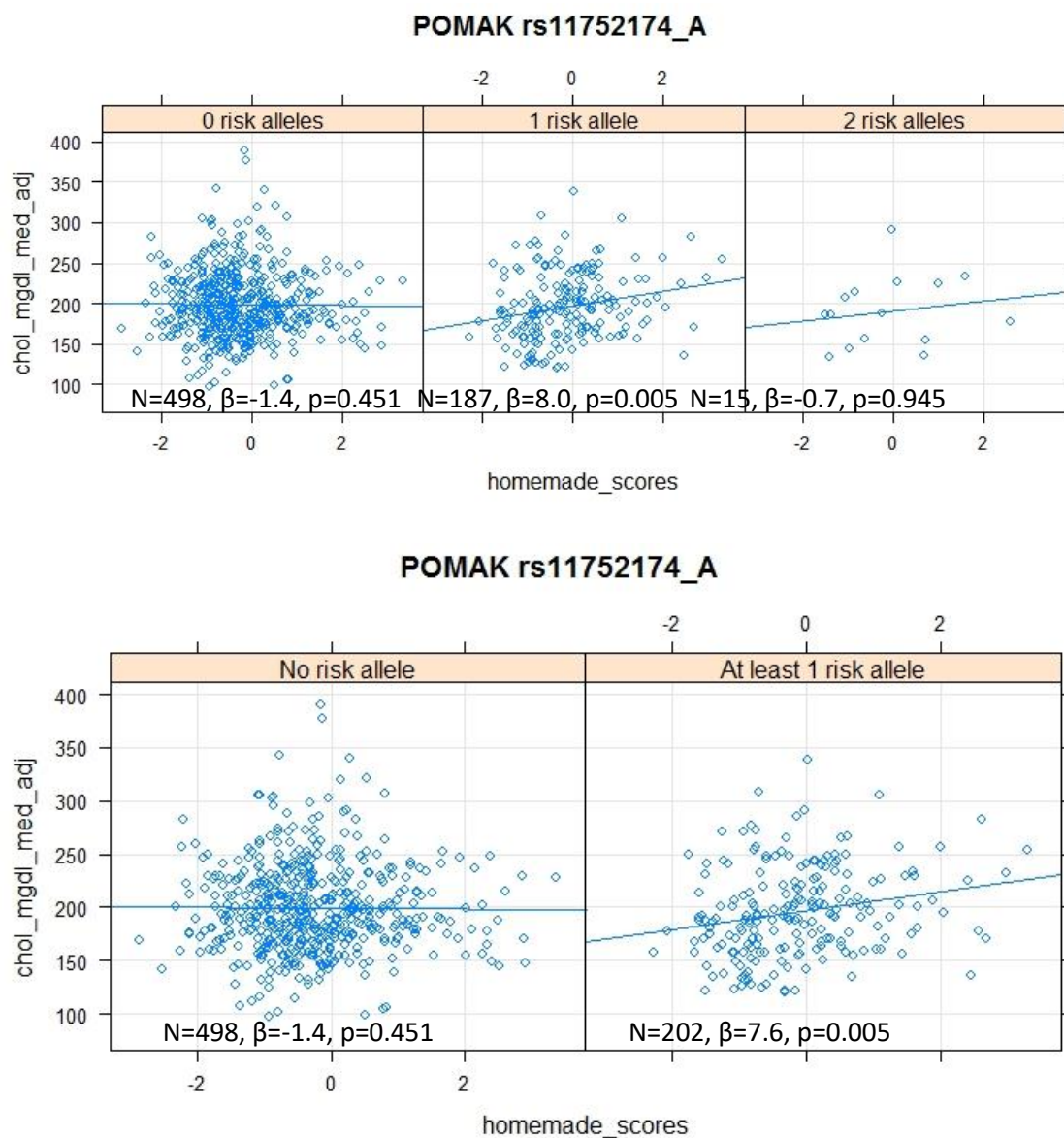
Εικόνα 3.65 Συσχέτιση της προσκόλλησης στο τοπικό διατροφικό πρότυπο με την περιφέρεια μέσης ανά τρεις κατηγορίες (πάνω) και δύο κατηγορίες (κάτω) γονοτύπου για τον πολυμορφισμό rs7991183 στα άτομα της μελέτης MANOLIS



Εικόνα 3.66 Συσχέτιση της προσκόλλησης στο σπιτικό διατροφικό πρότυπο με την ολική χοληστερόλη ανά τρεις κατηγορίες (πάνω) και δύο κατηγορίες (κάτω) γονοτύπου για τον πολυμορφισμό rs7991183 στα άτομα της μελέτης POMAK.



Εικόνα 3.67 Συσχέτιση της προσκόλλησης στο τοπικό διατροφικό πρότυπο με τον ΔΜΣ ανά τρεις κατηγορίες (πάνω) και δύο κατηγορίες (κάτω) γονοτύπου για τον πολυμορφισμό rs11752174 στα άτομα της μελέτης MANOLIS.



Εικόνα 3.68 Συσχέτιση της προσκόλλησης στο σπιτικό διατροφικό πρότυπο με την ολική χοληστερόλη ανά τρεις κατηγορίες (πάνω) και δύο κατηγορίες (κάτω) γονοτύπου για τον πολυμορφισμό rs11752174 στα άτομα της μελέτης POMAK.

Τέλος, διερευνήθηκε η συσχέτιση κάθε πολυμορφισμού με τον εκάστοτε καρδιομεταβολικό δείκτη ανά ομάδα προσκόλλησης στο αντίστοιχο διατροφικό πρότυπο όπως ορίζεται από την διάμεσο των σκορ του προτύπου, μετά από έλεγχο για την ηλικία και το φύλο και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.18.

Πίνακας 3.18. Συσχέτιση των πολυμορφισμών με τους αντίστοιχους καρδιομεταβολικούς δείκτες ανά κατηγορία προσκόλλησης στο εκάστοτε διατροφικό πρότυπο για τους δύο πληθυσμούς της μελέτης.

|                                                                            | MANOLIS    |                               |              |                                |                            |                               |                            | POMAK      |                              |       |                                |                            |                               |              |
|----------------------------------------------------------------------------|------------|-------------------------------|--------------|--------------------------------|----------------------------|-------------------------------|----------------------------|------------|------------------------------|-------|--------------------------------|----------------------------|-------------------------------|--------------|
| Πολυμορφισμός                                                              | Φαινότυπος | Σύνολο<br>δειγματος<br>N=1055 |              | Διατροφικό πρότυπο             |                            |                               |                            | Φαινότυπος | Σύνολο<br>δειγματος<br>N=905 |       | Διατροφικό πρότυπο             |                            |                               |              |
|                                                                            |            |                               |              | Τοπικό                         |                            |                               |                            |            |                              |       | Σπιτικό                        |                            |                               |              |
|                                                                            |            |                               |              | Χαμηλή<br>προσκόλληση<br>n=360 |                            | Υψηλή<br>προσκόλληση<br>n=460 |                            |            |                              |       | Χαμηλή<br>προσκόλληση<br>n=420 |                            | Υψηλή<br>προσκόλληση<br>n=260 |              |
|                                                                            |            | β                             | ρ            | β                              | ρ                          | β                             | ρ                          |            | β                            | ρ     | β                              | ρ                          | β                             | ρ            |
| rs6874544                                                                  | Περ.Μέσης  | 0.25                          | 0.899        | -4.08                          | 0.137                      | 11.19                         | <b>0.001</b>               | ΔΑΠ        | -1.13                        | 0.628 | -8.05                          | <b>0.013</b>               | 12.23                         | <b>0.009</b> |
| rs7725672                                                                  | Περ.Μέσης  | 0.73                          | 0.713        | -4.08                          | 0.137                      | 11.22                         | <b>0.001</b>               | ΔΑΠ        | -1.75                        | 0.465 | -9.39                          | <b>0.005</b>               | 13.83                         | <b>0.006</b> |
| rs2143682                                                                  | Περ.Μέσης  | 1.11                          | <b>0.033</b> | -1.20                          | 0.177                      | 2.87                          | <b>3.1x10<sup>-4</sup></b> | ΔΑΠ        | 0.22                         | 0.766 | -2.96                          | <b>0.013</b>               | 2.60                          | <b>0.026</b> |
| rs735072                                                                   | Περ.Μέσης  | 1.22                          | <b>0.020</b> | -1.21                          | 0.173                      | 2.99                          | <b>2.0x10<sup>-4</sup></b> | ΔΑΠ        | 0.22                         | 0.766 | -2.96                          | <b>0.013</b>               | 2.60                          | <b>0.026</b> |
| rs7991183                                                                  | Περ.Μέσης  | -1.02                         | 0.095        | -4.66                          | <b>4.2x10<sup>-6</sup></b> | 1.31                          | 0.16                       | Ολ.Χοληστ. | -3.25                        | 0.120 | -11.76                         | <b>1.1x10<sup>-4</sup></b> | 5.84                          | 0.12         |
| rs407206                                                                   | ΔΑΠ        | -1.06                         | 0.062        | -3.57                          | <b>1.1x10<sup>-4</sup></b> | 0.70                          | 0.416                      | ΔΜΣ        | -0.15                        | 0.527 | -0.70                          | <b>0.03</b>                | 0.85                          | <b>0.025</b> |
| rs1927595                                                                  | ΣΑΠ        | -2.93                         | <b>0.041</b> | -10.10                         | <b>1.2x10<sup>-4</sup></b> | 1.10                          | 0.598                      | ΔΜΣ        | 0.23                         | 0.437 | -0.69                          | 0.094                      | 1.56                          | <b>0.001</b> |
| rs11752174                                                                 | ΔΜΣ        | 0.03                          | 0.923        | -1.30                          | <b>0.013</b>               | 0.71                          | 0.12                       | Ολ.Χοληστ. | -2.83                        | 0.279 | -11.81                         | <b>0.003</b>               | 6.63                          | 0.13         |
|                                                                            |            |                               |              | Καφενείου                      |                            |                               |                            |            |                              |       | Σπιτικό                        |                            |                               |              |
|                                                                            |            |                               |              | Χαμηλή<br>προσκόλληση<br>n=395 |                            | Υψηλή<br>προσκόλληση<br>n=510 |                            |            |                              |       | Χαμηλή<br>προσκόλληση          |                            | Υψηλή<br>προσκόλληση          |              |
|                                                                            |            | β                             | ρ            | β                              | ρ                          | β                             | ρ                          |            | β                            | ρ     | β                              | ρ                          | β                             | ρ            |
| rs9859538                                                                  | Ολ.Χοληστ. | 3.1                           | 0.124        | -4.6                           | 0.131                      | 11.02                         | <b>0.002</b>               | ΣΑΠ        | -0.89                        | 0.442 | -5.47                          | <b>0.004</b>               | 3.53                          | 0.054        |
| Με έντονο χρώμα σημαίνονται οι στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις με p<0.05 |            |                               |              |                                |                            |                               |                            |            |                              |       |                                |                            |                               |              |

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 4.1 Γενετική απομόνωση

Στα πλαίσια της μελέτης HELIC μελετήθηκαν δύο απομονωμένοι πληθυσμοί MANOLIS και POMAK. Η ιστορική προέλευση αυτών των Ελληνικών απομονωμένων πληθυσμών είναι άγνωστη και οι πρόσφατες γενετικές αναλύσεις είχαν δώσει αντικρουόμενα αποτελέσματα.

Οι Κρήτες θεωρούνται απόγονοι των Μινωιτών που ίδρυσαν τον πρώτο Ευρωπαϊκό πολιτισμό της Εποχής του Χαλκού πριν 5,000 χρόνια. Αρχαιολογικές έρευνες έχουν προτείνει ότι οι Κρήτες κατάγονται από την Βόρεια Αφρική, τις Κυκλάδες και τη Μέση Ανατολή. Γενετικές έρευνες σε σύγχρονους κρητικούς πληθυσμούς προσδίδουν καταγωγή από την Μέση Ανατολή (KING *et al.* 2008) και τα Βαλκάνια (MARTINEZ *et al.* 2007; MARTINEZ *et al.* 2008). Πρόσφατη μελέτη του μιτοχονδριακού DNA διέψευσε την υπόθεση της Βορειοαφρικανικής καταγωγής και οι Μινωίτες βρέθηκε να έχουν ισχυρότερη σχέση με τους Ιταλούς και τους Ισπανούς της Νεολιθικής Εποχής, τους σύγχρονους Ευρωπαϊκούς πληθυσμούς και τους κατοίκους του οροπεδίου του Λασιθίου (HUGHEY *et al.* 2013).

Η ιστορική προέλευση του ελληνικού πληθυσμού των Πομάκων είναι ακόμα πιο διφορούμενη επειδή οι Πομάκοι είναι διεσπαρμένοι μεταξύ Βουλγαρίας, Τουρκίας και Ελλάδας.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης πολυδιάστατης κλίμακας της παρούσας μελέτης επιβεβαιώνουν την γενετική εγγύτητα και των δύο πληθυσμών με αυτούς της Ευρώπης. Επιπλέον, μετά τον έλεγχο διαφόρων κριτηρίων και οι δύο πληθυσμοί του HELIC ταυτοποιήθηκαν ως απομονωμένοι. Αξίζει να σημειωθεί ότι για μία περιοχή στο 15q25 παρατηρήσαμε ότι με μόλις 300 άτομα ανά πληθυσμό, 79% από τα δείγματα MANOLIS και 88% από τα POMAK είχαν τουλάχιστον έναν κοινό πρόγονο, συγκριτικά με 6% του γενικού πληθυσμού, ενώ στον πληθυσμό της Ισλανδίας, το μέγεθος δείγματος που απαιτείται προκειμένου να επιτευχθεί τόσο μεγάλο ποσοστό ατόμων με τουλάχιστον έναν κοινό πρόγονο είναι ~6,300 δείγματα (KONG *et al.* 2008).

Στον απομονωμένο πληθυσμό MANOLIS βρέθηκε μία σπάνια γενετική παραλλαγή, μία ανερμηνεύσιμη μετάλλαξη (R19X) στο γονίδιο APOC3 να σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα HDL

χοληστερόλης και μειωμένα επίπεδα τριγλυκεριδίων. Στο ίδιο γονίδιο έχουν επίσης κοινοί πολυμορφισμοί να σχετίζονται με λιπίδια σε μελέτες σάρωσης του γονιδιώματος (TESLOVICH *et al.* 2010). Το εύρημα αυτό υπογραμμίζει την μεγάλη αύξηση της ισχύος που μπορεί να εξασφαλιστεί με την μελέτη των απομονωμένων πληθυσμών. Η γενετική παραλλαγή R19X έχει αυξημένη συχνότητα ~2% στον πληθυσμό MANOLIS επιτρέποντας τον εντοπισμό σήματος συσχέτισης με λιπιδαιμικούς δείκτες σε επίπεδο σάρωσης του γονιδιώματος σε μικρό μέγεθος δείγματος (n=1,267). Το ισοδύναμο μέγεθος δείγματος που απαιτείται για την επίτευξη 80% ισχύος προκειμένου να εντοπισθεί εφάμιλλο μέγεθος επίδρασης στον γενικό Ευρωπαϊκό πληθυσμό θα ήταν 67,000 άτομα. Η ίδια παραλλαγή R19X είχε βρεθεί και στον απομονωμένο πληθυσμό των Amish (POLLIN *et al.* 2008) αποτελώντας το πρώτο παράδειγμα πολυμορφισμού με κλινική σημασία.

Όλα τα παραπάνω συνηγορούν στο γεγονός ότι η μελέτη των γενετικά απομονωμένων πληθυσμών μπορεί να βοηθήσει σημαντικά στις μελέτες συσχέτισης νέας γενιάς προς διερεύνηση σπάνιων πολυμορφισμών που σχετίζονται με πολυπαραγοντικές ασθένειες.

## 4.2 Περιγραφικά χαρακτηριστικά και διατροφικά πρότυπα

### 4.2.1 Κρήτη

Στα πλαίσια αυτής της διατριβής, περιγράψαμε την πληθυσμιακή μελέτη στα απομονωμένα χωριά του Μυλοποτάμου της Κρήτης, που αποτελεί μέρος της μελέτης HELIC-MANOLIS ([www.helic.org](http://www.helic.org)). Η μέση ηλικία αυτού του γενετικά απομονωμένου (ΠΑΝΟΥΤΣΟΡΟΥΛΟΥ *et al.* 2014) πληθυσμού από τον ορεινό Μυλοπόταμο ήταν 61.6 έτη, καταδεικνύοντας έναν ηλικιωμένο πληθυσμό.

Ο πληθυσμός της μελέτης MANOLIS βρέθηκε να είναι οριακά υπέρβαρος προς παχύσαρκος (μέσος ΔΜΣ=29.5kg/m<sup>2</sup>). Το εύρημα αυτό είναι σε συμφωνία με άλλους Ελληνικούς (ΚΑΝΟΝΙ AND DEDOUSSIS 2008; ΤΥΡΟΒΟΛΑΣ *et al.* 2009) και Ευρωπαϊκούς (DEDOUSSIS *et al.* 2008) πληθυσμούς ηλικιωμένων. Ο επιπολασμός της παχυσαρκίας ήταν 43.9% και οι γυναίκες παρουσίασαν μεγαλύτερη τάση προς το υπέρβαρο σε σχέση με τους άντρες. Γενικά οι γυναίκες φάνηκε να χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη νοσηρότητα σε σύγκριση με τους άντρες, γεγονός που θα μπορούσε να οφείλεται στο γεγονός ότι έχουν μεγαλύτερη μέση ηλικία. Το 82.5% το πληθυσμού ήταν υπέρβαροι ή παχύσαρκοι, ποσοστό μεγαλύτερο από το αντίστοιχο (57%) στην ίδια περιοχή (Ανώγεια), το 1990 (ΚΑΦΑΤΟΣ *et al.* 1993). Η διαφορά αυτή θα μπορούσε να οφείλεται στον διαφορετικό σχεδιασμό μιας και η άλλη μελέτη περιελάμβανε μόνο 167 εθελοντές από τα Ανώγεια, ενώ στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκαν 1,553 συμμετέχοντες από πολλά διαφορετικά χωριά συμπεριλαμβάνοντας τα Ανώγεια, τα Ζωνιανά, τις Γωνιές, την Αξό, το Αστυράκι, την Κάλυβο, και πολλά άλλα. Επιπλέον, η μείωση στην φυσική δραστηριότητα που συντελέστηκε κατά την διάρκεια των ετών λόγω της αλλαγής στα μέσα μεταφοράς είναι πιθανό να αποτελεί εξήγηση για αυτή την διαφορά, αφού η κύρια αιτία της παχυσαρκίας είναι το θετικό ισοζύγιο ενέργειας. Σχεδόν ο μισός πληθυσμός του MANOLIS (49.5%) είχε υπέρταση, ποσοστό 20-25% χαμηλότερο σε σύγκριση με άλλες Ελληνικές μελέτες σε ηλικιωμένους (ΚΑΝΟΝΙ AND DEDOUSSIS 2008; ΤΥΡΟΒΟΛΑΣ *et al.* 2009) και έναν άλλο απομονωμένο πληθυσμό (MISSONI 2009), αλλά 8% υψηλότερο από το αντίστοιχο μελέτης σε ένα από τα χωριά (Ανώγεια), πριν από 20 χρόνια (ΚΑΦΑΤΟΣ *et al.* 1993). Η μελέτη GHRAS (Greek Health Randomized Aging Study) είναι μία μελέτη 782 ηλικιωμένων Ελλήνων, που στρατολογήθηκαν με τυχαίο τρόπο στην περιοχή της

Αθήνας με σκοπό την διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ κοινωνικο-οικονομικών, βιοχημικών, ψυχολογικών και χαρακτηριστικών του τρόπου ζωής και την επίδρασή τους στην υγεία ηλικιωμένων Ελλήνων (KANONI AND DEDOUSSIS 2008). Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν σε ότι αφορά την υπερλιπιδαιμία (37.7%) ήταν προς την ίδια κατεύθυνση αλλά σε μεγαλύτερο βαθμό σε σύγκριση με την μελέτη GHRAS και την μελέτη MEDIS (Mediterranean Islands Study), όπου βρέθηκε μεγαλύτερος επιπολασμός της νόσου (87% και 54%, αντίστοιχα). Το ποσοστό του ΣΔ τύπου 2 (12.3%) ήταν συγκρίσιμο με αυτό για τον γενικό Ελληνικό πληθυσμό (ATHYROS *et al.* 2005) και για άλλους απομονωμένους πληθυσμούς στο Νησί Vis στην Κροατία (MISSONI 2009). Ωστόσο, ο πληθυσμός MANOLIS δεν φαίνεται να υποφέρει από επιπλοκές της νόσου όπως η νευροπάθεια, η νεφροπάθεια, αμφιβληστροειδοπάθεια κ.λπ.

Η πρόσληψη κρέατος στον πληθυσμό MANOLIS ήταν 3-8 φορές υψηλότερη από αυτή του γενικού πληθυσμού της Αττικής (PANAGIOTAKOS *et al.* 2009) και άλλων Ελληνικών πληθυσμών ηλικιωμένων (KANONI AND DEDOUSSIS 2008; TYROVOLAS *et al.* 2009). Το εύρημα αυτό συνάδει με την γεωγραφία της ορεινής αυτής απομονωμένης περιοχής και την παράδοση που έχει διατηρήσει ανά τους αιώνες, έχοντας ως κύρια ασχολία την κτηνοτροφία. Η αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ ειδικά από τους άντρες καταδεικνύει την κοινωνική αλλά και πολιτιστική πτυχή αυτής της συνήθειας. Οι άντρες συχνάζουν στα τοπικά παραδοσιακά καφενεία, κερνάνε και πίνουν με τους επισκέπτες την ρακή ως ένδειξη φιλοξενίας.

Στην πλειοψηφία τους τα άτομα ήταν παντρεμένα (70.6%), με λιγότερους από το 1% να είναι χωρισμένοι/διαζευγμένοι, επισημαίνοντας τον παραδοσιακό χαρακτήρα του πληθυσμού αυτού όπου η οικογένεια αποτελεί τον πυρήνα της κοινωνίας κάτι που εκλείπει στις πιο αστικές κοινωνίες (PANAGIOTAKOS *et al.* 2007c; KANONI AND DEDOUSSIS 2008). Οι περισσότεροι από τους συμμετέχοντες είχαν πρωτοβάθμια εκπαίδευση, με τους άντρες να έχουν περισσότερα χρόνια εκπαίδευσης σε σχέση με τις γυναίκες, ένα χαρακτηριστικό όμοιο με έναν γηραιό αστικό πληθυσμό (GHRAS) αλλά όχι με έναν νεότερο αστικό Ελληνικό πληθυσμό (ATHYROS *et al.* 2005) που είχε τα διπλάσια συνολικά έτη εκπαίδευσης. Αυτό το εύρημα είναι χαρακτηριστικό των αγροτικών περιοχών όπου η κύρια απασχόληση είναι η γεωργία. Η εκπαιδευτική διαδικασία ειδικά σε ότι αφορά τα πιο ηλικιωμένα άτομα του πληθυσμού MANOLIS περιορίστηκε ακόμα περισσότερο με την έναρξη του Δευτέρου Παγκοσμίου Πολέμου.

Οι άντρες ήταν βαρείς καπνιστές ενώ η πλειοψηφία των γυναικών δεν είχε καπνίσει ποτέ. Το ποσοστό των αντρών καπνιστών του MANOLIS ήταν τριπλάσιο από το αντίστοιχο της μελέτης

GHRAS (4.7%), ενώ το ποσοστό των καπνιστριών και πρώην καπνιστριών είναι πολύ πιο χαμηλό από ότι στην μελέτη GHRAS (KANONI AND DEDOUSSIS 2008). Αυτό υπογραμμίζει και πάλι τον παραδοσιακό χαρακτήρα της συγκεκριμένης κοινωνίας η οποία διατηρεί πρότυπα του παρελθόντος. Ωστόσο το κάπνισμα στους άντρες ήταν αρκετά χαμηλότερο (38%) σε σύγκριση με το 1960 (57%), όταν ένας άλλος πληθυσμός από την Κρήτη μελετήθηκε στα πλαίσια της Μελέτης των Επτά Χωρών (MOSCHANDREAS *et al.* 2005).

Τα επίπεδα της γλυκόζης του ορού ήταν παρόμοια με αυτά της μελέτης GHRAS (KANONI AND DEDOUSSIS 2008), ενώ τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης στον πληθυσμό MANOLIS βρέθηκαν να είναι λίγο πιο χαμηλά (7-9mg/dl) από αυτά άλλων Ελληνικών και Ευρωπαϊκών γηραιών πληθυσμών (DEDOUSSIS *et al.* 2008; KANONI AND DEDOUSSIS 2008) αλλά τα τελευταία 30 χρόνια κυμαίνονται στα ίδια επίπεδα όπως προκύπτει από μελέτες στην περιοχή (ARAVANIS *et al.* 1988; KAFATOS *et al.* 1991; SANDKER *et al.* 1993; MANIOS *et al.* 2005). Ο πληθυσμός μας από τον Μυλοπόταμο είχε κατά 25-45mg/dl χαμηλότερη LDL χοληστερόλη σε σύγκριση με τους ηλικιωμένους πληθυσμούς στην Αττική (KANONI AND DEDOUSSIS 2008) και τα Ανώγεια (MANIOS *et al.* 2005). Τα επίπεδα της ολικής χοληστερόλης ήταν 20-40 mg/dl χαμηλότερα από άλλες μελέτες στην Ελλάδα και την συγκεκριμένη περιοχή (KAFATOS *et al.* 1991; SANDKER *et al.* 1993; MANIOS *et al.* 2005), και προσομοιάζουν τα επίπεδα που είχαν αναφερθεί από την Μελέτη των Επτά Χωρών (MOSCHANDREAS *et al.* 2005) την δεκαετία του 1960, επισημαίνοντας το Κρητικό παράδειγμα μακροζωίας και υγείας.

Η Μεσογειακή Διατροφή είναι ένα από τα πιο μελετημένα διατροφικά πρότυπα, έχει συσχετιστεί με μειωμένο κίνδυνο για καρκίνο και ΚΝ καθώς και με μακροζωία (TRICHOPOULOU *et al.* 2003; KNOOPS *et al.* 2004; SOFI *et al.* 2010) και προέρχεται από την Κρήτη, τον τόπο καταγωγής του πληθυσμού μας. Ωστόσο, λαμβάνοντας υπ' όψη ότι η γεωμορφολογική ποικιλομορφία αυτού του μεγάλου νησιού επηρεάζει την διαθεσιμότητα τροφής και τις συνθήκες διαβίωσης, τόσο οι διατροφικές συνήθειες όσο και ο τρόπος ζωής μπορεί να διαφέρουν σημαντικά μεταξύ ενός ορεινού κι ενός πεδινού πληθυσμού. Προκειμένου να χαρακτηρίσουμε την μοναδική δίαιτα αυτού του συγκεκριμένου ορεινού πληθυσμού από τον Μυλοπόταμο, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ανάλυσης σε κύριες συνιστώσες στα διατροφικά δεδομένα. Τα πρότυπα που προέκυψαν είναι το τοπικό πρότυπο που αντιπροσωπεύει την παραδοσιακή διατροφή του πληθυσμού, το υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος και απλά σάκχαρα πρότυπο που περιλαμβάνει επεξεργασμένα και συσκευασμένα τρόφιμα, το πρότυπο του καφενείου που χαρακτηρίζεται

από την κατανάλωση καφέ και αλκοόλ, ελιές και τηγανιτές πατάτες σαν συνοδευτικά του ποτού και το πρότυπο με το ελαιόλαδο, τα φρούτα και τα λαχανικά.

Οι συσχετίσεις αυτών των προτύπων με διάφορους καρδιομεταβολικούς δείκτες όπως ο ΔΜΣ, ο λόγος περιφέρειας μέσης προς περιφέρεια ισχίου, η ολική, η HDL και η LDL χοληστερόλη, η ΣΑΠ και η ΔΑΠ, η γλυκόζη και η ινσουλίνη μελετήθηκαν μετά τον αποκλεισμό των υποαναφορέων. Η υποαναφορά είναι πιο συχνή μεταξύ των υπέρβαρων ατόμων (McCRORY *et al.* 2011), όπως ο πληθυσμός της μελέτης μας.

Από την ανάλυση των δεδομένων δεν φάνηκε συσχέτιση κανενός προτύπου με την HDL χοληστερόλη ούτε την ινσουλίνη. Αντίθετα, οι Fung και συν. (FUNG *et al.* 2001) παρατήρησαν αρνητική συσχέτιση μεταξύ της ινσουλίνης και του υγιεινού διατροφικού προτύπου που περιελάμβανε φρούτα, λαχανικά πουλερικά, ψάρια, μη επεξεργασμένα δημητριακά και όσπρια, και θετική συσχέτιση με το Δυτικού τύπου πρότυπο που χαρακτηριζόταν από υψηλή κατανάλωση κόκκινου και επεξεργασμένου κρέατος, τηγανιτών πατατών, αυγών, γαλακτοκομικών προϊόντων, γλυκών και επεξεργασμένων δημητριακών.

Το πρότυπο του ελαιολάδου, των φρούτων και των λαχανικών συσχετιζόταν αρνητικά με την ΣΑΠ, με το αντιοξειδωτικό φορτίο των συστατικών του (SU *et al.* 2002) να παίζει πιθανό προστατευτικό ρόλο. Το ελαιόλαδο κατέχει κυρίαρχη θέση στην Μεσογειακή δίαιτα η οποία έχει συσχετιστεί με μείωση της ΣΑΠ και ΔΑΠ (PSALTOPOULOU *et al.* 2004; PARAMICHAEL *et al.* 2008). Ωστόσο, το πρότυπο αυτό φάνηκε επίσης να σχετίζεται με υψηλότερο ΔΜΣ και λόγο περιφέρειας μέσης προς περιφέρεια ισχίου, μία επίδραση που θα μπορούσε να αποδοθεί στο λάδι που είναι το πιο θερμιδικά πυκνό συστατικό του προτύπου. Όταν η συμμόρφωση με αυτό το πρότυπο (σκορ) διαχωρίστηκε σε τριτημόρια, το μεσαίο τριτημόριο ήταν αυτό που σχετιζόταν με μεγαλύτερο κίνδυνο για υπερβάλλον βάρος/παχυσαρκία, και όχι το υψηλό. Το εύρημα αυτό πιθανώς να οφείλεται στην έλλειψη διακριτικής ικανότητας του συγκεκριμένου προτύπου εξαιτίας της ευρείας και γενικά υψηλής κατανάλωσης ελαιολάδου, φρούτων και λαχανικών στην περιοχή. Επίσης, θα μπορούσε να αποδοθεί στο γεγονός ότι στην πλειοψηφία τους τα άτομα του συγκεκριμένου πληθυσμού είναι υπέρβαρα ή παχύσαρκα, καθώς και στον προστατευτικό ρόλο ενάντια σε άλλους καρδιομεταβολικούς δείκτες όπως η αρτηριακή πίεση, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Στην μελέτη Di@bet.es (GUTIERREZ-REPISO *et al.* 2014), βρέθηκε αρνητική συσχέτιση μεταξύ των μεταβολικών επιπλοκών και της πρόσληψης ελαιολάδου.

Το τοπικό διατροφικό πρότυπο συσχετιζόταν με υψηλά επίπεδα γλυκόζης, σε συμφωνία με τα ευρήματα άλλων μελετών όπου διατροφικά πρότυπα που χαρακτηρίζονταν από υψηλή πρόσληψη ζωικού λίπος, κυρίως με την μορφή κόκκινου κρέατος και προϊόντων επεξεργασίας του, κορεσμένου λίπους, χοληστερόλης και γαλακτοκομικών προϊόντων, συσχετιζόταν με υψηλότερο καρδιαγγειακό κίνδυνο και θνησιμότητα (PANAGIOTAKOS *et al.* 2009). Το πρότυπο αυτό, όμως παραδόξως δεν βρέθηκε να συσχετίζεται στατιστικά σημαντικά με κανέναν άλλο παράγοντα καρδιαγγειακού κινδύνου, αν αναλογιστούμε τα επιβαρυντικά και ανθυγιεινά συστατικά του. Αυτό θα μπορούσε εν μέρει να ερμηνευθεί από την αντισταθμιστική δράση του χαμηλού σε υδατάνθρακες και υψηλού σε λίπος περιεχομένου του στην αύξηση της HDL χοληστερόλης (KATAN 1998), που αποτελεί ανεξάρτητο καρδιοπροστατευτικό παράγοντα. Επίσης, η απουσία συσκευασμένων και επεξεργασμένων τροφίμων από το τοπικό πρότυπο μειώνει το φορτίο των trans λιπαρών οξέων. Τα συστατικά αυτά έχει φανεί ότι έχουν καλά τεκμηριωμένες επιβαρυντικές επιδράσεις στην καρδιαγγειακή υγεία (MICHAS *et al.* 2014) και μειώνουν τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης (MOZAFFARIAN *et al.* 2006).

Το πρότυπο του καφενείου, ένα μοναδικό και πολύ χαρακτηριστικό για την κουλτούρα αυτού του πληθυσμού πρότυπο, φάνηκε να σχετίζεται με τον ΔΜΣ και τον λόγο περιφέρειας μέσης προς περιφέρεια ισχίου, καταδεικνύοντας την σχέση του με την παχυσαρκία, καθώς και την ολική χοληστερόλη και την ΔΑΠ, δείκτες που συμβάλουν ιδιαίτερα στον καρδιαγγειακό κίνδυνο. Το εύρημα αυτό συνάδει απόλυτα με την υπάρχουσα γνώση σχετικά με τους παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου ((WHO) Updated January 2015) λαμβάνοντας υπ' όψη την κατανάλωση αλκοόλ ως συστατικό του προτύπου, στην ίδια κατεύθυνση με την μελέτη ΑΤΤΙCΑ, που το πρότυπο που χαρακτηριζόταν από την κατανάλωση αλκοόλ συσχετιζόταν με τον κίνδυνο για ΚΝ (PANAGIOTAKOS *et al.* 2009).

#### **4.2.2 Πομακοχώρια**

Διεξήγαμε πληθυσμιακή μελέτη που περιγράφει τον γεωγραφικά και θρησκευτικά απομονωμένο και γενετικά ομοιογενή (PANOUTSOPOULOU *et al.* 2014) πληθυσμό από τα Πομακοχώρια της Ξάνθης, ως μέρος της μελέτης HELIC-POMAK ([www.helic.org](http://www.helic.org)). Ένα από τα πλεονεκτήματα των απομονωμένων πληθυσμών είναι ότι χαρακτηρίζονται από περιβαλλοντική

ομοιογένεια (VARILO AND PELTONEN 2004) με αποτέλεσμα να απαιτείται μικρότερο μέγεθος δείγματος προκειμένου να αναδειχθεί συσχέτιση με ικανοποιητική στατιστική ισχύ.

Ο πληθυσμός ΡΟΜΑΚ βρέθηκε να είναι υπέρβαρος (μέσος όρος ΔΜΣ=27.5kg/m<sup>2</sup>) όπως και ο γενικός πληθυσμός της μελέτης ΑΤΤΙΚΑ (PANAGIOTAKOS *et al.* 2008b). Το 31.3% του πληθυσμού μας ήταν παχύσαρκοι ενώ στην μελέτη MetS-Greece το ποσοστό της παχυσαρκίας έφτανε το 63.6% στην Ελληνική Μουσουλμανική Κοινότητα από την ίδια περιοχή (ATHYROS *et al.* 2005). Η παρατηρούμενη διαφορά είναι πιθανό να οφείλεται στο μέγεθος του δείγματος και την προέλευση του πληθυσμού, αφού η μελέτη MetS περιελάμβανε μόνο 300 άτομα από την πόλη της Ξάνθης, ενώ η δική μας είχε 1,702 από πολλά διαφορετικά χωριά όπως ο Κένταυρο, η Γλαύκη, ο Εχίνος, η Πάχνη, το Δημάριο, τα Μελίβοια, η Σμύνθη, οι Θέρμες, η Μύκη, το Ωραίο και άλλα Πομακοχώρια. Οι κάτοικοι των πιο απομακρυσμένων χωριών έχουν διατηρήσει τα έθιμα και τις παραδόσεις στις περισσότερες πτυχές της καθημερινότητάς τους ενώ στις πιο αστικές περιοχές και τις μεγαλουπόλεις υιοθετούν τον γενικότερο ελληνικό τρόπο ζωής. Η κατανάλωση κόκκινου κρέατος, γαλακτοκομικών προϊόντων και γλυκών, ήταν 2-3 φορές μεγαλύτερη από αυτήν του γενικού πληθυσμού της Αττικής (PANAGIOTAKOS *et al.* 2005) ενώ η κατανάλωση λαχανικών, φρούτων, οσπρίων και πατατών ήταν 2-4 φορές χαμηλότερη. Το ποσοστό των ατόμων με υπέρταση (26.1%) ήταν συγκρίσιμο με αυτό άλλων Ελληνικών μελετών (PITSAVOS *et al.* 2003; ATHYROS *et al.* 2005), αλλά πολύ χαμηλότερο από αυτό (80%) ενός άλλου απομονωμένου αλλά πιο ηλικιωμένου πληθυσμού από το Νησί Vis της Κροατίας (MISSONI 2009). Ο επιπολασμός της υπερλιπιδαιμίας (16.7%) ήταν χαμηλότερος σε σύγκριση με τον αντίστοιχο της μελέτης ΑΤΤΙΚΑ (43%). Το ποσοστό του ΣΔ τύπου 2 (7.3%) ήταν παρόμοιο με αυτό του γενικού Ελληνικού πληθυσμού (PITSAVOS *et al.* 2003) και ενός άλλου απομονωμένου πληθυσμού (MISSONI 2009), αλλά το μισό από αυτό που αναφερόταν (14.6%) στα αρχεία χρόνιων νόσων του τοπικού κέντρου υγείας (ATHANASIADIS 2012). Ωστόσο, τα αρχεία περιελάμβαναν μόνο τρεις περιοχές/χωριά και ίσως σε αυτό να οφείλεται η παρατηρούμενη διαφορά.

Στην συντριπτική τους πλειοψηφία τα άτομα του πληθυσμού ήταν παντρεμένα (86%), χαρακτηριστικό της παραδοσιακής θέσης που κατέχει η οικογένεια σε αυτή την κοινωνία και δεν παρατηρείται σε πιο αστικοποιημένες περιοχές (PITSAVOS *et al.* 2003). Οι περισσότεροι συμμετέχοντες είχαν πρωτοβάθμια εκπαίδευση, με τους άντρες να είναι πιο μορφωμένοι από τις γυναίκες, κάτι που δεν παρατηρείται στον αστικό Ελληνικό πληθυσμό (PANAGIOTAKOS *et al.* 2004a) που έχει σχεδόν τα διπλάσια συνολικά χρόνια εκπαίδευσης από τον πληθυσμό ΡΟΜΑΚ

(PANAGIOTAKOS *et al.* 2008b). Οι καπνιστικές συνήθειες των αντρών ήταν παρόμοιες με αυτές του γενικού πληθυσμού της Αττικής (PANAGIOTAKOS *et al.* 2003), ενώ σχεδόν όλες οι γυναίκες (97%) δεν είχαν καπνίσει ποτέ, ένα πρότυπο του παρελθόντος που τονίζει τον παραδοσιακό χαρακτήρα αυτού του καπνοπαραγωγικού πληθυσμού.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η λαογραφία των Πομακοχωριών έχει μελετηθεί περιπτωσιολογικά, μιας και οι παραδόσεις, συμπεριλαμβανομένων των διατροφικών συνηθειών μπορεί να διαφέρουν άλλοτε ελάχιστα και άλλοτε σημαντικά μεταξύ διαφορετικών χωριών. Σε αυτή την μελέτη, ο χαρακτηρισμός της μοναδικής δίαιτας του πληθυσμού ΡΟΜΑΚ επετεύχθη μέσω της ανάλυσης σε κύριες συνιστώσες, μιας τεχνικής εκ των υστέρων ανάλυσης των δεδομένων (TRICHOPOULOS AND LAGIOU 2001). Ως εκ τούτου, τα πρότυπα που προκύπτουν αντανakλούν τις πιο αντιπροσωπευτικές διατροφικές συνήθειες του υπό μελέτη πληθυσμού. Τα πρότυπα που προέκυψαν είναι: το πλούσιο σε απλά σάκχαρα πρότυπο που χαρακτηρίζεται από την κατανάλωση φρούτων, γλυκών, σοκολάτας, αναψυκτικών και χυμών, το πρότυπο του γρήγορου φαγητού που περιλαμβάνει προϊόντα επεξεργασίας του κρέατος, πίττες του εμπορίου, λευκό ψωμί και πατάτες τηγανιτές, το ισορροπημένο πρότυπο που αποτελείται από μακαρόνια, ρύζι, λαχανικά, όσπρια και κόκκινο κρέας και το σπιτικό πρότυπα που χαρακτηρίζεται από υψηλή κατανάλωση σπιτικών πιττών, τυριού και πατάτας.

Το κυρίαρχο διατροφικό πρότυπο ήταν το πλούσιο σε απλά σάκχαρα (ερμηνεύσιμη μεταβλητότητα 16.3%) και είναι πολύ χαρακτηριστικό και στενά συνδεδεμένο με την κοινωνική και πολιτισμική πτυχή του φαγητού στον πληθυσμό ΡΟΜΑΚ. Τα γλυκά που είναι το κύριο συστατικό του προτύπου, προσφέρονται μετά τις κηδείες ως σοκολατάκι ή λουκούμι. Επιπλέον, υπάρχει το «Σεκερ Μπαϊράμι» ή «Μπαϊράμι των γλυκών», μια γιορτή των Μουσουλμάνων αφιερωμένη στην προσφορά και κατανάλωση γλυκών (VARVOUNIS 2000). Το πλούσιο σε σάκχαρα αυτό πρότυπο βρέθηκε να συσχετίζεται αρνητικά με την HDL χοληστερόλη, εύρημα όμοιο με αυτό που δημοσιεύτηκε από την ανάλυση των δεδομένων της πληθυσμιακής μελέτης National Health and Nutrition Examination Survey 1999–2006 (WELSH *et al.* 2010). Τα μειωμένα επίπεδα HDL χοληστερόλης είναι πιθανή απόρροια του ρόλου των απλών σακχάρων στο μονοπάτι όπου μειώνεται η ευαισθησία στην ινσουλίνη, αυξάνεται το σπλαχνικό λίπος και ενεργοποιείται η ηπατική *de novo* βιογένεση (STANHOPE *et al.* 2009). Επίσης, το πρότυπο αυτό βρέθηκε να σχετίζεται με την ΣΑΠ και ΔΑΠ. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μίας μετα-ανάλυσης έξι προοπτικών μελετών, η κατανάλωση ζαχαρούχων αναψυκτικών συσχετιζόταν με μέτριο

κίνδυνο εμφάνισης υπέρτασης (JAYALATH *et al.* 2015). Επιπλέον, η συχνή κατανάλωση χυμού φρούτων βρέθηκε να σχετίζεται με υψηλότερη αρτηριακή πίεση (PASE *et al.* 2015), επίδραση που φαίνεται να αποδίδεται κυρίως στην υπερκατανάλωση φρουκτόζης (BROWN *et al.* 2008). Όπως ήταν αναμενόμενο, το πλούσιο σε απλά σάκχαρα πρότυπο συσχετιζόταν με αυξημένα επίπεδα γλυκόζης. Αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα από την μελέτη EPIC-InterAct όπου τα αναψυκτικά συσχετιζόνταν με αυξημένη επίπτωση του ΣΔ τύπου 2 (INTERACT *et al.* 2013). Η μελέτη EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition) είναι μία από τις μεγαλύτερες προοπτικές μελέτες, με συμμετέχοντες από 10 Ευρωπαϊκές χώρες, και διερευνά τις σχέσεις μεταξύ διατροφικών, περιβαλλοντικών και παραγόντων του τρόπου ζωής με την εμφάνιση χρόνιων νοσημάτων. Επίσης, η μελέτη παρακολούθησης EPIC-Netherlands έδειξε ότι η πρόσληψη υδατανθράκων (hazard ratio 1.15) και αμύλου (hazard ratio 1.25) συσχετιζόταν με αυξημένο κίνδυνο για ΣΔ (SLUIJS *et al.* 2010). Το πλούσιο σε απλά σάκχαρα πρότυπο στον πληθυσμό POMAΚ φάνηκε να συσχετίζεται με τους περισσότερους καρδιομεταβολικούς δείκτες, ενώ στην μελέτη ATTICA το πρότυπο των γλυκών δεν συσχετιζόταν με κανένα χαρακτηριστικό του ΜΣ (PANAGIOTAKOS *et al.* 2007b). Ένας πιθανός λόγος για αυτή την διαφορά είναι τα διαφορετικά εργαλεία αξιολόγησης της διαιτητικής πρόσληψης που χρησιμοποιήθηκαν (ερωτηματολόγιο συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων με 72 vs 156 τρόφιμα) και η διαφορά της σύστασης του προτύπου σε κάθε μελέτη. Η περιεκτικότητα σε λίπος του πλούσιου σε απλά σάκχαρα προτύπου στον πληθυσμό POMAΚ λόγω της ύπαρξης σοκολάτας και γλυκών με βάση το γάλα είναι πιθανό να εντείνει την αρνητική του επίδραση στον καρδιομεταβολικό κίνδυνο.

Η υψηλή πρόσληψη λίπους αντιπροσωπεύεται κυρίως από το πρότυπο του γρήγορου φαγητού το οποίο περιλαμβάνει προϊόντα επεξεργασίας του κρέατος, πατάτες τηγανιτές και άσπρο ψωμί. Το πρότυπο αυτό βρέθηκε να συσχετίζεται με αυξημένα επίπεδα ινσουλίνης, ένα εύρημα που βρίσκεται σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία. Πιο συγκεκριμένα, η κατανάλωση κρέατος έχει φανεί να συσχετίζεται με την υπερινσουλιναιμία και τον ΣΔ τύπου 2 (DUC SON LE *et al.* 2005; PANAGIOTAKOS *et al.* 2005). Το συνολικό λίπος, κυρίως το κορεσμένο που προέρχεται από το κρέας και τα trans λιπαρά οξέα από τις τηγανιτές πατάτες είναι αυτά που συμβάλλουν στην αυξημένη εμφάνιση αντίστασης στην ινσουλίνη και ΣΔ τύπου 2 (HAAG AND DIPPENAAR 2005; ANGELIERI *et al.* 2012; CASCIO *et al.* 2012]. Επίσης, είναι πιθανό ο μηχανισμός της παρατηρούμενης συσχέτισης να διαμεσολαβείται από τις πρακτικές επεξεργασίας που εμπλουτίζουν το

περιεχόμενο του προτύπου με γλυκοτοξίνες (Perra, 2002 #6541), καθώς και από της έλλειψη διαιτητικών ινών, που συμβάλουν στον γλυκαιμικό έλεγχο.

Το ισορροπημένο πρότυπο αντιπροσωπεύει την κατανάλωση ρυζιού, μακαρονιών, κόκκινου κρέατος, λαχανικών και οσπρίων. Το ρύζι είναι ένα παραδοσιακό φαγητό το οποίο σερβίρεται ως κυρίως πιάτο –πιλάφι- σε τελετές και εορταστικές εκδηλώσεις όπως οι κηδείες και οι γάμοι. Το κόκκινο κρέας, κυρίως το αρνί και το μοσχάρι, κατέχει κεντρικό ρόλο στην κοινωνική ζωή των Πομάκων καθόλη την διάρκεια της ιστορίας τους, με μία ολόκληρη γιορτή να είναι αφιερωμένη στην κατανάλωσή του, το λεγόμενο «Κουρμπάν Μπαϊράμι» ή «Μπαϊράμη της θυσίας» (VARVOUNIS 2000). Το πρότυπο αυτό αποτελεί το υγιεινό/συνετό πρότυπο που ενσωματώνει ήθη και έθιμα των Πομάκων και φάνηκε να συσχετίζεται με μειωμένα επίπεδα συστολικής και διαστολικής πίεσης. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρονται και από την μελέτη ATTICA (PANAGIOTAKOS *et al.* 2003), όπου η προσκόλληση σε ένα πρότυπο Μεσογειακής διατροφής συσχετιζόταν με μειωμένο κίνδυνο υπέρτασης (OR=0.74, p=0.021). Οι Pala και συν. ανέφεραν ότι η συμμόρφωση με ένα πρότυπο που χαρακτηριζόταν από την κατανάλωση κρέατος και μακαρονιών σχετιζόταν με την υπέρταση (PALA *et al.* 2006). Τα αντιφατικά αποτελέσματα είναι πιθανό να οφείλονται στα επιπλέον συστατικά του προτύπου με τα μακαρόνια και το κρέας όπως άλλα ζωικά λίπη, το κρασί, το ψωμί, το χοιρινό και τα προϊόντα επεξεργασίας του κρέατος καθώς και στην παρουσία λαχανικών και οσπρίων στο ισορροπημένο πρότυπο του πληθυσμού ΡΟΜΑΚ που έχουν πιθανό προστατευτικό ρόλο. Επιπλέον, το ισορροπημένο πρότυπο φάνηκε να σχετίζεται αρνητικά με τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης, εύρημα που συμφωνεί με τα αντίστοιχα άλλων μελετών (PALA *et al.* 2006).

### 4.3 Αλληλεπιδράσεις γονιδίων-διατροφής

Η μελέτη HELIC είναι η πρώτη μεγάλης κλίμακας μελέτη σάρωσης και αλληλούχισης του γονιδιώματος σε Ελληνικούς απομονωμένους πληθυσμούς. Στα άτομα αυτών των απομονωμένων πληθυσμών έγινε γονοτύπηση και λεπτομερής καταγραφή φαινοτύπων, συμπεριλαμβανομένων δημογραφικών, κλινικών, ανθρωπομετρικών και παραγόντων του τρόπου ζωής όπως η διατροφή, η φυσική δραστηριότητα και οι καπνιστικές συνήθειες, με απώτερο σκοπό την αλληλούχιση του γονιδιώματος και προσομοίωση των γονοτύπων. Στους απομονωμένους πληθυσμούς η αλληλούχιση είναι πιο αποδοτική, επειδή οι πολυμορφισμοί διασκορπίζονται σε εκτεταμένους απλότυπους, εξασφαλίζοντας ακριβέστερη εκτίμηση. Αξιοποιώντας τα γενετικά χαρακτηριστικά των απομονωμένων πληθυσμών μειώνεται ο αριθμός δειγμάτων για αλληλούχιση του γονιδιώματος, χωρίς μείωση της ισχύος. Στα πλαίσια αυτής της μελέτης προσδιορίστηκαν τα διατροφικά πρότυπα που χαρακτηρίζουν τα άτομα των δύο διαφορετικών πληθυσμών που την απαρτίζουν, MANOLIS και POMAK, μελετήθηκε η αλληλεπίδραση των γονιδίων με τα διατροφικά πρότυπα σε παράγοντες κινδύνου ΚΝ.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των αλληλεπιδράσεων ανέδειξαν νέους πολυμορφισμούς μερικοί εκ των οποίων βρίσκονται σε (ή κοντά σε) γονίδια που έχουν συσχετισθεί με ανάλογους καρδιομεταβολικούς φαινότυπους σε μελέτες συσχέτισης σάρωσης του γονιδιώματος, σύμφωνα με τον κατάλογο των μελετών συσχέτισης σάρωσης του γονιδιώματος (GWAS Catalog - The NHGRI-EBI Catalog of published genome-wide association studies- <https://www.ebi.ac.uk/gwas/home>).

Τα αποτελέσματα της μελέτης μας από την ανάλυση των αλληλεπιδράσεων του γονιδιώματος με τα διατροφικά πρότυπα στην περιφέρεια μέσης, έδειξαν και στους δύο πληθυσμούς ότι ο πολυμορφισμός στο ίδιο γονίδιο MC4R αλληλεπιδρώντας με πρότυπο πλούσιο σε απλά σάκχαρα σχετίζεται με καρδιομεταβολικούς δείκτες. Έπειτα από έλεγχο για κάθε κατηγορία αλληλομόρφου, η προσκόλληση στο πλούσιο σε απλά σάκχαρα πρότυπο σχετιζόταν στατιστικά σημαντικά με την περιφέρεια μέσης στον πληθυσμό MANOLIS αλλά όχι με την χοληστερόλη στον πληθυσμό POMAK, στα άτομα που έφεραν τουλάχιστον ένα αλληλόμορφο κινδύνου. Το γονίδιο MC4R είναι ένα από τα πιο γνωστά γονίδια που σχετίζονται με την παχυσαρκία στην παιδική ηλικία (WHEELER *et al.* 2013; WARRINGTON *et al.* 2015) αλλά και στην ενήλικη ζωή (PEI *et*

*al.* 2014). Στην μελέτη σάρωσης του γονιδιώματος των Chambers και συν. (CHAMBERS *et al.* 2008) βρέθηκαν πολυμορφισμοί στο γονίδιο MC4R να σχετίζονται με την περιφέρεια μέσης, με τους ομοζυγώτες για το αλληλόμορφο κινδύνου να έχουν ~2cm μεγαλύτερη περιφέρεια μέσης. Επίσης έχουν βρεθεί συσχετίσεις πολυμορφισμών στο γονίδιο MC4R με την HDL χοληστερόλη (TESLOVICH *et al.* 2010; GLOBAL LIPIDS GENETICS *et al.* 2013). Στην μελέτη των Koochaakroor και συν. βρέθηκε ότι μεταξύ των φορέων του αλληλομόρφου κινδύνου για τον πολυμορφισμό στο γονίδιο MC4R, αυτοί στο υψηλότερο τεταρτημόριο σκορ διατροφής δυτικού τύπου είχαν αυξημένο κίνδυνο για ΜΣ σε σχέση με αυτούς στο χαμηλότερο τεταρτημόριο σκορ διατροφής δυτικού τύπου (KOOSCHAKROOR *et al.* 2016).

Επίσης, στην παρούσα μελέτη ο πολυμορφισμός στο KLHL29 γονίδιο φάνηκε να αλληλεπιδρά και στους δύο πληθυσμούς με πρότυπο πλούσιο σε απλά σάκχαρα και να σχετίζεται με την ΔΑΠ στον πληθυσμό MANOLIS και με την HDL χοληστερόλη στον πληθυσμό POMAK, χωρίς τα αποτελέσματα να επιβεβαιώνονται και στους δύο πληθυσμούς στην περαιτέρω διερεύνηση ανά κατηγορία αλληλομόρφου. Πολυμορφισμοί στο γονίδιο KLHL29 έχουν βρεθεί να σχετίζονται σε αναλύσεις σάρωσης του γονιδιώματος τόσο με τον ΔΜΣ (COMUZZIE *et al.* 2012), όσο και με την υπέρταση (LETTRE *et al.* 2011).

Στη δική μας μελέτη, ο πολυμορφισμός στο γονίδιο HS3ST4 φάνηκε να αλληλεπιδρά και στους δύο πληθυσμούς με πρότυπο πλούσιο σε απλά σάκχαρα και να σχετίζεται με την ΔΑΠ στον πληθυσμό MANOLIS και με την HDL χοληστερόλη στον πληθυσμό POMAK. Ο πολυμορφισμός στο γονίδιο LOC100287225 φάνηκε να αλληλεπιδρά με το πρότυπο υψηλής περιεκτικότητας σε απλά σάκχαρα και λίπος και να σχετίζεται με την περιφέρεια μέσης στον πληθυσμό MANOLIS και με το γρήγορο διατροφικό πρότυπο και να σχετίζεται με την ΣΑΠ στον πληθυσμό POMAK. Ο πολυμορφισμός στο γονίδιο ARHGAP10 φάνηκε να αλληλεπιδρά με το πρότυπο υψηλής περιεκτικότητας σε απλά σάκχαρα και λίπος στον πληθυσμό MANOLIS και με το γρήγορο διατροφικό πρότυπο στον πληθυσμό POMAK και να σχετίζεται με την ΣΑΠ και στους δύο πληθυσμούς. Κανένα από τα παραπάνω αποτελέσματα δεν επιβεβαιώθηκαν και στους δύο πληθυσμούς στην περαιτέρω διερεύνηση ανά κατηγορία αλληλομόρφου. Στην μελέτη ταυτοποίησης νέων γενετικών τόπων που σχετίζονται με την παχυσαρκία, οι Comuzzie και συν. (COMUZZIE *et al.* 2012) αναφέρουν πολυμορφισμούς στα γονίδια HS3ST4, LOC100287225 και ARHGAP10 να συσχετίζονται με την λιπώδη μάζα σώματος, το βάρος γέννησης και τα επίπεδα οιστραδιόλης, αντίστοιχα.

Ο πολυμορφισμός στο γονίδιο ALCAM φάνηκε να αλληλεπιδρά με το τοπικό πρότυπο και να σχετίζεται με την ΔΑΠ στον πληθυσμό MANOLIS και με το πλούσιο σε απλά σάκχαρα πρότυπο και να σχετίζεται με την HDL χοληστερόλη στον πληθυσμό POMAK, με κανένα από τα παραπάνω αποτελέσματα να μην επιβεβαιώνεται και στους δύο πληθυσμούς στην περαιτέρω διερεύνηση ανά κατηγορία αλληλομόρφου. Οι Locke και συν. (Locke *et al.* 2015) ανέφεραν συσχέτιση πολυμορφισμών στο γονίδιο ALCAM με τον ΔΜΣ σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας σάρωσης του γονιδιώματος ( $p < 5 \times 10^{-8}$ ) ενώ στην δική μας μελέτη.

Η έλλειψη συσχετίσεων με τους ίδιους φαινότυπους που παρατηρείται, με βάση τα παραπάνω, μεταξύ των δεδομένων της βιβλιογραφίας και της μελέτης μας, είναι πολύ πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι οι αναφερθείσες μελέτες δεν μελετούν τις αλληλεπιδράσεις αυτών των γονιδίων με παράγοντες του τρόπου ζωής π.χ. τα διατροφικά πρότυπα, όπως συμβαίνει στην δική μας μελέτη, αλλά αποτελούν ενδείξεις επαλήθευσης της κατεύθυνσης της επίδρασης. Επιπλέον, τόσο οι γενετικοί όσο και οι διατροφικοί παράγοντες που μελετήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διατριβής δεν έχουν διερευνηθεί σε επίπεδο αλληλεπιδράσεων σε άλλες μελέτες. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η σύγκριση των ευρημάτων μας με αυτά άλλων μελετών παρόμοιου σχεδιασμού. Για τον λόγο αυτό, έλαβε χώρα εσωτερική επαλήθευση των αποτελεσμάτων με την χρήση και των δύο πληθυσμών της μελέτης HELIC με ίδιο πρωτόκολλο συλλογής των δειγμάτων και ανάλυσης των δεδομένων, και παρουσίαση των δεδομένων που σε όλα τα στάδια στατιστικών αναλύσεων έδωσαν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα και στους δύο πληθυσμούς.

Πρόσφατες μελέτες αλληλεπιδράσεων υποψηφίων γονιδίων με διατροφικά πρότυπα βρίσκουν συσχετίσεις με καρδιομεταβολικούς φαινότυπους και το ΜΣ. Συγκεκριμένα, μελέτη αλληλεπιδράσεων μεταξύ συγκεκριμένων πολυμορφισμών στα γονίδια APOC3 (rs5128 3238C>G) και APOA1 (rs670, -75G>A και rs5069,+83C>T) SNP και των διατροφικών προτύπων που προέκυψαν από παραγοντική ανάλυση: υγιεινό διατροφικό πρότυπο, διατροφικό πρότυπο δυτικού τύπου, και διατροφικό πρότυπο πλούσιο σε λίπος και γλυκά. Οι φορείς των αλληλομόρφων κινδύνου στο APOA1 είχαν περισσότερες πιθανότητες να έχουν ΜΣ αν βρίσκονταν στο υψηλότερο τεταρτημόριο συμμόρφωσης με το διατροφικό πρότυπο δυτικού τύπου (ΣΛ 3.22, 95% ΔΕ 1.21, 8.58,  $P=0.03$ ). Επίσης βρέθηκε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση των τεταρτημορίων του πλούσιου σε λίπος και γλυκά διατροφικού προτύπου με τον διπλότυπο του APOA1 (GA + AA/CT + TT). Σε σχέση με το ΜΣ, οι ΣΛ για αυτούς τους

γονότυπους ήταν 1, 0.65, 0.57 και 0.22 ( $P=0.06$ ) από το χαμηλότερο στο υψηλότερα τεταρτημόριο προσκόλλησης στο διατροφικό πρότυπο πλούσιο σε λίπος και γλυκά σε σύγκριση με άλλους συνδυασμούς γονοτύπων ( $P=0.03$ ) (HOSSEINI-ESFAHANI *et al.* 2015).

Ισπανική μελέτη παρέμβασης των Razquin και συν. (RAZQUIN *et al.* 2009) διερεύνησε την αλληλεπίδραση του πολυμορφισμού Pro12Ala στο γονίδιο PPAR $\gamma$  με την μεσογειακή δίαιτα στην περιφέρεια μέσης. Υπήρχαν τρεις ομάδες διατροφικής παρέμβασης: οι δύο ακολουθούσαν Μεσογειακού τύπου διατροφή και η τρίτη ήταν η ομάδα ελέγχου όπου είχε δοθεί η συμβουλή να ακολουθήσουν μία χαμηλών λιπαρών δίαιτα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι φορείς του αλληλομόρφου κινδύνου στην ομάδα ελέγχου είχαν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη αλλαγή στην περιφέρεια μέσης σε σχέση με τους ομόζυγους για το αλληλόμορφο αναφοράς μετά από 2 χρόνια διατροφικής παρέμβασης (2.37cm,  $p=0.014$ ), επίδραση που δεν επιβεβαιώθηκε μεταξύ των φορέων του αλληλομόρφου κινδύνου στις ομάδες με την Μεσογειακού τύπου διατροφή. Σε διαβητικούς ασθενείς, βρέθηκε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ της Μεσογειακής δίαιτας και του αλληλομόρφου κινδύνου στην περιφέρεια μέσης (-5.85cm,  $p=0.003$ ).

Μία άλλη μελέτη αλληλεπιδράσεων δύο πολυμορφισμών του γονιδίου INSIG2 και διατροφικών προτύπων στους κατοίκους των νήσων Σαμόα, έδειξε ότι το πιο σύγχρονο διατροφικό πρότυπο σχετιζόταν στατιστικά σημαντικά με υψηλότερα τριγλυκερίδια, ΔΜΣ, περιφέρεια μέσης και χαμηλότερα επίπεδα HDL χοληστερόλης. Στατιστικά σημαντική ήταν και η αλληλεπίδραση που παρατηρήθηκε μεταξύ του πιο σύγχρονου διατροφικού προτύπου και του ενός εκ των δύο πολυμορφισμών rs9308762 ( $p=0.04$ ), με αυτούς που καταναλώνουν το πιο σύγχρονο διατροφικό πρότυπο να έχουν υψηλά τριγλυκερίδια αν είναι ομόζυγοι για το αλληλόμορφο κινδύνου του rs9308762 (BAYLIN *et al.* 2013).

Αλληλεπιδράσεις μεταξύ διατροφικών προτύπων και δύο πολυμορφισμών του β-αδρενεργικού υποδοχέα (ADRB2 Gln27Glu και ADRB3 Trp64Arg) σε σχέση με τα επίπεδα τριγλυκεριδίων εξετάσθηκαν στα πλαίσια της Ιαπωνικής μελέτης J-MICC (Japan Multi-Institutional Collaborative Cohort) (NANRI *et al.* 2016). Μετά από ανάλυση για κάθε γονότυπο, βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του ADRB3 και του διατροφικού προτύπου με βάση το ψωμί ( $p=0.01$ ) σε σχέση με τα επίπεδα τριγλυκεριδίων.

## 4.4 Περιορισμοί της μελέτης

Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης θα πρέπει να γίνει υπό το πρίσμα των περιορισμών που την διέπουν. Ως συγχρονική πληθυσμιακή μελέτη, δεν ενδείκνυται για εξαγωγή αιτιολογικών συσχετίσεων μεταξύ των διατροφικών παραγόντων και των καρδιομεταβολικών δεικτών, ούτε για γενίκευση των αποτελεσμάτων που προέρχονται από τους δύο υπο μελέτη απομονωμένους πληθυσμούς. Ωστόσο, τα συμπεράσματα που προκύπτουν μπορούν να υποδείξουν την κατεύθυνση των επιδράσεων και να προτείνουν παράγοντες προς την διερεύνηση των οποίων πρέπει να διεξαχθούν άλλου τύπου μελέτες, όπως για παράδειγμα μελέτες παρέμβασης.

Επιπλέον, αν και όλες οι αναλύσεις διεξήχθησαν λαμβάνοντας υπ' όψη συγχυτικούς παράγοντες, δεν μπορεί να αποκλειστεί το ενδεχόμενο ύπαρξης και άλλων συγχυτικών παραγόντων για τους οποίους δεν έγινε διόρθωση.

Ένας άλλος περιορισμός της συγκεκριμένης μελέτης ήταν ότι το ιατρικό ιστορικό και το ιστορικό λήψης φαρμάκων ήταν αυτοδηλούμενα και δεν προέρχονταν από το τοπικό ιατρικό αρχείο του νοσοκομείου στο οποίο υπάγονταν οι εθελοντές.

Σε ότι αφορά την εκτίμηση των διατροφικών συνηθειών, αν και η εγκυρότητα του ερωτηματολογίου συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων που χρησιμοποιήθηκε δεν ελέγχθηκε στους συγκεκριμένους πληθυσμούς, έχει ελεγχθεί στον γενικό Ελληνικό πληθυσμό (BOUNTZIOUKA *et al.* 2012). Επίσης, ενδέχεται μεμονωμένα η επίδραση ενός διατροφικού παράγοντα, κι επομένως η αλληλεπίδρασή του με γενετικούς παράγοντες, να είναι αρκετά ασθενής ώστε να μπορέσει να ανιχνευθεί (SACKS *et al.* 1995). Για τον λόγο αυτό, στην μελέτη HELIC, διερευνήθηκαν τα διατροφικά πρότυπα του εκάστοτε πληθυσμού που αποτελούν και μία πιο ολιστική προσέγγιση της διατροφής.

Αναφορικά με τα ευρήματα της αλληλεπίδρασης των γενετικών παραγόντων με τα διατροφικά πρότυπα στους καρδιομεταβολικούς δείκτες, το μέγεθος του δείγματος ήταν ένας περιορισμός. Είναι πιθανό το σχετικά μικρό μέγεθος δείγματος να μην εξασφαλίζει την απαραίτητη ισχύ της μελέτης για τον εντοπισμό νέων γενετικών τόπων σε διορθωμένο επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ( $p < 5 \times 10^{-8}$ ), ωστόσο το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας της τάξεως του  $10^{-4}$  το οποίο επιτεύχθηκε στην ανάλυση των αλληλεπιδράσεων, είναι από τα μικρότερα που

έχουν αναφερθεί στην βιβλιογραφία σε επίπεδο σάρωσης του γονιδιώματος κι επιπλέον οι συσχετίσεις επιβεβαιώθηκαν και στους δύο πληθυσμούς. Επίσης, επιλέχθηκε οι καρδιαγγειακοί δείκτες/μεταβλητές υπο μελέτη να μη διχοτομηθούν, κάτι που θα μείωνε περαιτέρω την ισχύ των συσχετίσεων. Επιπλέον, η ταυτοποίηση των πληθυσμών της μελέτης HELIC ως απομονωμένων, εξασφαλίζει δραματική αύξηση της ισχύος σε επίπεδα που σε άλλους πληθυσμούς θα απαιτούνταν δεκάδες χιλιάδες δείγματα για τον εντοπισμό ίδιου μεγέθους επίδρασης.

## 4.5 Συμπεράσματα και μελλοντικές κατευθύνσεις

Η μελέτη HELIC περιλαμβάνει δύο πληθυσμούς, τον πληθυσμό MANOLIS στον ορεινό Μυλοπόταμο Κρήτης και τον πληθυσμό POMAK στα Πομακοχώρια του νομού Ξάνθης. Έγινε λεπτομερής καταγραφή φαινοτύπων και απομόνωση γενετικού υλικού. Τα αποτελέσματα της γονοτύπησης με χρήση διαφόρων εργαλείων πληθυσμιακής γενετικής ταυτοποίησαν και τους δύο πληθυσμούς ως γενετικά απομονωμένους, καθιστώντας τους χρήσιμους στην διερεύνηση σπάνιων γενετικών τόπων που εμπλέκονται στην παθογένεια και ερμηνεύουν μέρος της κληρονομικότητας των ΚΝ. Ο πολυμορφισμός R19X στο γονίδιο APOC3, που βρέθηκε να έχει αυξημένη συχνότητα και να σχετίζεται με την HDL στον πληθυσμό MANOLIS, αποτελεί το πρώτο παράδειγμα πολυμορφισμού με κλινική σημασία.

Τα πρότυπα που προέκυψαν από τα διατροφικά δεδομένα του εκάστοτε πληθυσμού φάνηκε να σχετίζονται με καρδιομεταβολικούς φαινότυπους. Συγκεκριμένα, στον πληθυσμό MANOLIS βρέθηκαν τέσσερα διατροφικά πρότυπα – «τοπικό», «υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος και απλά σάκχαρα», «καφενείου» και «ελαιόλαδο, φρούτα και λαχανικά», με την προσκόλληση στο τοπικό διατροφικό πρότυπο να σχετίζεται με τα επίπεδα γλυκόζης και την προσκόλληση στο πρότυπο του καφενείου να σχετίζεται με τον λόγο περιφέρειας μέσης προς περιφέρεια ισχίου, την ΑΠ και τα επίπεδα χοληστερόλης. Αντίστοιχα στον πληθυσμό POMAK τα διατροφικά πρότυπα ήταν τα εξής: «υψηλής περιεκτικότητας σε απλά σάκχαρα», «γρήγορο φαγητό», «ισορροπημένο» και «σπιτικό», με την συμμόρφωση στο πρότυπο υψηλής περιεκτικότητας σε απλά σάκχαρα να σχετίζεται με την ΑΠ, την γλυκόζη και τα χαμηλά επίπεδα HDL. Τα παραπάνω διατροφικά πρότυπα είναι χαρακτηριστικά κάθε πληθυσμού και αντανakλούν τα ήθη, τα έθιμα και την ιστορία του ανά τους αιώνες και οποιαδήποτε παρέμβαση προκειμένου να εφαρμοστούν οι οδηγίες για την μείωση των ΚΝ θα πρέπει να γίνει με σεβασμό στην πολιτιστική κληρονομιά και την θρησκευτική λατρεία, που αποτελούν τον πυρήνα της κοινωνίας αυτών των ιδιαίτερων πληθυσμών.

Η αλληλεπίδραση των πολυμορφισμών με τα διατροφικά πρότυπα – κυρίως το τοπικό στον πληθυσμό MANOLIS και το σπιτικό στον πληθυσμό POMAK – ήταν σημαντική στους εκάστοτε καρδιομεταβολικούς δείκτες – κυρίως την περιφέρεια μέσης στον πληθυσμό MANOLIS και την ΑΠ στον πληθυσμό POMAK – και η μεγαλύτερη προσκόλληση σε καθένα από αυτά υπό την

παρουσία κάθε επιπλέον αλληλομόρφου κινδύνου συσχετίστηκε με αύξηση του καρδιομεταβολικού δείκτη. Η επίδραση του κάθε πολυμορφισμού στον εκάστοτε καρδιομεταβολικό φαινότυπο ήταν θετική στα άτομα που είχαν μεγαλύτερη προσκόλληση στο υπό διερεύνηση πρότυπο και αρνητική στα άτομα που είχαν χαμηλότερη. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι έστω και μικρή μείωση της προσκόλλησης σε αυτού του είδους τα διατροφικά πρότυπα και όχι η ολική απαγόρευσή τους θα μπορούσε ενδεχομένως να συμβάλει στην μείωση του καρδιαγγειακού κινδύνου ακόμα και στα άτομα με γενετική προδιάθεση, με σεβασμό στην κουλτούρα τους μέρος της οποίας είναι και οι διατροφικές συνήθειες/επιλογές αυτών των πληθυσμών.

Είναι γεγονός ότι οι αλληλεπιδράσεις παρουσιάζουν χαμηλό προς μέτριο μέγεθος επίδρασης και απαιτούνται μεγάλα μεγέθη δείγματος, επαλήθευση και μετα-ανάλυση πολλών μελετών προκειμένου να υπάρξουν ισχυρά αποτελέσματα. Επίσης, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν εκτός από τα γενετικά σκορ και συνδυασμοί χαρακτηριστικών προκειμένου να ορισθούν οι σύνθετοι καρδιομεταβολικοί φαινότυποι και να αποσαφηνιστούν οι βιολογικές λειτουργίες των γενετικών περιοχών και τα μονοπάτια που σχετίζονται με αυτούς (RIED *et al.* 2016). Η μελέτη HELIC διαθέτει δεδομένα αλληλούχισης και προσομοίωσης για περαιτέρω μελλοντική διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων των γενετικών με τους περιβαλλοντικούς παράγοντες και προσφέρεται για μελέτες επιγενετικής οι οποίες σε συνδυασμό με δεδομένα –ομικής – μεταβολομικής, πρωτεομικής – ανάλυσης θα συμβάλουν στην διαλεύκανση της σχέσης της γενετικής προδιάθεσης με τον τρόπο ζωής στα πολυπαραγοντικά νοσήματα.

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- 1998 Clinical guidelines on the identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults: executive summary. Expert Panel on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight in Adults. *Am J Clin Nutr* 68: 899-917.
- 2000 Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. World Health Organ Tech Rep Ser 894: i-xii, 1-253.
- 2001 Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 285: 2486-2497.
- 2004 Appropriate body-mass index for Asian populations and its implications for policy and intervention strategies. *Lancet* 363: 157-163.
- 2007 Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 447: 661-678.
- 2009 Standards of medical care in diabetes--2009. *Diabetes Care* 32 Suppl 1: S13-61.
- Διαχρονικές σειρές (2000-2005) ΕΛ.ΣΤΑΤ. Φυσική Κίνηση Πληθυσμού.  
(NIH), N. I. o. D. a. D. a. K. D. N. N. I. o. H., 2005 National Diabetes Information Clearinghouse (NDIC).  
(WHO), W. H. O., 2004 The Atlas of Heart Disease and Stroke.  
(WHO), W. H. O., 2008a Controlling the global obesity epidemic.  
(WHO), W. H. O., 2008b *The Global Burden of Disease: 2004 Update*.  
(WHO), W. H. O., 2009 *Global Health Risks*  
(WHO), W. H. O., Updated January 2015 Cardiovascular diseases (CVDs). Fact sheets-Fact sheet N°317  
Abecasis, G. R., D. Ghosh and T. E. Nichols, 2005 Linkage disequilibrium: ancient history drives the new genetics. *Hum Hered* 59: 118-124.
- Ahima, R. S., 2006 Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity (Silver Spring)* 14 Suppl 5: 242S-249S.
- Alberti, K. G., R. H. Eckel, S. M. Grundy, P. Z. Zimmet, J. I. Cleeman *et al.*, 2009 Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 120: 1640-1645.
- Alberti, K. G., P. Zimmet and J. Shaw, 2005 The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet* 366: 1059-1062.
- Alberti, K. G., P. Zimmet and J. Shaw, 2006 Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med* 23: 469-480.
- Alberti, K. G., and P. Z. Zimmet, 1998 Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 15: 539-553.
- Alonso, A., C. de la Fuente, A. M. Martin-Arnau, J. de Irala, J. A. Martinez *et al.*, 2004 Fruit and vegetable consumption is inversely associated with blood pressure in a Mediterranean population with a high vegetable-fat intake: the Seguimiento Universidad de Navarra (SUN) Study. *Br J Nutr* 92: 311-319.
- Anderson, J. W., K. M. Randles, C. W. Kendall and D. J. Jenkins, 2004 Carbohydrate and fiber recommendations for individuals with diabetes: a quantitative assessment and meta-analysis of the evidence. *J Am Coll Nutr* 23: 5-17.
- Angelieri, C. T., C. R. Barros, A. Siqueira-Catania and S. R. Ferreira, 2012 Trans fatty acid intake is associated with insulin sensitivity but independently of inflammation. *Braz J Med Biol Res* 45: 625-631.
- Appel, L. J., M. W. Brands, S. R. Daniels, N. Karanja, P. J. Elmer *et al.*, 2006 Dietary approaches to prevent and treat hypertension: a scientific statement from the American Heart Association. *Hypertension* 47: 296-308.

- Appel, L. J., T. J. Moore, E. Obarzanek, W. M. Vollmer, L. P. Svetkey *et al.*, 1997 A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure. DASH Collaborative Research Group. *N Engl J Med* 336: 1117-1124.
- Aravanis, C., R. P. Mensink, A. Corcondilas, P. Ioanidis, E. J. Feskens *et al.*, 1988 Risk factors for coronary heart disease in middle-aged men in Crete in 1982. *Int J Epidemiol* 17: 779-783.
- Arcos-Burgos, M., and M. Muenke, 2002 Genetics of population isolates. *Clin Genet* 61: 233-247.
- Arvaniti, F., and D. B. Panagiotakos, 2008 Healthy indexes in public health practice and research: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 48: 317-327.
- Ashwell, M., P. Gunn and S. Gibson, 2012 Waist-to-height ratio is a better screening tool than waist circumference and BMI for adult cardiometabolic risk factors: systematic review and meta-analysis. *Obes Rev* 13: 275-286.
- Ashwell, M., and S. D. Hsieh, 2005 Six reasons why the waist-to-height ratio is a rapid and effective global indicator for health risks of obesity and how its use could simplify the international public health message on obesity. *Int J Food Sci Nutr* 56: 303-307.
- Assmann, G., and H. Schulte, 1992 Relation of high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides to incidence of atherosclerotic coronary artery disease (the PROCAM experience). Prospective Cardiovascular Munster study. *Am J Cardiol* 70: 733-737.
- Athanasiadis, A., 2012 Morbidity and mortality of four commune area of the Echinis Medical Centre <http://www.2040.syzefxis.gov.gr/images/athanasiadis.pdf>, pp. in *Epidemiological Map of the Cross-border Area of the Region of Eastern Macedonia-Thrace*, Alexandroupolis.
- Athyros, V. G., V. I. Bouloukos, A. N. Pehlivanidis, A. A. Papageorgiou, S. G. Dionysopoulou *et al.*, 2005 The prevalence of the metabolic syndrome in Greece: the MetS-Greece Multicentre Study. *Diabetes Obes Metab* 7: 397-405.
- Aulchenko, Y. S., S. Ripke, A. Isaacs and C. M. van Duijn, 2007 GenABEL: an R library for genome-wide association analysis. *Bioinformatics* 23: 1294-1296.
- Avogaro, P. C. G., 1965 Essential hyperlipidemia, obesity and diabetes. *Diabetologia*: 1:137.
- Bach, A., L. Serra-Majem, J. L. Carrasco, B. Roman, J. Ngo *et al.*, 2006 The use of indexes evaluating the adherence to the Mediterranean diet in epidemiological studies: a review. *Public Health Nutr* 9: 132-146.
- Baier, L. J., and R. L. Hanson, 2004 Genetic studies of the etiology of type 2 diabetes in Pima Indians: hunting for pieces to a complicated puzzle. *Diabetes* 53: 1181-1186.
- Baigent, C., A. Keech, P. M. Kearney, L. Blackwell, G. Buck *et al.*, 2005 Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet* 366: 1267-1278.
- Balkau, B., and M. A. Charles, 1999 Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *Diabet Med* 16: 442-443.
- Bansilal, S., M. E. Farkouh and V. Fuster, 2007 Role of insulin resistance and hyperglycemia in the development of atherosclerosis. *Am J Cardiol* 99: 6B-14B.
- Baylin, A., R. Deka, J. Tuitele, S. Viali, D. E. Weeks *et al.*, 2013 INSIG2 variants, dietary patterns and metabolic risk in Samoa. *Eur J Clin Nutr* 67: 101-107.
- Berg, A. H., T. P. Combs and P. E. Scherer, 2002 ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 13: 84-89.
- Berg, A. H., and P. E. Scherer, 2005 Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ Res* 96: 939-949.
- Berg, C. M., G. Lappas, E. Strandhagen, A. Wolk, K. Toren *et al.*, 2008 Food patterns and cardiovascular disease risk factors: the Swedish INTERGENE research program. *Am J Clin Nutr* 88: 289-297.
- Bianchi, C., G. Penno, L. Malloggi, R. Barontini, M. Corfini *et al.*, 2008 Non-traditional markers of atherosclerosis potentiate the risk of coronary heart disease in patients with type 2 diabetes and metabolic syndrome. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 18: 31-38.
- Bountziouka, V., E. Bathrellou, A. Giotopoulou, C. Katsagoni, M. Bonou *et al.*, 2012 Development, repeatability and validity regarding energy and macronutrient intake of a semi-quantitative food

- frequency questionnaire: methodological considerations. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 22: 659-667.
- Bourgain, C., and E. Genin, 2005 Complex trait mapping in isolated populations: Are specific statistical methods required? *Eur J Hum Genet* 13: 698-706.
- Bray, G. A., 2004 Medical consequences of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 2583-2589.
- Broman, K. W., and J. L. Weber, 1999 Long homozygous chromosomal segments in reference families from the centre d'Etude du polymorphisme humain. *Am J Hum Genet* 65: 1493-1500.
- Brown, C. M., A. G. Dulloo, G. Yepuri and J. P. Montani, 2008 Fructose ingestion acutely elevates blood pressure in healthy young humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294: R730-737.
- Cambien, F., O. Poirier, L. Lecerf, A. Evans, J. P. Cambou *et al.*, 1992 Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 359: 641-644.
- Cammisotto, P. G., and M. Bendayan, 2007 Leptin secretion by white adipose tissue and gastric mucosa. *Histol Histopathol* 22: 199-210.
- Can, A. S., T. P. Bersot, M. Gonen, G. Pekcan, N. Rakicioglu *et al.*, 2009 Anthropometric indices and their relationship with cardiometabolic risk factors in a sample of Turkish adults. *Public Health Nutr* 12: 538-546.
- Carr, M. C., and J. D. Brunzell, 2004 Abdominal obesity and dyslipidemia in the metabolic syndrome: importance of type 2 diabetes and familial combined hyperlipidemia in coronary artery disease risk. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 2601-2607.
- Cascio, G., G. Schiera and I. Di Liegro, 2012 Dietary fatty acids in metabolic syndrome, diabetes and cardiovascular diseases. *Curr Diabetes Rev* 8: 2-17.
- Caterson, I. D., and T. P. Gill, 2002 Obesity: epidemiology and possible prevention. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 16: 595-610.
- Chaer, R. A., R. Billeh and M. G. Massad, 2004 Genetics and gene manipulation therapy of premature coronary artery disease. *Cardiology* 101: 122-130.
- Chambers, J. C., P. Elliott, D. Zabaneh, W. Zhang, Y. Li *et al.*, 2008 Common genetic variation near MC4R is associated with waist circumference and insulin resistance. *Nat Genet* 40: 716-718.
- Chapman, M. J., G. Assmann, J. C. Fruchart, J. Shepherd and C. Sirtori, 2004 Raising high-density lipoprotein cholesterol with reduction of cardiovascular risk: the role of nicotinic acid--a position paper developed by the European Consensus Panel on HDL-C. *Curr Med Res Opin* 20: 1253-1268.
- Charrow, J., 2004 Ashkenazi Jewish genetic disorders. *Fam Cancer* 3: 201-206.
- Chiha, M., M. Njeim and E. G. Chedrawy, 2012 Diabetes and coronary heart disease: a risk factor for the global epidemic. *Int J Hypertens* 2012: 697240.
- Ciullo, M., C. Bellenguez, V. Colonna, T. Natile, A. Calabria *et al.*, 2006 New susceptibility locus for hypertension on chromosome 8q by efficient pedigree-breaking in an Italian isolate. *Hum Mol Genet* 15: 1735-1743.
- Comuzzie, A. G., S. A. Cole, S. L. Laston, V. S. Voruganti, K. Haack *et al.*, 2012 Novel genetic loci identified for the pathophysiology of childhood obesity in the Hispanic population. *PLoS One* 7: e51954.
- Conroy, R. M., K. Pyorala, A. P. Fitzgerald, S. Sans, A. Menotti *et al.*, 2003 Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. *Eur Heart J* 24: 987-1003.
- Corella, D., M. Guillen, C. Saiz, O. Portoles, A. Sabater *et al.*, 2002 Associations of LPL and APOC3 gene polymorphisms on plasma lipids in a Mediterranean population: interaction with tobacco smoking and the APOE locus. *J Lipid Res* 43: 416-427.
- Corella, D., O. Portoles, L. Arriola, M. D. Chirlaque, A. Barricarte *et al.*, 2011 Saturated fat intake and alcohol consumption modulate the association between the APOE polymorphism and risk of future coronary heart disease: a nested case-control study in the Spanish EPIC cohort. *J Nutr Biochem* 22: 487-494.
- Cornier, M. A., D. Dabelea, T. L. Hernandez, R. C. Lindstrom, A. J. Steig *et al.*, 2008 The metabolic syndrome. *Endocr Rev* 29: 777-822.
- Cusi, K., 2010 The role of adipose tissue and lipotoxicity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Curr Diab Rep* 10: 306-315.

- Dauchet, L., E. Kesse-Guyot, S. Czernichow, S. Bertrais, C. Estaquio *et al.*, 2007 Dietary patterns and blood pressure change over 5-y follow-up in the SU.VI.MAX cohort. *Am J Clin Nutr* 85: 1650-1656.
- de Andrade, F. M., A. C. Bulhoses, S. W. Maluf, J. B. Schuch, F. Voigt *et al.*, 2010 The influence of nutrigenetics on the lipid profile: interaction between genes and dietary habits. *Biochem Genet* 48: 342-355.
- de la Chapelle, A., and F. A. Wright, 1998 Linkage disequilibrium mapping in isolated populations: the example of Finland revisited. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 12416-12423.
- Dedoussis, G. V., S. Kanoni, E. Mariani, L. Cattini, G. Herbein *et al.*, 2008 Mediterranean diet and plasma concentration of inflammatory markers in old and very old subjects in the ZINCAGE population study. *Clin Chem Lab Med* 46: 990-996.
- Deloukas, P., S. Kanoni, C. Willenborg, M. Farrall, T. L. Assimes *et al.*, 2013 Large-scale association analysis identifies new risk loci for coronary artery disease. *Nat Genet* 45: 25-33.
- Deurenberg, P., M. Yap and W. A. van Staveren, 1998 Body mass index and percent body fat: a meta analysis among different ethnic groups. *Int J Obes Relat Metab Disord* 22: 1164-1171.
- Devaraj, S., R. S. Rosenson and I. Jialal, 2004 Metabolic syndrome: an appraisal of the pro-inflammatory and procoagulant status. *Endocrinol Metab Clin North Am* 33: 431-453, table of contents.
- Dimitriou, M., L. S. Rallidis, E. V. Theodoraki, I. P. Kalafati, G. Kolovou *et al.*, 2016 Exclusive olive oil consumption has a protective effect on coronary artery disease; overview of the THISEAS study. *Public Health Nutr* 19: 1081-1087.
- Djousse, L., D. K. Arnett, J. H. Eckfeldt, M. A. Province, M. R. Singer *et al.*, 2004 Alcohol consumption and metabolic syndrome: does the type of beverage matter? *Obes Res* 12: 1375-1385.
- Do, R., C. Xie, X. Zhang, S. Mannisto, K. Harald *et al.*, 2011 The effect of chromosome 9p21 variants on cardiovascular disease may be modified by dietary intake: evidence from a case/control and a prospective study. *PLoS Med* 8: e1001106.
- Duc Son le, N. T., T. T. Hanh, K. Kusama, D. Kunii, T. Sakai *et al.*, 2005 Anthropometric characteristics, dietary patterns and risk of type 2 diabetes mellitus in Vietnam. *J Am Coll Nutr* 24: 229-234.
- Dwyer, J. H., H. Allayee, K. M. Dwyer, J. Fan, H. Wu *et al.*, 2004 Arachidonate 5-lipoxygenase promoter genotype, dietary arachidonic acid, and atherosclerosis. *N Engl J Med* 350: 29-37.
- Ekelund, J., I. Hovatta, A. Parker, T. Paunio, T. Varilo *et al.*, 2001 Chromosome 1 loci in Finnish schizophrenia families. *Hum Mol Genet* 10: 1611-1617.
- Eleftheria Zeggini, A. M., 2011 *Analysis of Complex Disease Association Studies A practical Guide*. Elsevier/Academic Press, Amsterdam.
- Ervin, R. B., 2009 Prevalence of metabolic syndrome among adults 20 years of age and over, by sex, age, race and ethnicity, and body mass index: United States, 2003-2006. *Natl Health Stat Report*: 1-7.
- Escobar, E., 2002 Hypertension and coronary heart disease. *J Hum Hypertens* 16 Suppl 1: S61-63.
- Ethnologia, b., 1997 *Association for Balkan, Ethnologia balkanica*. .
- Facchini, F. S., C. B. Hollenbeck, J. Jeppesen, Y. D. Chen and G. M. Reaven, 1992 Insulin resistance and cigarette smoking. *Lancet* 339: 1128-1130.
- Fan, A. Z., M. Russell, J. Dorn, J. L. Freudenheim, T. Nochajski *et al.*, 2006 Lifetime alcohol drinking pattern is related to the prevalence of metabolic syndrome. The Western New York Health Study (WNYHS). *Eur J Epidemiol* 21: 129-138.
- Fargnoli, J. L., T. T. Fung, D. M. Olenczuk, J. P. Chamberland, F. B. Hu *et al.*, 2008 Adherence to healthy eating patterns is associated with higher circulating total and high-molecular-weight adiponectin and lower resistin concentrations in women from the Nurses' Health Study. *Am J Clin Nutr* 88: 1213-1224.
- Ford, E. S., 2005 Risks for all-cause mortality, cardiovascular disease, and diabetes associated with the metabolic syndrome: a summary of the evidence. *Diabetes Care* 28: 1769-1778.
- Ford, E. S., M. B. Schulze, T. Pischon, M. M. Bergmann, H. G. Joost *et al.*, 2008 Metabolic syndrome and risk of incident diabetes: findings from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition-Potsdam Study. *Cardiovasc Diabetol* 7: 35.
- Forman, J. P., M. J. Stampfer and G. C. Curhan, 2009 Diet and lifestyle risk factors associated with incident hypertension in women. *JAMA* 302: 401-411.

- Foy, C. G., R. A. Bell, D. F. Farmer, D. C. Goff, Jr. and L. E. Wagenknecht, 2005 Smoking and incidence of diabetes among U.S. adults: findings from the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Diabetes Care* 28: 2501-2507.
- Friedewald, W. T., R. I. Levy and D. S. Fredrickson, 1972 Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 18: 499-502.
- Fung, T. T., M. L. McCullough, P. K. Newby, J. E. Manson, J. B. Meigs *et al.*, 2005 Diet-quality scores and plasma concentrations of markers of inflammation and endothelial dysfunction. *Am J Clin Nutr* 82: 163-173.
- Fung, T. T., E. B. Rimm, D. Spiegelman, N. Rifai, G. H. Tofler *et al.*, 2001 Association between dietary patterns and plasma biomarkers of obesity and cardiovascular disease risk. *Am J Clin Nutr* 73: 61-67.
- Fung, T. T., M. Schulze, J. E. Manson, W. C. Willett and F. B. Hu, 2004 Dietary patterns, meat intake, and the risk of type 2 diabetes in women. *Arch Intern Med* 164: 2235-2240.
- Gallagher, D., S. B. Heymsfield, M. Heo, S. A. Jebb, P. R. Murgatroyd *et al.*, 2000 Healthy percentage body fat ranges: an approach for developing guidelines based on body mass index. *Am J Clin Nutr* 72: 694-701.
- Gami, A. S., B. J. Witt, D. E. Howard, P. J. Erwin, L. A. Gami *et al.*, 2007 Metabolic syndrome and risk of incident cardiovascular events and death: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *J Am Coll Cardiol* 49: 403-414.
- Gao, X., M. Yao, M. A. McCrory, G. Ma, Y. Li *et al.*, 2003 Dietary pattern is associated with homocysteine and B vitamin status in an urban Chinese population. *J Nutr* 133: 3636-3642.
- Gerstein, H. C., and S. E. Capes, 2002 Dysglycemia: a key cardiovascular risk factor. *Semin Vasc Med* 2: 165-174.
- Ghodsee, K. R., 2009 *Muslim lives in Eastern Europe: gender, ethnicity, and the transformation of Isla in postsocialist Bulgaria*. . Princeton University Press.
- Gibson, J., N. E. Morton and A. Collins, 2006 Extended tracts of homozygosity in outbred human populations. *Hum Mol Genet* 15: 789-795.
- Ginsberg, H. N., and P. R. MacCallum, 2009 The obesity, metabolic syndrome, and type 2 diabetes mellitus pandemic: Part I. Increased cardiovascular disease risk and the importance of atherogenic dyslipidemia in persons with the metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. *J Cardiometab Syndr* 4: 113-119.
- Global Lipids Genetics, C., C. J. Willer, E. M. Schmidt, S. Sengupta, G. M. Peloso *et al.*, 2013 Discovery and refinement of loci associated with lipid levels. *Nat Genet* 45: 1274-1283.
- Gordon, D. J., J. L. Probstfield, R. J. Garrison, J. D. Neaton, W. P. Castelli *et al.*, 1989 High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation* 79: 8-15.
- Greene, C. S., N. M. Penrod, S. M. Williams and J. H. Moore, 2009 Failure to replicate a genetic association may provide important clues about genetic architecture. *PLoS One* 4: e5639.
- Gretarsdottir, S., S. Sveinbjornsdottir, H. H. Jonsson, F. Jakobsson, E. Einarsdottir *et al.*, 2002 Localization of a susceptibility gene for common forms of stroke to 5q12. *Am J Hum Genet* 70: 593-603.
- Group, B. H. F. H. P. R., 2008 edition *European cardiovascular disease statistics*.
- Grundy, S. M., 2007 Metabolic syndrome: a multiplex cardiovascular risk factor. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 399-404.
- Grundy, S. M., J. I. Cleeman, S. R. Daniels, K. A. Donato, R. H. Eckel *et al.*, 2005 Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* 112: 2735-2752.
- Gudmundsson, G., S. E. Matthiasson, H. Arason, H. Johannsson, F. Runarsson *et al.*, 2002 Localization of a gene for peripheral arterial occlusive disease to chromosome 1p31. *Am J Hum Genet* 70: 586-592.

- Gutierrez-Repiso, C., F. Soriguer, G. Rojo-Martinez, E. Garcia-Fuentes, S. Valdes *et al.*, 2014 Variable patterns of obesity and cardiometabolic phenotypes and their association with lifestyle factors in the Di@bet.es study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 24: 947-955.
- Haag, M., and N. G. Dippenaar, 2005 Dietary fats, fatty acids and insulin resistance: short review of a multifaceted connection. *Med Sci Monit* 11: RA359-367.
- He, F. J., and G. A. MacGregor, 2007 Salt, blood pressure and cardiovascular disease. *Curr Opin Cardiol* 22: 298-305.
- Helgadóttir, A., G. Thorleifsson, A. Manolescu, S. Gretarsdóttir, T. Blondal *et al.*, 2007 A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction. *Science* 316: 1491-1493.
- Helgason, A., G. Nicholson, K. Stefansson and P. Donnelly, 2003 A reassessment of genetic diversity in Icelanders: strong evidence from multiple loci for relative homogeneity caused by genetic drift. *Ann Hum Genet* 67: 281-297.
- Heutink, P., and B. A. Oostra, 2002 Gene finding in genetically isolated populations. *Hum Mol Genet* 11: 2507-2515.
- Hindorff, L. M., J (European Bioinformatics Institute), J. E. B. I. Morales, H. Junkins, P. Hall, A. Klemm *et al.*, A Catalog of Published Genome-Wide Association Studies. .
- Hodge, A. M., D. R. English, K. O'Dea and G. G. Giles, 2007 Dietary patterns and diabetes incidence in the Melbourne Collaborative Cohort Study. *Am J Epidemiol* 165: 603-610.
- Hokanson, J. E., and M. A. Austin, 1996 Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a meta-analysis of population-based prospective studies. *J Cardiovasc Risk* 3: 213-219.
- Hosseini-Esfahani, F., P. Mirmiran, M. S. Daneshpour, Y. Mehrabi, M. Hedayati *et al.*, 2015 Dietary patterns interact with APOA1/APOC3 polymorphisms to alter the risk of the metabolic syndrome: the Tehran Lipid and Glucose Study. *Br J Nutr* 113: 644-653.
- Houslay, E. S., J. Sarma and N. G. Uren, 2007 The effect of intensive lipid lowering on coronary atheroma and clinical outcome. *Heart* 93: 149-151.
- Hu, F. B., and W. C. Willett, 2002 Optimal diets for prevention of coronary heart disease. *JAMA* 288: 2569-2578.
- Hu, G., Q. Qiao, J. Tuomilehto, B. Balkau, K. Borch-Johnsen *et al.*, 2004 Prevalence of the metabolic syndrome and its relation to all-cause and cardiovascular mortality in nondiabetic European men and women. *Arch Intern Med* 164: 1066-1076.
- Hughey, J. R., P. Paschou, P. Drineas, D. Mastropaolo, D. M. Lotakis *et al.*, 2013 A European population in Minoan Bronze Age Crete. *Nat Commun* 4: 1861.
- Hutley, L., and J. B. Prins, 2005 Fat as an endocrine organ: relationship to the metabolic syndrome. *Am J Med Sci* 330: 280-289.
- Huxley, R., S. Lewington and R. Clarke, 2002 Cholesterol, coronary heart disease and stroke: a review of published evidence from observational studies and randomized controlled trials. *Semin Vasc Med* 2: 315-323.
- InterAct, C., D. Romaguera, T. Norat, P. A. Wark, A. C. Vergnaud *et al.*, 2013 Consumption of sweet beverages and type 2 diabetes incidence in European adults: results from EPIC-InterAct. *Diabetologia* 56: 1520-1530.
- Ioannidis, J. P., 2007 Non-replication and inconsistency in the genome-wide association setting. *Hum Hered* 64: 203-213.
- Iqbal, R., S. Anand, S. Ounpuu, S. Islam, X. Zhang *et al.*, 2008 Dietary patterns and the risk of acute myocardial infarction in 52 countries: results of the INTERHEART study. *Circulation* 118: 1929-1937.
- Iso, H., C. Date, A. Yamamoto, H. Toyoshima, Y. Watanabe *et al.*, 2005 Smoking cessation and mortality from cardiovascular disease among Japanese men and women: the JACC Study. *Am J Epidemiol* 161: 170-179.
- Isomaa, B., P. Almgren, T. Tuomi, B. Forsen, K. Lahti *et al.*, 2001 Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 24: 683-689.

- Jayalath, V. H., R. J. de Souza, V. Ha, A. Mirrahimi, S. Blanco-Mejia *et al.*, 2015 Sugar-sweetened beverage consumption and incident hypertension: a systematic review and meta-analysis of prospective cohorts. *Am J Clin Nutr* 102: 914-921.
- Jeppesen, J., H. O. Hein, P. Suadicani and F. Gyntelberg, 1997 Relation of high TG-low HDL cholesterol and LDL cholesterol to the incidence of ischemic heart disease. An 8-year follow-up in the Copenhagen Male Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 1114-1120.
- Joshi, P. K., T. Esko, H. Mattsson, N. Eklund, I. Gandin *et al.*, 2015 Directional dominance on stature and cognition in diverse human populations. *Nature* 523: 459-462.
- Kafatos, A., A. Diacatou, D. Labadarios, D. Kounali, J. Apostolaki *et al.*, 1993 Nutrition status of the elderly in Anogia, Crete, Greece. *J Am Coll Nutr* 12: 685-692.
- Kafatos, A., J. L. Schlienger, J. P. Deslypere, A. Ferro-Luzzi and J. A. Cruz, 1991 Nutritional status: serum lipids. Euronut SENECA investigators. *Eur J Clin Nutr* 45 Suppl 3: 53-61.
- Kahn, R., J. Buse, E. Ferrannini and M. Stern, 2005 The metabolic syndrome: time for a critical appraisal: joint statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care* 28: 2289-2304.
- Kamel, E. G., G. McNeill and M. C. Van Wijk, 2000 Usefulness of anthropometry and DXA in predicting intra-abdominal fat in obese men and women. *Obes Res* 8: 36-42.
- Kanoni, S., and G. V. Dedoussis, 2008 Design and descriptive characteristics of the GHRAS: the Greek Health Randomized Aging Study. *Med Sci Monit* 14: CR204-212.
- Kant, A. K., A. Schatzkin, G. Block, R. G. Ziegler and M. Nestle, 1991 Food group intake patterns and associated nutrient profiles of the US population. *J Am Diet Assoc* 91: 1532-1537.
- Kaplan, N. M., 1989 The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. *Arch Intern Med* 149: 1514-1520.
- Katan, M. B., 1998 Effect of low-fat diets on plasma high-density lipoprotein concentrations. *Am J Clin Nutr* 67: 573S-576S.
- Kathiresan, S., B. F. Voight, S. Purcell, K. Musunuru, D. Ardisino *et al.*, 2009 Genome-wide association of early-onset myocardial infarction with single nucleotide polymorphisms and copy number variants. *Nat Genet* 41: 334-341.
- Kato, I., Y. Kiyohara, M. Kubo, Y. Tanizaki, H. Arima *et al.*, 2003 Insulin-mediated effects of alcohol intake on serum lipid levels in a general population: the Hisayama Study. *J Clin Epidemiol* 56: 196-204.
- Keys, A., C. Aravanis, H. W. Blackburn, F. S. Van Buchem, R. Buzina *et al.*, 1966 Epidemiological studies related to coronary heart disease: characteristics of men aged 40-59 in seven countries. *Acta Med Scand Suppl* 460: 1-392.
- Keys, A., A. Menotti, C. Aravanis, H. Blackburn, B. S. Djordevic *et al.*, 1984 The seven countries study: 2,289 deaths in 15 years. *Prev Med* 13: 141-154.
- Kim, H. J., T. Higashimori, S. Y. Park, H. Choi, J. Dong *et al.*, 2004 Differential effects of interleukin-6 and -10 on skeletal muscle and liver insulin action in vivo. *Diabetes* 53: 1060-1067.
- King, R. J., S. S. Ozcan, T. Carter, E. Kalfoglu, S. Atasoy *et al.*, 2008 Differential Y-chromosome Anatolian influences on the Greek and Cretan Neolithic. *Ann Hum Genet* 72: 205-214.
- Kirin, M., R. McQuillan, C. S. Franklin, H. Campbell, P. M. McKeigue *et al.*, 2010 Genomic runs of homozygosity record population history and consanguinity. *PLoS One* 5: e13996.
- Klaus, J. R., B. E. Hurwitz, M. M. Llabre, J. S. Skyler, R. B. Goldberg *et al.*, 2009 Central obesity and insulin resistance in the cardiometabolic syndrome: pathways to preclinical cardiovascular structure and function. *J Cardiometab Syndr* 4: 63-71.
- Klok, M. D., S. Jakobsdottir and M. L. Drent, 2007 The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. *Obes Rev* 8: 21-34.
- Klover, P. J., A. H. Clementi and R. A. Mooney, 2005 Interleukin-6 depletion selectively improves hepatic insulin action in obesity. *Endocrinology* 146: 3417-3427.
- Knoops, K. T., L. C. de Groot, D. Kromhout, A. E. Perrin, O. Moreiras-Varela *et al.*, 2004 Mediterranean diet, lifestyle factors, and 10-year mortality in elderly European men and women: the HALE project. *JAMA* 292: 1433-1439.

- Koerner, A., J. Kratzsch and W. Kiess, 2005 Adipocytokines: leptin--the classical, resistin--the controversial, adiponectin--the promising, and more to come. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 19: 525-546.
- Kong, A., G. Masson, M. L. Frigge, A. Gylfason, P. Zusmanovich *et al.*, 2008 Detection of sharing by descent, long-range phasing and haplotype imputation. *Nat Genet* 40: 1068-1075.
- Koochakpoor, G., M. S. Daneshpour, P. Mirmiran, S. A. Hosseini, F. Hosseini-Esfahani *et al.*, 2016 The effect of interaction between Melanocortin-4 receptor polymorphism and dietary factors on the risk of metabolic syndrome. *Nutr Metab (Lond)* 13: 35.
- Koppes, L. L., J. M. Dekker, H. F. Hendriks, L. M. Bouter and R. J. Heine, 2005 Moderate alcohol consumption lowers the risk of type 2 diabetes: a meta-analysis of prospective observational studies. *Diabetes Care* 28: 719-725.
- Kourlaba, G., and D. B. Panagiotakos, 2009 Dietary quality indices and human health: a review. *Maturitas* 62: 1-8.
- Kraja, A. T., D. Vaidya, J. S. Pankow, M. O. Goodarzi, T. L. Assimes *et al.*, 2011 A bivariate genome-wide approach to metabolic syndrome: STAMPEED consortium. *Diabetes* 60: 1329-1339.
- Kristiansson, K., J. Naukkarinen and L. Peltonen, 2008 Isolated populations and complex disease gene identification. *Genome Biol* 9: 109.
- Kristiansson, K., M. Perola, E. Tikkanen, J. Kettunen, I. Surakka *et al.*, 2012 Genome-wide screen for metabolic syndrome susceptibility Loci reveals strong lipid gene contribution but no evidence for common genetic basis for clustering of metabolic syndrome traits. *Circ Cardiovasc Genet* 5: 242-249.
- Kuwahara, K., T. Honda, T. Nakagawa, S. Yamamoto, S. Akter *et al.*, 2015 Associations of leisure-time, occupational, and commuting physical activity with risk of depressive symptoms among Japanese workers: a cohort study. *Int J Behav Nutr Phys Act* 12: 119.
- Lakka, H. M., D. E. Laaksonen, T. A. Lakka, L. K. Niskanen, E. Kumpusalo *et al.*, 2002 The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA* 288: 2709-2716.
- Landsberg, L., L. J. Aronne, L. J. Beilin, V. Burke, L. I. Igel *et al.*, 2013 Obesity-related hypertension: pathogenesis, cardiovascular risk, and treatment: a position paper of The Obesity Society and the American Society of Hypertension. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 15: 14-33.
- Law, M. R., N. J. Wald and S. G. Thompson, 1994 By how much and how quickly does reduction in serum cholesterol concentration lower risk of ischaemic heart disease? *BMJ* 308: 367-372.
- Lee, C. M., R. R. Huxley, R. P. Wildman and M. Woodward, 2008 Indices of abdominal obesity are better discriminators of cardiovascular risk factors than BMI: a meta-analysis. *J Clin Epidemiol* 61: 646-653.
- Lee, D. S., M. J. Pencina, E. J. Benjamin, T. J. Wang, D. Levy *et al.*, 2006 Association of parental heart failure with risk of heart failure in offspring. *N Engl J Med* 355: 138-147.
- Lesnick, T. G., S. Papapetropoulos, D. C. Mash, J. Ffrench-Mullen, L. Shehadeh *et al.*, 2007 A genomic pathway approach to a complex disease: axon guidance and Parkinson disease. *PLoS Genet* 3: e98.
- Lettre, G., C. D. Palmer, T. Young, K. G. Ejebe, H. Allayee *et al.*, 2011 Genome-wide association study of coronary heart disease and its risk factors in 8,090 African Americans: the NHLBI CARE Project. *PLoS Genet* 7: e1001300.
- Lewington, S., R. Clarke, N. Qizilbash, R. Peto and R. Collins, 2002 Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet* 360: 1903-1913.
- Li, W. C., I. C. Chen, Y. C. Chang, S. S. Loke, S. H. Wang *et al.*, 2013 Waist-to-height ratio, waist circumference, and body mass index as indices of cardiometabolic risk among 36,642 Taiwanese adults. *Eur J Nutr* 52: 57-65.
- Liu, S., I. M. Lee, U. Ajani, S. R. Cole, J. E. Buring *et al.*, 2001 Intake of vegetables rich in carotenoids and risk of coronary heart disease in men: The Physicians' Health Study. *Int J Epidemiol* 30: 130-135.

- Locke, A. E., B. Kahali, S. I. Berndt, A. E. Justice, T. H. Pers *et al.*, 2015 Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. *Nature* 518: 197-206.
- Loos, R., 2012a *The genetic determinants of common obesity-susceptibility*. Springer Science, New York.
- Loos, R. J., 2012b Genetic determinants of common obesity and their value in prediction. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 26: 211-226.
- Lopez-Alvarenga, J. C., R. A. Montesinos-Cabrera, C. Velazquez-Alva and J. Gonzalez-Barranco, 2003 Short stature is related to high body fat composition despite body mass index in a Mexican population. *Arch Med Res* 34: 137-140.
- Lopez-Garcia, E., M. B. Schulze, T. T. Fung, J. B. Meigs, N. Rifai *et al.*, 2004 Major dietary patterns are related to plasma concentrations of markers of inflammation and endothelial dysfunction. *Am J Clin Nutr* 80: 1029-1035.
- Lorenzo, C., M. Okoloise, K. Williams, M. P. Stern and S. M. Haffner, 2003 The metabolic syndrome as predictor of type 2 diabetes: the San Antonio heart study. *Diabetes Care* 26: 3153-3159.
- Lowe, J. K., J. B. Maller, I. Pe'er, B. M. Neale, J. Salit *et al.*, 2009 Genome-wide association studies in an isolated founder population from the Pacific Island of Kosrae. *PLoS Genet* 5: e1000365.
- Magi, L., C. Stramenga and P. Morosini, 2005 [Prevalence of the metabolic syndrome among Italian adults. Findings from the SIMAP study]. *Recenti Prog Med* 96: 280-283.
- Malita, F. M., V. Messier, J. M. Lavoie, J. P. Bastard, R. Rabasa-Lhoret *et al.*, 2010 Comparison between several insulin sensitivity indices and metabolic risk factors in overweight and obese postmenopausal women: a MONET study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 20: 173-179.
- Manios, Y., S. Antonopoulou, A. C. Kalliora, G. Felliou and D. Perrea, 2005 Dietary intake and biochemical risk factors for cardiovascular disease in two rural regions of Crete. *J Physiol Pharmacol* 56 Suppl 1: 171-181.
- Manolio, T. A., F. S. Collins, N. J. Cox, D. B. Goldstein, L. A. Hindorff *et al.*, 2009 Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature* 461: 747-753.
- Martinez-Larrad, M. T., C. Fernandez-Perez, J. L. Gonzalez-Sanchez, A. Lopez, J. Fernandez-Alvarez *et al.*, 2005 [Prevalence of the metabolic syndrome (ATP-III criteria). Population-based study of rural and urban areas in the Spanish province of Segovia]. *Med Clin (Barc)* 125: 481-486.
- Martinez, L., S. Mirabal, J. R. Luis and R. J. Herrera, 2008 Middle Eastern and European mtDNA lineages characterize populations from eastern Crete. *Am J Phys Anthropol* 137: 213-223.
- Martinez, L., P. A. Underhill, L. A. Zhivotovsky, T. Gayden, N. K. Moschonas *et al.*, 2007 Paleolithic Y-haplogroup heritage predominates in a Cretan highland plateau. *Eur J Hum Genet* 15: 485-493.
- McCrory, M. A., N. C. Howarth, S. B. Roberts and T. T. Huang, 2011 Eating frequency and energy regulation in free-living adults consuming self-selected diets. *J Nutr* 141: 148-153.
- McKusick, V. A., 2000 Ellis-van Creveld syndrome and the Amish. *Nat Genet* 24: 203-204.
- McNaughton, S. A., G. D. Mishra and E. J. Brunner, 2009 Food patterns associated with blood lipids are predictive of coronary heart disease: the Whitehall II study. *Br J Nutr* 102: 619-624.
- McNeill, A. M., W. D. Rosamond, C. J. Girman, S. H. Golden, M. I. Schmidt *et al.*, 2005 The metabolic syndrome and 11-year risk of incident cardiovascular disease in the atherosclerosis risk in communities study. *Diabetes Care* 28: 385-390.
- McPherson, R., A. Pertsemlidis, N. Kavaslar, A. Stewart, R. Roberts *et al.*, 2007 A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease. *Science* 316: 1488-1491.
- McQuillan, R., A. L. Leutenegger, R. Abdel-Rahman, C. S. Franklin, M. Pericic *et al.*, 2008 Runs of homozygosity in European populations. *Am J Hum Genet* 83: 359-372.
- Menotti, A., A. Keys, C. Aravanis, H. Blackburn, A. Dontas *et al.*, 1989 Seven Countries Study. First 20-year mortality data in 12 cohorts of six countries. *Ann Med* 21: 175-179.
- Michas, G., R. Micha and A. Zampelas, 2014 Dietary fats and cardiovascular disease: putting together the pieces of a complicated puzzle. *Atherosclerosis* 234: 320-328.
- Misra, A., and L. Khurana, 2008 Obesity and the metabolic syndrome in developing countries. *J Clin Endocrinol Metab* 93: S9-30.
- Missoni, S., 2009 Metabolic syndrome among the inhabitants of the island of Vis. *Coll Antropol* 33: 1281-1287.

- Moore, S. C., A. V. Patel, C. E. Matthews, A. Berrington de Gonzalez, Y. Park *et al.*, 2012 Leisure time physical activity of moderate to vigorous intensity and mortality: a large pooled cohort analysis. *PLoS Med* 9: e1001335.
- Morrison, A., and J. E. Hokanson, 2009 The independent relationship between triglycerides and coronary heart disease. *Vasc Health Risk Manag* 5: 89-95.
- Morton, D. H., C. S. Morton, K. A. Strauss, D. L. Robinson, E. G. Puffenberger *et al.*, 2003 Pediatric medicine and the genetic disorders of the Amish and Mennonite people of Pennsylvania. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 121C: 5-17.
- Moschandreas, J., A. Kafatos, C. Aravanis, A. Dontas, A. Menotti *et al.*, 2005 Long-term predictors of survival for the Seven Countries Study cohort from Crete: from 1960 to 2000. *Int J Cardiol* 100: 85-91.
- Mottillo, S., K. B. Filion, J. Genest, L. Joseph, L. Pilote *et al.*, 2010 The metabolic syndrome and cardiovascular risk a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* 56: 1113-1132.
- Mozaffarian, D., M. B. Katan, A. Ascherio, M. J. Stampfer and W. C. Willett, 2006 Trans fatty acids and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 354: 1601-1613.
- Nanri, H., Y. Nishida, K. Nakamura, K. Tanaka, M. Naito *et al.*, 2016 Associations between Dietary Patterns, ADRbeta2 Gln27Glu and ADRbeta3 Trp64Arg with Regard to Serum Triglyceride Levels: J-MICC Study. *Nutrients* 8.
- Neaton, J. D., H. Blackburn, D. Jacobs, L. Kuller, D. J. Lee *et al.*, 1992 Serum cholesterol level and mortality findings for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. Multiple Risk Factor Intervention Trial Research Group. *Arch Intern Med* 152: 1490-1500.
- Nettleton, J. A., J. F. Polak, R. Tracy, G. L. Burke and D. R. Jacobs, Jr., 2009 Dietary patterns and incident cardiovascular disease in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Am J Clin Nutr* 90: 647-654.
- Nettleton, J. A., M. B. Schulze, R. Jiang, N. S. Jenny, G. L. Burke *et al.*, 2008a A priori-defined dietary patterns and markers of cardiovascular disease risk in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Am J Clin Nutr* 88: 185-194.
- Nettleton, J. A., L. M. Steffen, H. Ni, K. Liu and D. R. Jacobs, Jr., 2008b Dietary patterns and risk of incident type 2 diabetes in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Diabetes Care* 31: 1777-1782.
- Nimgaonkar, V. L., R. Ganguli, S. S. Washington and A. Chakravarti, 1992 Schizophrenia and porphobilinogen deaminase gene polymorphisms: an association study. *Schizophr Res* 8: 51-58.
- Nordestgaard, B. G., M. Benn, P. Schnohr and A. Tybjaerg-Hansen, 2007 Nonfasting triglycerides and risk of myocardial infarction, ischemic heart disease, and death in men and women. *JAMA* 298: 299-308.
- O'Keefe, J. H., N. M. Gheewala and J. O. O'Keefe, 2008 Dietary strategies for improving post-prandial glucose, lipids, inflammation, and cardiovascular health. *J Am Coll Cardiol* 51: 249-255.
- Ober, C., Z. Tan, Y. Sun, J. D. Possick, L. Pan *et al.*, 2008 Effect of variation in CHI3L1 on serum YKL-40 level, risk of asthma, and lung function. *N Engl J Med* 358: 1682-1691.
- Ober, C., A. Tsalenko, R. Parry and N. J. Cox, 2000 A second-generation genomewide screen for asthma-susceptibility alleles in a founder population. *Am J Hum Genet* 67: 1154-1162.
- Onat, A., G. Can, G. Hergenc, M. Yazici, A. Karabulut *et al.*, 2007 Serum apolipoprotein B predicts dyslipidemia, metabolic syndrome and, in women, hypertension and diabetes, independent of markers of central obesity and inflammation. *Int J Obes (Lond)* 31: 1119-1125.
- Pajukanta, P., H. E. Lilja, J. S. Sinsheimer, R. M. Cantor, A. J. Lusis *et al.*, 2004 Familial combined hyperlipidemia is associated with upstream transcription factor 1 (USF1). *Nat Genet* 36: 371-376.
- Pala, V., S. Sieri, G. Masala, D. Palli, S. Panico *et al.*, 2006 Associations between dietary pattern and lifestyle, anthropometry and other health indicators in the elderly participants of the EPIC-Italy cohort. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 16: 186-201.
- Palacios, C., C. M. Perez, M. Guzman, A. P. Ortiz, A. Ayala *et al.*, 2011 Association between adiposity indices and cardiometabolic risk factors among adults living in Puerto Rico. *Public Health Nutr* 14: 1714-1723.

- Panagiotakos, D., C. Pitsavos, C. Chryschoou, K. Palliou, I. Lentzas *et al.*, 2009 Dietary patterns and 5-year incidence of cardiovascular disease: a multivariate analysis of the ATTICA study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 19: 253-263.
- Panagiotakos, D. B., C. Pitsavos, F. Arvaniti and C. Stefanadis, 2007a 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* 44: 335-340.
- Panagiotakos, D. B., C. Pitsavos, C. Chryschoou, I. Skoumas and C. Stefanadis, 2008a Five-year incidence of cardiovascular disease and its predictors in Greece: the ATTICA study. *Vasc Med* 13: 113-121.
- Panagiotakos, D. B., C. Pitsavos, C. Chryschoou, I. Skoumas, C. Stefanadis *et al.*, 2008b Five-year incidence of cardiovascular disease and its predictors in Greece: the ATTICA study. *Vasc Med* 13: 113-121.
- Panagiotakos, D. B., C. Pitsavos, C. Chryschoou, J. Skoumas and C. Stefanadis, 2004a Status and management of blood lipids in Greek adults and their relation to socio-demographic, lifestyle and dietary factors: the ATTICA Study. *Blood lipids distribution in Greece. Atherosclerosis* 173: 353-361.
- Panagiotakos, D. B., C. Pitsavos, C. Chryschoou, J. Skoumas, D. Tousoulis *et al.*, 2004b Impact of lifestyle habits on the prevalence of the metabolic syndrome among Greek adults from the ATTICA study. *Am Heart J* 147: 106-112.
- Panagiotakos, D. B., C. Pitsavos, Y. Skoumas and C. Stefanadis, 2007b The association between food patterns and the metabolic syndrome using principal components analysis: The ATTICA Study. *J Am Diet Assoc* 107: 979-987; quiz 997.
- Panagiotakos, D. B., C. H. Pitsavos, C. Chryschoou, J. Skoumas, L. Papadimitriou *et al.*, 2003 Status and management of hypertension in Greece: role of the adoption of a Mediterranean diet: the Attica study. *J Hypertens* 21: 1483-1489.
- Panagiotakos, D. B., N. Tzima, C. Pitsavos, C. Chryschoou, E. Papakonstantinou *et al.*, 2005 The relationship between dietary habits, blood glucose and insulin levels among people without cardiovascular disease and type 2 diabetes; the ATTICA study. *Rev Diabet Stud* 2: 208-215.
- Panagiotakos, D. B., A. Zeimbekis, V. Boutziouka, M. Economou, G. Kourlaba *et al.*, 2007c Long-term fish intake is associated with better lipid profile, arterial blood pressure, and blood glucose levels in elderly people from Mediterranean islands (MEDIS epidemiological study). *Med Sci Monit* 13: CR307-312.
- Panoutsopoulou, K., K. Hatzikotoulas, D. K. Xifara, V. Colonna, A. E. Farmaki *et al.*, 2014 Genetic characterization of Greek population isolates reveals strong genetic drift at missense and trait-associated variants. *Nat Commun* 5: 5345.
- Papamichael, C. M., K. N. Karatzi, T. G. Papaioannou, E. N. Karatzis, P. Katsichti *et al.*, 2008 Acute combined effects of olive oil and wine on pressure wave reflections: another beneficial influence of the Mediterranean diet antioxidants? *J Hypertens* 26: 223-229.
- Pase, M. P., N. Grima, R. Cockerell and A. Pipingas, 2015 Habitual intake of fruit juice predicts central blood pressure. *Appetite* 84: 68-72.
- Patel, C. J., J. Bhattacharya and A. J. Butte, 2010 An Environment-Wide Association Study (EWAS) on type 2 diabetes mellitus. *PLoS One* 5: e10746.
- Patel, C. J., R. Chen, K. Kodama, J. P. Ioannidis and A. J. Butte, 2013 Systematic identification of interaction effects between genome- and environment-wide associations in type 2 diabetes mellitus. *Hum Genet* 132: 495-508.
- Peden, J. F., and M. Farrall, 2011 Thirty-five common variants for coronary artery disease: the fruits of much collaborative labour. *Hum Mol Genet* 20: R198-205.
- Pei, Y. F., L. Zhang, Y. Liu, J. Li, H. Shen *et al.*, 2014 Meta-analysis of genome-wide association data identifies novel susceptibility loci for obesity. *Hum Mol Genet* 23: 820-830.
- Peltonen, L., A. Jalanko and T. Varilo, 1999 Molecular genetics of the Finnish disease heritage. *Hum Mol Genet* 8: 1913-1923.
- Peltonen, L., A. Palotie and K. Lange, 2000 Use of population isolates for mapping complex traits. *Nat Rev Genet* 1: 182-190.

- Pemberton, T. J., and N. A. Rosenberg, 2014 Population-genetic influences on genomic estimates of the inbreeding coefficient: a global perspective. *Hum Hered* 77: 37-48.
- Pigliucci, M., *Phenotypic plasticity: beyond nature and nurture*. . Johns Hopkins University Press Baltimore.
- Pitsavos, C., D. B. Panagiotakos, C. Chrysoshoou and C. Stefanadis, 2003 Epidemiology of cardiovascular risk factors in Greece: aims, design and baseline characteristics of the ATTICA study. *BMC Public Health* 3: 32.
- Pollin, T. I., C. M. Damcott, H. Shen, S. H. Ott, J. Shelton *et al.*, 2008 A null mutation in human APOC3 confers a favorable plasma lipid profile and apparent cardioprotection. *Science* 322: 1702-1705.
- Pouliot, M. C., J. P. Despres, S. Lemieux, S. Moorjani, C. Bouchard *et al.*, 1994 Waist circumference and abdominal sagittal diameter: best simple anthropometric indexes of abdominal visceral adipose tissue accumulation and related cardiovascular risk in men and women. *Am J Cardiol* 73: 460-468.
- Preuss, M., I. R. Konig, J. R. Thompson, J. Erdmann, D. Absher *et al.*, 2010 Design of the Coronary ARtery Disease Genome-Wide Replication And Meta-Analysis (CARDIoGRAM) Study: A Genome-wide association meta-analysis involving more than 22 000 cases and 60 000 controls. *Circ Cardiovasc Genet* 3: 475-483.
- Pruim, R. J., R. P. Welch, S. Sanna, T. M. Teslovich, P. S. Chines *et al.*, 2010 LocusZoom: regional visualization of genome-wide association scan results. *Bioinformatics* 26: 2336-2337.
- Psaltopoulou, T., A. Naska, P. Orfanos, D. Trichopoulos, T. Mountokalakis *et al.*, 2004 Olive oil, the Mediterranean diet, and arterial blood pressure: the Greek European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Am J Clin Nutr* 80: 1012-1018.
- Rachas, A., C. Raffaitin, P. Barberger-Gateau, C. Helmer, K. Ritchie *et al.*, 2012 Clinical usefulness of the metabolic syndrome for the risk of coronary heart disease does not exceed the sum of its individual components in older men and women. The Three-City (3C) Study. *Heart* 98: 650-655.
- Razquin, C., J. Alfredo Martinez, M. A. Martinez-Gonzalez, D. Corella, J. M. Santos *et al.*, 2009 The Mediterranean diet protects against waist circumference enlargement in 12Ala carriers for the PPARGgamma gene: 2 years' follow-up of 774 subjects at high cardiovascular risk. *Br J Nutr* 102: 672-679.
- Reaven, G. M., 1988 Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37: 1595-1607.
- Ried, J. S., M. J. Jeff, A. Y. Chu, J. L. Bragg-Gresham, J. van Dongen *et al.*, 2016 A principal component meta-analysis on multiple anthropometric traits identifies novel loci for body shape. *Nat Commun* 7: 13357.
- Ritchie, S. A., and J. M. Connell, 2007 The link between abdominal obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 17: 319-326.
- Roberts, N. J., J. T. Vogelstein, G. Parmigiani, K. W. Kinzler, B. Vogelstein *et al.*, 2012 The predictive capacity of personal genome sequencing. *Sci Transl Med* 4: 133ra158.
- Rosendorff, C., 2007 Hypertension and coronary artery disease: a summary of the American Heart Association scientific statement. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 9: 790-795.
- Sacks, F. M., and H. Campos, 2003 Clinical review 163: Cardiovascular endocrinology: Low-density lipoprotein size and cardiovascular disease: a reappraisal. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 4525-4532.
- Sacks, F. M., E. Obarzanek, M. M. Windhauser, L. P. Svetkey, W. M. Vollmer *et al.*, 1995 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* 5: 108-118.
- Saely, C. H., S. Aczel, T. Marte, P. Langer, G. Hoefle *et al.*, 2005 The metabolic syndrome, insulin resistance, and cardiovascular risk in diabetic and nondiabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 5698-5703.
- Samani, N. J., J. Erdmann, A. S. Hall, C. Hengstenberg, M. Mangino *et al.*, 2007 Genomewide association analysis of coronary artery disease. *N Engl J Med* 357: 443-453.
- Sandker, G. W., D. Kromhout, C. Aravanis, B. P. Bloembergen, R. P. Mensink *et al.*, 1993 Serum cholesteryl ester fatty acids and their relation with serum lipids in elderly men in Crete and The Netherlands. *Eur J Clin Nutr* 47: 201-208.

- Scherer, P. E., 2006 Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. *Diabetes* 55: 1537-1545.
- Schunkert, H., I. R. König, S. Kathiresan, M. P. Reilly, T. L. Assimes *et al.*, 2011 Large-scale association analysis identifies 13 new susceptibility loci for coronary artery disease. *Nat Genet* 43: 333-338.
- Schwartz, D., and F. Collins, 2007 Medicine. Environmental biology and human disease. *Science* 316: 695-696.
- Services, U. S. D. o. H. a. H., 2004 2004 Surgeon General's Report—The Health Consequences of Smoking.
- ShklyaeV, S., G. Aslanidi, M. Tennant, V. Prima, E. Kohlbrenner *et al.*, 2003 Sustained peripheral expression of transgene adiponectin offsets the development of diet-induced obesity in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 14217-14222.
- Sluijs, I., Y. T. van der Schouw, A. D. van der, A. M. Spijkerman, F. B. Hu *et al.*, 2010 Carbohydrate quantity and quality and risk of type 2 diabetes in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition-Netherlands (EPIC-NL) study. *Am J Clin Nutr* 92: 905-911.
- Sofi, F., R. Abbate, G. F. Gensini and A. Casini, 2010 Accruing evidence on benefits of adherence to the Mediterranean diet on health: an updated systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 92: 1189-1196.
- Song, Y., M. J. Stampfer and S. Liu, 2004 Meta-analysis: apolipoprotein E genotypes and risk for coronary heart disease. *Ann Intern Med* 141: 137-147.
- Stanhope, K. L., J. M. Schwarz, N. L. Keim, S. C. Griffen, A. A. Bremer *et al.*, 2009 Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *J Clin Invest* 119: 1322-1334.
- Storlien, L. H., A. D. Kriketos, A. B. Jenkins, L. A. Baur, D. A. Pan *et al.*, 1997 Does dietary fat influence insulin action? *Ann N Y Acad Sci* 827: 287-301.
- Su, Q., K. G. Rowley, C. Itsiopoulos and K. O'Dea, 2002 Identification and quantitation of major carotenoids in selected components of the Mediterranean diet: green leafy vegetables, figs and olive oil. *Eur J Clin Nutr* 56: 1149-1154.
- Surakka, I., A. Isaacs, L. C. Karssen, P. P. Laurila, R. P. Middelberg *et al.*, 2011 A genome-wide screen for interactions reveals a new locus on 4p15 modifying the effect of waist-to-hip ratio on total cholesterol. *PLoS Genet* 7: e1002333.
- Sutherland, J. P., B. McKinley and R. H. Eckel, 2004 The metabolic syndrome and inflammation. *Metab Syndr Relat Disord* 2: 82-104.
- Svetkey, L. P., D. Simons-Morton, W. M. Vollmer, L. J. Appel, P. R. Conlin *et al.*, 1999 Effects of dietary patterns on blood pressure: subgroup analysis of the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) randomized clinical trial. *Arch Intern Med* 159: 285-293.
- Terwilliger, J. D., and K. M. Weiss, 1998 Linkage disequilibrium mapping of complex disease: fantasy or reality? *Curr Opin Biotechnol* 9: 578-594.
- Teslovich, T. M., K. Musunuru, A. V. Smith, A. C. Edmondson, I. M. Stylianou *et al.*, 2010 Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature* 466: 707-713.
- Thomas, D., 2010 Gene--environment-wide association studies: emerging approaches. *Nat Rev Genet* 11: 259-272.
- Thomas, D., and M. D. Gelehrter, 2003 *Principles of Medical Genetics*. Williams & Wilkins.
- Thompson, T., 1991 *Genetics in Medicine*. W.B.S. Company.
- Trichopoulos, D., and P. Lagiou, 2001 Dietary patterns and mortality. *Br J Nutr* 85: 133-134.
- Trichopoulou, A., T. Costacou, C. Bamia and D. Trichopoulos, 2003 Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *N Engl J Med* 348: 2599-2608.
- Trichopoulou, A., A. Kouris-Blazos, M. L. Wahlqvist, C. Gnardellis, P. Lagiou *et al.*, 1995 Diet and overall survival in elderly people. *BMJ* 311: 1457-1460.
- Turner, R. C., H. Millns, H. A. Neil, I. M. Stratton, S. E. Manley *et al.*, 1998 Risk factors for coronary artery disease in non-insulin dependent diabetes mellitus: United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS: 23). *BMJ* 316: 823-828.

- Tyrovolas, S., G. Pounis, V. Bountziouka, E. Polychronopoulos and D. B. Panagiotakos, 2010 Repeatability and validation of a short, semi-quantitative food frequency questionnaire designed for older adults living in Mediterranean areas: the MEDIS-FFQ. *J Nutr Elder* 29: 311-324.
- Tyrovolas, S., A. Zeimbekis, V. Bountziouka, K. Voutsas, G. Pounis *et al.*, 2009 Factors Associated with the Prevalence of Diabetes Mellitus Among Elderly Men and Women Living in Mediterranean Islands: The MEDIS Study. *Rev Diabet Stud* 6: 54-63.
- Ursin, G., R. G. Ziegler, A. F. Subar, B. I. Graubard, R. W. Haile *et al.*, 1993 Dietary patterns associated with a low-fat diet in the national health examination follow-up study: identification of potential confounders for epidemiologic analyses. *Am J Epidemiol* 137: 916-927.
- van der Horst, I. C., M. W. Nijsten, M. Vogelzang and F. Zijlstra, 2007 Persistent hyperglycemia is an independent predictor of outcome in acute myocardial infarction. *Cardiovasc Diabetol* 6: 2.
- Varilo, T., and L. Peltonen, 2004 Isolates and their potential use in complex gene mapping efforts. *Curr Opin Genet Dev* 14: 316-323.
- Varvounis, M. G., 2000 *Traditional culture of Thrace Pomaks - Folklore essays*. Odysseas.
- Vourvouhaki, E., and G. V. Dedoussis, 2008 Cholesterol ester transfer protein: a therapeutic target in atherosclerosis? *Expert Opin Ther Targets* 12: 937-948.
- Wang, H., S. Dong, H. Xu, J. Qian and J. Yang, 2012 Genetic variants in FTO associated with metabolic syndrome: a meta- and gene-based analysis. *Mol Biol Rep* 39: 5691-5698.
- Wannamethee, S. G., 2008 The metabolic syndrome and cardiovascular risk in the British Regional Heart Study. *Int J Obes (Lond)* 32 Suppl 2: S25-29.
- Wannamethee, S. G., A. G. Shaper, L. Lennon and R. W. Morris, 2005 Metabolic syndrome vs Framingham Risk Score for prediction of coronary heart disease, stroke, and type 2 diabetes mellitus. *Arch Intern Med* 165: 2644-2650.
- Warrington, N. M., L. D. Howe, L. Paternoster, M. Kaakinen, S. Herrala *et al.*, 2015 A genome-wide association study of body mass index across early life and childhood. *Int J Epidemiol* 44: 700-712.
- Welsh, J. A., A. Sharma, J. L. Abramson, V. Vaccarino, C. Gillespie *et al.*, 2010 Caloric sweetener consumption and dyslipidemia among US adults. *JAMA* 303: 1490-1497.
- Wheeler, E., N. Huang, E. G. Bochukova, J. M. Keogh, S. Lindsay *et al.*, 2013 Genome-wide SNP and CNV analysis identifies common and low-frequency variants associated with severe early-onset obesity. *Nat Genet* 45: 513-517.
- Xin, X., J. He, M. G. Frontini, L. G. Ogden, O. I. Motsamai *et al.*, 2001 Effects of alcohol reduction on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Hypertension* 38: 1112-1117.
- Yamaoka, K., and T. Tango, 2012 Effects of lifestyle modification on metabolic syndrome: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med* 10: 138.
- Yusuf, S., S. Hawken, S. Ounpuu, T. Dans, A. Avezum *et al.*, 2004 Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* 364: 937-952.
- Yusuf, S., S. Reddy, S. Ounpuu and S. Anand, 2001 Global burden of cardiovascular diseases: part I: general considerations, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization. *Circulation* 104: 2746-2753.
- Zabaneh, D., and D. J. Balding, 2010 A genome-wide association study of the metabolic syndrome in Indian Asian men. *PLoS One* 5: e11961.
- Zdravkovic, S., A. Wienke, N. L. Pedersen, M. E. Marenberg, A. I. Yashin *et al.*, 2002 Heritability of death from coronary heart disease: a 36-year follow-up of 20 966 Swedish twins. *J Intern Med* 252: 247-254.
- Zimmet, P., K. G. Alberti and J. Shaw, 2001 Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414: 782-787.
- Zimmet, P., D. Magliano, Y. Matsuzawa, G. Alberti and J. Shaw, 2005 The metabolic syndrome: a global public health problem and a new definition. *J Atheroscler Thromb* 12: 295-300.
- Αλαχιώτης, 1992 *Εξέλιξη και μοριακή εξέλιξη*
- Ζαμπέλας, Α., *Κλινική Διαιτολογία και Διατροφή με στοιχεία παθολογίας.*

Θεοφάνης, Μ., Ανακοίνωση στο Διεθνές Επιστημονικό Συνέδριο. Χώρος και περιβάλλον:  
Παγκοσμιοποίηση-Διακυβέρνηση-Βιωσιμότητα Αθήνα, Πάντειο Πανεπιστήμιο.  
Μανιός, Γ., Διατροφική αξιολόγηση: Διαιτολογικό και Ιατρικό Ιστορικό, Σωματομετρικοί, Κλινικοί και  
Βιοχημικοί Δείκτες

## **Παράρτημα**



# The mountainous Cretan dietary patterns and their relationship with cardiovascular risk factors: the Hellenic Isolated Cohorts MANOLIS study

Aliki-Eleni Farmaki<sup>1,\*</sup>, Nigel William Rayner<sup>2,3,4</sup>, Angela Matchan<sup>2</sup>, Panagiota Spiliopoulou<sup>1</sup>, Arthur Gilly<sup>2</sup>, Vasiliki Kariakli<sup>1</sup>, Chrysoula Kiagiadaki<sup>5</sup>, Emmanouil Tsafantakis<sup>5</sup>, Eleftheria Zeggini<sup>2,†</sup> and George Dedoussis<sup>1,†</sup>

<sup>1</sup>Department of Nutrition and Dietetics, School of Health Science and Education, Harokopio University, 70 El Venizelou Avenue, 17671 Athens, Greece: <sup>2</sup>Wellcome Trust Sanger Institute, Cambridge, UK: <sup>3</sup>Wellcome Trust Centre for Human Genetics, University of Oxford, Oxford, UK: <sup>4</sup>Oxford Centre for Diabetes, Endocrinology and Metabolism, Churchill Hospital, Headington, UK: <sup>5</sup>Anogia Medical Centre, Anogia, Crete, Greece

Submitted 10 March 2016: Final revision received 28 October 2016: Accepted 2 November 2016

## Abstract

**Objective:** We carried out *de novo* recruitment of a population-based cohort (MANOLIS study) and describe the specific population, which displays interesting characteristics in terms of diet and health in old age, through deep phenotyping.

**Design:** Cross-sectional study where anthropometric, biochemical and clinical measurements were taken in addition to interview-based completion of an extensive questionnaire on health and lifestyle parameters. Dietary patterns were derived through principal component analysis based on a validated FFQ.

**Setting:** Geographically isolated Mylopotamos villages on Mount Idi, Crete, Greece.

**Subjects:** Adults (*n* 1553).

**Results:** Mean age of the participants was 61.6 years and 55.8% were women. Of the population, 82.7% were overweight or obese with a significantly different prevalence between overweight men and women (43.4 *v.* 34.7%, *P* = 0.002). The majority (70.6%) of participants were married, while a larger proportion of women were widowed than men (27.8 *v.* 3.5%, *P* < 0.001). Smoking was more prevalent in men (38.7 *v.* 8.2%, *P* < 0.001), as 88.8% of women had never smoked. Four dietary patterns emerged as characteristic of the population; these were termed 'local', 'high fat and sugar', 'Greek café/tavern' and 'olive oil, fruits and vegetables'. Individuals more adherent to the local dietary pattern presented higher blood glucose ( $\beta$  = 4.026, *P* < 0.001). Similarly, individuals with higher compliance with the Greek café/tavern pattern had higher waist-to-hip ratio ( $\beta$  = 0.012, *P* < 0.001), blood pressure ( $\beta$  = 1.015, *P* = 0.005) and cholesterol ( $\beta$  = 5.398, *P* < 0.001).

**Conclusions:** Profiling of the MANOLIS elderly population identifies unique unhealthy dietary patterns that are associated with cardiometabolic indices.

## Keywords

Dietary patterns  
Cardiovascular risk  
Isolated population  
Hellenic Isolated Cohorts  
Crete

CVD are the number one cause of death globally, representing 31% of all deaths. By 2030, almost 23.6 million people are predicted to die from CVD annually<sup>(1)</sup>. CVD is reaching epidemic proportions consistent with the world-wide sharp increase in diabetes and obesity<sup>(2)</sup>. Obesity relates to the total fat mass of an individual and is usually approximated by surrogate measurements such as BMI, waist circumference or waist-to-hip ratio (WHR). The latter two measures are more correlated to visceral fat content (central adiposity) than is BMI and are considered strong risk factors for diabetes and cardiometabolic risk<sup>(3,4)</sup>.

Risk factors associated with CVD include age, sex, ethnicity, family history, unhealthy diet, physical inactivity, smoking, alcohol consumption, obesity, hypertension, dyslipidaemia, impaired glucose and insulin metabolism, pro-thrombotic and pro-inflammatory state, and psychological and socio-economic factors<sup>(5,6)</sup>. Interestingly, most of these are associated with lifestyle and can be modified. A recent meta-analysis provided strong evidence that long-term regular lifestyle modification significantly improves many of the intermediate CVD risk factors<sup>(7)</sup>. In addition to environmental effects, a strong genetic component has also been shown to contribute to cardiometabolic disease risk<sup>(8,9)</sup>.

† These authors contributed equally to this work.

\*Corresponding author: Email [alelfarmaki@gmail.com](mailto:alelfarmaki@gmail.com)

© The Authors 2016

The Mediterranean diet represents a combination of many different foods in various consumption frequencies, combined with high levels of physical activity and moderate alcohol consumption, which suggests a more holistic approach to diet and lifestyle that can be incorporated in the term 'pattern'. The 'dietary pattern' approach overcomes both the conceptual and methodological limitations of the 'single nutrients' approach, taking into account the antagonistic, interactive or synergistic relationships between nutrients, as people eat meals consisting of a variety of foods and not isolated nutrients<sup>(10)</sup>.

The Seven Countries Study was the first major study to investigate diet and lifestyle along with other risk factors for CVD<sup>(11)</sup>. One of the regions studied within Greece was Crete, and the study included male residents of rural villages located inland from the northern coast, east of the capital of Heraklion. Cretan farmers were known for their longevity and held the title of the 'gold standard' of health status globally, with a very low prevalence of both CVD and cancer.

The inhabitants of mountainous Mylopotamos villages on Mount Idi, Crete, live in a geographically isolated high-altitude area and have preserved their customs, traditions and (generally) their anthropological type over the centuries. Anecdotally, this population is known to enjoy good health in old age despite a diet high in animal fat. In the present study, we established a well-phenotyped, population-based cohort in order to formally characterize the dietary and lifestyle patterns of this population and link those to traits of cardiometabolic relevance. In particular, we assessed the prevalence of diabetes and cardiovascular risk factors such as hypertension, hyperlipidaemia and obesity in this isolated population, analysed its particular dietary habits, and investigated the interactions among clinical, dietary and biochemical factors that may influence health.

## Methods

### Study population

The Minoan Isolates (MANOLIS) target population was adults originating from the mountainous region of Mylopotamos, on Mount Idi in Crete, which includes Anogia Municipality (2379 inhabitants), Zoniana Municipal Area (1117 inhabitants) and Livadia Local Community (1739 inhabitants). We contacted the local health centre of Anogia and with the cooperation of doctors and nurses from the regional clinics in each village, a total of 1553 volunteers were recruited between June 2010 and November 2012 (Fig. 1). According to the 2011 census, 29.7% of the total population of the region participated in the MANOLIS study.

In regional medical centres, blood samples were collected from the antecubital vein by trained health professionals following blood pressure measurement.

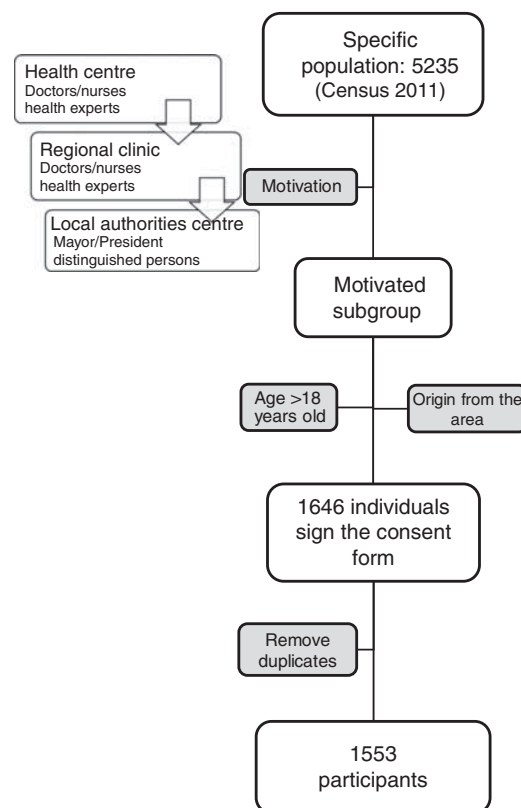


Fig. 1 Recruitment flowchart

All blood draws were conducted in the morning after an overnight fast and compliance was high.

Serum and plasma were isolated following centrifugation at 3000 rpm for 10 min and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for future analyses. All participants were interviewed by trained personnel using a standard questionnaire. The questionnaire included clinical assessment and anthropometric measurement sections, as well as questions about demographic and lifestyle characteristics, detailed medical history, physical activity and dietary habits. The medical history and corresponding medication were cross-checked and confirmed by trained clinicians.

### Anthropometric and biochemical measurements

The anthropometric measurements, including weight, height, waist and hip circumferences, were conducted by trained dietitians using standardized techniques and equipment. Body weight was measured using calibrated analogue scales. For height and other anthropometric measurements a stable tape was used.

BMI was calculated as weight divided by height<sup>2</sup> ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ). BMI was used to classify participants as underweight ( $\text{BMI} < 18.5 \text{ kg}/\text{m}^2$ ), normal weight ( $18.5 \leq \text{BMI} \leq 24.9 \text{ kg}/\text{m}^2$ ), overweight ( $25.0 \leq \text{BMI} \leq 29.9 \text{ kg}/\text{m}^2$ ) or obese ( $\text{BMI} \geq 30.0 \text{ kg}/\text{m}^2$ ). WHR was also calculated.

Biochemical factors were assessed using enzymatic colorimetric assays and included glucose (hexokinase

method), total cholesterol (cholesterol oxidase–phenol aminophenazone method), HDL cholesterol (HDL-C) and TAG (glycerol-3-phosphate oxidase–phenol aminophenazone method). Insulin was measured via chemiluminescence and LDL cholesterol (LDL-C) levels were calculated according to the Friedewald equation<sup>(12)</sup>.

### Demographic and lifestyle information

Information about the marital status (married, separated/divorced, single or widowed) of the participants was collected. Their educational level was defined as no education, primary, secondary or tertiary education, and the total number of years of education was recorded. Smoking habits were also collected. Participants were classified as current smokers, ex-smokers or never smoked. Pack-years was used as a unit for measuring the amount a person had smoked over a long period of time and was calculated by multiplying the number of packs of cigarettes (twenty cigarettes per pack) smoked per day by the number of years the person had smoked.

### Physical activity assessment

Physical activity was evaluated using a brief self-reported validated questionnaire: the Harokopio Physical Activity Questionnaire (HAPAQ)<sup>(13)</sup>. The questionnaire is based on the metabolic equivalents of all activities of the preceding week, including activities at work, leisure time and rest or sleep, thus allowing the prediction of mean physical activity level and mean daily energy expenditure. The compendium of physical activities was used to quantify the intensity and consequently to calculate energy expenditure from the activities identified in the questionnaire using the method of metabolic equivalents<sup>(14)</sup>.

Based on the HAPAQ and its corresponding tool for estimating the necessary variables from the data obtained through the questionnaire, a script, the Physical Activity Program, was developed for time and memory saving purposes in order to derive these estimations directly and save them in one file (<http://www.well.ox.ac.uk/~wrayner/tools/>). This script was written in Perl and can be globally used to transform physical activity data into physical activity level, total energy expenditure and any other intermediate calculations desired.

### Dietary assessment

Dietary information was collected via a validated, semi-quantitative, seventy-six-item FFQ<sup>(15)</sup>. All participants reported their daily, weekly or monthly average intake of several foods during the last year. Then the frequency of consumption was quantified on the basis of servings per week according to the dietary guidelines for adults in Greece<sup>(16)</sup>. Alcohol consumption was also assessed and calculated as drinks per day.

The above-mentioned transformations (foods and food groups in servings) were calculated programmatically.

Energy intake (EI) was extracted from the FFQ. The sex, weight and age data of participants were used to estimate their BMR with the Schofield equations and EI:BMR was calculated in order to identify and exclude energy under-reporters with the Goldberg *et al.* method<sup>(17,18)</sup>. Thus, a physiologically plausible EI:BMR value for our study is 1.15. Individuals whose EI:BMR was below this cut-off point were defined as under-reporters and excluded from subsequent dietary analyses ( $n_{\text{final}}$  1183).

### Statistical analysis

Principal component analysis (PCA) was conducted to identify underlying dietary patterns<sup>(19)</sup>. In order for PCA to be effective in assessing food patterns, strong correlations between the predictive variables should exist. The correlation matrix of the food variables used in the present analysis showed that there were several correlation coefficients ( $r$ )  $> |0.4|$ , indicating that the variables were highly correlated. Moreover, the Kaiser–Meyer–Olkin test of sphericity and Barlett's criterion was 0.76, implying high interrelationships between food variables and suitability of the data set for PCA. The orthogonal rotation (varimax option) was used to derive optimal non-correlated components (dietary patterns). From the entire database fifteen foods or food groups were used. To decide the number of components to retain the Kaiser criterion was used, according to which the number of components that should be retained from PCA is equal to the number of eigenvalues that are greater than 1. In our analysis, a four-component (food pattern) solution was selected. Based on the fact that factor loadings/correlation coefficients represent the correlation of each predicting variable with the dietary pattern score, higher absolute values indicate that the variable contributes more to the construction of this particular pattern. The dietary patterns were named according to scores of the predicting variables that correlated most with the component/pattern ( $> |0.4|$ ). The median was used to divide pattern scoring into two groups: low and high. The PCA was performed using the statistical software package IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. The data handling, basic processing and descriptive characteristics analysis were carried out in R. Outliers were defined as values that exceed 3 SD above or below the mean and were removed from subsequent analyses.

Hypothesis testing was performed using the  $\chi^2$  test for categorical variables and Student's *t* test or the Mann–Whitney for continuous variables in two different groups.

Multiple linear regression modelling was used to examine the associations between cardiometabolic indices and dietary patterns. In particular, three different models were applied: Model 1 was unadjusted; Model 2 included adjustment for age, sex, BMI (with the exception of BMI and WHR, in which analyses BMI was not a covariate), corresponding medication (for hypertension, hyperlipidaemia and diabetes), smoking in pack-years, physical

activity level and EI; and Model 3, as per Model 2 with additional adjustment for the rest of the dietary patterns as these patterns are statistically independent, so it is possible for an individual to have high or low scores on more than one pattern at the same time and therefore all the patterns might act in concert<sup>(20)</sup>. The results from the linear regression models are presented as beta coefficients ( $\beta$ ) and 95% confidence intervals. The linear regressions were performed in IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. In all statistical analyses, the level of nominal significance was set at  $P = 0.05$ .

## Results

The anthropometric and clinical characteristics of the population are presented in Table 1. In total, 1553 individuals were recruited (55.8% women and 44.2% men) with a mean age of 61.6 years. Men had higher waist circumference (103.6 *v.* 97.0 cm) and WHR (0.98 *v.* 0.89) compared with women. The mean value for systolic blood pressure (SBP) was 138 mmHg, with men presenting significantly a higher level than women (140.1 *v.* 136.7 mmHg). Only 17.3% of the participants were categorized as normal weight while the vast majority (82.7%) were categorized as overweight or obese. Vegetables, refined cereals, fruits, meat and dairy were the food groups of the highest weekly consumption. Obesity, hypertension and hyperlipidaemia were the most prevalent diseases in this population (Table 2), with women showing higher morbidity than men.

The sociodemographic and lifestyle characteristics of the population are presented in Table 3. The majority (70.6%) of participants were married, while a larger proportion of the women were widowed (27.8%) compared with the men (3.5%). The majority of participants reported primary education (63.0%) and 10.6% were illiterate. Men had significantly more total years of education than women (6.7 *v.* 5.5 years). A sex-specific difference was found for both current and former smokers, with the proportion of men being four and ten times higher, respectively, than that of women. Moreover, men were found to smoke for significantly longer, presented earlier starting and later quitting age points, and smoked more packs per year than women. Sixty per cent of the population had never smoked, the vast majority of whom were women (81.6%).

From the initial fifty foods and food groups, fifteen were included in the PCA because of their high intercorrelation level. The Kaiser–Meyer–Olkin criterion was equal to 0.76 and the four different diet components explained 51.5% of the total variance of the examined variables. Given that higher absolute values of the score coefficients derived from PCA (see online supplementary material, Supplemental Table 1) indicate that the food contributes more to the development of the component, the components were

defined as follows: (i) the 'local' diet (component 1), which includes homemade pies, legumes, red meat, full-fat cheese and refined cereals; (ii) 'high fat and sugar' diet (component 2) that consists of chocolate, milky and starchy sweets, simple sugars, ready-made pies and cheese-flavoured snacks/chips; (iii) the 'Greek café/tavern' pattern (component 3) that is characterized by coffee and alcohol consumption, olives as a side for alcohol and fries; and (iv) the 'olive oil, fruits and vegetables' pattern (component 4).

The data from biochemical analyses showed that women had significantly higher mean serum levels of HDL-C than men, while men had significantly higher mean glucose, LDL-C and TAG levels compared with women. Notably, mean total cholesterol levels were above the normal range ( $>200$  mg/dl)<sup>(21)</sup> for this population (Table 4). The median was used to divide pattern scoring into two groups: low and high. The group with higher scores of the local pattern had higher mean glucose, while the groups with higher scores of the remaining patterns had lower glucose levels. Mean HDL-C was lower in the group having high scores of the Greek café/tavern pattern, while LDL-C and total cholesterol levels were found to be higher in the group with high scores of both the high fat and sugar and Greek café/tavern patterns. The group with higher scoring on the Greek café/tavern pattern presented higher TAG levels compared with the group with lower scoring on the same pattern and the group with higher scoring on the oil, fruits and vegetables pattern had higher insulin levels.

The results of the multi-adjusted linear regression analysis (Table 5) showed that component 1, representing the local typical diet, was initially associated with BMI, WHR, SBP and diastolic blood pressure (DBP), but the associations were attenuated after adjusting for confounding factors. The local typical diet was found to be consistently associated with serum glucose levels ( $\beta = 4.861$ ,  $P < 0.001$ ;  $\beta = 4.618$ ,  $P < 0.001$  after adjusting for confounders;  $\beta = 4.026$ ,  $P < 0.001$  after adjusting for confounders and the rest of the dietary patterns). Component 2 with high fat and sugar content was found to be negatively associated with BMI, WHR, HDL-C and SBP, but all these associations became non-significant after adjusting for confounding factors. In addition, the high fat and sugar dietary pattern was found to be associated with reduced glucose levels even after adjustment for confounders but not when the remaining diet was taken into account.

Component 3, representing the Greek café/tavern pattern, was associated with reduced HDL-C but the effect was non-significant after adjusting for confounding factors. A consistent association of the Greek café/tavern pattern was found with increased WHR ( $\beta = 0.020$ ,  $P < 0.001$ ;  $\beta = 0.012$ ,  $P < 0.001$  after adjusting for confounders;  $\beta = 0.012$ ,  $P < 0.001$  after adjusting for confounders and the rest of the dietary patterns), DBP ( $\beta = 0.903$ ,  $P = 0.002$ ;  $\beta = 0.846$ ,  $P = 0.014$  after adjusting for confounders;

**Table 1** Anthropometric, clinical and dietary characteristics of the study population by sex: adults from isolated Mylopotamos villages, Crete, Greece, the Hellenic Isolated Cohorts MANOLIS study

|                                  | Total<br>(n 1533; 100.0 %) |          |       | Men<br>(n 687; 44.2 %) |          |       | Women<br>(n 866; 55.8 %) |          |       | P                |
|----------------------------------|----------------------------|----------|-------|------------------------|----------|-------|--------------------------|----------|-------|------------------|
|                                  | n                          | Mean     | SD    | n                      | Mean     | SD    | n                        | Mean     | SD    |                  |
| Age (years)                      | 1520                       | 61.6     | 19.3  | 671                    | 59.0     | 20.5  | 838                      | 63.7     | 18.0  | <b>&lt;0.001</b> |
| Current weight (kg)              | 1344                       | 77.9     | 15.1  | 596                    | 84.8     | 13.8  | 737                      | 72.3     | 13.5  | <b>&lt;0.001</b> |
| BMI (kg/m <sup>2</sup> )         | 1304                       | 29.52    | 4.97  | 585                    | 29.45    | 4.40  | 709                      | 29.60    | 5.39  | 0.877            |
| Standing height (cm)             | 1337                       | 162.5    | 10.0  | 598                    | 169.9    | 7.6   | 728                      | 156.4    | 7.2   | <b>&lt;0.001</b> |
| WC (cm)                          | 1350                       | 100.0    | 13.6  | 594                    | 103.6    | 11.8  | 745                      | 97.0     | 14.1  | <b>&lt;0.001</b> |
| HC (cm)                          | 1337                       | 107.6    | 9.8   | 591                    | 105.9    | 8.2   | 735                      | 109.0    | 10.7  | <b>&lt;0.001</b> |
| WHR                              | 1343                       | 0.93     | 0.10  | 592                    | 0.98     | 0.08  | 740                      | 0.89     | 0.10  | <b>&lt;0.001</b> |
| SBP (mmHg)                       | 1259                       | 138.16   | 19.33 | 552                    | 140.05   | 18.44 | 697                      | 136.71   | 19.93 | <b>0.0011</b>    |
| DBP (mmHg)                       | 1263                       | 78.55    | 10.97 | 553                    | 79.65    | 11.28 | 700                      | 77.68    | 10.63 | <b>0.002</b>     |
| Energy intake (kJ/d)             | 1445                       | 10 096   | 3573  | 645                    | 11 058   | 3741  | 800                      | 9318     | 3234  | <b>&lt;0.001</b> |
| Energy intake (kcal/d)           |                            | 2413     | 854   |                        | 2643     | 894   |                          | 2227     | 773   | <b>&lt;0.001</b> |
| Food consumption (servings/week) |                            |          |       |                        |          |       |                          |          |       |                  |
| Vegetables                       | 1444                       | 27.1     | 14.2  | 644                    | 26.7     | 14.0  | 800                      | 27.5     | 14.3  | 0.260            |
| Refined cereals                  | 1432                       | 24.4     | 11.0  | 639                    | 26.0     | 11.7  | 791                      | 23.2     | 10.3  | <b>&lt;0.001</b> |
| Fruits                           | 1445                       | 22.4     | 12.6  | 645                    | 22.2     | 13.0  | 800                      | 22.5     | 12.3  | 0.737            |
| Meat                             | 1414                       | 19.6     | 11.8  | 633                    | 22.8     | 13.1  | 781                      | 17.0     | 9.8   | <b>&lt;0.001</b> |
| Full-fat dairy                   | 1444                       | 12.2     | 7.1   | 644                    | 13.0     | 7.6   | 800                      | 11.4     | 6.7   | <b>&lt;0.001</b> |
| Sweets                           | 1431                       | 10.0     | 7.4   | 636                    | 11.2     | 7.8   | 795                      | 9.1      | 6.9   | <b>&lt;0.001</b> |
| Coffee                           | 1445                       | 8.1      | 4.9   | 645                    | 9.3      | 4.8   | 800                      | 7.1      | 4.7   | <b>&lt;0.001</b> |
| Fish                             | 1441                       | 5.1      | 4.6   | 644                    | 5.1      | 4.8   | 797                      | 5.2      | 4.5   | 0.763            |
| Alcoholic drinks                 | 1443                       | 4.2      | 7.4   | 645                    | 22.2     | 13.0  | 798                      | 0.6      | 1.3   | <b>&lt;0.001</b> |
| Potatoes                         | 1435                       | 2.8      | 1.9   | 640                    | 2.9      | 1.9   | 795                      | 2.8      | 1.8   | 0.430            |
| Legumes                          | 1437                       | 2.0      | 1.6   | 642                    | 1.9      | 1.6   | 795                      | 2.0      | 1.6   | 0.798            |
|                                  | <u>n</u>                   | <u>%</u> |       | <u>n</u>               | <u>%</u> |       | <u>n</u>                 | <u>%</u> |       |                  |
| BMI status                       | 1291                       |          |       | 583                    |          |       | 708                      |          |       |                  |
| Normal weight                    | 223                        | 17.3     |       | 83                     | 14.2     |       | 140                      | 19.8     |       | <b>0.002</b>     |
| Overweight                       | 500                        | 38.7     |       | 254                    | 43.6     |       | 246                      | 34.7     |       |                  |
| Obese                            | 568                        | 44.0     |       | 246                    | 42.2     |       | 322                      | 45.5     |       |                  |

WC, waist circumference; HC, hip circumference; WHR, waist-to-hip ratio; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure.  
P values <0.05 are indicated in bold font; Student's *t* test for continuous variables,  $\chi^2$  test for categorical variables.

**Table 2** Disease prevalence in the study population by sex: adults from isolated Mylopotamos villages, Crete, Greece, the Hellenic Isolated Cohorts MANOLIS study

| Disease                   | Total (n 1352) |      | Men (n 566) |      | Women (n 786) |      | P                |
|---------------------------|----------------|------|-------------|------|---------------|------|------------------|
|                           | n              | %    | n           | %    | n             | %    |                  |
| Obesity                   | 568            | 42.0 | 246         | 43.5 | 322           | 41.0 | 0.23             |
| Hypertension              | 669            | 49.5 | 256         | 45.2 | 412           | 52.4 | <b>&lt;0.001</b> |
| Hyperlipidaemia           | 509            | 37.7 | 171         | 30.2 | 338           | 43.0 | <b>&lt;0.001</b> |
| Arthritis                 | 448            | 33.1 | 119         | 21.0 | 329           | 41.9 | <b>&lt;0.001</b> |
| Presbyopia                | 415            | 30.7 | 154         | 27.2 | 261           | 33.2 | <b>0.0034</b>    |
| Osteoporosis              | 275            | 20.3 | 7           | 1.2  | 268           | 34.1 | <b>&lt;0.001</b> |
| Type 2 diabetes           | 166            | 12.3 | 67          | 11.8 | 99            | 12.6 | 0.28             |
| Weak hearing              | 203            | 15.0 | 90          | 15.9 | 113           | 14.4 | 0.69             |
| Cataracts                 | 199            | 14.7 | 74          | 13.1 | 125           | 15.9 | 0.12             |
| Chronic stress/depression | 195            | 14.4 | 31          | 5.5  | 164           | 20.9 | <b>&lt;0.001</b> |
| Allergy                   | 182            | 13.5 | 60          | 10.6 | 122           | 15.5 | <b>0.015</b>     |

P values <0.05 are indicated in bold font;  $\chi^2$  test.

**Table 3** Sociodemographic and lifestyle characteristics of the study population by sex: adults from isolated Mylopotamos villages, Crete, Greece, the Hellenic Isolated Cohorts MANOLIS study

|                              | Total |            | Men |            | Women |            | P                |
|------------------------------|-------|------------|-----|------------|-------|------------|------------------|
|                              | n     | %          | n   | %          | n     | %          |                  |
| Marital status               | 1433  | 100.0      | 637 | 44.5       | 796   | 55.5       | <b>&lt;0.001</b> |
| Married                      | 1011  | 70.6       | 503 | 79.0       | 508   | 63.8       |                  |
| In relationship              | 17    | 1.2        | 13  | 2.0        | 4     | 0.5        |                  |
| Separated/divorced           | 9     | 0.6        | 6   | 1.0        | 3     | 0.4        |                  |
| Single                       | 153   | 10.7       | 93  | 14.6       | 60    | 7.5        |                  |
| Widowed                      | 243   | 17.0       | 22  | 3.5        | 221   | 27.8       | <b>&lt;0.001</b> |
| Educational attainment       | 1443  | 100.0      | 645 | 44.7       | 798   | 55.3       |                  |
| No education                 | 153   | 10.6       | 30  | 4.7        | 123   | 15.4       |                  |
| Primary                      | 909   | 63         | 416 | 64.5       | 493   | 61.8       |                  |
| Secondary                    | 314   | 21.8       | 165 | 25.6       | 149   | 18.7       |                  |
| Tertiary                     | 57    | 4.0        | 28  | 4.3        | 29    | 3.6        | <b>&lt;0.001</b> |
| Other                        | 10    | 0.7        | 6   | 0.9        | 4     | 0.5        |                  |
| Smoking habits               | 1440  | 100.0      | 644 | 44.7       | 796   | 55.3       |                  |
| Current smokers              | 314   | 21.8       | 249 | 38.7       | 65    | 8.2        |                  |
| Former smokers               | 259   | 18.0       | 235 | 36.5       | 24    | 3.0        |                  |
| Never smokers                | 867   | 60.2       | 160 | 24.8       | 707   | 88.8       |                  |
|                              | n     | Mean or SD | n   | Mean or SD | n     | Mean or SD |                  |
| Smoking starting age (years) | 502   | 18.9       | 425 | 18.2       | 72    | 23.1       | <b>&lt;0.001</b> |
| SD                           |       | 7.0        |     | 6.5        |       | 8.5        |                  |
| Smoking quitting age (years) | 231   | 51.7       | 214 | 52.3       | 17    | 43.5       | <b>0.028</b>     |
| SD                           |       | 14.5       |     | 14.2       |       | 15.7       |                  |
| Total smoking years          | 317   | 30.2       | 277 | 31.8       | 38    | 19.7       | <b>&lt;0.001</b> |
| SD                           |       | 16.3       |     | 16.3       |       | 12.7       |                  |
| Total years of education     | 1025  | 6.1        | 463 | 6.7        | 555   | 5.5        | <b>&lt;0.001</b> |
| SD                           |       | 3.5        |     | 3.2        |       | 3.7        |                  |

P values <0.05 are indicated in bold font;  $\chi^2$  test for categorical variables, Mann–Whitney test for continuous variables.

$\beta = 1.015$ ,  $P = 0.005$  after adjusting for confounders and the rest of the dietary patterns), total cholesterol ( $\beta = 3.078$ ,  $P = 0.010$ ;  $\beta = 4.883$ ,  $P = 0.001$  after adjusting for confounders;  $\beta = 5.398$ ,  $P < 0.001$  after adjusting for confounders and the rest of the dietary patterns) and LDL-C ( $\beta = 3.977$ ,  $P < 0.001$ ;  $\beta = 3.933$ ,  $P = 0.001$  after adjusting for confounders;  $\beta = 4.401$ ,  $P = 0.001$  after adjusting for confounders and the rest of the dietary patterns).

Component 4, capturing olive oil, fruit and vegetable consumption, was significantly associated with higher BMI ( $\beta = 0.625$ ,  $P < 0.001$ ;  $\beta = 0.350$ ,  $P = 0.009$  after adjusting for

confounders;  $\beta = 0.362$ ,  $P = 0.010$  after adjusting for confounders and the rest of the dietary patterns), WHR ( $\beta = 0.013$ ,  $P < 0.001$ ;  $\beta = 0.011$ ,  $P < 0.001$  after adjusting for confounders;  $\beta = 0.011$ ,  $P < 0.001$  after adjusting for confounders and the rest of the dietary patterns) and insulin levels, but not after adjustment for confounding factors for the latter association. Olive oil, fruit and vegetable consumption was found to be nominally associated with decreased SBP only after adjustment for confounders ( $\beta = -1.252$ ,  $P = 0.010$ ) and taking into account both confounders and the rest of the diet ( $\beta = -1.146$ ,  $P = 0.025$ ).

**Table 4** Biochemical analyses according to low and high adherence to each dietary pattern in the study population: adults from isolated Mylopotamos villages, Crete, Greece, the Hellenic isolated Cohorts MANOLIS study

| Total    |       | Pattern adherence* |       |      |       |                           |             |      |       |                             |                  |      |       |                                    |       |      |                  |  |
|----------|-------|--------------------|-------|------|-------|---------------------------|-------------|------|-------|-----------------------------|------------------|------|-------|------------------------------------|-------|------|------------------|--|
|          |       | 'Local' diet       |       |      |       | 'High fat and sugar' diet |             |      |       | 'Greek café/tavern' pattern |                  |      |       | 'Olive oil, fruits and vegetables' |       |      |                  |  |
|          |       | Low                |       | High |       | Low                       |             | High |       | Low                         |                  | High |       | Low                                |       | High |                  |  |
| <i>n</i> | Mean  | SD                 | Mean  | SD   | Mean  | SD                        | Mean        | SD   | Mean  | SD                          | Mean             | SD   | Mean  | SD                                 | Mean  | SD   | <i>P</i>         |  |
| 1521     | 99.4  | 25.9               | 97.8  | 26.3 | 101.2 | 25.5                      | <b>0.01</b> |      | 95.0  | 22.3                        | <b>&lt;0.001</b> |      | 101.0 | 26.6                               | 98.0  | 25.1 | <b>0.024</b>     |  |
| 1541     | 48.4  | 13.2               | 48.3  | 13.1 | 48.5  | 13.3                      | 0.78        |      | 48.2  | 13.2                        | 0.64             |      | 50.3  | 13.3                               | 46.5  | 12.7 | <b>&lt;0.001</b> |  |
| 1540     | 125.1 | 35.8               | 126.7 | 35.3 | 123.6 | 36.3                      | 0.88        |      | 128.0 | 36.1                        | <b>0.002</b>     |      | 121.5 | 34.6                               | 128.7 | 36.6 | <b>&lt;0.001</b> |  |
| 1525     | 135.6 | 67.4               | 134.4 | 64.2 | 137.0 | 70.6                      | 0.45        |      | 133.8 | 69.8                        | 0.27             |      | 129.5 | 61.8                               | 141.9 | 72.2 | <b>&lt;0.001</b> |  |
| 1515     | 14.6  | 13.5               | 14.6  | 13.5 | 14.5  | 13.4                      | 0.82        |      | 14.5  | 13.6                        | 0.88             |      | 14.3  | 13.1                               | 14.8  | 13.8 | 0.49             |  |
| 1544     | 202.2 | 41.1               | 203.3 | 40.3 | 201.2 | 41.8                      | 0.33        |      | 204.4 | 40.9                        | <b>0.048</b>     |      | 199.4 | 40.7                               | 205.1 | 41.3 | <b>0.007</b>     |  |
|          |       |                    |       |      |       |                           |             |      |       |                             |                  |      |       |                                    |       |      |                  |  |
|          |       |                    |       |      |       |                           |             |      |       |                             |                  |      |       |                                    |       |      |                  |  |
|          |       |                    |       |      |       |                           |             |      |       |                             |                  |      |       |                                    |       |      |                  |  |
|          |       |                    |       |      |       |                           |             |      |       |                             |                  |      |       |                                    |       |      |                  |  |
|          |       |                    |       |      |       |                           |             |      |       |                             |                  |      |       |                                    |       |      |                  |  |
|          |       |                    |       |      |       |                           |             |      |       |                             |                  |      |       |                                    |       |      |                  |  |
|          |       |                    |       |      |       |                           |             |      |       |                             |                  |      |       |                                    |       |      |                  |  |
|          |       |                    |       |      |       |                           |             |      |       |                             |                  |      |       |                                    |       |      |                  |  |
|          |       |                    |       |      |       |                           |             |      |       |                             |                  |      |       |                                    |       |      |                  |  |
|          |       |                    |       |      |       |                           |             |      |       |                             |                  |      |       |                                    |       |      |                  |  |
|          |       |                    |       |      |       |                           |             |      |       |                             |                  |      |       |                                    |       |      |                  |  |
|          |       |                    |       |      |       |                           |             |      |       |                             |                  |      |       |                                    |       |      |                  |  |
|          |       |                    |       |      |       |                           |             |      |       |                             |                  |      |       |                                    |       |      |                  |  |
|          |       |                    |       |      |       |                           |             |      |       |                             |                  |      |       |                                    |       |      |                  |  |
|          |       |                    |       |      |       |                           |             |      |       |                             |                  |      |       |                                    |       |      |                  |  |
|          |       |                    |       |      |       |                           |             |      |       |                             |                  |      |       |                                    |       |      |                  |  |
|          |       |                    |       |      |       |                           |             |      |       |                             |                  |      |       |                                    |       |      |                  |  |
|          |       |                    |       |      |       |                           |             |      |       |                             |                  |      |       |                                    |       |      |                  |  |
|          |       |                    |       |      |       |                           |             |      |       |                             |                  |      |       |                                    |       |      |                  |  |
|          |       |                    |       |      |       |                           |             |      |       |                             |                  |      |       |                                    |       |      |                  |  |
|          |       |                    |       |      |       |                           |             |      |       |                             |                  |      |       |                                    |       |      |                  |  |
|          |       |                    |       |      |       |                           |             |      |       |                             |                  |      |       |                                    |       |      |                  |  |
|          |       |                    |       |      |       |                           |             |      |       |                             |                  |      |       |                                    |       |      |                  |  |
|          |       |                    |       |      |       |                           |             |      |       |                             |                  |      |       |                                    |       |      |                  |  |
|          |       |                    |       |      |       |                           |             |      |       |                             |                  |      |       |                                    |       |      |                  |  |
|          |       |                    |       |      |       |                           |             |      |       |                             |                  |      |       |                                    |       |      |                  |  |
|          |       |                    |       |      |       |                           |             |      |       |                             |                  |      |       |                                    |       |      |                  |  |
|          |       |                    |       |      |       |                           |             |      |       |                             |                  |      |       |                                    |       |      |                  |  |
|          |       |                    |       |      |       |                           |             |      |       |                             |                  |      |       |                                    |       |      |                  |  |
|          |       |                    |       |      |       |                           |             |      |       |                             |                  |      |       |                                    |       |      |                  |  |
|          |       |                    |       |      |       |                           |             |      |       |                             |                  |      |       |                                    |       |      |                  |  |
|          |       |                    |       |      |       |                           |             |      |       |                             |                  |      |       |                                    |       |      |                  |  |
|          |       |                    |       |      |       |                           |             |      |       |                             |                  |      |       |                                    |       |      |                  |  |
|          |       |                    |       |      |       |                           |             |      |       |                             |                  |      |       |                                    |       |      |                  |  |
|          |       |                    |       |      |       |                           |             |      |       |                             |                  |      |       |                                    |       |      |                  |  |
|          |       |                    |       |      |       |                           |             |      |       |                             |                  |      |       |                                    |       |      |                  |  |
|          |       |                    |       |      |       |                           |             |      |       |                             |                  |      |       |                                    |       |      |                  |  |
|          |       |                    |       |      |       |                           |             |      |       |                             |                  |      |       |                                    |       |      |                  |  |
|          |       |                    |       |      |       |                           |             |      |       |                             |                  |      |       |                                    |       |      |                  |  |
|          |       |                    |       |      |       |                           |             |      |       |                             |                  |      |       |                                    |       |      |                  |  |
|          |       |                    |       |      |       |                           |             |      |       |                             |                  |      |       |                                    |       |      |                  |  |
|          |       |                    |       |      |       |                           |             |      |       |                             |                  |      |       |                                    |       |      |                  |  |
|          |       |                    |       |      |       |                           |             |      |       |                             |                  |      |       |                                    |       |      |                  |  |
|          |       |                    |       |      |       |                           |             |      |       |                             |                  |      |       |                                    |       |      |                  |  |
|          |       |                    |       |      |       |                           |             |      |       |                             |                  |      |       |                                    |       |      |                  |  |
|          |       |                    |       |      |       |                           |             |      |       |                             |                  |      |       |                                    |       |      |                  |  |
|          |       |                    |       |      |       |                           |             |      |       |                             |                  |      |       |                                    |       |      |                  |  |
|          |       |                    |       |      |       |                           |             |      |       |                             |                  |      |       |                                    |       |      |                  |  |
|          |       |                    |       |      |       |                           |             |      |       |                             |                  |      |       |                                    |       |      |                  |  |
|          |       |                    |       |      |       |                           |             |      |       |                             |                  |      |       |                                    |       |      |                  |  |
|          |       |                    |       |      |       |                           |             |      |       |                             |                  |      |       |                                    |       |      |                  |  |
|          |       |                    |       |      |       |                           |             |      |       |                             |                  |      |       |                                    |       |      |                  |  |
|          |       |                    |       |      |       |                           |             |      |       |                             |                  |      |       |                                    |       |      |                  |  |
|          |       |                    |       |      |       |                           |             |      |       |                             |                  |      |       |                                    |       |      |                  |  |
|          |       |                    |       |      |       |                           |             |      |       |                             |                  |      |       |                                    |       |      |                  |  |
|          |       |                    |       |      |       |                           |             |      |       |                             |                  |      |       |                                    |       |      |                  |  |

HDL-C, HDL cholesterol; LDL-C, LDL cholesterol; TC, total cholesterol.

*P* values <0.05 are indicated in bold font; Student's *t* test for continuous variables.

\*Low v. high compliance as defined by the median of the corresponding pattern score.

## Discussion

In the present work we describe the collection of a population-based cohort from the isolated Mylopotamos villages on Crete, as part of the Hellenic Isolated Cohorts (HELIC) MANOLIS study ([www.helic.org](http://www.helic.org)). The mean age of this genetically homogeneous<sup>(22)</sup> population from mountainous Mylopotamos was 61.6 years old, denoting an elderly population.

The MANOLIS population cohort was found to be overweight to marginally obese (mean BMI = 29.5 kg/m<sup>2</sup>). This is in keeping with other Greek<sup>(23,24)</sup> and European<sup>(25)</sup> elderly populations. The prevalence of obesity was 44.0% and women showed a higher tendency to be overweight than men. Generally, women were found to present higher morbidity than men, which could be attributed to the fact that the mean age for women was significantly higher. Of the population, 82.7% was overweight or obese, higher than the corresponding percentage (57%) from the same area (Anogia) in 1990<sup>(26)</sup>. One reason for this difference may be the study design as the previous study included only 167 elderly volunteers from Anogia, while our study assessed 1553 participants from different villages including Anogia, Zoniana, Livadia, Gonies, Axos, Astiraki, Kalivos and many others from the Mylopotamos area. Moreover, an increase in physical inactivity due to the changing modes of transportation over the years may also explain the observed shift, as the fundamental cause of obesity and overweight is the energy imbalance between energy consumed and energy expended. Hypertension affected almost half of the MANOLIS population (49.5%), which is 20–25% lower when compared with other Greek studies in the elderly<sup>(23,24)</sup> and another isolated population<sup>(27)</sup>, but 8% higher than the prevalence reported by a study in one of the participating villages (Anogia), 20 years ago<sup>(26)</sup>. The Greek Health Randomized Aging Study (GHRAS) is a study of 782 elderly Greeks, randomly recruited in Athens, with the aim of investigating the interactions among socio-economic, lifestyle, biochemical and psychological factors determining the health status of elderly Greeks<sup>(24)</sup>. The discrepancies for hyperlipidaemia (37.7%) were in the same direction but of extended magnitude compared with GHRAS and the Mediterranean Islands Study (MEDIS), which found a higher prevalence of the disease (87 and 54%, respectively). The prevalence of type 2 diabetes (12.3%) in the MANOLIS population cohort is comparable with that in the general Greek population<sup>(28)</sup> and in other isolated cohorts like the one on the island of Vis in Croatia<sup>(27)</sup>. However, the MANOLIS population does not suffer from associated complications of the disease such as neuropathy, nephropathy, eye disease, etc. Their most prevalent diseases can be grouped into two categories: one related to CVD risk (obesity, hypertension, hyperlipidaemia, type 2 diabetes) and the other related to degenerative diseases which have age-related

**Table 5** Results from multiple linear regression analysis of the association between dietary patterns and cardiovascular risk factors among the study population (*n* 1183): adults from isolated Mylopotamos villages, Crete, Greece, the Hellenic Isolated Cohorts MANOLIS study

|                                       | Model 1* |                |                  | Model 2† |                |                  | Model 3‡              |                |                  |
|---------------------------------------|----------|----------------|------------------|----------|----------------|------------------|-----------------------|----------------|------------------|
|                                       | $\beta$  | 95 % CI        | <i>P</i>         | $\beta$  | 95 % CI        | <i>P</i>         | $\beta$               | 95 % CI        | <i>P</i>         |
| <b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>         |          |                |                  |          |                |                  |                       |                |                  |
| 'Local' diet                          | 0.529    | 0.272, 0.786   | <b>&lt;0.001</b> | 0.004    | -0.330, 0.338  | 0.980            | 0.099                 | -0.270, 0.468  | 0.598            |
| 'High fat and sugar' diet             | -0.461   | -0.718, -0.203 | <b>&lt;0.001</b> | -0.289   | -0.594, 0.015  | 0.063            | -0.193                | -0.526, 0.141  | 0.257            |
| 'Greek café/tavern' pattern           | -0.016   | -0.275, 0.243  | 0.905            | 0.241    | -0.056, 0.538  | 0.112            | 0.202                 | -0.111, 0.515  | 0.205            |
| 'Olive oil, fruits and vegetables'    | 0.625    | 0.368, 0.882   | <b>&lt;0.001</b> | 0.350    | 0.088, 0.613   | <b>0.009</b>     | 0.362                 | 0.087, 0.637   | <b>0.010</b>     |
| <b>WHR</b>                            |          |                |                  |          |                |                  |                       |                |                  |
| 'Local' diet                          | 0.006    | 0.000, 0.011   | <b>0.047</b>     | -0.005   | -0.011, 0.001  | 0.078            | $1.04 \times 10^{-5}$ | -0.006, 0.006  | 0.997            |
| 'High fat and sugar' diet             | -0.018   | -0.024, -0.013 | <b>&lt;0.001</b> | -0.004   | -0.009, 0.002  | 0.171            | $1.4 \times 10^{-4}$  | -0.006, 0.006  | 0.962            |
| 'Greek café/tavern' pattern           | 0.020    | 0.015, 0.026   | <b>&lt;0.001</b> | 0.012    | 0.007, 0.017   | <b>&lt;0.001</b> | 0.012                 | 0.006, 0.017   | <b>&lt;0.001</b> |
| 'Olive oil, fruits and vegetables'    | 0.013    | 0.008, 0.019   | <b>&lt;0.001</b> | 0.011    | 0.007, 0.016   | <b>&lt;0.001</b> | 0.011                 | 0.006, 0.016   | <b>&lt;0.001</b> |
| <b>HDL-C (mg/dl)</b>                  |          |                |                  |          |                |                  |                       |                |                  |
| 'Local' diet                          | -0.247   | -0.992, 0.498  | 0.516            | 0.918    | -0.005, 1.840  | 0.051            | 0.670                 | -0.354, 1.694  | 0.199            |
| 'High fat and sugar' diet             | -0.882   | -1.626, -0.139 | <b>0.02</b>      | -0.709   | -1.555, 0.136  | 0.100            | -0.616                | -1.542, 0.310  | 0.192            |
| 'Greek café/tavern' pattern           | -2.383   | -3.116, -1.650 | <b>&lt;0.001</b> | -0.173   | -0.996, 0.651  | 0.681            | -0.248                | -1.117, 0.621  | 0.576            |
| 'Olive oil, fruits and vegetables'    | -0.442   | -1.187, 0.303  | 0.245            | -0.224   | -0.955, 0.506  | 0.547            | -0.106                | -0.872, 0.660  | 0.786            |
| <b>SBP (mmHg)</b>                     |          |                |                  |          |                |                  |                       |                |                  |
| 'Local' diet                          | 1.726    | 0.708, 2.744   | <b>0.001</b>     | 1.108    | -0.099, 2.315  | 0.072            | 0.598                 | -0.740, 1.935  | 0.381            |
| 'High fat and sugar' diet             | -3.946   | -4.944, -2.948 | <b>&lt;0.001</b> | -0.608   | -1.714, 0.499  | 0.282            | -0.490                | -1.699, 0.720  | 0.427            |
| 'Greek café/tavern' pattern           | -0.873   | -1.894, 0.149  | 0.094            | 0.186    | -0.891, 1.264  | 0.734            | 0.136                 | -0.999, 1.271  | 0.814            |
| 'Olive oil, fruits and vegetables'    | -0.340   | -1.362, 0.683  | 0.515            | -1.252   | -2.206, -0.299 | <b>0.010</b>     | -1.146                | -2.147, -0.145 | <b>0.025</b>     |
| <b>DBP (mmHg)</b>                     |          |                |                  |          |                |                  |                       |                |                  |
| 'Local' diet                          | 0.612    | 0.038, 1.186   | <b>0.037</b>     | 0.329    | -0.431, 1.089  | 0.396            | 0.596                 | -0.245, 1.437  | 0.165            |
| 'High fat and sugar' diet             | 0.062    | -0.513, 0.637  | 0.832            | 0.026    | -0.671, 0.722  | 0.942            | 0.429                 | -0.332, 1.190  | 0.269            |
| 'Greek café/tavern' pattern           | 0.903    | 0.330, 1.475   | <b>0.002</b>     | 0.846    | 0.171, 1.522   | <b>0.014</b>     | 1.015                 | 0.301, 1.729   | <b>0.005</b>     |
| 'Olive oil, fruits and vegetables'    | 0.132    | -0.443, 0.707  | 0.653            | -0.130   | -0.731, 0.472  | 0.672            | 0.012                 | -0.681, 0.641  | 0.970            |
| <b>TC (mg/dl)</b>                     |          |                |                  |          |                |                  |                       |                |                  |
| 'Local' diet                          | 2.067    | -0.27, 4.405   | 0.083            | 1.946    | -1.161, 5.053  | 0.219            | 3.239                 | -0.191, 6.669  | 0.064            |
| 'High fat and sugar' diet             | -1.232   | -3.572, 1.107  | 0.302            | -1.535   | -4.382, 1.313  | 0.291            | 0.673                 | -2.429, 3.776  | 0.670            |
| 'Greek café/tavern' pattern           | 3.078    | 0.744, 5.411   | <b>0.010</b>     | 4.883    | 2.128, 7.638   | <b>0.001</b>     | 5.398                 | 2.488, 8.308   | <b>&lt;0.001</b> |
| 'Olive oil, fruits and vegetables'    | 1.001    | -1.338, 3.341  | 0.401            | 0.330    | -2.128, 2.788  | 0.792            | 1.036                 | -1.530, 3.601  | 0.428            |
| <b>LDL-C (mg/dl)</b>                  |          |                |                  |          |                |                  |                       |                |                  |
| 'Local' diet                          | 1.090    | -0.937, 3.116  | 0.292            | 0.746    | -1.937, 3.429  | 0.585            | 2.111                 | -0.853, 5.074  | 0.163            |
| 'High fat and sugar' diet             | 0.038    | -1.989, 2.065  | 0.971            | -0.692   | -3.151, 1.767  | 0.581            | 1.007                 | -1.673, 3.688  | 0.461            |
| 'Greek café/tavern' pattern           | 3.977    | 1.962, 5.991   | <b>&lt;0.001</b> | 3.933    | 1.550, 6.310   | <b>0.001</b>     | 4.401                 | 1.886, 6.916   | <b>0.001</b>     |
| 'Olive oil, fruits and vegetables'    | 1.136    | -0.891, 3.162  | 0.272            | 0.888    | -1.233, 3.009  | 0.411            | 1.368                 | -0.848, 3.585  | 0.226            |
| <b>Glucose (mg/dl)</b>                |          |                |                  |          |                |                  |                       |                |                  |
| 'Local' diet                          | 4.861    | 3.466, 6.256   | <b>&lt;0.001</b> | 4.618    | 3.025, 6.212   | <b>&lt;0.001</b> | 4.026                 | 2.259, 5.794   | <b>&lt;0.001</b> |
| 'High fat and sugar' diet             | -4.780   | -6.176, -3.384 | <b>&lt;0.001</b> | -1.660   | -3.144, -0.176 | <b>0.028</b>     | -0.987                | -2.595, 0.621  | 0.229            |
| 'Greek café/tavern' pattern           | -1.027   | -2.448, 0.394  | 0.157            | -1.254   | -2.691, 0.183  | 0.087            | -1.053                | -2.553, 0.448  | 0.169            |
| 'Olive oil, fruits and vegetables'    | -0.208   | -1.631, 1.214  | 0.774            | -1.303   | -2.578, -0.027 | <b>0.045</b>     | -0.490                | -1.813, 0.833  | 0.467            |
| <b>Insulin (<math>\mu</math>U/ml)</b> |          |                |                  |          |                |                  |                       |                |                  |
| 'Local' diet                          | 0.389    | -0.364, 1.142  | 0.311            | -0.619   | -1.602, 0.3636 | 0.216            | -0.141                | -1.230, 0.948  | 0.800            |
| 'High fat and sugar' diet             | 0.433    | -0.321, 1.186  | 0.360            | 0.678    | -0.226, 1.582  | 0.141            | 0.765                 | -0.226, 1.756  | 0.130            |
| 'Greek café/tavern' pattern           | 0.631    | -0.121, 1.384  | 0.100            | 0.156    | -0.719, 1.032  | 0.726            | 0.324                 | -0.600, 1.249  | 0.491            |
| 'Olive oil, fruits and vegetables'    | 0.997    | 0.245, 1.748   | <b>0.009</b>     | 0.635    | -0.142, 1.411  | 0.109            | 0.637                 | -0.178, 1.452  | 0.125            |

WHR, waist-to-hip ratio; HDL-C, HDL cholesterol; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; TC, total cholesterol; LDL-C, LDL cholesterol.

*P* values <0.05 are indicated in bold font.

\*Model 1: unadjusted.

†Model 2: adjusted for age, sex, BMI (where applicable), medication (where applicable), physical activity level, smoking and energy intake.

‡Model 3: adjusted for age, sex, BMI (where applicable), medication (where applicable), physical activity level, smoking, energy intake and the remaining food patterns scores.

pathologies (arthritis, presbyopia, osteoporosis, weak hearing, cataracts).

Meat intake of the MANOLIS population was three to eight times higher than that of the Attica general population<sup>(29)</sup> and other Greek elderly populations<sup>(23,24)</sup>. This is consistent with the geography of this mountainous isolated area and the tradition that has been preserved for centuries, with the local primary occupation being livestock farming. The increased alcohol consumption mainly by men reveals the social and cultural aspect of drinking. Men frequenting traditional cafés/bars drink and treat with their homemade alcoholic drink (*raki*) all visitors as a sign of hospitality.

The vast majority of the population was married (70.6%), while less than 1% were separated/divorced, demonstrating the traditional character of the population for which family is the core of social life, a characteristic that is weaker in populations living in more urban areas of Greece<sup>(24,30)</sup>. Most of the participants had attained primary education, with men more educated than women, a characteristic similar to an urban elderly population (GHRAS) but not to a younger urban Greek population<sup>(28)</sup> which has almost double the number of total years of education. This is a characteristic typical of rural areas, where agriculture is the main occupation. Educational attainment in the MANOLIS population is further curtailed by participant age and the effect of the onset of World War II.

Men were heavy smokers while the majority of women had never smoked. The percentage of male current smokers in MANOLIS is three times that in GHRAS (4.7%), while the proportion of females who are current and ex-smokers is much lower than in GHRAS (6 *v.* 16%)<sup>(24)</sup>. Again this demonstrates the traditional nature of the particular society that preserves etiquettes and standards of the past. However, smoking in men was considerably lower (38%) compared with 57% in 1960, when a Cretan population was studied for the first time as part of the Seven Countries Study<sup>(31)</sup>.

Serum glucose levels were the same as in GHRAS<sup>(24)</sup>, while HDL-C levels in MANOLIS were found to be slightly (7–9 mg/dl) lower than those of other elderly Greek and European populations<sup>(24,25)</sup> although the levels appear consistent with previous studies in the area over the past 30 years<sup>(32–35)</sup>. Our population from Mylopotamos had LDL-C levels that were 25–45 mg/dl lower compared with the mean level of both studies among the elderly in Attica<sup>(24)</sup> and Anogia<sup>(32)</sup>. Total cholesterol levels were found to be 20–40 mg/dl lower than those of other studies from Greece and the local area<sup>(24,32,34,35)</sup>, and resembled the levels found from the Seven Countries Study<sup>(31)</sup> in the 1960s. This highlights to some extent the Cretan paradigm of life expectancy and health.

The Mediterranean diet, one of the most studied dietary patterns, has been linked to increased survival, reduced risk of cancers and CVD and increased longevity<sup>(36–38)</sup>,

and has historically been derived from Crete, the origin of our study population. However, taking into account the geographical diversity of this island that affects the availability of food and living conditions, the dietary and lifestyle habits of a mountainous population may differ substantially from those of a valley population. In order to characterize the unique diet of this particular mountainous population from Mylopotamos, PCA, an *a posteriori* technique, was used to investigate patterns in the dietary data. *A posteriori* patterns are generated by empirically obtained data at hand<sup>(39)</sup> and thus they do not necessarily identify ‘healthy’ patterns, but patterns that depict the commonly recognized eating habits of the particular population. The extracted components are based on subjective decisions. The derived patterns found were: the ‘local’ diet pattern, which represents a traditional diet of the native population; the ‘high fat and sugar’ diet pattern, which in addition to high sweet and fat consumption includes the preference for processed and pre-packed food; the ‘Greek café/tavern’ pattern that is characterized by coffee and alcohol consumption, fries and olives as side dishes for alcohol; and the ‘olive oil, fruits and vegetables’ pattern with olive oil, fresh fruit and vegetable consumption.

The associations of these patterns with several cardiovascular risk factors like BMI, WHR, total cholesterol, HDL-C, LDL-C, SBP, DBP, glucose and insulin were evaluated, after removing energy under-reporters. Under-reporting is more frequent among overweight individuals<sup>(40)</sup>, like our study population.

Data analysis revealed no association of any of the derived dietary patterns with HDL-C and insulin. Others like Fung *et al.*<sup>(41)</sup> observed a negative association between insulin and the prudent dietary pattern that included fruits, vegetables, poultry, fish, whole grains and legumes, and a positive association with the Western pattern diet characterized by higher consumption of red and processed meat, French fries, eggs, high-fat dairy products, sweets and refined grains.

The olive oil, fruits and vegetables diet pattern was negatively associated with SBP, suggesting that the antioxidant compounds<sup>(42)</sup> of this specific pattern might play a protective role. Olive oil has a dominant presence in the Mediterranean diet, which has been inversely related to SBP and DBP<sup>(43,44)</sup>. Similar findings have been published before<sup>(45,46)</sup>. However, the olive oil, fruits and vegetables diet pattern was also found to be associated with high BMI and WHR, an effect that could be attributed to the oil, which is the most energy-dense component of the pattern. When the compliance to this pattern (scores) was divided into tertiles, it was the medium tertile, not the higher tertile, that was significantly associated with increased risk for overweight/obesity. The latter might be due to the lack of discriminating capacity of this pattern considering the broadly high consumption of olive oil, fruits and vegetables in the area. In addition, it can be

attributed to the fact that the majority of the specific population is overweight or obese, as well as to the previously mentioned protective role against other cardiometabolic risk factors such as blood pressure. In the Di@bet.es study<sup>(47)</sup>, a negative association was found between the prevalence of metabolic complications and olive oil intake, which explains the so-called 'Spanish paradox' where the morbidity and mortality rates for CVD are lower than expected from the high prevalence of metabolic complications, whether or not related to obesity<sup>(48)</sup>.

The local diet pattern was associated only with higher glucose levels, in line with other studies where dietary patterns characterized by a higher intake of animal fat, mainly red meat and meat products, saturated fat, cholesterol and full-fat dairy products have been associated with increased CVD risk and death rate<sup>(29,49)</sup>. This pattern was not found to be significantly associated with any other cardiometabolic risk factors, which seems surprising considering the unhealthy nature of the diet. This could be explained by the counterpoising effect of low carbohydrate and high fat content in increasing HDL-C levels<sup>(50)</sup>, an independent cardioprotective factor. Furthermore, the absence from the local pattern of any pre-packed or processed products reduces the load of *trans*-fatty acids. These compounds have been shown to have well-established adverse cardiovascular effects<sup>(51)</sup> and decrease HDL-C<sup>(52)</sup>. In addition, the HELIC-MANOLIS population was found to have a low-frequency cardioprotective genetic variant associated with increased HDL-C levels, at a frequency forty times higher than the general Greek population<sup>(53)</sup>. This shepherd population used to spend most of their time high in the mountains with their herds, so goat meat and milk/cheese were in abundance and in fact the only foods available to them to eat at times.

The Greek café/tavern pattern, a unique and very characteristic pattern for the culture of this population, was found to be associated with both BMI and WHR, demonstrating the relationship of this pattern with adiposity, as well as total cholesterol and DBP, indices that contribute more to the cardiometabolic risk. This finding is in absolute accordance with the established knowledge about cardiovascular risk factors<sup>(1)</sup> taking into account the alcohol consumption as a component of this pattern, being in the same direction as observed in the ATTICA study where a diet pattern indicated by alcohol consumption was associated with CVD risk<sup>(29)</sup>.

Our study had an observational, cross-sectional design and therefore shares the limitations of this approach. It is not appropriate to draw causal effect implications or to generalize based on the results from this particular Mylopotamos population. Residual confounding may also exist because of unused/unmeasured variables. Another limitation of the study is the self-reported medical history and medication data. In addition, the FFQ was not validated in this specific population, although it has been

validated in the general Greek population<sup>(15)</sup>. The subjective nature of the decision making in components extraction is a limitation of PCA application. Lastly, we have not corrected our results for the number of tests carried out. We have tested nine outcomes of interest and hence the stringent Bonferroni-corrected *P* value is 0.0056 (=0.05/9). Using this significance threshold, the associations of the local dietary pattern with glucose levels, the Greek café/tavern pattern with WHR and cholesterol levels, and the olive oil, fruits and vegetables diet pattern with WHR, remain significant. The associations of the Greek café/tavern pattern with DBP and LDL-C levels, and of the olive oil, fruits and vegetables diet pattern with BMI and SBP, become suggestive as they no longer reach nominal significance.

## Conclusion

The Cretan MANOLIS population is an isolated, elderly population with hypertension, obesity and hyperlipidaemia as the most prevalent diseases, the percentages of which resemble those of the general population. It can be described as a traditional society with family at the core of social life. The very characteristic dietary patterns, local and Greek café/tavern, identified in our study, are associated with overweight/obesity and other cardiovascular risk factors such as raised glucose, blood pressure and cholesterol levels, predicating their characterization as unhealthy. Consequently, the guidelines for decreasing cardiovascular risk should be applied to this population, through providing further information, raising awareness and policy making in these isolated areas. The burden of dietary compounds like high fat and red meat consumption in this population is not depicted in the intermediate cardiovascular manifestations to the expected extent, indicating compensatory procedures that require further investigation through gene–environment interaction analyses.

## Acknowledgements

**Acknowledgements:** The authors thank the residents of the Mylopotamos villages for taking part. The MANOLIS study is dedicated to the memory of Manolis Giannakakis, 1978–2010. The MANOLIS study has been supported by many individuals who have contributed to sample collection (including Olina Balaouti, Christina Batzaki, Georgios Daskalakis, Eleni Emmanouil, Chrisoula Giannakaki, Margarita Giannakopoulou, Anastasia Kaparou, Vasiliki Kariakli, Stella Koinaki, Dimitra Kokori, Maria Konidari, Hara Koundouraki, Dimitris Koutoukidis, Eirini Mamalaki, Eirini Mpamiaki, George Pananikolaou, Maria Tsoukara, Dimitra Tzakou, Katerina Vosdogianni and Niovi Xenaki), data entry (Eleni Zengini, Thanos Antonos and Dimitra Papagrigoriou) and research



administration (Anja Kolb-Kokocinski, Carol Smee and Danielle Walker). *Financial support*: This work was funded by the Wellcome Trust (grant number 098051) and the European Research Council (grant number ERC-2011-StG 280559-SEPI). The Wellcome Trust had no role in the design, analysis or writing of this article. The European Research Council had no role in the design, analysis or writing of this article. This work has taken place under the auspices of the Alexander S. Onassis Public Benefit Foundation Scholarship Program for Hellenes (grant number GZI 049/2012–2013). The Alexander S. Onassis Public Benefit Foundation had no role in the design, analysis or writing of this article. *Conflict of interest*: None. *Authorship*: E.Z. and G.D. contributed equally to this work. G.D. formulated the research question(s). E.Z. and G.D. designed the study. A.-E.F., P.S., V.K., C.K. and E.T. carried out the study. A.-E.F., N.W.R., A.M. and A.G. analysed the data. A.-E.F. wrote the article. *Ethics of human subject participation*: This study was conducted according to the guidelines laid down in the Declaration of Helsinki and all procedures involving human subjects were approved by the Bioethics Committee of Harokopio University of Athens. Written informed consent was obtained from all participants.

### Supplementary material

To view supplementary material for this article, please visit <https://doi.org/10.1017/S1368980016003207>

### References

- World Health Organization (2015) *Cardiovascular Diseases (CVDs). Fact Sheet* no. 317. Geneva: WHO.
- Zimmet P, Alberti KG & Shaw J (2001) Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* **414**, 782–787.
- Palacios C, Perez CM, Guzman M *et al.* (2011) Association between adiposity indices and cardiometabolic risk factors among adults living in Puerto Rico. *Public Health Nutr* **14**, 1714–1723.
- Ashwell M, Gunn P & Gibson S (2012) Waist-to-height ratio is a better screening tool than waist circumference and BMI for adult cardiometabolic risk factors: systematic review and meta-analysis. *Obes Rev* **13**, 275–286.
- Kahn R, Buse J, Ferrannini E *et al.* (2005) The metabolic syndrome: time for a critical appraisal: joint statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care* **28**, 2289–2304.
- Grundy SM (2007) Metabolic syndrome: a multiplex cardiovascular risk factor. *J Clin Endocrinol Metab* **92**, 399–404.
- Yamaoka K & Tango T (2012) Effects of lifestyle modification on metabolic syndrome: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med* **10**, 138.
- Visscher PM, Brown MA, McCarthy MI *et al.* (2012) Five years of GWAS discovery. *Am J Hum Genet* **90**, 7–24.
- Speliotes EK, Willer CJ, Berndt SI *et al.* (2010) Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. *Nat Genet* **42**, 937–948.
- National Research Council, National Committee on Diet and Health (1989) *Diet and Health: Implications for Reducing Chronic Disease Risk*. Washington, DC: National Academies Press.
- Keys A, Menotti A, Karvonen MJ *et al.* (1986) The diet and 15-year death rate in the seven countries study. *Am J Epidemiol* **124**, 903–915.
- Friedewald WT, Levy RI & Fredrickson DS (1972) Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* **18**, 499–502.
- Yannakoulia M, Melistas L, Solomou E *et al.* (2007) Association of eating frequency with body fatness in pre- and postmenopausal women. *Obesity (Silver Spring)* **15**, 100–106.
- Ainsworth BE, Haskell WL, Herrmann SD *et al.* (2011) 2011 Compendium of Physical Activities: a second update of codes and MET values. *Med Sci Sports Exerc* **43**, 1575–1581.
- Bountziouka V, Bathrellou E, Giotopoulou A *et al.* (2012) Development, repeatability and validity regarding energy and macronutrient intake of a semi-quantitative food frequency questionnaire: methodological considerations. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **22**, 659–667.
- Ministry of Health and Welfare, Supreme Scientific Health Council (1999) Dietary guidelines for adults in Greece. *Arch Hellenic Med* **16**, 516–524.
- Goldberg GR, Black AE, Jebb SA *et al.* (1991) Critical evaluation of energy intake data using fundamental principles of energy physiology: 1. Derivation of cut-off limits to identify under-recording. *Eur J Clin Nutr* **45**, 569–581.
- World Health Organization (1985) *Energy and Protein Requirements. Report of a Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation*. WHO Technical Report Series no. 724. Geneva: WHO.
- Mardia KV, Kent JT & Bibby JM (1979) *Multivariate Analysis*. New York: Academic Press.
- Hu FB (2002) Dietary pattern analysis: a new direction in nutritional epidemiology. *Curr Opin Lipidol* **13**, 3–9.
- Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (2001) Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* **285**, 2486–2497.
- Panoutsopoulou K, Hatzikotoulas K, Xifara DK *et al.* (2014) Genetic characterization of Greek population isolates reveals strong genetic drift at missense and trait-associated variants. *Nat Commun* **5**, 5345.
- Tyrovolas S, Zeimbekis A, Bountziouka V *et al.* (2009) Factors associated with the prevalence of diabetes mellitus among elderly men and women living in Mediterranean Islands: the MEDIS Study. *Rev Diabet Stud* **6**, 54–63.
- Kanoni S & Dedoussis GV (2008) Design and descriptive characteristics of the GHRAS: the Greek Health Randomized Aging Study. *Med Sci Monit* **14**, CR204–CR212.
- Dedoussis GV, Kanoni S, Mariani E *et al.* (2008) Mediterranean diet and plasma concentration of inflammatory markers in old and very old subjects in the ZINCAGE population study. *Clin Chem Lab Med* **46**, 990–996.
- Kafatos A, Diacatou A, Labadarios D *et al.* (1993) Nutrition status of the elderly in Anogia, Crete, Greece. *J Am Coll Nutr* **12**, 685–692.
- Missoni S (2009) Metabolic syndrome among the inhabitants of the island of Vis. *Coll Antropol* **33**, 1281–1287.
- Athyros VG, Bouloukos VI, Pehlivanidis AN *et al.* (2005) The prevalence of the metabolic syndrome in Greece: the MetS-Greece Multicentre Study. *Diabetes Obes Metab* **7**, 397–405.



29. Panagiotakos D, Pitsavos C, Chrysoshoou C *et al.* (2009) Dietary patterns and 5-year incidence of cardiovascular disease: a multivariate analysis of the ATTICA study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **19**, 253–263.
30. Panagiotakos DB, Zeimbekis A, Boutziouka V *et al.* (2007) Long-term fish intake is associated with better lipid profile, arterial blood pressure, and blood glucose levels in elderly people from Mediterranean islands (MEDIS epidemiological study). *Med Sci Monit* **13**, CR307–CR312.
31. Moschandreas J, Kafatos A, Aravanis C *et al.* (2005) Long-term predictors of survival for the Seven Countries Study cohort from Crete: from 1960 to 2000. *Int J Cardiol* **100**, 85–91.
32. Manios Y, Antonopoulou S, Kaliora AC *et al.* (2005) Dietary intake and biochemical risk factors for cardiovascular disease in two rural regions of Crete. *J Physiol Pharmacol* **56**, Suppl. 1, 171–181.
33. Aravanis C, Mensink RP, Corcondilas A *et al.* (1988) Risk factors for coronary heart disease in middle-aged men in Crete in 1982. *Int J Epidemiol* **17**, 779–783.
34. Kafatos A, Schlienger JL, Deslypere JP *et al.* (1991) Nutritional status: serum lipids. Euronut SENECA investigators. *Eur J Clin Nutr* **45**, Suppl. 3, 53–61.
35. Sandker GW, Kromhout D, Aravanis C *et al.* (1993) Serum cholesteryl ester fatty acids and their relation with serum lipids in elderly men in Crete and The Netherlands. *Eur J Clin Nutr* **47**, 201–208.
36. Sofi F, Abbate R, Gensini GF *et al.* (2010) Accruing evidence on benefits of adherence to the Mediterranean diet on health: an updated systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr* **92**, 1189–1196.
37. Trichopoulou A, Costacou T, Bamia C *et al.* (2003) Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *N Engl J Med* **348**, 2599–2608.
38. Knuops KT, de Groot LC, Kromhout D *et al.* (2004) Mediterranean diet, lifestyle factors, and 10-year mortality in elderly European men and women: the HALE project. *JAMA* **292**, 1433–1439.
39. Trichopoulos D & Lagiou P (2001) Dietary patterns and mortality. *Br J Nutr* **85**, 133–134.
40. McCrory MA, Howarth NC, Roberts SB *et al.* (2011) Eating frequency and energy regulation in free-living adults consuming self-selected diets. *J Nutr* **141**, 148–153.
41. Fung TT, Rimm EB, Spiegelman D *et al.* (2001) Association between dietary patterns and plasma biomarkers of obesity and cardiovascular disease risk. *Am J Clin Nutr* **73**, 61–67.
42. Su Q, Rowley KG, Itsiopoulos C *et al.* (2002) Identification and quantitation of major carotenoids in selected components of the Mediterranean diet: green leafy vegetables, figs and olive oil. *Eur J Clin Nutr* **56**, 1149–1154.
43. Psaltopoulou T, Naska A, Orfanos P *et al.* (2004) Olive oil, the Mediterranean diet, and arterial blood pressure: the Greek European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Am J Clin Nutr* **80**, 1012–1018.
44. Papamichael CM, Karatzi KN, Papaioannou TG *et al.* (2008) Acute combined effects of olive oil and wine on pressure wave reflections: another beneficial influence of the Mediterranean diet antioxidants? *J Hypertens* **26**, 223–229.
45. Alonso A, Ruiz-Gutierrez V & Martinez-Gonzalez MA (2006) Monounsaturated fatty acids, olive oil and blood pressure: epidemiological, clinical and experimental evidence. *Public Health Nutr* **9**, 251–257.
46. Ferrara LA, Raimondi AS, d'Episcopo L *et al.* (2000) Olive oil and reduced need for antihypertensive medications. *Arch Intern Med* **160**, 837–842.
47. Gutierrez-Repiso C, Soriguer F, Rojo-Martinez G *et al.* (2014) Variable patterns of obesity and cardiometabolic phenotypes and their association with lifestyle factors in the Di@bet.es study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **24**, 947–955.
48. Serra-Majem L, Ribas L, Tresserras R *et al.* (1995) How could changes in diet explain changes in coronary heart disease mortality in Spain? The Spanish paradox. *Am J Clin Nutr* **61**, 6 Suppl., 1351S–1359S.
49. Walker P, Rhubart-Berg P, McKenzie S *et al.* (2005) Public health implications of meat production and consumption. *Public Health Nutr* **8**, 348–356.
50. Katan MB (1998) Effect of low-fat diets on plasma high-density lipoprotein concentrations. *Am J Clin Nutr* **67**, 3 Suppl., 573S–576S.
51. Michas G, Micha R & Zampelas A (2014) Dietary fats and cardiovascular disease: putting together the pieces of a complicated puzzle. *Atherosclerosis* **234**, 320–328.
52. Mozaffarian D, Katan MB, Ascherio A *et al.* (2006) Trans fatty acids and cardiovascular disease. *N Engl J Med* **354**, 1601–1613.
53. Tachmazidou I, Dedoussis G, Southam L *et al.* (2013) A rare functional cardioprotective APOC3 variant has risen in frequency in distinct population isolates. *Nat Commun* **4**, 2872.

## ARTICLE

Received 22 Apr 2014 | Accepted 22 Sep 2014 | Published 6 Nov 2014

DOI: 10.1038/ncomms6345

OPEN

# Genetic characterization of Greek population isolates reveals strong genetic drift at missense and trait-associated variants

Kalliope Panoutsopoulou<sup>1,\*</sup>, Konstantinos Hatzikotoulas<sup>1,\*</sup>, Dionysia Kiara Xifara<sup>2,3</sup>, Vincenza Colonna<sup>4</sup>, Aliko-Eleni Farmaki<sup>5</sup>, Graham R.S. Ritchie<sup>1,6</sup>, Lorraine Southam<sup>1,2</sup>, Arthur Gilly<sup>1</sup>, Ioanna Tachmazidou<sup>1</sup>, Segun Fatumo<sup>1,7,8</sup>, Angela Matchan<sup>1</sup>, Nigel W. Rayner<sup>1,2,9</sup>, Ioanna Ntalla<sup>5,10</sup>, Massimo Mezzavilla<sup>1,11</sup>, Yuan Chen<sup>1</sup>, Chrysoula Kiagiadaki<sup>12</sup>, Eleni Zengini<sup>13,14</sup>, Vasiliki Mamakou<sup>13,15</sup>, Antonis Athanasiadis<sup>16</sup>, Margarita Giannakopoulou<sup>17</sup>, Vassiliki-Eirini Kariaki<sup>5</sup>, Rebecca N. Nsubuga<sup>18</sup>, Alex Karabarinde<sup>18</sup>, Manjinder Sandhu<sup>1,8</sup>, Gil McVean<sup>2</sup>, Chris Tyler-Smith<sup>1</sup>, Emmanouil Tsafantakis<sup>12</sup>, Maria Karaleftheri<sup>16</sup>, Yali Xue<sup>1</sup>, George Dedoussis<sup>5</sup> & Eleftheria Zeggini<sup>1</sup>

Isolated populations are emerging as a powerful study design in the search for low-frequency and rare variant associations with complex phenotypes. Here we genotype 2,296 samples from two isolated Greek populations, the Pomak villages (HELIC-Pomak) in the North of Greece and the Mylopotamos villages (HELIC-MANOLIS) in Crete. We compare their genomic characteristics to the general Greek population and establish them as genetic isolates. In the MANOLIS cohort, we observe an enrichment of missense variants among the variants that have drifted up in frequency by more than fivefold. In the Pomak cohort, we find novel associations at variants on chr11p15.4 showing large allele frequency increases (from 0.2% in the general Greek population to 4.6% in the isolate) with haematological traits, for example, with mean corpuscular volume (rs7116019,  $P = 2.3 \times 10^{-26}$ ). We replicate this association in a second set of Pomak samples (combined  $P = 2.0 \times 10^{-36}$ ). We demonstrate significant power gains in detecting medical trait associations.

<sup>1</sup>Department of Human Genetics, Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton CB10 1HH, UK. <sup>2</sup>Wellcome Trust Centre for Human Genetics, University of Oxford, Oxford OX3 7BN, UK. <sup>3</sup>Department of Statistics, University of Oxford, Oxford OX1 3TG, UK. <sup>4</sup>Institute of Genetics and Biophysics 'A. Buzzati-Traverso', National Research Council (CNR), Naples 80131, Italy. <sup>5</sup>Department of Nutrition and Dietetics, Harokopio University of Athens, Athens 17671, Greece. <sup>6</sup>European Molecular Biology Laboratory, European Bioinformatics Institute, Hinxton, Cambridge CB10 1SD, UK. <sup>7</sup>H3Africa Bioinformatics Network (H3ABioNet) Node, National Biotechnology Development Agency (NABDA), Federal Ministry of Science and Technology (FMST), Abuja 900107, Nigeria. <sup>8</sup>International Health Research Group, Department of Public Health and Primary Care, University of Cambridge, Cambridge CB1 8NR, UK. <sup>9</sup>Oxford Centre for Diabetes, Endocrinology and Metabolism, University of Oxford, Churchill Hospital, Oxford OX3 7LJ, UK. <sup>10</sup>Department of Health Sciences, University of Leicester, Leicester LE1 7RH, UK. <sup>11</sup>Division of Medical Genetics, Department of Reproductive Sciences and Development, IRCCS-Burlo Garofolo, University of Trieste, Trieste 34137, Italy. <sup>12</sup>Anogia Medical Centre, Anogia 74051, Greece. <sup>13</sup>Dromokaiteio Psychiatric Hospital of Athens, Chaidari, Athens 12461, Greece. <sup>14</sup>Department of Human Metabolism, University of Sheffield, Sheffield S10 2TN, UK. <sup>15</sup>School of Medicine, National and Kapodistrian University of Athens, Goudi, Athens 11527, Greece. <sup>16</sup>Echinos Medical Centre, Xanthi 67300, Greece. <sup>17</sup>School of Health Sciences, Faculty of Nursing, National and Kapodistrian University of Athens, Goudi, Athens 11527, Greece. <sup>18</sup>Medical Research Council/Uganda Virus Research Institute, Uganda Research Unit on AIDS, PO Box 49, Entebbe, Uganda. \* These authors contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to E.Zeg. (email: Eleftheria@sanger.ac.uk).

The study of isolated populations can help to increase the power of genetic association studies in search of low-frequency and rare variant associations with complex traits<sup>1–7</sup>. Population isolates have key features that can be used in disease mapping such as reduced environmental, phenotypic and genetic heterogeneity<sup>8</sup>. Isolated populations are usually contained within a region because of geographical and/or cultural barriers that often coincide with a homogeneous set of environmental exposures, for example, diet and lifestyle. The founding event and the limited or absent gene migration with neighbouring populations give rise to a small effective population size ( $N_e$ ), which is maintained over time and results in increased levels of homozygosity and linkage disequilibrium (LD). The genetic architecture of isolates can be further influenced by population bottlenecks that decrease population size. Under these circumstances, genetic drift can lead to significant reduction of extant genetic variability and drift potentially trait-associated alleles to higher frequency.

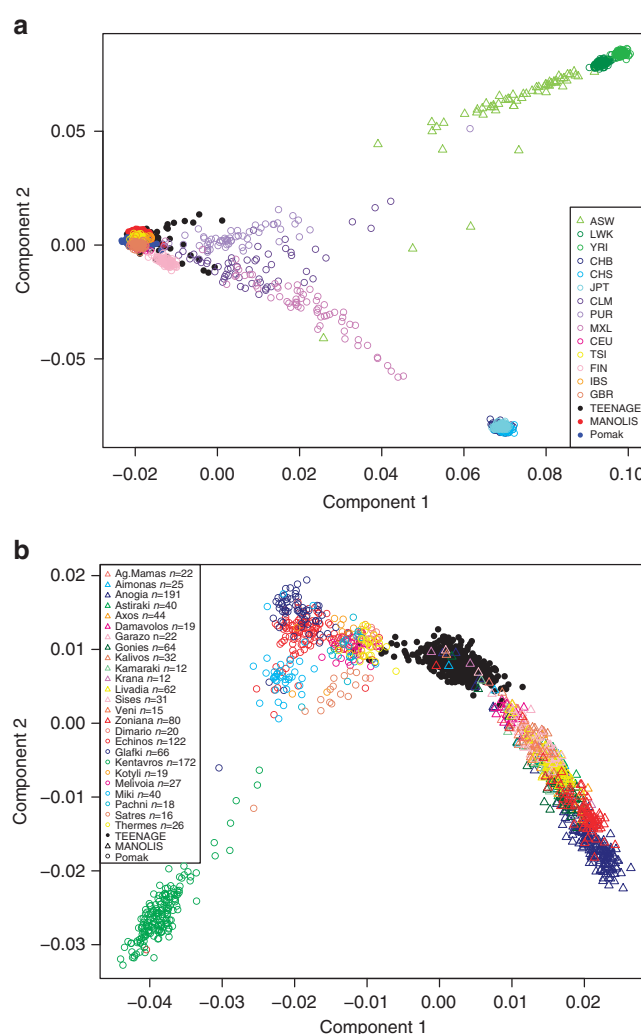
Under the auspices of the HELlenic Isolated Cohorts study (HELIC), we have collected samples from two isolated populations in Greece: the Pomak villages (HELIC-Pomak), a set of religiously isolated mountainous villages in the North of Greece, and the Mylopotamos mountainous villages (HELIC-MANOLIS) on the island of Crete. All samples have information on anthropometric, cardiometabolic, biochemical, haematological and diet-related traits and both cohorts form the substrate for medically relevant trait association studies.

The HELIC-MANOLIS (Minoan isolates) collection comprises individuals from the mountainous Mylopotamos villages, including Anogia, Zoniana, Livadia and Gonies (estimated population size of 6,000 in total). Residents of the Mylopotamos villages have over the centuries preserved their customs, traditions and anthropological character. The Pomaks inhabit the regional units of Xanthi, Rhodope and Evros. The HELIC-Pomak collection comprises individuals from the Pomak villages located in the regional unit of Xanthi (estimated to be 25,000 in total). The Pomaks represent a small minority of Muslims in Greece with uncertain historical origins<sup>9</sup>. The two most dominant theories state that the Pomaks are either descendants of natives of the Rhodope mountains (on the border of Bulgaria and Greece<sup>10</sup> or have come from Asia<sup>11</sup>). The Pomak language is thought to be either a Bulgarian or a Slavic dialect; however, today most Pomaks are also fluent in Turkish and Greek. After World War II and through the end of 1995, most Pomaks lived in a military-restricted zone, access to which required special permission<sup>12</sup>.

The aims of our study are twofold. First, we use genome-wide genotype data to genetically characterize the MANOLIS and Pomak cohorts and compare their allelic architecture to the general Greek population; we demonstrate that isolation caused extensive genetic drift in both isolates. Second, we evaluate the gains in power for complex trait mapping studies that can be afforded by studying well-characterized population isolates in two ways: we calculate power to detect loci that have drifted up in frequency in the isolates compared with the general Greek population highlighting significant theoretical gains in power for variants at the lower end of the minor allele frequency (MAF) spectrum. We then demonstrate this empirically by examining the biological role of these variants and their association with medically important complex traits. We find an enrichment of missense variants among alleles that have drifted up in frequency in the MANOLIS cohort and novel associations between haematological traits and alleles that have drifted up in frequency in the Pomak cohort.

## Results

**Population genetics.** To characterize the isolates in the context of broader global diversity, we applied multidimensional scaling (MDS) analyses including data from the general Greek population and from the 1000 Genomes Project<sup>13</sup>. As expected, the two isolates formed well-defined clusters proximal to the general Greek population (TEENAGE), the Utah Residents with Northern and Western European Ancestry (CEU) and the Toscani in Italia (TSI) population clusters (Fig. 1a). We also observed a distinctive pattern of the two population isolates clustering on either side of the general Greek population (Fig. 1b). This is consistent with the results of population differentiation assessed via pairwise  $F_{st}$  calculations that support higher, albeit still small, genetic differentiation between the isolates ( $F_{st}$  for MANOLIS versus Pomak = 0.005) than between each isolate and the general population ( $F_{st}$  for MANOLIS versus TEENAGE = 0.002 and  $F_{st}$  for Pomak versus TEENAGE = 0.003;



**Figure 1 | Population clustering.** (a) MDS analysis of HELIC-MANOLIS, HELIC-Pomak and TEENAGE combined with populations from the 1000 Genomes Project. (b) MDS analysis of HELIC-MANOLIS villages, HELIC-Pomak villages and TEENAGE. Individuals from the MANOLIS cohort are depicted by the differently coloured hollow triangles with each colour corresponding to the village of origin. Individuals from the Pomak villages are depicted by the differently coloured hollow circles with each colour corresponding to the village of origin. The black solid circles depict individuals from TEENAGE representing the general Greek population.

Supplementary Table 1). MDS analysis at this resolution reveals some intrapopulation structure for the Pomak population where individuals from one particular village (Kentavros) tend to form a distinct cluster (Fig. 1b). Since Kentavros is the largest village population in the Pomak cohort and population structure analyses can be strongly influenced by uneven sampling<sup>14</sup>, we repeated the MDS analysis by randomly selecting  $N=61$  individuals from Kentavros, which is comparable to the size of other large villages; we observe that the subsampled Kentavros individuals do not form a distinct cluster (Supplementary Fig. 1).

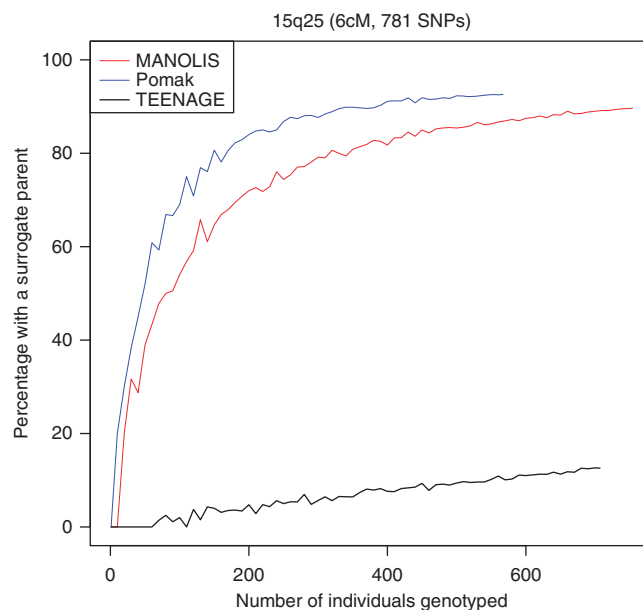
**Levels of isolatedness.** The inbreeding coefficient ( $F_{in}$ ) was higher in the Pomak and MANOLIS populations compared with TEENAGE (0.014, 0.007 and 0.0004, respectively; Supplementary Table 2). Similarly, genome-wide homozygosity ( $F_{hom}$ ) was elevated in the Pomak and MANOLIS populations compared with TEENAGE ( $0.643 \pm 0.006$ ,  $0.639 \pm 0.004$  and  $0.635 \pm 0.002$ , respectively), with the Pomak population showing higher variance in inbreeding than MANOLIS and TEENAGE, in which a tighter distribution is observed (Supplementary Fig. 2).

Consistent with these observations, genomic runs of homozygosity (ROH) show that the two isolated populations have on average a much larger number (nROH) and length (cROH) of ROH than TEENAGE. The Pomak isolate displays higher ROH values with respect to the MANOLIS isolate (Supplementary Table 2; Supplementary Fig. 3). When using a different definition of calling ROH based on LD-pruned data, we observe a larger relative difference in nROH and cROH in the two isolates compared with TEENAGE (Supplementary Table 2). This is expected, given that the ROH detected using the latter approach are likely to be because of recent parental relatedness rather than ancient patterns of shared ancestry.

We computed for each population the proportion of individuals that have at least one ‘surrogate parent’ for randomly chosen regions in the genome of varying length<sup>15</sup>. This concept was coined by Kong *et al.*<sup>15</sup> and refers to individuals from the same population who share local haplotypes with the index individual; these can be used to phase the index individual genotypes as though they are actual parents. Our results for randomly chosen regions across the genome are qualitatively similar. For example, for a region on 15q25 (781 single-nucleotide polymorphisms (SNPs)) we observe that with as little as 300 individuals analysed per population 88% of Pomak individuals and 79% of MANOLIS individuals have at least one ‘surrogate parent’ compared with 6% in the general Greek population (Fig. 2).

Using the modified long-range phasing (LRP) method<sup>15</sup> (Supplementary Methods) we find a much greater extent of haplotype sharing in the isolated populations, with the median length of haplotypes being 1.78, 1.42 and 1.07 cM in the Pomak, MANOLIS and TEENAGE cohorts, respectively (Fig. 3). Consequently, 50% of randomly sampled locations within the genome lie in shared haplotype lengths of at least 12.4, 12.5 and 1.3 cM, respectively (N50 haplotype length; Fig. 3). Interestingly, the distribution of shared haplotype lengths in the isolates is bimodal (Fig. 3), with peaks corresponding to very recent co-ancestry (within the last few generations) and much older co-ancestry (as in the TEENAGE population). Since only unrelated samples have been used in this analysis, it is likely that this difference reflects co-ancestry dating prior and subsequent to the population founding event, respectively.

The extent of isolation of the Pomak and MANOLIS samples is further reflected in the fact that nearest neighbours (NNs), that is, genealogically closest individuals in the sample (Supplementary Methods), are typically chosen from within their cohort: 88.3%



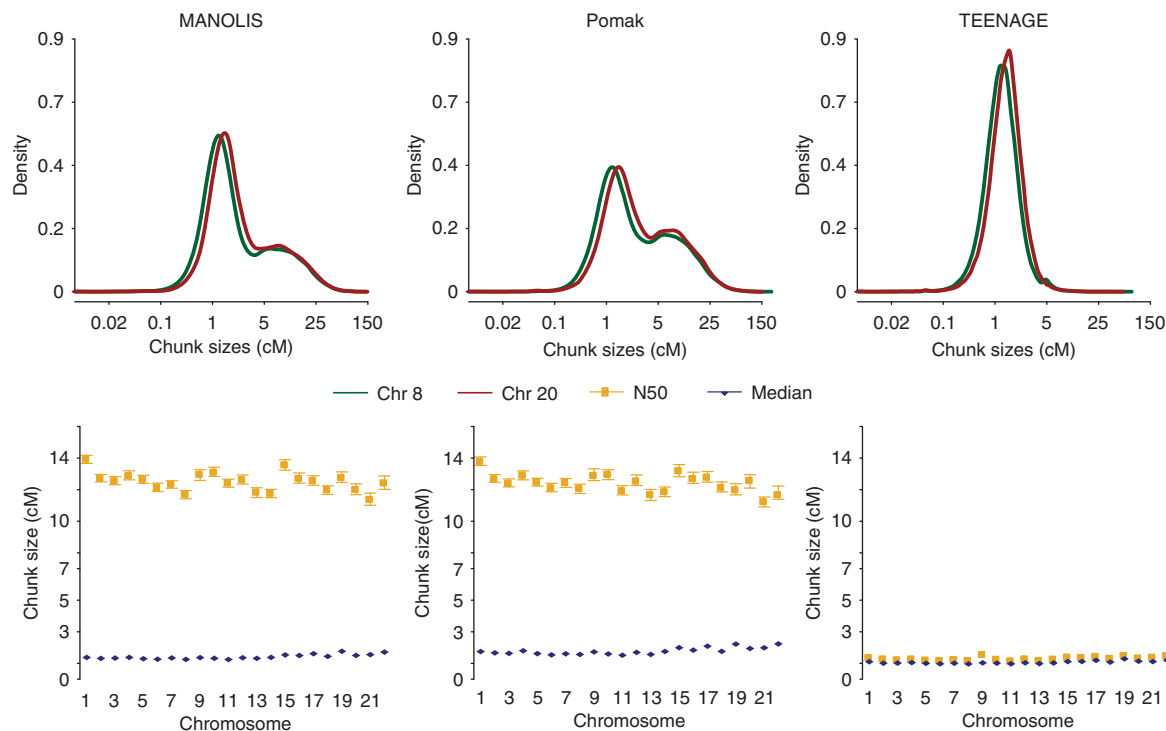
**Figure 2 | Proportion of individuals with at least one ‘surrogate parent’ in each study population.** Surrogate parents refer to individuals from the same population who share local haplotypes with the index individual. The proportion of surrogate parents is shown for each of the two population isolates, MANOLIS and Pomak, and the general Greek population, TEENAGE, as a function of sample size for a region of the genome (chr15q25).

and 90.5%, respectively, versus 48.5% for the TEENAGE samples (Supplementary Fig. 4). While ~10% of the isolates have NNs from the TEENAGE cohort, the shared haplotype chunks specific to these NNs are significantly shorter, fourfold and threefold for the Pomak and MANOLIS cohorts, respectively (Supplementary Fig. 5), suggesting that typically the inferred co-ancestry pre-dates the isolation events. The limited number of larger haplotype chunks (0.5% of chunks in the Pomak cohort copied from TEENAGE are > 5 cM, 1% for MANOLIS; Supplementary Fig. 5) is indicative of very limited migration and gene flow events.

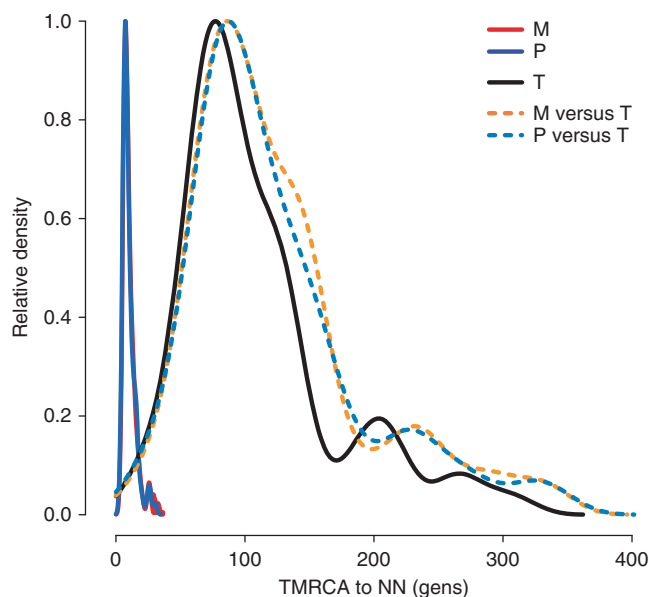
To estimate the age of co-ancestry, we fit a model of exponential decay of haplotype sharing around 100 randomly sampled locations across the genome (Supplementary Fig. 6; Supplementary Methods). We find that the median age of common ancestors is 8.56 and 8.65 generations in Pomak and MANOLIS, respectively, but 89.7 generations in TEENAGE (Fig. 4), which is comparable to that observed in other European populations. Using a simple moment estimator, these values imply recent effective population sizes of 2,400, 3,200 and 32,000 for the three populations, respectively. In short, the rate of genetic drift in the isolated populations is ~10 times that in the TEENAGE population.

Using a different approach that utilizes pairwise LD information<sup>16–18</sup>, we observe a qualitatively similar result (Supplementary Fig. 7, Supplementary Note 1). By examining trends of effective population size through time, we observe a recent expansion in TEENAGE as observed in general European populations<sup>19,20</sup>, whereas the two isolates show a reduction in effective population size, a sign that they experienced a strong genetic drift, as observed in other European isolated populations<sup>21</sup>.

**Genetic drift.** Overall, the MANOLIS, Pomak and TEENAGE cohorts have similar allele frequency distributions (Supplementary Note 2, Supplementary Fig. 8). We calculated



**Figure 3 | Maximal haplotype sharing between nearest-neighbours (NNs) for each cohort.** The output of our algorithm is a set of shared haplotypes of different lengths. The top panel shows the density curves for the shared haplotype chunks for chromosomes 8 (dark green) and 20 (dark red). Results were similar for the other chromosomes. The bottom panel shows the per chromosome median (dark blue) and N50 (gold), in cM, of all shared haplotype chunks obtained from all the unrelated individuals ( $\pi$  hat < 0.2, see Methods) in each cohort. The 95% confidence intervals (CIs), obtained by bootstrapping using 1000 repeats of resampling without replacement, are denoted by the horizontal bars (where these are very tight they are not visible in the plot). The median chunk length tells us about the distribution of contigs; however, we may also be interested in what a randomly sampled location will look like. The N50 measures this; specifically, it is a chunk length such that 50% of all randomly chosen positions will fall in a chunk of at least that size.



**Figure 4 | Relative density curves showing the estimated number of generations to the common ancestor between an individual and their NN.** The results are from 100 randomly sampled SNPs from across the genome for the MANOLIS individuals (M), the Pomaks (P), the TEENAGE samples (T), each considered separately and a scenario where the MANOLIS individuals (M versus T) and the Pomaks (P versus T) each are forced to select NNs from the TEENAGE cohort.

absolute allele frequency differences by comparing the allele frequencies of all variants in each of the two isolates against their respective allele frequency in the general Greek population. Compared with the general Greek population, we find that 49.74% (324,689) and 48.59% (311,922) of variants examined genome wide have increased in frequency in MANOLIS and Pomak, respectively (Supplementary Table 3). In all, 50.03% (326,623) and 51.19% (328,629) of variants examined genome wide have decreased in frequency in MANOLIS and Pomak, respectively, and 0.23% of variants in each isolate showed no allele frequency change with respect to TEENAGE (Supplementary Table 3).

In the respective fold analyses, 517 (0.08%) variants displayed > 10-fold increase in MANOLIS versus TEENAGE (Table 1). The highest fold difference in MANOLIS versus TEENAGE was observed for rs4135336, an intronic variant in *PPARG* (peroxisome proliferator-activated receptor gamma). Rs4135336 shows an increase in allele A frequency by 47-fold (from 0.0007 in TEENAGE to 0.033 in MANOLIS). This variant appears to be monomorphic in all European (EUR) populations from the 1000 Genomes Project except in TSI where it has been observed at a frequency of 0.01. It is, however, common in African (AFR) populations and has reached 0.14 frequency in the Yoruban (YRI) population.

A total of 261 (0.04%) variants displayed an increase of > 10-fold in Pomak versus TEENAGE and two variants displayed an increase of > 50-fold (Table 1). The highest fold difference was observed for rs12173144, an intergenic variant located between *CDH9* (cadherin 9, type 2 (T1-cadherin)) and *CDH6* (cadherin 6, type 2, K-cadherin (fetal kidney)) that shows an increase in allele

**Table 1 | Allele frequency increases in the isolates, MANOLIS and Pomak, compared with the general Greek population, TEENAGE.**

| Fold allele frequency increase | MANOLIS versus TEENAGE N (%) | Pomak versus TEENAGE N (%) |
|--------------------------------|------------------------------|----------------------------|
| > 50–60                        | —                            | 2 (0.0003)                 |
| > 40–50                        | 3 (0.0005)                   | 2 (0.0003)                 |
| > 30–40                        | 17 (0.0026)                  | 12 (0.0019)                |
| > 20–30                        | 63 (0.0097)                  | 50 (0.0078)                |
| > 10–20                        | 434 (0.07)                   | 195 (0.03)                 |
| > 1–10                         | 317,911 (48.70)              | 308,266 (48.02)            |

G frequency by 59-fold (from 0.0007 in TEENAGE to 0.0423 in Pomak). This variant is observed at low frequency (0.01–0.03) in all EUR populations from the 1000 Genomes Project but is common in populations from East Asia (ASN), Ad Mixed America (AMR) and AFR observed at the highest frequency in YRI (0.22). Rs9958680, an intronic variant in *SLC14A2* (solute carrier family 14 (urea transporter), member 2), shows an increase in allele G frequency by 56-fold (from 0.0007 in TEENAGE to 0.03897 in Pomak). This variant is monomorphic in all EUR and ASN populations from the 1000 Genomes Project, has low frequency (0.01–0.02) in AMR populations and is common in populations from AFR, observed at the highest frequency in the Luhya (LWK) population (0.18).

**Power calculations.** To investigate power gains for frequency differences at rare alleles we examined variants that had  $MAF < 0.01$  in TEENAGE. In all, 24,493 of the variants that overlap between TEENAGE and MANOLIS are rare in TEENAGE. Of these, 15,341 (62.6%) have risen in frequency in MANOLIS and 4,581 (18%) have reached  $MAF > 0.01$ . In the latter, allele frequency increases in the range from 0.000038 ( $MAF$  in MANOLIS = 0.01001,  $MAF$  in TEENAGE = 0.009972) to 0.06897 ( $MAF$  in MANOLIS = 0.06897,  $MAF$  in TEENAGE = 0) with a median increase of 0.01 ( $MAF$  in MANOLIS = 0.01527,  $MAF$  in TEENAGE = 0.00495). We calculated power (Supplementary Methods) to detect association in the non-isolated and isolated populations at allele frequencies that corresponded to the minimum, median and maximum values of this range and find absolute power gains of 0.4%, 76% and 100%, respectively (Supplementary Note 3). Similarly, we calculate power gains of 3.6–100% in the Pomak population (Supplementary Note 3). We note that we performed these power calculations (which assume independence of samples) by fixing the sample size to the full set of samples (including related) from our isolated populations, since our associations were carried out in the full set of samples but accounting for relatedness. We repeated the power calculations based on the sample size of unrelated individuals only in the Pomak and MANOLIS collections (Supplementary Methods) and calculate power gains of 0.1–100% in the MANOLIS and 0.5–100% in the Pomak population (Supplementary Note 3).

**Complex trait association signals.** After ranking all variants genome wide according to their absolute or fold allele frequency differences between each isolate and the general Greek population, we investigated the tails of the distribution (top 30 variants) for associations with medically relevant traits in the full set of Pomak and MANOLIS samples using GEMMA<sup>22</sup>, which accounts for relatedness. In the MANOLIS cohort, none of these variants are strongly associated with any of the measured traits. In the Pomak cohort two chr11p15.4 variants (rs16913631

and rs7116019;  $r^2 = 0.54$ ) show genome-wide significant association with haematological traits. Rs16913631 allele A shows a 32-fold increase in frequency, from 0.0014 in TEENAGE to 0.0441 in Pomak. This variant appears to be monomorphic in all EUR populations from the 1000 Genomes Project but common (0.13) in AFR populations, observed at highest frequency (0.21) in LWK. Rs16913631 is associated with three haematological traits: mean corpuscular volume (MCV) in 965 Pomak individuals (for allele A:  $\beta = -1.046$ ,  $s.e. = 0.106$ ,  $P = 6.86 \times 10^{-20}$ ); mean corpuscular haemoglobin concentration (MCHC) in 974 individuals ( $\beta = 0.864$ ,  $SE = 0.106$ ,  $P = 2.75 \times 10^{-14}$ ) and the mean corpuscular haemoglobin (MCH) in 960 individuals ( $\beta = -0.606$ ,  $s.e. = 0.111$ ,  $P = 8.89 \times 10^{-8}$ ; Supplementary Tables 4–6). Similarly, rs7116019 allele G shows a 29-fold increase in frequency, from 0.0014 in TEENAGE to 0.0415 in Pomak. This variant also appears to be monomorphic in all EUR populations from the 1000 Genomes Project but is common in AFR populations; in YRI and LWK it has a frequency of 0.18. The variant is associated with MCV (for allele G:  $\beta = -1.239$ ,  $s.e. = 0.105$ ,  $P = 2.26 \times 10^{-26}$ ; Fig. 5) and explains 3.1% of the trait variance, MCHC ( $\beta = 0.933$   $s.e. = 0.107$ ,  $P = 7.06 \times 10^{-16}$ ) and MCH ( $\beta = -0.775$ ,  $s.e. = 0.111$ ,  $P = 1.79 \times 10^{-11}$ ; Table 2 and Supplementary Tables 4–6).

The chr11p15.4 region harbours other, more significant associations with haematological traits in the Pomak cohort at rs12274659 and rs11035019 (in perfect LD with each other;  $r^2 = 0.68$  with rs16913631 and  $r^2 = 0.86$  with rs7116019; Fig. 5). The T allele of rs11035019 has increased in frequency by 22-fold (from 0.0021 in TEENAGE to 0.0459 in Pomak) and is monomorphic in the 1000 Genomes Project data except in AMR and in AFR subpopulations, in which it is observed at a frequency of 0.01–0.05. Similarly, the G allele of rs12274659 has risen in frequency by 16-fold (from 0.0028 in TEENAGE to 0.0459 in Pomak) and is only observed at a high frequency in the 1000 Genomes Project AFR populations (frequency of 0.07–0.13). Rs11035019 and rs12274659 are associated with MCV (for allele T of rs11035019 and allele G of rs12274659:  $\beta = -1.249$ ,  $s.e. = 0.099$  and  $P = 3.45 \times 10^{-29}$ ), MCHC ( $\beta = 1.010$ ,  $s.e. = 0.100$  and  $P = 5.54 \times 10^{-20}$ ) and MCH ( $\beta = -0.732$ ,  $s.e. = 0.106$  and  $P = 2.38 \times 10^{-11}$ ; Supplementary Tables 4–6).

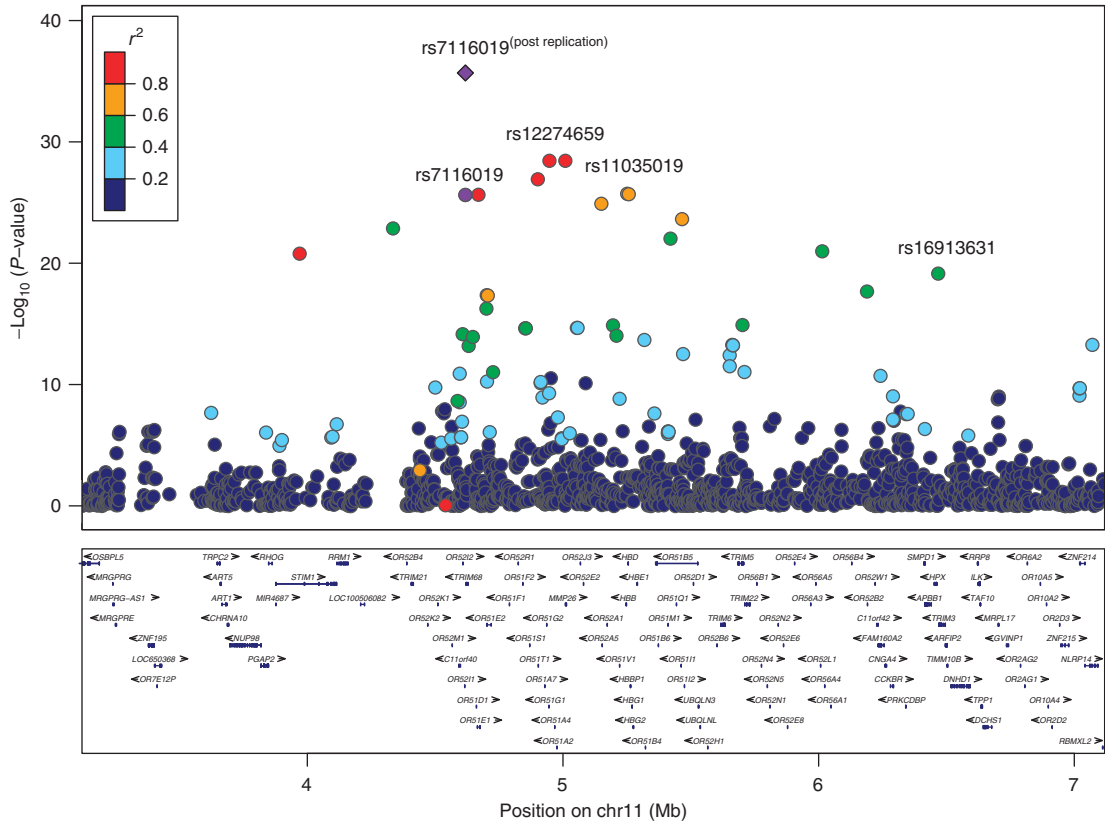
To determine whether the signal in chr11p15.4 region is because of a single or multiple independently associated variants, we tested the most highly MCV-associated index variant, rs11035019, conditioning on the two other most highly drifted variants, rs7116019 and rs16913631. Conditioning rs11035019 on rs7116019 resulted in attenuation of the signal ( $P = 2.9 \times 10^{-05}$  versus  $P = 3.45 \times 10^{-29}$ , respectively) suggesting that rs7116019, rs11035019 and its perfectly correlated proxy rs12274659 are part of the same signal. Conditioning rs11035019 on rs16913631 also resulted in a higher  $P$  value; however, the rs11035019 association with MCV still remained strong ( $P = 8.8 \times 10^{-13}$ ), which that cannot conclusively rule out the presence of two signals in this region.

Previous reports have provided evidence for association of several variants with haematological and related traits at the 11p15.4 locus<sup>23–35</sup>. The association of rs12274659 and rs11035019 with MCV after conditioning on the published variants remains genome-wide significant ( $P < 4.4 \times 10^{-18}$ ).

**Replication.** We sought replication of the chr11p15.4 signal in a second set of 734 Pomak samples genotyped on a different platform (Supplementary Methods). Among the most highly associated variants, rs7116019 was the only directly typed variant present in the Pomak replication set and was found to be

significantly associated with all three traits (Table 2). After pooling the genotypes at this SNP across the two data sets and re-analysing using GEMMA<sup>22</sup>, which accounts for relatedness, the associations became more significant:  $p_{\text{combined}} = 2.0 \times 10^{-36}$ ,  $8.3 \times 10^{-27}$  and  $1.7 \times 10^{-13}$  for MCV, MCHC and MCH, respectively (Table 2). Adjustment for the first 10 principal components generated from either the discovery or replication data sets (Supplementary Methods) does not attenuate the associations (Supplementary Table 7). Further evidence that rules out a spurious association because of the subtle population structure observed among the Pomak villages is that carriers of the minor allele ( $N = 92$ ) are spread across villages (Supplementary Fig. 9).

Motivated by the common frequency of the drifted alleles in African populations, we investigated association between variants in this chr11 region (1 Mb upstream and downstream of the most highly drifted variants) and MCV, MCHC and MCH in the Ugandan General Population Cohort<sup>36</sup> study of 1,479 individuals (Supplementary Methods). The four highlighted variants ( $\text{MAF} = 0.063\text{--}0.156$  in the Ugandan population) are not significantly associated with these traits in the Ugandan cohort (Supplementary Tables 4–6). The most highly associated SNP with MCV and MCH ( $\text{rs73404549}$ ,  $P = 8.54 \times 10^{-5}$ , not present in our data) is not in LD with the four highlighted variants ( $r^2 < 0.0008$ ) in the Ugandan cohort. Similarly, the most highly associated SNP with MCHC ( $\text{rs79639430}$ ,  $P = 1.10 \times 10^{-5}$ , not



**Figure 5 | Association of variants at chr11p15.4 with MCV.** The x axis shows the genomic interval, the left y axis shows the statistical significance of association as negative log<sub>10</sub> of *P* values (score test in GEMMA). rs7116019 was used as the reference SNP and its *P* value in the discovery set and post replication is denoted by the purple circle and diamond, respectively. In addition, annotated are variants that show the highest genetic drift (rs16913631) and most significantly associated with MCV (rs12274659 and rs11035019). The linkage disequilibrium was calculated dynamically from our own data and is presented as pairwise  $r^2$  between the reference SNP and the other SNPs in the region with colours according to different bins (0–0.2, dark blue; 0.2–0.4, light blue; 0.4–0.6, green; 0.6–0.8, orange; 0.8–1.0, red). The plot was produced using LocusZoom<sup>68</sup>.

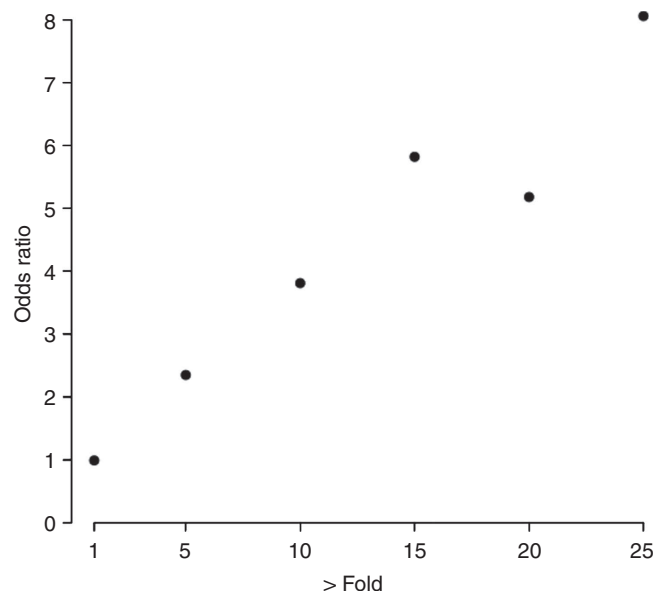
| Table 2   Association summary statistics (score test in GEMMA) of rs7116019 with haematological traits in the Pomak population.                                                                          |       |    |                            |        |       |                       |                            |        |       |                       |                                            |        |       |                       |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|----|----------------------------|--------|-------|-----------------------|----------------------------|--------|-------|-----------------------|--------------------------------------------|--------|-------|-----------------------|
| SNP                                                                                                                                                                                                      | Trait | EA | Pomak discovery, N = 1,014 |        |       |                       | Pomak replication, N = 719 |        |       |                       | Pomak discovery and replication, N = 1,684 |        |       |                       |
|                                                                                                                                                                                                          |       |    | EAF                        | Beta   | s.e.  | P value               | EAF                        | Beta   | s.e.  | P value               | EAF                                        | Beta   | s.e.  | P value               |
| rs7116019                                                                                                                                                                                                | MCV   | G  | 0.047                      | −1.239 | 0.105 | $2.3 \times 10^{-26}$ | 0.030                      | −1.220 | 0.147 | $1.6 \times 10^{-14}$ | 0.039                                      | −1.210 | 0.088 | $2.0 \times 10^{-36}$ |
| rs7116019                                                                                                                                                                                                | MCHC  | G  | 0.047                      | 0.933  | 0.107 | $7.1 \times 10^{-16}$ | 0.029                      | 1.219  | 0.146 | $8.6 \times 10^{-15}$ | 0.040                                      | 1.010  | 0.088 | $8.3 \times 10^{-27}$ |
| rs7116019                                                                                                                                                                                                | MCH   | G  | 0.046                      | −0.775 | 0.111 | $1.8 \times 10^{-11}$ | 0.029                      | −0.582 | 0.154 | $1.2 \times 10^{-04}$ | 0.039                                      | −0.702 | 0.092 | $1.7 \times 10^{-13}$ |
| EA, effect allele; EAF, effect allele frequency; MCH, mean corpuscular haemoglobin; MCHC, mean corpuscular haemoglobin concentration; MCV, mean corpuscular volume; SNP, single-nucleotide polymorphism. |       |    |                            |        |       |                       |                            |        |       |                       |                                            |        |       |                       |

present in our data) is not in high LD with the four highlighted variants ( $r^2 < 0.0007$ ) in the Ugandan cohort.

**Evolutionary insights into the trait-associated variants.** The haplotype length shared by all Pomak chromosomes carrying the minor alleles of the three correlated variants (rs7116019, rs12274659 and rs11035019) is  $\sim 1.8$  Mb, which is unusually long given the allele frequency (Supplementary Methods, Supplementary Note 4, Supplementary Fig. 10). This suggests that positive selection could have acted on it. Since the longest segments shared between the Pomak haplotype and other populations were 183 and 230 kb with the LWK, and 7 kb with the TEENAGE, and the frequency and diversity of the haplotypes carrying the minor alleles were both highest in the LWK, this suggested a scenario where independent haplotypes had entered the two Greek populations from the LWK. We therefore modelled the entry of a variant into the Pomak population and first assessed how likely it was to reach the currently observed frequency by drift from an initial frequency of 0.01 (Supplementary Methods, Supplementary Fig. 11). This corresponds to 30 identical copies of a single allele entering the Pomak population, although it is perhaps more likely that only one copy entered. The time allowed for it to increase in frequency by drift was the maximum possible in this demographic model. Thus, the simulation is highly conservative for our purpose. Nevertheless, we find that the probability for one locus to drift from a frequency of 0.01–0.046 or over is 0.19%, and thus unlikely to occur by chance. We then performed simulations with positive selection on this allele, using selection coefficients  $s = 0.005$ , 0.007 and 0.01 acting on carriers. Here the probabilities of reaching the observed 0.046 frequency were higher: 0.83%, 1.45% and 2.85%, respectively. We therefore conclude that positive selection is likely to have acted on the Pomak haplotype. If a 1% chance of reaching the observed frequency of 0.046 is used as a criterion, then a selective coefficient between 0.005 and 0.007 is suggested given the demographic model used here.

**Enrichment of missense variants.** In the MANOLIS cohort we found a significant enrichment of missense variants among those variants that have increased in frequency above a fold change of 5, and all higher thresholds examined (Fig. 6 and Supplementary Table 8). We also find a significant but considerably smaller enrichment of synonymous variants in the set of variants above fold change thresholds of 5 in MANOLIS (Supplementary Table 9). In the Pomak cohort we also observe a significant enrichment at a fold change threshold of 5; however, unlike in MANOLIS, we do not observe significant enrichment at higher thresholds or any enrichment of synonymous variants. In the MANOLIS versus TEENAGE fold analysis, there were four missense variants with a frequency increase over 25-fold: rs3741379 located in *SIPA1* (signal-induced proliferation-associated 1), rs6659553 in *POMGNT1* (protein O-linked mannose beta1,2-N-acetylglucosaminyltransferase) and two variants that are classified as deleterious in SIFT<sup>37</sup>: rs2274896 in *LSM14A* (SCD6 homologue A) and rs2290959 in *ACY3* (aspartacylase (aminocyclase) 3).

**Inbreeding depression.** In the Pomak population, we detected evidence for inverse associations between F<sub>hom</sub> and height ( $\beta = -19.755$ , s.e. = 7.306,  $P = 0.00707$ ); F<sub>hom</sub> and high-density lipoprotein ( $\beta = -15.588$ , s.e. = 6.960,  $P = 0.026$ ); F<sub>hom</sub> and homeostatic model assessment  $\beta$ -cell function (HOMA<sub>b</sub>;  $\beta = -30.604$ , s.e. = 15.184,  $P = 0.046$ ); F<sub>hom</sub> and MCH ( $\beta = -14.777$ , s.e. = 7.051,  $P = 0.037$ ); and F<sub>hom</sub> and MCV ( $\beta = -17.875$ , s.e. = 7.019,  $P = 0.011$ ; Supplementary



**Figure 6 | Enrichment of missense variants among those variants that have increased in frequency above incremental fold change thresholds in MANOLIS versus TEENAGE analysis.** At each threshold, we computed a contingency table comparing the number of missense and other variants found at a fold change higher than the threshold. Odds ratios were used to quantify enrichment. For example, an odds ratio of 2.35 above a fold change threshold of 5 indicates that variants that have drifted in frequency by more than fivefold in the MANOLIS isolate compared with the TEENAGE general population are 2.35 times more likely to be missense than variants below this threshold.

Table 10). The associations of F<sub>hom</sub> with these traits in MANOLIS were not significant at  $P < 0.05$ ; however, the direction of the effect was consistent with that in the Pomaks and in TEENAGE (Supplementary Table 10). We also performed this analysis using an inbreeding metric derived from ROH<sup>38</sup> but find no qualitative difference in  $P$  values between the two analyses (Supplementary Table 10).

## Discussion

The historical origins of the Greek population isolates under study are largely unknown and the sparse historical information and genetic analyses to date have yielded inconsistent results. Modern Cretans as a whole are thought to be the descendants of Minoans who established the first advanced Bronze Age civilization in Europe about 5,000 years ago. Archaeological studies have proposed North African<sup>39,40</sup>, Cycladic<sup>41</sup>, Anatolian<sup>41,42</sup> and Middle Eastern origins<sup>43,44</sup>. Genetic studies in modern Cretan populations using Y-chromosomal or mitochondrial DNA to infer ancient ancestry of the Bronze Age Cretans have indicated Anatolian<sup>45</sup>, Middle Eastern and Balkan<sup>46,47</sup> origins. A recent mitochondrial DNA study refuted the hypothesis of North African Ancestry, and Minoans were found to show the strongest relationships with Neolithic Spanish, Neolithic Italian and modern European populations as well as with the modern inhabitants of the Lassithi plateau in Central Crete<sup>48</sup>. Our MDS results are in agreement with the MANOLIS isolate showing genetic proximity to EUR populations. The historical origins of the Greek Pomak population are even more uncertain as Pomaks are spread across Bulgaria, Turkey and Greece. Our MDS analysis using populations from the 1000 Genomes Project shows that the Pomak cohort clusters with EUR

populations but cannot (nor is intended to) distinguish between these closely related ancestral populations.

All metrics used to characterize the levels of isolatedness in the HELIC cohorts (including inbreeding coefficients, ROH and the extent of haplotype sharing compared with the general Greek population) show consistently that they bear the genomic characteristics of genetic isolates. The extensive haplotype sharing in the isolates is further corroborated in the LRP analysis where for the 15q25 region we observe that with as little as 300 individuals analysed per population 88% of Pomak individuals and 79% of MANOLIS individuals have at least one 'surrogate parent' compared with 6% in the general Greek population. In the Icelandic population, the sample size required to reach such a high proportion of individuals with at least one surrogate parent is  $\sim 6,300$  samples<sup>15</sup>.

In our investigation of inbreeding effects on quantitative traits, we found the most significant association between height and genome-wide homozygosity in the Pomak population isolate. This inverse association is consistent with previously reported findings in other isolated populations<sup>49,50</sup>. In keeping with our observation, McQuillan *et al.*<sup>49</sup> identified effect heterogeneity across the different populations examined and argued that this could reflect biological heterogeneity. Observing an effect may depend on the variance in homozygosity in the population as well as the chance inheritance of individual recessive genotypes. It is therefore plausible that the inbreeding effect on height was detected with significance in the Pomak population because it appears more isolated but displays larger variance in homozygosity than in MANOLIS and TEENAGE. Our results support the hypothesis that along with a large number of common variants influencing height in an additive manner, multiple rare variants can also influence human height. It is noteworthy that in the Pomak population we observe evidence of inbreeding depression on MCV and MCH.

We find novel genome-wide significant association between rare variants that have drifted up in frequency in the Pomak population and MCV, MCHC and MCH at 11p15.4, which encompasses the  $\beta$ -globin locus. We pooled genotypes at rs7116019 across the discovery and replication data sets and repeated the association analysis appropriately accounting for sample relatedness; we find stronger evidence of association in the combined Pomak set:  $P = 2.0 \times 10^{-36}$ ,  $P = 8.3 \times 10^{-27}$ ,  $P = 1.7 \times 10^{-13}$  for the three traits, respectively. Rs7116019 is located at the 3' end of the *TRIM68* gene that functions as an ubiquitin E3 ligase and can act as a coactivator of androgen receptor depending on its ubiquitin ligase activity<sup>51</sup>. Previous reports have highlighted several independent variants at the chr11p15.4 locus to be associated with anaemias, traits underlying haemoglobin composition, red blood cell indices and the clinical manifestation of thalassemias<sup>24,25,27,29–33</sup>. Previously a mutation in the *HBB* (haemoglobin, beta) gene, HbO-Arab (E122K), has been reported to have drifted up in frequency in the Pomak population and appears to have originated on a local haplotype about 2,000 years ago<sup>52</sup>. HbO-Arab leads to microcytosis and elevated MCHC<sup>53</sup>. The specific variant (rs33946267 located at 11:5246908) is not present in our genotype data; the variation is multiallelic and the specific allele that leads to the HbO-Arab mutation (T) is not observed in 1000 Genomes Project and NHLBI Exome Sequencing Project data; therefore, we are not able to evaluate LD with this variant.

It is noteworthy that the associated variants are monomorphic in other European populations but have risen to high frequency in African populations. The prevalence of certain haemoglobinopathies is high in the Mediterranean region and Africa<sup>54</sup> and selection due to malaria is thought to be the force responsible for this<sup>54</sup>. We investigated association with haematological traits in a

population-based cohort from Uganda but did not find evidence for association of the Pomak trait-associated variants. We find association at variants with  $P < 10^{-4}$  in the Ugandan cohort that are not in LD with the four highly drifted loci. The complexity of chr11p15.4 as a risk locus for haemoglobinopathies, haematological and related traits is likely because of population-specific, trait-associated variants<sup>30</sup> or because of allelic heterogeneity. For example, heterogeneous signals of association in the region surrounding the causal variant for sickle cell anaemia that confers resistance to malaria have been described for three African populations, potentially because it has arisen on different haplotypes in different ancestral populations<sup>23,26</sup>. We do not find strong LD between the Pomak trait-associated variants with established variants for malaria severity and resistance<sup>23,26,28,34,55</sup>. However, we find that positive selection is likely to have acted on the Pomak haplotype.

Nonsynonymous variants in the human population are less frequently observed than expected based on the overall mutation rate<sup>55</sup>. Most alterations are deleterious and will be eventually eliminated because of purifying selection; however, beneficial mutations can sweep through the population and become fixed. We observed a significant enrichment of missense variants among loci that have drifted up in allele frequency by more than fivefold in the MANOLIS cohort. The highest fold difference in MANOLIS was observed for rs4135336. This variant is located in *PPARG*, which encodes a member of the peroxisome proliferator-activated receptor subfamily of nuclear receptors. *PPARG* is thought to regulate adipocyte differentiation and glucose homeostasis. Variants in *PPARG* have been associated with type 2 diabetes, obesity, atherosclerosis, cancer and hypertension<sup>56–58</sup>. Rs4135336 is located 43 kb downstream from T2D-associated SNPs ( $P < 5 \times 10^{-8}$ ) in the type 2 diabetes DIAGRAM meta-analysis<sup>59</sup>; however, these are not in LD ( $r^2 < 0.2$ ) with rs4135336. Similarly, we do not find this variant to be in LD with body mass index-associated variants from the GIANT study<sup>60</sup>, and rs4135336 is not associated with anthropometric or glycaemic traits in the MANOLIS cohort.

We evaluated power gains in detecting low frequency and rare variant associations afforded by studying the isolates. For an effect size of 1 s.d. (explaining 2% of trait variance for a variant with frequency of 0.01), the increase in power ranges from 0.4 to 100% with a median increase of >64%. The MCV-associated A allele of rs7116019 has increased in frequency to 0.044 in the Pomak population, empowering its discovery with genome-wide significance in a sample size of less than a thousand individuals. Ten times as many samples would be required to achieve 80% power to detect the observed effect in a nonisolated European population such as TEENAGE (risk allele frequency 0.0014).

It has been well documented that the use of genetically isolated populations can empower the identification of rare variants associated with complex traits, mainly through reduced allelic variability and genetic drift<sup>61</sup>. Here we have established the HELIC cohorts as population isolates through various metrics in terms of levels of isolatedness, reduced haplotype complexity and genetic drift. Leveraging these unique characteristics we show power gains that can be afforded by the study of isolated populations both theoretically and empirically by detecting variant associations with clinically important complex traits.

## Methods

**Study samples.** HELIC. This work utilized data from 1,364 HELIC-MANOLIS and 1,883 HELIC-Pomak samples. The HELIC collections include blood for DNA extraction, laboratory-based haematological and biochemical measurements, and interview-based questionnaire data. The study was approved by the Harokopio University Bioethics Committee, and informed consent was obtained from human subjects.

**TEENAGE.** The TEENAGE (TEENs of Attica: Genes and Environment) study comprises 857 adolescents of Greek origin randomly recruited from public secondary schools located in the wider Athens area of Attica in Greece<sup>62</sup>.

**Genotyping and quality control.** DNA samples from the MANOLIS and the Pomak collections were genotyped using Illumina HumanOmniExpress BeadChips (Illumina, San Diego, USA) at the Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, UK. Genotypes of both cohorts were called together using the Illumina genotype calling algorithm<sup>63</sup> and quality control (QC) was performed separately. The initial data sets comprised 1,364 MANOLIS individuals, 1,059 Pomak individuals and 733,202 SNPs. Samples underwent standard QC procedures, with exclusion criteria as follows: (i) sample call rate <98%; (ii) samples with sex discrepancies; (iii) samples who were outliers for autosomal heterozygosity; (iv) duplicated and related samples identified by calculating the pairwise identity by descent for each sample using PLINK v1.07 (ref. 64); from each pair with a  $\pi$ -hat >0.2 the sample with the lower call rate was excluded; (v) samples with evidence of non-European descent or outliers from the main cluster as assessed by MDS in PLINK<sup>64</sup> by combining each population with populations from HapMap2 (release 23)<sup>65</sup>. SNP exclusion criteria were as follows: (i) call rate <95% (for SNPs with MAF  $\geq$  5%) or call rate <99% for SNPs with MAF <5%; (ii) Hardy–Weinberg equilibrium exact  $P < 0.0001$ . A total of 754 unrelated individuals and 655,511 SNPs passed QC in the MANOLIS data set; 567 unrelated individuals and 643,679 SNPs passed QC in the Pomak data set. Genotyping and QC of the TEENAGE cohort were performed as above (except for genome-wide heterozygosity exclusion thresholds that were set at <32% or >35%) and have been described in detail elsewhere<sup>66</sup>. We further excluded SNPs with MAF <5% from all analyses except from the genetic drift analyses where a MAF threshold was not imposed (but we manually inspected calling algorithm cluster plots of rare variants for the loci of interest). The resulting data sets comprised 754 unrelated individuals and 582,214 SNPs in MANOLIS, 567 unrelated individuals and 578,677 SNPs in Pomak, 707 unrelated individuals and 586,710 SNPs in TEENAGE, of which 555,403 SNPs overlapped between the three cohorts.

**Statistical analyses.** Unrelated samples ( $N = 754$  in MANOLIS,  $N = 567$  in Pomak and  $N = 707$  in TEENAGE cohorts) were used for all statistical analyses described herein except for trait association analyses that were performed on the full set of samples passing QC in the isolates Methods, Supplementary Methods, Supplementary Tables 11 and 12. Power calculations were performed in both unrelated and in the full set of samples ( $N = 1,282$  for MANOLIS and  $N = 1,014$  for Pomak).

**Population structure.** We examined population structure by performing MDS analyses in PLINK<sup>64</sup> by combining genotype data from the isolates MANOLIS, Pomak with the TEENAGE general Greek population and with populations from the 1000 Genomes Project<sup>13</sup> (phase1, release\_v3, 20101123). Following the data merge we took the intersection of SNPs and performed LD pruning in PLINK<sup>64</sup> (with options --indep 50 5 1.25) to obtain a thinned set of data containing only independent SNPs ( $N = 79,015$  SNPs for the MDS performed on MANOLIS, Pomak, TEENAGE and 1000 Genomes Project populations;  $N = 75,477$  SNPs for the MDS performed on MANOLIS, Pomak and TEENAGE).

**Isolatedness.** F<sub>hom</sub>, F<sub>in</sub> and ROH were calculated using PLINK<sup>64</sup>. The estimation of F<sub>in</sub> is based on the observed versus the expected number of homozygous genotypes per individual (PLINK option --het). F<sub>hom</sub> is defined as the number of observed homozygous genotypes per individual, expressed as a fraction of the number of non-missing genotypes for that individual (PLINK option --het). ROH was defined using established parameters<sup>38</sup>, that is, comprising a minimum of 25 consecutive homozygous SNPs over a length of 1,500 Kb with a maximum gap of 100 kb between consecutive SNPs and a minimum density of 1 SNP per 50 Kb (PLINK options --homozyg --homozyg-snp 25 --homozyg-kb 1500 --homozyg-density 50 --homozyg-gap 100).

We estimated the proportion of individuals with a surrogate parent for random regions in the genome by using the method proposed in ref. 15. We used a modification of the LRP method<sup>15</sup> to identify stretches of extended haplotype sharing between individuals (Supplementary Methods, Supplementary Table 13). By examining the physical and genetic lengths of haplotype sharing within and between populations, we can also estimate the average date at which these common ancestors lived (TMRCA; T; Supplementary Methods, Supplementary Fig. 12).

**Effective population size and F<sub>st</sub>.** We estimated Ne of the three cohorts in two ways: by using estimates of haplotype sharing based on the modification of the LRP method<sup>15</sup> (Supplementary Methods) and by using pairwise LD information as follows: pairwise LD was calculated as the squared correlation ( $r^2$ ) between genotypes for 97,885 autosomal SNPs from four random chromosomes (6, 11, 15 and 20) using PLINK<sup>64</sup> (options --r2 --ld-window-kb 10,000 --ld-window-r2 0). Pairwise LD values were binned according to marker genetic distance categories (250 overlapping recombination distance classes from 0.005 to 0.25 cM, with each bin corresponding to a specific time into the past) and used to derive Ne

estimates<sup>16–18</sup> considering generation times of 25 years<sup>67</sup>. To avoid sampling issues, the same number ( $N = 567$ ) of individuals per population was considered. The genetic distance of pairs of markers was derived from HapMap recombination maps<sup>65</sup>. In all pairs of populations, for all pairs of markers, genetic distance was calculated as F<sub>st</sub> and averaged to obtain the genetic distance of population pairs.

**Analyses of genetic drift.** To examine genetic drift in the population isolates, we compared the allele frequencies of all variants in each of the two isolates against their respective allele frequency in the general Greek population in two ways: for each pairwise comparison we calculated the absolute difference and the fold difference in allele frequencies for 652,812 overlapping variants in MANOLIS versus TEENAGE, and for 642,011 variants in Pomak versus TEENAGE. We inspected genotype calling intensity plots for signals showing the strongest allele frequency differences (top 30 in each of the comparisons) and excluded badly clustering variants. We investigated the biological role of these variants and the closest gene to which they reside and examined their association with HELIC study measured traits.

**Association analyses.** Association analyses in the full set of samples from the MANOLIS ( $N = 1,282$ ) and Pomak ( $N = 1,014$ ) cohorts were carried out using GEMMA v0.94 (ref. 22) to account for relatedness (kinship matrix options: -bfile -gk -n -o; association test options: -bfile -n -notsnp -maf -miss -km -k -lmm -o). GEMMA fits a standard linear mixed model that accounts for sample substructure for single marker association tests, thus correcting for relatedness. This is achieved via a relatedness or kinship matrix, which is estimated from the samples' genotypes. The centred kinship matrix was created using only variants with MAF > 0.01 and missingness < 0.05. We report  $P$  values from the score test but note that these were very similar to  $P$  values from the Wald and likelihood ratio tests. Details of the phenotype transformation protocol for each trait tested in each population are given in Supplementary Methods and Supplementary Tables 11 and 12.

**Conditional association analyses.** Conditional association analyses were performed in GEMMA<sup>22</sup> by including variant genotypes as covariates in the analysis. The most highly MCV-associated variant was tested conditioning on each of the highly drifted variants to determine whether multiple signals were present at the locus. We also conditioned on published signals at variants that were present on our array and had  $r^2 > 0.2$  with the most highly associated variant.

**Enrichment of functional variants.** We investigated enrichment of putatively functional variants among those variants that have increased in allele frequency in the isolates compared with the general population. We annotated all variants in the data set using the Ensembl Variant Effect Predictor (version 74) and focused on variants lying in coding sequence, specifically variants called as missense, synonymous, nonsense, frameshift or overlapping an essential splice site. We found insufficient numbers of variants falling into each of the latter three categories; therefore, we limited further analysis to missense and synonymous variants only. To test for enrichment of missense and synonymous variants we used incrementally increasing thresholds of the fold change in allele frequency ( $1 \times$ ,  $5 \times$ ,  $10 \times$ ,  $15 \times$ ,  $20 \times$  and  $25 \times$ ), and at each threshold we computed a contingency table comparing the number of missense and other variants found at a fold change higher than the threshold. We focused this analysis on fold changes in order to primarily capture relevant changes in allele frequency for low frequency and rare variants. We used odds ratios to quantify enrichment and Fisher's exact tests to compute the significance of the result.

**Inbreeding depression.** Linear regression was used to examine association of F<sub>hom</sub> and F<sub>ROH</sub><sup>49</sup> with height and with cardiometabolic traits (Supplementary Tables 11 and 12) from the HELIC and TEENAGE studies. F<sub>ROH</sub> is the sum of the lengths of all ROH longer than 1,500 kb expressed as a percentage of the typed autosomal genome (that is, the sum of the length of all the autosomes from the first to the last SNP, excluding the centromeres)<sup>38,49</sup>.

## References

- Pollin, T. I. *et al.* A null mutation in human APOC3 confers a favorable plasma lipid profile and apparent cardioprotection. *Science* **322**, 1702–1705 (2008).
- Tachmazidou, I. *et al.* A rare functional cardioprotective APOC3 variant has risen in frequency in distinct population isolates. *Nat. Commun.* **4**, 2872 (2013).
- Gudmundsson, J. *et al.* A study based on whole-genome sequencing yields a rare variant at 8q24 associated with prostate cancer. *Nat. Genet.* **44**, 1326–1329 (2012).
- Stacey, S. N. *et al.* A germline variant in the TP53 polyadenylation signal confers cancer susceptibility. *Nat. Genet.* **43**, 1098–1103 (2011).
- Jonsson, T. *et al.* A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature* **488**, 96–99 (2012).
- Sulem, P. *et al.* Identification of low-frequency variants associated with gout and serum uric acid levels. *Nat. Genet.* **43**, 1127–1130 (2011).

7. Zeggini, E. Next-generation association studies for complex traits. *Nat. Genet.* **43**, 287–288 (2011).
8. Pelttonen, L., Palotie, A. & Lange, K. Use of population isolates for mapping complex traits. *Nat. Rev. Genet.* **1**, 182–190 (2000).
9. Asimakopoulou, F. *The Muslim Minority of Thrace and the Greco-Turkish Relations* (Livanis, 2002).
10. Weekes, R. V. *Muslim Peoples: a World Ethnographic Survey* (Greenwood, 1984).
11. Ghodsee, K. R. *Muslim Lives in Eastern Europe: Gender, Ethnicity, and the Transformation of Islam in Postsocialist Bulgaria* (Princeton University Press, 2009).
12. Tsitselikis, K. & Christopoulos, D. *Minorities in Greece* (Kritiki 1997).
13. 1000 Genomes Project Consortium *et al.* An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* **491**, 56–65 (2012).
14. McVean, G. A genealogical interpretation of principal components analysis. *PLoS Genet.* **5**, e1000686 (2009).
15. Kong, A. *et al.* Detection of sharing by descent, long-range phasing and haplotype imputation. *Nat. Genet.* **40**, 1068–1075 (2008).
16. McEvoy, B. P., Powell, J. E., Goddard, M. E. & Visscher, P. M. Human population dispersal 'Out of Africa' estimated from linkage disequilibrium and allele frequencies of SNPs. *Genome Res.* **21**, 821–829 (2011).
17. Tenesa, A. *et al.* Recent human effective population size estimated from linkage disequilibrium. *Genome Res.* **17**, 520–526 (2007).
18. Hayes, B. J., Visscher, P. M., McPartlan, H. C. & Goddard, M. E. Novel multilocus measure of linkage disequilibrium to estimate past effective population size. *Genome Res.* **13**, 635–643 (2003).
19. Coventry, A. *et al.* Deep resequencing reveals excess rare recent variants consistent with explosive population growth. *Nat. Commun.* **1**, 131 (2010).
20. Gravel, S. *et al.* Demographic history and rare allele sharing among human populations. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **108**, 11983–11988 (2011).
21. Colonna, V. *et al.* Small effective population size and genetic homogeneity in the Val Borbera isolate. *Eur. J. Hum. Genet.* **21**, 89–94 (2013).
22. Zhou, X. & Stephens, M. Genome-wide efficient mixed-model analysis for association studies. *Nat. Genet.* **44**, 821–824 (2012).
23. Band, G. *et al.* Imputation-based meta-analysis of severe malaria in three African populations. *PLoS Genet.* **9**, e1003509 (2013).
24. Milton, J. N. *et al.* Genetic determinants of haemolysis in sickle cell anaemia. *Br. J. Haematol.* **161**, 270–278 (2013).
25. Menzel, S., Garner, C., Rooks, H., Spector, T. D. & Thein, S. L. HbA2 levels in normal adults are influenced by two distinct genetic mechanisms. *Br. J. Haematol.* **160**, 101–105 (2013).
26. Jallow, M. *et al.* Genome-wide and fine-resolution association analysis of malaria in West Africa. *Nat. Genet.* **41**, 657–665 (2009).
27. van der Harst, P. *et al.* Seventy-five genetic loci influencing the human red blood cell. *Nature* **492**, 369–375 (2012).
28. Ding, K. *et al.* Genetic variants that confer resistance to malaria are associated with red blood cell traits in African-Americans: an electronic medical record-based genome-wide association study. *G3 (Bethesda)* **3**, 1061–1068 (2013).
29. Nuinon, M. *et al.* A genome-wide association identified the common genetic variants influence disease severity in beta0-thalassemia/hemoglobin E. *Hum. Genet.* **127**, 303–314 (2010).
30. Li, J. *et al.* GWAS of blood cell traits identifies novel associated loci and epistatic interactions in Caucasian and African-American children. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 1457–1464 (2013).
31. Naitza, S. *et al.* A genome-wide association scan on the levels of markers of inflammation in Sardinians reveals associations that underpin its complex regulation. *PLoS Genet.* **8**, e1002480 (2012).
32. Uda, M. *et al.* Genome-wide association study shows BCL11A associated with persistent fetal hemoglobin and amelioration of the phenotype of beta-thalassemia. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **105**, 1620–1625 (2008).
33. Solovieff, N. *et al.* Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: genome-wide association studies suggest a regulatory region in the 5' olfactory receptor gene cluster. *Blood* **115**, 1815–1822 (2010).
34. Timmann, C. *et al.* Genome-wide association study indicates two novel resistance loci for severe malaria. *Nature* **489**, 443–446 (2012).
35. Lauc, G. *et al.* Loci associated with N-glycosylation of human immunoglobulin G show pleiotropy with autoimmune diseases and haematological cancers. *PLoS Genet.* **9**, e1003225 (2013).
36. Asiki, G. *et al.* The general population cohort in rural south-western Uganda: a platform for communicable and non-communicable disease studies. *Int. J. Epidemiol.* **42**, 129–141 (2013).
37. Kumar, P., Henikoff, S. & Ng, P. C. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat. Protoc.* **4**, 1073–1081 (2009).
38. McQuillan, R. *et al.* Runs of homozygosity in European populations. *Am. J. Hum. Genet.* **83**, 359–372 (2008).
39. Evans, A. *The Palace of Minos; a Comparative Account of the Successive Stages of the Early Cretan Civilization as Illustrated by the Discoveries at Knossos* (Macmillan, 1921).
40. Evans, A. *The Early Nilotic, Libyan and Egyptian Relations with Minoan Crete. The Huxley Memorial Lecture of 1925* (Royal Anthropological Institute of Great Britain and Ireland, 1925).
41. Hutchinson, R. W. *Prehistoric Crete* (Penguin Books, 1962).
42. Caskey, J. *Greece, Crete and the Aegean Islands in the Early Bronze Age* (Cambridge University Press, 1964).
43. Hood, S. *The Minoans: Crete in the Bronze Age* (Thames and Hudson, 1971).
44. Ehrich, R. W. *Relative Chronologies in Old World Archeology* (The University of Chicago Press, 1954).
45. King, R. J. *et al.* Differential Y-chromosome Anatolian influences on the Greek and Cretan Neolithic. *Ann. Hum. Genet.* **72**, 205–214 (2008).
46. Martinez, L. *et al.* Paleolithic Y-haplogroup heritage predominates in a Cretan highland plateau. *Eur. J. Hum. Genet.* **15**, 485–493 (2007).
47. Martinez, L., Mirabal, S., Luis, J. R. & Herrera, R. J. Middle Eastern and European mtDNA lineages characterize populations from eastern Crete. *Am. J. Phys. Anthropol.* **137**, 213–223 (2008).
48. Hughey, J. R. *et al.* A European population in Minoan Bronze Age Crete. *Nat. Commun.* **4**, 1861 (2013).
49. McQuillan, R. *et al.* Evidence of inbreeding depression on human height. *PLoS Genet.* **8**, e1002655 (2012).
50. Macgregor, S. *et al.* Legacy of mutiny on the Bounty: founder effect and admixture on Norfolk Island. *Eur. J. Hum. Genet.* **18**, 67–72 (2010).
51. Miyajima, N. *et al.* TRIM68 regulates ligand-dependent transcription of androgen receptor in prostate cancer cells. *Cancer Res.* **68**, 3486–3494 (2008).
52. Papadopoulos, V. *et al.* HbO-Arab mutation originated in the Pomak population of Greek Thrace. *Haematologica* **90**, 255–257 (2005).
53. Papadopoulos, V. *et al.* The implications of haemoglobin O-Arab mutation. *Haematologica* **6**, 479–485 (2003).
54. Flint, J., Harding, R. M., Boyce, A. J. & Clegg, J. B. The population genetics of the haemoglobinopathies. *Baillieres Clin. Haematol.* **11**, 1–51 (1998).
55. Cargill, M. *et al.* Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat. Genet.* **22**, 231–238 (1999).
56. He, W. PPAR $\gamma$ 2 polymorphism and human health. *PPAR Res.* **2009**, 849538 (2009).
57. Guo, L. & Tabrizchi, R. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma as a drug target in the pathogenesis of insulin resistance. *Pharmacol. Ther.* **111**, 145–173 (2006).
58. Hotta, K. *et al.* Relationships of PPARgamma and PPARgamma2 mRNA levels to obesity, diabetes and hyperinsulinaemia in rhesus monkeys. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **22**, 1000–1010 (1998).
59. Morris, A. P. *et al.* Large-scale association analysis provides insights into the genetic architecture and pathophysiology of type 2 diabetes. *Nat. Genet.* **44**, 981–990 (2012).
60. Spiliotes, E. K. *et al.* Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. *Nat. Genet.* **42**, 937–948 (2010).
61. Hatzikotoulas, K., Gilly, A. & Zeggini, E. Using population isolates in genetic association studies. *Brief. Funct. Genomics* **13**, 371–377 (2014).
62. Ntalla, I. *et al.* Body composition and eating behaviours in relation to dieting involvement in a sample of urban Greek adolescents from the TEENAGE (TEENs of Attica: Genes & Environment) study. *Public Health Nutr.* **17**, 1–8 (2013).
63. Teo, Y. Y. *et al.* A genotype calling algorithm for the Illumina BeadArray platform. *Bioinformatics* **23**, 2741–2746 (2007).
64. Purcell, S. *et al.* PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am. J. Hum. Genet.* **81**, 559–575 (2007).
65. International HapMap Consortium. The International HapMap Project. *Nature* **426**, 789–796 (2003).
66. Ntalla, I. *et al.* Replication of established common genetic variants for adult BMI and childhood obesity in Greek adolescents: the TEENAGE study. *Ann. Hum. Genet.* **77**, 268–274 (2013).
67. Fenner, J. N. Cross-cultural estimation of the human generation interval for use in genetics-based population divergence studies. *Am. J. Phys. Anthropol.* **128**, 415–423 (2005).
68. Pruim, R. J. *et al.* LocusZoom: regional visualization of genome-wide association scan results. *Bioinformatics* **26**, 2336–2337 (2010).

## Acknowledgements

This work was funded by the Wellcome Trust (098051) and the European Research Council (ERC-2011-StG 280559-SEPI). The TEENAGE study has been supported by the Wellcome Trust (098051), European Union (European Social Fund—ESF) and Greek national funds through the Operational Programme 'Education and Lifelong Learning' of the National Strategic Reference Framework (NSRF)—Research Funding Programme: Heracleitus II, investing in knowledge society through the European Social Fund. G.R.S.R. is supported by the European Molecular Biology Laboratory and the Sanger Institute via an EBI-Sanger Postdoctoral Fellowship. S.F. was supported by H3ABioNet

Node, NABDA Abuja Nigeria with NIH Common Fund Award/NHGRI Grant Number U41HG006941 and Genetic Epidemiology Group at WTSI. We thank the residents of the Pomak and Mylopotamos villages for taking part. The MANOLIS study is dedicated to the memory of Manolis Giannakakis, 1978–2010. The HELIC study has been supported by many individuals who have contributed to sample collection (including Olina Bala-fouti, Christina Batzaki, Georgios Daskalakis, Eleni Emmanouil, Pounar Feritoglou, Chrisoula Giannakaki, Kiki Kaldaridou, Anastasia Kaparou, Stella Koinaki, Dimitra Kokori, Maria Konidari, Hara Koundouraki, Dimitris Koutoukidis, Eirini Mamalaki, Eirini Mpamiaki, Nilden Selim, Nesse Souloglou, Maria Tsoukara, Dimitra Tzakou, Katerina Vosdogianni and Niovi Xenaki), data entry (Thanos Antonos, Dimitra Papa-grigoriou and Betty Spiliopoulou), sample logistics (Sarah Edkins and Emma Gray), genotyping (Robert Andrews, Hannah Blackburn, Doug Simpkin and Siobhan White-head), research administration (Anja Kolb-Kokocinski, Carol Smeed and Danielle Walker) and informatics (Martin Pollard and Josh Randall). We thank all TEENAGE study participants and their families as well as all volunteers for their contribution in this study. We thank the following staff from the Sample Management and Genotyping Facilities at the Wellcome Trust Sanger Institute for sample preparation, quality control and genotyping: Dave Jones, Doug Simpkin, Emma Gray, Hannah Blackburn and Sarah Edkins. We thank MRC/UVRI for data contribution.

## Author contributions

Cohort collection: G.D., A.-E.F., C.K., E.T., M.K., R.N.N., A.K., M.S., E. Zeggini, V.M., A.A., M.G., V.-E.K. and E. Zeggini. Phenotype cleaning: A.-E.F., K.H., A.M., N.W.R., I.T. and E. Zeggini. Genetic data analyses: K.P., K.H., D.K.X., V.C., G.R.S.R., L.S., A.G., I.T., S.F., I.N., Y.X., M.M., Y.C., C.T.-S., M.S., G.McV. and E. Zeggini. Bioinformatics:

G.R.S.R., K.P., K.H., S.F. and E. Zeggini. Manuscript drafting: K.P., K.H., D.K.X., V.C., G.R.S.R., L.S., Y.X., M.M., C.T.-S., S.F. and E. Zeggini.

## Additional information

**Accession codes:** The HELIC-MANOLIS genotype data (Illumina Human OmniExpress) have been deposited in the European Genome-phenome Archive (EGA) under the accession code EGAS00001000687.

**Supplementary Information** accompanies this paper at <http://www.nature.com/naturecommunications>

**Competing financial interests:** The authors declare no competing financial interests.

**Reprints and permission** information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

**How to cite this article:** Panoutsopoulou, K. *et al.* Genetic characterization of Greek population isolates reveals strong genetic drift at missense and trait-associated variants. *Nat. Commun.* 5:5345 doi: 10.1038/ncomms6345 (2014).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

## ARTICLE

Received 25 Jun 2013 | Accepted 6 Nov 2013 | Published 17 Dec 2013

DOI: 10.1038/ncomms3872

OPEN

# A rare functional cardioprotective *APOC3* variant has risen in frequency in distinct population isolates

Ioanna Tachmazidou<sup>1</sup>, George Dedoussis<sup>2</sup>, Lorraine Southam<sup>1,3</sup>, Aliko-Eleni Farmaki<sup>2</sup>, Graham R.S. Ritchie<sup>1,4</sup>, Dionysia K. Xifara<sup>3,5</sup>, Angela Matchan<sup>1</sup>, Konstantinos Hatzikotoulas<sup>1</sup>, Nigel W. Rayner<sup>1,3</sup>, Yuan Chen<sup>1</sup>, Toni I. Pollin<sup>6</sup>, Jeffrey R. O'Connell<sup>6</sup>, Laura M. Yerges-Armstrong<sup>6</sup>, Chrysoula Kiagiadaki<sup>7</sup>, Kalliope Panoutsopoulou<sup>1</sup>, Jeremy Schwartzentruber<sup>1</sup>, Loukas Moutsianas<sup>3</sup>, UK10K consortium<sup>8</sup>, Emmanouil Tsafantakis<sup>7</sup>, Chris Tyler-Smith<sup>1</sup>, Gil McVean<sup>3</sup>, Yali Xue<sup>1</sup> & Eleftheria Zeggini<sup>1</sup>

Isolated populations can empower the identification of rare variation associated with complex traits through next generation association studies, but the generalizability of such findings remains unknown. Here we genotype 1,267 individuals from a Greek population isolate on the Illumina HumanExome Beadchip, in search of functional coding variants associated with lipid traits. We find genome-wide significant evidence for association between R19X, a functional variant in *APOC3*, with increased high-density lipoprotein and decreased triglycerides levels. Approximately 3.8% of individuals are heterozygous for this cardioprotective variant, which was previously thought to be private to the Amish founder population. R19X is rare (<0.05% frequency) in outbred European populations. The increased frequency of R19X enables discovery of this lipid traits signal at genome-wide significance in a small sample size. This work exemplifies the value of isolated populations in successfully detecting transferable rare variant associations of high medical relevance.

<sup>1</sup> Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton CB10 1SA, UK. <sup>2</sup> Department of Dietetics-Nutrition, Harokopio, University of Athens, Athens 17671, Greece.

<sup>3</sup> Wellcome Trust Centre for Human Genetics, Oxford OX3 7BN, UK. <sup>4</sup> European Molecular Biology Laboratory, European Bioinformatics Institute, Hinxton, CB10 1SD, UK. <sup>5</sup> Department of Statistics, University of Oxford, Oxford OX1 3TG, UK. <sup>6</sup> Division of Endocrinology, Diabetes, and Nutrition, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, Maryland 21201-1595, USA. <sup>7</sup> Anogia Medical Centre, Anogia 74051, Greece. <sup>8</sup> A list of consortium members are presented in Supplementary Note 1. Correspondence and requests for materials should be addressed to E.Z. (email: Eleftheria@sanger.ac.uk).

The escalating burden of cardiovascular and metabolic disease has growing health economics and societal implications. Blood lipid levels are measurable indices strongly associated with cardiometabolic disease endpoints. Genetic association studies have in the last few years substantially enhanced our understanding of factors underlying traits of high clinical importance, such as body mass index, lipid levels and blood pressure. Population isolates have been proposed as useful tools in genetic association studies for complex traits, as they are characterized by reduced phenotypic, environmental and genetic heterogeneity<sup>1</sup>. Furthermore, isolated populations can empower next generation association studies focusing on rare variation<sup>2</sup>, as trait-associated alleles may have drifted to higher frequency. However, the generalizability of novel associations identified in population isolates has been the subject of debate. Variants private to the isolate may be highly relevant for that particular population but of limited transferability to other populations. For example, a null *APOC3* variant, R19X, found to be associated with high-density lipoprotein (HDL) and triglycerides levels in the Amish was deemed to be population-specific as it was not detected in non-Amish individuals of European descent given available data at the time<sup>3</sup>.

There is growing empirical evidence that low-frequency and rare variants have an important role in complex human phenotypes. The Illumina HumanExome Beadchip has been developed as a cost-effective tool to study the role of exonic variants and has been successfully applied to the identification of new loci influencing insulin processing and secretion<sup>4</sup>.

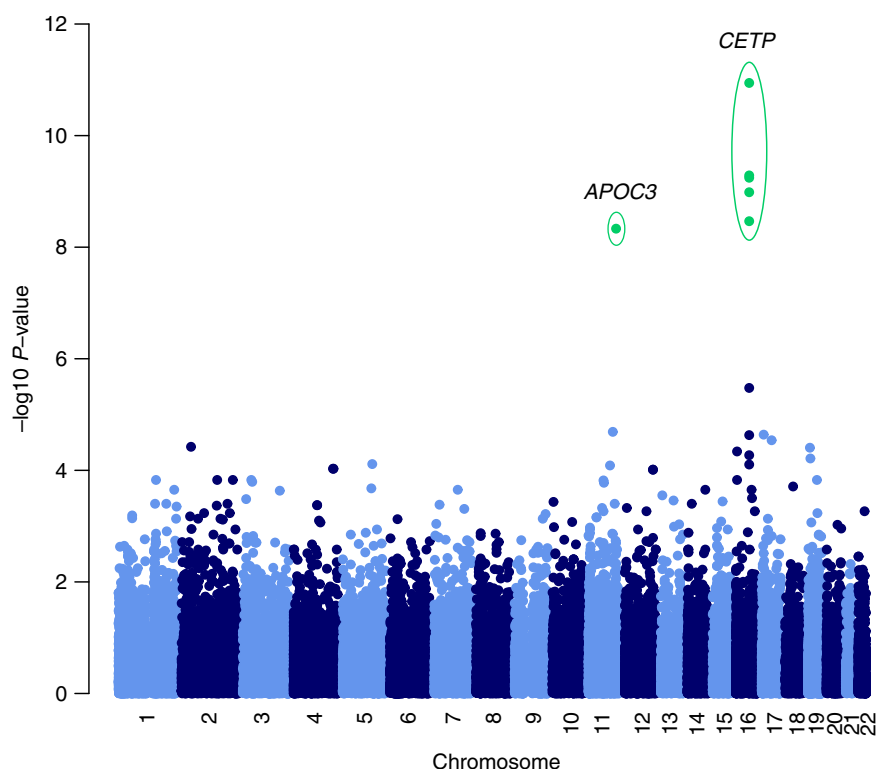
To identify potentially functional coding variants associated with cardiometabolic-related traits, we perform exome chip genotyping of 1,267 individuals from a Greek population isolate stemming from Anogia and the surrounding Mylopotamos villages on Crete (HELIC (Hellenic Isolated Cohorts) MANOLIS (Minoan Isolates) study, <http://www.helic.org>). The Mylopotamos villages' residents

anecdotally demonstrate high rates of longevity. Although Cretans have low mortality rates from cardiovascular disease<sup>5</sup>, their serum lipids are comparable to Northern Europeans<sup>6,7</sup>.

We find genome-wide significant evidence for association between R19X, a functional variant in *APOC3*, and increased HDL and decreased triglycerides levels. R19X is rare (<0.05% frequency) in outbred European populations, whereas its frequency has increased to 1.9% in MANOLIS, which enables discovery of this lipid traits signal at genome-wide significance in a small sample size. Our findings additionally address the generalizability of associations discovered in population isolates, as this cardioprotective variant was previously thought to be private to the Amish founder population.

## Results

**Exome chip-wide association analysis.** In an analysis of HDL levels using exome chip data in 1,256 individuals from the MANOLIS study (Supplementary Table S1), we find genome-wide significant evidence for association with common-frequency positive control variants in *CETP* (for example, rs1532624,  $P = 1.1 \times 10^{-11}$ , likelihood ratio test), the well-established HDL-associated locus which has accrued robust evidence for association across multiple populations (Fig. 1; Supplementary Fig. S1; Table 1)<sup>8–12</sup>. Despite the small sample size, we also find genome-wide significant evidence for association with a functional variant in *APOC3* (rs76353203, R19X,  $P = 4.6 \times 10^{-9}$ , likelihood ratio test), which explains 2.9% of the trait variance (Table 2; Fig. 2). The strongest R19X variant association is with decreased triglyceride levels ( $P = 1.1 \times 10^{-11}$ , likelihood ratio test) and explains 3.9% of trait variance (Table 2; Fig. 2). This clear cardioprotective effect is recapitulated in the strong association with high HDL as a dichotomized trait defined as  $> 60 \text{ mg dl}^{-1}$  (ref. 13) ( $P = 4.3 \times 10^{-10}$ , Table 2, likelihood ratio



**Figure 1 | Manhattan plot for HDL in MANOLIS.** Genome-wide statistical association evidence for HDL in MANOLIS.  $P$ -values are generated from the likelihood ratio test, as calculated by GEMMA software.

**Table 1 | CETP variants associated with HDL levels in MANOLIS.**

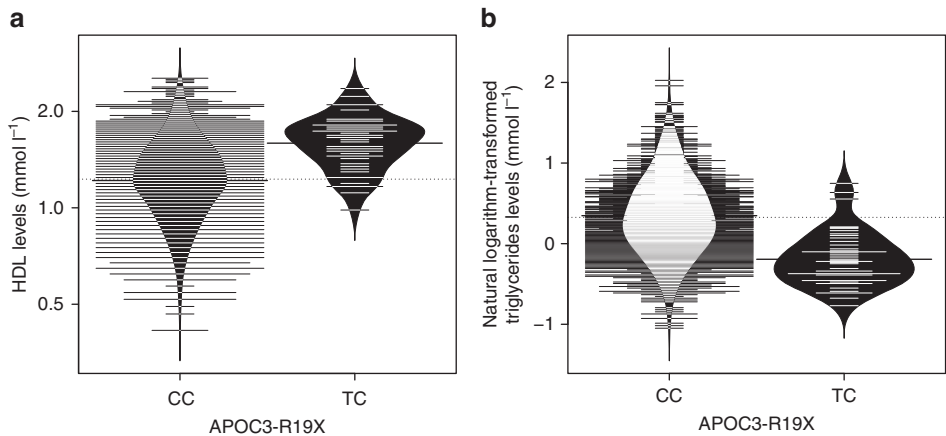
| rs ID     | Chromosome | Position | Effect allele | Effect allele frequency | Beta       | s.e.*      | P-value†               |
|-----------|------------|----------|---------------|-------------------------|------------|------------|------------------------|
| rs173539  | 16         | 56988044 | T             | 0.2924                  | 0.1007269  | 0.01689119 | $3.46 \times 10^{-9}$  |
| rs247616  | 16         | 56989590 | T             | 0.2833                  | 0.1044224  | 0.01694992 | $1.03 \times 10^{-9}$  |
| rs3764261 | 16         | 56993324 | A             | 0.2861                  | 0.1064031  | 0.01695299 | $5.16 \times 10^{-10}$ |
| rs1800775 | 16         | 56995236 | A             | 0.4514                  | 0.09163417 | 0.01461291 | $5.66 \times 10^{-10}$ |
| rs1532624 | 16         | 57005479 | A             | 0.4163                  | 0.103284   | 0.01503399 | $1.13 \times 10^{-11}$ |

\*Standard error.  
†P-values are calculated using the likelihood ratio test, as calculated by the GEMMA software.

**Table 2 | Distribution of lipid traits by R19X genotype.**

| Trait                                     | CC*               | CT*            | Effect size†         | P-value‡               |
|-------------------------------------------|-------------------|----------------|----------------------|------------------------|
| N                                         | 1,219             | 48             | —                    | —                      |
| Sex (M:F)                                 | 518:699           | 23:24          | 0.943 (0.813, 1.093) | 0.435                  |
| Age (years)§                              | 62.058 (19.51)    | 66.234 (17.20) | 5.257 (2.944)        | 0.189                  |
| HDL (mmol l <sup>-1</sup> )               | 1.265 (0.35)      | 1.619 (0.30)   | 0.319 (0.054)        | $4.65 \times 10^{-9}$  |
| LDL (mmol l <sup>-1</sup> )               | 3.272 (0.94)      | 3.205 (0.73)   | -0.042 (0.143)       | 0.767                  |
| Total cholesterol (mmol l <sup>-1</sup> ) | 5.288 (1.10)      | 5.225 (0.79)   | -0.047 (0.167)       | 0.778                  |
| Triglycerides (mmol l <sup>-1</sup> )     | 0.313 (0.49)      | -0.220 (0.33)  | -0.513 (0.075)       | $1.10 \times 10^{-11}$ |
| High HDL                                  | 232/1209 (0.192%) | 28/47 (0.596%) | 1.471 (1.305, 1.659) | $4.29 \times 10^{-10}$ |
| Low HDL                                   | 307/1209 (0.254%) | 1/47 (0.021%)  | 0.812 (0.713, 0.924) | $1.64 \times 10^{-3}$  |

\*Untransformed variables are presented as mean (s.d.) and natural logarithm-transformed variables are presented as median (s.d.).  
†For continuous traits beta values (standard error) are reported, whereas for binary traits odds ratios and 95% confidence intervals are reported.  
‡P-values are calculated using the likelihood ratio test, as calculated by the GEMMA software.  
§Inverse-normalized for analysis.



**Figure 2 | Bean plot of HDL and triglycerides by APOC3 R19X genotype.** The y-axis shows the untransformed HDL (a) levels (mmol l<sup>-1</sup>) and the natural logarithm-transformed triglycerides (b) levels (mmol l<sup>-1</sup>), respectively. HDL  $P = 4.65 \times 10^{-9}$  and triglycerides  $P = 1.10 \times 10^{-11}$ . P-values are generated from the likelihood ratio test, as calculated by GEMMA software.

test). We observe a trend for the minor allele frequency (MAF) to increase with age (Supplementary Fig. S2). There was no evidence for the association of R19X with C-reactive protein (CRP) levels, anthropometric, glycaemic and blood pressure traits and no attenuation of the signal was observed when conditioning on smoking status (Table 2; Supplementary Table S2). The single nucleotide protein (SNP) that led to the original R19X discovery in the Amish<sup>3</sup> is located in the *DSCAML1* gene (rs10892151) and was highly correlated to R19X in that founder population ( $D' = 1$ ,  $r^2 = 0.85$ ). In the MANOLIS cohort, we find that the two variants are poorly correlated ( $r^2 = 0.001$ ), whereas only three of the possible four haplotypes are observed ( $D' = 1$ , due to low allele frequency).

The T allele, which is the derived allele, changes an arginine residue into a stop codon in exon 2 of all three coding transcripts of the *APOC3* gene. The introduction of a premature stop codon at this position means that the mRNA transcripts are likely to be subject to non-sense-mediated decay and will not be translated.

**R19X frequency and haplotype analysis.** R19X has a frequency of 1.9% in the MANOLIS cohort, but is very rare (0.035% frequency; T:3, C:8585) in 4,924 European-descent exomes from the NHLBI data (Exome Variant Server, NHLBI, <http://evs.gs.washington.edu/EVS/> (accessed February 2013)) and is not present in the 1,000 Genome Project data<sup>14</sup>. The R19X minor allele is

carried by 4 out of 3,621 whole genome sequenced individuals in the UK10K study (<http://www.uk10k.org>) (MAF = 0.05%). Individuals with the R19X variant do not tend to be closely related in MANOLIS, with 97.3% of carrier pairs having  $\leq 10\%$  of alleles identical by descent exome array-wide (Supplementary Table S3).

The age of the R19X variant in the general European population is estimated at 3.0KYA (95% CI 0–9.0KYA)<sup>15</sup>, which supports the idea that this variant was present at a low frequency in Europe before this Cretan isolate was established. To test this, we examined local haplotypes from UK10K and find that the four chromosomes with the T (stop) alleles share the same  $\sim 700$  kb haplotype ( $\sim 200$  kb-stop- $\sim 500$  kb) as we might expect given the frequency of the allele and its age estimated from this frequency. The MANOLIS carriers also all share the same  $\sim 400$  kb downstream haplotype, which matches  $\sim 400$  kb of the  $\sim 500$  kb UK10K haplotype, and some share the entire region. We also examined the Amish T carrier haplotype data and found that the Amish also share almost the same haplotype (181 kb-stop-390 kb) (Supplementary Fig. S3). These findings suggest that R19X has a single recent origin in Europe that predates the establishment of the MANOLIS and Amish isolates, and that it has risen to a relatively high frequency in the two isolates due to genetic drift.

To examine patterns of haplotype sharing around R19X more broadly in the MANOLIS cohort, we identified stretches of maximal haplotype identity along chromosome 11 between pairs of samples using an adaptation of the long-range phasing algorithm of Kong *et al.*<sup>16</sup> As expected from an isolated population, haplotype sharing is extensive, such that the median size of maximal haplotype identity around a randomly sampled chromosomal location is 14.8 Mb (15.3 cM). However, around R19X, haplotype sharing is no more extensive than elsewhere on the chromosome, nor is it greater among carriers than non-carriers (Kolmogorov–Smirnov test  $P = 0.8$ ; Supplementary Fig. S4). Moreover, there is no evidence for cryptic relatedness, substructure or for any extended correlation between genetic background and carrier status (Supplementary Fig. S5), as excess relatedness decays exponentially away from the risk locus as expected. Around R19X, the profile of maximal haplotype identity is well-approximated by a model in which the common ancestor to the genealogical nearest neighbour occurred an average of 4.1 generations ago. This provides a lower bound for the age of the mutation at c. 100 years ago assuming a generation time of 25 years. Interestingly, around other variants of the same frequency, we find greater levels of cryptic relatedness (Supplementary Fig. S6), suggesting that these are typically more recent.

**APOC3 variant associations with lipid traits.** Functional coding mutations in the APOC3 locus have previously been implicated in several traits related to triglycerides and HDL cholesterol levels<sup>17–21</sup>. Variants in the promoter of this gene have also been associated with hypertriglyceridemia<sup>22,23</sup>, changes in response to insulin regulation<sup>24,25</sup>, and in the case of rs2542052, with low serum APOC3 levels and longevity<sup>26</sup>. We find no evidence for association between rs2542052 and HDL level in the MANOLIS cohort ( $P = 0.76$ , likelihood ratio test).

A large-scale meta-analysis of genome-wide association studies across  $\sim 100,000$  individuals has also identified robust associations between a common-frequency variant (rs964184) 51.5 kb upstream of APOC3 and HDL and triglycerides levels<sup>12</sup>. We find little evidence for linkage disequilibrium between rs964184 and R19X ( $r^2 = 0.01$ ,  $D' = 0.34$ ) in the MANOLIS cohort (Supplementary Table S4), indicating that these are two distinct signals within the same locus. This is further supported by conditional analysis (Supplementary Table S5).

## Discussion

In this study, we examine a newly characterized population isolate from Crete in Greece. Our findings in the Greek isolate demonstrate the utility of the exome array in the discovery of low-frequency variant associations in traits of medical relevance. We find R19X to be associated with increased HDL and reduced triglycerides levels at genome-wide significance. This work provides insights into the allelic architecture of the APOC3 locus, in which common variants have also been found to be associated with lipid traits by genome-wide association study (for example, Teslovich *et al.*<sup>12</sup>) and highlights the dramatic gains in power that can be afforded by studying population isolates. The R19X functional rare variant has risen in frequency to  $\sim 2\%$  in this population, enabling discovery of this lipid traits signal at genome-wide significance in a small sample size. The equivalent sample size needed to achieve 80% power to detect the observed effect size in an outbred European population would be 67,000. Our findings additionally address the generalizability of associations discovered in population isolates both at the gene and at the variant level. The R19X variant has also risen in frequency and shows association with HDL in the Amish founder population<sup>3</sup>. A summary statistic-based meta-analysis across the MANOLIS and Amish<sup>3</sup> population isolates for R19X leads to a combined  $P$ -value of  $8.1 \times 10^{-32}$ , achieved with a total sample size of  $\sim 2,700$ . APOC3 R19X constitutes to our knowledge the first known example of a clinically important variant that was previously thought to be private to a population but which has in fact drifted in frequency in two independent population isolates and is strongly associated with traits of high clinical relevance. Next generation association studies in search of low frequency and rare variants associated with complex disease can be greatly assisted by the study of population isolates.

## Methods

**Anogia population history.** Anogia is a geographically isolated mountainous village on the island of Crete, Greece (population size 4,000). It is located on mount Idi and is part of the municipality of Mylopotamos, which includes further isolated villages. The name Anogia means 'Upper Earth' and refers to the altitude at which the village is located (740 m). The residents of Anogia demonstrate characteristic Cretan resolve, great pride in their land and uphold ancient traditions. In 1593, the settlement numbered 911 citizens. Anogia is historically renowned for its residents' resistance to conquerors. The village has been built three times, as it was burnt down twice by the Turks (in 1822 and 1866) and once by the Germans (in 1944). The local dialect is still strongly influenced by the ancient Dorian language.

**HELIC cohort collection.** The HELIC-MANOLIS collection focuses on Anogia and surrounding Mylopotamos villages. Recruitment of this population-based sample was primarily carried out at the village medical centres. All individuals were older than 17 years and had to have at least one parent from the Mylopotamos area. The study includes biological sample collection for DNA extraction and lab-based blood measurements, and interview-based questionnaire filling. The phenotypes collected include anthropometric and biometric measurements, clinical evaluation data, biochemical and haematological profiles, self-reported medical history, demographic, socioeconomic and lifestyle information. Biochemical measurements were obtained using enzymatic colorimetric assays and included glucose (hexokinase method), total cholesterol (cholesterol oxidase – phenol aminophenazone method), HDL-cholesterol, triglycerides (glycerol-3-phosphate oxidase-phenol aminophenazone) and iron. Insulin and ferritin were measured via chemiluminescence and CRP through an immunoturbidimetric method. Low-density lipoprotein (LDL)-cholesterol levels were calculated according to Friedewald equation<sup>27</sup>. The study was approved by the Harokopio University Bioethics Committee, and informed consent was obtained from human subjects.

**Genotyping and QC.** Samples were genotyped using the Infinium HumanExome and genotypes were called using Illumina Genome Studio Gencall followed by zCall<sup>28</sup>. We undertook a staged quality control (QC) approach; briefly, we performed an initial prefilter on the GenCalled data excluding samples and variants that had call rate  $< 90\%$ . We carried out a pre-zCall sample QC, excluding samples that had  $< 98\%$  call rate or that were heterozygosity outliers based on the distribution at two different MAF thresholds (MAF  $< 1\%$  and MAF  $\geq 1\%$ ). We also excluded samples that were gender discordant and samples that had genotype discordances when we compared these exome chip genotypes to genome-wide

genotypes that were established previously using the Illumina OmniExpress platform. No variant exclusions were made at this stage because zCall performs variant QC (which includes call rate  $>99\%$ , MAF  $>5\%$ , Hardy Weinberg Equilibrium (HWE)  $<0.00001$ ). Following zCall, we performed variant QC using the GenCalled genotypes (call rate  $<95\%$ , HWE  $P<0.0001$ , cluster separation score  $<0.4$ ). Sample QC was then carried out on the zCall data excluding samples that were ethnicity outliers or duplicates, that had a call rate  $<99\%$ , or that were heterozygosity outliers, performed at two different MAF thresholds (MAF  $<1\%$  and MAF  $\geq 1\%$ ). We excluded variants with a zCall call rate  $<99\%$ . We applied a final sample QC step examining again the multidimensional scaling results, MAF  $<1\%$  heterozygosity distribution in combination with the number of singletons per sample, and excluded combined visual outliers and any samples that had a minor allele count of 1 for  $>100$  variants. We also applied a final HWE step excluding variants with HWE  $P<0.0001$ . A total of 1,267 samples and 61,638 variants that were not monomorphic passed QC (Supplementary Table S1).

**Trait transformations and analysis.** Trait values were considered to be outliers if they were five standard deviations away from the average value, and were removed from the analysis. Also, LDL values were excluded for individuals with triglycerides level of  $>400$  mg dl $^{-1}$ . All phenotypes were analysed directly, apart from triglycerides, insulin, CRP and ferritin, which were normalized using the natural logarithm transformation. Age was inverse normalized. An individual was considered to have high HDL if HDL was over or equal to 60 mg dl $^{-1}$ , whereas low HDL was defined as HDL  $<40$  mg dl $^{-1}$ . We performed trait association analysis using GEMMA<sup>29</sup> which incorporates a kinship matrix to account for the relatedness between individuals. *P*-values were produced using the likelihood ratio test. The kinship matrix was generated using exome array genotype data. For HDL and triglycerides, we performed a three-way meta-analysis using the Fisher's method across the MANOLIS data and the results reported by Pollin *et al.*<sup>3</sup> (809 Old Order Amish individuals from the Heredity and Phenotype Intervention Heart Study, and 698 Amish individuals from the Amish Family Calcification Study).

**Haplotype analysis to estimate the variant age.** Four individuals in the UK10K data set each have one stop allele at R19X. We extracted 1 Mb haplotypes each side of the variant from these individuals as well as from 20 other randomly chosen individuals from the UK data set using only the sites which overlapped with the MANOLIS data set. They shared the same  $\sim 700$  kb haplotype ( $\sim 200$  kb-stop- $\sim 500$  kb) as we might expect given the frequency of the allele and its age estimated from this frequency (3.0 KYA, 95% CI 0–9.0 KYA). We then constructed haplotypes for the 48 chromosomes with the stop allele in MANOLIS in the same way. One major inferred ancestral haplotype (accounting for 99/3,740 haplotypes (2.6%) in 99/1,870 individuals (5.3%) of the Amish cohort) with 53 SNPs from Illumina HumanExome Beadchip data was compared with the shared haplotype between UK10K and MANOLIS. Forty-five SNPs were shared among the three data sets. The Amish haplotype shares at least 571 kb (181 kb-stop-390 kb, 116,520,527–117,091,609) with the HELIC and UK10K haplotypes. There are no SNPs in the Amish data between 116,973,929 and 117,100,594 where the HELIC-UK10K shared haplotype ends, and the next SNP available in the Amish data shows that the haplotype is different from the UK10K haplotype. The shared haplotype between the Amish and HELIC-UK10K may extend some way beyond 117,091,609.

**Identification of maximal haplotype sharing.** To identify stretches of extended haplotype sharing between individuals, we used a modification of the long-range phasing method of Kong *et al.*<sup>16</sup> Briefly, for each target individual, we identify a pair of other individuals from the sample as surrogate parents, such that the target individual's genotype is compatible with Mendelian transmission from the pseudo-parents. We allow for a low level of genotyping error (here 1%) and recombination (here proportional to the fine-scale HapMap genetic map<sup>30</sup>, such that between any pair of SNPs, one of the pseudo-parents can change). We find the most likely parent-pair path using the Viterbi algorithm and reconstruct shared haplotype lengths. Informally, the algorithm can be thought of as attempting to find, for each of an individual's two chromosomes, those other samples that contain genealogical nearest neighbours. In isolated populations, the method can be used to detect cryptic relatedness and stratification within a sample. The analysis was restricted to those with low levels of relatedness ( $\hat{\pi}<0.2$ ; 754 individuals of whom 32 are carriers for the risk variant; results are similar with  $\hat{\pi}<0.1$ ).

## References

- Peltonen, L., Palotie, A. & Lange, K. Use of population isolates for mapping complex traits. *Nat. Rev. Genet.* **1**, 182–190 (2000).
- Zeggini, E. Next-generation association studies for complex traits. *Nat. Genet.* **43**, 287–288 (2011).
- Pollin, T. I. *et al.* A null mutation in human APOC3 confers a favorable plasma lipid profile and apparent cardioprotection. *Science* **322**, 1702–1705 (2008).
- Huyghe, J. R. *et al.* Exome array analysis identifies new loci and low-frequency variants influencing insulin processing and secretion. *Nat. Genet.* **45**, 197–201 (2013).
- Keys, A. Coronary Heart Disease in seven countries. *Circulation* **41**, 1–211 (1970).
- Menotti, A. *et al.* Food intake patterns and 25-year mortality from coronary heart disease: cross-cultural correlations in the Seven Countries Study. The Seven Countries Study Research Group. *Eur. J. Epidemiol.* **15**, 507–515 (1999).
- Renaud, S. *et al.* Cretan Mediterranean diet for prevention of coronary heart disease. *Am. J. Clin. Nutr.* **61**, 1360S–1367S (1995).
- Aulchenko, Y. S. *et al.* Loci influencing lipid levels and coronary heart disease risk in 16 European population cohorts. *Nat. Genet.* **41**, 47–55 (2009).
- Kathiresan, S. *et al.* Common variants at 30 loci contribute to polygenic dyslipidemia. *Nat. Genet.* **41**, 56–65 (2009).
- Ridker, P. M. *et al.* Polymorphism in the CETP gene region, HDL cholesterol, and risk of future myocardial infarction: genomewide analysis among 18 245 initially healthy women from the Women's Genome Health Study. *Circ. Cardiovasc. Genet.* **2**, 26–33 (2009).
- Smith, E. N. *et al.* Longitudinal genome-wide association of cardiovascular disease risk factors in the Bogalusa heart study. *PLoS Genet.* **6** (2010).
- Teslovich, T. M. *et al.* Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature* **466**, 707–713 (2010).
- Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* **285**, 2486–2497 (2001).
- Abecasis, G. R. *et al.* An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* **491**, 56–65 (2012).
- Fu, W. *et al.* Analysis of 6,515 exomes reveals the recent origin of most human protein-coding variants. *Nature* **493**, 216–220 (2013).
- Kong, A. *et al.* Detection of sharing by descent, long-range phasing and haplotype imputation. *Nat. Genet.* **40**, 1068–1075 (2008).
- Luttmann, S. *et al.* Electrophoretic screening for genetic variation in apolipoprotein C-III: identification of a novel apoC-III variant, apoC-III(Asp45-->Asn), in a Turkish patient. *J. Lipid. Res.* **35**, 1431–1440 (1994).
- Maeda, H., Hashimoto, R. K., Ogura, T., Hiraga, S. & Uzawa, H. Molecular cloning of a human apoC-III variant: Thr 74—Ala 74 mutation prevents O-glycosylation. *J. Lipid. Res.* **28**, 1405–1409 (1987).
- Pullinger, C. R. *et al.* A novel apolipoprotein C-III variant, apoC-III(Gln38—>Lys), associated with moderate hypertriglyceridemia in a large kindred of Mexican origin. *J. Lipid. Res.* **38**, 1833–1840 (1997).
- von Eckardstein, A. *et al.* Apolipoprotein C-III(Lys58—Glu). Identification of an apolipoprotein C-III variant in a family with hyperalphalipoproteinemia. *J. Clin. Invest.* **87**, 1724–1731 (1991).
- Xu, C. F. *et al.* Association between genetic variation at the APO AI-CIII-AIV gene cluster and familial combined hyperlipidaemia. *Clin. Genet.* **46**, 385–397 (1994).
- Dammerman, M., Sandkuijl, L. A., Halaas, J. L., Chung, W. & Breslow, J. L. An apolipoprotein CIII haplotype protective against hypertriglyceridemia is specified by promoter and 3' untranslated region polymorphisms. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **90**, 4562–4566 (1993).
- Talmud, P. J. *et al.* Relative contribution of variation within the APOC3/A4/A5 gene cluster in determining plasma triglycerides. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 3039–3046 (2002).
- Li, W. W. *et al.* Common genetic variation in the promoter of the human apo CIII gene abolishes regulation by insulin and may contribute to hypertriglyceridemia. *J. Clin. Invest.* **96**, 2601–2605 (1995).
- Waterworth, D. M. *et al.* Variants in the APOC3 promoter insulin responsive element modulate insulin secretion and lipids in middle-aged men. *Biochim. Biophys. Acta* **1637**, 200–206 (2003).
- Atzmon, G. *et al.* Lipoprotein genotype and conserved pathway for exceptional longevity in humans. *PLoS Biol.* **4**, e113 (2006).
- Friedewald, W. T., Levy, R. I. & Fredrickson, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.* **18**, 499–502 (1972).
- Goldstein, J. I. *et al.* zCall: a rare variant caller for array-based genotyping: genetics and population analysis. *Bioinformatics* **28**, 2543–2545 (2012).
- Zhou, X. & Stephens, M. Genome-wide efficient mixed-model analysis for association studies. *Nat. Genet.* **44**, 821–824 (2012).
- Altshuler, D. M. *et al.* Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations. *Nature* **467**, 52–58 (2010).

## Acknowledgements

This work was funded by the Wellcome Trust (098051) and the European Research Council (ERC-2011-StG 280559-SEPI). The Amish study was supported by the following grants: R01 HL04193, NIH U01 HL072515, NIH U01 HL105198, NIH P30 DK072488 and NIH K01 HL116770. The MANOLIS cohort is named in honour of Manolis

Giannakakis, 1978–2010. We thank the residents of Anogia and surrounding Mylopotamos villages for taking part. The HELIC study ([www.helic.org](http://www.helic.org)) has been supported by many individuals who have contributed to sample collection (including Olina Balafouti, Christina Batzaki, Georgios Daskalakis, Eleni Emmanouil, Chrisoula Giannakaki, Margarita Giannakopoulou, Anastasia Kaparou, Vasiliki Kariakli, Stella Koinaki, Dimitra Kokori, Maria Konidari, Hara Koundouraki, Dimitris Koutoukidis, Eirini Mamalaki, Eirini Mpamiaki, Maria Tsoukara, Dimitra Tzakou, Katerina Vosdogianni and Niovi Xenaki), data entry (Thanos Antonos, Dimitra Papagrigoriou and Betty Spiliopoulou), sample logistics (Sarah Edkins and Emma Gray), genotyping (Robert Andrews, Hannah Blackburn, Doug Simpkin and Siobhan Whitehead), research administration (Anja Kolb-Kokocinski and Carol Smea) and informatics (Martin Pollard and Josh Randall). We would also like to thank Klaudia Walter and Dawn Muddyman for their assistance with accessing UK10K data. This study makes use of data generated by the UK10K Consortium, derived from samples from UK10K\_COHORTS\_TWINSUK (The TwinsUK Cohort) and UK10K\_COHORT\_ALSPAC (the Avon Longitudinal Study of Parents and Children). A full list of the investigators who contributed to the generation of the data is available from [www.UK10K.org](http://www.UK10K.org). Funding for UK10K was provided by the Wellcome Trust under award WT091310.

### Author contributions

Cohort collection: G.D., A.-E.F., C.K., E.T. and E.Z. Phenotype cleaning: A.-E.F., K.H., A.M., N.W.R., I.T. and E.Z. Bioinformatics: G.R.S.R., L.S., I.T. and E.Z. Genotype data processing and cleaning: K.H., A.M., K.P., N.W.R., J.S., L.S., I.T. and E.Z. Genotype-phenotype association testing: L.S., I.T. and E.Z. UK10K haplotype analyses: Y.C.,

UK10K Consortium, Chris Tyler-Smith, Yali Xue. Amish haplotype analysis: T.I.P., J.R.O'C., L.M.Y.-A. and Y.X. HELIC haplotype sharing: G.M., L.M. and D.K.X. Manuscript drafting: G.R.S.R., L.S., I.T., D.K.X., Y.X. and E.Z.

### Additional information

**Accession codes:** The HELIC-MANOLIS study genotype data have been deposited to the European Genome-phenome Archive (EGA) under the accession code EGAS00001000630. UK10K sequence data have been deposited to the EGA under the accession codes EGAS00001000108 and EGAS00001000090.

**Supplementary Information** accompanies this paper at <http://www.nature.com/naturecommunications>

**Competing financial interests:** The authors declare no competing financial interests.

**Reprints and permissions** information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

**How to cite this article:** Tachmazidou, I. *et al.* A rare functional cardioprotective APOC3 variant has risen in frequency in distinct population isolates. *Nat. Commun.* 4:2872 doi: 10.1038/ncomms3872 (2013).



This article is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported Licence. To view a copy of this licence visit <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>.

Published in final edited form as:

Nature. 2015 July 23; 523(7561): 459–462. doi:10.1038/nature14618.

## Directional dominance on stature and cognition in diverse human populations

*A full list of authors and affiliations appears at the end of the article.*

# These authors contributed equally to this work.

### Abstract

Homozygosity has long been associated with rare, often devastating, Mendelian disorders<sup>1</sup> and Darwin was one of the first to recognise that inbreeding reduces evolutionary fitness<sup>2</sup>. However, the effect of the more distant parental relatedness common in modern human populations is less well understood. Genomic data now allow us to investigate the effects of homozygosity on traits of public health importance by observing contiguous homozygous segments (runs of homozygosity, ROH), which are inferred to be homozygous along their complete length. Given the low levels of genome-wide homozygosity prevalent in most human populations, information is required on very large numbers of people to provide sufficient power<sup>3,4</sup>. Here we use ROH to study 16 health-related quantitative traits in 354,224 individuals from 102 cohorts and find statistically significant associations between summed runs of homozygosity (SROH) and four complex traits: height, forced expiratory lung volume in 1 second (FEV1), general cognitive ability (*g*) and educational attainment (nominal  $p < 1 \times 10^{-300}$ ,  $2.1 \times 10^{-6}$ ,  $2.5 \times 10^{-10}$ ,  $1.8 \times 10^{-10}$ ). In each case increased homozygosity was associated with decreased trait value, equivalent to the offspring of first cousins being 1.2 cm shorter and having 10 months less education. Similar effect sizes were found across four continental groups and populations with different degrees of genome-wide homozygosity, providing convincing evidence for the first time that homozygosity, rather than confounding, directly contributes to phenotypic variance. Contrary to earlier reports in substantially smaller samples<sup>5,6</sup>, no evidence was seen of an influence of genome-wide homozygosity on blood pressure and low density lipoprotein (LDL) cholesterol, or ten other cardio-metabolic traits. Since directional dominance is predicted for traits under directional evolutionary selection<sup>7</sup>, this study provides evidence that increased stature and cognitive function have been positively selected in human evolution, whereas many important risk factors for late-onset complex diseases may not have been.

---

Reprints and permissions information is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints). Users may view, print, copy, and download text and data-mine the content in such documents, for the purposes of academic research, subject always to the full Conditions of use: [http://www.nature.com/authors/editorial\\_policies/license.html#terms](http://www.nature.com/authors/editorial_policies/license.html#terms)

Correspondence and requests for materials should be addressed to [jim.wilson@ed.ac.uk](mailto:jim.wilson@ed.ac.uk).

Supplementary Information is linked to the online version of the paper at [www.nature.com/nature](http://www.nature.com/nature)

Competing financial interests: GP is a co-founder of CAVADIS B.V. SWvL is a former employee of CAVADIS B.V. BMP serves on the Data and Safety Monitoring Board of a clinical trial funded by the manufacturer (Zoll Lifecor) and on the Yale Open Data Access Project funded by Johnson & Johnson. NPo has received financial support and consultancy fees from several pharmaceutical companies that manufacture either blood-pressure-lowering or lipid-lowering agents or both. PS has received research awards from Pfizer. No other authors declared a conflict of interest.

Inbreeding influences complex traits through increases in homozygosity and corresponding reductions in heterozygosity, most likely resulting from the action of deleterious (partially) recessive mutations<sup>8</sup>. For polygenic traits, a systematic association with genome-wide homozygosity is not expected when dominant alleles at some loci increase the trait value while others decrease it. Rather, dominance must be biased in one direction on average over all causal loci, for instance to decrease the trait. Such directional dominance is expected to arise in evolutionary fitness-related traits due to directional selection<sup>8</sup>. Studies of genome-wide homozygosity thus have the potential to reveal the non-additive allelic architecture of a trait and its evolutionary history. Historically inbreeding has been measured using pedigrees<sup>9</sup>. However, such techniques cannot account for the stochastic nature of inheritance, nor are they practical for the capture of the distant parental relatedness present in most modern day populations. High density genome-wide single nucleotide polymorphism (SNP) array data can now be used to assess genome-wide homozygosity directly, using genomic runs of homozygosity (ROH). Such runs are inferred to be homozygous-by-descent and are common in human populations<sup>10-11</sup>. SROH is the sum of the length of these ROH, in megabases of DNA.  $F_{ROH}$  is the ratio of SROH to the total length of the genome. Like pedigree-based  $F$  (with which it is highly correlated<sup>3</sup>),  $F_{ROH}$  estimates the probability of being homozygous at any site in the genome.  $F_{ROH}$  has been shown to vary widely within and between populations<sup>12</sup> and is a powerful method of detecting genome-wide homozygosity effects<sup>13</sup>.

We found marked differences by geography and demographic history in both the population mean SROH and the relationship between SROH and NROH (the numbers of separate runs of homozygosity). (Fig. 1). As observed previously<sup>3,12,14</sup>, isolated populations have a higher burden of ROH whereas African heritage populations have the least homozygosity.

We studied  $\beta_{F_{ROH}}$ , defined as the effect of  $F_{ROH}$  on 16 complex traits of biomedical importance (Fig. 2). For height, FEV1 (forced expiratory volume in one second, a measure of lung function), educational attainment (EA) and  $g$  (a measure of general cognitive ability derived from scores on several diverse cognitive tests), we found the effect sizes were greater than two intra-sex standard deviations (SD), with p-values all less than  $10^{-5}$ . Thus the associations could not plausibly be explained by chance alone (Table 1; see Extended data Figs. 1-4 for Forest plots of individual traits; Supplementary Table 1 for SD). To ensure that the results were not driven by a few outliers, we repeated the analysis excluding extreme sub-cohort trait results. In all cases the effect sizes and their significance remained similar or increased (see Supplementary Table 2 for comparisons with and without outliers). After exclusion of outliers, these effect sizes translate into a reduction of 1.2 cm in height and 137 ml in FEV1 for the offspring of first cousins, and into a decrease of 0.3 SD in  $g$  and 10 months less educational attainment.

We performed a number of analyses to exclude confounding. Whilst SROH is wholly a genetic effect, its inheritance is entirely non-additive. Therefore, unlike in genome-wide association, an association with population genetic structure or co-segregation of additive genome-wide polygenic effects and SROH (as opposed to SNPs in a GWAS) are not expected as a matter of course, except in the case of siblings. However, confounding could still theoretically arise as discussed below. We therefore assessed this by conducting

stratified and covariate analyses. We found effects of similar magnitude and in the same direction for all four traits across isolated and non-isolated European, Finnish, African, Hispanic, East Asian and South and Central Asian populations (Extended Data Fig. 5a, Supplementary Table 3). We further tested whether the effect sizes were similar when cohorts were split into more and less homozygous groups. The effect sizes were very similar even though the degree of homozygosity (and variation in homozygosity) varied 3-10-fold between the two strata (depending on which cohorts contributed to the trait; Extended Data Fig. 5b). This suggests a broadly linear relationship with SROH. In general confidence intervals overlap for stratified estimates, suggesting differences arose due to sampling variance. Larger confidence intervals for some estimates reflect the lower power of some strata, in turn reflecting the sample size and degree of homozygosity of those strata (e.g. the wider confidence intervals for estimates of Educational Attainment  $\beta_{\text{FROH}}$  for Finnish and African strata). Finally, we fitted educational attainment as a proxy for potential confounding by socio-economic status; this covariate was available in sufficient (47) cohorts to maintain power. The estimated effect sizes for height, FEV1 and  $g$  all reduced (17%, 18% and 35%, Fig. Extended Data Fig. 5c), but this might have been expected given the known covariance between these three traits and EA, and the association we found between educational attainment and  $\text{FROH}$ . We found very small differences (3-11% reductions) in estimated  $\beta_{\text{FROH}}$  (Extended Data Fig. 6, supplementary table 4), when comparing the fitting of polygenic mixed models as opposed to fixed-effect-only models, again suggesting that confounding (in this case due to polygenic effects due to recent common ancestry) was not substantially affecting the results.

Despite the observed 17-35% reductions in estimated effect sizes for  $\text{FROH}$  on height, FEV1 and  $g$ , when fitting educational attainment as a covariate, the persistence of an effect suggests that most of the signals we observe are genetic. The consistency of effects with and without fitting relatedness and in particular in populations with very different degrees of homozygosity, all appear inconsistent with confounding due to environmental or additive genetic effects. As does the broad similarity in effect sizes across continents, although the relatively smaller numbers of cohorts of non-European descent meant we had limited power to detect inter-continental differences in effect sizes.

It is also interesting to consider the potential influence of assortative mating, which is commonly observed for human stature, cognition and education. The phenotypic extremes could be more genetically similar to each other and hence the offspring more homozygous, even if the highly polygenic trait architectures reduce this effect. However, at least in its simplest balanced form, the increase in genetic similarity would be equal at both ends of the phenotypic distribution, leading to no linear association between such genetic similarity and the trait; both tall and short people would be more homozygous. Furthermore, humans also mate assortatively on body mass index (BMI), for which we see no effect. A more complex possibility, a form of reverse-causality, could arise when subjects from one trait extreme (e.g. more educated people) are on average more geographically mobile, and thus have less homozygous offspring, with those offspring in turn inheriting the trait extreme concerned<sup>15</sup>. We do not think that this mechanism can account for our results, since it does not readily explain the constancy of our results under different models, especially the similarity in

$\beta_{\text{FROH}}$  for either more or less homozygous populations. Moreover, we observe similar effects in multiple single village cohorts, and the Amish and Hutterites, where there is no geographic structure and/or no sampling of immigrants, hence such confounding by differential migration cannot occur.

Our estimate for the effect of homozygosity in height is consistent with previous work: genomic<sup>4</sup> and pedigree<sup>16</sup> studies have shown genome-wide homozygosity effects on stature with similar effect sizes (0.01 increase in  $F$  decreases height by 0.037 SD<sup>16</sup> versus 0.029 SD in the present study). We speculate that homozygosity is acting on a shared endophenotype of torso size which we detect in the height and FEV1 traits. The fact that the FEV1/FVC (forced vital capacity) ratio is not associated with ROH points to the effect being on lung/chest size rather than airway calibre. The cognition effects cannot be wholly generated by height as an intermediate cause, given the greater proportion of variance explained for cognition, although we note that the correlation between height and cognition is 0.16 (SE 0.01), and the genetic correlation (the correlation in additive genetic values) is 0.28 (SE 0.09; ref 17). Height is the canonical human complex trait, highly heritable and polygenic, with 697 genome-wide significant variants in 423 loci explaining 20% of the heritability and all common variants predicted to explain 60% of the heritability<sup>18</sup>. Most of the genetic architecture appears to be additive in nature, however ROH analysis reveals a distinct directional dominance component.

Our genomic confirmation of directional dominance for  $g$  and discovery of genome-wide homozygosity effects on educational attainment in a wide range of human populations adds to our knowledge of the genetic underpinnings of cognitive differences, which are currently thought to be largely due to additive genetic effects<sup>19</sup>. Our findings go beyond earlier pedigree-based analyses of recent consanguinity to demonstrate that the observed effect of genome-wide homozygosity is not a result of confounding and influences demographically diverse populations across the globe. The estimated effect size is consistent with pedigree data (0.01 increase in  $F$  decreases  $g$  by 0.046 SD in our analysis and 0.029-0.048 SD in pedigree-based studies)<sup>20</sup>. It is germane to note that one extreme of cognitive function, early onset cognitive impairment, is strongly influenced by deleterious recessive loci<sup>21</sup>, so we can speculate that an accumulation of recessive variants of weaker effect may influence normal variation in cognitive function. Although increasing migration and panmixia have generated a secular trend in decreasing homozygosity<sup>22</sup>, the Flynn effect, wherein succeeding generations perform better on cognitive tests than their predecessors<sup>23</sup>, cannot be explained by our findings, because the intergenerational change in cognitive scores is much larger than the differences in homozygosity would predict. Likewise, the genome-wide homozygosity effect on height cannot explain a significant proportion of the observed inter-generational increases<sup>24</sup>.

Inbreeding depression, which arises from the effect of genome-wide homozygosity, is ubiquitous in plants and is seen for numerous fitness-related traits in animals<sup>25</sup>, but we observed no effect for the 12 other mainly cardio-metabolic traits in which variation is strongly age-related. This suggests that previous reports in ecological studies or substantively smaller studies using pedigrees or relatively small numbers of genetic markers may have been false positives<sup>5,6</sup>. The lack of directional dominance on these traits does not,

however, rule out a recessive component, as recessive variants acting in different directions will cancel out. Dominance variance is predicted to be greater for late-onset fitness traits<sup>26</sup>, so the lack of genome-wide homozygosity effects in the cardio-metabolic traits may be due to lack of directional dominance. ROH analyses within specific genomic regions are warranted to map recessive effects even when there is no genome-wide directional dominance. Such recessive effects have been observed for a subset of cardiovascular risk factors<sup>27</sup> and expression traits<sup>28</sup>.

We have demonstrated the existence of directional dominance on four complex traits (stature, lung function, cognitive ability and educational attainment) whilst showing any effect on the other 12 health-related traits is at least almost an order of magnitude smaller or non-existent. This directional dominance implies that size and cognition (like schizophrenia protective alleles<sup>29</sup>) have been positively selected in human history – or at least that some variants increasing these traits contribute to fitness. However, the lack of any evidence for an association between many late onset cardiovascular disease risk factors and ROH is perhaps surprising and suggests testing directly for an association between ROH and disease outcome. The magnitude of genome-wide homozygosity effects is relatively small in all cases, thus Darwin's supposition<sup>30</sup> of “any evil [of inbreeding] being very small” is substantiated.

## METHODS

### Outline

Our aim was to look for an association between a genetic effect (SROH) and 16 complex traits. Our approach followed best practice genome-wide association meta-analysis (GWAMA) protocols, where applicable, except we had only one genetic effect to test.

Cohorts were invited to join based on known previous participation in GWAMA and willingness to participate. 159 sub-cohorts were created from 102 population-based or case-control genetic studies, by separating different genotyping arrays, cases and controls or ethnic sub-groups to ensure each sub-cohort was homogeneous. Within each of the 159 sub-cohorts we measured the association between SROH and trait using the following model. Where a sub-cohort had been ascertained on the basis of a disease status associated with a particular trait, that sub-cohort was excluded from the corresponding trait analysis.

Phenotype was regressed on genetic effect and known relevant covariates within each cohort, under the model specified in Equation 1. The estimated genetic effect of SROH was then meta-analysed using inverse variance meta-analysis.

$$Y = \mu + b_1 \text{SROH} + b_2 \text{age} + b_3 \text{sex} + b_4 \text{PC1} + b_5 \text{PC2} + b_6 \text{PC3} + e \quad \text{Equation (1)}$$

Where  $Y$  is the vector of trait values,  $\mu$  the intercept,  $b_1$  the effect of SROH and  $b_{2-6}$  the effect of covariates. PC1 – PC3, the post quality control within-cohort principal components of the cohort's relationship matrix and  $e$  the residual. Relationship matrices were determined genomically by each cohort using genome wide array data. In addition, any other cohort-specific covariates known to be associated with the trait, including further principal

components, and any trait-specific covariates and stratifications, such as medication and smoking status, were fitted as specified below. SROH was the sum of ROH called, with a length of at least 1.5 Mb using PLINK<sup>31</sup>.

As is routine in GWAMA, for family-based studies only, we also fitted an additional term to account for additive genetic values and relatedness, using grammar+ type residuals and full hierarchical mixed modeling using GenABEL<sup>32</sup> and hglm<sup>33</sup>, as specified in equation 2.

$$Y = \mu + b_1 \text{SROH} + b_2 \text{age} + b_3 \text{sex} + b_4 \text{PC1} + b_5 \text{PC2} + b_6 \text{PC3} + Za \quad \text{Equation (2)}$$

Where  $a$  is the additive genetic value of each individual.  $\text{Var}(a)$  is assumed to be proportionate to the Genomic Relationship matrix (GRM) (a pedigree relationship matrix was used in the Framingham Heart Study).  $Z$  is the identity matrix.

We then meta-analysed the regression coefficients ( $b_1$ ) of traits on SROH for the 159 subcohorts.

### Cohort Recruitment

Data from 102 independent genetic epidemiology studies of adults were included. All subjects gave written informed consent and studies were approved by the relevant research ethics committees. Homogeneous sub-cohorts were created for analysis on the basis of ethnicity, genotyping array or other factors. Where a cohort had multiple ethnicities, sub-cohorts for each separate ethnicity were created and analysed separately. In all cases European-, African-, South or Central Asian-, East Asian- and Hispanic-heritage individuals were separated. In some cases sub-categories such as Ashkenazi Jews were also distinguished. Ethnic outliers were excluded, as were the second of any monozygotic twins and pregnant subjects. Continental ancestry of cohorts participating in each trait study is presented in Extended data Table 1. Cohort genotyping and summary information are shown in Supplementary Table 6, with age, sex, trait and homozygosity summary statistics given in Supplementary Tables 9, 10, and 11. For case-control and trait extreme studies, patients or extreme-only sub-cohorts were analysed separately to controls. Where case status was associated with the trait under analysis the sub-cohort was excluded from that study (see below).

Subjects within a sub-cohort were genotyped using the same SNP array, or where two very similar arrays were used (e.g. Illumina OmniExpress and IlluminaOmni1), the intersection of SNPs on both arrays – provided the intersection exceeded 250,000 SNPs. Where a study used two different genotyping arrays, separate subcohorts were created for each array, and analysis was done separately. Paediatric cohorts were not included.

### Genotyping

All subjects were genotyped using high density genome-wide (>250,000 SNP) arrays, from Illumina, Affymetrix or Perlegen. Custom arrays were not included. Each study's usual array-specific genotype quality control standards for genome-wide association were used and are shown in Supplementary Table 6. Only autosomal data were analysed.

## Phenotyping

We studied 16 quantitative traits which are widely available and represent different domains related to health, morbidity and mortality: height, body mass index (BMI), waist : hip ratio (WHR), diastolic and systolic blood pressure (DBP, SBP), fasting plasma glucose (FPG), fasting insulin (FI), Haemoglobin A1c (HbA1c), total-, HDL- and LDL-cholesterol, triglycerides, forced expiratory volume in 1 second (FEV1), ratio of FEV1 to forced vital capacity (FVC), general cognitive ability (*g*) and years of educational attainment (EA). Phenotypic QC was performed locally to assess the accuracy and distribution of phenotypes and covariates. Further covariates were included when the relevant GWAS consortium also included them. The trait categories were anthropometry, blood pressure, glycaemic traits, classical lipids, lung function, cognitive function and educational attainment, following models in the GIANT<sup>34</sup>, ICBP<sup>35</sup>, MAGIC<sup>36</sup>, CHARGE<sup>37</sup>, Spirometa<sup>38</sup> and SSGAC<sup>39</sup> consortia. The model for FEV1 did not include height as a covariate. Effect sizes for FEV1 therefore include size effects that also underpin height. Studies assembled files containing study traits and the following covariates: sex, age, first three principal components of ancestry, lipid-lowering medication, ever-smoker status, anti-hypertensive medication, diabetes status and year of birth (YOB). Educational attainment was defined in accordance with the ISCED 1997 classification (UNESCO), leading to seven categories of educational attainment that are internationally comparable<sup>39</sup>. LDL values estimated using Friedewald's equation were accepted. Cohorts without fasting samples did not participate in the LDL-cholesterol, triglycerides, fasting insulin or fasting plasma glucose analyses. Cohorts with semi-fasting samples fitted a categorical or quantitative fasting time variable as a covariate. Subjects with less than 4 hours fasting were not included.

Where subjects were ascertained, for example, on the basis of hypertension, that sub-cohort was excluded from analysis of traits associated with the disorder, for example blood pressure. The traits excluded from meta-analysis are as follows: ascertainment on type-2-diabetes, thus fasting insulin, HbA1c, fasting plasma glucose excluded; ascertainment on hypertension, thus blood pressures excluded; ascertainment on venous thrombosis or coronary artery disease, thus blood lipids excluded; ascertainment on obesity or the metabolic syndrome, thus blood lipids, body mass index, waist-hip ratio, fasting insulin and fasting plasma glucose excluded.

Somewhat unusually for a large consortium meta-analysis, the majority of the analysis after initial genotype and phenotype QC was performed by a pipeline of standardised R and shell scripts, to ensure uniformity and reduce the risk of errors and ambiguities (available at <https://www.wiki.ed.ac.uk/display/ROHgen/Analysis+Plan+production+release+3.0>). The pipeline was used for all stages from this point onwards.

## Calling Runs of Homozygosity

SNPs with more than 3% missingness across individuals or with a minor allele frequency less than 5% were removed. ROH were defined as runs of at least 50 consecutive homozygous SNPs spanning at least 1500 kb, with less than a 1000 kb gap between adjacent ROH and a density of SNP coverage within the ROH of no more than 50 kb/SNP, with one heterozygote and 5 no calls allowed per window, and were called using PLINK<sup>31</sup>, with the

following settings --homozyg-window-snp 50 --homozyg-snp 50 --homozyg-kb 1500 --homozyg-gap 1000 --homozyg-density 50 --homozyg-window-missing 5 --homozyg-window-het 1. The same criteria were used by McQuillan *et al.*<sup>3</sup>, except SNP density has been relaxed to avoid regions of sparser coverage (still including 50 SNPs) being missed. The sum of runs of homozygosity was then calculated (SROH).  $F$  was calculated as  $SROH / (3 \times 10^9 ROH)$  reflecting the length of the autosomal genome. Copy number variants (CNV) are known to influence cognition<sup>40</sup>; however, prior calling of CNV and ROH in one of our cohorts reduced the SROH by only 0.3%<sup>3</sup>, making it implausible that deletions called as ROH influence our findings.

### ROH called from different genotyping arrays

We show that SROH called with these parameters is relatively insensitive to the density and type of array used (Extended data Fig. 7). We used 2.5 million SNPs available for 851 HapMap and 1000 Genomes Project<sup>41</sup> samples from multiple continents to investigate the effect of array when using our ROH-calling parameters in plink. The dataset included samples of African, European, admixed American, South and East Asian heritage. By subsampling SNPs from the 2.5 million we created array data for the commonly used Illumina CNV370 and OmniExpress beadchips and the Affymetrix6 array for each individual (see Supplementary Table 7 for details of the SNP numbers). The correlation in SROH using different arrays on the same individuals was 0.93-0.94 for all pairwise chip comparisons.

### Trait association with SROH

The association between trait and SROH was calculated using a linear model in accordance with equation 1. Additional covariates were fitted for some analyses (shown below) or for some cohorts where analysts were aware of study specific effects (e.g. study centre). For BMI, WHR, FEV1, FEV1/FVC and  $g$ , trait residuals were calculated for the model excluding SROH, these residuals were then rank-normalised and the effect of SROH on these rank-normalised residuals estimated. Triglycerides and fasting insulin were natural log transformed. Additional covariates were as follows: age<sup>2</sup> was included as a covariate for all traits apart from height and  $g$ . BMI was included as a covariate for WHR, SBP, DBP, FPG, FI and HbA1c. YOB was included as a covariate for educational attainment and ever-smoking for FEV1 and FEV1/FVC. Where a subject was known to be taking lipid-lowering medication, total cholesterol was adjusted by dividing by 0.8. Similarly, where a subject was known to be taking anti-hypertensive medication, SBP and DBP measurements were increased by 15 and 10 mm Hg, respectively.

Where the cohort was known to have significant kinship, genetic relatedness was also fitted, using the mixed model, in accordance with equation 2. The polygenic model was fitted in GenABEL using the fixed covariates and the genomic relationship matrix<sup>32</sup>. GRAMMAR+ (GR+) (ref. 42) residuals were then fitted to SROH as well as the full mixed model being fitted simultaneously, using GenABEL's hierarchical generalised linear model (HGLM) function<sup>33</sup>. Populations with kinship thus potentially had three estimates of  $\beta_{FROH}$ : using fixed effects only, and using the mixed model approaches, (GR+ and HGLM) for SROH.

To investigate potential confounding, where available, EA was added as an ordinal covariate and all models rerun, giving revised estimates of  $\beta_{\text{FROH}}$ . This is potentially an over adjustment for  $g$  due to the phenotypic and genetic correlations with EA<sup>43</sup>. However it must be recognised that EA does not capture all potential environmental confounding.

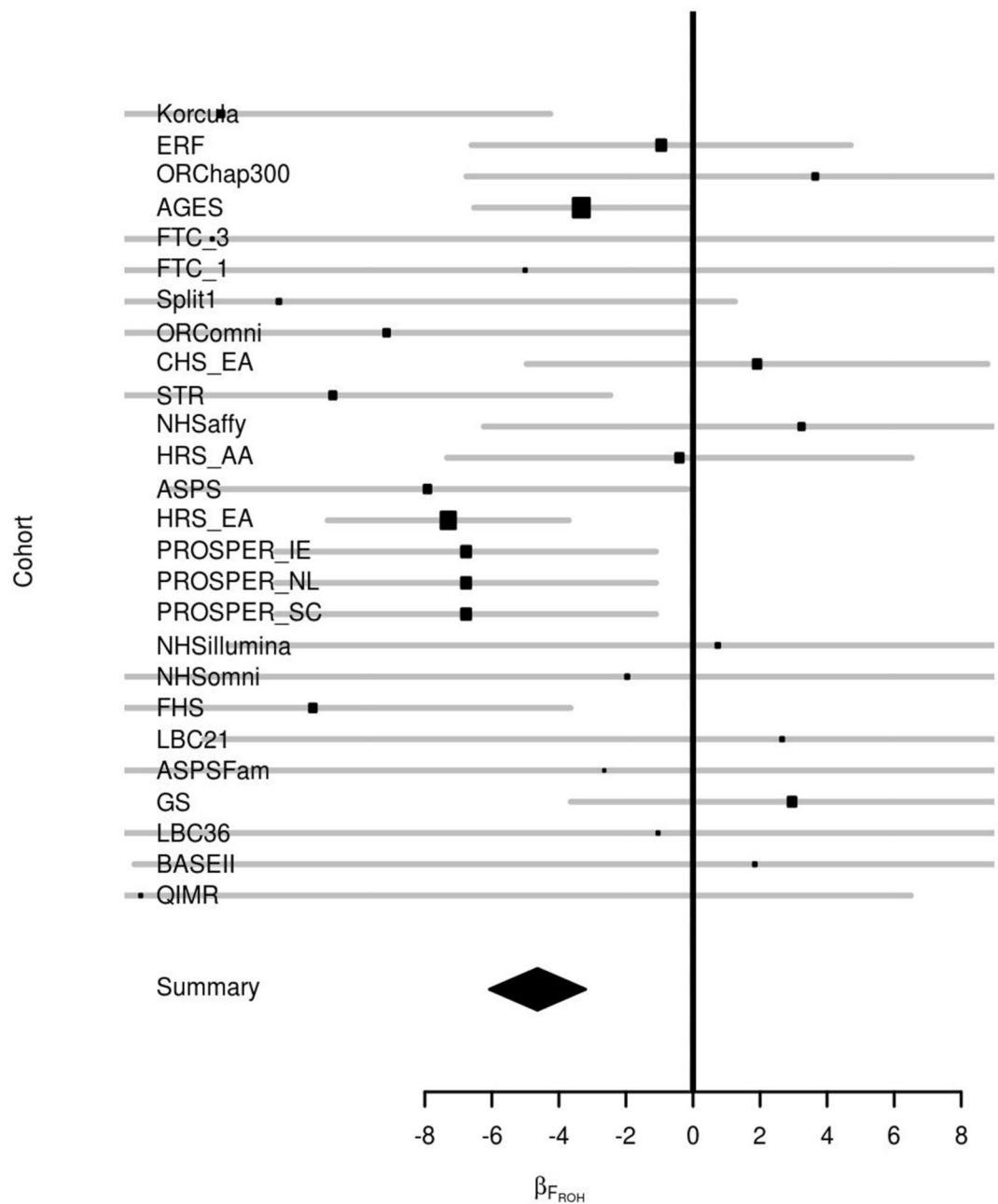
Cohort phenotypic means and standard deviations were checked visually for inter-cohort consistency, with apparent outliers then being corrected (e.g. due to units or incorrectly specified missing values), explained (e.g. due to different population characteristics) or excluded. Individual sub-cohort trait means and standard deviations are tabulated in Supplementary Table 9 and age and gender information is in Supplementary Table 10.

### Meta-analysis

Again as is routine in GWAMA, analysis was performed within homogeneous sub-populations and only meta-analysis of the estimated (within population) effect sizes was used to combine results between populations, avoiding any confounding effects of inter-population differences in trait or genetic effect distributions. Inverse-variance meta-analysis of all sub-cohorts' effect estimates was performed using Rmeta, on a fixed effect basis (Supplementary Table 5 compares random effects meta-analysis). In the principal analyses, for cohorts with relatedness, HGLM estimates of  $\beta_{\text{FROH}}$  were preferred, however where HGLM had failed to converge, results using GRAMMAR+ were included. These results were combined with those for unrelated cohorts on a fixed model only basis. Result outliers were defined as individual cohort by trait results, which failed the hypothesis, cohort ( $\beta_{\text{FROH}}$ ) = pre-QC meta-analysis ( $\beta_{\text{FROH}}$ ), with a t-test statistic  $>3$ . Analyses were performed with and without outliers for  $\beta_{\text{FROH}}$  in phenotypic units and in intra-sex phenotypic standard deviations (Supplementary Table 8). The principal results we present are for  $\beta_{\text{FROH}}$  with outliers included for the hypothesis tests (which turns out to be more conservative), but with outliers excluded when estimating  $\beta_{\text{FROH}}$  (ref. 44). Meta-analysis was performed using inverse variance meta-analysis in the R package Rmeta, with  $\beta_{\text{FROH}}$  taken as a fixed effect and alternatively as a random effect. The principal results are on a fixed effects basis, with Supplementary Table 5 showing comparison with the random effects analysis.

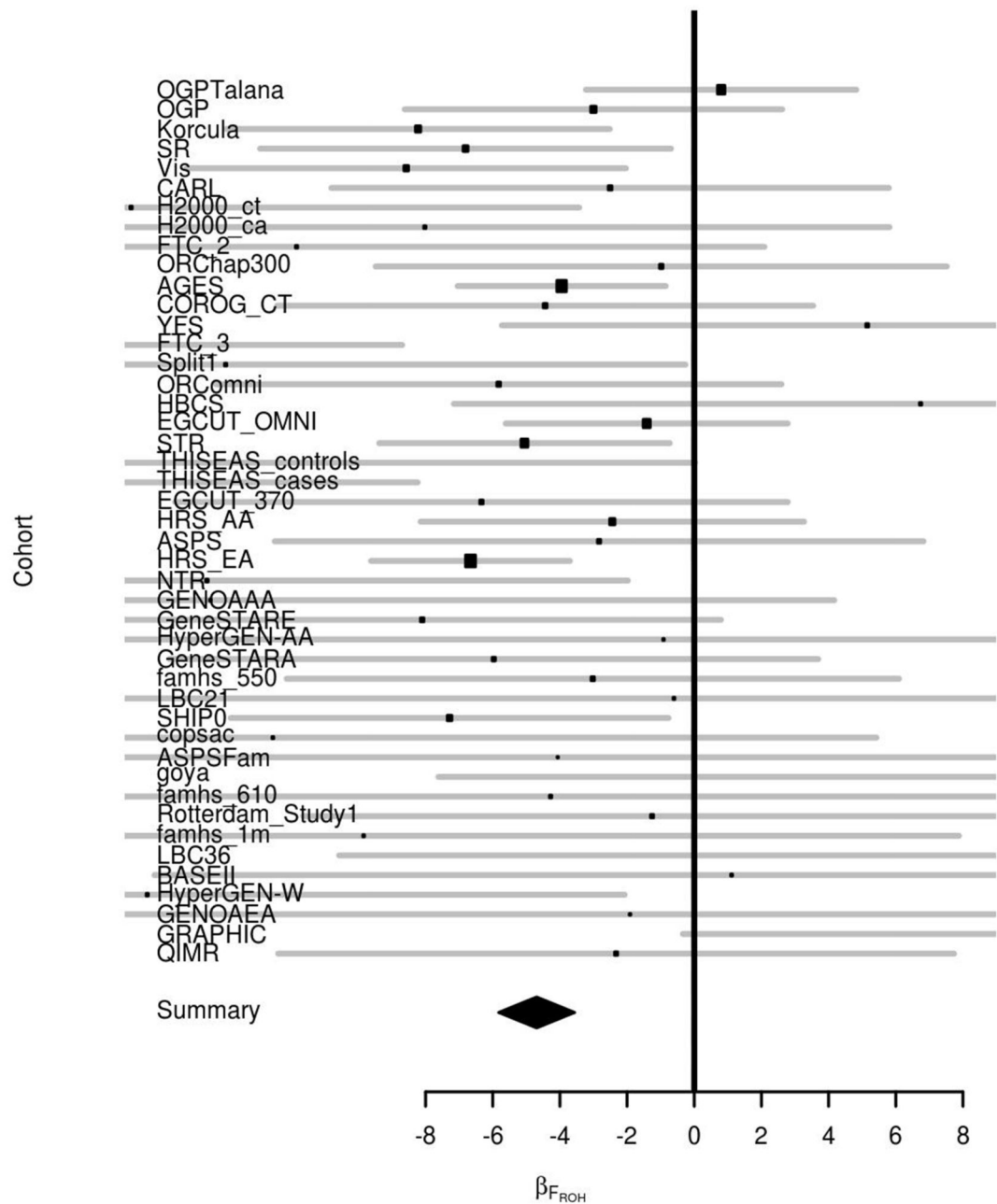
Meta-analyses were rerun for various subsets, according to geographic and demographic features of the cohorts. Cohorts were divided into more homozygous and less homozygous strata with the boundary being set so each within-stratum meta-analysis had equal statistical power.

## Extended Data

**Extended Data Figure 1. Forest plot for cognitive  $g$** 

Individual sub-cohort estimates of effect size and the standard error are plotted. Sub-cohorts are ordered from top to bottom according to their weight in the meta-analysis, so larger or more homozygous cohorts appear towards the top. The scale of  $\beta_{F_{ROH}}$  is in intra-sex standard deviations. The meta-analytical estimate is displayed at the bottom. Sub-cohort names follow the conventions detailed in Supplementary Table 6 and the Supplementary

Table 11 legend. Sample sizes, effect sizes and P values for association are given in Table 1. This trait was rank transformed.



#### Extended Data Figure 2. Forest plot for educational attainment

Individual sub-cohort estimates of effect size and the standard error are plotted. Subcohorts are ordered from top to bottom according to their weight in the meta-analysis, so larger or more homozygous cohorts appear towards the top. The scale of  $\beta_{F_{ROH}}$  is in intra-sex standard deviations. The meta-analytical estimate is displayed at the bottom. Sub-cohort

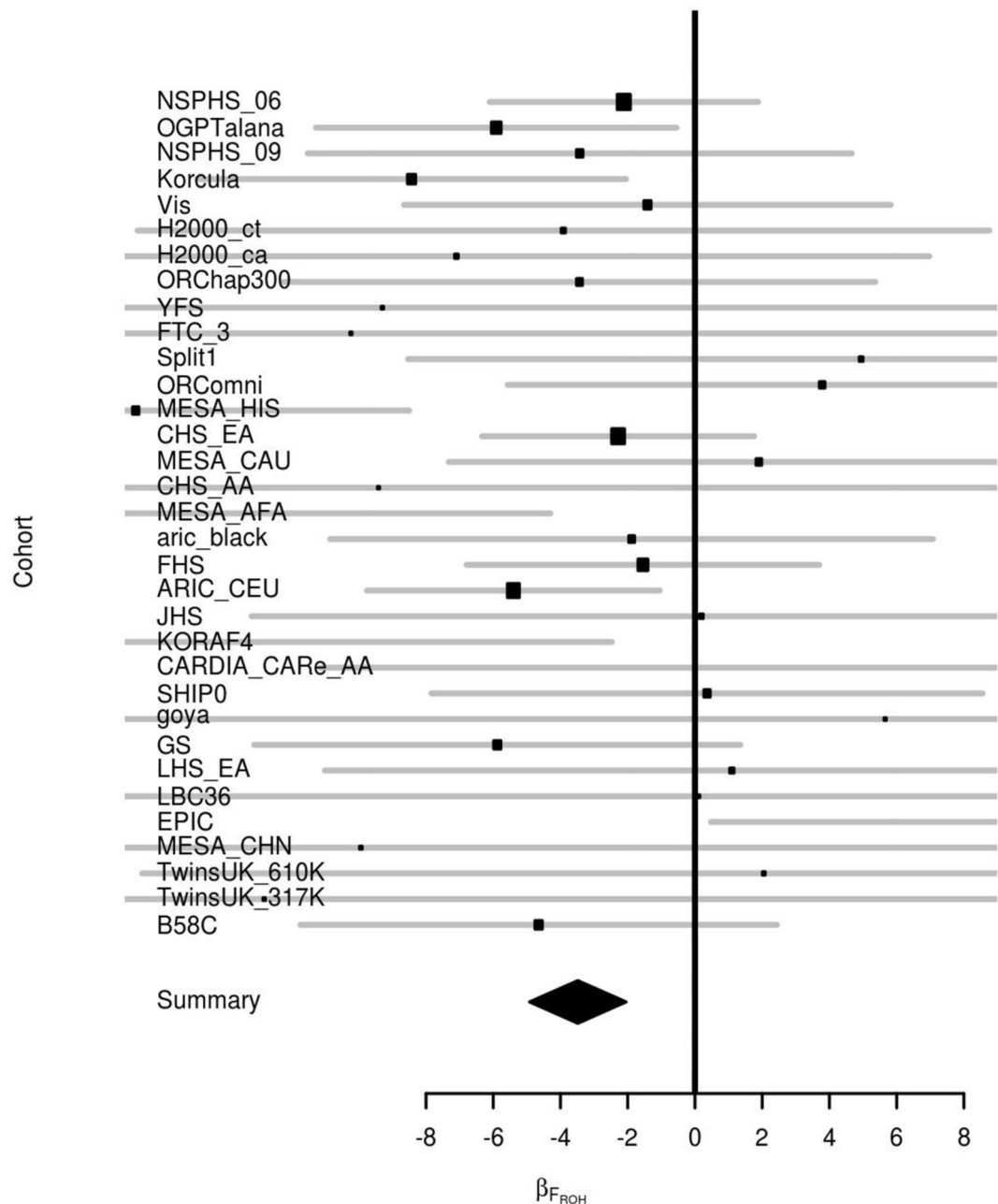
names follow the conventions detailed in Supplementary Table 6 and the Supplementary Table 11 legend. Sample sizes, effect sizes and P values for association are given in Table 1.



### Extended Data Figure 3. Forest plot for height

Individual sub-cohort estimates of effect size and the standard error are plotted. Subcohorts are ordered from top to bottom according to their weight in the meta-analysis, so larger or more homozygous cohorts appear towards the top. The scale of beta  $F_{ROH}$  is in intra-sex standard deviations. The meta-analytical estimate is displayed at the bottom. Sub-cohort

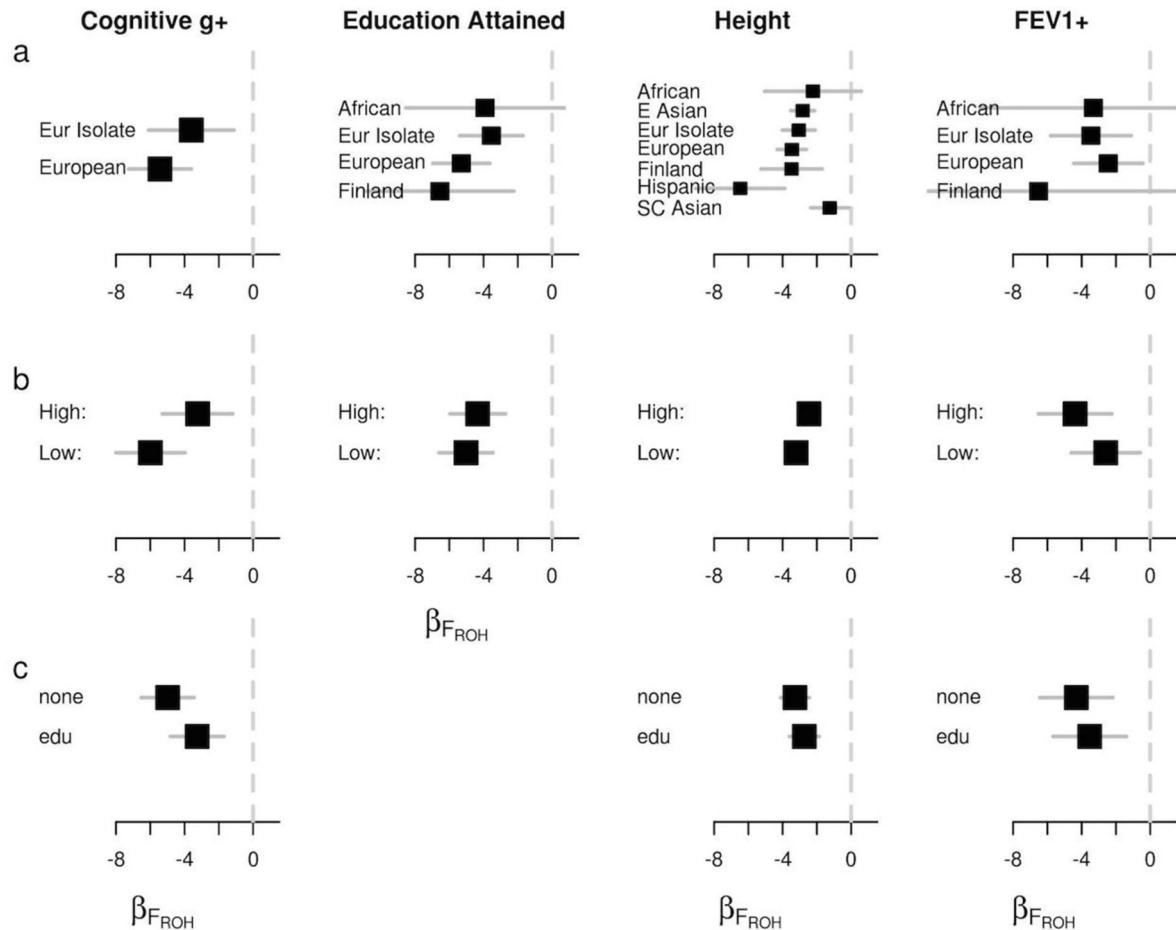
names follow the conventions detailed in Supplementary Table 6 and the Supplementary Table 11 legend. Sample sizes, effect sizes and P values for association are given in Table 1.



**Extended Data Figure 4. Forest plot for forced expiratory lung volume in one second**

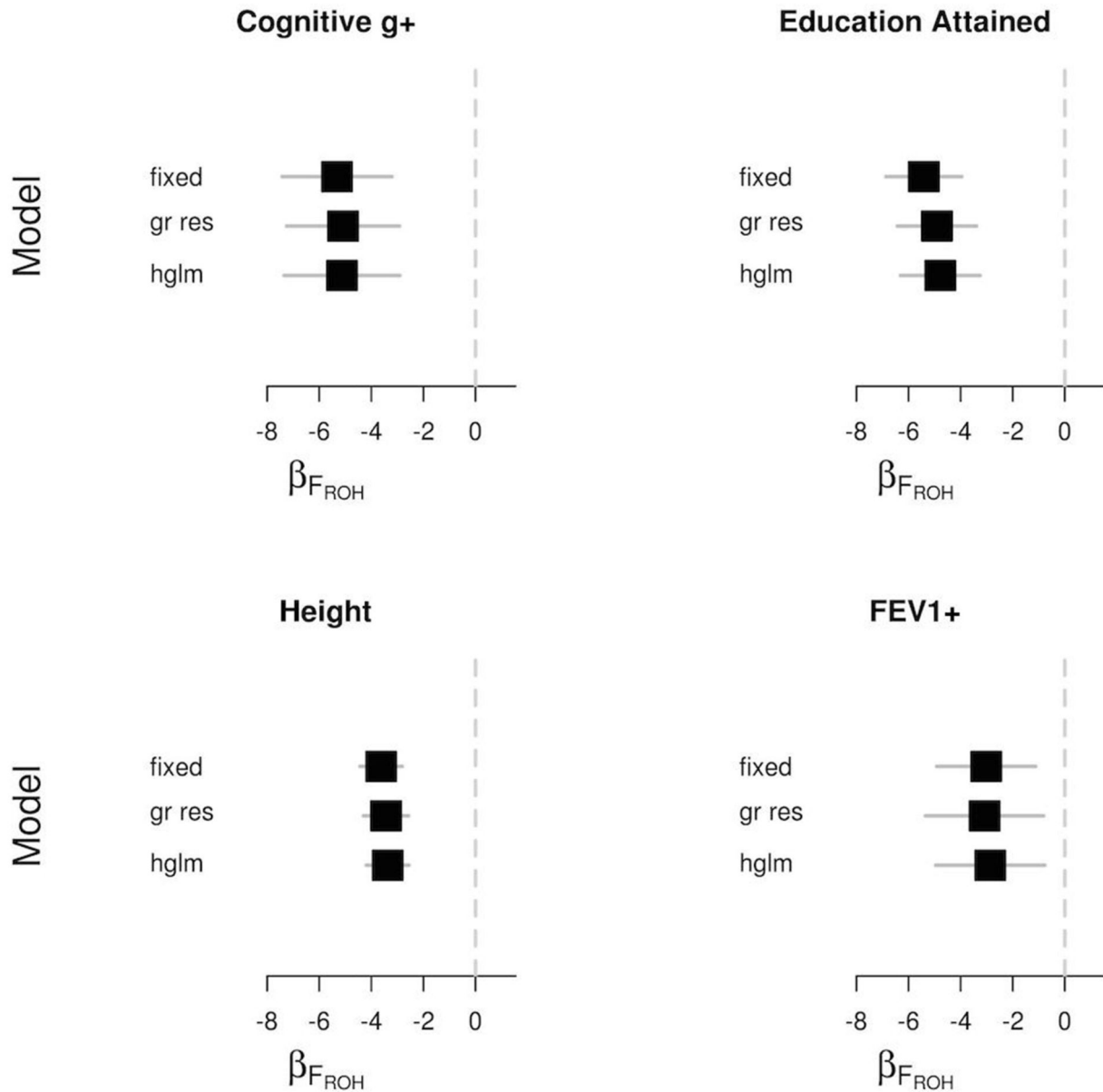
Individual sub-cohort estimates of effect size and the standard error are plotted. Subcohorts are ordered from top to bottom according to their weight in the meta-analysis, so larger or more homozygous cohorts appear towards the top. The scale of  $\beta_{FROH}$  is in intra-sex standard deviations. The meta-analytical estimate is displayed at the bottom. Sub-cohort

names follow the conventions detailed in Supplementary Table 6 and the Supplementary Table 11 legend. Sample sizes, effect sizes and P values for association are given in Table 1. This trait was rank transformed.



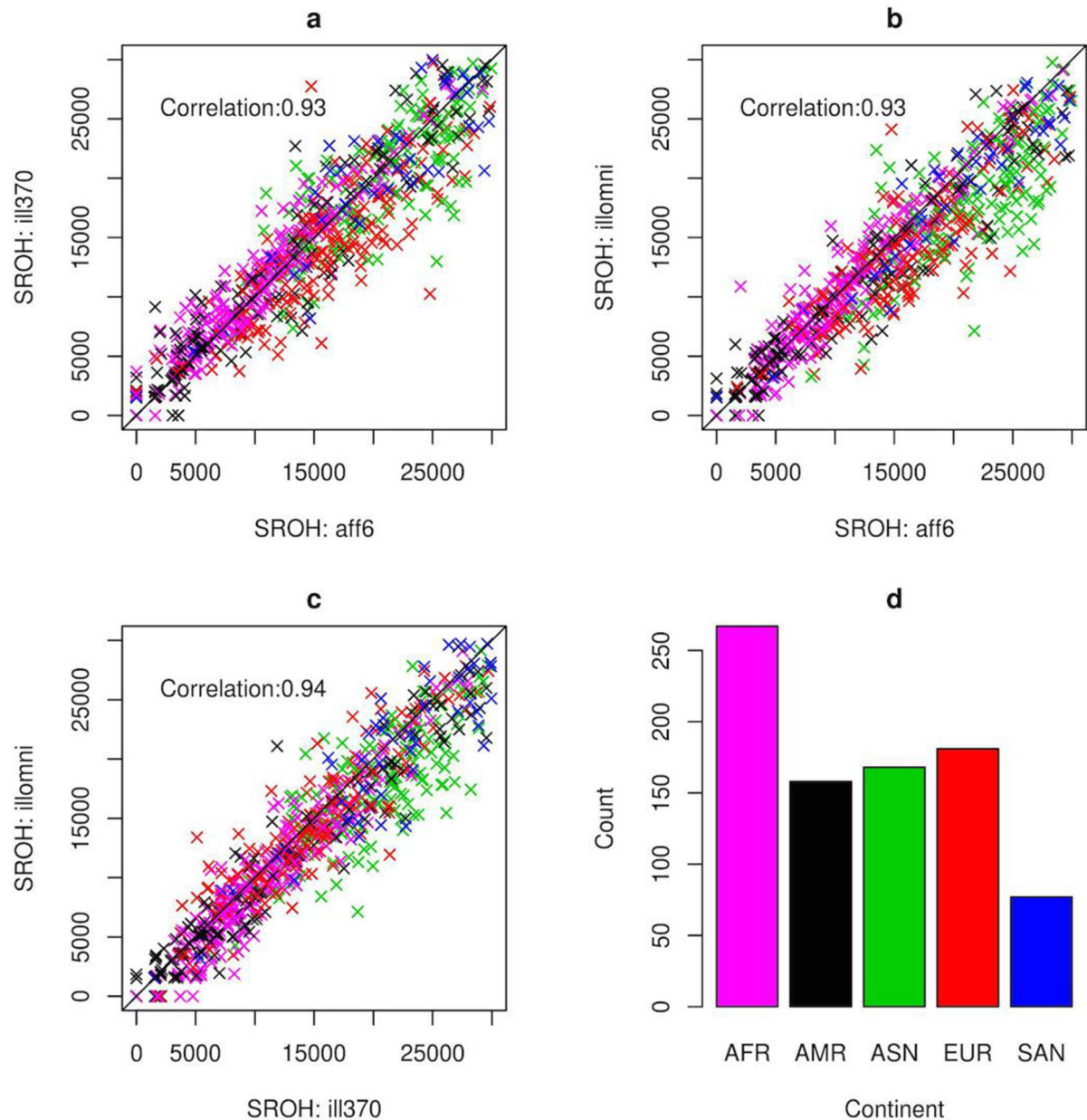
**Extended Data Figure 5. Signals of directional dominance are robust to stratification by geography or demographic history or inclusion of educational attainment as covariate** (a) Cohorts are divided by continental biogeographic ancestry (African (15 sub-cohorts), East Asian (5), South & Central Asian (10), Hispanic (3)), with Europeans being divided into Finns (13), other European isolates (self-declared, 23), and (non-isolated) Europeans (90). Meta-analysis was carried out for all subsets with 2000 or more samples available. Sample numbers are as follows: cognitive  $g$ , Eur isolate 6638, European 44,153; educational attainment, African 4811, Eur isolate 8032, European 55,549, Finland 9068; height, African 21,500, E Asian 30,011, Eur isolate 23,116, European 228,813, Finland 30,427, Hispanic 5469, SC Asian 13,523; FEV1, African 6604, Eur isolate 4837, European 49,223, Finland 2340.  $\beta_{FROH}$  is consistent across geography and in both isolates and more cosmopolitan populations. (b) Cohorts were divided into High and Low ROH strata of equal power and meta-analysis repeated – the effects are consistent across strata for all four traits. The mean SROH for the high and low strata are 13.4 and 4.3 Mb for cognitive  $g$ ; 28.1 and 5.1 Mb for

education attained; 31.9 and 10.8 Mb for height; and 41.4 and 4.5 Mb for FEV1. (c) To assess the potential for socio-economic confounding, where available, educational attainment was included in the regression model (edu) and compared to a model without educational attainment (none) in the same subset of cohorts. The signals reduce slightly when the education covariate is included; the analysis is not possible for educational attainment as a trait. For cognitive  $g$ , numbers are 36847 and 36023 for edu and none; for height 131,614 and 120,945; and for FEV1, 15717 and 15425. The numbers differ because of missing individual educational data within cohorts. + indicates phenotype was rank transformed. FEV1, forced expiratory lung volume in one second;  $g$  is the general cognitive component (first unrotated principal component of test scores across diverse tests of cognition); SC Asian is South & Central Asian, E Asian is East Asian, trait units are intra-sex standard deviations and the genomic measure is unpruned SROH.



#### Extended Data Figure 6. Signals of directional dominance are robust to model choice

Meta-analytical estimates of effect size and standard errors are plotted for various models. Fixed indicates no mixed modelling was used, gr res indicates the GRAMMAR+ residuals were fitted and hglm indicates the full hierarchical generalised linear mixed model was used. + indicates the phenotype was rank transformed; FEV1 is forced expiratory lung volume in one second; Cognitive  $g$  is the general cognitive factor. 15,355 subjects were used for cognitive  $g$ , 36,060 for educational attainment, 89,112 for height and 15,262 for FEV1.



**Extended Data Figure 7. Correlation in SROH for different genotyping arrays using HapMap populations**

In panels (a) – (c), X and Y axes show SROH (sum of runs of homozygosity) from 0–30 Mb (30,000 kb). ill370: Illumina CNV370, aff6: Affymetrix6, illumni: Illumina OmniExpress. The graphs are shown for the specific plink call parameters used. (d) Sample numbers per continent are presented in a bar chart. AFR: African, AMR: Mixed American, ASN: East Asian, EUR: European, SAN: South Asian. Only samples with SROH below 30 Mb are plotted, to be conservative to the effect of outliers, which have very strongly correlated

estimates of SROH ( $r = 0.96-0.97$  for comparisons including such very homozygous individuals). In these plots, the correlation between SROH called by the two arrays,  $r = 0.93-0.94$ .

**Extended data Table 1**  
**Continental ancestry of cohorts participating in each trait study**

The first number in each cell is the number of participants with that continental ancestry. The second number is the number of sub-cohorts. BP is blood pressure; FEV1 is forced expiratory lung volume in one second; FVC is forced vital lung capacity; FP is fasting plasma; HbA1c is haemoglobin A1c; HDL/LDL are High/low-density lipoprotein;  $g$  is the general cognitive factor (first unrotated principal component of test scores across diverse domains of cognition). S/C Asian is South & Central Asian.

|                    | African  | East Asian | European   | Hispanic | S/C Asian | All        |
|--------------------|----------|------------|------------|----------|-----------|------------|
| BMI                | 21689/15 | 29009/5    | 279400/117 | 7836/3   | 13464/10  | 351398/150 |
| Cognitive $g$      | 1539/1   | NA/NA      | 49559/22   | -        | -         | 51098/23   |
| Diastolic BP       | 17074/12 | 24200/5    | 204742/85  | 7284/3   | 12876/9   | 266176/114 |
| Education Attained | 4811/4   | NA/NA      | 79576/42   | -        | 338/1     | 84725/47   |
| Fasting Insulin    | 6895/8   | 1603/1     | 72006/49   | -        | 6303/5    | 86807/63   |
| FEV1               | 6604/5   | 617/1      | 58089/27   | 825/1    | -         | 66135/34   |
| FEV1/FVC           | 6565/5   | 616/1      | 57888/27   | 822/1    | -         | 65891/34   |
| FP Glucose         | 8942/9   | 1615/1     | 122368/74  | 1938/1   | 6921/5    | 141784/90  |
| HbA1c              | 6629/4   | 694/1      | 92732/31   | 4038/2   | 7509/4    | 111602/42  |
| HDL Cholesterol    | 15099/13 | 10478/5    | 215621/92  | 4426/3   | 12508/9   | 258132/122 |
| Height             | 20300/14 | 30011/5    | 281369/114 | 5469/2   | 13523/10  | 350672/145 |
| LDL Cholesterol    | 13375/11 | 2503/2     | 172245/77  | 4340/3   | 11186/8   | 203649/101 |
| Systolic BP        | 17023/12 | 24424/5    | 205253/85  | 7225/3   | 12859/9   | 266784/114 |
| Total Cholesterol  | 15130/13 | 20187/5    | 209421/91  | 4491/3   | 11674/8   | 260903/120 |
| Triglycerides      | 13886/12 | 2542/2     | 181526/84  | 2745/2   | 10688/7   | 211387/107 |
| Waist-hip ratio    | 8182/7   | 2549/2     | 171753/73  | 1446/1   | 12598/9   | 196528/92  |

## Supplementary Material

Refer to Web version on PubMed Central for supplementary material.

## Authors

Peter K. Joshi<sup>#1</sup>, Tonu Esko<sup>#2,3,4,5</sup>, Hannele Mattsson<sup>6,7</sup>, Niina Eklund<sup>6</sup>, Ilaria Gandin<sup>8</sup>, Teresa Natile<sup>9</sup>, Anne U. Jackson<sup>10</sup>, Claudia Schurmann<sup>11,12</sup>, Albert V. Smith<sup>13,14</sup>, Weihua Zhang<sup>15,16</sup>, Yukinori Okada<sup>17,18</sup>, Alena Stančáková<sup>19</sup>, Jessica D. Faul<sup>20</sup>, Wei Zhao<sup>21</sup>, Traci M. Bartz<sup>22</sup>, Maria Pina Concas<sup>23</sup>, Nora Franceschini<sup>24</sup>, Stefan Enroth<sup>25</sup>, Veronique Vitart<sup>26</sup>, Stella Trompet<sup>27</sup>, Xiuqing Guo<sup>28,29</sup>, Daniel I. Chasman<sup>30</sup>, Jeffery R. O'Connel<sup>31</sup>, Tanguy Corre<sup>32,33</sup>, Suraj S.

Nongmaithem<sup>34</sup>, Yuning Chen<sup>35</sup>, Massimo Mangino<sup>36,37</sup>, Daniela Ruggiero<sup>9</sup>, Michela Traglia<sup>38</sup>, Aliko-Eleni Farmaki<sup>39</sup>, Tim Kacprowski<sup>40</sup>, Andrew Bjornnes<sup>41</sup>, Ashley van der Spek<sup>42</sup>, Ying Wu<sup>43</sup>, Anil K. Giri<sup>44</sup>, Lisa R. Yanek<sup>45</sup>, Lihua Wang<sup>46</sup>, Edith Hofer<sup>47,48</sup>, Cornelius A. Rietveld<sup>49</sup>, Olga McLeod<sup>50</sup>, Marilyn C. Cornelis<sup>51,52</sup>, Cristian Pattaro<sup>53</sup>, Niek Verweij<sup>54</sup>, Clemens Baumbach<sup>55,56,57</sup>, Abdel Abdellaoui<sup>58</sup>, Helen R. Warren<sup>59,60</sup>, Dragana Vuckovic<sup>8</sup>, Hao Mei<sup>61</sup>, Claude Bouchard<sup>62</sup>, John R.B. Perry<sup>63</sup>, Stefania Cappellani<sup>64</sup>, Saira S. Mirza<sup>42</sup>, Miles C. Benton<sup>65</sup>, Ulrich Broeckel<sup>66</sup>, Sarah E. Medland<sup>67</sup>, Penelope A. Lind<sup>67</sup>, Giovanni Malerba<sup>68</sup>, Alexander Drong<sup>69</sup>, Loic Yengo<sup>70</sup>, Lawrence F. Bielak<sup>21</sup>, Degui Zhi<sup>71</sup>, Peter J. van der Most<sup>72</sup>, Daniel Shriner<sup>73</sup>, Reedik Mägi<sup>2</sup>, Gibran Hemani<sup>74</sup>, Tugce Karaderi<sup>69</sup>, Zhaoming Wang<sup>75,76</sup>, Tian Liu<sup>77,78</sup>, Ilja Demuth<sup>79,80</sup>, Jing Hua Zhao<sup>63</sup>, Weihua Meng<sup>81</sup>, Lazaros Lataniotis<sup>82</sup>, Sander W. van der Laan<sup>83</sup>, Jonathan P. Bradfield<sup>84</sup>, Andrew R. Wood<sup>85</sup>, Amelie Bonnefond<sup>70</sup>, Tarunveer S. Ahluwalia<sup>86,87,88</sup>, Leanne M. Hall<sup>89</sup>, Erika Salvi<sup>90</sup>, Seyhan Yazar<sup>91</sup>, Lisbeth Carstensen<sup>92</sup>, Hugoline G. de Haan<sup>93</sup>, Mark Abney<sup>94</sup>, Uzma Afzal<sup>15,16</sup>, Matthew A. Allison<sup>95</sup>, Najaf Amin<sup>42</sup>, Folkert W. Asselbergs<sup>96,97,98</sup>, Stephan J.L. Bakker<sup>99</sup>, R. Graham Barr<sup>100</sup>, Sebastian E. Baumeister<sup>101</sup>, Daniel J. Benjamin<sup>102,103</sup>, Sven Bergmann<sup>32,33</sup>, Eric Boerwinkle<sup>104</sup>, Erwin P. Bottinger<sup>11</sup>, Archie Campbell<sup>105</sup>, Aravinda Chakravarti<sup>106</sup>, Yingleong Chan<sup>3,4,5</sup>, Stephen J. Chanock<sup>75</sup>, Constance Chen<sup>107</sup>, Y.-D. Ida Chen<sup>28,29</sup>, Francis S. Collins<sup>108</sup>, John Connell<sup>109</sup>, Adolfo Correa<sup>61</sup>, L. Adrienne Cupples<sup>35,110</sup>, George Davey Smith<sup>74</sup>, Gail Davies<sup>111,112</sup>, Marcus Dörr<sup>113</sup>, Georg Ehret<sup>106,114</sup>, Stephen B. Ellis<sup>11</sup>, Bjarke Feenstra<sup>92</sup>, Mary F. Feitosa<sup>46</sup>, Ian Ford<sup>115</sup>, Caroline S. Fox<sup>110,116</sup>, Timothy M. Frayling<sup>85</sup>, Nele Friedrich<sup>117</sup>, Frank Geller<sup>92</sup>, Generation Scotland<sup>105</sup>, Irina Gillham-Nasanya<sup>36</sup>, Omri Gottesman<sup>11</sup>, Misa Graff<sup>118</sup>, Francine Grodstein<sup>52</sup>, Charles Gu<sup>119</sup>, Chris Haley<sup>26,120</sup>, Christopher J. Hammond<sup>36</sup>, Sarah E. Harris<sup>105,112</sup>, Tamara B. Harris<sup>121</sup>, Nicholas D. Hastie<sup>26</sup>, Nancy L. Heard-Costa<sup>110,122</sup>, Kauko Heikkilä<sup>123</sup>, Lynne J. Hocking<sup>124</sup>, Georg Homuth<sup>40</sup>, Jouke-Jan Hottenga<sup>58</sup>, Jinyan Huang<sup>125</sup>, Jennifer E. Huffman<sup>26</sup>, Pirro G. Hysi<sup>36</sup>, M. Arfan Ikram<sup>42,126</sup>, Erik Ingelsson<sup>69,127</sup>, Anni Joensuu<sup>6,7</sup>, Åsa Johansson<sup>25,128</sup>, Pekka Jousilahti<sup>129</sup>, J. Wouter Jukema<sup>130</sup>, Mika Kähönen<sup>131</sup>, Yoichiro Kamatani<sup>18</sup>, Stavroula Kanoni<sup>82</sup>, Shona M. Kerr<sup>26</sup>, Nazir M. Khan<sup>44</sup>, Philipp Koellinger<sup>49</sup>, Heikki A. Koistinen<sup>132,133,134</sup>, Manraj K. Kooner<sup>16</sup>, Michiaki Kubo<sup>135</sup>, Johanna Kuusisto<sup>136</sup>, Jari Lahti<sup>137,138</sup>, Lenore J. Launer<sup>121</sup>, Rodney A. Lea<sup>65</sup>, Benjamin Lehne<sup>15</sup>, Terho Lehtimäki<sup>139</sup>, David C.M. Liewald<sup>112</sup>, Lars Lind<sup>140</sup>, Marie Loh<sup>15</sup>, Marja-Liisa Lokki<sup>141</sup>, Stephanie J. London<sup>142</sup>, Stephanie J. Loomis<sup>143</sup>, Anu Loukola<sup>123</sup>, Yingchang Lu<sup>11,12</sup>, Thomas Lumley<sup>144</sup>, Annamari Lundqvist<sup>145</sup>, Satu Männistö<sup>129</sup>, Pedro Marques-Vidal<sup>146</sup>, Corrado Masciullo<sup>38</sup>, Angela Matchan<sup>147</sup>, Rasika A. Mathias<sup>45,148</sup>, Koichi Matsuda<sup>149</sup>, James B. Meigs<sup>150</sup>, Christa Meisinger<sup>56</sup>, Thomas Meitinger<sup>151,152</sup>, Cristina Menni<sup>36</sup>, Frank D. Mentch<sup>84</sup>, Evelin Mihailov<sup>2</sup>, Lili Milani<sup>2</sup>, May E. Montasser<sup>31</sup>, Grant W. Montgomery<sup>153</sup>, Alanna Morrison<sup>104</sup>, Richard H. Myers<sup>154</sup>, Rajiv Nadukuru<sup>11</sup>, Pau Navarro<sup>26</sup>, Mari Nelis<sup>2</sup>, Markku S. Nieminen<sup>155</sup>, Ilja M. Nolte<sup>72</sup>, George T. O'Connor<sup>110,156</sup>, Adesola Ogunniyi<sup>157</sup>, Sandosh Padmanabhan<sup>158</sup>, Walter R. Palmas<sup>100</sup>, James S. Pankow<sup>159</sup>, Inga Patarcic<sup>160</sup>, Francesca Pavani<sup>53</sup>, Patricia A. Peyser<sup>21</sup>, Kirsi Pietiläinen<sup>7,133,161</sup>, Neil Poulter<sup>162</sup>, Inga Prokopenko<sup>163</sup>, Sarju Ralhan<sup>164</sup>, Paul

Redmond<sup>111</sup>, Stephen S. Rich<sup>165</sup>, Harri Rissanen<sup>145</sup>, Antonietta Robino<sup>64</sup>, Lynda M. Rose<sup>30</sup>, Richard Rose<sup>166</sup>, Cinzia Sala<sup>38</sup>, Babatunde Salako<sup>157</sup>, Veikko Salomaa<sup>129</sup>, Antti-Pekka Sarin<sup>6,7</sup>, Richa Saxena<sup>41</sup>, Helena Schmidt<sup>167</sup>, Laura J. Scott<sup>10</sup>, William R. Scott<sup>15,16</sup>, Bengt Sennblad<sup>50,168</sup>, Sudha Seshadri<sup>110,122</sup>, Peter Sever<sup>162</sup>, Smeeta Shrestha<sup>34</sup>, Blair H. Smith<sup>169</sup>, Jennifer A. Smith<sup>21</sup>, Nicole Soranzo<sup>147</sup>, Nona Sotoodehnia<sup>170</sup>, Lorraine Southam<sup>69,147</sup>, Alice V. Stanton<sup>171</sup>, Maria G. Stathopoulou<sup>172</sup>, Konstantin Strauch<sup>57,173</sup>, Rona J. Strawbridge<sup>50</sup>, Matthew J. Suderman<sup>74</sup>, Nikhil Tandon<sup>174</sup>, Sian-Tsun Tang<sup>175</sup>, Kent D. Taylor<sup>28,29</sup>, Bamidele O. Tayo<sup>176</sup>, Anna Maria Töglhofer<sup>167</sup>, Maciej Tomaszewski<sup>89,177</sup>, Natalia Tšernikova<sup>2,178</sup>, Jaakko Tuomilehto<sup>132,179,180</sup>, Andre G. Uitterlinden<sup>42,181</sup>, Dhananjay Vaidya<sup>45,182</sup>, Astrid van Hylckama Vlieg<sup>93</sup>, Jessica van Setten<sup>83</sup>, Tuula Vasankari<sup>183</sup>, Sailaja Vedantam<sup>3,4,5</sup>, Efthymia Vlachopoulou<sup>141</sup>, Diego Vozzi<sup>64</sup>, Eero Vuoksimaa<sup>123</sup>, Melanie Waldenberger<sup>55,56</sup>, Erin B. Ware<sup>21</sup>, William Wentworth-Shields<sup>94</sup>, John B. Whitfield<sup>184</sup>, Sarah Wild<sup>1</sup>, Gonneke Willemsen<sup>58</sup>, Chittaranjan S. Yajnik<sup>185</sup>, Jie Yao<sup>28</sup>, Gianluigi Zaza<sup>186</sup>, Xiaofeng Zhu<sup>187</sup>, The BioBank Japan Project<sup>18</sup>, Rany M. Salem<sup>3,4,5</sup>, Mads Melbye<sup>92,188</sup>, Hans Bisgaard<sup>86,87</sup>, Nilesh J. Samani<sup>89,177</sup>, Daniele Cusi<sup>90</sup>, David A. Mackey<sup>91</sup>, Richard S. Cooper<sup>176</sup>, Philippe Froguel<sup>70,163</sup>, Gerard Pasterkamp<sup>83</sup>, Struan F.A. Grant<sup>84,189</sup>, Hakon Hakonarson<sup>84,189</sup>, Luigi Ferrucci<sup>190</sup>, Robert A. Scott<sup>63</sup>, Andrew D. Morris<sup>191</sup>, Colin N.A. Palmer<sup>192</sup>, George Dedoussis<sup>39</sup>, Panos Deloukas<sup>82,193</sup>, Lars Bertram<sup>78,194</sup>, Ulman Lindenberger<sup>77</sup>, Sonja I. Berndt<sup>75</sup>, Cecilia M. Lindgren<sup>4,69</sup>, Nicholas J. Timpson<sup>74</sup>, Anke Tönjes<sup>195</sup>, Patricia B. Munroe<sup>59,60</sup>, Thorkild I.A. Sørensen<sup>88,196</sup>, Charles N. Rotimi<sup>73</sup>, Donna K. Arnett<sup>197</sup>, Albertine J. Oldehinkel<sup>198</sup>, Sharon L.R. Kardia<sup>21</sup>, Beverley Balkau<sup>199</sup>, Giovanni Gambaro<sup>200</sup>, Andrew P. Morris<sup>2,69,201</sup>, Johan G. Eriksson<sup>129,202,203,204,205</sup>, Margie J. Wright<sup>206</sup>, Nicholas G. Martin<sup>184</sup>, Steven C. Hunt<sup>207</sup>, John M. Starr<sup>112,208</sup>, Ian J. Deary<sup>111,112</sup>, Lyn R. Griffiths<sup>65</sup>, Henning Tiemeier<sup>42,209</sup>, Nicola Pirastu<sup>8,64</sup>, Jaakko Kaprio<sup>7,123,210</sup>, Nicholas J. Wareham<sup>63</sup>, Louis Pérusse<sup>211</sup>, James G. Wilson<sup>212</sup>, Giorgia Grotto<sup>8</sup>, Mark J. Caulfield<sup>59,60</sup>, Olli Raitakari<sup>213,214</sup>, Dorret I. Boomsma<sup>58</sup>, Christian Gieger<sup>55,56,57</sup>, Pim van der Harst<sup>54,97,215</sup>, Andrew A. Hicks<sup>53</sup>, Peter Kraft<sup>107</sup>, Juha Sinisalo<sup>155</sup>, Paul Knekt<sup>145</sup>, Magnus Johannesson<sup>216</sup>, Patrik K.E. Magnusson<sup>217</sup>, Anders Hamsten<sup>50</sup>, Reinhold Schmidt<sup>47</sup>, Ingrid B. Borecki<sup>218</sup>, Erkki Vartiainen<sup>129</sup>, Diane M. Becker<sup>45,219</sup>, Dwaipayan Bharadwaj<sup>44</sup>, Karen L. Mohlke<sup>43</sup>, Michael Boehnke<sup>10</sup>, Cornelia M. van Duijn<sup>42</sup>, Dharambir K. Sanghera<sup>220,221</sup>, Alexander Teumer<sup>101</sup>, Eleftheria Zeggini<sup>147</sup>, Andres Metspalu<sup>2,178</sup>, Paolo Gasparini<sup>64</sup>, Sheila Ulivi<sup>64</sup>, Carole Ober<sup>94</sup>, Daniela Toniolo<sup>38</sup>, Igor Rudan<sup>1</sup>, David J. Porteous<sup>105,112</sup>, Marina Ciullo<sup>9</sup>, Tim D. Spector<sup>36</sup>, Caroline Hayward<sup>26</sup>, Josée Dupuis<sup>35,110</sup>, Ruth J.F. Loos<sup>11,12,222</sup>, Alan F. Wright<sup>26</sup>, Giriraj R. Chandak<sup>34,223</sup>, Peter Vollenweider<sup>146</sup>, Alan Shuldiner<sup>31,224,225</sup>, Paul M. Ridker<sup>30</sup>, Jerome I. Rotter<sup>28,29</sup>, Naveed Sattar<sup>226</sup>, Ulf Gyllenstein<sup>25</sup>, Kari E. North<sup>118,227</sup>, Mario Pirastu<sup>23</sup>, Bruce M. Psaty<sup>228,229</sup>, David R. Weir<sup>20</sup>, Markku Laakso<sup>136</sup>, Vilmundur Gudnason<sup>13,14</sup>, Atsushi Takahashi<sup>18</sup>, John C. Chambers<sup>15,16,230</sup>, Jaspal S. Kooner<sup>16,175,230</sup>, David P. Strachan<sup>231</sup>, Harry Campbell<sup>1</sup>, Joel N. Hirschhorn<sup>3,4,5</sup>, Markus Perola<sup>2,6</sup>, Ozren Polašek<sup>#1,160</sup>, and James F. Wilson<sup>#1,26</sup> **for ROHgen**

## Affiliations

<sup>1</sup>Usher Institute for Population Health Sciences and Informatics, University of Edinburgh, Teviot Place, Edinburgh, EH8 9AG, Scotland <sup>2</sup>Estonian Genome Center, University of Tartu, Riia 23b, 51010, Tartu, Estonia. <sup>3</sup>Division of Endocrinology and Center for Basic and Translational Obesity Research, Boston Children's Hospital, Cambridge, 02141, MA, USA <sup>4</sup>Program in Medical and Population Genetics, Broad Institute, Cambridge Center 7, Cambridge, 02242, MA, USA <sup>5</sup>Department of Genetics, Harvard Medical School, 25 Shattuck St, Boston, 02115, MA, USA <sup>6</sup>Unit of Public Health Genomics, National Institute for Health and Welfare, P.O. Box 104, Helsinki, FI-00251, Finland <sup>7</sup>Institute for Molecular Medicine Finland (FIMM), University of Helsinki, P.O. Box 20, Helsinki, FI-00014, Finland <sup>8</sup>Department of Medical Sciences, University of Trieste, Strada di Fiume 447 - Osp. di Cattinara, Trieste, 34149, Italy <sup>9</sup>Institute of Genetics and Biophysics "A. Buzzati-Traverso" CNR, via Pietro Castellino, 111, Naples, 80131, Italy <sup>10</sup>Department of Biostatistics and Center for Statistical Genetics, University of Michigan, Ann Arbor, 48109, MI, USA <sup>11</sup>The Charles Bronfman Institute for Personalized Medicine, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, One Gustave L. Levy Place, New York, 10029, USA <sup>12</sup>The Genetics of Obesity and Related Metabolic Traits Program, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, One Gustave L. Levy Place, New York, 10029, USA <sup>13</sup>Icelandic Heart Association, Holtasmari 1, 201, Kopavogur, Iceland <sup>14</sup>Faculty of Medicine, University of Iceland, Reykjavik, 101, Iceland <sup>15</sup>Department of Epidemiology and Biostatistics, Imperial College London, Norfolk Place, London, W2 1PG, UK <sup>16</sup>Department of Cardiology, Ealing Hospital NHS Trust, Uxbridge Road, Southall, Middlesex, UB1 3HW, UK <sup>17</sup>Department of Human Genetics and Disease Diversity, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8510, Japan <sup>18</sup>Laboratory for Statistical Analysis, RIKEN Center for Integrative Medical Sciences, 1-7-22 Suehiro-cho, Tsurumi-ku, Yokohama, Kanagawa, 230-0045, Japan <sup>19</sup>Department of Medicine, University of Eastern Finland, 70210 Kuopio, Finland <sup>20</sup>Institute for Social Research, University of Michigan, 426 Thompson Street, 48104, Ann Arbor, MI, USA <sup>21</sup>Department of Epidemiology, University of Michigan, 1415 Washington Heights, 48109, Ann Arbor, MI, USA <sup>22</sup>Cardiovascular Health Research Unit, Departments of Biostatistics and Medicine, University of Washington, 1730 Minor Ave, Suite 1360, Seattle, 98101, WA, USA <sup>23</sup>Institute of Population Genetics, National Research Council, Trav. La Crucca n. 3 – Reg. Balduina, Sassari, 07100, Italy <sup>24</sup>Epidemiology, University of North Carolina, 137 E. Franklin St., Suite 306, 27599-8050, Chapel Hill, USA <sup>25</sup>Immunology, Genetics & Pathology, Uppsala University, Husargatan 3, Box 815, Uppsala, SE-751 08, Sweden <sup>26</sup>MRC Human Genetics Unit, Institute of Genetics and Molecular Medicine, University of Edinburgh, Crewe Road, EH4 2XU, Edinburgh, UK <sup>27</sup>Department of Gerontology and Geriatrics, Leiden University Medical Center, PO Box 9600, Leiden, Netherlands <sup>28</sup>Institute for Translational Genomics and Population Sciences, Los Angeles Biomedical Research Institute, 1124 W. Carson Street, Torrance, 90502, USA <sup>29</sup>Department of Pediatrics, Harbor-UCLA Medical

Center, Torrance, 90502, USA <sup>30</sup>Division of Preventive Medicine, Brigham and Women's Hospital, 900 Commonwealth Avenue, East, Harvard Medical School, Boston, Boston, MA 02215, USA <sup>31</sup>Division of Endocrinology, Diabetes, and Nutrition and Program for Personalised and Genomic Medicine, Department of Medicine, University of Maryland School of Medicine, 685 Baltimore St. MSTF, Baltimore, 21201, USA <sup>32</sup>Department of Medical Genetics, University of Lausanne, Rue du Bugnon 27, Lausanne, 1005, Switzerland <sup>33</sup>Swiss Institute of Bioinformatics, Quartier Sorge - batiment génopode, Lausanne, 1015, Switzerland <sup>34</sup>Genomic Research on Complex Diseases (GRC) Group, CSIR-Centre for Cellular and Molecular Biology, Habshiguda, Uppal Road, Hyderabad, 500007, India <sup>35</sup>Department of Biostatistics, Boston University School of Public Health, 801 Massachusetts Avenue, Boston, 02118, MA, USA <sup>36</sup>Department of Twin Research & Genetic Epidemiology, King's College London, South Wing, Block D, 3rd Floor, Westminster Bridge Road, London, SE1 7EH, UK <sup>37</sup>NIHR Biomedical Research Centre, Guy's and St. Thomas' Foundation Trust, Westminster Bridge Road, London, SE1 7EH, UK <sup>38</sup>Division of Genetics and Cell Biology, San Raffaele Scientific Institute, Via Olgettina 58, Milano, 20132, Italy <sup>39</sup>Department of Nutrition and Dietetics, Harokopio University of Athens, 70, El. Venizelou Ave, Athens, 17671, Greece <sup>40</sup>Interfaculty Institute for Genetics and Functional Genomics, University Medicine Greifswald, Friedrich-Ludwig-Jahn-Str. 15A, Greifswald, 17475, Germany. <sup>41</sup>Center for Human Genetic Research, 55 Fruit Street, Massachusetts General Hospital, 2114, USA <sup>42</sup>Department of Epidemiology, Erasmus Medical Center, PO Box 2040, Rotterdam, 3000 CA, The Netherlands <sup>43</sup>Department of Genetics, University of North Carolina, Chapel Hill, 27599, NC, USA <sup>44</sup>Genomics and Molecular Medicine, CSIR-Institute of Genomics & Integrative Biology, Mathura Road, New Delhi, 110025, India <sup>45</sup>The GeneSTAR Research Program, Division of General Internal Medicine, Department of Medicine, The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, 21287, Maryland, USA <sup>46</sup>Department of Genetics, Washington University School of Medicine, 4444 Forest Park Boulevard, Saint Louis, 63108, MO, USA <sup>47</sup>Department of Neurology, Clinical Division of Neurogeriatrics, Medical University Graz, Auenbruggerplatz 22, Graz, A-8036, Austria <sup>48</sup>Institute for Medical Informatics, Statistics and Documentation, Medical University Graz, Auenbruggerplatz2, Graz, A-8036, Austria <sup>49</sup>Erasmus School of Economics, Erasmus University Rotterdam, Burgemeester Oudlaan 50, Rotterdam, 3000 DR, The Netherlands <sup>50</sup>Atherosclerosis Research Unit, Department of Medicine Solna, Karolinska Institutet, CMM L8:03, Karolinska University Hospital, Solna, Stockholm, 171 76, Sweden <sup>51</sup>Channing Division of Network Medicine, Brigham & Women's Hospital, 181 Longwood, Boston, 02115, USA <sup>52</sup>Nutrition, Harvard School of Public Health, 401 Park Drive, Boston, 02215, USA <sup>53</sup>Center for Biomedicine, European Academy Bozen/Bolzano (EURAC), Bolzano, Italy - Affiliated Institute of the University of Lübeck, Lübeck, Germany <sup>54</sup>University of Groningen, University Medical Center Groningen, Department of Cardiology, Hanzeplein 1, Groningen, 9700RB, The Netherlands <sup>55</sup>Research Unit of Molecular Epidemiology, Helmholtz Zentrum München, German Research Center for

Environmental Health, Ingolstädter Landstr. 1, Neuherberg, 85764, Germany

<sup>56</sup>Institute of Epidemiology II, Helmholtz Zentrum München, German Research Center for Environmental Health, Ingolstädter Landstr. 1, Neuherberg, 85764, Germany

<sup>57</sup>Institute of Genetic Epidemiology, Helmholtz Zentrum München, German Research Center for Environmental Health, Ingolstädter Landstr. 1, Neuherberg, 85764, Germany

<sup>58</sup>Department of Biological Psychology, VU University Amsterdam, Van der Boechorststraat 1, 1081 BT, Amsterdam, Netherlands

<sup>59</sup>Clinical Pharmacology, William Harvey Research Institute, Barts and The London School of Medicine and Dentistry, Queen Mary University of London, Charterhouse Square, London, EC1M 6BQ, UK

<sup>60</sup>NIHR Barts Cardiovascular Biomedical Research Unit, Queen Mary University of London, Charterhouse Square, London, EC1M 6BQ, UK

<sup>61</sup>Department of Medicine, University of Mississippi Medical Center, 2500 N. State St., Jackson, 39216, MS, USA

<sup>62</sup>Pennington Biomedical Research Center, 6400 Perkins Rd, Baton Rouge, LA 70808, USA

<sup>63</sup>MRC Epidemiology Unit, University of Cambridge School of Clinical Medicine, Cambridge Biomedical Campus, Cambridge, CB2 0QQ, UK

<sup>64</sup>Institute for Maternal and Child Health - IRCCS "Burlo Garofolo", via dell'Istria 65, Trieste, 34137, Italy

<sup>65</sup>Institute of Health and Biomedical Innovation, Queensland University of Technology, 60 Musk Avenue, Kelvin Grove, GPO Box 2434, Brisbane Qld 4001, Brisbane, Australia

<sup>66</sup>Department of Pediatrics, Medical College of Wisconsin, 8701 Watertown Plank Rd, Milwaukee, 53226, WI, USA

<sup>67</sup>Quantitative Genetics, QIMR Berghofer Medical Research Institute, 300 Herston Rd, Herston, Brisbane, 4006, Australia

<sup>68</sup>Dipartimento di Scienze della Vita e della Riproduzione, University of Verona, Strada Le Grazie 15, Verona, 37134, Italy

<sup>69</sup>Wellcome Trust Centre for Human Genetics, University of Oxford, Roosevelt Drive, Oxford, OX3 7BN, UK

<sup>70</sup>CNRS UMR 8199, European Genomic Institute for Diabetes (EGID), Lille 2 University, 1 Rue du Professeur Calmette, 59000, Lille, France

<sup>71</sup>Department of Biostatistics, University of Alabama at Birmingham, 1665 University Blvd, Birmingham, 35294, AL, USA

<sup>72</sup>Department of Epidemiology, University of Groningen, University Medical Center Groningen, Groningen, P.O. box 30.001, 9700 RB, Groningen, The Netherlands

<sup>73</sup>Center for Research on Genomics and Global Health, National Human Genome Research Institute, Building 12A/Room 4047, 12 South Dr., Bethesda, 20892, Maryland, USA

<sup>74</sup>MRC Integrative Epidemiology Unit, University of Bristol, Oakfield House, Oakfield Grove, Bristol, BS8 2BN, UK

<sup>75</sup>Division of Cancer Epidemiology and Genetics, National Cancer Institute, National Institutes of Health, 9609 Medical Center Drive, Rockville, 20850, MD, USA

<sup>76</sup>Cancer Genomics Research Laboratory, National Cancer Institute, SAIC-Frederick, Inc., Frederick National Laboratory for Cancer Research, Frederick, MD, USA

<sup>77</sup>Center for Lifespan Psychology, Max Planck Institute for Human Development, Lentzeallee 94, Berlin, 14195, Germany

<sup>78</sup>Vertebrate Genomics, Max Planck Institute for Molecular Genetics, Ihnestr. 72, Berlin, 14195, Germany

<sup>79</sup>Charité Research Group on Geriatrics, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Reinickendorferstr. 61, 13347, Berlin, Germany

<sup>80</sup>Institute of Medical and Human Genetics, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Augustenburger Platz 1,

Berlin, 13353, Germany <sup>81</sup>Division of Population Health Sciences, Medical Research Institute, University of Dundee, Ninewells hospital and School of Medicine, Dundee, DD2 4BF, Scotland. <sup>82</sup>William Harvey Research Institute, Barts and The London School of Medicine and Dentistry, Queen Mary University of London, Charterhouse Square, London, EC1M 6BQ, UK <sup>83</sup>Experimental Cardiology, Division Heart and Lungs, University Medical Center Utrecht, Heidelberglaan 100, Utrecht, 3584 CX, The Netherlands <sup>84</sup>Center for Applied Genomics, Children's Hospital of Philadelphia, 3615 Civic Center Boulevard, Philadelphia, PA 19104, USA <sup>85</sup>Genetics of Complex Traits, University of Exeter Medical School, University of Exeter, Royal Devon and Exeter Hospital, Barrack Road, Exeter, EX2 5DW, UK <sup>86</sup>Copenhagen Prospective Studies on Asthma in Childhood, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark <sup>87</sup>The Danish Pediatric Asthma Center, Gentofte Hospital, The Capital Region, Copenhagen, Denmark <sup>88</sup>Novo Nordisk Centre for Basic Metabolic Research, Section of Metabolic Genetics, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen, Universitetsparken 1, Copenhagen, 2100, Denmark <sup>89</sup>Department of Cardiovascular Sciences, University of Leicester, BHF Cardiovascular Research Centre, Glenfield Hospital, Groby Road, Leicester, LE3 9QP, UK <sup>90</sup>Department of Health Sciences, University of Milan, via A. di Rudinì 8, 20142 Milan, Italy. <sup>91</sup>Centre for Ophthalmology and Visual Science, University of Western Australia, Lions Eye Institute, 2 Verdun St, Perth, 6009, Australia <sup>92</sup>Department of Epidemiology Research, Statens Serum Institut, Artillerivej 5, Copenhagen, 2300, Denmark <sup>93</sup>Clinical Epidemiology, Leiden University Medical Center, PO Box 9600, Leiden, 2300RC, The Netherlands <sup>94</sup>Department of Human Genetics, University of Chicago, 920 E. 58th Street, Chicago, IL, USA <sup>95</sup>Department of Family and Preventive Medicine, University of California San Diego, 9500 Gilman Drive, La Jolla, 92093, USA <sup>96</sup>Department of Cardiology, Division Heart and Lungs, University Medical Center Utrecht, Heidelberglaan 100, Utrecht, 3584 CX, The Netherlands <sup>97</sup>Durrer Center for Cardiogenetic Research, ICIN-Netherlands Heart Institute, Catharijnesingel 52, Utrecht, 3501 DG, The Netherlands <sup>98</sup>Institute of Cardiovascular Science, faculty of Population Health Sciences, University College London, Gower Street, London, WC1E 6BT, UK <sup>99</sup>University of Groningen, University Medical Center Groningen, Department of Internal Medicine, Hanzeplein 1, Groningen, 9700RB, The Netherlands <sup>100</sup>Department of Medicine, Columbia University, 622 W. 168th Street, New York, 10032, NY, USA <sup>101</sup>Institute for Community Medicine, University Medicine Greifswald, W.-Rathenau-Str. 48, Greifswald, 17475, Germany <sup>102</sup>Department of Economics, Cornell University, 480 Uris Hall, Ithaca, NY, 14853, USA <sup>103</sup>Department of Economics and Center for Economic and Social Research, University of Southern California, 314C Dauterive Hall, 635 Downey Way, Los Angeles, CA, 90089, USA <sup>104</sup>Human Genetics Center, School of Public Health, University of Texas Health Science Center at Houston, 1200 Pressler St., Suite 453E, Houston, Texas, 77030, USA <sup>105</sup>Centre for Genomic and Experimental Medicine, University of Edinburgh, Western General Hospital, Edinburgh, EH4 2XU, UK <sup>106</sup>McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns

Hopkins University School of Medicine, Baltimore, 21205, MD, USA <sup>107</sup>Program in Genetic Epidemiology and Statistical Genetics, Harvard School of Public Health, 665 Huntington Ave, Boston, 02115, USA <sup>108</sup>Genome Technology Branch, National Human Genome Research Institute, NIH, Bethesda, 20892, MD, USA <sup>109</sup>College of Medicine, Dentistry and Nursing, Ninewells Hospital and Medical School, College Office, Level 10, Dundee, DD1 9SY, UK <sup>110</sup>National Heart, Lung, and Blood Institute's Framingham Heart Study, 73 Mt. Wayte Ave, Framingham, 01702, MA, USA <sup>111</sup>Psychology, University of Edinburgh, 7 George Square, Edinburgh, EH8 9JZ, UK <sup>112</sup>Centre for Cognitive Ageing and Cognitive Epidemiology, University of Edinburgh, 7 George Square, Edinburgh, EH8 9JZ, UK <sup>113</sup>Department of Internal Medicine B, University Medicine Greifswald, Ferdinand-Sauerbruch-Str. NK, Greifswald, 17475, Germany <sup>114</sup>Cardiology, Geneva University Hospitals, Rue Gabrielle-Perret-Gentil, 4, Genève 14, 1211, Switzerland <sup>115</sup>Robertson Centre, University of Glasgow, Boyd Orr Building, Glasgow, G12 8QQ, Scotland. <sup>116</sup>Division of Endocrinology, Brigham and Women's Hospital and Harvard Medical School, 75 Francis St, Boston, 02115, MA, USA <sup>117</sup>Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, University Medicine Greifswald, Ferdinand-Sauerbruch-Str. NK, 17475, Greifswald, Germany. <sup>118</sup>Epidemiology, University of North Carolina, 137 E Franklin St., Suite 306, USA <sup>119</sup>Division of Biostatistics, Washington University, 660 S Euclid, St Louis, 63110, MO, USA <sup>120</sup>Roslin Institute, University of Edinburgh, Easter Bush, Midlothian, EH25 9RG, Scotland <sup>121</sup>National Institutes on Aging, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA <sup>122</sup>Department of Neurology, Boston University School of Medicine, 72 E Concord St, Boston, 02118, MA, USA <sup>123</sup>Department of Public Health, University of Helsinki, Hjelt Institute, P.O.Box 41, Mannerheimintie 172, Helsinki, FI-00014, Finland <sup>124</sup>Musculoskeletal Research Programme, Division of Applied Medicine, University of Aberdeen, Foresterhill, Aberdeen, AB25 2ZD, UK <sup>125</sup>State Key Laboratory of Medical Genomics, Shanghai Institute of Hematology, Rui Jin Hospital Affiliated with Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, 197 Rui Jin Er Road, Shanghai, 200025 China <sup>126</sup>Department of Radiology, Erasmus Medical Center, PO Box 2040, Rotterdam, 3000 CA, The Netherlands <sup>127</sup>Department of Medical Sciences, Molecular Epidemiology and Science for Life Laboratory, Uppsala University, Uppsala, Sweden <sup>128</sup>Uppsala Clinical Research Center, Uppsala University, Uppsala, SE-75237, Sweden. <sup>129</sup>Department of Chronic Disease Prevention, National Institute for Health and Welfare, P.O. Box 30, Helsinki, FI-00271, Finland <sup>130</sup>Department of Cardiology C5-P, Leiden University Medical Center, PO Box 9600, Leiden, Netherlands <sup>131</sup>Department of Clinical Physiology, University of Tampere and Tampere University Hospital, P.O. Box 2000, Tampere, 33521, Finland <sup>132</sup>Diabetes Prevention Unit, National Institute for Health and Welfare, P.O. Box 30, FI-00271 Helsinki, Finland <sup>133</sup>Department of Medicine, Division of Endocrinology, Helsinki University Central Hospital, P.O.Box 340, Haartmaninkatu 4, Helsinki, FI-00029, Finland <sup>134</sup>Minerva Foundation Institute for Medical Research, Biomedicum 2U, Tukholmankatu 8, Helsinki, FI-00290, Finland <sup>135</sup>Laboratory for Genotyping Development RCfIMS, 1-7-22 Suehiro-cho, Tsurumi-ku, Yokohama,

Kanagawa, 230-0045, Japan <sup>136</sup>Department of Medicine, University of Eastern Finland and Kuopio University Hospital, Kuopio, 70210, Finland <sup>137</sup>Institute of Behavioural Sciences, University of Helsinki, P.O. Box 9, FI-00014 University of Helsinki, Helsinki, Finland <sup>138</sup>Folkhälsan Research Centre, PB 63, Helsinki, FI-00014 University of Helsinki, Finland <sup>139</sup>Department of Clinical Chemistry, Fimlab Laboratories and School of Medicine University of Tampere, Tampere, 33520, Finland <sup>140</sup>Department of Medical Sciences, University Hospital, Uppsala, 75185, Sweden. <sup>141</sup>Transplantation laboratory, Haartman Institute, University of Helsinki, P.O. Box 21, Helsinki, FI-00014, Finland <sup>142</sup>National Institute of Environmental Health Sciences, National Institutes of Health, Department of Health and Human Services, RTP, NC, USA <sup>143</sup>Ophthalmology, Massachusetts Eye and Ear, 243 Charles St, Boston, 02114, USA <sup>144</sup>Department of Statistics, University of Auckland, 303.325 Science Centre, Private Bag 92019, Auckland, 1142, New Zealand <sup>145</sup>Department of Health, Functional Capacity and Welfare, National Institute for Health and Welfare, P.O. Box 30, Helsinki, FI-00271, Finland <sup>146</sup>Department of Internal Medicine, University Hospital, Route du Bugnon 44, Lausanne, 1011, Switzerland <sup>147</sup>Human Genetics, Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, Cambridge, CB10 1HH, UK <sup>148</sup>Division of Allergy and Clinical Immunology, Department of Medicine, The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland, 21224, USA <sup>149</sup>Laboratory of Molecular Medicine, Human Genome Center, Institute of Medical Science, The University of Tokyo, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo, 108-8639, Japan <sup>150</sup>Division of General Internal Medicine, Massachusetts General Hospital, 50 Staniford St, Boston, 02114, MA, USA <sup>151</sup>Institute of Human Genetics, Helmholtz Zentrum München, German Research Center for Environmental Health, Ingolstädter Landstr. 1, Neuherberg, 85764 Germany <sup>152</sup>Institute of Human Genetics, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München, Ismaninger Str. 22, München, 81675, Germany <sup>153</sup>Molecular Epidemiology, QIMR Berghofer Medical Research Institute, 300 Herston Rd, Herston, Brisbane, 4006, Australia <sup>154</sup>Genome Science Institute, Boston University School of Medicine, 72 East Concord Street, E-304, Boston, 2118, MA, USA <sup>155</sup>HUCH Heart and Lung center, Helsinki University Central Hospital, P.O. Box 340, Helsinki, FI-00029, Finland <sup>156</sup>Pulmonary Center and Department of Medicine, Boston University School of Medicine, 72 E Concord St, Boston, 02118, MA, USA <sup>157</sup>Department of Medicine, University of Ibadan, Ibadan, Nigeria <sup>158</sup>ICAMS, University of Glasgow, 126 University Way, Glasgow, G12 8TA, UK <sup>159</sup>Division of Epidemiology and Community Health, University of Minnesota, 1300 S 2nd Street, Minneapolis, 55454, USA <sup>160</sup>Centre for Global Health and Department of Public Health, School of Medicine, University of Split, Soltanska 2, 21000 Split, Croatia <sup>161</sup>Obesity Research Unit, Research Programs Unit, Diabetes and Obesity, University of Helsinki, P.O.Box 63, Haartmaninkatu 8, FI-00014, Helsinki, Finland <sup>162</sup>International Centre for Circulatory Health, Imperial College London, London, W2 1LA, UK <sup>163</sup>Department of Genomics of Common Disease, School of Public Health, Imperial College London, London, SW7 2AZ, UK <sup>164</sup>Department of Cardiology and Cardio thoracic Surgery Hero DMC Heart Institute,

Civil Lines, 141001, Ludhiana, India <sup>165</sup>Department Public Health Sciences, University of Virginia School of Medicine, 3232 West Complex, Charlottesville, 22908, USA <sup>166</sup>Department of Psychological & Brain Sciences, Indiana University Bloomington, 1101 E. 10th St., Bloomington, IN 47405, USA <sup>167</sup>Institute of Molecular Biology and Biochemistry, Medical University Graz, Harrachgasse 21, Graz, A-8010, Austria <sup>168</sup>Science for Life Laboratory, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden. <sup>169</sup>University of Dundee, Kirsty Semple Way, Dundee, DD2 4DB, UK <sup>170</sup>Cardiovascular Health Research Unit, Division of Cardiology, University of Washington, 1730 Minor Ave, Suite 1360, Seattle, 98101, WA, USA <sup>171</sup>Molecular and Cellular Therapeutics, Royal College of Surgeons in Ireland, St. Stephen's Green, Dublin 2, Ireland <sup>172</sup>UMR INSERM U1122; IGE-PCV "Interactions Gène-Environnement en Physiopathologie Cardio-Vasculaire", INSERM, University of Lorraine, 30 Rue Lionnois, Nancy, 54000, France <sup>173</sup>Institute of Medical Informatics, Biometry and Epidemiology, Chair of Genetic Epidemiology, Ludwig-Maximilians-Universität, Munich, Germany. <sup>174</sup>Department of Endocrinology, All India Institute of Medical Sciences, Ansari Nagar East, New Delhi, 110029, India <sup>175</sup>National Heart and Lung Institute, Imperial College London, Du Cane Road, London, W12 0NN, UK <sup>176</sup>Department of Public Health Sciences, Stritch School of Medicine, Loyola University Chicago, Maywood, USA <sup>177</sup>NIHR Leicester Cardiovascular Biomedical Research Unit, University of Leicester, Glenfield Hospital, Groby Road, Leicester, LE3 9QP, UK <sup>178</sup>Institute of Molecular and Cell Biology, University of Tartu, Riia 23, Tartu, 51010 Estonia <sup>179</sup>Centre for Vascular Prevention, Danube-University Krems, 3500 Krems, Austria <sup>180</sup>Diabetes Research Group, King Abdulaziz University, 21589 Jeddah, Saudi Arabia <sup>181</sup>Department of Internal Medicine, Erasmus Medical Center, PO Box 2040, Rotterdam, 3000 CA, The Netherlands <sup>182</sup>Department of Epidemiology, Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, Baltimore, Maryland, 21205, USA <sup>183</sup>Finnish Lung Health Association, Sibeliuskatu 11 A 1, Helsinki, FI-00250, Finland. <sup>184</sup>Genetic Epidemiology, QIMR Berghofer Medical Research Institute, 300 Herston Rd, Herston, Brisbane, 4006, Australia <sup>185</sup>Diabetes Unit, KEM Hospital and Research Centre, Rasta Peth, Pune, 411011, India. <sup>186</sup>Renal Unit, Department of Medicine, Piazzale A. Stefani 1, Verona, 37124, Italy. <sup>187</sup>Department of Epidemiology and Biostatistics, Case Western Reserve University, Cleveland, USA <sup>188</sup>Department of Medicine, Stanford University, 300 Pasteur Drive, Stanford, 94305, CA, USA <sup>189</sup>Department of Pediatrics, Perelman School of Medicine, The University of Pennsylvania, 3615 Civic Center Boulevard, Philadelphia, PA 19104, USA <sup>190</sup>Translational Gerontology Branch, National institute on Aging, Baltimore, 21225, Maryland, USA <sup>191</sup>Jacqui Wood Cancer Centre, Medical Research Institute, University of Dundee, Ninewells hospital and School of Medicine, Dundee, DD1 9SY, Scotland. <sup>192</sup>Centre for Pharmacogenetics and Pharmacogenomics, Medical Research Institute, University of Dundee, Ninewells hospital and School of Medicine, Dundee, DD1 9SY, Scotland <sup>193</sup>Princess Al-Jawhara Al-Brahim Centre of Excellence in Research of Hereditary Disorders (PACER-HD), King Abdulaziz University, Jeddah, 21589, Saudi Arabia. <sup>194</sup>Faculty of Medicine, Imperial College London, Charing Cross Campus - St Dunstan's Road,

London, W6 8RP, UK <sup>195</sup>Department of Medicine, University of Leipzig, Leipzig, Germany. <sup>196</sup>Institute of Preventive Medicine, Bispebjerg and Frederiksberg Hospital, The Capital Region, Copenhagen, 2000, Denmark <sup>197</sup>Department of Epidemiology, University of Alabama at Birmingham, 1665 University Blvd, Birmingham, 35294, AL, USA <sup>198</sup>Department of Psychiatry, University Medical Center Groningen, University of Groningen, P.O. box 30.001, Groningen, 9700 RB, The Netherlands <sup>199</sup>Epidemiology of diabetes, obesity and chronic kidney disease over the lifecourse, Inserm, CESP Center for Research in Epidemiology and Population Health U1018, 16 Avenue Paul Vaillant Couturier, Villejuif, 94807, France <sup>200</sup>Dipartimento di Scienze Mediche, Catholic University of the Sacred Heart, Via G. Moscati 31/34, Roma, 00168, Italy <sup>201</sup>Department of Biostatistics, University of Liverpool, Duncan Building, Daulby Stree, Liverpool, L69 3GA, UK <sup>202</sup>Department of General Practice and Primary Health Care, University of Helsinki, P.O. Box 20, University of Helsinki, Helsinki, FI-00014, Finland <sup>203</sup>Vasa Central Hospital, Sandviksgatan 2-4, Vasa, 65130, Finland <sup>204</sup>Folkhälsan Research Centre, PB 63, University of Helsinki, Helsinki, FI-00014, Finland <sup>205</sup>Unit of General Practice, Helsinki University Central Hospital, Haartmaninkatu 4, Helsinki, FI-00290, Finland <sup>206</sup>Neuro-Imaging Genetics, QIMR Berghofer Medical Research Institute, 300 Herston Rd, Herston, Brisbane, 4006 Australia <sup>207</sup>Cardiovascular Genetics Division, University of Utah, 420 Chipeta Way, Room 1160, Salt Lake City, 84117, Utah, USA <sup>208</sup>Alzheimer Scotland Research Centre, University of Edinburgh, 7 George Square, Edinburgh, EH8 9JZ, UK <sup>209</sup>Department of Psychiatry, Erasmus Medical Center, PO Box 2040, Rotterdam, 3000 CA, The Netherlands <sup>210</sup>National Institute for Health and Welfare (THL), P.O.Box 30, Mannerheimintie 166, Helsinki, FI-00271, Finland <sup>211</sup>Department of kinesiology, Laval University, 2300 rue de la Terrasse, Quebec, G1V 0A6, Canada <sup>212</sup>Department of Physiology and Biophysics, University of Mississippi Medical Center, 2500 N. State St., Jackson, 39216, MS, USA <sup>213</sup>Department of Clinical Physiology and Nuclear Medicine, University of Turku and Turku University Hospital, Turku, 20521, Finland <sup>214</sup>Research Center of Applied and Preventive Cardiovascular medicine, University of Turku, Turku, 20521, Finland <sup>215</sup>University of Groningen, University Medical Center Groningen, Department of Genetics, Hanzeplein 1, Groningen, 9700RB, The Netherlands <sup>216</sup>Department of Economics, Stockholm School of Economics, Box 6501, Stockholm, SE-113 83, Sweden <sup>217</sup>Department of Medical Epidemiology and Biostatistics, Karolinska Institutet, Box 281, Stockholm, SE-171 77, Sweden <sup>218</sup>Department of Genetics and Biostatistics, Washington University School of Medicine, 4444 Forest Park Boulevard, Saint Louis, 63108, MO, USA <sup>219</sup>Department of Health Policy and Management, Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, Baltimore, 21205, Maryland, USA <sup>220</sup>Department of Pediatrics, University of Oklahoma Health Sciences Center, 940 Stanton Young Boulevard, Oklahoma City, 73104, OK, USA <sup>221</sup>Department of Pharmaceutical Sciences, University of Oklahoma Health Sciences Center, Oklahoma City, 73104, USA <sup>222</sup>The Mindich Child Health and Development Institute, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, One Gustave L. Levy Place, New York, 10029, USA

<sup>223</sup>Genome Institute of Singapore, 60 Biopolis Street, #02-01 Genome, Singapore, 138672, Singapore <sup>224</sup>Program for Personalised and Genomic Medicine, Department of Medicine, University of Maryland School of Medicine, 685 Baltimore St. MSTF, Baltimore, 21201, USA <sup>225</sup>Geriatric Research and Education Clinical Center, Veterans Administration Medical Center, 685 W Baltimore MSTF, Baltimore, 21201, USA <sup>226</sup>BHF centre, University of Glasgow, 126 University Avenue, Glasgow, G12 8TA, Scotland <sup>227</sup>Carolina Center for Genome Sciences, University of North Carolina at Chapel Hill, 137 E. Franklin St., Suite 306, Chapel Hill, USA <sup>228</sup>Cardiovascular Health Research Unit, Departments of Medicine, Epidemiology and Health Services, University of Washington, 1730 Minor Ave, Suite 1360, Seattle, 98101, WA, USA <sup>229</sup>Group Health Research Institute, Group Health Cooperative, 1730 Minor Ave, Suite 1360, Seattle, 98101, WA, USA <sup>230</sup>Imperial College Healthcare NHS Trust, Imperial College London, Praed Street, London, W2 1NY, UK <sup>231</sup>Population Health Research Institute, St George's, University of London, Cranmer Terrace, London, SW17 0RE, UK.

## Acknowledgements

We thank the participants in all ROHgen studies; cohort-specific acknowledgements are detailed in Supplementary Table 6. This work was funded by a UK Medical Research Council (MRC) PhD studentship to PKJ, and JFW and OP acknowledge support from the MRC Human Genetics Unit “QTL in Health and Disease” programme. We thank W.G. Hill for discussions and comments on the manuscript and K. Lindsay for administrative assistance.

## Author contributions

CHaI, PN, MMe, HB, NJS, DC, DAM, RSC, PF, GP, SFG, HH, LF, RAS, ADM, CNP, GDe, PD, LB, UL, SIB, CML, NJT, ATon, PBM, TIS, CNR, DKA, AJO, SLK, BB, GGa, APM, JGE, MJW, NGM, SCH, JMS, IJD, LRG, HT, NPi, JKa, NJW, LP, JGW, GGi, MJC, OR, DDB, CGi, Pv, AAH, PKr, JS, PKn, MJ, PKM, AH, RSc, IBB, EVa, DMB, DB, KLM, MB, CMvD, DKS, ATe, EZ, AMe, PG, SU, CO, DT, GDS, IR, DJP, MC, TDS, CHay, JD, RJL, AFW, GRC, PV, ASH, PMR, JIR, NS, UG, KEN, MP, BMP, DRW, MLa, VG, ATa, JCC, JSK, DPS, HC, JNH, MP, OP, JFW designed individual studies. TN, JDF, SE, VV, STTr, DIC, SSN, MMa, DR, AF, LRY, EH, CBo, JRP, SC, UB, GM, TLi, ID, JZ, JPB, ES, SY, MAA, SJB, GRB, EPB, ACa, YChan, SJC, YDIC, FSC, JC, ACo, LCu, GDa, MD, SBE, BF, MFF, IF, CSF, TMF, NFri, FGe, IGi, OG, FGr, CGu, CJH, SEH, NDH, NLH, KH, LJH, GHo, PGH, EI, ÅJ, PJ, JJ, MKa, SK, SMK, NMK, HKK, MKu, JKu, JL, RAL, TLe, DCL, LLi, MLL, ALo, TLu, ALu, SM, KM, JBM, CMei, TM, CMen, FDM, LM, GWM, RHM, RN, MN, MSN, GTO, AO, SP, WRP, JSP, IPa, KP, NPo, SRa, PR, SSR, HR, AR, LMR, RR, BSa, RMS, VS, ASa, LJS, SSe, PS, BHS, NSor, ASttn, MGS, KS, NTa, KDT, BOT, ATog, MTo, JT, AGU, AvHV, TV, SV, EVl, EVu, MW, JBW, SW, GW, CSY, GZ, XZ, MMe, HB, NJS, DC, DAM, RSC, GP, SFG, HH, LF, RAS, GDe, PD, LB, UL, SIB, GDS, NJT, ATon, PBM, TIS, CNR, DKA, AJO, SLK, BB, MKK, GGa, JGE, MJW, NGM, SCH, JMS, IJD, LRG, JKa, NJW, LP, JGW, GGi, MJC, OR, DDB, CGi, Pv, AAH, PKr, JS, PKn, MJ, PKM, AH, RSc, IBB, EVa, DMB, DB, KLM, MB, CMvD, DKS, EZ, AMe, PG, CO, DT, DJP, MC, TDS, CHay, RJL, AFW, GRC, PV, ASH, PMR, JIR, NS, UG, MP, BMP, DRW, MLa, JCC, JSK, DPS, JNH, MP, OP, JFW collected the data. STTr, DIC,

MCC, CBo, UB, ID, MA, FWA, SJB, DJB, EB, EPB, ACc, SJC, JC, IF, TMF, CGu, CJH, TBH, NDH, MI, EI, JJ, PKo, MKu, LJL, RAL, LLi, RAM, KM, JBM, GWM, RHM, PAP, KP, SSR, RR, HS, PS, BHS, NSor, NSot, DVa, JBW, CSY, MMe, NJS, DC, DAM, RSC, PF, GP, SFG, HH, LF, GDe, PD, LB, UL, SIB, CML, ATon, PBM, CNR, DKA, AJO, SLK, BB, GGa, APM, MJW, NGM, SCH, JMS, IJD, LRG, JKa, NJW, LP, MJC, DDB, Pv, PKr, MJ, PKM, AH, RSc, IBB, DMB, DB, KLM, MB, CMvD, DKS, EZ, AMe, PG, SU, CO, IR, DJP, MC, TDS, CHay, AFW, GRC, PV, ASH, PMR, JIR, NS, UG, KEN, BMP, DRW, MLa, VG, DPS, HC, OP, JFW contributed to funding. PKJ, TE, HMa, NE, IGa, TN, AUJ, CSc, AVS, WZhan, YO, AStc, JDF, WZhao, TMB, MMC, NFra, SE, VV, STTr, XG, DIC, JRO, TC, SSN, YChen, MMa, DR, MTa, AF, TKac, ABj, AvS, YW, AKG, LRY, LW, EH, CAR, OM, MCC, CP, NV, CBa, AAA, HRW, DVu, HMe, JRP, SSMi, MCB, SSMe, PAL, GM, AD, LY, LFB, DZ, PJv, DS, RM, GHe, TKar, ZW, TLi, ID, JZ, WM, LLa, SWvL, JPB, ARW, ABo, TSA, LMH, ES, SY, IMM, LCa, HGdH, MA, UA, NA, FWA, SEB, SB, ACa, YChan, CC, GDa, GE, BF, MFF, FGe, MG, SEH, JJH, JH, JEH, PGH, AJ, YK, SK, RAL, BL, MLo, SJLoo, YL, PM, AMa, CMen, FDM, EM, MEM, AMo, AO, IPa, FP, IPr, LMR, BSa, RMS, RSa, HS, WRS, CSa, CMa, BSe, SSh, SJLon, JAS, LS, RJS, MJS, STa, BOT, ATog, MTo, NTs, JvS, SV, DVo, EBW, WW, JY, GZ, NJS, RAS, ADM, CNP, SIB, NJT, APM, SCH, HT, NPi, LP, Pv, PKr, RSc, IBB, ATe, CO, MC, JD, JIR, NS, KEN, ATa, JCC, JSK, DPS analysed the data. PKJ, TE, HMa, NE, IGa, TN, AUJ, CSc, AVS, MCB, DPS performed beta-testing of scripts. PKJ and TE performed meta-analysis. PKJ, TE, OP and JFW wrote the manuscript. All authors approved the final manuscript.

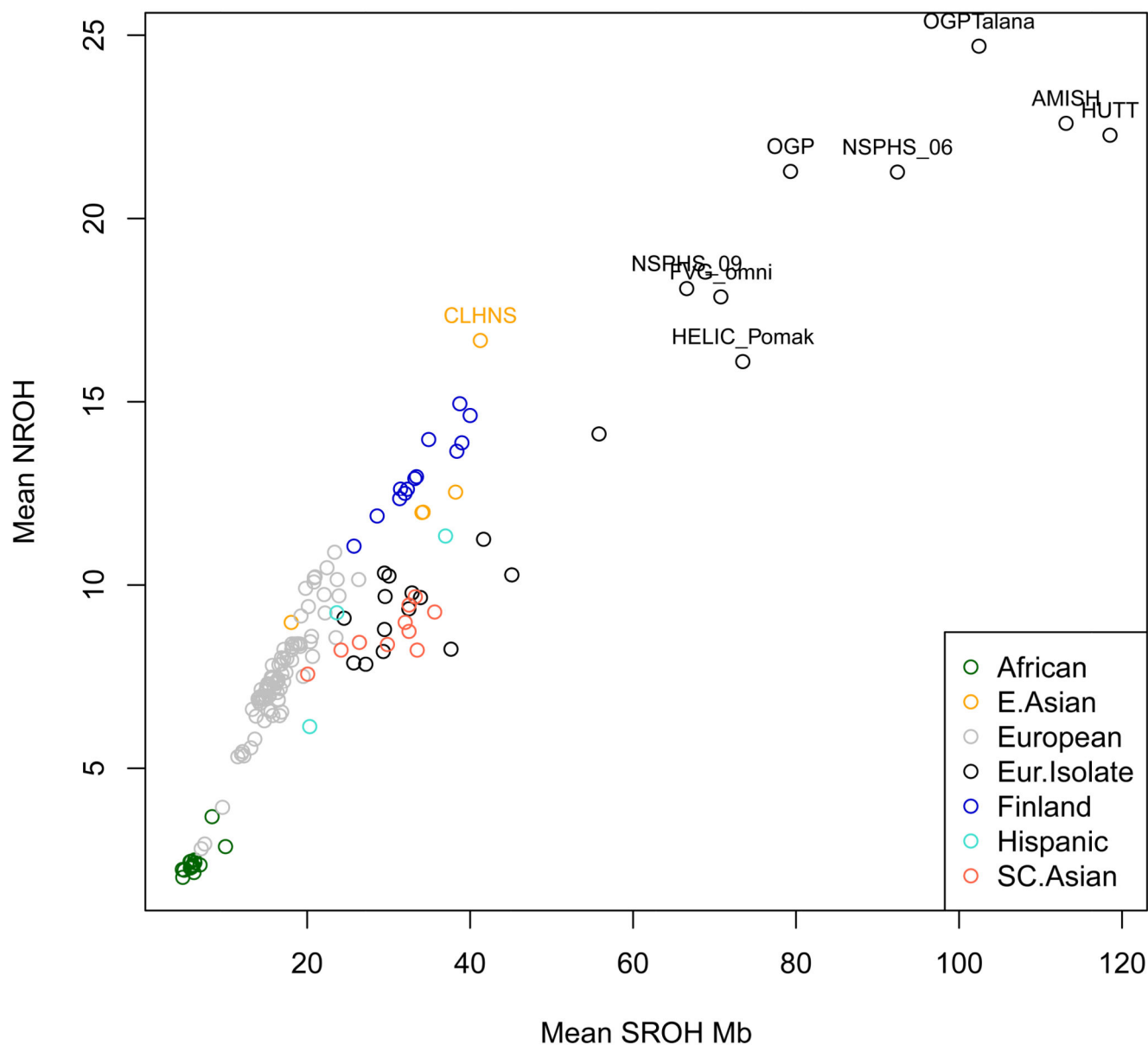
## References

1. Garrod A. The incidence of alkaptonuria: a study of chemical individuality. *Lancet*. 1902; 11:1616–1620.
2. Darwin, C. *The Variation of Animals and Plants Under Domestication*. Appleton: 1868.
3. McQuillan R, et al. Runs of Homozygosity in European Populations. *Am. J. Hum. Genet.* 2008; 83:359–372. [PubMed: 18760389]
4. McQuillan R, et al. Evidence of Inbreeding Depression on Human Height. *PLoS Genet.* 2012; 8:e1002655. [PubMed: 22829771]
5. Rudan I, et al. Inbreeding and the Genetic Complexity of Human Hypertension. *Genetics*. 2003; 163:1011–1021. [PubMed: 12663539]
6. Campbell H, et al. Effects of genome-wide heterozygosity on a range of biomedically relevant human quantitative traits. *Hum. Mol. Genet.* 2007; 16:233–241. [PubMed: 17220173]
7. Charlesworth D, Willis JH. The genetics of inbreeding depression. *Nature Rev. Genetics*. 2009; 10:783–796. [PubMed: 19834483]
8. Wright, S. *Evolution and the Genetics of Populations, Vol. 3: Experimental Results and Evolutionary Deductions*. University of Chicago Press; 1977.
9. Wright S. Coefficients of inbreeding and relationships. *Am. Nat.* 1922; 56:330–339.
10. Broman KW, Weber JL. Long Homozygous Chromosomal Segments in Reference Families from the Centre d'Étude du Polymorphisme Humain. *Am. J. Hum. Genet.* 1999; 65:1493–1500. [PubMed: 10577902]
11. Gibson J, Morton NE, Collins A. Extended tracts of homozygosity in outbred human populations. *Hum. Mol. Genet.* 2006; 15:789–795. [PubMed: 16436455]
12. Kirin M, McQuillan R, Franklin CS, Campbell H, McKeigue PM, Wilson JF. Genomic Runs of Homozygosity Record Population History and Consanguinity. *PLoS ONE*. 2010; 5:e13996. [PubMed: 21085596]

13. Keller MC, Visscher PM, Goddard ME. Quantification of Inbreeding Due to Distant Ancestors and Its Detection Using Dense Single Nucleotide Polymorphism Data. *Genetics*. 2011; 189:237–249. [PubMed: 21705750]
14. Pemberton TJ, Rosenberg NA. Population-genetic influences on genomic estimates of the inbreeding coefficient: a global perspective. *Hum Hered*. 2014; 77:37–48. [PubMed: 25060268]
15. Abdellaoui A, et al. Educational Attainment Influences Levels of Homozygosity through Migration and Assortative Mating. *PLoS ONE*. 2015; 10:e0118935. [PubMed: 25734509]
16. Neel JV, Schull WJ, Yamamoto M, Uchida S, Yanase T, Fujiki N. The effects of parental consanguinity and inbreeding in Hirado, Japan. II. Physical development, tapping rate, blood pressure, intelligence quotient, and school performance. *Am. J. Hum. Genet.* 1970; 22:263–83. [PubMed: 5444999]
17. Marioni RE, et al. Common genetic variants explain the majority of the correlation between height and intelligence: the generation Scotland study. *Behav. Genet.* 2014; 44:91–96. [PubMed: 24554214]
18. Wood AR, et al. Defining the role of common variation in the genomic and biological architecture of adult human height. *Nature Genet.* 2014; 46:1173–86. [PubMed: 25282103]
19. Deary IJ, et al. Genetic contributions to stability and change in intelligence from childhood to old age. *Nature*. 2012; 482:212–215. [PubMed: 22258510]
20. Morton NE. Effect of inbreeding on IQ and mental retardation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1978; 75:3906–3908. [PubMed: 279005]
21. Najmabadi H, et al. Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders. *Nature*. 2011; 478:57–63. [PubMed: 21937992]
22. Nalls MA, et al. Measures of Autozygosity in Decline: Globalization, Urbanization, and Its Implications for Medical Genetics. *PLoS Genet.* 2009; 5:e1000415. [PubMed: 19282984]
23. Flynn JR. Massive IQ gains in 14 nations: what IQ tests really measure. *Psychol. Bull.* 1987; 101:171–191.
24. Galton, F. *Natural inheritance*. MacMillan; London: 1889.
25. Hoffman JI, et al. High-throughput sequencing reveals inbreeding depression in a natural population. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014; 111:3775–3780. [PubMed: 24586051]
26. Wright A, Charlesworth B, Rudan I, Carothers A, Campbell H. A polygenic basis for late-onset disease. *Trends Genet.* 2003; 19:97–106. [PubMed: 12547519]
27. Weiss, L.A, Pan, L.; Abney, M.; Ober, C. The sex-specific genetic architecture of quantitative traits in humans. *Nature Genet.* 2006; 38:218–222. [PubMed: 16429159]
28. Powell JE, et al. Congruence of Additive and Non-Additive Effects on Gene Expression Estimated from Pedigree and SNP Data. *PLoS Genet.* 2014; 9:e1003502. [PubMed: 23696747]
29. Keller MC, et al. Runs of Homozygosity Implicate Autozygosity as a Schizophrenia Risk Factor. *PLoS Genet.* 2012; 8:e1002656. [PubMed: 22511889]
30. Darwin, C. *The Effects of Crossing and Self Fertilization in the Vegetable Kingdom*. John Murray; 1876.
31. Purcell S. PLINK: A Tool Set for Whole-Genome Association and Population-Based Linkage Analyses. *Am. J. Hum. Genet.* 2007; 81:559–575. [PubMed: 17701901]
32. Aulchenko YS, Ripke S, Isaacs A, van Duijn CM. GenABEL: an R library for genome-wide association analysis. *Bioinformatics*. 2007; 23:1294–1296. [PubMed: 17384015]
33. Ronnegard L, Shen X, Alam M. hglm: A Package for Fitting Hierarchical Generalized Linear Models. *The R Journal*. 2010; 2:20–28.
34. Lango Allen H, et al. Hundreds of variants clustered in genomic loci and biological pathways affect human height. *Nature*. 2010; 467:832–838. [PubMed: 20881960]
35. Ehret GB, et al. Genetic variants in novel pathways influence blood pressure and cardiovascular disease risk. *Nature*. 2011; 478:103–109. [PubMed: 21909115]
36. Scott RA, et al. Large-scale association analyses identify new loci influencing glycemic traits and provide insight into the underlying biological pathways. *Nature Genetics*. 2012; 44:991–1005. [PubMed: 22885924]

37. Willer CJ, et al. Discovery and refinement of loci associated with lipid levels. *Nature Genetics*. 2013; 45:1274–1283. [PubMed: 24097068]
38. Soler Artigas M, et al. Genome-wide association and large-scale follow up identifies 16 new loci influencing lung function. *Nature Genetics*. 2011; 43:1082–1090. [PubMed: 21946350]
39. Rietveld CA, et al. GWAS of 126,559 individuals identified genetic variants associated with educational attainment. *Science*. 2013; 340:1467–1471. [PubMed: 23722424]
40. Stefansson H, et al. CNVs conferring risk of autism or schizophrenia affect cognition in controls. *Nature*. 2014; 505:361–366. [PubMed: 24352232]
41. 1000 Genomes Project. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*. 2012; 491:56–65. [PubMed: 23128226]
42. Aulchenko YS, de Koning DJ, Haley C. Genomewide rapid association using mixed model and regression: a fast and simple method for genome-wide pedigree-based quantitative trait loci association analysis. *Genetics*. 2007; 177:577–85. [PubMed: 17660554]
43. Marioni RE, et al. Molecular genetic contributions to socioeconomic status and intelligence. *Intelligence*. 2014; 44:26–32. [PubMed: 24944428]
44. Hedges, LV.; Olkin, I. *Statistical Methods for Meta-Analysis*. Academic Press; New York: 1985.

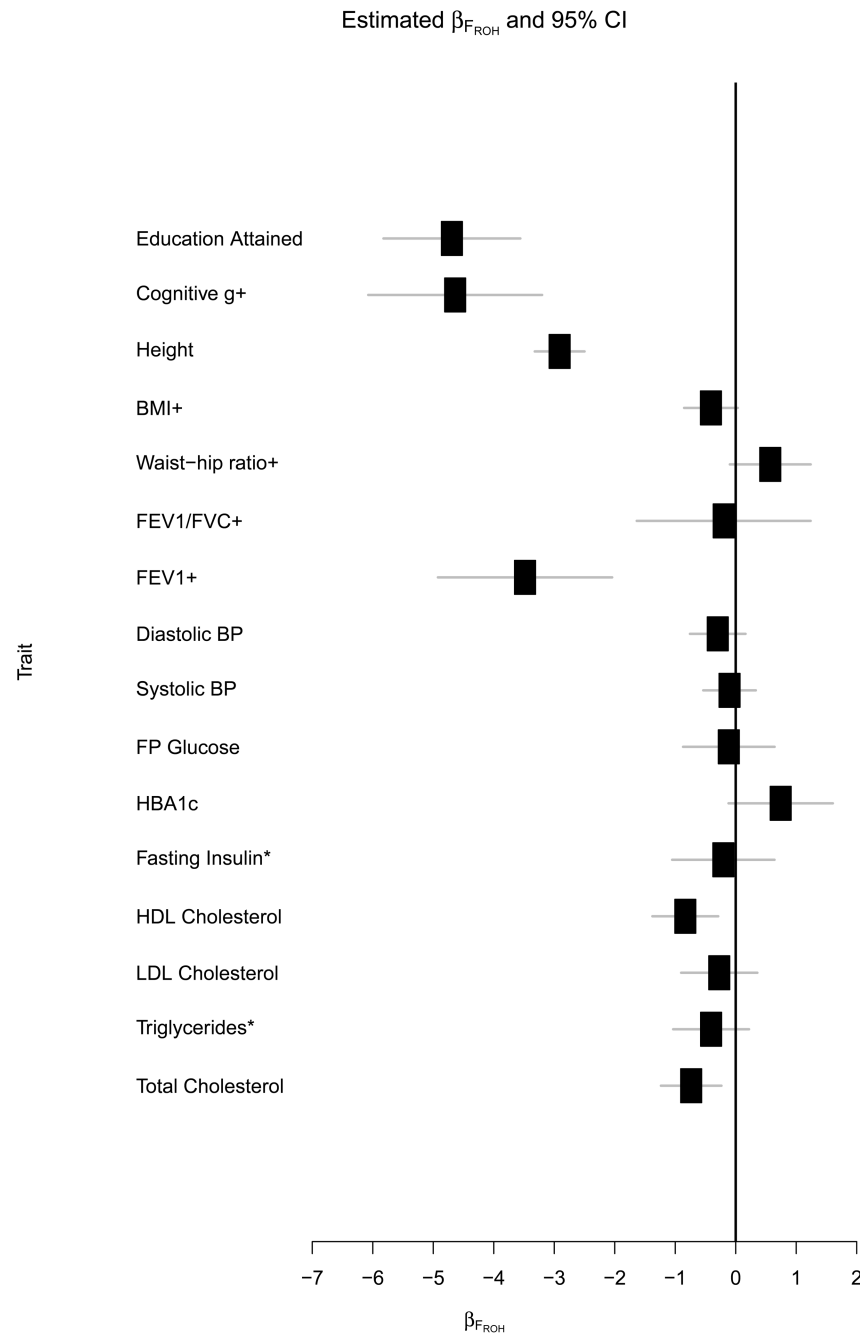
## Runs of Homozygosity by Cohort



**Figure 1. Runs of Homozygosity by Cohort**

The sum of runs of homozygosity (SROH) and the number of runs of homozygosity (NROH) are shown by sub-cohort. . Populations differ by an order of magnitude in their mean burden of ROH. There are clear differences by continent and population type both in the mean SROH, and the relationship between SROH and NROH.. SC.Asian is South & Central Asian, E.Asian is East Asian, Eur.Isolate is European isolates. The ten most homozygous cohorts are labelled: AMISH are the Old Order Amish from Lancaster County, Pennsylvania; HUTT, S-Leut Hutterites from South Dakota; NSPHS, North Swedish Population Health Study, 06 and 09 suffixes are different sampling years from different

counties in Northern Sweden; OGP, Ogliastra Genetic Park, Sardinia, Italy; Talana is a particular village in the region; FVG, Friuli-Venezia-Giulia Genetic Park, Italy, omni and 370 suffices refer to subsets genotyped with the Illumina OmniX and 370CNV arrays; HELIC, Hellenic Isolates, Greece, from Pomak villages in Thrace, and CLHNS, Cebu Longitudinal Health and Nutrition Study in the Philippines.



**Figure 2. Effects of genome-wide homozygosity,  $\beta_{F_{ROH}}$ , on 16 traits**

Four phenotypes show a significant effect of burden of ROH: height (145 sub-cohorts), FEV1 (34), educational attainment (47) and general cognitive ability,  $g$  (23). HDL and total cholesterol are not significantly different from zero after correcting for 16 tests and no effect is observed for the other traits. To account for the different numbers of males and females in cohorts and marked effect of sex on some traits, trait units are intra-sex standard deviations.  $\beta_{F_{ROH}}$  is the estimated effect of  $F_{ROH}$  on the trait, where  $F_{ROH}$  is the ratio of the SROH to the total length of the genome. 95% confidence intervals (CIs) are also plotted. + indicates

phenotype was rank transformed, \* indicates phenotype was log transformed. BMI, body mass index; BP, blood pressure; FP fasting plasma; HbA1c, haemoglobin A1c (glycated haemoglobin); FEV1, forced expiratory volume in one second; FVC, forced vital capacity; HDL, high density lipoprotein; LDL, low density lipoprotein.

**Table 1**  
**Effects of genome-wide burden of runs of homozygosity on four traits**

P-association is P value for association, P-heterogeneity is P value for heterogeneity in a meta-analysis between trait and unpruned  $F_{ROH}$ ,  $\beta_{FROH-SD}$  is the effect size estimate of  $F_{ROH}$  expressed in units of intra-sex phenotypic standard deviations and SE is the standard error.  $\beta_{FROH-units}$  is the effect size estimate for  $F_{ROH} = 1$  expressed in the measurement units and SE the standard error. The P values for those traits showing evidence for association are calculated including 5 outlying cohort-specific effect size estimates (an outlier was defined as T-test statistic over 3 for the null hypothesis that the cohort effect size estimate equals the meta-analysis effect size estimate), which is conservative as the majority of these are in the opposite direction. Beta estimates however exclude these outliers, for which there is evidence of discrepancy, and should thus be more accurate. + indicates phenotype was rank transformed; FEV1 is forced expiratory lung volume in one second; g is the general cognitive factor (first unrotated principal component of test scores across diverse domains of cognition).

| Phenotype                     | Outliers | Height                | FEV1+                | Educational Attainment | Cognitive g+          |
|-------------------------------|----------|-----------------------|----------------------|------------------------|-----------------------|
| Subjects                      |          | 354,224               | 64,446               | 84,725                 | 53,300                |
| P-association                 | Included | $<1 \times 10^{-300}$ | $2.1 \times 10^{-6}$ | $1.8 \times 10^{-10}$  | $2.5 \times 10^{-10}$ |
| P-heterogeneity               | Included | 0.014                 | 0.10                 | $1.2 \times 10^{-5}$   | 0.071                 |
| $\beta_{FROH-SD}$             | Excluded | -2.91                 | -3.48                | -4.69                  | -4.64                 |
| SE $\beta_{FROH-SD}$          | Excluded | 0.21                  | 0.73                 | 0.58                   | 0.73                  |
| $\beta_{FROH-units}$          | Excluded | -0.188                | -2.2                 | -12.9                  | -4.64                 |
| SE $\beta_{FROH-units}$       | Excluded | 0.014                 | 0.46                 | 1.83                   | 0.73                  |
| Units                         |          | m                     | litres               | years                  | SD                    |
| First cousin offspring effect | Excluded | -1.2                  | -137                 | -9.7                   | -0.29                 |
| Units                         |          | cm                    | ml                   | months                 | SD                    |