



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ – ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ ΣΤΗΝ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ ΣΕ
ΚΛΙΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ:
ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΚΛΙΝΙΚΟΥΣ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΥΣ ΔΕΙΚΤΕΣ ΣΕ
ΠΑΧΥΣΑΡΚΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ
ΛΙΠΟΚΥΤΤΑΡΑ**

ΔΕΡΔΕΜΕΖΗΣ ΧΡΗΣΤΟΣ

ΚΛΙΝΙΚΟΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2011



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ – ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ ΣΤΗΝ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ ΣΕ
ΚΛΙΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ:
ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΚΛΙΝΙΚΟΥΣ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΥΣ ΔΕΙΚΤΕΣ ΣΕ
ΠΑΧΥΣΑΡΚΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ
ΛΙΠΟΚΥΤΤΑΡΑ**

ΔΕΡΔΕΜΕΖΗΣ ΧΡΗΣΤΟΣ

ΚΛΙΝΙΚΟΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2011

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική καταχώρηση του Ιατρικού Τμήματος)».

Ημερομηνία αίτησης του κ Δερδεμέζη Χρήστου: 30-9-2002

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 485^α/12-11-2002

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Κιόρτσης Δημήτριος Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Ελισάφ Μωυσής Καθηγητής Παθολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Βεζυράκη Πατρώνα Επίκουρη Καθηγήτρια Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 13-7-2005

«Ο ρόλος των φλαβονοειδών στην αθηροσκλήρωση σε κλινικό και κυτταρικό επίπεδο: Συσχέτιση με κλινικούς και βιοχημικούς δείκτες σε παχύσαρκους ασθενείς και επίδραση σε ανθρώπινα λιποκύτταρα»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 714^α/7-6-2011

Αργυροπούλου Μαρία	Καθηγήτρια Ακτινολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Ελισάφ Μωυσής	Καθηγητής Παθολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Ευαγγέλου Άγγελος	Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Τσελέπης Αλέξανδρος	Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Κιόρτσης Δημήτριος	Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Βεζυράκη Πατρώνα	Επίκουρη Καθηγήτρια Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Τσιμιχόδημος Βασίλειος	Λέκτορας Παθολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 23-6-2011

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Ιωάννης Γουδέβενος

Καθηγητής Παθολογίας- Καρδιολογίας

Η Γραμματέας της Σχολής

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΣΒΕΝΤΖΟΥΡΗ-ΖΩΗ



Στην οικογένειά μου

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων σε συνεργασία με το Ιατρείο Μελέτης των Διαταραχών του Μεταβολισμού των Λιπιδίων και Παχυσαρκίας της Β' Παθολογικής Παν/κής Κλινικής, το Ακτινολογικό Τμήμα του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων και το εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Ο κύριος καθοδηγητής μου κατά την διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν ο επιβλέπων κ. Κιόρτσης Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Η βοήθειά του και η συμπαράστασή του, καθώς και οι πολύτιμες υποδείξεις του έκαναν δυνατή την πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης. Η συνεργασία μας ήταν εξαιρετική τιμή για μένα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον κ. Μωυσή Ελισάφ, καθηγητή Παθολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, χωρίς τη συμβολή του οποίου, ηθική πρωτίστως, η εκπόνηση της παρούσας διατριβής θα ήταν αδύνατη.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά την κ. Βεζυράκη Πάτρα, Επίκουρη Καθηγήτρια Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, της οποίας η υποστήριξη ακόμη και από τις προπτυχιακές μου σπουδές ήταν σημαντική.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω και στους κκ. Μ. Αργυροπούλου, Α. Ευαγγέλου, Α. Τσελέπη και Β. Τσιμιχόδημο. Η κυρία Αργυροπούλου Μαρία, καθηγήτρια Ακτινολογίας και οι συνεργάτες της με βοήθησαν σημαντικά στο πραγματικά δύσκολο κομμάτι της μελέτης των μαγνητικών τομογραφιών της αορτής και για αυτό τους οφείλω ευγνωμοσύνη. Η συνεργασία μας ήταν εξαιρετική και εποικοδομητική. Ο κ. Ευαγγέλου Άγγελος, καθηγητής Φυσιολογίας, ως διευθυντής του Εργαστηρίου Φυσιολογίας μου

έκανε την τιμή να μου εμπιστευτεί την υποβοήθηση του διδακτικού έργου του εργαστηρίου. Ο κ. Τσελέπης Αλέξανδρος, καθηγητής Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, μου έδωσε την άδεια να πραγματοποιήσω πολλά από τα πειράματα της διατριβής στο εργαστήριό του, με καθοδήγησε και μου αφιέρωσε πολύ από τον χρόνο του. Ο κ. Τσιμιχόδημος Βασίλειος, λέκτορας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, με τον οποίο είχαμε άριστη συνεργασία, έδειξε ιδιαίτερο ενδιαφέρον και με βοήθησε στις διορθώσεις της παρούσας διατριβής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον κ. Θεοδόση Φιλιππάτο, υποψήφιο διδάκτορα και ειδικευόμενο ιατρό της Β' Π/Θ κλινικής για τη βοήθειά του σε πολλαπλά επίπεδα και κυρίως για τη φιλία του. Ευχαριστώ θερμά όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Φυσιολογίας, τους συνεργάτες του Ιατρείου Λιπιδίων και Παχυσαρκίας, παλιούς και νεότερους, για την άριστη συνεργασία, όπως επίσης και τους συνεργάτες του κ. Τσελέπη για τη ζεστή φιλοξενία στο εργαστήριο Βιοχημείας.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου και την αδερφή μου για την ηθική υποστήριξη και συμπαράσταση. Χωρίς αυτούς θα ήταν αδύνατη η ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής.

Χρήστος Δερδεμέζης

Ιωάννινα, Ιούνιος 2011

Πίνακας περιεχομένων

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ	vi
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	3
1.1 Καρδιαγγειακά νοσήματα και αθηροσκλήρωση	3
1.1.1 Καρδιαγγειακά νοσήματα	3
1.1.2 Επιδημιολογία καρδιαγγειακών νοσημάτων στην Ελλάδα	3
1.1.3 Παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου	4
1.1.4 Παθοφυσιολογία της αθηροσκλήρωσης	14
1.2 Παχυσαρκία	19
1.2.1 Ορισμός & επιπτώσεις	19
1.2.2 Αιτιολογία της παχυσαρκίας	21
1.2.3 Παχυσαρκία και καρδιαγγειακή νόσος	25
1.2.4 Μεταβολικό Σύνδρομο	26
1.3 Λιπώδης ιστός και αδιποκίνες	30
1.3.1 Λιποκύτταρο	32
1.3.2 Λιποκυτταρογένεση	33
1.3.3 Μεταβολικές διαδικασίες στο λιποκύτταρο	35
1.3.4 Αδιποκίνες, φλεγμονή και ινσουλινοαντίσταση	37
1.3.5 Λεπτίνη	41
1.3.6 Αντιπονεκτίνη	44
1.3.7 Βισφατίνη	47
1.4 Πολυφαινόλες: φλαβονοειδή & ρεσβερατρόλη	51

1.4.1 Φλαβονοειδή	51
1.4.2 Σύνθεση και ρόλος στα φυτά	54
1.4.3 Μεταβολισμός στον άνθρωπο και σε πειραματόζωα.....	55
1.4.4 Πρόσληψη φλαβονοειδών στον άνθρωπο και σε πειραματόζωα	56
1.4.5 Βιολογικές δράσεις των φλαβονοειδών	58
1.4.6 Φλαβονοειδή και αθηροσκλήρωση.....	59
1.4.7 Ρεσβερατρόλη	64
1.5 Σκοπός της μελέτης	69
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	71
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	73
2.1 Φλαβονοειδή και παχυσαρκία.....	73
2.1.1 Πληθυσμός της μελέτης.....	73
2.1.2 Αναλυτικές μέθοδοι	74
2.1.3 Υπολογισμός πρόσληψης μακροθρεπτικών συστατικών και φλαβονοειδών	77
2.1.4 Έλεγχος διατασιμότητας της αορτής	80
2.2 Διερεύνηση επιπέδων βισφατίνης στο Μεταβολικό Σύνδρομο.....	82
2.2.1 Πληθυσμός της μελέτης.....	82
2.2.2 Μέτρηση βισφατίνης.....	82
2.3 Πειραματική διαδικασία σε ινοβλάστες SGBS	83
2.3.1 Κύτταρα SGBS	83
2.3.2 Αντιδραστήρια - Όργανα	83
2.3.3 Διαλύματα εργασίας	86
2.3.4 Καλλιέργεια ινοβλαστών SGBS	87

2.3.5 Διαφοροποίηση των κυττάρων	87
2.3.6 Ταυτοποίηση των λιποκυττάρων	88
2.3.7 Επίδραση με πολυφαινόλες.....	88
2.3.8 Χρώση με Oil Red O.....	89
2.3.9 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των τριγλυκεριδίων	91
2.3.10 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών	93
2.3.11 Μέτρηση λεπτίνης.....	96
2.3.12 Μέτρηση αντιγονεκτίνης	100
2.3.13 Μέτρηση βισφατίνης.....	103
2.4 Στατιστική ανάλυση	107
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	109
3.1 Εκτίμηση της πρόσληψης φλαβονοειδών σε υπέρβαρους και παχύσαρκους ασθενείς.....	109
3.2 Διατασιμότητα των αγγείων	125
3.3 Βισφατίνη και Μεταβολικό Σύνδρομο	127
3.4 Επίδραση πολυφαινολών σε ανθρώπινα λιποκύτταρα SGBS	130
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	135
4.1 Πληθυσμός.....	135
4.2 Ερωτηματολόγιο συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων.....	136
4.3 Πρόσληψη μακροθρεπτικών συστατικών.....	143
4.4 Πρόσληψη φλαβονοειδών.....	143
4.5 Συσχέτιση της πρόσληψης φλαβονοειδών με κλινικούς και βιοχημικούς δείκτες	150
4.6 Έλεγχος διατασιμότητας της αορτής με μαγνητική τομογραφία.....	157

4.7 Βισφατίνη στο Μεταβολικό Σύνδρομο	161
4.8 Επίδραση των φλαβονοειδών και της ρεσβερατρόλης σε ανθρώπινα λιποκύτταρα SGBS	164
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	171
6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	173
7. SUMMARY	177
8. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ-ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ	179
9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	181

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

AMP k:	AMP-activated protein kinase
Apo:	Απολιποπρωτεΐνη
AST:	Ασπαρτική αμινοτρανσφεράση
BMI:	Body mass index, ΔΜΣ
C/EBP:	CCAAT-enhancer-binding protein
CK:	Κινάση της κρεατίνης
CLS:	Crown-like structure, δομή που ομοιάζει με στέμμα
CRP:	C-αντιδρώσα πρωτεΐνη
ERK:	Extracellular-signal-regulated kinase
FGF:	Fibroblast growth factor
FMD:	flow-mediated dilatation,
GLUT-4:	Glucose transporter type 4
ICAM-1:	Διακυτταρικό μόριο προσκόλλησης-1
IDF:	International diabetes federation
IFN-γ:	Ιντερφερόνη-γ
IL:	Ιντερλευκίνη
IL-1RA:	Ανταγωνιστής του υποδοχέα της ιντερλευκίνης-1
IR:	Υποδοχέας ινσουλίνης (insulin receptor)
IRS-1:	Insulin receptor substrate 1
JAK/STAT:	Janus kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription
ΚΝΣ:	Κεντρικό νευρικό σύστημα
LDH:	Γαλακτική αφυδρογονάση
LDL:	Λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας
Lp(a) :	Απολιποπρωτεΐνη (a)
MCP-1:	Χημειοτακτική πρωτεΐνη-1
NAD:	Νικοτιναμινοδινουκλεοτίδιο
nampt:	Φωσφοριβοσυλτρανσφεράση του νικοτιναμιδίου ή βισφατίνη
NCEP ATP III:	National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III
NF-Κβ:	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NO:	Μονοξείδιο του αζώτου
NOS:	Συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου

p38-MAPK:	P38 mitogen-activated protein kinase
PAI-1:	Plasminogen activator inhibitor-1
PBEF:	Pre-beta colony enhancing factor, παράγοντας αύξησης των αποικιών των πρόιμων Β λεμφοκυττάρων ή nampt ή βισφατίνη
PDGF:	Platelet-derived growth factor
PI3K:	Phosphatidylinositol 3-kinase
PPAR:	Peroxisome proliferator-activated receptor
PWV:	Pulse wave velocity, ταχύτητα σφυγμικού κύματος
RR:	Relative risk, σχετικός κίνδυνος
SGBS:	Σύνδρομο Simpson Golabi Behmel
SREBP:	Sterol Regulatory Element-Binding Protein
TC:	Ολική χοληστερόλη
TG:	Τριγλυκερίδια
TNF-α:	Παράγοντας- α νέκρωσης όγκου
VCAM-1:	Αγγειακό μόριο προσκόλλησης-1
VEGF:	Vascular endothelial growth factor
WC:	Waist circumference, περίμετρος μέσης
WHR:	Περίμετρος μέσης / περίμετρο γοφών
γ-GT:	Γ-γλουταμυλτρανσπεπτιδάση
ΔΜΣ:	Δείκτης μάζας σώματος
ΕΣΚΤ:	Ερωτηματολόγιο συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων
KAN:	Καρδιαγγειακή νόσος
ΜετΣ:	Μεταβολικό σύνδρομο
Π.Ο.Υ. :	Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας
ΣΔ:	Σακχαρώδης διαβήτης

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Καρδιαγγειακά νοσήματα και αθηροσκλήρωση

1.1.1 Καρδιαγγειακά νοσήματα

Τα καρδιαγγειακά νοσήματα αποτελούν την πρώτη αιτία θανάτου παγκοσμίως. Σε αυτά τα νοσήματα περιλαμβάνονται η στεφανιαία νόσος, τα αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια και η περιφερική αγγειοπάθεια. Σύμφωνα με στοιχεία της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας (Π.Ο.Υ), τα καρδιαγγειακά νοσήματα είναι υπεύθυνα για περίπου 18 εκατομμύρια θανάτους ετησίως (το 33% των συνολικών θανάτων) σε παγκόσμια κλίμακα¹. Ο επιπολασμός τους μπορεί να διαφέρει σημαντικά από χώρα σε χώρα. Εκτιμάται όμως ότι ακόμη και σε αναπτυσσόμενες χώρες αποτελούν πλέον την πρώτη αιτία θανάτου. Τα καρδιαγγειακά νοσήματα αποτελούν επίσης μια από τις κύριες αιτίες μακροχρόνιων παθήσεων και παθολογικών καταστάσεων εις βάρος της αγοράς εργασίας. Η οικονομική επιβάρυνση που προκαλούν συνολικά υπολογίζεται σε περίπου 170-190 δις ευρώ ετησίως, που αντιστοιχούν στο 10% περίπου των συνολικών δαπανών υγειονομικής περίθαλψης σε όλη την Ευρωπαϊκή Ένωση¹. Στην Ελλάδα, παρά το γεγονός ότι τα διαγνωστικά και θεραπευτικά μέσα για την αντιμετώπιση των καρδιαγγειακών νοσημάτων έχουν βελτιωθεί σημαντικά, το ποσοστό εμφάνισης τους και οι θάνατοι από αυτά έχουν αυξηθεί σημαντικά τα τελευταία 30 χρόνια.

1.1.2 Επιδημιολογία καρδιαγγειακών νοσημάτων στην Ελλάδα

Η προσαρμοσμένη ανά ηλικία θνητότητα από καρδιαγγειακά νοσήματα κατά τη δεκαετία του 1960 στην Ελλάδα ήταν η χαμηλότερη στην Ευρώπη². Για παράδειγμα, η επίπτωση του εμφράγματος του μυοκαρδίου ήταν μόλις 0.3% σε άνδρες ηλικίας 40–59 ετών. Τα δεδομένα, με τη μεταστροφή στο Δυτικό τρόπο ζωής άλλαξαν δραματικά: Η

παραδοσιακή Μεσογειακή διατροφή εγκαταλείφθηκε, η σωματική δραστηριότητα αντικαταστάθηκε από καθιστική ζωή, το ήδη υψηλό ποσοστό καπνίσματος αυξήθηκε περαιτέρω και η παχυσαρκία και ο σακχαρώδης διαβήτης αποτελούν πια μείζονα δημόσια προβλήματα υγείας. Ήδη από τις αρχές της δεκαετίας του 1980³ αλλά και σε πιο πρόσφατες μελέτες⁴⁻⁶, τα δεδομένα συγκλίνουν στην υψηλή θνητότητα από καρδιαγγειακά νοσήματα, ιδιαίτερα στεφανιαία νόσο, τα οποία ευθύνονται συνολικά στην Ελλάδα για περισσότερο από το 50% περίπου των θανάτων ετησίως. Κατά τη χρονική περίοδο 1956-2007, τα καρδιαγγειακά νοσήματα αυξήθηκαν κατά 38% στους άνδρες⁶. Η θνησιμότητα παρουσίασε διαχρονικά σημαντική αύξηση μέχρι τα μέσα της δεκαετίας του 1980 και στη συνέχεια παρατηρήθηκε μικρή μείωση. Όμως, ο επιπολασμός του εμφράγματος του μυοκαρδίου τετραπλασιάστηκε από τις αρχές του 1980 έως το 2006 (από 1,08% στο 4,2%). Η μείωση είναι μεγαλύτερη όσον αφορά τη θνησιμότητα από παθήσεις των εγκεφαλικών αγγείων, ενώ η θνησιμότητα από ισχαιμική καρδιοπάθεια φαίνεται διαχρονικά περισσότερο σταθερή, με τάσεις μείωσης μόλις τα τελευταία χρόνια. Διαπιστώνεται επίσης η ύπαρξη υψηλής θνησιμότητας από ισχαιμική καρδιοπάθεια στις ηλικίες 45-59 ετών, καθώς και σημαντική θνησιμότητα από την ίδια νόσο στην ηλικία των 30-44 ετών. Εάν επικεντρωθούμε μόνο στις ηλικίες κάτω των 65 ετών η Ελλάδα το 2004 παρουσίασε την υψηλότερη θνησιμότητα από ισχαιμική καρδιοπάθεια στη Δυτική Ευρώπη, διπλάσια από την αντίστοιχη των μεσογειακών και των περισσότερων άλλων δυτικοευρωπαϊκών χωρών.

1.1.3 Παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου.

Η αιτιολογία της καρδιαγγειακής νόσου (ΚΑΝ) είναι πολυπαραγοντική. Επιδημιολογικές και κλινικές μελέτες έχουν προσδιορίσει διάφορους παράγοντες που επηρεάζουν την εμφάνισή της, οι οποίοι διακρίνονται σε τροποποιήσιμους και σε μη

τροποποιήσιμους. Τα τελευταία χρόνια έχουν προταθεί αρκετοί νέοι παράγοντες κινδύνου, των οποίων η συμβολή δεν έχει απόλυτα τεκμηριωθεί. Κλασσικοί παράγοντες κινδύνου θεωρούνται οι παρακάτω:

Μη τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου

- **Ηλικία:** Ο κίνδυνος ΚΑΝ αυξάνει σημαντικά με την αύξηση της ηλικίας, πιθανά λόγω της έκθεσης σε άλλους παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με την ηλικία, αλλά λόγω και της φυσιολογικής φθοράς του ανθρώπινου οργανισμού. Στις κατευθυντήριες οδηγίες της Εθνικής επιτροπής των ΗΠΑ για τη χοληστερόλη (National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III, NCEP ATP III), η ηλικία άνω των 45 ετών στους άντρες και των 55 στις γυναίκες θεωρείται μείζων καρδιαγγειακός παράγοντας κινδύνου⁷.
- **Φύλο:** Η εμφάνιση στεφανιαίας νόσου στις γυναίκες περίπου κατά 10 έτη αργότερα σε σύγκριση με τους άντρες, οφείλεται κυρίως στην προστατευτική δράση των οιστρογόνων, γεγονός που εξηγεί την αύξηση των συμβαμάτων μετά την εμμηνόπαυση, καθώς επίσης και με τη διαφορετική επίδραση άλλων παραγόντων κινδύνου που συνυπάρχουν στα 2 φύλα.
- **Οικογενειακό ιστορικό:** Το γενετικό υλικό καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την πιθανότητα εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου. Ιστορικό συγγενή πρώτου βαθμού με στεφανιαία νόσο που εκδηλώθηκε σε ηλικία μικρότερη των 55 για άνδρα και 65 ετών για γυναίκα αυξάνει την πιθανότητα εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου⁷.
- **Φυλή-εθνικότητα:** Σύμφωνα με επιδημιολογικές μελέτες υπάρχουν πληθυσμοί που έχουν υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης ΚΑΝ, ένα γεγονός που αποδίδεται αφενός στο διαφορετικό γενετικό υλικό που καθιστά περισσότερο ευάλωτες ορισμένες φυλές,

αφετέρου σε διαφορές που αφορούν κοινωνικο-οικονομικές συνθήκες, τον τρόπο ζωής και τις συνθήκες ιατρικής περίθαλψης⁸.

Τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου

- **Κάπνισμα:** Είναι από τους σημαντικότερους τροποποιήσιμους παράγοντες κινδύνου για ΚΑΝ, αλλά και για τη συνολική θνησιμότητα γενικότερα. Ο κίνδυνος προσβολής από στεφανιαία νόσο στους καπνιστές είναι περίπου 2-3 φορές υψηλότερος σε σύγκριση με τους μη καπνιστές. Το κάπνισμα ευθύνεται για το 1/5 των καρδιαγγειακών συμβαμάτων σε παγκόσμια κλίμακα και για το 30-40% του συνόλου των θανάτων από καρδιαγγειακή νόσο. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης «INTERHEART», υπολογίσθηκε ότι το 30% των εμφραγμάτων στη Ευρώπη οφείλονται στο κάπνισμα⁹. Η χρήση καπνού με οποιοδήποτε τρόπο, καθώς και το παθητικό κάπνισμα, συμπεριλαμβάνονται στους παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου¹⁰. Εκτιμάται ότι το 51% περίπου των Ελλήνων ανδρών και το 39% των Ελληνίδων είναι καπνιστές¹¹. Δυστυχώς, στην Ελλάδα η πολιτική υγείας όσον αφορά την πρόληψη του καπνίσματος και τις προσπάθειες διακοπής του¹² είναι ακόμη ανεπαρκής, όπως καταδεικνύεται και από την αναποτελεσματική εφαρμογή του πρόσφατου αντικαπνιστικού νόμου του 2010.
- **Αρτηριακή υπέρταση:** Ως αρτηριακή υπέρταση ορίζεται η αύξηση της συστολικής αρτηριακής πίεσης πάνω από 140 mmHg και/ή η αύξηση της διαστολικής αρτηριακής πίεσης πάνω από 90 mmHg. Η αρτηριακή υπέρταση αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα αίτια νοσηρότητας και θνητότητας, αφού ευθύνεται για 7 εκατομμύρια πρόωρους θανάτους ετησίως, καθώς και για 64 εκατομμύρια χαμένα έτη ζωής από πρόωρο θάνατο ή ανικανότητα. Επίσης, αποτελεί μείζονα παράγοντα κινδύνου για αγγειακή εγκεφαλική νόσο, στεφανιαία νόσο, καρδιακή και νεφρική

ανεπάρκεια και ευθύνεται για το 50% των καρδιαγγειακών νοσημάτων παγκοσμίως. Συγκεκριμένα, ο κίνδυνος εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων διπλασιάζεται για κάθε κατά 10 mmHg αύξηση της διαστολικής αρτηριακής πίεσης ή για κάθε κατά 20 mmHg αύξηση της συστολικής αρτηριακής πίεσης. Πληθυσμιακές μελέτες στον ευρωπαϊκό χώρο καταδεικνύουν ότι ασθενείς με υπέρταση διατρέχουν διπλάσιο κίνδυνο για την εμφάνιση ΚΑΝ, σε σύγκριση με τα νορμοτασικά άτομα¹³. Υπολογίζεται ότι περισσότερο από το 50% των καρδιαγγειακών επεισοδίων και περίπου το 75% των αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων οφείλονται στην αρτηριακή υπέρταση. Η Π.Ο.Υ εκτιμά ότι 600 εκατομμύρια άνθρωποι παγκοσμίως πάσχουν από υπέρταση¹⁴. Στην Ελλάδα, το ποσοστό του ενήλικου πληθυσμού με αρτηριακή υπέρταση ανέρχεται στο 40% περίπου^{14, 15}.

- **Δυσλιπιδαιμία:** Η δυσλιπιδαιμία ορίζεται ως ποιοτική ή ποσοτική διαταραχή των λιπιδίων του πλάσματος. Η λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (LDL) συμμετέχει στην αθηρωματική διαδικασία στο τοίχωμα των αγγείων και έτσι αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης εμφράγματος του μυοκαρδίου και ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου. Η λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας (HDL) αντιθέτως έχει αντιαθηρογόνες ιδιότητες. Σύμφωνα με τη μελέτη Framingham και άλλες επιδημιολογικές μελέτες, αυξημένα επίπεδα ολικής και LDL χοληστερόλης και χαμηλά επίπεδα HDL χοληστερόλης αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης ΚΑΝ. Η θετική συσχέτιση μεταξύ καρδιαγγειακού κινδύνου και δυσλιπιδαιμίας διαπιστώνεται από το γεγονός ότι αύξηση κατά 10% της ολικής χοληστερόλης στον ορό του αίματος προκαλεί αύξηση κατά 27% της επίπτωσης της στεφανιαίας νόσου¹⁶. Αντιθέτως, μείωση της ολικής χοληστερόλης κατά 10% συσχετίζεται με μείωση του κινδύνου εμφάνισης στεφανιαίας νόσου κατά 25% μετά από 5 έτη, ενώ μείωση της LDL κατά 40mg/dl συνοδεύεται από μείωση του κινδύνου εμφάνισης στεφανιαίας νόσου κατά

23%, εγκεφαλικού αγγειακού επεισοδίου κατά 19% και επίπτωσης καρδιαγγειακής νόσου κατά 21%¹⁷. Στην Ελλάδα, σε αντίθεση με την τάση μείωσης σε άλλες χώρες, η συχνότητα της υπερχοληστερολαιμίας τα τελευταία 40 χρόνια έχει αυξηθεί⁶. Χαρακτηριστικά, το 46% των ανδρών και το 40% των γυναικών ηλικίας άνω των 18 έχουν υψηλά επίπεδα χοληστερόλης (>200 mg/dl) στην περιοχή της Αττικής¹⁸, ενώ εκτιμάται ότι περισσότερο από 3 εκατομμύρια Έλληνες εμφανίζουν υπερχοληστερολαιμία¹⁸.

- **Σακχαρώδης διαβήτης:** Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου και αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου, ενώ αποτελεί το συχνότερο αίτιο ακρωτηριασμών των κάτω άκρων μη τραυματικής αιτιολογίας. Πληθυσμιακές μελέτες έχουν δείξει ότι τα άτομα που πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη διατρέχουν τριπλάσιο κίνδυνο να προσβληθούν από ισχαιμική καρδιοπάθεια, σε σύγκριση με τα νορμογλυκαιμικά άτομα¹³. Ο σακχαρώδης διαβήτης δρα συνεργικά και πολλαπλασιάζει τη δυσμενή επίδραση των υπολοίπων παραγόντων κινδύνου, όπως της δυσλιπιδαιμίας, της αρτηριακής υπέρτασης, του καπνίσματος και της παχυσαρκίας και πλέον θεωρείται ως ισοδύναμο στεφανιαίας νόσου. Ο πληθυσμός σε παγκόσμια κλίμακα με σακχαρώδη διαβήτη υπερβαίνει τα 280 εκατομμύρια¹⁹. Η επίπτωση της νόσου είναι μεγαλύτερη στις αναπτυσσόμενες χώρες με αυξανόμενη τάση σχεδόν σε όλες τις χώρες της Ευρώπης. Με την αλλαγή του τρόπου ζωής, τη βιομηχανοποίηση και την αστικοποίηση, η εμφάνιση σακχαρώδη διαβήτη έχει αρχίσει να παίρνει μορφή επιδημίας και στον αναπτυσσόμενο κόσμο¹⁹. Ο επιπολασμός του σακχαρώδη διαβήτη υπολογίζεται στην Ελλάδα μεταξύ 8 και 10 %, με τα ποσοστά να είναι υψηλότερα σε ηλικίες άνω των 45 ετών^{11, 20}. Η αλλαγή του τρόπου ζωής, καθώς και η έλλειψη σωματικής άσκησης έχουν οδηγήσει σε αύξηση

της επίπτωσης της νόσου ήδη από την παιδική ηλικία. Ο σακχαρώδης διαβήτης όχι μόνο αποτελεί παράγοντα κινδύνου για καρδιαγγειακά νοσήματα, αλλά δρα συνεργικά και ενισχύει τη δυσμενή επίδραση των υπολοίπων παραγόντων κινδύνου, όπως της δυσλιπιδαιμίας, της αρτηριακής υπέρτασης, του καπνίσματος και της παχυσαρκίας.

- **Παχυσαρκία:** Η παχυσαρκία μπορεί να ορισθεί ως νόσος με παθολογικά αυξημένη εναπόθεση λίπους στο ανθρώπινο σώμα. Είναι ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων^{13, 21}: Τα παχύσαρκα άτομα διατρέχουν διπλάσιο κίνδυνο εμφάνισης εμφράγματος του μυοκαρδίου^{13, 21}. Αξίζει να σημειωθεί, ότι ακόμη και μια μικρή αύξηση της μέσης τιμής του δείκτη μάζας σώματος σε πληθυσμιακό επίπεδο μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική αύξηση της νοσηρότητας²².²³. Οι ευρύτερα χρησιμοποιούμενοι δείκτες εκτίμησης της παχυσαρκίας είναι η περίμετρος της μέσης και ο δείκτης μάζας σώματος (ΔΜΣ ή BMI) = $\text{σωματικό βάρος(kgr)} / \text{ύψος(m)}^2$, ο οποίος χρησιμοποιείται κυρίως για την ταξινόμηση των υπέρβαρων και παχύσαρκων ατόμων: Άτομο με ΔΜΣ από 18,5 έως <25 kg/m² θεωρείται φυσιολογικό, άτομο με ΔΜΣ>25 kg/m² θεωρείται υπέρβαρο και άτομο με ΔΜΣ>30 kg/m² θεωρείται παχύσαρκο. Με βάση τα στοιχεία που προκύπτουν από μελέτες και στατιστικά στοιχεία της Π.Ο.Υ, οι άνθρωποι του πλανήτη γίνονται ολοένα πιο παχύσαρκοι: Πάνω από 1 δισεκατομμύριο άτομα είναι υπέρβαροι, από τους οποίους 300 εκατομμύρια είναι παχύσαρκοι. Στην Ελλάδα, ο επιπολασμός της παχυσαρκίας στο γενικό πληθυσμό βρίσκεται πλέον στα υψηλότερα επίπεδα μεταξύ των χωρών της Δυτικής Ευρώπης. Στους άνδρες ανέρχεται στο 20-26%, το οποίο αποτελεί την υψηλότερη τιμή, ενώ στις γυναίκες το 15-18%, η οποία είναι η δεύτερη υψηλότερη μεταξύ των γυναικών^{24, 25}. Πρέπει επίσης να επισημανθεί ότι η παχυσαρκία συνδέεται με σακχαρώδη διαβήτη, δυσλιπιδαιμία και αρτηριακή

υπέρταση, καταστάσεις οι οποίες αποτελούν ανεξάρτητους παράγοντες κινδύνου καρδιαγγειακής νόσου. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με την έκταση του φαινομένου παγκοσμίως, καθιστά την παχυσαρκία πολύ πιο σημαντικό παράγοντα κινδύνου από ότι εθεωρείτο μέχρι σήμερα.

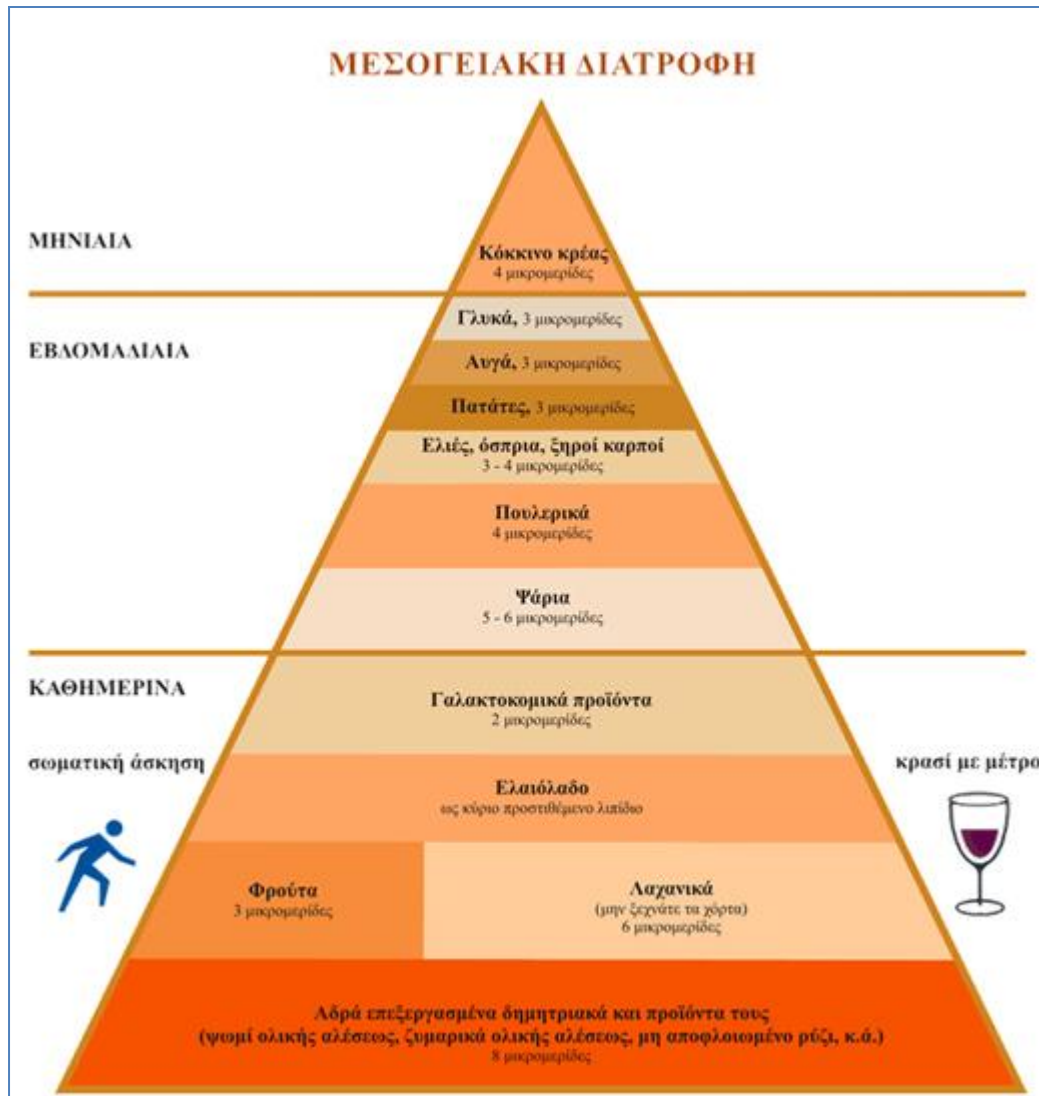
- **Έλλειψη σωματικής δραστηριότητας:** Η σωματική δραστηριότητα και κυρίως η άσκηση έχουν καταγραφεί ως καρδιοπροστατευτικοί παράγοντες, ενώ η έλλειψη σωματικής δραστηριότητας σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου²⁶. Υπολογίζεται ότι η συστηματική σωματική δραστηριότητα μειώνει τον κίνδυνο ΚΑΝ κατά 30 έως 50 %, ανεξάρτητα από άλλους παράγοντες κινδύνου, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης, η παχυσαρκία και η υπέρταση. Επιπρόσθετα οφέλη από τη σωματική δραστηριότητα είναι η μείωση του άγχους καθώς και η βελτίωση του λιπιδαιμικού προφίλ και της λειτουργίας του ενδοθηλίου. Η βιομηχανοποίηση, η αστικοποίηση και η ευρεία χρήση των μηχανοκίνητων μέσων μεταφοράς έχουν οδηγήσει σε ελάττωση της σωματικής δραστηριότητας, ακόμη και στις αναπτυσσόμενες χώρες, σε τέτοιο βαθμό ώστε πλέον η πλειοψηφία του πληθυσμού παγκοσμίως να μην ασκείται επαρκώς. Σε παγκόσμια κλίμακα η έλλειψη σωματικής δραστηριότητας ευθύνεται για 1,9 εκατομμύρια θανάτους εκ των οποίων το 20% αποδίδεται σε καρδιαγγειακά νοσήματα. Στην Ελλάδα, το ποσοστό του πληθυσμού που στερείται άσκησης και έχει καθιστική ζωή υπερβαίνει το 50%²⁷.
- **Διατροφή:** Οι διατροφικές συνήθειες έχουν σημαντική επίδραση στον καρδιαγγειακό κίνδυνο. Αυτή η παραδοχή είναι ευρύτατα αποδεκτή από τη δεκαετία του 1960, όταν δημοσιεύτηκε η μελέτη των 7 χωρών (7 Countries Study), στην οποία μελετήθηκε για πρώτη φορά η σχέση ανάμεσα στον τρόπο ζωής, τη διατροφή και τα καρδιαγγειακά

νοσήματα σε διάφορες χώρες. Ακολούθησαν και άλλες προοπτικές μελέτες καθώς και κλινικές δοκιμές που κατέδειξαν τον ουσιαστικό ρόλο της διατροφής στην πρόληψη της ΚΑΝ, τόσο την πρωτογενή όσο και τη δευτερογενή πρόληψη²⁸⁻³⁴. Υψηλή πρόσληψη πρωτεϊνών ζωικής προέλευσης³⁵, κορεσμένων³⁶ και trans λιπαρών οξέων³⁷, απλών κατεργασμένων υδατανθράκων³⁸ και άλατος^{39, 40} αυξάνει την πιθανότητα εμφάνισης στεφανιαίας νόσου και εγκεφαλικού επεισοδίου. Αντίθετα, προστατευτική επίδραση έχει η κατανάλωση λιπαρών ψαριών⁴¹ και ω-3 λιπαρών οξέων, μονοακόρεστων λιπαρών οξέων (κυρίως ελαιόλαδο), καθώς και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων⁴², φυτικών ινών από αδρά επεξεργασμένα δημητριακά⁴³, φρούτων, λαχανικών^{44, 45}, οσπρίων και η μέτρια κατανάλωση οινοπνεύματος³⁶. Η διατροφή επηρεάζει τον καρδιαγγειακό κίνδυνο είτε έμμεσα μέσω της επίδρασης σε άλλους παράγοντες κινδύνου, όπως το λιπιδαιμικό προφίλ και η υπέρταση, είτε άμεσα. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το Μεσογειακό μοντέλο διατροφής. Στη διεθνή βιβλιογραφία συνήθως όταν χρησιμοποιείται ο όρος «Μεσογειακή διατροφή» γίνεται αναφορά στην παραδοσιακή Κρητική διατροφή του 1960-70, η οποία έχει τα εξής χαρακτηριστικά⁴⁶:

- Υψηλό λόγο μονοακόρεστων/κορεσμένα λιπαρά οξέα, με το ελαιόλαδο να αποτελεί το βασικό μαγειρικό λίπος.
- Μέτρια κατανάλωση οινοπνεύματος, κυρίως κόκκινου κρασιού που συνοδεύει τα γεύματα.
- Υψηλή πρόσληψη οσπρίων και ξηρών καρπών
- Υψηλή πρόσληψη δημητριακών συμπεριλαμβανομένου του ψωμιού
- Υψηλή πρόσληψη φρούτων και λαχανικών
- Κατανάλωση κόκκινου κρέατος σπάνια
- Μέτρια πρόσληψη γάλακτος και γαλακτοκομικών.

Στην εικόνα 1.1 φαίνεται η πυραμίδα της Μεσογειακής Διατροφής όπως διαμορφώθηκε από τις οδηγίες του Ανώτατου Ειδικού Επιστημονικού Συμβουλίου Υγείας.

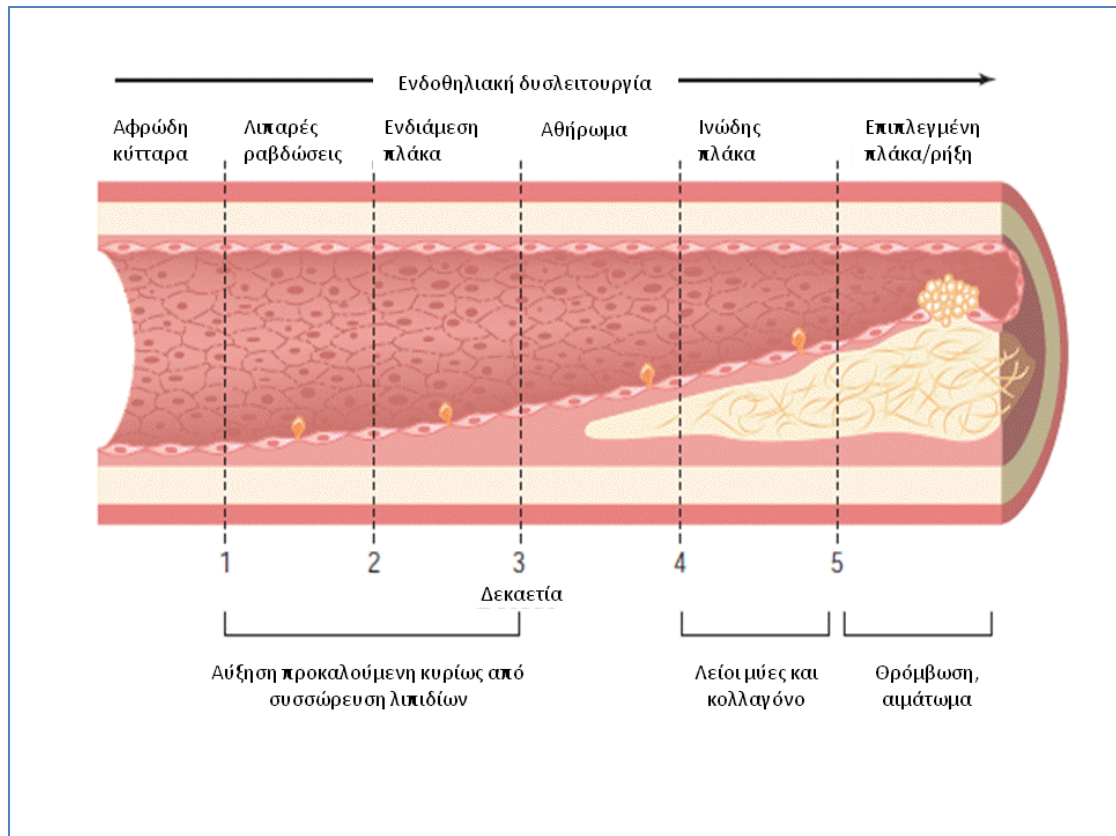
Πρόκειται για ένα διατροφικό μοντέλο που περικλείει όλα τα ευεργετικά στοιχεία που αναφέρθηκαν παραπάνω. Τα οφέλη από τη συμμόρφωση στη Μεσογειακή διατροφή στην επιβίωση, αλλά και στην πρόληψη των καρδιαγγειακών νοσημάτων είναι σημαντικά^{29, 47-49}. Εξαιτίας των αλλαγών στον τρόπο ζωής στη χώρα μας τα τελευταία 40 χρόνια, σημειώθηκε διαφοροποίηση στην ποιοτική σύνθεση της θερμιδικής πρόσληψης. Αυτή η διαφοροποίηση είχε ως συνέπεια την απομάκρυνση από το πρότυπο της Μεσογειακής διατροφής και την υιοθέτηση ενός Δυτικού τρόπου διατροφής που προάγει την παχυσαρκία, το διαβήτη, την υπέρταση και την καρδιαγγειακή νόσο⁵⁰.



Εικόνα 1.1 Πυραμίδα της Μεσογειακής Διατροφής (Πηγή: Ανώτατο Ειδικό Επιστημονικό Συμβούλιο Υγείας)

1.1.4 Παθοφυσιολογία της αθηροσκλήρωσης

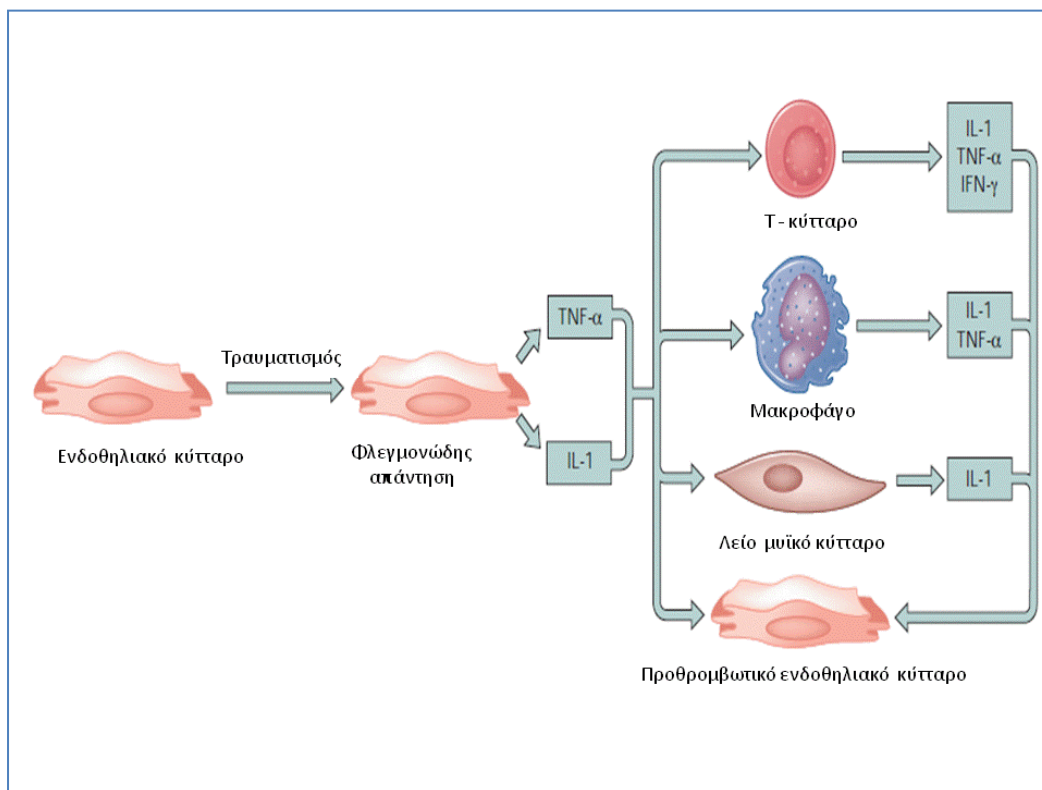
Η καρδιαγγειακή νόσος επηρεάζει τα στεφανιαία, τα εγκεφαλικά ή περιφερικά αγγεία και έχει ως βασικό παθοφυσιολογικό μηχανισμό την αθηροσκλήρωση. Η τελευταία θα μπορούσε αυστηρά να οριστεί ως νόσος πάχυνσης του έσω χιτώνα του αρτηριακού τοιχώματος, με αποτέλεσμα στένωση του αυλού και παρεμπόδιση της αιματικής ροής. Όμως, το απλοϊκό μοντέλο του αθηρώματος με τη συσσώρευση και εναπόθεση λίπους στα τοιχώματα εξαιτίας της υπερχοληστερολαιμίας θεωρείται πλέον ξεπερασμένο. Η αθηροσκλήρωση θεωρείται μία πολύπλοκη φλεγμονώδης διαδικασία η έναρξη της οποίας άρχεται από την εμβρυική ακόμη ηλικία και εξελίσσεται διαρκώς σε όλη τη διάρκεια της ζωής (Εικόνα 1.2). Η φυσική πορεία του αθηρώματος αρχίζει με σημείο αναφοράς το ενδοθήλιο, ενώ κομβικής σημασίας θεωρείται η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία. Η τελευταία χαρακτηρίζεται κύρια από μειωμένη παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO) και αύξηση των αγγειοσυσταλτικών και χημειοτακτικών παραγόντων από το ίδιο το ενδοθήλιο, με αποτέλεσμα διαταραχή της ενδοθηλιοεξαρτώμενης αγγειοδιαστολής. Επιπρόσθετο χαρακτηριστικό της νόσου είναι η ενεργοποίηση μηχανισμών που ευοδώνουν τη φλεγμονή, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη διαδικασία της θρόμβωσης. Πιθανές αιτίες της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας θεωρούνται τα αυξημένα επίπεδα της LDL χοληστερόλης, το οξειδωτικό στρες, οι ελεύθερες ρίζες από το κάπνισμα, η αρτηριακή υπέρταση, ο σακχαρώδης διαβήτης, η λοίμωξη από παθογόνους μικροοργανισμούς κλπ.



Εικόνα 1.2. Η χρονική εξέλιξη της αθηροσκληρωτικής διαδικασίας (προσαρμοσμένο από Grundy, Άτλας Αθηροσκλήρωσης).

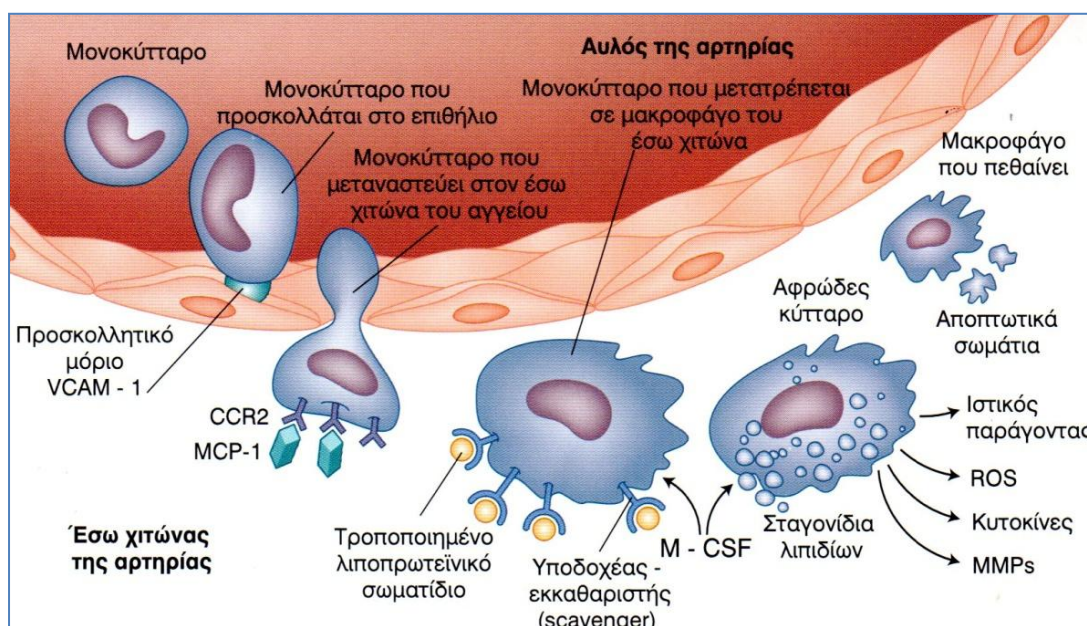
Τα ενδοθηλιακά κύτταρα που υπόκεινται σε βλάβες παράγουν και εκκρίνουν μόρια προσκόλλησης και φλεγμονώδεις κυτταροκίνες (Εικόνα 1.3). Έτσι, διαταράσσεται ο έλεγχος του αγγειακού τόνου και η ομοιοστατική ισορροπία μεταξύ θρόμβωσης και ινωδόλυσης. Επίσης, προσελκύονται στο σημείο της βλάβης λευκοκύτταρα, κυρίως μακροφάγα και T λεμφοκύτταρα. Αυτή η στρατολόγηση επιτυγχάνεται με την έκφραση μορίων προσκόλλησης, όπως το διακυτταρικό μόριο προσκόλλησης-1 (ICAM-1), το αγγειακό μόριο προσκόλλησης-1 (VCAM-1) και με την απελευθέρωση χημειοτακτικών ουσιών, όπως η χημειοτακτική πρωτεΐνη-1 (MCP-1). Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος εισέρχονται στον υπενδοθηλιακό χώρο (Εικόνα 1.4). Στην ίδια περιοχή παγιδεύονται λιποπρωτεΐνες, κυρίως LDL σωματίδια, τα οποία υπόκεινται σε οξείδωση

και γλυκοζυλίωση. Τα μονοκύτταρα προσλαμβάνουν αυτά τα σωματίδια μέσω ειδικών μεμβρανικών υποδοχέων και τα υποβάλλουν σε περαιτέρω οξειδωτική τροποποίηση. Με αυτό τον τρόπο, τα μονοκύτταρα ενεργοποιούνται σε μακροφάγα και τελικά να μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα. Τα ενεργοποιημένα αφρώδη κύτταρα «στρατολογούν» λεία μυϊκά κύτταρα στην περιοχή. Τα T-λεμφοκύτταρα συμμετέχουν σε αυτή τη διαδικασία, τόσο ενεργοποιώντας περαιτέρω τα μακροφάγα, όσο και τα λεία μυϊκά κύτταρα. Έτσι δημιουργείται ένας νεκρωτικός πυρήνας από αφρώδη και λεία μυϊκά κύτταρα, εξωκυττάριο λίπος και θραύσματα (Εικόνα 1.5α). Στη συνέχεια, παρατηρείται αύξηση του τοιχώματος του μέσου χιτώνα του αγγείου και προάγεται περαιτέρω η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία. Ταυτόχρονα, η προεκβολή του λιπιδιακού νεκρωτικού πυρήνα προς τον αυλό του αγγείου έχει ως αποτέλεσμα τη μείωσή του.

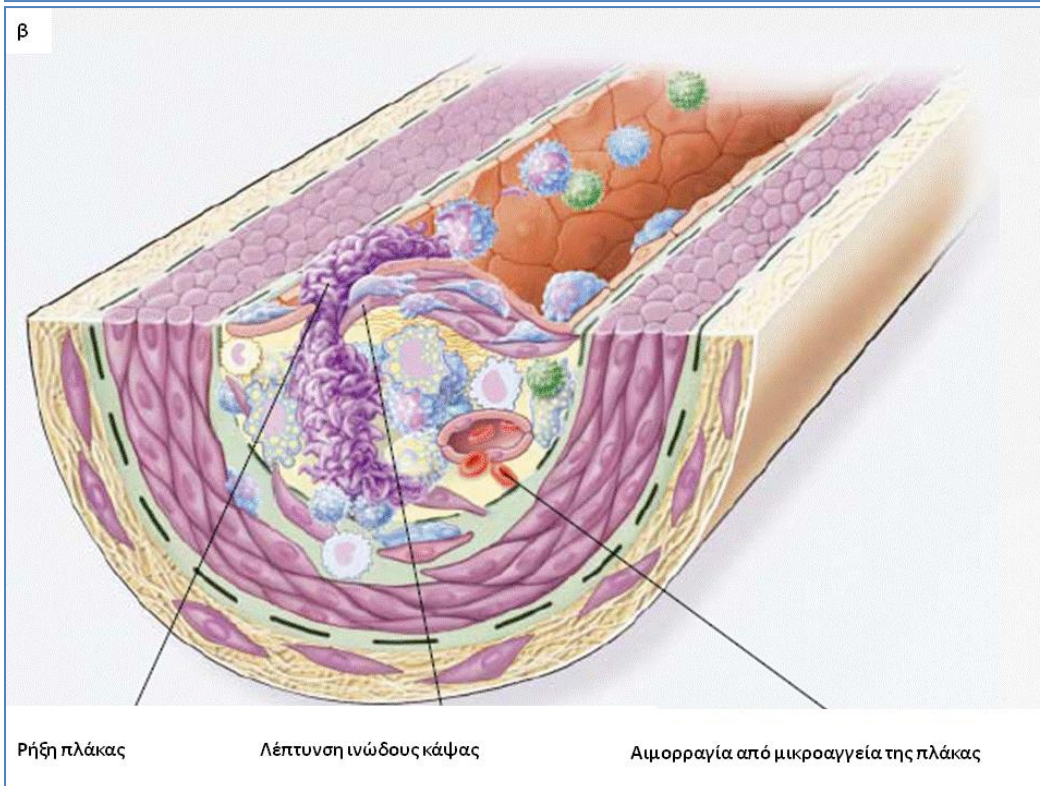
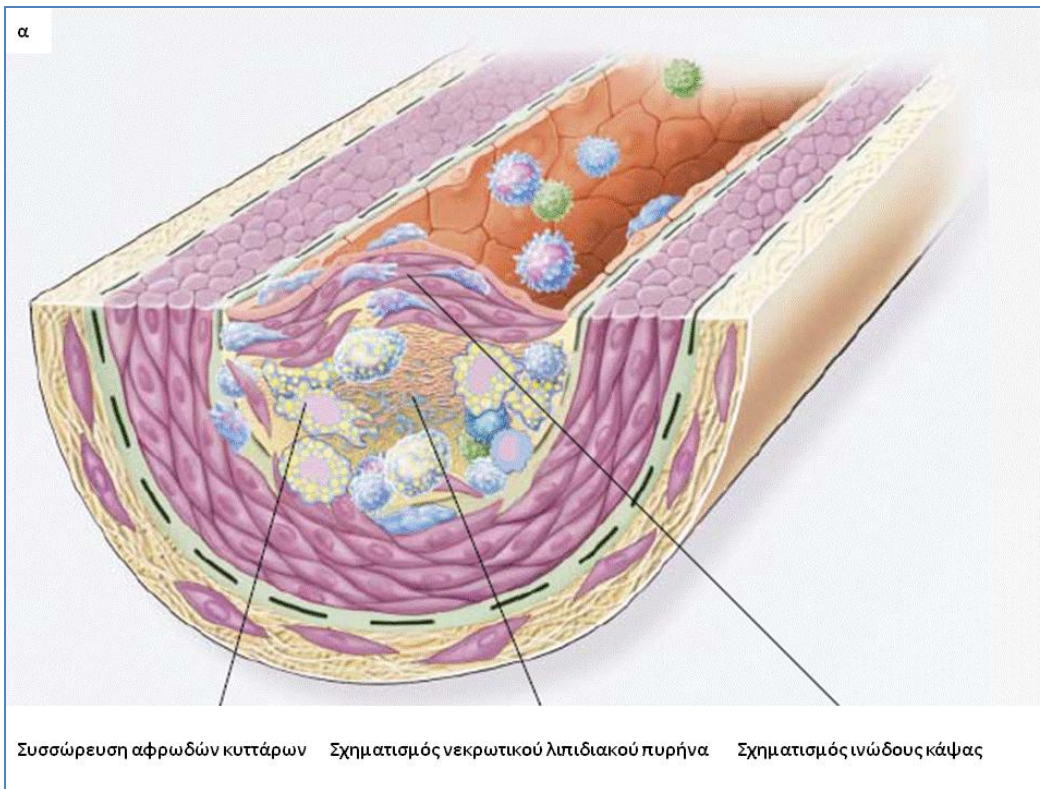


Εικόνα 1.3. Συμμετοχή των ενδοθηλιακών κυττάρων στη διαδικασία της αθηροσκλήρωσης. TNF- α , παράγοντας α νέκρωσης όγκων; IL-1, ιντερλευκίνη-1; IFN- γ , ιντερφερόνη- γ ; (προσαρμοσμένο από Grundy, Άτλας Αθηροσκλήρωσης).

Η διαδοχική αυτή σειρά γεγονότων οδηγεί σε θετική ανατροφοδότηση και περαιτέρω εξέλιξη του αθηρώματος. Η στένωση που δημιουργείται επηρεάζει την αιματική ροή, αλλά επηρεάζεται και από αυτή. Πράγματι, η μορφή της στένωσης του ίδιου του αγγείου έχει διαπιστωθεί ότι μπορεί να τροποποιήσει τη σύνθεση της πλάκας, τον αγγειακό τόνο και την τοπική διατμηματική τάση, καθιστώντας την πλάκα πιο ευάλωτη. Στην κορυφή της βλάβης δημιουργείται ινώδης κάψα που μπορεί να διαρραγεί κάτω υπό προϋποθέσεις. Το τελικό στάδιο είναι η δημιουργία θρόμβου που οφείλεται στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και των παραγόντων πήξης (Εικόνα 1.5β). Με αυτό τον τρόπο προκαλείται ένα μείζον καρδιαγγειακό σύμβαμα ή ακόμα και ο θάνατος.



Εικόνα 1.4. Συμμετοχή των μακροφάγων στη διαδικασία της αθηρογένεσης (προσαρμοσμένο από Libby και συνεργάτες⁵¹).



Εικόνα 1.5.α. Δημιουργία νεκρωτικού πυρήνα λιπιδίων και ινώδους κάψας **1.5.β.** Ρήξη επιπλεγμένης αθηρωματικής πλάκας και δημιουργία θρόμβου (προσαρμοσμένο από ⁵²)

1.1 Παχυσαρκία

1.2.1 Ορισμός & επιπτώσεις

Όπως ήδη αναφέρθηκε στο 1^ο κεφάλαιο, η παχυσαρκία αποτελεί νόσο που έχει λάβει παγκόσμια επιδημικές διαστάσεις τις τελευταίες δεκαετίες. Πρόκειται για νόσο σύνθετης αιτιολογίας, στην οποία το γενετικό υπόβαθρο και το περιβάλλον συνδυάζονται και με περίπλοκους μηχανισμούς που δεν είναι απόλυτα κατανοητοί με αποτέλεσμα την εμφάνιση συγκεκριμένων φαινοτύπων, με κοινό χαρακτηριστικό το αυξημένο σωματικό βάρος. Με βάση τον ορισμό της Π.Ο.Υ., η παχυσαρκία είναι η μη φυσιολογική – πλεονάζουσα εναπόθεση λίπους στο σώμα σε βαθμό που διαταράσσει την υγεία του ατόμου. Η διάγνωση της παχυσαρκίας τίθεται με τον υπολογισμό του ΔΜΣ (Πίνακας 1.1). Όταν ο ΔΜΣ είναι από 30 έως 35 kg/m² υπάρχει παχυσαρκία πρώτου βαθμού, όταν ο ΔΜΣ είναι από 35 έως 40 kg/m² υπάρχει παχυσαρκία δεύτερου βαθμού και πάνω από 40 kg/m² παχυσαρκία τρίτου βαθμού ή νοσογόνος παχυσαρκία. Πέραν του ΔΜΣ, ένα σημαντικό διαγνωστικό εργαλείο για τη διάγνωση της παχυσαρκίας είναι η μέτρηση της περιμέτρου της μέσης (waist circumference, WC): Τα 102 εκατοστά για τους άντρες και τα 88 εκατοστά για τις γυναίκες είναι τα κριτήρια για τον προσδιορισμό της κοιλιακής παχυσαρκίας.

Πίνακας 1.1: Κατηγορίες της παχυσαρκίας σύμφωνα με την Π.Ο.Υ.

	BMI (kg/m²)
Μειωμένο σωματικό βάρος	
Σοβαρή υποθρεψία	<16
Μετρίου βαθμού υποθρεψία	16 – 16.9
Ήπιου βαθμού υποθρεψία	17 – 18.49
Φυσιολογικό σωματικό βάρος	18.5 – 24.9
Υπέρβαροι ασθενείς	25 – 29.9
Παχυσαρκία	≥30

Παχυσαρκία 1 ^{ου} βαθμού	30 – 34.9
Παχυσαρκία 2 ^{ου} βαθμού	34.9 - 39.9
Παχυσαρκία 3 ^{ου} βαθμού	≥40

Πηγή: Π.Ο.Υ. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation. WHO Technical Report Series 894. Geneva: World Health Organization, 2000. http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_894.pdf

Επιδημιολογικές μελέτες έδειξαν ότι η παχυσαρκία σχετίζεται με πολλά προβλήματα υγείας και μειώνει σημαντικά το προσδόκιμο ζωής(Πίνακας 1.2). Πράγματι, η παχυσαρκία αυξάνει την πιθανότητα εμφάνισης χολολιθίασης, οστεοαρθρίτιδας, άσθματος, υπνικής άπνοιας, ψυχιατρικών διαταραχών και κάποιων μορφών καρκίνου. Επιπλέον, η παχυσαρκία συνδέεται με την εμφάνιση αντίστασης στη δράση της ινσουλίνης, σακχαρώδη διαβήτη, δυσλιπιδαιμίας και αρτηριακής υπέρτασης, δηλαδή με τους πιο σημαντικούς παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση της καρδιαγγειακής νόσου, ενώ φαίνεται ότι η ίδια η αύξηση του σωματικού βάρους αυξάνει την πιθανότητα ΚΑΝ ανεξάρτητα από τους υπάρχοντες παράγοντες κινδύνου. Στις επιπτώσεις της παχυσαρκίας πρέπει να συμπεριληφθούν τόσο το κοινωνικό στίγμα όσο και η ζημία στην οικονομία από το κόστος περίθαλψης των ατόμων και τη μειωμένη παραγωγικότητα. Τα παραπάνω, σε συνδυασμό με τις ανησυχητικές διαστάσεις που έχει λάβει η νόσος, την καθιστούν σήμερα ένα μείζον πρόβλημα δημόσιας υγείας.

Πίνακας 1.2: Προβλήματα υγείας που σχετίζονται με την παχυσαρκία

Αντίσταση στη δράση της ινσουλίνης

- διαταραχή ανοχής στη γλυκόζη
- μεταβολικό σύνδρομο
- σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2

Υπέρταση

Δυσλιπιδαιμία

-
- Αύξηση ολικής χοληστερόλης
 - Αύξηση τριγλυκεριδίων
 - Αύξηση LDL χοληστερόλης
 - Αύξηση απολιποπρωτεΐνης Β
 - Αύξηση μικρών πυκνών LDL σωματιδίων
 - Μείωση HDL χοληστερόλης
 - Μείωση απολιποπρωτεΐνης A₁
-

Υπερτροφία αριστεράς κοιλίας

Συστολική και διαστολική δυσλειτουργία της αριστεράς κοιλίας

Καρδιακή ανεπάρκεια

Στεφανιαία νόσος

Δυσλειτουργία του ενδοθηλίου

Αύξηση δεικτών φλεγμονής και προδιάθεσης για θρομβώσεις

Άλλες καταστάσεις

- Κολπική μαρμαρυγή
 - Σύνδρομο ύπνου-άπνοιας
 - Αλβουμινουρία
 - Οστεοαρθρίτιδες
 - Διάφορες μορφές καρκίνου (πχ παχέος εντέρου)
-

1.2.2 Αιτιολογία της παχυσαρκίας

Στον πυρήνα του προβλήματος βρίσκεται η ανισορροπία στο ισοζύγιο θερμιδικής πρόσληψης και ενεργειακών δαπανών. Συγκεκριμένα, η πρόσληψη ενέργειας είναι υψηλότερη από την κατανάλωση. Αυτή η ανισορροπία έχει ως συνέπεια την αύξηση του σωματικού βάρους με τη μορφή της εναπόθεσης λίπους στο σώμα. Όμως, η ανάλυση της αιτιολογίας της παχυσαρκίας δεν είναι τόσο απλοϊκή, αλλά ιδιαίτερος σύνθετη.

Η παχυσαρκία, με εξαίρεση ορισμένες σπάνιες περιπτώσεις γενετικής συνδρομής όπως για παράδειγμα το σύνδρομο Prader–Willi, δεν οφείλεται σε ένα μόνο γονίδιο⁵³⁻⁵⁵.

Ωστόσο, μελέτες σε διδύμους έδειξαν ότι κατά 70% γενετικοί παράγοντες – κληρονομικότητα καθορίζουν το σωματικό βάρος, το βαθμό της παχυσαρκίας και την κατανομή του λίπους. Ειδικότερα τα τελευταία χρόνια, με την επιστήμη της γενετικής να έχει κάνει άλματα, έγινε σαφές ότι μεμονωμένοι πολυμορφισμοί γονιδίων σχετίζονται με την ποικιλομορφία στο ΔΜΣ. Οι μελέτες αυτές αναμένεται να οδηγήσουν στην ταυτοποίηση γονιδίων για την παχυσαρκία και επακόλουθα στη διαλεύκανση των βιολογικών μηχανισμών και της αιτιολογίας της, με σκοπό τον εντοπισμό των ατόμων που έχουν περισσότερες πιθανότητες να γίνουν παχύσαρκα και στην προαγωγή της εξατομικευμένης πρόληψης και θεραπείας. Το πρόβλημα είναι ότι οι πολυμορφισμοί που ανακαλύφθηκαν μπορούν να εξηγήσουν μικρές μόνο μεταβολές του σωματικού βάρους. Χαρακτηριστικά, το γονίδιο FTO, που πρόσφατα αποδείχτηκε ότι αυξάνει την πιθανότητα παχυσαρκίας, καθορίζει το ΔΜΣ μόνο κατά 0,5% ή κατ' αντιστοιχία εξηγεί διαφορά 2-3 κιλών μεταξύ των ομόζυγων ατόμων για το αλληλόμορφο γονίδιο και των ομόζυγων για το εναλλακτικό γονίδιο⁵³⁻⁵⁵. Επιπρόσθετα, υποστηρίζεται ότι δεν άλλαξε το γενετικό υλικό τις τελευταίες δεκαετίες ώστε να δικαιολογείται η εντυπωσιακή αύξηση του επιπολασμού της παχυσαρκίας. Κύριο ρόλο στην εμφάνιση της παχυσαρκίας φαίνεται ότι διαδραματίζουν περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως η διατροφή και η άσκηση. Παράδειγμα αποτελούν οι Ινδιάνοι Pima, που ενώ είναι ένας πληθυσμός με ιδιαίτερα υψηλά ποσοστά παχυσαρκίας και διαβήτη, όσοι από αυτούς δεν άφησαν τις εστίες τους και τον παραδοσιακό τρόπο ζωής τους εμφανίζουν σε πολύ μικρότερο ποσοστό τα δύο αυτά νοσήματα.

Από τους τροποποιήσιμους παράγοντες του σύγχρονου «παχυσαρκιογόνου» περιβάλλοντος, η διατροφή κλασικά θεωρείται ως ο πιο σημαντικός, σε συνδυασμό με τη μειωμένη σωματική δραστηριότητα. Επιδημιολογικές μελέτες έδειξαν ότι άτομα που καταναλώνουν δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά, είναι περισσότερο πιθανό να

γίνονται παχύσαρκα, παρότι αυτά τα δεδομένα αμφισβητούνται έντονα από ορισμένους μελετητές⁵⁶⁻⁵⁸. Ανάλογες μελέτες έχουν επικεντρωθεί σε άλλα θρεπτικά συστατικά ή διατροφικά μοντέλα σε σχέση με τη δυνατότητα να προάγουν ή να αποτρέπουν την παχυσαρκία. Για παράδειγμα, η κατανάλωση πρωινού σε εφήβους και ενήλικες μειώνει τα ποσοστά εμφάνισης παχυσαρκίας^{59, 60}. Αντίστοιχα, το πρότυπο της μεσογειακής διατροφής συσχετίζεται με μειωμένη πιθανότητα αύξησης του σωματικού βάρους^{61, 62}. Παρεμβατικές μελέτες σε παχύσαρκα άτομα δεν επιβεβαίωσαν την υπεροχή μιας δίαιτας έναντι μίας άλλης, π.χ. μίας δίαιτας χαμηλής σε λιπαρά vs χαμηλής σε υδατάνθρακες. Τα δεδομένα αυτά αποδεικνύουν ότι η θεραπεία της παχυσαρκίας είναι το ίδιο σύνθετη με την αιτιολογία της. Σαφώς, ανεξάρτητα από την απώλεια βάρους και τη διατήρησή του στο χρόνο, ένα διατροφικό θεραπευτικό σχήμα κρίνεται και από την επίδρασή του και σε άλλους παράγοντες κινδύνου, όπως στην αρτηριακή πίεση ή στο λιπιδαιμικό προφίλ.

Η αυξημένη σωματική δραστηριότητα, συσχετίζεται με σημαντικά χαμηλότερο κίνδυνο αύξησης του σωματικού βάρους^{57, 58}. Προοπτικές μελέτες έδειξαν ότι άτομα με υψηλότερα επίπεδα σωματικής δραστηριότητας τείνουν να προσλαμβάνουν λιγότερο βάρος μακροπρόθεσμα. Η εκτίμηση των συνολικών ενεργειακών δαπανών γίνεται συνήθως έμμεσα, με τη χρήση δεικτών, και πιο σπάνια άμεσα με τη χρήση μεταβολικών κλωβών. Η αστικοποίηση, οι νέες τεχνολογίες, η ευκολία των μετακινήσεων, ο μειωμένος ελεύθερος χρόνος, είναι κάποιοι παράγοντες που συμβάλλουν στον περιορισμό της σωματικής δραστηριότητας. Δείκτες, όπως ο αριθμός ωρών παρακολούθησης τηλεόρασης και χρήσης ηλεκτρονικών παιχνιδιών ή υπολογιστών, ο αριθμός αυτοκινήτων ανά οικογένεια, η συμμετοχή σε αθλητικές δραστηριότητες, η έλλειψη ενδιαφέροντος για συμμετοχή σε αθλητικές δραστηριότητες, η διάρκεια χρόνου που κάποιος κάθεται στην εργασία του σχετίζονται με την παχυσαρκία και είναι απόλυτα

συμβατοί με τη θεώρηση ότι οι ενεργειακές δαπάνες αποτελούν καθοριστικό αιτιολογικό παράγοντα στην αύξηση του σωματικού βάρους και στην εμφάνιση παχυσαρκίας⁶³.

Επιπρόσθετοι προγνωστικοί δείκτες για την εμφάνιση της παχυσαρκίας είναι και ορισμένα κοινωνικο-οικονομικά χαρακτηριστικά, όπως το χαμηλό μορφωτικό επίπεδο, το διαζύγιο, η ανεργία και η οικονομική δυσχέρεια^{57, 58}. Εκτιμάται ότι και άλλες παράμετροι, όπως το στρες ή η κατάθλιψη, που ενδεχόμενα προκαλούνται από την παχυσαρκία, μπορεί διαμέσου διαφόρων μηχανισμών να οδηγήσουν σε αύξηση του σωματικού βάρους. Πρόσφατα, βρέθηκε ότι και η κοινωνική δικτύωση μπορεί να συνεισφέρει στην εξάπλωση του φαινομένου⁶⁴, γιατί η κοινωνική επαφή με άτομα που είναι παχύσαρκα ίσως επηρεάζει τις διατροφικές συνήθειες ή τη συχνότητα άσκησης ή πολύ περισσότερο, την πεποίθηση ή την αντίληψη για το τι είναι φυσιολογικό ή αποδεκτό. Ακόμη, η αύξηση του σωματικού βάρους μπορεί να οφείλεται σε φυσιολογικούς μηχανισμούς που έχουν σχέση με ερεθίσματα που προκαλούνται στον εγκέφαλο όταν κάποιο άτομο παρακολουθεί κάποιο άλλο να τρώει ή, τέλος, να είναι αποτέλεσμα μεταδοτικών αιτιών π.χ. ιών. Ανακεφαλαιώνοντας, η παχυσαρκία είναι μία νόσος με σοβαρές επιπτώσεις, με πολύπλοκη και όχι απόλυτα κατανοητή ακόμη αιτιολογία που έχει λάβει επιδημικές διαστάσεις σε παγκόσμια κλίμακα. Το γεγονός αυτό επιτάσσει την περαιτέρω διερεύνησή της, το σχεδιασμό κατάλληλων στρατηγικών πρόληψης από την επιστημονική κοινότητα και την πολιτεία και τέλος, την εφαρμογή πιο αποτελεσματικών θεραπευτικών μέσων, ιδίως σε σχέση με την παθοφυσιολογία της.

1.2.3 Παχυσαρκία και καρδιαγγειακή νόσος

Τονίστηκε ήδη ότι η παχυσαρκία, είτε ληφθεί υπόψη ο ΔΜΣ ως διαγνωστικό εργαλείο είτε η περίμετρος της μέσης, αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης ΚΑΝ. Η επίδραση της παχυσαρκίας στην ΚΑΝ φαίνεται ότι αναπτύσσεται από μικρή σχετικά ηλικία.

Χαρακτηριστικά, σε άνδρες ηλικίας 15-34 ετών, η αύξηση του σωματικού βάρους συσχετίζεται με την εμφάνιση στεφανιαίας αθηροσκλήρωσης⁶⁵. Πρόσφατη μετα-ανάλυση στην οποία συμμετείχαν 900.000 άτομα, έδειξε ότι για κάθε αύξηση του ΔΜΣ κατά 5 kg/m² πάνω από τα 25 kg/m² η ολική θνητότητα αυξάνεται κατά 30% και η καρδιαγγειακή θνητότητα κατά 40%⁶⁶. Αν και υπάρχει πολύ καλή συσχέτιση μεταξύ του σωματικού λίπους και του ΔΜΣ, από πολλούς τίθεται υπό αμφισβήτηση η ειδικότητα του ΔΜΣ και αναζητούνται καλύτεροι δείκτες⁶⁷. Εδώ και 50 και πλέον χρόνια παρατηρήθηκε ότι η ανδροειδής κατανομή του λίπους, ή διαφορετικά, η κοιλιακή παχυσαρκία προδιαθέτει περισσότερο σε σακχαρώδη διαβήτη και στεφανιαία νόσο σε σύγκριση με τη γυνοειδή κατανομή του λίπους ή διαφορετικά την περιφερική παχυσαρκία. Αφού η κατανομή του λίπους διαδραματίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο, η περίμετρος της μέσης ή ο λόγος της περιμέτρου μέσης προς αυτή των γοφών (WHR) θεωρούνται πιο αξιόπιστα μεθοδολογικά και διαγνωστικά εργαλεία για την εκτίμηση του καρδιαγγειακού κινδύνου. Πράγματι, για κάθε αύξηση της περιμέτρου μέσης κατά 1 cm ή του λόγου κατά 0,01, ο σχετικός κίνδυνος εμφάνισης ΚΑΝ αυξάνει κατά 2 και 5 % αντίστοιχα, ενώ στη μελέτη INTERHEART ένας λόγος περιμέτρου μέσης/ περίμετρο γοφών υψηλότερος από 0,85 στις γυναίκες και 0,90 στους άντρες, συνιστούσε ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου^{13, 68}. Παθοφυσιολογικά, αυτή η συσχέτιση εκπορεύεται σε μεγάλο βαθμό από την άμεση επίδραση της παχυσαρκίας στην καρδιακή λειτουργία, αλλά και την αυξημένη επίπτωση παραγόντων κινδύνου, όπως είναι η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου, η αρτηριακή υπέρταση και ο σακχαρώδης διαβήτης. Ωστόσο, καθοριστικός φαίνεται ότι είναι ο ρόλος του λιπώδους ιστού και των προϊόντων του, όπως αναλύεται στη συνέχεια.

1.2.4 Μεταβολικό Σύνδρομο

Το 1988 για πρώτη φορά χρησιμοποιήθηκε ο όρος «Σύνδρομο X» ή Μεταβολικό Σύνδρομο (ΜετΣ) για να περιγράψει ένα σύνολο παραγόντων –με σημαντικότερο την αντίσταση στην ινσουλίνη– που συσχετίζονταν με τη στεφανιαία νόσο⁶⁹. Εκτός από την αντίσταση στην ινσουλίνη, τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά του συνδρόμου ήταν η αυξημένη γλυκόζη, τα αυξημένα τριγλυκερίδια, η ελαττωμένη HDL χοληστερόλη και η αρτηριακή υπέρταση. Στις οδηγίες της NCEP ATP III για την αντιμετώπιση των δυσλιπιδαιμιών, αναγνωρίστηκε η καθοριστική σημασία του ΜετΣ στην παθογένεια της αθηροθρομβωτικής νόσου και διατυπώθηκαν τα κριτήρια που αποσκοπούν στην έγκαιρη διάγνωση και την κατάλληλη αντιμετώπιση αυτού του συνδρόμου⁷ (Πίνακας 1.3). Στα κριτήρια της NCEP ATP III τονίζεται ο κεντρικός ρόλος της κοιλιακής (σπλαχνικής) παχυσαρκίας στην παθογένεια του ΜετΣ. Άλλοι διεθνείς οργανισμοί και επιστημονικές εταιρείες έχουν προτείνει διαφορετικούς ορισμούς και κριτήρια για τη διάγνωσή του^{70, 71} (Πίνακας 1.3).

Η κύρια διαφορά του ορισμού της NCEP ATP III με τους άλλους ορισμούς συνίσταται στο γεγονός ότι για τη διάγνωση αυτού του συνδρόμου δεν απαιτείται η εκτίμηση της αντίστασης των περιφερικών ιστών στη δράση της ινσουλίνης, η οποία χρειάζεται ειδικές μεθόδους. Επιπρόσθετα, έμμεσες ενδείξεις για την παρουσία της ινσουλινοαντίστασης, όπως η δοκιμασία ανοχής στη γλυκόζη, δεν χρησιμοποιούνται ως εξετάσεις ρουτίνας. Σύμφωνα με τα κριτήρια της NCEP, χρειάζονται οποιαδήποτε τρία από τα παρακάτω κριτήρια για τη διάγνωση του ΜετΣ: κοιλιακή παχυσαρκία, υψηλά επίπεδα τριγλυκεριδίων, χαμηλά επίπεδα HDL χοληστερόλης, υψηλά επίπεδα γλυκόζης νηστείας και αυξημένη αρτηριακή πίεση⁷. Τα κριτήρια της NCEP θεωρούν την κοιλιακή παχυσαρκία σημαντικό παράγοντα που συμβάλλει στην εμφάνιση του συνδρόμου και

χρησιμοποιούν τις τιμές που προτάθηκαν από την Εθνική Επιτροπή Υγείας (National Institutes for Health) για την περίμετρο μέσης, δηλαδή ≥ 102 cm για τους άνδρες και ≥ 88 cm για τις γυναίκες. Ωστόσο, τα όρια αυτά είναι χαμηλότερα (94-101 cm στους άνδρες και 80-87 cm στις γυναίκες) για ειδικές εθνικές ομάδες (όπως για άτομα ασιατικής καταγωγής). Σύμφωνα με τα κριτήρια της NCEP ATP III, οι ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 περιλαμβάνονται στο ΜετΣ, επειδή αυτοί οι ασθενείς συχνά έχουν πολλαπλούς παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση ΚΑΝ.

Τα πιο πρόσφατα κριτήρια θεσπίστηκαν το 2005 – όπως προτάθηκαν από την Αμερικανική Καρδιολογική Εταιρεία (American Heart Association, AHA) και το Εθνικό Καρδιολογικό, Πνευμονολογικό και Αιματολογικό Ινστιτούτο (National Heart, Lung, and Blood Institute, NHLBI)⁷¹ – και ουσιαστικά χρησιμοποιούν τα NCEP ATP III κριτήρια για τη διάγνωση του ΜετΣ με μικρές τροποποιήσεις. Τα πλεονεκτήματα αυτών των κριτηρίων είναι η απλότητα στην εφαρμογή τους, καθώς και η αποφυγή της χρήσης μιας και μοναδικής διαταραχής ως παθογενετικού μηχανισμού για το ΜετΣ. Μία τροποποίηση αφορά τη μείωση της τιμής της γλυκόζης νηστείας σε 100 (από 110) mg/dL. Επιπρόσθετα, ενώ παραμένουν τα όρια των 102 cm για τους άνδρες και τα 88 cm για τις γυναίκες, όσον αφορά την περίμετρο μέσης, αναγνωρίζονται ειδικές ομάδες πληθυσμού που πιθανά έχουν περιμέτρου μέσης μεταξύ 94-101 cm για τους άνδρες και μεταξύ 80-87 cm για τις γυναίκες. Τέτοιες ομάδες αποτελούν ασθενείς με α) συγγενείς ηλικίας κάτω των 60 ετών με σακχαρώδη διαβήτη τύπου II σε 1ου βαθμού, β) σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, γ) λιπώδες ήπαρ, δ) επίπεδα C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP) >3 mg/L, ε) μικροαλβουμινουρία, στ) διαταραχή ανοχής στη γλυκόζη και ζ) αυξημένα επίπεδα apoB.

Πίνακας 1.3.Κριτήρια για τη διάγνωση του μεταβολικού συνδρόμου

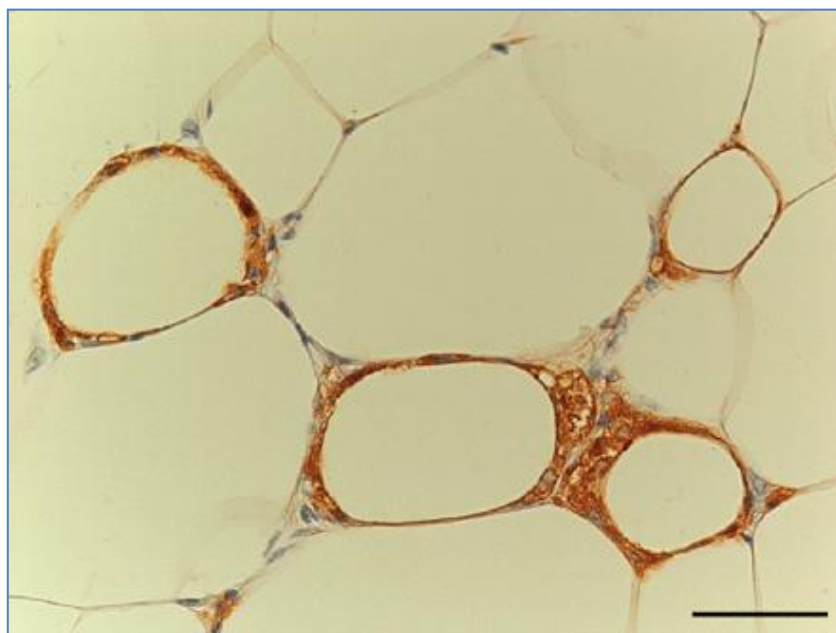
Παράμετρος	Π.Ο.Υ. (1998)	NCEP ATP III (2001)	IDF (2005)
Ινσουλινοαντίσταση	Διαταραχή ανοχής στη γλυκόζη ή της γλυκόζης νηστείας ή σακχαρώδης διαβήτη (ΣΔ) ή μειωμένη ευαισθησία των περιφερικών ιστών στη δράση της ινσουλίνης και δύο από τα επόμενα	Κανένα, οποιαδήποτε τρία από επόμενα	Κανένα
Σωματικό βάρος	Περίμετρος μέσης (waist circumference, WC)/περίμετρος ισχίων >0.90 (άνδρες), >0.85 (γυναίκες) και/ή BMI >30 kg/m ²	WC ≥102 cm (άνδρες), ≥88 cm (γυναίκες)**	Αυξημένη WC (ανάλογα με τον πληθυσμό) και δύο από τα επόμενα
Λιπίδια	TG ≥150 mg/dL και/ή HDL-C <35 mg/dL (άνδρες), <39 mg/dL (γυναίκες)	TG ≥150 mg/dL, HDL-C <40 mg/dL (άνδρες), <50 mg/dL (γυναίκες)	TG ≥150 mg/dL ή θεραπεία για TG HDL-C <40 mg/dL (άνδρες) ή <50 mg/dL (γυναίκες) ή θεραπεία για τη μείωση της HDL-C
Αρτηριακή πίεση (ΑΠ)	≥140/90 mm Hg	≥130/85 mm Hg	≥130 mm Hg συστολική ή ≥85 mm Hg διαστολική ή θεραπεία για αυξημένη ΑΠ
Γλυκόζη	Διαταραχή ανοχής στη γλυκόζη ή γλυκόζης νηστείας ή ΣΔ	>110 mg/dL (συμπεριλαμβανομένου του ΣΔ) ⁺	≥100 mg/dL (συμπεριλαμβανομένου του ΣΔ)
Άλλα	Μικροαλβουμινουρία		

Η επίπτωση του ΜετΣ αυξάνεται συνεχώς σε παγκόσμιο επίπεδο, κυρίως εξαιτίας της αύξησης της επίπτωσης της παχυσαρκίας⁷². Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μελετών, περίπου 50 εκατ. Αμερικανοί πληρούσαν τα κριτήρια για τη διάγνωση του ΜετΣ το 1990 και περίπου 64 εκατ. το 2000⁷³. Τα ελληνικά δεδομένα για την επίπτωση του ΜετΣ προέρχονται από δύο μεγάλες μελέτες: τη μελέτη ΑΤΤΙCΑ^{74, 75} και τη μελέτη Mets-GREECE^{20, 76, 77}. Η επίπτωση του ΜετΣ κυμαίνεται μεταξύ 17.9%⁷⁸ - 19.8%^{74, 79} σύμφωνα με τη μελέτη ΑΤΤΙCΑ και με τη χρήση των κριτηρίων κατά NCEP ATP III και μεταξύ 23.6%⁷⁶ – 24.5%^{20, 77} σύμφωνα με τη μελέτη MetS-GREECE με τα ίδια κριτήρια. Το ποσοστό είναι ακόμη μεγαλύτερο όταν χρησιμοποιούνται τα κριτήρια της International Diabetes Federation (IDF).

Ο κίνδυνος εμφάνισης ΚΑΝ σε ασθενείς με ΜετΣ είναι περίπου διπλάσιος σε σύγκριση με ασθενείς που δεν πληρούν τα κριτήρια για τη διάγνωση του συνδρόμου⁷¹. Για παράδειγμα, μια μετα-ανάλυση 43 μελετών με περίπου 170000 ασθενείς έδειξε ότι οι ασθενείς με ΜετΣ είχαν σχετικό κίνδυνο (relative risk, RR) για την εμφάνιση ΚΑΝ ίσο με 1,78⁸⁰. Στις γυναίκες ο κίνδυνος ήταν ακόμη μεγαλύτερος (RR 2,63). Επιπρόσθετα, ο κίνδυνος εμφάνισης ΚΑΝ ήταν υψηλός σε ασθενείς με ΜετΣ ακόμη και αφού είχαν ληφθεί υπόψη οι κλασικοί παράγοντες κινδύνου (RR 1,54). Παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα άλλων μελετών^{81, 82}. Το ΜετΣ επίσης αποτελεί ισχυρότερο προγνωστικό παράγοντα για την εμφάνιση ενός οξέος στεφανιαίου συμβάματος (RR 1,93) σε σύγκριση με τις κλασικές μεθόδους εκτίμησης του καρδιαγγειακού κινδύνου (όπως το Framingham risk score) σε άτομα <45 ετών⁸³. Τέλος, το ΜετΣ φαίνεται ότι συσχετίζεται επίσης με την εμφάνιση ισχαιμικών αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων⁸⁴.

1.3 Λιπώδης ιστός και αδιποκίνες

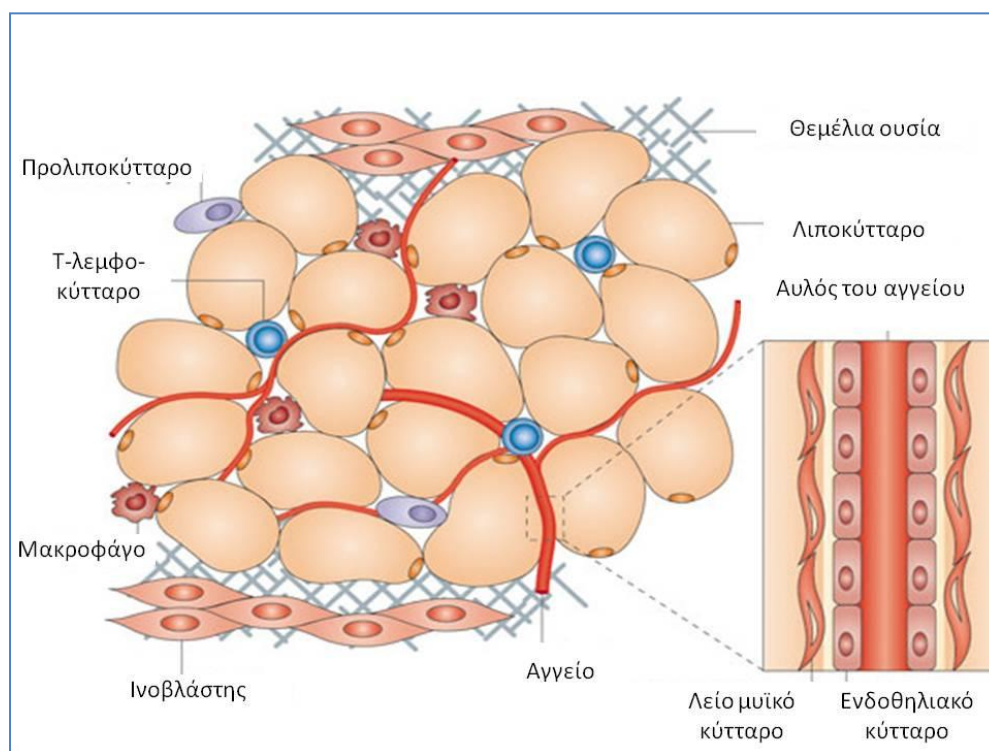
Η πεποίθηση ότι ο λιπώδης ιστός (Εικόνα 1.6) είναι αδρανής έχοντας ως μοναδικούς ρόλους την αποθήκευση της πλεονάζουσας ενέργειας με τη μορφή τριγλυκεριδίων και τη μόνωση ή/και την υποστήριξη γειτονικών ιστών θεωρείται παρωχημένη^{85, 86}. Το γεγονός ότι η παχυσαρκία, και κυρίως η σπλαχνική, αποτελεί παράγοντα καρδιαγγειακού κινδύνου ανεξάρτητα από την επίδραση στην αρτηριακή πίεση, το σακχαρώδη διαβήτη και το λιπιδαιμικό προφίλ, υποδηλώνει ότι παράγοντες προερχόμενοι από το λιπώδη ιστό εμπλέκονται στην αθηρωματική διαδικασία. Πράγματι, τα τελευταία χρόνια ο λιπώδης ιστός έχει αναβαθμισθεί σε ενεργό ενδοκρινή και αυτοκρινή αδέν. Παράλληλα, βρέθηκε ότι η παχυσαρκία χαρακτηρίζεται συχνά και από δυσλειτουργία του λιπώδους ιστού.



Εικόνα 1.6 Φωτογραφία λιπώδους ιστού στο οπτικό μικροσκόπιο. Διακρίνονται λιποκύτταρα και με χρώση μακροφάγα που σχηματίζουν δομές που ομοιάζουν με στέμμα (CLS).

Φυσιολογικά, ο λιπώδης ιστός συνιστά το 10-20% του σωματικού βάρους του σώματος στους άνδρες και το 20-30% στις γυναίκες^{87, 88}. Σε μερικές κατηγορίες αθλητών μπορεί να είναι χαμηλότερο από 5%, ενώ σε άτομα με παχυσαρκία αυξάνει και σε εξαιρετικές περιπτώσεις με υψηλότατο ΔΜΣ ξεπερνά το 60-70% του σωματικού βάρους. Αποτελείται κύρια από λιποκύτταρα, τα οποία συνιστούν το 35-70% του ιστού⁸⁹. Παρόντα επίσης είναι προ-λιποκύτταρα (μη διαφοροποιημένοι ινοβλάστες), ενδοθηλιακά κύτταρα και κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως ουδετερόφιλα, μακροφάγα, μαστοκύτταρα, φονικά κύτταρα, καθώς και CD4 και CD8 T λεμφοκύτταρα (Εικόνα 1.7). Τα μακροφάγα εντοπίζονται γύρω από νεκρωτικά λιποκύτταρα, όπου σχηματίζουν δομές που ομοιάζουν με στέμμα (Crown-like structures-CLS) (Εικόνα 1.6). Η παρουσία των λευκοκυττάρων και των CLS είναι πιο έντονη σε παχύσαρκα άτομα σε σύγκριση με νορμοβαρή και στο σπλαχνικό λιπώδη ιστό σε σύγκριση με τον υποδόριο λιπώδη ιστό. Ο λιπώδης ιστός χαρακτηρίζεται επίσης από ένα πλούσιο δίκτυο αγγείων και νεύρων και βρίσκεται σε συνεχή αλληλεπίδραση με άλλους ιστούς και όργανα, όπως το ήπαρ, οι μύες, ο εγκέφαλος, το πάγκρεας, τα οστά, το ενδοθήλιο και το αναπαραγωγικό και ανοσοποιητικό σύστημα. Καθώς ο λιπώδης ιστός εντοπίζεται ανατομικά σε διάφορα σημεία του σώματος, είναι δυνατός ο διαχωρισμός του με βάση αυτό το κριτήριο πχ σε υποδόριο, επικάρδιο, οπισθοπεριτοναϊκό, μεσεντερικό, επιδιδυμικό, κτλ. Συνήθως όμως, απλά διακρίνεται σε υποδόριο και σπλαχνικό λιπώδη ιστό, για λόγους που αφορούν στις διαφορετικές επιδράσεις του καθενός. Στους ενήλικες υπάρχει λευκός λιπώδης ιστός κατά κύριο λόγο, εάν και υπάρχουν περιπτώσεις στη βιβλιογραφία στις οποίες αναφέρεται η παρουσία φαιού λιπώδους ιστού, σε πολύ μικρότερη αναλογία, ο οποίος σε αντίθεση με τον λευκό, έχει ως κύρια λειτουργία τη θερμογένεση. Όσον αφορά τα λιποκύτταρα, αυτά διακρίνονται με βάση το μέγεθός

τους, ένα γεγονός που επίσης χαρακτηρίζει τον ιστό με ταξινόμησή του σε υπερτροφικό ή υπερπλαστικό, δηλαδή με λιγότερα και ευμεγέθη λιποκύτταρα ή με περισσότερα και μικρότερης διαμέτρου λιποκύτταρα αντίστοιχα. Αυτές οι διαφορές μπορεί να επηρεάζουν ουσιαστικά τη λειτουργία του και την απόκρισή του σε θρεπτικά, ορμονικά και άλλα ερεθίσματα.



Εικόνα 1.7 Κύτταρα και δομή του λιπώδους ιστού

1.3.1 Λιποκύτταρο

Το λιποκύτταρο του λευκού λιπώδους ιστού είναι σφαιρικό με διάμετρο από 20 έως 200 nm και χαρακτηρίζεται από την κυρίαρχη παρουσία ενός σταγονιδίου λίπους που περιέχει τριγλυκερίδια^{85, 86}, το οποίο καταλαμβάνει το 90% περίπου του κυττάρου, με συνέπεια ο πυρήνας και τα υπόλοιπα σωματίδια του κυτταροπλάσματος, όπως το ενδοπλασματικό δίκτυο και τα μιτοχόνδρια, να περιορίζονται στην περιφέρεια. Τα ώριμα λιποκύτταρα προέρχονται από ινοβλάστες

αστεροειδούς μορφής, και μέσω διαφοροποίησης, αποδιαφοροποίησης, διαδιαφοροποίησης, απόπτωσης και νέκρωσής τους, ο ιστός βρίσκεται σε μία δυναμική ισορροπία. Εκτιμάται ότι περίπου το 10% του συνόλου των λιποκυττάρων αναγεννώνται κάθε χρόνο⁹⁰.

1.3.2 Λιποκυτταρογένεση

Η λιποκυτταρογένεση ή λιπογένεση (adipogenesis) είναι η δυναμική διαδικασία διαφοροποίησης των προ-λιποκυττάρων σε ώριμα λιποκύτταρα. Είναι μια σύνθετη διαδικασία που βρίσκεται κάτω από την επίδραση ορμονικών ερεθισμάτων, κυτταροκινών, επάρκειας θρεπτικών συστατικών ή φαρμάκων και υπόκειται στον έλεγχο μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι ενεργοποιούνται διαδοχικά. Κυρίαρχοι παράγοντες θεωρούνται οι peroxisome proliferator-activated receptor(PPAR)- γ και CCAAT-enhancer-binding protein (C/EBP)- α , ενώ αρκετοί ακόμη παράγοντες έχει αναφερθεί ότι προάγουν ή αναστέλλουν τη λιπογένεση. Το προλιποκύτταρο φαίνεται ότι έχει το ίδιο κοινό πρόδρομο βλαστοκύτταρο με τους οστεοβλάστες, τα χονδροκύτταρα και τους μυοβλάστες, ενώ κάτω από ορισμένες προϋποθέσεις μπορεί να διαφοροποιηθεί σε αυτά τα κύτταρα. Αρχικά, προκαθορίζεται η ένταξη του πολυδύναμου βλαστοκυττάρου στο «λιπογενετικό πρόγραμμα» με τη μετατροπή του σε ινοβλάστη λιποκυττάρου. Στη συνέχεια τα προλιποκύτταρα πολλαπλασιάζονται με την επίδραση των πυρηνικών μεταγραφικών παραγόντων C/EBP- γ , C/EBP- δ , ενώ με την επίδραση των PPAR- γ και C/EBP- α , αναδιαμορφώνονται, και τελικά προκύπτουν ώριμα λιποκύτταρα που μπορούν να επιτελέσουν όλες τις βιολογικές διεργασίες, όπως λιπογένεση, λιπόλυση και έκκριση ουσιών. Εκτός των αλλαγών του κυτταροσκελετού παρατηρείται ταυτόχρονη αναδιάρθρωση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (του στρώματος).

Γνωστοί παράγοντες που διεγείρουν την λιπογένεση είναι οι ακόλουθοι: Τα γλυκοκορτικοειδή, που ενεργοποιούν την έκφραση των C/EBP- δ και PPAR- γ , το ένζυμο 11- β -υδροξυστερο-αφυδρογονάση, που μετατρέπει την κορτιζόνη σε κορτιζόλη, η ινσουλίνη και η γλυκόζη που συνδέονται με επάρκεια ενέργειας, η τετραϊοδωθυρονίνη με αναβολικές δράσεις και ορισμένα λιπαρά οξέα, κυρίως πολυακόρεστα, που πιθανά δρουν ως ενεργοποιητές των PPAR- γ . Προϊόντα των ίδιων των λιποκυττάρων, όπως η αντιγονεκτίνη, επίσης αναφέρονται ως παράγοντες που προάγουν τη λιπογένεση. Αντίθετα, η λεπτίνη, οι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως ο TNF- α , οι ιντερλευκίνες (IL) -1, IL-6, IL-11, η ιντερφερόνη- γ , ορισμένα λιπαρά οξέα μέσης αλύσου και η αντιρετροϊκή θεραπεία αναστέλλουν τη λιπογένεση.

Για την κατανόηση των λειτουργιών του λιποκυττάρου και τη μελέτη της βιολογίας του λιπώδους ιστού έχουν εφαρμοσθεί διάφορα πειραματικά μοντέλα, όπως ποντίκια στα οποία έχουν υπερεκφρασθεί ή αποσιωπηθεί συγκεκριμένα γονίδια και αθανατοποιημένες κυτταρικές σειρές τρωκτικών, όπως η 3T3-L1. Αν και η μελέτη της παθοφυσιολογίας πολλών καταστάσεων συχνά γίνεται σε πειραματόζωα ή σε κύτταρα προερχόμενα από ζώα, θεωρείται ότι υπερέχει η μελέτη ανθρώπινων εθελοντών ή κυττάρων. Επιπρόσθετα, έχουν αναφερθεί σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφόρων τύπων λιποκυττάρων. Για παράδειγμα, τα ανθρώπινα λιποκύτταρα είναι μεγαλύτερα κατά 30-40% από τα λιποκύτταρα των τρωκτικών και σε ορισμένες περιπτώσεις τα ευρήματα που προκύπτουν στα πρώτα δεν επαληθεύονται σε ανθρώπους. Πρόσφατα δημιουργήθηκε η κυτταρική σειρά ανθρώπινων ινοβλαστών που προέρχεται από ένα νεογνό με σύνδρομο Simpson-Golabi-Behmel (SGBS), η οποία θεωρείται ένα χρήσιμο ερευνητικό μοντέλο για τη μελέτη της βιολογίας των λιποκυττάρων και του λιπώδους ιστού.

1.3.3 Μεταβολικές διαδικασίες στο λιποκύτταρο

Τα λιποκύτταρα συσσωρεύουν και αποθηκεύουν λιπαρά οξέα με τη μορφή τριγλυκεριδίων σε περιόδους περίσσειας ενέργειας. Αντίθετα, απελευθερώνουν λιπαρά οξέα σε συνθήκες ανεπάρκειας τροφής και θερμιδικού ελλείμματος, πχ σε νηστεία, αστία ή μετά από παρατεταμένη σωματική άσκηση. Τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων του λιποκυττάρου είναι το τελικό αποτέλεσμα διαφόρων διαδικασιών, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται η λιπόλυση, δηλαδή η υδρόλυση τριγλυκεριδίων, η πρόσληψη λιπαρών οξέων και η de novo λιπογένεση. Δυσλειτουργία σε κάποια από αυτές τις διαδικασίες μπορεί να προκαλέσει αύξηση των τριγλυκεριδίων του ορού και των ελεύθερων λιπαρών οξέων. Η δυσλιπιδαιμία σε συνδυασμό με την εναπόθεση τριγλυκεριδίων σε άλλους ιστούς, όπως το ήπαρ, ένα φαινόμενο που είναι γνωστό ως λιποτοξικότητα, συνεισφέρει σημαντικά στις συνέπειες της παχυσαρκίας και την εκδήλωση του μεταβολικού συνδρόμου.

Στους ανθρώπους τα τριγλυκερίδια προσλαμβάνονται από τα λιποκύτταρα κυρίως από την κυκλοφορία. Η ικανότητα του ιστού για de novo λιπογένεση (δηλαδή η ενζυμική-βιοχημική διαδικασία σχηματισμού λιπαρών οξέων από ποικίλα μη λιπιδικά πρόδρομα μόρια όπως υδατάνθρακες, κύρια στο ήπαρ⁹¹) είναι περιορισμένη σε σύγκριση με τα τρωκτικά και ως διεργασία έχει μηδαμινή σχεδόν συνδρομή στη σύνθεση τριγλυκεριδίων στον ανθρώπινο οργανισμό. Εξαίρεση αποτελεί η υπερθερμιδική διατροφή που είναι πλούσια σε υδατάνθρακες⁹¹. Η πρόσληψη των τριγλυκεριδίων από τα λιποκύτταρα, που προέρχονται είτε από τη διατροφή, είτε από τη de novo λιπογένεση στο ήπαρ, γίνεται αφού πρώτα υδρολυθούν σε λιπαρά οξέα και γλυκερόλη από τη λιποπρωτεϊνική λιπάση. Στο εσωτερικό του κυττάρου τελικά σχηματίζουν και πάλι τριγλυκερίδια συνδεόμενα εκ νέου με γλυκερόλη.

Η λιπόλυση πραγματοποιείται όταν υπάρχει ανάγκη για χρησιμοποίηση ενέργειας στον ανθρώπινο οργανισμό⁹²⁻⁹⁴. Αποτελεί μία σύνθετη διαδικασία, η οποία εξαρτάται από ορμονικά ερεθίσματα. Περιληπτικά, στη λιπόλυση συμμετέχουν διαδοχικά τρία ένζυμα. Αρχικά, η πρόσφατα ανακαλυφθείσα τριγλυκεριδική λιπάση του λιπώδους ιστού ή αλλιώς δεσνουτρίνη, υδρολύει το τριγλυκερίδιο σε διγλυκερίδιο και ένα λιπαρό οξύ. Στη συνέχεια η ορμονοευαίσθητη λιπάση καταλύει την υδρόλυση του διγλυκεριδίου σε μονογλυκερίδιο και ένα λιπαρό οξύ. Τέλος, με την μονογλυκεριδική λιπάση προκύπτει ένα μόριο γλυκερόλης και το τρίτο λιπαρό οξύ. Τα μη εστεροποιημένα – ελεύθερα λιπαρά οξέα απελευθερώνονται στην κυκλοφορία και μεταφέρονται στους μύες όπου οξειδώνονται ή στο ήπαρ όπου δρουν ως σηματοδοτικά μόρια και ως υποστρώματα για τη σύνθεση λιποπρωτεϊνών. Σημαντικό δομικό και λειτουργικό ρόλο έχει η περιλιπίνη, μία φωσφωπρωτεΐνη που περιβάλλει το σταγονίδιο λίπους και επιτρέπει τη λιπόλυση μόνο εφόσον υποστεί φωσφορυλίωση. Η λιπόλυση αναστέλλεται ισχυρά από την ινσουλίνη. Ανασταλτικό ρόλο στη λιπόλυση έχει επίσης η αυξητική ορμόνη σε συνθήκες επάρκειας θρεπτικών συστατικών και ενέργειας. Οι κατεχολαμίνες, όπως και η προσταγλανδίνη E₂, έχουν διφασική δράση. Μέσω των β-αδρενεργικών υποδοχέων επάγουν τη λιπόλυση και μέσω των α-αδρενεργικών υποδοχέων την αναστέλλουν. Η προσταγλανδίνη E₂ σε νανομοριακές συγκεντρώσεις μειώνει τη λιπόλυση, ενώ σε μικρομοριακές την προάγει. Τη λιπόλυση επάγουν επίσης ο TNF-α, οι θυρεοειδικές ορμόνες, το νατριουρητικό πεπτίδιο, τα γλυκοκορτικοειδή, και τέλος η αυξητική ορμόνη στη νηστεία.

1.3.4 Αδιποκίνες, φλεγμονή και ινσουλινοαντίσταση.

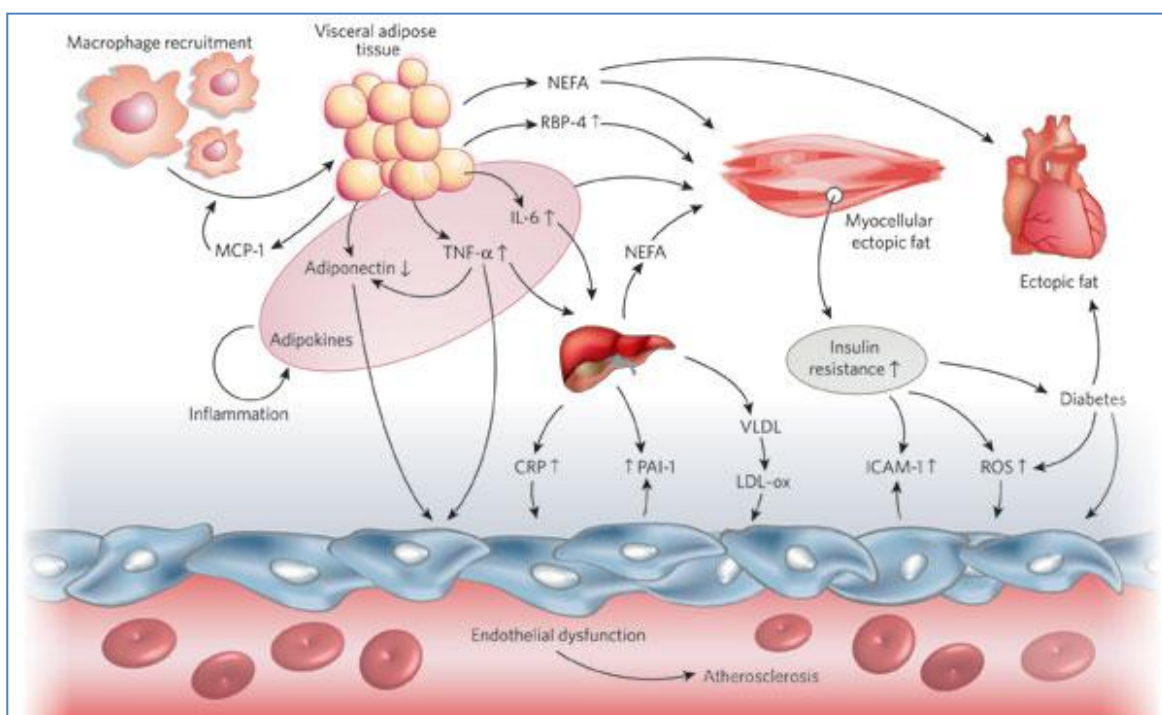
Εκτός από την αποθήκευση τριγλυκεριδίων, εκείνο το οποίο χαρακτηρίζει το λιπώδη ιστό και τείνει να επισκιάσει το ρόλο του ως αποταμιευτή ενέργειας, είναι η παραγωγή βιολογικά ενεργών ουσιών, οι οποίες συνολικά αναφέρονται ως αδιποκίνες ή λιποκυτταροκίνες. Η παχυσαρκία σχετίζεται με έντονες μεταβολές της παραγωγής, στην πλειοψηφία αυξήσεις, των αδιποκινών. Η διαταραχή της παραγωγής και έκκρισης των αδιποκινών διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε μεταβολικές διαταραχές, όπως η φλεγμονή, η αντίσταση στην ινσουλίνη, ο σακχαρώδης διαβήτης και τα καρδιαγγειακά νοσήματα. Η άποψη ότι η παχυσαρκία είναι μία κατάσταση που χαρακτηρίζεται από χαμηλού βαθμού χρόνια φλεγμονή έχει πολλούς υποστηρικτές. Η φλεγμονή του λιπώδους ιστού στην παχυσαρκία δεν είναι ακόμη γνωστό ποια αφετηρία έχει. Πάντως, είναι γνωστό ότι ο αυξανόμενος λιπώδης ιστός, ιδίως ο σπλαχνικός, συνδέεται με αύξηση του μεγέθους των λιποκυττάρων. Εικάζεται ότι με την πάροδο του χρόνου τα υπερτροφικά-ευμεγέθη λιποκύτταρα καθίστανται δυσλειτουργικά. Οι αδιποκίνες, ως αυτοκρινείς παράγοντες που εκκρίνονται από τα ίδια τα λιποκύτταρα, αλλά και η υποξία λόγω του επεκτεινόμενου ιστού, σε συνδυασμό με την ενεργοποίηση κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος (μονοκυττάρων κτλ) επιτείνουν τη δυσλειτουργία των λιποκυττάρων και του ιστού γενικότερα, με αποτέλεσμα περαιτέρω προσέλκυση μονοκυττάρων, φλεγμονή και αντίσταση στην ινσουλίνη. Οι αδιποκίνες διακρίνονται σε δύο τύπους: σε εκείνες που εκκρίνονται αποκλειστικά από το λιπώδη ιστό και σε εκείνες που εκκρίνονται σε μεγάλες ποσότητες, αλλά δεν είναι αποκλειστικά προϊόντα του λιπώδους ιστού. (Πίνακας 1.3)

Πίνακας 1.3. Αδικοκίνες που εκκρίνονται από το λευκό λιπώδη ιστό.

Ειδικές αδικοκίνες του λευκού λιπώδους ιστού	Μη ειδικές αδικοκίνες του λευκού λιπώδους ιστού
Λεπτίνη	Παράγοντας νέκρωσης όγκου-α (TNF-α)
Αντιγονεκτίνη	Διαλυτός υποδοχέας του TNF-α
Βισφατίνη	Ιντερλευκίνη-1(IL-1)
Ρεζιστίνη	Ιντερλευκίνη-6
Βασπίνη	Ιντερλευκίνη-10
Ομεντίνη	Ανταγωνιστής του υποδοχέα της IL-1 (IL-1RA)
Πρωτεΐνη δέσμευσης ρετινόλης 4	Χημειοτακτική πρωτεΐνη-1(MCP-1)
Αδιψίνη	Plasminogen activator inhibitor(PAI)-1
	Οιστρογόνα & ανδρογόνα
	Μεταλλοπρωτεϊνάσες

Η παθοφυσιολογία της συσχέτισης ανάμεσα στην παχυσαρκία και την αντίσταση στη δράση της ινσουλίνης δεν είναι απόλυτα κατανοητή, όμως σημαντική πρόοδος στην αποσαφήνιση των πιθανών μηχανισμών έχει γίνει τις δύο τελευταίες δεκαετίες και υπάρχουν αρκετά δεδομένα τα οποία υποδεικνύουν τη φλεγμονή ως ενδιάμεσο μεσολαβητή. Το έναυσμα για την αναθεώρηση του ρόλου του λιπώδους ιστού ως ενεργού ενδοκρινή αδένου και την εμπλοκή του στην ινσουλινοαντίσταση δόθηκε το 1993. Τότε, διαπιστώθηκε ότι ο TNF-α υπερεκφράζεται στο λιπώδη ιστό παχύσαρκων τρωκτικών και ότι γενετικά τροποποιημένα ποντίκια τα οποία δεν εκφράζουν το γονίδιο του ή τον υποδοχέα του, εμφάνισαν βελτίωση της απόκρισης στην ινσουλίνη. Τα αποτελέσματα αυτά στη συνέχεια επιβεβαιώθηκαν και σε ανθρώπους. Ο TNF-α παράγεται από λιποκύτταρα, όμως το μεγαλύτερο ποσοστό προέρχεται από άλλα κύτταρα, όπως τα προλιποκύτταρα, τα λευκοκύτταρα και κυρίως τα μακροφάγα, τα οποία προσελκύονται μέσω χημειοταξίας κύρια με την

επίδραση της MCP-1. Έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον το γεγονός ότι θεραπεία με βιολογικούς παράγοντες έναντι του TNF- α (anti-TNF α) σε νόσους, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, έχει ως δευτερεύον αποτέλεσμα μερική βελτίωση της ινσουλινοευσθησίας. Επίσης, ο TNF- α σε καταστάσεις οξείας φλεγμονής συνδέεται με μείωση της όρεξης και της πρόσληψης τροφής. Επιπρόσθετα, αναστέλλει την πρόσληψη λιπαρών οξέων από το λιποκύτταρο και αυξάνει τη λιπόλυση. Η επίδραση του TNF- α στη δράση της ινσουλίνης γίνεται μέσω της μείωσης της έκφρασης των GLUT4, IR, IRS-1 και της αναστολής του IR και της δραστηριότητας του IRS-1. Παράλληλα, ο TNF- α επιδρά στους μεταγραφικούς παράγοντες PPAR- γ και C/EBP. Ο TNF- α συνδέεται επίσης με την αθηροσκλήρωση: Προάγει την έκφραση προσκολλητικών μορίων στο ενδοθήλιο, στρατολογεί και ενεργοποιεί φλεγμονώδη κύτταρα, πυροδοτεί τον καταρράκτη της φλεγμονής στο αρτηριακό τοίχωμα και παρεμβαίνει απευθείας στο μεταβολισμό της χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων.



Εικόνα 1.8 Η συμμετοχή του λιπώδους ιστού στην αθηροσκλήρωση: Η συσσώρευση του λίπους, ιδιαίτερα ενδοσπλαχνικά, η ινσουλινοαντίσταση, η ηπατική φλεγμονή και η δυσλιπιδαιμία προάγουν την αθηροσκλήρωση. Ο λιπώδης ιστός, είτε άμεσα, είτε έμμεσα, μέσω παραγωγής φλεγμονωδών κυτταροκινών, αδιποκινών και χημειοτακτικών μορίων, επάγει την ινσουλινοαντίσταση, τη φλεγμονή, το οξειδωτικό στρες και τελικά τη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου.

1.3.5 Λεπτίνη

Η λεπτίνη είναι μία πρωτεΐνη 16 kD, προϊόν του γονιδίου *ob* στο χρωμόσωμα 7, που ανήκει στην υπερικογένεια των κυτοκινών τύπου 1. Ανακαλύφθηκε το 1994 και σύμφωνα με τα αρχικά δεδομένα, σηματοδοτεί στον εγκέφαλο την παρουσία σωματικού λίπους, μειώνοντας την πρόσληψη τροφής και ελέγχοντας το μεταβολισμό. Αποτελείται από 4 αντιπαράλληλες α-έλικες και η δράση της διαμεσολαβείται από τον υποδοχέα της, μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη, που έχει 6 ισομορφές, Ob-Ra έως Ob-Rf, με πλήρως ενεργό υποδοχέα την ισομορφή Ob-Rb. Οι υποδοχείς της λεπτίνης βρίσκονται σχεδόν σε όλο το σώμα: στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ), στο πάγκρεας, το ήπαρ, στους νεφρούς, τους πνεύμονες, στο ενδοθήλιο, στο εντερικό επιθήλιο, στις γονάδες και σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, γεγονός το οποίο υποδηλώνει ότι η λεπτίνη έχει πλειότροπες δράσεις. Σε μοριακό επίπεδο, η λεπτίνη δρα μέσω των υποδοχέων της για την ενεργοποίηση σημαντικών κινασών (JAK, STAT, PI3K, ERK1/2).

Τα επίπεδα λεπτίνης στο πλάσμα αυξάνουν ανάλογα με την αύξηση του ΔΜΣ και του ποσοστού του σωματικού λίπους. Η έκκρισή της είναι αναλογικά μεγαλύτερη από το σπλαχνικό σε σύγκριση με τον υποδόριο λιπώδη ιστό και στις γυναίκες μεγαλύτερη σε σύγκριση με άντρες. Παράλληλα, η σύνθεση της λεπτίνης καθορίζεται και από το μέγεθος του λιποκυττάρου, αφού τα μεγάλα λιποκύτταρα παράγουν περισσότερη λεπτίνη από τα μικρότερα. Ο έλεγχος της σύνθεσης και έκκρισης της λεπτίνης είναι σύνθετος και εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, πλην των προαναφερθέντων, όπως το σωματικό βάρος, το φύλο, η προέλευση του ιστού και το μέγεθος του λιποκυττάρου. Η νηστεία και η απώλεια βάρους μειώνουν θεαματικά τα επίπεδα λεπτίνης και η επανασίτιση τα επαναφέρει στα αρχικά επίπεδα. Η ινσουλίνη, τα οιστρογόνα και τα γλυκοκορτικοειδή προάγουν την έκφραση του γονιδίου της.

Αντίθετα, τα ανδρογόνα και η αυξητική ορμόνη τη μειώνουν. Το ίδιο αποτέλεσμα έχει και η θεραπεία με γλιταζόνες. Επιπλέον, η παραγωγή της λεπτίνης επηρεάζεται από την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Πράγματι, λοιμώξεις και φλεγμονές διαμέσου της IL-1, του TNF-α και του λιποπολυσακχαριδίου, μιας βακτηριακής τοξίνης, αυξάνουν τα επίπεδα της λεπτίνης.

Η κύρια δράση της λεπτίνης είναι ο έλεγχος της όρεξης, του αισθήματος του κορεσμού και η μείωση της πρόσληψης τροφής μέσω του υποθαλάμου. Πράγματι, ποντίκια τα οποία έχουν υποστεί γενετική τροποποίηση ώστε να μην εκφράζουν τη λεπτίνη ή τον υποδοχέα της είναι εξαιρετικά παχύσαρκα. Στον άνθρωπο ελάχιστες αντίστοιχες περιπτώσεις έχουν περιγραφεί. Η κοινή παχυσαρκία, όπως ήδη αναφέρθηκε, σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα λεπτίνης, ένα εύρημα που υποδηλώνει αντίσταση στη λεπτίνη, τουλάχιστον όσον αφορά τον έλεγχο της όρεξης. Η λεπτίνη έχει ακόμη άμεσες αυτοκρινικές επιδράσεις, αφού επάγει τη λιπόλυση και αναστέλλει τη λιπογένεση. Βελτιώνει επίσης την ινσουλινοαντίσταση στους μύες και το ήπαρ σε άτομα με φυσιολογικό βάρος, ενώ σε άτομα με παχυσαρκία σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα ινσουλίνης⁹⁵. Η λεπτίνη είναι απαραίτητη για τη λειτουργία της αναπαραγωγικής διαδικασίας, με χαμηλά επίπεδα να συνδέονται με αμηνόρροια, ενώ ευθύνεται και για την πρόωμη εφηβεία, σηματοδοτώντας την επάρκεια των ενεργειακών αποθεμάτων στον οργανισμό για την εγκυμοσύνη. Τέλος, πρόσφατα, βρέθηκε ότι η λεπτίνη αναστέλλει την οστεογένεση, μέσω επίδρασης στο ΚΝΣ.

Η λεπτίνη θεωρείται ως ένας από τους συνδετικούς κρίκους ανάμεσα στην παχυσαρκία και την αθηροσκλήρωση. Μάλιστα, οι Reilly και συνεργάτες⁹⁶ έδειξαν ότι η υπερλεπτιναιμία σχετίζεται ανεξάρτητα με στεφανιαία αθηροσκλήρωση. Οι πιθανοί υποκείμενοι μηχανισμοί αφορούν την επίδραση στο ανοσοποιητικό σύστημα:

Προστατεύει τα T-λεμφοκύτταρα από απόπτωση, προάγει τον πολλαπλασιασμό τους και τα ενεργοποιεί σε T-βοηθητικά 1 (Th-1) λεμφοκύτταρα. Επίσης, επηρεάζει τη φαγοκύτωση και την παραγωγή κυτοκινών από τα ουδετερόφιλα, τα φονικά κύτταρα και τα δενδριτικά κύτταρα και επάγει τον πολλαπλασιασμό και την ενεργοποίηση των μονοκυττάρων σε μακροφάγα. Πέρα από την ενεργοποίηση των μακροφάγων, προάγει την πρόσληψη χοληστερόλης από τα μακροφάγα. Επιπρόσθετα, ενισχύει την παραγωγή ελευθέρων ριζών και αυξάνει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών και των λείων μυϊκών κυττάρων. Η λεπτίνη διεγείρει την παραγωγή MCP-1 από ενδοθηλιακά κύτταρα και αυξάνει τη συγκόλληση των αιμοπεταλίων. Τέλος, αυξάνει το συμπαθητικό τόνο και έτσι συνδέεται με την παθοφυσιολογία της αρτηριακής υπέρτασης, ενώ έχει και ισχυρές αγγειογενετικές επιδράσεις.

1.3.6 Αντιπονεκτίνη

Η αντιπονεκτίνη ανακαλύφθηκε ταυτόχρονα από 4 ερευνητικές ομάδες. Το γονίδιο της βρίσκεται στο χρωμόσωμα 3 και κωδικοποιεί την παραγωγή ενός μονομερούς πεπτιδίου 30 kDa. Αποτελείται από μία ινώδη, κολλαγονοειδή περιοχή και μία σφαιρική περιοχή και η τριτοταγής δομή της προσομοιάζει με αυτή του TNF- α , αν και αυτές οι δύο πρωτεΐνες έχουν εντελώς διαφορετικές δράσεις. Η αντιπονεκτίνη σχηματίζει τριμερή πριν εκκριθεί από το λιποκύτταρο, τα οποία συνενώνονται είτε σε εξαμερή, με σύνδεση της σφαιρικής κεφαλής, ή σε πολυμερή υψηλού μοριακού βάρους, με αλληλεπίδραση της κολλαγονοειδούς περιοχής. Επίσης, ανιχνεύονται στον ορό και μικρές ποσότητες σφαιρικής αντιπονεκτίνης που έχει διασπασθεί από το πλήρους μήκους πεπτίδιο.

Η αντιπονεκτίνη έχει δύο διαμεμβρανικούς υποδοχείς με 7 αναδιπλώσεις, μέσω των οποίων δρα: τον Adipo-R1 και τον Adipo-R2, οι οποίοι βρίσκονται κυρίως στους σκελετικούς μύες και το ήπαρ αντίστοιχα. Βρίσκονται όμως και σε άλλους ιστούς και όργανα: Ο Adipo-R1 στο ενδοθήλιο, στο μυοκάρδιο και τα β -κύτταρα του παγκρέατος, και ο Adipo-R2 στο ενδοθήλιο. Παρουσία των υποδοχέων έχει ακόμη αναφερθεί σε μονοκύτταρα και μακροφάγα. Βρέθηκε επίσης ότι η T-καδχερίνη, μία εξωκυττάρια πρωτεΐνη των ενδοθηλιακών και λείων μυϊκών κυττάρων, μπορεί να συνδέεται με την αντιπονεκτίνη, χωρίς κάποιο γνωστό μηχανισμό σηματοδότησης μέχρι τώρα. Γενικά, οι μοριακές μεταβολικές ακολουθίες οι οποίες φαίνεται να ενεργοποιούνται από την αντιπονεκτίνη είναι η ενεργοποιούμενη από το AMP κινάση, οι υποδοχείς PPAR- γ και η p38-MAPK, χωρίς να αποκλείονται και άλλες οδοί.

Η αντιπονεκτίνη είναι η αδιποκίνη που παράγεται στο μεγαλύτερο βαθμό από το λιπώδη ιστό. Ανευρίσκεται στο πλάσμα σε συγκεντρώσεις από 3-30 μg/ml, συνήθως 5-10 μg/ml, με το 50% της συγκέντρωσης να αντιστοιχεί στα υψηλού μοριακού βάρους πολυμερή. Συνιστά το 0,01% του συνόλου των πρωτεϊνών του πλάσματος και σε αντίθεση με τη λεπτίνη, τα επίπεδά της μειώνονται στην παχυσαρκία, την ινσουλινοαντίσταση, το σακχαρώδη διαβήτη, ενώ αντίστοιχα είναι υψηλότερα σε γυναίκες σε σύγκριση με άντρες. Το μέγεθος του λιποκυττάρου και η ανατομική προέλευση του ιστού επηρεάζουν την παραγωγή της, με το σπλαχνικό λιπώδη ιστό να σχετίζεται με χαμηλότερα επίπεδα αντιπονεκτίνης. Τα επίπεδα αντιπονεκτίνης αυξάνονται κυρίως με την απώλεια βάρους, μετά από τη χορήγηση ινσουλίνης, μετά από θεραπεία με γλιταζόνες και σε μικρότερο βαθμό, με θεραπεία με φιμπράτες ή αυξητική ορμόνη. Αντιθέτως, μειώνονται από την πρόσληψη βάρους, τα γλυκοκορτικοειδή και τον TNF- α ⁹⁷.

Η αντιπονεκτίνη θεωρείται ιδιαίτερα ευεργετική αδιποκίνη, αφού βελτιώνει την ινσουλινοαντίσταση και εμφανίζει αντιαθηρογόνες ιδιότητες⁹⁸. Επιδημιολογικές μελέτες έδειξαν ότι τα επίπεδά της και κάποιοι πολυμορφισμοί του γονιδίου της σχετίζονται αρνητικά με την εμφάνιση σακχαρώδη διαβήτη⁹⁹⁻¹⁰¹. Σε ασθενείς με ΣΔ, η μακροαγγειοπάθεια συνοδεύεται από χαμηλά επίπεδα αντιπονεκτίνης¹⁰². Ποντίκια στα οποία αποσιωπείται γενετικά το γονίδιο της, εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα γλυκόζης, ινσουλίνης και αντίσταση στη δράση της τελευταίας, μετά από διατροφή πλούσια σε λίπος και σουκρόζη¹⁰³⁻¹⁰⁵. Αντίθετα, παχύσαρκα ποντίκια που προσβάλλονται από αδενοϊό ώστε να την υπερεκφράζουν, εμφανίζουν μειωμένη πρόσληψη τροφής και συνακόλουθα μείωση του σωματικού βάρους, της γλυκόζης και βελτίωση του λιπιδαιμικού προφίλ^{98, 106}.

Σε προοπτικές και διαστρωματικές μελέτες, τα υψηλά επίπεδα αντιπονεκτίνης συσχετίστηκαν με χαμηλότερο κίνδυνο για την εμφάνιση ΚΑΝ¹⁰⁷⁻¹⁰⁹. Οι συσχετίσεις αυτές ήταν ανεξάρτητες από τους κλασσικούς παράγοντες κινδύνου, όπως η υπέρταση ή ο ΣΔ. Σε *in vivo* μελέτες, ποντίκια που δεν εκφράζουν την απολιποπρωτεΐνη Ε και υπερεκφράζουν το γονίδιο της αντιπονεκτίνης προστατεύονται από αθηροσκλήρωση, ενώ τρωκτικά που δεν κωδικοποιούν το γονίδιο της εμφανίζουν υπερπλασία του διάμεσου χιτώνα των αγγείων. Τα αθηροπροστατευτικά αυτά αποτελέσματα οφείλονται τόσο στις αντιδιαβητικές της ιδιότητες, όσο και σε πλειοτροπικές δράσεις κυρίως στο ενδοθήλιο. Πιο συγκεκριμένα, η αντιπονεκτίνη αυξάνει το NO, αναστέλλει την παραγωγή των προσκολλητικών μορίων ICAM-1, VCAM-1 και Ε-σελεκτίνης από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Οι αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της αντιπονεκτίνης αφορούν τη μείωση του TNF-α, της IFN-γ, ορισμένων μεταλλοπρωτεϊνών και την αύξηση της IL-10 και του IL-1RA. Ειδικότερα για τον TNF-α, η αντιπονεκτίνη, εκτός από τη μείωση της παραγωγής του TNF-α από μακροφάγα, αναστέλλει και τις αθηρογόνες δράσεις του διαμέσου καταστολής της σηματοδότησης του NF-Κβ. Πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι η αντιπονεκτίνη επηρεάζει τα μακροφάγα ελαττώνοντας την πρόσληψη της οξειδωμένης LDL και τη μετατροπή τους σε αφρώδη κύτταρα. Όσον αφορά τα άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, η αντιπονεκτίνη μειώνει τη στρατολόγηση των Τ-λεμφοκυττάρων και την παραγωγή κυτοκινών από τα μονοκύτταρα. Η πολυπλοκότητα των δράσεών της δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί, αλλά πιθανά οφείλεται στις διαφορετικές μορφές της και την παρουσία των δύο υποδοχέων σε διάφορους ιστούς και κύτταρα

1.3.7 Βισφατίνη

Η βισφατίνη θεωρείται εξίσου σημαντική αδιποκίνη. Πρόκειται για μία πρωτεΐνη 52 kDa που παράγεται κυρίως από το σπλαχνικό λιπώδη ιστό και αποτελεί ένα από τους συνδετικούς κρίκους ανάμεσα στην κοιλιακή παχυσαρκία και στις επιπτώσεις της. Το γονίδιο της βρίσκεται στο χρωμόσωμα 7¹¹⁰. Κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη αποτελούμενη από 2 μονομερή, που το καθένα έχει πολλαπλές α-έλικες¹¹¹,¹¹². Αν και μόλις το 2005 μία ερευνητική ομάδα από την Ιαπωνία αναφέρθηκε για πρώτη φορά σε αυτή ως αδιποκίνη, η βισφατίνη ήταν ήδη γνωστή ως παράγοντας αύξησης των αποικιών των πρώιμων Β λεμφοκυττάρων που εκκρίνεται από λεμφοκύτταρα (pre-beta colony enhancing factor – PBEF)¹¹³. Είναι ακόμη γνωστή ως φωσφοριβοσυλτρανσφεράση του νικοτιναμιδίου (nampt), ένα ένζυμο που συμμετέχει στη βιοσύνθεση του νικοτιναμινοδινουκλεοτιδίου (NAD) από το νικοτιναμίδιο^{111, 112}. Παράγεται εκτός από λεμφοκύτταρα και από μεσαγγειακά κύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα, μυοκύτταρα, λιποκύτταρα και μακροφάγα¹¹⁴⁻¹¹⁶. Δεν έχει εξακριβωθεί ακόμη ο ακριβής μηχανισμός δράσης της βισφατίνης, αφού αρχικά πειράματα που έδειξαν ότι συνδέεται και ενεργοποιεί τον υποδοχέα της ινσουλίνης σε διαφορετικό από την ινσουλίνη σημείο, δεν επαληθεύτηκαν στη συνέχεια. Συμφωνία υπάρχει όσον αφορά τις ιδιότητές της να βελτιώνει την ινσουλινοαντίσταση¹¹⁷. Η βισφατίνη επιτείνει την πρόσληψη γλυκόζης σε καλλιέργειες λιποκυττάρων ποντικού και λιποκυττάρων SGBS¹¹⁸. Παρόμοια δράση έχει και σε μυοκύτταρα, ενώ παράλληλα μειώνει την έκκριση γλυκόζης από τα ηπατοκύτταρα και βελτιώνει τη λειτουργία των β-παγκρεατικών κυττάρων διαμέσου ενζυμικής δράσης.

Η βισφατίνη φαίνεται ότι βελτιώνει την ινσουλινοευαισθησία σε ποντίκια που τρέφονται με δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος. Τα αποτελέσματα αυτά

συνοδεύονταν από αύξηση της φωσφορυλίωσης του IRS-1 και της έκφρασης των PPAR- γ και SREBP2. Η υπερέκφρασή της μέσω ένεσης αδενοϊού σε διαβητικά ποντίκια ή η απευθείας χορήγηση ανασυνδυασμένης βισφατίνης μείωσε σημαντικά τα επίπεδα γλυκόζης. Πειραματόζωα με ένα μόνο αλληλόμορφο γονίδιο, είχαν αυξημένη γλυκόζη νηστείας και παθολογική απάντηση σε δοκιμασία φόρτισης με γλυκόζη.

Αυτό που καθιστά τη βισφατίνη περισσότερο ενδιαφέρουσα είναι το γεγονός ότι εμπλέκεται στη διαδικασία της φλεγμονής και της απόπτωσης. Οι Moschen και συνεργάτες, έδειξαν ότι η βισφατίνη επάγει σε μυοκύτταρα την παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως οι IL-1, IL-6 και TNF- α , και αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως οι IL-10 και IL1-RA, ότι αυξάνει την έκφραση μεμβρανικών υποδοχέων των μονοκυττάρων και επίσης ενεργοποιεί T λεμφοκύτταρα. Αναστολή της δράσης της μειώνει τον TNF- α του πλάσματος σε ποντίκια με ενδοτοξιναιμία¹¹⁹, ενώ αντίθετα ενέσιμη ανασυνδυασμένη βισφατίνη αυξάνει σημαντικά τα επίπεδα της IL-6¹¹⁸. Επιπρόσθετα, η βισφατίνη αναστέλλει την απόπτωση των ουδετερόφιλων¹¹⁰ και των μακροφάγων¹²⁰ και αυξάνει την έκκριση PGE₂ και τη σύνθεση μεταλλοπρωτεϊνών από μονοκύτταρα¹²¹. Σε ενδοθηλιακά κύτταρα αυξάνει την έκφραση προσκολλητικών μορίων συμβάλλοντας στη χημειοταξία των λευκοκυττάρων¹²²⁻¹²⁴, ενεργοποιεί μεταλλοπρωτεϊνάσες¹²⁴ και αγγειογενετικούς παράγοντες, όπως ο FGF-2 (fibroblast growth factor 2) και ο VEGF^{124, 125}.

Αξιοσημείωτη είναι η αύξηση των επιπέδων της βισφατίνης που παρατηρήθηκαν σε αρκετές φλεγμονώδεις καταστάσεις, όπως η οξεία πνευμονοπάθεια, η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου, η ψωρίαση, η οστεοαρθρίτιδα και η ρευματοειδής αρθρίτιδα. Πρόσφατα, αναφέρθηκε σε μία ομάδα Αμερικανών Ιαπωνικής καταγωγής, συσχέτιση της

βισφατίνης με τη CRP και την IL-6, αλλά παραδόξως όχι με δείκτες ινσουλινοαντίστασης¹²⁶. Είναι λογικό επομένως να υποθέσει κανείς ότι η βισφατίνη πιθανά συμμετέχει και στη διαδικασία της αθηροσκλήρωσης λόγω των φλεγμονωδών ιδιοτήτων της. Σε εναρμόνιση με αυτή την υπόθεση είναι, σε ανοσοϊστοχημικές μελέτες, η παρουσία βισφατίνης σε αθηρωματικές πλάκες συμπτωματικών ασθενών με στεφανιαία νόσο¹²¹. Η αύξηση της παραγωγής της βισφατίνης από μακροφάγα ασταθών αθηρωματικών βλαβών προτάθηκε ως ένας ακόμη παράγοντας για την περαιτέρω αποσταθεροποίηση της πλάκας¹²¹. Επίσης, σε στεφανιαίες αρτηρίες βοοειδών, η βισφατίνη είχε ως αποτέλεσμα ενδοθηλιακή δυσλειτουργία σχετιζόμενη με τη μετακίνηση λυσοσωμάτων στην κυτταρική μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων και την προαγωγή οξειδοαναγωγικών σημάτων¹²⁷. Επιπρόσθετα, η βισφατίνη, ως ενδοκυτταρικό ένζυμο, μειώνει την απόπτωση των λείων μυϊκών κυττάρων, αυξάνει την επιβίωση και το βαθμό ωρίμανσής τους σε καλλιέργεια¹²⁸, προάγει την περιτύλιξη των λείων μυϊκών κυττάρων γύρω από νεοδιαμορφούμενα αγγεία και εν τέλει την αγγειογένεση *in vivo*. Αντικρουόμενα είναι τα αποτελέσματα που αφορούν στην επίδραση της βισφατίνης στη λειτουργία και την αύξηση της παραγωγή της NOS από ενδοθηλιακά κύτταρα¹²⁹. Η βισφατίνη με ενδοκυτταρικό μηχανισμό μειώνει την απόπτωση των καρδιοκυττάρων, μία επίδραση που φαίνεται ότι έχει καρδιοπροστατευτικό ρόλο, καθώς μειώνει την έκταση του εμφράγματος μετά από ισχαιμία *in vivo*¹³⁰.

Αρκετοί ερευνητές αξιολόγησαν τα επίπεδα της βισφατίνης σε ανθρώπους. Στην πλειοψηφία, οι μελέτες περιορίστηκαν σε ασθενείς με παχυσαρκία, σακχαρώδη διαβήτη και γενικότερα ινσουλινοαντίσταση¹³¹. Ωστόσο, σε αντίθεση με τα δεδομένα σε φλεγμονώδεις καταστάσεις, δεν υπάρχει συμφωνία των αποτελεσμάτων σε όλες τις περιπτώσεις. Συνεπώς, τα δεδομένα όσον αφορά τα επίπεδα της βισφατίνης σε

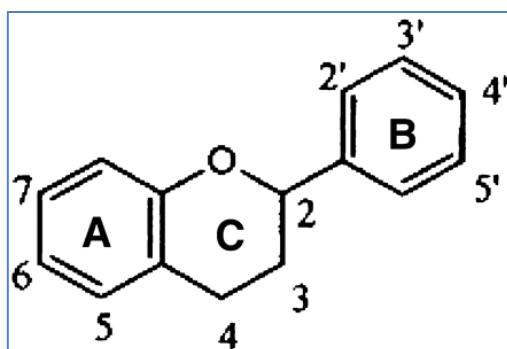
ασθενείς με παχυσαρκία και σε καταστάσεις με αντίσταση στη δράση της ινσουλίνης, όπως το μεταβολικό σύνδρομο, δεν είναι επαρκή. Απαιτούνται περισσότερα δεδομένα για να διευκρινιστεί ο ρόλος της βισφατίνης, καθώς και οι καταστάσεις και τα θεραπευτικά σχήματα που επηρεάζουν τα επίπεδα, την παραγωγή και την έκκριση της βισφατίνης.

1.4 Πολυφαινόλες: φλαβονοειδή & ρεσβερατρόλη

Όπως ήδη αναφέρθηκε, επιδημιολογικές μελέτες υποδηλώνουν μία προστατευτική επίδραση των φρούτων και των λαχανικών έναντι των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Η ιδιότητά τους αυτή αποδίδεται εν μέρει σε αντιοξειδωτικά φαινολικά συστατικά που περιέχουν, ανεξάρτητα από τα γνωστά θρεπτικά συστατικά, όπως είναι οι φυτικές ίνες ή οι βιταμίνες¹³². Οι φυτικές φαινόλες προέρχονται από το αμινοξύ φαινυλαλανίνη διαμέσου της μεταβολικής οδού του σικιμικού οξέος στα φυτά. Ανάλογα με τη χημική δομή τους διακρίνονται σε διάφορες υποκατηγορίες με κοινό χαρακτηριστικό την παρουσία ενός αρωματικού δακτυλίου με ένα ή περισσότερα υδροξύλια¹³². Υπολογίζεται ότι η συνολική ημερήσια πρόσληψη των πολυφαινολών μπορεί να φθάνει ή να ξεπερνάει το 1 γραμμάριο. Η ποσότητα αυτή είναι ιδιαίτερα υψηλή, χαρακτηριστικά, δέκα και εκατό φορές υψηλότερη της μέσης διαιτητικής πρόσληψης βιταμίνης C και E αντίστοιχα¹³³. Από τις πολυφαινόλες, ενδιαφέρον λόγω των ιδιοτήτων τους έχουν τα φλαβονοειδή και η ρεσβερατρόλη.

1.4.1 Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι ίσως η κυριότερη κατηγορία διφαινολικών φυτικών χρωστικών και αποτελούν τις βασικές πολυφαινόλες της ανθρώπινης διατροφής. Απαντώνται συνήθως συζευγμένα με ζάχαρα (γλυκοζυλιωμένα). Η πρώτη αναφορά στη βιβλιογραφία έγινε το 1936 από τους Rusznyak και Szent-Györgi όπου αναφέρονται ως βιταμίνη «P»¹³⁴. Χαρακτηριστικό της δομής τους είναι η παρουσία ενός βενζολικού δακτυλίου (A) συμπυκνωμένου με ένα διυδροπυρανονικό δακτύλιο (C) που στη θέση 2 έχει ένα φαινολικό δακτύλιο ως υποκαταστάτη (B) (Εικόνα 1.9).



Εικόνα 1.9 Βασική δομή των φλαβονοειδών

Ο βασικός αυτός ανθρακικός σκελετός μπορεί θεωρητικά να αποδώσει πάνω από 2.000.000 εκατομμύρια ενώσεις, ενώ τα φλαβονοειδή που έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι τώρα ξεπερνούν τα 6.000^{134, 135}. Διακρίνονται με βάση τη δομή τους σε 6 βασικές κατηγορίες: Φλαβονόλες, φλαβόνες, φλαβανόνες, φλαβανόλες, ανθοκυανιδίνες και ισοφλαβόνες (Εικόνα 1.10)^{136, 137}.

Οι φλαβονόλες είναι οι πιο διαδεδομένες από όλα τα φλαβονοειδή. Κυριότερες είναι η κουερσετίνη και η кемπερόλη. Είναι παρούσες γενικά σε χαμηλές συγκεντρώσεις της τάξεως των 15 έως 30 mg ανά kg βάρους. Πλούσιες πηγές φλαβονολών είναι τα κρεμμύδια, τα μπρόκολα, τα μήλα και τα βατόμουρα. Το κόκκινο κρασί επίσης περιέχει σημαντικές ποσότητες^{136, 137}.

Οι φλαβόνες ανευρίσκονται λιγότερο συχνά και σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε φρούτα και λαχανικά. Οι βασικές φλαβόνες είναι η λουτεολίνη και η απιγενίνη. Το σέλινο και ο μαϊντανός είναι οι κυριότερες πηγές φλαβονών^{136, 137}.

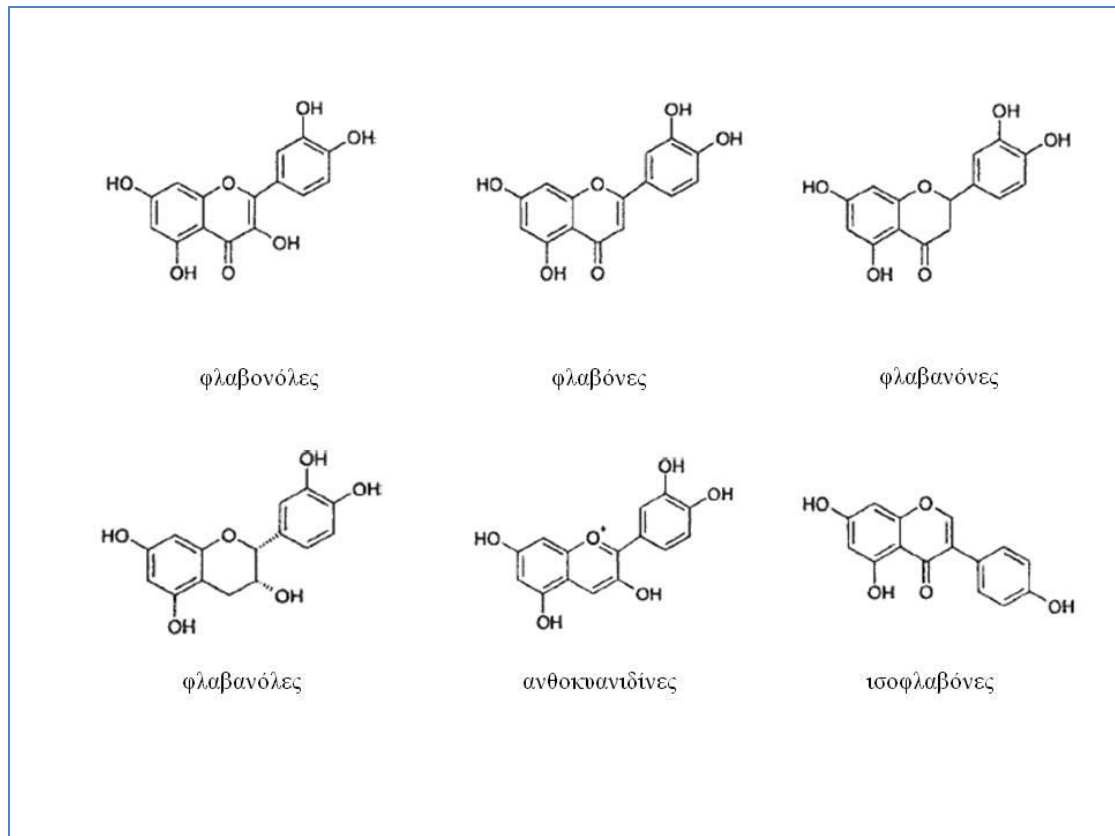
Οι κύριες φλαβανόνες είναι η ναρινγενίνη και η εσπεριτίνη. Τα εσπεριδοειδή έχουν την υψηλότερη περιεκτικότητα σε αυτές τις ουσίες. Ο χυμός πορτοκαλιού

περιέχει από 200 έως 600 mg εσπεριτίνης ανά λίτρο. Όμως, το πορτοκάλι αυτούσιο μπορεί να περιέχει μέχρι και πενταπλάσια ποσότητα^{136, 137}.

Οι φλαβανόλες ανευρίσκονται τόσο ως μονομερή πχ επικατεχίνη και κατεχίνη, όσο και ως ολιγομερή και αυτή την περίπτωση ονομάζονται προανθοκυανιδίνες. Απαντώνται σε πολλά φρούτα, κυρίως όμως σε σταφύλια, στο χυμό σταφυλιών και στο κρασί, στο τσάι, ιδιαίτερα το πράσινο, και στο κακάο. Η κατεχίνη και η επικατεχίνη είναι τα κύρια φλαβονοειδή των φρούτων και του κακάο, ενώ ο γαλλικός εστέρας επικατεχίνης, η γαλλοκατεχίνη, η επιγαλλοκατεχίνη και ο γαλλικός εστέρας επιγαλλοκατεχίνης βρίσκονται κυρίως σε σταφύλια και στο τσάι^{136, 137}.

Οι ανθοκυανιδίνες είναι υδατοδιαλυτές χρωστικές ουσίες, υπεύθυνες για το κόκκινο, πράσινο και ιώδες χρώμα των φρούτων και λαχανικών. Η κυανιδίνη είναι η κυριότερη εκπρόσωπος αυτής της υποκατηγορίας. Τα μούρα και τα σταφύλια είναι ιδιαίτερα πλούσια σε ανθοκυανιδίνες. Βρίσκονται επίσης σε κόκκινο κρασί, σε ορισμένα δημητριακά και σε φυλλώδη και βολβώδη λαχανικά, όπως ο αρακάς, το κρεμμύδι και το ραπανάκι. Τα μαύρα σταφύλια και τα μούρα περιέχουν έως και 600 mg ανθοκυανιδινών ανά 100 gr^{136, 137}.

Οι ισοφλαβόνες είναι φλαβονοειδή με χημική δομή που προσομοιάζει με αυτή των οιστρογόνων. Διαφοροποιούνται από τα υπόλοιπα φλαβονοειδή από τη θέση σύνδεσης του Β δακτυλίου, στη θέση 3 αντί της θέσης 2. Οι τρεις βασικές ισοφλαβόνες είναι η γενιστεΐνη, η νταϊτζεΐνη και η γλυσιτεΐνη. Η σόγια και τα προϊόντα της είναι οι κυριότερες πηγές ισοφλαβονών στην ανθρώπινη διατροφή. Στα φασόλια οι ισοφλαβόνες βρίσκονται ως επί το πλείστον με τη γλυκοζυλιωμένη μορφή τους^{136, 137}.



Εικόνα 1.10 Δομή των βασικών κατηγοριών φλαβονοειδών

1.4.2 Σύνθεση και ρόλος στα φυτά

Τα φλαβονοειδή είναι δευτερεύοντα προϊόντα του μεταβολισμού των φυτών^{135, 138}. Συντίθενται μέσω της μεταβολικής οδού του σικιμικού οξέος και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο. Ορισμένα, κυρίως οι ανθοκυανίνες, ως χρωστικές ουσίες προσελκύουν έντομα, όπως οι μέλισσες και τα πουλιά όπως το κολιμπρί, που χρησιμεύουν στην επικονίαση και τη διασπορά των καρπών. Παράλληλα, τα φλαβονοειδή προάγουν τη γονιμοποίηση με τη διευκόλυνση της προώθησης της γύρης στη σάλπιγγα του λουλουδιού. Ως αντιοξειδωτικές ουσίες, προφυλάσσουν τα φυτά από την υπεριώδη ακτινοβολία, ενώ θεωρούνται επίσης φυτοαλεξίνες, δηλαδή ουσίες που προστατεύουν από μολύνσεις που οφείλονται σε παθογόνους μικροοργανισμούς. Ιδιαίτερης βιολογικής σημασίας θεωρείται ακόμη η συμμετοχή

τους στον ορμονικό μεταβολισμό των φυτών, ως μεταφορείς των φυτικών ορμονών που επάγουν την αύξηση των φυτών, των αυξινών. Αξίζει να τονισθεί ότι η δράση ενός συγκεκριμένου φλαβονοειδούς σε ένα φυτό μπορεί να μην επιβεβαιωθεί σε κάποιο άλλο φυτό, στο οποίο ίσως δρα διαφορετικά ή και καθόλου.

1.4.3 Μεταβολισμός στον άνθρωπο και σε πειραματόζωα

Ο μεταβολισμός τους αποτελεί αντικείμενο εντατικής επιστημονικής μελέτης τα τελευταία χρόνια^{133, 136, 139}. Αν και υπάρχουν αρκετά δεδομένα, ο ακριβής μηχανισμός απορρόφησης – μεταφοράς – μεταβολισμού και απέκκρισης δεν είναι πλήρως κατανοητός. Ορισμένα πειράματα σε αρουραίους έδειξαν ότι η απορρόφηση στο στομάχι είναι δυνατή για ορισμένα μη γλυκοζυλιωμένα φλαβονοειδή, όπως η κουερσετίνη ή η νταϊτζεΐνη. Φαίνεται όμως ότι τα περισσότερα φλαβονοειδή είναι ανθεκτικά στην υδρόλυση στο στομάχι και οι περισσότερες μελέτες συνηγορούν στο ότι απορροφούνται κυρίως με τη μη γλυκοζυλιωμένη μορφή τους στο δωδεκαδάκτυλο και τη νήστιδα, αφού προηγείται ενζυμική υδρόλυση στο λεπτό έντερο από γλυκοσιδάσες. Δεν είναι απολύτως βέβαιο εάν η απορρόφηση γίνεται με παθητική διάχυση ή με ενεργό μεταφορά, ενώ δεν έχει αποκλειστεί και η απορρόφηση άθικτων γλυκοζυλιωμένων φλαβονοειδών. Όσα φλαβονοειδή δεν απορροφούνται στο λεπτό έντερο υδρολύονται από ένζυμα της εντερικής χλωρίδας στο παχύ έντερο και ακολουθεί απορρόφησή τους στο παχύ έντερο. Μόλις τα φλαβονοειδή απορροφηθούν από τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου, υπόκεινται σε γλουκορυνίωση, σουλφωρυλίωση ή μεθυλίωση και στη συνέχεια μεταφέρονται με πρωτεΐνες, κυρίως αλβουμίνη, στο ήπαρ και τους ιστούς για περαιτέρω μεταβολισμό. Η θέση και το μόριο της σύνδεσης στο φλαβονοειδές ποικίλει, γεγονός το οποίο μπορεί να επιφέρει και διαφορές στις χημικές, φυσικές και βιολογικές ιδιότητες του

μορίου^{133, 136, 139}. Η απέκκριση των μεταβολιτών γίνεται είτε μέσω της χολής είτε στα ούρα. Οι εκτενώς συζευγμένοι μεταβολίτες είναι πιο πιθανό να αποβάλλονται μέσω της χολής και οι πιο απλοί μεταβολίτες κυρίως στα ούρα. Ο χρόνος ημίσειας ζωής κυμαίνεται, ανάλογα με το φλαβονοειδές, από λίγες ώρες έως και λίγο παραπάνω από ένα 24ωρο, ένα εύρημα που υποδηλώνει ότι μπορεί να υπάρχει συσσώρευση σε ιστούς, ειδικά όταν υπάρχει συστηματική πρόσληψη¹³⁶. Η βιοδιαθεσιμότητα των βασικών υποκατηγοριών των φλαβονοειδών ποικίλει και εξαρτάται εκτός από τις διαφορές στη δομή τους, από τον τύπο των σακχάρων με τα οποία συνδέονται, που είναι συνηθέστερα γλυκόζη, ραμνόζη ή γαλακτόζη, τον αριθμό των σακχάρων, που συνήθως είναι ένα, και τη θέση σύνδεσης του σακχάρου, κύρια στη θέση 1, από τη περιεκτικότητα του τροφίμου σε ένα συγκεκριμένο φλαβονοειδές και την παρουσία άλλων θρεπτικών συστατικών, όπως του διατροφικού λίπους, της πρωτεΐνης ή του αλκοόλ που ενδέχεται να επηρεάσει την απορρόφηση, το χρόνο διέλευσης από τον εντερικό σωλήνα και την ισορροπία της εντερικής χλωρίδας^{133, 136, 139}.

1.4.4 Πρόσληψη φλαβονοειδών στον άνθρωπο και σε πειραματόζωα

Αρκετές μελέτες προσπάθησαν να εκτιμήσουν τη μέση ημερήσια πρόσληψη φλαβονοειδών στην ανθρώπινη διατροφή. Η συνολική ποσότητα των ολικών φλαβονοειδών ποικίλει σε διάφορες χώρες. Χαρακτηριστικά, μπορεί να κυμαίνεται από περίπου 20 mg ανά ημέρα σε Δανία, Φινλανδία και ΗΠΑ έως και περισσότερα από 70 mg στην Ολλανδία ή 100 mg την Ισπανία, ενώ σε ορισμένες μελέτες υπάρχει και υπολογισμός των επιμέρους φλαβονοειδών^{136, 140, 141}. Οι τιμές αυτές είναι σαφώς χαμηλότερες από εκείνες που είχαν αρχικά εκτιμηθεί και έφθαναν τα μερικές εκατοντάδες mg. Στη Ελλάδα, τα λιγοστά δεδομένα προέρχονται από μελέτες του εργαστηρίου Υγιεινής και Επιδημιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου

Αθηνών¹⁴². Αναλύθηκαν περισσότερα από εκατό παραδοσιακά τρόφιμα και φαγητά όσον αφορά την περιεκτικότητά τους σε φλαβόνες, φλαβονόλες και φλαβανόλες και υπολογίστηκε η απόδοση μιας τυπικής εβδομαδιαίας διατροφής σε φλαβονοειδή. Πρόσφατα, από την ίδια ερευνητική ομάδα εκτιμήθηκε η πρόσληψη αντιοξειδωτικών ουσιών στον ελληνικό πληθυσμό της μελέτης EPIC. Βρέθηκε ότι η συνολική μέση κατανάλωση φλαβονοειδών είναι 92 mg ημερησίως, εκ των οποίων, οι φλαβονόλες συνεισέφεραν 28 mg, οι φλαβόνες 7 mg, οι φλαβανόνες 27 mg, οι φλαβανόλες 16 mg, οι ανθοκυανιδίνες 10 και οι ισοφλαβόνες λιγότερο από 1 mg. Οι προανθοκυανιδίνες, πολυμερή των φλαβανολών, υπολογίσθηκαν χωριστά και στον πληθυσμό της παραπάνω μελέτης ήταν κατά μέσο όρο 87 mg ημερησίως, τη στιγμή που στις ΗΠΑ ήταν 58 mg και στη Φινλανδία 83 mg. Βασικές πηγές των φλαβονοειδών ήταν φρούτα, όπως τα σταφύλια, τα πορτοκάλια, τα πεπόνια, τα κεράσια, οι φράουλες, τα ροδάκινα; μυρωδικά όπως το σέλινο, ο άνηθος και ο μαϊντανός; λαχανικά όπως τα κρεμμύδια, οι πιπεριές, το σπανάκι, η μελιτζάνα, οι ντομάτες και ροφήματα, όπως το τσάι και το κρασί.

Γενικά, ο υπολογισμός της πρόσληψης είναι δύσκολη και πολύπλοκη διαδικασία που μπορεί να έχει μεγάλη απόκλιση ακόμη και στον ίδιο πληθυσμό¹⁴³. Πρόσφατη μελέτη στις ΗΠΑ ανέφερε περίπου εννεαπλάσια πρόσληψη (~190 mg / ημέρα) σε σύγκριση με προηγούμενες μελέτες¹⁴⁴, μία διαφορά που οφείλεται στις φλαβανόλες του τσαγιού. Η πρόσληψη εξαρτάται από τη μεθοδολογία κατά την αξιολόγηση συνολικά των διατροφικών συνηθειών, την επιλογή των φλαβονοειδών προς εκτίμηση, το ποια μέθοδος χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της σύστασης τροφίμων σε φλαβονοειδή και ποια τρόφιμα ερευνώνται ως πηγές φλαβονοειδών^{133, 137, 145}. Για τις υποκατηγορίες των φλαβονοειδών, τα τρόφιμα που συνηθέστερα καταναλώνονται σε κάποια χώρα και μπορεί να είναι πλούσιες πηγές μιας

υποκατηγορίας, είναι αυτά που καθορίζουν τελικά την πρόσληψη^{137, 145}. Έτσι, ενώ στην Ιαπωνία όπου η σόγια αποτελεί βασικό χαρακτηριστικό της διατροφής, η ημερήσια πρόσληψη ισοφλαβονών φθάνει τα 30-40 mg ημερησίως, στο δυτικό κόσμο η αντίστοιχη ημερήσια πρόσληψη είναι μόλις 1-2 mg^{133, 137, 145}. Ιδιαίτερα για την εκτιμώμενη σύσταση τροφών σε φλαβονοειδή, η περιεκτικότητα σε αυτά εξαρτάται από τα εξής: την ανισότητα όσον αφορά την κατανομή τους στους φυτικούς ιστούς, τις διαφορές λόγω ποικιλίας, κλίματος, συνθηκών καλλιέργειας, συγκομιδής, φύλαξης ή πιθανές απώλειες φλαβονοειδών κατά το μαγείρεμα¹⁴³. Χαρακτηριστικά, η κουερσετίνη των μήλων βρίσκεται σχεδόν αποκλειστικά στη φλούδα. Επίσης, η φύλαξη των κρεμμυδιών μειώνει κατά 25-33% την κουερσετίνη κατά τις πρώτες 12 ημέρες, αλλά ελάχιστα μετέπειτα, ενώ οι φλαβανόλες του τσαγιού μειώνονται δραματικά κατά τη διαδικασία ωρίμανσης-οξειδωσης των πράσινων φύλλων σε μαύρο τσάι. Παρόλα αυτά, ο υπολογισμός της πρόσληψης με βάση πίνακες τροφίμων θεωρείται ένα αρκετά αξιόπιστο και χρήσιμο εργαλείο. Τέτοιοι πίνακες έχουν συσταθεί και δημοσιευτεί από το Αμερικανικό Υπουργείο Γεωργίας και πιο πρόσφατα και στον ευρωπαϊκό χώρο^{133, 137, 145}.

1.4.5 Βιολογικές δράσεις των φλαβονοειδών

Τα φλαβονοειδή ως πολυφαινόλες διακρίνονται για τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες: Δρουν ως εκκαθαριστές ελευθέρων ριζών αφού προσφέρουν ηλεκτρόνια, επιδρούν σε ένζυμα και δεσμεύουν μέταλλα μετάπτωσης, όπως ο χαλκός και ο σίδηρος. Εικάζεται ότι λόγω των παραπάνω ιδιοτήτων τα φλαβονοειδή παρουσιάζουν αξιοσημείωτες δράσεις σε διάφορα πειραματικά μοντέλα: Φέρονται να έχουν αντιφλεγμονώδεις, αντιϊκές, αντιμικροβιακές, ηπατοπροστατευτικές, νευροπροστατευτικές, αντιδιαβητικές, αντιθρομβωτικές και αντικαρκινικές

δράσεις^{135, 146}. Πολλές από αυτές τις δράσεις έχουν επιβεβαιωθεί σε επιδημιολογικές μελέτες, στις οποίες η πρόσληψη φλαβονοειδών συσχετίστηκε με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης άσθματος και κάποιων μορφών καρκίνου, όπως του λάρυγγα, του πνεύμονα, του παγκρέατος, του παχέος εντέρου και του non-Hodgkin λεμφώματος¹⁴⁷
132, 148-151.

1.4.6 Φλαβονοειδή και αθηροσκλήρωση

Η διατροφή σχετίζεται με καρδιαγγειακά νοσήματα, επομένως είναι λογικό η επιστημονική κοινότητα να έχει στραφεί στην ανεύρεση εκείνων των θρεπτικών συστατικών που δρουν καρδιοπροστατευτικά και δυνητικά μπορούν να αποτελέσουν ελκυστικά θεραπευτικά μέσα. Τα φλαβονοειδή είναι ανάμεσα σε αυτά τα θρεπτικά συστατικά. Επιδημιολογικές μελέτες έδειξαν ότι η υψηλή πρόσληψη φλαβονοειδών ή τροφίμων, όπως το τσάι, το κακάο ή το κόκκινο κρασί που είναι πλούσια σε φλαβονοειδή, μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων. Τα πρώτα δεδομένα για μείωση της θνησιμότητας από στεφανιαία νόσο προήλθαν από την προοπτική μελέτη Zutphen των ηλικιωμένων στην Ολλανδία¹⁵². Ο σχετικός κίνδυνος ήταν περίπου 70% χαμηλότερος για άντρες που κατανάλωναν 30 mg φλαβονοειδών ανά ημέρα. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και από ανάλυση της μελέτης των 7 χωρών και σε άλλους πληθυσμούς¹⁵³, όπου υπολογίστηκε ότι μειωμένη πρόσληψη φλαβονοειδών εξηγεί περίπου το 8% των στεφανιαίων επεισοδίων. Παρόμοια ποσοστά προέκυψαν και στη μελέτη του Rotterdam σε 4807 άνδρες και γυναίκες¹⁵⁴. Από τον ευρωπαϊκό χώρο, 2 ακόμη μελέτες από τη Φινλανδία εξέτασαν τα αποτελέσματα μίας διατροφής πλούσιας σε φλαβονοειδή^{155, 156}. Το ποσοστό μείωσης όσον αφορά την εμφάνιση της στεφανιαίας νόσου κυμάνθηκε από 25 έως 35%, ανάλογα με το στατιστικό μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε. Στις ΗΠΑ, 2 μεγάλες

κοορτές επίσης έδειξαν θετική επίδραση των φλαβονοειδών όσον αφορά τη μείωση της εμφάνισης ΚΑΝ^{157, 158}. Σε άλλη μελέτη στις ΗΠΑ σε > 38.000 γυναίκες με διάρκεια 6,9 έτη, δεν βρέθηκε επίδραση των φλαβονοειδών στην ΚΑΝ¹⁵⁹, όπως και στη μελέτη των νοσοκόμων (Nurses' Health Study)¹⁶⁰, γεγονός που υποδηλώνει πιθανές επιδράσεις του φύλου, της ηλικίας και της εμμηνόπαυσης στις γυναίκες. Η χρονική διάρκεια της μελέτης, δηλαδή ο συνολικός χρόνος που καταναλώνονται τα φλαβονοειδή, μπορεί επίσης να επηρεάσει το αποτέλεσμα όσον αφορά την ευεργετική δράση των φλαβονοειδών. Τέλος, φαίνεται ότι το αποτέλεσμα εξαρτάται επίσης από τη συνολική πρόσληψη φλαβονοειδών, τον τρόπο υπολογισμού της καθώς και το ποια και πόσα φλαβονοειδή μελετούνται. Σε αντίθεση με τα παραπάνω, θετική συσχέτιση μεταξύ της πρόσληψης φλαβονοειδών και της εμφάνισης ΚΑΝ αναφέρθηκε σε μια μελέτη από την Ουαλία σε 1900 άντρες¹⁶¹, γεγονός που αποδόθηκε κύρια στην επίδραση κοινωνικο-οικονομικών παραγόντων. Αντίστοιχα, όπως για τη στεφανιαία νόσο, αναφέρεται αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στην πρόσληψη φλαβονοειδών και την εμφάνιση των ισχαιμικών αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων, παρότι αυτό το εύρημα δεν επιβεβαιώνεται σε όλες τις μελέτες^{132, 162}. Σε πρόσφατη μετα-ανάλυση 7 μελετών το ποσοστό μείωσης καρδιαγγειακών θανάτων έφθανε το 20% στο υψηλότερο τεταρτημόριο πρόσληψης φλαβονοειδών σε σύγκριση με το χαμηλότερο¹⁶³. Σε μερικές από τις παραπάνω μελέτες μελετήθηκαν και επιμέρους υποκατηγορίες φλαβονοειδών με παρόμοια αποτελέσματα. Επίσης, σημαντικά είναι τα ευρήματα που αφορούν την αρνητική συσχέτιση των προσλαμβανόμενων φλαβονοειδών με τα επίπεδα της αρτηριακής πίεσης, την αθηρωμάτωση των καρωτίδων καθώς και με δείκτες ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας¹⁶⁴⁻¹⁶⁷. Βέβαια, αν και οι επιδημιολογικές μελέτες αποτελούν ισχυρές ενδείξεις για τη επίδραση των φλαβονοειδών, έχουν και μειονεκτήματα, ακριβώς γιατί υποδεικνύουν

συσχετίσεις. Δεν αποδεικνύουν σχέση αιτίας-αποτελέσματος, ενώ το στατιστικό σφάλμα (bias) πρέπει επίσης να λαμβάνεται υπόψη. Για παράδειγμα μπορεί το μέγιστο της ευεργετικής δράσης να υπάρχει ήδη από τη μικρότερη πρόσληψη ή οι συμμετέχοντες, ιδιαίτερα εκείνοι με τις χειρότερες υγεινοδιαιτητικές συνήθειες, να αποκρύπτουν τις πραγματικές διατροφικές τους συνήθειες.

Ερευνητικές προσπάθειες να ερμηνευτούν τα αποτελέσματα των επιδημιολογικών μελετών κατέδειξαν ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Οι ευεργετικές επιδράσεις των φλαβονοειδών προέκυψαν σε όλα τα επίπεδα της παθοφυσιολογίας της αθηροσκληρωτικής νόσου¹⁶⁸⁻¹⁷¹: Τα φλαβονοειδή έχουν την ιδιότητα να ευοδώνουν τη λειτουργία του ενδοθηλίου μέσω της αύξησης της συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου από μακροφάγα και ενδοθηλιακά κύτταρα. Η συνακόλουθη αύξηση του μονοξειδίου του αζώτου συνοδεύεται από αγγειοδιαστολή και επιδράσεις στα λευκοκύτταρα και τα λεία μυϊκά κύτταρα. Παράλληλα, τα φλαβονοειδή μειώνουν την παραγωγή των προσκολλητικών μορίων ICAM-1, VCAM-1 και E-σελεκτίνης από ενδοθηλιακά κύτταρα, αποτρέποντας τη στρατολόγηση λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο. Παρουσιάζουν επίσης αντιφλεγμονώδεις δράσεις, αφού αναστέλλουν ένζυμα, όπως η λιποξυγενάση και η κυκλοξυγενάση, με συνέπεια τη μείωση του αραχιδονικού οξέος και του καταρράκτη της φλεγμονής που σχετίζεται με τα εικοσανοειδή. Αυτή τους η ιδιότητα, σε συνδυασμό με τη αύξηση του NO και τη μείωση του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF), φαίνεται ότι ευθύνεται για τη μειωμένη προσέλκυση, ενεργοποίηση και συγκόλληση των αιμοπεταλίων που τελικά συνοδεύεται από μείωση της θρομβογένεσης. Επίσης τα φλαβονοειδή μειώνουν τους VEGF, FGF και τις μεταλλοπρωτεϊνάσες MMP-2 και -9, που συμμετέχουν στην αγγειογένεση, όπως και τον PDGF που ευθύνεται για τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων και την υπερπλασία του αρτηριακού

τοιχώματος. Σημαντική θεωρείται και η κινητοποίηση από τα φλαβονοειδή των προγονικών ενδοθηλιακών κυττάρων που σχετίζονται με την επιδιόρθωση ενδοθηλιακών βλαβών. Τέλος, μέσω μηχανισμών που ήδη αναφέρθηκαν, προστατεύουν την LDL από οξείδωση. Όπως είναι γνωστό, η οξειδωμένη LDL είναι περισσότερο αθηρογόνος διότι προσλαμβάνεται από μακροφάγα που μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα. Σε ορισμένες μελέτες σε πειραματόζωα, η πρόσληψη φλαβονοειδών συνδέεται με βελτίωση του λιπιδαιμικού προφίλ. Ο τεράστιος αριθμός των φλαβονοειδών σε συνάρτηση με τις διαφορές στη δομή τους και την πολυπλοκότητα της βιοδιαθεσιμότητάς τους, καθιστά δύσκολο να προσδιοριστούν τα περισσότερο δραστικά και ίσως δικαιολογεί γιατί μία δράση ενός συγκεκριμένου φλαβονοειδούς δεν επιβεβαιώνεται και από κάποιο άλλο.

Τα ευρήματα αυτά έχουν εν μέρει επιβεβαιωθεί και σε κλινικές μελέτες, στις οποίες συνηθέστερα χρησιμοποιήθηκαν τροφές πλούσιες σε κάποια κατηγορία φλαβονοειδών, όπως για παράδειγμα οι κατεχίνες του πράσινου τσαγιού ή οι φλαβανόλες του κακάο και σπανιότερα απομονωμένα φλαβονοειδή^{164, 172}. Οι πιο σημαντικοί παράγοντες κινδύνου οι οποίοι μελετήθηκαν ήταν η αρτηριακή πίεση, τα επίπεδα των λιπιδίων, καθώς και η λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων και του ενδοθηλίου. Σε πρόσφατες μελέτες ανασκόπησης φαίνεται ότι υπάρχουν μεικτά αποτελέσματα, λόγω της ετερογένειας των μελετών. Κυριότερα προβλήματα των μελετών είναι ο μικρός αριθμός συμμετεχόντων, η μικρή διάρκεια και τα διαφορετικά φλαβονοειδή που μελετώνται, χωρίς πάντα να υπολογίζεται με ακρίβεια η ποσότητα φλαβονοειδών που προσλαμβάνεται. Ειδικά όταν εξετάζεται κάποιο τρόφιμο δεν είναι ξεκάθαρο αν τα φλαβονοειδή αυτά καθαυτά ή άλλα ενεργά συστατικά είναι υπεύθυνα για τα παρατηρούμενα αποτελέσματα. Ενδεικτικά πάντως υπολογίζεται ότι άτομα χαμηλού κινδύνου ωφελούνται αφού παρατηρείται αύξηση της διατασιμότητας

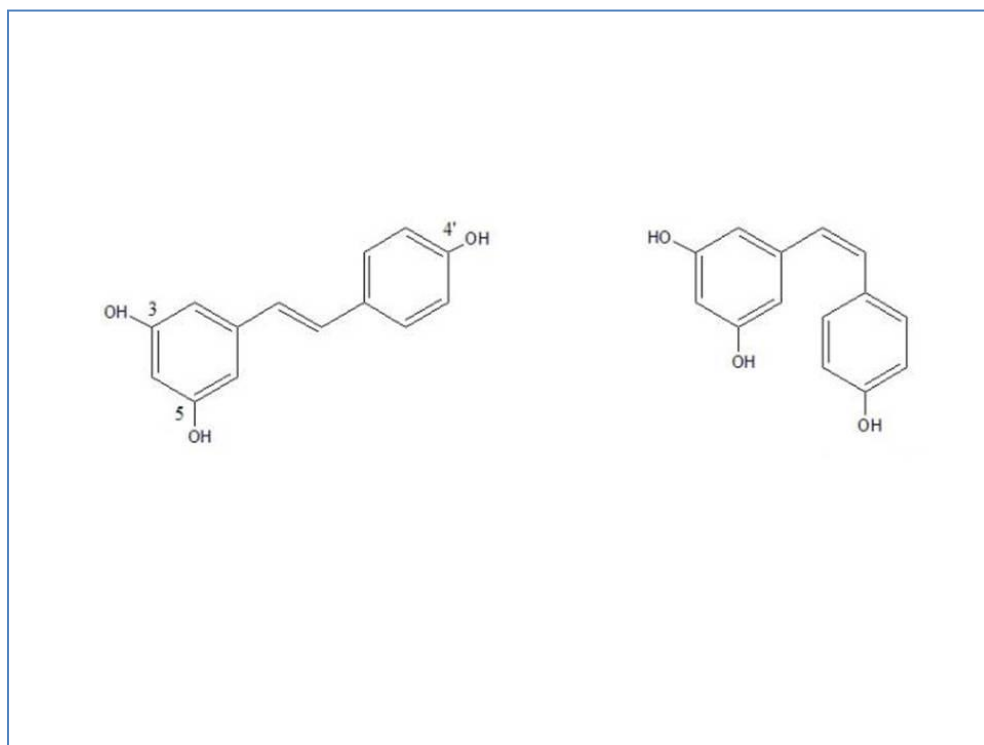
των αγγείων (flow-mediated dilatation, FMD), ενός δείκτη της ενδοθηλιακής λειτουργίας, κατά 1,4% μετά από χρόνια κατανάλωση 50 γρ μαύρης σοκολάτας πλούσιας σε φλαβονοειδή¹⁶⁴. Επίσης, μετά από χρόνια κατανάλωση 50 γρ μαύρης σοκολάτας μειώνεται η συστολική ΑΠ κατά 5,9 mm Hg και κατ' επέκταση η πιθανότητα εμφάνισης ενός αγγειακού εγκεφαλικού κατά 8% και η στεφανιαία θνησιμότητα κατά 5%¹⁶⁴. Το πράσινο τσάι, που είναι επίσης πλούσιο σε κατεχίνες, μειώνει κατά ~0,2 mmol/L την LDL χοληστερόλη και η μείωση αυτή μπορεί να μειώσει κατά 6% τα στεφανιαία επεισόδια¹⁶⁴. Παρά τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα, μέχρι στιγμής δεν υπάρχει κάποια μελέτη με τελικό καταληκτικό σημείο καρδιαγγειακό σύμβαμα ή θάνατο. Κρίνεται λοιπόν επιβεβλημένο στο μέλλον να σχεδιαστούν και να πραγματοποιηθούν μελέτες μεθοδολογικά άρτιες ώστε να υπάρξουν σαφή συμπεράσματα.

1.4.7 Ρεσβερατρόλη

Η ευνοϊκή επίδραση του κόκκινου κρασιού και το «Γαλλικό παράδοξο» κινητοποιήσαν την επιστημονική κοινότητα, που αναζήτησε την αιτία πίσω από τις θετικές επιδράσεις του¹⁷³. Η πλειοψηφία συνέκλινε στη ρεσβερατρόλη ως πιθανή δραστική ουσία¹⁷⁴. Η ρεσβερατρόλη ανήκει στην οικογένεια των στιλβενίων. Απαντάται σε 2 μορφές, την cis και την trans, με συνηθέστερη τη δεύτερη, είτε ελεύθερη είτε συνδεδεμένη με άλλα μόρια (Εικόνα 1.11). Παράγεται από μικρό αριθμό φυτών ως απάντηση στο στρες¹⁷⁴ και συγκεκριμένα, ως φυτοαλεξίνη, προφυλάσσει το φυτό από μολύνσεις και την υπεριώδη ακτινοβολία. Η ρεσβερατρόλη και κάποια ανάλογά της ανιχνεύονται στα παρακάτω είδη: στα σταφύλια, στα μούρα της οικογένειας Vaccinium (πχ τα βατόμουρα, τα μύρτιλλα, τα κράνα, κτλ), στον ευκάλυπτο, στα φιστίκια και άλλα¹⁷⁴. Η περιεκτικότητα των πηγών της ρεσβερατρόλης σε αυτή ποικίλει και εξαρτάται από τις συνθήκες καλλιέργειας, το κλίμα, τη μόλυνση από μικροοργανισμούς, την υπεριώδη ακτινοβολία και τέλος, τον τρόπο παραγωγής και την ποικιλία όσον αφορά το κρασί.

Στην ανθρώπινη διατροφή δεν υπάρχουν σαφείς εκτιμήσεις για την ημερήσια πρόσληψη ρεσβερατρόλης, υπολογίζεται όμως σε λιγότερο από 1 mg ημερησίως¹⁷⁵. Η απορρόφηση, η μεταφορά, ο μεταβολισμός και η απέκκριση της έχει μελετηθεί σε πειραματόζωα και ανθρώπους τόσο in vitro όσο και in vivo, ωστόσο, η βιοδιαθεσιμότητά της δεν είναι απόλυτα κατανοητή¹⁷⁴. Πιστεύεται ότι η νήστιδα, και δευτερευόντως ο ειλεός, είναι τα σημεία που απορροφάται ελεύθερη ή συζευγμένη με άλλα μόρια, σε ποσοστό που ποικίλει από 6 έως 75%, ενώ το υπόλοιπο αποβάλλεται με τα κόπρανα¹⁷⁶. Η ρεσβερατρόλη κυκλοφορεί στο πλάσμα και μεταβολίζεται στα εντεροκύτταρα και το ήπαρ, ενώ ένα μέρος της αποβάλλεται με τη χολή, από το

οποίο, κάποιο ποσοστό μπορεί να επαναπορροφηθεί. Νεφρική απέκκριση στα ούρα παρατηρείται μέσα στο πρώτο 24ωρο.



Εικόνα 1.11 Δομή trans- και cis-ρεσβερατρόλη

Επιδημιολογικές μελέτες αντίστοιχες με εκείνες για τα φλαβονοειδή δεν υπάρχουν. Η απουσία τέτοιων μελετών οφείλεται εν μέρει στο γεγονός ότι δεν υπάρχουν αξιόπιστα εργαλεία ελέγχου της πρόσληψης ρεσβερατρόλης, όμως έχουν περιγραφεί αντικαρκινικές, νευροπροστατευτικές, αντιαρθριτικές, αντιδιαβητικές, αντιαθηρογόνες, αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές ιδιότητες^{174, 177, 178}. Οι αντιαθηρογόνες ιδιότητες αφορούν ενδεχόμενη επίδραση στα λιπίδια, τα αιμοπετάλια, τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, καθώς και στο ενδοθήλιο¹⁷⁹⁻¹⁸².

Πράγματι, μελέτες έδειξαν ότι η ρεσβερατρόλη προφυλάσσει απομονωμένες καρδιές αρουραίων από ισχαιμία, καθώς και ότι διαστέλλει απομονωμένους αορτικούς δακτυλίους και αρτηρίες. Επιπρόσθετα, εμποδίζει τη συσσώρευση και τη

συγκόλληση των αιμοπεταλίων με σύνθετους μηχανισμούς τόσο σε καλλιέργειες κυττάρων όσο και σε αρουραίους¹⁸⁰. Οι δράσεις αυτές αποδίδονται στην επίδρασή της σε αγγειοσυσταλτικούς και αγγειοδιασταλτικούς μηχανισμούς, όπως ο μεταβολισμός του μονοξειδίου του αζώτου/συνθάσης του NO, όσο και ο μεταβολισμός των προσταγλανδινών και της ενδοθηλίνης¹⁸². Πρόσφατα ευρήματα έδειξαν ότι η ρεσβερατρόλη δρα ως ισχυρός ενεργοποιητής της μιτοχονδριακής βιογένεσης και επηρεάζει το μεταβολισμό των ενδοθηλιακών κυττάρων των στεφανιαίων αρτηριών¹⁸⁰ και με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται προστασία του ενδοθηλίου. Επίσης σε συγκεντρώσεις 100 μM αναστέλλει την πρόσληψη χοληστερόλης από τα μακροφάγα μέσω της αύξησης της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στη μεταφορά της χοληστερόλης¹⁸³. Όσον αφορά το λιπιδαιμικό προφίλ, αρκετές μελέτες έδειξαν ότι η χορήγησή της σε πειραματόζωα μειώνει σημαντικά την LDL χοληστερόλη, τα τριγλυκερίδια και τη σύνθεση λιπιδίων στο ήπαρ, ενώ αυξάνει την HDL χοληστερόλη¹⁸². Επιπρόσθετα, η ρεσβερατρόλη προστατεύει την LDL από την οξειδωτική δράση των ελευθέρων ριζών και του χαλκού¹⁸⁴. Οι αντιφλεγμονώδεις δράσεις της που σχετίζονται με αθηροσκλήρωση αφορούν τη μείωση της συσσώρευσης και της ενεργοποίησης των λευκοκυττάρων: Η ρεσβερατρόλη σε μικρές συγκεντρώσεις μείωσε τα επίπεδα των προσκολλητικών μορίων ICAM-1 και VCAM-1 από το ενδοθήλιο και κατέστειλε την έκκριση ιντερλευκινών από τα μακροφάγα^{181, 182}. Αρκετές αναφορές υπάρχουν όσον αφορά την αντιοξειδωτική της ικανότητα, αφού αυξάνει την ενεργότητα ενζύμων, όπως η δισμουτάση του υπεροξειδίου, η καταλάση, η αναγωγή και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και μειώνει τις ελεύθερες ρίζες¹⁸². Μία νέα επίδραση αφορά στη βελτίωση της λειτουργικότητας των ενδοθηλιακών προγονικών κυττάρων, τα οποία προστατεύει από τον TNF- α ¹⁸⁵. Όλες οι παραπάνω δράσεις της πιθανά εξηγούν και τη μείωση των

αθηροσκληρωτικών βλαβών σε apoE^{-/-} ποντίκια¹⁸⁶. Τέλος, μεγάλο κλινικό ενδιαφέρον παρουσιάζουν μελέτες που έδειξαν αντιδιαβητικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της ρεσβερατρόλης, μόνης ή ως συστατικό κρασιού ή και μείγματος αντιοξειδωτικών, ή αναλόγων της σε ανθρώπους^{187, 185, 187} και άλλες μελέτες που έδειξαν ότι προκαλεί αύξηση του προσδόκιμου ζωής σε σακχαρομούκτες, σε σκουλήκια, σε δροσόφιλα και σε ποντίκια¹⁸⁸⁻¹⁹¹.

1.5 Σκοπός της μελέτης

Η παχυσαρκία συσχετίζεται με αυξημένη προδιάθεση για την εμφάνιση αθηροσκλήρωσης και αυξημένη επίπτωση στεφανιαίας νόσου. Ο λιπώδης ιστός είναι ενεργός μεταβολικά ιστός που παράγει κυτταροκίνες που ονομάζονται αδιποκίνες. Οι μηχανισμοί για την εμφάνιση της στεφανιαίας νόσου σε ασθενείς με παχυσαρκία που έχουν προταθεί είναι η αυξημένη εναπόθεση λίπους, κυρίως σπλαχνικού, και τα παθολογικά επίπεδα των αδιποκινών. Αξίζει να σημειωθεί ότι ορισμένες αντιοξειδωτικές πολυφαινολικές ουσίες, σύμφωνα με όσα έδειξαν μεγάλες επιδημιολογικές μελέτες, όπως είναι τα φλαβονοειδή και η ρεσβερατρόλη, που υπάρχουν σε διάφορες τροφές, ιδιαίτερα σε φρούτα και λαχανικά, φαίνεται ότι προστατεύουν από καρδιαγγειακά συμβάματα.

Παρουσιάζει, λοιπόν, ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον η διερεύνηση της συσχέτισης της πρόσληψης των φλαβονοειδών της διατροφής με κλινικούς και βιοχημικούς δείκτες σε άτομα με παχυσαρκία, όσο και η εκτίμηση της επίδρασης των παραπάνω παραγόντων σε κυτταρικό επίπεδο σε ανθρώπινα λιποκύτταρα, οι μεταβολικές διαταραχές των οποίων πιστεύεται ότι αποτελούν κομβικό σημείο στην παθοφυσιολογία τόσο της παχυσαρκίας, όσο και της αθηροσκλήρωσης. Επιπρόσθετα, ο ρόλος της βισφατίνης στην παχυσαρκία και το μεταβολικό σύνδρομο, αν και σημαντικός, δεν έχει μελετηθεί πλήρως και χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Φλαβονοειδή και παχυσαρκία

2.1.1. Πληθυσμός της μελέτης

Τον πληθυσμό της μελέτης για τη διερεύνηση της συσχέτισης μεταξύ της πρόσληψης φλαβονοειδών και των κλινικών και βιοχημικών δεικτών σε ασθενείς με παχυσαρκία, αποτέλεσαν ασθενείς του τακτικού Εξωτερικού Ιατρείου των διαταραχών των Λιπιδίων και Παχυσαρκίας της Β' Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, που προσήλθαν στο ιατρείο με σκοπό την απώλεια βάρους. Κριτήρια αποκλεισμού από τη μελέτη ήταν η παρουσία ΔΜΣ < 27 kg/m², ηλικία < 18 ετών και η εγκυμοσύνη. Από τη μελέτη αποκλείστηκαν επίσης ασθενείς οι οποίοι έπαιρναν φάρμακα τα οποία επηρεάζουν το μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών (διουρητικά, β-αποκλειστές, υπολιπιδαιμικά φάρμακα, ορμόνες κ.α) και τα άτομα που παρουσίαζαν κλινικά, εργαστηριακά ή ηλεκτροκαρδιογραφικά ευρήματα στεφανιαίας νόσου. Στην πρώτη επίσκεψη ελήφθη πλήρες ιατρικό ιστορικό και δείγμα αίματος, ενώ έγινε κλινική εξέταση και καταγράφηκαν αναλυτικά οι αυξομειώσεις του σωματικού βάρους, πιθανές εκούσιες προσπάθειες απώλειας βάρους κατά το παρελθόν και οι διατροφικές συνήθειες των ασθενών με τη μορφή απλής συνέντευξης. Καταγράφηκαν ακόμη η κατάσταση της εμμήνου ρύσεως στις γυναίκες και οι καπνιστικές συνήθειες. Μετεμμηνοπαυσιακές θεωρήθηκαν οι γυναίκες άνω των 40ετών που ανέφεραν διακοπή της εμμήνου ρήσεως. Καπνιστές θεωρήθηκαν τα άτομα που ανέφεραν ότι καπνίζουν τσιγάρα ή καπνό και μη καπνιστές τα άτομα που δεν έχουν καπνίσει ποτέ ή το είχαν διακόψει για τουλάχιστον ένα έτος εφόσον κάπνιζαν. Επιπλέον, συμπληρώθηκε με την καθοδήγηση

εκπαιδευμένου διαιτολόγου ένα ερωτηματολόγιο συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων (ΕΣΚΤ).

Το βάρος μετρήθηκε σε χιλιόγραμμα με ακρίβεια ενός δεκαδικού με Tanita BF600 χωρίς παπούτσια και χωρίς περιττό ρουχισμό. Το ύψος μετρήθηκε με ακρίβεια εκατοστού με επιτοίχιο αναστημόμετρο Seca 206 χωρίς παπούτσια. Ο δείκτης μάζας σώματος (ΔΜΣ) υπολογίστηκε ως το πηλίκο του βάρους σε χιλιόγραμμα προς το τετράγωνο του ύψους σε μέτρα, με ακρίβεια ενός δεκαδικού ψηφίου.

Η περίμετρος μέσης και η περίμετρος γοφών μετρήθηκαν με ταινία μέτρησης περιφέρειας Seca 201 με ακρίβεια εκατοστού και ενός δεκαδικού ψηφίου στο επίπεδο της μέσης απόστασης μεταξύ του κατώτερου άκρου των πλευρών και της λαγόνιας ακρολοφίας και στο επίπεδο των μειζόνων τροχαντήρων αντίστοιχα, με τον εξεταζόμενο όρθιο σε εκπνοή και την ταινία οριζόντια και ρυθμισμένη σε τέτοιο μήκος ώστε αφενός να μην είναι χαλαρή και αφετέρου να μην πιέζει τον υποκείμενο ιστό.

Η αρτηριακή πίεση μετρήθηκε και καταγράφηκε σύμφωνα με τις οδηγίες της Ευρωπαϊκής Εταιρείας Υπέρτασης με ηλεκτρονικό πιεσόμετρο Microlife BP 100A και πραγματοποιήθηκε ηλεκτροκαρδιογράφημα με ηλεκτρονικό καρδιογράφο 12 απαγωγών.

2.1.2 Αναλυτικές μέθοδοι

Τα δείγματα αίματος συλλέχθηκαν μετά από 12ωρη νηστεία. Ο διαχωρισμός του ορού έγινε μετά από φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές για 15 λεπτά και ένα δείγμα καταψύχθηκε στους -80°C .

Ο προσδιορισμός της γλυκόζης και των λιπιδαιμικών παραμέτρων του ορού έγινε σε αυτόματο αναλυτή OLYMPUS AU 640 (Olympus Diagnostica, Hamburg, Germany). Η γλυκόζη προσδιορίστηκε με τη μέθοδο της εξοκινάσης: Παρουσία

εξοκινάσης και ATP, η γλυκόζη μετατρέπεται αρχικά σε 6-P-γλυκόζη και στην συνέχεια παρουσία αφυδρογονάσης της 6-P-γλυκόζης και NADP⁺ σε 6-P-γλυκονικό. Μετράται η αύξηση της απορρόφησης στα 340nm (NADH).

Η ολική χοληστερόλη (TC) και τα τριγλυκερίδια (TG) του ορού προσδιορίστηκαν με ενζυματικές μεθόδους. Για τον προσδιορισμό της TC αρχικά το ποσοστό της χοληστερόλης που είναι εστεροποιημένο υδρολύεται σε ελεύθερη χοληστερόλη και λιπαρά οξέα και στη συνέχεια η TC μετατρέπεται σε χολεστερόνη και υπεροξείδιο το οποίο μετράται ποσοτικά με το σχηματισμό χρωμογόνου στα 510nm. Για τη μέτρηση των TG γίνεται καταρχήν υδρόλυση των TG σε γλυκερόλη και λιπαρά οξέα και στη συνέχεια ποσοτικός προσδιορισμός της γλυκερόλης σε τρία στάδια.

Ο προσδιορισμός της HDL-C έγινε με ενζυματική μέθοδο (όπως η TC) μετά από δέσμευση των LDL, VLDL και των χυλομικρών με αντισώματα κατά των β-λιποπρωτεϊνών.

Η τιμή της LDL χοληστερόλης υπολογίστηκε από τον τύπο του Friedewald:

$$\text{LDL-C} = \text{TC} - (\text{HDL-C} + \text{TG}/5)$$

σε δείγματα τα οποία συλλέχθηκαν μετά από 12ωρη νηστεία και η τιμή των τριγλυκεριδίων ήταν <400 mg/dL. Οι συγκεντρώσεις της LDL-C ατόμων με TG >400 mg/dL δεν προσδιορίστηκαν.

Ο προσδιορισμός των τιμών των απολιποπρωτεϊνών A₁, B και E και της Lp(a) στον ορό έγινε με ανοσονεφελόμετρία σε νεφελόμετρο PROSPECT (Dade Behring, Liederbach, Germany) χρησιμοποιώντας ειδικά αντισώματα για κάθε απολιποπρωτεΐνη.

Η ινσουλίνη προσδιορίσθηκε με ανοσοενζυμική μέθοδο με φθορίζον προϊόν η οποία χρησιμοποιεί την τεχνική των μικροσωματιδίων (Microparticle Enzyme Immunoassay, ABBOTT GmbH Diagnostika, Wiesbaden-Delkenheim, Germany). Ο δείκτης HOMA υπολογίσθηκε ως εξής:

$$\text{HOMA} = \text{Ινσουλίνη νηστείας (mU/L)} * \text{γλυκόζη νηστείας (mg/dL)} / 405$$

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της ασπαρτικής αμινοτρανσφεράσης (AST), της αμινοτρανσφεράσης της αλανίνης (ALT), της γ-γλουταμυλ-τρανσπεπτιδάσης (γGT), της αλκαλικής φωσφατάσης (ALP), της κινάσης της κρεατίνης (CK) και της γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH) του ορού έγινε σε αυτόματο αναλυτή OLYMPUS AU 640 (Olympus Diagnostica, Hamburg, Germany). Η κρεατινίνη ορού μετρήθηκε με τη μέθοδο Jaffé και η ουρία και το ουρικό οξύ με ενζυματική δοκιμασία στον παραπάνω αναλυτή.

2.1.3 Υπολογισμός πρόσληψης μακροθρεπτικών συστατικών και φλαβονοειδών.

Ο υπολογισμός της πρόσληψης τόσο των μακροθρεπτικών συστατικών και της ενέργειας, όσο και των διαφόρων φλαβονοειδών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ενός ημιποσοτικού ερωτηματολογίου συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων (ΕΣΚΤ) που περιλάμβανε 103 τρόφιμα. Οι ασθενείς ρωτήθηκαν και έτσι συμπληρώθηκε το πόσο συχνά κατανάλωναν ένα συγκεκριμένο τρόφιμο κατά το προηγούμενο έτος. Η συχνότητα που μπορούσε να επιλεγεί είναι «σχεδόν ποτέ», «1 φορά το μήνα», «1 φορά το δεκαπενθήμερο», «1 φορά την εβδομάδα», «2-4 φορές την εβδομάδα», «5-6 φορές την εβδομάδα», «1 φορά την ημέρα», «2-3 φορές την ημέρα», «4-5 φορές την ημέρα» και «>5 φορές την ημέρα». Τα τρόφιμα που συμπεριλήφθηκαν στο ερωτηματολόγιο ανήκουν στην κατηγορία των γαλακτοκομικών, των αυγών, του κρέατος (κοτόπουλο, κόκκινο κρέας, ψάρι, θαλασσινά), του ψωμιού, των δημητριακών και των ζυμαρικών, των οσπρίων, των λαχανικών, των ξηρών καρπών, των φρούτων και των γλυκών. Τα ροφήματα που επελέγησαν ήταν οι χυμοί, ο καφές και το τσάι, σε διάφορες παραλλαγές τους, το ρόφημα κακάο, αναψυκτικά με ή χωρίς ζάχαρη και αλκοολούχα, όπως το λευκό και κόκκινο κρασί, η μύρα, το ούζο και το τσίπουρο και άλλα αλκοολούχα υψηλής περιεκτικότητας (40% κατά όγκο) σε αιθανόλη, όπως ούισκι, βότκα κτλ. Παράλληλα, το ερωτηματολόγιο περιλάμβανε ερωτήσεις για τον τρόπο μαγειρέματος: Συμπληρώθηκε ποια λιπαρή ύλη χρησιμοποιείται στο μαγείρεμα (ελαιόλαδο, βούτυρο, κτλ), αν χρησιμοποιούνται και ποια μυρωδικά ή μπαχαρικά και σε ποια φαγητά ή σαλάτες καθώς και η χρήση αλατιού στο μαγείρεμα ή στο τραπέζι. Τέλος, διευκρινίστηκαν πιθανές διαφορές ανά άτομο στην κατανάλωση των φρούτων και λαχανικών στις διάφορες εποχές του έτους, λήφθηκε υπόψη η περίοδος που αυτά είναι διαθέσιμα και επίσης ρωτήθηκε η πιθανή κατανάλωση καταψυγμένων τροφίμων.

Για την ανάλυση των συμπληρωμένων ερωτηματολογίων, καταφύγαμε στη χρήση πινάκων σύστασης τροφίμων. Συγκεκριμένα, για τον υπολογισμό της προσλαμβανόμενης ενέργειας, του νερού, των υδατανθράκων, της πρωτεΐνης, του λίπους και της διατροφικής χοληστερόλης χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από τους πίνακες του Ελληνικού Ιδρύματος Υγείας (www.hhf-greece.gr), του ευρωπαϊκού προγράμματος πληροφοριών για τρόφιμα (EuroFIR Project – www.eurofir.net) και του Αγγλικού Foods Standards Agency (<http://www.food.gov.uk/science/dietarysurveys/dietsurveys>). Στους πίνακες αναγράφονται τα παραπάνω δεδομένα ανά 100 γρ τροφίμου. Για τον υπολογισμό ανά μερίδα πολλαπλασιάσαμε με κατάλληλο συντελεστή για κάθε συμπεριλαμβανόμενο τρόφιμο πχ 0,35 για το λευκό ψωμί, ώστε να προκύψει η σύσταση ανά τυπική μερίδα. Αν κάποιο τρόφιμο ή φαγητό αναγραφόταν ωμό ή αμαγείρευτο, στον τελικό υπολογισμό εκτιμήσαμε, με βάση μία συνηθισμένη ελληνική συνταγή, τη σύσταση για το εδώδιμο τρόφιμο-φαγητό. Ειδικά οι πίνακες του Ελληνικού Ιδρύματος Υγείας περιλαμβάνουν αρκετά μαγειρεμένα τρόφιμα. Στη συνέχεια, με βάση την αναφερόμενη συχνότητα με την οποία καταναλωνόταν κάποιο φαγητό πολλαπλασιάσαμε εκ νέου με κατάλληλο συντελεστή, πχ 1 αν καταναλώνεται καθημερινά, ώστε να υπολογιστεί η μέση ημερήσια πρόσληψη, για τα επιμέρους θρεπτικά συστατικά και την ενέργεια ανά τρόφιμο, και τελικά η συνολική ημερήσια πρόσληψη για κάθε συμμετέχοντα χωριστά.

Για τον υπολογισμό των προσλαμβανόμενων φλαβονοειδών χρησιμοποιήσαμε την ενημερωμένη βάση δεδομένων για φλαβονοειδή καθώς και αυτή για τις προανθοκυανιδίνες του Αμερικανικού Υπουργείου Γεωργίας (US Department of Agriculture – www.ars.usda.gov). Με την ίδια λογική που χρησιμοποιήθηκε και για τα μακροθρεπτικά συστατικά, υπολογίσαμε την πρόσληψη φλαβανονών (εσπεριτίνη,

ναρινγενίνη), ανθοκυανιδινών (κυανιδίνη, δελφινιδίνη, μαλβιδίνη, πετουνιδίνη και πεονιδίνη), φλαβανολών (κατεχίνη, γαλλοκατεχίνη, επικατεχίνη, επιγαλλοκατεχίνη, γαλλικούς εστέρες αυτών και θεαφλαβίνες), φλαβονολών (κουερσετίνη, καμπφερόλη, μυρισετίνη), φλαβονών (λουτεολίνη και απιγενίνη) και των πολυμερών προανθοκυανιδινών.

2.1.4 Έλεγχος διατασιμότητας της αορτής με μαγνητική τομογραφία

Επιλεγμένοι παχύσαρκοι ασθενείς χωρίς συνοδά νοσήματα που δεν έπαιρναν καμία φαρμακευτική αγωγή στην πρώτη επίσκεψη και δεν ανέφεραν μεταβολή του σωματικού τους βάρους κατά το τελευταίο τρίμηνο και συναίνεσαν με γραπτή συγκατάθεση, επελέγησαν να υποβληθούν σε μαγνητική τομογραφία της αορτής.

Για την εξέταση αυτή οι ασθενείς προσέρχονταν πρωινή ώρα μετά από 12ωρη νηστεία και χωρίς να έχουν καπνίσει εφόσον ήταν καπνιστές.

Τα κριτήρια αποκλεισμού από τη μελέτη ήταν :

1. Βάρος > 130 kg
2. Φαρμακευτική αγωγή που επηρεάζει τη βιολογία του αρτηριακού τοιχώματος: πχ αντιυπερτασικά, αντιδιαβητικά, υπολιπιδαιμικά, αντιφλεγμονώδη φάρμακα, ορμονικά σκευάσματα κτλ.
3. Οξεία νόσος τις τελευταίες 15 μέρες
4. Στεφανιαία νόσος και σακχαρώδης διαβήτης
5. Βαλβιδοπάθεια
6. Η παρουσία βηματοδότη
7. Ιστορικό αρθροπλαστικής (αν έγινε πριν από 10 έτη)

Η μαγνητική τομογραφία πραγματοποιήθηκε σε μαγνήτη έντασης 1.5 Tesla (Gyrosan ACS NT; Philips Medical Systems, Best, The Netherlands) με τη χρήση πηνίου σώματος και παράλληλη καταγραφή ηλεκτροκαρδιογραφήματος. Ελήφθησαν συνεχείς εγκάρσιες και λοξές οβελιαίες εικόνες της θωρακικής αορτής με τη συμβατική ακολουθία spin echo [χρόνος επανάληψης (TR) =RR μεσοδιάστημα σε msec, χρόνος ηχούς (TE) =16 msec]. Ελήφθη μια ακολουθία βαθμιδωτής ηχούς με κωδικοποίηση ταχύτητας, TR = RR , TE= 5.5msec, μέγεθος μήτρας 256 x 256, field of view 300 msec, πάχος τομής 6 mm, γωνία νέυσης 20°, κάθετα στην ανιούσα αορτή

και στο επίπεδο διχασμού της πνευμονικής αρτηρίας. Η μέγιστη επιλεγείσα ταχύτητα κωδικοποίησης ήταν 200 cm/sec. Η ακολουθία βαθμιδωτής ηχούς είχε ως αποτέλεσμα το να δημιουργηθούν ζεύγη modulus και εικόνες με κωδικοποίηση ταχύτητας που είχαν χρονική ανάλυση περίπου 50 msec και χωρική ανάλυση 1 pixel/mm. Η απόσταση μεταξύ ανιούσας και κατιούσας θωρακικής αορτής μετρήθηκε στο σταθμό εργασίας με τον ελεύθερο σχεδιασμό μιας γραμμής που διερχόταν από τη μεσότητα του αυλού σε πλάγια λοξή εικόνα. Πριν και μετά την εξέταση μετρήθηκε τόσο η συστολική όσο και η διαστολική ταχύτητα της βραχιόνιου αρτηρίας με μανομετρικό αεροθάλαμο σε ύπτια θέση.

Ο αυλός της αορτής σχεδιάστηκε στις εικόνες modulus σε όλες τις καρδιακές φάσεις και η ροή στην ανιούσα και στην κατιούσα αορτή υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας τις ταχύτητες των αντίστοιχων εικόνων κωδικοποίησης ταχύτητας. Οι γραφικές παραστάσεις ροής (σε mm/sec) έναντι χρόνου (σε msec) έγιναν με τη χρήση του SPSS 7.5 για Windows. Υπολογίστηκε η ταχύτητα του σφυγμικού κύματος, σε μέτρα ανά δευτερόλεπτο, ως ο λόγος της απόστασης μεταξύ ανιούσας και κατιούσας θωρακικής αορτής και του χρόνου που απαιτείται για να διανύσει το σφυγμικό κύμα αυτή την απόσταση. Το σφυγμικό κύμα θεωρήθηκε ότι έφτανε σε συγκεκριμένο επίπεδο όταν η ροή έφτανε στο ήμισυ της μέγιστης τιμής της. Η διατασιμότητα σε mm Hg⁻¹ υπολογίστηκε με βάση το μαθηματικό τύπο:

$(A_{\max} - A_{\min}) / [A_{\min} \times (P_{\max} - P_{\min})]$ όπου A_{\max} = συστολική περιοχή (mm²), A_{\min} = διαστολική περιοχή (mm²), P_{\max} = συστολική αρτηριακή πίεση (mm Hg), και P_{\min} = διαστολική αρτηριακή πίεση (mm Hg).

2.2. Διερεύνηση επιπέδων βισφατίνης στο μεταβολικό σύνδρομο.

2.2.1 Πληθυσμός της μελέτης

Στη μελέτη συμμετείχαν συνολικά 186 ασθενείς οι οποίοι παρακολουθούνταν στο Εξωτερικό Ιατρείο Λιπιδίων του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Η στρατολόγηση και ένταξή τους στη μελέτη διήρκεσε συνολικά περίπου 3 χρόνια (1998-2001). Τα δευτεροπαθή αίτια δυσλιπιδαιμίας (σακχαρώδης διαβήτης, υπο- και υπερθυρεοειδισμός, νεφρική ή ηπατική νόσος, αλκοολισμός κ.α.) αποκλείστηκαν με βάση το ιστορικό, τη φυσική εξέταση και τον κατάλληλο εργαστηριακό έλεγχο. Από τη μελέτη αποκλείστηκαν επίσης οι ασθενείς που ελάμβαναν φάρμακα τα οποία επηρεάζουν το μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών (διουρητικά, β-αποκλειστές, υπολιπιδαιμικά φάρμακα, ορμόνες κ.α.). Επιπρόσθετα, κανείς από τους ασθενείς δεν παρουσίαζε κλινικά, εργαστηριακά ή ηλεκτροκαρδιογραφικά ευρήματα στεφανιαίας νόσου. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι ίδιες που χρησιμοποιήθηκαν στους παχύσαρκους ασθενείς και αναφέρονται στο υποκεφάλαιο 2.1.2.

2.2.2. Μέτρηση βισφατίνης

Η διαδικασία είναι παρόμοια με αυτή για τη μέτρηση της βισφατίνης στο υπερκείμενο των κυττάρων και περιγράφεται αναλυτικά στο υποκεφάλαιο 2.3.13.

2.3 Πειραματική διαδικασία σε ινοβλάστες Simpson-Golabi-Behmel (SGBS)

2.3.1 Κύτταρα SGBS

Για τη μελέτη της επίδρασης φλαβονοειδών και ρεσβερατρόλης στη βιολογία του λιπώδους ιστού *in vitro*, επιλέχθηκε η ανθρώπινη κυτταρική σειρά ινοβλαστών προλιποκυττάρων Simpson-Golabi-Behmel (SGBS). Τα κύτταρα αρχικά προήλθαν από δείγμα λιπώδους ιστού αποθανόντος νεογνού με σύνδρομο Simpson-Golabi-Behmel, το οποίο είναι ένα πολύπλοκο συγγενές φυλοσύνδετο σύνδρομο με κύρια χαρακτηριστικά του, τη μακρογλωσσία, τη μακροσωμία, νεφρικές και σκελετικές ανωμαλίες και τον αυξημένο κίνδυνο εμβρυικών καρκίνων.

2.3.2 Αντιδραστήρια-Όργανα

- Ρυθμιστικό διάλυμα PBS απουσία ιόντων Ca^{2+} , Mg^{2+} (10x Dulbecco's, Biowhittaker, Walkersville, MD)
- Διάλυμα Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) /Nutrient Mix F12 (Sigma)
- Βιοτίνη (Sigma)
- D-παντοθενικό (Sigma)
- L-γλουταμίνη (Sigma)
- Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη (100x, PAA)
- Ορός από έμβryo βοδιού, όχι θερμικά απενεργοποιημένος (foetal bovine serum, FBS not-heat inactivated, Gibco-BRL)
- Θρυψίνη + EDTA (1x (0,05% / 0,02% σε D-PBS), PAA)
- Διάλυμα αιθανόλης (EtOH) 70%
- Ισοπροπανόλη
- dH₂O αποστειρωμένο

- Διμεθυλ-σουλφοξείδιο (DMSO)
- Triton x100
- Pefabloc (4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride, MB= 279g/mol, Merck)
- Κουερσετίνη (Sigma)
- Γαλλικός εστέρας επιγαλλοκατεχίνης (Sigma)
- Ρεσβερατρόλη (Sigma)
- Ισοβουτυλμεθυλξανθίνη (IBMX) (Sigma)
- Δεξαμεθαζόνη (Sigma)
- Ινσουλίνη (Sigma)
- Τριωδοθυρονίνη (T3) (Sigma)
- Ροζιγλιταζόνη (BRL49653, Cayman Chemicals)
- Φλάσκες και τριβλία καλλιέργειας
- Πλακίδια καλλιέργειας κυττάρων 24 θέσεων (Falcon, Becton Dickinson)
- Αποστειρωμένα σιφόνια των 5,10 και 25ml (Costar, Corning Incorporated)
- Φίλτρα διήθησης 0,20 μm (Corning Incorporated)
- Eppendorfs
- Σύριγγες, γάντια
- Ηλεκτρική πιπέτα (Labopet 240, Fortuna)
- Μικροσκόπιο (A. Krüss, Optronic)
- Φυγόκεντρος (Rotofix 32, Hettich, Zentrifugen)
- Κλίβανος επώασης με ατμόσφαιρα 5% CO₂ (NUAIRE)
- Κλίβανος υγρής αποστείρωσης
- Υδατόλουτρο
- Οκτακάναλη πολυπιπέτα μεταβαλλόμενου όγκου 20-200μl (Costar)
- Σωληνάκια πολυπροπυλενίου

- Πλακίδιο ELISA 96 θέσεων (Sarstedt)
- Πιπέτες 50-1000 μl
- Τροχιακός αναδευτήρας για μικροπλακίδια
- Μετρητής microELISA (Spectra MAX 190, Molecular Devices)

2.3.3 Διαλύματα εργασίας

- Διάλυμα PBS(1x): 100ml διαλύματος PBS(10x) διαλύονται σε 900ml φυσιολογικού ορού.
- Διάλυμα βιοτίνης / παντοθενικού: 0.04 gr βιοτίνης & 0.02 gr βιοτίνης / παντοθενικού διαλύονται σε 50 ml dH₂O και ακολουθεί φιλτράρισμα σε φίλτρο διήθησης 0,2 μm.
- Θρεπτικό διάλυμα OF: Σε 500 ml DMEM /Nutrient Mix F12 προστίθενται 5 ml διάλυμα βιοτίνης / παντοθενικού, 5 ml L-γλουταμίνη και 10 ml πενικιλίνης / στρεπτομυκίνης.
- Θρεπτικό διάλυμα καλλιέργειας ινοβλαστών: OF & 10% FCS.
- Διάλυμα 3FC: Διάλυμα διαφοροποίησης όπου η αναλογία είναι 10 ml OF, 100 μl αποτρανσφερίνης 1 mg/ml , 2 μl ινσουλίνης 100 μM, 10 μl κορτιζόλης 100 μM, 10 μl T3 200nM.
- Διάλυμα διαφοροποίησης “Quickdiff”: στο προηγούμενο διάλυμα 3FC προστίθενται επιπλέον 10 μl δεξαμεθαζόνης 25μM, 222 μl IBMX 22.5 mM και 2 μl ροζιγλιταζόνης 10 mM.
- Διάλυμα λύσης (Lysis buffer): PBS/ 0,1% Triton x100/ 1mM Pefabloc, παρασκευάζεται με την προσθήκη 100 μl Triton x100 και 1000μl Pefabloc σε διάλυμα PBS έως τον όγκο των 100ml. Το διάλυμα φυλάσσεται στον ψυχρό θάλαμο.

2.3.4 Καλλιέργεια ινοβλαστών SGBS

Οι ανθρώπινοι ινοβλάστες SGBS καλλιεργούνται σε φλάσκες 75 cm² με θρεπτικό διάλυμα OF (10 ml), σε κλίβανο επώασης με ατμόσφαιρα 5% CO₂ και θερμοκρασία 37 °C. Μετά από 4-5 ημέρες, αφού οι ινοβλάστες έχουν πολλαπλασιαστεί σε μεγάλο βαθμό καλύπτοντας το μεγαλύτερο ποσοστό της επιφάνειας της φλάσκας καλλιέργειας (confluent), όπως αυτό φαίνεται με μικροσκοπική παρατήρηση, ακολουθεί θρυψινοποίηση και στη συνέχεια ανακαλλιέργεια σε πλακίδια καλλιέργειας κυττάρων 24 θέσεων με διάλυμα OF (1 ml ανά θέση).

2.3.5 Διαφοροποίηση των κυττάρων

Το πρόγραμμα διαφοροποίησης των κυττάρων έχει ως εξής: Αρχικά τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται σε μέγιστο βαθμό καλύπτοντας πλήρως την επιφάνεια των πλακιδίων. Δύο ημέρες μετά παρατηρείται αναστολή του περαιτέρω πολλαπλασιασμού λόγω επαφής (contact inhibition), που επηρεάζει τη διαφοροποίηση, το θρεπτικό διάλυμα OF αναρροφάται και τα κύτταρα εκπλένονται με διάλυμα PBS (1 ml ανά θέση). Στη συνέχεια προστίθεται το θρεπτικό διάλυμα διαφοροποίησης “Quickdiff” (1 ml ανά θέση) και τα κύτταρα επωάζονται για 4 ημέρες. Την πέμπτη ημέρα το θρεπτικό διάλυμα “Quickdiff” αναρροφάται, τα κύτταρα εκπλένονται με διάλυμα PBS και προστίθεται το θρεπτικό διάλυμα 3FC. Ακολουθεί επώαση μέχρι την δέκατη πέμπτη ημέρα από την έναρξη του προγράμματος διαφοροποίησης με αλλαγή του θρεπτικού υλικού 3FC ανά 3 ημέρες. Στη διάρκεια των 15 ημερών παρατηρούνται σταδιακές αλλαγές στη μορφολογία των κυττάρων με τη χαρακτηριστική συσσώρευση σταγονιδίων λίπους και στο τέλος της δέκατης πέμπτης ημέρας προκύπτουν ώριμα λειτουργικά λιποκύτταρα.

2.3.6 Ταυτοποίηση των λιποκυττάρων

Η ταυτοποίηση των κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν για τις πειραματικές διαδικασίες της παρούσας διατριβής έγινε με χρώση Oil Red O, μέτρηση των τριγλυκεριδίων των κυττάρων και προσδιορισμό της λεπτίνης, της αντιγονεκτίνης και της βισφατίνης στο υπερκείμενο. Η μέτρηση της πρωτεΐνης των κυττάρων έγινε με τη μέθοδο Lowry. Οι παραπάνω μέθοδοι περιγράφονται παρακάτω αναλυτικά.

2.3.7 Επίδραση με πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες που επιλέχθηκαν ήταν η κουερσετίνη, ο γαλλικός εστέρας επικατεχίνης και η ρεσβερατρόλη. Διαλύθηκαν σε DMSO και στη συνέχεια σε διάλυμα 3FC με κατάλληλη αραίωση ώστε να προκύψουν τελικές συγκεντρώσεις από 10 έως 50 μM . Σε πρώιμα πειράματα παρατηρήθηκε η παρουσία ιζήματος σε συγκεντρώσεις $>40 \mu\text{M}$. Επιλέχθηκαν τελικά οι συγκεντρώσεις των 10 και 25 μM . Τα κύτταρα εκπλύθηκαν με PBS δις και προστέθηκε διάλυμα 3FC παρουσία των τριών πολυφαινολών στις προαναφερθείσες συγκεντρώσεις. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 και 48 ώρες και συλλέχθηκε υπερκείμενο στις αντίστοιχες χρονικές στιγμές. Τελικά, μετά από εκπλύσεις με PBS, τα κύτταρα συλλέγησαν με 200 μl διαλύματος λύσης.

2.3.8 Χρώση με Oil Red O

Αρχή της μεθόδου

Η χρωστική Oil Red O είναι μία λιπόφιλη χρωστική ειδική για τριγλυκερίδια και κατά συνέπεια κατάλληλη για χρώση των ενδοκυττάρων σταγονιδίων λίπους των λιποκυττάρων¹⁹².

Διαλύματα

- Αποθεματικό διάλυμα (stock) Oil Red O: διαλύονται 0,7 gr Oil Red O (Sigma) σε 200 ml ισοπροπανόλης, και το διάλυμα φιλτράρεται με φίλτρα διήθησης 0,20 μm και φυλάσσεται στους 4 °C.
- Διάλυμα εργασίας: το παραπάνω διάλυμα αναμιγνύεται με αναλογία 60/40 με απιονισμένο νερό και φιλτράρεται με φίλτρα διήθησης 0,20 μm.
- Διάλυμα φορμαλδεΐδης 4% σε PBS

Πειραματική Διαδικασία

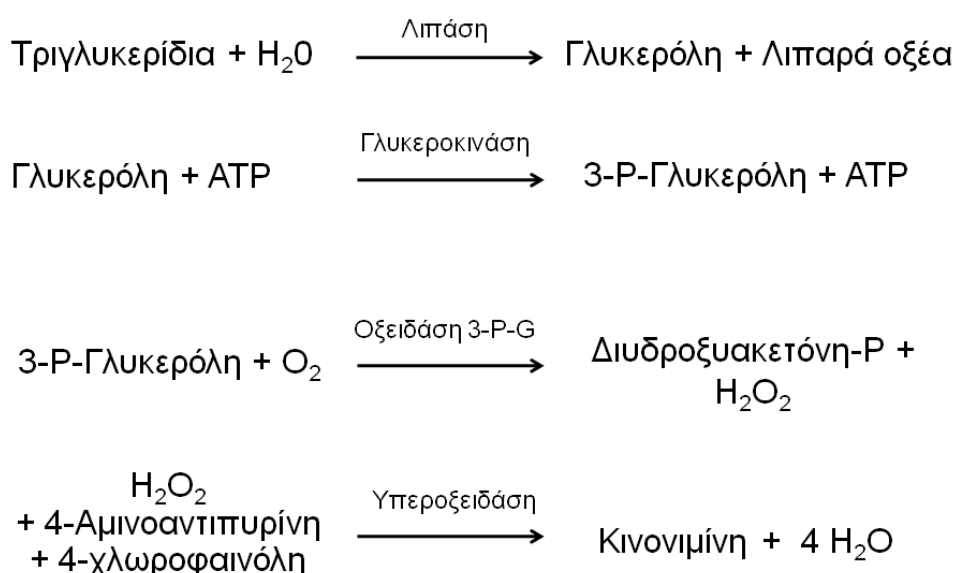
Το θρεπτικό διάλυμα – υπερκείμενο αναρροφάται και τα κύτταρα εκπλένονται με PBS (1 ml ανά θέση) τρις. Προστίθεται διάλυμα φορμαλδεΐδης 4% (500 μL ανά θέση) και ακολουθεί επώαση για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια τα κύτταρα εκπλένονται επιμελώς με απιονισμένο νερό, προστίθεται ισοπροπανόλη 60% (500 μL ανά θέση) και αφήνεται να εξατμιστεί. Μόλις εξατμιστεί όλη η ισοπροπανόλη, προστίθεται διάλυμα εργασίας Oil Red O (500 μL ανά θέση) και ακολουθεί επώαση για 10 – 15 λεπτά. Μετά από αυτό το στάδιο αφαιρείται το διάλυμα εργασίας και γίνεται έκπλυση με απιονισμένο νερό επιμελώς. Τα

λιποκύτταρα είναι ορατά στο μικροσκόπιο με ευδιάκριτα τα σταγονίδια λίπους χρωματισμένα με κόκκινο χρώμα.

2.3.9 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των τριγλυκεριδίων

Αρχή της μεθόδου

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των τριγλυκεριδίων έγινε με τη μέθοδο της οξειδάσης της φωσφογλυκερόλης/υπεροξειδάσης. Τα τριγλυκερίδια παράγουν μέσω των συζευγμένων αντιδράσεων που παρουσιάζονται στη συνέχεια έγχρωμο σύμπλοκο που προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά¹⁹³.



Διαλύματα – αντιδραστήρια

Αντιδραστήριο Α: Pipes 45 mmol/L, χλωριούχο μαγνήσιο 5 mmol/L, 4-χλωροφαινόλη 6 mmol/L, λιπάση > 100 U/ml, κινάση της γλυκερόλης > 1,5 mmol/l, οξειδάση της 3-φωσφογλυκερόλης > 4 U/ml, υπεροξειδάση > 0,8 U/ml, 4-αμινοαντιπυρίνη 0,75 mmol/l, ATP 0,9 mmol/l, pH7,0.

Πρότυπο τριγλυκεριδίων (standard): Γλυκερόλη ισοδύναμη με 200 mg/dl τριολείνη.

Πειραματική Διαδικασία

1^ο στάδιο

Για την πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιούμε 20 μl πρότυπου συγκέντρωσης (200 mg/dl = 2 mg/ml), τα οποία αραιώνουμε με πιπέτα ρυθμισμένη στα 10 μl διαδοχικά σε erpendorfs όπου έχουμε (εκτός του πρώτου) προσθέσει ήδη φυσιολογικό ορό 10 μl. Προκύπτουν έτσι οι ακόλουθες συγκεντρώσεις: 2, 1, 0,5, 0,25 & 0,125 mg/ml. Στα erpendorfs προστίθεται το αντιδραστήριο A μέχρι τελικού όγκου 1000 μl και αναδεύονται.

Τα κύτταρα που προηγουμένα έχουν συλλεχθεί με το διάλυμα λύσης διασπώνται πλήρως με τη χρήση υπερήχων για 10 δευτερόλεπτα στα 40 Watt σε πάγο. 100 μl από κάθε δείγμα αναμιγνύεται με 100 μl αντιδραστηρίου A και αναδεύεται.

2^ο στάδιο

Σε πλακάκι 96 θέσεων τύπου ELISA προστίθενται τα διαλύματα για την πρότυπη καμπύλη και τα δείγματα από τα κύτταρα του πρώτου σταδίου (200 μl ανά θέση) και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Ακολουθεί μέτρηση των απορροφήσεων στα 500 nm έναντι του τυφλού στο μετρητή microELISA και επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Με βάση τις απορροφήσεις των προτύπων δειγμάτων σχεδιάζεται, με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή, η βέλτιστη ευθεία και από την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης και τις απορροφήσεις των δειγμάτων υπολογίζονται τα μg τριγλυκεριδίων που περιέχουν τα δείγματα.

2.3.10 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών

Αρχή της μεθόδου

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών των κυττάρων έγινε με τη μέθοδο Lowry. Οι πρωτεΐνες αρχικά αντιδρούν με τα ιόντα Cu^{2+} , σε αλκαλικό περιβάλλον και στη συνέχεια ανάγουν το φωσφομολυβδαινικό-φωσφοβολφραμικό αντιδραστήριο με αποτέλεσμα το σχηματισμό μπλε χρώματος που απορροφά στα 720nm^{194} .

Αντιδραστήρια- Όργανα

- NaOH (Merck)
- Na_2CO_3 (Merck)
- Κιτρικό νάτριο ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, MB=294,10 g/mol, Merck)
- CuSO_4 (MB= 159,61 g/mol, Riedel-deHaen)
- Αντιδραστήριο φαινόλης 2N (Folin & Ciocalteu's phenol reagent, Sigma)

Διαλύματα

- Διάλυμα 1N NaOH: 4gr NaOH διαλύονται σε 80ml dH_2O . Το διάλυμα αφήνεται να κρυώσει, μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 100ml όπου συμπληρώνεται ο όγκος με dH_2O . Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος
- Διάλυμα 0,5N NaOH: Γίνεται αραιώση 1:1 (v/v) του διαλύματος 1N NaOH με dH_2O . Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος
- Διάλυμα 2% Na_2CO_3 : 2gr Na_2CO_3 διαλύονται σε 100ml dH_2O . Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C
- Διάλυμα 1% κιτρικού νατρίου: 1,139 gr κιτρικού νατρίου διαλύονται σε 100ml dH_2O . Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C

- Διάλυμα 0,5% CuSO₄ σε 1% κιτρικό νάτριο: 0,5 gr CuSO₄ διαλύονται σε 100ml κιτρικού νατρίου 1%. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C
- Διάλυμα εργασίας A: 2% Na₂CO₃ και 0,5% CuSO₄ σε αναλογία 50:1 (v/v). Σε 50ml διαλύματος 2% Na₂CO₃ προστίθεται 1ml διαλύματος 0,5% CuSO₄. Το διάλυμα εργασίας παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του
- Πρότυπο διάλυμα 100μg/ml BSA σε 0,5N NaOH: 10mg BSA διαλύονται σε 100ml 0,5N NaOH. Το διάλυμα διατηρείται στους -20°C
- Αντιδραστήριο φαινόλης: Ορισμένος όγκος Folin & Ciocalteu's αναμιγνύεται με ίσο όγκο dH₂O. Το αντιδραστήριο παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του.

Πειραματική Διαδικασία

Σε πλακίδιο ELISA 96 θέσεων τοποθετούνται 5μl δείγματος και 5μl 1N NaOH. Ο όγκος συμπληρώνεται έως τα 50μl με 0,5N NaOH και ακολουθεί ισχυρή ανάδευση. Ετοιμάζεται και μια πρότυπη καμπύλη με την τοποθέτηση BSA (100μg/ml) σε όγκους 0, 5, 12.5, 25, 37.5 και 50μl και ο τελικός όγκος συμπληρώνεται έως τα 50μl με 0,5N NaOH. Τα δείγματα αφήνονται για 60 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και στη συνέχεια προστίθενται με πολυπιπέτα σε κάθε θέση της πλάκας 250μl διαλύματος A. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση και το πλακίδιο παραμένει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για άλλα 10 λεπτά. Τέλος προστίθενται με πολυπιπέτα 25μl αντιδραστηρίου φαινόλης, ακολουθεί ισχυρή ανάδευση και επώαση των δειγμάτων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 30 λεπτά. Γίνεται μέτρηση της απορρόφησης στα 720 nm στον μετρητή microELISA.

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Με βάση τις απορροφήσεις των προτύπων δειγμάτων σχεδιάζεται με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή, η βέλτιστη ευθεία και από την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης και τις απορροφήσεις των δειγμάτων υπολογίζονται τα μg πρωτεΐνης που περιέχουν τα δείγματα.

2.3.11 Μέτρηση λεπτίνης

Αρχή της μεθόδου:

Για τον προσδιορισμό της λεπτίνης, το υπερκείμενο των κυττάρων καθώς και τα πρότυπα διαλύματα επωάζονται σε πλακίδια ELISA που περιέχουν ακινητοποιημένο ανθρώπινο πολυκλωνικό αντίσωμα εξειδικευμένο στη λεπτίνη. Οποιαδήποτε ποσότητα λεπτίνης υπάρχει δεσμεύεται στο αντίσωμα, ενώ με διαδοχικές εκπλύσεις η λεπτίνη που δεν έχει δεσμευθεί απομακρύνεται και ακολουθεί επώαση με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της λεπτίνης, συζευγμένο με ραφανιδική υπεροξειδάση (horseradish peroxidase). Η περίσσεια του αντισώματος απομακρύνεται και ακολουθεί η προσθήκη κατάλληλου υποστρώματος για την ανάπτυξη χρώματος. Η αντίδραση διακόπτεται με την προσθήκη οξέος και μετράται η απορρόφηση στα 450nm. Η ένταση του χρώματος που παρατηρείται είναι ανάλογη της ποσότητας της λεπτίνης.

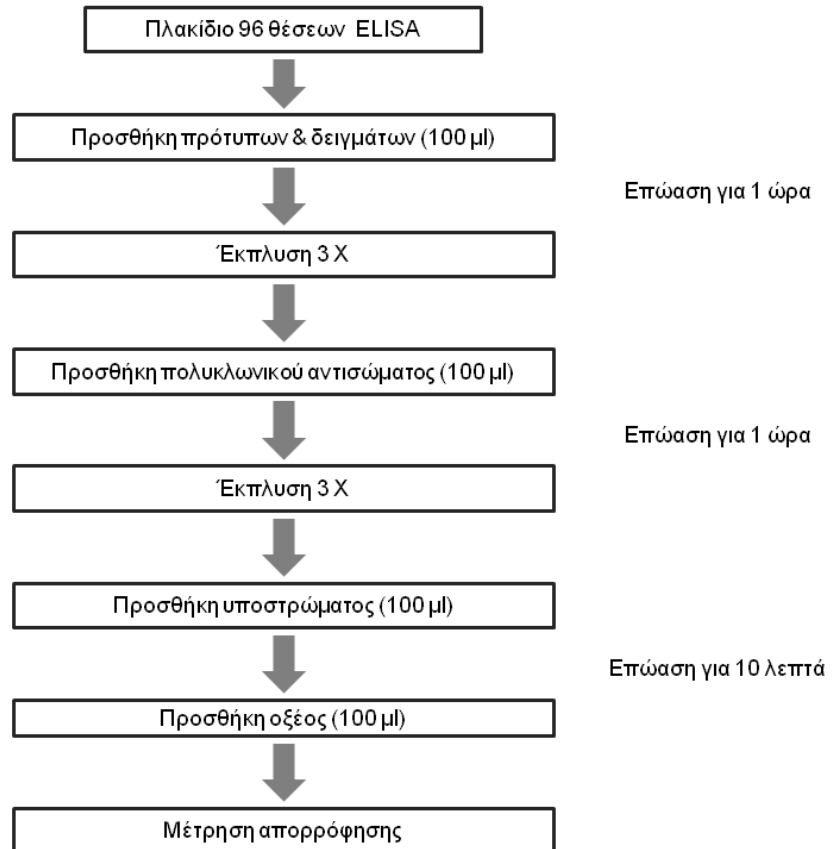
Αντιδραστήρια-Όργανα

Ο προσδιορισμός της λεπτίνης πραγματοποιείται με εμπορική συσκευασία kit (Human leptin ELISA, Biovendor) το οποίο περιέχει:

- Πλακίδιο ELISA 96 θέσεων επικαλυμμένο με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της λεπτίνης
- Πρότυπο διάλυμα πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της λεπτίνης, επισημασμένο με ένζυμο (υπεροξειδάση του χρένου), 13 ml
- Πρότυπα λεπτίνης (1, 2, 5, 10, 20, 50 ng/ml) : 0,35 ml / φιαλίδιο
- Δύο φιαλίδια ανασυνδυασμένης ανθρώπινης λεπτίνης λυοφιλοποιημένης υψηλής και χαμηλής συγκέντρωσης αντίστοιχα (Quality control).
- Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης (Dilution buffer) 13ml
- Διάλυμα έκπλυσης συμπυκνωμένο(5X) 100 ml
- Διάλυμα υποστρώματος (TMB) 13 ml

- Διάλυμα τερματισμού της αντίδρασης (0,2 M H₂SO₄), 13 ml

Διαδικασία σχηματικά



Διαδικασία αναλυτικά:

Πριν από την έναρξη προσδιορισμού της λεπτίνης, όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα που χρησιμοποιούνται αφήνονται να αποκτήσουν θερμοκρασία περιβάλλοντος. Αρχικά γίνεται ανασύσταση κάθε φιαλιδίου του quality control με 0.35 ml απιονισμένου νερού τα οποία στη συνέχεια αραιώνονται 1:3 με ρυθμιστικό

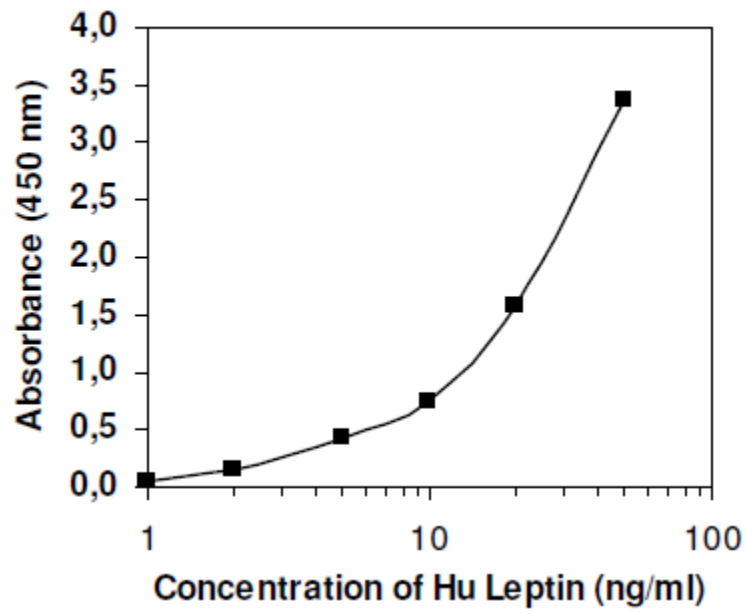
διάλυμα αραιώσης (πχ. 100 μl Quality Control + 200 μl Dilution Buffer εις διπλούν). Ακόλουθα αραιώνονται τα πρότυπα λεπτίνης και τα δείγματα προς μέτρηση (υπερκείμενα κυττάρων) 1:3 με ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης. Στο πλακίδιο ELISA τοποθετούνται από 100μl των προτύπων, των quality control και των δειγμάτων προς μέτρηση εις διπλούν και το πλακίδιο επώάζεται για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου σε τροχιακό αναδευτήρα σε 300 rpm.

Στη φάση αυτή η υπάρχουσα λεπτίνη δεσμεύεται από το αντίσωμα. Ακολουθεί απόρριψη του υπερκειμένου και τρεις εκπλύσεις με την προσθήκη 350μl ανά θέση, του αντιδραστηρίου έκπλυσης ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια της λεπτίνης που δεν έχει δεσμευθεί. Στη συνέχεια προστίθενται 100μl του πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της λεπτίνης και ακολουθεί επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά τη 1 ώρα το πλακίδιο εκπλένεται τρεις φορές με το αντιδραστήριο έκπλυσης ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του πολυκλωνικού αντισώματος που δεν έχει δεσμευθεί. Ακολουθεί προσθήκη 100μl του υποστρώματος και επώαση για 10 λεπτά απουσία φωτός. Στη φάση αυτή το χρώμα γίνεται μπλε σταδιακά. Τέλος, σε κάθε θέση, προστίθενται 100μl του όξινου διαλύματος τερματισμού της αντίδρασης. Σε αυτή τη φάση το χρώμα μετατρέπεται άμεσα σε κίτρινο και παραμένει σταθερό για 10 λεπτά, εντός των οποίων πρέπει να γίνει η μέτρηση. Η μέτρηση της απορρόφησης γίνεται στα 450nm.

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Με τη βοήθεια των πρότυπων διαλυμάτων κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη, η οποία έχει τον οριζόντιο άξονα λογαριθμικό. Από την εξίσωση της ευθείας που προκύπτει υπολογίζεται η ποσότητα της λεπτίνης που περιέχουν τα δείγματα και τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ng/ml.

Human Leptin ELISA, Clinical Range
Standard Curve



2.3.12 Μέτρηση αντιπονεκτίνης

Για τον προσδιορισμό της αντιπονεκτίνης, το υπερκείμενο των κυττάρων καθώς και τα πρότυπα διαλύματα επωάζονται σε πλακίδια ELISA που περιέχουν ακινητοποιημένο ανθρώπινο πολυκλωνικό αντίσωμα εξειδικευμένο στην αντιπονεκτίνη με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της αντιπονεκτίνης, συζευγμένο με ραφανιδική υπεροξειδάση (horseradish peroxidase). Οποιαδήποτε ποσότητα αντιπονεκτίνης υπάρχει δεσμεύεται στο αντίσωμα, ενώ με διαδοχικές εκπλύσεις η αντιπονεκτίνη που δεν έχει δεσμευθεί απομακρύνεται και ακολουθεί επώαση με κατάλληλο υπόστρωμα για την ανάπτυξη χρώματος. Η αντίδραση διακόπτεται με την προσθήκη οξέος και μετράται η απορρόφηση στα 450nm. Η ένταση του χρώματος που παρατηρείται είναι αντιστρόφως ανάλογη της ποσότητας της αντιπονεκτίνης.

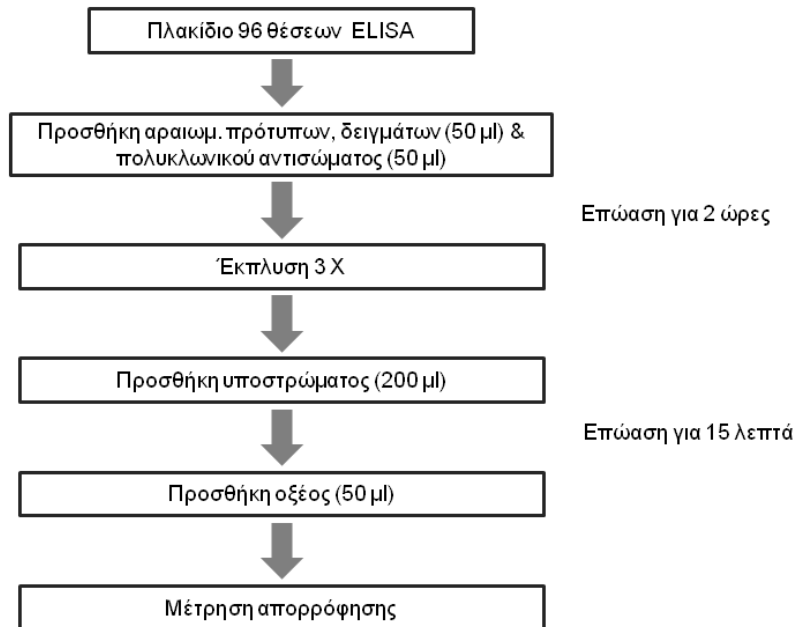
Αντιδραστήρια-Όργανα

Ο προσδιορισμός της αντιπονεκτίνης πραγματοποιείται με εμπορική συσκευασία kit (Human adiponectin ELISA, Biovendor) το οποίο περιέχει:

- Πλακίδιο ELISA 96 θέσεων επικαλυμμένο με ανασυνδυσμένη ανθρώπινη αντιπονεκτίνη
- Πρότυπο διάλυμα πολυκλωνικού αντισώματος έναντι αντιπονεκτίνης, επισημασμένο με ένζυμο (υπεροξειδάση του χρένου), 7 ml
- Πρότυπα αντιπονεκτίνης (0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$) : 0,22 ml / φιαλίδιο
- Δύο φιαλίδια ανασυνδυσμένης ανθρώπινης αντιπονεκτίνης υψηλής και χαμηλής συγκέντρωσης αντίστοιχα (Quality control): 2 x 0,1 ml.
- Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης(Dilution buffer) 2 x 13ml
- Διάλυμα έκπλυσης συμπυκνωμένο(5X) 100 ml

- Διάλυμα υποστρώματος (TMB) 2 x 13 ml
- Διάλυμα τερματισμού της αντίδρασης (0,5 M H₂SO₄), 9 ml

Διαδικασία σχηματικά



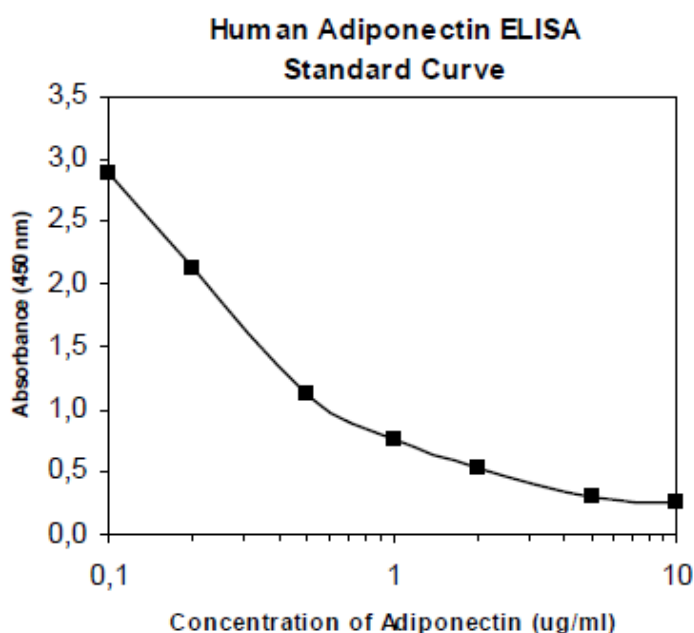
Διαδικασία αναλυτικά:

Πριν από την έναρξη προσδιορισμού της αντιγονεκτίνης, όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα που χρησιμοποιούνται αφήνονται να αποκτήσουν θερμοκρασία περιβάλλοντος. Αρχικά αραιώνονται τα quality control 1:30 με ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης (πχ. 10 μl Quality Control + 290 μl Dilution Buffer). Στη συνέχεια αραιώνονται τα πρότυπα αντιγονεκτίνης 1:3 και τα δείγματα προς μέτρηση (υπερκείμενα κυττάρων) 1:3 με ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης (πχ. 50 μl δείγματος + 100 μl Dilution Buffer). Στο πλακίδιο ELISA τοποθετούνται από 50μl των προτύπων, των quality control και των δειγμάτων προς μέτρηση εις διπλούν. Σε κάθε θέση προστίθενται 50μl πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της αντιγονεκτίνης

επισημασμένου με ένζυμο και το πλακίδιο επωάζεται για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου σε τροχιακό αναδευτήρα σε 300 rpm. Ακολουθεί απόρριψη του υπερκειμένου και τρεις εκπλύσεις με την προσθήκη 350μl ανά θέση, του διαλύματος έκπλυσης ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια της αντιγονεκτίνης που δεν έχει δεσμευθεί. Ακολουθεί προσθήκη 200μl του υποστρώματος και επώαση για 15 λεπτά απουσία φωτός. Στη φάση αυτή το χρώμα γίνεται μπλε σταδιακά. Τέλος, σε κάθε θέση, προστίθενται 50μl του όξινου διαλύματος τερματισμού της αντίδρασης. Σε αυτή τη φάση το χρώμα μετατρέπεται άμεσα σε κίτρινο και παραμένει σταθερό για 10 λεπτά, εντός των οποίων πρέπει να γίνει η μέτρηση. Η μέτρηση της απορρόφησης γίνεται στα 450nm.

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Με τη βοήθεια των πρότυπων διαλυμάτων κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη, η οποία έχει τον οριζόντιο άξονα λογαριθμικό. Από την εξίσωση της ευθείας που προκύπτει υπολογίζεται η ποσότητα της αντιγονεκτίνης που περιέχουν τα δείγματα και τα αποτελέσματα εκφράζονται σε μg/ml.



2.3.13 Μέτρηση βισφατίνης

Για τον προσδιορισμό της βισφατίνης, το υπερκείμενο των κυττάρων καθώς και τα πρότυπα διαλύματα επωάζονται σε πλακίδια ELISA που περιέχουν ακινητοποιημένο ανθρώπινο πολυκλωνικό αντίσωμα εξειδικευμένο στη βισφατίνη. Οποιαδήποτε ποσότητα βισφατίνης υπάρχει δεσμεύεται στο αντίσωμα, ενώ με διαδοχικές εκπλύσεις η βισφατίνη που δεν έχει δεσμευθεί απομακρύνεται και ακολουθεί επώαση με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της βισφατίνης συζευγμένο με ραφανιδική υπεροξειδάση (horseradish peroxidase). Η περίσσεια του αντισώματος απομακρύνεται και ακολουθεί η προσθήκη κατάλληλου υποστρώματος για την ανάπτυξη χρώματος. Η αντίδραση διακόπτεται με την προσθήκη οξέος και μετράται η απορρόφηση στα 450nm. Η ένταση του χρώματος που παρατηρείται είναι ανάλογη της ποσότητας της βισφατίνης.

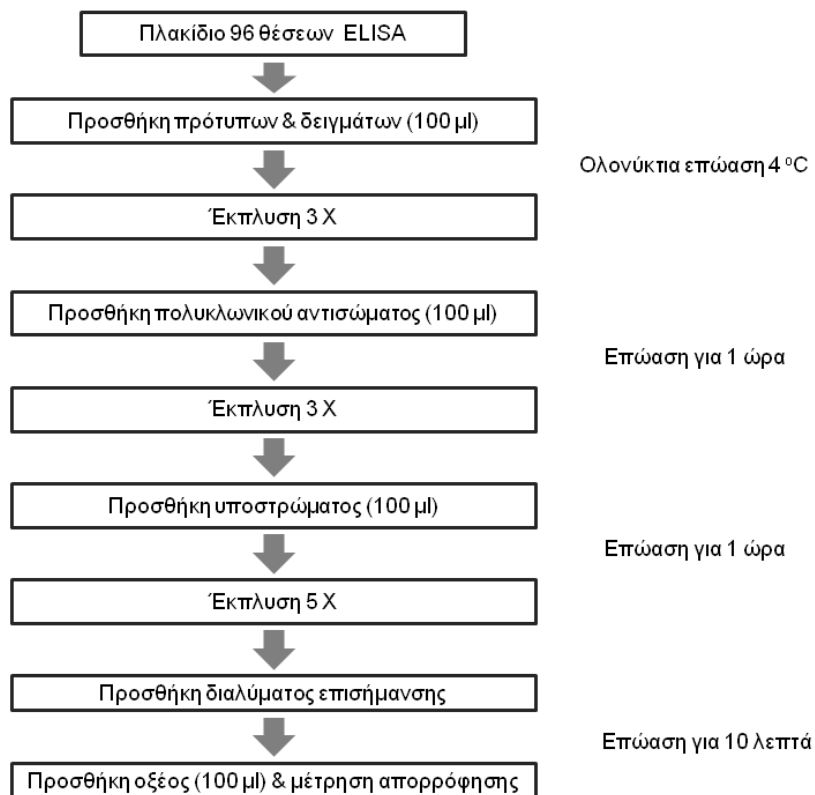
Αντιδραστήρια-Όργανα

Ο προσδιορισμός της βισφατίνης πραγματοποιείται με εμπορική συσκευασία kit (Human visfatin ELISA, Alpcο) το οποίο περιέχει:

- Πλακίδιο ELISA 96 θέσεων επικαλυμμένο με ανασυνδυσμένη ανθρώπινη βισφατίνη
- Πρότυπο διάλυμα πολυκλωνικού αντισώματος έναντι βισφατίνης, 12 ml
- Διάλυμα επισήμανσης αντισώματος IgG επισημασμένο με ένζυμο (υπεροξειδάση του χρένου),(100x)150 μl
- Φιαλίδιο πρότυπης βισφατίνης λυοφιλοποιημένης : 16 ng

- Δύο φιαλίδια ανασυνδυασμένης ανθρώπινης βισφατίνης λυοφιλοποιημένης, υψηλής και χαμηλής συγκέντρωσης αντίστοιχα (Quality control): 0,5 & 3 ng / φιαλίδιο.
- Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης (Dilution buffer (5x) 50 ml
- Διάλυμα έκπλυσης συμπυκνωμένο (5X) 100 ml
- Διάλυμα υποστρώματος (TMB) 12 ml
- Διάλυμα τερματισμού της αντίδρασης (1 M H₃PO₄), 12 ml

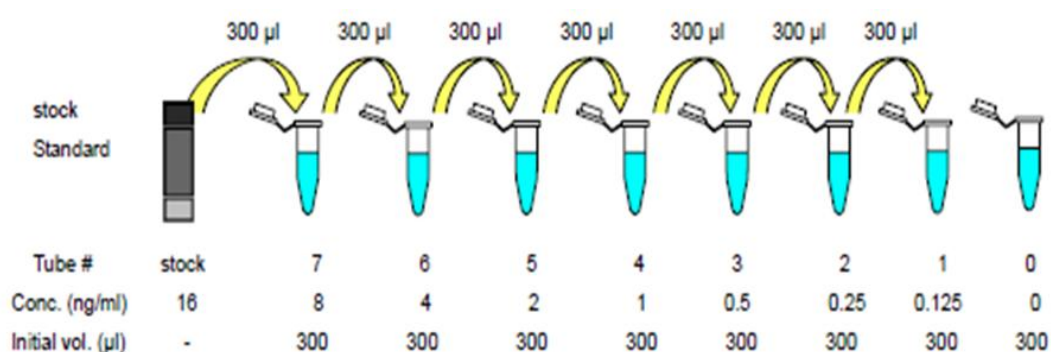
Διαδικασία σχηματικά



Διαδικασία αναλυτικά:

Πριν από την έναρξη προσδιορισμού της βισφατίνης, όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα που χρησιμοποιούνται αφήνονται να αποκτήσουν θερμοκρασία

περιβάλλοντος. Γίνεται αραίωση 1x των διαλυμάτων αραίωσης, έκπλυσης και επισήμανσης και ανασύσταση των λυοφιλοποιημένου προτύπου και των controls με 1 ml απιονισμένου νερού. Για την πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιούμε 300 μl από το αρχικό πρότυπο συγκέντρωσης 16 ng/ml, το οποίο αραιώνουμε διαδοχικά σε 7 erpendorfs που περιέχουν το καθένα 300 μl διαλύματος αραίωσης σύμφωνα με το παρακάτω σχήμα, ώστε να προκύψουν οι εξής συγκεντρώσεις: 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0125 ng/ml.

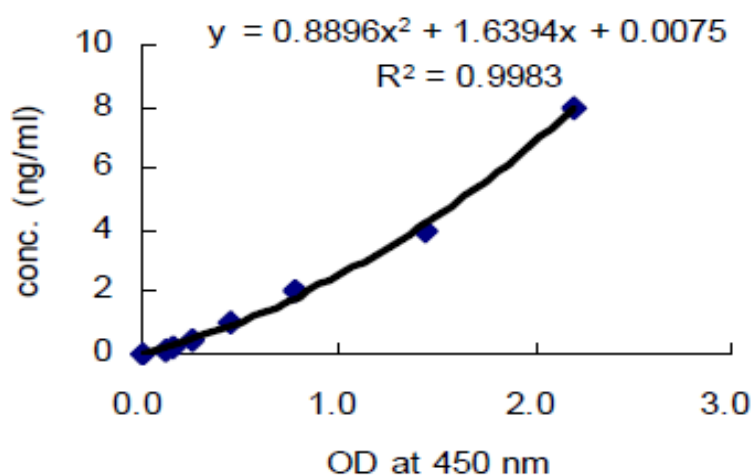


Στο πλακίδιο ELISA τοποθετούνται από 100μl των προτύπων, των quality control και των δειγμάτων προς μέτρηση εις διπλούν και επωάζονται ολονύκτια σε θερμοκρασία 4 °C. Στη φάση αυτή η υπάρχουσα βισφατίνη δεσμεύεται από το αντίσωμα. Ακολουθεί απόρριψη του υπερκειμένου και τρεις εκπλύσεις με την προσθήκη 300μl ανά θέση, του αντιδραστήριου έκπλυσης ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια της βισφατίνης που δεν έχει δεσμευθεί. Στη συνέχεια προστίθενται 100μl ανά θέση του πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της βισφατίνης και ακολουθεί επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία 37 °C. Μετά τη 1 ώρα το πλακίδιο εκπλένεται τρεις φορές με το αντιδραστήριο έκπλυσης (300 μl ανά θέση) ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του πολυκλωνικού αντισώματος που δεν έχει δεσμευθεί. Ακολουθεί προσθήκη 100μl ανά θέση του διαλύματος επισήμανσης 1x και ακολουθεί επώαση για 1 ώρα σε

θερμοκρασία 37 °C. Μετά τη 1 ώρα το πλακίδιο εκπλένεται πέντε φορές με το αντιδραστήριο έκπλυσης ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του διαλύματος επισήμανσης 1x και εν συνεχεία προστίθεται το διάλυμα υποστρώματος 100 μl ανά θέση. Επωάζεται για 10 λεπτά απουσία φωτός σε θερμοκρασία δωματίου. Στη φάση αυτή το χρώμα γίνεται μπλε σταδιακά. Τέλος, σε κάθε θέση, προστίθενται 100μl του όξινου διαλύματος τερματισμού της αντίδρασης. Σε αυτή τη φάση το χρώμα μετατρέπεται άμεσα σε κίτρινο και παραμένει σταθερό για 30 λεπτά, εντός των οποίων πρέπει να γίνει η μέτρηση. Η μέτρηση της απορρόφησης γίνεται στα 450nm.

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Με τη βοήθεια των πρότυπων διαλυμάτων κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη με εξίσωση quadratic και από την ευθεία που προκύπτει υπολογίζεται η ποσότητα της βισφατίνης που περιέχουν τα δείγματα και τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ng/ml.



2.4 Στατιστική ανάλυση

Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή \pm σταθερή απόκλιση (SD) και ως διάμεση τιμή (εύρος) για τις παραμετρικές και τις μη παραμετρικές παραμέτρους, αντίστοιχα. Το τεστ Kolmogorov-Smirnov χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της κανονικότητας των κατανομών. Οι διαφορές στις παραμέτρους μεταξύ διαφορετικών ομάδων εκτιμήθηκαν με τη χρησιμοποίηση του t-test για ανεξάρτητα δείγματα ή του Mann-Whitney U test για κανονικές και μη-κανονικές μεταβλητές, αντίστοιχα. Οι διαφορές στα ποσοστά εκτιμήθηκαν με το τεστ χ^2 . Οι συσχετίσεις μεταξύ των μεταβλητών της μελέτης εκτιμήθηκαν με τη χρησιμοποίηση του Pearson - correlation coefficient (r) ή του Spearman's rank order correlation (rho) για τις κανονικές και μη-κανονικές μεταβλητές, αντίστοιχα. Ως όριο στατιστικής σημαντικότητας θεωρήθηκε το $p < 0,05$. Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με προσωπικό υπολογιστή και τη χρησιμοποίηση του λογισμικού SPSS 17.0.

3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Εκτίμηση της πρόσληψης φλαβονοειδών σε υπέρβαρους και παχύσαρκους ασθενείς

Χαρακτηριστικά του πληθυσμού

Για τη μελέτη της πρόσληψης φλαβονοειδών μελετήθηκαν 100 άτομα που προσήλθαν για απώλεια βάρους στο Εξωτερικό Ιατρείο Διαταραχών του Μεταβολισμού των Λιπιδίων και Παχυσαρκίας. Τα κλινικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού φαίνονται στους πίνακες 3.1 & 3.2.

Συνολικά, μελετήθηκαν 100 άτομα, 20 άνδρες και 80 γυναίκες, από τις οποίες οι 66(82%) ήταν προεμμηνοπαυσιακές. Ο μέσος όρος ηλικίας ήταν $38,9 \pm 10,3$ έτη. Η μέση τιμή του ΔΜΣ ήταν $35,4 \pm 5,1 \text{ kg} / \text{m}^2$ και η ενδιάμεση τιμή του ΔΜΣ $34,3 \text{ kg} / \text{m}^2$, με εύρος 27 έως $47 \text{ kg} / \text{m}^2$. Τόσο οι άνδρες όσο και οι γυναίκες χαρακτηρίζονταν από κοιλιακή παχυσαρκία, καθώς η περίμετρος μέσης ήταν $111,5 \pm 12,7 \text{ cm}$ ($109,5 \pm 10,9$ και $124,1 \pm 9,8 \text{ cm}$ αντίστοιχα). Κανείς από τους ασθενείς δεν ελάμβανε αντιυπερτασική αγωγή (μέση τιμή ΣΑΠ 123 ± 16 & ΔΑΠ $82 \pm 10 \text{ mm Hg}$) και το 61% των ατόμων ήταν καπνιστές. Τη διάγνωση του μεταβολικού συνδρόμου πληρούσαν 39 άτομα. Τέλος, κανείς από τους ασθενείς δεν λάμβανε υπολιπιδαιμική αγωγή, δεν ήταν διαβητικός και δεν είχε διαταραχές της νεφρικής λειτουργίας.

Πίνακας 3.1 Κλινικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης

Παράμετρος	
Φύλο (♀/♂)	80 / 20
Ηλικία (έτη)	$38,9 \pm 10,3$
Σε εμμηνόπαυση	66(82%)
Βάρος (kg)	$95,3 \pm 16,8$

ΔΜΣ (kg / m²)	35,4 ± 5,1 [34,3 (27-47)]
Περίμετρος μέσης (cm)	111,5 ± 12,7
Περίμετρος ισχίων (cm)	122,5 ± 8,7
Συστολική αρτηριακή πίεση (mm Hg)	123 ± 16
Διαστολική αρτηριακή πίεση (mm Hg)	82 ± 10
Κάπνισμα (ναι/όχι)	61/39
Μεταβολικό Σύνδρομο (ναι/όχι)	39/61

Τα βιοχημικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης φαίνονται στον Πίνακα 3.2.

Πίνακας 3.2 Βιοχημικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης

Παράμετρος	
Ολική χοληστερόλη (mg/dl)	217 ± 44
Τριγλυκερίδια (mg/dl)	116 ± 64
HDL χοληστερόλη (mg/dl)	54 ± 13
LDL χοληστερόλη (mg/dl)	142 ± 33
Non-HDL χοληστερόλη (mg/dl)	164 ± 38
Apo A₁ (mg/dl)	149 ± 19,9
Apo B (mg/dl)	105,7 ± 30
Apo E (mg/dl)	42,9 ± 9,8
Lp(a) (mg/dl)	5 (2,0 – 32,7)
Γλυκόζη (mg/dl)	93 ± 11
Ινσουλίνη (μU/ml)	11,8 (3,4 – 32,0)
Δείκτης HOMA	2,77 (0,9-5,9)

Κρεατινίνη (mg/dl)	0,83 ± 0,13
Ουρικό οξύ (mg/dl)	4,6 ± 1,2
Ουρία (mg/dl)	28,3 ± 6,7
AST (IU/l)	20 (10-62)
ALT (IU/l)	23 (7-114)
γ- GT (IU/l)	17 (8-119)
ALP (IU/l)	67,5 (14-209)
CK (IU/l)	85 (32-291)
LDH (IU/l)	325 (102-571)

Η σύγκριση μεταξύ ανδρών και γυναικών έδειξε ότι οι πρώτοι είχαν υψηλότερο βάρος και ΔΜΣ. Ακόμη, οι άντρες είχαν μεγαλύτερη περίμετρο μέσης, όχι όμως και ισχίων. Η συστολική και διαστολική αρτηριακή πίεση δεν διέφερε μεταξύ ανδρών και γυναικών (Πίνακας 3.3).

Πίνακας 3.3 Σύγκριση των κλινικών χαρακτηριστικών μεταξύ ανδρών και γυναικών

Παράμετρος	Άνδρες	Γυναίκες	p
Φύλο (♀/♂)	20	80	-
Ηλικία (έτη)	37,7 ± 7,3	39,4 ± 10,6	NS
Εμμηνόπαυση	-	66 (82%)	-
Βάρος (kg)	119,7 ± 15,4	91,2 ± 12,4	< 0,001
ΔΜΣ (kg / m²)	38,0 ± 4,5	34,9 ± 4,9	NS
Περίμετρος μέσης (cm)	124,1 ± 9,8	109,5 ± 10,9	< 0,01
Περίμετρος ισχίων (cm)	126,0 ± 9,8	121,9 ± 8,3	NS
Συστολική αρτηριακή πίεση (mm Hg)	125 ± 13	122 ± 16	NS

Διαστολική αρτηριακή πίεση (mm Hg)	85 ± 11	81 ± 9	NS
Κάπνισμα (ναι/όχι)	11/9 (55/45%)	28/ 52 (35/65%)	NS
Μεταβολικό Σύνδρομο (ναι/όχι)	10/10(50/50%)	29/51(37/63%)	0,05

Όσον αφορά το βιοχημικό έλεγχο, εντοπίστηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ ανδρών και γυναικών με τις γυναίκες να έχουν υψηλότερη HDL χοληστερόλη και χαμηλότερα τριγλυκερίδια και non-HDL χοληστερόλη. Επιπρόσθετα, οι γυναίκες είχαν χαμηλότερα επίπεδα ουρικού οξέος, AST, ALT και γGT .

Πίνακας 3.4 Σύγκριση των βιοχημικών χαρακτηριστικών μεταξύ ανδρών και γυναικών

Παράμετρος	Άνδρες	Γυναίκες	p
Ολική χοληστερόλη (mg/dl)	234 ± 52	213 ± 42	NS
Τριγλυκερίδια (mg/dl)	141 (58-264)	90 (29 – 300)	0,009
HDL χοληστερόλη (mg/dl)	42 (32-74)	54 (33 – 92)	0,05
LDL χοληστερόλη (mg/dl)	153 ± 41	143 ± 39	NS
Non-HDL χοληστερόλη (mg/dl)	188 ± 46	159 ± 35	0,02
Apo A₁ (mg/dl)	128 ± 6	151 ± 19	NS
Apo B (mg/dl)	110 ± 14	104 ± 32	NS
Apo E (mg/dl)	39 ± 8	44 ± 18	NS
Lp(a) (mg/dl)	6,5 (2,0 – 27,5)	7,3 (2,0 – 32,7)	NS
Γλυκόζη (mg/dl)	98 ± 14	92 ± 11	NS
Ινσουλίνη (μU/ml)	15,2 (3,4–32,0)	13,4 (4,4–29,0)	NS
Δείκτης HOMA	2,0 (0,84– 5,62)	2,88 (0,86–5,94)	NS
Κρεατινίνη (mg/dl)	1,0 ± 0,2	0,8 ± 0,1	NS
Ουρικό οξύ (mg/dl)	6,4 ± 0,8	4,3 ± 1,0	< 0,001

Ουρία (mg/dl)	32± 3	28 ± 7	NS
AST (IU/l)	25 (13-47)	20 (10-62)	0,02
ALT (IU/l)	37 (18-114)	21 (7-72)	<0,001
γ- GT (IU/l)	38 (15-119)	16 (2-104)	0,003
ALP (IU/l)	68 (44-120)	65(14-209)	NS
CK (IU/l)	159 (75-291)	81 (32-280)	NS
LDH (IU/l)	296 (180-573)	326 (102-426)	NS

Προεμμηνοπαυσιακές και μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες

Αναλύοντας τα αποτελέσματα σε προεμμηνοπαυσιακές και μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, παρατηρήθηκε διαφορά στο βάρος και την περίμετρο της μέσης. Επιπρόσθετα, οι μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες είχαν υψηλότερα επίπεδα ολικής, LDL και non-HDL χοληστερόλης και γλυκόζης νηστείας σε σύγκριση με τις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (Πίνακες 3.5 & 3.6).

Πίνακας 3.5 Σύγκριση των κλινικών χαρακτηριστικών μεταξύ προεμμηνοπαυσιακών και μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών

Παράμετρος	Προεμμην/κές	Μετεμμην/κές	p
Αριθμός	66	14	
Ηλικία	36 ± 8,7	53,1 ± 4,9	<0,001
Βάρος (kg)	92,4 ± 12,5	86,2 ± 11,4	0,05
ΔΜΣ (kg / m²)	34,9 ± 4,9	35,1 ± 5,1	NS
Περίμετρος μέσης (cm)	108,5 ± 10,9	112,9 ± 11,1	0,05
Περίμετρος ισχίων (cm)	122,7 ± 9,1	119,4 ± 4,6	NS
Συστολική αρτηριακή πίεση (mm Hg)	121 ± 16	127 ± 16	NS

Διαστολική αρτηριακή πίεση (mm Hg)	81 ± 10	81 ± 9	NS
Κάπνισμα (ναι/όχι)	25/41	4/10	NS
Μεταβολικό Σύνδρομο (ναι/όχι)	21/44	8/6	NS

Πίνακας 3.6 Σύγκριση των βιοχημικών χαρακτηριστικών μεταξύ προεμμηνοπαυσιακών και μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών

Παράμετρος	Προεμμην/κές	Μετεμμην/κές	p
Ολική χοληστερόλη (mg/dl)	208 ± 43	236 ± 23	<0,01
Τριγλυκερίδια (mg/dl)	89 (29-300)	111 (43-205)	NS
HDL χοληστερόλη (mg/dl)	53 ± 12	63 ± 13	NS
LDL χοληστερόλη (mg/dl)	135 ± 31	179 ± 49	<0,05
Non-HDL χοληστερόλη (mg/dl)	156 ± 36	177 ± 19	0,05
Apo A₁ (mg/dl)	147 ± 15	170 ± 29	NS
Apo B (mg/dl)	96 ± 21	140 ± 52	NS
Apo E (mg/dl)	41 ± 19	55 ± 6	NS
Lp(a) (mg/dl)	7,2 (2-32)	5,2 (2-18)	NS
Γλυκόζη (mg/dl)	90 ± 9	99 ± 14	0,05
Ινσουλίνη (μU/ml)	13,4 (4,4-29)	8 (4,4-19,7)	NS
Δείκτης HOMA	3,0 (0,9-5,94)	1,9 (0,8-5,5)	NS
Κρεατινίνη (mg/dl)	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1	NS
Ουρικό οξύ (mg/dl)	4,3 ± 0,9	4,2 ± 1,1	NS
Ουρία (mg/dl)	27 ± 6,6	31 ± 7,8 8	NS
AST (IU/l)	19 (10 - 62)	20 (16 - 31)	NS
ALT (IU/l)	20 (7-72)	23 (12-40)	NS
γ- GT (IU/l)	17 (10-104)	15 (2-60)	NS

ALP (IU/l)	63 (14-209)	77 (44-123)	NS
CK (IU/l)	81 (32-278)	81 (38-280)	NS
LDH (IU/l)	312 (102-426)	372 (173-405)	NS

Πρόσληψη θρεπτικών συστατικών

Η εκτίμηση της πρόσληψης ενέργειας σε θερμίδες (Kcal) και των μακροθρεπτικών συστατικών σε γραμμάρια (gr) έγινε με τη χρήση ενός ημιποσοτικού ΕΣΚΤ. Η υπολογιζόμενη πρόσληψη ενέργειας ήταν 2015 ± 542 kcal ανά ημέρα. Από αυτές τις θερμίδες, το 15,8% προέρχονταν από πρωτεΐνη, το 45,5% από υδατάνθρακες, το 37,9% από λιπαρά και το 0,8% από αλκοόλ. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 3.7.

Πίνακας 3.7 Ημερήσια πρόσληψη ενέργειας και μακροθρεπτικών συστατικών

Παράμετρος	
Ενέργεια (kcal)	2015 \pm 542 [1826 (1201-3193)]
Πρωτεΐνες (gr)	77,8 \pm 15,4 [77,2 (51-109)]
Λιπαρά (gr)	93,8 \pm 27,4 [90,9 (47-146)]
Κορεσμένα	37,5 (11-103)
Μονοακόρεστα	21,5 (9,3-46,2)
Πολυακόρεστα	7 (4-20,5)
Trans λιπαρά	0,85 (0,3-2,2)
Υδατάνθρακες (gr)	231 \pm 75 [211 (122-418)]
Γλυκόζη	18,2 (6-62)
Φρουκτόζη	24,3 (6,3-78)
Σουκρόζη	43,7 (14-176)
Αλκοόλ (ml)	2,5 (0-35)

Διατροφική χοληστερόλη (mg)	220 ± 76 [209 (106-392)]
------------------------------------	--------------------------

Η σύγκριση της πρόσληψης μακροθρεπτικών συστατικών μεταξύ γυναικών και ανδρών, έδειξε ότι οι μόνες διαφορές αφορούσαν την πρόσληψη πρωτεϊνών και οιοπνεύματος που ήταν αυξημένη στους άνδρες (Πίνακας 3.8).

Πίνακας 3.8 Σύγκριση ημερήσιας πρόσληψης ενέργειας και μακροθρεπτικών συστατικών μεταξύ ανδρών και γυναικών

Παράμετρος	Άνδρες	Γυναίκες	p
Ενέργεια (kcal)	2229 ± 497	1949 ± 511	NS
Πρωτεΐνες (gr)	86,1 ± 9,7	75,6 ± 15,3	0,05
Λιπαρά (gr)	93 (53-141)	87,8 (47-166)	NS
Κορεσμένα	39 (11-98)	37,5 (13-103)	NS
Μονοακόρεστα	20 (13-36)	21,5 (9-46)	NS
Πολυακόρεστα	6,8 (5,6-14,7)	7,2 (4-20)	NS
Trans λιπαρά	0,8 (0,3-2,1)	0,85 (0,3-2,1)	NS
Υδατάνθρακες (gr)	244 (169-413)	205 (122-408)	NS
Γλυκόζη	14 (7-47)	18,2 (6-63)	NS
Φρουκτόζη	19 (8-65)	24 (6-78)	NS
Σουκρόζη	45 (30-156)	42 (14-124)	NS
Αλκοόλ (ml)	8,5 (0-35)	1,9 (0-35)	<0,05
Διατροφική χοληστερόλη (mg)	237 (134-392)	208 (107-385)	NS

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.9, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ προεμμηνοπαυσιακών και μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών όσον αφορά την ημερήσια πρόσληψη ενέργειας και μακροθρεπτικών συστατικών, με μόνη εξαίρεση

την πρόσληψη πρωτεϊνών και των απλών σακχάρων (γλυκόζης και φρουκτόζης), που ήταν υψηλότερα στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες.

Πίνακας 3.9 Σύγκριση ημερήσιας πρόσληψης ενέργειας και μακροθρεπτικών συστατικών ανάμεσα σε προεμμηνοπαυσιακές και μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες

Παράμετρος	Προεμμην/κές	Μετεμμην/κές	p
Ενέργεια (kcal)	1886 ± 485	2172 ± 563	NS
Πρωτεΐνες (γρ)	73,3 ± 15	84 ± 14	<0,05
Λιπαρά (γρ)	89 (49-157)	86 (64-166)	NS
Κορεσμένα	37 (14-103)	29 (13-96)	NS
Μονοακόρεστα	21,5 (9,4-46)	21 (9-34)	NS
Πολυακόρεστα	7 (4-16)	7,4 (5-20,5)	NS
Trans λιπαρά	0,9 (0,3-2,1)	0,8 (0,3-1,5)	NS
Υδατάνθρακες (γρ)	200 (122-418)	236 (173-378)	NS
Γλυκόζη	17 (6-46)	27,7 (8-63)	0,05
Φρουκτόζη	21 (6-61)	35 (8,5-78,6)	0,05
Σουκρόζη	43 (14-124)	32 (22,8-84)	NS
Αλκοόλ (ml)	1,9 (0-35)	3,9 (0-29)	NS
Διατροφική χοληστερόλη (mg)	207 (106-385)	217 (107-318)	NS

Πρόσληψη φλαβονοειδών

Η μέση ημερήσια πρόσληψη φλαβονοειδών υπολογίστηκε από τα συμπληρωμένα ΕΣΚΤ και τις αναφερόμενες συγκεντρώσεις των επιμέρους υποκατηγοριών φλαβονοειδών σε συγκεκριμένα τρόφιμα που περιλαμβάνονται στους πίνακες του Αμερικανικού Υπουργείου Γεωργίας.

Στον πίνακα 3.10 παρουσιάζεται η εκτιμώμενη ημερήσια πρόσληψη ανά υποομάδα φλαβονοειδών, δηλαδή οι ανθοκυανιδίνες, οι φλαβανόλες, οι φλαβανόνες, οι φλαβόνες και οι φλαβονόλες, μαζί με τα βασικότερα φλαβονοειδή που συνιστούν την καθεμία από αυτές, και στο τέλος δίνεται το άθροισμά τους. Στον ίδιο πίνακα αναγράφεται ακόμη η εκτιμώμενη ημερήσια πρόσληψη προανθοκυανιδινών και τελικά το συνολικό άθροισμα των φλαβονοειδών και των προανθοκυανιδινών.

Πίνακας 3.10 Ημερήσια πρόσληψη φλαβονοειδών (mg)

Ανθοκυανιδίνες	24,9 (2,4-102)
Κυανιδίνη	11,9 (1,2 - 86,7)
Δελφινιδίνη	4,4 (0,5-17,5)
Μαλβιδίνη	3,3 (0-23)
Πεονιδίνη	1,2 (0,2-5,2)
Πετουνιδίνη	3,2 (0-17,4)
Φλαβανόλες	45,6 (0,69-412,4)
Επικατεχίνη	15 (0,2-80)
Γαλλικός εστέρας επικατεχίνης	0,03 (0-23,4)
Επιγαλλοκατεχίνη	2,5 (0,01-27,9)
Γαλλικός εστέρας επιγαλχίνης	0,77 (0-73,36)
Κατεχίνη	9,4 (0,45-62,28)
Γαλλοκατεχίνη	0,03 (0-3,4)

Θεαρουμπιγγίνες	0 (0-230,35)
Φλαβανόνες	41,66 (0,53-252,98)
Εσπεριτίνη	24,33 (0-154,81)
Ναριγγενίνη	21,6 (0.53-98,17)
Φλαβόνες	7,43 (1,02-19,63)
Απιγενίνη	2,87 (0-12,47)
Λουτεολίνη	3,19 (0,42-9,1)
Φλαβονόλες	103,64 (29,82-326,99)
Κεμπφερόλη	32,15 (12,38-83,98)
Μυρισετίνη	1,3 (0,28-4,97)
Κουερσετίνη	72,94 (6,57-242,26)
Συνολικά φλαβονοειδή	275,38 (77,21-823,03)
Προανθοκυανιδίνες	134,61 (5,92-444,6)
Σύνολο φλαβονοειδών – προανθοκυανιδινών	405,69 (85,23-1214,45)

Παρά το γεγονός ότι οι γυναίκες φαίνεται ότι έχουν υψηλότερη πρόσληψη φλαβονοειδών και μικρότερη προανθοκυανιδινών, οι διαφορές αυτές δεν είναι στατιστικά σημαντικές (Πίνακας 3.11).

Πίνακας 3.11 Σύγκριση ημερήσιας πρόσληψης φλαβονοειδών μεταξύ ανδρών και γυναικών (mg)

	Άνδρες	Γυναίκες	p
Ανθοκυανιδίνες	29,5 (12,8-83)	24,5 (2,4-102)	NS
Κυανιδίνη	14 (3,7-54)	11,6 (1,2-86,7)	NS
Δελφινιδίνη	4,4 (2,8-8,5)	4,5 (0,4-17,5)	NS
Μαλβιδίνη	4,8 (1,7-10,2)	3,3 (0,1-23,5)	NS

Πεονιδίνη	1,1 (0,8-3,6)	1,2 (0,2-5,2)	NS
Πετουνιδίνη	3,1 (1,7-7,4)	3,2 (0-17,5)	NS
Φλαβανόλες	59,8 (18-115)	44 (0,7-412)	NS
Επικατεχίνη	16,4 (6,1-61,4)	14,7 (0,2-80)	NS
Γαλλικός εστέρας επικατεχίνης	0,1 (0-5,27)	0,1 (0-23)	NS
Επιγαλλοκατεχίνη	2,7 (0,5-6,86)	2,4 (0-28)	NS
Γαλλικός εστέρας επιγαλ/χίνης	0,8 (0-16,3)	0,7 (0-73)	NS
Κατεχίνη	9,9 (5,5-40,5)	8,5 (0,4-62)	NS
Γαλλοκατεχίνη	0,06 (0-0,9)	0,03 (0-3,4)	NS
Θεαρουμπιγγίνες	0 (0-61)	0 (0-230)	NS
Φλαβανόνες	34,5 (17-240)	52,5 (0,5-253)	NS
Εσπεριτίνη	17,5 (5-150)	28 (0-155)	NS
Ναρινγενίνη	17 (10-90)	22,8 (0,5-98)	NS
Φλαβόνες	5 (1-13,8)	8 (1,1-19,6)	NS
Απιγενίνη	1,8 (0,1-6,3)	3,3 (0-12,5)	NS
Λουτεολίνη	2,8 (0,4-7,7)	3,2 (0,8-9)	NS
Φλαβονόλες	89 (40-158)	107 (29-327)	NS
Κεμπφερόλη	26,8 (13,1-60,2)	35,1 (12-84)	NS
Μυρισετίνη	1,1 (0,5-1,7)	1,3 (0,3-4,9)	NS
Κουερσετίνη	49,7 (13-120)	74,7 (6,5-242)	NS
Συνολικά φλαβονοειδή	224 (124-565)	293 (77-823)	NS
Προανθοκυανιδίνες	151 (78-444)	129 (5,9-400)	NS
Σύνολο φλαβονοειδών – προανθοκυανιδινών	375 (204-854)	414 (85-1200)	NS

Οι μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες προσλαμβάνουν περισσότερες κατεχίνες, σε σύγκριση με τις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (Πίνακας 3.12).

Πίνακας 3.12 Σύγκριση ημερήσιας πρόσληψης φλαβονοειδών μεταξύ προεμμηνοπαυσιακών και μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών (mg)

	Προεμμην/κές	Μετεμμην/κές	p
Ανθοκυανιδίνες	24,1 (2,4-71,2)	43,5 (12-102)	0,05
Κυανιδίνη	10,8 (1,2-47)	16 (2,7-86,7)	NS
Δελφινιδίνη	4,3 (0,4-17,5)	6,2 (2,15-13,1)	NS
Μαλβιδίνη	3,2 (0,01-17,7)	4 (1,7-23,5)	NS
Πεονιδίνη	1,2 (0,2-3,6)	2,4 (0,8-5,2)	NS
Πετουνιδίνη	2,8 (0-9,6)	3,5 (2,2-17,5)	NS
Φλαβανόλες	41,5 (3-355)	80 (0,7-412)	NS
Επικατεχίνη	12,7 (1,2-40,5)	17,9 (0,2-80)	NS
Γαλλικός εστέρας επικατεχίνης	0,02 (0-20,2)	0,05 (0-23)	NS
Επιγαλλοκατεχίνη	2,3 (0,01-25,9)	4,5 (0,04-28)	NS
Γαλλικός εστέρας επιγαλ/χίνης	0,7 (0-67,8)	1,4 (0-73)	NS
Κατεχίνη	7,4 (1,3-23,2)	16,1 (0,4-62)	0,05
Γαλλοκατεχίνη	0,03 (0-3,4)	0,2 (0-3)	NS
Θεαρουμπιγγίνες	0 (0-230)	0 (0-203)	NS
Φλαβανόνες	40 (0,5-253)	80,7 (8,7-139)	NS
Εσπεριτίνη	22,9 (0-154)	45 (0,1-82)	NS
Ναρινγενίνη	21 (0,5-98)	35 (8,6-57)	NS
Φλαβόνες	8,1 (1,1-17,2)	8 (1,3-19,6)	NS

Απιγενίνη	4,8 (0-10,7)	3,2 (0,1-12,5)	NS
Λουτεολίνη	3 (0,8-9,1)	4,7 (1,2-7,1)	NS
Φλαβονόλες	111 (29-327)	99 (54-214)	NS
Κεμπφερόλη	36,8 (12,4-84)	29,5 (21,5-72)	NS
Μυρισετίνη	1,2 (0,3-4,8)	1,4 (0,6-5)	NS
Κουερσετίνη	76,9 (6,5-242)	71,9 (26-147)	NS
Συνολικά φλαβονοειδή	245 (77-713)	332 (79-823)	NS
Προανθοκυανιδίνες	115 (25-363)	118 (5,9-400)	NS
Σύνολο φλαβονοειδών – προανθοκυανιδινών	397 (132-919)	618 (85-1214)	NS

Συσχέτιση της πρόσληψης φλαβονοειδών με κλινικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά

Διερευνώντας τις πιθανές συσχετίσεις ανάμεσα στην πρόσληψη φλαβονοειδών και προανθοκυανιδινών και σε κλινικούς και βιοχημικούς δείκτες προέκυψαν τα ακόλουθα αποτελέσματα: Παρατηρήθηκε μία θετική συσχέτιση ανάμεσα στην πρόσληψη φλαβονοειδών και την ηλικία ($r = 0,27$) και μία αρνητική συσχέτιση των προσλαμβανόμενων φλαβονοειδών και προανθοκυανιδινών με τα τριγλυκερίδια ($r = -0,21$ και $-0,22$ αντίστοιχα). Ανιχνεύθηκε επίσης μία θετική συσχέτιση μεταξύ της HDL χοληστερόλης και της πρόσληψης των φλαβονοειδών ($r = 0,24$), ενώ η ημερήσια πρόσληψη προανθοκυανιδινών συσχετιζόταν αρνητικά με τα επίπεδα της ινσουλίνης ($r = -0,26$). Τέλος, παρατηρήθηκαν αρνητικές συσχετίσεις της ημερήσιας πρόσληψης φλαβονοειδών όσο και της ημερήσιας πρόσληψης των προανθοκυανιδινών με τη δραστικότητα της αμινοτρανσφεράσης της αλανίνης (ALT) ($r = -0,25$ και $-0,22$ αντίστοιχα), ενώ υπήρχε επίσης αρνητική συσχέτιση μεταξύ της πρόσληψης των προσλαμβανόμενων φλαβονοειδών με τη δραστικότητα της γ-γλουταμινικής τρανσφεράσης (γGT) ($r = -0,23$).

3.2 Διατασιμότητα των αγγείων

Η διατασιμότητα των αγγείων ελέγχθηκε με μαγνητική τομογραφία της αορτής σε 20 ασθενείς. Τα χαρακτηριστικά αυτών των ασθενών φαίνονται στον πίνακα 3.13 . Η ταχύτητα του σφυγμικού κύματος (PWV, pulse wave velocity) ήταν $9,81 \pm 5,93$ m/sec και η διατασιμότητα της αορτής ήταν $4,75 \pm 2,85 \cdot 10^{-3}$ mm Hg⁻¹. Δεν παρατηρήθηκε καμία συσχέτιση των κλινικών ή βιοχημικών χαρακτηριστικών αυτών των ατόμων είτε με την πρόσληψη μακροθρεπτικών συστατικών είτε με την πρόσληψη φλαβονοειδών.

Πίνακας 3.13 Χαρακτηριστικά των 20 ασθενών που ελέγχθηκαν με μαγνητική τομογραφία αορτής

Παράμετρος	
Φύλο (♀/♂)	16 / 4
Ηλικία (έτη)	$38,9 \pm 10,3$
Βάρος (kg)	$95,3 \pm 16,8$
ΔΜΣ (kg / m²)	$35,4 \pm 5,1$ [34,3 (27-47)]
Περίμετρος μέσης (cm)	$111,5 \pm 12,7$
Περίμετρος ισχίων (cm)	$122,5 \pm 8,7$
Συστολική αρτηριακή πίεση (mm Hg)	125 ± 16
Διαστολική αρτηριακή πίεση (mm Hg)	81 ± 11
Κάπνισμα (ναι/όχι)	10/10
Μεταβολικό Σύνδρομο (ναι/όχι)	8/12
Ολική χοληστερόλη (mg/dl)	217 ± 44
Τριγλυκερίδια (mg/dl)	116 ± 64
HDL χοληστερόλη (mg/dl)	54 ± 13
LDL χοληστερόλη (mg/dl)	142 ± 33

Non-HDL χοληστερόλη (mg/dl)	164 ± 38
Apo A₁ (mg/dl)	149 ± 19,9
Apo B (mg/dl)	105,7 ± 30
Apo E (mg/dl)	42,9 ± 9,8
Lp(a) (mg/dl)	5 (2,0 – 32,7)
Γλυκόζη (mg/dl)	93 ± 11
Ινσουλίνη (μU/ml)	11,8 (3,4 – 32,0)
Δείκτης HOMA	2,77 (0,9-5,9)
Διατασιμότητα αορτής (10⁻³ mm Hg⁻¹)	4,75 ± 2,85
PWV (m/sec)	9,81±5,93

PWV, pulse wave velocity, ταχύτητα σφυγμικού κύματος

Πίνακας 3.14 Ημερήσια πρόσληψη φλαβονοειδών των 20 ατόμων που ελέχθησαν με μαγνητική τομογραφία αορτής (mg)

Ανθοκυανιδίνες	22,9 (2,1-100)
Κυανιδίνη	10,9 (1,1 – 87,6)
Δελφινιδίνη	3,9 (0,4-15)
Μαλβιδίνη	3,2 (0-22)
Πεονιδίνη	1,3 (0,2-5,0)
Πετουνιδίνη	3,4 (0-16,4)
Φλαβανόλες	43,4 (0,6-410)
Επικατεχίνη	13 (0,2-81)
Γαλλικός εστέρας επικατεχίνης	0,02 (0-23)
Επιγαλλοκατεχίνη	2,7 (0,01-27)
Γαλλικός εστέρας επιγαλχίνης	0,7 (0-73)

Κατεχίνη	9,2 (0,4-62)
Γαλλοκατεχίνη	0,03 (0-3,1)
Θεαρουμπιγγίνες	0 (0-230)
Φλαβανόνες	41,6 (0,5-250)
Εσπεριτίνη	24,3 (0-151)
Ναριγγενίνη	20,3 (0,53-97)
Φλαβόνες	7,3 (1,0-19,6)
Απιγενίνη	2,8 (0-12,7)
Λουτεολίνη	3,9 (0,4-9,1)
Φλαβονόλες	103,6 (29,8-323)
Κεμπφερόλη	32,1 (12,8-81,8)
Μυρισετίνη	1,2 (0,2-4,7)
Κουερσετίνη	73,5 (6,5-242,6)
Συνολικά φλαβονοειδή	265,8 (57,2-801,3)
Προανθοκυανιδίνες	134,6 (5,9-446)
Σύνολο φλαβονοειδών – προανθοκυανιδινών	398,9 (85,2-1203)

3.3 Βισφατίνη και Μεταβολικό Σύνδρομο

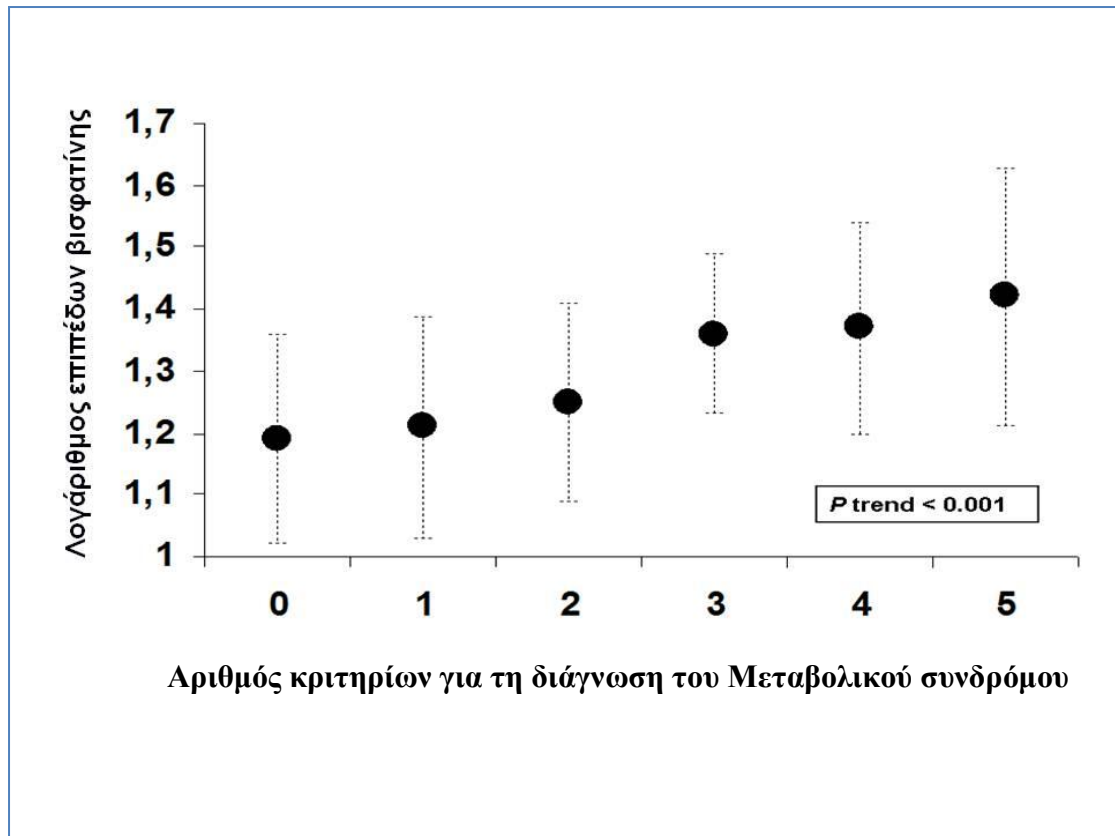
Για τη μελέτη των επιπέδων της βισφατίνης στο πλάσμα μελετήθηκαν 186 άτομα χωρίς σακχαρώδη διαβήτη, 81 άντρες και 106 γυναίκες, που προσήλθαν στο εξωτερικό ιατρείο μεταβολισμού των λιπιδίων και παχυσαρκίας. Από αυτά τα άτομα, τα 90 πληρούσαν τα κριτήρια για τη διάγνωση του μεταβολικού συνδρόμου σύμφωνα με την NCEP ATP III, ενώ τα υπόλοιπα 96 άτομα αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου. Στον πίνακα 3.14 φαίνονται τα κλινικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά αυτών των ατόμων. Τα επίπεδα της βισφατίνης πλάσματος ήταν αυξημένα στα άτομα με μεταβολικό σύνδρομο.

Πίνακας 3.15 Κλινικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των 186 ατόμων που μελετήθηκαν

Παράμετρος	Ομάδα ελέγχου	Μεταβολικό Σύνδρομο	p
Άτομα	96	90	NS
Άνδρες/γυναίκες	40/56	41/49	NS
Ηλικία	48 ± 14	49 ± 15	NS
ΔΜΣ (kg/m ²)	26,4 ± 3,7	28,5 ± 2,1	<0,05
Περίμετρος Μέσης (cm)	94 ± 13	111 ± 12	<0,05
Άνδρες	100 ± 9	111 ± 10	<0,05
Γυναίκες	88 ± 12	110 ± 13	<0,05
Συστολική ΑΠ (mmHg)	126 ± 17	145 ± 15	<0,05
Διαστολική ΑΠ (mmHg)	80 ± 9	89 ± 9	<0,05
Ολική Χοληστερόλη (mg/dl)	225 ± 37	247 ± 45	<0,05
HDL Χοληστερόλη (mg/dl)	58 ± 11	50 ± 10	<0,05

Τριγλυκερίδια (mg/dl)	95 (55-318)	203 (83-776)	<0,05
LDL Χοληστερόλη (mg/dl)	148 ± 42	159 ± 43	NS
Γλυκόζη (mg/dl)	93 ± 9	105 ± 18	<0,05
Ινσουλίνη (IU/L)	8 (2,0-40,0)	14,5 (3,8-59)	<0,05
HOMA index	1,78 (0,4-9,6)	3,71 (0,39-19,7)	<0,05
Βισφατίνη (ng/ml)	16,1 (6,7-48,7)	24,6 (9,1-56,6)	<0,05

Τα επίπεδα βισφατίνης αυξάνονταν με την αύξηση του αριθμού των κριτηρίων για τη διάγνωση του μεταβολικού συνδρόμου (p for trend < 0,001)(Σχήμα 3.1). Επίσης, η συγκέντρωση της βισφατίνης συσχετιζόταν με τα τέσσερα από τα πέντε κριτήρια για τη διάγνωση του μεταβολικού συνδρόμου: Με την περίμετρο μέσης ($r = 0,3$, $p < 0,001$), τα τριγλυκερίδια ($r = 0,35$, $p < 0,001$), τη συστολική και τη διαστολική αρτηριακή πίεση ($r = 0,28$ και $r = 0,27$, αντίστοιχα, $p < 0,001$) και οριακά με τη γλυκόζη νηστείας ($r = 0,144$, $p < 0,055$), χωρίς ωστόσο να υπάρχει συσχέτιση με την HDL χοληστερόλη. Επίσης τα επίπεδα της βισφατίνης συσχετιζόταν με τα επίπεδα της ολικής και non-HDL χοληστερόλης ($r = 0,23$ και $r = 0,25$, αντίστοιχα, $p < 0,01$), με τα επίπεδα της LDL χοληστερόλη ($p > 0,07$), της ινσουλίνης ($r = 0,165$, $p = 0,035$), καθώς και με το δείκτη ινσουλινοαντίστασης HOMA ($r = 0,16$, $p = 0,04$). Σε μία υποομάδα αυτού του πληθυσμού με 28 παχύσαρκα άτομα με ΜετΣ και 28 παχύσαρκα άτομα της ίδιας ηλικίας και φύλου χωρίς μεταβολικό σύνδρομο, τα επίπεδα της βισφατίνης ήταν υψηλότερα [27 (16- 65) ng/ml vs 19 (10-47) ng/ml, $p < 0,05$].



Σχήμα 3.1 Λογάριθμος επιπέδων βισφατίνης σε σχέση με τον αριθμό των κριτηρίων για τη διάγνωση του μεταβολικού συνδρόμου κατά NCEP ATP III

3.4 Επίδραση πολυφαινολών σε ανθρώπινα λιποκύτταρα SGBS

3.4.1 Διαφοροποίηση ινοβλαστών SGBS

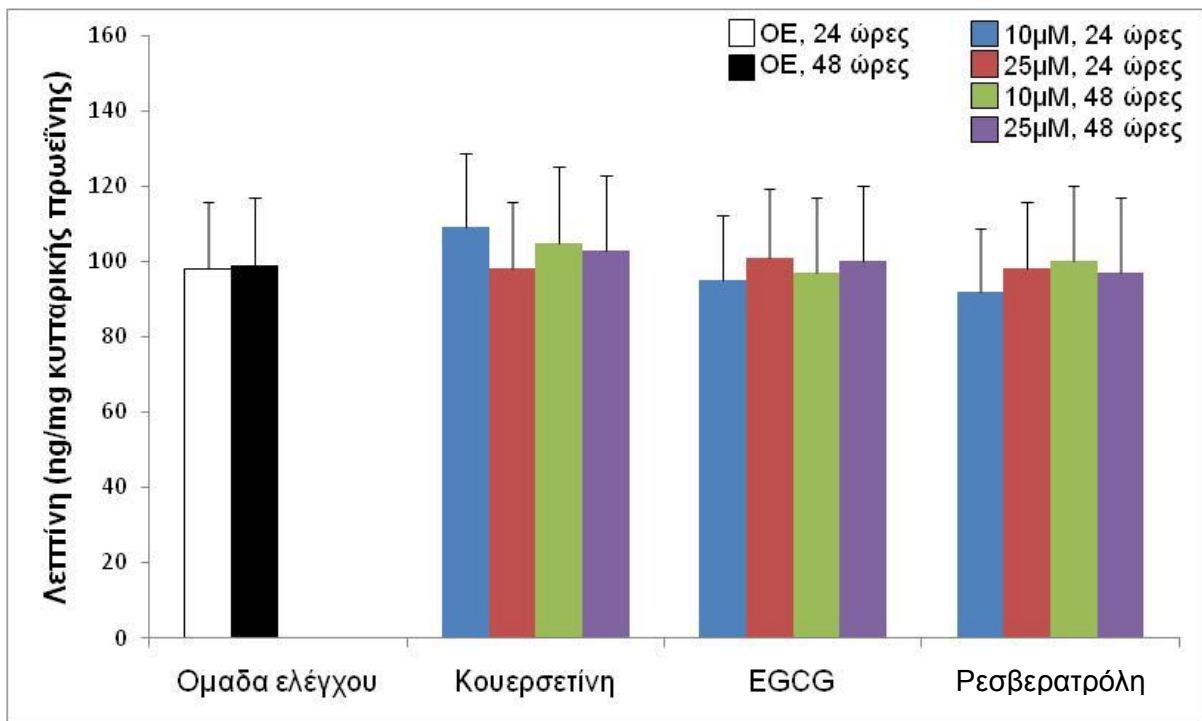
Οι ινοβλάστες SGBS διαφοροποιήθηκαν επιτυχώς σε ώριμα λιποκύτταρα 15 ημέρες από την έναρξη του προγράμματος διαφοροποίησης. Αυτή η διαφοροποίηση επιβεβαιώθηκε με μικροσκοπική παρατήρηση των λιποκυττάρων στο οπτικό μικροσκόπιο. Παράλληλα, έγινε χρώση με τη χρωστική Oil Red O και ταυτοποιήθηκε η παρουσία των σταγονιδίων λίπους – τριγλυκεριδίων των λιποκυττάρων, που βάφθηκαν κόκκινα.

Η λειτουργικότητα των λιποκυττάρων ελέγχθηκε με τον προσδιορισμό στο υπερκείμενο της κυτταροκαλλιέργειας των εκκρινόμενων αδιποκινών λεπτίνης, αντιπονεκτίνης και βισφατίνης. Ο προσδιορισμός των τριών παραπάνω αδιποκινών έγινε με τη χρήση εμπορικά διαθέσιμων kit τύπου ELISA, 24 ώρες μετά από την αλλαγή του θρεπτικού υλικού και συγκρίθηκε με δείγμα από το υπερκείμενο μη διαφοροποιημένων ινοβλαστών. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν και στη συνέχεια προσδιορίστηκαν τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων και της πρωτεΐνης. Ο λόγος τριγλυκεριδίων / πρωτεΐνη ήταν $1,14 \pm 0,30$ $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ ανά θέση και δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά μεταξύ των διαφορετικών θέσεων, $p > 0,05$.

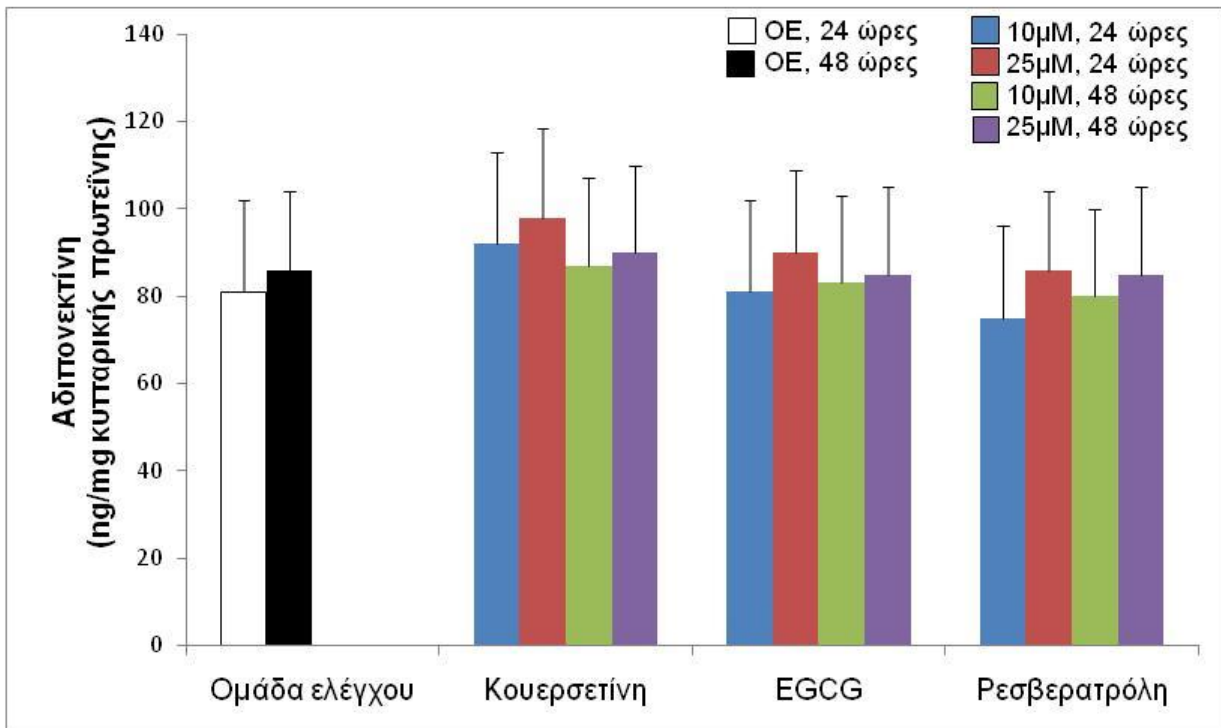
Τα επίπεδα της λεπτίνης ήταν 98 ± 22 , της αντιπονεκτίνης 81 ± 23 και της βισφατίνης 320 ± 70 ng/mg κυτταρικής πρωτεΐνης. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των διαφορετικών θέσεων, τόσο αρχικά, όσο και μετά από τη διόρθωση για το λόγο τριγλυκεριδίων / πρωτεΐνη ($p > 0,05$).

3.4.2 Επίδραση των πολυφαινόλων σε λιποκύτταρα SGBS

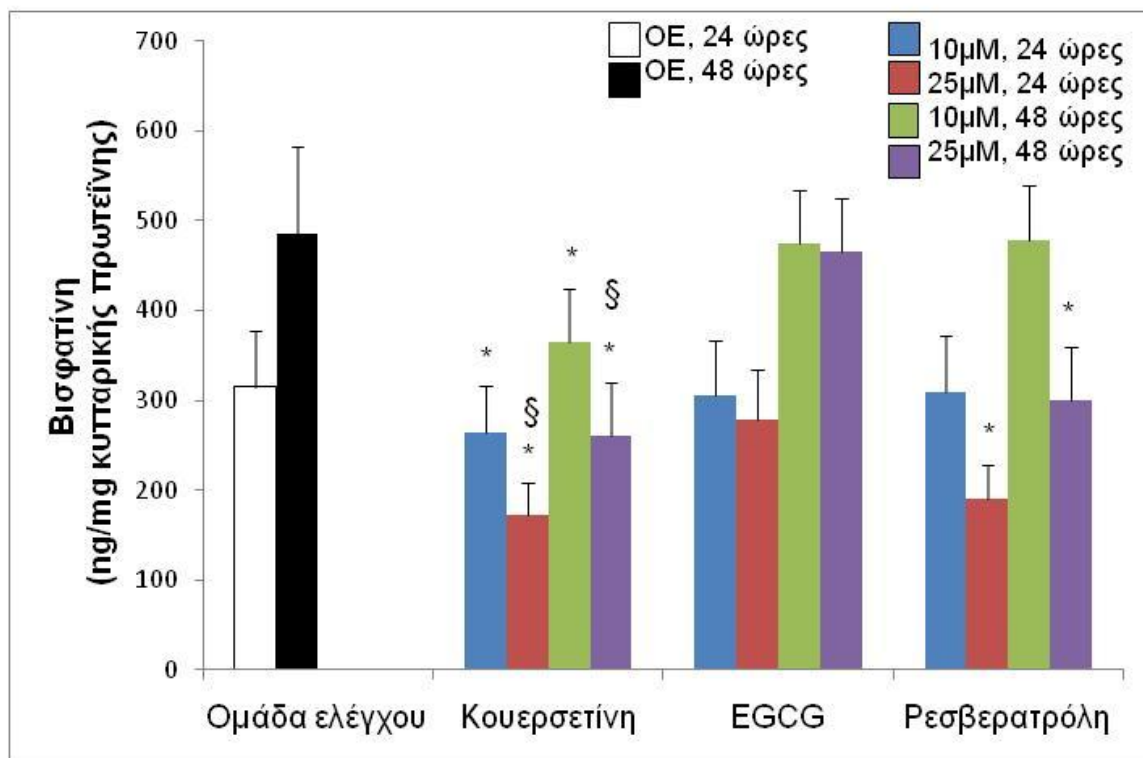
Η επίδραση σε ώριμα SGBS λιποκύτταρα των πολυφαινόλων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη μελετήθηκε σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφηκε στις μεθόδους. Οι συγκεντρώσεις που επιλέχθηκαν ήταν 10 και 25 μM . Καμία από τις τρεις πολυφαινόλες δεν επηρέασε την έκκριση της λεπτίνης και αντιπονεκτίνης στις 24 και 48 ώρες (Σχήματα 3.2 & 3.3). Αντίθετα, η επώαση των λιποκυττάρων με κουερσετίνη είχε ως αποτέλεσμα μία δοσο-εξαρτώμενη μείωση της εκκρινόμενης βισφατίνης (Σχήμα 3.4). Συγκεκριμένα, η κουερσετίνη στη συγκέντρωση των 10 μM μείωσε την έκκριση βισφατίνης κατά 16% και 25% στις 24 και 48 ώρες αντίστοιχα ($p < 0,05$ έναντι της ομάδας ελέγχου), ενώ οι αντίστοιχες ποσοστιαίες μειώσεις με την συγκέντρωση των 25 μM ήταν 47 % και 48% ($p < 0,05$ έναντι της ομάδας ελέγχου και $p < 0,05$ έναντι της κουερσετίνης 10 μM στις ίδιες χρονικές στιγμές) (Σχήμα 3.5). Η χαμηλή συγκέντρωση ρεσβερατρόλης δεν επηρέασε την έκκριση της βισφατίνης, ενώ στην συγκέντρωση των 25 μM οι μειώσεις ήταν 28% και 38% αντίστοιχα ($p < 0,05$ έναντι της ομάδας ελέγχου) και δεν διέφεραν από τις μεταβολές που παρατηρήθηκαν με την υψηλή συγκέντρωση κουερσετίνης (Σχήμα 3.5). Ο γαλλικός εστέρας επιγαλλοκατεχίνης δεν επηρέασε τα επίπεδα της βισφατίνης στο υπερκείμενο. Στη συνέχεια προσδιορίστηκε η βισφατίνη σε κυτταρόλυμα. Η συνολική βισφατίνη εντός των κυττάρων ήταν σχεδόν μηδενική (ποσοστού 1%) σε σύγκριση με τη συνολική εκκρινόμενη βισφατίνη του υπερκειμένου και δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των διαφορετικών θέσεων: (4.1 ± 0.9 ng βισφατίνης / mg κυτταρικής πρωτεΐνης, p μεταξύ των ομάδων $> 0,05$).



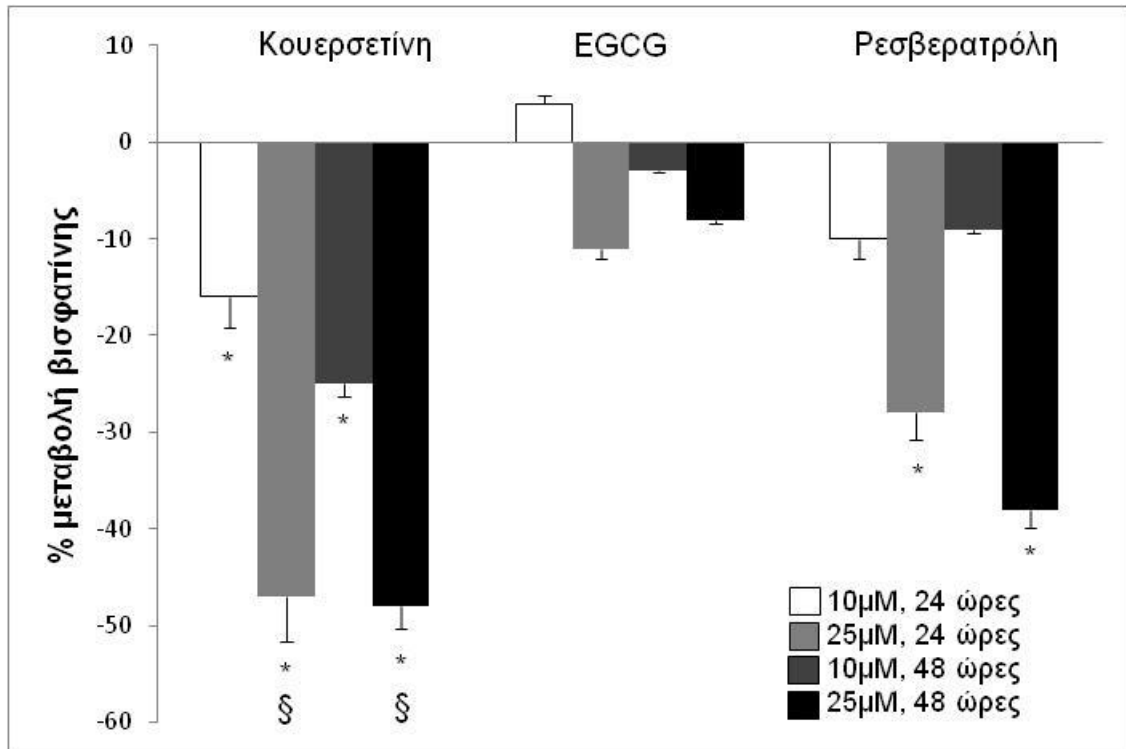
Σχήμα 3.2 Οι πολυφαινόλες κουερσετίνη, γαλλικός εστέρας επιγαλλοκατεχίνης και ρεσβερατρόλη δεν επηρεάζουν την έκκριση της λεπτίνης από ώριμα ανθρώπινα λιποκύτταρα σε καλλιέργεια. OE, ομάδα ελέγχου; EGCG, γαλλικός εστέρας επιγαλλοκατεχίνης.



Σχήμα 3.3 Οι πολυφαινόλες κουερσετίνη, γαλλικός εστέρας επιγαλλοκατεχίνης και ρεσβερατρόλη δεν επηρεάζουν την έκκριση της αντιπυονεκτίνης από ώριμα ανθρώπινα λιποκύτταρα σε καλλιέργεια. OE, ομάδα ελέγχου; EGCG, γαλλικός εστέρας επιγαλλοκατεχίνης.



Σχήμα 3.4 Επίδραση των πολυφαινολών κουερσετίνης, γαλλικού εστέρα επιγαλλοκατεχίνης και ρεσβερατρόλης στην έκκριση της βισφατίνης από ώριμα ανθρώπινα λιποκύτταρα σε καλλιέργεια. OE, ομάδα ελέγχου; EGCG, γαλλικός εστέρας επιγαλλοκατεχίνης. * $p < 0,05$ έναντι OE, § $p < 0,05$ έναντι της τιμής με 10 μM .



Σχήμα 3.5 Επίδραση των πολυφαινολών κουερσετίνης, γαλλικού εστέρα επιγαλλοκατεχίνης και ρεσβερατρόλης στην έκκριση της βισφατίνης από ώριμα ανθρώπινα λιποκύτταρα σε καλλιέργεια. OE, ομάδα ελέγχου; EGCG, γαλλικός εστέρας επιγαλλοκατεχίνης. * $p < 0,05$ έναντι OE, § $p < 0,05$ έναντι της τιμής με 10 μM

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Πληθυσμός

Για τη μελέτη της πρόσληψης φλαβονοειδών μελετήθηκαν 100 άτομα που προσήλθαν στο Εξωτερικό Ιατρείο Διαταραχών του Μεταβολισμού των Λιπιδίων και Παχυσαρκίας για απώλεια σωματικού βάρους. Οι υπέρβαροι και παχύσαρκοι ασθενείς του ιατρείου δεν αποτελούν ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα του γενικού πληθυσμού, όμως η διερεύνηση της πρόσληψης φλαβονοειδών στο γενικό πληθυσμό δεν ήταν ο σκοπός της παρούσας μελέτης. Ωστόσο, η διερεύνηση της πρόσληψης φλαβονοειδών στο συγκεκριμένο πληθυσμό έχει ένα συγκεκριμένο πλεονέκτημα, αφού μελετήθηκε ένας πληθυσμός που έχει ιδιαίτερα χαρακτηριστικά.

Η μέση τιμή του ΔΜΣ ήταν $34,3 \text{ kg} / \text{m}^2$, με εύρος 27 έως $47 \text{ kg} / \text{m}^2$. Τόσο οι άνδρες όσο και οι γυναίκες χαρακτηρίζονταν από σπλαχνική παχυσαρκία (περίμετρος μέσης > 102 και 88 cm αντίστοιχα). Η σύγκριση γυναικών και ανδρών έδειξε ότι οι τελευταίοι είχαν σημαντικά υψηλότερο βάρος και περίμετρο μέσης. Επιπρόσθετα, οι γυναίκες είχαν υψηλότερη HDL χοληστερόλη και χαμηλότερα τριγλυκερίδια και non-HDL χοληστερόλη σε σύγκριση με τους άνδρες. Επιπρόσθετα, οι γυναίκες είχαν χαμηλότερα επίπεδα ουρικού οξέος, AST, ALT και γGT, διαφορές που πιθανά οφείλονται στην επίδραση του φύλου.

Πρέπει να υπογραμμισθεί ότι οι προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες είχαν μεγαλύτερο σωματικό βάρος σε σύγκριση με τις μετεμμηνοπαυσιακές, όχι όμως και ΔΜΣ, κάτι το οποίο πιθανά οφείλεται στο γεγονός ότι περισσότερες μικρότερης ηλικίας γυναίκες απευθύνονται σε ένα εξειδικευμένο ιατρείο αφού πρώτα έχουν αποτύχει με άλλα μέσα να επιτύχουν απώλεια σωματικού βάρους και έχοντας

παράλληλα περισσότερα κιλά. Πράγματι, η ανάλυση των δεδομένων του πληθυσμού της μελέτης έδειξε ότι οι προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες είχαν επιδιώξει συχνότερα κατά το παρελθόν απώλεια βάρους σε σύγκριση με τις μετεμμηνοπαυσιακές. Η περίμετρος μέσης ήταν σχετικά αυξημένη στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, χωρίς ωστόσο να είναι στατιστικά σημαντική η διαφορά, ένα εύρημα που αποδίδεται στην επίδραση της εμμηνόπαυσης, που όπως είναι γνωστό, σχετίζεται με ανακατανομή του λίπους, κυρίως λόγω απουσίας των οιστρογόνων. Όσον αφορά το λιπιδαιμικό προφίλ, οι μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες είχαν υψηλότερα επίπεδα ολικής, LDL και non-HDL χοληστερόλης, ενώ και τα επίπεδα της γλυκόζη νηστείας ήταν υψηλότερα στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, πιθανά εξαιτίας της εμμηνόπαυσης που όπως είναι γνωστό ασκεί δυσμενή επίδραση στο μεταβολισμό υδατανθράκων και λιπιδίων.

4.2 Ερωτηματολόγιο συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων

Η εκτίμηση της πρόσληψης μακρο- και μικροθρεπτικών συστατικών ενός πληθυσμού αποτελεί πραγματική πρόκληση για τη διατροφική επιδημιολογία. Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι για τον υπολογισμό της πρόσληψης των διαφόρων θρεπτικών συστατικών¹⁹⁵⁻¹⁹⁸. Η πρόσληψη μπορεί να υπολογισθεί με τη βοήθεια διαφόρων διατροφικών μεθόδων, όπως η μεμονωμένη ή η επαναλαμβανόμενη ανάκληση της πρόσληψης τροφής σε ένα 24ωρο, η καταγραφή της κατανάλωσης τροφών και τα ερωτηματολόγια συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων (ΕΣΚΤ). Η επιλογή της πλέον κατάλληλης μεθόδου είναι δύσκολη. Το μειονέκτημα της 24ωρης ανάκλησης τροφής και της καταγραφής κατανάλωσης τροφής είναι ότι μπορεί να μην αντλήσουν αντιπροσωπευτικά δεδομένα για τις πραγματικές διατροφικές συνήθειες του ατόμου σε ένα δεδομένο χρονικό διάστημα. Ακόμη, επιπρόσθετο μειονέκτημα της 24ωρης ανάκλησης τροφής και της καταγραφής κατανάλωσης τροφής αποτελεί και η τάση υποεκτίμησης της πρόσληψης τροφής, αλλά και ο περιορισμός, σε σύγκριση με τα ΕΣΚΤ, για τα καταναλισκόμενα τρόφιμα που είναι πιθανό να αναφερθούν και να αναφέρονται σε ένα δεδομένο χρονικό διάστημα. Τα ΕΣΚΤ έχουν αξιολογηθεί, συγκρινόμενα με άλλες μεθόδους, κυρίως όσον αφορά την πρόσληψη ενέργειας, λιπαρών οξέων (κορεσμένων, μονοακόρεστων και πολυακόρεστων), υδατανθράκων και πρωτεϊνών, όπως επίσης και φυτικών ινών και θεωρούνται αποτελεσματικά και αξιόπιστα εργαλεία για την εκτίμηση της πρόσληψης θρεπτικών συστατικών¹⁹⁵⁻¹⁹⁸. Λιγότερα δεδομένα υπάρχουν για τα ΕΣΚΤ όσον αφορά την πρόσληψη μικροθρεπτικών συστατικών, όπως οι βιταμίνες ή τα μέταλλα¹⁹⁶. Όμως, τα ΕΣΚΤ θεωρούνται συνολικά κατάλληλα ερευνητικά εργαλεία για εφαρμογή σε μεγάλο αριθμό ατόμων ή σε ολόκληρους πληθυσμούς, ιδιαίτερα όταν η εκτίμηση της μακροπρόθεσμης πρόσληψης αποτελεί τον κύριο στόχο. Για αυτούς του λόγους,

επιλέξαμε να χρησιμοποιήσουμε ένα ΕΣΚΤ για την εκτίμηση της πρόσληψης ενέργειας, μακροθρεπτικών συστατικών και κυρίως των φλαβονοειδών. Αντίστοιχη μεθοδολογία χρησιμοποιήθηκε και σε άλλες μελέτες^{165, 166, 199-201}.

Τα κύρια χαρακτηριστικά που καθορίζουν την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων μιας έρευνας με τη χρήση ΕΣΚΤ είναι το είδος του δείγματος, το μέγεθος του δείγματος, η διαδικασία με την οποία συμπληρώνεται το ΕΣΚΤ, η εποχικότητα και η πιθανή χρήση συμπληρωμάτων διατροφής¹⁹⁶. Η εκτίμηση των διατροφικών συνηθειών ενός ατόμου εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ικανότητά του να αναφέρει την πρόσληψη - κατανάλωση τροφής. Διάφοροι παράγοντες επηρεάζουν τις διαιτητικές συνήθειες ενός ατόμου. Σε παχύσαρκα άτομα είναι γνωστό ότι υπάρχει υποεκτίμηση κυρίως της ενεργειακής πρόσληψης, όπως αποδείχθηκε και από μελέτες με τη μέθοδο του διπλά επισημασμένου νερού, γεγονός ωστόσο που μπορεί να επηρεάσει και τον υπολογισμό των επιμέρους θρεπτικών συστατικών²⁰²⁻²⁰⁴. Ένα επιπρόσθετο πρόβλημα είναι η τάση για αναφορά ψευδών δεδομένων αναφορικά με την αντίληψη για το ποια τρόφιμα ο ερωτώμενος θεωρεί πιο υγιεινά ή θρεπτικά^{205, 206}. Το φαινόμενο αυτό στη βιβλιογραφία αναφέρεται ως κοινωνικά επιθυμητή προκατάληψη (social desirability bias/trait) και περιγράφεται συχνότερα σε παχύσαρκα άτομα²⁰⁴. Αυτού του είδους το σφάλμα από την πλευρά του ασθενή μπορεί να είναι είτε εκούσιο, είτε ακούσιο ως μορφή αυτό-παραπλάνησης²⁰⁴. Δεν είναι πλήρως γνωστό ποιες κατηγορίες τροφίμων υποαναφέρονται. Σε μία μελέτη από τη Δανία τα παχύσαρκα άτομα έτειναν να υποεκτιμούν και να μην αναφέρουν πλήρως τα τρόφιμα υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος και υδατάνθρακες²⁰³. Προκειμένου να αποφευχθεί, αυτό το σφάλμα, όσο αυτό είναι εφικτό, οι ασθενείς δεν ενημερώθηκαν για το κύριο ερώτημα της μελέτης, που ήταν η πρόσληψη των φλαβονοειδών. Αντίθετα, τους ζητήθηκε να ανακαλέσουν στη μνήμη τους και να αναφέρουν τις

διατροφικές συνήθειές τους με ειλικρίνεια κατά το τελευταίο έτος και στη συνέχεια τους δόθηκε το κατάλληλο διαιτολόγιο.

Η επιλογή του αριθμού των ατόμων που απαιτείται να συμμετάσχουν σε μία τέτοια έρευνα εξαρτάται από τα θρεπτικά συστατικά που εξετάζονται. Εκτιμάται ότι ένας λογικός αριθμός είναι μεταξύ 100 και 200 ατόμων. Κατά συνέπεια ο αριθμός των ατόμων που συμμετέχουν στην παρούσα μελέτη κρίνεται ικανοποιητικός.

Το ΕΣΚΤ συμπληρώνεται με προσωπική συνέντευξη, τηλεφωνικά ή αποστέλλεται με αλληλογραφία ή εναλλακτικά με ηλεκτρονικό ταχυδρομείο¹⁹⁵. Το μειονέκτημα των αυτό-συμπληρούμενων ερωτηματολογίων είναι η μεγαλύτερη αναξιοπιστία τους, ιδιαίτερα σε πληθυσμούς χαμηλού κοινωνικο-οικονομικού και μορφωτικού επιπέδου. Αντίθετα, η ακρίβεια και η ποιότητα των συλλεγόμενων δεδομένων θεωρούνται υψηλότερες όταν γίνεται προσωπική συνέντευξη¹⁹⁵. Για αυτό το λόγο, αλλά και για πρακτικούς λόγους που αφορούν την πιθανότητα να γίνουν λάθη κατά τη συμπλήρωση των ερωτηματολογίων ή να μην επιστραφούν ακόμη και εάν συμπληρωθούν, στον πληθυσμό της μελέτης μας επιλέχθηκε η προσωπική συνέντευξη από εκπαιδευμένο διαιτολόγο, τον ίδιο για κάθε συμμετέχοντα, για να μειωθεί το ενδεχόμενο σφάλματος – προκατάληψης (bias).

Η εποχικότητα αποτελεί σημαντικό κριτήριο στην επιδημιολογία της διατροφής, ιδιαίτερα σε σχέση με την πρόσληψη συγκεκριμένων θρεπτικών συστατικών, όπως οι βιταμίνες¹⁹⁶. Επιπρόσθετα, οι διατροφικές συνήθειες κατά τη διάρκεια του έτους μπορεί να μεταβάλλονται¹⁹⁶. Για παράδειγμα, μπορεί κάποιος να καταναλώνει περισσότερα φρούτα και χυμούς κατά τους καλοκαιρινούς μήνες και λιγότερα το χειμώνα. Τα παραπάνω δεδομένα, σε συνάρτηση με το γεγονός ότι δεν ρωτήθηκαν όλοι οι ασθενείς την ίδια περίοδο του χρόνου, συνιστούν ένα μεθοδολογικό μειονέκτημα. Συνήθως όμως, τα ΕΣΚΤ είναι σχεδιασμένα να εκτιμούν

τη διατροφή κατά τον τελευταίο χρόνο. Λαμβάνοντας υπόψη αυτή την αδυναμία του ΕΣΚΤ και προκειμένου να την περιορίσουμε, συμπεριλάβαμε σε αυτό ερωτήσεις για την εποχική κατανάλωση συγκεκριμένων τροφίμων, ιδιαίτερα φρούτων και λαχανικών, ώστε να έχουμε πλήρη εικόνα της διατροφής των ασθενών το τελευταίο 12μηνο. Επίσης, πρέπει να υπογραμμισθεί ότι κανένα άτομο που συμμετείχε στη μελέτη δεν ανέφερε λήψη οποιουδήποτε συμπληρώματος διατροφής.

Ο αριθμός των τροφίμων που συμπεριλαμβάνονται στο ΕΣΚΤ θεωρείται εξίσου σημαντικός. Η χρήση συγκεκριμένης λίστας μπορεί να αποτελεί μειονέκτημα καθώς ίσως αποκλείει συγκεκριμένα τρόφιμα τα οποία ενδεχομένως κάποιο άτομο καταναλώνει συχνά. Εκτιμάται ότι πιο αξιόπιστα είναι τα ερωτηματολόγια με περισσότερα από 100 τρόφιμα. Ωστόσο, μακροσκελή ερωτηματολόγια είναι κουραστικά και υπάρχει η πιθανότητα να μην συμπληρωθούν μέχρι το τέλος ή να μην συμπληρωθούν σωστά. Σύμφωνα με τον Willett¹⁹⁵, τα 130 τρόφιμα περίπου είναι ο μέγιστος ιδανικός αριθμός που μπορεί να χρησιμοποιηθεί. Επιπρόσθετα, ο αριθμός των τροφίμων εξαρτάται και από τις παραμέτρους τις οποίες θέλουμε να εκτιμήσουμε. Για παράδειγμα, όταν διερευνάται κάποιο θρεπτικό συστατικό που βρίσκεται κυρίως σε φυτικής προέλευσης τρόφιμα, τότε η λίστα οφείλει να συμπεριλάβει κυρίως τέτοιου είδους τρόφιμα. Στο ερωτηματολόγιο που χρησιμοποιήθηκε τόσο ο σχεδιασμός, όσο και η επιλογή των τροφίμων και του αριθμού τους, έγινε με γνώμονα αυτό το κριτήριο και με βάση ερωτηματολόγια που χρησιμοποιήθηκαν σε αντίστοιχες μελέτες. Τέλος, η επιλογή στη συχνότητα με την οποία αναφέρεται η κατανάλωση κάποιου τροφίμου είναι σημαντική και οφείλει να καλύπτει όλο το πιθανό εύρος από σχεδόν ποτέ έως πολλές φορές καθημερινά. Στο παρόν ερωτηματολόγιο καλύφθηκαν οι περισσότερες πιθανές συχνότητες πρόσληψης τροφίμων για περισσότερη σαφήνεια και ακρίβεια.

Εξίσου σημαντικό ζήτημα είναι η ανάλυση των απαντήσεων ώστε να υπολογιστούν τα προσλαμβανόμενα θρεπτικά συστατικά με τη μεγαλύτερη δυνατή ακρίβεια. Για αυτό το σκοπό, η χρήση πινάκων σύστασης τροφίμων είναι η συνήθης τακτική²⁰⁷. Οι πίνακες διαμορφώνονται μετά από χημικές αναλύσεις πολλαπλών δειγμάτων εκατοντάδων τροφίμων. Η μεγάλη ποικιλία τροφίμων, οι αναλυτικές μέθοδοι που εφαρμόζονται, οι πιθανές διαφορές που οφείλονται στην επεξεργασία, και στη συντήρηση των τροφίμων και στον τρόπο μαγειρέματος, ιδιαίτερα από χώρα σε χώρα με διάφορα παραδοσιακά τρόφιμα, ακόμα και ανάμεσα σε δείγματα του ίδιου τροφίμου, υποδηλώνουν ότι η διαμόρφωση των πινάκων σύστασης τροφίμων είναι σύνθετη διαδικασία και η αξιοποίηση τους προϋποθέτει προσοχή στα δεδομένα που αντλούνται από αυτούς. Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν οι πίνακες του Ελληνικού Ιδρύματος Υγείας (www.hhf-greece.gr) και του ευρωπαϊκού προγράμματος πληροφοριών για τρόφιμα (EuroFIR Project – www.eurofir.net) και του Αγγλικού Foods Standards Agency (<http://www.food.gov.uk/science/dietarysurveys/dietsurveys>). Οι συγκεκριμένοι πίνακες θεωρούνται ακριβείς και σύγχρονοι. Με βάση αυτούς τους πίνακες, υπολογίστηκε η συνολική ενεργειακή πρόσληψη, καθώς και η πρόσληψη των υδατανθράκων, των πρωτεϊνών, των κορεσμένων, μονοακόρεστων και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, του αλκοόλ και των φυτικών ινών²⁰⁸.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως η ποιότητα του υπεδάφους, η ηλιοφάνεια και η βροχόπτωση, ο τρόπος και η διαδικασία καλλιέργειας πχ βιολογική ή καλλιέργεια σε θερμοκήπια, η χρήση λιπασμάτων ή φυτοφαρμάκων και ο αριθμός καρπών ή φρούτων ανά φυτό, μπορεί να επηρεάσουν σημαντικά την περιεκτικότητα τροφίμων σε φλαβονοειδή¹³⁶. Η φύλαξη και συντήρηση των τροφίμων μπορούν επίσης να επηρεάσουν το περιεχόμενο σε φαινολικές ουσίες, αφού

οι πολυφαινόλες είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες στην οξείδωση¹³⁶. Τέλος, η επεξεργασία από το απλό ξεφλούδισμα των φρούτων και λαχανικών, έως το μαγείρεμα σε υψηλές θερμοκρασίες και το βράσιμο ή τη βιομηχανική επεξεργασία τροφίμων μπορεί να μειώσουν σημαντικά το περιεχόμενο σε φαινόλες και φλαβονοειδή¹³⁶. Με βάση τα παραπάνω, γίνεται αντιληπτό ότι ο υπολογισμός της πρόσληψης φλαβονοειδών είναι περίπλοκος και σε κάθε περίπτωση η ερμηνεία των αποτελεσμάτων χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή²⁰⁹. Συνολικά υπάρχουν αρκετά αξιόπιστοι πίνακες σύστασης τροφίμων όσον αφορά την ενέργεια και τα μακροθρεπτικά συστατικά όπως οι υδατάνθρακες, τα λιπαρά και οι πρωτεΐνες, αλλά και πρόσφατα όσον αφορά την περιεκτικότητα των τροφίμων σε φλαβονοειδή. Συχνότερα στη διεθνή βιβλιογραφία χρησιμοποιείται η βάση δεδομένων του Αμερικανικού Υπουργείου Γεωργίας (USDA) με 225 επιλεγμένα τρόφιμα, η οποία θεωρείται αξιόπιστη^{165, 166, 199-201}. Για την παρούσα διατριβή επιλέχθηκε και χρησιμοποιήθηκε η συγκεκριμένη βάση δεδομένων. Δεν επιλέχθηκε η μέτρηση κάποιου ή κάποιων φλαβονοειδών στο πλάσμα ή τα ούρα, γιατί λόγω του μεταβολισμού τους και της διακύμανσης της πρόσληψής τους από ημέρα σε ημέρα, ακόμα και στο ίδιο άτομο, δεν θεωρείται αρκετά αξιόπιστος δείκτης της πρόσληψης^{136, 210, 211}.

4.3 Πρόσληψη μακροθρεπτικών συστατικών

Συνολικά, η υπολογιζόμενη πρόσληψη ενέργειας ήταν 2015 ± 542 kcal ανά ημέρα και δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ γυναικών και ανδρών. Από αυτές τις θερμίδες, το 16% προέρχεται από πρωτεΐνες, το 45% από υδατάνθρακες, το 38% από λιπαρά και το ~1% από αλκοόλ. Τα ποσοστά αυτά είναι παρόμοια με αυτά που έχουν αναφερθεί σε άλλες μελέτες στον ελληνικό πληθυσμό²¹². Συγκρίνοντας την πρόσληψη μακροθρεπτικών συστατικών μεταξύ γυναικών και ανδρών, οι μόνες διαφορές αφορούσαν την πρόσληψη πρωτεϊνών και οινοπνεύματος, αφού οι άνδρες καταλάωναν υψηλότερες ποσότητες κρέατος και γαλακτοκομικών και με μεγαλύτερη συχνότητα και επίσης έπιναν οινοπνευματώδη ποτά συχνότερα σε σύγκριση με τις γυναίκες. Η πρόσληψη πρωτεϊνών και απλών σακχάρων (γλυκόζης και φρουκτόζης) ήταν υψηλότερη στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες σε σύγκριση με τις προεμμηνοπαυσιακές, πιθανά εξαιτίας της υψηλότερης αναφερόμενης κατανάλωσης γαλακτοκομικών και φρούτων.

4.4 Πρόσληψη φλαβονοειδών

Όσον αφορά την ημερήσια πρόσληψη φλαβονοειδών, η μέση τιμή ήταν 275 mg και των προανθοκυανιδινών 135 mg. Τα κύρια τρόφιμα που συνέβαλλαν στην πρόσληψη φλαβονοειδών στα υπέρβαρα και παχύσαρκα άτομα που μελετήθηκαν ήταν τα φρούτα, κυρίως τα μήλα, τα πορτοκάλια, άλλα εποχικά φρούτα, όπως τα σταφύλια και τα κεράσια, τα τρόφιμα με βάση το κακάο, όπως η σοκολάτα (μαύρη και γάλακτος), καθώς και αφειγήματα, όπως ρόφημα κακάου, πράσινο και μαύρο τσάι και από τα οινοπνευματώδη ποτά, το κόκκινο κρασί.

Αν και στις γυναίκες παρατηρείται υψηλότερη πρόσληψη φλαβονοειδών και μικρότερη πρόσληψη προανθοκυανιδινών σε σύγκριση με τους άνδρες, δεν εντοπίστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, όπως και για καμία υποομάδα φλαβονοειδών. Η απουσία διαφορών ενδέχεται να οφείλεται στο γεγονός ότι δεν διέφερε η υπολογιζόμενη πρόσληψη ενέργειας, υδατανθράκων και λιπαρών μεταξύ των δύο φύλων, που όπως αναφέρεται και στη συνέχεια σχετίζονται με την πρόσληψη φλαβονοειδών. Επίσης, υπάρχει το ενδεχόμενο η μικρότερη πρόσληψη φλαβονοειδών από κάποιο τρόφιμο στους άνδρες σε σύγκριση με τις γυναίκες, πχ των κατεχινών του πράσινου τσαγιού, να αντισταθμίζεται από την υψηλότερη πρόσληψη φλαβονοειδών από κάποιο άλλο, όπως είναι το κόκκινο κρασί. Πράγματι παρατηρήθηκε μεγαλύτερη πρόσληψη οινοπνεύματος στους άνδρες που δεν προέρχεται αποκλειστικά από το κόκκινο κρασί, αλλά είναι το βασικότερο οινοπνευματώδες της συγκεκριμένης κατηγορίας. Στην Ισπανία οι άνδρες είχαν υψηλότερη πρόσληψη ολικών φλαβονοειδών σε σύγκριση με τις γυναίκες. Η διαφορά αυτή αφορούσε κυρίως τις προανθοκυανιδίνες και πιθανά οφείλεται στη συνήθεια των Ισπανών ανδρών να πίνουν περισσότερο κόκκινο κρασί σε σύγκριση με τις Ισπανίδες¹⁴¹.

Όσον αφορά τις διαφορές της διατροφικής πρόσληψης μεταξύ προ- και μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών, φαίνεται ότι οι τελευταίες προσλαμβάνουν περισσότερες ανθοκυανιδίνες, κάτι που πιθανά οφείλεται στην τάση των μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών να καταναλώνουν μεγαλύτερη ποσότητα οινοπνεύματος, κυρίως κόκκινου κρασιού, ενώ από τις φλαβονόλες, μόνο η πρόσληψη κατεχίνης βρέθηκε υψηλότερη στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, πιθανά λόγω συχνότερης κατανάλωσης τσαγιού. Ωστόσο, συνολικά παρότι φαίνεται ότι οι μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες καταναλώνουν περισσότερα φλαβονοειδή και προανθοκυανιδίνες σε σύγκριση με τις προεμμηνοπαυσιακές, οι διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων δεν είναι στατιστικά σημαντικές.

Οι αναφερόμενες τιμές των προσλαμβανόμενων φλαβονοειδών στην παρούσα μελέτη, είναι υψηλότερες από τις αναφερόμενες στη διεθνή βιβλιογραφία^{140, 141, 144, 213}. Αυτή η διαφορά πιθανά οφείλεται στο γεγονός ότι τα παχύσαρκα άτομα εμφανίζουν υψηλότερη θερμιδική κατανάλωση σε σύγκριση με άτομα φυσιολογικού σωματικού βάρους. Επομένως, τα παχύσαρκα άτομα χαρακτηρίζονται και μεγαλύτερη κατανάλωση τροφίμων, πολλά από τα οποία είναι πλούσια σε φλαβονοειδή, όπως γενικά είναι τα φρούτα και τα λαχανικά, το κόκκινο κρασί, το τσάι και η σοκολάτα. Πράγματι μελέτες έδειξαν ότι υπέρβαρα άτομα (με ΔΜΣ μεταξύ 25 και 30 kg/m²) είχαν την υψηλότερη πρόσληψη φλαβονοειδών¹⁴¹. Στην παρούσα μελέτη δεν εκτιμήθηκε η πρόσληψη φλαβονοειδών σε άτομα με φυσιολογικό βάρος και έτσι δεν υπάρχουν συγκριτικά δεδομένα. Μία δεύτερη εξήγηση είναι ότι υπάρχουν διαφορές στον αριθμό και το είδος των τροφίμων που συμπεριλαμβάνονται στα ερωτηματολόγια των διαφόρων μελετών. Το παρόν ερωτηματολόγιο σχεδιάστηκε με γνώμονα τον εντοπισμό των τροφίμων με υψηλή περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή, ενώ συχνά τα ερωτηματολόγια που

χρησιμοποιήθηκαν σε άλλες μελέτες ως κύριο στόχο είχαν την εκτίμηση των μακροθρεπτικών συστατικών και χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό της πρόσληψης φλαβονοειδών αναδρομικά. Επιπρόσθετα, ακόμα και μελέτες που προέρχονται από τις ίδιες χώρες, αναφέρουν διαφορετικές τιμές προσλαμβανόμενων φλαβονοειδών^{144, 213}, ένα γεγονός που αποδεικνύει ότι οι ποσοτικές εκτιμήσεις με τη χρήση των ΕΣΚΤ είναι σύνθετη διαδικασία που εξαρτάται από αρκετούς παράγοντες, όπως ήδη αναλύθηκε παραπάνω. Εξίσου σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την πρόσληψη φλαβονοειδών είναι και η χρήση συμπληρωμάτων διατροφής που στο εξωτερικό είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη και μπορεί να αυξήσει σημαντικά την πρόσληψη αντιοξειδωτικών ουσιών²¹⁴. Στον πληθυσμό που μελετήθηκε κανένα άτομο δεν ελάμβανε συμπληρώματα διατροφής.

Ακόμη, δεν πρέπει να αποκλειστεί η πιθανότητα στην Ελλάδα, άρα και στον πληθυσμό της μελέτης, παρά τη στροφή προς μία διατροφή δυτικού τύπου τις τελευταίες δεκαετίες, η κατανάλωση φλαβονοειδών, λόγω της σχετικά υψηλής κατανάλωσης φρούτων και λαχανικών σε σύγκριση με άλλες χώρες, να είναι υψηλότερη¹⁴². Πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι Μεσογειακοί πληθυσμοί (Ισπανοί, Ιταλοί) έχουν μεγαλύτερη πρόσληψη φλαβονοειδών από μη-Μεσογειακούς πληθυσμούς, όπως οι Δανοί, οι Φιλανδοί, οι Άγγλοι και οι Αμερικανοί¹⁴¹.

Σε σύγκριση με άλλες μελέτες από τον Ελλαδικό χώρο, η ημερήσια πρόσληψη που υπολογίστηκε τόσο για το σύνολο των φλαβονοειδών και τις υποκατηγορίες τους, όσο και για τις προανθοκυανιδίνες είναι επίσης υψηλότερη. Σε 2 μελέτες ασθενών – μαρτύρων (ασθενών που εισήχθησαν στο νοσοκομείο για άλλες αιτίες που δεν σχετίζονταν με τη διατροφή), εκτιμήθηκε η πρόσληψη φλαβονοειδών και η συσχέτιση της πρόσληψής τους με την εμφάνιση περιφερικής αρτηριακής νόσου²⁰⁰

και στεφανιαίας νόσου²¹⁵. Ενδεικτικά, η μέση τιμή των προσλαμβανόμενων φλαβονοειδών του πέμπτου πεμπτημορίου του συνόλου των ερωτηθέντων ήταν 175 mg / ημέρα και 235 mg / ημέρα αντίστοιχα, στις δύο αυτές μελέτες. Όμως, η σύγκριση με τα παρόντα ευρήματα δεν είναι εφικτή. Οι συμμετέχοντες σε αυτές τις μελέτες είχαν χαμηλότερο δείκτη μάζας σώματος, ενώ τα δεδομένα αναλύθηκαν αναδρομικά και χωρίς να συνυπολογισθεί η πρόσληψη από κόκκινο κρασί, αφού δεν έγινε ανάλυση όσον αφορά την πρόσληψη οιοπνευματωδών ποτών κατά τη συλλογή των ερωτηματολογίων. Σε πρόσφατη ανάλυση των δεδομένων της ελληνικής κοορτής της μελέτης EPIC¹⁴², η ημερήσια μέση πρόσληψη των προσλαμβανόμενων φλαβονοειδών ήταν 92 mg και των προανθοκυανιδινών 87 mg, τιμές κατά πολύ χαμηλότερες από τις αντίστοιχες του πληθυσμού που εξετάστηκε στην παρούσα μελέτη. Όμως τα αποτελέσματα της μελέτης EPIC αναφέρονται στο γενικό πληθυσμό και τα ερωτηματολόγια εστάλησαν ταχυδρομικά, ένα γεγονός που δεν αποκλείει σφάλμα κατά τη συμπλήρωσή τους, ενώ στην παρούσα μελέτη τα ερωτηματολόγια συμπληρώθηκαν με προσωπική συνέντευξη.

Οι συσχετίσεις που ανιχνεύθηκαν μεταξύ της πρόσληψης των φλαβονοειδών και της προσλαμβανόμενης ενέργειας, καθώς και της ποσότητας των υδατανθράκων και των λιπαρών είναι λογικές και ενισχύουν την ορθότητα στην επιλογή της μεθόδου των ΕΣΚΤ για την εκτίμηση των προσλαμβανόμενων φλαβονοειδών στην παρούσα μελέτη. Πράγματι, όσο μεγαλύτερες ποσότητες φλαβονοειδών καταναλώνει κάποιο άτομο, τόσο αυξάνει και η πρόσληψη ενέργειας. Ειδικά για τους υδατάνθρακες και ιδιαίτερα για τους απλούς, δηλαδή τη γλυκόζη, τη φρουκτόζη και τη σουκρόζη, για τους οποίους υπάρχουν δεδομένα από τα ερωτηματολόγια, οι κυριότερες πηγές τους είναι πρωτίστως τα φρούτα, που ταυτόχρονα είναι και πλούσιες πηγές φλαβονοειδών. Όπως φαίνεται δεν υπάρχει σημαντική συσχέτιση μεταξύ των προσλαμβανόμενων

φλαβονοειδών με το συνολικό λίπος της διατροφής. Ωστόσο, παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ των προσλαμβανόμενων φλαβονοειδών και των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων της διατροφής. Αυτό το εύρημα δεν είναι παράδοξο, από τη στιγμή που πολλά λαχανικά στην Ελλάδα μαγειρεύονται με ελαιόλαδο, που είναι πλούσιο, όχι μόνο σε μονοακόρεστα, αλλά και σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Επιπρόσθετα, αρκετά τρόφιμα που περιέχουν κακάο, όπως χαρακτηριστικά η μαύρη σοκολάτα ή η σοκολάτα γάλακτος, αποτελούν ταυτόχρονα σημαντικές πηγές πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και φλαβονοειδών.

Στην παρούσα μελέτη δεν εξετάστηκε η πρόσληψη ισοφλαβονών, διότι στην Ελληνική διατροφή δεν συνηθίζεται η κατανάλωση προϊόντων σόγιας. Χαρακτηριστικά, σε ορισμένες ελληνικές μελέτες η πρόσληψη ισοφλαβονών ήταν μικρότερη από 1 mg ημερησίως^{142, 200, 215}. Αντίστοιχες τιμές αναφέρονται σε ευρωπαϊκούς πληθυσμούς, ενώ μόνο σε Ασιατικές χώρες, όπως η Ιαπωνία και η Κίνα, αναφέρονται υψηλότερες τιμές (>10 mg / ημέρα)²¹⁶.

Όσον αφορά τη ρεσβερατρόλη, κατά τη χρονική περίοδο που πραγματοποιήθηκε η μελέτη, δεν υπήρχαν λεπτομερείς πίνακες σύστασης τροφίμων για τη συγκεκριμένη πολυφαινόλη. Έτσι δεν προσδιορίστηκε η μέση ημερήσια πρόσληψή της. Πρόσφατα, οι Zamora-Ros και συνεργάτες μελέτησαν την πρόσληψη ρεσβερατρόλης και παραγώγων της στην Ισπανική κοορτή της μελέτης EPIC¹⁷⁵. Οι συγγραφείς ανέλυσαν τη χημική σύσταση και την περιεκτικότητα τροφίμων πλούσιων σε ρεσβερατρόλη και συνέθεσαν ένα πίνακα τον οποίο χρησιμοποίησαν για την εκτίμηση της διαιτητικής πρόσληψης ρεσβερατρόλης στην τυπική Ισπανική διατροφή. Οι Ισπανοί είναι Μεσογειακός λαός με τον οποίο οι Έλληνες έχουν αρκετά κοινά χαρακτηριστικά, ιδίως στη διατροφή τους. Η αναφερόμενη πρόσληψη ήταν

933μg / ημέρα, με διάμεση τιμή τα 100 μg / ημέρα, που οφείλονταν (>98%) κυρίως σε κόκκινο κρασί και λιγότερο σε σταφύλια, μούρα, κεράσια και ξηρούς καρπούς¹⁷⁵. Θα ήταν ενδιαφέρον μελλοντικά να εκτιμηθεί η διαιτητική πρόσληψη ρεσβερατρώλης και σε ελληνικό πληθυσμό.

4.5 Συσχέτιση της πρόσληψης φλαβονοειδών με κλινικούς και βιοχημικούς δείκτες

Ενδιαφέρουσες συσχετίσεις ανάμεσα στην πρόσληψη φλαβονοειδών και προανθοκυανιδινών και σε κλινικούς και βιοχημικούς δείκτες προέκυψαν στην παρούσα μελέτη και χρήζουν περαιτέρω ανάλυσης. Όσον αφορά στην πρόσληψη των φλαβονοειδών βρέθηκε μία συσχέτιση με την ηλικία, η οποία εξηγείται από το γεγονός ότι οι μεγαλύτερης ηλικίας ασθενείς ανέφεραν υψηλότερη πρόσληψη φλαβονοειδών. Η αυξημένη κατανάλωση φρούτων, λαχανικών και κυρίως τσαγιού στα άτομα αυτά φαίνεται ότι μπορεί να ερμηνεύσει αυτό τη συσχέτιση. Αυτό το εύρημα δεν είναι παράδοξο, αφού είναι σύνηθες οι διατροφικές συνήθειες μεταξύ νεότερων και μεγαλύτερων σε ηλικία ατόμων σε επιδημιολογικές μελέτες να διαφέρουν.

Η μελέτη μας έδειξε μία αρνητική συσχέτιση της πρόσληψης φλαβονοειδών και προανθοκυανιδινών με τα τριγλυκερίδια και μία θετική συσχέτιση της πρόσληψης φλαβονοειδών με την HDL χοληστερόλη. Μία παλαιότερη μελέτη σε 115 γυναίκες από την Ιαπωνία έδειξε αρνητική συσχέτιση μεταξύ της πρόσληψης φλαβονοειδών με την ολική και LDL χοληστερόλη, όχι όμως με τα τριγλυκερίδια ή την HDL χοληστερόλη²¹⁶. Οι διαφορές μεταξύ της παρούσας μελέτης και αυτής σε Ιάπωνες ενδεχομένως οφείλονται στις διαφορετικές διατροφικές συνήθειες και κατά συνέπεια στις διαφορετικές ποσότητες των προσλαμβανόμενων φλαβονοειδών και των υποομάδων τους.

Αρκετές κλινικές μελέτες εξέτασαν την επίδραση διαφόρων φλαβονοειδών, είτε σε μορφή σκευάσματος είτε ως συστατικό κάποιου τροφίμου, στο λιπιδαιμικό προφίλ. Εκχύλισμα πράσινου τσαγιού πλούσιο σε θεαφλαβίνες (375 mg την ημέρα

για 12 εβδομάδες), μείωσε σημαντικά τα επίπεδα της ολικής και LDL χοληστερόλης (περίπου κατά 11 και 16 % αντίστοιχα) σε σύγκριση με το εικονικό φάρμακο²¹⁷. Σε μία μικρή μελέτη εννιά Ιαπώνων με υπερτριγλυκεριδαιμία, η μέτρια (224 mg) και η υψηλή (674 mg) δόση κατεχινών πράσινου τσαγιού μαζί με λιπαρό γεύμα μείωσε την μεταγευματική υπερτριγλυκεριδαιμία κατά περίπου 15 και 28% αντίστοιχα σε σύγκριση με τη χαμηλή δόση (<10 mg)²¹⁸. Σε υπερχοληστερολαιμικούς ασθενείς (n=30), κάψουλα ναρινγενίνης (400mg/ ημέρα) για 8 εβδομάδες είχε ως αποτέλεσμα μείωση της ολικής και LDL χοληστερόλης κατά 14 και 17% αντίστοιχα²¹⁹. Σε προ- και μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, ορισμένα φλαβονοειδή από λυοφιλοποιημένη σκόνη σταφυλιών βελτίωσαν το λιπιδαιμικό προφίλ μειώνοντας τα τριγλυκερίδια και την LDL χοληστερόλη²²⁰. Πρόσφατη μετα-ανάλυση εξέτασε την επίδραση των φλαβονοειδών του κακάο²²¹. Βρέθηκε μία μικρή αλλά κλινικά σημαντική μείωση της LDL χοληστερόλης κατά περίπου 6 mg/dl²²¹. Η ευεργετική αυτή δράση αφορούσε λιγότερο τα υγιή άτομα, ένα εύρημα το οποίο επισημαίνει ότι ευνοούνται κυρίως άτομα υψηλού καρδιαγγειακού κινδύνου, χωρίς αυτό να αποκλείει ότι και τα υγιή άτομα μπορεί να έχουν όφελος σε κάποιες περιπτώσεις²²². Επιπρόσθετα, η ευεργετική δράση των φλαβονοειδών δεν αφορούσε μεγαλύτερες δόσεις, πιθανά λόγω της ταυτόχρονης αύξησης των λιπαρών της σοκολάτας²²¹ ή της πιθανής αύξησης του βάρους από το υψηλό ενεργειακό περιεχόμενό της²²³.

Οι υπολιπιδαιμικές αυτές ιδιότητες των φλαβονοειδών δεν επαληθεύονται σε όλες τις μελέτες. Για παράδειγμα, η χορήγηση κουερσετίνης για δύο μόνο εβδομάδες δεν είχε καμία επίδραση σε υγιείς εθελοντές²²⁴, ενώ συμπλήρωμα κατεχίνης και θεαφλαβινών δεν βελτίωσε το λιπιδαιμικό προφίλ σε ασθενείς με υπερχοληστερολαιμία μετά από 11 εβδομάδες σε μία πρόσφατη μελέτη²²⁵.

Η πρόσληψη προανθοκυανιδινών συσχετίζονταν επίσης αρνητικά με τα επίπεδα της ινσουλίνης, μία συσχέτιση που δεν επαληθεύθηκε για τα φλαβονοειδή. Σε προοπτικές επιδημιολογικές μελέτες, δεν ανιχνεύθηκαν ενδείξεις μειωμένου κινδύνου εμφάνισης σακχαρώδη διαβήτη (ΣΔ) με την αυξανόμενη πρόσληψη φλαβονοειδών^{226, 227}, εκτός από μία μελέτη από τη Φινλανδία που έδειξε ότι η κουερσετίνη και η μυρισετίνη συσχετίζονταν αρνητικά με τον κίνδυνο εμφάνισης ΣΔ²²⁸. Όσον αφορά τις ισοφλαβόνες, εξίσου ενδιαφέρουσα πρέπει να θεωρείται και η προστασία από εμφάνιση ΣΔ των υπέρβαρων Γιαπωνέζων γυναικών με την υψηλότερη πρόσληψη ισοφλαβονών²²⁹. Τέλος, παρά το γεγονός ότι δεν βρέθηκε συσχέτιση της πρόσληψης φλαβονοειδών και της εμφάνισης ΣΔ, η κατανάλωση μήλων και τσαγιού, δηλαδή τροφίμων που είναι πλούσια σε φλαβονοειδή, μείωσε έως και 30% την πιθανότητα εμφάνισης ΣΔ σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες σε σύγκριση με τις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες που είχαν μηδενική κατανάλωση²²⁶.

Τα αποτελέσματα από μικρές κλινικές μελέτες είναι αντικρουόμενα. Η μαύρη σοκολάτα βελτιώνει την ινσουλινοαντίσταση μέσα σε μόλις 2 εβδομάδες σε υγιή άτομα και σε υπερτασικούς ασθενείς με διαταραχή ανοχής στη γλυκόζη^{230, 231}. Αντίθετα, ρόφημα κακάου πλούσιου σε φλαβανόλες δεν μετέβαλε την ινσουλινοαντίσταση σε υπερτασικούς ασθενείς μετά από 2 εβδομάδες²³², ενώ σοκολάτα πλούσια σε πολυφαινόλες δεν μετέβαλε το γλυκαιμικό έλεγχο σε διαβητικούς ασθενείς μετά από 16 εβδομάδες²³³. Σε μία πρόσφατη μελέτη, παχύσαρκοι άνδρες που έλαβαν κάψουλες EGCG (400mg) ημερησίως για 8 εβδομάδες δεν παρουσίασαν βελτίωση στα επίπεδα της γλυκόζης και της ινσουλίνης νηστείας²³⁴. Η δόση των φλαβονοειδών, το ποια φλαβονοειδή επιλέγονται, η χρονική διάρκεια χορήγησής τους και τα χαρακτηριστικά του πληθυσμού είναι παράγοντες από τους οποίους εξαρτώνται τα αποτελέσματα των μελετών. Χρειάζονται

περισσότερες μελέτες για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων όσον αφορά την ενδεχόμενη αντιδιαβητική δράση των διαφόρων φλαβονοειδών.

Τέλος, τόσο για τα φλαβονοειδή, όσο και για τις προανθοκυανιδίνες βρέθηκαν αρνητικές συσχετίσεις με τις παραμέτρους της ηπατικής βιολογίας (με την ALT και για τα δύο και με την γGT μόνο για τα φλαβονοειδή). Πολύ συχνά αυξημένα επίπεδα των ηπατικών ενζύμων εφόσον αποκλειστούν άλλα αίτια, αποτελούν ενδείξεις μη αλκοολικής λιπώδους ηπατοπάθειας (NAFLD). Πρόκειται για νόσο που χαρακτηρίζεται από διαταραχές της ηπατικής βιολογίας που δεν οφείλονται, όπως υποδηλώνει το όνομά της, σε κατανάλωση αλκοόλ. Το αρχικό στάδιο της νόσου είναι η λιπώδης διήθηση. Ακολουθείται από στεατοηπατίτιδα, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε ίνωση σε ποσοστό 20-30% και σπανιότερα να καταλήξει σε κίρρωση του ήπατος, με συγκεκριμένες ιστολογικές αλλοιώσεις σε κάθε στάδιο. Για την παθοφυσιολογία της νόσου έχει αναπτυχθεί η θεωρία των «πολλαπλών χτυπημάτων» - multiple hit -. Το πρώτο χτύπημα είναι η λιπώδης διήθηση ή αλλιώς η έκτοπη εναπόθεση λίπους στα ηπατοκύτταρα, ένα φαινόμενο που αναφέρεται και ως λιποτοξικότητα, η οποία οφείλεται στα αυξημένα ελεύθερα λιπαρά οξέα τόσο από τη διατροφή, όσο και από τον αυξανόμενο λιπώδη ιστό ή και τη de novo λιπογένεση. Η λιπώδης διήθηση συνοδεύεται από ινσουλινοαντίσταση, η οποία προοδευτικά επιδεινώνεται και οδηγεί σε φλεγμονή, η οποία ανατροφοδοτεί την αντίσταση στη δράση της ινσουλίνης και αυξάνει το οξειδωτικό στρες. Το τελευταίο σε συνδυασμό με τη δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων και την απελευθέρωση φλεγμονωδών κυτταροκινών, τόσο από το ήπαρ όσο και από άλλους ιστούς, οδηγεί σε στεατοηπατίτιδα και εν τέλει σε ίνωση ή και σε κίρρωση. Παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση μη αλκοολικής λιπώδους ηπατοπάθειας είναι η παχυσαρκία, ιδιαίτερα η σπλαχνική, ο σακχαρώδης διαβήτης και το μεταβολικό σύνδρομο, η δυσλιπιδαιμία, το οικογενειακό ιστορικό, η φυλή και

η ηλικία. Σύμφωνα με νεότερα δεδομένα, η μη αλκοολική λιπώδης ηπατοπάθεια συσχετίζεται με δείκτες της αθηρωματικής νόσου (IMT, PWV, στεφανιαία ασβέστωση). Τα флаβονοειδή με τις αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντιδιαβητικές δράσεις τους αποτελούν δυνητικά μέσα για τη διαιτητική αντιμετώπιση της μη αλκοολικής λιπώδους ηπατοπάθειας.

Στη μελέτη του Maron και συνεργατών, σε μη παχύσαρκα άτομα με διαταραχές της ηπατικής βιολογίας, χορηγήθηκε ένα εκχύλισμα πράσινου τσαγιού πλούσιου σε θεαφλαβίνες. Αν και δεν αναφέρονται αναλυτικά δεδομένα για τη μεταβολή των τρανσαμινασών, υπάρχει αναφορά ότι τα επίπεδά τους δεν μεταβλήθηκαν²¹⁷. Σε άλλη μελέτη, σε ασθενείς με μη αλκοολική λιπώδη ηπατοπάθεια, η σιλυβίνη, ένα флаβονοειδές, όταν χορηγήθηκε συζευγμένη με βιταμίνη E και φωσφολιπίδια, βελτίωσε τους δείκτες της ηπατικής βιολογίας, καθώς και την υπερηχογραφική εικόνα της λιπώδους διήθησης μετά από 6 μήνες θεραπείας²³⁵. Ανάλογα ήταν τα αποτελέσματα χορήγησης για 3 μήνες εκχυλίσματος σταφυλιών πλούσιου σε флаβονοειδή²³⁶. Αυτά τα ευρήματα πρέπει να επιβεβαιωθούν σε τυχαιοποιημένες κλινικές μελέτες στο μέλλον.

Επίσης, σε τρωκτικά που τράφηκαν με δίαιτα υψηλή σε флаβονοειδή παρατηρήθηκε μείωση της στεάτωσης του ήπατος²³⁷⁻²⁴¹. Παράλληλα, αναφέρονται σημαντικές δράσεις διαφόρων флаβονοειδών *in vitro*: Συγκεκριμένα, η απιγενίνη, ένα флаβονοειδές της υποκατηγορίας των флаβονών, μείωσε τη συσσώρευση λίπους σε ανθρώπινα ηπατοκύτταρα HepG2 μετά από έκθεσή τους σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης, μέσω φωσφορυλίωσης της AMPK²⁴². Στον ίδιο τύπο κυττάρων, флаβονοειδή του πράσινου τσαγιού (εστέρας επιγαλλοκατεχίνης & θεαφλαβίνες)

μείωσαν με τον ίδιο μηχανισμό τη συσσώρευση λίπους στα ηπατοκύτταρα και βελτίωσαν την απόκριση στην ινσουλίνη^{240, 243}.

Άλλες σημαντικές επιδράσεις ή συσχετίσεις που αφορούν την πρόσληψη φλαβονοειδών αναφέρονται κύρια στη μείωση της αρτηριακής πίεσης²⁴⁴⁻²⁴⁸, των δεικτών φλεγμονής, του οξειδωτικού στρες και την ευόδωση της ενδοθηλιακής λειτουργίας^{167, 231, 246, 249}. Στην παρούσα μελέτη δεν βρέθηκε συσχέτιση των προσλαμβανόμενων φλαβονοειδών με την αρτηριακή πίεση, ένα εύρημα που ίσως οφείλεται στο γεγονός ότι κανένα από τα άτομα της μελέτης δεν είχε αρτηριακή υπέρταση.

Συνολικά, λοιπόν, φαίνεται ότι τα φλαβονοειδή μπορεί να βελτιώσουν το λιπιδαιμικό προφίλ, ενώ οι μηχανισμοί δράσης τους χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης. Μάλιστα, τα δεδομένα συγκλίνουν στο ότι ωφελούνται περισσότερο ασθενείς υψηλού καρδιαγγειακού κινδύνου και ότι τα κλινικά οφέλη είναι εφικτά ακόμα και με την ημερήσια πρόσληψή τους από τη διατροφή. Στην παρούσα μελέτη παχύσαρκων ατόμων ανιχνεύθηκαν έμμεσες ενδείξεις συμβατές με την υπολιπιδαιμική δράση των φλαβονοειδών. Γενικά, η αποτελεσματικότητα των φλαβονοειδών στις κλινικές μελέτες φαίνεται να εξαρτάται από το είδος της τροφής στην οποία περιέχονται και από την αρχική διατροφική πρόσληψη φλαβονοειδών. Ακόμη, ένα σημαντικό εύρημα της παρούσας μελέτης είναι η αρνητική συσχέτιση των προσλαμβανόμενων προανθοκυανιδινών με τα επίπεδα της ινσουλίνης, που επισημαίνει μία πιθανή αντιδιαβητική δράση τους, όπως φαίνεται και από άλλες μελέτες. Όσον αφορά τη συσχέτιση ανάμεσα στα προσλαμβανόμενα φλαβονοειδή και τις τρανσαμινάσες, τα δεδομένα είναι λιγοστά και από τις υπάρχουσες μελέτες δεν μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα. Για τη θεραπεία της υπερχοληστερολαιμίας, του σακχαρώδη

διαβήτη και της μη αλκοολικής λιπώδους ηπατοπάθειας, τα φλαβονοειδή αποτελούν μία δυνητική θεραπευτική προσέγγιση, ωστόσο η δράση τους πρέπει να εξεταστεί στο μέλλον με τυχαιοποιημένες μελέτες. Τέλος, τόσο τα ευρήματα της παρούσας μελέτης όσο και αυτά που αναφέρονται από άλλες μελέτες, δεν αποκλείουν την καρδιοπροστατευτική, συνεργική ή μη, δράση και άλλων βιοδραστικών πολυφαινολών ή αντιοξειδωτικών ουσιών που βρίσκονται στις ίδιες ομάδες τροφίμων, όπως το λυκοπένιο, οι λιγνάνες, τα τερπένια ή οι φυτικές στερόλες²⁵⁰.

4.6 Έλεγχος διατασιμότητας της αορτής με μαγνητική τομογραφία

Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία αποτελεί κομβικό σημείο στην παθοφυσιολογία και την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης. Η λειτουργία του ενδοθηλίου φαίνεται ότι συσχετίζεται σημαντικά με τη διατασιμότητα-ελαστικότητα των αγγείων. Έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι εκτίμησης της αρτηριακής λειτουργίας. Η ταχύτητα του σφυγμικού κύματος στην αορτή (aortic PWV) και η διατασιμότητα της αορτής είναι χρήσιμες, έγκυρες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται ως κλινικοί δείκτες της αρτηριακής σκληρότητας (arterial stiffness). Μία αυξημένη τιμή PWV υποδηλώνει ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και φαίνεται ότι σχετίζεται με αυξημένη θνησιμότητα, καθώς και με εμφάνιση στεφανιαίας νόσου και αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων.

Προγενέστερες μέθοδοι που χρησιμοποιούνταν για την εκτίμηση της PWV ήταν η υπερηχογραφική μέθοδος Doppler και η σφυγμική τονομετρία (pulse tonometry). Ωστόσο η μαγνητική τομογραφία της αορτής πλεονεκτεί των δύο παραπάνω μεθόδων, καθώς θεωρείται πιο ακριβής με μεγαλύτερη αξιοπιστία και καλύτερη επαναληψιμότητα. Σε αντίθεση με τις παραπάνω μεθόδους, η μαγνητική τομογραφία δεν βασίζεται σε γεωμετρικές υποθέσεις και λόγω της άμεσης οπτικής απεικόνισης δεν επηρεάζεται από τη σωματική διάπλαση. Αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία σε παχύσαρκα άτομα για την ακριβή και χωρίς σφάλματα μέτρηση της διατασιμότητας της αορτής²⁵¹.

Η παχυσαρκία, όπως εκτενώς αναφέρθηκε, αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων και μειώνει το προσδόκιμο επιβίωσης. Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι ένας πιθανός μηχανισμός με τον οποίο η παχυσαρκία συνεισφέρει σε αυτή την αύξηση της καρδιαγγειακής νοσηρότητας και θνητότητας είναι και η επίδρασή της στη σκλήρυνση της αορτής, η οποία με τη σειρά της αποτελεί προγνωστικό

παράγοντα για την αύξηση της καρδιαγγειακής θνητότητας. Σε παχύσαρκα άτομα, έχει δειχθεί ότι ο ΔΜΣ συσχετίζεται με αυξημένες τιμές PWV: Ήδη από τη δεκαετία του 1980 ήταν γνωστό ότι η παχυσαρκία αυξάνει τη PWV ανεξάρτητα από την παρουσία αρτηριακής υπέρτασης²⁵². Το εύρημα αυτό επιβεβαιώθηκε και σε παχύσαρκες προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες²⁵³. Σε περίπου 2500 ηλικιωμένα άτομα που συμμετείχαν στη μελέτη Health ABC, η PWV μετρήθηκε με Doppler και συσχετίστηκε θετικά με το σωματικό βάρος, την περίμετρο μέσης και κυρίως το σπλαχνικό λιπώδη ιστό²⁵⁴. Σε διαστρωματικές μελέτες, τα αποτελέσματα φαίνεται ότι εξαρτώνται εκτός από το ΔΜΣ και από άλλους παράγοντες, όπως το φύλο και η ηλικία²⁵⁵. Μία ειδοποιός διαφορά της παρούσας μελέτης με τις παραπάνω μελέτες είναι η μέθοδος μέτρησης. Η πολυπλοκότητα και το κόστος της μαγνητικής τομογραφίας είναι οι λόγοι για τους οποίους λίγες μόνο μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη σε παχύσαρκα άτομα^{256, 257}.

Δεν αποκλείεται η απουσία συσχετίσεων μεταξύ των διαφόρων παραμέτρων, όπως μεταξύ του ΔΜΣ και της διατασιμότητας της αορτής στον πληθυσμό της μελέτης μας να οφείλεται στο γεγονός ότι από τη μελέτη αποκλείστηκαν άτομα υψηλού κινδύνου. Είναι γνωστό ότι το φύλο, η ηλικία, η δυσλιπιδαιμία, η αρτηριακή υπέρταση και ο σακχαρώδης διαβήτης αποτελούν σημαντικούς παράγοντες κινδύνου για αυξημένη αρτηριακή σκληρότητα. Αφού λοιπόν απουσίαζαν οι παραπάνω παράγοντες κινδύνου και ο μέσος όρος ηλικίας των παχύσαρκων ατόμων που υποβλήθηκαν στη συγκεκριμένη εξέταση δεν ήταν ιδιαίτερα αυξημένος, οι μεταβολικές επιπτώσεις της παχυσαρκίας πιθανά να μην είχαν εκδηλωθεί κατά τη χρονική στιγμή διεξαγωγής της μελέτης και για αυτό το λόγο να μην παρατηρήθηκαν οι αναμενόμενες συσχετίσεις. Το φαινόμενο αυτό έχει παρατηρηθεί και σε άλλες

μελέτες. Συχνότερα αναφέρεται με την έννοια «του μεταβολικά υγιούς παχύσαρκου»²⁵⁸. Παρόλα αυτά, στη μελέτη των Rider και συνεργατών²⁵⁷, σε παχύσαρκους ασθενείς χωρίς άλλους παράγοντες κινδύνου, η PWV συσχετιζόνταν θετικά με το ΔΜΣ, τη λιπώδη μάζα και τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων. Η συγκεκριμένη υποομάδα εκείνης της μελέτης είχε υψηλότερο ΔΜΣ σε σύγκριση με τον αντίστοιχο της παρούσας μελέτης. Για πρακτικούς λόγους που αφορούσαν την αδυναμία εξέτασης ατόμων με σωματικό βάρος μεγαλύτερο από 130 κιλά στο μαγνητικό τομογράφο, στη μελέτη δεν συμπεριλήφθηκαν παχύσαρκοι με βάρος >130 kg που θα αύξαναν τη μέση τιμή του ΔΜΣ του πληθυσμού και ενδεχομένως θα οδηγούσε στην εμφάνιση συσχετίσεων.

Στην παρούσα μελέτη η μέτρηση της διατασιμότητας της αορτής με μαγνητική τομογραφία δεν συσχετίστηκε με την πρόσληψη φλαβονοειδών. Σε ορισμένες επιδημιολογικές μελέτες, η πρόσληψη φλαβονοειδών συσχετίστηκε είτε με δείκτες ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας ή με τη διατασιμότητα των αγγείων που εκτιμήθηκε με FMD στη βραχιόνια αρτηρία^{167, 259}. Μικρές κλινικές μελέτες έδειξαν ότι τα φλαβονοειδή ή τροφές πλούσιες σε αυτά ευοδώνουν τη λειτουργία του ενδοθηλίου αυξάνοντας το FMD. Σε μία πρόσφατη μετα-ανάλυση κλινικών μελετών, τόσο η οξεία όσο και η χρόνια πρόσληψη φλαβονοειδών, συσχετιζόνταν με τη βελτίωση του FMD¹⁶⁴. Το αποτέλεσμα αυτό όμως δεν αφορούσε όλα τα τρόφιμα. Για παράδειγμα, το πράσινο τσάι και η σοκολάτα είχαν ισχυρότερες συσχετίσεις σε σύγκριση με το κόκκινο κρασί ή τα σταφύλια¹⁶⁴.

Σε καμία μέχρι σήμερα γνωστή μελέτη δεν έχει εκτιμηθεί η συσχέτιση της πρόσληψης φλαβονοειδών με την ενδοθηλιακή λειτουργία με τη μέθοδο της μαγνητικής τομογραφίας στην αορτή. Τα δεδομένα της παρούσας μελέτης μπορεί να

σημαίνουν είτε ότι τα φλαβονοειδή δεν διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διατασιμότητα των αγγείων των παχύσαρκων ατόμων, είτε ότι χρειάζονται περαιτέρω μελέτες σε βάθος χρόνου για να αναδειχθούν ενδεχόμενες συσχετίσεις. Επίσης, υπάρχει το ενδεχόμενο η σχετικά υψηλή, συγκρινόμενη με τις τιμές στη διεθνή βιβλιογραφία, πρόσληψη φλαβονοειδών που παρατηρήθηκε στη μελέτη μας, να υπερβαίνει την μέγιστη πρόσληψη που πιθανά επιφέρει ευεργετικά αποτελέσματα στο ενδοθήλιο, πλέον της οποίας να μην υπάρχει επιπρόσθετο όφελος.

4.7 Βισφατίνη στο Μεταβολικό Σύνδρομο

Στην παρούσα μελέτη για πρώτη φορά προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της βισφατίνης σε ασθενείς με ΜετΣ. Παρατηρήθηκαν υψηλά επίπεδα βισφατίνης του πλάσματος σε άτομα με ΜετΣ, τα οποία συσχετίζονταν με τον αριθμό των κριτηρίων για τη διάγνωση του ΜετΣ. Επιπρόσθετα, παχύσαρκοι ασθενείς με ΜετΣ εμφάνισαν υψηλότερα επίπεδα της βισφατίνης σε σύγκριση με παχύσαρκους χωρίς ΜετΣ. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι τα επίπεδα βισφατίνης είναι αυξημένα στο ΜετΣ ανεξάρτητα από την παρουσία ή όχι της παχυσαρκίας. Προγενέστερες επιδημιολογικές μελέτες έδειξαν ότι το ΜετΣ διπλασιάζει τον κίνδυνο εμφάνισης ΚΑΝ⁷¹. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό και με το γεγονός ότι η βισφατίνη έχει φλεγμονώδεις ιδιότητες²⁶⁰ και πιθανά συμμετέχει στην αθηρωματική διαδικασία¹²¹, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα αυξημένα επίπεδα βισφατίνης μπορεί να σχετίζονται έμμεσα με αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο.

Παρατηρήθηκαν επίσης, θετικές συσχετίσεις των επιπέδων της βισφατίνης με το σωματικό βάρος, το ΔΜΣ και την περίμετρο της μέσης. Πολλές μελέτες έδειξαν θετικές συσχετίσεις ανάμεσα στα επίπεδα της βισφατίνης και σε ανθρωπομετρικές παραμέτρους, όπως ο ΔΜΣ και η περίμετρος της μέσης, ενώ άλλες μελέτες ανέφεραν καμία ή ακόμη και αρνητική συσχέτιση¹³¹. Είναι πιθανό αυτές οι διαφορές να οφείλονται στους διαφορετικούς πληθυσμούς που μελετήθηκαν. Αναφορικά με παραμέτρους του μεταβολισμού των λιπιδίων, η βισφατίνη συσχετίστηκε με τα επίπεδα της ολικής, της non-HDL χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων και οριακά με τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης. Αντίστοιχα, συσχετίσεις της βισφατίνης με την ολική χοληστερόλη και τα τριγλυκερίδια έχουν αναφερθεί και σε άλλες μελέτες¹³¹. Αυτές οι συσχετίσεις υπογραμμίζουν το ρόλο της βισφατίνης ως έμμεσου δείκτη της παρουσίας ενός αθηρογόνου λιπιδαιμικού προφίλ, όμως οι μηχανισμοί μέσω των

οποίων η βισφατίνη συνδέεται με το μεταβολισμό των λιπιδίων δεν είναι ακόμη γνωστοί.

Στην παρούσα μελέτη δεν βρέθηκε συσχέτιση των επιπέδων της βισφατίνης με τα επίπεδα της γλυκόζης νηστείας, όμως διαπιστώθηκε σημαντική συσχέτιση με την ινσουλίνη και το δείκτη HOMA. Ο ρόλος της βισφατίνης στο μεταβολισμό της γλυκόζης, την έκκριση ινσουλίνης, την ινσουλινοευαισθησία και το σακχαρώδη διαβήτη έχει διερευνηθεί τόσο σε κυτταρικό επίπεδο ή σε πειραματόζωα, όσο και σε μελέτες στις οποίες μετρήθηκαν τα επίπεδα της βισφατίνης του ορού σε ανθρώπους: Οι Revollo και συνεργάτες²⁶¹ έδειξαν ότι ποντίκια *Nampt^{+/-}*, με ένα μόνο αλληλόμορφο γονίδιο της βισφατίνης, εμφάνισαν μειωμένη ανοχή στη γλυκόζη, λόγω μείωσης της έκκρισης ινσουλίνης, η οποία βελτιώθηκε με τη χορήγηση νικοτινάμινο-μονονουκλεοτιδίου, το οποίο είναι προϊόν της ενζυμικής δράσης της βισφατίνης. Σε ηπατοκύτταρα με μειωμένη έκφραση βισφατίνης, η διαμέσου της ινσουλίνης πρόσληψη γλυκόζης βρέθηκε μειωμένη²⁶². Αρνητική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων βισφατίνης και της λειτουργικότητας των β-κυττάρων του παγκρέατος αναφέρθηκε σε ανθρώπους²⁶³, καθώς και σημαντική αύξηση της έκκρισης ινσουλίνης από τη βισφατίνη σε β-κύτταρα ποντικών¹¹⁷. Επιπρόσθετα, η συνεχής ενδοφλέβια χορήγηση γλυκόζης προκάλεσε αύξηση των επιπέδων της βισφατίνης²⁶⁴. Η αύξηση αυτή περιορίστηκε με τη χορήγηση ινσουλίνης²⁶⁴. Άτομα με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 εμφανίζουν υψηλά επίπεδα βισφατίνης^{263, 265, 266}. Όλα τα παραπάνω δεδομένα φαίνεται ότι είναι σε αντιστοιχία με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης και συνηγορούν στο σημαντικό ρόλο της βισφατίνης στο μεταβολισμό της γλυκόζης.

Τέλος, παρατηρήθηκε συσχέτιση των επιπέδων της βισφατίνης με τη συστολική και διαστολική αρτηριακή πίεση. Παρόμοιες συσχετίσεις έχουν αναφερθεί και από άλλους ερευνητές^{267, 268}. Σε μη διαβητικές Κορεάτισσες γυναίκες, τα επίπεδα

της βισφατίνης σχετίζονταν θετικά με τη διαστολική αρτηριακή πίεση ανεξάρτητα από τα επίπεδα του ΔΜΣ²⁶⁸. Αντίθετα, τα ευρήματα αυτά δεν επιβεβαιώθηκαν από άλλους μελετητές, καθώς δεν παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα βισφατίνης σε υπέρτασικούς άντρες έναντι υγιών ατόμων²⁶⁶. Ο ρόλος της βισφατίνης όσον αφορά την αρτηριακή πίεση χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

4.8 Επίδραση των φλαβονοειδών και της ρεσβερατρόλης σε ανθρώπινα λιποκύτταρα SGBS

4.8.1 Λιποκύτταρα SGBS

Αναμφίβολα, η μελέτη πειραματόζωων και κυτταρικών σειρών που προέρχονται από αυτά συνέβαλλε αποφασιστικά στην κατανόηση της φυσιολογίας και των δράσεων του λιπώδους ιστού και της παχυσαρκίας. Όμως, έχουν αναφερθεί αρκετές διαφορές ανάμεσα στο λιπώδη ιστό ανθρώπων και τρωκτικών. Τα ανθρώπινα λιποκύτταρα πέρα από το μεγαλύτερο μέγεθός τους⁸⁹, την παρουσία α2-αδρενεργικών υποδοχέων σε μεγαλύτερο βαθμό σε σύγκριση με τα αντίστοιχα του ποντικού, τις διαφορές στην επίδραση των λιπολυτικών ενζύμων στη λιπόλυση²⁶⁹, έχουν ακόμη διαφορετικό τρόπο στην έκφραση και τη δράση ορισμένων αδιποκινών²⁷⁰:

Η λεπτίνη φαίνεται ότι έχει πιο ισχυρές επιδράσεις στα τρωκτικά σε σύγκριση με τον άνθρωπο, καθώς σε συνθήκες έλλειψης τροφής, τα επίπεδα της λεπτίνης των τρωκτικών μεταβάλλονται άμεσα ώστε η ορμόνη να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στο ισοζύγιο ενέργειας, καταστέλλοντας την αναπαραγωγή, μειώνοντας τη σωματική θερμοκρασία και τη θυρεοειδική λειτουργία και αυξάνοντας ορισμένες ορμόνες²⁷¹. Ο TNF-α παράγεται και εκκρίνεται από το λιπώδη ιστό των τρωκτικών, ενώ στον άνθρωπο δρα ως αυτοκρινικός και παρακρινικός παράγοντας, χωρίς να εκκρίνεται στην κυκλοφορία²⁷². Η ρεζιστίνη σε ποντίκια εκφράζεται από λευκά λιποκύτταρα, ενώ στον άνθρωπο υψηλότερα επίπεδα έκφρασής της βρέθηκαν σε μακροφάγα του μυελού των οστών και σχεδόν μηδενικά επίπεδα σε λιποκύτταρα²⁷⁰. Η συσχέτιση της ρεζιστίνης με την ινσουλινοαντίσταση σε ποντίκια δεν επιβεβαιώθηκε στον άνθρωπο. Η αδιψίνη αυξάνεται ανάλογα με το βαθμό της παχυσαρκίας στον άνθρωπο, αλλά μειώνεται στα τρωκτικά²⁷⁰. Η έκφραση της πρωτεΐνης δέσμευσης ρετινόλης-4

(retinol-binding protein 4) συσχετίζεται αρνητικά με την έκφραση του υποδοχέα της γλυκόζης GLUT4 σε ποντίκια και θετικά σε ανθρώπους²⁷⁰.

Οι ανθρώπινοι ινοβλάστες SGBS διατηρούν την λιπογεννητική τους ικανότητα σε ώριμα λιποκύτταρα έως και 50 γενιές, τη στιγμή που ανθρώπινοι ινοβλάστες που προέρχονται από βιοψίες λιπώδους ιστού μπορούν να την απολέσουν σύντομα *in vitro*. Επιπρόσθετο πλεονέκτημα των ινοβλαστών SGBS είναι ότι η διαφοροποίηση τους λαμβάνει χώρα απουσία ορού και αλβουμίνης. Λειτουργικά, οι πλήρως διαφοροποιημένοι ινοβλάστες SGBS δεν διαφέρουν από τα ώριμα λιποκύτταρα πρωτογενούς καλλιέργειας. Χαρακτηριστικά, εκκρίνουν πληθώρα αδιποκινών, όπως λεπτίνη, αντιπονεκτίνη, βισφατίνη, TNF- α , ιντερλευκίνες, PAI-1 κ.ά.²⁷³

Για τους παραπάνω λόγους, επιλέχθηκε η κυτταρική σειρά ανθρώπινων λιποκυττάρων SGBS αντί κάποιας άλλης κυτταρικής σειράς ποντικού, όπως η ευρέως χρησιμοποιούμενη 3T3-L1, καθώς η πρώτη πλεονεκτεί των κυτταρικών σειρών που προέρχονται από τρωκτικά, αφού προσομοιάζουν περισσότερο με τη φυσιολογία του ανθρώπινου λιπώδους ιστού. Επιπρόσθετα, για το σκοπό της παρούσας μελέτης τα λιποκύτταρα SGBS υπερέχουν έναντι των ινοβλαστών που προέρχονται από βιοψία ανθρώπινου λιπώδους ιστού.

4.8.2 Επίδραση των πολυφαινολών σε λιποκύτταρα SGBS

Η παχυσαρκία θεωρείται μία κατάσταση που χαρακτηρίζεται από μικρού βαθμού χρόνια φλεγμονή. Κατά συνέπεια, από πολλούς ερευνητές εκτιμάται ότι η θεραπεία της παχυσαρκίας δεν πρέπει να έχει ως μοναδικό στόχο την απώλεια σωματικού βάρους, αλλά να στοχεύει παράλληλα στη διόρθωση των μεταβολικών

διαταραχών που τη συνοδεύουν και ενδεχομένως στην επαναφορά της ισορροπίας των αδιποκινών στα επίπεδα του φυσιολογικού σωματικού βάρους. Στην παρούσα μελέτη, διερευνήθηκε η πιθανή επίδραση των φυτικών πολυφαινολών στην έκκριση των αδιποκινών σε καλλιέργειες ανθρώπινων λιποκυττάρων SGBS.

Περιοριστήκαμε στη μελέτη τριών πολυφαινολών. Συνολικά οι πολυφαινόλες απαρτίζουν μία αναρίθμητη ομάδα φυτικών ουσιών. Μέχρι πρόσφατα, περισσότερες από 6000 έχουν χαρακτηριστεί σε λαχανικά, φρούτα και ροφήματα, όπως το τσάι, το κρασί, οι χυμοί και το κακάο. Επιλέχθηκαν η κουερσετίνη, ο γαλλικός εστέρας επιγαλλοκατεχίνης και η ρεσβερατρόλη, γιατί αποτελούν αντιπροσωπευτικά δείγματα πολυφαινολών, που απαντώνται συχνότερα στην ανθρώπινη διατροφή και παράλληλα έχουν περιγραφεί για αυτές τις ουσίες ενδεχόμενες θετικές καρδιοπροστατευτικές δράσεις σε προηγούμενες μελέτες²⁷⁴. Αρκετοί ερευνητές εξέτασαν διάφορα φλαβονοειδή και τη ρεσβερατρόλη σε σχέση με την επίδρασή τους στη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων, τη λιπόλυση, ή την πρόσληψη γλυκόζης. Η κυτταρική σειρά που κατά κανόνα χρησιμοποιήθηκε σε προγενέστερες μελέτες ήταν η 3T3-L1 του ποντικού ή απομονωμένα λιποκύτταρα αρουραίων. Αντίθετα, όπως ήδη αναφέρθηκε, στην παρούσα διατριβή, επιλέχθηκε η ανθρώπινη κυτταρική σειρά SGBS και το ενδιαφέρον επικεντρώθηκε στην έκκριση ορισμένων αδιποκινών.

Η παρούσα αναφορά για τη μεταβολή των εκκρινόμενων επιπέδων βισφατίνης στο υπερκείμενο καλλιέργειας από ανθρώπινα λιποκύτταρα περιγράφεται για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία. Κατά τη μέτρηση της βισφατίνης στο κυτταρόλυμα παρατηρήθηκε ελάχιστη ποσότητα της πρωτεΐνης, ένα εύρημα που υποδηλώνει ότι η πλειοψηφία της συνολικής βισφατίνης εκκρίνεται στο υπερκείμενο. Το εύρημα αυτό είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της μελέτης του Revollo και συνεργατών

στον ίδιο τύπο λιποκυττάρων²⁶¹. Μπορεί επομένως να συμπεράνει κανείς ότι οι πολυφαινόλες επιδρούν στην παραγωγή και την έκκριση βισφατίνης. Επιπρόσθετα, φαίνεται ότι η επίδραση των πολυφαινολών εξαρτάται από τη χημική δομή τους. Παρατηρήθηκε ισχυρότερη δράση από την κουερσετίνη σε σύγκριση με τη ρεσβερατρόλη, μία διαφορά που ωστόσο δεν ήταν στατιστικά σημαντική, ενώ ο γαλλικός εστέρας επιγαλλοκατεχίνης δεν επηρέασε την έκκριση της βισφατίνης. Πρόσφατα, περιγράφηκε η επίδραση κουερσετίνης και ρεσβερατρόλης σε ανθρώπινα λιποκύτταρα και αναφέρθηκε ότι η πρώτη βελτιώνει πιο αποτελεσματικά την αντίσταση στη δράση της ινσουλίνης και τη φλεγμονώδη απάντηση στον TNFα²⁷⁵. Τα αποτελέσματα αυτά είναι συμβατά με τα δεδομένα της παρούσας μελέτης που έδειξε μεγαλύτερη αναστολή της εκκρινόμενης βισφατίνης με την κουερσετίνη συγκριτικά με τη ρεσβερατρόλη. Γενικά, διαφορετικές επιδράσεις των φλαβονοειδών, ακόμη και της ίδιας υποομάδας, έχουν περιγραφεί σε προγενέστερες μελέτες^{276, 277}. Αυξημένα επίπεδα βισφατίνης σχετίζονται με παχυσαρκία, σακχαρώδη διαβήτη, αρτηριακή υπέρταση και ΚΑΝ. Αν και η φύση αυτής της συσχέτισης δεν είναι απόλυτα κατανοητή και βρίσκεται υπό διερεύνηση, τα δεδομένα συγκλίνουν στη δυνατότητα της βισφατίνης να ευοδώνει την αθηρωματική διαδικασία. Κάτω από αυτό το πρίσμα, η μείωση των επιπέδων της βισφατίνης στο υπερκείμενο από τις πολυφαινόλες που μελετήθηκαν μπορεί να θεωρηθεί ότι συσχετίζεται με τις αντιαθηρογόνες ιδιότητες αυτών των ουσιών.

Η επίδραση των πολυφαινολών στο μεταβολισμό της λεπτίνης είναι αμφιλεγόμενη. Σε μία μελέτη, η ανθοκυανίνη είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της έκκρισης της λεπτίνης από λιποκύτταρα αρουραίων. Στην παρούσα μελέτη, δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση των πολυφαινολών στα επίπεδα της λεπτίνης στο υπερκείμενο. Αυτό το εύρημα μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι δεν προεπώασαμε

ή συνεπώασαμε τα κύτταρα με κάποιο φλεγμονώδη παράγοντα, όπως είναι ο TNFα, που μπορεί να αυξήσει τα επίπεδα λεπτίνης πέραν της βασικής έκκρισής της. Αντίθετα με τα δεδομένα in vitro, σε τρωκτικά, μετά από διατροφή πλούσια σε πολυφαινόλες είτε δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή είτε παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων της λεπτίνης του ορού, περιπλέκοντας την όλη εικόνα. Βέβαια, η σύγκριση ανάμεσα σε κύτταρα διαφορετικών ειδών, καθώς και μεταξύ κυτταροκαλλιιεργειών και πειραματόζωων δεν είναι άμεση και πρέπει να αξιολογείται προσεκτικά.

Στα SGBS λιποκύτταρα, οι πολυφαινόλες οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν δεν προκάλεσαν μεταβολή στα επίπεδα της αντιπνεκτίνης στο υπερκείμενο. Από αυτό το εύρημα προκύπτει ότι σε ώριμα λιποκύτταρα οι πολυφαινόλες δεν επηρεάζουν κάτω από τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες την έκκριση της αντιπνεκτίνης. Εξάλλου, κατά τη διαφοροποίηση ανθρώπινων λιποκυττάρων, η έκφραση και τα επίπεδα της αντιπνεκτίνης αυξάνονται συνεχώς από την πρώτη ημέρα έως και την 15^η, μετά από την οποία η έκκριση μειώνεται σημαντικά²⁷⁸, ένα εύρημα το οποίο συνάδει με τα δεδομένα της παρούσας μελέτης στην οποία ανιχνεύθηκαν χαμηλά επίπεδα αντιπνεκτίνης στο υπερκείμενο των SGBS λιποκυττάρων, κάτω από τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες. Πρέπει ωστόσο να αναφερθεί ότι σε άλλη μελέτη η ανθοκυανίνη αύξησε τόσο τη γονιδιακή έκφραση και όσο και την έκκριση της αντιπνεκτίνης σε λιποκύτταρα αρουραίων²⁷⁹. Εκτός από τη χρησιμοποίηση διαφορετικού φλαβονοειδούς, οι συγκεντρώσεις που επιλέχθηκαν στη μελέτη αυτή ήταν αρκετά υψηλότερες σε σύγκριση με τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη μας. Παρόμοια αποτελέσματα με αύξηση της αντιπνεκτίνης του ορού αναφέρθηκαν και σε μελέτες στις οποίες χορηγήθηκαν φλαβονοειδή σε τρωκτικά²⁸⁰,²⁸¹. Όμως, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι σε πρόσφατη μελέτη ορισμένα φλαβονοειδή, συμπεριλαμβανομένων της κουερσετίνης και του γαλλικού

εστέρα επιγαλλοκατεχίνης, μείωσαν την αντιπονεκτίνη²⁷⁶. Το συμπέρασμα που εξάγεται από τα παραπάνω είναι ότι σημαντικό ρόλο μπορεί να διαδραματίζει το πειραματικό μοντέλο, η επιλογή του φλαβονοειδούς, καθώς και η συγκέντρωσή του²⁸².

Συμπερασματικά, οι πολυφαινόλες στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν δεν επηρέασαν τα επίπεδα της εκκρινόμενης λεπτίνης και αντιπονεκτίνης σε καλλιέργεια λιποκυττάρων. Από αυτές τις πολυφαινόλες, μόνο η κουερσετίνη και η ρεσβερατρόλη μείωσαν την έκκριση της βισφατίνης. Η επίδραση αυτή μπορεί να αποτελεί μία ωφέλιμη δράση αυτών των ουσιών και πιθανά μπορεί να συμβάλλει στις αντι-αθηρογόνες ιδιότητές τους. Επιπρόσθετες μελέτες απαιτούνται, τόσο σε κυτταρικό επίπεδο, όσο και σε πειραματόζωα και ανθρώπους, για να επιβεβαιωθεί το παραπάνω εύρημα.

5. Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, στην παρούσα μελέτη, υπάρχουν έμμεσες ενδείξεις για μία ευνοϊκή επίδραση των προσλαμβανόμενων φλαβονοειδών στο μεταβολισμό των λιπιδίων σε παχύσαρκα άτομα, ενώ σημαντικό ένα εύρημα πρέπει να θεωρείται και η αρνητική συσχέτιση των προσλαμβανόμενων πολυφαινολών με τα επίπεδα της ινσουλίνης, που επισημαίνει μία πιθανή ευνοϊκή δράση τους στο μεταβολισμό των υδατανθράκων. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα βισφατίνης στην παχυσαρκία και το μεταβολικό σύνδρομο, τα οποία μπορεί να σχετίζονται έμμεσα με αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο. Τέλος, η μείωση της εκκρινόμενης βισφατίνης από ανθρώπινα λιποκύτταρα με την επίδραση των πολυφαινολών, μπορεί να αποτελεί μία ωφέλιμη δράση αυτών των ουσιών και πιθανά μπορεί να συμβάλλει στις αντιαθηρογόνες ιδιότητές τους. Τα φλαβονοειδή μελλοντικά μπορεί να αποτελέσουν μία δυνητική θεραπευτική προσέγγιση για τη θεραπεία των μεταβολικών διαταραχών της παχυσαρκίας.

6. Περίληψη

Η παχυσαρκία συσχετίζεται με αυξημένη προδιάθεση για την εκδήλωση αθηροσκλήρωσης και αυξημένη επίπτωση στεφανιαίας νόσου. Ο λιπώδης ιστός είναι ενεργός μεταβολικά ιστός που παράγει κυτταροκίνες που ονομάζονται αδιποκίνες, οι σημαντικότερες από τις οποίες είναι η λεπτίνη, η αντιγονεκτίνη και η βισφατίνη. Οι μηχανισμοί που έχουν προταθεί για την εμφάνιση της στεφανιαίας νόσου σε ασθενείς με παχυσαρκία είναι η αυξημένη εναπόθεση λίπους, κυρίως σπλαχνικού, καθώς και οι επιδράσεις των αδιποκινών. Η διατροφή είναι γνωστό ότι σχετίζεται με την πρόληψη και τη θεραπεία, τόσο των καρδιαγγειακών νοσημάτων, όσο και της παχυσαρκίας. Αξίζει να σημειωθεί ότι αντιοξειδωτικές πολυφαινολικές ουσίες, όπως είναι τα φλαβονοειδή και η ρεσβερατρόλη, που περιέχονται κυρίως σε φρούτα και λαχανικά, φαίνεται ότι προστατεύουν από καρδιαγγειακά συμβάματα.

Παρουσιάζει, λοιπόν, ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον η διερεύνηση της συσχέτισης της πρόσληψης των φλαβονοειδών της διατροφής με κλινικούς και βιοχημικούς δείκτες σε άτομα με παχυσαρκία, όσο και η εκτίμηση της επίδρασης των παραπάνω παραγόντων σε κυτταρικό επίπεδο σε ανθρώπινα λιποκύτταρα, οι μεταβολικές διαταραχές των οποίων πιστεύεται ότι αποτελούν κομβικό σημείο στην παθοφυσιολογία τόσο της παχυσαρκίας, όσο και της αθηροσκλήρωσης. Επιπρόσθετα, ο ρόλος της βισφατίνης στην παχυσαρκία και το μεταβολικό σύνδρομο, αν και θεωρείται σημαντικός, δεν έχει μελετηθεί πλήρως και χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Στην παρούσα μελέτη συμμετείχαν 100 παχύσαρκοι ασθενείς (20 άνδρες & 80 γυναίκες). Η πρόσληψη των φλαβονοειδών εκτιμήθηκε με τη συμπλήρωση ερωτηματολογίων συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων. Η πρόσληψη φλαβονοειδών ήταν 275,38 (77,21-823,03) mg ανά ημέρα. Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στη

πρόσληψη φλαβονοειδών μεταξύ ανδρών και γυναικών. Βρέθηκαν θετικές συσχετίσεις της πρόσληψης φλαβονοειδών με την ηλικία και με την HDL χοληστερόλη, καθώς και αρνητική συσχέτιση των προσλαμβανόμενων φλαβονοειδών και προανθοκυανιδινών με τα τριγλυκερίδια και την ινσουλίνη. Επιπρόσθετα, η ημερήσια πρόσληψη φλαβονοειδών και προανθοκυανιδινών συσχετιζόνταν αρνητικά με τη δραστικότητα της αμινοτρανσφεράσης της αλανίνης, ενώ τα προσλαμβανόμενα φλαβονοειδή συσχετιζόνταν επιπλέον αρνητικά με τη δραστικότητα της γλουταμινικής αμινοτρανσφεράσης. Η διατασιμότητα των αγγείων ελέγχθηκε σε 20 από τους παραπάνω ασθενείς με μαγνητική τομογραφία της αορτής, χωρίς να βρεθεί καμία συσχέτιση της διατασιμότητας της αορτής με κλινικά ή βιοχημικά χαρακτηριστικά, με την πρόσληψη μακροθρεπτικών συστατικών ή την πρόσληψη φλαβονοειδών.

Σε ένα διαφορετικό πληθυσμό υγιών ατόμων και ασθενών με μεταβολικό σύνδρομο (n= 186) μετρήθηκαν τα επίπεδα της βισφατίνης του πλάσματος και βρέθηκαν ότι αυτά είναι αυξημένα. Τα επίπεδα της βισφατίνης αυξάνονταν με την αύξηση του αριθμού των κριτηρίων για τη διάγνωση του μεταβολικού συνδρόμου και συσχετιζόνταν με την περίμετρο μέσης, τα τριγλυκερίδια, τη συστολική και τη διαστολική αρτηριακή πίεση καθώς και με τη γλυκόζη νηστείας.

Διερευνήθηκε, επίσης, η πιθανή επίδραση των πολυφαινόλων στην έκκριση αδιποκινών σε καλλιέργειες ανθρώπινων λιποκυττάρων SGBS. Οι πολυφαινόλες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η κουερσετίνη, ο γαλλικός εστέρας επιγαλλοκατεχίνης και η ρεσβερατρόλη. Καμία από τις παραπάνω πολυφαινόλες δεν επηρέασε τα επίπεδα της εκκρινόμενης λεπτίνης και αντιπονεκτίνης, όμως τόσο η κουερσετίνη όσο και η ρεσβερατρόλη μείωσαν την έκκριση της βισφατίνης.

Συμπερασματικά, στην παρούσα μελέτη, υπάρχουν έμμεσες ενδείξεις για μία ευνοϊκή επίδραση των προσλαμβανόμενων φλαβονοειδών στο μεταβολισμό των λιπιδίων σε παχύσαρκα άτομα, ενώ σημαντικό εύρημα πρέπει να θεωρείται και η αρνητική συσχέτιση των προσλαμβανόμενων πολυφαινολών με τα επίπεδα της ινσουλίνης, που επισημαίνει μία πιθανή ευνοϊκή δράση τους στο μεταβολισμό των υδατανθράκων. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα βισφατίνης σε παχύσαρκα άτομα και σε άτομα με μεταβολικό σύνδρομο, τα οποία μπορεί να σχετίζονται έμμεσα με αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο. Τέλος, η μείωση της εκκρινόμενης βισφατίνης από ανθρώπινα λιποκύτταρα με την επίδραση των πολυφαινολών, μπορεί να αποτελεί μία ωφέλιμη δράση αυτών των ουσιών και πιθανά μπορεί να συμβάλλει στις αντιαθηρογόνες ιδιότητές τους. Τα φλαβονοειδή μελλοντικά μπορεί να αποτελέσουν μία δυνητική θεραπευτική προσέγγιση για τη θεραπεία των μεταβολικών διαταραχών της παχυσαρκίας.

7. Summary

Obesity increases the risk of developing insulin resistance, diabetes mellitus, hypertension, coronary heart disease and overall is associated with elevated morbidity and mortality. Several explanations have been offered, yet one widely accepted is that adipose tissue serves more than mere neighboring organ insulator and triglyceride depot storage. In fact, adipocytes produce and secrete a variety of proteins, collectively termed adipokines that exhibit important metabolic and inflammatory properties. Of particular interest are adipokines leptin, adiponectin and visfatin. Human nutrition and dietary intake are risk factors, as well as important therapeutic targets for both cardiovascular disease and obesity. Indeed, antioxidant polyphenols, such as flavonoids and resveratrol, primarily found in fruit and vegetables, may protect from cardiovascular disease.

Thus, it is of scientific interest to explore possible correlations between dietary flavonoid intake and clinical and biochemical parameters in obese individuals; and to investigate the effects of three polyphenols, namely quercetin, epigallocatechin gallate (EGCG) and resveratrol on adipokine secretion from cultured human adipocytes. Furthermore, additional aim of this study was to measure visfatin levels in obesity and the metabolic syndrome

In the present study, the dietary flavonoid intake of 100 obese patients (20 men – 80 women) was evaluated with a food frequency questionnaire. Total dietary flavonoid intake was 275,38 (77,21-823,03) mg daily. No difference in flavonoid intake between men and women was observed. Flavonoid intake was positively correlated with age and HDL cholesterol, whereas flavonoid and proanthocyanidin intake was negatively correlated with triglycerides and insulin. Furthermore, both

flavonoid and proanthocyanidin intake were negatively correlated with alanine aminotransferase and flavonoid intake with glutamine aminotransferase as well. Distensibility of the aorta was assessed with magnetic resonance imaging in 20 of the above patients, without showing any correlation with clinical and biochemical parameters or flavonoid intake.

In another population (n=186) of healthy individuals and patients with metabolic syndrome (MetS), visfatin levels were found elevated in subjects with MetS. Visfatin levels increased proportionally to the number of MetS components and correlated positively with waist circumference, triglycerides, systolic and diastolic blood pressure and fasting blood glucose.

The possible effect of polyphenols on adipokine secretion from human adipocytes was investigated. None of the polyphenols tested (quercetin, epigallocatechin gallate and resveratrol) affected leptin or adiponectin levels. However, both quercetin and resveratrol inhibited visfatin secretion.

In conclusion, in the present study, there is indirect evidence for a favorable effect of dietary flavonoids on lipid metabolism in obese individuals. Equally important should be considered the correlation found between polyphenol intake and insulin levels, which may suggest a favorable effect on carbohydrate metabolism. In addition, we observed increased plasma visfatin levels in obesity and the metabolic syndrome. Finally, the decrease in visfatin secretion from human adipocytes by the polyphenols tested, may contribute to their overall anti-atherogenic properties. Flavonoids may be used as therapeutic regimens of the metabolic disturbances of obesity in the future.

8. Δημοσιεύσεις – Ανακοινώσεις

Δημοσιεύσεις:

1. Filippatos TD, Derdemezis CS, Gazi IF, Lagos K, Kiortsis DN, Tselepis AD, Elisaf, MS (2008). Increased plasma visfatin levels in subjects with the metabolic syndrome. *European Journal of Clinical Investigation*, 38: 71–72
2. Filippatos TD, Derdemezis CS, Kiortsis DN, Tselepis AD, Elisaf MS (2007). Increased plasma levels of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in obese and overweight patients with metabolic syndrome. *Journal of Endocrinological Investigation*; 30(4): 323-6
3. Filippatos TD, Randevas HS, Derdemezis CS, Elisaf MS, Mikhailidis DP (2010). Visfatin/PBEF and atherosclerosis-related diseases. *Current Vascular Pharmacology*; 8(1): 12-28
4. Derdemezis CS, Kiortsis DN, Tsimihodimos V, Petraki MP, Veziraki P, Elisaf MS, Tselepis AD. *Effect of plant polyphenols on adipokine secretion from human SGBS adipocytes. Submitted to Biochemistry Research International. Currently under major revision*

Ανακοινώσεις:

1. Δερδεμέζης Χ, Πετράκη Μ, Ελισάφ Μ, Κιόρτσης Δ, Τσελέπης Α. Επίδραση φλαβονοειδών στην έκκριση λιποκινών από ανθρώπινα λιποκύτταρα. Προφορική ανακοίνωση στο 4ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αθηροσκλήρωσης, 13-16 Οκτωβρίου 2010, Ιωάννινα

9. Βιβλιογραφία

1. Atella V, Brady A, Catapano AL, et al. Bridging science and health policy in cardiovascular disease: focus on lipid management: A Report from a Session held during the 7th International Symposium on Multiple Risk Factors in Cardiovascular Diseases: Prevention and Intervention--Health Policy, in Venice, Italy, on 25 October, 2008. *Atheroscler Suppl* 2009;10:3-21.
2. The diet and all-causes death rate in the Seven Countries Study. *Lancet* 1981;2:58-61.
3. Aravanis C, Mensink RP, Corcondilas A, Ioanidis P, Feskens EJ, Katan MB. Risk factors for coronary heart disease in middle-aged men in Crete in 1982. *Int J Epidemiol* 1988;17:779-83.
4. Chimonas ET. The treatment of coronary heart disease: an update. Part 2: Mortality trends and main causes of death in the Greek population. *Curr Med Res Opin* 2001;17:27-33.
5. Gikas A, Sotiropoulos A, Panagiotakos D, Pastromas V, Papazafiropoulou A, Pappas S. Prevalence trends for myocardial infarction and conventional risk factors among Greek adults (2002-06). *QJM* 2008;101:705-12.
6. Chimonas T, Fanouraki I, Liberopoulos EN, Chimonas E, Elisaf M. Diverging trends in cardiovascular morbidity and mortality in a low risk population. *Eur J Epidemiol* 2009;24:415-23.
7. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001;285:2486-97.
8. Kuller LH. Ethnic differences in atherosclerosis, cardiovascular disease and lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol* 2004;15:109-13.
9. Teo KK, Ounpuu S, Hawken S, et al. Tobacco use and risk of myocardial infarction in 52 countries in the INTERHEART study: a case-control study. *Lancet* 2006;368:647-58.
10. Hu FB. Diet and lifestyle influences on risk of coronary heart disease. *Curr Atheroscler Rep* 2009;11:257-63.
11. Pitsavos C, Panagiotakos DB, Chrysohoou C, Stefanadis C. Epidemiology of cardiovascular risk factors in Greece: aims, design and baseline characteristics of the ATTICA study. *BMC Public Health* 2003;3:32.
12. Vardavas CI, Kafatos AG. Smoking policy and prevalence in Greece: an overview. *Eur J Public Health* 2007;17:211-3.

13. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* 2004;364:937-52.
14. Panagiotakos DB, Pitsavos CH, Chrysohoou C, et al. Status and management of hypertension in Greece: role of the adoption of a Mediterranean diet: the Attica study. *J Hypertens* 2003;21:1483-9.
15. Psaltopoulou T, Orfanos P, Naska A, Lenas D, Trichopoulos D, Trichopoulou A. Prevalence, awareness, treatment and control of hypertension in a general population sample of 26,913 adults in the Greek EPIC study. *Int J Epidemiol* 2004;33:1345-52.
16. Law MR, Wald NJ, Thompson SG. By how much and how quickly does reduction in serum cholesterol concentration lower risk of ischaemic heart disease? *BMJ* 1994;308:367-72.
17. Baigent C, Keech A, Kearney PM, et al. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet* 2005;366:1267-78.
18. Panagiotakos DB, Pitsavos C, Chrysohoou C, Skoumas J, Stefanadis C. 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* 2004;173:353-61.
19. Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract*;87:4-14.
20. Athyros VG, Ganotakis ES, Bathianaki M, et al. Awareness, treatment and control of the metabolic syndrome and its components: a multicentre Greek study. *Hellenic J Cardiol* 2005;46:380-6.
21. Hubert HB, Feinleib M, McNamara PM, Castelli WP. Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study. *Circulation* 1983;67:968-77.
22. Meigs JB, D'Agostino RB, Sr., Wilson PW, Cupples LA, Nathan DM, Singer DE. Risk variable clustering in the insulin resistance syndrome. The Framingham Offspring Study. *Diabetes* 1997;46:1594-600.
23. Kenchaiah S, Evans JC, Levy D, et al. Obesity and the risk of heart failure. *N Engl J Med* 2002;347:305-13.
24. Kapantais E, Tzotzas T, Ioannidis I, et al. First national epidemiological survey on the prevalence of obesity and abdominal fat distribution in Greek adults. *Ann Nutr Metab* 2006;50:330-8.

25. Panagiotakos DB, Pitsavos C, Chryschoou C, et al. Epidemiology of overweight and obesity in a Greek adult population: the ATTICA Study. *Obes Res* 2004;12:1914-20.
26. Bassuk SS, Manson JE. Epidemiological evidence for the role of physical activity in reducing risk of type 2 diabetes and cardiovascular disease. *J Appl Physiol* 2005;99:1193-204.
27. Skoumas J, Pitsavos C, Panagiotakos DB, et al. Physical activity, high density lipoprotein cholesterol and other lipids levels, in men and women from the ATTICA study. *Lipids Health Dis* 2003;2:3.
28. He J, Ogden LG, Vupputuri S, Bazzano LA, Loria C, Whelton PK. Dietary sodium intake and subsequent risk of cardiovascular disease in overweight adults. *JAMA* 1999;282:2027-34.
29. de Lorgeril M, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Delaye J, Mamele N. Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation* 1999;99:779-85.
30. Burr ML, Fehily AM, Gilbert JF, et al. Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART). *Lancet* 1989;2:757-61.
31. Ornish D, Brown SE, Scherwitz LW, et al. Can lifestyle changes reverse coronary heart disease? The Lifestyle Heart Trial. *Lancet* 1990;336:129-33.
32. Stampfer MJ, Hu FB, Manson JE, Rimm EB, Willett WC. Primary prevention of coronary heart disease in women through diet and lifestyle. *N Engl J Med* 2000;343:16-22.
33. Fung TT, Chiuve SE, McCullough ML, Rexrode KM, Logroscino G, Hu FB. Adherence to a DASH-style diet and risk of coronary heart disease and stroke in women. *Arch Intern Med* 2008;168:713-20.
34. Fung TT, van Dam RM, Hankinson SE, Stampfer M, Willett WC, Hu FB. Low-carbohydrate diets and all-cause and cause-specific mortality: two cohort studies. *Ann Intern Med*;153:289-98.
35. Bernstein AM, Sun Q, Hu FB, Stampfer MJ, Manson JE, Willett WC. Major dietary protein sources and risk of coronary heart disease in women. *Circulation*;122:876-83.
36. Hu FB, Willett WC. Optimal diets for prevention of coronary heart disease. *JAMA* 2002;288:2569-78.
37. Mozaffarian D, Katan MB, Ascherio A, Stampfer MJ, Willett WC. Trans fatty acids and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 2006;354:1601-13.

38. Jakobsen MU, O'Reilly EJ, Heitmann BL, et al. Major types of dietary fat and risk of coronary heart disease: a pooled analysis of 11 cohort studies. *Am J Clin Nutr* 2009;89:1425-32.
39. Bibbins-Domingo K, Chertow GM, Coxson PG, et al. Projected effect of dietary salt reductions on future cardiovascular disease. *N Engl J Med*;362:590-9.
40. Cook NR, Obarzanek E, Cutler JA, et al. Joint effects of sodium and potassium intake on subsequent cardiovascular disease: the Trials of Hypertension Prevention follow-up study. *Arch Intern Med* 2009;169:32-40.
41. Mozaffarian D, Rimm EB. Fish intake, contaminants, and human health: evaluating the risks and the benefits. *JAMA* 2006;296:1885-99.
42. Mozaffarian D, Ascherio A, Hu FB, et al. Interplay between different polyunsaturated fatty acids and risk of coronary heart disease in men. *Circulation* 2005;111:157-64.
43. Jacobs DR, Jr., Gallaher DD. Whole grain intake and cardiovascular disease: a review. *Curr Atheroscler Rep* 2004;6:415-23.
44. Joshipura KJ, Hu FB, Manson JE, et al. The effect of fruit and vegetable intake on risk for coronary heart disease. *Ann Intern Med* 2001;134:1106-14.
45. Joshipura KJ, Hung HC, Li TY, et al. Intakes of fruits, vegetables and carbohydrate and the risk of CVD. *Public Health Nutr* 2009;12:115-21.
46. Trichopoulou A, Lagiou P. Healthy traditional Mediterranean diet: an expression of culture, history, and lifestyle. *Nutr Rev* 1997;55:383-9.
47. Trichopoulou A, Costacou T, Bamia C, Trichopoulos D. Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *N Engl J Med* 2003;348:2599-608.
48. Fung TT, Rexrode KM, Mantzoros CS, Manson JE, Willett WC, Hu FB. Mediterranean diet and incidence of and mortality from coronary heart disease and stroke in women. *Circulation* 2009;119:1093-100.
49. Trichopoulou A, Bamia C, Trichopoulos D. Mediterranean diet and survival among patients with coronary heart disease in Greece. *Arch Intern Med* 2005;165:929-35.
50. Arvaniti F, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Zampelas A, Stefanadis C. Dietary habits in a Greek sample of men and women: the ATTICA study. *Cent Eur J Public Health* 2006;14:74-7.
51. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;420:868-74.
52. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-26.

53. Blakemore AI, Froguel P. Is obesity our genetic legacy? *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:S51-6.
54. Loos RJ. Recent progress in the genetics of common obesity. *Br J Clin Pharmacol* 2009;68:811-29.
55. Muller MJ, Bosy-Westphal A, Krawczak M. Genetic studies of common types of obesity: a critique of the current use of phenotypes. *Obes Rev*;11:612-8.
56. Mendoza JA, Drewnowski A, Christakis DA. Dietary energy density is associated with obesity and the metabolic syndrome in U.S. adults. *Diabetes Care* 2007;30:974-9.
57. Marti A, Moreno-Aliaga MJ, Hebebrand J, Martinez JA. Genes, lifestyles and obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004;28 Suppl 3:S29-36.
58. Popkin BM, Gordon-Larsen P. The nutrition transition: worldwide obesity dynamics and their determinants. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004;28 Suppl 3:S2-9.
59. Timlin MT, Pereira MA, Story M, Neumark-Sztainer D. Breakfast eating and weight change in a 5-year prospective analysis of adolescents: Project EAT (Eating Among Teens). *Pediatrics* 2008;121:e638-45.
60. van der Heijden AA, Hu FB, Rimm EB, van Dam RM. A prospective study of breakfast consumption and weight gain among U.S. men. *Obesity (Silver Spring)* 2007;15:2463-9.
61. Beunza JJ, Toledo E, Hu FB, et al. Adherence to the Mediterranean diet, long-term weight change, and incident overweight or obesity: the Seguimiento Universidad de Navarra (SUN) cohort. *Am J Clin Nutr*;92:1484-93.
62. Romaguera D, Norat T, Vergnaud AC, et al. Mediterranean dietary patterns and prospective weight change in participants of the EPIC-PANACEA project. *Am J Clin Nutr*;92:912-21.
63. Mendoza JA, Zimmerman FJ, Christakis DA. Television viewing, computer use, obesity, and adiposity in US preschool children. *Int J Behav Nutr Phys Act* 2007;4:44.
64. Christakis NA, Fowler JH. The spread of obesity in a large social network over 32 years. *N Engl J Med* 2007;357:370-9.
65. Lakka TA, Lakka HM, Salonen R, Kaplan GA, Salonen JT. Abdominal obesity is associated with accelerated progression of carotid atherosclerosis in men. *Atherosclerosis* 2001;154:497-504.
66. Whitlock G, Lewington S, Sherliker P, et al. Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. *Lancet* 2009;373:1083-96.

67. Lee CM, Huxley RR, Wildman RP, Woodward M. Indices of abdominal obesity are better discriminators of cardiovascular risk factors than BMI: a meta-analysis. *J Clin Epidemiol* 2008;61:646-53.
68. de Koning L, Merchant AT, Pogue J, Anand SS. Waist circumference and waist-to-hip ratio as predictors of cardiovascular events: meta-regression analysis of prospective studies. *Eur Heart J* 2007;28:850-6.
69. Reaven G. Metabolic syndrome: pathophysiology and implications for management of cardiovascular disease. *Circulation* 2002;106:286-8.
70. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 1998;15:539-53.
71. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* 2005;112:2735-52.
72. Hossain P, Kavar B, El Nahas M. Obesity and diabetes in the developing world--a growing challenge. *N Engl J Med* 2007;356:213-5.
73. Ford ES, Giles WH, Mokdad AH. Increasing prevalence of the metabolic syndrome among u.s. Adults. *Diabetes Care* 2004;27:2444-9.
74. Panagiotakos DB, Pitsavos C, Chrysohoou C, et al. Impact of lifestyle habits on the prevalence of the metabolic syndrome among Greek adults from the ATTICA study. *Am Heart J* 2004;147:106-12.
75. Pitsavos C, Panagiotakos DB, Chrysohoou C, Kavouras S, Stefanadis C. The associations between physical activity, inflammation, and coagulation markers, in people with metabolic syndrome: the ATTICA study. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2005;12:151-8.
76. Athyros VG, Bouloukos VI, Pehlivanidis AN, et al. The prevalence of the metabolic syndrome in Greece: the MetS-Greece Multicentre Study. *Diabetes Obes Metab* 2005;7:397-405.
77. Athyros VG, Mikhailidis DP, Papageorgiou AA, et al. Prevalence of atherosclerotic vascular disease among subjects with the metabolic syndrome with or without diabetes mellitus: the METS-GREECE Multicentre Study. *Curr Med Res Opin* 2004;20:1691-701.
78. Panagiotakos DB, Pitsavos C, Das UN, Skoumas Y, Stefanadis C. The implications of anthropometric, inflammatory and glycaemic control indices in the epidemiology of the metabolic syndrome given by different definitions: a classification analysis. *Diabetes Obes Metab* 2007;9:660-8.

79. Skoumas J, Papadimitriou L, Pitsavos C, et al. Metabolic syndrome prevalence and characteristics in Greek adults with familial combined hyperlipidemia. *Metabolism* 2007;56:135-41.
80. Gami AS, Witt BJ, Howard DE, et al. Metabolic syndrome and risk of incident cardiovascular events and death: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:403-14.
81. Hunt KJ, Resendez RG, Williams K, Haffner SM, Stern MP. National Cholesterol Education Program versus World Health Organization metabolic syndrome in relation to all-cause and cardiovascular mortality in the San Antonio Heart Study. *Circulation* 2004;110:1251-7.
82. Malik S, Wong ND, Franklin SS, et al. Impact of the metabolic syndrome on mortality from coronary heart disease, cardiovascular disease, and all causes in United States adults. *Circulation* 2004;110:1245-50.
83. Kalantzi K, Korantzopoulos P, Tzimas P, Katsouras CS, Goudevenos JA, Milionis HJ. The relative value of metabolic syndrome and cardiovascular risk score estimates in premature acute coronary syndromes. *Am Heart J* 2008;155:534-40.
84. Milionis HJ, Rizos E, Goudevenos J, Seferiadis K, Mikhailidis DP, Elisaf MS. Components of the metabolic syndrome and risk for first-ever acute ischemic nonembolic stroke in elderly subjects. *Stroke* 2005;36:1372-6.
85. Fruhbeck G, Gomez-Ambrosi J, Muruzabal FJ, Burrell MA. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;280:E827-47.
86. Trujillo ME, Scherer PE. Adipose tissue-derived factors: impact on health and disease. *Endocr Rev* 2006;27:762-78.
87. Cinti S. The adipose organ: morphological perspectives of adipose tissues. *Proc Nutr Soc* 2001;60:319-28.
88. Cinti S. The adipose organ. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2005;73:9-15.
89. Fruhbeck G. Overview of adipose tissue and its role in obesity and metabolic disorders. *Methods Mol Biol* 2008;456:1-22.
90. Spalding KL, Arner E, Westermark PO, et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 2008;453:783-7.
91. Hellerstein MK. De novo lipogenesis in humans: metabolic and regulatory aspects. *Eur J Clin Nutr* 1999;53 Suppl 1:S53-65.
92. Duncan RE, Ahmadian M, Jaworski K, Sarkadi-Nagy E, Sul HS. Regulation of lipolysis in adipocytes. *Annu Rev Nutr* 2007;27:79-101.

93. Jaworski K, Sarkadi-Nagy E, Duncan RE, Ahmadian M, Sul HS. Regulation of triglyceride metabolism. IV. Hormonal regulation of lipolysis in adipose tissue. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;293:G1-4.
94. Lass A, Zimmermann R, Oberer M, Zechner R. Lipolysis - a highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores. *Prog Lipid Res*;50:14-27.
95. Seufert J. Leptin effects on pancreatic beta-cell gene expression and function. *Diabetes* 2004;53 Suppl 1:S152-8.
96. Reilly MP, Iqbal N, Schutta M, et al. Plasma leptin levels are associated with coronary atherosclerosis in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:3872-8.
97. Lau DC, Dhillon B, Yan H, Szmitko PE, Verma S. Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288:H2031-41.
98. Ahima RS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity (Silver Spring)* 2006;14 Suppl 5:242S-9S.
99. Li S, Shin HJ, Ding EL, van Dam RM. Adiponectin levels and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2009;302:179-88.
100. Fumeron F, Aubert R, Siddiq A, et al. Adiponectin gene polymorphisms and adiponectin levels are independently associated with the development of hyperglycemia during a 3-year period: the epidemiologic data on the insulin resistance syndrome prospective study. *Diabetes* 2004;53:1150-7.
101. Mather KJ, Funahashi T, Matsuzawa Y, et al. Adiponectin, change in adiponectin, and progression to diabetes in the Diabetes Prevention Program. *Diabetes* 2008;57:980-6.
102. Matsuzawa Y, Funahashi T, Kihara S, Shimomura I. Adiponectin and metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:29-33.
103. Kubota N, Terauchi Y, Yamauchi T, et al. Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *J Biol Chem* 2002;277:25863-6.
104. Maeda N, Shimomura I, Kishida K, et al. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med* 2002;8:731-7.
105. Nawrocki AR, Rajala MW, Tomas E, et al. Mice lacking adiponectin show decreased hepatic insulin sensitivity and reduced responsiveness to peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J Biol Chem* 2006;281:2654-60.
106. Shklyayev S, Aslanidi G, Tennant M, et al. Sustained peripheral expression of transgene adiponectin offsets the development of diet-induced obesity in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:14217-22.

107. Pischon T, Girman CJ, Hotamisligil GS, Rifai N, Hu FB, Rimm EB. Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men. *JAMA* 2004;291:1730-7.
108. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, et al. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* 1999;100:2473-6.
109. Kumada M, Kihara S, Sumitsuji S, et al. Association of Hypoadiponectinemia With Coronary Artery Disease in Men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:85-9.
110. Jia SH, Li Y, Parodo J, et al. Pre-B cell colony-enhancing factor inhibits neutrophil apoptosis in experimental inflammation and clinical sepsis. *J Clin Invest* 2004;113:1318-27.
111. Kim MK, Lee JH, Kim H, et al. Crystal structure of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor 1/nicotinamide phosphoribosyltransferase, free and in complex with the anti-cancer agent FK-866. *J Mol Biol* 2006;362:66-77.
112. Wang T, Zhang X, Bheda P, Revollo JR, Imai S, Wolberger C. Structure of Nampt/PBEF/visfatin, a mammalian NAD⁺ biosynthetic enzyme. *Nat Struct Mol Biol* 2006;13:661-2.
113. Samal B, Sun Y, Stearns G, Xie C, Suggs S, McNiece I. Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor. *Mol Cell Biol* 1994;14:1431-7.
114. Curat CA, Wegner V, Sengenès C, et al. Macrophages in human visceral adipose tissue: increased accumulation in obesity and a source of resistin and visfatin. *Diabetologia* 2006;49:744-7.
115. Costford SR, Bajpeyi S, Pasarica M, et al. Skeletal muscle NAMPT is induced by exercise in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*;298:E117-26.
116. Song HK, Lee MH, Kim BK, et al. Visfatin: a new player in mesangial cell physiology and diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008;295:F1485-94.
117. Brown JE, Onyango DJ, Ramanjaneya M, et al. Visfatin regulates insulin secretion, insulin receptor signalling and mRNA expression of diabetes-related genes in mouse pancreatic beta-cells. *J Mol Endocrinol*;44:171-8.
118. Moschen AR, Kaser A, Enrich B, et al. Visfatin, an adipocytokine with proinflammatory and immunomodulating properties. *J Immunol* 2007;178:1748-58.
119. Busso N, Karababa M, Nobile M, et al. Pharmacological inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase/visfatin enzymatic activity identifies a new inflammatory pathway linked to NAD. *PLoS One* 2008;3:e2267.

120. Li Y, Zhang Y, Dorweiler B, et al. Extracellular Nampt promotes macrophage survival via a nonenzymatic interleukin-6/STAT3 signaling mechanism. *J Biol Chem* 2008;283:34833-43.
121. Dahl TB, Yndestad A, Skjelland M, et al. Increased expression of visfatin in macrophages of human unstable carotid and coronary atherosclerosis: possible role in inflammation and plaque destabilization. *Circulation* 2007;115:972-80.
122. Kim SR, Bae YH, Bae SK, et al. Visfatin enhances ICAM-1 and VCAM-1 expression through ROS-dependent NF-kappaB activation in endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 2008;1783:886-95.
123. Lee WJ, Wu CS, Lin H, et al. Visfatin-induced expression of inflammatory mediators in human endothelial cells through the NF-kappaB pathway. *Int J Obes (Lond)* 2009;33:465-72.
124. Adya R, Tan BK, Chen J, Randeva HS. Pre-B cell colony enhancing factor (PBEF)/visfatin induces secretion of MCP-1 in human endothelial cells: role in visfatin-induced angiogenesis. *Atherosclerosis* 2009;205:113-9.
125. Bae YH, Park HJ, Kim SR, et al. Notch1 mediates visfatin-induced FGF-2 up-regulation and endothelial angiogenesis. *Cardiovasc Res*;89:436-45.
126. Oki K, Yamane K, Kamei N, Nojima H, Kohno N. Circulating visfatin level is correlated with inflammation, but not with insulin resistance. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2007;67:796-800.
127. Xia M, Zhang C, Boini KM, Thacker AM, Li PL. Membrane raft-lysosome redox signalling platforms in coronary endothelial dysfunction induced by adipokine visfatin. *Cardiovasc Res*;89:401-9.
128. van der Veer E, Nong Z, O'Neil C, Urquhart B, Freeman D, Pickering JG. Pre-B-cell colony-enhancing factor regulates NAD⁺-dependent protein deacetylase activity and promotes vascular smooth muscle cell maturation. *Circ Res* 2005;97:25-34.
129. Lovren F, Pan Y, Shukla PC, et al. Visfatin activates eNOS via Akt and MAP kinases and improves endothelial cell function and angiogenesis in vitro and in vivo: translational implications for atherosclerosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009;296:E1440-9.
130. Hsu CP, Oka S, Shao D, Hariharan N, Sadoshima J. Nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates cell survival through NAD⁺ synthesis in cardiac myocytes. *Circ Res* 2009;105:481-91.
131. Filippatos TD, Randeva HS, Derdemezis CS, Elisaf MS, Mikhailidis DP. Visfatin/PBEF and atherosclerosis-related diseases. *Curr Vasc Pharmacol*;8:12-28.
132. Arts IC, Hollman PC. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* 2005;81:317S-25S.

133. Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 2000;130:2073S-85S.
134. Geleijnse JM, Hollman P. Flavonoids and cardiovascular health: which compounds, what mechanisms? *Am J Clin Nutr* 2008;88:12-3.
135. Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther* 2002;96:67-202.
136. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004;79:727-47.
137. Erdman JW, Jr., Balentine D, Arab L, et al. Flavonoids and heart health: proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop, May 31-June 1, 2005, Washington, DC. *J Nutr* 2007;137:718S-37S.
138. Taylor LP, Grotewold E. Flavonoids as developmental regulators. *Curr Opin Plant Biol* 2005;8:317-23.
139. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* 2005;81:230S-42S.
140. Ovaskainen ML, Torronen R, Koponen JM, et al. Dietary intake and major food sources of polyphenols in Finnish adults. *J Nutr* 2008;138:562-6.
141. Zamora-Ros R, Andres-Lacueva C, Lamuela-Raventos RM, et al. Estimation of dietary sources and flavonoid intake in a Spanish adult population (EPIC-Spain). *J Am Diet Assoc*;110:390-8.
142. Dilis V, Trichopoulou A. Antioxidant intakes and food sources in Greek adults. *J Nutr*;140:1274-9.
143. Beecher GR. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *J Nutr* 2003;133:3248S-54S.
144. Chun OK, Chung SJ, Song WO. Estimated dietary flavonoid intake and major food sources of U.S. adults. *J Nutr* 2007;137:1244-52.
145. Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* 2001;74:418-25.
146. Middleton E, Jr., Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev* 2000;52:673-751.
147. Frankenfeld CL, Cerhan JR, Cozen W, et al. Dietary flavonoid intake and non-Hodgkin lymphoma risk. *Am J Clin Nutr* 2008;87:1439-45.

148. Garavello W, Rossi M, McLaughlin JK, et al. Flavonoids and laryngeal cancer risk in Italy. *Ann Oncol* 2007;18:1104-9.
149. Kyle JA, Sharp L, Little J, Duthie GG, McNeill G. Dietary flavonoid intake and colorectal cancer: a case-control study. *Br J Nutr*;103:429-36.
150. Nothlings U, Murphy SP, Wilkens LR, Henderson BE, Kolonel LN. Flavonols and pancreatic cancer risk: the multiethnic cohort study. *Am J Epidemiol* 2007;166:924-31.
151. Tang NP, Zhou B, Wang B, Yu RB, Ma J. Flavonoids intake and risk of lung cancer: a meta-analysis. *Jpn J Clin Oncol* 2009;39:352-9.
152. Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 1993;342:1007-11.
153. Hertog MG, Kromhout D, Aravanis C, et al. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med* 1995;155:381-6.
154. Geleijnse JM, Launer LJ, Van der Kuip DA, Hofman A, Witteman JC. Inverse association of tea and flavonoid intakes with incident myocardial infarction: the Rotterdam Study. *Am J Clin Nutr* 2002;75:880-6.
155. Hirvonen T, Pietinen P, Virtanen M, et al. Intake of flavonols and flavones and risk of coronary heart disease in male smokers. *Epidemiology* 2001;12:62-7.
156. Knekt P, Jarvinen R, Reunanen A, Maatela J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *BMJ* 1996;312:478-81.
157. Rimm EB, Katan MB, Ascherio A, Stampfer MJ, Willett WC. Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals. *Ann Intern Med* 1996;125:384-9.
158. Yochum L, Kushi LH, Meyer K, Folsom AR. Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women. *Am J Epidemiol* 1999;149:943-9.
159. Sesso HD, Gaziano JM, Liu S, Buring JE. Flavonoid intake and the risk of cardiovascular disease in women. *Am J Clin Nutr* 2003;77:1400-8.
160. Lin J, Rexrode KM, Hu F, et al. Dietary intakes of flavonols and flavones and coronary heart disease in US women. *Am J Epidemiol* 2007;165:1305-13.
161. Hertog MG, Sweetnam PM, Fehily AM, Elwood PC, Kromhout D. Antioxidant flavonols and ischemic heart disease in a Welsh population of men: the Caerphilly Study. *Am J Clin Nutr* 1997;65:1489-94.

162. Hollman PC, Geelen A, Kromhout D. Dietary flavonol intake may lower stroke risk in men and women. *J Nutr*;140:600-4.
163. Huxley RR, Neil HA. The relation between dietary flavonol intake and coronary heart disease mortality: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Eur J Clin Nutr* 2003;57:904-8.
164. Hooper L, Kroon PA, Rimm EB, et al. Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr* 2008;88:38-50.
165. Cassidy A, O'Reilly EJ, Kay C, et al. Habitual intake of flavonoid subclasses and incident hypertension in adults. *Am J Clin Nutr*;93:338-47.
166. Mursu J, Nurmi T, Tuomainen TP, Ruusunen A, Salonen JT, Voutilainen S. The intake of flavonoids and carotid atherosclerosis: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. *Br J Nutr* 2007;98:814-8.
167. Landberg R, Sun Q, Rimm EB, et al. Selected Dietary Flavonoids Are Associated with Markers of Inflammation and Endothelial Dysfunction in U.S. Women. *J Nutr*.
168. Heiss C, Keen CL, Kelm M. Flavanols and cardiovascular disease prevention. *Eur Heart J*;31:2583-92.
169. Michalska M, Gluba A, Mikhailidis DP, et al. The role of polyphenols in cardiovascular disease. *Med Sci Monit*;16:RA110-9.
170. Stangl V, Dreger H, Stangl K, Lorenz M. Molecular targets of tea polyphenols in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 2007;73:348-58.
171. Zern TL, Fernandez ML. Cardioprotective effects of dietary polyphenols. *J Nutr* 2005;135:2291-4.
172. Chong MF, Macdonald R, Lovegrove JA. Fruit polyphenols and CVD risk: a review of human intervention studies. *Br J Nutr*;104 Suppl 3:S28-39.
173. Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 1992;339:1523-6.
174. Signorelli P, Ghidoni R. Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. *J Nutr Biochem* 2005;16:449-66.
175. Zamora-Ros R, Andres-Lacueva C, Lamuela-Raventos RM, et al. Concentrations of resveratrol and derivatives in foods and estimation of dietary intake in a Spanish population: European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Spain cohort. *Br J Nutr* 2008;100:188-96.
176. Wenzel E, Somoza V. Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. *Mol Nutr Food Res* 2005;49:472-81.

177. Fremont L. Biological effects of resveratrol. *Life Sci* 2000;66:663-73.
178. Khanna D, Sethi G, Ahn KS, et al. Natural products as a gold mine for arthritis treatment. *Curr Opin Pharmacol* 2007;7:344-51.
179. Fan E, Zhang L, Jiang S, Bai Y. Beneficial effects of resveratrol on atherosclerosis. *J Med Food* 2008;11:610-4.
180. Borriello A, Cucciolla V, Della Ragione F, Galletti P. Dietary polyphenols: focus on resveratrol, a promising agent in the prevention of cardiovascular diseases and control of glucose homeostasis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*;20:618-25.
181. Penumathsa SV, Maulik N. Resveratrol: a promising agent in promoting cardioprotection against coronary heart disease. *Can J Physiol Pharmacol* 2009;87:275-86.
182. Ramprasath VR, Jones PJ. Anti-atherogenic effects of resveratrol. *Eur J Clin Nutr*;64:660-8.
183. Sevov M, Elfineh L, Cavelier LB. Resveratrol regulates the expression of LXR-alpha in human macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;348:1047-54.
184. Frankel EN, Waterhouse AL, Kinsella JE. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet* 1993;341:1103-4.
185. Huang PH, Chen YH, Tsai HY, et al. Intake of red wine increases the number and functional capacity of circulating endothelial progenitor cells by enhancing nitric oxide bioavailability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*;30:869-77.
186. Do GM, Kwon EY, Kim HJ, et al. Long-term effects of resveratrol supplementation on suppression of atherogenic lesion formation and cholesterol synthesis in apo E-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;374:55-9.
187. Ghanim H, Sia CL, Abuaysheh S, et al. An antiinflammatory and reactive oxygen species suppressive effects of an extract of *Polygonum cuspidatum* containing resveratrol. *J Clin Endocrinol Metab*;95:E1-8.
188. Barger JL, Kayo T, Vann JM, et al. A low dose of dietary resveratrol partially mimics caloric restriction and retards aging parameters in mice. *PLoS One* 2008;3:e2264.
189. Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 2003;425:191-6.
190. Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell* 2006;127:1109-22.

191. Moller DE. New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Nature* 2001;414:821-7.
192. Ramirez-Zacarias JL, Castro-Munozledo F, Kuri-Harcuch W. Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O. *Histochemistry* 1992;97:493-7.
193. Fossati P, Prencipe L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin Chem* 1982;28:2077-80.
194. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
195. Cade J, Thompson R, Burley V, Warm D. Development, validation and utilisation of food-frequency questionnaires - a review. *Public Health Nutr* 2002;5:567-87.
196. Henriquez-Sanchez P, Sanchez-Villegas A, Doreste-Alonso J, Ortiz-Andrellucchi A, Pfrimer K, Serra-Majem L. Dietary assessment methods for micronutrient intake: a systematic review on vitamins. *Br J Nutr* 2009;102 Suppl 1:S10-37.
197. Molag ML, de Vries JH, Ocke MC, et al. Design characteristics of food frequency questionnaires in relation to their validity. *Am J Epidemiol* 2007;166:1468-78.
198. Serra-Majem L, Frost Andersen L, Henrique-Sanchez P, et al. Evaluating the quality of dietary intake validation studies. *Br J Nutr* 2009;102 Suppl 1:S3-9.
199. Beking K, Vieira A. An assessment of dietary flavonoid intake in the UK and Ireland. *Int J Food Sci Nutr*;62:17-9.
200. Lagiou P, Samoli E, Lagiou A, et al. Flavonoid classes and risk of peripheral arterial occlusive disease: a case-control study in Greece. *Eur J Clin Nutr* 2006;60:214-9.
201. Somerset SM, Johannot L. Dietary flavonoid sources in Australian adults. *Nutr Cancer* 2008;60:442-9.
202. Tooze JA, Subar AF, Thompson FE, Troiano R, Schatzkin A, Kipnis V. Psychosocial predictors of energy underreporting in a large doubly labeled water study. *Am J Clin Nutr* 2004;79:795-804.
203. Heitmann BL, Lissner L. Dietary underreporting by obese individuals--is it specific or non-specific? *BMJ* 1995;311:986-9.
204. Lissner L. Measuring food intake in studies of obesity. *Public Health Nutr* 2002;5:889-92.

205. Hebert JR, Hurley TG, Peterson KE, et al. Social desirability trait influences on self-reported dietary measures among diverse participants in a multicenter multiple risk factor trial. *J Nutr* 2008;138:226S-34S.
206. Kipnis V, Midthune D, Freedman L, et al. Bias in dietary-report instruments and its implications for nutritional epidemiology. *Public Health Nutr* 2002;5:915-23.
207. Pennington JA, Stumbo PJ, Murphy SP, et al. Food composition data: the foundation of dietetic practice and research. *J Am Diet Assoc* 2007;107:2105-13.
208. McNutt S, Zimmerman TP, Hull SG. Development of food composition databases for food frequency questionnaires (FFQ). *Journal of Food Composition and Analysis* 2008;21:S20-S6.
209. Dwyer JT, Peterson JJ. Measuring flavonoid intake: need for advanced tools. *Public Health Nutr* 2002;5:925-30.
210. Erlund I, Silaste ML, Alfthan G, Rantala M, Kesaniemi YA, Aro A. Plasma concentrations of the flavonoids hesperetin, naringenin and quercetin in human subjects following their habitual diets, and diets high or low in fruit and vegetables. *Eur J Clin Nutr* 2002;56:891-8.
211. Cao J, Zhang Y, Chen W, Zhao X. The relationship between fasting plasma concentrations of selected flavonoids and their ordinary dietary intake. *Br J Nutr*;103:249-55.
212. Panagiotakos DB, Tzima N, Pitsavos C, et al. 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* 2005;2:208-15.
213. Sampson L, Rimm E, Hollman PC, de Vries JH, Katan MB. Flavonol and flavone intakes in US health professionals. *J Am Diet Assoc* 2002;102:1414-20.
214. Floegel A, Chung SJ, von Ruesten A, et al. Antioxidant intake from diet and supplements and elevated serum C-reactive protein and plasma homocysteine concentrations in US adults: a cross-sectional study. *Public Health Nutr*:1-10.
215. Lagiou P, Samoli E, Lagiou A, et al. Intake of specific flavonoid classes and coronary heart disease--a case-control study in Greece. *Eur J Clin Nutr* 2004;58:1643-8.
216. Arai Y, Watanabe S, Kimira M, Shimoi K, Mochizuki R, Kinae N. Dietary intakes of flavonols, flavones and isoflavones by Japanese women and the inverse correlation between quercetin intake and plasma LDL cholesterol concentration. *J Nutr* 2000;130:2243-50.
217. Maron DJ, Lu GP, Cai NS, et al. Cholesterol-lowering effect of a theaflavin-enriched green tea extract: a randomized controlled trial. *Arch Intern Med* 2003;163:1448-53.

218. Unno T, Tago M, Suzuki Y, et al. Effect of tea catechins on postprandial plasma lipid responses in human subjects. *Br J Nutr* 2005;93:543-7.
219. Jung UJ, Kim HJ, Lee JS, et al. Naringin supplementation lowers plasma lipids and enhances erythrocyte antioxidant enzyme activities in hypercholesterolemic subjects. *Clin Nutr* 2003;22:561-8.
220. Zern TL, Wood RJ, Greene C, et al. Grape polyphenols exert a cardioprotective effect in pre- and postmenopausal women by lowering plasma lipids and reducing oxidative stress. *J Nutr* 2005;135:1911-7.
221. Jia L, Liu X, Bai YY, et al. Short-term effect of cocoa product consumption on lipid profile: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr*;92:218-25.
222. Mursu J, Voutilainen S, Nurmi T, et al. Dark chocolate consumption increases HDL cholesterol concentration and chocolate fatty acids may inhibit lipid peroxidation in healthy humans. *Free Radic Biol Med* 2004;37:1351-9.
223. Corti R, Flammer AJ, Hollenberg NK, Luscher TF. Cocoa and Cardiovascular Health. *Circulation* 2009;119:1433-41.
224. Egert S, Wolfram S, Bosy-Westphal A, et al. Daily Quercetin Supplementation Dose-Dependently Increases Plasma Quercetin Concentrations in Healthy Humans. *The Journal of Nutrition* 2008;138:1615-21.
225. Trautwein EA, Du Y, Meynen E, et al. Purified black tea theaflavins and theaflavins/catechin supplements did not affect serum lipids in healthy individuals with mildly to moderately elevated cholesterol concentrations. *Eur J Nutr*;49:27-35.
226. Song Y, Manson JE, Buring JE, Sesso HD, Liu S. Associations of dietary flavonoids with risk of type 2 diabetes, and markers of insulin resistance and systemic inflammation in women: a prospective study and cross-sectional analysis. *J Am Coll Nutr* 2005;24:376-84.
227. Nettleton JA, Harnack LJ, Scrafford CG, Mink PJ, Barraj LM, Jacobs DR, Jr. Dietary flavonoids and flavonoid-rich foods are not associated with risk of type 2 diabetes in postmenopausal women. *J Nutr* 2006;136:3039-45.
228. Knekt P, Kumpulainen J, Jarvinen R, et al. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr* 2002;76:560-8.
229. Nanri A, Mizoue T, Takahashi Y, et al. Soy product and isoflavone intakes are associated with a lower risk of type 2 diabetes in overweight Japanese women. *J Nutr*;140:580-6.
230. Grassi D, Lippi C, Necozione S, Desideri G, Ferri C. Short-term administration of dark chocolate is followed by a significant increase in insulin sensitivity and a decrease in blood pressure in healthy persons. *Am J Clin Nutr* 2005;81:611-4.

231. Grassi D, Necozione S, Lippi C, et al. Cocoa reduces blood pressure and insulin resistance and improves endothelium-dependent vasodilation in hypertensives. *Hypertension* 2005;46:398-405.
232. Muniyappa R, Hall G, Kolodziej TL, Karne RJ, Crandon SK, Quon MJ. Cocoa consumption for 2 wk enhances insulin-mediated vasodilatation without improving blood pressure or insulin resistance in essential hypertension. *Am J Clin Nutr* 2008;88:1685-96.
233. Mellor DD, Sathyapalan T, Kilpatrick ES, Beckett S, Atkin SL. High-cocoa polyphenol-rich chocolate improves HDL cholesterol in Type 2 diabetes patients. *Diabet Med*;27:1318-21.
234. Brown AL, Lane J, Coverly J, et al. Effects of dietary supplementation with the green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate on insulin resistance and associated metabolic risk factors: randomized controlled trial. *Br J Nutr* 2009;101:886-94.
235. Federico A, Trappoliere M, Tuccillo C, et al. A new silybin-vitamin E-phospholipid complex improves insulin resistance and liver damage in patients with non-alcoholic fatty liver disease: preliminary observations. *Gut* 2006;55:901-2.
236. Khoshbaten M, Aliasgarzadeh A, Masnadi K, et al. Grape seed extract to improve liver function in patients with nonalcoholic fatty liver change. *Saudi J Gastroenterol*;16:194-7.
237. Chiba H, Uehara M, Wu J, et al. Hesperidin, a citrus flavonoid, inhibits bone loss and decreases serum and hepatic lipids in ovariectomized mice. *J Nutr* 2003;133:1892-7.
238. Quesada H, del Bas JM, Pajuelo D, et al. Grape seed proanthocyanidins correct dyslipidemia associated with a high-fat diet in rats and repress genes controlling lipogenesis and VLDL assembling in liver. *Int J Obes (Lond)* 2009;33:1007-12.
239. Shrestha S, Ehlers SJ, Lee JY, Fernandez ML, Koo SI. Dietary green tea extract lowers plasma and hepatic triglycerides and decreases the expression of sterol regulatory element-binding protein-1c mRNA and its responsive genes in fructose-fed, ovariectomized rats. *J Nutr* 2009;139:640-5.
240. Lin CL, Huang HC, Lin JK. Theaflavins attenuate hepatic lipid accumulation through activating AMPK in human HepG2 cells. *J Lipid Res* 2007;48:2334-43.
241. Bose M, Lambert JD, Ju J, Reuhl KR, Shapses SA, Yang CS. The major green tea polyphenol, (-)-epigallocatechin-3-gallate, inhibits obesity, metabolic syndrome, and fatty liver disease in high-fat-fed mice. *J Nutr* 2008;138:1677-83.
242. Zang M, Xu S, Maitland-Toolan KA, et al. Polyphenols stimulate AMP-activated protein kinase, lower lipids, and inhibit accelerated atherosclerosis in diabetic LDL receptor-deficient mice. *Diabetes* 2006;55:2180-91.

243. Lin CL, Lin JK. Epigallocatechin gallate (EGCG) attenuates high glucose-induced insulin signaling blockade in human hepG2 hepatoma cells. *Mol Nutr Food Res* 2008;52:930-9.
244. Desch S, Schmidt J, Kobler D, et al. Effect of cocoa products on blood pressure: systematic review and meta-analysis. *Am J Hypertens*;23:97-103.
245. Allen RR, Carson L, Kwik-Urbe C, Evans EM, Erdman JW, Jr. Daily consumption of a dark chocolate containing flavanols and added sterol esters affects cardiovascular risk factors in a normotensive population with elevated cholesterol. *J Nutr* 2008;138:725-31.
246. Taubert D, Roesen R, Lehmann C, Jung N, Schomig E. Effects of low habitual cocoa intake on blood pressure and bioactive nitric oxide: a randomized controlled trial. *JAMA* 2007;298:49-60.
247. Edwards RL, Lyon T, Litwin SE, Rabovsky A, Symons JD, Jalili T. Quercetin reduces blood pressure in hypertensive subjects. *J Nutr* 2007;137:2405-11.
248. Taubert D, Roesen R, Schomig E. Effect of cocoa and tea intake on blood pressure: a meta-analysis. *Arch Intern Med* 2007;167:626-34.
249. Steptoe A, Gibson EL, Vuononvirta R, et al. The effects of chronic tea intake on platelet activation and inflammation: a double-blind placebo controlled trial. *Atherosclerosis* 2007;193:277-82.
250. Derdemezis CS, Filippatos TD, Mikhailidis DP, Elisaf MS. Review article: effects of plant sterols and stanols beyond low-density lipoprotein cholesterol lowering. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*;15:120-34.
251. Cavalcante JL, Lima JA, Redheuil A, Al-Mallah MH. Aortic stiffness current understanding and future directions. *J Am Coll Cardiol*;57:1511-22.
252. Toto-Moukouo JJ, Achimastos A, Asmar RG, Hugues CJ, Safar ME. Pulse wave velocity in patients with obesity and hypertension. *Am Heart J* 1986;112:136-40.
253. Ounis-Skali N, Bentley-Lewis R, Mitchell GF, Solomon S, Seely EW. Central aortic pulsatile hemodynamics in obese premenopausal women. *J Am Soc Hypertens* 2007;1:341-6.
254. Sutton-Tyrrell K, Newman A, Simonsick EM, et al. Aortic stiffness is associated with visceral adiposity in older adults enrolled in the study of health, aging, and body composition. *Hypertension* 2001;38:429-33.
255. Zebekakis PE, Nawrot T, Thijs L, et al. Obesity is associated with increased arterial stiffness from adolescence until old age. *J Hypertens* 2005;23:1839-46.

256. Joly L, Perret-Guillaume C, Kearney-Schwartz A, et al. Pulse wave velocity assessment by external noninvasive devices and phase-contrast magnetic resonance imaging in the obese. *Hypertension* 2009;54:421-6.
257. Rider OJ, Tayal U, Francis JM, et al. The effect of obesity and weight loss on aortic pulse wave velocity as assessed by magnetic resonance imaging. *Obesity (Silver Spring)*;18:2311-6.
258. Bluher M. The distinction of metabolically 'healthy' from 'unhealthy' obese individuals. *Curr Opin Lipidol*;21:38-43.
259. Shenouda SM, Vita JA. Effects of Flavonoid-Containing Beverages and EGCG on Endothelial Function. *J Am Coll Nutr* 2007;26:366S-72.
260. Tilg H, Moschen AR. Role of adiponectin and PBEF/visfatin as regulators of inflammation: involvement in obesity-associated diseases. *Clin Sci (Lond)* 2008;114:275-88.
261. Revollo JR, Korner A, Mills KF, et al. Nampt/PBEF/Visfatin regulates insulin secretion in beta cells as a systemic NAD biosynthetic enzyme. *Cell Metab* 2007;6:363-75.
262. Skop V, Kontrova K, Zidek V, et al. Autocrine effects of visfatin on hepatocyte sensitivity to insulin action. *Physiol Res*;59:615-8.
263. Lopez-Bermejo A, Chico-Julia B, Fernandez-Balsells M, et al. Serum visfatin increases with progressive beta-cell deterioration. *Diabetes* 2006;55:2871-5.
264. Haider DG, Schaller G, Kapiotis S, Maier C, Luger A, Wolzt M. The release of the adipocytokine visfatin is regulated by glucose and insulin. *Diabetologia* 2006;49:1909-14.
265. Chen MP, Chung FM, Chang DM, et al. Elevated plasma level of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:295-9.
266. Dogru T, Sonmez A, Tasci I, et al. Plasma visfatin levels in young male patients with uncomplicated and newly diagnosed hypertension. *J Hum Hypertens* 2007;21:173-5.
267. Adali E, Yildizhan R, Kulusari A, et al. Increased visfatin and leptin in pregnancies complicated by pre-eclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2009;22:873-9.
268. Seo JA, Jang ES, Kim BG, et al. Plasma visfatin levels are positively associated with circulating interleukin-6 in apparently healthy Korean women. *Diabetes Res Clin Pract* 2008;79:108-11.
269. Arner P, Langin D. The role of neutral lipases in human adipose tissue lipolysis. *Curr Opin Lipidol* 2007;18:246-50.

270. Wang P, Mariman E, Renes J, Keijer J. The secretory function of adipocytes in the physiology of white adipose tissue. *J Cell Physiol* 2008;216:3-13.
271. Himms-Hagen J. Physiological roles of the leptin endocrine system: differences between mice and humans. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1999;36:575-655.
272. Ryden M, Arner P. Tumour necrosis factor-alpha in human adipose tissue -- from signalling mechanisms to clinical implications. *J Intern Med* 2007;262:431-8.
273. Fischer-Posovszky P, Newell FS, Wabitsch M, Tornqvist HE. Human SGBS cells - a unique tool for studies of human fat cell biology. *Obes Facts* 2008;1:184-9.
274. Grove KA, Lambert JD. Laboratory, epidemiological, and human intervention studies show that tea (*Camellia sinensis*) may be useful in the prevention of obesity. *J Nutr*;140:446-53.
275. Chuang CC, Martinez K, Xie G, et al. Quercetin is equally or more effective than resveratrol in attenuating tumor necrosis factor- α -mediated inflammation and insulin resistance in primary human adipocytes. *Am J Clin Nutr*;92:1511-21.
276. Cho SY, Park PJ, Shin HJ, et al. (-)-Catechin suppresses expression of Kruppel-like factor 7 and increases expression and secretion of adiponectin protein in 3T3-L1 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;292:E1166-72.
277. Harmon AW, Harp JB. Differential effects of flavonoids on 3T3-L1 adipogenesis and lipolysis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;280:C807-13.
278. Wang B, Jenkins JR, Trayhurn P. Expression and secretion of inflammation-related adipokines by human adipocytes differentiated in culture: integrated response to TNF- α . *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005;288:E731-40.
279. Tsuda T, Ueno Y, Aoki H, et al. Anthocyanin enhances adipocytokine secretion and adipocyte-specific gene expression in isolated rat adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;316:149-57.
280. Wein S, Behm N, Petersen RK, Kristiansen K, Wolfram S. Quercetin enhances adiponectin secretion by a PPAR- γ independent mechanism. *Eur J Pharm Sci*;41:16-22.
281. Decorde K, Teissedre PL, Sutra T, Ventura E, Cristol JP, Rouanet JM. Chardonnay grape seed procyanidin extract supplementation prevents high-fat diet-induced obesity in hamsters by improving adipokine imbalance and oxidative stress markers. *Mol Nutr Food Res* 2009;53:659-66.
282. Scott EN, Gescher AJ, Steward WP, Brown K. Development of dietary phytochemical chemopreventive agents: biomarkers and choice of dose for early clinical trials. *Cancer Prev Res (Phila)* 2009;2:525-30.

