



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗΣ ΑΕΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΚΑΙΡΟΠΟΙΗΣΗ ΓΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟΦΟΙΤΩΝ ΑΕΙ (ΠΕΓΑ)

«Οι σύγχρονες τεχνικές βιο-ανάλυσης στην υγεία, τη γεωργία, το περιβάλλον και τη διατροφή»

Ενότητα 3

Σύγχρονες τεχνικές βιο-ανάλυσης στη διατροφή

Υπο-ενότητα

Γενετικό προφίλ-μεταβολισμός και διατροφή

Τίτλος: Μεθοδολογία και τεχνικές μελέτης της
επίδρασης της διατροφής στο μεταβολισμό: Από το
κύτταρο στον άνθρωπο

Τζώρτζης Νομικός, Επίκουρος Καθηγητής

Εισαγωγή

Σκοπός της συγκεκριμένης διάλεξης είναι να παρουσιάσει τις βασικές μεθοδολογικές προσεγγίσεις στη σύγχρονη διατροφική έρευνα. Δεν έχει σκοπό να περιγράψει βιοαναλυτικές τεχνικές – άλλωστε αυτές έχουν περιγραφεί στις άλλες ενότητες – αλλά να εξηγήσει πως αυτές χρησιμοποιούνται σήμερα για να απαντήσουν σε διατροφικά ερωτήματα. Η διάλεξη φιλοδοξεί να μην παραμείνει στα στενά πλαίσια των εργαστηριακών πειραματικών τεχνικών αλλά να περιγράψει γενικότερα τα μεθοδολογικά εργαλεία που έχει σήμερα ο ερευνητής της διατροφής, να τονίσει τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα τους, ξεκινώντας από το κύτταρο και καταλήγοντας στον άνθρωπο. Στα επιμέρους κεφάλαια θα παραθέτονται δημοσιεύσεις από τη σύγχρονη βιβλιογραφία και το αντίστοιχο link της περίληψης. Οι δημοσιεύσεις αυτές είναι χαρακτηριστικά παραδείγματα των μεθοδολογικών προσεγγίσεων που αναφέρονται στα κεφάλαια. Δεν απαιτείται το διάβασμα τους αλλά δίνονται για να γίνει πιο κατανοητό το περιεχόμενο των κεφαλαίων.

Τι είναι διατροφική έρευνα

Η διατροφική έρευνα μελετάει τη σχέση της διατροφής με την υγεία και τη νόσο. Απώτερος στόχος της είναι, μέσα από τη κατανόηση της παραπάνω σχέσης, να προτείνει τροποποιήσεις στις διατροφικές συνήθειες, με σκοπό τη βελτίωση της υγείας του πληθυσμού, τη πρόληψη εμφάνισης παθήσεων, την επιβράδυνση της εξέλιξη τους ή ακόμα και της θεραπείας τους, κατά το δυνατόν.

Η πολυπλοκότητα της σύγχρονης διατροφικής έρευνας

Τα μέχρι τώρα αποτελέσματα της έρευνας στο χώρο της διατροφής, έχουν συνεισφέρει σημαντικά στην αύξηση του προσδόκιμου επιβίωσης τόσο στο Δυτικό όσο και στον αναπτυσσόμενο κόσμο. Τα αποτελέσματα αυτά στηρίζονται κυρίως σε επιδημιολογικές και κλινικές μελέτες. Ωστόσο, τα νέα εργαλεία βιοανάλυσης σε συνδυασμό με την ανάπτυξη της βιοπληροφορικής και της τεχνολογίας δίνουν νέες δυνατότητες εξέλιξης της διατροφικής έρευνας στην πλέον σύγχρονη μορφή της που είναι η μοριακή διατροφική έρευνα. Η μοριακή διατροφική έρευνα μελετά την επίδραση που έχουν τα συστατικά της διατροφής στην φυσιολογία του ανθρώπινου οργανισμού, ως σύνολο, σε μοριακό και κυτταρικό επίπεδο και εκμεταλλεύεται, πέρα από τις κλασσικές τεχνικές, τις σύγχρονες τεχνικές –omics. Η μοριακή διατροφή θα επιτρέψει, στο μέλλον, την διευκρίνιση των φυσιολογικών και παθολογικών μηχανισμών στους οποίους εμπλέκονται τα συστατικά της διατροφής, τη βελτιστοποίηση και εξατομίκευση των διατροφικών οδηγιών καθώς και την ανάπτυξη νέων διατροφικών προϊόντων και συμπληρωμάτων που θα προάγουν την υγεία.

Ωστόσο, η ανάπτυξη της βιοανάλυσης σε συνδυασμό με τη συσσώρευση της διατροφικής γνώσης έχει αναδείξει και την τεράστια πολυπλοκότητα που υποβόσκει κάτω από τη σχέση Διατροφής – Φυσιολογίας. Ενδεικτικά της πολυπλοκότητας είναι τα παρακάτω δεδομένα:

- Τρώμε ~ 1,5 Kg τροφής και πίνουμε ~ 2L υγρά καθημερινά
- Γνωρίζουμε περίπου 40 θρεπτικά συστατικά
- Υπάρχουν χιλιάδες γνωστά συστατικά των τροφίμων με άγνωστες βιολογικές δράσεις
- Υπάρχουν χιλιάδες άγνωστα συστατικά των τροφίμων με άγνωστες βιολογικές δράσεις

- Περίπου 10^{13} κύτταρα έχει το σώμα μας και περίπου 10^{14} βακτήρια ο γαστρεντερικός σωλήνας
- Η αλληλεπίδραση των διατροφικών συστατικών με τα βακτήρια της εντερικής μικροχλωρίδας είναι εν πολλοίς άγνωστη
- Περίπου 25,000 γονίδια στα ανθρώπινα κύτταρα
- Το ανθρώπινο γονιδίωμα περιλαμβάνει 3 δις ζεύξη βάσεων
- Υπάρχουν μερικά εκατομμύρια μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (Single nucleotide polymorphisms-SNPs)
- Μεγάλη επιγενετική ποικιλομορφία μεταξύ των ανθρώπων λόγω περιβαλλοντικών αλληλεπιδράσεων
- Περίπου 100.000 μετάγραφα RNA
- Περίπου 100.000 πρωτεΐνες
- Περίπου 1000 λιπίδια και χιλιάδες υδατοδιαλυτοί μεταβολίτες

Η πολυπλοκότητα ενισχύεται από το γεγονός ότι ένα μόνο διατροφικό συστατικό μπορεί να έχει πλειοτροπικές δράσεις και να επηρεάζει περισσότερους του ενός παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς. Για παράδειγμα ένα πολυακόρεστο λιπαρό οξύ μπορεί να είναι:

- Προσδέτης για μεταγραφικούς παράγοντες
- Να ενσωματώνεται στα φωσφολιποειδή των μεμβρανών και να επηρεάζει τη ρευστότητα τους
- Να αποτελεί υπόστρωμα για παραγωγή ελευθέρων ριζών
- Να αποτελεί πρόδρομη ένωση για παραγωγή βιοδραστικών μεταβολιτών όπως είναι τα εικοσανοειδή, οι ρεσολβίνες και οι προτεκτίνες
- Να αποτελεί ενεργειακό υπόστρωμα της β-οξείδωσης
- Να ακυλώνει και να τροποποιεί τη δράση των πρωτεϊνών

Είναι λοιπόν φανερό από τα παραπάνω ότι η παραδοσιακή προσέγγιση της διατροφικής έρευνας που εστιάζοταν στη μελέτη μίας δράσης ενός διατροφικού συστατικού είναι ξεπερασμένη δεδομένου ότι αυτή η δράση πρέπει να αξιολογείται στα πλαίσια και των άλλων δράσεων του συστατικού αυτού και με τη λογική ότι αυτό το συστατικό συνυπάρχει με άλλα συστατικά που μπορεί να έχουν αντίθετες ή και συνεργιστικές δράσεις. Η σύγχρονη διατροφική έρευνα εστιάζεται περισσότερο στην ολιστική προσέγγιση χρησιμοποιώντας σύγχρονες και παραδοσιακές προσεγγίσεις οι οποίες και θα περιγραφούν παρακάτω.

Πειραματικές προσεγγίσεις διατροφικής έρευνας

In vitro μοντέλα

Τα in vitro μοντέλα βασίζονται στη χρησιμοποίηση βιοχημικών δοκιμασιών, ενζύμων, κυτταρικών οργανιδίων, κυτταρικών καλλιιεργειών ή απομονωμένων ιστών για την εκτίμηση της επίδρασης διατροφικών συστατικών στην φυσιολογία σε κυτταρικό ή ιστικό επίπεδο.

Βιοχημικές δοκιμασίες

Οι βιοχημικές δοκιμασίες ελέγχουν την ικανότητα διατροφικών συστατικών ή εκχυλισμάτων να επηρεάζουν βιοχημικές αντιδράσεις που γίνονται in vitro και

προσομοιάζουν αυτές που συμβαίνουν φυσιολογικά μέσα σε έναν οργανισμό. Τέτοιες αντιδράσεις είναι για παράδειγμα η αναστολή κάποιας ενζυμικής αντίδρασης, η δέσμευση ελευθέρων ριζών, η αναστολή της οξειδωσης λιποπρωτεϊνών κ.α. Αυτές οι δοκιμασίες γίνονται με χημικά αντιδραστήρια, ή απομονωμένα ένζυμα και άλλα βιομοριακά συμπλέγματα. Τα τελευταία χρόνια μελετώνται ιδιαίτερα εκτεταμένα οι ανασταλτικές ιδιότητες συστατικών τροφίμων έναντι ενζύμων του πεπτικού σωλήνα (αμυλάση, α-γλυκοζιδάση, παγκρεατική λιπάση) σε μία προσπάθεια να εκτιμηθεί η ικανότητα τροφίμων και εκχυλισμάτων να μειώνουν τις μεταγευματική απορρόφηση γλυκόζης και λιπιδίων

Antioxidant and lipoxigenase inhibitory activities of pumpkin seed extracts.
Xanthopoulou MN, Nomikos T, Fragopoulou E et al.
Food Research International, Volume 42, Issues 5–6, June–July 2009, Pages 641-646.

Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation in vitro by ginger extracts.
Gunathilake KD, Rupasinghe HP.
J Med Food. 2014 Apr;17(4):424-31.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24404979>

Flaxseed (Linum usitatissimum L.) extract as well as (+)-secoisolariciresinol diglucoside and its mammalian derivatives are potent inhibitors of α -amylase activity.
Hano C, Renouard S, Molinié R, Corbin C, Barakzoy E, Doussot J, Lamblin F, Lainé E.
Bioorg Med Chem Lett. 2013 May 15;23(10):3007-12
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23583514>

Είναι προφανές ότι τέτοιες δοκιμασίες διεξάγονται εύκολα στο εργαστήριο, είναι φθηνές και επιτρέπουν τον έλεγχο πολλών εκχυλισμάτων σε μικρό χρονικό διάστημα και άρα μπορούν να οδηγήσουν στην εκλογή του κατάλληλου εκχυλίσματος για περαιτέρω πειραματισμό. Από την άλλη όμως στα αποτελέσματα αυτών των δοκιμασιών δεν πρέπει να αποδίδεται βιολογική σημασία και να παρερμηνεύονται αφού οι δομές των βιοδραστικών μορίων των εκχυλισμάτων, οι ιονικές μορφές τους και η πραγματική τους συγκέντρωση μέσα στον οργανισμό μπορεί να είναι τελείως διαφορετικά.

Κυτταρικά οργανίδια

Συγκεκριμένα κυτταρικά οργανίδια, όπως τα μιτοχόνδρια, ο πυρήνας ή τα μικροσώματα μπορούν χρησιμοποιηθούν σε διατροφικές μελέτες αν είναι εκ των προτέρων γνωστό ότι τα συστατικά του διατροφικού ερεθίσματος μπορούν να μεταβολίζονται από ένζυμα ή να δρουν σε βιομόρια του συγκεκριμένου οργανιδίου. Για παράδειγμα τα μικροσώματα, τα οποία αποτελούνται από ριβοσώματα και θραύσματα ενδοπλασματικού δικτύου χρησιμοποιούνται για τη μελέτη του μεταβολισμού φυτοχημικών ουσιών από τις ισομορφές του κυτοχρώματος P450. Αν και αυτές οι μελέτες είναι πιο κοντά στη φυσιολογία σε σχέση με τις βιοχημικές δοκιμασίες και πάλι δεν πρέπει να υποδεικνύουν in vivo βιολογικές δράσεις αν αυτές δεν επιβεβαιώνονται και με πραγματικά in vivo πειράματα.

In vitro biotransformation of flavonoids by rat liver microsomes.
Nielsen SE, Breinholt V, Justesen U, Cornett C, Dragsted LO.
Xenobiotica. 1998 Apr;28(4):389-401.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9604302>

Mangifera indica L. extract (Vimang) inhibits Fe²⁺-citrate-induced lipoperoxidation in isolated rat liver mitochondria.

Pardo Andreu G, Delgado R, Velho J, Inada NM, Curti C, Vercesi AE.
Pharmacol Res. 2005 May;51(5):427-35
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15749457>

Ζύμες

Η ζύμη αποτελεί ένα καλό μοντέλο ευκαρυωτικού κυττάρου με γνωστό γονιδίωμα και καλά καθορισμένες μεταβολικές πορείες. Συνεπώς εύκολα μπορεί να μελετηθεί η επίδραση κάποιου διατροφικού συστατικού σε αυτές. Επίσης, οι συνθήκες καλλιέργειας της είναι εύκολα ελεγχόμενες και η απόκριση της σε ερεθίσματα εύκολα μετρήσιμη. Για παράδειγμα, οι ζύμες έχουν χρησιμοποιηθεί ως ένα *in vitro* μοντέλο για τον έλεγχο της οιστρογονικότητας φυτοχημικών και συστατικών τροφίμων.

Estrogens in the daily diet: in vitro analysis indicates that estrogenic activity is omnipresent in foodstuff and infant formula.
Behr M, Oehlmann J, Wagner M.
Food Chem Toxicol. 2011 Oct;49(10):2681-8
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21801783>

Κυτταρικές σειρές

Οι κυτταρικές σειρές αποτελούν έναν αθάνατο, ομοιογενή κυτταρικό πληθυσμό από κύτταρα που έχουν ληφθεί απευθείας από ιστό με νεοπλασία ή από καλλιιεργούμενα κύτταρα που έχουν μετασηματιστεί και συμπεριφέρονται ως καρκινικά. Το μεγάλο τους πειραματικό πλεονέκτημα είναι ότι μπορούν να διατηρηθούν για μεγάλα χρονικά διαστήματα στο εργαστήριο και να πολλαπλασιαστούν όποτε υπάρχει ανάγκη πειράματος. Αποτελούν συνεπώς μία συνεχώς ανανεούμενη κυτταρική πλατφόρμα με την οποία μπορούν να γίνουν πειράματα ελέγχου της δράσης πλήθους εκχυλισμάτων και διατροφικών συστατικών με σχετικά απλό και γρήγορο τρόπο. Ωστόσο απαιτείται και προσοχή γιατί κυτταρικές σειρές που βρίσκονται σε καλλιέργεια για μεγάλα χρονικά διαστήματα, μέσω αποδιαφοροποίησης και γενετικών αλλοιώσεων, μπορούν να αλλάξουν τελείως κυτταρικό φαινότυπο, ο οποίος μπορεί να διαφέρει τελείως με τον αρχικό.

Chemopreventive properties of raisins originating from Greece in colon cancer cells.
Kountouri AM, Gioxari A, Karvela E, Kaliora AC, Karvelas M, Karathanos VT.
Food Funct. 2013 Feb 26;4(3):366-72.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23211994>

Active extracts of black tea (Camellia Sinensis) induce apoptosis of PC-3 prostate cancer cells via mitochondrial dysfunction.
Sun S, Pan S, Miao A, Ling C, Pang S, Tang J, Chen D, Zhao C.
Oncol Rep. 2013 Aug;30(2):763-72.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23715786>

Μία κυτταρική σειρά που χρησιμοποιείται ευρύτατα σε διατροφικές μελέτες είναι τα Caco-2 κύτταρα τα οποία έχουν προέλθει από ανθρώπινο ορθοκολικό καρκίνο αλλά διατηρούν πολλά από τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των φυσιολογικών ανθρώπινων εντεροκυττάρων. Τα Caco-2 χρησιμοποιούνται σε μελέτες εκτίμησης της απορρόφησης συστατικών της τροφής από το εντερικό επιθήλιο αλλά και σε μελέτες εκτίμησης της αντιφλεγμονώδους και αντικαρκινικής δράσης, στο επίπεδο του εντέρου, εκχυλισμάτων και συστατικών των τροφίμων.

Trotter PJ, Storch J.

Fatty acid uptake and metabolism in a human intestinal cell line (Caco-2): comparison of apical and basolateral incubation.

J Lipid Res. 1991 Feb;32(2):293-304.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Trotter+PJ+AND+1991>

Tyrosol, the major olive oil biophenol, protects against oxidized-LDL-induced injury in Caco-2 cells.

Giovannini C, Straface E, Modesti D, Coni E, Cantafora A, De Vincenzi M, Malorni W, Masella R.

J Nutr. 1999 Jul;129(7):1269-77.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10395586>

Πρωτογενείς καλλιέργειες

Τα κύτταρα των πρωτογενών καλλιεργείων προέρχονται από ανθρώπινους ή ζωικούς ιστούς, απομονώνονται από αυτούς με κατάλληλες διεργασίες και είτε καλλιεργούνται άμεσα είτε κρυσταλλοποιούνται και καλλιεργούνται μετά από ένα χρονικό διάστημα στη συντήρηση. Για παράδειγμα ένα καλό μοντέλο ενδοθηλιακών κυττάρων είναι τα HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) τα οποία μπορούν να απομονωθούν από τις φλέβες ομφάλιων λώρων αμέσως μετά τη γέννα. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα έχουν χρησιμοποιηθεί κατά κόρον για τη μελέτη των αντιαθηρογενετικών ιδιοτήτων συστατικών της διατροφής μας.

Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells.

Leikert JF, Räthel TR, Wohlfart P, Cheynier V, Vollmar AM, Dirsch VM.

Circulation. 2002 Sep 24;106(13):1614-7.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12270851>

Ένα άλλο εύχρηστο μοντέλο πρωτογενούς καλλιέργειας είναι τα περιφερικά μονοκύτταρα αίματος (peripheral blood mononuclear cells, PBMC), τα οποία απομονώνονται εύκολα από το αίμα του ανθρώπου και έχουν χρησιμοποιηθεί ευρύτατα ως κυτταρική πλατφόρμα για τον έλεγχο της δραστηριότητας διατροφικών συστατικών και εκχυλισμάτων.

Select human milk oligosaccharides directly modulate peripheral blood mononuclear cells isolated from 10-d-old pigs.

Comstock SS, Wang M, Hester SN, Li M, Donovan SM.

Br J Nutr. 2014 Mar 14;111(5):819-28.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24131853>

Τέλος, τα αιμοπετάλια ή το πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια, αποτελούν ένα ακόμα εύκολο, ex vivo, μοντέλο για να ελεγχθεί η αντιαιμοπεταλιακή και γενικότερα η αντιθρομβωτική δράση συστατικών τροφίμων

Lipid fractions with aggregatory and antiaggregatory activity toward platelets in fresh and fried cod (Gadus morhua): correlation with platelet-activating factor and atherogenesis.

Panayiotou A, Samartzis D, Nomikos T, Fragopoulou E, Karantonis HC, Demopoulos CA, Zabetakis I.

J Agric Food Chem. 2000 Dec;48(12):6372-9.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11312810>

Το μεγάλο πρόβλημα με τις πρωτογενείς καλλιέργειες είναι ότι απαιτείται η συχνή λήψη ιστού για την απομόνωση των κυττάρων γεγονός το οποίο δυσχεραίνει τη χρήση των

καλλιιεργειών αυτών σε πειράματα ρουτίνας ή ελέγχου μεγάλου αριθμού δειγμάτων. Επίσης, ίδιοι τύποι ιστών από διαφορετικούς ανθρώπους μπορούν να δώσουν κύτταρα με μικρές διαφορές στα φαινοτυπικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά γεγονός που δυσχεραίνει την επαναληψιμότητα των πειραμάτων. Από την άλλη, το γεγονός ότι δεν έχουν υποστεί καρκινικές μεταλλαγές, όπως τα κύτταρα των κυτταρικών σειρών, τα καθιστούν πιο κοντά σε ένα φυσιολογικό κύτταρο.

Μικτές καλλιέργειες

Είναι γεγονός ότι η απόκριση ενός κυττάρου σε πραγματικές *in vivo* συνθήκες εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις παρακρινικές αλληλεπιδράσεις του με άλλα κύτταρα. Για παράδειγμα, οι μηχανισμοί αθηροσκλήρωσης εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την επικοινωνία ενδοθηλιακών κυττάρων και λευκοκυττάρων. Είναι, συνεπώς, ιδιαίτερα σημαντικό να βρεθεί κατά πόσο διαφορετικές διατροφικές συνθήκες ή διαφορετικά διατροφικά συστατικά μπορούν να επηρεάσουν την επικοινωνία των κυττάρων. Τέτοιου είδους μελέτες μπορούν να γίνουν σε συστήματα μικτών καλλιιεργειών, όπου, σε διακριτούς χώρους, που επικοινωνούν όμως μεταξύ τους μέσω πορώδους μεμβράνης, μπορούν να καλλιιεργηθούν ταυτόχρονα διαφορετικά είδη κυττάρων. Η ενεργοποίηση του ενός είδους από κάποιο διατροφικό παράγοντα μπορεί να επάγει την έκκριση διαλυτών μεσολαβητών, οι οποίοι θα ενεργοποιήσουν το δεύτερο είδος κυττάρου. Με αυτό τον τρόπο μελετάται η δυνατότητα συστατικών της διατροφής να παρεμβαίνουν στις διακυτταρικές επικοινωνίες.

Docosahexaenoic acid decreases pro-inflammatory mediators in an in vitro murine adipocyte macrophage co-culture model.

De Boer AA, Monk JM, Robinson LE.

PLoS One. 2014 Jan 20;9(1):e85037.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24465472>

Τομές οργάνων ή μοσχεύματα ιστών

Δεδομένου ότι η *in vivo* απόκριση ενός κυττάρου σε ένα διατροφικό παράγοντα εξαρτάται από το μικροπεριβάλλον του κυττάρου, το οποίο δεν λαμβάνεται υπόψη στις απλές κυτταρικές καλλιέργειες, οι ερευνητές προσπαθούν να προσομοιάσουν αυτό το περιβάλλον κάνοντας πειράματα με λεπτές τομές οργάνων ή μοσχεύματα ιστών. Οι τομές οργάνων αντιπροσωπεύουν ένα πολυκυτταρικό, τρισδιάστατο *in vitro* μοντέλο που έχει παρόμοια χαρακτηριστικά με αυτά των πραγματικών ιστών και στο οποίο οι δράσεις των διατροφικών συστατικών έχουν μεγαλύτερη φυσιολογική σημασία. Τέτοιου είδους μοντέλα έχουν χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της τοξικότητας χημικών, το μελέτη του μεταβολισμού ξενοβιοτικών κ.α.

Modulation of carcinogen-metabolising cytochromes P450 in human liver by the chemopreventive phytochemical phenethyl isothiocyanate, a constituent of cruciferous vegetables.

Konsue N, Ioannides C.

Toxicology. 2010 Feb 9;268(3):184-90.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20025923>

Διατροφικές επιδράσεις στα *in vitro* μοντέλα

Οι διατροφικές επιδράσεις που μπορούν να προκληθούν στα *in vitro* μοντέλα είναι προφανώς περιορισμένες εξαιτίας της φύσης των πειραμάτων. Θα πρέπει να επιλέγεται ο κατάλληλος συνδυασμός διατροφικού συστατικού και *in vitro* μοντέλου ώστε η μελέτη να έχει φυσιολογική σημασία. Οι διατροφικοί διεγέρτες στα *in vitro* μοντέλα μπορεί να είναι:

- Μακροθρεπτικά, μικροθρεπτικά και μικροσυστατικά της διατροφής ή μεταβολίτες αυτών

Biological activity of acetylated phenolic compounds.

Fragoroulou E, Nomikos T, Karantonis HC, Apostolakis C, Pliakis E, Samiotaki M, Panayotou G, Antonopoulou S.

J Agric Food Chem. 2007 Jan 10;55(1):80-9.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17199317>

- Καλλιέργειες κυττάρων εμπλουτισμένες με κάποιο θρεπτικό συστατικό ή εκχύλισμα

Effects of zinc on epithelial barrier properties and viability in a human and a porcine intestinal cell culture model.

Lodemann U, Einspanier R, Scharfen F, Martens H, Bondzio A.

Toxicol In Vitro. 2013 Mar;27(2):834-43.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23274768>

- Καλλιέργειες κυττάρων με έλλειψη κάποιου θρεπτικού συστατικού

Selenium is critical for cancer-signaling gene expression but not cell proliferation in human colon Caco-2 cells.

Zeng H, Botnen JH.

Biofactors. 2007;31(3-4):155-64.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18997278>

- Βιολογικά δείγματα πειραματόζων ή ανθρώπων πριν και μετά από μία διατροφική παρέμβαση. Τα πειράματα αυτά γίνονται με σκοπό να μελετηθεί αν η τροποποίηση της βιοχημικής σύστασης ενός βιολογικού δείγματος (π.χ. ορός, πλάσμα, λιποπρωτείνες) μετά από μία διατροφική παρέμβαση έχει επίδραση σε κάποιο *in vitro* μοντέλο.

The unsaponifiable fraction of virgin olive oil in chylomicrons from men improves the balance between vasoprotective and prothrombotic factors released by endothelial cells.

Perona JS, Martínez-González J, Sanchez-Domínguez JM, Badimon L, Ruiz-Gutierrez V.

J Nutr. 2004 Dec;134(12):3284-9.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15570026>

Πλεονεκτήματα *in vitro* μοντέλων

- Μελέτη της λειτουργίας του κυττάρου χωρίς τις διακυμάνσεις που υπάρχουν σε έναν οργανισμό
- Άμεση πρόσβαση στα κύτταρα
- Χρήση ραδιενεργών υποστρωμάτων
- Αντικαθιστούν και μειώνουν τον αριθμό των πειραματόζων (ηθικοί λόγοι)
- Ελεγχόμενες συνθήκες (pH, ώσμωση, θερμοκρασία, O₂, CO₂)
- Δυνατότητα ελέγχου μεγάλου αριθμού δειγμάτων σχετικά φθηνά και σε μικρό χρονικό διάστημα

- Χρήσιμο μοντέλο για τη μελέτη των βιοχημικών μηχανισμών με τους οποίους δρουν τα συστατικά της τροφής

Μειονεκτήματα in vitro μοντέλων

- Περίπτωση μόλυνσεων.
- Πιθανότητα διαφοροποίησης των κυττάρων.
- Τα αποτελέσματα των in vitro πειραμάτων δεν μεταφράζονται απαραίτητα στις in vivo συνθήκες δεδομένου ότι σε αυτές το κύτταρο δεν είναι απομονωμένο αλλά μέρος ενός αυστηρά αυτορυθμιζόμενου πολυκυτταρικού ιστού.
- Τα συστατικά της τροφής υφίστανται τροποποιήσεις κατά τη διέλευση τους από το στομάχι, έντερο, ήπαρ με αποτέλεσμα να μην είναι πολλές φορές γνωστή η πραγματική ενεργή μορφή με την οποία έρχονται σε επαφή με τα κύτταρα.
- Είναι δύσκολο να βρεθούν οι πραγματικές, in vivo, ενεργές συγκεντρώσεις με τις οποίες αλληλεπιδρούν τα διατροφικά συστατικά με τα κύτταρα και πολλές φορές χρησιμοποιούνται στα in vitro μοντέλα συγκεντρώσεις που καμία σχέση δεν έχουν με την πραγματικότητα.

Ζωικά μοντέλα

Ως ζωικό μοντέλο νοείται κάθε ζωντανός οργανισμός στον οποίο μπορεί να μελετηθεί:

- Η φυσιολογική βιολογία ή συμπεριφορά
- Μια αυθόρμητη ή επαγόμενη παθολογική διαδικασία

Ιδανικά, τα φαινόμενα αυτά πρέπει να προσομοιάζουν τα αντίστοιχα φαινόμενα στον άνθρωπο.

Τα ζωικά μοντέλα έρχονται να καλύψουν το κενό μεταξύ των εγγενών αδυναμιών που έχουν τα in vitro μοντέλα με τις προφανείς δυσκολίες που έχουν τα πειράματα σε ανθρώπους. Ιστορικά τα ζωικά μοντέλα ήταν πολύ χρήσιμα στη διατροφική έρευνα αφού πάρα πολλές παθήσεις που οφείλονταν σε έλλειψη διατροφικών συστατικών άλλα και πάρα πολλά πειράματα βιοδιαθεσιμότητας έγιναν σε πειραματόζωα. Τα ζωικά μοντέλα επιτρεπουν την εκτίμηση της αξίας μία διατροφικής παρέμβασης γρήγορα και καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό αν αυτή η ιδέα αξίζει να μελετηθεί και στον άνθρωπο. Τα ζωικά μοντέλα είναι επίσης χρήσιμα για την εύρεση των ανώτατων ανεκτών ορίων (upper tolerance levels) πρόσληψης ενός συστατικού αλλά και σε πειράματα τοξικότητας

Είδη ζωικών μοντέλων

Τα ζωικά μοντέλα μπορούν να ομαδοποιηθούν στις παρακάτω κατηγορίες:

- **Φυσιολογικά** ως προς τις βιολογικές τους λειτουργίες πειραματόζωα. Τα πειραματόζωα αυτά είναι ζώα που δεν έχουν υποστεί γενετικές τροποποιήσεις.

Beneficial effects of dietary copper supplementation on serum lipids and antioxidant defenses in rats. Galhardi CM, Diniz YS, Rodrigues HG, Faine LA, Burneiko RC, Ribas BO, Novelli EL. Ann Nutr Metab. 2005 Sep-Oct;49(5):283-8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16088091>

- **Γενετικά τροποποιημένα ζώα.** Τα διαγονιδιακά ζώα παράγονται από την εσκεμμένη εισαγωγή ξένου DNA στο γονιδίωμα ενός ζώου δέκτη. Το ξένο DNA πρέπει στη συνέχεια

να μεταδοθεί διαμέσου των γεννητικών κυττάρων προκειμένου κάθε κύτταρο να περιέχει το ίδιο τροποποιημένο γενετικό υλικό και να μπορεί να κληρονομηθεί στις επόμενες γενεές. Η εισαγωγή DNA μπορεί να οδηγήσει στην υπερ- ή υπο-έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων ή στην έκφραση νέων γονιδίων για το είδος του ζώου. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν ζωικά μοντέλα αυθόρμητης εκδήλωσης παθολογικού φαινομένου. Στα πρότυπα αυτά εκδηλώνεται αυθόρμητα παθολογικό φαινόμενο λόγω γενετικά επιλεγμένων μεταλλάξεων που οδηγούν σε εκδήλωση παθολογικού φαινότυπου ανεξαρτήτως διαίτας. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι τα NOD ποντίκια που εκδηλώνουν διαβήτη τύπου I, τα ob/ob ποντίκια που εξαιτίας αδυναμίας παραγωγής λεπτίνης εκδηλώνουν φαινότυπο διαβήτη τύπου II, τα Watanabe Heritable Hyperlipidemic κουνέλια (WHHL) που είναι μοντέλο που προσομοιάζει την οικογενή υπερχοληστερολαιμία κ.α. Είναι προφανές ότι τέτοιου είδους ζωικά πρότυπα είναι ιδιαίτερα χρήσιμα για τη μελέτη, τόσο της δυνατότητας πρόληψης ή επιβράδυνσης της εμφάνισης των παραπάνω παθήσεων από διατροφικές παρεμβάσεις, όσο και για τη μελέτη της προστατευτικής δράσης διατροφικών συστατικών έναντι των επιπλοκών που μπορούν να παρατηρηθούν από αυτές τις παθήσεις. Από την άλλη πρέπει να τονιστεί ότι η γονιδιακή επίδραση της παθογένεια της νόσου είναι πολύ ισχυρή σε αυτά τα πειραματόζωα, ισχυρότερη από την επίδραση που έχουν παράγοντες του τρόπου ζωής (καθιστική ζωή, κάπνισμα, κακή διατροφή, παχυσαρκία) οι οποίοι έχουν ηπιότερη και μακροχρόνια επίδραση στη παθογένεια της νόσου. Αυτό σημαίνει ότι διατροφικές παρεμβάσεις που μπορεί να είναι ανεπιτυχείς σε τόσο ισχυρά μοντέλα νόσου μπορεί τελικά να έχουν αποτελεσματικότητα στις πραγματικές συνθήκες επώασης των χρόνιων παθήσεων στους ανθρώπους.

Epigallocatechin gallate delays the onset of type 1 diabetes in spontaneous non-obese diabetic mice.
Fu Z, Zhen W, Yuskavage J, Liu D.
Br J Nutr. 2011 Apr;105(8):1218-25.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21144096>

Genistein and daidzein prevent diabetes onset by elevating insulin level and altering hepatic gluconeogenic and lipogenic enzyme activities in non-obese diabetic (NOD) mice.
Choi MS, Jung UJ, Yeo J, Kim MJ, Lee MK.
Diabetes Metab Res Rev. 2008 Jan-Feb;24(1):74-81.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17932873>

Anti-obesity effect of a standardised ethanol extract from Curcuma longa L. fermented with Aspergillus oryzae in ob/ob mice and primary mouse adipocytes.
Ho JN, Jang JY, Yoon HG, Kim Y, Kim S, Jun W, Lee J.
J Sci Food Agric. 2012 Jul;92(9):1833-40.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22278718>

Effect of rapeseed oil-derived plant sterol and stanol esters on atherosclerosis parameters in cholesterol-challenged heterozygous Watanabe heritable hyperlipidaemic rabbits.
Schrøder M, Fricke C, Pilegaard K, Poulsen M, Wester I, Lütjohann D, Mortensen A.
Br J Nutr. 2009 Dec;102(12):1740-51.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19772679>

- Ζωικά μοντέλα επαγόμενης εκδήλωσης παθολογικού φαινομένου. Στις περιπτώσεις αυτές εξωγενείς παράγοντες (υποσιτισμός, φάρμακα, χειρουργικές παρεμβάσεις) επάγουν το επιθυμητό κλινικό φαινόμενο. Για παράδειγμα, διαίτες υψηλού θερμιδικού περιεχομένου επάγουν παχυσαρκία, διαίτες υψηλού περιεχομένου σε χοληστερόλη επάγουν αθηροσκλήρωση στα κουνέλια, χειρουργικές παρεμβάσεις

ισχαιμίας/επαναιμάτωσης επάγουν οξειδωτικό στρες, ενώ διάφορα μεταλλαξιγόνα χημικά επάγουν νεοπλασίες.

Orally Administered Lycopene Attenuates Diethylnitrosamine-Induced Hepatocarcinogenesis in Rats by Modulating Nrf-2/HO-1 and Akt/mTOR Pathways.
Sahin K, Orhan C, Tuzcu M, Sahin N, Ali S, Bahcecioglu IH, Guler O, Ozercan I, Ilhan N, Kucuk O.
Nutr Cancer. 2014;66(4):590-8.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24660901>

Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids attenuate hepatic ischemia/reperfusion injury in rats by modulating toll-like receptor recruitment into lipid rafts.
Kim K, Jung N, Lee K, Choi J, Kim S, Jun J, Kim E, Kim D.
Clin Nutr. 2013 Oct;32(5):855-62.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23395256>

- Αρνητικά ζωικά μοντέλα. Ένα αρνητικό ζωικό πρότυπο χρησιμοποιείται για την μελέτη ενός βιολογικού φαινομένου που εμφανίζεται στους ανθρώπους, το οποίο όμως δεν εμφανίζεται στο συγκεκριμένο ζωικό πρότυπο. Με αυτό το τρόπο επιχειρείται η διευκρίνιση μηχανισμών μέσω της εξήγησης του γιατί δεν εμφανίζεται το φαινόμενο στο συγκεκριμένο ζωικό πρότυπο. Για παράδειγμα, ποντίκια που έχουν κατασταλαμένο στο συγκεκριμένο ζωικό πρότυπο. Για παράδειγμα, ποντίκια που έχουν κατασταλαμένο το γονίδιο S100A έχουν μειωμένη ικανότητα ανάπτυξης όγκων και μεταστάσεων.

A high-fat meal does not activate blood coagulation factor VII in minipigs.
Olsen AK, Larsen LF, Bladbjerg EM, Hansen AK, Jespersen J, Marckmann P.
Blood Coagul Fibrinolysis. 2001 Mar;12(2):117-22.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11302473>

- Ορφανά μοντέλα. Είναι ζωικά μοντέλα στα οποία αναγνωρίζεται και χαρακτηρίζεται για πρώτη φορά μία πάθηση, η οποία εμφανίζεται στη συνέχεια στους ανθρώπους. Παραδείγματα τέτοιων μοντέλων η σπογγώδης εγκεφαλοπάθεια στα βοοειδή, ο ιός προϊούσας πνευμονίας στα πρόβατα και ο ιός της λευχαιμίας στα αιλουροειδή.

Exposure to low dietary copper or low copper coupled with high dietary manganese for one year does not alter brain prion protein characteristics in the mature cow.
Legleiter LR, Liu HC, Lloyd KE, Hansen SL, Fry RS, Spears JW.
J Anim Sci. 2007 Nov;85(11):2895-903.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17644786>

Όσον αφορά τα είδη των ζώων που έχουν χρησιμοποιηθεί σε διατροφικές έρευνες συνοπτικά φαίνονται παρακάτω:

- Ποντικός
- Αρουραίος
- Ινδικό χοιρίδιο
- Κόνικλος
- Χοίρος
- Σκύλος
- Γάτα
- Πρωτεύοντα

Ιδανικά τα ζωικά μοντέλα πρέπει να προσομοιάζουν τη φυσιολογία του ανθρώπινου οργανισμού αλλά και τους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς των προς μελέτη παθήσεων. Ωστόσο, τις περισσότερες φορές αυτό δεν είναι δυνατόν και θα πρέπει να λαμβάνονται

πολύ σοβαρά υπόψη αυτές οι διαφορές στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων και την εξαγωγή συμπερασμάτων για τον άνθρωπο. Χαρακτηριστικές διαφορές μεταξύ πειραματοζώων και ανθρώπου είναι οι παρακάτω:

Πειραματόζωο	Άνθρωπος
<i>Τρωκτικά, κοτόπουλα</i> Τρώνε τσιμπολογώντας	Τρώει συγκεκριμένα γεύματα
<i>Αρουραίοι, χοίροι, κοτόπουλα, σκύλοι</i> Ασήμαντη απώλεια Na και Fe με τον ιδρώτα και την έμμηνο ρύση, αντίστοιχα	Σημαντική απώλεια Na και Fe με τον ιδρώτα ή την έμμηνο ρύση, αντίστοιχα
Ο λιπώδης ιστός είναι ο ιστός που γίνεται κυρίως η βιοσύνθεση λιπαρών οξέων στους χοίρους και στα μηρυκαστικά, ενώ τόσο ο λιπώδης ιστός όσο και το ήπαρ είναι εξίσου σημαντικά για τη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων στους αρουραίους και στους κόνικλους.	Η βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων γίνεται κυρίως στο ήπαρ.
<i>Μηρυκαστικά ζώα</i> Η ταχύτητα γλυκονογένεσης αυξάνεται μεταγευματικά	Η ταχύτητα γλυκονογένεσης μειώνεται μεταγευματικά και ενεργοποιείται σε έλλειψη ενέργειας στον άνθρωπο και στα μη μηρυκαστικά ζώα
<i>Τρωκτικά, κόνικλοι</i> Κοπροφάγοι	Δεν είναι κοπροφάγος
<i>Χοίροι, αρουραίοι</i> Χρησιμοποιούν εξίσου αποτελεσματικά το D και το L ισομερές της θρυπτοφάνης	Δεν χρησιμοποιεί το D ισομερές της θρυπτοφάνης
<i>Κοτόπουλα, τρωκτικά</i> Αποκρίνονται γρήγορα σε διατροφικές ελλείψεις βιταμινών και ιχνοστοιχείων	Αποκρίνεται αργά σε διατροφικές ελλείψεις βιταμινών και ιχνοστοιχείων
Σημαντικές διαφοροποιήσεις στη βιοδιαθεσιμότητα και μεταβολισμό βιταμινών και ιχνοστοιχείων, ειδικά του β-καροτενίου	
Τα φυτοφάγα ζώα έχουν αυξημένη εντερική μικροχλωρίδα για να επεξεργαστούν το πλούσιο σε φυτικές ίνες φυτικό υλικό. Τόσο οι πρωτεΐνες όσο και το λίπος τροποποιούνται από την εντερική μικροχλωρίδα, ενώ η ζύμωση των υδατανθράκων από την εντερική μικροχλωρίδα οδηγεί σε αυξημένη απορρόφηση μικρής αλύσου λιπαρών οξέων. Τα σαρκοφάγα ζώα (σκύλοι, γάτες) έχουν μικρότερη γαστρεντερικό σωλήνα και μικρότερη ζύμωση από τα βακτήρια. Οι άνθρωποι, όπως και οι χοίροι εμφανίζουν μια ενδιάμεση κατάσταση.	

Κριτήρια επιλογής ζωικών μοντέλων

Η απόφαση για την χρησιμοποίηση ενός ζωικού μοντέλου σε μεγάλο βαθμό θα πρέπει να κατευθύνεται από τις αρχές της βιοηθικής και της μη δυνατότητας καλών εναλλακτικών *in vitro* μοντέλων. Απο κει και πέρα τα βασικά κριτήρια επιλογής ενός ζωικού μοντέλου στη διατροφική έρευνα είναι :

- Τα αποτελέσματα της μελέτης να μπορούν να μεταφερθούν στον άνθρωπο
- Τα μελετώμενα μεταβολικά μονοπάτια να έχουν ομοιότητες ως προς τον άνθρωπο
- Τα ζωικά πρότυπα να υποστηρίζονται από εκτεταμένη βιβλιογραφία
- Τα πειραματόζωα να είναι εύκολα προσβάσιμα σε άλλους ερευνητές
- Τα ζωικά μοντέλα να είναι χαρακτηρισμένα γενετικά και μικροβιακά
- Τα πειραματόζωα να έχουν ικανοποιητικό μέγεθος για την παραλαβή επαρκούς βιολογικού δείγματος
- Να υπάρχει εμπειρία στον χειρισμό τους
- Χαμηλό κόστος

- Καλές αναπαραγωγικές επιδόσεις
- Διαθέσιμα kits για την μέτρηση των πρωτεϊνικών ισομορφών του κάθε είδους

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που έχουν, κοινά στις διατροφικές μελέτες, ζωικά είδη

Είδος (βάρους)	Ποντικός (20-40 g)	Αρουραίος (150-300 g)	Χοίρος (60 kg)	Ινδικό χοιρίδιο	Άνθρωπος (60-80 kg)
Πεπτικό σύστημα	Παμφάγο	Παμφάγο	Παμφάγο	Φυτοφάγο	Παμφάγο
Διαιτητικές απαιτήσεις					
Λίπος (g)	0,3	0,5	64		129
Λόγος PUFA/S	1,85	1,85	1,85	1,85	0,4
Λίπος (% E)	11	11	10	11	44
Πρωτεΐνη (% E)	18	18	25	18	14
CHO (%E)	70	70	65	70	42
Όγκος αίματος στην αιμοληψία (ml)	0,13	0,8-1,3	250	0,5	450
Τρόπος αιμοληψίας	Εύκολος	Εύκολος	Δύσκολος	Εύκολος	Εύκολος
Διατήρηση	Φθηνή/εύκολη	Φθηνή/εύκολη	Σχετικά φθηνή/σχετικά εύκολη	Φθηνή/εύκολη	
Διαθεσιμότητα kits	Διαθέσιμα	Διαθέσιμα	Όχι για όλα τα βιομόρια	Όχι για όλα τα βιομόρια	Διαθέσιμα

Διατροφικές επιδράσεις στα ζωικά μοντέλα

Χορήγηση διαίτας πλούσιας σε κάποιο θρεπτικό συστατικό

Στην τυποποιημένη, εμπορικά διαθέσιμη τροφή προστίθεται ένα συγκεκριμένο θρεπτικό συστατικό ή συστατικά σε μεγάλες ποσότητες. Η ποσότητα των θρεπτικών συστατικών πρέπει να υπολογίζεται ανά κιλό σωματικού βάρους. Σε πολλές περιπτώσεις τα ευεργετικά αποτελέσματα που εμφανίζονται σε τέτοιου είδους πειράματα δεν μπορούν σε καμία περίπτωση να μεταφραστούν στον άνθρωπο αφού η ανά κιλό σωματικού βάρους πρόσληψη του συγκεκριμένου συστατικού δεν μπορεί να επιτευχθεί με τη συνήθη διαίτα στον άνθρωπο.

Oral supplementation with L-aspartate and L-glutamate inhibits atherogenesis and fatty liver disease in cholesterol-fed rabbit.
 Yanni AE, Agrogiannis G, Nomikos T, Fragopoulou E, Pantopoulou A, Antonopoulou S, Perrea D. *Amino Acids*. 2010 May;38(5):1323-31.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19701712>

Effects of alpha-tocopherol and astaxanthin on LDL oxidation and atherosclerosis in WHHL rabbits.
 Jacobsson LS, Yuan XM, Ziedén B, Olsson AG. *Atherosclerosis*. 2004 Apr;173(2):231-7.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15064096>

Χορήγηση διαίτας φτωχής σε κάποιο θρεπτικό συστατικό

Οι μελέτες αυτές έχουν αναδείξει το φυσιολογικό ρόλο πολλών θρεπτικών συστατικών και τη σημασία της έλλειψης τους στη παθογένεια πολλών παθήσεων όπως φαίνεται και από το παρακάτω πίνακα.

Διατροφικό συστατικό σε έλλειψη	Πειραματόζωο	Πάθηση
Θειαμίνη	Κοτόπουλα	Beri-beri
Ασκορβικό οξύ	Ινδικά χοιρίδια	Σκορβούτο
Νιασίνη, θρυπτοφάνη	Σκύλος, αρουραίος, χοίρος	Πελλάγρα
Ασβέστιο, φώσφορο, βιταμίνη D	Σκύλος, αρουραίος, κοτόπουλο	Ραχίτιδα
Βιταμίνη E	Αρουραίος	Υπογονιμότητα, μυϊκή δυστροφία
Φυλλικό ή/και βιταμίνη B12	Πίθηκος, αρουραίος, κοτόπουλο	Αναιμία

A combined deficiency of vitamins E and C causes severe central nervous system damage in guinea pigs.

Burk RF, Christensen JM, Maguire MJ, Austin LM, Whetsell WO Jr, May JM, Hill KE, Ebner FF.

J Nutr. 2006 Jun;136(6):1576-81.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16702324>

Χορήγηση εκχυλισμάτων

Τα εκχυλίσματα θα πρέπει με κάποιο τρόπο να ενσωματώνονται στη τροφή του πειραματόζωου. Θα πρέπει επίσης να ελέγχεται η πιθανότητα αλλοίωσης (π.χ οξείδωσης) των συστατικών του εκχυλίσματος κατά τη διάρκεια παραμονής τους στη τροφή αφού πιθανές αλλοιώσεις θα οδηγούσαν σε αντίθετα από τα επιδιωκόμενα αποτελέσματα. Ένας τρόπος προφύλαξης είναι η καθημερινή ανανέωση της τροφής και η παρασκευή της σε αποστειρωμένες και ανοξικές συνθήκες.

Atherosclerosis regression study in rabbits upon olive pomace polar lipid extract administration.

Tsantila N, Karantonis HC, Perrea DN, Theocharis SE, Iliopoulos DG, Iatrou C, Antonopoulou S, Demopoulos CA.

Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2010 Dec;20(10):740-7.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19748252>

Χορήγηση τροφίμων

Είναι προφανές ότι στην περίπτωση των πειραματόζωων δεν μπορούν να χορηγηθούν ολόκληρα τρόφιμα, τουλάχιστον στην μορφή που καταναλώνονται από τους ανθρώπους. Ωστόσο, εδώδιμα έλαια, γάλα, λυοφιλοποιημένες σκόνες π.χ. από γαλακτοκομικά προϊόντα μπορούν να ενσωματωθούν στη τροφή και να ληφθούν από το πειραματόζωο.

Effects of flaxseed oil on serum lipids and atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits.

Lee P, Prasad K.

J Cardiovasc Pharmacol Ther. 2003 Sep;8(3):227-35.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14506548>

Effect of commercial or depurinated milk on rat liver growth-regulatory kinases, nuclear factor-kappa B, and endonuclease in experimental hyperuricemia: Comparison with allopurinol therapy.

Kocic G, Pavlovic R, Nikolic G, Veljkovic A, Panseri S, Chiesa LM, Andjelkovic T, Jevtovic-Stoimenov T, Sokolovic D, Cvetkovic T, Stojanovic S, Kocic H, Nikolic R.
J Dairy Sci. 2014 May 15. pii: S0022-0302(14)00369-5.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24835972>

Διαιτητικά πρότυπα

Στην περίπτωση αυτή εξετάζεται η δράση διαιτητικών προτύπων που διαφοροποιούνται στη σύσταση της δίαιτας σε μακροθρεπτικά και μικροθρεπτικά συστατικά σε κλινικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά του πειραματόζωου. Για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η διαφορετική φυσιολογία του ζώου σε σχέση με τον άνθρωπο.

A ketogenic diet impairs energy and glucose homeostasis by the attenuation of hypothalamic leptin signaling and hepatic insulin signaling in a rat model of non-obese type 2 diabetes.
Park S, Kim da S, Kang S, *Daily JW 3rd.*
Exp Biol Med (Maywood). 2011 Feb;236(2):194-204.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21321316>

Πλεονεκτήματα ζωικών μοντέλων

- Τα πειράματα διαρκούν μικρότερο χρονικό διάστημα σε σχέση με τα αντίστοιχα πειράματα σε ανθρώπους
- Εύκολη φύλαξη σε μεγάλους αριθμούς κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες
- Μικρή γενετική μεταβλητότητα → μεγάλη επαναληψιμότητα των πειραμάτων που δεν επηρεάζονται από το γενετικό υπόβαθρο. Η μικρή μεταβλητότητα επιτυγχάνεται μετά από 20 τουλάχιστον γενεές διασταυρώσεων μεταξύ αδελφών (inbred animals)
- Πειράματα με μεγάλο αριθμό πειραματόζωων οδηγούν σε αυξημένη στατιστική δύναμη της μελέτης και στην διαπίστωση μικρών βιολογικών διαφορών.
- Τα πειραματόζωα έχουν μικρό κύκλο ζωής άρα είναι καλά μοντέλα για τη μελέτη της διατροφής στα στάδια της ζωής αλλά και την επίδραση της στη γήρανση. Βέβαια πρέπει να τονιστεί ότι ο κύκλος ζωής των πειραματόζωων έχει σημαντικές διαφορές από αυτόν στον άνθρωπο.
- Πρόσβαση σε όλα τα επίπεδα βιολογικών δειγμάτων (κύτταρα, ιστοί, βιολογικά υγρά). Γονιδιακές μελέτες σε πλήθος ιστών.
- Μεγαλύτερη συμμόρφωση στη διατροφική παρέμβαση και καλύτερη εκτίμηση της συμμόρφωσης στη διατροφική παρέμβαση

Μειονεκτήματα ζωικών μοντέλων

- Διαφοροποιήσεις από τη φυσιολογία του ανθρώπου
- Είναι απαραίτητο τα αποτελέσματα των διατροφικών παρεμβάσεων στα πειραματόζωα να επιβεβαιώνονται και στον άνθρωπο.
- Τα πειραματόζωα δεν μπορούν να εκφράσουν το τι αισθάνονται όταν προκαλείται μία διατροφική έλλειψη ή τοξικότητα
- Στα πειραματόζωα πολλές φορές χρησιμοποιούνται πολύ υψηλές συγκεντρώσεις θρεπτικών συστατικών που δεν μπορούν να εφαρμοστούν στον άνθρωπο
- Τα πειραματόζωα διαφοροποιούνται σημαντικά ως προς τη λειτουργία του γαστρεντερικού τους συστήματος τόσο μεταξύ τους όσο και μεταξύ αυτών και του

ανθρώπου. Συνεπώς, υπάρχουν σημαντικές διαφοροποιήσεις τόσο στην απορρόφηση διαφορετικών συστατικών όσο και στην ποσότητα και ποιότητα των απορροφούμενων ειδών.

Μελέτες σε ανθρώπους

Ανεξαρτήτως, των αποτελεσμάτων που θα προκύψουν από τα *in vitro* ή ζωικά πειραματικά πρότυπα, οι διατροφικές μελέτες στους ανθρώπους είναι αυτές που τελικά θα οδηγήσουν στην σύνταξη διατροφικών οδηγιών και πάνω τους θα βασιστούν διατροφικές συστάσεις και πολιτικές δημόσιας υγείας. Συνήθως αποτελούν το τελικό στάδιο πειραματισμού και μόνο όταν τα δεδομένα σε κύτταρα και πειραματόζωα είναι υποσχόμενα. Ωστόσο, πολλές φορές συμβαίνει και το αντίθετο, δηλαδή μία παρατηρούμενη συσχέτιση μεταξύ ενός διατροφικού παράγοντα και ενός βιολογικού αποτελέσματος να αποτελέσει το έναυσμα για την πιο ενδελεχή μελέτη αυτή της σχέσης και την ανάδειξη μηχανισμών σε κυτταρικό επίπεδο.

Μεθοδολογικές προσεγγίσεις

Οι μεθοδολογικές προσεγγίσεις, που εφαρμόζονται στη διατροφική έρευνα στους ανθρώπους, μπορούν να διαχωριστούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες:

- α) Επιδημιολογία της διατροφής
- β) Διατροφικές παρεμβάσεις

Επιδημιολογία της διατροφής

Σκοπός της διατροφικής επιδημιολογίας είναι να μελετήσει το ρόλο της διατροφής ως αίτιο αλλά και ως προληπτικό παράγοντα στην εμφάνιση ασθενειών με απώτερο σκοπό την σύνταξη νέων αλλά και τη βελτιστοποίηση ήδη υπάρχοντων διατροφικών οδηγιών. Τα αποτελέσματα της διατροφικής επιδημιολογίας επιτρέπουν την ανάπτυξη υποθέσεων για μηχανιστικές μελέτες που μπορούν να διεξαχθούν είτε σε κύτταρα είτε σε πειραματόζωα. Οι διατροφικές επιδημιολογικές μελέτες μπορούν να έχουν έναν από τους παρακάτω σχεδιασμούς:

Συγχρονικές μελέτες

Οι συγχρονικές μελέτες (*cross-sectional studies*) αποτιμούν τις διατροφικές συνήθειες ενός πληθυσμού καθώς και άλλα χαρακτηριστικά αυτού (βιοχημικά, ανθρωπομετρικά, κλινικά) μία δεδομένη χρονική στιγμή. Στη συνέχεια επιχειρούν να βρουν συσχετίσεις μεταξύ των διατροφικών και των υπολοίπων χαρακτηριστικών του πληθυσμού.

Το βασικό μειονεκτήματα των συγχρονικών, παρατηρητικών μελετών είναι ότι δεν εξετάζουν αλληλουχίες γεγονότων συνεπώς δεν μπορούν να οδηγήσουν σε αιτιολογικές σχέσεις αλλά μόνο σε συσχετίσεις. Ουσιαστικά αποτελούν μία φωτογραφική απεικόνιση του πληθυσμού σε συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Επίσης, οι παρατηρούμενες σχέσεις μεταξύ διατροφικής πρόσληψης και βιοχημικών/κλινικών δεικτών μπορεί να επηρεάζεται από πολλούς συγχυτικούς παράγοντες, κάποιοι από τους οποίους δεν εκτιμώνται στις επιδημιολογικές μελέτες. Επίσης, δεν μπορούν να προκύψουν συσχετίσεις μεταξύ διατροφικών συνθηκών και ασθενειών που έχουν μεγάλο λανθάνων χρόνο εμφάνισης ενώ πολλές φορές ασθενείς με συγκεκριμένη πάθηση (π.χ. καρδιαγγειακά, διαβήτης, υπέρταση) έχουν βελτιώσει, εξαιτίας αυτής της πάθησης, τις διατροφικές τους συνήθειες με

αποτέλεσμα πολλές φορές να προκύπτει το παράδοξο αποτέλεσμα οι ασθενείς να έχουν καλύτερες διατροφικές συνήθειες από τους υγιείς.

Ωστόσο, οι συγχρονικές μελέτες είναι σχετικά φθηνές, μπορούν να γίνουν σε μεγάλους πληθυσμούς και οι εθελοντές είναι δεκτικοί στο να συμμετέχουν αφού δεν απαιτείται μεγάλος κόπος και χρόνος από αυτούς για τη συμμετοχή τους στη μελέτη. Αυτές οι μελέτες είναι επίσης χρήσιμες για την αποτύπωση διαφορών στις διατροφικές συμπεριφορές του πληθυσμού ανά το χρόνο.

Dietary habits of Greek adults and serum total selenium concentration: the ATTICA study.
Letsiou S, Nomikos T, Panagiotakos D, Pergantis SA, Fragopoulou E, Antonopoulou S, Pitsavos C, Stefanadis C.

Eur J Nutr. 2010 Dec;49(8):465-72.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20386916>

Dietary fiber intake and cardiometabolic risks among US adults, NHANES 1999-2010.

Grooms KN, Ommerborn MJ, Pham DQ, Djoussé L, Clark CR.

Am J Med. 2013 Dec;126(12):1059-67.e1-4.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24135514>

Προοπτικές μελέτες

Οι προοπτικές μελέτες μπορούν να διαχωριστούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες, στις μελέτες κοορτής και στις μελέτες ασθενών-μαρτύρων

Στις μελέτες κοορτής (cohort studies) παρακολουθείται ο πληθυσμός για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Αυτό σημαίνει ότι λαμβάνεται βιολογικό δείγμα, γίνονται ανθρωπομετρήσεις και εκτίμηση διατροφικών συνηθειών ανά 2-5 χρόνια σε μία πάροδο 10-20 έως και 50 ετών. Το μεγάλο πλεονέκτημα των προοπτικών μελετών είναι ότι μπορεί να εκτιμηθεί ή έκβαση πολλών χαρακτηριστικών των εθελοντών με τη πάροδο του χρόνου.

Τα προβλήματα που μπορούν να εμφανιστούν στις μελέτες κοορτής είναι η δυσκολία διατήρησης επαφής με μεγάλο αριθμό εθελοντών, πολλοί εθελοντές εγκαταλείπουν την μελέτη με την πάροδο του χρόνου, ενώ μπορεί να μην υπάρχει στατιστική επάρκεια συμβαμάτων για πιο σπάνιες παθήσεις. Επίσης, είναι πολυέξοδες, χρονοβόρες και δεν είναι καλές για την εκτίμηση της διατροφής σε παθήσεις που απαιτούν μεγάλο χρόνο για να εκδηλώσουν παθολογικό φαινότυπο.

Dietary patterns and 5-year incidence of cardiovascular disease: a multivariate analysis of the ATTICA study.

Panagiotakos D, Pitsavos C, Chrysohoou C, Palliou K, Lentzas I, Skoumas I, Stefanadis C.

Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2009 May;19(4):253-63.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18722096>

Στις μελέτες ασθενών μαρτύρων (case-control studies), οι οποίες είναι αναδρομικές μελέτες, επιλέγεται ένα χαρακτηριστικό των εθελοντών, στο οποίο θέλουμε να μελετήσουμε την επίδραση της διατροφής και επιλέγονται εθελοντές βάση αυτού του χαρακτηριστικού. Η ομάδα των ασθενών περιλαμβάνει εθελοντές που έχουν το χαρακτηριστικό αυτό (π.χ. έχουν υποστεί έμφραγμα του μυοκαρδίου) και η ομάδα μαρτύρων περιλαμβάνει εθελοντές με παρόμοια χαρακτηριστικά με αυτά των εθελοντών της ομάδας ασθενών (ηλικία, αναλογία αντρών/γυναικών, αναλογία καπνιστών, BMI κ.α.) εκτός από το προς διερεύνηση χαρακτηριστικό (έμφραγμα μυοκαρδίου). Και στις δύο ομάδες γίνεται διατροφική εκτίμηση και αναζητούνται διαφορές μεταξύ των ομάδων που

μπορούν να οδηγήσουν σε συμπεράσματα σε σχέση με τη επίδραση της διατροφής στο συγκεκριμένο χαρακτηριστικό. Στην προκειμένη περίπτωση αυτό που είναι σημαντικό είναι να εκτιμηθούν οι διατροφικές συνήθειες του παρελθόντος και όχι οι τρέχουσες αφού το κλινικό χαρακτηριστικό έχει ήδη εγκατασταθεί και αυτό είναι αποτέλεσμα διατροφικών συμπεριφορών πολλών ετών πίσω. Για αυτό η διατροφική εκτίμηση στις συγκεκριμένες μελέτες γίνεται με την βοήθεια ερωτηματολογίων συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων. Αυτό βέβαια αποτελεί και ένα σημαντικό μειονέκτημα αυτών των μελετών αφού η ανάκληση διατροφικών συμπεριφορών αρκετά χρόνια πίσω δεν είναι εύκολη υπόθεση. Ένα σημαντικό σφάλμα που ελογχεύει σε αυτές τις μελέτες είναι και το ότι οι ασθενείς, λόγω μεγαλύτερης ευαισθητοποίησης, εξαιτίας του προβλήματος τους, ενδιαφέρονται και επεξεργάζονται καλύτερα τη μνήμη τους σε αυτό το θέμα σε σχέση με τους μάρτυρες που είναι πιο αδιάφοροι και άρα δεν μπαίνουν στο κόπο να ανακαλέσουν τις διατροφικές τους συνήθειες στο παρελθόν όσο το δυνατόν πιο πιστά.

Adherence to the Mediterranean Diet is Associated With Lower Likelihood of Breast Cancer: A Case-Control Study.

Mourouti N, Kontogianni MD, Papavagelis C, Plytzanopoulou P, Vassilakou T, Malamos N, Linos A, Panagiotakos DB.

Nutr Cancer. 2014 May 21:1-8.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24847911>

Διατροφικές παρεμβάσεις

Οι διατροφικές παρεμβάσεις σε ανθρώπους και η μελέτη της επίδρασης τους σε συγκεκριμένα χαρακτηριστικά αυτών αποτελούν την ισχυρότερη απόδειξη της αποτελεσματικότητας ή μη των διατροφικών συνηθειών στην υγεία και τη πρόληψη.

Οι μελέτες θα πρέπει να είναι ελεγχόμενες, δηλαδή θα πρέπει να περιέχουν ομάδα ελέγχου (control) στην οποία θα χορηγείται εικονικό σκεύασμα (placebo) ή διατροφή/τρόφιμο/εκχύλισμα το οποίο θα έχει παρόμοια χαρακτηριστικά με αυτό της ομάδας παρέμβασης αλλά θα είναι αδρανές όσον αφορά την επίδραση του στη μελετώμενη παράμετρο. Επίσης, οι μελέτες θα πρέπει να είναι τυχαιοποιημένες, δηλαδή ο επιλεγόμενος πληθυσμός της μελέτης να διαμοιράζεται με τυχαίο τρόπο, είτε στην ομάδα ελέγχου, είτε στην ομάδα παρέμβασης. Τέλος, οι παρεμβάσεις πρέπει να είναι τυφλές, δηλαδή δεν θα πρέπει να γνωρίζει ούτε ο εθελοντής τι λαμβάνει αλλά ούτε και αναλυτής τι δείγμα αναλύει (double-blinded). Βέβαια, σε πολλές διατροφικές παρεμβάσεις δεν είναι δυνατόν να μην γνωρίζει ο εθελοντής το είδος της παρέμβασης, οπότε τότε θα πρέπει τουλάχιστον ο αναλυτής να μην γνωρίζει τη προέλευση των δειγμάτων. Οι double-blinded, randomized, placebo-controlled trials αποτελούν το τελευταίο, ανώτατο στάδιο πειραματισμού στους ανθρώπους και οι περισσότερες διατροφικές συστάσεις λαμβάνουν πολύ σοβαρά υπόψη τους τα δεδομένα που προκύπτουν από αυτές. Όσον αφορά τους ισχυρισμούς υγείας ενός νέου τροφίμου, βιολειτουργικού τροφίμου ή συμπληρώματος, αυτοί γίνονται αποδεκτοί από την επιστημονική κοινότητα και τους δημόσιους φορείς υγείας μόνο όταν έχουν προκύψει από τυχαιοποιημένες κλινικές μελέτες ή διατροφικές παρεμβάσεις.

Effects of dietary supplementation with epigallocatechin-3-gallate on weight loss, energy homeostasis, cardiometabolic risk factors and liver function in obese women: randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial.

Mielgo-Ayuso J, Barrenechea L, Alcorta P, Larrarte E, Margareto J, Labayen I.

Br J Nutr. 2014 Apr 14;111(7):1263-71.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24299662>

Ένας εναλλακτικός τρόπος διατροφικής παρέμβασης είναι οι διασταυρούμενες μελέτες (cross-over studies) όπου οι μισοί εθελοντές της παρέμβασης ξεκινάνε με το εικονική παρέμβαση και οι άλλοι μισοί με την πειραματική παρέμβαση. Μετά το τέλος της παρέμβασης, ακολουθεί μία περίοδος wash out όπου οι εθελοντές επανέρχονται στην αρχική τους κατάσταση και στη συνέχεια όσοι εθελοντές έκαναν την εικονική παρέμβαση συνεχίζουν με την πειραματική και το αντίθετο. Με αυτό το σχεδιασμό, οι συγχυτικοί παράγοντες περιορίζονται στο ελάχιστο αφού ο κάθε άνθρωπος είναι control του εαυτού του.

Extra virgin olive oil phenols and markers of oxidation in Greek smokers: a randomized cross-over study.

Moschandreas J, Vissers MN, Wiseman S, van Putte KP, Kafatos A.

Eur J Clin Nutr. 2002 Oct;56(10):1024-9.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12373624>

Τέλος, μία ειδική κατηγορία διατροφικών παρεμβάσεων είναι οι μεταγευματικές μελέτες. Η μεταγευματική κατάσταση, δηλαδή η απόκριση του οργανισμού σε ένα γεύμα, αποτελεί πλέον σημαντικό προδιαθεσικό παράγοντα για πολλές παθήσεις και η εκτίμηση των διατροφικών παραγόντων που την επηρεάζουν αποτελεί σημαντικό κομμάτι της σύγχρονης διατροφικής έρευνας. Για παράδειγμα, οι μεταγευματικές καμπύλες γλυκόζης, τριγλυκεριδίων και ορμονών αποτελούν προδιαθεσικό παράγοντα για πολλές χρόνιες παθήσεις όπως τα καρδιαγγειακά νοσήματα. Μέρος, συνεπώς, των ποιοτικών χαρακτηριστικών ενός τροφίμου ή μίας δίαιτας είναι να βελτιστοποιεί τη μεταγευματική απόκριση, είτε άμεσα, είτε μακροπρόθεσμα. Στο πλαίσιο αυτό οι μεταγευματικές μελέτες μπορούν να διαχωριστούν σε άμεσες και μακροχρόνιες. Στις άμεσες μελέτες εξετάζεται η επίδραση που έχει ένα τρόφιμο ή ένα γεύμα στην μεταγευματική απόκριση άμεσα ενώ στις μακροχρόνιες εξετάζεται η επίδραση που έχει μία διατροφική παρέμβαση στην μεταγευματική απόκριση σε τυποποιημένα γεύματα ειδικά για μεταγευματικές μελέτες.

Mediterranean wild plants reduce postprandial platelet aggregation in patients with metabolic syndrome.

Fragopoulou E, Detopoulou P, Nomikos T, Pliakis E, Panagiotakos DB, Antonopoulou S.

Metabolism. 2012 Mar;61(3):325-34.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21944262>

Postprandial antioxidant effect of the Mediterranean diet supplemented with coenzyme Q10 in elderly men and women.

Yubero-Serrano EM, Delgado-Casado N, Delgado-Lista J, Perez-Martinez P, Tasset-Cuevas I, Santos-Gonzalez M, Caballero J, Garcia-Rios A, Marin C, Gutierrez-Mariscal FM, Fuentes F, Villalba JM, Tunez I, Perez-Jimenez F, Lopez-Miranda J.

Age (Dordr). 2011 Dec;33(4):579-90.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21170684>

Είδη πληθυσμών

- Γενικός πληθυσμός

Dietary sodium, added salt, and serum sodium associations with growth and depression in the U.S. general population.

Goldstein P, Leshem M.
Appetite. 2014 Aug;79:83-90.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2474721>

- Συγκεκριμένες κατηγορίες γενικού πληθυσμού ανάλογα τα δημογραφικά χαρακτηριστικά κα χαρακτηριστικά τρόπου ζωής (άντρες, γυναίκες, νέοι, ηλικιωμένοι, προ-μεταεμμηνοπαυσικές γυναίκες, καπνιστές, ασκούμενοι κτλ)

Dietary Intake of Fiber, Fruit, and Vegetables Decrease the Risk of Incident Kidney Stones in Women: A Women's Health Initiative (WHI) Report.
WHI Writing Group, Sorensen MD, Hsi RS, Chi T, Shara N, Wactawski-Wende J, Kahn AJ, Wang H, Hou L, Stoller ML.
J Urol. 2014 May 21. pii: S0022-5347(14)03618-0.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24859445>

- Συγκεκριμένες κατηγορίες γενικού πληθυσμού ανάλογα τα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά (νορμοβαρείς, υπέρβαροι, παχύσαρκοι, με κοιλιακή παχυσαρκία, κ.ο.κ.)

Total antioxidant capacity and oxidative stress after a 10-week dietary intervention program in obese children.
Rendo-Urteaga T, Puchau B, Chueca M, Oyarzabal M, Azcona-Sanjulián MC, Martínez JA, Marti A.
Eur J Pediatr. 2014 May;173(5):609-16.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24310523>

- Πληθυσμοί με κάποιο παθοφυσιολογικό φαινότυπο (ινσουλινοαντίσταση, διαβήτη, υπερθυρεοειδισμό, οστεοπόρωση, αυτόανοσο νόσημα κ.α.)

Effect of fast-food Mediterranean-type diet on type 2 diabetics and healthy human subjects' platelet aggregation.
Karantonis HC, Fragopoulou E, Antonopoulou S, Rementzis J, Phenekos C, Demopoulos CA.
Diabetes Res Clin Pract. 2006 Apr;72(1):33-41.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16236380>

- Πληθυσμοί οι οποίοι έχουν υποστεί κάποιο κλινικό σύμβαμα (καρδιαγγειακό επεισόδιο, εγκεφαλικό, θρόμβωση, καρκίνος κ.α.)

Background and rationale of the SU.FOL.OM3 study: double-blind randomized placebo-controlled secondary prevention trial to test the impact of supplementation with folate, vitamin B6 and B12 and/or omega-3 fatty acids on the prevention of recurrent ischemic events in subjects with atherosclerosis in the coronary or cerebral arteries.
Galan P, de Bree A, Mennen L, Potier de Courcy G, Preziosi P, Bertrais S, Castetbon K, Hercberg S.
J Nutr Health Aging. 2003;7(6):428-35.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14625623>

Γενικότερα, στις κατηγορίες γενικού πληθυσμού, οι οποίες διατροφικές επιδημιολογικές μελέτες και παρεμβάσεις στοχεύουν κυρίως στη πρόληψη, ενώ οι παρεμβάσεις που γίνονται σε πληθυσμούς με κάποιο κλινικό σύμβαμα στοχεύουν είτε στη δευτερογενή πρόληψη (επανάληψη του συμβάματος) ή και στη μείωση των κλινικών χαρακτηριστικών της νόσου.

Διατροφικές επιδράσεις στους ανθρώπους

Χορήγηση μεμονωμένων θρεπτικών συστατικών

Η χορήγηση αυτή μπορεί να γίνει είτε φαρμακολογικά με τη χορήγηση χαπιού ή άλλου σκευάσματος, είτε με χορήγηση τροφίμων πλούσιων σε αυτό το συστατικό.

Supplementation with wheat selenium induces a dose-dependent response in serum and urine of a Se-replete population.

Meltzer HM, Norheim G, Løken EB, Holm H.

Br J Nutr. 1992 Mar;67(2):287-94.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1596501>

Ομάδες τροφίμων

Στους εθελοντές δίνονται οδηγίες ώστε να αυξήσουν ή να μειώσουν την κατανάλωση συγκεκριμένων ομάδων τροφίμων (π.χ. γαλακτομικά, φρούτα, λαχανικά κ.α.)

Influence of a diet very high in vegetables, fruit, and fiber and low in fat on prognosis following treatment for breast cancer: the Women's Healthy Eating and Living (WHEL) randomized trial.

Pierce JP, Natarajan L, Caan BJ, Parker BA, Greenberg ER, Flatt SW, Rock CL, Kealey S, Al-Delaimy WK, Bardwell WA, Carlson RW, Emond JA, Faerber S, Gold EB, Hajek RA, Hollenbach K, Jones LA, Karanja N, Madlensky L, Marshall J, Newman VA, Ritenbaugh C, Thomson CA, Wasserman L, Stefanick ML.

JAMA. 2007 Jul 18;298(3):289-98.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17635889>

Συγκεκριμένα είδη τροφίμων

Στους εθελοντές χορηγούνται ή δίνονται οδηγίες για αύξηση της κατανάλωσης συγκεκριμένων τροφίμων. Σκοπός είναι να μελετηθεί η επίδραση τους σε συγκεκριμένους βιολογικούς μηχανισμούς αλλά και η αποδοχή τους από το καταναλωτικό κοινό.

Appetitive, dietary and health effects of almonds consumed with meals or as snacks: a randomized, controlled trial.

Tan SY, Mattes RD.

Eur J Clin Nutr. 2013 Nov;67(11):1205-14.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24084509>

Effect of banana consumption on faecal microbiota: a randomised, controlled trial.

Mitsou EK, Kougia E, Nomikos T, Yannakoulia M, Mountzouris KC, Kyriacou A.

Anaerobe. 2011 Dec;17(6):384-7.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21524710>

Λειτουργικά τρόφιμα

Είναι προϊόντα της βιομηχανίας τροφίμων που έχουν ως σκοπό, πέρα από τη χορήγηση απαραίτητων θρεπτικών συστατικών, τη βελτιστοποίηση κλινικών ή βιοχημικών δεικτών υγείας. Παρασκευάζονται με τροποποίηση της σύστασης κλασικών τροφίμων στα οποία, είτε ενσωματώνονται βιοδραστικά συστατικών είτε απομακρύνονται επιβλαβή για την υγεία μικροθρεπτικά συστατικά. Τέτοια τρόφιμα είναι για παράδειγμα, μαργαρίνες εμπλουτισμένες με φυτικές στερόλες/στανόλες, οι οποίες έχουν τη δυνατότητα να

μειώνουν την ολική και LDL-χοληστερόλη ή τρόφιμα με χαμηλή περιεκτικότητα σε αλάτι ή λίπος.

Consuming functional foods enriched with plant sterol or stanol esters for 85 weeks does not affect neurocognitive functioning or mood in statin-treated hypercholesterolemic individuals.
Schiepers OJ, de Groot RH, van Boxtel MP, Jolles J, de Jong A, Lütjohann D, Plat J, Mensink RP.
J Nutr. 2009 Jul;139(7):1368-73.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19458031>

Συμπληρώματα διατροφής

Τα συμπληρώματα διατροφής είναι διατροφικά προϊόντα αρμοδιότητας ΕΟΦ με σκοπό τη συμπλήρωση της συνήθους δίαιτας. Αποτελούν συμπυκνωμένες πηγές θρεπτικών συστατικών ή άλλων ουσιών με θρεπτικές ή φυσιολογικές επιδράσεις (π.χ βρώσιμα εκχυλίσματα φυτών και άλλα συστατικά φυσικής προέλευσης με θρεπτικά συστατικά όπως βιταμίνες, μέταλλα, αμινοξέα, πρωτεΐνες, αντιοξειδωτικές ουσίες κ.τ.λ) μεμονωμένα ή σε συνδυασμούς.

Τα πλεονεκτήματα που έχει η χορήγηση ενός ή περισσότερων μικροθρεπτικών συστατικών μέσω συμπληρωμάτων έναντι διαιτών πλούσιων στα συγκεκριμένα συστατικά είναι:

- Ελεγχόμενη πρόσληψη του συγκεκριμένου θρεπτικού συστατικού
- Εύκολη πρόσληψη
- Δυνατότητα χρήσης placebo

Ωστόσο, οι όποιες τροποποιήσεις μπορεί να επιφέρει ένα συμπλήρωμα διατροφής στη κλινική ή βιοχημική εικόνα ενός ανθρώπου θα πρέπει να μεταφράζονται με προσοχή όσον αφορά τις διατροφικές επιδράσεις των συστατικών του συμπληρώματος αφού:

- Είναι διαφορετική η δράση ενός συστατικού όταν δίνεται μόνο του ως συμπλήρωμα και διαφορετική όταν είναι ενσωματωμένο μέσα σε ένα τρόφιμο, όπου μπορούν να υπάρχουν και συνεργιστικές ή ανταγωνιστικές δράσεις με άλλα συστατικά.
- Υπάρχει διαφορετική βιοδιαθεσιμότητα μεταξύ συμπληρωμάτων και τροφίμων
- Στην καθημερινή ζωή, η αύξηση της πρόσληψης ενός θρεπτικού συστατικού μέσω συγκεκριμένων τροφίμων μπορεί να σημαίνει και μείωση της κατανάλωσης κάποιων άλλων και τελικά αυτή η μείωση να είναι που επιφέρει το τελικό αποτέλεσμα. Στην χορήγηση συμπληρωμάτων απλά αυξάνεται η πρόσληψη συγκεκριμένων συστατικών στις ήδη υπάρχουσες διατροφικές συνήθειες.

Multivitamin use and risk of cancer and cardiovascular disease in the Women's Health Initiative cohorts.
Neuhouser ML, Wassertheil-Smoller S, Thomson C, Aragaki A, Anderson GL, Manson JE, Patterson RE, Rohan TE, van Horn L, Shikany JM, Thomas A, LaCroix A, Prentice RL.
Arch Intern Med. 2009 Feb 9;169(3):294-304
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19204221>

Τρόφιμα μαγειρεμένα με διαφορετικό τρόπο

Ο τρόπος μαγειρέματος ενός τροφίμου παίζει σημαντικό ρόλο στη τελική διατροφική του αξία και μπορεί να διαφοροποιήσει σημαντικά τη σύσταση των θρεπτικών της ωμού τροφίμου. Στις παρεμβάσεις αυτού του είδους, το ίδιο τρόφιμο καταναλώνεται ύστερα από διαφορετικό τρόπο μαγειρέματος και η σχετική επίδραση του είδους μαγειρέματος στην διατροφική αξία του τροφίμου εκτιμάται με διάφορους κλινικούς και βιοχημικούς δείκτες.

Dietary practices in households as risk factors for stomach cancer: a familial study in Poland.
Jedrychowski W, Boeing H, Popiela T, Wahrendorf J, Tobiasz-Adamczyk B, Kulig J.
Eur J Cancer Prev. 1992 Jun;1(4):297-304.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1467778>

Διατροφικές συστάσεις

Οι διατροφικές συστάσεις έχουν ως σκοπό μέσω τακτικών συνεδριών να οδηγήσουν τον εθελοντή σε αλλαγή των διατροφικών του συνηθειών. Η αλλαγές αυτές έχουν να κάνουν είτε με αύξηση, είτε με μείωση της πρόσληψης συγκεκριμένων ομάδων τροφίμων αλλά και με την υιοθέτηση ολιστικών ευεργετικών διατροφικών προτύπων όπως είναι για παράδειγμα η Μεσογειακή Δίαιτα.

A multicomponent lifestyle intervention produces favourable changes in diet quality and cardiometabolic risk indices in hypercholesterolaemic adults.
Petrogianni M, Kanellakis S, Kallianioti K, Argyropoulou D, Pitsavos C, Manios Y.
J Hum Nutr Diet. 2013 Dec;26(6):596-605.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23510154>

Βιολογικά δείγματα

Σχεδόν όλα τα είδη βιολογικών δειγμάτων έχουν χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της βιοδιαθεσιμότητας, το μεταβολισμό και τις βιολογικές δράσεις των συστατικών της διατροφής. Είναι προφανές ότι τα βιολογικά υγρά και ειδικότερα ο ορός, το πλάσμα, τα ούρα και το σάλιο είναι, εξαιτίας της ευκολίας λήψης τους, είναι τα πλέον χρησιμοποιούμενα βιολογικά δείγματα. Ωστόσο, τα επίπεδα των μεταβολιτών και των βιομορίων στα βιολογικά υγρά είναι το τελικό αποτέλεσμα πλήθους μεταβολικών πορειών και είναι δύσκολο να εκτιμηθεί η σχετική συνεισφορά της κάθε μιας στο τελικό φαινοτυπικό αποτέλεσμα.

Από το ολικό αίμα είναι εύκολο να απομονωθούν τα κυκλοφορούντα κύτταρα (λευκοκύτταρα, ερυθροκύτταρα, αιμοπετάλια) και υποπληθυσμοί αυτών. Τα κύτταρα αυτά είτε επεξεργάζονται κατάλληλα ώστε να μετρηθούν, σε ομογενοποιημένα και υποκυτταρικά σωματίδια αυτών, βιομόρια και δραστηκότητες ενζύμων, είτε καλλιεργούνται άμεσα, είτε κρυοσυντηρούνται και καλλιεργούνται μετέπειτα. Άλλα είδη κυττάρων που μπορούν να απομονωθούν από κατάλληλες βιοψίες και ενδιαφέρουν άμεσα τη μελέτη της διατροφής είναι τα λιποκύτταρα, τα οποία μπορούν να ληφθούν από βιοψίες λιπώδους ιστούς. Η μέτρηση λειτουργικών ιδιοτήτων των απομονωμένων κυττάρων (συσσώρευση, προσκόλληση, έκκριση μεσολαβητών, μεταγραφή γονιδίων) επιτρέπουν την εκτίμηση της δράσης διατροφικών συστατικών στις κυτταρικές λειτουργίες.

Η παραλαβή ιστών από τους ανθρώπους είναι ιδιαίτερα δύσκολη και σίγουρα δεν μπορεί να γίνει σε μεγάλες επιδημιολογικές μελέτες και διατροφικές παρεμβάσεις. Οι συνηθέστερες βιοψίες, οι οποίες μπορούν να γίνουν και σε υγιείς εθελοντές είναι οι βιοψίες του λιπώδους ιστού και του μυϊκού ιστού. Από κει και πέρα πιο εξειδικευμένες βιοψίες μπορούν να ληφθούν στα πλαίσια κλινικού ελέγχου του εθελοντή ή μετά από εγχειρήσεις. Τα δείγματα ανθρώπινου ιστού πρέπει πάντα να λαμβάνονται ύστερα από σύμφωνη γνώμη αυτού. Τα ιστικά δείγματα μπορούν να δώσουν πληροφορίες για μεταβολές βιοχημικών δεικτών από τα πλέον σημαντικά για την ανθρώπινη φυσιολογία σημεία αλλά συνήθως δεν φτάνουν για πολλές δοκιμασίες ενώ πολλές φορές ή ίδια η λήψη του ιστού επάγει φλεγμονώδεις διεργασίες στον ιστό που καλύπτουν την επίδραση της διατροφής. Άλλα βιολογικά δείγματα ειδικού ενδιαφέροντος είναι το σπέρμα, τα νύχια και

οι τρίχες. Στα δύο τελευταία δείγματα, η συγκέντρωση ιχνοστοιχείων, όπως το σελήνιο, είναι ενδεικτική της μακροχρόνιας πρόσληψης αυτών από τη διατροφή.

Εκτίμηση διατροφικής πρόσληψης

Μία από τις μεγαλύτερες προκλήσεις της διατροφικής έρευνας στους ανθρώπους είναι η σωστή εκτίμηση της διατροφικής πρόσληψης των εθελοντών, είτε γιατί από αυτή θα προσδιορίσουμε τις διατροφικές συνήθειες του εθελοντή και τα ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά της διατροφής του, είτε γιατί θα εκτιμήσουμε τη προσκόλληση του στη διατροφική παρέμβαση. Οι συνηθέστερες προσεγγίσεις είναι οι παρακάτω:

- Ανακλήσεις 24ώρου: Ο εξεταζόμενος δηλώνει με ακρίβεια τι έφαγε και πόσο έφαγε μέσα σε μία μέρα. Η ανάκληση μπορεί να γίνει από τον ίδιο τον εξεταζόμενο αλλά συνήθως αυτός δεν έχει την εμπειρία και τις γνώσεις να δηλώσει με ακρίβεια το είδος και την ποσότητα της τροφής που έφαγε. Για αυτό το λόγο οι ανακλήσεις πρέπει να γίνονται από εξειδικευμένους διαιτολόγους, οι οποίοι με την βοήθεια προπλάσμάτων και δοσομετρητών θα βοηθήσουν τον εξεταζόμενο να δώσει σωστή εκτίμηση της προσλαμβανόμενης τροφής. Στη συνέχεια, εξειδικευμένο προσωπικό, χρησιμοποιώντας εμπορικά διαθέσιμα προγράμματα και βάσεις δεδομένων τροφίμων μπορεί να προσδιορίσει τη πρόσληψη των μακροθρεπτικών και μικροθρεπτικών συστατικών του εθελοντή. Τρεις ανακλήσεις 24ωρου (δύο σε καθημερινές μέρες και μία σαββατοκύριακου) θεωρούνται επαρκείς για να εκτιμήσεις τη διατροφική πρόσληψη ενός ανθρώπου.
- Ημερολόγια καταγραφής τροφίμων: Στον εξεταζόμενο δίνεται ειδικό ημερολόγιο και αναλυτικές οδηγίες βάση των οποίων μπορεί να καταγράψει για διάστημα μερικών ημερών τη πρόσληψη τροφής. Τα ημερολόγια χρησιμοποιούνται όταν ο αριθμός των εθελοντών και γενικότερα οι συνθήκες της έρευνας δεν επιτρέπουν την ανάκληση από εξειδικευμένο προσωπικό. Ο προσδιορισμός της διατροφικής πρόσληψης γίνεται όπως και στις ανακλήσεις 24ώρου.
- Ερωτηματολόγια συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων: Τα ερωτηματολόγια αυτά ζητάνε από τους εθελοντές να δηλώσουν την συχνότητα κατανάλωσης ομάδων τροφίμων ή και συγκεκριμένων τροφίμων σε εβδομαδιαία ή μηνιαία βάση για το προηγούμενο διάστημα μερικών μηνών. Τα ερωτηματολόγια αυτά δεν είναι το ίδιο αξιόπιστα, όπως οι ανακλήσεις 24ώρου, για την εκτίμηση της πρόσληψης μακρο- και μικροθρεπτικών συστατικών, αλλά μπορούν να δώσουν μία εκτίμηση των διατροφικών προτύπων που ακολουθεί ένας εθελοντής για ένα μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

Από τα παραπάνω ερωτηματολόγια μπορούν να υπολογιστούν δείκτες που εκτιμούν ολιστικά συγκεκριμένα χαρακτηριστικά της διατροφής ενός εθελοντή. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων δεικτών είναι:

- Γλυκαιμικός δείκτης – Γλυκαιμικό φορτίο: Ο γλυκαιμικός δείκτης της δίαιτας είναι μέτρο της ικανότητας των τροφών που καταναλώνει ένας άνθρωπος να αυξάνουν τη γλυκόζη του αίματος. Γενικά, επεξεργασμένα αμυλούχα προϊόντα έχουν υψηλό γλυκαιμικό δείκτη (ΓΔ), ενώ τρόφιμα πλούσια σε φυτικές ίνες έχουν χαμηλό γλυκαιμικό δείκτη. Ο γλυκαιμικός δείκτης δεν λαμβάνει υπόψιν του την περιεκτικότητα των τροφίμων σε υδατάνθρακες σε αντίθεση με το γλυκαιμικό φορτίο που συνυπολογίζει και αυτή τη

παράμετρο δίνοντας μια καλύτερη εκτίμηση της περιεκτικότητας της δίαιτας σε πολλούς και εύκολα αφομοιώσιμους υδατάνθρακες.

- MedDietScore: Δείκτης προσκόλλησης στην Μεσογειακή Δίαιτα
- FRAP, TRAP, TEAC: Δείκτες εκτίμησης του αντιοξειδωτικού δυναμικού των τροφίμων και της δίαιτας συνολικά που υπολογίζονται με μέτρηση της in vitro ικανότητας των διαφόρων τροφίμων να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες.

Effect of the glycemic index of the diet on weight loss, modulation of satiety, inflammation, and other metabolic risk factors: a randomized controlled trial.

Juanola-Falgarona M, Salas-Salvadó J, Ibarrola-Jurado N, Rabassa-Soler A, Díaz-López A, Guasch-Ferré M, Hernández-Alonso P, Balanza R, Bulló M.

Am J Clin Nutr. 2014 Apr 30.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24787494>

The association between adherence to the Mediterranean diet and adiponectin levels among healthy adults: the ATTICA study.

Fragopoulou E, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Tampourlou M, Chrysohoou C, Nomikos T, Antonopoulou S, Stefanadis C.

J Nutr Biochem. 2010 Apr;21(4):285-9.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19369051>

Dietary antioxidant capacity and concentration of adiponectin in apparently healthy adults: the ATTICA study.

Detopoulou P, Panagiotakos DB, Chrysohoou C, Fragopoulou E, Nomikos T, Antonopoulou S, Pitsavos C, Stefanadis C.

Eur J Clin Nutr. 2010 Feb;64(2):161-8.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19904292>

Το βασικό μειονέκτημα της εκτίμησης της διατροφικής πρόληψης μέσω ερωτηματολογίων είναι η υποεκτίμηση της καθημερινής κατανάλωσης και η τάση για υπερεκτίμηση της πρόσληψης «υγιεινών» τροφών και υποκαταγραφής των «ανθυγιεινών» τροφίμων.

- Ζύγιση καταναλισκόμενης τροφής: Από τους εθελοντές ζητείται η ζύγιση των τροφών που καταναλώνουν για ένα χρονικό διάστημα μερικών ημερών. Αυτός είναι ο καλύτερος τρόπος για να εκτιμήσεις την ποσοτική πρόληψη τροφής αλλά ιδιαίτερα δύσκολος να εφαρμοστεί σε μεγάλες πληθυσμιακές μελέτες.
- Βιοχημικοί δείκτες διατροφικής πρόσληψης: Αυτός ο τρόπος εκτίμησης της διατροφικής πρόσληψης θα αναφερθεί αναλυτικότερα σε επόμενο υποκεφάλαιο.

Εκτίμηση διατροφικής πρόσληψης μέσω βιοχημικών δεικτών

Η ποσότητα και οι ποιότητα των προσλαμβανόμενων διατροφικών συστατικών είναι ένας μόνο τρόπος εκτίμησης της διατροφικής κατάστασης ενός ανθρώπου και αυτό γιατί κάθε άνθρωπος έχει το δικό του μοναδικό τρόπο να απορροφά και μεταβολίζει τα θρεπτικά συστατικά. Είναι λοιπόν σημαντικό να υπάρξουν αξιόπιστοι βιοχημικοί δείκτες διατροφικής πρόσληψης, οι οποίοι θα εκτιμούσαν όχι μόνο την ποσότητα πρόσληψης αλλά και την τελική βιοδιαθεσιμότητα ενός θρεπτικού συστατικού. Οι δείκτες αυτοί, για να μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη διατροφική έρευνα κλινική πράξη, θα πρέπει να έχουν τις παρακάτω ιδιότητες:

- Να αναλύονται σχετικά εύκολα.
- Να έχουν ευαισθησία ως προς την πρόσληψη, δηλαδή μικρές αλλαγές στις διατροφικές προσλήψεις να επάγουν μετρήσιμες αλλαγές στο βιοδείκτη.
- Η ποσότητα τους στο βιολογικό δείγμα να είναι ανάλογη της βραχυχρόνιας ή μακροχρόνιας πρόσληψης του συστατικού για ένα μεγάλο εύρος προσλήψεων. Γενικότερα, ιστοί και κύτταρα με μεγάλο χρόνο ανακύκλωσης της σύστασής τους (π.χ. ερυθροκύτταρα, λιπώδης ιστός) αποτελούν καλύτερα βιολογικά δείγματα για την εκτίμηση της μακροχρόνιας πρόσληψης.
- Να μην επηρεάζονται κατά το δυνατόν από άλλους παράγοντες και αν αυτό δεν είναι δυνατόν να κανονικοποιούνται βάση αυτών. Για παράδειγμα τα επίπεδα της βιταμίνης E στο πλάσμα σχετίζονται με τα επίπεδα των λιποπρωτεϊνών.

Βιοχημικοί δείκτες διατροφικής πρόσληψης μπορεί να είναι τόσο τα επίπεδα του θρεπτικού συστατικού σε κάποιον ιστό αλλά και λειτουργικές δοκιμασίες όπως για παράδειγμα η δραστικότητα ενός ενζύμου, του οποίου η ποσότητα ή/και δραστικότητα εξαρτάται από το θρεπτικό συστατικό (π.χ. η δραστικότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης στα ερυθροκύτταρα είναι ανάλογη της πρόσληψης σεληνίου).

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται χαρακτηριστικοί βιοχημικοί δείκτες διατροφικής πρόσληψης για βασικά θρεπτικά συστατικά και τρόφιμα.

Θρεπτικό συστατικό	Βιοχημικός δείκτης πρόσληψης	Αναλυτική τεχνική	Σχόλια
Βιταμίνη Α	Ρετινόλη ορού ή πλάσματος	HPLC	Δεν είναι ευαίσθητος δείκτης για καλά τρεφόμενους πληθυσμούς
	Πρωτεΐνη σύνδεσης ρετινόλης ορού (retinol-binding protein, RBP)	ELISA	Η RBP είναι η πρωτεΐνη μεταφοράς της ρετινόλης στο αίμα. Η μέτρηση της είναι δείκτης της βιολογικά διαθέσιμης ρετινόλης
Βιταμίνη Ε	α-τοκοφερόλη ή συνολική βιταμίνη Ε στον ορό ή πλάσμα	HPLC	Τα επίπεδα της στο πλάσμα είναι ανάλογα με τα επίπεδα της χοληστερόλης. Μέτρια απόκριση στη πρόσληψη α-τοκοφερόλης
	α,β,γ,δ-τοκοφερόλες στα ερυθροκύτταρα	HPLC	Καλύτερος δείκτης της βιοδιαθέσιμης βιταμίνης Ε
Βιταμίνη D	25(OH)D	HPLC	Ο κύριος μεταβολίτης της βιταμίνης D στην κυκλοφορία και ο πιο χρησιμός δείκτης της πρόσληψης της. Επηρεάζεται από τον έκθεση στον ήλιο → καλύτερος δείκτης για πληθυσμός με χαμηλή έκθεση στον ήλιο
	1,25(OH) ₂ D	HPLC	Όχι καλός δείκτης εξαιτίας της επίδρασης των Ca, P και PTH στα επίπεδα της
	Αλκαλική φωσφατάση ορού	Φωτομετρικός προσδιορισμός	Έμμεση εκτίμηση της κατάστασης βιταμίνης D. Επηρεάζεται από υπερπαραθυροειδισμό και πρωτεϊνικό υποσιτισμό

Βιταμίνη C	Βιταμίνη C λευκοκυττάρων	HPLC	Δείκτης μακροχρόνιας πρόσληψης
Βιταμίνη Β1 (θειαμίνη)	Διέγερση της ερυθροκυτταρικής τρανσκετολάσης από πυροφωσφορική θειαμίνη (TPP)	Φωτομετρικός προσδιορισμός	Μέτρηση δραστικότητας ενζύμου πριν και μετά την προσθήκη TPP. Μεγάλη αύξηση της δραστικότητας → έλλειψη ενδογενούς θειαμίνης
Σελήνιο	Σελήνιο σε τρίχες και νύχια	Ατομική απορρόφηση, ICP-MS	Δείκτης μακροχρόνιας πρόσληψης
	Σελήνιο σε πλάσμα	Ατομική απορρόφηση, ICP-MS	Δεν δείχνει στοιχεία για την κατανομή του σεληνίου στις σεληνοπρωτεΐνες.
	Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης στα ερυθροκύτταρα ή τον ορό	Φωτομετρικά ενζυμικά τεστ	Δείκτης της λειτουργικής κατάστασης του σεληνίου
Na	Na ούρων	Ατομική απορρόφηση, εκλεκτικά ηλεκτρόδια	Καλός δείκτης βραχυχρόνιας πρόσληψης Na
K	Na ούρων	Ατομική απορρόφηση, εκλεκτικά ηλεκτρόδια	Καλή συσχέτιση με διατροφική πρόσληψη
Zn	Μεταλλοθειονίνες ψευδαργύρου	ELISA	Δείκτης βραχυχρόνιας πρόσληψης, επηρεάζεται από παθήσεις
Σύσταση της δίαιτας σε λιπαρά οξέα	Λιπαρά οξέα μεμβράνης ερυθροκυττάρων ή λιπώδους ιστού	GC-MS	Δείκτης μακροχρόνιας πρόσληψης. Εκτιμά τη σύσταση του προσλαμβανόμενου λίπους σε κορεσμένα, μονοακόρεστα, πολυακόρεστα λιπαρά οξέα.
Πρωτεΐνη	Πρωτεΐνη ορού	Φωτομετρικά	Μόνο για πληθυσμούς με χαμηλή πρόσληψη πρωτεΐνης
	Άζωτο ούρων	Φωτομετρικά	Η πιο αξιόπιστη μέθοδος αλλά απαιτείται συνεκτίμηση και με άλλες μεθόδους
Κρέας	3-μεθυλο-ιστιδίνη ούρων	HPLC	Απαιτείται επιβεβαίωση και με άλλες μελέτες
Δημητριακά ολικής άλεσης	Αλκυλορεσορκινόλη και μεταβολίτες αυτής στον ορό και στα ούρα.	HPLC	Ο πιο αξιόπιστος δείκτης μέχρι τώρα
Διαιτητικές ίνες	Διαιτητικές ίνες κοπράνων		Δυσκολία παραλαβής βιολογικού δείγματος

Πειράματα με ανθρώπους - Πλεονεκτήματα

- Άμεσο αποτέλεσμα της δράσης στον άνθρωπο

Πειράματα με ανθρώπους - Μειονεκτήματα

- Μη ελεγχόμενες συνθήκες – μεγάλες διακυμάνσεις. Στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται από τις επιδημιολογικές μελέτες και τις διατροφικές παρεμβάσεις σε άνθρωπο πρέπει να συνεκτιμάται και η μεγάλη διακύμανση, που έτσι και αλλιώς

παρατηρείται στις συγκεντρώσεις των φλεγμονωδών μεσολαβητών και στη δραστηριότητα των κυττάρων. Η διακύμανση αυτή οφείλεται κατά κύριο λόγο στους γενετικούς πολυμορφισμούς που χαρακτηρίζουν το ανοσολογικό σύστημα του κάθε ανθρώπου αλλά και στην ηλικία, το φύλο, το κάπνισμα, τις διατροφικές συνήθειες, τη φυσική δραστηριότητα κ.α.

- Μεγάλη γενετική διακύμανση
- Δύσκολη εκτίμηση στην προσκόλληση
- Μειωμένη πρόσβαση σε ιστούς
- Μικροί χρόνοι παρέμβασης, ανεπαρκείς στο να εκδηλωθεί η ευεργετική δράση της διατροφής
- Μέτρηση αλλαγών μόνο σε μεταβολίτες του μεταβολισμού και όχι σε ένζυμα ή πορείες αυτού → δύσκολες οι μηχανιστικές εξηγήσεις
- Μικρό δείγμα
- Μεγάλο κόστος

Τα -omics στην υπηρεσία της διατροφικής έρευνας

Διατροφογενομική, διατροφογενετική (nutrigenomics, nutrigenetics)

Η δράση ενός διατροφικού συστατικού εξαρτάται από πολλές διεργασίες που ξεκινάνε από τη πέψη και απορρόφηση του συστατικού, τη μεταφορά τους στην κυκλοφορία, την πρόσληψη του από τα κύτταρα, τον μεταβολισμό του και τελικά από την απέκκριση του από το γαστρεντερικό σωλήνα και τους νεφρούς. Σε όλες τις παραπάνω διεργασίες, μεσολαβούν ένζυμα και πρωτεΐνες, τα γονίδια των οποίων μπορούν να εκφράζουν μία μεγάλη ποικιλία γενετικών πολυμορφισμών, οι οποίοι καθορίζουν τελικά τη διαφορετική απόκριση του κάθε οργανισμού στα διατροφικά συστατικά.

Η διατροφογενομική μελετά την επίδραση της διατροφής στην έκφραση του γονιδιώματος και στην φαινοτυπικές αλλαγές που μπορούν να προκληθούν από αυτή την επίδραση. Η διατροφογενετική από την άλλη μελετά κατά πόσο το γενετικό υπόβαθρο (γενετικοί πολυμορφισμοί) κάθε ανθρώπου μπορεί να επηρεάσει και με ποιόν τρόπο την απορρόφηση, μεταβολισμό και βιολογικές δράσεις των συστατικών της διατροφής.

Omega-3 fatty acid deficiency increases stearoyl-CoA desaturase expression and activity indices in rat liver: positive association with non-fasting plasma triglyceride levels.

Hofacer R, Magrisso JJ, Jandacek R, Rider T, Tso P, Benoit SC, McNamara RK.

Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2012 Jan-Feb;86(1-2):71-7.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22047910>

Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 polymorphisms are associated with bone mineral density in Greek postmenopausal women: an interaction with calcium intake.

Stathopoulou MG, Dedoussis GV, Trovas G, Katsalira A, Hammond N, Deloukas P, Lyritis GP.

J Am Diet Assoc. 2010 Jul;110(7):1078-83.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20630166>

Οι μελέτες συσχέτισης σε όλο το γονιδίωμα (genome-wide association studies, GWAS) εκμεταλλεύονται τις διαφορές στο γενετικό υπόβαθρο κάθε ανθρώπου λόγω των SNPs και αναζητούν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ SNPs και φαινοτύπων που οφείλονται σε αυτούς.

Genome-wide association analysis of eating disorder-related symptoms, behaviors, and personality traits.

Boraska V, Davis OS, Cherkas LF, Helder SG, Harris J, Liao TP, Treasure J, Ntalla I, Karhunen L, Keski-Rahkonen A, Christakopoulou D, Raevuori A, Shin SY, Dedoussis GV, Kaprio J, Soranzo N, Spector TD, Collier DA, Zeggini E.

Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2012 Oct;159B(7):803-11.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22911880>

Μειονέκτημα της διατροφογενομικής και διατροφογενετικής είναι ότι οι αναλύσεις είναι ακόμα σχετικά ακριβές, δεν μπορούν να εφαρμοστούν σε μεγάλους πληθυσμούς άρα δεν υπάρχει η στατιστική δύναμη ώστε να αποδειχτούν συσχετίσεις μεταξύ γονιδιακών χαρακτηριστικών και διαφορετικών φαινοτυπικών αποκρίσεων στα διατροφικά συστατικά.

Επιγενετική (epigenomics)

Η επιγενετική μελετά τις αλλαγές που επισυμβαίνουν στο γονιδιακό υλικό του ανθρώπου και επηρεάζουν την γονιδιακή έκφραση, οι οποίες όμως δεν οφείλονται σε αλλαγές στις αλληλουχίες των βάσεων (μεταλλάξεις) αλλά σε χημικές τροποποιήσεις όπως η μεθύλιση του DNA, ομοιοπολικές αλλαγές στις ιστόνες, τροποποιήσεις στην χρωματίνη κ.α. Η μελέτη του συνόλου των αλλαγών αυτών σε ένα κύτταρο/ιστό σε δεδομένη χρονική στιγμή αποτελεί αντικείμενο της επιγενομικής.

Αρκετές μελέτες τα τελευταία χρόνια έχουν δείξει ότι διατροφικές επιδράσεις μπορούν να επιφέρουν επιγενετικές αλλαγές και αυτές με τη σειρά τους βιοχημικές και τελικά φαινοτυπικές αλλαγές.

Milagro FI, Campión J, Cordero P, Goyenechea E, Gómez-Uriz AM, Abete I, Zulet MA, Martínez JA.

A dual epigenomic approach for the search of obesity biomarkers: DNA methylation in relation to diet-induced weight loss.

FASEB J. 2011 Apr;25(4):1378-89

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21209057>

Τα τελευταία χρόνια έχει φανεί επίσης ότι υιοθέτηση συγκεκριμένων διατροφικών προτύπων μπορεί να επιφέρει επιγενετικές αλλαγές που οδηγούν σε φαινοτυπικές αλλαγές στις επόμενες γενιές.

Chronic high-fat diet in fathers programs β -cell dysfunction in female rat offspring.

Ng SF, Lin RC, Laybutt DR, Barres R, Owens JA, Morris MJ.

Nature. 2010 Oct 21;467(7318):963-6.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20962845>

Η μελέτη των microRNAs εντάσσεται συνήθως στο πλαίσιο της επιγενετικής. Τα microRNAs είναι μικρά, μη κωδικοποιήσιμα μόρια RNA (20-30 νουκλεοτιδίων), τα οποία έχουν συμπληρωματικές αλληλουχίες στο 3' μη μεταφράσιμο άκρο των γονιδίων. Με αυτό τον τρόπο τα microRNAs επάγουν αποσιώπηση συγκεκριμένων γονιδίων και με αυτό τον τρόπο ρυθμίζουν μεταβολικές πορείες. Τα τελευταία χρόνια έχει φανεί ότι φυτικά microRNAs μπορούν να απορροφηθούν και να ρυθμίσουν την έκφραση γονιδίων στα θηλαστικά άρα πιθανόν αποτελούν άλλο ένα τρόπο μέσω του οποίου η διατροφή επηρεάζει τη φυσιολογία του ανθρώπινου οργανισμού.

Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA.

Zhang L, Hou D, Chen X, Li D, Zhu L, Zhang Y, Li J, Bian Z, Liang X, Cai X, Yin Y, Wang C, Zhang T, Zhu D, Zhang D, Xu J, Chen Q, Ba Y, Liu J, Wang Q, Chen J, Wang J, Wang M, Zhang Q, Zhang J, Zen K, Zhang CY.

Cell Res. 2012 Jan;22(1):107-26. doi: 10.1038/cr.2011.158.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21931358>

Μεταγραφομική (transcriptomics)

Η μεταγραφομική (transcriptomics) μελετά το σύνολο των μεταγράφων σε ένα κύτταρο/ιστό σε δεδομένη χρονική στιγμή. Οι σύγχρονες τεχνολογίες των μικροσυστοιχιών RNA και αλληλούχισης επιτρέπουν τη μελέτη της αλληλεπίδρασης διατροφικών παραγόντων και της έκφρασης ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων. Μέσω αυτής της αλληλεπίδραση διατροφικά συστατικά μπορούν να εμπλέκονται στη ρύθμιση πλήθους μεταβολικών πορειών ενεργοποιώντας ή αναστέλλοντας την σύνθεση ενζύμων/πρωτεϊνών. Για παράδειγμα πάρα πολλά διατροφικά συστατικά, όπως λιπαρά οξέα και βιταμίνες συνδέονται σε πυρηνικούς υποδοχείς (RXR, PPARs, LXRs) και ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων.

Detailed transcriptomics analysis of the effect of dietary fatty acids on gene expression in the heart.

Georgiadi A, Boekschoten MV, Müller M, Kersten S.

Physiol Genomics. 2012 Mar 19;44(6):352-61.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22274564>

Οι μεταβολές στα επίπεδα των μεταγράφων από ένα διατροφικό παράγοντα δεν σημαίνει απαραίτητα ότι αυτές οδηγούν και σε αλλαγές στα επίπεδα των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν αφού η αυξημένη βιοσύνθεση mRNA μπορεί να οδηγεί και σε αυξημένη αποικοδόμηση. Επίσης, pre-mRNA μετάγραφα μπορούν να οδηγήσουν σε διαφορετικές πρωτεΐνες λόγω διαφορετικού ματίσματος του mRNA.

Πρωτεομική (proteomics)

Η πρωτεομική μελετά το σύνολο ή μεγάλα υποσύνολα των πρωτεϊνών που υπάρχουν σε κυτταρικά και ιστικά βιολογικά δείγματα. Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται είτε με υγρή χρωματογραφία είτε με δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση και η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός τους είτε με φασματοσκοπία μάζας είτε με ειδικές μικροσυστοιχίες αντισωμάτων ειδικά για τις προς ανίχνευση πρωτεΐνες. Η επίδραση διατροφικών παραγόντων στο σύνολο ή μεγάλα υποσύνολα του πρωτεόματος έχει αναπτυχθεί ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια αλλά θα πρέπει να λαμβάνεται πάντοτε υπόψη ότι οι αλλαγές στη μάζα μίας πρωτεΐνης δεν συμβαδίζει απαραίτητα με αλλαγές στη δραστηριότητα της.

Quantitative proteomic and functional analysis of liver mitochondria from high fat diet (HFD) diabetic mice.

Guo Y, Darshi M, Ma Y, Perkins GA, Shen Z, Haushalter KJ, Saito R, Chen A, Lee YS, Patel HH, Briggs SP, Ellisman MH, Olefsky JM, Taylor SS.

Mol Cell Proteomics. 2013 Dec;12(12):3744-58.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24030101>

Μεταβολομική (metabolomics)

Η μελέτη των επιπέδων και των αλλαγών, κάτω από διαφορετικές επιδράσεις, του συνόλου των μεταβολιτών ενός βιολογικού δείγματος αποτελεί αντικείμενο της μεταβολομικής ανάλυσης. Οι αλλαγές στην σύσταση των μεταβολιτών ενός βιολογικού δείγματος είναι το τελικό συνδυαστικό αποτέλεσμα γονιδιακών, πρωτεομικών και μεταγραφικών αλλαγών. Η δυνατότητα ανάλυσης του συνόλου των μεταβολιτών ενός δείγματος με μία αναλυτική πλατφόρμα είναι αυτή τη στιγμή αδύνατη εξαιτίας της μεγάλης δομικής ετερογένειας των μεταβολιτών αυτών. Γι'αυτό το λόγο υπάρχουν στοχευμένες αναλυτικές πλατφόρμες που επιδιώκουν την ανάλυση συγκεκριμένης ομάδας μεταβολιτών. Οι μεταβολίτες αυτές είτε συμμετέχουν σε κοινές μεταβολικές πορείες, είτε είναι δομικά παρόμοιοι. Ανάλογα τη χημική σύσταση των μεταβολιτών που προσδιορίζονται υπάρχουν υποκατηγορίες της μεταβολομικής όπως η λιπιδιομική, μεταλλομική, γλυκομική κ.α.

Είναι προφανές ότι η εφαρμογή της μεταβολομικής στη διατροφική έρευνα μπορεί με ολιστικό τρόπο να εκτιμήσει αλλαγές στον μεταβολισμό που επάγονται από διατροφικές επιδράσεις. Η μεταβολομική μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην εύρεση νέων βιοδεικτών διατροφικής πρόσληψης δηλαδή μεταβολιτών που αντικατοπτρίζουν την πρόσληψη συγκεκριμένων ομάδων τροφίμων ή διατροφικών συστατικών.

Ένα από τα βασικά προβλήματα της μεταβολομικής ανάλυσης είναι ότι για να έχουν νόημα οι οποιεσδήποτε μεταβολές πρέπει να συνδυαστούν με genomics – proteomics. Επίσης, δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε μεγάλο όγκο δεδομένων λόγω κόστους. Τέλος, ο μεγάλος αριθμός μη προσδιοριζόμενων μεταβολιτών κάνει την ερμηνεία των αποτελεσμάτων ακόμα δυσκολότερη.

Metabolomic analysis reveals extended metabolic consequences of marginal vitamin B-6 deficiency in healthy human subjects.

Gregory JF 3rd, Park Y, Lamers Y, Bandyopadhyay N, Chi YY, Lee K, Kim S, da Silva V, Hove N, Ranka S, Kahveci T, Muller KE, Stevens RD, Newgard CB, Stacpoole PW, Jones DP.

PLoS One. 2013 Jun 11;8(6):e63544.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23776431>

Συστημική βιολογία

Η συστημική βιολογία μελετά την αντίδραση του οργανισμού, ως σύνολο, στις περιβαλλοντικές και γενετικές τροποποιήσεις χρησιμοποιώντας τη θεωρία των συστημάτων. Θεωρεί ότι οι αλλαγές σε ένα βιολογικό σύστημα θα πυροδοτήσουν αλλαγές και στα υπόλοιπα και ότι η τελική απόκριση του οργανισμού θα είναι το αποτέλεσμα αυτών των αλληλεπιδράσεων. Η συστημική βιολογία προσπαθεί να συνδυάσει τις πληροφορίες που προκύπτουν από πλήθος αναλυτικών τεχνικών και να αναπτύξει μοντέλα πρόβλεψης των βιολογικών αλλαγών κάτω από διαφορετικές αλληλεπιδράσεις. Η εφαρμογή της συστημικής βιολογίας στη διατροφική έρευνα, αν και στα σπάργανα, είναι προφανώς σημαντική αφού μπορεί να οδηγήσει σε στοχευμένες και εξατομικευμένες παρεμβάσεις.

A systems biology approach to nutritional immunology - focus on innate immunity.

Afacan NJ, Fjell CD, Hancock RE.

Mol Aspects Med. 2012 Feb;33(1):14-25.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22061966>

Συμπεράσματα

Η διαμόρφωση διατροφικών οδηγιών απαιτεί τη συλλογή και συνεκτίμηση ερευνητικών δεδομένων από in vitro πειράματα σε κύτταρα ή ιστούς, από πειράματα σε ζωικά μοντέλα και από πειράματα στους ανθρώπους. Μόνο όταν η σχέση μεταξύ ενός διατροφικού συστατικού και ενός κλινικού αποτελέσματος επιβεβαιωθεί από τη διατροφική επιδημιολογία και από κλινικές μελέτες και μόνο όταν η βιολογική εξήγηση ερμηνευθεί από πειράματα βασικής έρευνας μόνο τότε η αιτιολογική σχέση ενδυναμώνεται και οδηγεί τελικά στη διαμόρφωση διατροφικών οδηγιών.

Ενδεικτική βιβλιογραφία

1. F. Norheim, I. M. Gjelstad, M. Hjorth, K. J. Vinknes, T. M. Langleite, T. Holen, J. Jensen, K. T. Dalen, A. S. Karlsen, A. Kielland, A. C. Rustan, and C. A. Drevon, Molecular nutrition research; the modern way of performing nutritional science, *Nutrients.*, 4 (2012) 1898-1944.
2. D. H. Baker, Animal models in nutrition research, *J Nutr*, 138 (2008) 391-396.
3. B. Bruemmer, J. Harris, P. Gleason, C. J. Boushey, P. M. Sheehan, S. Archer, and H. L. Van, Publishing nutrition research: a review of epidemiologic methods, *J Am. Diet. Assoc.*, 109 (2009) 1728-1737.
4. C. J. Boushey, J. Harris, B. Bruemmer, and S. L. Archer, Publishing nutrition research: a review of sampling, sample size, statistical analysis, and other key elements of manuscript preparation, Part 2, *J Am. Diet. Assoc.*, 108 (2008) 679-688.
5. C. Boushey, J. Harris, B. Bruemmer, S. L. Archer, and H. L. Van, Publishing nutrition research: a review of study design, statistical analyses, and other key elements of manuscript preparation, Part 1, *J Am. Diet. Assoc.*, 106 (2006) 89-96.
6. F. J. Schweigert, Nutritional proteomics: methods and concepts for research in nutritional science, *Ann. Nutr Metab*, 51 (2007) 99-107.
7. I. Hoffmann, Transcending reductionism in nutrition research, *Am. J Clin. Nutr*, 78 (2003) 514S-516S.
8. A. Mortensen, I. K. Sorensen, C. Wilde, S. Dragoni, D. Mullerova, O. Toussaint, Z. Zloch, G. Sgaragli, and J. Ovesna, Biological models for phytochemical research: from cell to human organism, *Br. J Nutr*, 99 E Suppl 1 (2008) ES118-ES126.