



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΥΓΕΙΑΣ
Τμήμα Πολιτικών Δημόσιας Υγείας

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΣΤΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ**

ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ: ΠΡΟΑΓΩΓΗ ΥΓΕΙΑΣ ΠΑΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΕΦΗΒΩΝ- ΣΧΟΛΙΚΗ ΥΓΕΙΑ
ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΟ ΕΤΟΣ 2020-2022

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

**Ο επιγενετικός ρόλος της διατροφής στα παιδιά και τους
εφήβους: Συστηματική ανασκόπηση**

Γκιουλέκα Μαρία

AM: mdy20010

Επιβλέπουσα: Ναΐρ Τώνια Βασιλάκου-

Καθηγήτρια Διατροφής Ειδικών Πληθυσμιακών Ομάδων & Δημόσιας Υγείας, Δ/ντρια
ΠΜΣ Δημόσια Υγεία, Τμήμα Πολιτικών Δημόσιας Υγείας, Σχολή Δημόσιας Υγείας,
Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

Αθήνα, Μάιος, 2023



**UNIVERSITY OF WEST ATTICA
SCHOOL OF PUBLIC HEALTH
DEPARTMENT OF PUBLIC HEALTH POLICY**

POSTGRADUATE PROGRAM IN PUBLIC HEALTH (MSc)

**SPECIALIZATION: HEALTH PROMOTION OF CHILDREN AND
ADOLESCENTS - SCHOOL HEALTH**

ACADEMIC YEARS: 2020-2022

Master Thesis

**The epigenetic role of nutrition in children and adolescents: A
systematic review**

Gkiouleka Maria

Mdy20010

Supervisor: NairTonia Vassilakou-

**Professor of Public Health Nutrition, Dept. of Public Health Policy, School
of Public Health, University of West Attica**

Athens, May 2023



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΥΓΕΙΑΣ
Τμήμα Πολιτικών Δημόσιας Υγείας

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΣΤΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ**

ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ: ΠΡΟΑΓΩΓΗ ΥΓΕΙΑΣ ΠΑΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΕΦΗΒΩΝ- ΣΧΟΛΙΚΗ ΥΓΕΙΑ

ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΑ ΈΤΗ: 2020-2022

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Ο επιγενετικός ρόλος της διατροφής στα παιδιά και
τους εφήβους: Συστηματική ανασκόπηση**

Μέλη εξεταστικής επιτροπής

Η μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία εξετάστηκε επιτυχώς από την
κάτωθι Εξεταστική Επιτροπή:

Ναΐρ Τώνια Βασιλάκου	Καθηγήτρια Διατροφής Ειδικών Πληθυσμιακών Ομάδων & Δημόσιας Υγείας, Δ/ντρια ΠΜΣ Δημόσια Υγεία	
Κορνάρου Ελένη	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Επιδημιολογίας στη Δημόσια Υγεία και στις Υπηρεσίες Υγείας	
Σεργεντάνης Θεόδωρος	Επίκουρος Καθηγητής Επιδημιολογίας και Μεθοδολογίας της Έρευνας	

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Γκιουλέκα Μαρία του Ηλία, με αριθμό μητρώου mdy20010, φοιτήτρια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών στη Δημόσια Υγεία του Τμήματος Πολιτικών Δημόσιας Υγείας της Σχολής Δημόσιας Υγείας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι: «Είμαι συγγραφέας αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της, είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Η Δηλούσα



Copyright © Γκιουλέκα Μαρία, 2023

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο των απαιτήσεων του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών στη Δημόσια Υγεία του Τμήματος Πολιτικών Δημόσιας Υγείας της Σχολής Δημόσιας Υγείας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής. Η έγκρισή της δεν υποδηλώνει απαραίτητως και την αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα εκ μέρους του Τμήματος Πολιτικών Δημόσιας Υγείας.

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

«Είμαι συγγραφέας αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας και, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

* Επιθυμώ την απαγόρευση πρόσβασης στο πλήρες κείμενο της εργασίας μου για διάστημα 12 μηνών από την ανάρτησή του και έπειτα από αίτησή μου στη Βιβλιοθήκη και έγκριση της επιβλέπουσας Καθηγήτριας.

Η Επιβλέπουσα

Η Δηλούσα



Τώνια Βασιλάκου

Μαρία Γκιουλέκα

Καθηγήτρια

Βεβαιώνω ότι η παρούσα Διπλωματική Εργασία είναι αποτέλεσμα προσωπικής μου εργασίας και δεν αποτελεί προϊόν αντιγραφής. Στις δημοσιευμένες ή μη δημοσιευμένες πηγές που αναφέρω έχω χρησιμοποιήσει εισαγωγικά όπου απαιτείται και έχω παραθέσει τις πηγές τους στο σχετικό τμήμα της βιβλιογραφίας.

Υπογραφή:



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Η διατροφή συνιστά πρωταρχικό καθοριστή της κατάστασης της υγείας των πληθυσμών. Η Επιγενετική μελετά τις αιτιολογικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των γονιδίων και των βιολογικών προϊόντων τους, με τους μηχανισμούς της να πυροδοτούν τροποποιήσεις στην έκφραση των γονιδίων, χωρίς να προκαλούν αλλαγές στην αλληλουχία του DNA.

Σκοπός: Η διερεύνηση της επιγενετικής επίδραση της διατροφής των παιδιών και των εφήβων στην ανάπτυξη και την υγεία τους.

Υλικό και Μέθοδος: Πραγματοποιήθηκε συστηματική ανασκόπηση της βιβλιογραφίας σύμφωνα με τις αρχές του PRISMA. Η αναζήτηση έγινε στις βάσεις δεδομένων PubMed, Cochrane, Science Direct, Scopus, Google Scholar με καταληκτική ημερομηνία αναζήτησης τις 31/05/2022. Μετά από έλεγχο και αποκλεισμό των μη συναφών μελετών ανασκοπήθηκαν 14 άρθρα.

Αποτελέσματα: Βρέθηκαν δεκατέσσερις πρωτογενείς μελέτες, 7 παρατήρησης και 7 παρέμβασης που πληρούσαν τα κριτήρια της ανασκόπησης. Δύο από τις μελέτες αφορούν στις επιγενετικές τροποποιήσεις που προκύπτουν από τον συνδυασμό διατροφής και άσκησης, ενώ οι υπόλοιπες στον αποκλειστικό ρόλο των διατροφικών συστατικών. Δύο μελέτες αφορούν στη μείωση της σοβαρότητας του συνδρόμου Angelman μέσα από συγκεκριμένες διατροφικές παρεμβάσεις, τρεις μελέτες πραγματεύονται τη χρονική στιγμή έναρξης παρεντερικής διατροφής σε παιδιά νοσηλευόμενα σε ΜΕΘΠ (πρώιμη έναντι όψιμης), μία κλινική δοκιμή αφορά στην ανάλυση αλλαγών στο προφίλ μεθυλίωσης του DNA σε παιδιά με ΔΕΠΥ μετά από χορήγηση συμπληρώματος διατροφής και τρεις μελέτες αναδεικνύουν τους επιγενετικούς δείκτες ως νέα εργαλεία για την κατανόηση και πρόβλεψη της ανταπόκρισης ή μη των συμμετεχόντων στις διατροφικές παρεμβάσεις. Μία μελέτη αφορά στη σχέση μεταξύ διατροφικής πρόσληψης φυτικών ινών, μεθυλίωσης του DNA και εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων, μία αναφορά πραγματεύεται το ρόλο των μικροθρεπτικών συστατικών σε παιδιά με άσθμα και τέλος, μία αναφορά μελετάει τη σχέση μεταξύ πρόσληψης βιταμίνης B12 και διαφορικής μεθυλίωσης γονιδίων που εμπλέκονται στα μεταβολικά μονοπάτια εμφάνισης παχυσαρκίας, αντίστασης στην ινσουλίνη και ΣΔ.

Συμπεράσματα: Στο μέλλον είναι πιθανή η δυνατότητα χρησιμοποίησης των επιγενετικών τροποποιήσεων ως εργαλείων πρόβλεψης της ανταπόκρισης σε παρεμβάσεις αλλαγής του τρόπου ζωής και η εφαρμογή εξατομικευμένων διατροφικών προσεγγίσεων.

ΛΕΞΕΙΣ- ΚΛΕΙΔΙΑ: Επιγενετική, διατροφή, παιδιά, έφηβοι, μεθυλίωση, ακετυλίωση, μη κωδικοποιούντα RNAs, micro RNAs, ιστόνες, μετα- μεταφραστικές τροποποιήσεις, επιγενετικοί μηχανισμοί

ABSTRACT

Introduction: Nutrition plays a crucial role in the quality of life and the total level of health of populations around the world. Epigenetics is the branch of Biology which studies the causal interactions between genes and their products, the mechanisms of which trigger alterations in gene expression and genome activity without causing modifications in the sequence of the DNA.

Objective: To investigate the epigenetic impact of nutrition of children and adolescents on their health and development.

Methods and material: A systematic review of the literature was conducted according to the PRISMA checklist. The search strategy was performed in 5 databases- PubMed, Cochrane, Science Direct, Scopus, Google Scholar; the end date of the search was the 31st/05/2022. After checking titles, abstracts and full texts and excluding non-relevant entries, 14 articles were included in this review.

Results: Among the aforementioned 14 primary studies, seven were observational epidemiological studies and seven were interventional studies. Two of the studies examine the epigenetic alterations occurring from lifestyle interventions that combine changes both in nutrition and in physical activity, while the remaining 12 studies focus solely on the role of food components on the regulation of epigenetic mechanisms. Two of the studies investigate the possibility of alleviation of the severity of Angelman's syndrome through methyl-group donating food interventions, three studies emphasize on the timing of initiation of parenteral nutrition (early vs late) in children and adolescents admitted in PICU and its impact on epigenetic modifications, one study analyzes the changes in the methylation profile in children with ADHD after the administration of food supplements and three of the eligible studies suggest the epigenetic markers as new tools for the comprehension and prediction of the participants' response to the nutritional interventions. One study discusses the relationship between total dietary fiber intake, total methylation levels and the risk of developing cardiovascular diseases, one study analyzes the role of dietary micronutrients in the DNA methylation profiles of children with asthma and lastly, one study examines the interaction between the nutritional intake of B12 and the differentially methylated regions in the most important genes involved in the metabolic pathways of obesity, insulin resistance and T2DM.

Conclusions: In the future, the identification of epigenetic biomarkers could become a very useful tool for either the diagnosis of chronic diseases or the prediction of responsiveness to personalized lifestyle changes, paving the way for new feasible diagnostic methods and novel therapies, suitable to apply in clinical practice.

KEY WORDS: Epigenetics, nutrition, children, adolescents, methylation, acetylation, non- coding RNAs, microRNAs, histones, post-translational alterations, epigenetic mechanisms

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	8
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	10
Κατάλογος πινάκων	12
Κατάλογος γραφημάτων	13
Κατάλογος εικόνων	14
Συνομογραφίες	15
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	17
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	18
A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	21
Κεφάλαιο 1: Ο ρόλος της διατροφής στην υγεία και την ασθένεια	22
Κεφάλαιο 2: Η αλληλεπίδραση των γονιδίων με τη διατροφή	28
Κεφάλαιο 3: Ιστορική αναδρομή και ορισμός της Επιγενετικής	30
Κεφάλαιο 4: Περιβαλλοντική Επιγενετική	33
Κεφάλαιο 5: Μηχανισμοί επιγενετικής τροποποίησης	36
5.1 Μεθυλίωση του DNA	
5.2 Μετα- μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών	
5.3 Μη- κωδικοποιούντα RNA	
Κεφάλαιο 6: Οι επιγενετικοί μηχανισμοί εμπλέκονται στην διεργασία της φλεγμονής	46
Κεφάλαιο 7: Ο ρόλος της διατροφής στην κύηση και τα πρώτα στάδια της ζωής	49
Κεφάλαιο 8: Ο επιγενετικός ρόλος της διατροφής στην μετέπειτα ζωή - Τρέχοντα δεδομένα	57

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	65
Κεφάλαιο 9: Σκοπός	66
Κεφάλαιο 10: Μεθοδολογία	67
Κεφάλαιο 11: Αποτελέσματα	69
11.1 Ο επιγενετικός ρόλος της διατροφής	80
11.2 Ο επιγενετικός ρόλος του συνδυασμού διατροφής και σωματικής δραστηριότητας	100
Κεφάλαιο 12: Συζήτηση	105
Κεφάλαιο 13: Συμπεράσματα- Προτάσεις	112
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ	114
Παράρτημα	116

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 11.1: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων	Σελ. 70
Πίνακας 11.2 Μελέτες κοόρτης και μη- τυχαιοποιημένες κλινικές δοκιμές (Newcastle- Ottawa Scale)	Σελ. 78
Πίνακας 11.3 Μελέτες ασθενών- μαρτύρων (Newcastle- Ottawa Scale)	Σελ. 78
Πίνακας 11.4 Συγχρονικές μελέτες (Newcastle- Ottawa Scale)	Σελ. 78
Πίνακας 11.5 Αξιοπιστία τυχαιοποιημένων κλινικών δοκιμών (Rob 2)	Σελ. 79

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 11.1.: Διάγραμμα ροής για την ανίχνευση και την ένταξη μελετών	Σελ. 69
--	---------

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1: Ποσοστό υπέρβαρων και παχύσαρκων αγοριών 5-16 ετών	Σελ.24
Εικόνα 1.2: Ποσοστό υπέρβαρων και παχύσαρκων κοριτσιών 5-16 ετών	Σελ. 24
Εικόνα 1.3: Επιπλοκές παιδικής παχυσαρκίας	Σελ. 25
Εικόνα 1.4: Αναθεωρημένη Πυραμίδα Μεσογειακής Διατροφής	Σελ. 27
Εικόνα 5.1: Μηχανισμός μεθυσίωσης του μορίου της κυτοσίνης	Σελ. 38
Εικόνα 5.2: Νουκλεόσωμα. Ακετυλίωση και μεθυσίωση των ιστονών.	Σελ. 41
Εικόνα 6.1: Οξεία φλεγμονή	Σελ. 47
Εικόνα 6.2: Χρόνια φλεγμονή	Σελ. 47
Εικόνα 8.1: Μεταβολισμός της ομοκυστεΐνης	Σελ. 58

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

5mC: 5-Methylcytosine

AINS: Anti- inflammatory nutritional supplement

BMI: Body mass index

CpG: Cytosine- phosphate- Guanine

CRP: C- reactive protein

DMR: Differentially Methylated Region

DNA: deoxyribonucleic acid

DNMT: DNA methyltransferase

dPFV: Diurnal peak flow variability

FEV1: Forced expiratory volume in 1 second

HAT: Histone acetyltransferase

HDAC: Histone deacetylase

HDL: High density lipoprotein

HMT: Histone methyltransferase

HOMA-IR: Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance

IFN- γ : Interferon gamma

IL-4: Interleukin 4

LCPUFAs: Long-chain polyunsaturated fatty acids

LDL: Low density lipoprotein

miRNAs: micro RNAs

mRNA: messenger RNA

MUFA: Mono- unsaturated fatty acids

ncRNAs: non coding RNAs

nF- κ B: Nuclear factor kappa B

NOS: Newcastle- Ottawa scale

PAQLQ: Pediatric Asthma Quality of Life Questionnaire

piRNAs: Piwi interacting RNAs

PLS: Preschool Language scale

PUFA: Poly- unsaturated fatty acids

RNA: ribonucleic acid

SAM-e: S-adenosyl-L-methionine

SFA: Saturated fatty acids

siRNAs: Small interfering RNAs

SNPs: Single nucleotide polymorphisms

T2DM: Type 2 diabetes mellitus

TNF-a: Tumor necrosis factor a

VABS: Vineland Adaptive Behavior Scales

ΔΕΠΥ: Διαταραχή ελλειμματικής προσοχής- Υπερκινητικότητα

ΔΜΣ: Δείκτης μάζας σώματος

ΕΠΕ: Εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο

ΙΦΝΕ: Ιδιοπαθή φλεγμονώδη νοσήματα του εντέρου

ΜΔ: Μεσογειακή διατροφή

ΜΕΘ: Μονάδα Εντατικής Θεραπείας

ΜΕΘΠ: Μονάδα Εντατικής Θεραπείας Παιδιών

ΣΔ 2: Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω ειλικρινά την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, κ. Τώνια Βασιλάκου, Καθηγήτρια Διατροφής Ειδικών Πληθυσμιακών Ομάδων και Δημόσιας Υγείας και Διευθύντρια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Δημόσια Υγεία» στο Τμήμα Πολιτικών Δημόσιας Υγείας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, για την εμπιστοσύνη, την καθοδήγηση, την υποστήριξη και την πολύτιμη βοήθεια που μου παρείχε σε όλο το διάστημα εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας. Η συμβολή της ήταν καθοριστική για την ολοκλήρωση της ερευνητικής αυτής προσπάθειας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους διδάσκοντες εισηγητές στο Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών «Δημόσια Υγεία» και ιδιαίτερα την κυρία Κορνάρου Ελένη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Επιδημιολογίας στη Δημόσια Υγεία και στις Υπηρεσίες Υγείας και τον κύριο Σεργεντάνη Θεόδωρο, Επίκουρο Καθηγητή Επιδημιολογίας και Μεθοδολογίας της έρευνας για τις πολύτιμες γνώσεις, τις υποδείξεις, τις χρήσιμες συμβουλές, τις εύστοχες παρατηρήσεις και τις σημαντικές κατευθύνσεις που μου έδωσαν κατά τη διάρκεια της φοίτησής μου. Τέλος, οφείλω να ευχαριστήσω τους αφανείς ήρωες, τον σύζυγο, τους γονείς, την αδερφή και τον αδερφό μου, για την ενθάρρυνση, την εμπύχωση, την στήριξη και την κατανόηση που έδειξαν καθ' όλη τη διάρκεια της φοίτησης, αλλά και της εκπόνησης της εργασίας μου.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο ρόλος της διατροφής στην ανθρώπινη υγεία είναι καταλυτικός και αδιαμφισβήτητος. Αφενός μεγάλες πληθυσμιακές ομάδες υποφέρουν από υποσιτισμό και έλλειψη βασικών θρεπτικών συστατικών, αφετέρου πληθυσμοί που ακολουθούν τον Δυτικό τρόπο ζωής με αυξημένη ενεργειακή πρόσληψη κατανάλωση αυξημένων θερμίδων και μειωμένη σωματική δραστηριότητα υποφέρουν από σοβαρά νοσήματα, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης και η παχυσαρκία (1,2). Τα τρέχοντα ερωτήματα που αφορούν στην έρευνα γύρω από την διατροφή έχουν στόχο να δώσουν απαντήσεις σχετικά με συγκεκριμένα διαιτητικά συστατικά, όπως τα βιοενεργά πεπτίδια, οι πρωτεΐνες, καθώς και οι δευτερογενείς μεταβολίτες, τα οποία δεν αποσκοπούν μόνο στην κάλυψη των ενεργειακών θερμιδικών αναγκών, αλλά χαρακτηρίζονται από ευρύ φάσμα ανοσοτροποποιητικών, αντιοξειδωτικών, οστεοπροστατευτικών, αντιλιπιδαιμικών, αντιθρομβωτικών και αντιμικροβιακών ιδιοτήτων (3,4). Παράλληλα, έρευνες στρέφονται στην διαμόρφωση μεθόδων παρακολούθησης ειδικών βιοδεικτών, προκειμένου να σχεδιαστούν κατάλληλες και αποτελεσματικές διαιτητικές παρεμβάσεις (3).

Η Επιγενετική αποτελεί κλάδο της Βιολογίας που μελετά τις αιτιολογικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των γονιδίων και των βιολογικών προϊόντων τους και συνιστά επιπρόσθετο στάδιο στην διαδικασία διαμόρφωσης του γονιδιώματος, καθοδηγώντας την μετάβαση από τον γονότυπο στον φαινότυπο του ατόμου (5). Οι μηχανισμοί της Επιγενετικής πυροδοτούν τροποποιήσεις στην έκφραση των γονιδίων είτε ενεργοποιώντας είτε αποσιωπώντας τα, χωρίς ωστόσο να σημειώνονται αλλαγές στην αλληλουχία του DNA. Οι κύριοι επιγενετικοί μηχανισμοί που διαμορφώνουν την επιγενετική κατάσταση του γονιδιώματος περιλαμβάνουν την μεθυλίωση του DNA, την τροποποίηση των ιστονών (ακετυλίωση, μεθυλίωση, φωσφορυλίωση) και τα μη κωδικοποιούντα RNAs (πχ. miRNAs) (5). Η επιγενετική, όπως και η γενετική πληροφορία, είναι κληρονομούμενη, αλλά σε αντίθεση με τη γενετική πληροφορία η οποία δεν αναστρέφεται, χαρακτηρίζεται από επιγενετική πλαστικότητα, καθώς είναι αναστρέψιμη και μπορεί να επηρεαστεί από διάφορα περιβαλλοντικά ερεθίσματα (6). Η Περιβαλλοντική Επιγενετική αναφέρεται στον τρόπο με τον οποίο

η έκθεση του ατόμου σε περιβαλλοντικούς παράγοντες επιδρά κι επηρεάζει τους επιγενετικούς μηχανισμούς. Οι παράγοντες αυτοί περιλαμβάνουν συμπεριφορές, όπως η διατροφή και η σωματική άσκηση αλλά και την έκθεση σε περιβαλλοντικούς ρύπους (7). Με άλλα λόγια, ο τρόπος ζωής μας διαμορφώνει το ποιοι είμαστε, μεταβάλλοντας το επιγονιδίωμα και ως αποτέλεσμα την υγεία μας. Παράλληλα, τόσο η διατροφή της γυναίκας κατά την περίοδο της κύησης όσο και τα περιβαλλοντικά ερεθίσματα κατά τη διάρκεια της προγεννητικής και πρώιμης μεταγεννητικής περιόδου ανάπτυξης του εμβρύου και του νεογνού μπορούν να προκαλέσουν μόνιμες αλλαγές, οι οποίες δημιουργούν με την σειρά τους την προδιάθεση για εμφάνιση ασθενειών στην ενήλικη ζωή του απογόνου (8). Ωστόσο, παρά το ότι η μητρική διατροφή αποτελεί έναν από τους καλύτερα μελετημένους μηχανισμούς επιγενετικής τροποποίησης του εμβρύου και του νεογνού, στην παρούσα εργασία το ενδιαφέρον θα επικεντρωθεί στον ρόλο της διατροφής των παιδιών και των εφήβων στην ρύθμιση των επιγενετικών μηχανισμών μετά το πρώτο έτος ζωής.

Στο Γενικό Μέρος η διπλωματική αυτή εργασία αρχίζει περιγράφοντας τον ρόλο της διατροφής στην ανθρώπινη υγεία και την πρόληψη της ασθένειας, προχωρά στην περιγραφή της αλληλεπίδρασης των γονιδίων με την διατροφή, συνεχίζει δίνοντας τον ορισμό και κάνοντας μία σύντομη ιστορική αναδρομή στις αρχές της Επιγενετικής, περιγράφοντας την άρρηκτη σύνδεσή της με τον κλάδο της Αναπτυξιακής Βιολογίας, αναλύει τους κύριους μηχανισμούς επιγενετικής τροποποίησης, επεξηγεί πώς οι μηχανισμοί αυτοί εμπλέκονται στην διεργασία της φλεγμονής, κι έπειτα προχωρά σε ανασκόπηση της σχετικής βιβλιογραφίας για την επίδραση των διατροφικών παραγόντων στην ρύθμιση των επιγενετικών μηχανισμών, πρώτα κατά την κύηση και τα αρχικά στάδια της ζωής και στην συνέχεια στα επόμενα στάδια αύξησης και ανάπτυξης του οργανισμού.

Στο Ειδικό Μέρος σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να συνοψίσει την υπάρχουσα γνώση μέσα από συστηματική ανασκόπηση της τρέχουσας βιβλιογραφίας σχετικά με την επίδραση της διατροφής των παιδιών και των εφήβων στην διαδικασία της φλεγμονής μέσω επιγενετικών τροποποιήσεων, οδηγώντας στην ανάπτυξη χρόνιων νοσημάτων και θέτοντας σε κίνδυνο την υγεία τους. Η γνώση των επιγενετικών αυτών μηχανισμών μπορεί να οδηγήσει στην εφαρμογή εξατομικευμένων

προγραμμάτων διατροφής, με σκοπό την πρόληψη ή την πιο αποτελεσματική διαχείριση των χρόνιων φλεγμονωδών νοσημάτων, δίνοντας νέα πνοή και προοπτική στον τομέα της πρόληψης, της διάγνωσης και της θεραπείας, καθώς τα εργαλεία της Επιγενετικής μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως προγνωστικοί, διαγνωστικοί αλλά και θεραπευτικοί δείκτες.

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1.

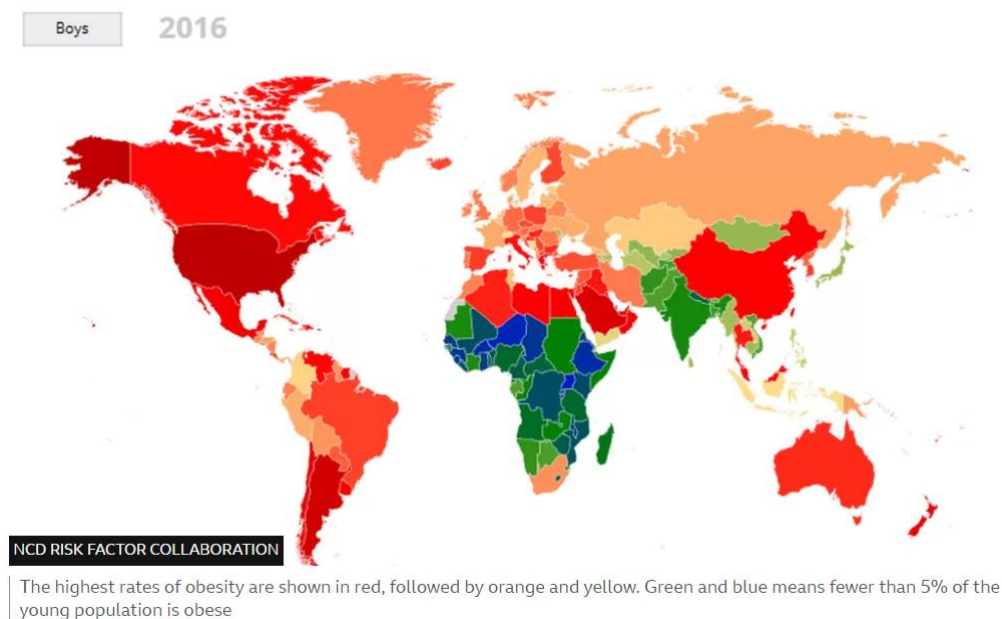
Ο ρόλος της διατροφής στην υγεία και την ασθένεια

Το 1848 ο Γερμανός φιλόσοφος Ludwig Feuerbach ισχυρίστηκε πως οι άνθρωποι είμαστε ό,τι τρώμε (9). Πράγματι, πολλά χρόνια μετά τον ισχυρισμό αυτό, καθίσταται σαφές πως η διατροφή συνιστά πρωταρχικό καθοριστή της κατάστασης της υγείας μας και ως αποτέλεσμα, της ποιότητας ζωής μας. Διάφοροι διατροφικοί παράγοντες έχουν συσχετισθεί με προφλεγμονώδεις δυναμικό και συγκεκριμένα, το Δυτικό πρότυπο διατροφής έχει βρεθεί ότι προκαλεί μία χρόνια φλεγμονώδη κατάσταση, η οποία προδιαθέτει στην εμφάνιση ασθενειών (10), καθώς περιλαμβάνει διατροφικές συνήθειες όπως αυξημένη κατανάλωση λιπαρών και ζάχαρης, κατάχρηση αλκοόλ, αυξημένη πρόσληψη επεξεργασμένων τροφίμων και μειωμένη πρόσληψη φρούτων και λαχανικών, οι οποίες αποτελούν μετρήσιμους παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση μη μεταδοτικών νοσημάτων που χαρακτηρίζονται από αυξημένη αρτηριακή πίεση, υψηλά επίπεδα σακχάρου και χοληστερόλης στο αίμα και παχυσαρκία (11,12). Αντίθετα, πιο υγιεινά διατροφικά πρότυπα, όπως αυτό της Μεσογειακής διατροφής (ΜΔ), έχει βρεθεί πως σχετίζονται σε μικρότερο βαθμό με τους κινδύνους της φλεγμονώδους απόκρισης (2,13).

Τις τελευταίες δεκαετίες μάλιστα, διάφοροι περιβαλλοντικοί και κοινωνικοί παράγοντες, που έχουν την προέλευσή τους στην ραγδαία οικονομική ανάπτυξη και την απουσία ουσιώδους σχεδιασμού υποστηρικτικών πολιτικών πρόληψης στους τομείς της παιδείας, της υγείας, των μεταφορών, της κλιματικής αλλαγής, της περιβαλλοντικής προστασίας, καθώς και της επεξεργασίας, διανομής και διαφήμισης των τροφίμων συμβάλλουν στην αλλαγή αυτή που παρατηρείται στα πρότυπα της διατροφής και της σωματικής δραστηριότητας (12). Έτσι, ενώ μεγάλες και ουσιώδεις τροποποιήσεις έχουν σημειωθεί τόσο στον τρόπο ζωής όσο και στις διατροφικές συνήθειες των ανθρώπων παγκοσμίως, δεν μεταβάλλεται με παρόμοιο ρυθμό και στον ίδιο βαθμό η γενετική υπογραφή και ταυτότητα των ατόμων. Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία ανισορροπίας μεταξύ της θερμιδικής πρόσληψης και της ενεργειακής κατανάλωσης, γεγονός που οδηγεί στην αύξηση του επιπολασμού των υπέρβαρων και παχύσαρκων ενηλίκων, εφήβων και παιδιών. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, η επίπτωση της παχυσαρκίας σε παιδιά κι εφήβους

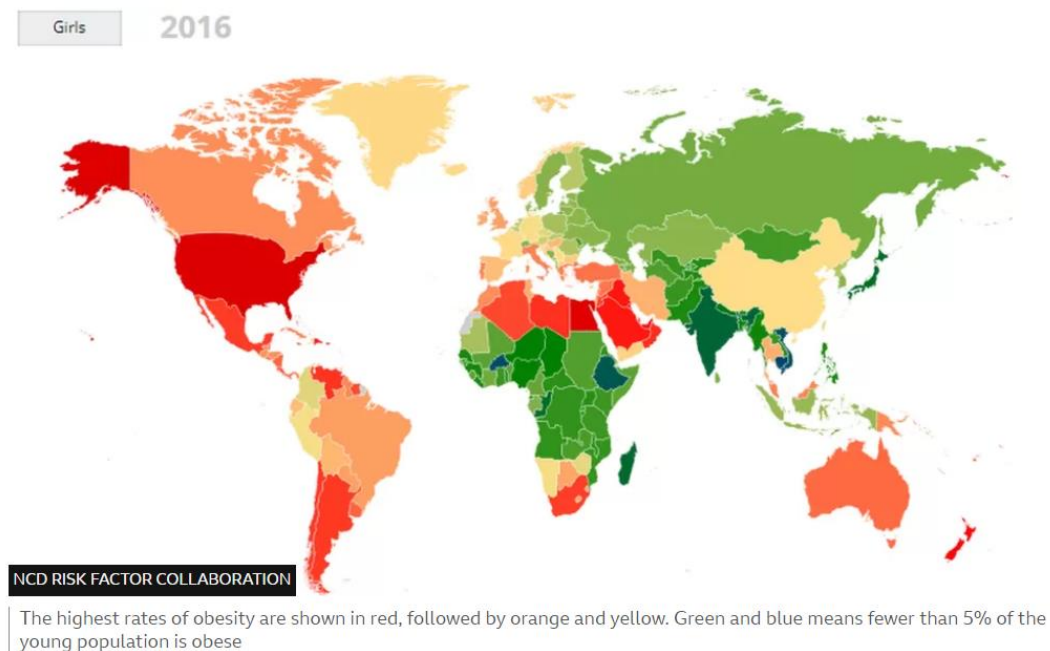
είχε σχεδόν τριπλασιαστεί από το 1975 έως το 2016, καθώς αυξήθηκε από 4% σε σχεδόν 18%(14). Κατά το έτος 2016, περισσότερα από 340 εκατομμύρια παιδιά κι έφηβοι ηλικίας 5 έως 19 ετών βρέθηκαν να είναι υπέρβαρα ή παχύσαρκα, με τα ποσοστά να είναι παρόμοια ανάμεσα στα 2 φύλα (19% των αγοριών και 1% των κοριτσιών, εικ.1, 2) (15), ενώ το έτος 2020 39 εκατομμύρια παιδιά μικρότερα των 5 ετών βρέθηκε πως ήταν υπέρβαρα ή παχύσαρκα, γεγονός που αποτελεί σοβαρότατη κρίση δημόσιας υγείας, καθώς είναι καθολικά αποδεκτό πως ένα παχύσαρκο παιδί είναι πολύ πιθανό να εξελιχθεί σε παχύσαρκο ενήλικα (15). Στον πληθυσμό αυτό, η παχυσαρκία συνιστά προδιαθεσικό παράγοντα αυξημένου κινδύνου για την εμφάνιση επιπλοκών, όπως καρδιοαναπνευστικά, μυοσκελετικά, ψυχικά και ψυχολογικά προβλήματα οφειλόμενα σε χαμηλή ακαδημαϊκή απόδοση και οικονομικές διακρίσεις, ενώ παράλληλα αυξάνει σημαντικά την πιθανότητα εμφάνισης χρόνιων εκφυλιστικών μη μεταδοτικών νοσημάτων στη μετέπειτα ζωή- ακόμη και πρόωρου θανάτου (16) (εικ.3), γιατί οι σχετιζόμενες με την παχυσαρκία επιπλοκές συνδέονται με την χαμηλού βαθμού φλεγμονώδη διεργασία που λαμβάνει χώρα στον λιπώδη ιστό. Πιο συγκεκριμένα, στα κύτταρα του λιπώδους ιστού των παχύσαρκων ατόμων παρατηρείται διαταραχή στην παραγωγή κυτταροκινών και πρωτεϊνών που σχετίζονται με προφλεγμονώδες δυναμικό, όπως οι ιντερλευκίνες IL-6, IL-8, IL-18, η λεπτίνη, ο παράγοντας νέκρωσης όγκου α (Tumor Necrosis Factor alpha, TNF- α) και της χημειοκίνης C-C motif ligand 2 (CCL2) (16).

Εικόνα 1. Ποσοστό υπέρβαρων και παχύσαρκων αγοριών 5-16 ετών



Πηγή: World Health Organization

Εικόνα 1.2 Ποσοστό υπέρβαρων και παχύσαρκων κοριτσιών 5-16 ετών



Πηγή: World Health Organization

Εικόνα 1.3. Επιπλοκές παιδικής παχυσαρκίας



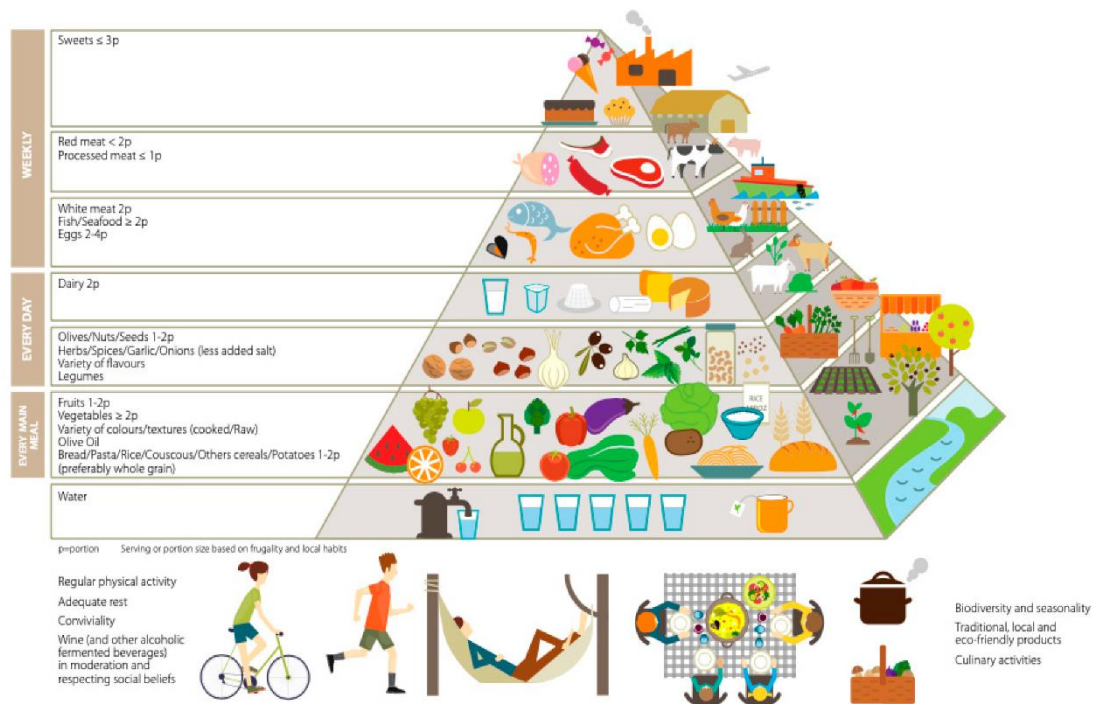
Πηγή: *Front Pediatr* 2020 (17)

Αρκετές τυχαιοποιημένες κλινικές δοκιμές έχουν δείξει πως οι διατροφικές συνήθειες, σε συνδυασμό με τη σωματική δραστηριότητα μπορούν να επηρεάσουν τους τροποποιήσιμους παράγοντες κινδύνου των μη μεταδιδόμενων νοσημάτων, μέσα από την παρουσία χρόνιας μικρού βαθμού φλεγμονής, μηχανισμών επιγενετικής τροποποίησης, αλλά και μεταβολών του κερκάδιου ρυθμού (18). Από τη δεκαετία του 1950 διάφορες μελέτες έχουν εστιάσει στη ΜΔ ως το διατροφικό μοντέλο αναφοράς για την πρόληψη των μη μεταδιδόμενων νοσημάτων, η οποία μάλιστα αναγνωρίστηκε το 2010 ως αγαθό της Άυλης Πολιτιστικής Κληρονομιάς της Unesco (19). Το διατροφικό αυτό μοντέλο, που έχει τις ρίζες του στην κουλτούρα και τον τρόπο ζωής των λαών που ζουν γύρω από τη λεκάνη της Μεσογείου, χαρακτηρίζεται από αυξημένη πρόσληψη φρούτων, λαχανικών, σπόρων, δημητριακών, ψαριού κι ελαιόλαδου (πηγή μονοακόρεστων λιπαρών οξέων), μέτρια κατανάλωση λευκού κρέατος (κοτόπουλου), αυγών, γαλακτοκομικών προϊόντων και

κόκκινου κρασιού και χαμηλή πρόσληψη κόκκινου κρέατος και ζωικού λίπους (20) (εικ.4). Η μελέτη που πρώτη χαρακτήρισε τη Μεσογειακή Διατροφή και αναγνώρισε τον προστατευτικό ρόλο της ενάντια στην εμφάνιση της στεφανιαίας νόσου ήταν η μελέτη των 7 χωρών για τα καρδιαγγειακά νοσήματα (20). Επίσης, η προοπτική μελέτη κοόρτης που πραγματοποιήθηκε από την Τριχοπούλου και συν., η οποία περιελάμβανε 182 ενήλικες ηλικίας άνω των 70 ετών που κατοικούσαν σε 3 χωριά της Ελλάδας, ήταν η πρώτη αναλυτική επιδημιολογική μελέτη που κατέγραψε τη συσχέτιση μεταξύ ενός καθορισμένου διατροφικού προτύπου, αυτού της ΜΔ, με τη συνολική επιβίωση των συμμετεχόντων (21). Τα αποτελέσματά της έδειξαν ότι ακολουθώντας ένα συγκεκριμένο πρότυπο διατροφής, το οποίο αντανάκλούσε την ελληνική εκδοχή της ΜΔ, επηρεάστηκε θετικά το προσδόκιμο επιβίωσης των συμμετεχόντων στη μελέτη και μάλιστα υπογραμμίστηκε πως τα επίπεδα μακροζωίας του Μεσογειακού αυτού λαού μπορούσαν να εξηγηθούν από το συνδυασμό των τροφίμων που περιλαμβάνονται στη ΜΔ και όχι από κάθε διατροφικό θρεπτικό συστατικό ξεχωριστά (21). Στην πραγματικότητα, η θετική επίδραση της ΜΔ στην υγεία εστιάζεται όχι μόνο στην πρωτογενή αλλά και στη δευτερογενή πρόληψη (11).

Συμπερασματικά, γίνεται σαφές πως η διατροφή παίζει βαρυσήμαντο ρόλο στην υγεία και την πρόληψη της ασθένειας σε παγκόσμια κλίμακα, καθώς οι σύνθετες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συστατικών των τροφών και των επιγενετικών τροποποιήσεων διαμορφώνουν τον κυτταρικό φαινότυπο μέσα από μια δυναμική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (22). Έτσι, ένα κατάλληλα διαμορφωμένο διατροφικό πρότυπο συνιστάται ως προστατευτικός παράγοντας ενάντια στην εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων, καρκίνου, σακχαρώδη διαβήτη και άλλων παθήσεων, που αποτελούν πρωταρχικές αιτίες νοσηρότητας και θνησιμότητας παγκοσμίως (11). Εάν μάλιστα, τα σωστά διατροφικά πρότυπα εισαχθούν από νωρίς στην παιδική ηλικία και εφαρμοστούν με ορθές μεθόδους και όχι πρακτικές επιβολής, ο ρόλος τους στην πρόληψη σοβαρών μη μεταδιδόμενων ασθενειών μπορεί να αποδειχθεί θεμελιώδης, οδηγώντας σε σημαντική μείωση της θνησιμότητας, αλλά και των σχετιζόμενων με τη Δημόσια Υγεία δαπανών (23).

Εικόνα 1.4. Αναθεωρημένη Πυραμίδα Μεσογειακής Διατροφής



Πηγή: World Health Organization

Κεφάλαιο 2.

Η αλληλεπίδραση των γονιδίων με τη διατροφή

Αδιαμφισβήτητο είναι το γεγονός πως τα γονίδια με την γενετική πληροφορία που μεταφέρουν είναι σε θέση να επηρεάσουν την απορρόφηση, τον μεταβολισμό, την μεταφορά, την ανακατανομή και τον τόπο δράσης συγκεκριμένων βιοενεργών συστατικών που περιέχονται στις τροφές ή ακόμη και σε φαρμακευτικές ουσίες, επηρεάζοντας την γενικευμένη απάντηση του οργανισμού στην διατροφή ή στην εφαρμογή φαρμακευτικής θεραπείας (24). Παρόμοια και αμοιβαία φαίνεται όμως πως είναι η επίδραση των ίδιων των βιοενεργών συστατικών των τροφίμων στην τροποποίηση της έκφρασης της γενετικής πληροφορίας και στους ρυθμιστικούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στα μοριακά μονοπάτια, επηρεάζοντας με τον τρόπο αυτό την κλινική έκβαση και την συνολική επιβίωση (24). Θα πρέπει να γίνει λοιπόν κατανοητό πως το σύνολο των γονιδίων ενός ατόμου αλληλεπιδρά με την διατροφή του, καθώς από την μία πλευρά επηρεάζει την απορρόφηση και δράση των συστατικών των τροφών, ενώ από την άλλη επηρεάζεται από τις διατροφικές επιλογές του, καθώς οι τροφές που καταναλώνονται έχουν την ικανότητα να μεταβάλλουν την κατάσταση λειτουργίας των γονιδίων, ενεργοποιώντας τα, αδρανοποιώντας τα ή μεταβάλλοντας την δομή πρωτεϊνών που έχουν ήδη σχηματισθεί με διεργασίες όπως η γλυκοζυλίωση και η φωσφορυλίωση. Έτσι, ενώ παραδοσιακά, το ερευνητικό ενδιαφέρον γύρω από τη διατροφή εστιαζόταν αποκλειστικά στην παροχή ικανοποιητικής ποσότητας τροφίμων και θρεπτικών συστατικών στον πληθυσμό, σήμερα είναι καθολικά αποδεκτό πως η διατροφή είναι ένας τροποποιήσιμος παράγοντας κινδύνου που έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά τόσο με το γονιδίωμα όσο και με το επιγονιδίωμα του ατόμου και να επηρεάζει την υγεία του.

Επιπρόσθετα, με τα εργαλεία που προσφέρουν οι σύγχρονες τεχνολογίες, οι επιστήμες της Διατροφογενετικής και της Διατροφογενωμικής, αλλά και η Ιατρική της Ακριβείας, δίνεται η δυνατότητα μελέτης της έκφρασης χιλιάδων γονιδίων σε μεγάλη κλίμακα, ανάλυσης του πρωτεώματος και μέτρησης των ενδογενών μεταβολικών προϊόντων, αναδεικνύοντας την συσχέτισή τους με την διατροφή και την υγεία ή την

ασθένεια. Με τον όρο Διατροφογενετική ορίζεται το επιστημονικό πεδίο που μελετά την αντίδραση του οργανισμού στα διάφορα θρεπτικά συστατικά της διατροφής ανάλογα με το γενετικό υπόβαθρο και τις γενετικές παραλλαγές που διαθέτει [στη μορφή των μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (single nucleotide polymorphisms, SNPs)], αλλά και τις επιπτώσεις της αλληλεπίδρασης αυτής, την επίδραση στην κατάσταση της υγείας του και την προδιάθεση για σχετιζόμενες με τη διατροφή ασθένειες (24). Εστιάζει στην μοναδικότητα του κάθε ατόμου, καθώς οι διαφορετικές εκδοχές ενός γονιδίου μεταξύ των ατόμων είναι ικανές να πυροδοτήσουν διαφορετική απόκριση στα ίδια συστατικά των τροφίμων που καταναλώνονται, όπως στην καφεΐνη, την λακτόζη, την γλουτένη και άλλα μακρο- και μικροθρεπτικά συστατικά. Από την άλλη, με τον όρο Διατροφογενωμική ορίζεται το επιστημονικό πεδίο που ερευνά τον ρόλο των θρεπτικών συστατικών των τροφίμων στην έκφραση και λειτουργία των γονιδίων του ατόμου και εστιάζει στον τρόπο με τον οποίο η διατροφή μπορεί να επηρεάσει την γενετική πληροφορία (24). Παρά το γεγονός, λοιπόν, πως η γενετική υπογραφή κάθε ατόμου είναι ξεχωριστή και αμετάβλητη, το περιβάλλον, και ειδικότερα ο αποκλεισμός ή η κατανάλωση συγκεκριμένων θρεπτικών συστατικών, φαρμακευτικών ουσιών, συμπληρωμάτων διατροφής κλπ., έχουν την ικανότητα να επηρεάσουν την γονιδιακή έκφραση, παρεμβαίνοντας έτσι στην γενετική προδιάθεση και την εμφάνιση παθολογιών ή στην διατήρηση της υγείας στο βέλτιστο επίπεδο.

Κεφάλαιο 3.

Ιστορική αναδρομή και ορισμός της Επιγενετικής

Μέχρι το πρώτο μισό του 20^{ου} αιώνα η Αναπτυξιακή Βιολογία και η Γενετική θεωρούνταν δύο ξεχωριστά επιστημονικά πεδία. Προς τα μέσα του αιώνα ορισμένοι πρωτοπόροι βιολόγοι έφτασαν στην συνειδητοποίηση πως οι δύο αυτοί κλάδοι είναι αλληλένδετοι και θα πρέπει να μελετώνται ως ενιαίο γνωστικό αντικείμενο (25). Η συνειδητοποίηση ότι η αλληλουχία του DNA δεν είναι ο μοναδικός καθοριστής του κλινικού φαινότυπου του ατόμου υπήρξε αποτέλεσμα παρατήρησης, καθώς μονοζυγωτικά δίδυμα αδέρφια που φέρουν τον ίδιο γονότυπο (δηλαδή το ίδιο DNA) παρουσιάζουν συχνά διαφορές στον φαινότυπο, με τον έναν αδελφό να εμφανίζει συγκεκριμένη ασθένεια και τον άλλο να είναι απόλυτα υγιής (26,27). Ο όρος «Επιγενετική» χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Βρετανό εμβρυολόγο Conrad Waddington, Καθηγητή Γενετικής στο Πανεπιστήμιο του Εδιμβούργου, το 1942, ο οποίος εισήγαγε τον όρο «επιγενετικό τοπίο», για να περιγράψει τους μοριακούς και βιολογικούς μηχανισμούς που είναι υπεύθυνοι για την μετατροπή ενός γονοτυπικού σε ένα φαινοτυπικό χαρακτηριστικό, γεφυρώνοντας τους δύο επιστημονικούς κλάδους (28). Ο Waddington χρησιμοποίησε δηλαδή την Επιγενετική, με σκοπό να αναλύσει τον κλάδο της Βιολογίας που μελετά τις αιτιώδεις συσχετίσεις μεταξύ των γονιδίων και των προϊόντων τους, οι οποίες επιδρούν στην έκφραση του φαινότυπου (29). Δημιούργησε μοντέλα σχετικά με τον τρόπο με τον οποίο προϊόντα της γονιδιακής ρύθμισης θα μπορούσαν να προκαλέσουν αναπτυξιακά φαινόμενα και- σύμφωνα με την μοριακή βάση των παρατηρήσεών του μέσω συστηματικής ανάλυσης μεταλλάξεων στη μορφολογία των πτερών του γένους *Drosophila melanogaster*- κατέληξε στο συμπέρασμα πως το περιβαλλοντικό στρες προκάλεσε γενετική αφομοίωση ορισμένων φαινοτυπικών χαρακτηριστικών στα μέλη της *Drosophila* (30).

Με την αρχική της έννοια, η Επιγενετική είχε οριστεί ως το σύνολο των μηχανισμών που ήταν υπεύθυνοι για την επίδραση της γενετικής πληροφορίας στην αναπτυξιακή διαδικασία- δηλαδή για τον τρόπο με τον οποίο τα αναπτυξιακά φαινόμενα οδηγούσαν το γονιμοποιημένο ζυγωτό στην εξέλιξή του προς ώριμο οργανισμό,

ξεκινώντας από το γενετικό υλικό και καταλήγοντας στο τελικό προϊόν (25). Με αυτή την έννοια δηλαδή, η Επιγενετική αναφερόταν σε όλα τα μοριακά μονοπάτια που μπορούσαν να τροποποιήσουν την έκφραση του γονότυπου προς έναν συγκεκριμένο φαινότυπο. Τις τελευταίες δεκαετίες, ωστόσο, με τη ραγδαία εξέλιξη της Γενετικής, ο ορισμός της Επιγενετικής έχει αποκτήσει μία περισσότερο εξειδικευμένη διάσταση, καθώς αναφέρεται μόνο στη μελέτη των αλλαγών της γονιδιακής λειτουργίας που κληρονομούνται μέσω μιτωτικών ή/και μειωτικών μηχανισμών και δεν μπορούν να εξηγηθούν από αλλαγές στη νουκλεοτιδική αλληλουχία (25). Πρόκειται ουσιαστικά για κληρονομήσιμες φαινοτυπικές αλλαγές, οι οποίες δεν τροποποιούν την αλληλουχία των βάσεων του DNA (δηλαδή τον γονότυπο), αλλά προκαλούν χημικές τροποποιήσεις του DNA ή των δομικών και ρυθμιστικών πρωτεϊνών, επηρεάζοντας με τον τρόπο αυτό την γονιδιακή έκφραση. Με άλλα λόγια, «επιγενετικό χαρακτηριστικό» είναι ένα σταθερά κληρονομούμενο φαινοτυπικό χαρακτηριστικό που οφείλεται σε αλλαγή στα χρωμοσώματα από την αλληλεπίδρασή τους με περιβαλλοντικούς παράγοντες, χωρίς μεταβολή της ακολουθίας του DNA (5).

Παρά το γεγονός ότι τροποποιήσεις στις βάσεις του DNA είχαν περιγραφεί ήδη από το 1948 (31), ήταν το 1969 όταν οι Griffith και Mahler διατύπωσαν την υπόθεση ότι αυτές οι τροποποιήσεις μπορούν να ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση (32), αποδεικνύοντας τον ρόλο της μεθυλίωσης του DNA στην λειτουργία της μακροπρόθεσμης μνήμης (33). Το 1975 δύο επιστημονικά άρθρα από τους Holliday, Pugh, Riggs και συν. κατόρθωσαν να αποδείξουν την αναπόσπαστη σύνδεση της Επιγενετικής με τη μεθυλίωση του DNA, καθώς κατέληξαν στο συμπέρασμα πως αυτή η μεταβολή της δομής του DNA αποτελεί έναν μηχανισμό επιγενετικής τροποποίησης, ο οποίος ρυθμίζει την αδρανοποίηση του X χρωμοσώματος και κατά συνέπεια την γονιδιακή έκφραση (34,35). Έτσι, για πρώτη φορά οι επιστήμονες κατάφεραν να συνδέσουν τις κυτταρικές και φαινοτυπικές ιδιότητες ενός οργανισμού με διαφορές σε μοριακό επίπεδο, αρχίζοντας από τη μεθυλίωση του DNA και περιλαμβάνοντας τελικά όλες τις τροποποιήσεις του DNA και της χρωματίνης, οι οποίες μεταβάλλουν την γονιδιακή λειτουργία (25). Η τροποποίηση, λοιπόν, της γονιδιακής έκφρασης είναι ο τρόπος με τον οποίο η νουκλεοτιδική αλληλουχία

μπορεί να οδηγήσει στην διέγερση ή καταστολή μορίων ή βιολογικών μονοπατιών, τα οποία με τη σειρά τους καταλήγουν στην εμφάνιση ή μη ασθενειών.

Κεφάλαιο 4.

Περιβαλλοντική Επιγενετική

Κεντρικό δόγμα της Γενετικής αποτέλεσε επί χρόνια η παραδοχή πως η γενετική πληροφορία ρέει μόνο προς μία κατεύθυνση- από το DNA στο RNA και στη συνέχεια στον σχηματισμό των πρωτεϊνών (36), ενώ για πολλές δεκαετίες στο παρελθόν οι επιστήμονες επιχειρούσαν να συνδέσουν την εμφάνιση ασθενειών και διαταραχών είτε μόνο με γενετικούς είτε μόνο με περιβαλλοντικούς παράγοντες. Χάρη στην σύγχρονη επιστημονική γνώση ωστόσο, το δόγμα αυτό έχει αμφισβητηθεί και καταρριφθεί, καθώς μετά το 2ο μισό του 20ου αιώνα ο ρόλος της Επιγενετικής στην εμφάνιση νοσημάτων άρχισε να αποκτά υπόσταση κερδίζοντας ολοένα και περισσότερο έδαφος στα συμπεράσματα της επιστημονικής κοινότητας, ειδικά όσον αφορά στην εμφάνιση σύνθετων νοσημάτων, όπως οι νευροεκφυλιστικές νόσοι, ο καρκίνος, τα αυτοάνοσα νοσήματα, οι ψυχικές διαταραχές, η νοητική υστέρηση, τα διάφορα χρωμοσωμικά σύνδρομα, αλλά και στην διαμόρφωση της συμπεριφοράς και της μακροπρόθεσμης μνήμης (5). Οι επιστήμονες έχουν καταλήξει εδώ και λίγα χρόνια στο συμπέρασμα πως οι διεργασίες της διαίρεσης και διαφοροποίησης ενός κυττάρου κατά την διάρκεια της εμβρυογένεσης είναι άρρηκτα συνυφασμένες με τους μηχανισμούς της Επιγενετικής (37). Είναι γνωστό πλέον πως το προφίλ της μεθυλίωσης του DNA αρχίζει να δημιουργείται από τα πρώτα στάδια της ανάπτυξης του ατόμου, καθώς συμμετέχει στην εγκατάσταση και διατήρηση των κυτταρικών σειρών, ενώ μπορεί να υποστεί μεταβολές στα επόμενα στάδια της ζωής (38). Οι επιγενετικοί μηχανισμοί, λοιπόν, εμπλέκονται και στην ενδομήτρια ανάπτυξη του εμβρύου, με αποτέλεσμα οι διάφορες περιβαλλοντικές εκθέσεις να μπορούν δυνητικά να επηρεάσουν αρνητικά το έμβρυο, διαταράσσοντας το επιγονιδίωμα του αναπτυσσόμενου οργανισμού και μεταβάλλοντας τον κίνδυνο εμφάνισης ασθένειας στη μετέπειτα ζωή του (39). Μια διαταραχή στο επιγενετικό προφίλ του ατόμου μπορεί να έχει σημαντική επίδραση στην κυτταρική λειτουργία, οδηγώντας σε διαταραχή της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης και σε πιθανή διαταραχή της κατάστασης της υγείας του με εμφάνιση κάποιας «επιγενετικής» ασθένειας (5).

Το γεγονός ότι ο ρόλος του περιβάλλοντος στην διαμόρφωση της γονιδιακής έκφρασης είναι πλέον αδιαμφισβήτητος (29), αποδεικνύεται και από το γεγονός ότι στους πολυκύτταρους οργανισμούς, πολλοί και διαφορετικοί φαινότυποι είναι δυνατόν να προέλθουν από τον ίδιο γονότυπο, λόγω της δράσης των επιγενετικών μηχανισμών (40). Ως αποτέλεσμα,- όπως αναφέρθηκε προηγουμένως- μονοζυγωτικά δίδυμα αδέρφια που φέρουν ακριβώς το ίδιο γενετικό υλικό (δηλ. γονότυπο) μπορεί να έχουν διαφορετικό επιγενετικό προφίλ, το οποίο καθορίζεται από το περιβάλλον στο οποίο ζουν και μεγαλώνουν και το οποίο με τη σειρά του μπορεί να οδηγήσει σε διαφορές όσον αφορά στην κατάσταση της υγείας τους, αλλά και στην εμφάνιση ασθενειών (δηλαδή φαινότυπο) (40). Με άλλα λόγια, οι μηχανισμοί της επιγενετικής τροποποίησης αποτελούν την απάντηση στο ερώτημα της δημιουργίας πολλών διαφορετικών φαινότυπων από τον ίδιο γονότυπο και παίζουν σπουδαίο ρόλο στις διαδικασίες της κυτταρικής διαίρεσης και διαφοροποίησης.

Η Περιβαλλοντική Επιγενετική είναι ο κλάδος της Επιγενετικής που περιγράφει το πώς οι περιβαλλοντικοί παράγοντες επηρεάζουν τους επιγενετικούς μηχανισμούς σε κυτταρικό επίπεδο και κατά συνέπεια διαμορφώνουν την κατάσταση της υγείας του ατόμου (39). Περιβαλλοντικοί παράγοντες με επιγενετική δράση περιλαμβάνουν συμπεριφορές, όπως η διατροφή, το κάπνισμα και η σωματική άσκηση, αλλά και χημικές ουσίες, βιομηχανικούς ρύπους και απόβλητα, προϊόντα καπνού και βαρέα μέταλλα (41). Τα τελευταία χρόνια μεγάλο είναι το ενδιαφέρον της επιστήμης για τον ρόλο της διατροφής στην ανθρώπινη αναπαραγωγή, όχι μόνο επειδή η υπογονιμότητα συνιστά κρίσιμο πρόβλημα υγείας στις δυτικές κοινωνίες, αλλά κυρίως λόγω της υπόθεσης της «αναπτυξιακής προέλευσης της υγείας και της ασθένειας», η οποία υπογραμμίζει την επίδραση της περιβαλλοντικής έκθεσης κατά την προγεννητική ή ακόμη και κατά την προεμφυτευτική περίοδο στην μακροπρόθεσμη υγεία των απογόνων (42). Ωστόσο, το μοντέλο «ένα μέγεθος για όλους» δεν επαρκεί για να περιγράψει την ιδανική διατροφική προσέγγιση που θα βελτιώσει το επίπεδο υγείας των ατόμων, καθώς δεν λαμβάνει υπόψιν τη γενετικά καθορισμένη ποικιλία που παρατηρείται σχετικά με τον μεταβολισμό των συστατικών των τροφίμων μεταξύ του πληθυσμού (42).

Συνεπώς, η συνολική κατάσταση της υγείας του ατόμου είναι ένας συνδυασμός τόσο γενετικών παραγόντων όσο και περιβαλλοντικών ερεθισμάτων που αρχίζουν από τα πρώτα στάδια της ενδομήτριας ανάπτυξης. Γι' αυτόν τον λόγο, όλη η έρευνα γύρω από τον επιστημονικό κλάδο της Επιγενετικής επικεντρώνεται στην αποσαφήνιση και κατανόηση των μηχανισμών με τους οποίους το περιβάλλον, οι κοινωνικές συνθήκες, η διατροφή και οι ψυχοκοινωνικοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση της γενετικής πληροφορίας σε κάθε άτομο ξεχωριστά. Έτσι, η κατανόηση της επίδρασης των περιβαλλοντικών παραγόντων και συγκεκριμένα της διατροφής σε μοριακό επίπεδο μπορεί να βοηθήσει στη διαμόρφωση στρατηγικών πρόληψης κι εξατομικευμένων προγραμμάτων θεραπείας, καθώς και στην ανάπτυξη νέων επιγενετικών φαρμάκων, τα οποία θα στοχεύουν σε συγκεκριμένους επιγενετικούς μηχανισμούς, για την θεραπευτική διαχείριση πολλών νοσημάτων, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου (24).

Κεφάλαιο 5

Μηχανισμοί επιγενετικής τροποποίησης

Οι τρεις βασικοί επιγενετικοί μηχανισμοί είναι η μεθυλίωση του DNA, οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών και η έκφραση μη κωδικοποιούντων RNAs (ncRNAs), με σημαντικότερα ανάμεσά τους τα micro-RNAs (miRNAs). Οι μηχανισμοί αυτοί, οι οποίοι λειτουργούν με αμοιβαία συνεργασία μεταξύ τους, με σκοπό την έκφραση ή τη σίγαση της γενετικής πληροφορίας, αποτελούν τους ακρογωνιαίους λίθους σε μια σειρά κυτταρικών διεργασιών, όπως η κυτταρική διαφοροποίηση, η αδρανοποίηση του X χρωμοσώματος, η γονιδιακή έκφραση, η γενετική αποτύπωση και η εμβρυογένεση (34) και μπορούν να επηρεάσουν την γονιδιακή λειτουργία σε μεταγραφικό, μετα-μεταγραφικό, μεταφραστικό και μετα-μεταφραστικό επίπεδο, οδηγώντας σε αναστολή της μεταγραφής ή της μετάφρασης, καθώς και σε σφάλματα κατά την διαδικασία επιδιόρθωσης του DNA (43). Οι μηχανισμοί επιγενετικής ρύθμισης έχουν ένα δυνητικά τεράστιο φάσμα κλινικών εκβάσεων, με μεγάλη ποικιλία στην κυτταρική διαφοροποίηση, την μορφογένεση, την μεταβλητότητα και την προσαρμοστικότητα ενός οργανισμού, και μπορούν να επηρεαστούν τόσο από γενετικούς όσο και από περιβαλλοντικούς παράγοντες (8).

5.1 Μεθυλίωση του DNA

Η κυριότερη και συχνότερη τροποποίηση του DNA που παρατηρήθηκε ήταν η μεθυλίωση του νουκλεοτιδίου της κυτοσίνης (31), που αντιστοιχεί σε ποσοστό περίπου 3-6% (44,45), ακολουθούμενη από τη μεθυλίωση της αδενίνης και της γουανίνης (31,46). Ως μεθυλίωση του DNA ορίζεται η προσθήκη μίας μεθυλικής ομάδας στο 5' μόριο άνθρακα του πυριμιδινικού δακτυλίου στο νουκλεοτίδιο της κυτοσίνης, που συμβαίνει είτε σε δινουκλεοτιδικές αλληλουχίες κυτοσίνης - γουανίνης (CpGs) είτε σε περιοχές πλούσιες σε CpGs που ονομάζονται νησίδες και συναντώνται κατά μήκος του γονιδιώματος, όπως στους υποκινητές και σε ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων (εικ.5). Το αποτέλεσμα είναι ο σχηματισμός της 5-μεθυλοκυτοσίνης (5-mc), η οποία έχει χαρακτηριστεί και ως η 5^η βάση (44). Το ανθρώπινο γονιδίωμα αποτελείται από περίπου 30 εκατομμύρια CpG δινουκλεοτίδια κυτοσίνης - γουανίνης, τα οποία βρίσκονται είτε σε μεθυλιωμένη είτε σε μη

μεθυλιωμένη κατάσταση (47,48). Μάλιστα, παρά το γεγονός ότι οι μεθυλίωση της κυτοσίνης είχε αρχικά παρατηρηθεί σε δινουκλεοτιδικές CpG αλληλουχίες, δεδομένα υποδεικνύουν την συχνή παρουσία μεθυλιωμένων βάσεων κυτοσίνης και σε μη- CpG δινουκλεοτιδικές αλληλουχίες (49).

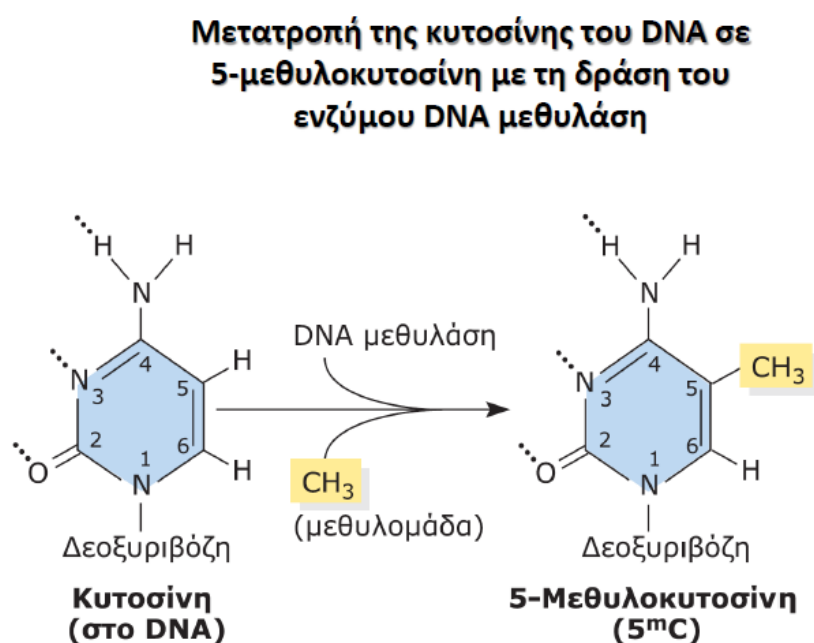
Για την ολοκλήρωση της διαδικασίας της μεθυλίωσης και τον σχηματισμό του μορίου της 5-μεθυλκυτοσίνης είναι απαραίτητη η παρουσία ενζύμων της ομάδας των μεθυλοτρανσφερασών (DNA-methyl transferases, DNMTs) (50). Υπάρχουν 2 τύποι DNMTs. Ο πρώτος, DNMT1 εμπλέκεται κυρίως στον μηχανισμό διατήρησης της ήδη υπάρχουσας κατάστασης μεθυλίωσης του DNA (50), ενώ ο δεύτερος DNMT3a και DNMT3b ευθύνεται βασικά για την πραγματοποίηση της *de novo* μεθυλίωσης σε περιοχές της διπλής έλικας του DNA που δεν έχουν ήδη υποστεί την προσθήκη μεθυλικής ομάδας, κυρίως στα πρώιμα στάδια ανάπτυξης του οργανισμού και διαμόρφωσης του επιγονιδιώματός του (51).

Ως κλασικός δότης μεθυλικής ομάδας θεωρείται η S-αδενοσυλμεθειονίνη (SAM ή SAM-e ή AdoMet), ένα τροποποιημένο αμινοξύ που φέρει μια εξαιρετικά αντιδραστική μεθυλική ομάδα και που προκύπτει από τον μεταβολισμό του άνθρακα 1 (1C), ενώ στη φύση υπάρχουν και άλλα παραδείγματα δοτών μεθυλίου. Δέκτης της μεθυλικής αυτής ομάδας είναι συνήθως η κυτοσίνη που συναντάται στα δινουκλεοτίδια CpG (5- mc CpG), ενώ καταλύτης της αντίδρασης θεωρούνται τα ένζυμα DNMT1, DNMT3a/b (52).

Η μεθυλίωση του DNA κατά μήκος του γονιδιώματος εξασφαλίζει στους φυσιολογικούς ιστούς χρωμοσωμική σταθερότητα, αποτρέπει τις χρωμοσωμικές μεταθέσεις και καταστέλλει την κινητικότητα των μεταθετών στοιχείων, τα οποία είναι υπεύθυνα για μεταλλάξεις στα διάφορα γονίδια (5). Επιπλέον, δεδομένου ότι στις περιοχές εντός του γονιδιώματος στις οποίες εδράζονται οι υποκινητές σιωπηλών μεταγραφικά γονιδίων έχουν βρεθεί σημαντικά αυξημένα ποσοστά μεθυλιωμένων βάσεων κυτοσίνης συγκριτικά με ενεργά μεταγραφικά γονίδια, η τροποποίηση αυτή του DNA βρέθηκε πως εμπλέκεται στην καταστολή της διαδικασίας της μεταγραφής (53). Η μεθυλίωση της κυτοσίνης στους υποκινητές των γονιδίων - νησίδες CpG- καταστέλλει, δηλαδή, την γονιδιακή έκφραση είτε

αποτρέποντας την πρόσδεση συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων (54) είτε προσελκύοντας ένζυμα τροποποιητικά των ιστονών ή άλλων διαμεσολαβητών αναμόρφωσης της χρωματίνης, που δρουν καταστέλλοντας την μεταγραφική διαδικασία (53). Η μεθυλίωση της κυτοσίνης συμβάλλει, με αυτό τον τρόπο, στην κυτταρική διαφοροποίηση, στην αδρανοποίηση του X χρωμοσώματος και στην γενετική αποτύπωση.

Εικόνα 5.1. Μηχανισμός μεθυλίωσης του μορίου της κυτοσίνης



Πηγή: Marzena Ciechomska, 2019 (55)

Παρά το γεγονός ότι αλλαγές στο συνολικό προφίλ μεθυλίωσης ενός οργανισμού επέρχονται φυσιολογικά με την γήρανση (56), όταν αυτές συμβαίνουν σε συγκεκριμένες γονιδιακές περιοχές, έχει βρεθεί πως σχετίζονται με διαταραχή της μνήμης, οργανική δυσλειτουργία, μειωμένη οστική πυκνότητα και άλλα σχετιζόμενα με την ηλικία προβλήματα (56,57). Σε αρκετές μελέτες τις τελευταίες δεκαετίες έχει διαμορφωθεί η υπόθεση του ρόλου της μεθυλίωσης του DNA στην διαδικασία της ογκογένεσης, με τη συνολική υπομεθυλίωση του DNA ή με την υπερμεθυλίωση στις

περιοχές των υποκινητών των γονιδίων να έχουν συσχετισθεί με την εμφάνιση καρκίνου (58–60). Πιθανή θεωρείται η εκτροπή των DNA μεθυλοτρανσφερασών από την φυσιολογική λειτουργία τους στα καρκινικά κύτταρα, καθώς στα μεταλλαγμένα κύτταρα διαπιστώνεται αυξημένη δραστηριότητα των ενζύμων αυτών, με αποτέλεσμα αφενός απώλεια της μεθυλίωσης σε φυσιολογικά μεθυλιωμένες περιοχές και αφετέρου εμφάνιση υπερμεθυλίωσης σε άλλες (61).

Η απόκλιση στο προφίλ μεθυλίωσης του DNA αποτελεί κοινή κλινική εκδήλωση στις ασθένειες που έχουν την ρίζα τους στους επιγενετικούς μηχανισμούς. Γενικά, η μεθυλίωση σχετίζεται με την γονιδιακή σίγαση, ενώ η απομεθυλίωση συνδέεται κυρίως με την ενεργοποίηση γονιδίων (62). Έτσι, από την μια πλευρά, τα χαμηλά επίπεδα συνολικής μεθυλίωσης στο γονιδίωμα (υπομεθυλίωση) οδηγούν σε ενεργοποίηση ογκογονιδίων και ευνοούν την χρωμοσωμική αστάθεια (63), ενώ από την άλλη η υπερμεθυλίωση των υποκινητών στις νησίδες CpGs προκαλεί αδρανοποίηση γονιδίων που έχουν ογκοκατασταλτική δράση αλλά και γονιδίων που εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο (60), όπως στα p16INK4A, CDH1, DAPK, p14ARF (64).

5.2 Μετα- μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών

Εκτός από τη μεθυλίωση του DNA, οι ιστόνες και οι μετα- μεταφραστικές τους τροποποιήσεις αποτελούν επίσης μηχανισμό επιγενετικής τροποποίησης, καθώς εμπλέκονται στην οργάνωση της δομής της χρωματίνης και στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (29). Το νουκλεόσωμα αποτελεί τη βασική μονάδα οργάνωσης της χρωματίνης και αποτελείται από 147 ζεύγη βάσεων DNA, τα οποία περιελλίσσονται γύρω από ένα οκταμερές πρωτεϊνών (εικ.6). Κάθε οκταμερές αποτελείται από 2 ζεύγη των τεσσάρων πυρηνικών ιστονών ή και παραλλαγών τους (H1, H2A, H2B, H3, H4) (65). Η συμπύκνωση της χρωματίνης που επιτυγχάνεται με την οργάνωση αυτή σταθεροποιεί τη δομή των χρωμοσωμάτων και καταστέλλει την κινητικότητα των μεταθετών στοιχείων. Ποικίλες μετα- μεταφραστικές τροποποιήσεις λαμβάνουν χώρα στο αμινοτελικό άκρο των ιστονών, οι οποίες περιλαμβάνουν την ακετυλίωση, την μεθυλίωση, την φωσφορυλίωση, την ADP-

ριβοσυλίωση, την ουβικουιτινίωση και την βιοτινυλίωση (66). Οι συνδυασμοί αυτοί των τροποποιήσεων των ιστονών στο σύνολό τους συγκροτούν τον «ιστονικό κώδικα», που αντιστοιχεί στη δυναμικά μεταβαλλόμενη, μεταγραφικά ενεργή ή ανενεργή κατάσταση της δομής της χρωματίνης (66).

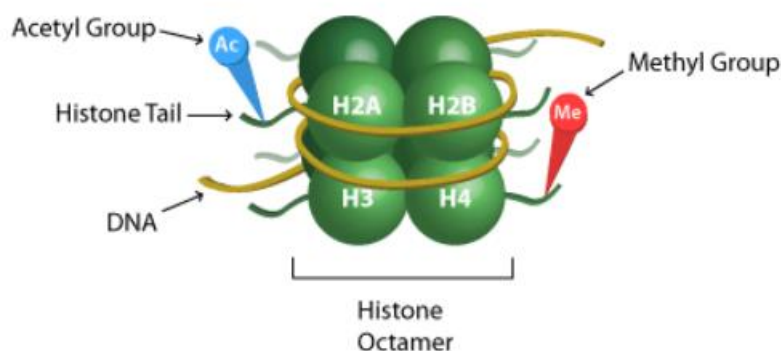
Σε γενικές γραμμές, η ακετυλίωση, δηλαδή η προσθήκη μίας ακετυλικής ομάδας στις ιστόνες οδηγεί συνήθως σε ενεργοποίηση της μεταγραφικής δραστηριότητας, ενώ η αποακετυλίωση είναι ενδεικτική μεταγραφικής σιγής (67). Επιπλέον, παρά το γεγονός ότι όλες τις περιπτώσεις ακετυλίωσης των καταλοίπων λυσίνης των ιστονών H3 και H4 έχουν συσχετισθεί με ενεργοποίηση της μεταγραφικής διαδικασίας (H3K9, H3K14, H3K18, H3K23, H4K5, H4K8, H4K12, H4K16) (68), δεν συμβαίνει το ίδιο και με την μεθυλίωση των συγκεκριμένων καταλοίπων, η οποία μπορεί να σχετίζεται είτε με καταστολή (H3K9, H3K27, H4K20) είτε με ενεργοποίηση της μεταγραφικής διαδικασίας (H3K4, H3K36, H3K79), γιατί εξαρτάται από τον βαθμό στον οποίο τροποποιείται το συγκεκριμένο αμινοξύ (μονομεθυλίωση, διμεθυλίωση ή τριμεθυλίωση) (68).

Μία μεγάλη ποικιλία τροποποιητικών των ιστονών ενζύμων είναι υπεύθυνα για τις πολλαπλές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις τους, με τις ακετυλοτρασφεράσες [Histone acetyltransferases (HAT)], τις αποακετυλάσες [histone deacetylases (HDACs)] και τις μεθυλοτρασφεράσες (HMT) να συνιστούν τις κύριες κατηγορίες ενζύμων που ευθύνονται για την ακετυλίωση, την αποακετυλίωση και την μεθυλίωση των ιστονών, αντίστοιχα (5,69).

Σε αντίθεση με την μεθυλίωση του DNA, δεν είναι απόλυτα σαφές εάν και με ποιον τρόπο οι ιστονικές τροποποιήσεις κληρονομούνται/ αντιγράφονται κατά τη διάρκεια της μιτωτικής διαίρεσης. Λίγοι είναι οι ερευνητές που έχουν ισχυριστεί και υποστηρίξει πως τα συμπλέγματα των ιστονών κατανέμονται και αντιγράφονται σύμφωνα με τον ημισυντηρητικό μηχανισμό της αντιγραφής- όπως συμβαίνει και με την αντιγραφή της διπλής έλικας του DNA (70), ενώ οι περισσότεροι επιστήμονες απορρίπτουν αυτόν τον μηχανισμό αντιγραφής των ιστονών (71). Για τον λόγο αυτό, θα πρέπει να αμφισβητηθεί το εάν οι παραλλαγές των ιστονών και οι μετα-μεταφραστικές τους τροποποιήσεις συνιστούν επιγενετικούς μηχανισμούς,

σύμφωνα με τον τρέχοντα, πιο «αυστηρό» ορισμό που έχει χρησιμοποιηθεί τις τελευταίες δεκαετίες από τους επιστημονικούς κύκλους.

Εικόνα 5.2. Νουκλεόσωμα. Ακετυλίωση και μεθυλίωση των ιστονών



Πηγή: Bruce Alberts, 2014 (72)

5.3 Μη- κωδικοποιούντα RNA

Σύμφωνα με την κλασική θεωρία της εξέλιξης, ο γενετικός κώδικας αποτελείται κυρίως από γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, τα οποία αντιστοιχούν μόλις στο 2% του ανθρώπινου γονιδιώματος. Ωστόσο, πρόσφατα δεδομένα δείχνουν πως το περισσότερο DNA (έως 98%) είναι παρεμβαλλόμενο και δεν δρα κωδικοποιώντας συγκεκριμένες πρωτεΐνες (73,74), ενώ παλαιότερα θεωρούνταν άχρηστο “junk DNA” (75). Σ’ αυτές τις γενετικές περιοχές όπου τα γονίδια δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες, υπάρχουν τα μη- κωδικοποιούντα RNA, τα οποία είναι λειτουργικά μόρια RNA, που ενώ δεν μεταφράζονται σε πρωτεΐνες, συμμετέχουν ενεργά στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, γιατί τροποποιούν την δομή, την ακολουθία και την έκφραση των αγγελιοφόρων RNA (mRNA) ή προσδέονται στα mRNA και επηρεάζουν είτε την μεταγραφή των αντίστοιχων γονιδίων είτε την μετάφρασή τους σε πρωτεΐνες (76). Σήμερα, είναι αποδεδειγμένη η παρουσία αρκετών τάξεων μη- κωδικοποιούντων RNA, μικρού μεγέθους (< 200 nt): miRNAs (micro RNAs), piRNAs (piwi-interacting RNAs) και siRNAs (small interfering RNAs) ή μεγάλου μεγέθους (> 200 nt): μακρά μη κωδικοποιούντα RNAs (long non- coding RNAs), τα οποία συμμετέχουν στην ρύθμιση της γενετικής πληροφορίας μέσω των μηχανισμών της Επιγενετικής, διαδραματίζοντας ουσιαστικό ρόλο στη μεγάλη ποικιλία της φαινοτυπικής έκφρασης

μεταξύ των ατόμων και κατά συνέπεια στην εμφάνιση επιγενετικών ασθενειών (77), (78).

Μικρο-RNA (microRNAs, miRNAs)

Μία από τις σπουδαιότερες κατηγορίες μη κωδικοποιούντων RNA είναι τα μικρο-RNA (miRNAs), τα οποία μεταγράφονται από το γονιδίωμα του κυττάρου με την μεσολάβηση της RNA πολυμεράσης II. Τα miRNAs είναι μικρά RNA μόρια αποτελούμενα από 18-25 νουκλεοτίδια, τα οποία αναγνωρίζονται σήμερα ως η κύρια οικογένεια ρυθμιστικών γονιδίων στα ευκαρυωτικά κύτταρα (79). Η βασική τους λειτουργία είναι πως ρυθμίζουν αρνητικά την μετα- μεταγραφική έκφραση του γονιδίου-στόχου τους, καθώς προσδένονται σε αγγελιοφόρο RNA με συμπληρωματική ακολουθία νουκλεοτιδίων, αποσιωπούν την έκφραση ή προκαλούν την αποδόμησή τους και παρεμποδίζουν την διαδικασία της μετάφρασης, μεταβάλλοντας τα επίπεδα της τελικής πρωτεΐνης, χωρίς να επιδρούν στην αλληλουχία του DNA (80). Από μελέτες σε πειραματόζωα έχει επίσης γίνει γνωστό ότι μπορούν -μέσω της διαδικασίας της μείωσης- να μεταφέρουν την επιγενετική πληροφορία στο ζυγωτό και ως αποτέλεσμα, να τη μεταβιβάζουν στις επόμενες γενιές (81). Μέχρι σήμερα, έχουν βρεθεί περισσότερα από 460 miRNAs στο ανθρώπινο γονιδίωμα, ενώ ο συνολικός αριθμός τους προβλέπεται σημαντικά μεγαλύτερος. Παράλληλα, έχει αναφερθεί ότι κάθε miRNA μπορεί να στοχεύσει έως και εκατοντάδες mRNAs (82), ενώ κάθε mRNA μπορεί να ρυθμίζεται από περισσότερα από ένα miRNAs (83). Επιπλέον, περισσότερα από 30% των γονιδίων του ανθρώπου έχουν αποτελέσει γονίδια-στόχους των miRNAs, κάτι που σημαίνει ότι τα miRNAs έχουν καθολική επίδραση στο συνολικό μεταγραφικό προϊόν (μεταγράψωμα) και το σύνολο των πρωτεϊνών (πρωτέωμα) του ανθρώπινου οργανισμού (84).

Τα miRNAs έχει βρεθεί πως παίζουν σημαντικό ρόλο στην κυτταρική διαίρεση, διαφοροποίηση και ανάπτυξη (85). Επηρεάζουν πολλαπλά βιολογικά μονοπάτια του οργανισμού, όπως η ανοσο-μεσολαβούμενη φλεγμονώδης αντίδραση, το σηματοδοτικό μονοπάτι ρύθμισης της ινσουλίνης (86), ο μεταβολισμός των λιπιδίων,

η λιποσύνθεση (87), η έκφραση της αδιπονεκτίνης και η ρύθμιση της πρόσληψης τροφής (88,89), ενώ μέσω της επίδρασής τους στη γονιδιακή έκφραση συμμετέχουν στη ρύθμιση της καρδιακής λειτουργίας ή δυσλειτουργίας, της ακεραιότητας του κοιλιακού τοιχώματος, της μυοκυτταρικής αύξησης και της συσταλτικότητας της καρδιάς (90). Οποιαδήποτε, λοιπόν, διαταραχή στην έκφραση των miRNAs μπορεί να επηρεάσει την γονιδιακή έκφραση, άρα και την κυτταρική λειτουργία, με αποτέλεσμα τα μόρια αυτά να σχετίζονται άμεσα με εμφάνιση ασθενειών, όπως ο καρκίνος, ο σακχαρώδης διαβήτης, τα διάφορα αυτοάνοσα νοσήματα και οι καρδιαγγειακές παθήσεις (5,85). Πρόσφατα δεδομένα που υποδεικνύουν την στενή σύνδεση μεταξύ της έκφρασης συγκεκριμένων miRNAs με την ανάπτυξη ορισμένων τύπων καρκίνου, καθιστούν τα miRNAs πολύτιμα διαγνωστικά εργαλεία για την ταξινόμηση των διάφορων μορφών όγκων (91) αλλά και θεραπευτικούς στόχους για την αντιμετώπισή τους (92). Για παράδειγμα, η εξάλειψη του ογκογόνου miRNA miR-21 μπορεί να προκαλέσει διέγερση της απόπτωσης κυττάρων του γλοιοβλαστώματος σε κυτταρικές καλλιέργειες (93). Αντίθετα, η αποκατάσταση της λειτουργίας miRNAs που έχουν γνωστή ογκοκατασταλτική δράση μπορεί επίσης να αποτελέσει σημαντική θεραπευτική προσέγγιση στον καρκίνο. Συνεπώς, τα επιγενετικά φάρμακα ασκούν τις αντικαρκινικές τους ιδιότητες σε δύο μέτωπα, καθώς από την μια πλευρά ενεργοποιούν ογκοκατασταλτικά γονίδια που είχαν υποστεί σίγαση μέσω επιγενετικών μηχανισμών, ενώ από την άλλη ενεργοποιούν miRNAs με ογκοκατασταλτική δράση, τα οποία ρυθμίζουν αρνητικά (προς τα κάτω) τα αγγελιοφόρα mRNA-στόχο τους με ογκογόνο δράση (92).

Ο μηχανισμός με τον οποίο τα miRNAs δρουν ως μηχανισμοί επιγενετικής τροποποίησης είναι η στόχευση ενζύμων, τα οποία καταλύουν ουσιώδεις αντιδράσεις της επιγενετικής ρύθμισης, όπως είναι οι DNA μεθυλοτρανσφεράσες (DNMTs), οι αποακετυλάσες των ιστονών (HDACs) και οι μεθυλοτρανσφεράσες των ιστονών (EZH) (94). Πιο συγκεκριμένα, το miRNA-29b ανήκει στην οικογένεια miRNA-29, η οποία στοχεύει τις DNA μεθυλοτρανσφεράσες και επομένως ρυθμίζει την μεθυλίωση του DNA. Ο αναστολέας του miRNA-29b προκαλεί αύξηση των συνολικών

επιπέδων μεθυλίωσης του γονιδιώματος, γιατί επάγει την προς τα άνω ρύθμιση του ενζύμου DNMT3A/B (95).

Εκτός από τις DNA μεθυλοτρανσφεράσες, αναλύσεις βιοπληροφορικής υποδεικνύουν πως τα miRNAs ρυθμίζουν και τις ιστονικές τροποποιήσεις, στις οποίες περιλαμβάνονται οι ιστόνες H3K4me1, H3K27me3, H3K27ac, H3K9ac, H3K4me3 και H2AZ (96). Πιο αναλυτικά, η υπερέκφραση του miRNA miR-34a καταστέλλει την έκφραση της αποακετυλάσης των ιστονών HDAC1, οδηγώντας έτσι σε αυξημένα επίπεδα ακετυλίωσης της ιστόνης H3K9ac, καταλήγοντας τελικά σε υπέρμετρη συσσώρευση λιπιδίων στα αφρώδη κύτταρα του λιπώδους ιστού (97).

Από την άλλη πλευρά, η ίδια η έκφραση των miRNAs ρυθμίζεται από τους επιγενετικούς μηχανισμούς, δηλαδή τις τροποποιήσεις των ιστονών και την μεθυλίωση του DNA (79). Η μεθυλίωση του DNA που συμβαίνει κατά κύριο λόγο στις CpG νησίδες στους υποκινητές των γονιδίων αναστέλλει την έκφραση των miRNAs, ενώ οι τροποποιήσεις των ιστονών έχουν την ικανότητα είτε να αναστέλλουν είτε να ενισχύουν την ενεργοποίηση της μεταγραφής των miRNAs. Η αμοιβαία αυτή ρυθμιστική σχέση που δημιουργείται μεταξύ των miRNAs και των λοιπών επιγενετικών μηχανισμών δημιουργεί έναν παλίνδρομο μηχανισμό ρύθμισης, που συμμετέχει στις διεργασίες του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, απόπτωσης και διαφοροποίησης (98,99). Η καλύτερη κατανόηση της παλίνδρομης αυτής σχέσης (feedback loop) αλλά και της διαταραχής της ρύθμισής της στις διάφορες ασθένειες μπορεί να αποτελέσει τη βάση για την ανακάλυψη νέων θεραπευτικών στόχων και στρατηγικών στο μέλλον.

Μάλιστα, εκτός από τις προαναφερθείσες ενδογενείς αιτίες - πηγές ρύθμισης της έκφρασης των miRNAs, μελέτες υπέδειξαν την επίδραση και των εξωγενών miRNAs στην γενετική πληροφορία του ατόμου και την πρωτεϊνική έκφραση. Οι Zhang και συν. έδειξαν πως τα εξωγενή miRNAs που εισέρχονται στον οργανισμό από την κατανάλωση ρυζιού μεταφέρονται από τον γαστρεντερικό σωλήνα στο κυκλοφορικό σύστημα με την βοήθεια μικροκυστιδίων και στη συνέχεια κατανέμονται στα διάφορα όργανα, όπου προσδένονται στα mRNA με συμπληρωματική ακολουθία και ασκούν την δράση τους, αποδομώντας τα mRNA ή αναστέλλοντας τις διαδικασίες

μεταγραφής και μετάφρασης (100). Ένα τέτοιο miRNA που συναντάται σε αφθονία στο ρύζι είναι το miR-168a, το οποίο όταν καταναλώνεται από ανθρώπους και ποντίκια έχει την ικανότητα να προσδένεται στο mRNA της βοηθητικής του υποδοχέα της LDL πρωτεΐνης 1 (LDLRAP1) και να αναστέλλει την μετάφρασή της. Δεδομένου ότι η LDLRAP1 εμπλέκεται στην απομάκρυνση των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών από το πλάσμα (LDL), η αυξημένη κατανάλωση του εξωγενούς miR-168a οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων LDL στο πλάσμα και άρα σε υπερχοληστερολαιμία (100). Η μελέτη αυτή υπογραμμίζει τον ρόλο της διατροφής στην γονιδιακή έκφραση, χρησιμοποιώντας ως γέφυρα τα εξωγενή miRNAs, που μέσω της μετα-μεταγραφικής αποσιώπησης των αντίστοιχων αγγελιοφόρων mRNAs, τροποποιούν την γενετική πληροφορία, χωρίς μεταβολή της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας και αναδεικνύει τη σημασία των περιβαλλοντικών επιδράσεων στην φαινοτυπική έκφραση.

Μικρά παρεμβαλλόμενα RNAs (Small Interfering RNAs: siRNAs)

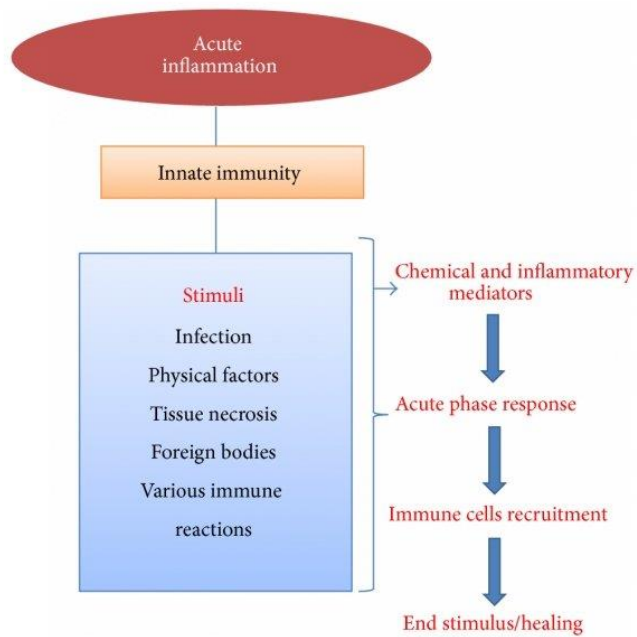
Τα μικρά αυτά μόρια RNA αποτελούνται από 20–25 νουκλεοτίδια και έχει βρεθεί πως σχετίζονται στενά με τα miRNAs, καθώς εμπλέκονται και στην μεθυλίωση του DNA και στις τροποποιήσεις των ιστονών (101). Κύρια πηγή προέλευσής τους θεωρούνται μόρια RNA με διπλή έλικα, στα οποία προσδένονται και δρουν RNA πολυμεράσες, που τα διασπούν στη συνέχεια σε μικρότερα τμήματα (20-25 βάσεων), τα siRNAs. Ακολούθως, τα siRNAs προσδένονται σε ένα σύμπλεγμα πολυνουκλεασών (RNA-induced silencing complex, RISC) και προκαλούν αποδόμηση των ομόλογων (με συμπληρωματική αλληλουχία) αγγελιοφόρων mRNAs μονής αλύσου (102). Με τον τρόπο αυτό, τα siRNAs οδηγούν σε μετα-μεταγραφική γονιδιακή σίγαση με εξαιρετική ειδικότητα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην διαμόρφωση κι εφαρμογή συγκεκριμένων θεραπευτικών προσεγγίσεων για την αντιμετώπιση πολυάριθμων νοσημάτων (103).

Κεφάλαιο 6.

Οι επιγενετικοί μηχανισμοί εμπλέκονται στην διεργασία της φλεγμονής

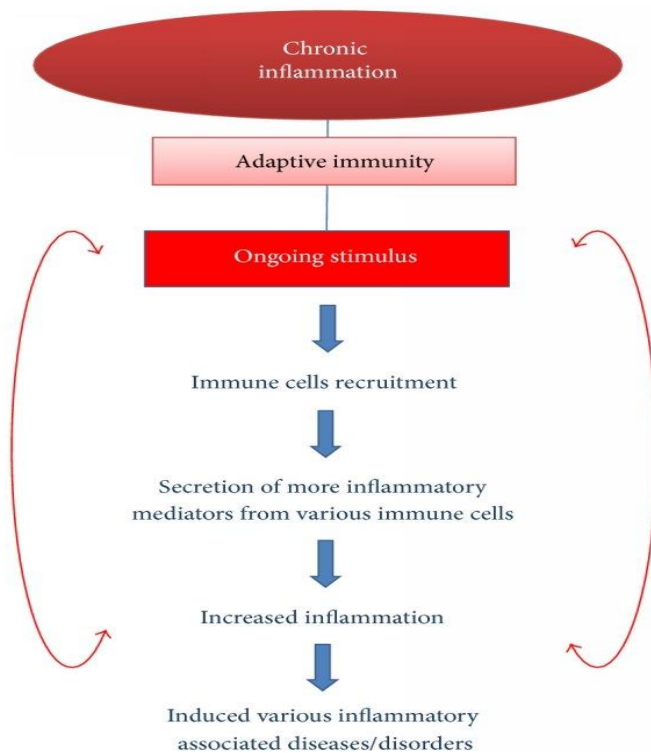
Η διαδικασία της φλεγμονής περιλαμβάνει πολυάριθμους παθοφυσιολογικούς και ανοσολογικούς μηχανισμούς, ως απαντήσεις στα ποικίλα περιβαλλοντικά ερεθίσματα που δέχεται ο οργανισμός, όπως τα παθογόνα ή οι τοξίνες, με σκοπό την αποκατάσταση της προκληθείσας βλάβης των ιστών και την διατήρηση της ομοιόστασης (104) (εικ.7). Στις διαδικασίες περιορισμού του εξωτερικού ερεθίσματος και επιδιόρθωσης των ιστών δρουν ως μεσολαβητές οι κυτταροκίνες, οι χημειοκίνες, τα μόρια προσκόλλησης, αλλά και άλλα αυτοκρινή και παρακρινή μόρια που παράγονται και στρατολογούνται στο σημείο της βλάβης, πυροδοτώντας την έναρξη της οξείας φλεγμονώδους αντίδρασης (105). Όταν, ωστόσο, η φλεγμονή επιμένει για μεγάλο χρονικό διάστημα, γίνεται χρόνια κατάσταση, η οποία πυροδοτεί με την σειρά της έναν καταρράκτη κυτταροκινών και άλλων φλεγμονωδών γεγονότων, που οδηγούν σε ανθεκτική κυτταρική βλάβη και σε μόνιμη ιστική καταστροφή, με συνέπεια την χρόνια οργανική δυσλειτουργία (106) (εικ.8). Η κατάσταση αυτή περιλαμβάνει την επαγωγή κι ενεργοποίηση προφλεγμονωδών διαμεσολαβητών της φλεγμονής, μεταξύ των οποίων ανήκουν η Ιντερλευκίνη 1β (IL-1β), ο παράγοντας νέκρωσης όγκου (TNF-α) και η ιντερλευκίνη 6 (IL-6), που παράγονται από ενεργοποιημένα μακροφάγα και οδηγούν σε διαιώνιση της φλεγμονώδους αντίδρασης (106). Μόρια προσκόλλησης, ένζυμα, μεταγραφικοί παράγοντες και η ενεργοποίηση του πυρηνικού παράγοντα κΒ (NF-κΒ) συμμετέχουν επίσης στην ενορχήστρωση της φλεγμονώδους διεργασίας (107). Η αναγνώριση και ταυτοποίηση όλων των παραγόντων που συμμετέχουν στην έναρξη και προοδευτική πορεία της διαδικασίας της φλεγμονής είναι ζωτικής σημασίας για την καλύτερη κατανόηση νοσημάτων και παθήσεων σχετιζόμενων με φλεγμονώδεις μηχανισμούς, αλλά και για την αναζήτηση νέων πιο αποτελεσματικών θεραπευτικών στόχων.

Εικόνα 6.1 Οξεία φλεγμονή



Πηγή: Fernanda V. S. Castanheira, 2019 (108)

Εικόνα 6.2 Χρόνια φλεγμονή



Πηγή: Fernanda V. S. Castanheira, 2019 (108)

Σύμφωνα με νεότερα δεδομένα, έχει βρεθεί ότι οι επιγενετικοί μηχανισμοί, που επηρεάζουν την γονιδιακή έκφραση χωρίς να επιδρούν στην αλληλουχία του DNA, συμβάλλουν σημαντικά στην παθοφυσιολογία της διεργασίας της φλεγμονής, ρυθμίζοντας την έκφραση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών, του παράγοντα TNF-α, ιντερλευκινών, ογκογονιδίων και ογκοκατασταλτικών γονιδίων, αλλά και την αυτοκρινή και παρακρινή ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ. Τα μόρια αυτά παράγονται από κύτταρα τα οποία έχουν βρεθεί σε συνθήκες χρόνιας φλεγμονής και βαθμιαία οδηγούν σε ανάπτυξη σοβαρών νοσημάτων, όπως η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, τα καρδιαγγειακά νοσήματα, ο καρκίνος, οι αυτοάνοσες διαταραχές, καθώς και νευροεκφυλιστικά νοσήματα (109). Έτσι, οι επιγενετικές τροποποιήσεις μπορεί να επιδεινώσουν την φλεγμονώδη απάντηση του οργανισμού και να αυξήσουν τον κίνδυνο που σχετίζεται με την χρόνια ενεργοποίηση των φλεγμονωδών διεργασιών, άρα και με την εμφάνιση νόσων (λ105).

Αναλυτικές μελέτες του επιγονιδιώματος (epigenome-wide association studies, EWAS), χρησιμοποιώντας σύγχρονες, μεγάλης κλίμακας αναλύσεις βιοπληροφορικής, έχουν αναδείξει διαφορετικούς επιγενετικούς δείκτες, οι οποίοι σχετίζονται με συγκεκριμένους δείκτες φλεγμονής στην κυκλοφορία του αίματος, και κυρίως με την C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP), που αποτελεί πρωτεΐνη οξείας φάσης, με σημαντικό ρόλο στην οξεία φλεγμονώδη αντίδραση (111). Ωστόσο, η αποσαφήνιση με απόλυτη ακρίβεια όλων των επιγενετικών μονοπατιών, που ενέχονται στην διαμόρφωση και τροποποίηση του φλεγμονοσώματος, επομένως και στην επιρρέπεια του ατόμου σε κακή σωματική ή ψυχική υγεία και σε εμφάνιση ασθενειών, παραμένει αχαρτογράφητη σε μεγάλο βαθμό και αποτελεί σημαντική πρόκληση για μελλοντική έρευνα.

Κεφάλαιο 7.

Ο ρόλος της διατροφής στην κύηση και τα πρώτα στάδια της ζωής

Οι διαδικασίες της αύξησης και της ανάπτυξης που λαμβάνουν χώρα τόσο ενδομητρίως όσο και στην βρεφική και νηπιακή παιδική ηλικία σηματοδοτούν μία ευαίσθητη περίοδο, κατά την οποία εξωτερικοί παράγοντες πυροδοτούν βιολογικές αλλαγές ικανές να τροποποιήσουν την επιγενετική υπογραφή και να καθορίσουν με αυτόν τον τρόπο την διατήρηση της υγείας ή την επιρρέπεια στην εμφάνιση ασθενειών στην διάρκεια της ζωής (112). Έχουν μελετηθεί ποικίλοι μηχανισμοί οι οποίοι δρουν στα πρώιμα στάδια της ζωής κι έχουν αντίκτυπο στα επόμενα, με τους μηχανισμούς της Επιγενετικής να βρίσκουν σημαντική θέση ανάμεσά τους (112,113). Επιδημιολογικές μελέτες έχουν αναδείξει την επίδραση του περιβάλλοντος, τόσο πριν όσο και λίγο μετά την γέννηση, στην αύξηση αλλά και στην μακροπρόθεσμη κατάσταση της υγείας του ατόμου και στον κίνδυνο εμφάνισης παχυσαρκίας, καρδιαγγειακών νοσημάτων και σακχαρώδη διαβήτη (8,114). Το βάρος γέννησης (115), η διατροφή τόσο της μητέρας όσο και του απογόνου (114) και η κοινωνικοοικονομική θέση της οικογένειας (116) κατά την νεογνική, βρεφική και παιδική ηλικία εμφανίζουν ισχυρό συσχετισμό με την μετέπειτα ζωή του αναπτυσσόμενου οργανισμού. Μελέτες έχουν αναδείξει πως τα ποσοστά εναπόθεσης λίπους σε νεογνά συμβάλλουν δραστικά στην εμφάνιση παχυσαρκίας στην πρώτη παιδική ηλικία και προτείνουν παρεμβάσεις που αφορούν στη μητρική διατροφή κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (117). Η υπόθεση Barker σχετικά με την εμβρυική προέλευση της ασθένειας κατά την ενηλικίωση ισχυρίζεται πως η κακή διατροφή του εμβρύου και του βρέφους προδιαθέτει σε αυξημένη επιρρέπεια εμφάνισης μεταβολικού συνδρόμου (118), ενώ η περίοδος των 1000 ημερών που διαρκεί από τη σύλληψη μέχρι περίπου το τέλος του 2^{ου} έτους ζωής αντιπροσωπεύει την μοναδική περίοδο με τεράστια και μη αναστρέψιμη επίδραση στην μακροπρόθεσμη υγεία, αύξηση και ανάπτυξη του νέου οργανισμού (119)

Όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως, το προφίλ μεθυλίωσης κάθε οργανισμού διαμορφώνεται σε μεγάλο βαθμό κατά την διάρκεια της εμβρυογένεσης ή στα αρχικά στάδια της μεταγεννητικής περιόδου. Μετά την γονιμοποίηση και την δημιουργία

του ζυγωτού, το μητρικό και το πατρικό γονιδίωμα υπόκεινται σε εκτεταμένη απομεθυλίωση, η οποία ακολουθείται από de novo μεθυλίωση προεμφυτευτικά (120). Καθώς, λοιπόν, η επιγενετική ρύθμιση των υποκινητών των γονιδίων, που είναι υπεύθυνη για την μεταγραφική έκφραση ή σίγαση, λαμβάνει χώρα από νωρίς στην διάρκεια της ανάπτυξης, οποιαδήποτε διαταραχή στην διαδικασία αυτή μέσω περιβαλλοντικών ερεθισμάτων και επιδράσεων μπορεί να αποτελεί υποψήφιο μοριακό μηχανισμό για την εμφάνιση μόνιμων αλλαγών στον φαινότυπο του ατόμου (121). Για παράδειγμα, τα επίπεδα μεθυλίωσης του DNA σε γονίδια που εμπλέκονται στην ρύθμιση της κορτιζόλης στο αίμα, την δράση των γλυκοκορτικοειδών στους ιστούς και την αρτηριακή πίεση, και που επηρεάζουν τον συνολικό καρδιομεταβολικό κίνδυνο του ατόμου, έχει βρεθεί πως σχετίζονται με περιβαλλοντικές εκθέσεις στα αρχικά στάδια της ζωής (122).

Ο υποσιτισμός ή/ και η υπερβολική πρόσληψη τροφής από την μητέρα κατά την προ- και μετα-γεννητική περίοδο συνιστούν κυρίαρχους καθοριστές της κλινικής έκβασης των απογόνων και της διαμόρφωσης του φαινοτύπου τους (42), γιατί η διαθεσιμότητα των μητρικών διατροφικών δοτών μεθυλικών ομάδων στην αρχή της κύησης είναι ουσιώδης για την σωστή ανάπτυξη του εμβρύου (123). Διαγενεακές έρευνες σε ζώα έχουν αποκαλύψει πως η μητρική διατροφή που στερούνταν θρεπτικών συστατικών - δοτών μεθυλικών ομάδων κατά την περίοδο της σύλληψης είχε ως αποτέλεσμα αλλαγή στο προφίλ μεθυλίωσης των απογόνων και επομένως την εμφάνιση διαφορετικών φαινότυπων (124). Αντίθετα, ο θερμιδικός περιορισμός χωρίς ωστόσο σοβαρή έλλειψη θρεπτικών συστατικών βρέθηκε να αυξάνει την διάρκεια ζωής των απογόνων (125). Ο περιορισμός των θερμίδων, όπως έχει ήδη αναφερθεί, βρέθηκε πως διαθέτει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, μέσα από την ανασταλτική δράση συγκεκριμένων γονιδίων, συμπεριλαμβανομένου και του γονιδίου που κωδικοποιεί τον παράγοντα NF-κB (124). Επιπρόσθετα, ανάλογα με τα διαιτητικά συμπληρώματα που λαμβάνονται από ποντίκια κατά την διάρκεια της κύησης, διαφορετικός φαίνεται πως είναι και ο φαινότυπος των απογόνων που θα προκύψουν λόγω των διαφορών στην μεθυλίωση του γονιδιώματός τους. Για παράδειγμα, η δισφαινόλη A, χημική ένωση που χρησιμοποιείται από την βιομηχανία για την παραγωγή πολυκαρβονικών πλαστικών και τη συγκόλληση υλικών επίστρωσης, με τροποποιητικές του επιγονιδιώματος ιδιότητες (bisphenol A, BPA),

χορηγήθηκε σε ενήλικα ποντίκια στο στάδιο της εγκυμοσύνης τους. Οι απόγονοι μητέρων που έλαβαν μόνο BPA έτειναν σε μη υγιή φαινότυπο, καθώς ήταν κίτρινου χρώματος, παχύσαρκοι και με επιρρέπεια σε εμφάνιση καρκίνου και σακχαρώδη διαβήτη. Αντίθετα, οι απόγονοι μητέρων που έλαβαν BPA σε συνδυασμό με διατροφή εμπλουτισμένη σε θρεπτικά συστατικά - δότες μεθυλικών ομάδων, όπως φυλλικό οξύ και βιταμίνη B12 ήταν υγιείς, καφετί χρώματος και φυσιολογικού σωματικού βάρους. Έτσι, στην περίπτωση αυτή, η υπομεθυλίωση του DNA θα μπορούσε να περιοριστεί με την χορήγηση φυλλικού οξέος στην μητέρα, ως μεθυλικού δότη. Συμπερασματικά, η ενίσχυση της μητρικής διατροφής με συγκεκριμένα θρεπτικά συστατικά βρέθηκε πως αντιστάθμιζε τις αρνητικές επιπτώσεις της έκθεσης στο επιβλαβές αυτό χημικό, υπογραμμίζοντας την τεράστια σημασία μιας δίαιτας πλούσιας σε φρούτα, λαχανικά και άλλα υψηλής αξίας θρεπτικά συστατικά (124).

Συσχέτιση μεταξύ δυσμενών προγεννητικών διατροφικών συνθηκών, μεταγεννητικής υγείας και κινδύνου εμφάνισης ασθενειών βρέθηκε στην μελέτη κοόρτης γεννήσεων μετά τον Ολλανδικό λιμό κατά την περίοδο 1944–1945, στην οποία μελετήθηκε η επίδραση της ασιτίας κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης στην μετέπειτα υγεία, αύξηση και ανάπτυξη του αναπτυσσόμενου οργανισμού, αλλά και στον κίνδυνο εμφάνισης σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, άλλων μεταβολικών διαταραχών, καρδιαγγειακών νοσημάτων και γνωστικής δυσλειτουργίας στην μετέπειτα ζωή του (126). Με βάση τα αποτελέσματα της έρευνας, συγκριτικά με ενήλικες που ήταν γεννημένοι πριν ή μετά την περίοδο του λιμού, βρέθηκε αυξημένος ο κίνδυνος εμφάνισης αντίστασης στην ινσουλίνη, παχυσαρκίας και υπέρτασης σε ενήλικες των οποίων η σύλληψη και γέννηση πραγματοποιήθηκε κατά την διάρκεια του λιμού. Επιπλέον, οι πρώτοι μήνες της εγκυμοσύνης φαίνεται να έχουν την σημαντικότερη επίδραση στον κίνδυνο ανάπτυξης ασθενειών, καθώς παιδιά των οποίων η σύλληψη έγινε κατά την διάρκεια του Ολλανδικού λιμού έτειναν να γεννούν απογόνους χαμηλότερου βάρους συγκριτικά με παιδιά που δεν είχαν εκτεθεί προγεννητικά στον λιμό. Αυτό υποδεικνύει πως οι επιπτώσεις της προγεννητικής διατροφής στην υγεία κατά την ενήλικη ζωή γίνονται εμφανείς σε περισσότερες από μία επόμενες γενιές (127). Οι επιγενετικοί μηχανισμοί με τους οποίους η προγεννητική έκθεση του εμβρύου στην ασιτία της μητέρας επιδρά στην υγεία του απογόνου αφορούν στον

μικρότερο βαθμό μεθυλίωσης του DNA που παρατηρείται σε γονίδια, τα οποία εμπλέκονται στον μεταβολισμό της ινσουλίνης (126).

Ο υποσιτισμός κατά την βρεφική και πρώτη παιδική ηλικία αποτελεί μείζον πρόβλημα δημόσιας υγείας, καθώς εκτιμάται ότι αφορά σε σχεδόν 113 εκατομμύρια παιδιά σε παγκόσμια κλίμακα με σημαντικά ποσοστά νοσηρότητας και θνητότητας ανάμεσά τους (128). Η νοσηρότητα αυτή περιλαμβάνει, μεταξύ άλλων, αυξημένη ευαλωτότητα σε ψυχικά αλλά και λοιμώδη νοσήματα, διαταραχή της αναπαραγωγικής λειτουργίας, διαταραχές προσωπικότητας, ελλείματα στην προσοχή, τη γνωστική και την αισθητηριακή λειτουργία, ακόμη και πολλά χρόνια μετά την έκθεση, με τους υποκείμενους μηχανισμούς να μην είναι απόλυτα γνωστοί και κατανοητοί (129,130). Μάλιστα, πρόσφατα δεδομένα ερευνών σχετικά με την αναπτυξιακή προέλευση της υγείας και της ασθένειας υποδεικνύουν ότι τόσο ο υποσιτισμός (131) όσο και ο υπερσιτισμός (132) κατά την εμβρυική, νεογνική και βρεφική περίοδο είναι σημαντικοί παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση παχυσαρκίας και σοβαρών επιπλοκών στη μετέπειτα ζωή (12), γεγονός που υπογραμμίζει τη σημασία μιας υγιεινής και ισορροπημένης διατροφής. Επιπλέον, ο υποσιτισμός των βρεφών και των παιδιών προκαλεί αύξηση των δαπανών της δημόσιας υγείας, μείωση της παραγωγικότητας στην ενήλικη ζωή, συρρίκνωση της οικονομικής άνθισης και ανάπτυξης οδηγώντας σε έναν φαύλο κύκλο ασθένειας και φτώχειας (12).

Στο σημείο αυτό, οφείλει να αναφερθεί η τεράστια σημασία του μητρικού θηλασμού τόσο στην βραχυπρόθεσμη όσο και στη μακροπρόθεσμη κατάσταση της υγείας του νέου αναπτυσσόμενου οργανισμού (133), καθώς η προώθηση του αποκλειστικού μητρικού θηλασμού κατά τους πρώτους 6 μήνες ζωής έχει ευρέως αναγνωρισθεί ως μία από τις πιο αποτελεσματικές στρατηγικές διασφάλισης επαρκούς και υγιεινής διατροφής με αποδεδειγμένα πολλαπλά οφέλη στην πρόληψη τόσο μεταδοτικών όσο και μη μεταδιδόμενων νοσημάτων (134). Το ανθρώπινο μητρικό γάλα, το οποίο αποτελείται όχι μόνο από υψηλής διατροφικής αξίας συστατικά αλλά και από ουσίες με βιοενεργό δράση (133), έχει εδώ και πολλές δεκαετίες συσχετισθεί με την καλή λειτουργία του γαστρεντερικού συστήματος (ΓΕΣ), την παρουσία υγιούς εντερικού μικροβιώματος, την ανάπτυξη του ανοσοποιητικού συστήματος αλλά και τη νευρο-

συμπεριφορική διαμόρφωση των απογόνων (135). Θηλάζοντα νεογνά και βρέφη έχει βρεθεί πως βρίσκονται σε μικρότερο κίνδυνο εμφάνισης λοιμώξεων του ΓΕΣ αλλά και του αναπνευστικού συστήματος καθώς και οξείας μέσης ωτίτιδας (136), ενώ σημαντική είναι και η μείωση της επίπτωσης εμφάνισης νεκρωτικής εντεροκολίτιδας (NEK) σε θηλάζοντα πρόωρα νεογνά (137). Προστατευτική φαίνεται να είναι η δράση του θηλασμού και ως προς την εμφάνιση αυτοάνοσων νοσημάτων, όπως η κοιλιοκάκη, ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 (ΣΔ1) και τα ιδιοπαθή φλεγμονώδη νοσήματα του εντέρου (ΙΦΝΕ) (133,136). Επιπλέον, τα αποτελέσματα πρόσφατης επιδημιολογικής μελέτης στις ΗΠΑ ανέδειξαν την θετική συσχέτιση μεταξύ της έναρξης του θηλασμού και της μείωσης της βρεφικής θνησιμότητας (138), ενώ εκτιμάται ότι περισσότεροι από 820.000 βρεφικοί θάνατοι θα μπορούσαν να είχαν αποφευχθεί με την υιοθέτηση του μητρικού θηλασμού ως πρακτικής πρόληψης (135). Παράλληλα, είναι αποδεδειγμένο πως νεογνά και βρέφη που θήλασαν ή έλαβαν μητρικό γάλα στα πρώτα στάδια της ζωής τους έχουν μικρότερο κίνδυνο εμφάνισης μη μεταδιδόμενων ασθενειών στα επόμενα στάδια, καθώς ο θηλασμός έχει συσχετισθεί με χαμηλότερα επίπεδα αρτηριακής πίεσης, ολικής και LDL χοληστερόλης αλλά και με μικρότερα ποσοστά εμφάνισης παχυσαρκίας και ΣΔ2 στην ενήλικη ζωή (133,136). Τέλος, η τυχαίοποιημένη κλινική δοκιμή παρέμβασης PROBIT (Promotion of Breastfeeding Intervention Trial) για την προώθηση του μητρικού θηλασμού ανέδειξε τη σχέση μεταξύ της νευροαναπτυξιακής διαμόρφωσης και των γνωστικών ικανοτήτων του ατόμου με τον αποκλειστικό μητρικό θηλασμό, γιατί σημειώθηκαν σημαντικά υψηλότερα σκορ σε τεστ ευφυΐας/ νοημοσύνης σε παιδιά ηλικίας 6 ετών που είχαν θηλάσει αποκλειστικά για 3 ή περισσότερους μήνες (139). Τα λιπαρά οξέα που περιέχονται στο μητρικό γάλα φαίνεται πως παίζουν καθοριστικό ρόλο προς την κατεύθυνση αυτή, καθώς πρόσφατη ανασκόπηση έδειξε πως η από νωρίς προσφορά μέσω του μητρικού γάλακτος πολυακόρεστων λιπαρών οξέων μακράς αλυσού (n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids, LCPUFAs) και δοκοσαεξανοϊκού οξέος (docosahexaenoic acid, DHA), που είναι βασικά δομικά συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών του εγκεφάλου και των φωτοϋποδοχέων του κερατοειδούς, βελτιώνει τις γνωστικές ικανότητες, τη νευροανάπτυξη, την οπτική οξύτητα αλλά και την αύξηση των απογόνων (140).

Ωστόσο, τα θρεπτικά συστατικά που περιέχονται στο γάλα του μητρικού θηλασμού δεν πρέπει να αντιμετωπίζονται μόνο ως πηγή ενέργειας ή ως παράγοντες που συμμετέχουν στην ανάπτυξη, γιατί πρόσφατες έρευνες της Μοριακής Βιολογίας και της Διατροφογενετικής έχουν μελετήσει την επίδρασή τους και στη γονιδιακή έκφραση (141). Μάλιστα, το γεγονός ότι αυτή η έκθεση του οργανισμού στο μητρικό γάλα στα πολύ πρώιμα στάδια της ζωής του παραμένει «αντέχοντας στον χρόνο» και ασκεί την επίδρασή της σε μεταγενέστερα στάδια ενισχύει την άποψη ότι η συγκεκριμένη έκθεση αφήνει με κάποιον τρόπο το «στίγμα» της στο γονιδίωμα (142). Ορισμένα από τα θρεπτικά συστατικά και τα μητρικά αντισώματα που περιέχονται στο μητρικό γάλα μπορούν να εξηγήσουν τα βραχυπρόθεσμα οφέλη του θηλασμού στα νεογνά και τα βρέφη (143). Ωστόσο, τα δεδομένα της βιβλιογραφίας που υποστηρίζουν την υπόθεση ότι οι επιγενετικοί μηχανισμοί αποτελούν το συνδετικό κρίκο που γεφυρώνει τον θηλασμό με τις μακροπρόθεσμες επιδράσεις του στη νευροαναπτυξιακή έκβαση του ατόμου τόσο κατά την παιδική όσο και αργότερα κατά την ενήλικη ζωή είναι λίγα (143–145). Ένα παράδειγμα που υποστηρίζει ότι το μητρικό γάλα επιδρά στη μεθυλίωση του DNA αποτελεί η μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ζώα με πρώιμη ενίσχυση της διατροφής τους σε ω-3 λιπαρά οξέα (διατροφικό συστατικό του μητρικού γάλακτος), η οποία βρέθηκε πως σχετίζεται με αλλαγές στα προφίλ μεθυλίωσης του γονιδιώματός τους (146). Παράλληλα, έχει προταθεί η υπόθεση ότι το γάλα του μητρικού θηλασμού επιδρά στη μεθυλίωση του DNA με έμμεσο τρόπο μέσω του εντερικού μικροβιώματος, καθώς το μητρικό γάλα επηρεάζει τη σύνθεση του μικροβιώματος και το μικροβίωμα επηρεάζει με τη σειρά του τον μηχανισμό της μεθυλίωσης του DNA (147). Μελέτη που εξέτασε την επίδραση της διάρκειας του θηλασμού στη μεθυλίωση του DNA στο γονίδιο της λεπτίνης (LEP), ορμόνης που εμπλέκεται στη ρύθμιση της όρεξης, στον μεταβολισμό του λίπους και κατά συνέπεια στην εμφάνιση παχυσαρκίας και αντίστασης στην ινσουλίνη (148), βρήκε σημαντικές συσχετίσεις ανάμεσα στη διάρκεια του μητρικού θηλασμού, το βάρος γέννησης, τον Δείκτη Μάζας Σώματος (ΔΜΣ), τη συγκέντρωση λεπτίνης στον ορό και τα επίπεδα μεθυλίωσης του DNA στο γονίδιο LEP (149). Ειδικότερα, η διάρκεια του θηλασμού βρέθηκε να έχει αρνητική συσχέτιση με τα επίπεδα μεθυλίωσης του LEP (όσο μεγαλύτερη η διάρκεια θηλασμού τόσο χαμηλότερα τα επίπεδα μεθυλίωσης) και αντίστοιχα, τα χαμηλότερα επίπεδα

μεθυλίωσης του LEP βρέθηκε πως οδήγησαν σε αυξημένη έκφραση και ψηλότερη συγκέντρωση λεπτίνης στον ορό (149) [η ανεπάρκεια λεπτίνης στον υποθάλαμο σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο παχυσαρκίας (150)]. Μελλοντικές έρευνες θα ήταν σκόπιμο να μελετήσουν εάν αυτή η αρνητική συσχέτιση της διάρκειας του μητρικού θηλασμού με την μεθυλίωση του γονιδίου της λεπτίνης αποτελεί τον βασικό επιγενετικό μηχανισμό με τον οποίο ο θηλασμός συμβάλλει προστατευτικά στην εμφάνιση παχυσαρκίας. Η μελέτη κοόρτης που πραγματοποιήθηκε σε δίδυμα από την Αυστραλία (Peri/postnatal Epigenetic Twins Study, PETS) είχε στόχο να περιγράψει τη συσχέτιση της διάρκειας του μητρικού θηλασμού με τη σωματική αύξηση στην ηλικία των 18 μηνών και κατέληξε στο συμπέρασμα πως μη θηλάζοντα βρέφη κατά τους πρώτους 4 μήνες ζωής είχαν αυξημένο ΔΜΣ και αυξημένη περίμετρο κοιλιάς και βραχίονα κατά τον 18^ο μήνα ζωής (151). Επιπλέον, βρέφη που θηλάσαν για τουλάχιστον 4- 6 μήνες βρέθηκε πως είχαν μικρότερο ΔΜΣ στην ηλικία των 18 μηνών σε σχέση με θηλάζοντα βρέφη μόνο έως τους 3 πρώτους μήνες ζωής (151), αναδεικνύοντας την προστατευτική επίδραση του θηλασμού ενάντια στην εμφάνιση παιδικής παχυσαρκίας. Η διάρκεια του θηλασμού συσχετίστηκε επίσης και με τα επίπεδα μεθυλίωσης στο γονίδιο του υποδοχέα της Ιντερλευκίνης 4 (IL-4R) και άρα στην προδιάθεση εμφάνισης άσθματος στην ηλικία των 18 ετών (152), καθώς τόσο η IL-4 και ο υποδοχέας της είναι γνωστό πως συμμετέχουν στον παθογενετικό μηχανισμό του άσθματος (153). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής, αύξηση στα επίπεδα μεθυλίωσης του DNA μπορεί να προκαλέσει σίγαση, ενώ μείωση στα επίπεδα μεθυλίωσης μπορεί να οδηγήσει σε ενεργοποίηση, αντίστοιχα, των επιδράσεων συγκεκριμένων μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (Single Nuclear Polymorphisms, SNPs) στο γονίδιο του υποδοχέα IL-4R, οι οποίοι εμφανίζουν ισχυρή συσχέτιση με την εμφάνιση άσθματος (152). Πιθανή συσχέτιση του θηλασμού με τα επίπεδα μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου CDKN2A, το οποίο κωδικοποιεί πρωτεΐνες με σημαντική ογκοκατασταλτική δράση όπως οι p14 και p16 μελέτησαν οι Ταο και συν. σε πληθυσμό 639 γυναικών μέσης ηλικίας 57,5 ετών που έπασχαν από καρκίνο του μαστού, με την μελέτη τους να έχει ωστόσο σημαντικούς περιορισμούς και τα συμπεράσματα να μην αναδεικνύουν ισχυρή αιτιολογική συσχέτιση (154). Τέλος, έχει βρεθεί πως το μητρικό γάλα περιέχει περίπου 1400 μακρά μη-κωδικοποιούντα RNA αλλά και micro-RNAs που εμπλέκονται στη γονιδιακή έκφραση

σε μετα- μεταφραστικό επίπεδο, γεγονός που υπογραμμίζει πως η επιγενετική δράση του δεν περιορίζεται μόνο στον μηχανισμό μεθυλίωσης του DNA (155,156). Αυτά τα κυκλοφορούντα miRNAs αποτελούν πιθανούς ανοσορυθμιστικούς παράγοντες που στοχεύουν συγκεκριμένα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος συμβάλλοντας στη διαμόρφωσή του ήδη από τη βρεφική ηλικία (157). Για παράδειγμα, πολυάριθμα miRNAs έχουν ταυτοποιηθεί στο μητρικό γάλα με ρυθμιστική επίδραση στη διαφοροποίηση, την ωρίμανση, τον πολλαπλασιασμό και την ενεργοποίηση ή καταστολή των Β και Τ λεμφοκυττάρων αλλά και την ανάπτυξη των μονοκύτταρων λευκοκυττάρων του οργανισμού (158).

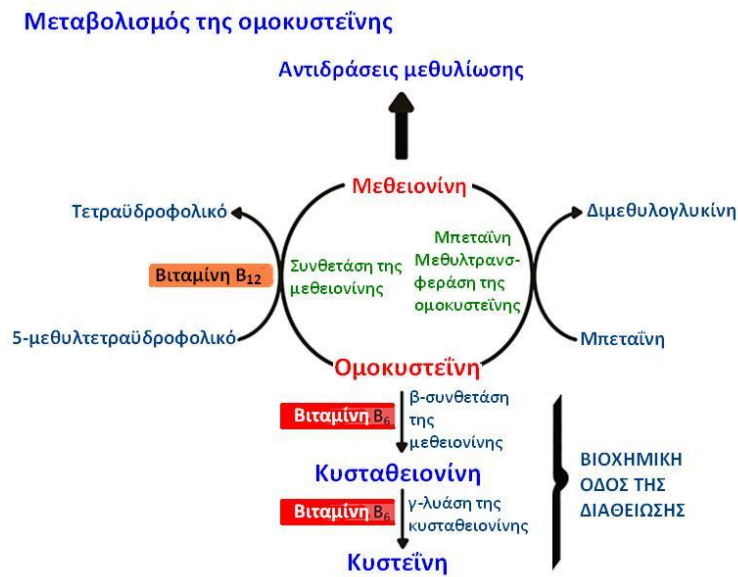
Συνεπώς, από όλα τα παραπάνω γίνεται σαφές πως η κατανόηση των περιβαλλοντικών εκθέσεων στα πρώιμα στάδια της ζωής και των αλλαγών που αυτές προκαλούν στο επιγονιδίωμα, αλλά και η ταυτοποίηση των γενετικών περιοχών στις οποίες συμβαίνουν οι αλλαγές αυτές, μπορούν να βοηθήσουν σημαντικά στην βελτίωση της υγείας του πληθυσμού και στην πρόληψη της ασθένειας. Πολύ σημαντική είναι και η αποσαφήνιση της επιγενετικής επίδρασης του μητρικού γάλακτος στη ρύθμιση της γενετικής έκφρασης και τελικά στην εμφάνιση αλλαγών στον φαινότυπο, γιατί μπορεί να επιφέρει μεγάλα οφέλη στην κατάσταση της υγείας του αναπτυσσόμενου οργανισμού (134).

Κεφάλαιο 8.

Ο επιγενετικός ρόλος της διατροφής στην μετέπειτα ζωή - Τρέχοντα δεδομένα

Η διατροφή δρα επηρεάζοντας τους μηχανισμούς επιγενετικής τροποποίησης και επομένως την οργάνωση και έκφραση των γονιδίων, χωρίς να μεταβάλλει την γονιδιακή αλληλουχία (159). Οι κύριες πηγές μεθυλικών ομάδων από τα τρόφιμα είναι το φυλλικό οξύ, η μεθειονίνη και η χολίνη, τα μεταβολικά μονοπάτια των οποίων εμπλέκονται στον σχηματισμό μεθειονίνης από ομοκυστεΐνη (εικ.9). Οποιαδήποτε διαταραχή στον μεταβολισμό των μορίων αυτών έχει ως αποτέλεσμα μεταβολή στην διαθεσιμότητα των μεθυλικών ομάδων που προσφέρονται από την S-αδενυλομεθειονίνη (SAM-e) στις βάσεις κυτοσίνης και κατά συνέπεια την εμφάνιση λαθών κατά την μεθυλίωση του DNA (52). Από επιγενετικής πλευράς, είναι γνωστό πως υπάρχει συνομιλία και αλληλεπίδραση μεταξύ της διαδικασίας της μεθυλίωσης του DNA και των μετα μεταφραστικών τροποποιήσεων των ιστονών, με την δομή της χρωματίνης να συμμετέχει και στον καθορισμό της μεθυλίωσης του DNA. Επιπλέον, τα miRNAs μπορούν να ρυθμίζουν την μεθυλίωση του DNA και τις τροποποιήσεις των ιστονών, αλλά η μεθυλίωση και η ακετυλίωση των ιστονών μπορούν επίσης να ρυθμίζουν την έκφραση των miRNAs μέσω ενός σύνθετου δικτύου παλίνδρομης ρύθμισης (feed-forward / feed-back loops). Έτσι, όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο, δεδομένου ότι οποιαδήποτε διαταραχή στην έκφραση των miRNAs σχετίζεται με ανάπτυξη ή επιδείνωση διάφορων μορφών καρκίνου στον άνθρωπο μέσω μεταβολών στις διεργασίες του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, κυτταρικής διαφοροποίησης και απόπτωσης, γίνεται κατανοητό πως δίαιτες φτωχές σε δότες μεθυλικών ομάδων ή/ και φυλλικό οξύ έχουν επίσης παρόμοια αποτελέσματα, γιατί εμπλέκονται και διαταράσσουν την έκφραση των miRNAs και συνεπώς ασκούν με παρόμοιο μηχανισμό δράσης τις καρκινικές τους ιδιότητες (33,160). Συνεπώς, η διαθέσιμη διατροφική δεξαμενή μεθυλικών δοτών είναι σημαντικός ρυθμιστής και των τριών βασικών επιγενετικών μηχανισμών, δηλαδή της μεθυλίωσης του DNA, των ιστονικών τροποποιήσεων και της έκφρασης των miRNAs (24,159).

Εικόνα 8.1 Μεταβολισμός της ομοκυστεΐνης



Πηγή: Louis R Pasquale, 2016 (161)

Παράλληλα, ορισμένα βιοενεργά συστατικά των τροφίμων μπορούν επίσης να μεταβάλλουν την γονιδιακή έκφραση ενεργοποιώντας τους μηχανισμούς επιγενετικής τροποποίησης με δύο τρόπους: είτε άμεσα μεταβάλλοντας την λειτουργία επιγενετικών ενζύμων, όπως οι DNMT (διμεθυλοτρανσφεράσες), HDAC (αποακετυλάσες των ιστονών), HAT (ακετυλοτρανσφεράσες των ιστονών) είτε έμμεσα τροποποιώντας την διαθεσιμότητα των υποστρωμάτων που είναι απαραίτητα για την πραγματοποίηση των ενζυμικών αντιδράσεων (124), μεταβάλλοντας τελικά την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στην διατήρηση της υγείας και της μακροβιότητας (162). Αρκετοί είναι οι διατροφικοί παράγοντες που δρουν ως ρυθμιστές των HDAC και HAT ενζύμων, μεταξύ των οποίων η σουλφοραφάνη, μια φυσική ένωση που συναντάται σε λαχανικά της οικογένειας των σταυρανθών, όπως το μπρόκολο, το λάχανο, το κουνουπίδι και το διαλλυλ-δισουλφίδιο (DADS), η κύρια οργανοθειική χημική ένωση του σκόρδου, ο μηχανισμός δράσης των οποίων σχετίζεται με την αναστολή της λειτουργίας των ενζύμων HDAC (163,164). Η δράση τους αυτή καθιστά τις ουσίες αυτές χρήσιμα επιγενετικά εργαλεία, μέσα από τη ρύθμιση της διακοπής του κυτταρικού κύκλου και της

διαφοροποίησης των καρκινικών κυττάρων, αλλά και μέσα από την αύξηση της ευαισθησίας των όγκων σε περισσότερο συμβατικές θεραπείες (165).

Πιο αναλυτικά, πολυάριθμες είναι οι μελέτες που καταδεικνύουν τις επιγενετικές επιδράσεις της διατροφής στον φαινότυπο και την επιρρέπεια στην εμφάνιση ασθενειών.

Αναφορικά με τα μικροθρεπτικά συστατικά της διατροφής, μελέτες σχετικά με αλλαγές στο προφίλ μεθυλίωσης του DNA και, κατά συνέπεια, με αλλαγή στην έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στον μηχανισμό της φλεγμονώδους απόκρισης έχουν διεξαχθεί σε πληθυσμούς αναφορικά με την κατανάλωση φυλλικού οξέος (166), μαγγανίου (167), χολίνης (124) και καροτενοειδών (168). Η βιταμίνη B12 και το φυλλικό οξύ, μια υδατοδιαλυτή βιταμίνη του συμπλέγματος B, είναι παραδείγματα δύο επιγενετικά ενεργών διατροφικών παραγόντων που παίζουν σημαντικό ρόλο στην διατήρηση του προφίλ μεθυλίωσης του DNA, γιατί εμπλέκονται στον σχηματισμό ομοκυστεΐνης από μεθειονίνη, ενδιάμεσο στάδιο του οποίου είναι ο σχηματισμός της S-αδενοσυλομεθειονίνης (SAM-e) (52). Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η SAM-e είναι ο κλασικός δότης μεθυλίου για τις μεθυλοτρανσφεράσες, καθώς φέρει μία εξαιρετικά δραστική ομάδα μεθυλίου (52). Η βιοδιαθεσιμότητα της SAM-e εξαρτάται από τον μεταβολισμό του άνθρακα 1 (1C), ένα μεταβολικό μονοπάτι στο οποίο εμπλέκονται οι βιταμίνες B6, B12, το φυλλικό οξύ, η χολίνη, η βηταΐνη και τα αμινοξέα μεθειονίνη, κυστεΐνη, γλυκίνη και σερίνη. Όταν κάποιο από τα συστατικά που είναι απαραίτητα για το μεταβολικό αυτό μονοπάτι απουσιάζει, όπως συμβαίνει, για παράδειγμα, στην περίπτωση ανεπάρκειας βιταμίνης B λόγω διατροφικής έλλειψης, οι διεργασίες της μεθυλίωσης του DNA και των ιστονικών τροποποιήσεων διαταράσσονται (162,169). Αρκετές είναι, επίσης, οι επιδημιολογικές μελέτες που υποδεικνύουν τις αντικαρκινικές ιδιότητες του φυλλικού οξέος μέσω επιγενετικών τροποποιήσεων, καθώς η ανεπάρκεια φυλλικού μειώνει την ικανότητα μεθυλίωσης του γονιδιώματος και μεταβολές στο προφίλ μεθυλίωσης συναντώνται σε πολλούς τύπους καρκίνου. Συγκεκριμένα, η διαιτητική πρόσληψη φυλλικού οξέος βρέθηκε να συσχετίζεται με την έκφραση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p16, στον υποκινητή του οποίου παρατηρείται συχνά μεθυλίωση του DNA, προκαλώντας την εκφραστική του σιγή στους περισσότερους τύπους καρκίνου (124). Αντίθετα, η χαμηλή κατανάλωση φυλλικού οξέος σχετίζεται

με υπομεθυλίωση και αυξημένο κίνδυνο καρκίνου του παχέος εντέρου και του παγκρέατος (163,170). Μελέτες σε ζώα αναφέρουν πως μια δίαιτα χαμηλής περιεκτικότητας σε χολίνη ή φυλλικό οξύ πριν ή και αμέσως μετά την γέννηση προκαλεί μόνιμη υπομεθυλίωση σε τμήματα του γονιδιώματος. Το ίδιο συμβαίνει και σε ενήλικες, με την διαφορά όμως πως οι αλλαγές στην μεθυλίωση του γονιδιώματος είναι αναστρέψιμες, εάν οι μεθυλικοί δότες προστεθούν εκ νέου στην διατροφή (124). Η χρόνια κατανάλωση αλκοόλ μπορεί επίσης να μεταβάλει το επιγενετικό προφίλ είτε λόγω τροποποίησης της βιοδιαθεσιμότητας των βιταμινών του συμπλέγματος Β είτε λόγω απώλειας των αμινοξέων χολίνη και μεθειονίνη, ελαττώνοντας κατ' αυτόν τον τρόπο τα ποσά της SAM-e που είναι διαθέσιμα για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων μεθυλίωσης (171).

Οι Milagro και συνεργάτες το 2013 αποκάλυψαν, επίσης, την παρουσία συστατικών της διατροφής με επίδραση στον μεταβολισμό του οργανισμού μέσω τροποποίησης των επιγενετικών μηχανισμών, όπως οι πολυφαινόλες και οι βιταμίνες (22). Διάφορες φυτικά παραγόμενες πολυφαινόλες διαθέτουν αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, καθώς παρεμβάλλονται στην ρύθμιση της λειτουργίας των ανοσοδραστικών κυττάρων, στην σύνθεση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών και στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την φλεγμονή, δρώντας προστατευτικά στην εμφάνιση ασθενειών στην παθογένεια των οποίων εμπλέκονται οι μηχανισμοί της φλεγμονής (172). Οι πολυφαινόλες είναι μία κατηγορία χημικών ενώσεων που χαρακτηρίζονται από την παρουσία πολλών δομικών μονάδων φαινόλης και συναντώνται σε αρκετές ομάδες τροφίμων, όπως τα φρούτα, τα λαχανικά και τα δημητριακά ολικής άλεσης, το τσάι, ο καφές, η μαύρη σοκολάτα, οι κόκκοι κακάο, το κόκκινο κρασί, το κύμινο, η κανέλα, η ρίγανη και τα περισσότερα μπαχαρικά (173). Διακρίνονται σε τέσσερις κατηγορίες ανάλογα με τη χημική τους δομή: τα φλαβονοειδή (επικατεχίνη, λουτεολίνη), τα φαινολικά οξέα, τις ανθοκυανίνες και τα στυλβένια, με πιο γνωστά ανάμεσά τους την ρεσβερατρόλη, το γαλλικό οξύ και την κουρκουμίνη (173). Μελέτες υποδεικνύουν την προστατευτική δράση των πολυφαινολών ενάντια στη φλεγμονή μέσω επιγενετικών τροποποιήσεων. Πιο συγκεκριμένα, η ημερήσια πρόσληψη ρεσβερατρόλης από εκχύλισμα σταφυλιού για έναν χρόνο τροποποιεί την έκφραση ομάδας miRNAs (miR-21, miR-181b, miR-663, miR-30c2, miR-155, miR-34a), τα οποία εμπλέκονται στη ρύθμιση της φλεγμονώδους απάντησης των μονοκυττάρων του αίματος σε ομάδα

αρρένων ασθενών με αρτηριακή υπέρταση και σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (174). Παράλληλα, η ρεσβερατρόλη βρέθηκε πως δρα ενεργοποιώντας μία NAD+ εξαρτώμενη αποακετυλάση των ιστονών (HDAC), το ένζυμο σιρτουΐνη 1 (SIRT 1), το οποίο συμμετέχει στην κυτταρική ρύθμιση, καθυστερώντας ή αντιστρέφοντας ορισμένες από τις φυσιολογικές αλλαγές που επέρχονται με την γήρανση, συμβάλλοντας με τον τρόπο αυτό στην μακροζωία (125). Επίσης, οι πολυφαινόλες που περιέχονται στο μάνγκο (γαλλοτανίνες και γαλλικό οξύ) μείωσαν την προκληθείσα φλεγμονή σε περιπτώσεις εντεροκολίτιδας, ρυθμίζοντας το σηματοδοτικό μονοπάτι της φλεγμονής PI3K/AKT/mTOR με προς τα άνω ρύθμιση της έκφρασης του miRNA miR-126 (175). Η χορήγηση της επικατεχίνης οδήγησε σε εξασθένιση της φλεγμονώδους απόκρισης των μονοκυττάρων της περιφερικής αιματικής κυκλοφορίας, μέσω επιγενετικής τροποποίησης με ακετυλίωση της ιστόνης H3K9 και διμεθυλίωση της ιστόνης H3K4 (176), ενώ ο συνδυασμός λουτεολίνης - φυσετίνης είχε αντιφλεγμονώδη επίδραση στα ανθρώπινα μονοκύτταρα, μέσω μηχανισμού αποακετυλίωσης των ιστονών (177). Με παρόμοιο μηχανισμό, βρέθηκε πως η κουρκουμίνη ελαττώνει την παραγωγή των προφλεγμονωδών κυτταροκινών, αναστέλλοντας την ακετυλίωση ιστονών στα μονοκύτταρα (178). Τέλος, η κουρκουμίνη και το ρετινοϊκό οξύ (ουσία που συναντάται σε τρόφιμα πλούσια σε βιταμίνη A) έχει βρεθεί πως διαθέτουν προστατευτική δράση ενάντια στον καρκίνο μέσω ρύθμισης της έκφρασης των miRNAs (99).

Αναλύσεις του προφίλ της μεθυλίωσης του DNA σε άτομα με αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο υποδεικνύουν ότι η επιγενετική υπογραφή που σχετίζεται με την κατανάλωση φρέσκου χυμού φρούτων, πλούσιου σε φρουκτόζη, βρίσκεται εμπλουτισμένη στα μονοπάτια της προφλεγμονώδους διεργασίας (179). Παράλληλα, δεδομένα της βιβλιογραφίας υποστηρίζουν την σύνδεση της υπέρμετρης κατανάλωσης φρουκτόζης με την εμφάνιση μη αλκοολικής λιπώδους διήθησης του ήπατος (ΜΑΣΗ - μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα), εμπλέκοντας την τροποποίηση των μεταγραφικών και επιγενετικών μηχανισμών στη διαταραγμένη ρύθμιση του μεταβολισμού των λιπιδίων, στη συσσώρευση λιπώδους ιστού στο ήπαρ και τελικά στην πρόκληση φλεγμονώδους αντίδρασης στον ηπατικό ιστό, καθώς οι μεμονωμένοι μοριακοί μηχανισμοί με τους οποίους η φρουκτόζη επιδρά αρνητικά

στην ρύθμιση του μεταβολισμού του ήπατος δεν είναι δυνατόν να περιγραφούν με ακρίβεια (180).

Συσχέτιση της διατροφής και με την γονιμότητα σε άρρενα άτομα έχει καταδειχθεί σε αναφορές που περιγράφουν την επίδραση συγκεκριμένων τροφίμων στην ποιότητα του σπέρματος (181). Πιο συγκεκριμένα, από την μια πλευρά έχει αναφερθεί η θετική επίδραση των φρούτων, λαχανικών, ζωικών οργάνων, ψαριού και βιταμινών A, C, E και φυλλικού οξέος στην ποιότητα του σπέρματος, ενώ από την άλλη έχει περιγραφεί η αρνητική επίδραση των κορεσμένων και trans λιπαρών οξέων, του επεξεργασμένου κρέατος, των γαλακτοκομικών προϊόντων και των φυτοοιστρογόνων που περιέχονται στη σόγια στη σπερματογένεση (181). Άλλες διατροφικές συνήθειες, όπως η κατανάλωση τείνης και καφεΐνης έχει προταθεί πως επηρεάζουν την ανδρική αναπαραγωγική ικανότητα, επιδρώντας στα ποσοστά γονιμοποίησης, εγκυμοσύνης και αποβολών (182).

Διαγενεακές έρευνες σε ζώα έχουν αποκαλύψει αυξημένη φλεγμονώδη απόκριση μετά την κατανάλωση διατροφής υψηλής θερμιδικής αξίας, πλούσιας σε λιπαρά, μέσω της μεθυλίωσης του DNA και της τροποποίησης της έκφρασης των miRNAs (183,184).

Από την άλλη πλευρά, το αντιφλεγμονώδες δυναμικό των απαραίτητων λιπαρών οξέων της διατροφής, το οποίο σχετίζεται με επιγενετικά φαινόμενα, έχει επίσης αναλυθεί, καθώς ορισμένα από τα βιοδραστικά συστατικά της διατροφής είναι γνωστό πως έχουν αρνητική επίδραση στην ρύθμιση σημαντικών φλεγμονωδών μονοπατιών (185). Η προσθήκη των ω-3 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (n-3 PUFA) στη διατροφή έχει συσχετισθεί με αλλαγές στο προφίλ μεθυλίωσης του DNA στα λευκοκύτταρα του αίματος, τα οποία συμμετέχουν στα φλεγμονώδη μονοπάτια και τις ανοσολογικές αντιδράσεις του οργανισμού (186). Επίσης, αλλαγές στην μεθυλίωση των νησίδων CpG σε γενετικές περιοχές των γονιδίων AKT3, ATF1, HDAC4, και IGFBP5 συσχετίστηκαν με μεταβολές στα επίπεδα τριγλυκεριδίων του πλάσματος, καθώς και με μεταβολή του ηλικίου ολικής προς HDL (High Density Lipoprotein) χοληστερόλη σε 36 υπέρβαρα και παχύσαρκα άτομα που μελετήθηκαν πριν και μετά την χορήγηση των ω-3 λιπαρών οξέων (186). Επιπρόσθετα, έχει αναλυθεί η αντιφλεγμονώδης επίδραση του ελαϊκού οξέος, ενός μονοακόρεστου

λιπαρού οξέος (MUFA) που συναντάται κυρίως στο ελαιόλαδο, σχετικά με την επιγενετική του υπογραφή στην μεθυλίωση του DNA (187). Μεγάλη πολυκεντρική τυχαιοποιημένη διατροφική παρέμβαση σε ασθενείς υψηλού καρδιαγγειακού κινδύνου που πραγματοποιήθηκε στην Ισπανία έδειξε πως η υιοθέτηση Μεσογειακής Διατροφής εμπλουτισμένης με εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο (ΕΠΕ) και ξηρούς καρπούς πλούσιους σε λιπαρά επηρέασε το προφίλ μεθυλίωσης CpG νησίδων του DNA σε γονίδια που εμπλέκονται στις φλεγμονώδεις οδούς των μονοκυττάρων του περιφερικού αίματος, στη μετάδοση σημάτων και στον ενδιάμεσο μεταβολισμό του οργανισμού (188). Τα αποτελέσματα της κλινικής αυτής δοκιμής ανέδειξαν την επίδραση της Μεσογειακής διατροφής στην ελάττωση του καρδιαγγειακού κινδύνου και την θετική επίδρασή της στην αρτηριακή πίεση, το λιπιδαιμικό προφίλ, την ευαισθησία στη ινσουλίνη, το οξειδωτικό στρες, την φλεγμονώδη απόκριση και τις εκδηλώσεις του μεταβολικού συνδρόμου (189), με το ΕΠΕ να ασκεί την αντιφλεγμονώδη δράση του μέσω επιγενετικών μηχανισμών στα μακροφάγα του οργανισμού, τα οποία έχουν εκτεθεί σε λιποπολυσακχαρίτες της εξωτερικής μεμβράνης Gram αρνητικών (-) μικροοργανισμών (190). Τέλος, η υιοθέτηση της Μεσογειακής Διατροφής παρουσιάζει θετική συσχέτιση με την μεθυλίωση σειράς γονιδίων που συμμετέχουν στη φλεγμονή και την ανοσοεπάρκεια σε καρδιαγγειακούς ασθενείς (188). Τα αποτελέσματα των μελετών αυτών δείχνουν πως οι φαινοτυπικές αλλαγές που παρατηρούνται μετά από την διατροφική παρέμβαση με διατροφή Μεσογειακού τύπου μπορούν να συσχετισθούν με επιγενετικές τροποποιήσεις σε συγκεκριμένα γονίδια (189) και ότι τα λιπαρά οξέα βρίσκονται ανάμεσα στους παράγοντες που διαμορφώνουν το επιγονιδίωμα, επιδρώντας στον μεταβολισμό των κυττάρων και στη μετάδοση σημάτων (106,191). Όσον αφορά στην διαιτητική πρόσληψη φυτικών ινών, μελέτη του επιγονιδιώματος που διεξήχθη σε Αφρο-Αμερικανούς εφήβους αποκάλυψε ότι τα επίπεδα μεθυλίωσης του DNA στα γονίδια LPCAT1 και RASA3, τα οποία εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία του καρκίνου του παχέος εντέρου, σχετίζονται με την κατανάλωση φυτικών ινών από την διατροφή, την συσσώρευση λιπώδους ιστού και την ενεργοποίηση της φλεγμονής (106). Επιπρόσθετα, σημαντικό φαίνεται ότι είναι ο ρόλος της επιγενετικής τροποποίησης που ασκεί και ο μεγάλης διάρκειας θερμιδικός περιορισμός στην ρύθμιση γονιδίων που συμμετέχουν σε μεταβολικές και ανοσολογικές διεργασίες

(192). Δεδομένα από δύο μεγάλες κλινικές δοκιμές [RESMENA (193)] και DIOGENES (194)] δείχνουν τη μείωση της φλεγμονώδους απόκρισης και των εκδηλώσεων του μεταβολικού συνδρόμου μετά από εφαρμογή ενεργειακού περιορισμού στην διατροφή, οδηγώντας σε πρόληψη σοβαρών χρόνιων φλεγμονωδών νοσημάτων. Ακόμη, αυξημένα επίπεδα μεθυλίωσης του DNA στο γονίδιο του παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF- α) βρέθηκαν μετά την ενίσχυση της διατροφής με εκχύλισμα από το φρούτο γκρέιπφρουτ σε ποντίκια, γεγονός το οποίο βρέθηκε πως συμβάλλει στην ελάττωση της χρόνιας χαμηλού βαθμού συστηματικής φλεγμονής που συναντάται στην παχυσαρκία (195). Επίσης, η πιπερόριζα (ginger) βρέθηκε πως μπορεί να σχετίζεται με την βελτίωση της εμφάνισης φλεγμονής στον λευκό λιπώδη ιστό τρωκτικών, μέσω ρύθμισης της έκφρασης του miRNA miR-21/132 και ενεργοποίησης του AMPK σηματοδοτικού μονοπατιού (196).

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 9.

Σκοπός

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω, θα ήταν εύλογο να θεωρηθεί ότι η μελέτη των επιγενετικών μηχανισμών μπορεί να αποδειχθεί χρήσιμη στο πλαίσιο της αλληλεπίδρασής της με την διατροφή των παιδιών και των εφήβων, καθώς θα μπορούσε να βρει εφαρμογή σε παρεμβάσεις για την πρόληψη ασθενειών, αλλά και στην διαμόρφωση ειδικών βιοδεικτών. Ωστόσο, αυτές οι μελέτες βρίσκονται ακόμα σε αρχικό στάδιο και υπάρχει έλλειψη αναφορών για τον τρόπο με τον οποίο η γονιδιακή έκφραση των ανηλίκων επηρεάζεται από τη διατροφή τους.

Η παρούσα εργασία - συστηματική ανασκόπηση στοχεύει στην κάλυψη μέρους αυτού του κενού, συνοψίζοντας την υπάρχουσα γνώση από την τρέχουσα διεθνή βιβλιογραφία σχετικά με την επίδραση της διατροφής των παιδιών και των εφήβων στη ρύθμιση των επιγενετικών τροποποιήσεων που λαμβάνουν χώρα, οδηγώντας στην ανάπτυξη χρόνιων νοσημάτων και θέτοντας σε κίνδυνο την υγεία τους.

Η γνώση των επιγενετικών αυτών μηχανισμών μπορεί να οδηγήσει στην εφαρμογή εξατομικευμένων προγραμμάτων διατροφής, με σκοπό την πρόληψη ή την πιο αποτελεσματική διαχείριση των χρόνιων παθήσεων.

Κεφάλαιο 10.

Μεθοδολογία

Πρόκειται για συστηματική ανασκόπηση με θέμα τον επιγενετικό ρόλο της διατροφής σε παιδιά και εφήβους, η οποία διενεργήθηκε σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές για τα Προτιμώμενα Στοιχεία Αναφοράς για Συστηματικές Ανασκοπήσεις και Μετα-αναλύσεις (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses, PRISMA).

Η υπόθεση κατά PRISMA ορίστηκε σύμφωνα με το ερευνητικό εργαλείο PICOS, ως εξής:

- Participants (συμμετέχοντες): Παιδιά και έφηβοι (1- 19 ετών)
- Intervention/ Exposure (Παρέμβαση/ έκθεση): Οι διατροφικές συνήθειες
- Comparators (Συγκρίσεις): Υγιεινή και ανθυγιεινή διατροφή
- Outcome (Εκβάσεις): Οι μηχανισμοί επιγενετικής ρύθμισης/ τροποποίησης
- Study Design (Σχεδιασμοί επιλέξιμων μελετών): Όλες οι πρωτογενείς μελέτες

Πραγματοποιήθηκε αναζήτηση στις ηλεκτρονικές βιβλιογραφικές βάσεις δεδομένων PubMed, Cochrane, Science Direct, Scopus, Google Scholar σε δημοσιευμένα άρθρα, για όλα τα έτη έως το 2022, με καταληκτική ημερομηνία αναζήτησης την 31η/05/2022.

Οι λέξεις-κλειδιά που χρησιμοποιήθηκαν στον αλγόριθμο αναζήτησης είναι οι ακόλουθες:

(children OR adolescents) AND (diet OR dietary OR nutrition OR food OR cereal OR carbohydrates OR fiber OR fruit OR vegetables OR fish OR meat OR sugar OR oil OR dairy) AND (“DNA methylation” OR epigenetic* OR “MicroRNAs [Mesh] OR “Histone Code” [Mesh] OR “Epigenome” [Mesh] OR “Epigenomics [Mesh]).

Επιπλέον, τέθηκαν κριτήρια ένταξης και αποκλεισμού μελετών στην παρούσα ανασκόπηση. Εντάχθηκαν άρθρα που δημοσιεύτηκαν στην ελληνική ή την αγγλική γλώσσα, με δείγμα παιδιών 1-10 ετών ή εφήβων 10-19 ετών. Οι παρεμβάσεις-εκθέσεις έπρεπε να αφορούν στις διατροφικές συνήθειες των ανηλίκων (φρούτα, λαχανικά, ψάρια, κρέας, γαλακτοκομικά, δημητριακά, φυτικές ίνες, υδατάνθρακες, λιπαρά οξέα, σάκχαρα) και οι συγκρίσεις να γίνονται ανάλογα με την χαμηλή ή υψηλή πρόσληψη συστατικών της διατροφής και με τις υγιεινές ή ανθυγιεινές συνήθειες των ηλικιακών αυτών ομάδων. Αυτές οι εκβάσεις θα έπρεπε να περιλαμβάνουν όλους τους επιγενετικούς μηχανισμούς που συμμετέχουν στη διαδικασία της γονιδιακής ρύθμισης, δηλαδή τη μεθυλίωση του DNA, την παρουσία μη κωδικοποιούντων RNA (miRNA και άλλων) και όλες τις τροποποιήσεις των ιστονών (μεθυλίωση,

φωσφορυλίωση, ακετυλίωση). Κάθε τύπος πρωτογενούς μελέτης ήταν επιτρεπτός. Αποκλείστηκαν άρθρα με δείγματα νεογνών, βρεφών και ενηλίκων καθώς και διαγενεακές μελέτες και μελέτες που δεν πραγματεύονταν τη σχέση της διατροφής με τις επιγενετικές τροποποιήσεις και την επίδρασή τους στην υγεία των παιδιών και των εφήβων.

Περαιτέρω, από κάθε μελέτη εξήχθησαν οι ακόλουθες πληροφορίες:

- πρώτος συγγραφέας,
- το έτος δημοσίευσης,
- το είδος της μελέτης,
- ο τίτλος,
- ο πληθυσμός,
- η μέση ηλικία ή το εύρος ηλικιών,
- το μέγεθος του δείγματος,
- η έκθεση (είδος ή και ποσότητα τροφίμου),
- το εργαλείο αξιολόγησης της έκθεσης και
- το αποτέλεσμα.

Για την εξέταση της ποιότητας των μελετών που προέκυψαν από την προαναφερθείσα στη μεθοδολογία διαδικασία αναζήτησης στις βάσεις δεδομένων, χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλα εργαλεία αξιολόγησης της συστηματικής μεροληψίας (risk of bias). Πιο συγκεκριμένα, για το σύνολο των μελετών παρατήρησης (συγχρονικές, ασθενών-μαρτύρων, κοόρτης) χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο Newcastle-Ottawa Scale (NOS) (http://www.ohri.ca/programs/clinical_epidemiology/oxford.asp), ενώ για τις τυχαιοποιημένες κλινικές δοκιμές χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο Risk of Bias-2 (RoB 2: a revised tool for assessing risk of bias in randomised trials) (197). Στην κλίμακα Newcastle- Ottawa ο κίνδυνος πιθανού σφάλματος για κάθε μελέτη αξιολογείται σε 3 κύριες κατηγορίες, την επιλεξιμότητα του δείγματος, την συγκρισιμότητα των υπο- ομάδων και την έκβαση/ αποτέλεσμα. Το RoB 2 είναι το συνιστώμενο εργαλείο αξιολόγησης του πιθανού σφάλματος στις τυχαιοποιημένες κλινικές δοκιμές. Αποτελείται από 5 κατηγορίες αξιολόγησης που εστιάζουν στον σχεδιασμό, την διεξαγωγή και την αναφορά των αποτελεσμάτων, με καθεμία από αυτές να αποτελείται από μία σειρά σηματοδοτικών ερωτήσεων που έχουν ως στόχο να αποσπάσουν πληροφορίες για την αξιολόγηση του σφάλματος και μέσα από μία κριτική διεργασία για τον κίνδυνο σφάλματος. Η παραπάνω διαδικασία διευκολύνεται από έναν αλγόριθμο που χαρτογραφεί τις απαντήσεις στις σηματοδοτικές ερωτήσεις και οδηγεί στην προτεινόμενη για το σφάλμα απάντηση.

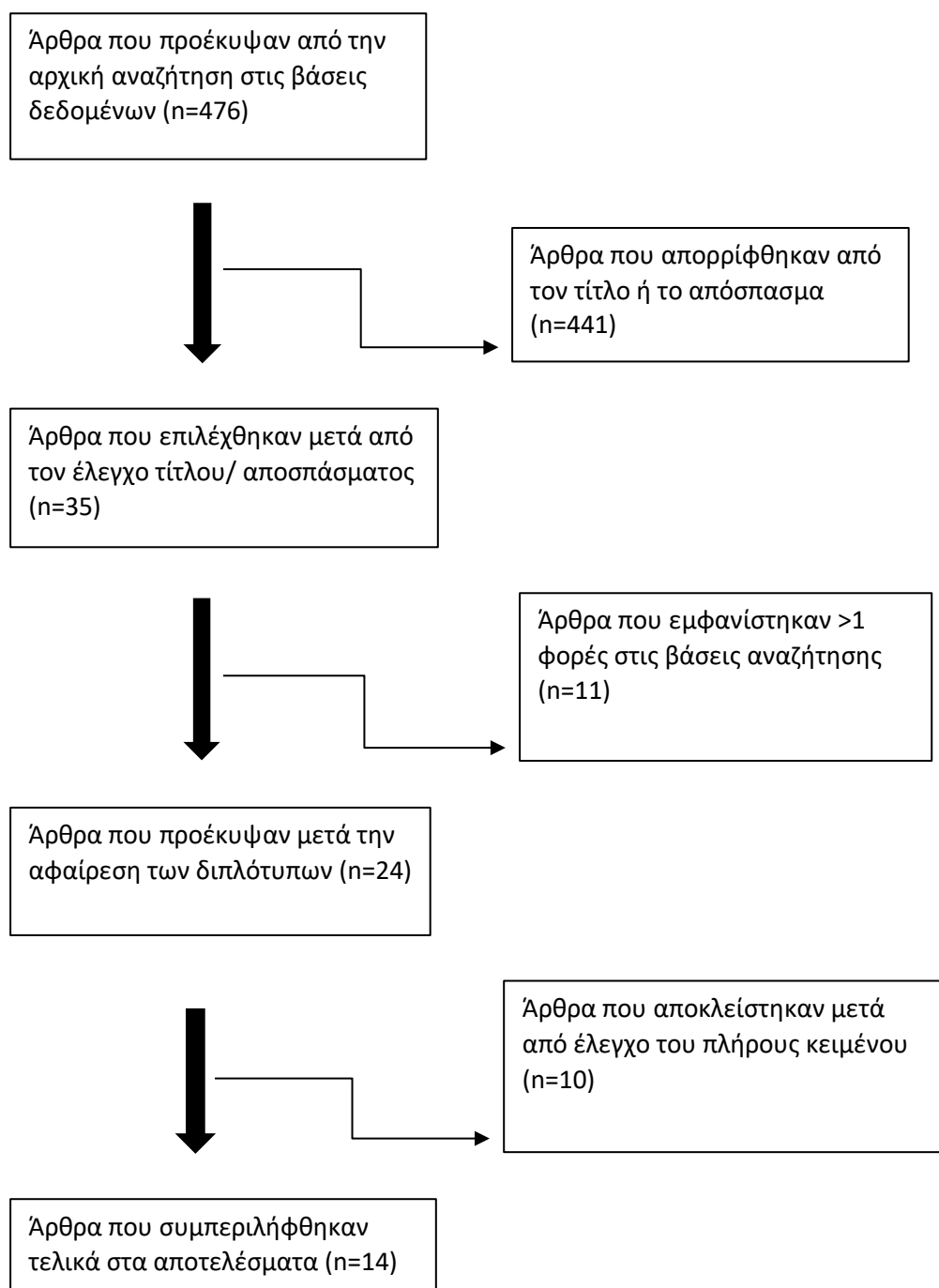
Ακολουθούν οι σχετικοί πίνακες των συνολικών αποτελεσμάτων.

Κεφάλαιο 11.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Σχήμα 11.1. Διάγραμμα ροής για την ανίχνευση και την ένταξη μελετών

PRISMA FLOWCHART



Πίνακας 11.1 Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων

Συγγραφέας, έτος δημοσίευσης, τίτλος	Είδος μελέτης	Πληθυσμός/ δείγμα	Εργαλείο	Έκθεση	Αποτελέσματα
Μελέτες παρατήρησης ασθενών-μαρτύρων					
Güiza et al. (2020). Effect of early parenteral nutrition during paediatric critical illness on DNA methylation as a potential mediator of impaired neurocognitive development: a pre-planned secondary analysis of the PEPaNIC international randomised controlled trial	Μελέτη παρατήρησης ασθενών-μαρτύρων. Προσχεδιασμένα δευτερογενή ανάλυση της κλινικής δοκιμής PEPaNIC	Ασθενείς με δείγμα αίματος τελευταίας ημέρας στην εντατική (n=825) και υγιή παιδιά-μάρτυρες (n=352)	Infinium Human Methylation EPIC BeadChip.	Πρώιμη και όψιμη παρεντερική διατροφή.	Παιδιά που νοσηλεύτηκαν σε ΜΕΘ βρέθηκε πως είχαν 159 διαφορεικά μεθυλιωμένα CpG δινουκλεοτίδια συγκριτικά με υγιή παιδιά, με μέσο μέγεθος επίδρασης 2,6% (SD 2,5) έως 21,6% (p<0.00002), με τα περισσότερα από αυτά (126/159) να είναι υπομεθυλιωμένα. Η πρώιμη παρεντερική διατροφή και ειδικότερα, η δοσολογία των χορηγούμενων αμινοξέων φάνηκε να συμβάλλει ανεξάρτητα στη διαφορεική μεθυλίωση για 37 (23%) από τις 159 θέσεις CpG (p=0.0001 έως 0.050).
Verlinden et al. (2020). Time course of altered DNA methylation evoked by critical illness and by early administration of parenteral nutrition in the paediatric ICU.	Μελέτη παρατήρησης ασθενών-μαρτύρων. Προσχεδιασμένα δευτερογενή ανάλυση της κλινικής δοκιμής PEPaNIC	Ασθενείς που έλαβαν πρώιμη (n=36) και όψιμη παρεντερική διατροφή (n=36) και υγιή παιδιά-μάρτυρες (n=42).	Infinium® HumanMethylation EPIC BeadChip	Πρώιμη και όψιμη παρεντερική διατροφή.	Τα επίπεδα μεθυλίωσης βρέθηκαν να διαφέρουν μεταξύ ασθενών και υγιών μαρτύρων στο 64,6% των 147 CpG δινουκλεοτιδίων την ημέρα 3 παραμονής στη ΜΕΘ, ποσοστό που αυξήθηκε σε

					72,8% κατά την ημέρα 5 και σε 90,5% την ημέρα 7. Μεταξύ των ζευγών ασθενών που έλαβαν είτε πρώιμη είτε όψιμη παρεντερική διατροφή, ραγδαία απομεθυλίωση παρατηρήθηκε από την ημέρα εισαγωγής έως την ημέρα 3 στο 76,2% των CpG θέσεων. Από την ημέρα εισαγωγής έως την ημέρα 3, το 19,7% των CpG δινουκλεοτιδίων εμφάνισαν υπερμεθυλίωση, ενώ μόλις το 4,1% των CpG εμφάνισαν αλλαγές στα επίπεδα μεθυλίωσης όχι από την εισαγωγή αλλά μετά την ημέρα 3.
Συγχρονικές μελέτες					
Voisin et al. (2015). Dietary fat quality impacts genome-wide DNA methylation patterns in a cross-sectional study of Greek preadolescents.	Συγχρονική επιδημιολογική μελέτη παρατήρησης.	Παιδιά σχολικής ηλικίας (n=69)	Illumina Infinium HumanMethylation27 BeadChip. Προσωπικές συνεντεύξεις διατροφής.	Ελεύθερη διατροφή: Συνολική πρόσληψη χοληστερόλης, την αναλογία της ενεργειακής πρόσληψης από λίπος, καναλογία ενεργειακής πρόσληψης από PUFA/SFA, MUFA/SFA (MUFA+PUFA)/SFA.	Τα επίπεδα μεθυλίωσης 2 νησίδων, 11 ακτών και 16 CpG θέσεων συσχετίστηκαν σημαντικά με την αναλογία πρόσληψης PUFA/SFA, τα επίπεδα μεθυλίωσης από 9 νησίδες, 26 ακτές και 158 CpG θέσεις συσχετίστηκαν με την αναλογία πρόσληψης MUFA/SFA, ενώ τα επίπεδα μεθυλίωσης από 10 νησίδες, 40 ακτές και 130 CpG θέσεις συσχετίστηκαν με την αναλογία

					<p>διατροφικής πρόσληψης (MUFA+PUFA)/SFA. Τα επίπεδα μεθυλίωσης σε μία νησίδα CpG και σε 4 CpG δινουκλεοτιδικές αλληλουχίες συσχέτιστηκαν σημαντικά με τη συνολική πρόσληψη λίπους</p>
<p>Chen et al. (2018). Epigenome-Wide Association Study of Dietary Fiber Intake in African American Adolescents.</p>	<p>Συγχρονική επιδημιολογική μελέτη παρατήρησης</p>	<p>Αφρο-αμερικανοί έφηβοι (n=284).</p>	<p>Illumina 450K Bead-Chip.</p> <p>Ειδικά δομημένες 24ωρες διατροφικές συνεντεύξεις</p>	<p>Ελεύθερη διατροφή (διατροφική ή πρόσληψη φυτικών ινών).</p>	<p>Βρέθηκαν 4 διαφορετικά μεθυλωμένες CpG θέσεις που είχαν αρνητική συσχέτιση με την διατροφική πρόσληψη φυτικών ινών, οι 2 από τις οποίες (στα γονίδια LPCAT1 και RASA3) εμφάνισαν συσχέτιση με την σπλαχνική παχυσαρκία και τον φλεγμονώδη μηχανισμό.</p>
<p>Montrose et al. (2017). Dietary intake is associated with respiratory health outcomes and DNA methylation in children with asthma.</p>	<p>Συγχρονική επιδημιολογική μελέτη παρατήρησης</p>	<p>Παιδιά με άσθμα (n=32), που είχαν χρησιμοποιηθεί σε άλλη μεγαλύτερη τυχαιοποιημένη κλινική δοκιμή για το άσθμα (ARTIS)</p>	<p>Όργανο ποιότητας ζωής για το άσθμα RAQLQ. Πνευμονικές λειτουργικές δοκιμασίες dPFV και FEV1.</p> <p>Ερωτηματολόγια συχνότητας τροφίμων. Προσδιορισμοί πυροαλληλουχίας για την</p>	<p>Ελεύθερη διατροφή.</p>	<p>Η πρόσληψη θρεπτικών συστατικών-δοτών μεθυλίου, όπως η χολίνη και το φυλλικό οξύ, συσχέτιστηκε θετικά με τη μεθυλίωση της μεταθετής αλληλουχίας LINE-1. Η πρόσληψη βηταΐνης και βιταμίνης B6 σχετίστηκε αρνητικά με τη μεθυλίωση της θέσης CpG-186 του υποκινητή της IFN-γ.</p>

			μέτρηση της μεθυλίωσης.		
Μελέτες κοόρτης					
Moleres et al. (2013). Differential DNA methylation patterns between high and low responders to a weight loss intervention in overweight or obese adolescents: the EVASYON study.	Μελέτη κοόρτης	Υπέρβαροι ή παχύσαρκοι έφηβοι (n=36)	Human Methylation 27 Bead Chip για 27.578 CpG δινουκλεοτιδικές αλληλουχίες σε συνολικό αριθμό 14.495 γονιδίων και φασματομετρία μάζας MALDI-TOF. Ερωτηματολόγια συχνότητας τροφίμων	Εξατομικευμένο πρόγραμμα διατροφής (30% λιπαρά, 15% πρωτεΐνες, 55% υδατάνθρακες) για 10 εβδομάδες.	Σε 5 περιοχές που βρίσκονται μέσα ή κοντά στα γονίδια AQP9, DUSP22, HIPK3, TNNT1 και TNNT3 βρέθηκαν διαφορετικά επίπεδα μεθυλίωσης μεταξύ των δύο υποομάδων. Ένα αθροιστικό σκορ μεθυλίωσης συσχετίστηκε σημαντικά με αλλαγές στο βάρος, τον ΔΜΣ και την απώλεια σωματικού λίπους μετά την παρέμβαση.
Jacobs et al. (2021). Differential DNA methylation by early versus late parenteral nutrition in the PICU: a biological basis for its impact on emotional and behavioral problems documented 4 years later.	Μελέτη κοόρτης	Παιδιά από την ομάδα όψιμης (n=211) και από την ομάδα πρώιμης παρεντερικής διατροφής (n=192).	Κλινικά τεστ-προσαρμοσμένους στην ηλικία για τον δείκτη νοημοσύνη, τη μνήμη, την εγρήγορση, τον κινητικό συντονισμό και την οπτικοκινητική ανάπτυξη. Ερωτηματολόγια από γονείς/φροντιστές για την εκτελεστική	Πρώιμη και όψιμη παρεντερική ή διατροφή.	Η προκαλούμενη από έναρξη πρόωρης παρεντερικής διατροφής διαφορική μεθυλίωση των 37 θέσεων CpG εξήγησε τον επιβλαβή αντίκτυπο της στους 3 τομείς συμπεριφοράς και συναισθήματος (εσωτερίκευση-εξωτερίκευση συναισθήματος και συνολικά συμπεριφορικά-συναισθηματικά προβλήματα).

			ή λειτουργία, συναισθηματικά και συμπεριφορικά προβλήματα των παιδιών Ανάλυση διαμεσολάβησης		
Μελέτες Παρέμβασης					
Stevens et al. (2018). Methylomic changes in response to micronutrient supplementation and MTHFR genotype.	Τυχαιοποιημένα ελεγχόμενη κλινική δοκιμή	Παιδιά με ΔΕΠΥ (n=36).	Infinium Methylation EPIC 850 K.	Συμπλήρωμα διατροφής με βιταμίνες, μέταλλα, αμινοξέα και αντιοξειδωτικά	Η μεθυλίωση αυξήθηκε στο 84% των πιο σημαντικών διαφορικά μεθυλιωμένων CpG. Ωστόσο, κανένα μεμονωμένο CpG δινοκυλεοτιδίο δεν έδειξε σημαντικότητα μετά την προσαρμογή για γονιδίωμα.
Peters et al. (2010). Double-blind therapeutic trial in Angelman syndrome using betaine and folic acid.	Διπλή τυφλή ελεγχόμενη κλινική δοκιμή	Παιδιά με σύνδρομο Angelman (n=48)	Γενικές κλινικές και αναπτυξιακές αξιολογήσεις, γονεϊκό ερωτηματολόγιο VABS-II, κλίμακα BSID- II, κλίμακα PLS-3, βιοχημικές παράμετροι σε αίμα και ούρα και ηλεκτροεγκ	Συμπλήρωμα διατροφής με βηταΐνη και φυλλικό οξύ για 1 χρόνο	Δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές αλλαγές στην αναπτυξιακή απόδοση μεταξύ των παιδιών που έλαβαν θεραπεία και των παιδιών που δεν έλαβαν θεραπεία. Στατιστικά σημαντική διαφορά στην βελτίωση της κινητικότητας και των κοινωνικών δεξιοτήτων στα παιδιά που έλαβαν θεραπεία έναντι

			εφαλογραφικές μελέτες		αυτών που έλαβαν placebo.
Bird et al. (2011). A therapeutic trial of pro-methylation dietary supplements in Angelman syndrome.	Μη τυχαιοποιημένα προοπτική κλινική δοκιμή	Παιδιά με σύνδρομο Angelman (n=65)	Γονεϊκό ερωτηματολόγιο VABS-II, κλίμακα BSID- III, κλίμακα PLS-4. Ανάλυση μεθυλίωσης με την συστοιχία Human Methylation 27 Bead Chip array,	Συμπλήρωμα διατροφής με βηταΐνη, μεταφολίνη, κρεατίνη και βιταμίνη B12 για 1 χρόνο	Δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές αλλαγές στη γνωστική και γλωσσική λειτουργία των παιδιών που έλαβαν θεραπεία. Δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές αλλαγές στα ολικά επίπεδα μεθυλίωσης του DNA κατά τη σύγκριση δειγμάτων πριν και μετά τη θεραπεία. Υπήρξαν παρενέργειες.
McMorrow et al. (2018). Personalized Cardio-Metabolic Responses to an Anti-Inflammatory Nutrition Intervention in Obese Adolescents: A Randomized Controlled Crossover Trial.	Τυχαιοποιημένα, διπλή τυφλή, ελεγχόμενη διασταυρούμενη κλινική δοκιμή	Υπέρβαροι και παχύσαρκοι έφηβοι (n=70)	Αξιολόγηση ομοιοστατικού μοντέλου (HOMA)-IR, επίπεδα αδιπονεκτίνης, συγκεντρώσεις λιπιδίων και λιποπρωτεϊνών, φλεγμονώδεις προφίλ και επίπεδα μεθυλίωσης DNA. Infinium HumanMethylation45	Αντιφλεγμονώδες συμπλήρωμα διατροφής (n-3 PUFA, βιταμίνη C, α-τοκοφερόλη, εκχύλισμα πράσινου τσαγιού και λυκοπένιο) για 8 εβδομάδες	Το AINS δεν επηρέασε τον δείκτη HOMA-IR στη συνολική κοόρτη, αλλά διατήρησε τα επίπεδα αδιπονεκτίνης ΨMB ρυθμίζοντας προς τα πάνω και τα επίπεδα mRNA των ADIPOR1 και ADIPOR2. Σημαντικές συσχετίσεις βρέθηκαν μεταξύ των επιπέδων αδιπονεκτίνης ΨMB και του status μεθυλίωσης σε 487 CpG θέσεις σε 5 αδιπογόνα γονίδια που εμπλέκονται

			0 BeadChip assay		στη διαφοροποίηση του λιπώδους ιστού
Yadav et al. (2017). Vitamin B12 supplementation influences methylation of genes associated with Type 2 diabetes and its intermediate traits.	Τυχαιοποιημένη κλινική δοκιμή	Παιδιά που είχαν χρησιμοποιηθεί σε προηγούμενη κλινική δοκιμή (PMNS) (n=48)	Infinium HumanMethylation450 BeadChip.	Συμπλήρωμα διατροφής (με B12, B12 + φυλλικό οξύ, φυλλικό οξύ, placebo)	Η διατροφική χορήγηση συμπληρώματος βιταμίνης B12 (είτε αποκλειστικά είτε σε συνδυασμό με φυλλικό οξύ) βρέθηκε να σχετίζεται με μεγάλο αριθμό διαφορικά μεθυλιωμένων CpGs (στα FTO και TCF7L2 γονίδια που σχετίζονται με τον ΣΔ 2) αλλά και με την υπερμεθυλίωση μίας γενετικής περιοχής κοντά στον υποκινητή του miR21.
Martins et al. (2020). Effects of grape juice consumption on oxidative stress and inflammation in male volleyball players: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial.	Τυχαιοποιημένη διπλή-τυφλή κλινική δοκιμή.	Αγόρια-παίκτες βόλλεϋ (n=12, μέση ηλικία 16 ετών).	Δείκτες οξειδωτικού ύστρες, φλεγμονώδεις κυτταροκίνες IFN-γ + IL-4, βαθμός μυϊκής καταστροφής (επίπεδα κρεατινικής κινάσης), ολικά επίπεδα ακετυλίωσης ιστόνης H4. Μέτρηση μυϊκής ισχύος για	Χυμός σταφυλιού (400ml) ή placebo (400ml) για 14 ημέρες.	Η κατανάλωση χυμού σταφυλιού μείωσε σημαντικά την υπεροξειδωση των λιπιδίων (p = 0,04) και τη βλάβη του DNA μετά τον αγώνα. Τα επίπεδα IFN-γ, IL-4, CK-NAC και ακετυλίωσης ιστόνης H4 μετά τον αγώνα δεν άλλαξαν με την κατανάλωση χυμού σταφυλιού. Στατιστικά σημαντικές ήταν οι διαφορές στα επίπεδα ακετυλίωσης της H4 τόσο μεταξύ των 3 καταστάσεων κατανάλωσης ή μη ροφημάτων (p <

			άνω + κάτω άκρα. Προσδιορισμός ακετυλίωσης της ιστόνης: Histone H4 Assay Kit.		0.01) όσο και μεταξύ των χρονικών στιγμών πριν και μετά τους αγώνες προσομοίωσης ($p < 0.01$). Σημαντική ελάττωση στα ολικά επίπεδα ακετυλίωσης (-59.1%) παρατηρήθηκε στην ομάδα ελέγχου μετά την προσομοίωση αγώνα ($p < 0.01$).
Gallardo-Escribano et al. (2020). Epigenetic approach in obesity: DNA methylation in a prepubertal population which underwent a lifestyle modification.	Μη τυχαιοποιημένη κλινική δοκιμή	Προεφηβικά άτομα με φαινότυπο μεταβολικά υγιούς παχυσαρκίας (n=131).	Αξιολόγηση ομοιοστατικού μοντέλου (HOMA)-IR, για την αδιπονεκτινη, το προφίλ φλεγμονής και την μεθυλίωση DNA, σωματομετρήσεις.	Εξατομικευμένη μεσογειακή διατροφή σε συνδυασμό με πρόγραμμα άσκησης επί 12 μήνες.	Η μεθυλίωση του DNA όλων των γονιδίων που μελετήθηκαν τροποποιήθηκε σημαντικά. Η μεθυλίωση του γονιδίου LPL βρέθηκε αυξημένη στα κορίτσια μετά από 4 μήνες και διατηρήθηκε αυξημένη στο τέλος των παρεμβάσεων. Το ίδιο συνέβη και με τη μεθυλίωση του γονιδίου LEP, η οποία αυξήθηκε στα κορίτσια μετά από 12 μήνες. Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις βρέθηκαν μεταξύ μεθυλίωσης των προαναφερθέντων γονιδίων και ανθρωπομετρικών μετρήσεων (ΔΜΣ), σύστασης του σώματος-εναπόθεσης

					σπλαγγνικού λίπους, δείκτη HOMA-IR, επιπέδων ινσουλίνης στο αίμα και τήρησης της ΜΔ.
--	--	--	--	--	--

Αξιολόγηση της ποιότητας των μελετών (risk of bias)

Πίνακας 11.2 Μελέτες κοόρτης και μη- τυχαιοποιημένες κλινικές δοκιμές (Newcastle-Ottawa Scale)

	Επιλογή (έως 4)	Συγκρισιμότητα (έως 2)	Αποτέλεσμα (έως 3)	Σύνολο (έως 9)
Μελέτη				
Moleres et al. (2013).	3	1	3	7
Jacobs et al., 2021.	4	1	3	8
Gallardo-Escribano et al., 2020	3	2	3	8
Bird et al., 2011	4	2	3	9

Πίνακας 11.3 Μελέτες ασθενών- μαρτύρων (Newcastle- Ottawa Scale)

	Επιλογή (έως 4)	Συγκρισιμότητα (έως 2)	Αποτέλεσμα (έως 3)	Σύνολο (έως 9)
Μελέτη				
Güiza et al., 2020.	4	1	2	7
Verlinden et al., 2020.	4	1	2	7

Πίνακας 11.4 Συγχρονικές μελέτες (Newcastle- Ottawa Scale)

	Επιλογή (έως 5)	Συγκρισιμότητα (έως 2)	Αποτέλεσμα (έως 3)	Σύνολο (έως 10)
Μελέτη				
Montrose et al., 2017	2	1	3	6
Chen et al., 2018	3	2	3	8
Voisin et al., 2015	3	2	3	8

Πίνακας 11.5 Αξιολογία τυχαιοποιημένων κλινικών δοκιμών (Rob 2)

Domains	Stevens et al., 2018	Peters et al., 2010	McMorrow et al., 2018	Yadav et al., 2017	Martins et al., 2020
Risk of bias arising from the randomization process	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk
Risk of bias due to deviations from the intended interventions	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk
Bias due to missing outcome data	Low risk	Some concerns	Some concerns	Low risk	Low risk
Risk of bias in measurement of the outcome	Low risk	Low risk	Low risk	High risk	Low risk
Risk of bias in selection of the reported result	Low risk	Some concerns	Low risk	Some concerns	Low risk
Overall risk of bias	Low risk	Some concerns	Some concerns	High risk	Low risk

11.1 Ο επιγενετικός ρόλος της διατροφής

Ο χρόνος έκθεσης και η δοσολογία των διατροφικών συστατικών που απαιτούνται για την τροποποίηση των προτύπων μεθυλίωσης του DNA είναι σε μεγάλο βαθμό άγνωστα. Παρόλα αυτά, οι Stevens και συν. πραγματοποίησαν την πρώτη ανάλυση αλλαγών μεθυλίωσης του DNA σε ολόκληρο το γονιδίωμα κατά τη διάρκεια μιας τυχαιοποιημένης ελεγχόμενης κλινικής δοκιμής με συμπλήρωμα διατροφής αποτελούμενο από ευρέως φάσματος βιταμίνες, μέταλλα και αμινοξέα σε παιδιά με διάγνωση Διαταραχής Ελλειμματικής Προσοχής και Υπερκινητικότητα (ΔΕΠΥ), (n=36), ηλικίας 7 έως 12 ετών (198). Η παρέμβαση έλαβε χώρα για συνολικό χρονικό διάστημα 10 εβδομάδων. Όλοι οι συμμετέχοντες βρίσκονταν κάτω από επιτηρούμενη χορήγηση χαπιού με τη μορφή κάψουλας, η οποία για την ομάδα που έλαβε την θεραπευτική παρέμβαση περιείχε μεταξύ άλλων βιταμίνες A,C,D,K, σύμπλεγμα βιταμινών B, σίδηρο, ασβέστιο, ψευδάργυρο, μαγνήσιο, φώσφορο, ιώδιο, σελήνιο, αντιοξειδωτικά κ.ά, ενώ για την ομάδα που έλαβε το εικονικό φάρμακο (placebo), αυτό περιείχε μεταξύ άλλων μαλτοδεξτρίνη και σκόνη κακάο. Οι αλλαγές σε όλο το γονιδίωμα στη μεθυλίωση του DNA από ζεύγη δειγμάτων περιφερικού αίματος, τα οποία ελήφθησαν πριν και μετά την εφαρμογή της διατροφικής παρέμβασης και αξιολογήθηκαν χρησιμοποιώντας τη συστοιχία Infinium Methylation EPIC 850 K. Ανάλυση της μεθυλίωσης του DNA πραγματοποιήθηκε σε κάθε ένα από τα ληφθέντα δείγματα (N=72). Από τις 100 πιο σημαντικά διαφορικά μεθυλιωμένες CpG αλληλουχίες, η μεθυλίωση στα δείγματα πριν και μετά την εφαρμογή της διατροφικής παρέμβασης βρέθηκε αυξημένη στις 84 εξ' αυτών (αύξηση κατά 84%) [ως διαφορικά μεθυλιωμένη περιοχή (Differentially Methylated Region, DMR) χαρακτηρίζεται ο γονδιακός τόπος στον οποίο υπάρχουν διαφορετικά πρότυπα μεθυλίωσης μεταξύ πολλαπλών δειγμάτων, τα οποία μπορεί να προέρχονται είτε από διαφορετικά κύτταρα/ ιστούς του ίδιου οργανισμού είτε από το ίδιο κύτταρο σε διαφορετικές χρονικές στιγμές είτε ακόμη και από κύτταρα διαφορετικών οργανισμών]. Ωστόσο, σε κανένα μεμονωμένο CpG δινουκλεοτίδιο η αύξηση της μεθυλίωσης δεν έδειξε στατιστική σημαντικότητα μετά την προσαρμογή για δοκιμές σε όλο το γονιδίωμα, γιατί στις πιο σημαντικά διαφορικά μεθυλιωμένες CpG αλληλουχίες το ποσοστό αύξησης της μεθυλίωσης δεν ξεπέρασε το 5%. Επιπλέον, δεν βρέθηκαν σημαντικές αλλαγές στα ολικά επίπεδα μεθυλίωσης μεταξύ των ομάδων που έλαβαν θεραπεία ή placebo ($p > 0.05$), καθώς μόνο 11 ήταν οι θέσεις CpG στις οποίες η μέση διαφορά στη μεθυλίωση μεταξύ των δύο ομάδων ήταν $>10\%$. Οι βάσεις δεδομένων GO και KEGG χρησιμοποιήθηκαν με σκοπό να γίνει η αντιστοίχιση των 100 των πιο σημαντικών διαφορικά μεθυλιωμένων CpG θέσεων και να αξιολογηθεί η βιολογική τους σημαντικότητα και βρέθηκε συσχέτισή τους με 3 γονίδια που εμπλέκονται στο οσφρητικό σηματοδοτικό μονοπάτι ($p = 0.0001$), κάτι που θα πρέπει όμως να ερμηνευτεί με μεγάλη προσοχή, γιατί στο μονοπάτι αυτό εμπλέκονται περισσότερα από 388 διαφορετικά γονίδια. Η οσφρητική οδός παίζει

ρόλο στην αντίληψη των γεύσεων, των οσμών και του φαγητού, αλλά η συσχέτισή της με το συμπλήρωμα μικροθρεπτικών συστατικών και με την μεθυλίωση του DNA δεν είναι γνωστή. Συνεπώς, η γενική τάση προς την υπερμεθυλίωση που παρατηρήθηκε στην ομάδα που έλαβε την θεραπευτική παρέμβαση υποδεικνύει ότι οι επιδράσεις του χορηγούμενου συμπληρώματος στα επίπεδα μεθυλίωσης του DNA αντιστοιχούν κυρίως σε αλλαγές στην έκφραση μικρών γονιδιακών τόπων και όχι συγκεκριμένων γονιδίων, με αποτέλεσμα να θεωρείται σχεδόν απίθανο η μεθυλίωση των μορίων κυτοσίνης να παίζει άμεσο ρόλο στην ευνοϊκή επίδραση του συμπληρώματος σε παιδιά με ΔΕΠΥ.

Δύο μελέτες παρέμβασης αφορούσαν στο σύνδρομο Angelman, το οποίο οφείλεται σε μειωμένη έκφραση ή απουσία έκφρασης του μητρικά κληρονομούμενου γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη λιγκάση 3A της ουβικουιτίνης (UBE3A) και το οποίο χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 15q11-q13 (199). Το γονίδιο UBE3A υπόκειται σε γονιδιακή αποτύπωση σε νευρώνες στις περισσότερες περιοχές του εγκεφάλου, δηλαδή σε μηχανισμό κατά τον οποίο η έκφραση των δύο αλληλόμορφων ενός γονιδίου εξαρτάται από την μητρική ή την πατρική τους προέλευση (199). Έτσι, η έκφραση του UBE3A από το μητρικό χρωμόσωμα είναι απαραίτητη για την πρόληψη του συνδρόμου Angelman, επειδή το πατρικά κληρονομούμενο γονίδιο δεν εκφράζεται, πιθανώς με τη μεσολάβηση του αντιπληροφοριακού UBE3A RNA.

Οι Peters και συν. υπέθεσαν ότι η αύξηση της μεθυλίωσης μπορεί να μειώσει την έκφραση του αντιπληροφοριακού UBE3A RNA, αυξάνοντας έτσι την έκφραση του πατρικής προέλευσης UBE3A γονιδίου και βελτιώνοντας με αυτό τον τρόπο τον κλινικό φαινότυπο του συνδρόμου (200), ο οποίος περιλαμβάνει μεταξύ άλλων αναπτυξιακή καθυστέρηση, ήπια έως σοβαρή νοητική υστέρηση, σπασμούς, κρίσεις απρόσφορου γέλιου, υπερκινητικότητα, αταξία και διαταραχές ύπνου (199). Πραγματοποίησαν κλινική δοκιμή χρησιμοποιώντας δύο συμπληρώματα διατροφής, τη βηταΐνη και το φυλλικό οξύ, τα οποία είναι δότες μεθυλικών ομάδων, επιχειρώντας να αυξήσουν τα ολικά επίπεδα μεθυλίωσης του DNA και να προκαλέσουν έτσι ενεργοποίηση του γονιδίου UBE3A που κληρονομήθηκε από τον πατέρα σε παιδιά με σύνδρομο Angelman. Διενήργησαν έναν αριθμό ελέγχων ανά τακτά χρονικά διαστήματα, συμπεριλαμβανομένων γενικών κλινικών και αναπτυξιακών αξιολογήσεων, μετρήσεων βιοχημικών παραμέτρων σε δείγματα αίματος και ούρων, καθώς και ηλεκτροεγκεφαλογραφικών ευρημάτων και ανέφεραν τα δεδομένα για 48 παιδιά με το σύνδρομο, ηλικιών 5 μηνών έως 14 ετών, τα οποία εντάχθηκαν σε διπλό τυφλό ελεγχόμενο πρωτόκολλο με εικονικό φάρμακο χρησιμοποιώντας βηταΐνη και φυλλικό οξύ για 1 έτος. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης τους, δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των παιδιών που έλαβαν και των παιδιών που δεν έλαβαν θεραπεία ούτε ως προς τις βιοχημικές παραμέτρους που μετρήθηκαν ούτε ως προς τις αναπτυξιακές αξιολογήσεις που πραγματοποιήθηκαν, μέσω ποικίλων σταθμισμένων αναπτυξιακών εργαλείων

βασισμένων σε σειρά καθηκόντων - εργασιών που ανατέθηκαν στα παιδιά από ειδικό ψυχολόγο/ αξιολογητή (όπως τα BSID-II: Bayley Scales of Infant and Toddler Development, 2nd Edition και PLS-3: Preschool Language Scale, 3rd Edition). Επίσης, στατιστικά σημαντικές διαφορές δεν βρέθηκαν και στις περισσότερες από τις παραμέτρους που χρησιμοποιήθηκαν στο γονεϊκό ερωτηματολόγιο αξιολόγησης των καθημερινών δεξιοτήτων αυτοεξυπηρέτησης, κινητικότητας, κοινωνικότητας και επικοινωνίας (Vineland Adaptive Behavior Scales, Second Edition: VABS-II) των παιδιών με το σύνδρομο, αλλά ούτε και στον αριθμό των αντιεπιληπτικών φαρμάκων που χρειάστηκαν για τον έλεγχο των επιληπτικών κρίσεων μεταξύ των παιδιών που έλαβαν θεραπευτική παρέμβαση και αυτών που έλαβαν εικονικό φάρμακο. Παιδιά που έλαβαν τη θεραπεία και δεν είχαν συνυπάρχουσα διάγνωση αυτισμού έδειξαν ανοδική πορεία στην αναπτυξιακή τους κλίμακα με τη διαφορά όμως να μην είναι στατιστικά σημαντική σε σχέση με αυτά που δεν έλαβαν θεραπεία. Μία στατιστικά σημαντική διαφορά που παρατηρήθηκε ανάμεσα στις παραμέτρους του γονεϊκού ερωτηματολογίου ($p=0.02$) ήταν η αναφερόμενη ελάττωση στα επίπεδα της υπερκινητικής συμπεριφοράς των παιδιών τα οποία έλαβαν για ένα έτος τη διατροφική παρέμβαση με βηταΐνη και φυλλικό οξύ σε αντίθεση με αυτά που έλαβαν placebo. Πιο συγκεκριμένα, οι γονείς/ φροντιστές των συμμετεχόντων και των δύο ομάδων ανέφεραν ότι τα παιδιά εμφάνισαν βελτίωση στην κινητικότητά τους, καθώς ήταν ικανά να παραμείνουν ήρεμα ή ακίνητα για μεγαλύτερη διάρκεια, ωστόσο οι γονείς των παιδιών που έλαβαν την θεραπεία ανέφεραν μεγαλύτερες βελτιώσεις στην ικανότητα αυτή συγκριτικά με τα προ της θεραπείας επίπεδα. Επιπλέον, στατιστικά σημαντική βρέθηκε η διαφορά στα επίπεδα των κοινωνικών δεξιοτήτων των παιδιών που έλαβαν θεραπεία συγκριτικά με αυτά που δεν έλαβαν θεραπεία, όπως αναφέρθηκε από τους γονείς/ φροντιστές στο σχετικό ερωτηματολόγιο ($p < 0.03$), με τα αποτελέσματα αυτά να αφορούν κυρίως παιδιά μικρότερων ηλικιακών ομάδων που είχαν διαγνωστεί με το σύνδρομο. Συνολικά, τα αποτελέσματα αυτής της κλινικής δοκιμής δεν ανέδειξαν τη βηταΐνη και το φυλλικό οξύ σε αποτελεσματικές θεραπείες του συνδρόμου Angelman, αν και μερικοί γονείς/ φροντιστές επέλεξαν να συνεχίσουν την χορήγηση 5mg φυλλικού οξέος καθημερινά στα παιδιά, καθώς δεν αναφέρθηκαν ανεπιθύμητες αντιδράσεις από την παρέμβαση αυτή.

Παρομοίως, οι Bird και συν. πραγματοποίησαν μια μη τυχαιοποιημένη, προοπτική κλινική δοκιμή χρησιμοποιώντας συμπληρώματα διατροφής που προάγουν τη μεθυλίωση, όπως η βηταΐνη, η μεταφολίνη, η κρεατίνη και η βιταμίνη B12, σε μια προσπάθεια να μειώσουν την παραγωγή αντιπληροφοριακών μεταγραφών, να αυξήσουν την έκφραση του γονιδίου UBE3A και να βελτιώσουν τα συμπτώματα του συνδρόμου σε παιδιά με σύνδρομο Angelman ηλικιών 5 έως 64 μηνών (201). Όλοι οι συμμετέχοντες στην μελέτη έλαβαν τη θεραπευτική παρέμβαση και τα δεδομένα από αυτή συγκρίθηκαν με τα δεδομένα της ομάδας ελέγχου από προηγούμενη

τυχαιοποιημένη διπλή-τυφλή κλινική δοκιμή με χρήση φυλλικού οξέος και βηταΐνης, αυτής των Peters και συν. (200). Οι νευροψυχολογικές αξιολογήσεις, οι βιοχημικοί έλεγχοι και η αξιολόγηση της μεθυλίωσης του DNA πραγματοποιήθηκαν στην αρχή και στο τέλος ενός έτους από την εφαρμογή της θεραπευτικής παρέμβασης. Οι κύριες εκβάσεις που αξιολογήθηκαν ήταν οι αλλαγές στο επίπεδο της αναπτυξιακής λειτουργίας των παιδιών (γνωστικής, κινητικής και γλωσσικής) με τη βοήθεια σταθμισμένων εργαλείων, ενώ οι δευτερεύουσες εκβάσεις ήταν οι αλλαγές σε συγκεκριμένες βιοχημικές παραμέτρους καθώς και στα ολικά επίπεδα μεθυλίωσης του DNA. Η ανάλυση της μεθυλίωσης πραγματοποιήθηκε με την συστοιχία Human Methylation 27 Bead Chip array, η οποία μέτρησε τα επίπεδα μεθυλίωσης του DNA σε 27.578 CpG δινουκλεοτιδικές αλληλουχίες σε ολόκληρο το γονιδίωμα. Δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές στην αναπτυξιακή απόδοση των παιδιών που έλαβαν θεραπεία με το διατροφικό συμπλήρωμα συγκριτικά με αυτά που έλαβαν placebo στις κλίμακες BSID-III and PLS-4. Ωστόσο, στην ομάδα των συμμετεχόντων που έλαβε το διατροφικό συμπλήρωμα παρατηρήθηκε βελτίωση στις καθημερινές δεξιότητες αυτοεξυπηρέτησης, αλλά και στην κινητική λειτουργία, όπως αυτές αξιολογήθηκαν από το γονεϊκό ερωτηματολόγιο VABS-II- συγκριτικά με συνομηλικούς τους από την ομάδα που έλαβε placebo. Όμως, η κινητική λειτουργία δεν βρέθηκε βελτιωμένη όταν αξιολογήθηκε σύμφωνα με την BSID- III κλίμακα. Η διαφορά αυτή οφείλεται πιθανώς στο γεγονός ότι το εργαλείο αξιολόγησης BSID- III βασίζεται κυρίως σε αντικειμενικά παρατηρούμενες δεξιότητες του παιδιού, ενώ το ερωτηματολόγιο VABS - II είναι αποτέλεσμα υποκειμενικής κρίσης του γονέα/ φροντιστή, κάτι που θα μπορούσε να δικαιολογήσει την αναντιστοιχία μεταξύ των παρατηρήσεων. Επίσης, πολλές από τις καθημερινές δεξιότητες αυτοεξυπηρέτησης είναι άρρηκτα συνυφασμένες με την κινητικότητα, η βελτίωση της οποίας συνεπάγεται επομένως και βελτίωση στην αυτοεξυπηρέτηση. Η αναφερόμενη βελτίωση των κινητικών δεξιοτήτων μπορεί να οφείλεται αποκλειστικά στην χορήγηση κρεατίνης, καθώς πολλοί γονείς/ φροντιστές είχαν την υποκειμενική εντύπωση βελτίωσης του μυϊκού τόνου και της μυϊκής ισχύος των παιδιών που έλαβαν τη θεραπεία με το διατροφικό συμπλήρωμα. Παράλληλα, δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές αλλαγές στα συνολικά επίπεδα μεθυλίωσης του DNA στις περισσότερες από τις 27.578 CpG θέσεις που αναλύθηκαν κατά τη σύγκριση δειγμάτων περιφερικού αίματος των παιδιών πριν και μετά τη θεραπεία, καθώς μόνο 4 ήταν οι συμμετέχοντες στους οποίους οι αλλαγές αυτές ήταν στατιστικά σημαντικές, αλλά ούτε η κατεύθυνση της τροποποίησης (υπερ- ή υπο- μεθυλίωση) ούτε οι διαφορικά μεθυλιωμένες CpG αλληλουχίες εμφάνισαν συνέπεια μεταξύ των υπόλοιπων συμμετεχόντων. Δεδομένου μάλιστα ότι δεν βρέθηκαν σημαντικές μεταβολές στα ολικά επίπεδα μεθυλίωσης DNA δύο ήταν οι πιθανές ερμηνείες: α) Η μεθυλίωση δεν μπορεί να επηρεαστεί από την διατροφική χορήγηση προ-μεθυλιωτικών παραγόντων/ δοτών μεθυλικών ομάδων, β) Η μεθυλίωση δεν μπορεί να τροποποιηθεί μετά την εμβρυική ή πρώιμη βρεφική περίοδο. Τέλος, αναφέρθηκαν

10 τύποι ανεπιθύμητων ενεργειών που οδήγησαν σε απόσυρση 7 συμμετεχόντων (επιδείνωση των κρίσεων, έναρξη ή επιδείνωση των διαταραχών του ύπνου, δυσκοιλιότητα και μειωμένη όρεξη) και για τον λόγο αυτό, δεν κατέστη εφικτό να αξιολογηθεί η ασφάλεια της μακροπρόθεσμης χορήγησης του συγκεκριμένου διατροφικού συμπληρώματος.

Ορισμένες από τις μελέτες που συμπεριλήφθηκαν στην παρούσα συστηματική ανασκόπηση μελέτησαν τον τρόπο με τον οποίο οι επιγενετικοί δείκτες λειτουργούν ως νέο εργαλείο για την κατανόηση της επίδρασης των συστατικών της διατροφής στο φαινότυπο της παχυσαρκίας και την εμφάνιση μεταβολικού συνδρόμου.

Σκοπός της κλινικής δοκιμής των Moleres και συν. (202) ήταν να διερευνήσει τις βασικές αλλαγές στη μεθυλίωση του DNA, οι οποίες θα μπορούσαν να συσχετιστούν με καλύτερη απόκριση απώλειας βάρους μετά από διεπιστημονικό πρόγραμμα παρέμβασης που είχε προηγουμένως εφαρμοστεί σε Ισπανούς παχύσαρκους ή υπέρβαρους εφήβους ηλικιών μεταξύ 12 και 16 ετών στην κλινική δοκιμή EVASYON study (203). Ο πληθυσμός της μελέτης EVASYON αποτελούνται από 204 υπέρβαρους ή παχύσαρκους εφήβους και η παρέμβαση που εφαρμόστηκε σε αυτούς ήταν ένα εκπαιδευτικό πρόγραμμα απώλειας βάρους βασισμένο σε διατροφικές αλλαγές και αλλαγές του τρόπου ζωής, καθοδηγούμενο από διεπιστημονική ομάδα παιδιάτρων, φυσιοθεραπευτών, διατροφολόγων και ψυχολόγων, διάρκειας 10 εβδομάδων. Στην μελέτη των Moleres και συν. μικροσυστοιχία μεθυλίωσης πραγματοποιήθηκε αρχικά για μία υπο- ομάδα 24 εφήβων που επιλέχθηκαν από τον πληθυσμό της αρχικής κλινικής δοκιμής (42% άρρενες) και οι οποίοι ήταν αυτοί στους οποίους διαπιστώθηκε η καλύτερη και η χειρότερη ανταπόκριση στην παρέμβαση απώλειας βάρους. Ως ανταποκρινόμενοι με υψηλή ανταπόκριση χαρακτηρίστηκαν οι έφηβοι που έχασαν > 1.1 μονάδες ΔΜΣ στο τέλος της θεραπείας, ενώ ως ανταποκρινόμενοι με χαμηλή ανταπόκριση χαρακτηρίστηκαν οι έφηβοι που έχασαν < 0.4 μονάδες ΔΜΣ στο τέλος της θεραπείας. Έπειτα το δείγμα της μελέτης ενισχύθηκε από 12 ακόμη υπέρβαρους και παχύσαρκους εφήβους (6 από την ομάδα της υψηλής και 6 από την ομάδα της χαμηλής στην παρέμβαση ανταπόκρισης). Πραγματοποιήθηκε μια μικροσυστοιχία μεθυλίωσης για την αναζήτηση βασικών επιγενετικών διαφορών μεταξύ των δύο υπο-ομάδων χρησιμοποιώντας την μέθοδο Human Methylation 27 Bead Chip για 27.578 CpG δινουκλεοτιδικές αλληλουχίες σε συνολικό αριθμό 14.495 γονιδίων και διενεργήθηκε φασματομετρία μάζας MALDI-TOF για την επικύρωση των σχετικών CpG δινουκλεοτιδίων και των γύρω περιοχών τους. Η ανάλυση της μικροσυστοιχίας έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά στη μεθυλίωση σε 97 από τις 27.578 CpG αλληλουχίες μεταξύ των 2 ομάδων συμμετεχόντων πριν την εφαρμογή της παρέμβασης, οι 34 από τις οποίες ήταν υπο- και οι 63 υπερ- μεθυλιωμένες στην ομάδα των εφήβων υψηλής ανταπόκρισης. Μετά την επικύρωση, σε 5 περιοχές που βρίσκονταν μέσα ή κοντά στα γονίδια AQP9, DUSP22, HIPK3, TNNT1 και TNNI3 βρέθηκαν διαφορετικά επίπεδα μεθυλίωσης μεταξύ των συμμετεχόντων υψηλής και

χαμηλής ανταπόκρισης. Διαφορές στα επίπεδα μεθυλίωσης αναφοράς στα γονίδια AQP9, DUSP22, TNNT3 και TNNT1 συσχετίστηκαν με αλλαγές στο βάρος σώματος, τον ΔΜΣ, το σωματικό λίπος και την περιφέρεια της μέσης στο τέλος των 10 εβδομάδων του προγράμματος. Ειδικότερα, δύο διαφορεικά μεθυλιωμένα CpG δινοκλεοτίδια εντοπίστηκαν στο γονίδιο AQP9 μεταξύ των συμμετεχόντων υψηλής και χαμηλής ανταπόκρισης, η αυξημένη έκφραση του οποίου οδηγεί σε αυξημένη λιποσύνθεση. Η καταστολή της έκφρασης του συγκεκριμένου γονιδίου μέσα από αύξηση της μεθυλίωσής του θα μπορούσε να βελτιώσει την απώλεια σωματικού βάρους. Στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα ολικής μεθυλίωσης ($p < 0.05$) μεταξύ των υψηλά και χαμηλά ανταποκρινόμενων στην παρέμβαση εφήβων παρατηρήθηκε επίσης στη γενετική περιοχή που αντιστοιχεί στο γονίδιο HIPK3 και υψηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης αναφοράς στο HIPK3 σχετίστηκαν με μεγαλύτερα ποσοστά απώλειας σωματικού βάρους, λίπους και ΔΜΣ στο τέλος της παρέμβασης. Έτσι, τα ευρήματα της μελέτης αυτής επιβεβαίωσαν την παρουσία 2 γενετικών περιοχών μέσα ή γύρω από τα γονίδια AQP9 και HIPK3, τα οποία είχαν προηγουμένως συσχετιστεί με απώλεια βάρους ή εμφάνιση παχυσαρκίας (22,204), η αλλαγή στη μεθυλίωση των οποίων θα μπορούσε να αξιοποιηθεί ως βιοδείκτης για την πρόβλεψη της απώλειας βάρους. Τέλος, χρησιμοποιήθηκε ένα αθροιστικό σκορ μεθυλίωσης για τους παχύσαρκους εφήβους, το οποίο συσχετίστηκε σημαντικά με αλλαγές στο βάρος, τον ΔΜΣ και την απώλεια σωματικού λίπους μετά τη θεραπεία, για τον υπολογισμό του οποίου ελήφθησαν υπόψη μόνο οι 97 CpG ακολουθίες με αλλαγή στην μεθυλίωση του DNA $>5\%$ μεταξύ εφήβων υψηλής και χαμηλής ανταπόκρισης στην αρχή της παρέμβασης. Συμμετέχοντες με υψηλότερο σκορ μεθυλίωσης αναφοράς είχαν καλύτερη ανταπόκριση στη θεραπεία ($p < 0.001$) συγκριτικά με συμμετέχοντες με χαμηλότερη βαθμολογία αναφοράς.

Οι Voisin και συν. εξέτασαν τις επιδράσεις δύο μεταβλητών που σχετίζονται με την ποσότητα της διατροφικής πρόσληψης λίπους και τριών μεταβλητών που σχετίζονται με την ποιότητα του διατροφικά προσλαμβανόμενου λίπους στα προφίλ μεθυλίωσης του DNA σε ολόκληρο το γονιδίωμα παιδιών κανονικού σωματικού βάρους και παιδιών με παχυσαρκία (205). Ανέλυσαν δηλαδή την συνολική πρόσληψη χοληστερόλης, την αναλογία της ενεργειακής πρόσληψης που προέρχεται από λίπος, καθώς και την αναλογία ενεργειακής πρόσληψης από πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (polyunsaturated fatty acids, PUFA) προς κορεσμένα λιπαρά οξέα (saturated fatty acids, SFA) (PUFA/SFA), την αναλογία μονοακόρεστων λιπαρών οξέων (monounsaturated fatty acids, MUFA) προς SFA (MUFA/SFA) και την αναλογία MUFA και PUFA προς SFA [(MUFA+ PUFA)/SFA]. Έπειτα, προσδιόρισαν το προφίλ μεθυλίωσης σε όλο το γονιδίωμα από δείγματα περιφερικού αίματος 69 παιδιών από την Ελλάδα, 5^{ης} και 6^{ης} τάξης Δημοτικού Σχολείου, με μέσο όρο ηλικίας τα 10 έτη, είτε φυσιολογικού σωματικού βάρους είτε παχύσαρκων. Η ανάλυση της μεθυλίωσης του DNA έγινε με την μέθοδο Illumina Infinium HumanMethylation27 BeadChip. Η

ανάλυση της διατροφικής πρόσληψης των παιδιών έγινε για δύο συνεχόμενες καθημερινές μέρες της βδομάδας και μία ημέρα του Σαββατοκύριακου με τη βοήθεια προσωπικών συνεντεύξεων στο χώρο του σχολείου, περιγράφοντας τον τύπο και την ποσότητα των καταναλισκόμενων ποτών και τροφίμων, χρησιμοποιώντας βασικές μονάδες μέτρησης που χρησιμοποιούνται στην καθημερινή ζωή. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των ερευνητών, τα επίπεδα μεθυλίωσης σε μία νησίδα CpG και σε 4 CpG δινουκλεοτιδικές αλληλουχίες συσχετίστηκαν σημαντικά με τη συνολική πρόσληψη λίπους, ενώ η συσχέτισή τους με την ολική πρόσληψη χοληστερόλης δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική. Επιπλέον, τα επίπεδα μεθυλίωσης 2 νησίδων, 11 ακτών και 16 CpG θέσεων συσχετίστηκαν σημαντικά με την αναλογία πρόσληψης PUFA/ SFA, τα επίπεδα μεθυλίωσης από 9 νησίδες, 26 ακτές και 158 CpG θέσεις συσχετίστηκαν με την αναλογία πρόσληψης MUFA/ SFA, ενώ τα επίπεδα μεθυλίωσης από 10 νησίδες, 40 ακτές και 130 CpG θέσεις συσχετίστηκαν με την αναλογία διατροφικής πρόσληψης (MUFA+PUFA)/ SFA. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε ανάλυση γονιδιακού εμπλουτισμού, με σκοπό να καθοριστεί ποια γονίδια ρυθμίζονται από κάθε θέση ή νησίδα CpG, δημιουργήθηκαν 3 λίστες γονιδίων για κάθε μία από τις αναλογίες πρόσληψης λιπαρών οξέων που μελετήθηκαν και εφαρμόστηκε η μέθοδος ConsensusPathDB-human (CPDB), για να ταυτοποιηθούν τα σημαντικά σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία εμπλέκονται οι 3 γονιδιακές λίστες. Σημαντικά θεωρήθηκαν τα σηματοδοτικά μονοπάτια, όταν οι σημαντικές CpG θέσεις, νησίδες ή ακτές βρέθηκαν να σχετίζονται με υψηλή αναλογία γονιδίων που εμπλέκονται στα μονοπάτια αυτά. Από την ανάλυση βρέθηκε σημαντικός γονιδιακός εμπλουτισμός σε 34 μονοπάτια για το λόγο PUFA/SFA, συμπεριλαμβανομένης μίας ομάδας σηματοδοτικών μηχανισμών σχετιζόμενων με τη λιποσύνθεση και τη γονιδιακή ρύθμιση των υπεροξεισωμάτων, καθώς και μίας ομάδας μονοπατιών εμπλεκόμενων στην οδό της λεπτίνης και της IL-6. Παράλληλα, σημαντικός γονιδιακός εμπλουτισμός βρέθηκε και σε 5 μονοπάτια για το λόγο (MUFA+PUFA)/SFA, μεταξύ των οποίων ταυτοποιήθηκε μία ομάδα σχετιζόμενη με την φωσφορυλίωση και τελικά με την αποδόμηση του παράγοντα NF-κΒ ($p < 0.041$), ο οποίος συμμετέχει στον μηχανισμό της φλεγμονής. Το NCOA1 είναι ένα από τα πιο σημαντικά γονίδια που βρέθηκε να σχετίζεται με όλες τις προαναφερθείσες αναλογίες λιπαρών οξέων που αναλύθηκαν και το οποίο εμπλέκεται στον μηχανισμό ρύθμισης των υπεροξεισωματίων, ως μεταγραφικός συνενεργοποιητής, του οποίου η αποδόμηση και απομάκρυνση επιφέρει επιρρέπεια στην διατροφικά - επαγόμενη εμφάνιση παχυσαρκίας. Επίσης, το NCOA1 μαζί με το PDE3A, το πέμπτο πιο σημαντικό γονίδιο που βρέθηκε να σχετίζεται με την αναλογία πρόσληψης PUFA/SFA, συμμετέχουν και στο μεταβολικό μονοπάτι της λεπτίνης, ορμόνης που παράγεται από τα κύτταρα του λιπώδους ιστού και ρυθμίζει την ενεργειακή πρόσληψη καταστέλλοντας το αίσθημα της πείνας και επιφέροντας τον κορεσμό (αναφ). Στην μελέτη αυτή μεταξύ Ελλήνων προ-εφήβων βρέθηκε ότι οι μεταβλητές που σχετίζονται με την ποιότητα του διατροφικού λίπους εμφανίζουν σημαντική συσχέτιση με μεγάλο αριθμό CpG θέσεων και νησιδίων, ενώ αυτές που

σχετίζονται με την ποσότητα του λίπους που καταναλώνεται έχουν σημαντική συσχέτιση με μικρό αριθμό CpG δινουκλεοτιδίων και νησίδων. Τα ευρήματα αυτά υπογραμμίζουν αφενός ότι η ποιότητα του λίπους που προέρχεται από τη διατροφή μπορεί να επηρεάσει τη μεθυλίωση του DNA σε μεγάλη κλίμακα και αφετέρου ότι συγκεκριμένες αλλαγές στη μεθυλίωση μπορεί να παίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλούς από τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στις φυσιολογικές αποκρίσεις του οργανισμού στους διαφορετικούς τύπους του διατροφικά προσλαμβανόμενου λίπους.

Οι McMorrow και συν., μελέτησαν την επίδραση ενός αντιφλεγμονώδους συμπληρώματος διατροφής (Anti- Inflammatory Nutrition Supplement, AINS) στη βιολογία της αντίστασης στην ινσουλίνη και της αδιπονεκτίνης (ορμόνης που παίζει ουσιώδη ρόλο στην προστασία από την αντίσταση στην ινσουλίνη) σε υπέρβαρους εφήβους, βασιζόμενοι στην παραδοχή ότι η χρόνια φλεγμονή και η υποαδιπονεκτιναιμία είναι χαρακτηριστικά της επαγόμενης από την παχυσαρκία αντίστασης στην ινσουλίνη (206). Δευτερεύων στόχος της μελέτης τους ήταν να εξετάσουν σε ποιον βαθμό τα προφίλ βιοδεικτών των συμμετεχόντων θα μπορούσαν να προβλέψουν την ανταπόκριση ή μη στη χορήγηση του αντιφλεγμονώδους συμπληρώματος διατροφής. Επιπλέον, αξιολογήθηκε ο αντίκτυπος της μεθυλίωσης του DNA στην αποτελεσματικότητα της παρέμβασης. Εβδομήντα υπέρβαροι και παχύσαρκοι έφηβοι (ηλικίας 13-18 ετών) συμμετείχαν σε αυτή την τυχαιοποιημένη, διπλή τυφλή, ελεγχόμενη διασταυρούμενη κλινική δοκιμή, οι οποίοι τυχαιοποιήθηκαν είτε για να λάβουν το αντιφλεγμονώδες διατροφικό συμπλήρωμα, το οποίο αποτελούνταν από πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μακράς αλύσου (n-3 PUFA), βιταμίνη C, α-τοκοφερόλη, εκχύλισμα πράσινου τσαγιού και λυκοπένιο, είτε το εικονικό φάρμακο για χρονικό διάστημα 8 εβδομάδων. Μετά από περίοδο «έκπλυσης» 6 εβδομάδων οι δύο ομάδες συμμετεχόντων έλαβαν την παρέμβαση αντίστροφα για άλλες 8 εβδομάδες, δηλαδή όσοι είχαν αρχικά λάβει το AINS έλαβαν στη συνέχεια το placebo και όσοι αρχικά έλαβαν το placebo έλαβαν έπειτα το AINS. Ανθρωπομετρικές μετρήσεις και δείγματα περιφερικού αίματος ελήφθησαν πριν και μετά από κάθε παρέμβαση. Η πρωταρχική έκβαση που μελετήθηκε ήταν η αξιολόγηση του ομοιοστατικού μοντέλου αντίστασης στην ινσουλίνη, του δείκτη HOMA-IR, ενός από τους πιο αξιόπιστους δείκτες υπολογισμού της αντίστασης στην ινσουλίνη. Παράλληλα, μετρήθηκαν τα επίπεδα της αδιπονεκτίνης στο πλάσμα (ολικής και υψηλού μοριακού βάρους), οι συγκεντρώσεις λιπιδίων και λιποπρωτεϊνών, το φλεγμονώδες προφίλ και τα επίπεδα μεθυλίωσης του DNA. Η ανάλυση της μεθυλίωσης πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Infinium HumanMethylation450 BeadChip assay. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν, το αντιφλεγμονώδες διατροφικό συμπλήρωμα δεν άλλαξε τον δείκτη HOMA-IR στη συνολική κοόρτη. Σε ποσοστό 40% των υπέρβαρων και παχύσαρκων εφήβων που χαρακτηρίστηκαν ως ανταποκρινόμενοι στη θεραπεία, παρατηρήθηκε

βελτίωση του δείκτη HOMA- IR κατά τουλάχιστον 10% μετά την θεραπευτική παρέμβαση με το AINS, με τη μείωση αυτή να είναι σημαντικά μεγαλύτερη συγκριτικά με τους εφήβους που έλαβαν placebo. Η αδιπονεκτίνη υψηλού μοριακού βάρους (ΨΜΒ), η οποία αποτελεί καλύτερο προγνωστικό δείκτη για την εμφάνιση ΣΔ 2 από την ολική αδιπονεκτίνη, πιθανώς λόγω της αυξημένης δεσμευτικής ικανότητας στους υποδοχείς της, διατηρήθηκε μετά την παρέμβαση με το συμπλήρωμα διατροφής, ενώ μειώθηκε με την πάροδο του χρόνου μετά την χορήγηση του εικονικού φαρμάκου. Μάλιστα, μετρήθηκαν σε δείγματα μονοκυττάρων του περιφερικού αίματος τα επίπεδα mRNA των γονιδίων ADIPOR1 και ADIPOR2, τα οποία κωδικοποιούν τους υποδοχείς της αδιπονεκτίνης και ρυθμίζονται προς τα κάτω σε παχύσαρκα άτομα, και βρέθηκαν σημαντικά υψηλότερα ακολουθώντας τη θεραπεία με AINS συγκριτικά με το placebo. Σημαντικές αλλαγές από την χορήγηση της θεραπευτικής παρέμβασης στα επίπεδα γλυκόζης του πλάσματος και ινσουλίνης ορού δεν επισημάνθηκαν. Επιπρόσθετα, ο φαινότυπος προ-θεραπείας των ανταποκρινόμενων χαρακτηρίστηκε από υψηλότερο δείκτη HOMA-IR και υψηλότερα επίπεδα ολικής και LDL χοληστερόλης. Πιο συγκεκριμένα, επίπεδα του δείκτη HOMA-IR > 1,83 βρέθηκαν να είναι 45,7% ευαίσθητα και 95,6% ειδικά στην αναγνώριση των συμμετεχόντων που αναμένονταν να έχουν ανταπόκριση στην χορήγηση AINS. Αντιθέτως, το φύλο, η ηλικία, ο ΔΜΣ και η σύσταση του σώματος δεν εμφάνισαν διαφορές μεταξύ των ανταποκρινόμενων και των μη ανταποκρινόμενων στη θεραπεία. Τέλος, ελέγχθηκε εάν οι αλλαγές στην μεθυλίωση του DNA μετά τη χορήγηση του αντιφλεγμονώδους συμπληρώματος συσχετίστηκαν με την απόκριση της αδιπονεκτίνης ΨΜΒ και βρέθηκαν σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των επιπέδων αδιπονεκτίνης ΨΜΒ και του status μεθυλίωσης σε 487 CpG δινουκλεοτιδικές αλληλουχίες από 5 αδιπογόνα γονίδια που εμπλέκονται στη διαφοροποίηση του λιπώδους ιστού (EGR2, WNT1, MED4, MED13L, and TBL1XR1) μετά τη λήψη συμπληρώματος AINS. Δεδομένης της δυνητικά βιολογικής σημαντικότητας των αλλαγών στη μεθυλίωση των συγκεκριμένων γονιδίων, εφαρμόστηκε συμπληρωματικά και η ανάλυση EpiTYPER, η οποία επιβεβαίωσε την στατιστική σημαντικότητα μεταξύ της αδιπονεκτίνης ΨΜΒ και της μεθυλίωσης στις CpG θέσεις των γονιδίων EGR2 και MED4, αλλά δεν ανέδειξε σημαντική συσχέτιση για τα γονίδια WNT1, MED13L και TBL1XR1. Συμπερασματικά, η χορήγηση n-3 PUFA μαζί με άλλα αντιφλεγμονώδη συστατικά της διατροφής οδήγησε σε διατήρηση των κυκλοφορούντων επιπέδων αδιπονεκτίνης ΨΜΒ σε υπέρβαρους και παχύσαρκους εφήβους και παράλληλα, η απόκριση της αδιπονεκτίνης ΨΜΒ στο AINS συσχετίστηκε με την μεταβολή των επιπέδων μεθυλίωσης γονιδίων που εμπλέκονται στην λιπογένεση και τον ΣΔ 2.

Οι Chen και συν. εστίασαν στην συσχέτιση της χαμηλής πρόσληψης φυτικών ινών με τον αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων και καρκίνου, ελέγχοντας δυο υποθέσεις: 1) οι διαιτητικές ίνες εμφανίζουν συσχέτιση με τα

επίπεδα μεθυλίωσης του DNA, 2) αυτές οι αλλαγές της μεθυλίωσης του DNA σχετίζονται με σπλαχνική εναπόθεση λίπους και φλεγμονή (207). Επίσης, ελέγχθηκε μέσω ανάλυσης ευαισθησίας η πιθανότητα η πρόσληψη φυλλικού οξέος να αποτελεί συγχυτικό παράγοντα για τις συσχετίσεις μεταξύ των επιπέδων μεθυλίωσης του DNA και της πρόσληψης φυτικών ινών, δεδομένου ότι τρόφιμα που περιέχουν φυτικές ίνες τείνουν να είναι πλούσια σε φυλλικό οξύ, το οποίο παίζει καθοριστικό ρόλο στο μεταβολικό μονοπάτι του άνθρακα 1 (C1) ως δότης μεθυλικής ομάδας. Η ανάλυση της μεθυλίωσης έγινε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Illumina 450K Bead-Chip σε DNA λευκοκυττάρων από 284 Αφροαμερικανούς εφήβους ηλικίας 16,2 +/- 1,2 ετών. Για την εκτίμηση της διαιτητικής τους πρόσληψης χρησιμοποιήθηκαν ειδικά δομημένες 24ωρες διατροφικές συνεντεύξεις (επτά συνολικά για κάθε έναν από τους συμμετέχοντες σε συνολικό χρονικό διάστημα 12 εβδομάδων, με τις πρώτες δύο να γίνονται πρόσωπο – με – πρόσωπο και τις υπόλοιπες 5 να λαμβάνουν χώρα διά τηλεφώνου) από ειδικά εκπαιδευμένους διατροφολόγους. Δείγματα περιφερικού αίματος νηστείας συλλέχθηκαν για την μέτρηση των επιπέδων λεπτίνης ορού, ινωδογόνου, C- αντιδρώσας πρωτεΐνης και αδιπονεκτίνης πλάσματος και η σύσταση του σώματος των εφήβων συμμετεχόντων εκτιμήθηκε σύμφωνα με δείκτες όπως η μάζα ελεύθερου λίπους σε μαλακούς ιστούς, η μάζα του λιπώδους ιστού και το ποσοστό του σπλαχνικού λίπους. Πραγματοποιήθηκε γραμμική παλινδρόμηση για τον εντοπισμό των 20 διαφορεικά μεθυλιωμένων θέσεων CpG που σχετίζονται με την πρόσληψη φυτικών ινών, οι 4 πιο σημαντικές από τις οποίες βρέθηκαν να έχουν αρνητική συσχέτιση με την διατροφική πρόσληψη φυτικών ινών. Συγκεκριμένα, από τις 4 προαναφερθείσες CpG θέσεις, οι cg15200711 και cg07035602 εδράζονται στο γονίδιο LPCAT1 (γονίδιο που συμμετέχει στον μεταβολισμό των φωσφολιπιδίων και στην απελευθέρωση λιποπρωτεϊνών από τα ηπατοκύτταρα), η θέση cg19462022 εδράζεται στο γονίδιο RASA3 (γονίδιο που εμπλέκεται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, τη διαφοροποίηση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό) και η θέση cg15302376 στο γονίδιο DNMT3 (γονίδιο που συμμετέχει στην σύνθεση των διμεθυλοτρανσφερασών, ενζύμων που καταλύουν την προσθήκη μεθυλικών ομάδων σε μόρια DNA). Στη συνέχεια, διενεργήθηκε ανάλυση ευαισθησίας στα μοντέλα της γραμμικής παλινδρόμησης για να περιοριστεί η πιθανή συγχυτική επίδραση της διαιτητικής πρόσληψης φυλλικού οξέος και οι 3 από τις 4 CpG θέσεις διατήρησαν την στατιστική τους σημαντικότητα. Τέλος, εξετάστηκε εάν κάποια από αυτές τις 3 CpG θέσεις εμφάνισε συσχέτιση με την σπλαχνική παχυσαρκία και τον φλεγμονώδη μηχανισμό και βρέθηκε πως η cg07035602 (στο γονίδιο LPCAT1) είχε σημαντική συσχέτιση με την λεπτίνη, το ινωδογόνο και τη CRP ($p < 0.05$ για κάθε μεταβλητή) και η cg19462022 (στο γονίδιο RASA3) είχε σημαντική συσχέτιση με τη CRP ($p = 0.002$). Συμπερασματικά δηλαδή, οι δύο από τις 4 πιο σημαντικά διαφορεικά μεθυλιωμένες CpG δινουκλεοτιδικές αλληλουχίες φάνηκε να συσχετίζονται τόσο με την πρόσληψη φυτικών ινών μέσω της διατροφής όσο και με την ενεργοποίηση του φλεγμονώδους μηχανισμού και την σπλαχνική εναπόθεση λίπους, χωρίς όμως να μπορεί να

δικαιολογηθεί μεταξύ τους σαφής αιτιολογική συσχέτιση. Αυτό το εύρημα υποδηλώνει ότι οι φυτικές ίνες της διατροφής μπορεί να επηρεάζουν έμμεσα τον επιγενετικό μηχανισμό της μεθυλίωσης του DNA.

Οι Yadav και συν. διεξήγαγαν μελέτη για να εξετάσουν την επίδραση συμπληρώματος διατροφής με βιταμίνη B12 ή/και φυλλικό οξύ στη μεθυλίωση του DNA σε όλο το γονιδίωμα (208). Η μελέτη περιλάμβανε 48 παιδιά που είχαν χρησιμοποιηθεί σε προηγούμενη κλινική δοκιμή (Pune Maternal Nutrition Study, PMNS) και τα οποία χωρίστηκαν σε 4 ομάδες (n = 12 σε κάθε ομάδα) για να λάβουν συμπλήρωμα με α) βιταμίνη B12, β) βιταμίνη B12 και φυλλικό οξύ, γ) φυλλικό οξύ, δ) placebo, για χρονικό διάστημα ενός έτους. Έγινε σύγκριση του μεθυλιώματός τους πριν και μετά την εφαρμογή της διατροφικής παρέμβασης και, για να καθοριστούν οι επαγόμενες από τη διατροφή διαφορικά μεθυλιωμένες CpG αλληλουχίες στην αρχή και μετά από ένα έτος θεραπευτικής παρέμβασης, εφαρμόστηκε το μοντέλο της γραμμικής παλινδρόμησης. Για την ανάλυση της μεθυλίωσης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Infinium Human Methylation 450 Bead Chip. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά των ερευνητών, πριν τη χορήγηση του συμπληρώματος δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στα επίπεδα μεθυλίωσης του DNA μεταξύ των 4 υπο- ομάδων συμμετεχόντων. Αντίθετα, σημειώθηκαν σημαντικές αλλαγές στα συνολικά επίπεδα μεθυλίωσης μετά τη χορήγηση συμπληρώματος B12 (589 διαφορετικά μεθυλιωμένα CpG δινουκλεοτίδια και 2892 θέσεις), καθώς και μετά τη χορήγηση συμπληρώματος B12 με φυλλικό οξύ (169 διαφορετικά μεθυλιωμένα CpG δινουκλεοτίδια και 3241 θέσεις). Στην υπο-ομάδα που έλαβε συμπλήρωμα με φυλλικό οξύ, 19 ήταν οι διαφορικά μεθυλιωμένες CpG αλληλουχίες που αναγνωρίστηκαν, αριθμός σχεδόν συγκρίσιμος με αυτές που παρατηρήθηκαν στην ομάδα που έλαβε placebo (12 διαφορετικά μεθυλιωμένες CpGs), γεγονός που υποδεικνύει ότι οι αλλαγές αυτές μπορεί να οφείλονται στην πάροδο του χρόνου και όχι σε διατροφική παρέμβαση.

Συγκρίνοντας στη συνέχεια τις υπο-ομάδες που έλαβαν βιταμίνη B12 (είτε σε συνδυασμό με φυλλικό οξύ είτε μόνη της) με τις υπο-ομάδες που δεν έλαβαν καθόλου συμπλήρωμα B12 (είτε φυλλικό οξύ είτε placebo), βρέθηκε ότι ο συνολικός αριθμός των διαφορικά μεθυλιωμένων CpGs ανερχόταν σε 8609 στην πρώτη έναντι των 519 διαφορικά μεθυλιωμένων CpGs στη δεύτερη περίπτωση. Πιο συγκεκριμένα, η πλειοψηφία των διαφορικά μεθυλιωμένων CpGs (n= 432/589, 73,3%) στην ομάδα που έλαβε B12 και (93/169, 55,03%) στην ομάδα που έλαβε B12 και φυλλικό οξύ εμφάνισε υπομεθυλίωση. Οι παρατηρήσεις αυτές έδειξαν πως η βιταμίνη B12 ως συμπλήρωμα διατροφής έχει πολύ μεγαλύτερη επίδραση στο status μεθυλίωσης των διαφόρων γονιδίων σε σύγκριση με το φυλλικό οξύ στον πληθυσμό που μελετήθηκε. Στη συνέχεια, για την ταυτοποίηση των γονιδίων, στα οποία εδράζονται οι διαφορικά μεθυλιωμένες CpGs που αναγνωρίστηκαν, χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό IPA (Ingenuity Pathway Analysis). Σημαντικός γονιδιακός εμπλουτισμός βρέθηκε σε μεταβολικά μονοπάτια που έχει βρεθεί πως εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία του

ΣΔ2, όπως τα μονοπάτια της βιοσύνθεσης γλυκογόνου, της σύνθεσης και συσώρευσης λιποκυττάρων για τον σχηματισμό του λιπώδους ιστού, αλλά και της ενεργοποίησης των οιστρογονικών υποδοχέων στην υπο- ομάδα των παιδιών στην οποία χορηγήθηκε συμπλήρωμα βιταμίνης Β12. Παρομοίως, σημαντικός γονιδιακός εμπλουτισμός βρέθηκε σε μεταβολικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην φάση G2/M του κυτταρικού κύκλου, έναν ουσιαστικό ρυθμιστικό μηχανισμό που είναι υπεύθυνος για την επιδιόρθωση τυχόν κατεστραμμένου DNA πριν την ολοκλήρωση του κυτταρικού κύκλου, αλλά και στο σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/ β -κατενίνης, που παίζει βασικό ρόλο στη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης, ρυθμίζοντας την διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση των κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, 4 CpG δινοκλεοτίδια εντοπίστηκαν σε σχετιζόμενα με τον ΣΔ 2 γονίδια, στο FTO (cg26580413), στο TCF7L2 (cg03683087), στο PPARGC1B (cg08928958) και στο GALNT2 (cg00589617) και 2 διαφορικά μεθυλιωμένες περιοχές βρέθηκαν στο micro RNA 21 (miR21) και στο γονίδιο SKI. Στη συνέχεια, διενεργήθηκε τεχνική ανάλυση επικύρωσης των 4 CpGs που αναφέρθηκαν προηγουμένως, στην οποία στατιστικά σημαντική διαφορά των επιπέδων μεθυλίωσης επιβεβαιώθηκε μόνο για τα FTO και TCF7L2 γονίδια και όχι για τα PPARGC1B και GALNT2. Επίσης, αναγνωρίστηκε μία διαφορικά μεθυλιωμένη περιοχή στο microRNA 21 και στη συνέχεια ταυτοποιήθηκαν 4 γονίδια - στόχοι του miR21, τα TCF7L2, FTO, CREBBP και SIRT1, τα οποία έχουν επιβεβαιωμένη βιολογική σημαντικότητα στον μεταβολισμό της ινσουλίνης, της γλυκόζης και των λιπιδίων στον οργανισμό και σχετίζονται με την εμφάνιση ΣΔ 2 και παχυσαρκίας. Συμπερασματικά, βρέθηκε ότι η διατροφική χορήγηση συμπληρώματος βιταμίνης Β12 (είτε αποκλειστικά είτε σε συνδυασμό με φυλλικό οξύ) επηρεάζει τη ρύθμιση πολλών μεταβολικά σημαντικών γονιδίων που σχετίζονται με τον ΣΔ 2, όχι μόνο μέσω διαφορικής μεθυλίωσης των FTO και TCF7L2 γονιδίων αλλά και μέσω υπερμεθυλίωσης μίας γενετικής περιοχής κοντά στον υποκινητή του miR21, παρέχοντας μία νέα επιγενετική εξήγηση για τη συσχέτιση μεταξύ του διαταραγμένου μεταβολισμού του άνθρακα 1 (C1) και του κινδύνου εμφάνισης παχυσαρκίας, αντίστασης στην ινσουλίνη και ΣΔ.

Περαιτέρω, στο πλαίσιο μίας συγχρονικής μελέτης παρατήρησης για το άσθμα οι Montrose και συν. διερεύνησαν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ της διατροφής, των παραμέτρων υγείας που σχετίζονται με το άσθμα και της μεθυλίωσης του DNA (209). Συλλέχθηκαν δεδομένα για 32 παιδιά με άσθμα, ηλικίας μεταξύ 6 και 17 ετών, που ζούσαν στη δυτική Μοντάνα των ΗΠΑ, τα οποία είχαν προηγουμένως στρατολογηθεί για να συμμετάσχουν σε μία μεγαλύτερη τυχαιοποιημένη κλινική δοκιμή για το άσθμα, τη μελέτη ARTIS. Η μελέτη αυτή εξέτασε την ποιότητα του αέρα όπου πραγματοποιούνταν καύση ξύλου στο εσωτερικό των σπιτιών 114 παιδιών με άσθμα. Η διατροφική πρόσληψη αξιολογήθηκε με ερωτηματολόγιο συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων σταθμισμένο για χρήση σε παιδιά που ανήκαν στην ηλικιακή ομάδα 6-17 ετών, το οποίο περιλάμβανε 77 διατροφικά συστατικά και ήταν ειδικά

σχεδιασμένο για την εκτίμηση και αξιολόγηση των μικροθρεπτικών συστατικών της διατροφής, όπως η βηταΐνη, η χολίνη και το φυλλικό οξύ, τα οποία όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως, συμμετέχουν στον μεταβολισμό του άνθρακα 1 (C1) ως δότες ομάδων μεθυλίου (CH₃). Στις παραμέτρους υγείας που σχετίζονται με το άσθμα συμπεριλαμβάνονταν ένα εργαλείο αξιολόγησης της ποιότητας ζωής - συγκεκριμένα το παιδιατρικό ερωτηματολόγιο της ποιότητας ζωής στο άσθμα (pediatric asthma quality of life questionnaire, PAQLQ), η μεταβλητικότητα της μέγιστης ημερήσιας εκπνευστικής ροής ως δείκτης υπεραντιδραστικότητας των αεραγωγών (diurnal peak flow variability, dPFV) και ο εξαναγκαζόμενος εκπνευστικός όγκος στο πρώτο δευτερόλεπτο (forced expiratory volume in the first second, FEV₁) μετά από σπιρομέτρηση. Τα επίπεδα μεθυλίωσης του επαναλαμβανόμενου στοιχείου LINE-1 και δύο θέσεων CpG στην περιοχή του υπηζινογόνου της IFN- γ , (CpG-186 και CpG-54), τα οποία ελήφθησαν από κυτταρικό DNA του στοματικού βλεννογόνου των συμμετεχόντων, μετρήθηκαν χρησιμοποιώντας προσδιορισμούς πυροαλτησυχίας.

Όπως προέκυψε από τα αποτελέσματα της μελέτης των Montrose και συν., η πρόσληψη συστατικών της διατροφής, της φωσφοχολίνης και της βηταΐνης, τα οποία συμπεριφέρονται ως δότες μεθυλικών ομάδων, αλλά και του σεληνίου, συσχετίστηκαν θετικά με την ποιότητα ζωής των παιδιών με άσθμα, καθώς παιδιά με μεγαλύτερη πρόσληψη των μικροθρεπτικών αυτών σημείωσαν υψηλότερα σκορ στο ερωτηματολόγιο PAQLQ. Ωστόσο, τα περισσότερα από τα τρόφιμα που καταναλώθηκαν δεν μπόρεσαν να συσχετισθούν με βελτίωση στις λειτουργικές δοκιμασίες των πνευμόνων (dPFV και FEV₁), με εξαίρεση την διατροφικά προσλαμβανόμενη φωσφατιδυλοχολίνη (φωσφολιπίδιο που αποτελεί την κύρια πηγή χολίνης, χημικής ένωσης που συμμετέχει στον μεταβολισμό του μορίου C1), η οποία συσχετίστηκε με μεγαλύτερο FEV₁ σε παιδιά που κατανάλωσαν μέτρια ποσότητα συγκριτικά με αυτά που είχαν χαμηλή πρόσληψη, χωρίς όμως σαφή συνέπεια μεταξύ της πρόσληψης φωσφατιδυλοχολίνης και των πρωινών και απογευματινών μετρήσεων FEV₁. Δεδομένου όμως πως τα μόρια που ανήκουν στην οικογένεια των φωσφολιπιδίων (όπως η φωσφατιδυλοχολίνη) μπορούν να επηρεάζουν την λειτουργία των T λεμφοκυττάρων με διάφορους τρόπους, είτε μέσω της γονιδιακής έκφρασης είτε μέσω της ρευστότητας - κινητικότητας της κυτταρικής μεμβράνης, έχοντας έμμεσες ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες, το εύρημα της μελέτης των Montrose και συν. για την θετική συσχέτιση της φωσφατιδυλοχολίνης με την αύξηση του FEV₁ οφείλει να ερμηνευθεί με πολύ μεγάλη προσοχή. Παράλληλα, από τη μία πλευρά η πρόσληψη διάφορων θρεπτικών συστατικών - δοτών μεθυλίου, όπως της ελεύθερης και ολικής χολίνης και του φυλλικού οξέος, συσχετίστηκε θετικά με τη μεθυλίωση της μεταθετής αλληλουχίας LINE-1 (μακρύ διεσπαρμένο πυρηνικό στοιχείο με καθορισμένη δομή που μπορεί να αλλάζει θέση στο γονιδίωμα), ενώ από την άλλη πλευρά, το σεληνίο δεν συσχετίστηκε με τα προφίλ μεθυλίωσης του LINE-1 και των CpG θέσεων. Επίσης,

διερευνήθηκε η σχέση της μεθυλίωσης του DNA και των μέτρων υγείας για το άσθμα και βρέθηκε πως μία αύξηση στα επίπεδα μεθυλίωσης του μεταθετού στοιχείου LINE-1 κατά 1% συσχετίστηκε με αύξηση της dPFV κατά 1,24%.

Δεδομένου πως η παθοφυσιολογία του άσθματος, όπως και όλων των μορφών αλλεργίας/ ατοπίας, χαρακτηρίζεται από στροφή προς την Th2 κυτταρική απάντηση και πως οι παραγόμενες από τα Th1 βοηθητικά κύτταρα κυτταροκίνες, με κυριότερη ανάμεσά τους την IFN- γ , παίζουν καθοριστικό ρόλο στην ρύθμιση και αντιστάθμιση της εκτροπής αυτής προς την αλλεργική κατεύθυνση, γίνεται κατανοητό πως μία μείωση στα επίπεδα παραγωγής IFN- γ συμβάλλει και δικαιολογεί την παρουσία σοβαρών και χρόνιων συμπτωμάτων άσθματος. Με αυτό τον τρόπο, το γονίδιο που κωδικοποιεί την IFN- γ θα μπορούσε να αποτελέσει σημαντικό υποψήφιο γονίδιο για την εξήγηση της σύνδεσης μεταξύ της διαιτητικής πρόσληψης ορισμένων συστατικών με την υγεία του αναπνευστικού συστήματος μέσω επιγενετικής τροποποίησης της ισορροπίας των Th1/Th2 κυτταροκινών. Σύμφωνα με τα ευρήματα των ερευνητών, η διατροφική πρόσληψη βηταΐνης και βιταμίνης B6 συσχετίστηκε αρνητικά με τη μεθυλίωση της θέσης CpG-186 του υποκινητή της IFN- γ , ενώ η πρόσληψη MUFA συσχετίστηκε θετικά με την μεθυλίωση στη θέση αυτή. Συσχέτιση της διατροφής με τη μεθυλίωση της CpG-54 του υποκινητή της IFN- γ δεν βρέθηκε. Παρόλα αυτά, η μεθυλίωση στις θέσεις CpG-54 και CpG-186 του υποκινητή της IFN- γ δεν βρέθηκε να έχει καμία επίδραση ούτε στις λειτουργικές πνευμονικές δοκιμασίες dPFV και FEV1 ούτε στο ερωτηματολόγιο PAQLQ για την ποιότητα ζωής. Επομένως, αν και οι ερευνητές διαπίστωσαν θετικές συσχετίσεις μεταξύ των διάφορων θρεπτικών συστατικών που συμμετέχουν στον μεταβολισμό του άνθρακα 1 και του παιδιατρικού ερωτηματολογίου PAQLQ, δεν κατάφεραν να δείξουν ότι υπάρχει συσχέτιση των πρώτων με τη βελτίωση των λειτουργικών δοκιμασιών των πνευμόνων μέσα από αντικειμενικές μετρήσεις, όπως η σπιρομέτρηση. Συνεπώς, παρέμεινε ασαφής ο επιγενετικός μηχανισμός μέσω του οποίου η διατροφή - και ειδικότερα το σελήνιο, η βηταΐνη, το φυλλικό οξύ, και η φωσφατιδυλοχολίνη-επηρεάζει την ποιότητα ζωής παιδιών με άσθμα.

Τρεις αναφορές (Πίνακας 2) προήλθαν από την μεγάλη, πολυκεντρική, τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη κλινική δοκιμή PEPaNIC, στην οποία συμπεριλήφθηκαν παιδιά που νοσηλεύονταν σε Μονάδες Εντατικής Θεραπείας Παιδιών (ΜΕΘΠ) σε κρίσιμη κατάσταση. Στην μελέτη αυτή συγκρίθηκε η πρώιμη (έναρξη εντός του 1^{ου} 24ώρου από την εισαγωγή) με την καθυστερημένη - όψιμη (έναρξη μία εβδομάδα μετά την εισαγωγή) χορήγηση παρεντερικής διατροφής αναφορικά με την κλινική έκβαση των συμμετεχόντων και τη διάρκεια νοσηλείας τους στη ΜΕΘΠ (210). Η δοκιμή περιελάμβανε συνολικά 1440 παιδιά ηλικίας 0–17 ετών σε κρίσιμη κλινική κατάσταση που νοσηλεύτηκαν στις ΜΕΘΠ της Λεβέν (Βέλγιο), του Ρότερνταμ (Ολλανδία) και του Έντμοντον (Καναδάς) κατά το χρονικό διάστημα μεταξύ 2012-2015. Οι ασθενείς ταξινομήθηκαν τυχαία είτε σε πρώιμη έναρξη παρεντερικής

διατροφής είτε σε αναβολή οποιασδήποτε συμπληρωματικής παρεντερικής διατροφής έως το πρωί της 8^{ης} ημέρας νοσηλείας τους στη ΜΕΘΠ - όψιμη παρεντερική διατροφή. Η τελευταία βρέθηκε να συνδέεται με μικρότερο κίνδυνο εμφάνισης νέας λοίμωξης, με λιγότερες ημέρες παραμονής στη μονάδα, με μικρότερη διάρκεια παραμονής σε μηχανικό αερισμό, καθώς και με χαμηλότερο ποσοστό ασθενών που έχρηζαν τεχνητής νεφρικής υποστήριξης. Το σημαντικότερο συμπέρασμα της κλινικής δοκιμής PEPaNIC ήταν πως η όψιμη έναρξη παρεντερικής διατροφής αναδείχθηκε κλινικά ανώτερη σε σύγκριση με την πρώιμη (211).

Ειδικότερα, οι Guiza και συν. βασίστηκαν στην υπόθεση ότι η πρώιμη χρήση παρεντερικής διατροφής στη ΜΕΘΠ επηρεάζει αρνητικά την ανάπτυξη των εκτελεστικών λειτουργιών, την εξωτερίκευση της συμπεριφοράς και την οπτικοκινητική ολοκλήρωση του παιδιού στα επόμενα 2 χρόνια της ζωής του σε σύγκριση με την όψιμη παρεντερική διατροφή (212). Ωστόσο, η μοριακή βάση αυτού του ευρήματος παρέμενε αβέβαιη και για το λόγο αυτό οι ερευνητές επιχείρησαν να ελέγξουν την υπόθεση ότι οι αλλαγές στα επίπεδα μεθυλίωσης του DNA συμβαίνουν κατά τη διάρκεια μιας κρίσιμης ασθένειας και ότι η πρώιμη παρεντερική διατροφή (ή ένα συγκεκριμένο μακροθρεπτικό συστατικό αυτής) συμβάλλει στη δημιουργία μεταβολών στη μεθυλίωση, κάτι που θα μπορούσε να αποτελεί εξήγηση για τις αρνητικές επιπτώσεις της στη νευρογνωστική ανάπτυξη. Σχεδίασαν, λοιπόν, μία δευτερογενή ανάλυση της κλινικής δοκιμής PEPaNIC, η οποία περιλάμβανε όλους τους ασθενείς με δείγμα αίματος από την τελευταία ημέρα τους στη ΜΕΘ (n=825, ηλικίας 0–17 ετών) που τυχαιοποιήθηκαν σε πρώιμη ή όψιμη παρεντερική διατροφή, αλλά και 352 υγιή παιδιά με παρόμοια δημογραφικά χαρακτηριστικά, που δεν είχαν νοσηλευτεί ποτέ σε ΜΕΘ. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση της μεθυλίωσης του DNA ήταν η Infinium Human Methylation EPIC BeadChip και τα δείγματα ελήφθησαν από λευκοκύτταρα του περιφερικού αίματος για περισσότερες από 850.000 θέσεις CpG, αποδίδοντας αποτελέσματα υψηλής ποιότητας για 403 ασθενείς που έλαβαν πρώιμη και για 411 ασθενείς που έλαβαν όψιμη παρεντερική διατροφή. Εφαρμόζοντας ένα ψευδές ποσοστό ανακάλυψης μικρότερο από 5% τα επίπεδα μεθυλίωσης του DNA των ασθενών κατά την τελευταία ημέρα νοσηλείας τους στη ΜΕΘ συγκρίθηκαν με αυτά των υγιών παιδιών, αφού εξαιρέθηκαν πρώτα όλες οι διαφορικά μεθυλιωμένες CpG αλληλουχίες κατά την ημέρα εισαγωγής στη ΜΕΘ (374.106 στο σύνολο), καθώς αυτές πιθανώς αντανάκλυσαν καταστάσεις προ της εισαγωγής, ώστε να εξασφαλιστεί η αποκλειστική καταγραφή μόνο των de novo αλλαγών κατά την παραμονή στη μονάδα.

Πρωταρχική μετρήσιμη έκβαση της μελέτης των Guiza και συν. ήταν οι de novo αλλαγές στη μεθυλίωση του DNA που συνέβησαν κατά τη διάρκεια παραμονής στη ΜΕΘΠ και προκλήθηκαν από την εφαρμογή της πρώιμης παρεντερικής διατροφής και η σχέση τους με τη νευροαναπτυξιακή επιδείνωση των συμμετεχόντων 2 χρόνια μετά το τέλος της νοσηλείας τους. Τα παιδιά που νοσηλεύτηκαν σε ΜΕΘΠ βρέθηκε πως

είχαν 159 διαφορεικά μεθυλιωμένα CpG δινοκυλεοτίδια συγκριτικά με τα υγιή παιδιά, με μέσο μέγεθος επίδρασης 2,6% (SD 2,5) έως 21,6% ($p < 0.00002$), με τα περισσότερα από αυτά (126/159) να είναι υπομεθυλιωμένα. Αυτές οι διαφορεικά μεθυλιωμένες θέσεις CpG εντοπίστηκαν σε γονίδια που εμπλέκονται στην διαμόρφωση, την πλαστικότητα και την ανάπτυξη σηματοδοτικών μηχανισμών του εγκεφάλου, τη διαφοροποίηση, μετανάστευση και αύξηση των νευρώνων, καθώς και στον μεταβολισμό, τη μεταγραφική ρύθμιση, την ανάπτυξη και κινητική λειτουργία του οργανισμού, όπως επίσης και σε γονίδια που ενοχοποιούνται για νευροεκφυλιστικά και νευροψυχιατρικά νοσήματα. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν πολυμεταβλητές αναλύσεις γραμμικής και μη γραμμικής παλινδρόμησης, για να αξιολογηθεί η επίδραση της πρώιμης έναντι της όψιμης παρεντερικής διατροφής στις επαγόμενες από ασθένεια τροποποιήσεις της μεθυλίωσης του DNA, αλλά και για να εκτιμηθεί ο βαθμός στον οποίο αυτές οι διαφορεικά μεθυλιωμένες θέσεις CpG μπορούν να εξηγήσουν την επιδείνωση της νευρογνωστικής ανάπτυξης των παιδιών 2 χρόνια αργότερα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτών των αναλύσεων, η πρώιμη παρεντερική διατροφή και ειδικότερα, η δοσολογία των χορηγούμενων σε αυτή αμινοξέων και όχι της γλυκόζης ή των λιπιδίων, φάνηκε να συμβάλλει ανεξάρτητα στη διαφορεική μεθυλίωση για 37 (23%) από τις 159 θέσεις CpG ($p = 0.0001$ έως 0.050), οι 27 από τις οποίες ήταν υπομεθυλιωμένες. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να αποτελέσει τη μοριακή βάση για την εξήγηση της αρνητικής επίδρασης της πρώιμης παρεντερικής διατροφής στη νευρογνωστική ανάπτυξη των συμμετεχόντων μετά από διάστημα παρακολούθησης 2 ετών. Συμπερασματικά, η πρώιμη παρεντερική διατροφή αναγνωρίστηκε ως ένας τροποποιήσιμος αιτιολογικός παράγοντας για περίπου το $\frac{1}{4}$ (23%) των αλλαγών που παρατηρήθηκαν στα επίπεδα μεθυλίωσης του DNA, με την πρώιμη χορήγηση των αμινοξέων να παίζει καθοριστικό ρόλο προς αυτή την κατεύθυνση. Ωστόσο, παρέμεινε ασαφές το πόσο γρήγορα συμβαίνουν αυτές οι αλλαγές στη μεθυλίωση του DNA, καθώς και το πώς εξελίσσονται με την πάροδο του χρόνου στη ΜΕΘΠ, εάν δηλαδή οι μεταβολές είναι μόνιμες ή αναστρέψιμες.

Αυτό οδήγησε τους Verlinden και συν. στο να χρησιμοποιήσουν ένα υποσύνολο ζευγών ασθενών ($n=72$, 36 εκ των οποίων έλαβαν πρώιμη και 36 όψιμη παρεντερική διατροφή), αλλά και υγιών μαρτύρων ($n=42$), με σκοπό να εξετάσουν τη χρονική πορεία και τα μοτίβα των μεταβολών της μεθυλίωσης που είχαν ήδη αναγνωριστεί (213). Προκειμένου να τεκμηριωθεί η χρονική πορεία των de novo αλλαγών που προκλήθηκαν από την πρώιμη συγκριτικά με την καθυστερημένη παρεντερική διατροφή κατά τη διάρκεια της παραμονής στη μονάδα με οικονομικά εφικτό τρόπο και αποφεύγοντας συγχυτικούς παράγοντες, επιλέχθηκε μια υποομάδα 36 ασθενών στους οποίους χορηγήθηκε όψιμη και μία υποομάδα 36 ασθενών στους οποίους χορηγήθηκε πρώιμη παρεντερική διατροφή. Οι υποομάδες αυτές επιλέχθηκαν μεταξύ των ασθενών της ΜΕΘΠ της Λεβέν, οι οποίοι χρειάζονταν εντατική θεραπεία για περισσότερες από 3 ημέρες, εξήλθαν ζωντανοί από την μονάδα και για τους

οποίους ήταν διαθέσιμο DNA για την ημέρα εισαγωγής, την ημέρα 3 και την τελευταία ημέρα νοσηλείας. Από αυτούς τους 72 ασθενείς, οι 42 (19 με πρώιμη και 23 με όψιμη παρεντερική διατροφή) εντάχθηκαν στη συνέχεια σε ζεύγη με 42 υγιή παιδιά ελέγχου. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε 147 θέσεις CpG, των οποίων η κατάσταση μεθυλίωσης ήταν φυσιολογική κατά την πρώτη ημέρα εισαγωγής στη μονάδα, αλλά τροποποιημένη είτε λόγω παρουσίας σοβαρής νόσου είτε εφαρμογής εντατικής θεραπείας κατά την ημέρα εξόδου από την μονάδα. Για τις 37 από τις 147 αυτές διουκλεοτιδικές αλληλουχίες είχε βρεθεί πως η πρώιμη παρεντερική διατροφή ήταν υπεύθυνη για τη διαφορική μεθυλίωσή τους συγκριτικά με την όψιμη-de novo αλλαγές (212). Διαδοχικά δείγματα περιφερικού αίματος, που προορίζονταν για λήψη DNA, συλλέχθηκαν κατά την ημέρα εισαγωγής, την ημέρα 3, την ημέρα 5, την ημέρα 7 καθώς και την ημέρα εξόδου από τη μονάδα, ενώ για τη διενέργεια σύγκρισης με υγιή παιδιά έγινε δειγματοληψία αίματος από παιδιά που δεν είχαν εισαχθεί ποτέ σε ΜΕΘΠ.

Τα επίπεδα μεθυλίωσης βρέθηκαν να διαφέρουν μεταξύ των ασθενών και των υγιών μαρτύρων στο 64,6% των 147 CpG διουκλεοτιδίων την ημέρα 3 παραμονής στη ΜΕΘ, ποσοστό που αυξήθηκε σε 72,8% κατά την ημέρα 5 και σε 90,5% την ημέρα 7. Μεταξύ των ζευγών ασθενών που έλαβαν είτε πρώιμη είτε όψιμη παρεντερική διατροφή, ραγδαία απομεθυλίωση παρατηρήθηκε από την ημέρα εισαγωγής έως την ημέρα 3 στο 76,2% των CpG θέσεων. Επίσης, από την ημέρα εισαγωγής έως την ημέρα 3, το 19,7% των CpG διουκλεοτιδίων εμφάνισαν υπερμεθυλίωση, ενώ μόλις το 4,1% των CpG εμφάνισαν αλλαγές στα επίπεδα μεθυλίωσης όχι από την εισαγωγή αλλά μετά την ημέρα 3. Πιο αναλυτικά, η χρονική σειρά των αλλαγών εντός της ομάδας των ασθενών στη μεθυλίωση του DNA αποκάλυψε τρεις κύριες κατηγορίες προτύπων μεταξύ της ημέρας εισαγωγής στη ΜΕΘΠ και της ημέρας 3, οι οποίες θα μπορούσαν να χωριστούν στη συνέχεια σε έξι μοτίβα/ πρότυπα με βάση την εξέλιξη τους πέρα από την ημέρα 3. Στην πρώτη κατηγορία προτύπων, η οποία κάλυπτε την πλειονότητα (76,2%) των θέσεων CpG, σημειώθηκε ταχεία απομεθυλίωση μεταξύ της ημέρας εισαγωγής και της 3^{ης} ημέρας νοσηλείας. Μετά από την ημέρα 3, το 67,9% αυτών των θέσεων CpG παρέμειναν απομεθυλιωμένες στον ίδιο βαθμό ή επαναμεθυλιώθηκαν μερικώς (μοτίβο 1), ενώ το 32,1% αυτών υπέστησαν περαιτέρω απομεθυλίωση μετά την ημέρα 3 (μοτίβο 2) με πιο αργό ρυθμό. Στη δεύτερη κατηγορία προτύπων, σημειώθηκε υπερμεθυλίωση του 19,7% των θέσεων CpG μεταξύ της ημέρας εισαγωγής και της ημέρας 3, με τις 34,5% εξ' αυτών να παραμένουν εξίσου υπερμεθυλιωμένες ή να απομεθυλιώνονται μόνο μερικώς (μοτίβο 3), και με τις υπόλοιπες 65,5% να υπερμεθυλιώνονται περαιτέρω μετά την ημέρα 3 (μοτίβο 4) με βραδύτερο όμως ρυθμό ανόδου. Η τρίτη κατηγορία προτύπων κάλυψε το 4,1% των θέσεων CpG, από τις οποίες η μεθυλίωση δεν άλλαξε μεταξύ της ημέρας εισαγωγής και της ημέρας 3 και για τις οποίες σαφείς αλλαγές έγιναν ορατές μόνο μετά την ημέρα 3. Από αυτές τις θέσεις CpG, το 50% έδειξε καθυστερημένη

απομεθυλίωση (μοτίβο 5) και το 50% έδειξε καθυστερημένη υπερμεθυλίωση (μοτίβο 6).

Από τις θέσεις CpG των οποίων η μεθυλίωση DNA είχε προηγουμένως αποδειχθεί ότι επηρεάζεται από την πρώιμη έναντι της όψιμης παρεντερικής διατροφής, κατά την τελευταία ημέρα νοσηλείας στη ΜΕΘΠ το 33,3% καταχωρήθηκε στο πρότυπο 1 (ταχεία απομεθυλίωση ακολουθούμενη από εξίσου διατηρούμενη απομεθυλίωση ή μόνο μερική επαναμεθυλίωση), το 38,9% στο πρότυπο 2 (ταχεία απομεθυλίωση ακολουθούμενη από περαιτέρω απομεθυλίωση), το 5,6% στο πρότυπο 3 (ταχεία υπερμεθυλίωση ακολουθούμενη από εξίσου διατηρούμενη υπερμεθυλίωση ή μόνο μερική απομεθυλίωση) και το 22,2% στο πρότυπο 4 (ταχεία υπερμεθυλίωση ακολουθούμενη από ακόμη περαιτέρω υπερμεθυλίωση). Σε ασθενείς που έλαβαν όψιμη παρεντερική διατροφή, η κατάσταση μεθυλίωσης του DNA παρέμεινε σχετικά σταθερή με λιγότερο εμφανείς αλλαγές, ενώ τα χρόνο-εξαρτώμενα πρότυπα παρατηρήθηκαν κυρίως στους ασθενείς στους οποίους χορηγήθηκε πρώιμη παρεντερική διατροφή. Από τις θέσεις CpG που επηρεάστηκαν από την πρώιμη παρεντερική διατροφή έναντι της όψιμης την ημέρα εξόδου από την μονάδα, το 38,9% μεθυλιώθηκε διαφορετικά ήδη από την ημέρα 3, το 25% την ημέρα 5 και το 13,9% την ημέρα 7. Συνοπτικά, οι μεταβολές στα επίπεδα μεθυλίωσης του DNA που προκλήθηκαν από τη χορήγηση πρώιμης παρεντερικής διατροφής εμφανίστηκαν σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα, κυρίως εντός των πρώτων ημερών από την εισαγωγή σε ΜΕΘΠ και οι περισσότερες από τις μεταβολές αυτές είτε διατηρήθηκαν τουλάχιστον εν μέρει είτε επιδεινώθηκαν κατά την 1^η εβδομάδα νοσηλείας. Ο ρυθμός προόδου των αλλαγών μετά την ημέρα 3 ήταν σε κάθε περίπτωση πιο αργός. Καταλήγοντας στα συμπεράσματά τους, οι ερευνητές πρότειναν ότι μελλοντικές παρεμβάσεις που θα στοχεύουν στην άμβλυνση παρόμοιων τροποποιήσεων στην κατάσταση μεθυλίωσης του DNA θα πρέπει να ξεκινούν κατά το δυνατόν νωρίτερα μετά την εισαγωγή ασθενών στη ΜΕΘΠ.

Επειδή ορισμένοι τομείς της νευροανάπτυξης του οργανισμού μπορούν να αξιολογηθούν αποτελεσματικά μόνο από την ηλικία των τεσσάρων ετών κι έπειτα, οι Jacobs και συν. επιχείρησαν να προσδιορίσουν την επίδραση της όψιμης έναντι της πρώιμης παρεντερικής διατροφής στη σωματική, νευρογνωστική, συναισθηματική και συμπεριφορική ανάπτυξη των συμμετεχόντων 4 χρόνια μετά την τυχαιοποίηση, σχεδιάζοντας μία τετραετή follow-up μελέτη της αρχικής κλινικής δοκιμής (214). Πρόκειται για μία σημαντική μελέτη, η οποία δεν συμπεριλήφθηκε στα αποτελέσματα της παρούσας συστηματικής ανασκόπησης, καθώς δεν εξέτασε τον ρόλο αυτού του τύπου διατροφής σε κάποιον από τους επιγενετικούς μηχανισμούς, αλλά έθεσε τα θεμέλια για την πραγματοποίηση της επόμενης κλινικής δοκιμής από ερευνητές της ίδιας ομάδας, η οποία θα αναλυθεί στη συνέχεια. Στην πρώτη, αυτή μελέτη των Jacobs και συν., κατά το χρονικό διάστημα μεταξύ Μαρτίου 2016 και Νοεμβρίου 2019, 684 παιδιά από την αρχική δοκιμή PEPaNIC (356 από την ομάδα της

όψιμης και 328 από την ομάδα πρώιμης παρεντερικής διατροφής) αξιολογήθηκαν για τη μακροπρόθεσμη νευρογνωστική τους ανάπτυξη. Για τους σκοπούς της σύγκρισης στρατολογήθηκαν και 369 υγιή παιδιά με παρόμοια δημογραφικά χαρακτηριστικά (φύλο, ηλικία), ώστε να υποβληθούν σε ιατρικούς και αναπτυξιακούς ελέγχους, μεταξύ των οποίων συμπεριλαμβάνονταν και αδέρφια ή συγγενείς της ομάδας των ασθενών, προκειμένου να ελεγχθούν κατά το δυνατόν οι διαφορές στο γενετικό, κοινωνικοοικονομικό και περιβαλλοντικό τους υπόβαθρο. Οι εκβάσεις που μελετήθηκαν ήταν η κατάσταση της υγείας (διάγνωση με σωματική ή ψυχική ασθένεια ή/και νοσηλεία σε νοσοκομείο στη διάρκεια των 4 ετών), οι ανθρωπομετρικές μετρήσεις (ύψος, βάρος σώματος, περίμετρος κεφαλής), οι αναφερόμενες από τους γονείς/ φροντιστές εκτελεστικές λειτουργίες (μέσα από κλινικά τεστ αξιολόγησης της νοημοσύνης, της εγρήγορσης, της μνήμης και του οπτικο-κινητικού συντονισμού), αλλά και οι διαταραχές συμπεριφοράς και συναισθήματος των παιδιών (μέσα από ειδικά σταθμισμένα ερωτηματολόγια στα οποία οι υψηλότερες βαθμολογίες υποδηλώνουν χειρότερη έκβαση). Οι αξιολογήσεις πραγματοποιήθηκαν από ομάδες εξειδικευμένων παιδιάτρων και παιδοψυχολόγων.

Σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, τόσο από μονοπαραγοντικές όσο και από πολυπαραγοντικές αναλύσεις, η ομάδα των ασθενών σημείωσε χειρότερη έκβαση σε όλους τους τομείς που μελετήθηκαν (χαμηλότερο ύψος και περίμετρος κεφαλής, μεγαλύτερο βάρος σώματος, χειρότερη κατάσταση υγείας-αναλογία πιθανοτήτων εισαγωγής στο νοσοκομείο, χειρότερη νευρογνωστική ανάπτυξη- αναφερόμενη από τους γονείς ή από τους φροντιστές συνολική εκτελεστική λειτουργία, συνολικό πηλίκιο νοημοσύνης και συναισθηματική και συμπεριφορική διαμόρφωση). Μεταξύ των ασθενών, τα αποτελέσματα δεν ήταν ποτέ χειρότερα στην ομάδα της όψιμης σε σύγκριση με την ομάδα της πρώιμης παρεντερικής διατροφής. Οι ασθενείς που έλαβαν καθυστερημένα παρεντερική διατροφή είχαν λιγότερες εισαγωγές στο νοσοκομείο και λιγότερα προβλήματα συμπεριφοράς και συναισθήματος από αυτούς που έλαβαν πρώιμη, και μάλιστα, μετά από προσαρμογή για παράγοντες κινδύνου βρέθηκε πως δεν διέφεραν πλέον από τους υγιείς μάρτυρες για τα αποτελέσματα αυτά. Στα προβλήματα που αναφέρθηκαν εντάσσονται οι διαταραχές εσωτερίκευσης των συναισθημάτων, όπως αυτές εκφράζονται μέσα από το άγχος, την κατάθλιψη και την κοινωνική απόσυρση, της εξωτερίκευσης συναισθημάτων, που εκφράζονται με επιθετικότητα, την απόκλιση από κοινωνικούς κανόνες και πρότυπα και τις συγκρούσεις με άλλους, όπως επίσης και οι διαταραχές ύπνου, προσοχής και σκέψης και όλα αυτά θεωρείται πως απορρέουν από την φτωχή ανάπτυξη των εκτελεστικών λειτουργιών του ατόμου. Επομένως, η καθυστέρηση έναρξης παρεντερικής διατροφής σε βαρέως πάσχοντα παιδιά κατά την 1^η εβδομάδα νοσηλείας τους σε ΜΕΘΠ δεν φάνηκε να επηρέασε αρνητικά τη μακροπρόθεσμη έκβαση αναφορικά με τη σωματική και νευρογνωστική τους ανάπτυξη 4 χρόνια μετά

την τυχαιοποίηση, ενώ βρέθηκε πως λειτούργησε προστατευτικά στους τομείς των συναισθηματικών διαταραχών και των προβλημάτων συμπεριφοράς.

Τέλος, στην επόμενη προσχεδιασμένη υποανάλυση της κλινικής δοκιμής PEPaNIC, οι Jacobs και συν. επιχείρησαν να εξετάσουν εάν η διαφορική μεθυλίωση των 37 θέσεων CpG που παρατηρήθηκε μεταξύ της ημέρας εισαγωγής και της ημέρας εξιτηρίου από τη ΜΕΘΠ και που βρέθηκε ότι οφείλεται στην πρώιμη έναρξη παρεντερικής διατροφής (212), θα μπορούσε να εξηγήσει τον αρνητικό αντίκτυπο της πρώιμης παρεντερικής διατροφής στο συναίσθημα και τη συμπεριφορά, ο οποίος τεκμηριώθηκε 4 χρόνια μετά στην μελέτη που αναλύθηκε προηγουμένως (215). Στη 2^η κατά σειρά μελέτη των Jacobs και συν. πραγματοποιήθηκε ανάλυση διαμεσολάβησης, η οποία αποκάλυψε ότι η προκαλούμενη από την έναρξη πρόωρης παρεντερικής διατροφής διαφορική μεθυλίωση των 37 θέσεων CpG μπορούσε να εξηγήσει τον επιβλαβή αντίκτυπο της στους 3 τομείς συμπεριφοράς και συναισθήματος (εσωτερίκευση - εξωτερίκευση συναισθήματος και συνολικά συμπεριφορικά - συναισθηματικά προβλήματα). Όταν προστέθηκαν οι 37 θέσεις CpG στα πολυμεταβλητά μοντέλα για τα 3 συμπεριφορικά αποτελέσματα, η επεξηγηματική ισχύς βελτιώθηκε με αύξηση από 1,710 έως 1,851 φορές και η επίδραση της διαφορικής μεθυλίωσης των 37 θέσεων CpG αντικατέστησε και ξεπέρασε την επίδραση της τυχαιοποίησης στην πρώιμη και όψιμη παρεντερική διατροφή. Οι κυριότερες θέσεις CpG που διατηρήθηκαν συχνότερα στα μη γραμμικά μοντέλα ως ανεξάρτητα συσχετιζόμενες με τις 3 μετρούμενες εκβάσεις ήταν οι: cg14172797 στο γονίδιο PRKCA (που εμπλέκεται στη μνήμη, στη ρύθμιση της διάθεσης και της συμπεριφοράς), cg11047783 στο KAT6B (που εμπλέκεται στη διαμόρφωση του εγκεφαλικού φλοιού, την εμφάνιση ΔΕΠΥ και της νοητικής δυσλειτουργίας), cg14109551 στο CEP85L (που εμπλέκεται σε όγκους εγκεφάλου, ΔΕΠΥ και διπολική διαταραχή), cg14450616 σε PLD3 (για τη νευρωνική ανάπτυξη, τη νευροδιαβίβαση, την οπτική μάθηση, μνήμη και ευελιξία), cg26308668 στο γονίδιο srGAP1 (που εμπλέκεται στην ανάπτυξη και μετανάστευση νευρώνων και συνδέεται με νοητική υστέρηση), cg14364797 στο FNBP1 (που εμπλέκεται στον σχηματισμό νευρωνικού δικτύου και στην επεξεργασία των σημάτων), cg22645359 στο TCF7L2 (για το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt που σχετίζεται με τη νευροανάπτυξη και την πλαστικότητα των ώριμων νευρώνων), cg12928479 στο NLRC5 (που εμπλέκεται σε νευροάνοσες και νευροφλεγμονώδεις διεργασίες), cg22076676 στο THADA (για την απόπτωση, τη νευροφλεγμονή και την πολλαπλή σκλήρυνση) κ.ά. Όλες αυτές οι CpG θέσεις εδράζονται σε γονίδια τα οποία συμμετέχουν και σχετίζονται με μονοπάτια που συμβάλλουν στην διαμόρφωση των γνωστικών λειτουργιών, της διάθεσης, του συναισθήματος και της συμπεριφοράς και με αυτό τον τρόπο, η διαφορική τους μεθυλίωση, που προκαλείται από τη χρήση της πρώιμης παρεντερικής διατροφής στη ΜΕΘΠ, εξηγεί -τουλάχιστον εν μέρει- την επιβλαβή της επίδραση στα μακροπρόθεσμα συναισθηματικά και συμπεριφορικά προβλήματα που

παρατηρήθηκαν τέσσερα χρόνια αργότερα. Μάλιστα, πολλές από αυτές τις CpG αλληλουχίες βρέθηκε πως ήταν ίδιες με αυτές που ευθύνονταν για την επιδείνωση της νευρογνωστικής ανάπτυξης των παιδιών στην μελέτη των Guiza και συν. στο διετές follow-up (212).

11.2 Ο επιγενετικός ρόλος του συνδυασμού διατροφής και σωματικής δραστηριότητας

Στην μελέτη των Martins και συν. στόχος ήταν να εξεταστούν οι επιπτώσεις της κατανάλωσης χυμού κόκκινου σταφυλιού στους δείκτες οξειδωτικού στρες και φλεγμονής, στη μυϊκή καταστροφή, στα επίπεδα της μυϊκής ισχύος αλλά και στα συνολικά επίπεδα ακετυλίωσης της ιστόνης H4 σε έφηβους αθλητές πετοσφαίρισης (βόλεϋ) (216). Πρόκειται για διπλή, τυφλή τυχαιοποιημένη κλινική δοκιμή στην οποία συμμετείχαν 12 αγόρια παίκτες βόλεϋ, ηλικιών $16 \pm 0,6$ ετών, σε επίπεδο πρωταθλητισμού με τουλάχιστον 3 ώρες προπόνησης/ ημέρα, 5 ημέρες/ εβδομάδα, όλα στο ίδιο περίπου στάδιο της αγωνιστικής περιόδου. Κάθε αθλητής ολοκλήρωσε 3 προσομοιώσεις αγώνα βόλλεϋ (διάρκειας τριών σετ ο καθένας) κατά τη διάρκεια της μελέτης και πιο συγκεκριμένα, κάθε έφηβος πραγματοποίησε αρχικά μία προσομοίωση αγώνα χωρίς παρέμβαση, δηλαδή χωρίς κατανάλωση κάποιου ροφήματος. Στη συνέχεια, οι συμμετέχοντες τυχαιοποιήθηκαν, ώστε να λάβουν οι μισοί απ' αυτούς παρέμβαση με χυμό από κόκκινα σταφύλια (400ml - διάλυμα πλούσιο σε πολυφαινόλες και φλαβονοειδή) και οι υπόλοιποι εικονικό διάλυμα (400ml διάλυμα μαλτοδεξτρίνης χωρίς πολυφαινόλες) επί συνολικά 14 ημέρες. Μετά από την περίοδο αυτή, έλαβε χώρα ο 2^{ος} αγώνας προσομοίωσης κι έπειτα ακολούθησε περίοδος «έκπλυσης» 14 ημερών, στην οποία ζητήθηκε από τους συμμετέχοντες να μην καταναλώνουν κανένα από τα δύο ροφήματα. Τέλος, οι ίδιες παρεμβάσεις εφαρμόστηκαν στη συνέχεια αντεστραμμένες στις 2 ομάδες εφήβων αθλητών για άλλες 14 ημέρες (μοντέλο cross-over) και κατόπιν πραγματοποιήθηκε ο 3^{ος} αγώνας προσομοίωσης. Πριν και μετά από κάθε αγώνα, οι αθλητές υποβλήθηκαν σε έλεγχο μυϊκής δύναμης, αξιολόγηση της υποκειμενικής αντίληψης της καταβαλλόμενης προσπάθειας, έλεγχο της έντασης της φυσικής δραστηριότητας μετά από μέτρηση του γαλακτικού οξέος στο αίμα και σε δειγματοληψία περιφερικού αίματος. Οι εκβάσεις που μετρήθηκαν ήταν οι δείκτες οξειδωτικού στρες, οι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες IFN- γ και IL-4, ο βαθμός μυϊκής καταστροφής από τα επίπεδα της κρεατινικής κινάσης (CK-NAC), τα ολικά επίπεδα ακετυλίωσης της ιστόνης H4 σε μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος και η μυϊκή δύναμη με την μέτρηση της ισχύος της γροθιάς (για τα άνω άκρα) με τη βοήθεια υδραυλικού χειροδυναμόμετρου και με την μέτρηση του άλματος (για τα κάτω άκρα). Για τον προσδιορισμό της ακετυλίωσης της ιστόνης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Histone H4 Assay Kit (Colorimetric Detection, catalog number P-4009, EpiQuik, USA).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης, η κατανάλωση χυμού σταφυλιού μείωσε σημαντικά την υπεροξειδωση των λιπιδίων ($p = 0.04$) και την καταστροφή του DNA ($-27,8\%$, $p = 0.01$) [οι πολυφαινόλες που περιέχονται στο σταφύλι μπορούν να αποτρέψουν την οξειδωτική βλάβη του DNA και των πρωτεϊνών, προσφέροντας ένα άτομο υδρογόνου (H^+) στις ελεύθερες ρίζες O_2^- (ROS)]. Δεν παρατηρήθηκε μείωση της υπεροξειδωσης των λιπιδίων από την κατανάλωση placebo ή κανενός ροφήματος, όπως επίσης δεν ήταν στατιστικά σημαντική η διαφορά των καταστάσεων αυτών με την μείωση της καταστροφής του DNA ($p > 0.05$). Τα επίπεδα των IFN- γ , IL-4, CK-NAC και της ακετυλίωσης της H4 δεν μεταβλήθηκαν με την κατανάλωση χυμού σταφυλιού. Όσον αφορά στην προφλεγμονώδη κυτταροκίνη IFN- γ , στατιστικά σημαντικές διαφορές διαπιστώθηκαν τόσο μεταξύ των 3 καταστάσεων κατανάλωσης ($p = 0.01$) όσο και μεταξύ των προ και μετά τον αγώνα τιμών της ($p < 0.01$), ενώ στα επίπεδα της IL-4 φάνηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μόνο μεταξύ των χρονικών στιγμών πριν και μετά την προσομοίωση αγώνα ($p < 0.01$). Στην ομάδα ελέγχου που δεν κατανάλωσε κανένα ρόφημα, σημειώθηκε οξεία αύξηση των επιπέδων της INF- γ κατά 8,3% μετά τον 1^ο αγώνα- ενδεικτική της ενίσχυσης της φλεγμονώδους απόκρισης του οργανισμού, χωρίς αντίστοιχη αύξηση της αντιφλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-4, όπως θα ήταν γενικά αναμενόμενο προκειμένου να περιοριστεί η προκαλούμενη από την οξεία φλεγμονή κυτταρική καταστροφή. Αξιοσημείωτη αύξηση της IL-4 μετά την άσκηση παρατηρήθηκε μόνο στην ομάδα αθλητών που έλαβε placebo (+14%), με συνοδό αύξηση της μυϊκής καταστροφής (αύξηση των επιπέδων της κρεατινικής κινάσης κατά 22%). Αντίθετα, στην ομάδα αθλητών που κατανάλωσε χυμό σταφυλιού ή κανένα ρόφημα η σωματική άσκηση δεν συσχετίστηκε με αύξηση της IL-4 μετά τον αγώνα, αλλά ούτε και με μείωση των τιμών της κρεατινικής κινάσης - μείωση του βαθμού μυϊκής καταστροφής. Επιπλέον, βρέθηκε πως η χορήγηση για 14 ημέρες χυμού σταφυλιού ή placebo διαλύματος μαλτοδεξτρίνης ελαχιστοποίησε την επίδραση της σωματικής δραστηριότητας στα επίπεδα της IFN- γ , καθώς και στις 2 περιπτώσεις οι υδατάνθρακες που περιέχονται στα ροφήματα που καταναλώθηκαν φάνηκε πως συσχετίζονται με τον έλεγχο/ περιορισμό της φλεγμονώδους διαδικασίας. Η ισχύς των κάτω άκρων βελτιώθηκε μετά από την κάθε προσομοίωση αγώνα, αλλά δεν βρέθηκε να συσχετίζεται με την κατανάλωση χυμού σταφυλιού, placebo ή κανενός ροφήματος.

Στατιστικά σημαντικές ήταν οι διαφορές στα επίπεδα ακετυλίωσης της H4 τόσο μεταξύ των 3 καταστάσεων κατανάλωσης ή μη ροφημάτων ($p < 0.01$) όσο και μεταξύ των χρονικών στιγμών πριν και μετά τους αγώνες προσομοίωσης ($p < 0.01$). Σημαντική ελάττωση στα ολικά επίπεδα ακετυλίωσης (-59.1%) παρατηρήθηκε στην ομάδα ελέγχου των αθλητών (στην οποία δεν καταναλώθηκε κανένα ρόφημα) μετά την προσομοίωση αγώνα ($p < 0.01$), με τον επιγενετικό αυτό δείκτη ωστόσο να παραμένει σχεδόν αμετάβλητος πριν και μετά τον αγώνα στις καταστάσεις

κατανάλωσης χυμού και placebo. Τα αυξημένα επίπεδα ακετυλίωσης των ιστονών έχει βρεθεί πως συνδέονται με την παραγωγή κυτταροκινών (217). Επίσης, ένα εντατικό πρόγραμμα άσκησης φάνηκε πως προάγει την υπερακετυλίωση της ιστόνης H4, οδηγώντας παράλληλα και σε αυξημένη παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως οι IL-8 και TNF- α (218). Ωστόσο, σύμφωνα με τα ευρήματα της μελέτης των Martins και συν., αντίθετα από ό,τι συμβαίνει με την αύξηση των ολικών επιπέδων ακετυλίωσης της ιστόνης H4, η κατάσταση της συνολικής υπομεθυλίωσης της H4 που παρατηρήθηκε στην ομάδα ελέγχου, είναι πιθανό πως συνέβαλε στη σίγαση γονιδίων που εμπλέκονται στην παραγωγή κυτταροκινών που προάγουν τη φλεγμονή και μάλιστα προτάθηκε πως ο βιοδείκτης αυτός είναι ευαίσθητος μόνο σε αλλαγές που σχετίζονται με την σωματική δραστηριότητα και όχι με την κατανάλωση ροφημάτων πλούσιων σε αντιοξειδωτικά και υδατάνθρακες (ομάδες χυμού σταφυλιού και placebo). Έτσι, οι ερευνητές συμπέραναν πως η πρόσληψη χυμού σταφυλιού για δύο εβδομάδες φαίνεται να μειώνει το οξειδωτικό στρες - μέσα από μείωση της υπεροξειδωσης των λιπιδίων-, καθώς και τη σχετιζόμενη με διαλείπουσα άσκηση βλάβη του DNA, χωρίς όμως να σημειώνεται σαφώς επιγενετική επίδραση.

Στην μελέτη των Gallardo-Escribano και συν. στόχος ήταν να προσδιοριστεί εάν η κατάσταση της μεταβολικά υγιούς παχυσαρκίας (Metabolically Healthy Obesity, MHO) επηρεάζεται από τη μεθυλίωση του DNA γονιδίων που σχετίζονται με τον μεταβολισμό των λιπιδίων και τον μηχανισμό της φλεγμονής (219). Τα γονίδια που εξετάστηκαν ήταν το γονίδιο που κωδικοποιεί την λιποπρωτεϊνική λιπάση (lipoprotein lipase, LPL), τον υποδοχέα- α του ρετινοειδούς X (retinoid X receptor alpha, RXRa), τον υποδοχέα X του ήπατος (liver X receptor, LXR), τη δεσατουράση Δ -9 (stearoyl-CoA desaturase, SCD), τον δεσμευτικό παράγοντα του ρυθμιστικού στοιχείου στερόλης 1 (Sterol regulatory element binding factor 1, SREBF1) και το γονίδιο της λεπτίνης (LEP). Η λήψη του DNA έγινε από μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος 131 ατόμων παιδικής και προεφηβικής ηλικίας με φαινότυπο μεταβολικά υγιούς παχυσαρκίας μετά από τροποποιήσεις του τρόπου ζωής τους, έπειτα δηλαδή από εξατομικευμένη υιοθέτηση Μεσογειακής Διατροφής σε συνδυασμό με πρόγραμμα φυσικής δραστηριότητας. Ο πληθυσμός της μελέτης αποτελούνταν από αγόρια και κορίτσια ηλικιών 4 έως 9 ετών με παχυσαρκία (Δ MΣ > 95^η ΕΘ), τα οποία ήταν μεταβολικά υγιή, δεν πληρούσαν δηλαδή τα κριτήρια ένταξης στην κατηγορία του μεταβολικού συνδρόμου. Η διάρκεια της παρέμβασης ήταν 12 μήνες. Χρησιμοποιήθηκαν ειδικά ερωτηματολόγια συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων τα οποία ταξινομούνταν σε 9 κατηγορίες τροφίμων (αυγά, γαλακτοκομικά, κρέας- ψάρι, φρούτα- λαχανικά, όσπρια- δημητριακά, έλαια- λίπη, γλυκά, ροφήματα- αναψυκτικά και άλλα) και η συνιστώμενη ημερήσια ενεργειακή πρόσληψη ήταν 1500kcal/ ημέρα. Παράλληλα, ζητήθηκε από τους συμμετέχοντες να λαμβάνουν μέρος σε πρόγραμμα σωματικής δραστηριότητας διάρκειας τουλάχιστον 120

λεπτών/ πρόγραμμα τουλάχιστον 3 φορές/ εβδομάδα, με ασκήσεις ενδυνάμωσης, ισορροπίας- ευλυγισίας ή αερόβιες.

Σύμφωνα με τα ευρήματα της μελέτης, ποσοστό 91,8% των συμμετεχόντων σημείωσε αύξηση σωματικού βάρους και 100% αυτών είχε αύξηση και στο ύψος στο τέλος του προγράμματος. Μη σημαντικές ήταν οι μεταβολές του ΔΜΣ. Αναλύσεις της σύστασης του σώματος έδειξαν αύξηση της μυϊκής μάζας κι ελάττωση της μάζας του λιπώδους ιστού 12 μήνες μετά την έναρξη της παρέμβασης. Σε ολόκληρο τον πληθυσμό της μελέτης φάνηκε στατιστικά σημαντική αύξηση στις τιμές γλυκόζης νηστείας (εντός φυσιολογικών ορίων), μείωση των επιπέδων ινσουλίνης και του δείκτη HOMA-IR και αύξηση των IL-6 και TNF-α στο τέλος της θεραπευτικής παρέμβασης. Αλλαγές παρατηρήθηκαν και στο λιπιδαιμικό προφίλ των συμμετεχόντων χωρίς στατιστική σημαντικότητα. Ανάλυση της συμμόρφωσης/ προσκόλλησης στη ΜΔ έδειξε βελτίωση σχεδόν κατά 2 μονάδες σε ολόκληρο τον πληθυσμό στους 4 και 12 μήνες της παρέμβασης. Ο χρόνος καθιστικής δραστηριότητας ανά ημέρα αυξήθηκε με στατιστική σημαντικότητα για όλους τους συμμετέχοντες ($p < 0.0001$), ενώ παράλληλα αυξήθηκαν και οι χρόνοι μέτριας και έντονης σωματικής δραστηριότητας/ ημέρα. Τα επίπεδα μεθυλίωσης DNA όλων των γονιδίων που εξετάστηκαν βρέθηκαν τροποποιημένα σε όλο τον πληθυσμό 12 μήνες από την έναρξη των παρεμβάσεων. Ειδικότερα, η μεθυλίωση του γονιδίου της LPL βρέθηκε αυξημένη στα κορίτσια μετά από 4 μήνες και διατηρήθηκε αυξημένη στο τέλος των παρεμβάσεων- μετά από 12 μήνες. Το ίδιο συνέβη και με τη μεθυλίωση του γονιδίου της λεπτίνης, η οποία αυξήθηκε στα κορίτσια μετά από 12 μήνες. Δεν βρέθηκαν σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα μεθυλίωσης του γονιδίου RXRa. Η μεθυλίωση του γονιδίου LXR σημείωσε πτώση στους 4 μήνες στον συνολικό πληθυσμό, αλλά επέστρεψε στα αρχικά προ των παρεμβάσεων επίπεδα στους 12 μήνες, ενώ αντίθετα η μεθυλίωση του SREBF1 γονιδίου εμφάνισε αύξηση στους 4 μήνες στον συνολικό πληθυσμό, αλλά επέστρεψε στα επίπεδα αναφοράς στους 12 μήνες. Επιπλέον, στατιστικά σημαντικές ήταν οι συσχετίσεις που βρέθηκαν μεταξύ της μεθυλίωσης των προαναφερθέντων γονιδίων και των ανθρωπομετρικών μετρήσεων (ΔΜΣ), της σύστασης του σώματος- εναπόθεσης σπλαγχνικού λίπους, του δείκτη HOMA-IR, των επιπέδων ινσουλίνης στο αίμα και της τήρησης της ΜΔ. Πιο συγκεκριμένα, τα επίπεδα μεθυλίωσης του LPL βρέθηκαν να έχουν θετική συσχέτιση με τη συμμόρφωση στη ΜΔ και τη μέτρια- έντονη σωματική άσκηση και αρνητική συσχέτιση με την ποσότητα του κοιλιακού σπλαγχνικού λίπους, ενώ η μεθυλίωση του γονιδίου LEP φάνηκε να συσχετίζεται θετικά με τα επίπεδα της ινσουλίνης και αρνητικά με τα επίπεδα της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL) και με την ήπια ή έντονη άσκηση στο τέλος της παρέμβασης. Τα επίπεδα μεθυλίωσης του RXRa βρέθηκαν να έχουν σημαντική συσχέτιση με τις τιμές της HDL και τα ποσά ολικού σωματικού λίπους στο τέλος της παρέμβασης, ενώ η μεθυλίωση του γονιδίου SCD βρέθηκε να συσχετίζεται σημαντικά με παραμέτρους του γλυκαιμικού προφίλ

(επίπεδα γλυκόζης και ινσουλίνης, δείκτη HOMA-IR). Επομένως, έγινε φανερή η πιθανή αλληλεπίδραση του τρόπου ζωής (άσκηση και διατροφή) με τους επιγενετικούς μηχανισμούς, οι οποίοι ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στην αύξηση του ΔΜΣ, τον μεταβολισμό και την εναπόθεση λίπους. Μάλιστα, το προφίλ της μεθυλίωσης βρέθηκε ότι επηρεάζεται και τροποποιείται ήδη από την παιδική ηλικία, ενισχύοντας την υπόθεση ότι οι περιβαλλοντικές επιρροές στα πρώιμα στάδια της ζωής επιφέρουν επιγενετικές τροποποιήσεις που οδηγούν σε μόνιμες αλλαγές του μεταβολισμού και επομένως στην εμφάνιση ή μη χρόνιων παθήσεων. Συμπερασματικά, δώδεκα μήνες μετά την εφαρμογή των παρεμβάσεων στον τρόπο ζωής των συμμετεχόντων, ο πληθυσμός της μελέτης σημείωσε βελτίωση στην αντίσταση στην ινσουλίνη και την υπερινσουλιναιμία συγκριτικά με τα αρχικά επίπεδα αναφοράς, δηλαδή σε παραμέτρους που παίζουν βασικό ρόλο στην διαμόρφωση σχετιζόμενων με την παχυσαρκία καρδιομεταβολικών παραγόντων κινδύνου.

Κεφάλαιο 12.

Συζήτηση

Ο όρος εξατομικευμένη διατροφή έχει κάνει τις τελευταίες δεκαετίες την εμφάνισή του στους κλάδους της Πρωτεωμικής, της Μεταβολωμικής και της Διατροφογενωμικής με σκοπό να οδηγήσει σε μία καθοδηγούμενη από το γονιδίωμα του κάθε οργανισμού διατροφική προσέγγιση για την πρόληψη της παχυσαρκίας ή την θεραπεία νοσημάτων. Ο κύκλος μεταβολισμού του άνθρακα 1 (C1) αποτελεί ένα πολύ ελκυστικό μονοπάτι, μέσω του οποίου οι περιβαλλοντικές επιρροές, με κυριότερη ανάμεσά τους τη διατροφή, θα μπορούσαν να τροποποιήσουν άμεσα το προφίλ μεθυλίωσης των ατόμων. Όπως έχει αναφερθεί στο γενικό μέρος της εργασίας, το μόριο της SAM-e, το οποίο προκύπτει από τον μεταβολικό αυτό κύκλο είναι ο σημαντικότερος δότης μεθυλικών ομάδων στα ένζυμα DNMTs, που με τη σειρά τους καταλύουν την αντίδραση μετατροπής της κυτοσίνης σε 5-μεθυλοκυτοσίνη (5mC). Οποιαδήποτε διαταραχή στην βιοδιαθεσιμότητα της SAM-e μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την μεταβολή του μεθυλιώματος του οργανισμού, γεγονός που προσφέρει μία αρκετά σαφή εξήγηση του μηχανισμού μέσω του οποίου η διατροφή μεταβάλλει τα επίπεδα μεθυλίωσης και άρα, επηρεάζει την γονιδιακή ρύθμιση κι έκφραση. Σκοπός της παρούσας συστηματικής ανασκόπησης της βιβλιογραφίας είναι να συνοψίσει την υπάρχουσα γνώση σχετικά με την επίδραση της διατροφής των παιδιών και των εφήβων στη ρύθμιση των επιγενετικών τροποποιήσεων, καθώς η γνώση των επιγενετικών αυτών μηχανισμών μπορεί να οδηγήσει στην εφαρμογή εξατομικευμένων προγραμμάτων διατροφής, με σκοπό την πρόληψη ή την πιο αποτελεσματική διαχείριση των χρόνιων παθήσεων.

Από την αναζήτηση των βάσεων δεδομένων ανασύρθηκαν 14 πρωτογενείς μελέτες, 7 από τις οποίες ήταν μελέτες παρατήρησης (3 συγχρονικές, 2 μελέτες κοόρτης και 2 μελέτες ασθενών μαρτύρων) και 7 μελέτες παρέμβασης (5 τυχαιοποιημένες και 2 μη-τυχαιοποιημένες κλινικές δοκιμές). Κατά την συζήτηση των αποτελεσμάτων των διαφορετικών ειδών μελετών θα πρέπει να ληφθεί υπόψη πως υπάρχουν σημαντικές διαφορές στην σχετική ισχύ, αλλά και την επιμέρους ποιότητά τους. Πιο συγκεκριμένα, από τις 3 συγχρονικές μελέτες που συμπεριλήφθηκαν στην ανασκόπηση, μία βρέθηκε να είναι υψηλού κινδύνου συστηματικής μεροληψίας (6/10), ενώ οι υπόλοιπες δύο κρίθηκαν υψηλής ποιότητας (>7/10), σύμφωνα με την κλίμακα NOS. Όσον αφορά στις 2 μελέτες ασθενών-μαρτύρων θεωρήθηκε πως και οι 2 ήταν υψηλής ποιότητας (>7/9), όπως συνέβη επίσης και με τις 2 μελέτες κοόρτης που συμπεριλήφθηκαν στα αποτελέσματα (υψηλής ποιότητας: >7/9). Από τις 5 τυχαιοποιημένες κλινικές δοκιμές, σε μία διαπιστώθηκε υψηλός κίνδυνος συστηματικής προκατάληψης, για δύο υπάρχουν ορισμένες ανησυχίες και για δύο ο κίνδυνος σφάλματος βρέθηκε χαμηλός. Συγκεκριμένα, στις μελέτες των Peters και συν. (200) και McMorrow και συν. (206), οι ανησυχίες προκύπτουν από την απουσία

δεδομένων για όλους τους συμμετέχοντες που συμπεριλήφθηκαν αρχικά στις κλινικές δοκιμές (καθώς υπήρχε ένας αριθμός παιδιών κι εφήβων που χάθηκαν στο follow-up) αλλά και από την απουσία τεκμηριωμένων αποδείξεων ότι τα αποτελέσματα που προέκυψαν ήταν απαλλαγμένα από τον κίνδυνο συστηματικού σφάλματος μεροληψίας. Η ποιότητα των δύο μη τυχαιοποιημένων κλινικών δοκιμών αξιολογήθηκε σύμφωνα με την κλίμακα NOS για τις μελέτες κοόρτης και θεωρήθηκε πως και οι δύο ήταν υψηλής ποιότητας σχετικά με τον κίνδυνο συστηματικής μεροληψίας (>7/10).

Οι επιγενετικοί μηχανισμοί που σχετίζονται με την διατροφή των παιδιών και των εφήβων εξετάστηκαν θεματικά σε δύο ενότητες: αρχικά εστιάζοντας μόνο στον ρόλο της διατροφής και στη συνέχεια εξετάζοντας τον συνδυασμό της διατροφής με τη σωματική δραστηριότητα.

Στην πρώτη ενότητα εντάχθηκε η πλειονότητα των μελετών που εντοπίστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στο πλαίσιο αυτής της συστηματικής ανασκόπησης. Από τις μελέτες που εξετάστηκαν, δύο μελέτες παρέμβασης αφορούσαν στο σύνδρομο Angelman (200, 201). Τα αποτελέσματα της μελέτης των Peters και συν. δεν ανέδειξαν τη χρήση βηταΐνης και φυλλικού οξέος σε αποτελεσματική θεραπεία του συνδρόμου Angelman, ωστόσο η τάση βελτίωσης που παρατηρήθηκε σε ορισμένες από τις αναπτυξιακές παραμέτρους που αξιολογήθηκαν θα μπορούσε να αποτελέσει το έναυσμα για την διενέργεια μελετών με χρησιμοποίηση περισσότερων και ισχυρότερων δοτών μεθυλικών ομάδων, οι οποίοι θα προάγουν τα ολικά επίπεδα μεθυλίωσης του DNA, βελτιώνοντας τελικά τον κλινικό φαινότυπο του συνδρόμου. Επίσης, σύμφωνα με τα αποτελέσματα των Bird και συν., το συμπλήρωμα διατροφής με βηταΐνη, μεταφολίνη, κρεατίνη και βιταμίνη B12 φάνηκε ασφαλές αλλά αναποτελεσματικό στη μείωση της σοβαρότητας του συνδρόμου Angelman, καθώς η μη αύξηση των συνολικών επιπέδων μεθυλίωσης του DNA δεν επέφερε την αναμενόμενη βελτίωση του κλινικού φαινότυπου, όπως είχε προταθεί στην αρχική υπόθεση των ερευνητών, ενώ συνοδεύτηκε από αρκετές ανεπιθύμητες ενέργειες. Δεδομένης λοιπόν της απουσίας σαφούς βελτίωσης στην αναπτυξιακή απόδοση των παιδιών με σύνδρομο Angelman, δεν κατέστη δυνατό να προταθούν οι συγκεκριμένοι διατροφικοί δότες μεθυλικών ομάδων ως δυνητικά θεραπευτικοί παράγοντες. Παρομοίως, μια παρέμβαση με συμπλήρωμα μικροθρεπτικών συστατικών στην διατροφή βρέθηκε πως δεν είχε ουσιαστική βιολογική επίδραση στη μεθυλίωση του DNA σε διάστημα χορήγησης 10 εβδομάδων, αν και αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στο σύντομο χρόνο έκθεσης των συμμετεχόντων στο διατροφικό συμπλήρωμα (198). Ωστόσο, το μέγεθος των αλλαγών που παρατηρήθηκαν στα επίπεδα μεθυλίωσης σε ολόκληρο το γονιδίωμα είναι πιθανό να μπορεί να αυξηθεί αναλογικά, εάν αυξηθεί αντίστοιχα και η περίοδος έκθεσης, κάτι που μπορεί να αποτελέσει αντικείμενο μελλοντικών ερευνών.

Πιο σημαντικά ήταν τα ευρήματα των μελετών που εξέτασαν τη μεθυλίωση του DNA ως νέο εργαλείο για την κατανόηση της επίδρασης της διατροφής στους φαινότυπους της παχυσαρκίας και του μεταβολικού συνδρόμου. Η μελέτη των Moleres και συν. ήταν η πρώτη η οποία υπολόγισε μία συνολική προδιαθεσική επιγενετική βαθμολογία για την παχυσαρκία. Τα αποτελέσματά της έδειξαν ότι το επιγενετικό προφίλ των ατόμων, το οποίο διαμορφώνεται σύμφωνα με το αθροιστικό επιγενετικό σκορ των διαφορεικά μεθυλιωμένων CpGs πριν την εφαρμογή της διατροφικής παρέμβασης μεταξύ συμμετεχόντων με χαμηλή ή υψηλή ανταπόκριση, μπορεί να προβλέψει την μείωση του ΔΜΣ και τη βελτίωση άλλων ανθρωπομετρικών μετρήσεων στο τέλος του προγράμματος (202). Συνεπώς, το επιγενετικό αυτό σκορ θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικό εργαλείο προκειμένου να προβλέψει την έκβαση ενός διεπιστημονικού προγράμματος αλλαγής τρόπου ζωής και διατροφικών συνηθειών με σκοπό την απώλεια βάρους.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασαν οι διαπιστώσεις των Yadan και συν. και McMorrow και συν., σύμφωνα με τις οποίες συγκεκριμένες διατροφικές παρεμβάσεις θα μπορούσαν να επηρεάσουν την εμφάνιση ΣΔ2 και παχυσαρκίας (206,208). Τα ευρήματα των McMorrow και συν. υποδήλωσαν ότι μια αντιφλεγμονώδης διατροφική παρέμβαση (AINS) μπορεί να επηρεάσει το επίπεδο μεθυλίωσης γονιδίων που εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία της παχυσαρκίας και υπογράμμισαν ότι η εφαρμογή πιο στρωματοποιημένων ή εξατομικευμένων διατροφικών προσεγγίσεων θα μπορούσε να ενισχύσει την αποτελεσματικότητα διατροφικών παρεμβάσεων που στοχεύουν στην προστασία από τον ΣΔ 2. Αυτό που μένει να αποδειχθεί σε μελλοντικές μελέτες είναι εάν αυτές οι αλλαγές στον επιγενετικό μηχανισμό της μεθυλίωσης του DNA προκαλούν ή είναι το αποτέλεσμα της φαινοτυπικής απάντησης στη θεραπευτική παρέμβαση. Σύμφωνα πάλι με τους Yadan και συν., η διατροφική χορήγηση συμπληρώματος βιταμίνης B12 (είτε αποκλειστικά είτε σε συνδυασμό με φυλλικό οξύ) επηρέασε τη ρύθμιση πολλών μεταβολικά σημαντικών γονιδίων που σχετίζονται με τον ΣΔ 2, όχι μόνο μέσω της διαφορεικής μεθυλίωσης των FTO και TCF7L2 γονιδίων αλλά και μέσω της υπερμεθυλίωσης μίας γενετικής περιοχής κοντά στον υποκινητή του miR21, παρέχοντας μία νέα επιγενετική εξήγηση για τη συσχέτιση μεταξύ του διαταραγμένου μεταβολισμού του άνθρακα 1 (C1) και του κινδύνου εμφάνισης παχυσαρκίας, αντίστασης στην ινσουλίνη και ΣΔ 2.

Παράλληλα, είναι γνωστό από πολυάριθμες μελέτες ότι ο τύπος και η ποσότητα του διατροφικά προσλαμβανόμενου λίπους επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τα μεταβολικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην εμφάνιση παχυσαρκίας, μεταβολικού συνδρόμου, ΣΔ 2 και καρδιαγγειακών παθήσεων. Αυτό όμως που δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως είναι το σε ποιο βαθμό εμπλέκεται στην διαδικασία αυτή ο επιγενετικός μηχανισμός της μεθυλίωσης. Τα ευρήματα των Voisin και συν. κατάφεραν να αναδείξουν ότι η ποιότητα του λίπους που προέρχεται από την διατροφή μπορεί να επηρεάσει τη

μεθυλίωση του DNA σε μεγάλη κλίμακα, καθώς η ανάλυση γονιδιακού εμπλουτισμού ταυτοποίησε την παρουσία σημαντικών σηματοδοτικών μονοπατιών για τις 3 αναλογίες διατροφικής πρόσληψης λιπαρών οξέων που μελετήθηκαν [PUFA/SFA, MUFA/SFA, (MUFA+PUFA)/SFA] (205).

Στην κλινική δοκιμή των Chen και συν. βρέθηκαν 3 CpG αλληλουχίες, που εδράζονται στα γονίδια LPCAT1 και RASA3 και των οποίων τα επίπεδα μεθυλίωσης είχαν σημαντική συσχέτιση με την διατροφική πρόσληψη φυτικών ινών. Βρέθηκε επίσης, ότι η μεθυλίωση δύο εκ των τριών αυτών CpG θέσεων σχετίζεται με την εναπόθεση σπλαγχνικού λίπους και την φλεγμονή. Συνεπώς, οι δύο από τις 4 πιο σημαντικά διαφορικά μεθυλιωμένες CpG δινουκλεοτιδικές αλληλουχίες φάνηκε να συσχετίζονται τόσο με την κατανάλωση φυτικών ινών από τη διατροφή όσο και με την ενεργοποίηση του φλεγμονώδους μηχανισμού και την σπλαγχνική εναπόθεση λίπους, με το εύρημα αυτό να υποδηλώνει ότι οι φυτικές ίνες της διατροφής μπορεί να επηρεάζουν έμμεσα τον επιγενετικό μηχανισμό της μεθυλίωσης του DNA (207). Μελλοντικές μελέτες απαιτούνται για να καθοριστεί εάν η επιγενετική ρύθμιση (μέσω της μεθυλίωσης συγκεκριμένων CpG θέσεων) αποτελεί την αιτιολογική βάση των ευνοϊκών επιδράσεων των φυτικών ινών στη φλεγμονή και την εναπόθεση λίπους στον οργανισμό.

Θετικός μπορεί να είναι ο επιγενετικός ρόλος της διατροφής και σε παιδιά με άσθμα, όπως διαπιστώθηκε από τους Montrose και συν. Εφόσον βρέθηκε ότι το σελήνιο και άλλα θρεπτικά συστατικά της διατροφής-δότες μεθυλίου, όπως η φωσφοχολίνη, η βηταΐνη και το φυλλικό οξύ συσχετίστηκαν θετικά με τη μέτρηση της ποιότητας ζωής του άσθματος, επιτυγχάνοντας μεγαλύτερες βαθμολογίες στο ερωτηματολόγιο PAQLQ, αυτό το εύρημα θα μπορούσε να είναι χρήσιμο στη σύσταση νέων πρωτοκόλλων για τη διαχείριση του παιδικού άσθματος στο μέλλον (209). Ωστόσο, παρά το γεγονός ότι αναδείχθηκαν θετικές συσχετίσεις μεταξύ των διάφορων θρεπτικών συστατικών που συμμετέχουν στον μεταβολισμό του άνθρακα 1 και του παιδιατρικού ερωτηματολογίου PAQLQ, δεν κατέστη εφικτό να αποδειχθεί σαφής συσχέτιση των πρώτων με τη βελτίωση των λειτουργικών δοκιμασιών των πνευμόνων, FEV1 και dPFV μέσα από αντικειμενικές μετρήσεις, όπως η σπιρομέτρηση.

Ολοκληρώνοντας με την πρώτη θεματική ενότητα, η μεθυλίωση του DNA έχει μελετηθεί και ως προς τη διερεύνηση της επίδρασης της παρεντερικής διατροφής κατά τη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας νοσηλείας σε παιδιατρικές ΜΕΘ σε βαρέως πάσχοντα παιδιά. Η μελέτη των Guiza και συν. επιβεβαίωσε ότι η χορήγηση πρώιμης παρεντερικής διατροφής και ειδικότερα, η δοσολογία των χορηγούμενων σε αυτή αμινοξέων συνέβαλε ανεξάρτητα στη διαφορική μεθυλίωση για 37 (23%) από τις 159 θέσεις CpG (οι οποίες βρέθηκαν διαφορικά μεθυλιωμένες ανάμεσα σε υγιή παιδιά και σε παιδιά που νοσηλεύτηκαν σε ΜΕΘΠ) (212). Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να

υποδηλώνει μια εύλογη μοριακή βάση για την αρνητική επίδραση της πρώιμης έναντι της όψιμης παρεντερικής διατροφής στη μακροπρόθεσμη νευρογνωστική ανάπτυξη των συμμετεχόντων μετά από διάστημα παρακολούθησης 2 ετών. Ωστόσο, η συγκεκριμένη έρευνα δεν κατάφερε να αποσαφηνίσει την ταχύτητα αυτών των αλλαγών στη μεθυλίωση του DNA, καθώς και του τρόπου με τον οποίο εξελίσσονται με την πάροδο του χρόνου στη ΜΕΘΠ, εάν δηλαδή πρόκειται για μεταβολές μόνιμες ή αναστρέψιμες. Σε μια επόμενη μελέτη διαπιστώθηκε ότι υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στο μεγαλύτερο χρόνο παραμονής στη μονάδα και στην διατήρηση ή επιδείνωση των τροποποιήσεων της μεθυλίωσης του DNA (213). Από τις διαφορετικά μεθυλιωμένες θέσεις CpG που επηρεάστηκαν από την πρώιμη παρεντερική διατροφή έναντι της όψιμης κατά την ημέρα εξόδου από την Μονάδα Εντατικής Θεραπείας, το 38,9% μεθυλιώθηκε διαφορετικά ήδη από την ημέρα 3, το 25% την ημέρα 5 και το 13,9% την ημέρα 7. Οι μεταβολές, δηλαδή, στα επίπεδα μεθυλίωσης του DNA που προκλήθηκαν από τη χορήγηση πρώιμης παρεντερικής διατροφής εμφανίστηκαν σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα, κυρίως εντός των πρώτων ημερών από την εισαγωγή σε ΜΕΘΠ και οι περισσότερες από αυτές είτε διατηρήθηκαν- τουλάχιστον εν μέρει- είτε επιδεινώθηκαν κατά την 1η εβδομάδα νοσηλείας. Σε ασθενείς που έλαβαν καθυστερημένη παρεντερική διατροφή, η κατάσταση μεθυλίωσης του DNA παρέμεινε σχετικά σταθερή με λιγότερο εμφανείς αλλαγές, ενώ τα χρονο-εξαρτώμενα πρότυπα παρατηρήθηκαν κυρίως στους ασθενείς στους οποίους χορηγήθηκε πρώιμη παρεντερική διατροφή. Σημαντική ήταν η πρόταση των ερευνητών ότι σε μελλοντικές παρεμβάσεις που θα στοχεύουν στην άμβλυση των τροποποιήσεων της μεθυλίωσης του DNA, θα είναι χρήσιμο αυτές να ξεκινούν από νωρίς κατά τη νοσηλεία στη ΜΕΘ. Τέλος, στην επόμενη προσχεδιασμένη υποανάλυση της κλινικής δοκιμής PEPaNIC, οι Jacobs και συν. επιχείρησαν να εξετάσουν εάν η διαφορετική μεθυλίωση των 37 θέσεων CpG που παρατηρήθηκε μεταξύ της ημέρας εισαγωγής και της ημέρας εξόδου από τη ΜΕΘΠ, η οποία είχε βρεθεί ότι οφείλεται στην πρώιμη έναρξη παρεντερικής διατροφής, θα μπορούσε να εξηγήσει τον αρνητικό αντίκτυπο της πρώιμης παρεντερικής διατροφής στο συναίσθημα και τη συμπεριφορά των συμμετεχόντων μετά από 4 χρόνια παρακολούθησης (215). Οι ερευνητές βρήκαν ότι μεγάλος αριθμός αυτών των διαφορετικά μεθυλιωμένων CpG θέσεων εδράζονται σε γονίδια εμπλεκόμενα σε μονοπάτια που ρυθμίζουν την διαμόρφωση των γνωστικών λειτουργιών, της διάθεσης, του συναισθήματος και της συμπεριφοράς. Κατάφεραν με αυτό τον τρόπο να εξηγήσουν πως η διαφορετική μεθυλίωση αυτών των CpGs μπορεί να αποτελεί την αιτιολογική βάση για την επιβλαβή επίδραση της πρώιμης παρεντερικής διατροφής στις μακροπρόθεσμες διαταραχές του συναισθήματος και της συμπεριφοράς 4 χρόνια αργότερα. Μάλιστα, πολλές από αυτές τις CpG αλληλουχίες βρέθηκε πως ήταν ίδιες με αυτές που ευθύνονταν για την επιδείνωση της νευρογνωστικής ανάπτυξης των παιδιών στην μελέτη των Guiza και συν. στο διετές follow-up τους (212).

Στη δεύτερη θεματική ενότητα των αποτελεσμάτων της παρούσας ανασκόπησης εντάχθηκαν δύο μελέτες. Από την πρώτη, διαπιστώθηκε ότι δεν σημειώθηκε επιγενετική επίδραση από την κατανάλωση χυμού κόκκινου σταφυλιού, γιατί παρά το γεγονός ότι η κατάσταση της συνολικής υπομεθυλίωσης της ιστόνης H4 που παρατηρήθηκε στην ομάδα ελέγχου φάνηκε πως συνέβαλε στη σίγαση γονιδίων που εμπλέκονται στην παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών, παρατηρήθηκε πως ο βιοδείκτης αυτός ήταν ευαίσθητος μόνο σε αλλαγές που σχετίζονται με την σωματική δραστηριότητα και όχι με την κατανάλωση ροφημάτων πλούσιων σε αντιοξειδωτικά και υδατάνθρακες (ομάδες χυμού σταφυλιού και placebo). Η μείωση της υπεροξειδωσης των λιπιδίων και της καταστροφής του DNA μετά από αγώνα πετοσφαίρισης ήταν πιο σημαντικά ευρήματα (216). Τέλος, ο συνδυασμός άσκησης και ισορροπημένης διατροφής φάνηκε ότι μπορεί να είναι πιο αποτελεσματικός ανάλογα με το χρονικό διάστημα και το βαθμό συμμόρφωσης στις θεραπευτικές παρεμβάσεις, όπως ανέδειξαν τα ευρήματα της δεύτερης μελέτης των Gallardo-Escribano και συν. (219). Σε κάθε περίπτωση, οι συσχετισμοί μεταξύ των επιπέδων μεθυλίωσης συγκεκριμένων γονιδίων που εμπλέκονται στον μεταβολισμό των λιπιδίων και τον μηχανισμό της φλεγμονής και του ΔΜΣ, του ομοιοστατικού μοντέλου αξιολόγησης της αντίστασης στην ινσουλίνη (HOMA-IR), της πρόσληψης μονοακόρεστων και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, της μέτριας ή έντονης φυσικής δραστηριότητας, της ποσότητας σπλαγχνικού λίπους και της υιοθέτησης της ΜΔ ήταν ισχυροί, γεγονός που αναδεικνύει ότι ο επιγενετικός ρόλος της διατροφής μπορεί να μεγιστοποιηθεί, όταν αυτή συνδυάζεται με πρόγραμμα αθλητικής δραστηριότητας. Εξαιρετικά ουσιαστικό εύρημα της μελέτης αυτής είναι πως το προφίλ μεθυλίωσης των ατόμων μπορεί να τροποποιηθεί ήδη από την παιδική τους ηλικία μέσα από παρεμβάσεις που βασίζονται στην εφαρμογή ενός υγιεινού προτύπου διατροφής-της ΜΔ- και άθλησης. Αυτό σημαίνει πως η υιοθέτηση ενός υγιεινού τρόπου ζωής σε ολόκληρο το ηλικιακό φάσμα του πληθυσμού, από την παιδική έως τη μεγάλη ηλικία, είναι πολύ κρίσιμη για τη Δημόσια Υγεία, γιατί εξασφαλίζει πως οι επιγενετικές τροποποιήσεις που συμβαίνουν στο ανθρώπινο DNA δεν θα οδηγήσουν σε μοριακές διαδικασίες και παθολογίες που είναι άρρηκτα συνυφασμένες με την ανάπτυξη αντίστασης στην ινσουλίνη, δυσλιπιδαιμίας, υπέρτασης, αγγειακής δυσλειτουργίας και καρδιαγγειακών παθήσεων.

Περιορισμοί της μελέτης

Η συγκεκριμένη μελέτη, παρά το γεγονός ότι αποτελεί την πρώτη συστηματική ανασκόπηση για τον ρόλο του συνόλου των συστατικών που προέρχονται από την διατροφή στην διαμόρφωση και τροποποίηση των επιγενετικών μηχανισμών σε παιδιά και εφήβους, δεν στερείται ορισμένων περιορισμών. Ο κυριότερος ανάμεσά τους είναι ο μικρός σχετικά αριθμός πρωτογενών μελετών που έχουν

πραγματοποιηθεί στις ηλικιακές ομάδες των παιδιών και των εφήβων, καθώς οι περισσότερες από τις μελέτες που πραγματεύονται την επιγενετική επίδραση της διατροφής είναι διαγενεακές μελέτες, που εξετάζουν τον ρόλο της διατροφής της μητέρας κατά τη διάρκεια της κύησης και της πρώιμης μεταγεννητικής περιόδου στη ρύθμιση των επιγενετικών μηχανισμών των απογόνων κατά τη νεογνική και βρεφική ηλικία. Παράλληλα, σχεδόν σε όλες τις μελέτες παρέμβασης που συμπεριλήφθηκαν στην ανασκόπηση η διάρκεια πραγματοποίησης των παρεμβάσεων ήταν μικρή, γεγονός που θα μπορούσε να έχει επηρεάσει την αξιοπιστία τους, κυρίως επειδή στην πλειοψηφία τους οι επιγενετικές αλλαγές σχετίζονται με μακροπρόθεσμη έκθεση σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η διατροφή. Τέλος, στις περισσότερες μελέτες παρατήρησης, αλλά και παρέμβασης, τα δείγματα των συμμετεχόντων ήταν μικρά, γεγονός που ελαττώνει την στατιστική τους σημαντικότητα, γι' αυτό και τα ευρήματά τους οφείλουν να ερμηνεύονται με ιδιαίτερη προσοχή.

Κεφάλαιο 13.

Συμπεράσματα

Για πολλές δεκαετίες στο παρελθόν και δεδομένων των τεράστιων κοινωνικών και οικονομικών ανισοτήτων μεταξύ των αναπτυγμένων και των αναπτυσσόμενων χωρών, το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας σχετικά με την διατροφή και τον ρόλο της στην υγεία και την πρόληψη της ασθένειας εστιαζόταν αποκλειστικά στην κάλυψη των θερμιδικών αναγκών και στην παροχή ικανοποιητικής ποσότητας θρεπτικών συστατικών στους πληθυσμούς ανά τον κόσμο. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια αδιαμφισβήτητο είναι πλέον το γεγονός πως η διατροφή συνιστά έναν τροποποιήσιμο παράγοντα κινδύνου, ο οποίος εμφανίζει σημαντικές αλληλεπιδράσεις τόσο με το γονιδίωμα όσο και με το επιγονιδίωμα των ατόμων όλων των ηλικιακών ομάδων και ως αποτέλεσμα, επηρεάζει τόσο την κατάσταση της υγείας τους όσο και την ποιότητα της ζωής τους (24). Η αλληλεπίδραση της γενετικής πληροφορίας, η οποία μεταφέρεται μέσω των γονιδίων, και ορισμένων βιοενεργών μακρο- και μικρο- θρεπτικών συστατικών, τα οποία περιέχονται στα καταναλισκόμενα τρόφιμα, είναι μία συνεχιζόμενη και δυναμική διαδικασία. Με άλλα λόγια, το σύνολο των γονιδίων ενός οργανισμού σχετίζεται και αλληλεπιδρά άμεσα με την διατροφή του, καθώς από την μία πλευρά επηρεάζει την απορρόφηση, τον μεταβολισμό, την μεταφορά, την ανακατανομή, τον μηχανισμό και τον τόπο δράσης των διατροφικών συστατικών, ενώ από την άλλη το ίδιο το γονιδίωμα επηρεάζεται από τις διατροφικές επιλογές του ατόμου, καθώς οι τροφές που καταναλώνονται μπορούν να μεταβάλλουν τη γονιδιακή λειτουργία, ενεργοποιώντας ή αποσιωπώντας συγκεκριμένα γονίδια ή γονιδιακούς τόπους και μεταβάλλοντας τη δομή ήδη μεταφρασμένων πρωτεϊνών. Νέοι επιστημονικοί κλάδοι, όπως οι επιστήμες της Διατροφογενετικής, της Διατροφογενωμικής, της Πρωτεωμικής, της Μεταβολωμικής, αλλά και της Ιατρικής της Ακριβείας, έχουν κάνει την εμφάνισή τους τις τελευταίες δεκαετίες μέσα από τους τομείς της Βιολογίας και της Γενετικής, προκειμένου να μελετήσουν την έκφραση πολυάριθμων γονιδίων σε μεγάλη κλίμακα, να αναλύσουν τη δομή του πρωτεώματος και να προβούν σε μετρήσεις των ενδογενών μεταβολικών προϊόντων ενός οργανισμού, αναδεικνύοντας τελικά την κρίσιμη συσχέτισή τους με την διατροφή και την υγεία ή την ασθένεια. Μάλιστα, ο όρος εξατομικευμένη διατροφή έχει αρχίσει να κερδίζει ολοένα και περισσότερο έδαφος στους επιστημονικούς αυτούς κλάδους, με σκοπό να οδηγήσει σε μία διατροφική προσέγγιση για την πρόληψη της παχυσαρκίας ή την θεραπεία νοσημάτων, η οποία θα καθορίζεται από το γονιδίωμα του κάθε οργανισμού ξεχωριστά.

Παράλληλα, δεδομένου ότι η εφηβεία αποτελεί μία εξαιρετικά κρίσιμη φάση στην εξέλιξη κάθε οργανισμού, καθώς είναι η περίοδος κατά την οποία διαμορφώνονται μεταξύ άλλων οι διατροφικές του συνήθειες και αναπτύσσονται αρκετοί παράγοντες

κινδύνου που καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό την εμφάνιση ή μη παχυσαρκίας, ΣΔ2, μεταβολικού συνδρόμου, καρδιαγγειακών παθήσεων, διάφορων τύπων καρκίνου και άλλων χρόνιων νοσημάτων, από επιγενετικής άποψης η περίοδος αυτή συνιστά ένα εξαιρετικά κρίσιμο χρονικό παράθυρο, στο οποίο οι περιβαλλοντικές επιρροές αλληλεπιδρούν με το γονιδίωμα και ρυθμίζουν την έκφραση ή αποσιώπηση μεταβολικά σημαντικών γονιδίων και σηματοδοτικών μονοπατιών. Για τον λόγο αυτό, πολύ ουσιαστικό εύρημα της παρούσας μελέτης συνιστά το γεγονός ότι το προφίλ μεθυλίωσης των ατόμων μπορεί να τροποποιηθεί ήδη από την παιδική τους ηλικία μέσα από παρεμβάσεις που βασίζονται στην εφαρμογή ενός υγιεινού προτύπου διατροφής- της ΜΔ- και άθλησης. Αυτό επαληθεύει την ήδη κεκτημένη γνώση πως η υιοθέτηση ενός υγιεινού τρόπου ζωής σε ολόκληρο το ηλικιακό φάσμα του πληθυσμού είναι πολύ κρίσιμη για τη Δημόσια Υγεία, γιατί εξασφαλίζει πως οι επιγενετικές τροποποιήσεις που συμβαίνουν στο ανθρώπινο DNA δεν θα οδηγήσουν σε μοριακές διαδικασίες και παθολογίες που είναι άρρηκτα συνυφασμένες με την ανάπτυξη αντίστασης στην ινσουλίνη, δυσλιπιδαιμία, υπέρτασης, αγγειακής δυσλειτουργίας και καρδιαγγειακών παθήσεων. Υπό αυτό το πρίσμα λοιπόν, η γνώση και κατανόηση της σύνθετης αλληλεπίδρασης των επιγενετικών μηχανισμών και των τροφίμων μπορεί να οδηγήσει στην εφαρμογή εξατομικευμένων προγραμμάτων διατροφής, δίνοντας νέα πνοή και στον τομέα της πρόληψης, της διάγνωσης και της θεραπείας ασθενειών που υποβαθμίζουν το επίπεδο υγείας και την ποιότητα ζωής των πληθυσμών και ιδιαίτερα των ηλικιακών ομάδων των παιδιών και των εφήβων.

Συμπερασματικά, πολύ σημαντικά είναι τα αποτελέσματα των 14 πρωτογενών μελετών, οι οποίες ασχολήθηκαν με τους επιγενετικούς μηχανισμούς ως εργαλεία πρόβλεψης της ανταπόκρισης των συμμετεχόντων στις διατροφικές παρέμβασεις και οι οποίες ανέδειξαν ότι το επιγενετικό προφίλ των ατόμων διαμορφώνεται σύμφωνα με ένα αθροιστικό επιγενετικό σκορ βασισμένο στις διαφορικά μεθυλιωμένες CpGs αλληλουχίες. Τέλος, στις περισσότερες από τις πρωτογενείς μελέτες που συμπεριλήφθηκαν στην παρούσα ανασκόπηση, η χορήγηση διατροφικών συμπληρωμάτων πλούσιων σε συστατικά - δότες μεθυλικών ομάδων δεν κατόρθωσε να επιφέρει σοβαρή βελτίωση του φαινότυπου των ασθενειών για τις οποίες χρησιμοποιήθηκε μέσα από αντικειμενικές μετρήσεις και παρατηρήσεις. Παρ' όλα αυτά η τάση βελτίωσης που παρατηρήθηκε σε ορισμένες από τις παραμέτρους που αξιολογήθηκαν - κυρίως σε κλίμακες υποκειμενικής εκτίμησης, αλλά και το μέγεθος των αλλαγών που σημειώθηκαν στα συνολικά επίπεδα μεθυλίωσης σε ολόκληρο το γονιδίωμα, θα μπορούσαν να αποτελέσουν το έναυσμα για την διενέργεια νέων μελετών.

Προτάσεις

Για να διερευνηθεί περαιτέρω η επιγενετική επίδραση της διατροφής στην υγεία των παιδιών και των εφήβων σκόπιμη θεωρείται η διενέργεια περισσότερων μελετών που θα εστιάζουν στο συγκεκριμένο θέμα. Αντικείμενο των μελλοντικών ερευνών θα μπορούσε να αποτελέσει είτε η μεγαλύτερη περίοδος έκθεσης των συμμετεχόντων στις διατροφικές παρεμβάσεις είτε η χρησιμοποίηση περισσότερων και ισχυρότερων δοτών μεθυλικών ομάδων, που θα προάγουν τα ολικά επίπεδα μεθυλίωσης του DNA. Με τον τρόπο αυτό θα καταστεί δυνατό να καθοριστεί εάν η ρύθμιση των επιγενετικών μηχανισμών (κυρίως μέσω της μεθυλίωσης συγκεκριμένων CpG θέσεων) είναι η κύρια αιτιολογική βάση για τις ευνοϊκές επιδράσεις που έχει φανεί πως έχουν τα διάφορα διατροφικά συστατικά στους μηχανισμούς της φλεγμονής, της εναπόθεσης λίπους στον οργανισμό και της εμφάνισης παχυσαρκίας, ΣΔ2 και καρδιαγγειακών νοσημάτων. Παράλληλα, προτείνονται περισσότερες κλινικές δοκιμές σε παιδιά και εφήβους, προκειμένου να μελετηθεί ο ρόλος της διατροφής κατά την παιδική κι εφηβική ηλικία τόσο όσον αφορά στις ιστονικές τροποποιήσεις όσο και στα μη- κωδικοποιούντα RNAs, καθώς οι δύο αυτοί μηχανισμοί δεν έχουν ερευνηθεί σε βάθος, συγκριτικά με τη διαδικασία μεθυλίωσης του DNA. Έτσι θα μπορούσαν να προκύψουν ακριβέστερα αποτελέσματα για την αλληλεπίδραση των διατροφικών παρεμβάσεων και των 3 βασικών επιγενετικών μηχανισμών

Επίσης, η συνολική επιγενετική βαθμολογία θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικό εργαλείο προκειμένου να προβλέψει την έκβαση διεπιστημονικών προγραμμάτων αλλαγής τρόπου ζωής και διατροφικών συνηθειών, με σκοπό όχι μόνο την απώλεια βάρους και την πρόληψη της εμφάνισης παχυσαρκίας και του ΣΔ2-όπως ήδη εξετάστηκε σε 2 από τις μελέτες, αλλά και στην αποτελεσματικότερη διαχείριση και άλλων χρόνιων φλεγμονωδών- μη μεταδοτικών νοσημάτων.

Τέλος, προτείνεται η οργάνωση προγραμμάτων αγωγής υγείας και διατροφής που στόχο θα έχουν την βελτίωση της ποιότητας ζωής και του επιπέδου υγείας των παιδιών και των εφήβων και που θα είναι βασισμένα στις αρχές της πρόληψης και τροποποίησης των συμπεριφορών που σχετίζονται με την υγεία και την πρόληψη της ασθένειας. Τα προγράμματα αυτά μπορούν να ξεκινήσουν μέσα από παρεμβάσεις σε σχολεία με σκοπό τη διεύρυνση των γνώσεων των μαθητών σχετικά με τα επιμέρους διατροφικά συστατικά, τα υγιεινά διαιτητικά πρότυπα, την αλληλεπίδρασή τους με το γονιδίωμα και το επιγονιδίωμα, αλλά και με τον σπουδαίο ρόλο της σωματικής δραστηριότητας στην ρύθμιση των επιγενετικών μηχανισμών και συνεπώς στην έκφραση ποικίλων γονιδίων και γονιδιακών μονοπατιών με στόχο την βελτίωση των στάσεων και των συμπεριφορών τους σχετικά με τη διατροφή και τη σωματική δραστηριότητα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Koloverou E, Esposito K, Giugliano D, Panagiotakos D. The effect of Mediterranean diet on the development of type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of 10 prospective studies and 136,846 participants. *Metabolism*. 2014 Jul;63(7):903–11.
2. Psaltopoulou T, Sergentanis TN, Panagiotakos DB, Sergentanis IN, Kosti R, Scarmeas N. Mediterranean diet, stroke, cognitive impairment, and depression: A meta-analysis. *Ann Neurol*. 2013 Oct;74(4):580–91.
3. Kussmann M, Raymond F, Affolter M. OMICS-driven biomarker discovery in nutrition and health. *J Biotechnol*. 2006 Aug 5;124(4):758–87.
4. Kussmann M, Affolter M. Proteomics at the center of nutrigenomics: comprehensive molecular understanding of dietary health effects. *Nutrition*. 2009 Dec;25(11–12):1085–93.
5. Zhang L, Lu Q, Chang C. Epigenetics in Health and Disease. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1253:3–55.
6. Lillycrop KA, Burdge GC. Environmental challenge, epigenetic plasticity and the induction of altered phenotypes in mammals. *Epigenomics*. 2014;6(6):623–36.
7. Torres N, Martinez-Lopez E, Vizmanos-Lamotte B, Garaulet M. Healthy Obese Subjects Differ in Chronotype, Sleep Habits, and Adipose Tissue Fatty Acid Composition from Their Non-Healthy Counterparts. *Nutrients*. 2020 Sep 31;13:119.
8. Godfrey KM, Barker DJ. Fetal programming and adult health. *Public Health Nutr*. 2001 Apr;4(2B):611–24.
9. Franzago M, Santurbano D, Vitacolonna E, Stuppia L. Genes and Diet in the Prevention of Chronic Diseases in Future Generations. *Int J Mol Sci*. 2020 Apr 10;21(7):E2633.
10. Christ A, Lauterbach M, Latz E. Western Diet and the Immune System: An Inflammatory Connection. *Immunity*. 2019 Nov 19;51(5):794–811.
11. Di Daniele N. The Role of Preventive Nutrition in Chronic Non-Communicable Diseases. *Nutrients*. 2019 Dec 15;11(5):E1074.
12. Vassilakou T. Childhood Malnutrition: Time for Action. *Children*. 2021 Feb;8(2):103.
13. Ramallal R, Toledo E, Martínez JA, Shivappa N, Hébert JR, Martínez-González MA, et al. Inflammatory potential of diet, weight gain, and incidence of overweight/obesity: The SUN cohort. *Obesity (Silver Spring)*. 2017 Jun;25(6):997–1005.
14. World Health Organization. Obesity and Overweight. [Internet]. Available from: Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (accessed on 12 March 2019)
15. Serdula MK, Ivery D, Coates RJ, Freedman DS, Williamson DF, Byers T. Do obese children become obese adults? A review of the literature. *Prev Med*. 1993 Mar;22(2):167–77.

16. Di Daniele N, Noce A, Vidiri MF, Moriconi E, Marrone G, Annicchiarico-Petruzzelli M, et al. Impact of Mediterranean diet on metabolic syndrome, cancer and longevity. *Oncotarget*. 2016 Nov 24;8(5):8947–79.
17. Kansra AR, Lakkunarajah S, Jay MS. Childhood and Adolescent Obesity: A Review. *Front Pediatr*. 2021 Jan 12;8:581461.
18. Kerr J, Anderson C, Lippman SM. Physical activity, sedentary behaviour, diet, and cancer: an update and emerging new evidence. *Lancet Oncol*. 2017 Aug;18(8):e457–71.
19. UNESCO. Representative List of the Intangible Cultural Heritage of Humanity. [Internet]. Available from: Available online: www.unesco.org/culture/ich/en/RL/00394 (accessed on 12 march 2019).
20. Keys A, Menotti A, Karvonen MJ, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, et al. The diet and 15-year death rate in the seven countries study. *Am J Epidemiol*. 1986 Dec;124(6):903–15.
21. Trichopoulou A, Kouris-Blazos A, Wahlqvist ML, Gnardellis C, Lagiou P, Polychronopoulos E, et al. Diet and overall survival in elderly people. *BMJ*. 1995 Dec 2;311(7018):1457–60.
22. Milagro FI, Mansego ML, De Miguel C, Martínez JA. Dietary factors, epigenetic modifications and obesity outcomes: progresses and perspectives. *Mol Aspects Med*. 2013 Aug;34(4):782–812.
23. Birnbaum HG, Mattson ME, Kashima S, Williamson TE. Prevalence rates and costs of metabolic syndrome and associated risk factors using employees' integrated laboratory data and health care claims. *J Occup Environ Med*. 2011 Jan;53(1):27–33.
24. Junien C. Impact of diets and nutrients/drugs on early epigenetic programming. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2006;29(2–3):359–65.
25. Holliday R. Epigenetics: a historical overview. *Epigenetics*. 2006 Jun;1(2):76–80.
26. Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, et al. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *PNAS*. 2005 Jul 26;102(30):10604–9.
27. Javierre BM, Fernandez AF, Richter J, Al-Shahrour F, Martin-Subero JI, Rodriguez-Ubreva J, et al. Changes in the pattern of DNA methylation associate with twin discordance in systemic lupus erythematosus. *Genome Res*. 2010 Jan 2;20(2):170–9.
28. Esteller M. Epigenetics in evolution and disease. *The Lancet*. 2008 Dec 1;372:S90–6.
29. Dupont C, Armant DR, Brenner CA. Epigenetics: Definition, Mechanisms and Clinical Perspective. *Semin Reprod Med*. 2009 Sep;27(5):351–7.
30. Moosavi A, Motevalizadeh Ardekani A. Role of Epigenetics in Biology and Human Diseases. *Iran Biomed J*. 2016 Nov;20(5):246–58.

31. Hotchkiss RD. The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography. *J Biol Chem.* 1948 Aug;175(1):315–32.
32. Griffith JS, Mahler HR. DNA ticketing theory of memory. *Nature.* 1969 Aug 9;223(5206):580–2.
33. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 2002 Jan 1;16(1):6–21.
34. Holliday R, Pugh JE. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science.* 1975 Jan 24;187(4173):226–32.
35. Riggs AD. X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet Cell Genet.* 1975;14(1):9–25.
36. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol.* 2010 Oct;28(10):1057–68.
37. Meissner A, Mikkelsen TS, Gu H, Wernig M, Hanna J, Sivachenko A, et al. Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature.* 2008 Aug;454(7205):766–70.
38. Zhang W, Song M, Qu J, Liu GH. Epigenetic Modifications in Cardiovascular Aging and Diseases. *Circ Res.* 2018 Sep 14;123(7):773–86.
39. Tiffon C. The Impact of Nutrition and Environmental Epigenetics on Human Health and Disease. *Int J Mol Sci.* 2018 Nov 1;19(11):E3425.
40. Kaminsky ZA, Tang T, Wang SC, Ptak C, Oh GHT, Wong AHC, et al. DNA methylation profiles in monozygotic and dizygotic twins. *Nat Genet.* 2009 Feb;41(2):240–5.
41. Chung FFL, Herceg Z. The Promises and Challenges of Toxic-Epigenomics: Environmental Chemicals and Their Impacts on the Epigenome. *Environ Health Perspect.* 2020 Jan;128(1):15001.
42. Oestreich AK, Moley KH. Developmental and Transmittable Origins of Obesity-Associated Health Disorders. *Trends Genet.* 2017 Jun;33(6):399–407.
43. Coccozza S, Akhtar MM, Miele G, Monticelli A. CpG islands undermethylation in human genomic regions under selective pressure. *PLoS One.* 2011;6(8):e23156.
44. Lister R, Ecker JR. Finding the fifth base: genome-wide sequencing of cytosine methylation. *Genome Res.* 2009 Jun;19(6):959–66.
45. Singal R, Ginder GD. DNA methylation. *Blood.* 1999 Jun 15;93(12):4059–70.
46. Ratel D, Ravanat JL, Berger F, Wion D. N6-methyladenine: the other methylated base of DNA. *Bioessays.* 2006 Mar;28(3):309–15.
47. Woodcock DM, Crowther PJ, Diver WP. The majority of methylated deoxycytidines in human DNA are not in the CpG dinucleotide. *Biochem Biophys Res Commun.* 1987 Jun 15;145(2):888–94.

48. Nyce J, Liu L, Jones PA. Variable effects of DNA-synthesis inhibitors upon DNA methylation in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 1986 Dec 27;14(10):4353–67.
49. Sinsheimer RL. The action of pancreatic deoxyribonuclease. II. Isomeric dinucleotides. *J Biol Chem.* 1955 Aug;215(2):579–83.
50. Smith SS, Kaplan BE, Sowers LC, Newman EM. Mechanism of human methyl-directed DNA methyltransferase and the fidelity of cytosine methylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Dec 15;89(10):4744–8.
51. Gowher H, Jeltsch A. Enzymatic properties of recombinant Dnmt3a DNA methyltransferase from mouse: the enzyme modifies DNA in a non-processive manner and also methylates non-CpG [correction of non-CpA] sites. *J Mol Biol.* 2001 Jun 22;309(5):1201–8.
52. Niculescu MD, Zeisel SH. Diet, methyl donors and DNA methylation: interactions between dietary folate, methionine and choline. *J Nutr.* 2002 Aug;132(8 Suppl):2333S-2335S.
53. Valinluck V, Tsai HH, Rogstad DK, Burdzy A, Bird A, Sowers LC. Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2). *Nucleic Acids Res.* 2004;32(14):4100–8.
54. Meehan RR, Lewis JD, Bird AP. Characterization of MeCP2, a vertebrate DNA binding protein with affinity for methylated DNA. *Nucleic Acids Res.* 1992 Oct 11;20(19):5085–92.
55. Ciechomska M, Roszkowski L, Maslinski W. DNA Methylation as a Future Therapeutic and Diagnostic Target in Rheumatoid Arthritis. *Cells.* 2019 Sep;8(9):953.
56. Liu L, Wylie RC, Andrews LG, Tollefsbol TO. Aging, cancer and nutrition: the DNA methylation connection. *Mech Ageing Dev.* 2003 Dec;124(10–12):989–98.
57. Lepeule J, Baccarelli A, Tarantini L, Motta V, Cantone L, Litonjua AA, et al. Gene promoter methylation is associated with lung function in the elderly. *Epigenetics.* 2012 Mar;7(3):261–9.
58. Issa JP, Vertino PM, Wu J, Sazawal S, Celano P, Nelkin BD, et al. Increased cytosine DNA-methyltransferase activity during colon cancer progression. *J Natl Cancer Inst.* 1993 Aug 4;85(15):1235–40.
59. Laird PW, Jackson-Grusby L, Fazeli A, Dickinson SL, Jung WE, Li E, et al. Suppression of intestinal neoplasia by DNA hypomethylation. *Cell.* 1995 Apr 21;81(2):197–205.
60. Kautiainen TL, Jones PA. DNA methyltransferase levels in tumorigenic and nontumorigenic cells in culture. *J Biol Chem.* 1986 Feb 5;261(4):1594–8.
61. Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res.* 1998;72:141–96.
62. Huang B, Jiang C, Zhang R. Epigenetics: the language of the cell? *Epigenomics.* 2014 Feb;6(1):73–88.

63. Gama-Sosa MA, Slagel VA, Trewyn RW, Oxenhandler R, Kuo KC, Gehrke CW, et al. The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. *Nucleic Acids Res.* 1983 Oct 11;11(19):6883–94.
64. Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet.* 2007 Apr;8(4):286–98.
65. Kornberg RD. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science.* 1974 Dec 24;184(4139):868–71.
66. Margueron R, Reinberg D. Chromatin structure and the inheritance of epigenetic information. *Nat Rev Genet.* 2010 Apr;11(4):285–96.
67. Shahbazian MD, Grunstein M. Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu Rev Biochem.* 2007;76:75–100.
68. Sims RJ, Nishioka K, Reinberg D. Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends Genet.* 2003 Nov;19(11):629–39.
69. Marmorstein R, Trievel RC. Histone modifying enzymes: structures, mechanisms, and specificities. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Jan;1789(1):58–68.
70. Tagami H, Ray-Gallet D, Almouzni G, Nakatani Y. Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell.* 2004 Jan 9;116(1):51–61.
71. Henikoff S, Furuyama T, Ahmad K. Histone variants, nucleosome assembly and epigenetic inheritance. *Trends Genet.* 2004 Jul;20(7):320–6.
72. Alberts B, editor. *Molecular biology of the cell.* 4th ed. New York: Garland Science; 2002. 1548 p.
73. Lunter G, Ponting CP, Hein J. Genome-wide identification of human functional DNA using a neutral indel model. *PLoS Comput Biol.* 2006 Jan;2(1):e5.
74. Dunham I, Kundaje A, Aldred SF, Collins PJ, Davis CA, Doyle F, et al. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature.* 2012 Sep;489(7414):57–74.
75. Wright MW, Bruford EA. Naming “junk”: Human non-protein coding RNA (ncRNA) gene nomenclature. *Hum Genomics.* 2011 Jan 1;5(2):90–8.
76. Gaiti F, Calcino AD, Tanurdžić M, Degnan BM. Origin and evolution of the metazoan non-coding regulatory genome. *Dev Biol.* 2017 Jul 15;427(2):193–202.
77. Lei Q, Li C, Zuo Z, Huang C, Cheng H, Zhou R. Evolutionary Insights into RNA trans-splicing in Vertebrates. *Genome Biology and Evolution.* 2016 Mar 1;8(3):562–77.
78. Wei JW, Huang K, Yang C, Kang CS. Non-coding RNAs as regulators in epigenetics (Review). *Oncology Reports.* 2017 Jan 1;37(1):3–9.
79. Yao Q, Chen Y, Zhou X. The roles of microRNAs in epigenetic regulation. *Current Opinion in Chemical Biology.* 2019 Aug 1;51:11–7.

80. Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*. 2010 Aug 12;466(7308):835–40.
81. Ouyang Y, Mouillet JF, Coyne CB, Sadovsky Y. Review: placenta-specific microRNAs in exosomes - good things come in nano-packages. *Placenta*. 2014 Feb;35 Suppl:S69-73.
82. Selbach M, Schwanhäusser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*. 2008 Sep;455(7209):58–63.
83. Lim LP, Lau NC, Garrett-Engle P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*. 2005 Feb 17;433(7027):769–73.
84. Valinezhad Orang A, Safaralizadeh R, Kazemzadeh-Bavili M. Mechanisms of miRNA-Mediated Gene Regulation from Common Downregulation to mRNA-Specific Upregulation. *Int J Genomics*. 2014;2014:970607.
85. Mendell JT, Olson EN. MicroRNAs in stress signaling and human disease. *Cell*. 2012 Mar 16;148(6):1172–87.
86. Wu B, Miller D. Involvement of MicroRNAs in Diabetes and Its Complications. *Methods Mol Biol*. 2017 Jan 1;1617:225–39.
87. Ouimet M, Ediriweera H, Afonso MS, Ramkhelawon B, Singaravelu R, Liao X, et al. microRNA-33 Regulates Macrophage Autophagy in Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2017 Jun;37(6):1058–67.
88. Krek A, Grün D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, et al. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet*. 2005 Dec;37(5):495–500.
89. Rajewsky N. microRNA target predictions in animals. *Nat Genet*. 2006 Jun;38 Suppl:S8-13.
90. Al-Hayali MA, Sozer V, Durmus S, Erdenen F, Altunoglu E, Gelisgen R, et al. Clinical Value of Circulating Microribonucleic Acids miR-1 and miR-21 in Evaluating the Diagnosis of Acute Heart Failure in Asymptomatic Type 2 Diabetic Patients. *Biomolecules*. 2019 May 17;9(5):E193.
91. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Nov 26;99(24):15524–9.
92. Chuang JC, Jones PA. Epigenetics and MicroRNAs. *Pediatr Res*. 2007 May;61(7):24–9.
93. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res*. 2005 Jul 15;65(14):6029–33.
94. Kwa FAA, Jackson DE. Manipulating the epigenome for the treatment of disorders with thrombotic complications. *Drug Discovery Today*. 2018 Mar 1;23(3):719–26.

95. Bao N, Lye KW, Barton MK. MicroRNA binding sites in Arabidopsis class III HD-ZIP mRNAs are required for methylation of the template chromosome. *Dev Cell*. 2004 Nov;7(5):653–62.
96. Dews M, Homayouni A, Yu D, Murphy D, Seignani C, Wentzel E, et al. Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. *Nat Genet*. 2006 Sep;38(9):1060–5.
97. Scott GK, Mattie MD, Berger CE, Benz SC, Benz CC. Rapid Alteration of MicroRNA Levels by Histone Deacetylase Inhibition. *Cancer Research*. 2006 Feb 1;66(3):1277–81.
98. Kiga K, Mimuro H, Suzuki M, Shinozaki-Ushiku A, Kobayashi T, Sanada T, et al. Epigenetic silencing of miR-210 increases the proliferation of gastric epithelium during chronic *Helicobacter pylori* infection. *Nature communications*. 2014;5:4497.
99. Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet*. 2006 Feb;38(2):228–33.
100. Zhang L, Hou D, Chen X, Li D, Zhu L, Zhang Y, et al. Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. *Cell Res*. 2012 Jan;22(1):107–26.
101. Morris KV, Chan SWL, Jacobsen SE, Looney DJ. Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. *Science*. 2004 Aug 27;305(5688):1289–92.
102. Agrawal N, Dasaradhi PVN, Mohammed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK. RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003 Dec;67(4):657–85.
103. Sunkar R, Chinnusamy V, Zhu J, Zhu JK. Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation. *Trends in plant science* [Internet]. 2007 [cited 2022 Oct 6]; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.05.001>
104. Medzhitov R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell*. 2010 Mar 19;140(6):771–6.
105. Bennett JM, Reeves G, Billman GE, Sturmberg JP. Inflammation-Nature’s Way to Efficiently Respond to All Types of Challenges: Implications for Understanding and Managing “the Epidemic” of Chronic Diseases. *Front Med (Lausanne)*. 2018;5:316.
106. Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*. 2018 Jan 23;9(6):7204–18.
107. Bondia-Pons I, Ryan L, Martinez JA. Oxidative stress and inflammation interactions in human obesity. *J Physiol Biochem*. 2012 Dec;68(4):701–11.
108. Castanheira FVS, Kubes P. Neutrophils and NETs in modulating acute and chronic inflammation. *Blood*. 2019 May 16;133(20):2178–85.
109. Shanmugam MK, Sethi G. Role of epigenetics in inflammation-associated diseases. *Subcell Biochem*. 2013;61:627–57.

110. Stylianou E. Epigenetics of chronic inflammatory diseases. *J Inflamm Res.* 2018 Dec 20;12:1–14.
111. Gonzalez-Jaramillo V, Portilla-Fernandez E, Glisic M, Voortman T, Ghanbari M, Bramer W, et al. Epigenetics and Inflammatory Markers: A Systematic Review of the Current Evidence. *Int J Inflamm.* 2019;2019:6273680.
112. Gluckman PD, Hanson MA, Cooper C, Thornburg KL. Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. *N Engl J Med.* 2008 Jul 3;359(1):61–73.
113. Mitchell C, Schneper LM, Notterman DA. DNA methylation, early life environment, and health outcomes. *Pediatr Res.* 2016 Jan;79(1–2):212–9.
114. Barker DJ. Maternal nutrition, fetal nutrition, and disease in later life. *Nutrition.* 1997 Sep;13(9):807–13.
115. Lucas A. Long-term programming effects of early nutrition -- implications for the preterm infant. *J Perinatol.* 2005 Dec;25 Suppl 2:S2-6.
116. Galobardes B, Lynch JW, Davey Smith G. Childhood socioeconomic circumstances and cause-specific mortality in adulthood: systematic review and interpretation. *Epidemiol Rev.* 2004;26:7–21.
117. Moore BF, Harrall KK, Sauder KA, Glueck DH, Dabelea D. Neonatal Adiposity and Childhood Obesity. *Pediatrics.* 2020 Sep;146(3):e20200737.
118. Walters E, Edwards R. Further thoughts regarding evidence offered in support of the 'Barker hypothesis.' *Reproductive BioMedicine Online.* 2004 Jan 1;9(2):129–31.
119. Godfrey KM, Barker DJ. Fetal programming and adult health. *Public Health Nutr.* 2001 Apr;4(2B):611–24.
120. Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science.* 2001 Aug 10;293(5532):1089–93.
121. Burdge GC, Lillycrop KA, Jackson AA. Nutrition in early life, and risk of cancer and metabolic disease: alternative endings in an epigenetic tale? *British Journal of Nutrition.* 2008 Dec;101(5):619–30.
122. Drake AJ, McPherson RC, Godfrey KM, Cooper C, Lillycrop KA, Hanson MA, et al. An unbalanced maternal diet in pregnancy associates with offspring epigenetic changes in genes controlling glucocorticoid action and foetal growth. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2012 Dec;77(6):808–15.
123. Dolinoy DC, Das R, Weidman JR, Jirtle RL. Metastable Epialleles, Imprinting, and the Fetal Origins of Adult Diseases. *Pediatr Res.* 2007 May;61(7):30–7.
124. Choi SW, Friso S. Epigenetics: A New Bridge between Nutrition and Health. *Adv Nutr.* 2010 Nov;1(1):8–16.
125. Ford D, Ions LJ, Alatawi F, Wakeling LA. The potential role of epigenetic responses to diet in ageing. *Proc Nutr Soc.* 2011 Aug;70(3):374–84.

126. Bleker LS, de Rooij SR, Painter RC, Ravelli AC, Roseboom TJ. Cohort profile: the Dutch famine birth cohort (DFBC)— a prospective birth cohort study in the Netherlands. *BMJ Open*. 2021 Mar 4;11(3):e042078.
127. Roseboom TJ, van der Meulen JH, Ravelli AC, Osmond C, Barker DJ, Bleker OP. Effects of prenatal exposure to the Dutch famine on adult disease in later life: an overview. *Mol Cell Endocrinol*. 2001 Dec 20;185(1–2):93–8.
128. Walker SP, Wachs TD, Meeks Gardner J, Lozoff B, Wasserman GA, Pollitt E, et al. Child development: risk factors for adverse outcomes in developing countries. *The Lancet*. 2007 Jan 13;369(9556):145–57.
129. Galler JR, Bryce CP, Zichlin ML, Waber DP, Exner N, Fitzmaurice GM, et al. Malnutrition in the first year of life and personality at age 40. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*. 2013;54(8):911–9.
130. Galler JR, Bryce CP, Zichlin ML, Fitzmaurice G, Eaglesfield GD, Waber DP. Infant Malnutrition Is Associated with Persisting Attention Deficits in Middle Adulthood. *The Journal of Nutrition*. 2012 Apr 1;142(4):788–94.
131. Morgan AR, Thompson JM, Murphy R, Black PN, Lam WJ, Ferguson LR, et al. Obesity and diabetes genes are associated with being born small for gestational age: Results from the Auckland Birthweight Collaborative study. *BMC Medical Genetics*. 2010 Aug 16;11(1):125.
132. Kim SY, Sharma AJ, Sappenfield W, Wilson HG, Salihu HM. Association of maternal body mass index, excessive weight gain, and gestational diabetes mellitus with large-for-gestational-age births. *Obstet Gynecol*. 2014 Apr;123(4):737–44.
133. SECTION ON BREASTFEEDING, Eidelman AI, Schanler RJ, Johnston M, Landers S, Noble L, et al. Breastfeeding and the Use of Human Milk. *Pediatrics*. 2012 Mar 1;129(3):e827–41.
134. Sotiraki M, Malliou A, Tachirai N, Kellari N, Grammatikopoulou MG, Sergentanis TN, et al. Burden of Childhood Malnutrition: A Roadmap of Global and European Policies Promoting Healthy Nutrition for Infants and Young Children. *Children (Basel)*. 2022 Aug 6;9(8):1179.
135. Victora CG, Bahl R, Barros AJD, França GVA, Horton S, Krasevec J, et al. Breastfeeding in the 21st century: epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. *Lancet*. 2016 Jan 30;387(10017):475–90.
136. Bernardo H, Cesar V, Organization WH. Long-term effects of breastfeeding: a systematic review. World Health Organization; 2013.
137. Sullivan S, Schanler RJ, Kim JH, Patel AL, Trawöger R, Kiechl-Kohlendorfer U, et al. An exclusively human milk-based diet is associated with a lower rate of necrotizing enterocolitis than a diet of human milk and bovine milk-based products. *J Pediatr*. 2010 Apr;156(4):562-567.e1.
138. Li R, Ware J, Chen A, Nelson JM, Kmet JM, Parks SE, et al. Breastfeeding and post-perinatal infant deaths in the United States, A national prospective cohort analysis. *The Lancet Regional Health – Americas [Internet]*. 2022 Jan 1 [cited 2023 Mar 14];5.

Available from: [https://www.thelancet.com/journals/lanam/article/PIIS2667-193X\(21\)00090-9/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lanam/article/PIIS2667-193X(21)00090-9/fulltext)

139. Kramer MS, Aboud F, Mironova E, Vanilovich I, Platt RW, Matush L, et al. Breastfeeding and child cognitive development: new evidence from a large randomized trial. *Arch Gen Psychiatry*. 2008 Dec;65(5):578–84.
140. Campoy C, Escolano-Margarit MV, Anjos T, Szajewska H, Uauy R. Omega 3 fatty acids on child growth, visual acuity and neurodevelopment. *Br J Nutr*. 2012 Jun;107 Suppl 2:S85-106.
141. Mead MN. Nutrigenomics: The Genome–Food Interface. *Environ Health Perspect*. 2007 Dec;115(12):A582–9.
142. Relton CL, Hartwig FP, Davey Smith G. From stem cells to the law courts: DNA methylation, the forensic epigenome and the possibility of a biosocial archive. *Int J Epidemiol*. 2015 Aug;44(4):1083–93.
143. Verduci E, Banderali G, Barberi S, Radaelli G, Lops A, Betti F, et al. Epigenetic effects of human breast milk. *Nutrients*. 2014 Apr 24;6(4):1711–24.
144. Hartwig FP, Davey Smith G, Simpkin AJ, Victora CG, Relton CL, Caramaschi D. Association between Breastfeeding and DNA Methylation over the Life Course: Findings from the Avon Longitudinal Study of Parents and Children (ALSPAC). *Nutrients*. 2020 Oct 29;12(11):3309.
145. Briollais L, Rustand D, Allard C, Wu Y, Xu J, Rajan SG, et al. DNA methylation mediates the association between breastfeeding and early-life growth trajectories. *Clin Epigenetics*. 2021 Dec 22;13(1):231.
146. Boddicker RL, Koltjes JE, Fritz-Waters ER, Koesterke L, Weeks N, Yin T, et al. Genome-wide methylation profile following prenatal and postnatal dietary omega-3 fatty acid supplementation in pigs. *Anim Genet*. 2016 Dec;47(6):658–71.
147. Mischke M, Plösch T. More than just a gut instinct—the potential interplay between a baby’s nutrition, its gut microbiome, and the epigenome. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2013 Jun 15;304(12):R1065-1069.
148. Noer A, Sørensen AL, Boquest AC, Collas P. Stable CpG hypomethylation of adipogenic promoters in freshly isolated, cultured, and differentiated mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Mol Biol Cell*. 2006 Aug;17(8):3543–56.
149. Obermann-Borst SA, Eilers PHC, Tobi EW, de Jong FH, Slagboom PE, Heijmans BT, et al. Duration of breastfeeding and gender are associated with methylation of the LEPTIN gene in very young children. *Pediatr Res*. 2013 Sep;74(3):344–9.
150. Bouret SG. Neurodevelopmental actions of leptin. *Brain Res*. 2010 Sep 2;1350:2–9.
151. Temples HS, Willoughby D, Holaday B, Rogers CR, Wueste D, Bridges W, et al. Breastfeeding and Growth of Children in the Peri/postnatal Epigenetic Twins Study (PETS): Theoretical Epigenetic Mechanisms. *J Hum Lact*. 2016 Aug;32(3):481–8.

152. Soto-Ramírez N, Arshad SH, Holloway JW, Zhang H, Schauburger E, Ewart S, et al. The interaction of genetic variants and DNA methylation of the interleukin-4 receptor gene increase the risk of asthma at age 18 years. *Clin Epigenetics*. 2013 Jan 3;5(1):1.
153. Rosa-Rosa L, Zimmermann N, Bernstein JA, Rothenberg ME, Khurana Hershey GK. The R576 IL-4 receptor alpha allele correlates with asthma severity. *J Allergy Clin Immunol*. 1999 Nov;104(5):1008–14.
154. Tao MH, Marian C, Shields PG, Potischman N, Nie J, Krishnan SS, et al. Exposures in early life: associations with DNA promoter methylation in breast tumors. *J Dev Orig Health Dis*. 2013 Apr;4(2):182–90.
155. Karlsson O, Rodosthenous RS, Jara C, Brennan KJ, Wright RO, Baccarelli AA, et al. Detection of long non-coding RNAs in human breastmilk extracellular vesicles: Implications for early child development. *Epigenetics*. 2016 Aug 5;11(10):721–9.
156. Alsaweed M, Hartmann PE, Geddes DT, Kakulas F. MicroRNAs in Breastmilk and the Lactating Breast: Potential Immunoprotectors and Developmental Regulators for the Infant and the Mother. *Int J Environ Res Public Health*. 2015 Nov;12(11):13981–4020.
157. Kosaka N, Izumi H, Sekine K, Ochiya T. microRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk. *Silence*. 2010 Mar 1;1(1):7.
158. Carrillo-Lozano E, Sebastián-Valles F, Knott-Torcal C. Circulating microRNAs in Breast Milk and Their Potential Impact on the Infant. *Nutrients*. 2020 Oct;12(10):3066.
159. Heijmans BT, Tobi EW, Stein AD, Putter H, Blauw GJ, Susser ES, et al. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *PNAS*. 2008 Nov 4;105(44):17046–9.
160. Tammen SA, Friso S, Choi SW. Epigenetics: the link between nature and nurture. *Mol Aspects Med*. 2013 Aug;34(4):753–64.
161. Pasquale L, Borrás T, Fingert J, Wiggs J, Ritch R. Exfoliation syndrome: Assembling the puzzle pieces. *Acta ophthalmologica*. 2015 Dec 9;94.
162. Davis CD, Ross SA. Dietary components impact histone modifications and cancer risk. *Nutr Rev*. 2007 Feb;65(2):88–94.
163. Weisbeck A, Jansen RJ. Nutrients and the Pancreas: An Epigenetic Perspective. *Nutrients*. 2017 Mar 15;9(3):E283.
164. Bishop KS, Ferguson LR. The interaction between epigenetics, nutrition and the development of cancer. *Nutrients*. 2015 Jan 30;7(2):922–47.
165. Tiffon C. Histone Deacetylase Inhibition Restores Expression of Hypoxia-Inducible Protein NDRG1 in Pancreatic Cancer. *Pancreas*. 2018 Feb;47(2):200–7.
166. Ramos-Lopez O, Milagro FI, Riezu-Boj JI, Martinez JA. Epigenetic signatures underlying inflammation: an interplay of nutrition, physical activity, metabolic diseases, and environmental factors for personalized nutrition. *Inflamm Res*. 2021 Jan;70(1):29–49.

167. Kresovich JK, Bulka CM, Joyce BT, Vokonas PS, Schwartz J, Baccarelli AA, et al. The Inflammatory Potential of Dietary Manganese in a Cohort of Elderly Men. *Biol Trace Elem Res.* 2018 Dec;183(1):49–57.
168. Bollati V, Favero C, Albetti B, Tarantini L, Moroni A, Byun HM, et al. Nutrients Intake Is Associated with DNA Methylation of Candidate Inflammatory Genes in a Population of Obese Subjects. *Nutrients.* 2014 Oct 22;6(10):4625–39.
169. Kim K chol, Friso S, Choi SW. DNA methylation, an epigenetic mechanism connecting folate to healthy embryonic development and aging. *J Nutr Biochem.* 2009 Dec;20(12):917–26.
170. Larsson SC, Giovannucci E, Wolk A. Folate intake, MTHFR polymorphisms, and risk of esophageal, gastric, and pancreatic cancer: a meta-analysis. *Gastroenterology.* 2006 Oct;131(4):1271–83.
171. Mason JB, Choi SW. Effects of alcohol on folate metabolism: implications for carcinogenesis. *Alcohol.* 2005 Apr;35(3):235–41.
172. Yahfoufi N, Alsadi N, Jambi M, Matar C. The Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Role of Polyphenols. *Nutrients.* 2018 Nov 2;10(11):1618.
173. Tsao R. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients.* 2010 Dec;2(12):1231–46.
174. Tomé-Carneiro J, Larrosa M, Yáñez-Gascón MJ, Dávalos A, Gil-Zamorano J, González M, et al. One-year supplementation with a grape extract containing resveratrol modulates inflammatory-related microRNAs and cytokines expression in peripheral blood mononuclear cells of type 2 diabetes and hypertensive patients with coronary artery disease. *Pharmacol Res.* 2013 Jun;72:69–82.
175. Kim H, Banerjee N, Barnes RC, Pfent CM, Talcott ST, Dashwood RH, et al. Mango polyphenolics reduce inflammation in intestinal colitis-involvement of the miR-126/PI3K/AKT/mTOR axis in vitro and in vivo. *Mol Carcinog.* 2017 Jan;56(1):197–207.
176. Cordero-Herrera I, Chen X, Ramos S, Devaraj S. (-)-Epicatechin attenuates high-glucose-induced inflammation by epigenetic modulation in human monocytes. *Eur J Nutr.* 2017 Apr;56(3):1369–73.
177. Kim A, Yun JM. Combination Treatments with Luteolin and Fisetin Enhance Anti-Inflammatory Effects in High Glucose-Treated THP-1 Cells Through Histone Acetyltransferase/Histone Deacetylase Regulation. *J Med Food.* 2017 Aug;20(8):782–9.
178. Yun JM, Jialal I, Devaraj S. Epigenetic regulation of high glucose-induced proinflammatory cytokine production in monocytes by curcumin. *J Nutr Biochem.* 2011 Dec;22(5):450–8.
179. Nicodemus-Johnson J, Sinnott RA. Correction: Nicodemus-Johnson, J.; et al. Fruit and Juice Epigenetic Signatures Are Associated with Independent Immunoregulatory Pathways. *Nutrients* 2017, 9, 752. *Nutrients.* 2017 Sep 20;9(9):E1038.

180. DiStefano JK. Fructose-mediated effects on gene expression and epigenetic mechanisms associated with NAFLD pathogenesis. *Cell Mol Life Sci.* 2020 Jun;77(11):2079–90.
181. Ricci E, Al-Beitawi S, Cipriani S, Alteri A, Chiaffarino F, Candiani M, et al. Dietary habits and semen parameters: a systematic narrative review. *Andrology.* 2018;6(1):104–16.
182. Salas-Huetos A, Bulló M, Salas-Salvadó J. Dietary patterns, foods and nutrients in male fertility parameters and fecundability: a systematic review of observational studies. *Hum Reprod Update.* 2017 Jul 1;23(4):371–89.
183. Zheng J, Zhang Q, Mul JD, Yu M, Xu J, Qi C, et al. Maternal high-calorie diet is associated with altered hepatic microRNA expression and impaired metabolic health in offspring at weaning age. *Endocrine.* 2016 Oct;54(1):70–80.
184. Ding Y, Li J, Liu S, Zhang L, Xiao H, Li J, et al. DNA hypomethylation of inflammation-associated genes in adipose tissue of female mice after multigenerational high fat diet feeding. *Int J Obes (Lond).* 2014 Feb;38(2):198–204.
185. Ricker MA, Haas WC. Anti-Inflammatory Diet in Clinical Practice: A Review. *Nutr Clin Pract.* 2017 Jun;32(3):318–25.
186. Tremblay BL, Guénard F, Rudkowska I, Lemieux S, Couture P, Vohl MC. Epigenetic changes in blood leukocytes following an omega-3 fatty acid supplementation. *Clinical Epigenetics.* 2017 Dec 26;9(1):43.
187. Silva-Martínez GA, Rodríguez-Ríos D, Alvarado-Caudillo Y, Vaquero A, Esteller M, Carmona FJ, et al. Arachidonic and oleic acid exert distinct effects on the DNA methylome. *Epigenetics.* 2016 Apr 18;11(5):321–34.
188. Arpón A, Milagro FI, Razquin C, Corella D, Estruch R, Fitó M, et al. Impact of Consuming Extra-Virgin Olive Oil or Nuts within a Mediterranean Diet on DNA Methylation in Peripheral White Blood Cells within the PREDIMED-Navarra Randomized Controlled Trial: A Role for Dietary Lipids. *Nutrients.* 2017 Dec 23;10(1):E15.
189. Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, Covas MI, Corella D, Arós F, et al. Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet Supplemented with Extra-Virgin Olive Oil or Nuts. *N Engl J Med.* 2018 Jun 21;378(25):e34.
190. Bordoni L, Fedeli D, Fiorini D, Gabbianelli R. Extra Virgin Olive Oil and Nigella sativa Oil Produced in Central Italy: A Comparison of the Nutrigenomic Effects of Two Mediterranean Oils in a Low-Grade Inflammation Model. *Antioxidants (Basel).* 2019 Dec 24;9(1):E20.
191. Bayarsaihan D. Epigenetic mechanisms in inflammation. *J Dent Res.* 2011 Jan;90(1):9–17.
192. Hernández-Saavedra D, Moody L, Xu GB, Chen H, Pan YX. Epigenetic Regulation of Metabolism and Inflammation by Calorie Restriction. *Adv Nutr.* 2019 May 1;10(3):520–36.
193. Perez-Cornago A, de la Iglesia R, Lopez-Legarrea P, Abete I, Navas-Carretero S, Lacunza CI, et al. A decline in inflammation is associated with less depressive symptoms after a

- dietary intervention in metabolic syndrome patients: a longitudinal study. *Nutr J.* 2014 Apr 24;13:36.
194. Gögebakan O, Kohl A, Osterhoff MA, van Baak MA, Jebb SA, Papadaki A, et al. Effects of weight loss and long-term weight maintenance with diets varying in protein and glycemic index on cardiovascular risk factors: the diet, obesity, and genes (DiOGenes) study: a randomized, controlled trial. *Circulation.* 2011 Dec 20;124(25):2829–38.
 195. de la Garza AL, Etxeberria U, Haslberger A, Aumueller E, Martínez JA, Milagro FI. Helichrysum and Grapefruit Extracts Boost Weight Loss in Overweight Rats Reducing Inflammation. *Journal of Medicinal Food.* 2015 Aug;18(8):890–8.
 196. Kim S, Lee MS, Jung S, Son HY, Park S, Kang B, et al. Ginger Extract Ameliorates Obesity and Inflammation via Regulating MicroRNA-21/132 Expression and AMPK Activation in White Adipose Tissue. *Nutrients.* 2018 Oct 23;10(11):1567.
 197. Sterne JAC, Savović J, Page MJ, Elbers RG, Blencowe NS, Boutron I, et al. RoB 2: a revised tool for assessing risk of bias in randomised trials. *BMJ.* 2019 Aug 28;366:l4898.
 198. Stevens AJ, Rucklidge JJ, Darling KA, Eggleston MJ, Pearson JF, Kennedy MA. Methylomic changes in response to micronutrient supplementation and MTHFR genotype. *Epigenomics.* 2018 Sep;10(9):1201–14.
 199. Clayton-Smith J, Laan L. Angelman syndrome: a review of the clinical and genetic aspects. *J Med Genet.* 2003 Feb;40(2):87–95.
 200. Peters SU, Bird LM, Kimonis V, Glaze DG, Shinawi LM, Bichell TJ, et al. Double-blind therapeutic trial in Angelman syndrome using betaine and folic acid. *Am J Med Genet A.* 2010 Aug;152A(8):1994–2001.
 201. Bird LM, Tan WH, Bacino CA, Peters SU, Skinner SA, Anselm I, et al. A therapeutic trial of pro-methylation dietary supplements in Angelman syndrome. *Am J Med Genet A.* 2011 Dec;155A(12):2956–63.
 202. Molerés A, Campi3n J, Milagro FI, Marcos A, Campoy C, Garagorri JM, et al. Differential DNA methylation patterns between high and low responders to a weight loss intervention in overweight or obese adolescents: the EVASYON study. *FASEB J.* 2013 Jun;27(6):2504–12.
 203. Martínez-Gómez D, Gómez-Martínez S, Puertollano MA, Nova E, Wärnberg J, Veiga OL, et al. Design and evaluation of a treatment programme for Spanish adolescents with overweight and obesity. The EVASYON Study. *BMC Public Health.* 2009 Nov 15;9:414.
 204. Wang X, Zhu H, Snieder H, Su S, Munn D, Harshfield G, et al. Obesity related methylation changes in DNA of peripheral blood leukocytes. *BMC Med.* 2010 Dec 21;8:87.
 205. Voisin S, Alm3n MS, Moschonis G, Chrousos GP, Manios Y, Schi3th HB. Dietary fat quality impacts genome-wide DNA methylation patterns in a cross-sectional study of Greek preadolescents. *European Journal of Human Genetics.* 2015;23(5):654–62.
 206. McMorrow AM, Connaughton RM, Magalhães TR, McGillicuddy FC, Hughes MF, Cheishvili D, et al. Personalized Cardio-Metabolic Responses to an Anti-Inflammatory

- Nutrition Intervention in Obese Adolescents: A Randomized Controlled Crossover Trial. *Mol Nutr Food Res*. 2018 May;62(10):e1701008.
207. Chen L, Dong Y, Wang X, Hao G, Huang Y, Gutin B, et al. Epigenome-Wide Association Study of Dietary Fiber Intake in African American Adolescents. *Mol Nutr Food Res*. 2018 Jun;62(12):e1800155.
208. Yadav DK, Shrestha S, Lillycrop KA, Joglekar CV, Pan H, Holbrook JD, et al. Vitamin B12 supplementation influences methylation of genes associated with Type 2 diabetes and its intermediate traits. *Epigenomics*. 2018;10(1):71–90.
209. Montrose L, Ward TJ, Semmens EO, Cho YH, Brown B, Noonan CW. Dietary intake is associated with respiratory health outcomes and DNA methylation in children with asthma. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*. 2017 Feb 27;13(1):12.
210. F G, I V, S V, I V, I D, C I, et al. Effect of early parenteral nutrition during paediatric critical illness on DNA methylation as a potential mediator of impaired neurocognitive development: a pre-planned secondary analysis of the PEPaNIC international randomised controlled trial. *The Lancet Respiratory medicine* [Internet]. 2020 Mar [cited 2022 May 30];8(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32085844/>
211. Fizez T, Kerklaan D, Mesotten D, Verbruggen S, Wouters PJ, Vanhorebeek I, et al. Early versus Late Parenteral Nutrition in Critically Ill Children. *New England Journal of Medicine*. 2016 Mar 24;374(12):1111–22.
212. Güiza F, Vanhorebeek I, Verstraete S, Verlinden I, Derese I, Ingels C, et al. Effect of early parenteral nutrition during paediatric critical illness on DNA methylation as a potential mediator of impaired neurocognitive development: a pre-planned secondary analysis of the PEPaNIC international randomised controlled trial. *Lancet Respir Med*. 2020 Mar;8(3):288–303.
213. Verlinden I, Güiza F, Derese I, Wouters PJ, Joosten K, Verbruggen SC, et al. Time course of altered DNA methylation evoked by critical illness and by early administration of parenteral nutrition in the paediatric ICU. *Clinical Epigenetics*. 2020;12(1).
214. Jacobs A, Dulfer K, Eveleens RD, Hordijk J, Van Cleemput H, Verlinden I, et al. Long-term developmental effect of withholding parenteral nutrition in paediatric intensive care units: a 4-year follow-up of the PEPaNIC randomised controlled trial. *Lancet Child Adolesc Health*. 2020 Jul;4(7):503–14.
215. Jacobs A, Güiza F, Verlinden I, Dulfer K, Garcia Guerra G, Joosten K, et al. Differential DNA methylation by early versus late parenteral nutrition in the PICU: a biological basis for its impact on emotional and behavioral problems documented 4 years later. *Clin Epigenetics*. 2021 Jul 27;13(1):146.
216. Martins NC, Dorneles GP, Blembeel AS, Marinho JP, Proença ICT, da Cunha Goulart MJV, et al. Effects of grape juice consumption on oxidative stress and inflammation in male volleyball players: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Complement Ther Med*. 2020 Nov;54:102570.
217. Garrett S, Dietzmann-Maurer K, Song L, Sullivan KE. Polarization of Primary Human Monocytes by IFN- γ Induces Chromatin Changes and Recruits RNA Pol II to the TNF- α Promoter1. *The Journal of Immunology*. 2008 Apr 15;180(8):5257–66.

218. Dorneles GP, Boeira MCR, Schipper LL, Silva IRV, Elsner VR, Dal Lago P, et al. Acute Strenuous Exercise Induces an Imbalance on Histone H4 Acetylation/Histone Deacetylase 2 and Increases the Proinflammatory Profile of PBMC of Obese Individuals. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:1530230.
219. Gallardo-Escribano C, Buonaiuto V, Ruiz-Moreno MI, Vargas-Candela A, Vilches-Perez A, Benitez-Porres J, et al. Epigenetic approach in obesity: DNA methylation in a prepubertal population which underwent a lifestyle modification. *Clinical Epigenetics*. 2020;12(1).