

# METODY STUDIA BIOAKTIVNÍCH SLOŽEK VÝŽIVY

## Process for the Assessment of Scientific Support for Claims on Food (PASSCLAIM)

Evropský program – zapojeno více než 160 vědců v rámci 5 evropského rámcového programu (akademičtí pracovníci, průmysl, veřejnost).

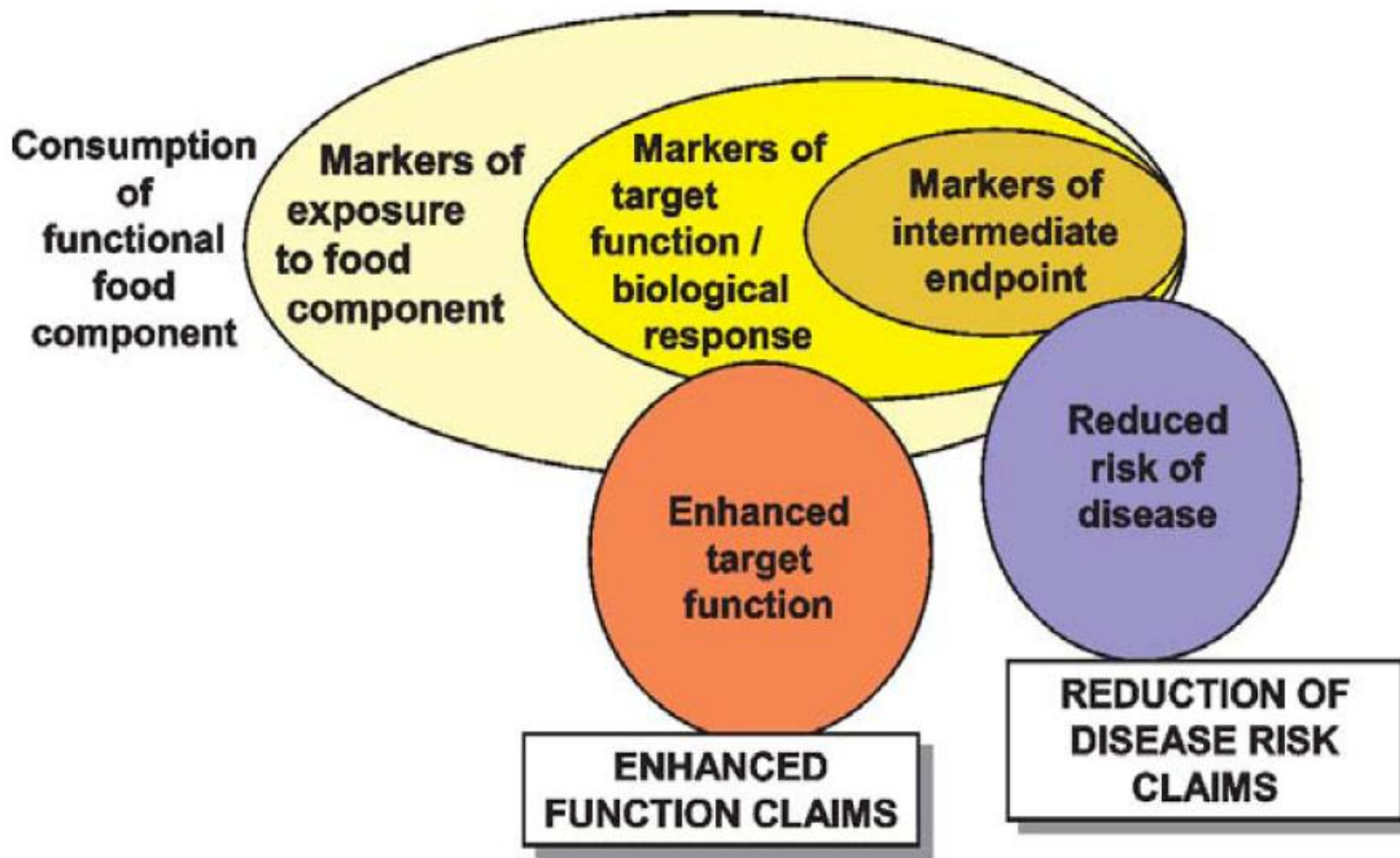
EU projekt „Functional food Science in Europe“

Nutné dodat vědecké základy a důkazy pro vytváření požadavků a nároků na výživu a složky potravy.

Ověření markerů expozice, zvýšeného nebo sníženého rizika onemocnění.

Biomarkery a tzv. “surrogate“ (náhradní) markery

## Koncept vědeckých důkazů a odpovídajících zdravotních požadavků



## Kritéria pro vědecké zdůvodnění požadavků

### Criteria for the scientific substantiation of claims

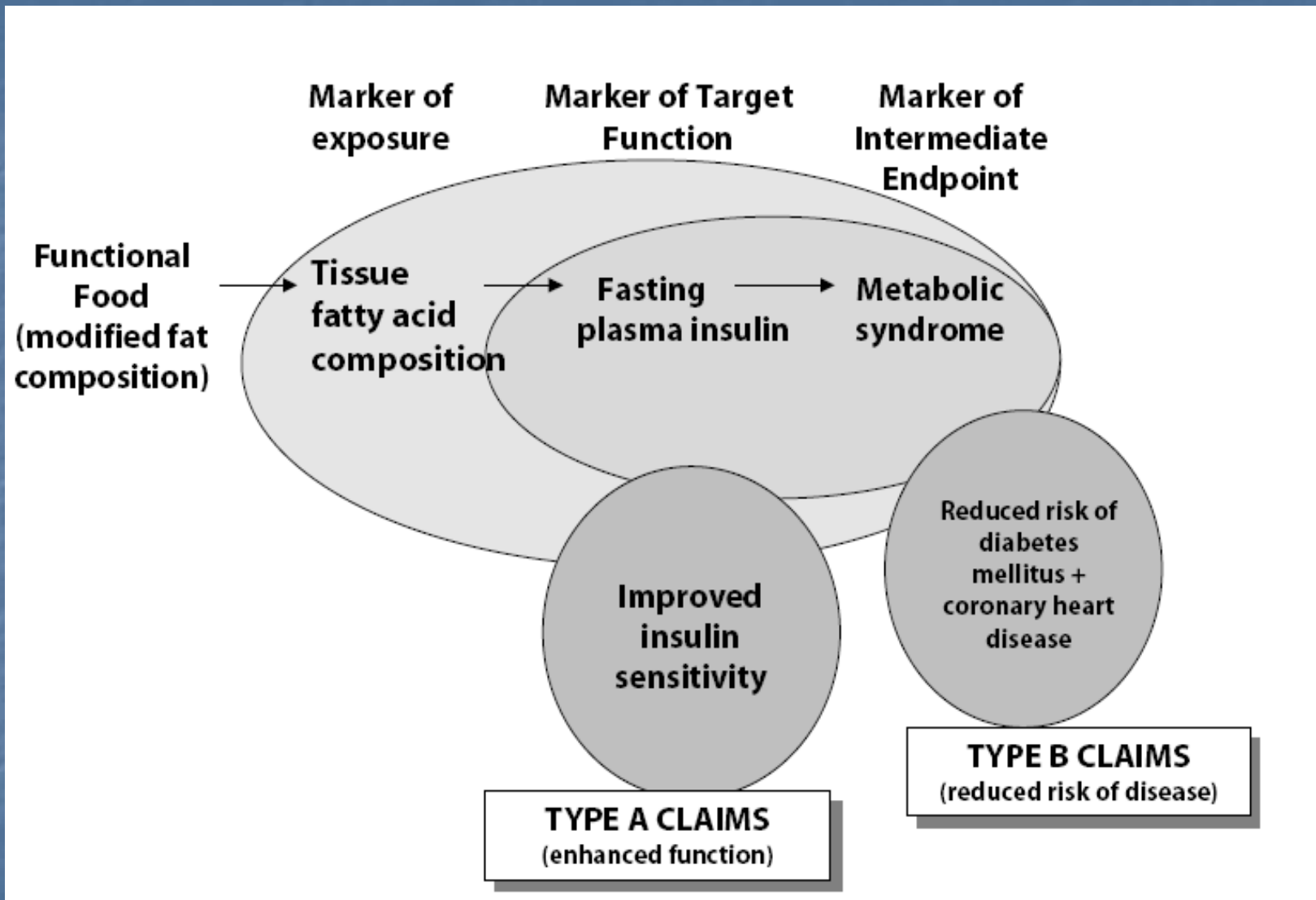
1. The food or food component to which the claimed effect is attributed should be characterised.
2. Substantiation of a claim should be based on human data, primarily from intervention studies the design of which should include the following considerations:
  - 2 (a) Study groups that are representative of the target group.
  - 2 (b) Appropriate controls.
  - 2 (c) An adequate duration of exposure and follow up to demonstrate the intended effect.
  - 2 (d) Characterisation of the study groups' background diet and other relevant aspects of lifestyle.
  - 2 (e) An amount of the food or food component consistent with its intended pattern of consumption.
  - 2 (f) The influence of the food matrix and dietary context on the functional effect of the component.
  - 2 (g) Monitoring of subjects' compliance concerning intake of food or food component under test.
  - 2 (h) The statistical power to test the hypothesis.
3. When the true endpoint of a claimed benefit cannot be measured directly, studies should use markers.
4. Markers should be:
  - biologically valid in that they have a known relationship to the final outcome and their variability within the target population is known;
  - methodologically valid with respect to their analytical characteristics.
5. Within a study the target variable should change in a statistically significant way and the change should be biologically meaningful for the target group consistent with the claim to be supported.
6. A claim should be scientifically substantiated by taking into account the totality of the available data and by weighing of the evidence.



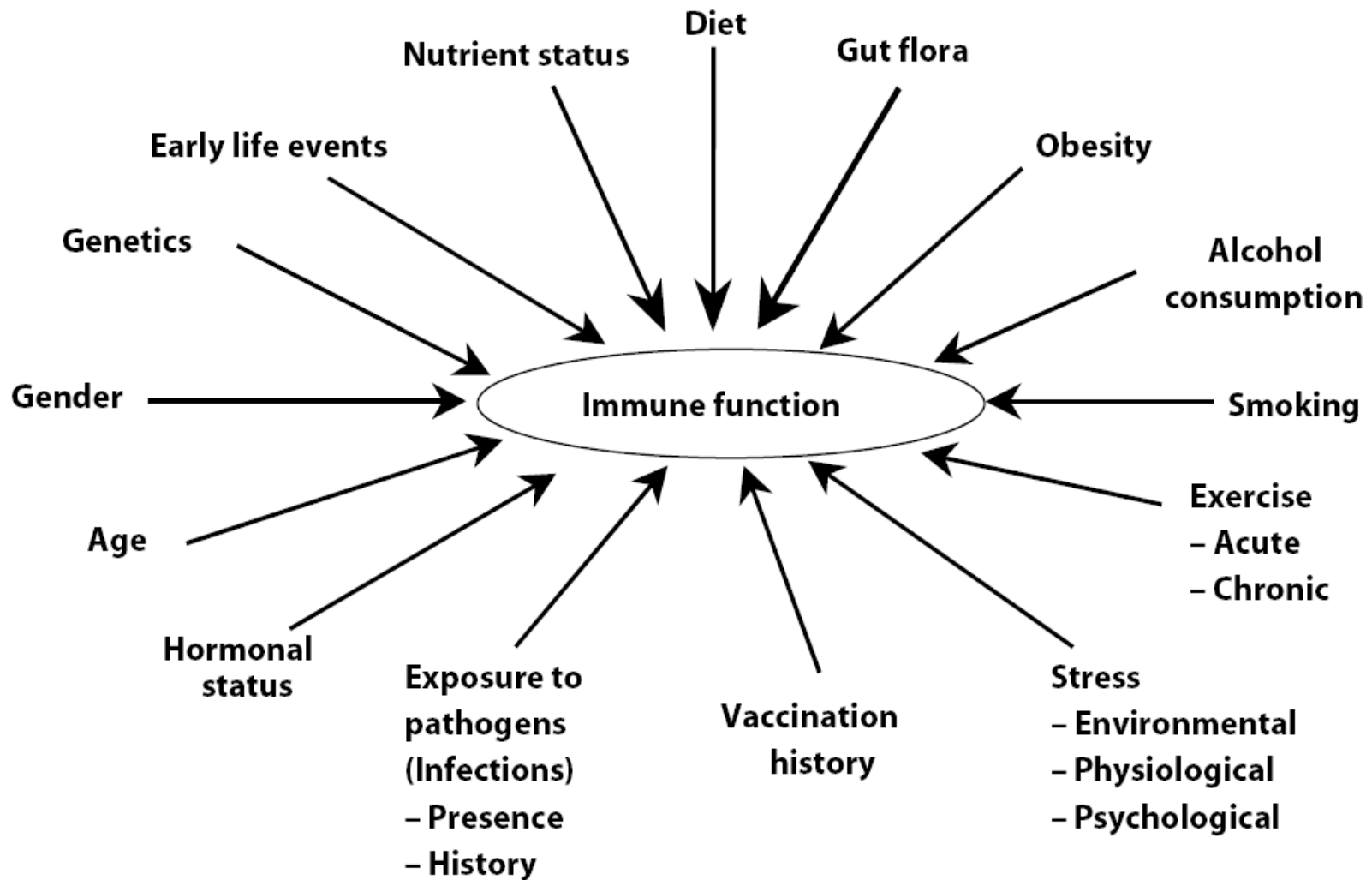
# HLAVNÍ OKRUHY ZÁJMU

- ▶ Regulace váhy, citlivost k inzulínu a diabetes
- ▶ Výživa a kardiovaskulární onemocnění
- ▶ Zdraví a problémy kostí a osteoporóza
- ▶ Fyzická aktivita a fitness
- ▶ Výživa a nádorová onemocnění
- ▶ Mentální stav a chování
- ▶ Zdraví zažívacího traktu a imunita

# Příklad požadavků na funkční potraviny ovlivňujících citlivost k inzulinu



# ZDROJE MODULACE IMUNITNÍHO SYSTÉMU



**GENOMICS + PROTEOMICS = CYTOMICS**

**METABOLOMICS**

**TRANSCRIPTOMICS**

**NUTRIGENOMICS**

**PHARMACOGENOMICS**

**LIPIDOMICS**

**„OMICS“**

vědecké směry od mapování vnitřního spektra lipidů v biologických systémech k popisu funkce a metabolismu jednotlivých lipidů.



# Potrava a výživa - zdraví a nemoc

Funkční potraviny, potraviny pro zvláštní lékařské účely

Nutrigenomika, farmakogenomika – relativně nové pojmy  
Cílem je individualizovat nebo personalizovat medicínu a výživu a nakonec zdraví spojením léků nebo potravy s individuálním genotypem.

Lidský genom kóduje asi 30 000 genů, které jsou zodpovědné za produkci více než 100 000 funkčně odlišných proteinů. Kromě toho jsou geny ovlivněny epigenetickými modifikacemi (acytlace, metylace).

Znamé mutace způsobující onemocnění identifikovány asi u 1000 genů. Předpoklad, že chyba v každém genu je schopna způsobit odchylku.

**Každý člověk je geneticky (i epigeneticky) jedinečný a fenotypově odlišný.**

Nutrigenomika je vědecké odvětví studující interakce specifických genů, potravy a jejích bioaktivních složek. Je základem porozumění jak se liší zdravotní důsledky stravovacích návyků mezi jedinci a kdo a jak (prospěch, riziko) může být ovlivněn intervenčními strategiemi.

Vychází z předpokladu, že

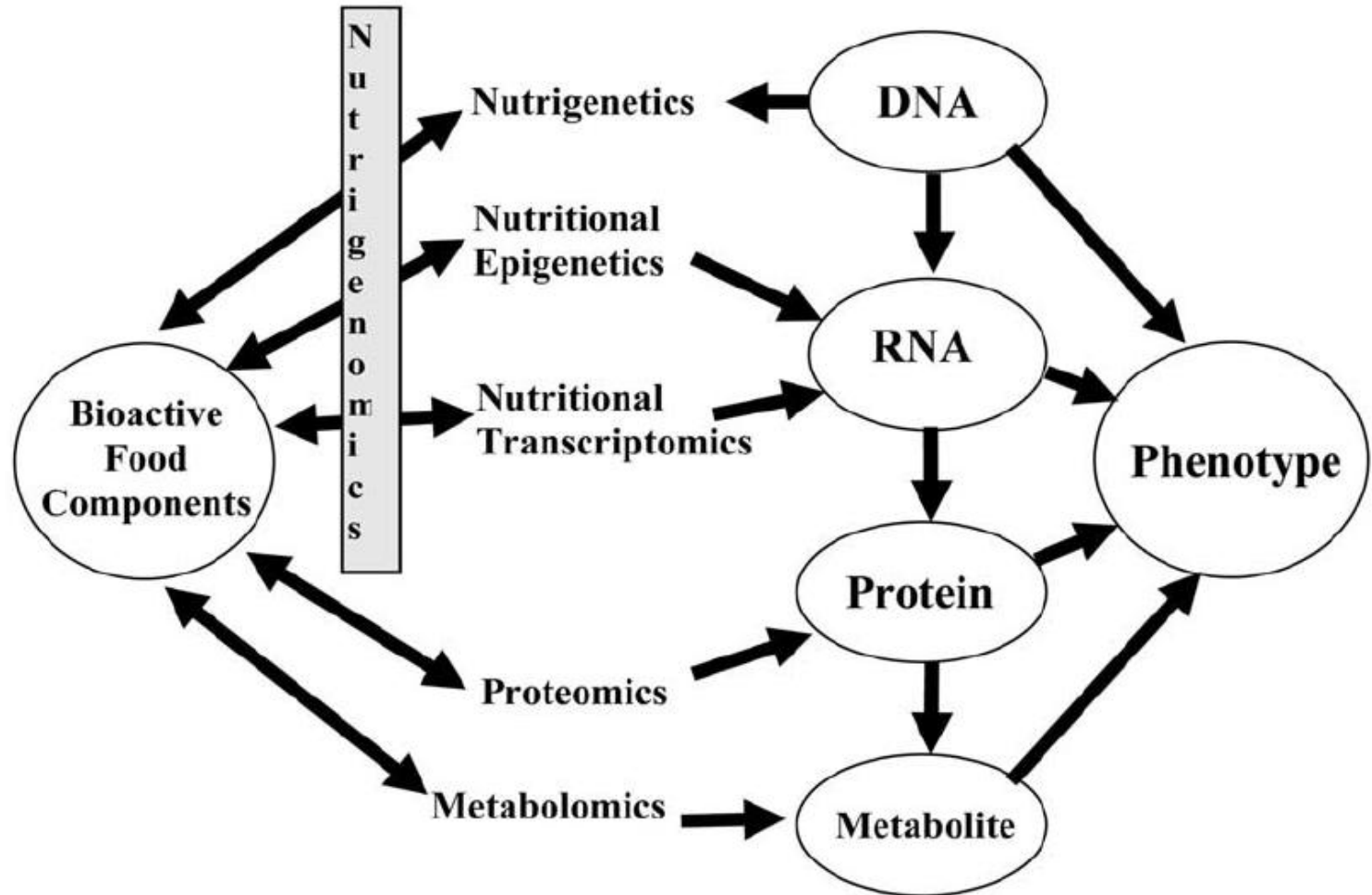
- Výživa a její složky mohou měnit riziko vývoje onemocnění modulací mnoha procesů souvisejících s počátkem, incidencí, progresí a vážností onemocnění
- Složky výživy působí na lidský genom přímo nebo nepřímo a mění expresi genů a jejich produktů
- výživa by mohla kompenzovat nebo zvýrazňovat účinky genetických polymorfismů
- důsledky výživy závisejí na rovnováze zdraví a nemoci a na genetickém pozadí jedince

Úzké propojení s proteomikou a metabolomikou – identifikace molekulárních cílů pro nutriční doporučení. Inovativní technologie (microarrays, high-throughput analysis, RNA interference, nanotechnologie)

Synergie s farmakogenomikou – získání masivních dat pro zvýšení biologické komplexnosti vyvíjených léčiv a výživových doporučení pro budoucí medicínu.

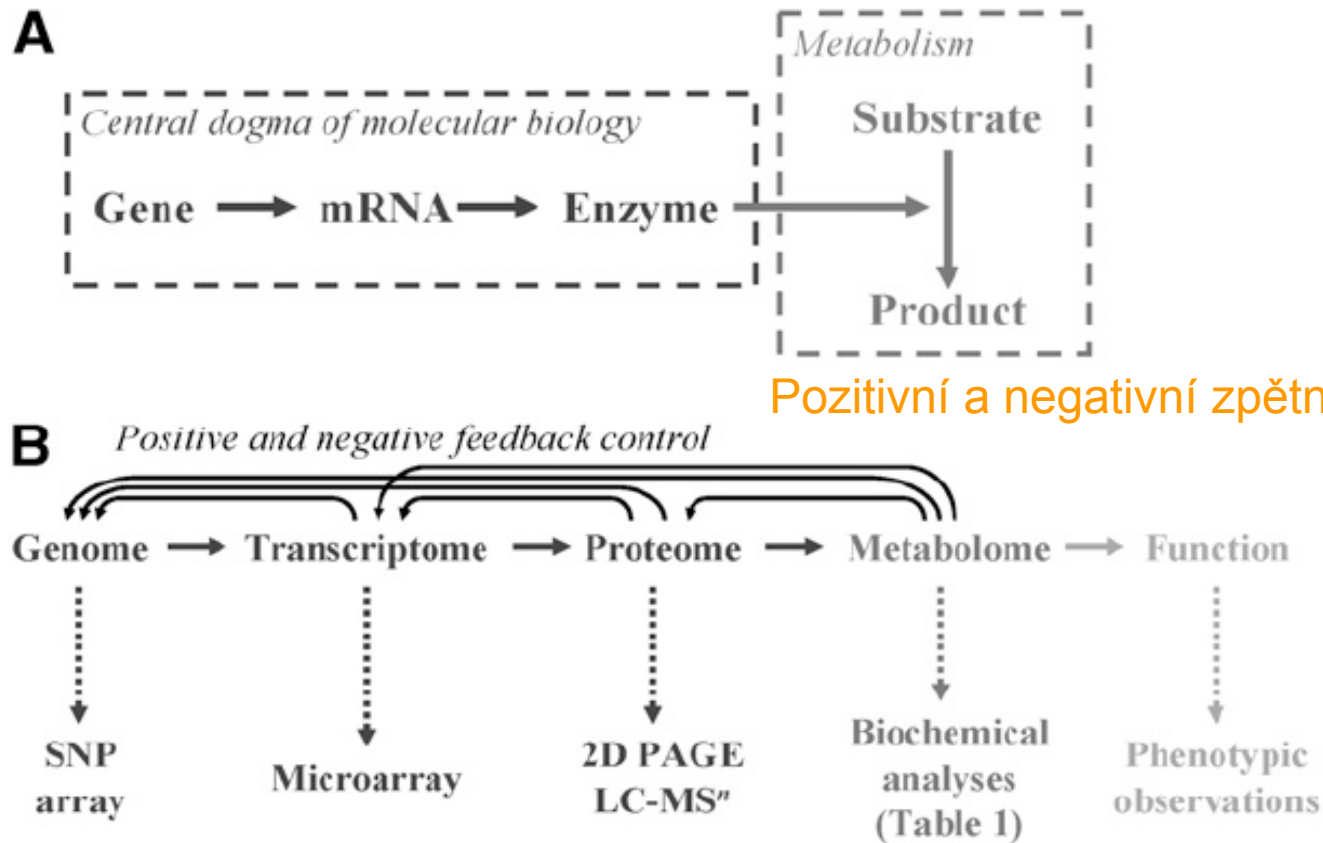


# OMICS, farmakogenomika, nutrigenomika



Using the “omics” of nutrition to identify how dietary factors contribute to establishing a phenotype.

# Tradiční dogma molekulární biologie vs. pojetí zahrnující „omics“



Pozitivní a negativní zpětná vazba!!!

**Figure 1** (A) Traditional central dogma of molecular biology where the flow of information goes from gene to transcript to protein; also shown are sites where enzymes act on metabolism. (B) General schematic of the 'omic organization where the flow of information is from genes to transcripts to proteins to metabolites to function (or phenotype).



# Řada složek potravy ovlivňuje genetické a epigenetické děje a tak ovlivňuje zdraví

Jak esenciální (kalcium, zinek, selen, folate, vitamíny) tak neesenciální složky potravy významně ovlivňují zdraví.

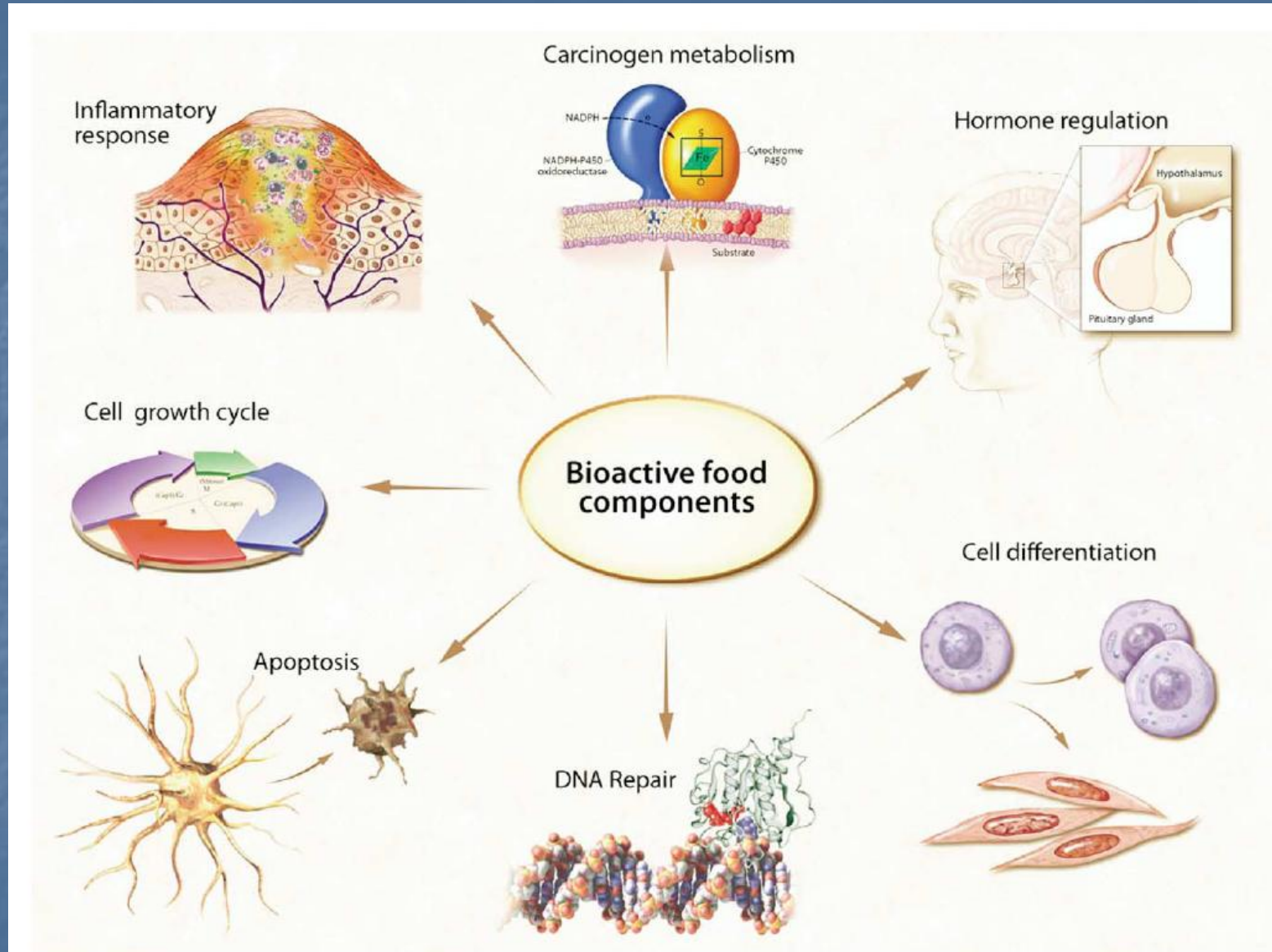
Modifikují řadu buněčných procesů spojených se zdravím a prevencí chorob včetně

metabolismu karcinogenů, hormonální rovnováhy, buněčného signálování, kontroly buněčného cyklu, apoptózy, angiogeneze atd. jedna bioaktivní složka může ovlivňovat současně několik procesů.

Revoluce v genetice a vznik „omics“ poskytují nový pohled na řadu hledisek zdraví včetně úlohy výživy v prevenci chorob.

Rychle se vyvíjející analytické metody a informační technologie umožňují identifikaci a validaci molekulárních cílů bioaktivních složek potravy a jejich vztah ke změnám fenotypu.

# Bioaktivní složky potravy ovlivňují genetické i epigenetické děje v buňkách, tkáních a organismu



**Figure 3.** Bioactive food components can influence genetic and epigenetic events associated with a host of disease processes.



# Důležité aspekty

## Interindividuální reakce na složky výživy

genové polymorfismy (malé rozdíly v sekvenci genů mezi jedinci), ovlivňují funkci a interakci proteinu.

**Polymorfismus** je označení pro stav, kdy v populaci existují pro určitý znak minimálně 2 genetické varianty (alely). Zároveň musí frekvence jeho výskytu přesahovat v populaci 1 %. Jestliže je procentuální výskyt menší, mluvíme o náhodném výskytu – mutaci.

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) – důležité pro rozdílnou reakci na složky potravy

Genetická odpověď na jednotlivé složky potravy se mezi jedinci liší

Např. selen – prevence nádorů jater kolonu, prostaty, plic

Genetická variabilita zodpovídá za nejednotnou odpověď různých jedinců (polymorfismus genu pro glutathion-peroxidázu – na selenu závislý antioxidační enzym).

Účinky kofeinu – rizikový faktor osteoporózy u starších žen – závisí na variantě receptoru pro vitamin D.

Více není vždy lépe! – zvýšený příjem některých složek potravy je škodlivý obecně

zvýšený příjem energie – nerovnováha – obezita – nemoci

Korelace BMI s řadou chorob včetně určitých typů rakoviny

Polymorfismy pro proliferator-activated receptors (PPARs) – regulují expresi genů

zahrnutých ve skladování a metabolismu tuků – vliv poměru nasycených a nenasycených mastných kyselin

## Reakce na kombinace potravin

kombinace některých složek potravy jsou účinnější než jednotlivé komponenty. Např. sója s čajem synergicky snižují PCA – antigen spojený s rakovinou prostaty.

## Nutriční epigenetika

Ovlivnění metylační struktury DNA – ovlivnění genové exprese. Některé dietetické faktory ovlivňují metylaci DNA a naopak metylační vzorec DNA ovlivňuje reakci na bioaktivní složky potravy.

Bioaktivní složky modifikují nejen samotnou DNA, ale ovlivňují i transkripci (transcriptom) a translaci (vitamíny, minerály, fytochemikálie, makronutrienty) – výsledné změny metabolismu, buněčného růstu, diferenciaci – význam pro rozvoj nemocí.

DNA microarrays – detekce transkripce tisíců genů

Nebezpečí nesprávné interpretace, je nutné uvažovat kvantitu a délku expozice – organismus se adaptuje

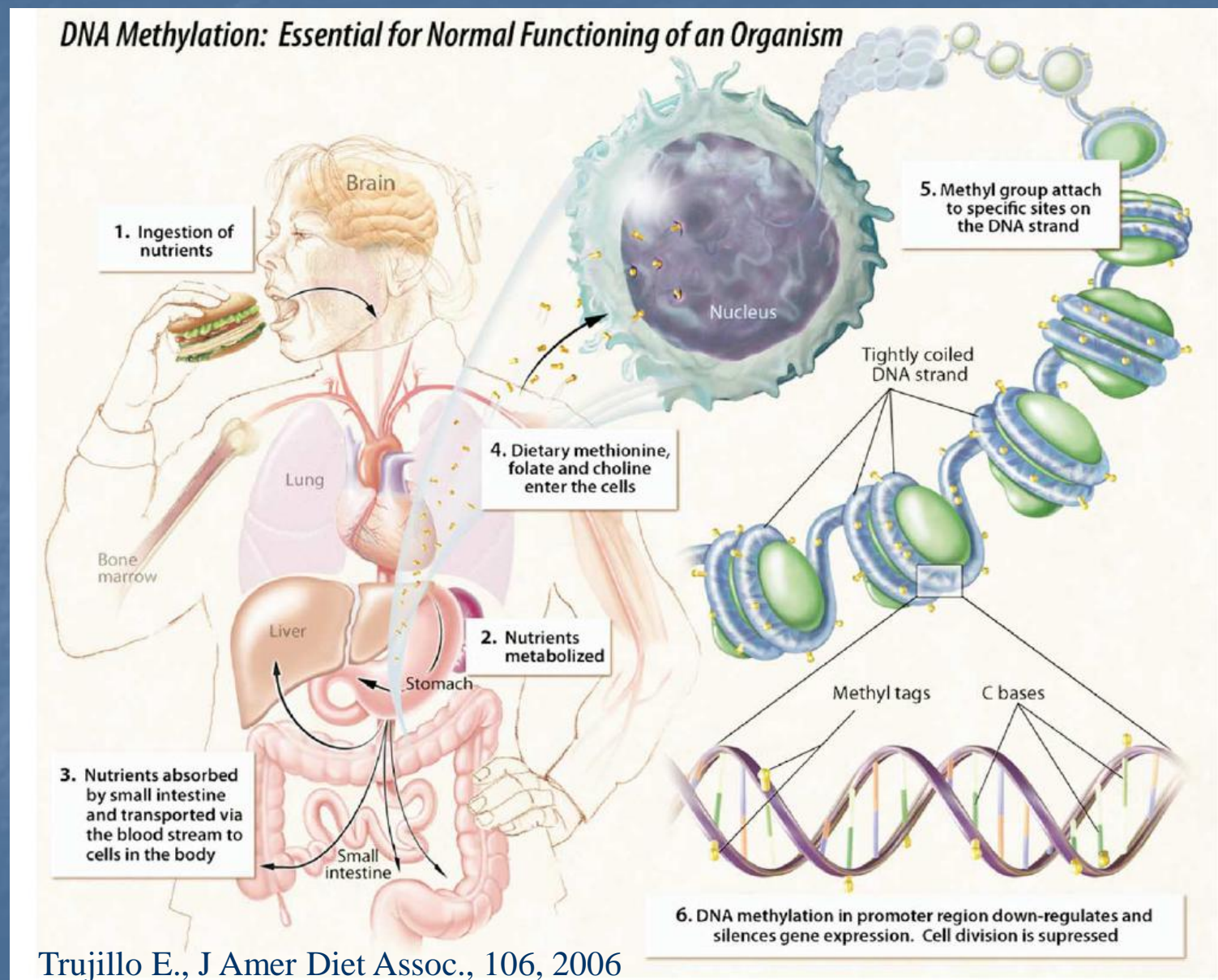
RNA interference – blokuje expresi určitého genu – identifikace genů regulujících zásoby a metabolismus tuků

Modely knock-out myší

Další „omics“ – proteomics – úroveň translace – abnormální struktury proteinů

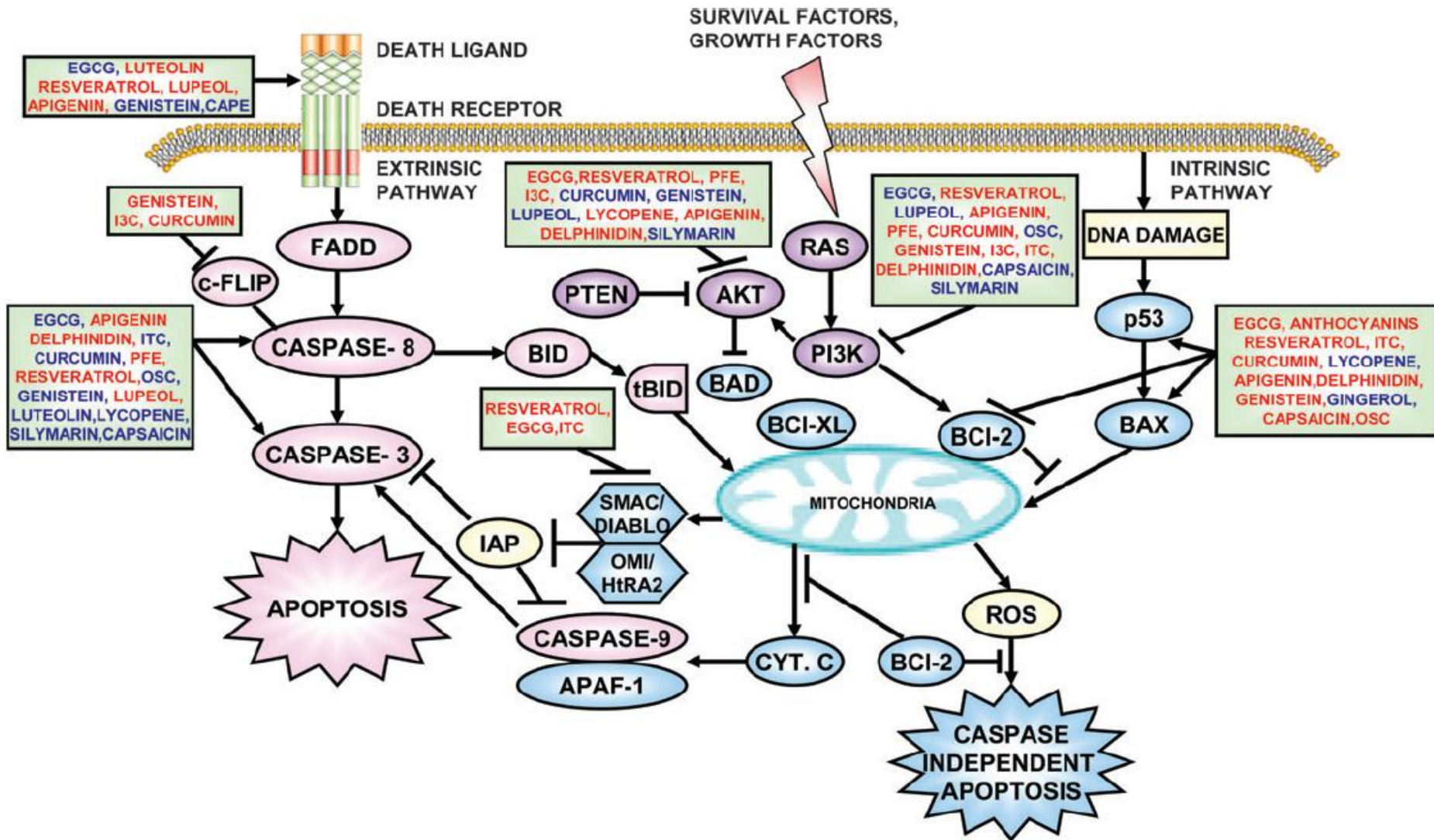


# Ovlivnění exprese genů složkami potravy prostřednictvím metylace DNA (epigenetické mechanismy)





# Apoptóza indukovaná dietetickými faktory



**Fig. 1.** Induction of apoptosis by dietary chemopreventive agents. The extrinsic pathway is initiated by ligation of transmembrane death receptors (CD95, TNF receptor and TRAIL receptor) to activate membrane-proximal (activator) caspase-8 via the adaptor molecule FADD. This in turn cleaves and activates effector caspase-3. Dietary agents block the death receptor and also target the caspases blocking the caspase cascade. This pathway can be regulated by c-FLIP, which inhibits upstream activator caspases and IAPs, that affects both activator and effector caspases. The intrinsic pathway requires disruption of the mitochondrial membrane and the release of mitochondrial proteins into the cytoplasm. Stress signals elicited by the dietary chemopreventive compounds regulate the proapoptotic proteins and antiapoptotic proteins, leading to the release of cytochrome *c* from the mitochondrial inner membrane. Cytochrome *c* forms an apoptosome with Apaf-1 and caspase-9, thereby initiating the apoptotic caspase cascade, whereas Smac/DIABLO and high-temperature requirement protein-A2 bind to and antagonize IAPs. The activated caspases catalyze the dissolution of intracellular structure that leads to apoptotic cell death. The Bcl-2 family proteins regulate apoptosis as they form complexes that enter the mitochondrial membrane, regulating the release of cytochrome *c* and other proteins. The activation of the caspase cascade occurs by the TNF family receptor and it also causes activation of Bid that activates mitochondria-mediated apoptosis. Bax is activated and releases cytochrome *c* and other mitochondrial proteins. Dietary agents can also block growth factor-mediated antiapoptotic signals through the direct inhibition of the binding of growth factors to the receptor or inhibition of the downstream phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt pathway. Blue color of dietary chemopreventive agents denotes that both the *in vivo* and *in vitro* effects have been demonstrated and red color denotes that only *in vitro* effects have been

**Table I.** Dietary agents shown to induce apoptosis of cancer cells *in vitro* or during chemopreventive intervention

Dietary agent	Major dietary source	Target/mechanism	References
EGCG	Green tea	Activation of Fas Enhancement of TRAIL-induced apoptosis Activation of caspases Release of cytochrome <i>c</i> from mitochondria, inhibition of Bcl-2 Reduction in tumor growth and increase in apoptotic markers in mice	(16) (20) (34) (34, 35, 38) (34)
Curcumin	Turmeric	TRAIL-induced apoptosis, activation of caspases Release of cytochrome <i>c</i> from mitochondria Increase in the number of apoptotic tumor cells in mice	(18) (36) (61)
Genistein	Soybean	Degradation of c-FLIP Induced MMP change, caspase-3 activation and PARP cleavage	(24) (29)
Indole-3-carbinol	Cruciferous vegetables	Downregulation of Bcl-2 and Bcl-xL expression, activation of caspase-3 Downregulation of Bcl-2, Bcl-xL, IAP, X chromosome-linked IAP and FLIP Downregulation of survivin, IAP1, IAP2, X chromosome-linked IAP, Bcl-2, TNF receptor-associated factor 1 and c-FLIP	(40) (23, 25) (55)
Resveratrol	Grape, red wine	Release of cytochrome <i>c</i> from mitochondria, activation of caspases, induction of p53-dependent transcriptional activation Sensitizes TRAIL-induced apoptosis Decrease in survivin, increase in Smac/DIABLO	(15) (19) (63)
Isothiocyanates	Cruciferous vegetables	Activation of caspases Activation of p53 activity, induction of apoptosis in lung tissues, effect on AP-1 and p53	(39) (52)
Luteolin	Celery, green pepper and peppermint	Sensitizes TRAIL-induced apoptosis Induction of TRAIL, along with Bid cleavage and the activation of caspases Decrease in the expression of surviving	(21) (22) (56)
Lycopene	Tomato	Release of cytochrome <i>c</i> from mitochondria Effect on p53, activation of caspases, decrease in PCNA, increase in Bax	(33) (54)
Anthocyanins	Pomegranate	Bcl-XL downregulation, mitochondrial release of cytochrome <i>c</i> , activation of caspases Shift in the ratio of Bax to Bcl-2	(37) (43)
Delphinidin	Pigmented fruits and vegetables such as strawberry and pomegranate	PARP cleavage, nuclear condensation and fragmentation, induced MMP change Activation of caspases, increase in Bax, decrease in Bcl-2, upregulation of Bid, Bak, downregulation of Bcl-xL, inhibition of UVB-mediated apoptosis in mice	(31) (48)
Lupeol	Mango, olive and grape	Increase in the expression of Fas receptor and FADD, activation of caspases	(14)
Caffeic acid phenethyl ester	Honey	Fas activation, induction of p53, Bax and activation of caspases	(17, 68)
Apigenin	Parsley, celery and lettuce	Activation of caspases and PKCdelta	(41, 64)
Silymarin	Milk thistle	Activation of caspases and PARP cleavage Decrease in the apoptotic sunburn cells, increase in p53, p21	(42) (67)
Gingerol	Ginger	Induced MMP change, release of cytochrome <i>c</i> from mitochondria, downregulation of Bcl-2 and enhancement of Bax	(47)
Capsaicin	Red pepper	Dissipation of the mitochondrial inner transmembrane potential, activation of caspase-3, induced apoptosis of prostate tumor cells in nude mice Increase in protein expression of p53, p21 and Bax	(30) (46)
Organosulfur compounds	Garlic and onion	Induction of p53, Bax and downregulation of Bcl-2, cytochrome <i>c</i> release, activation of caspases	(49)

This list provides selected examples.

**Složky potravy indukující apoptózu nádorových buněk**



# DIETETICKÁ DOPORUČENÍ

**Zdraví a prevence chorob**  
(nedostatek a nadbytek potravy, správná  
výživa)

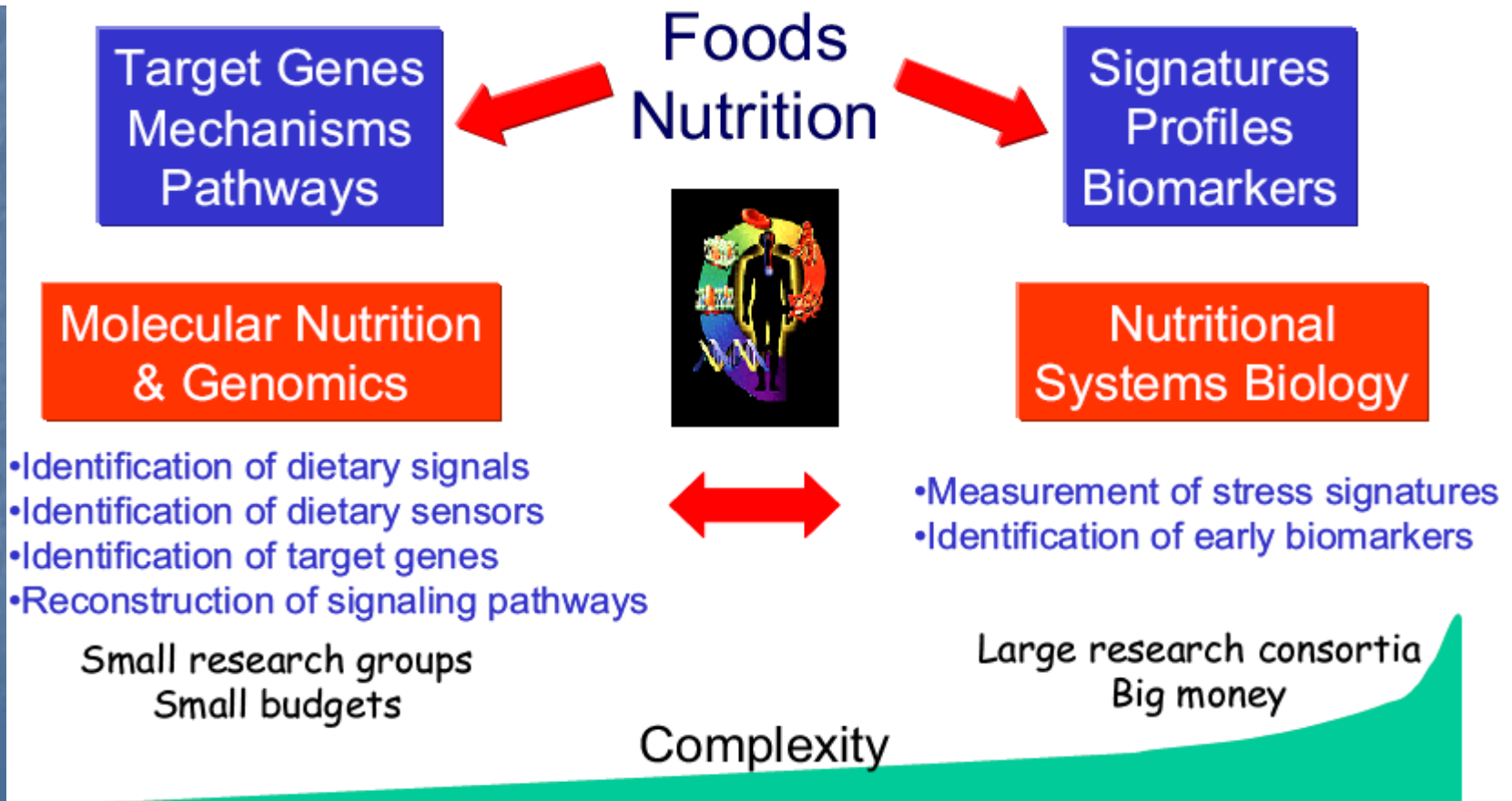
**Funkční potraviny**

**Potraviny pro zvláštní lékařské účely**  
**Terapeutické využití –nutriční farmakologie**  
(adjuvantní terapie, „disease specific  
nutrition“,  
nosiče léků)

**Parenterální a enterální výživa**

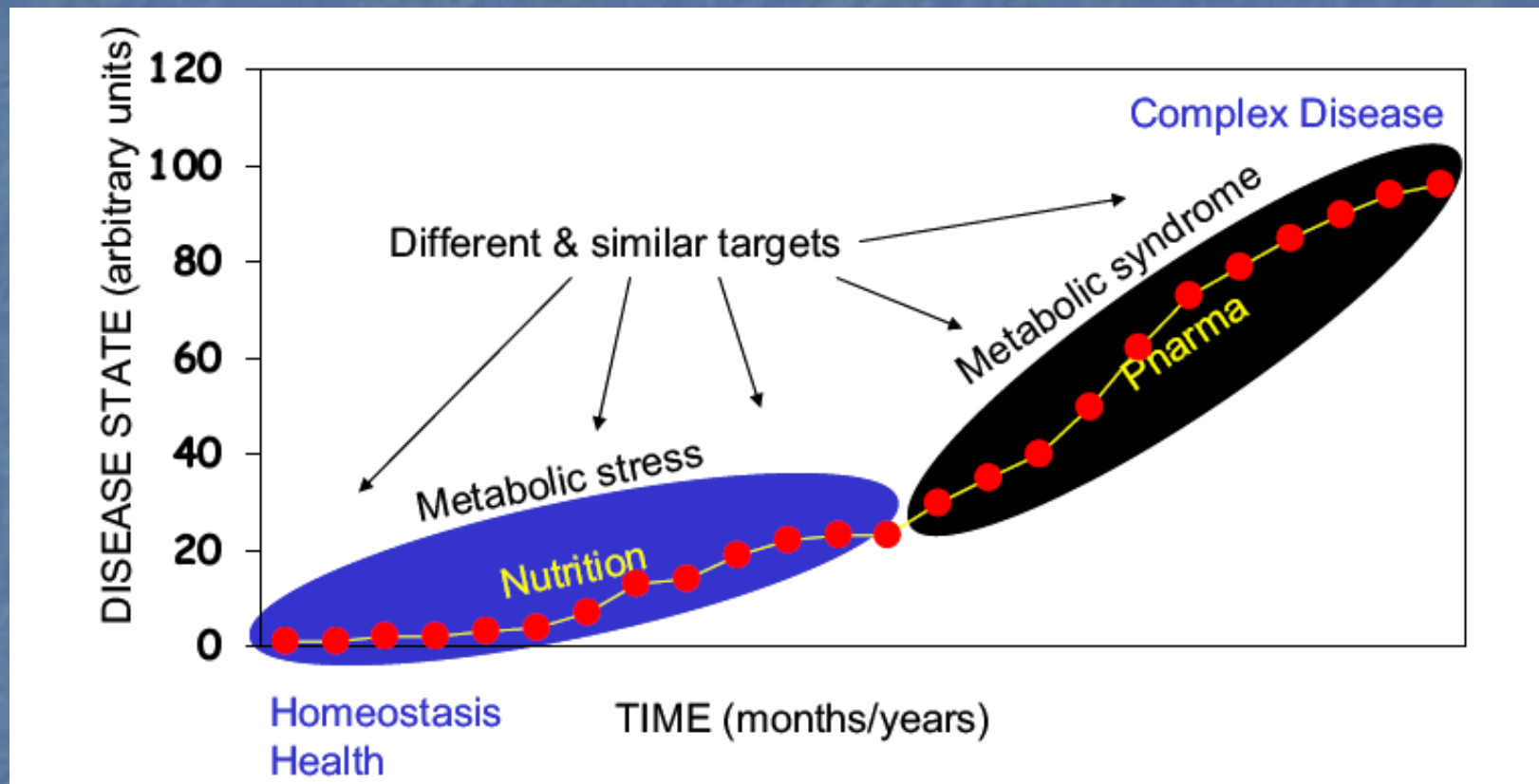
# Strategie nutrigenomického výzkumu

**Figure 3.** Two strategies of nutrigenomics research. The first strategy will provide detailed molecular data on the interaction between nutrition and the genome, whereas the second strategy might be important for human nutrition, given the difficulty of collecting tissue samples from healthy individuals. The first strategy, typically applied by smaller research groups, will reveal the identification of transcription factors that function as nutrient sensors and the genes they target; elucidation of the signaling pathways involved, and characterization of the main dietary signals; measurement and validation of cell- and organ-specific gene expression signatures of the metabolic consequences of specific micronutrients and macronutrients; elucidation of interactions between nutrient-related regulatory pathways and proinflammatory stress pathways, to understand the process of metabolic dysregulation that leads to diet-related diseases; and identification of genotypes that are risk factors for development of diet-related human diseases (such as diabetes, hypertension, or atherosclerosis) and quantification of their impact. The second strategy is the application of nutritional systems biology to develop biomarkers of early metabolic dysregulation and susceptibility (stress signatures) that are influenced by diet. This strategy requires large consortia, considerable research funding, and excellent multidisciplinary (and possible multinational) collaboration.





Vývoj komplexního, multifaktoriálního, polygenního onemocnění – metabolický syndrom  
Preventivní dietetické strategie – rané biomarkery  
Nutriční a farmakologická intervence se doplňují (společný molekulární cíl – např. PPAR)



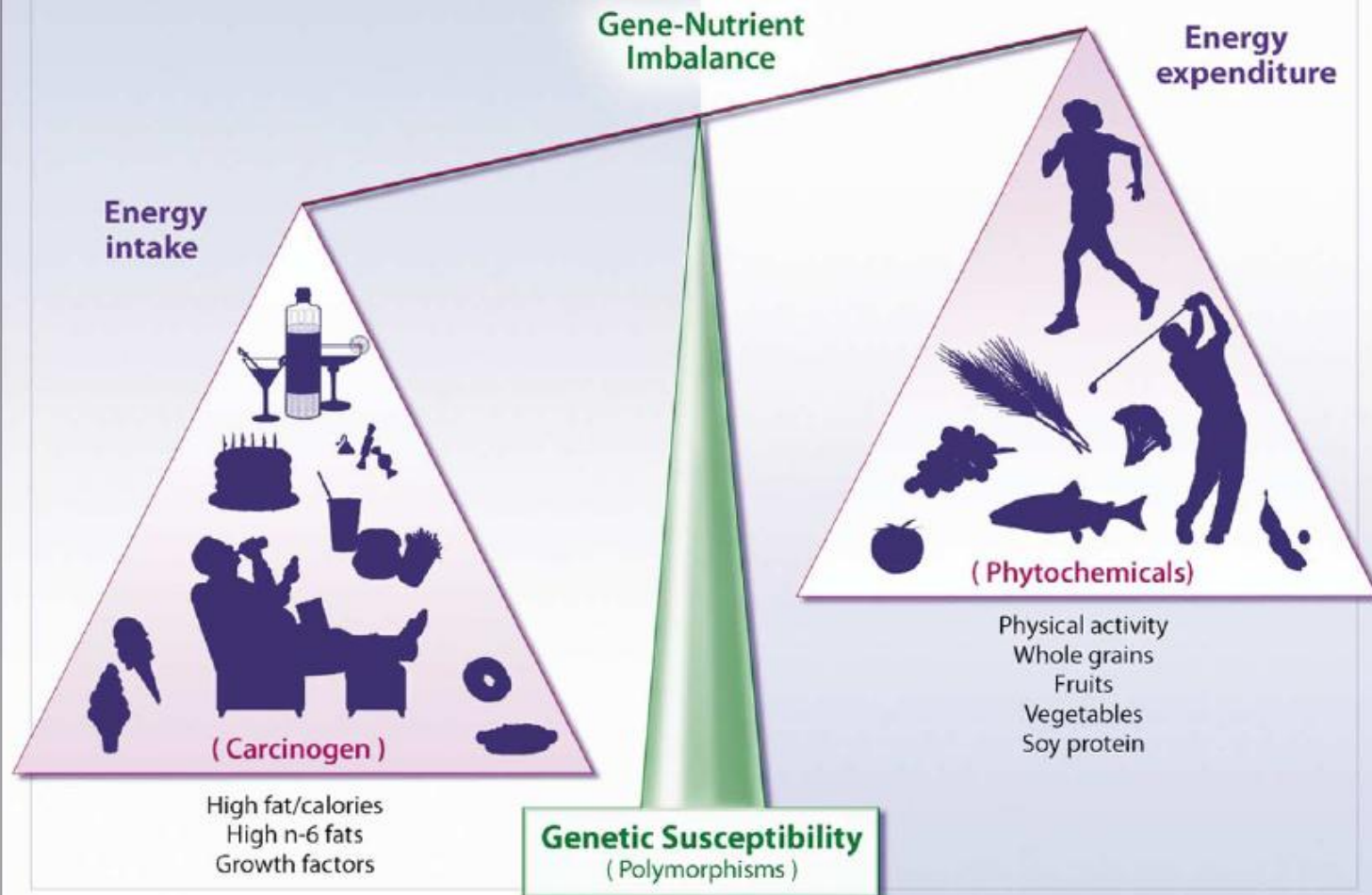
**Figure 2.** Development of complex, multifactorial, polygenic diseases, such as metabolic syndrome. Nutrition is primarily focused on health and on the earliest phases of disease pathology. In order to effectively apply dietary strategies to prevent disease or to recover homeostasis, validated early biomarkers of the disease state are needed. Nutrition and pharma (pharmacology) are complementary approaches to apply to metabolic stress or metabolic syndrome. Interestingly, there is considerable overlap between cellular targets for nutritional and pharmacological intervention, such as peroxisome proliferator activator receptor- $\alpha$  or peroxisome proliferator activator receptor- $\gamma$ , which bind fatty acids and fibrates or fatty acids and thiazolidinediones, respectively.

## Chemopreventivní látky mohou být různého původu

Nutrient group	Example
Phytochemicals	Carotenoids, flavonoids, indoles, isothiocyanates, allyl sulfur
Zoochemicals	Conjugated linoleic acid, n-3 fatty acids
Fungochemicals	$\beta$ -glucans, lentinan, schizophyllan, and other compounds in mushrooms
Bacteriochemicals	Equol, butyrate, and other compounds formed from gastrointestinal flora fermentation

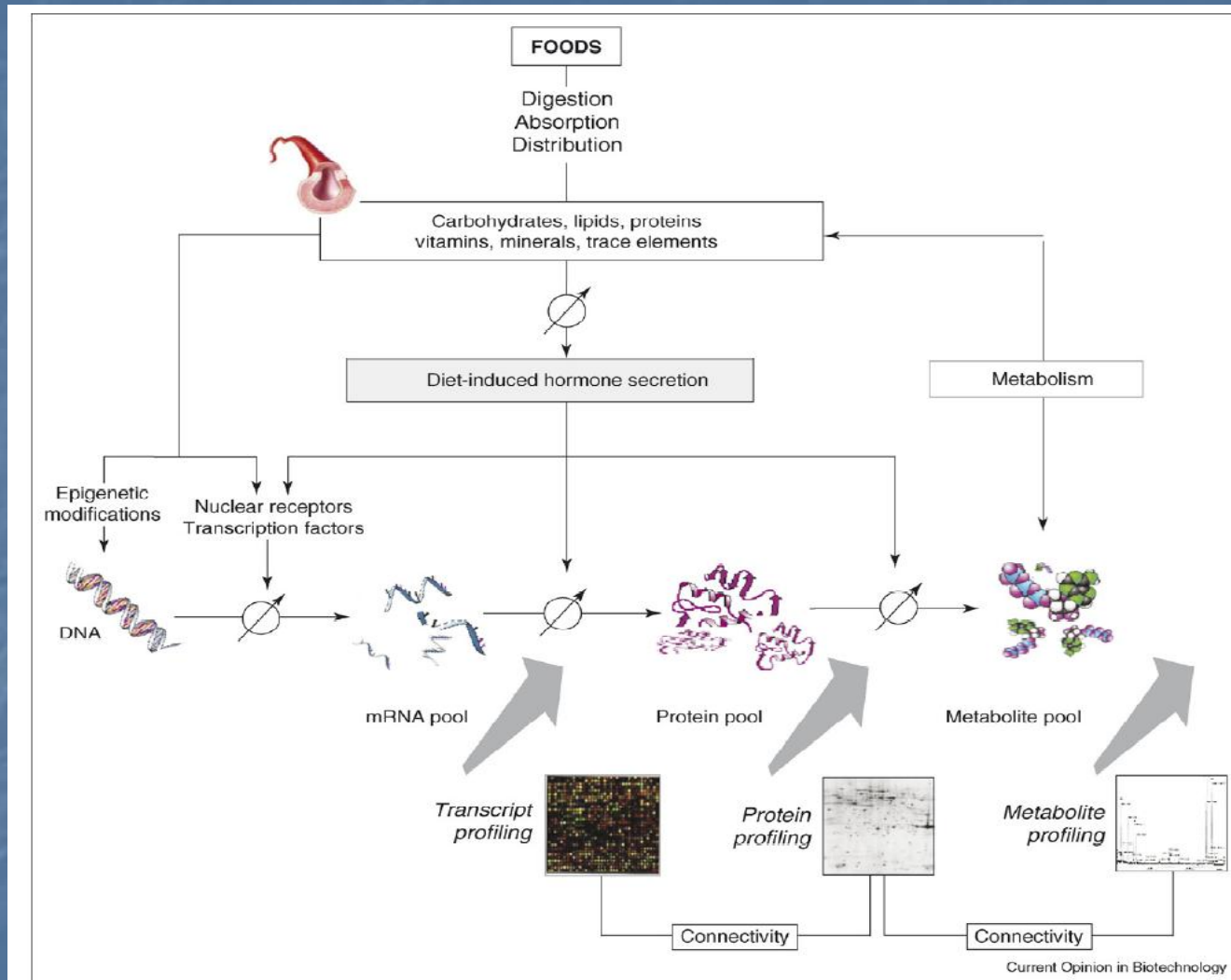
# Vztah genetického polymorfismu a rovnováhy příjmu a výdeje energie (ovlivnění bioenergetického metabolismu a obezity)

Trujillo E., J Amer Diet Assoc., 106, 2006



**Figure 4.** Certain genetic polymorphisms can shift the balance of energy intake and energy expenditure and thereby influence bioenergetics and obesity. Higher energy intakes, a low polyunsaturated-to-saturated fat ratio, insulin resistance, and a sedentary lifestyle leading to obesity are risk factors for chronic diseases, such as heart disease, diabetes, and cancer, depicted when the scale is sloping downward. The right side of the scale portrays lifestyle including physical activity and a diet rich in whole grains, fruits, vegetables, and soy protein, which are associated with less risk for obesity and chronic disease. Gene-nutrient imbalances may explain the morbidity and mortality associated with obesity.

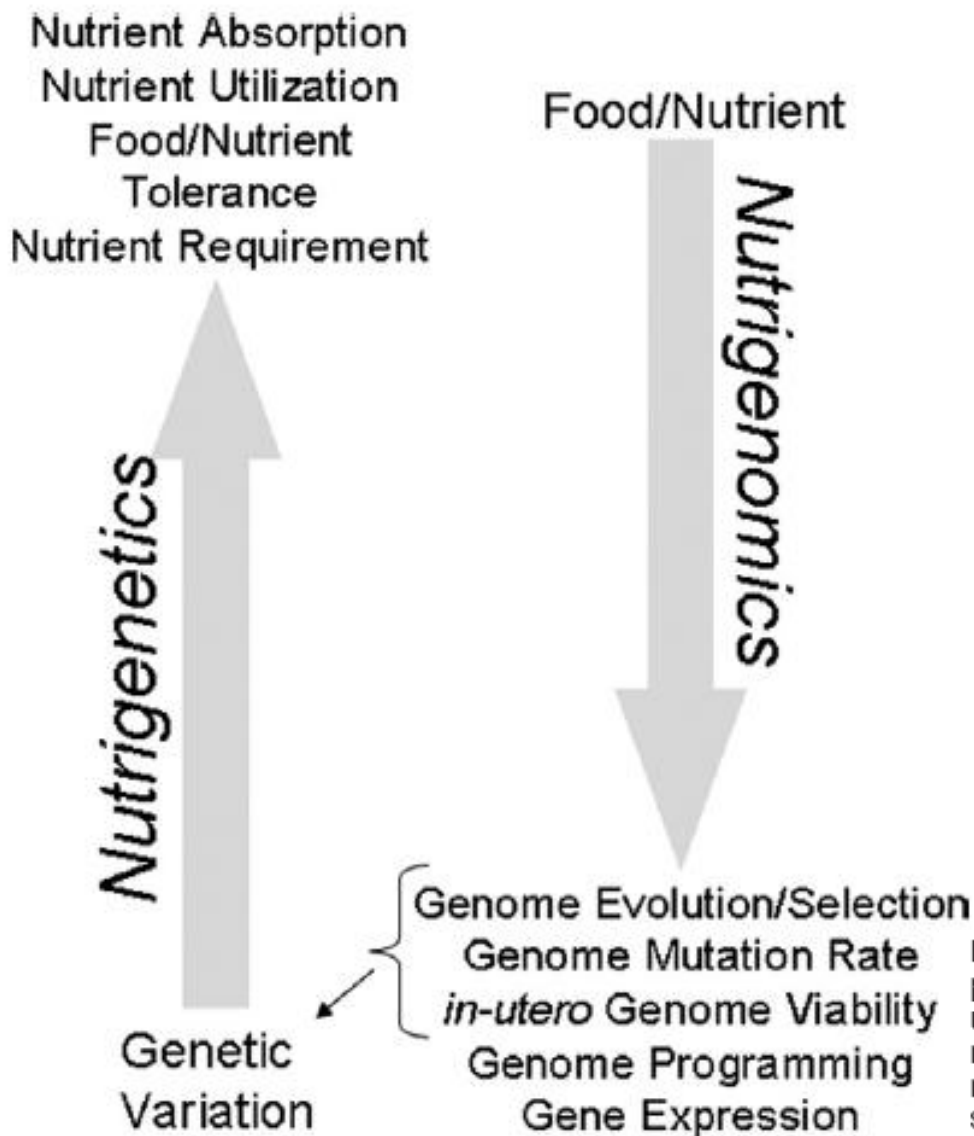
# Makro- a mikronutrienty působí změny na úrovni RNA, proteinů a metabolitů v buňkách a organismu detekovatelné novými technologiemi



Foods are digested, absorbed and distributed in the body. Food stuffs contain macronutrients (carbohydrates, lipids and proteins) and micronutrients (vitamins, minerals, trace elements). These nutrients induce changes at RNA, protein and metabolite level in the receiving cell or organism. The corresponding profiling technologies, namely transcriptomics (gene expression analysis), proteomics (protein expression analysis) and metabolomics (metabolite profiling) are applied to better understand and assess these effects in a holistic fashion.



# Interakce živin a genomu



Nutrigenetika  
vliv genetických variant na  
požadavek, utilizaci, toleranci a  
metabolismus živin

vs.

Nutrigenomika  
modulační úloha živin na evoluci  
genomu, frekvenci mutací, in-  
utero viabilitu

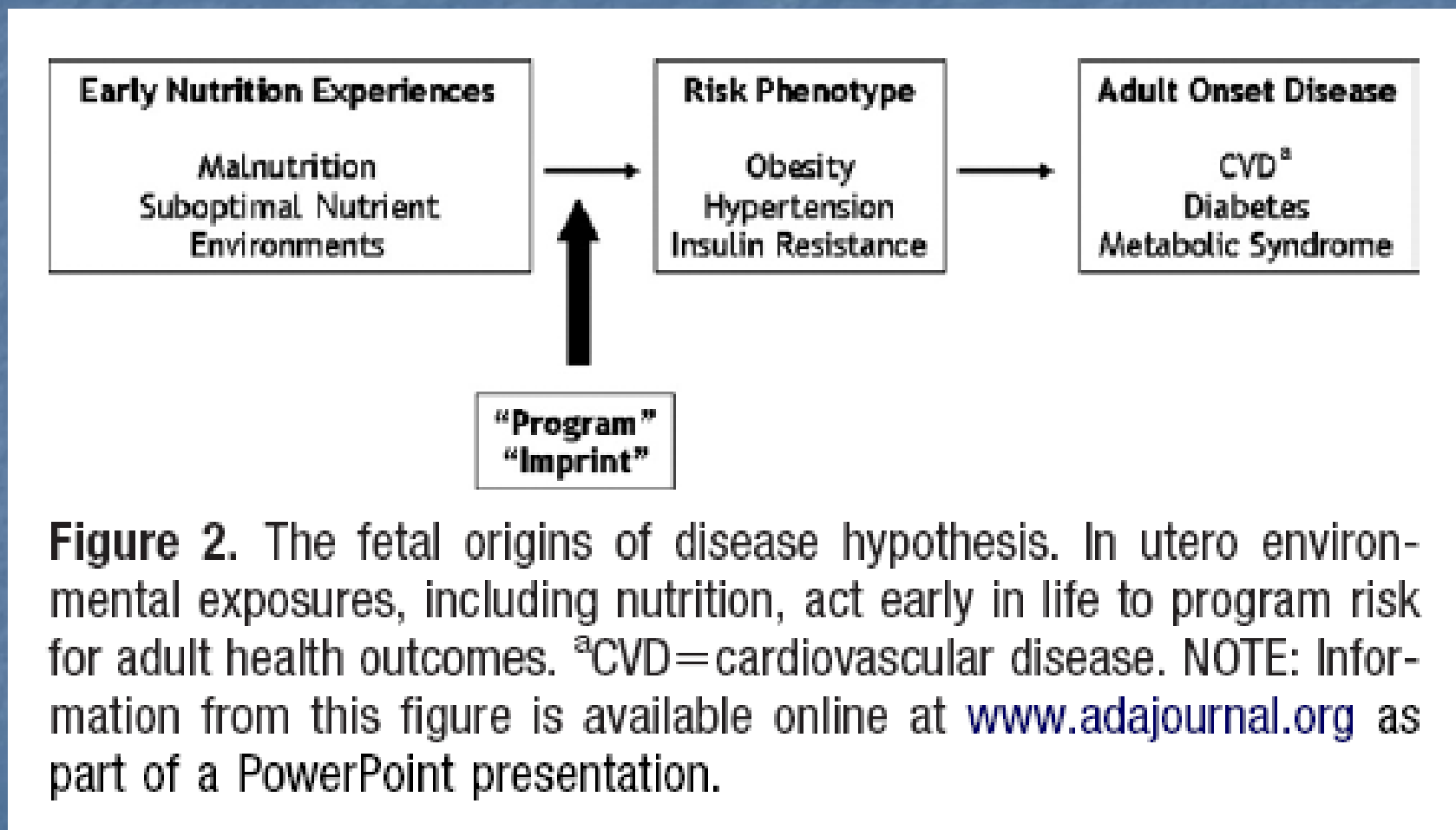
Nutrigenomika zpětně ovlivňuje  
genetické variace pozorované v  
různých lidských populacích

**Figure 1.** Nutrient-genome interactions. Nutritional genomics encompasses both nutrigenetics, the influence of genetic variation on nutrient utilization/metabolism, food tolerances, and nutrient requirements; and nutrigenomics, the modulatory role of nutrients on genome evolution, mutation rate, in-utero viability, programming, and expression. In turn, several of the nutrigenomic outcomes (ie, genome evolution) contribute to the genetic variation observed within genetically diverse human populations. NOTE: This figure is available online at [www.adajournal.org](http://www.adajournal.org) as part of a PowerPoint presentation.



## Vznik rizikového fenotypu a onemocnění

Ovlivnění *in utero* (včetně výživy) může ovlivnit pozdější riziko a náchylnost k onemocnění



# Farmakogenomika

Farmakologický přístup beroucí v úvahu genotyp pacienta.  
S využitím genomových technik zkoumá funkčnost léčiv a odhaluje jejich nové cíle  
genetické „high-throughput“ techniky

Cílem je individualizace léčby – účinnější terapie

**Interakce mezi léčivy a složkami potravy!!!**

# XENOBIOTIKA

Látky z vnějšího prostředí, které nejsou tělu vlastní  
Metabolizace, detoxifikace (játra)

Léčiva mohou interferovat s absorpcí, trávením,  
metabolismem, utilizací a exkrecí živin.

Naopak nutriční stav a výživa může ovlivnit významně  
působení léků změnou jejich metabolismu a funkce.

Navíc, řada složek potravy vykazuje farmakologické aktivity za určitých  
podmínek. Např. grapefruit interaguje s řadou léků, warfarin s  
vitaminem K.

Vysoké dávky složek výživy mají farmakologické účinky (niacin,  
retinoidy, vitamin A).

Naopak jsou využívány nízké koncentrace přírodních látek (v podstatě  
toxických) jako součást léčiv.

**„Tell me what you eat, and I will tell you what you are“ (J. A. Brillat-Savarin (1775-1826))**

**„Tell me what you eat, what drugs you take, and your genotype, and I will tell you what you are“ .**

<http://www.dietandcancerreport.org/>

<http://www.wiley.com/bw/journal.asp?ref=0029-6643&site=1>

<http://www.eatright.org/>

<http://www.aicr.org/site/PageServer>

[http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa\\_locale-1178620753812\\_ScientificDocuments.htm](http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_ScientificDocuments.htm)