



ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ανίχνευση Καζεϊνών Αγελαδινού Γάλακτος σε Μητρικό Γάλα με τη
Μέθοδο ELISA

Σουζάνα Βρέλλου – Μάριος Γκίνης

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Δήμητρα Χούχουλα

Αθήνα
Σεπτέμβριος 2021

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΩΝ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι κάτωθι υπογεγραμμένοι Βρέλλου Σουζάννα του Μιχαήλ με αριθμό μητρώου 17011 και Γκίνης Μάριος του Ιωάννη με αριθμό μητρώου 17014 φοιτητές του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, δηλώνουμε υπεύθυνα ότι:

«Είμαστε συγγραφείς αυτής της διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχαμε για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες κάναμε 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, βεβαιώνουμε ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από εμάς αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μας, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μας ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση των πτυχίων μας».

Η Δηλούσα

Βρέλλου Σουζάννα



Ο Δηλών

Γκίνης Μάριος



ΜΕΛΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η πτυχιακή εργασία αξιολογήθηκε από την κάτωθι εξεταστική επιτροπή:

A/A	ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ	ΒΑΘΜΙΔΑ	ΥΠΟΓΡΑΦΗ
1	Χούχουλα Δήμητρα	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια	
2	Ζουμπουλάκης Παναγιώτης	Αναπληρωτής Καθηγητης	
3	Αντωνόπουλος Διονύσιος	Εργαστηριακό Διδακτικό Προσωπικό	

Θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε την επιβλέπουσα καθηγήτρια κ. Χούχουλα για την ευχάριστη συνεργασία και την πολύτιμη βοήθειά της. Επιπλέον ευχαριστούμε τον κ. Ζουμπουλάκη για την προσφορά ενός αριθμού δειγμάτων που ήταν πολύ χρήσιμα για την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
2. ΑΛΛΕΡΓΙΑ	10
2.1. Τροφική Αλλεργία	10
2.2. Αλλεργία στο Γάλα	13
3. ΜΗΤΡΙΚΟ ΓΑΛΑ	14
3.1. Σύνθεση Μητρικού Γάλακτος.....	15
3.1.1. Λίπος.....	15
3.1.2. Υδατάνθρακες	16
3.1.3. Πρωτεΐνες.....	17
3.1.4. Αντισώματα στο μητρικό γάλα.....	18
3.1.5. Βιταμίνες	18
3.1.6. Μέταλλα & Ιχνοστοιχεία	19
3.2. Επίδραση του Θηλασμού στην Ανάπτυξη Τροφικών Αλλεργιών.....	20
4. ΑΠΕΚΚΡΙΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΓΕΛΑΔΙΝΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΣΤΟ ΜΗΤΡΙΚΟ ΓΑΛΑ.....	23
5. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΛΛΕΡΓΙΟΓΟΝΩΝ ΣΤΟ ΓΑΛΑ	27
5.1. Μέθοδοι Ανίχνευσης Αλλεργιογόνων στο Γάλα	28
5.1.1. SDS- PAGE.....	29
5.1.2. HPLC.....	29
5.1.3. ELISA	30
6. ΣΚΟΠΟΣ	31
7. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	32
7.1. Αντιδραστήρια, Υλικά & Όργανα.....	33
7.2. Πειραματική Πορεία.....	35
7.3. Προσομοίωση Συνθηκών Στομαχίου.....	38
7.3.1. Αντιδραστήρια, Υλικά & Όργανα.....	39
7.3.2. Πειραματική Πορεία.....	40

8.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	42
8.1.	Ανίχνευση Καζεΐνων Αγελαδινού Γάλακτος σε Δείγματα Μητρικού Γάλακτος	42
8.1.1.	ΠΕΙΡΑΜΑ 1.....	44
8.1.2.	ΠΕΙΡΑΜΑ 2.....	46
8.1.3.	ΠΕΙΡΑΜΑ 3.....	48
8.1.4.	ΠΕΙΡΑΜΑ 4.....	50
8.1.5.	ΠΕΙΡΑΜΑ 5.....	52
8.1.6.	ΠΕΙΡΑΜΑ 6.....	54
8.2.	Προσομοίωση Συνθηκών Στομαχιού.....	56
9.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	58
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	60

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η απέκκριση πρωτεϊνών προερχόμενων από το αγελαδινό γάλα, στο μητρικό γάλα, ικανών να προκαλέσουν αλλεργικές αντιδράσεις στα βρέφη, αποτελεί μέχρι σήμερα αμφιλεγόμενο ζήτημα, παρά την πληθώρα μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί πάνω στο θέμα, παλαιότερα αλλά και από την σύγχρονη επιστήμη. Δεδομένου ότι οι καζεΐνες και η β-λακτοσφαιρίνη, εκ των πρωτεϊνών του ορού, έχουν αναγνωρισθεί ως οι πλέον αλλεργιογόνες πρωτεΐνες του αγελαδινού γάλακτος, προχωρήσαμε στην ανάλυση 42 δειγμάτων μητρικού γάλακτος προερχόμενων από διαφορετικές μητέρες, οι οποίες καταναλώνουν γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα στη διατροφή τους. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ELISA τύπου sandwich. Σκοπός ήταν ο έλεγχος των δειγμάτων για την παρουσία καζεϊνών αγελαδινού γάλακτος. Τα ευρήματα έδειξαν ότι από τα 42 δείγματα, μόνο 2 ήταν θετικά σε αγελαδινή καζεΐνη, με χαμηλές συγκεντρώσεις, αντιπροσωπεύοντας το 4,8% του συνόλου των δειγμάτων, ενώ στο 38,1% (16 από τα 42 δείγματα) εντοπίστηκαν μόνο ίχνη, με υψηλή αβεβαιότητα και πιθανότητα διασταυρούμενης αντίδρασης. Εκ του αποτελέσματος οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι το ενδεχόμενο απέκκρισης καζεϊνών αγελαδινής προέλευσης στο μητρικό γάλα, δεν μπορεί να αποκλειστεί, ωστόσο οι ποσότητες των αλλεργιογόνων είναι πολύ μικρές και δεν είναι γνωστό εάν είναι ικανές να προκαλέσουν αλλεργική απόκριση στα θηλάζοντα βρέφη.

ABSTRACT

The excretion of proteins derived from cow milk, which are capable of causing allergic reaction to infants, into breast milk, is still a controversial issue, despite the number of studies that have been conducted on the subject, both in the past and in modern science. Since caseins and β -lactoglobulin, of serum proteins, have been identified as the most allergenic cow milk proteins, we have analyzed 42 samples of breast milk deriving from different mothers, who consume milk and dairy products in their diet. The method we used is ELISA, sandwich type. Our purpose was to test these samples for the presence of bovine casein proteins. The findings showed that only 2 out of the 42 samples were positive in bovine casein, in low concentrations, representing 4.8% of the samples, while in 38.1% (16 out of the 42 samples) only traces were found, with high uncertainty and possibility of cross-reaction. In conclusion, the possibility of excretion of bovine casein proteins into breast milk, cannot be ruled out, however the amounts of allergens found were very low and it is not known whether they are enough to cause allergic responses in breastfed infants.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ανίχνευση αλλεργιογόνων συστατικών σε τρόφιμα και προϊόντα τροφίμων έχει πρόσφατα λάβει μεγάλη προσοχή από τη βιομηχανία τροφίμων, αλλά και από τις νομοθετικές υπηρεσίες και τις υπηρεσίες ελέγχου. Οι αλλεργίες που συνδέονται με τις διατροφικές συνήθειες, ωστόσο, απασχολούν εδώ και πολλά χρόνια την επιστημονική κοινότητα, καθώς αφορούν ένα σημαντικό αριθμό ανθρώπων, ενώ πολύ συχνή είναι η εκδήλωσή τους στην παιδική ηλικία. Μάλιστα, τις τελευταίες δύο δεκαετίες η εμφάνισή τους παρουσιάζεται αυξημένη.

Στο πέρασμα των χρόνων έχουν καταγραφεί πολλά περιστατικά αλλεργικών αντιδράσεων με ανεπιθύμητα συμπτώματα σε θηλάζοντα βρέφη, ακόμη και σε περιπτώσεις που ο θηλασμός είναι αποκλειστικός. Το γεγονός αυτό έχει οδηγήσει τους επιστήμονες, γιατρούς και ερευνητές, στο συμπέρασμα ότι οι ουσίες που προκαλούν τις αλλεργικές αποκρίσεις πρέπει να βρίσκονται και στο μητρικό γάλα. Αυτό σημαίνει ότι με κάποιο τρόπο οι ουσίες αυτές μπορούν και μεταναστεύουν από το γαστρεντερικό σύστημα, στους γαλακτοφόρους αδένες και συνεπώς στο γάλα της μητέρας. Ανάμεσα στις ουσίες που έχουν κατηγορηθεί αρκετά είναι οι καζεΐνες, καθώς και κάποιες από τις πρωτεΐνες ορού του αγελαδινού γάλακτος, όπως η β-λακτοσφαιρίνη και η α-λακταλβουμίνη, εξαιτίας της γνωστής αλλεργιογόνου δράσης τους.

Λόγω της μεγάλης σημασίας του μητρικού γάλακτος για την φυσιολογική και υγιή ανάπτυξη των βρεφών κατά την αρχή της ζωής τους, το θέμα αυτό έχει ερευνηθεί αρκετά. Ωστόσο, τα αποτελέσματα των ερευνών που πραγματοποιούνται εδώ και μερικές δεκαετίες, άλλοτε είναι αμφιλεγόμενα, και άλλοτε έρχονται σε σύγκρουση μεταξύ τους. Εδώ και πολλά χρόνια θεωρείται δεδομένο ότι οι πρωτεΐνες διασπώνται πλήρως στο στομάχι, πριν συνεχίσουν την πορεία τους στον ανθρώπινο οργανισμό. Κάποιες έρευνες όμως, δείχνουν ότι ίσως αυτή η θέση να μην αποτελεί αδιαμφισβήτητο γεγονός. Για τους παραπάνω λόγους, είναι απαραίτητη η περαιτέρω διερεύνηση του ζητήματος, τόσο βιβλιογραφικά όσο και πειραματικά, ώστε να

εντοπιστούν με βεβαιότητα οι ουσίες που ευθύνονται, και να καταστεί δυνατή η πρόληψη εμφάνισης των προαναφερθέντων αλλεργικών αντιδράσεων στα νεογνά.

2. ΑΛΛΕΡΓΙΑ

Ο όρος «αλλεργία» χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στο επιστημονικό περιοδικό *Münchener Medizinische Wochenschrift* στις 24 Ιουλίου 1906 από τον Clemens von Pirquet, παιδίατρο από τη Βιέννη, ως «ειδικά τροποποιημένη αντιδραστικότητα του οργανισμού». Σήμερα, η αλλεργία ορίζεται ως μια ανοσολογικά επαγόμενη, και ειδική σε αλλεργιογόνο, υπερευαισθησία. Η αλλεργία δεν αποτελεί η ίδια νόσο, αλλά έναν μηχανισμό που οδηγεί σε νοσηρές καταστάσεις (Ring, 2014).

2.1. Τροφική Αλλεργία

Το Εθνικό Ινστιτούτο Αλλεργίας και Μολυσματικών Ασθενειών των ΗΠΑ – National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) ορίζει την τροφική αλλεργία ως μία αρνητική επίδραση στην υγεία, που συμβαίνει αναπαραγώγιμα με την έκθεση σε ένα δεδομένο τρόφιμο (Sicherer et al., 2018). Οι τροφικές αλλεργικές αντιδράσεις εμφανίζονται ως αποτέλεσμα της αναγνώρισης των αλλεργιογόνων πρωτεϊνών από αντισώματα της, ειδικής για αλλεργιογόνα, ανοσοσφαιρίνης E (IgE) (van Hengel, 2007). Η IgE διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αντίδραση υπερευαισθησίας τύπου I, που είναι γνωστή ως «αντίδραση άμεσης υπερευαισθησίας».

Το ανοσοποιητικό σύστημα των ασθενών με αλλεργία στα τρόφιμα έχει αναπτύξει υπερευαισθησία κατά την ευαισθητοποίηση σε αλλεργιογόνο τρόφιμο και έτσι έχει ωθήσει το ανοσοποιητικό να αναγνωρίζει το αλλεργιογόνο στο μέλλον. «Ευαισθητοποίηση» καλείται η ανάπτυξη υπερβολικής ευαισθησίας μετά από επαναλαμβανόμενη έκθεση σε αλλεργιογόνο. Επακόλουθη κατανάλωση του αλλεργιογόνου προκαλεί ανοσολογικές αντιδράσεις οι οποίες ποικίλουν όσο αφορά στη σοβαρότητα των εκδηλούμενων συμπτωμάτων, και κυμαίνονται από ήπια συμπτώματα, όπως κνίδωση, κνησμό, πρήξιμο χειλιών και λαιμού, δυσκολία στην αναπνοή, εμετό, διάρροια, έως σοβαρά, οδηγώντας σε αναφυλαξία που μπορεί να

περιλαμβάνει θανατηφόρα αναπνευστικά προβλήματα και σοκ (Taylor & Hefle, 2006).

Η τροφική αλλεργία αποτελεί μείζον πρόβλημα υγείας, με τη συχνότητα εμφάνισής της να έχει ανέλθει μάλιστα τις τελευταίες δεκαετίες από το 4%, στο 10% του πληθυσμού (Sicherer et al., 2018). Συναντάται πιο συχνά σε βρέφη και παιδιά, και αφορά περισσότερο δυτικού τύπου κοινωνίες.

Σύμφωνα με τον FDA (Food and Drug Administration) με τον νόμο περί επισήμανσης αλλεργιογόνων τροφίμων και προστασίας των καταναλωτών του 2004 (Food Allergen Labeling and Consumer Protection Act - FALCPA) που ψηφίστηκε από το Κογκρέσο, ως κύρια αλλεργιογόνα τροφίμων προσδιορίστηκαν τα εξής οκτώ τρόφιμα: γάλα, αυγά, ψάρια, οστρακοειδή, ξηροί καρποί, φιστίκια, σιτάρι και σόγια. Τον Απρίλιο του 2021, ο νόμος περί τροφικής αλλεργίας για την ασφάλεια, τη θεραπεία, την εκπαίδευση και την έρευνα (Food Allergy Safety, Treatment, Education, and Research - FASTER) υπογράφηκε, ανακηρύσσοντας το σουσάμι ως το 9^ο σημαντικό τροφικό αλλεργιογόνο που αναγνωρίστηκε από τις Ηνωμένες Πολιτείες.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι οι τροφικές αλλεργίες δεν πρέπει να συγχέονται με τις τροφικές δυσανεξίες. Όπως αναφέρθηκε ξανά προηγουμένως οι τροφικές αλλεργίες είναι ασυνήθεις ανοσολογικές αντιδράσεις σε ένα τρόφιμο ή συστατικό τροφίμου. Η εμπλοκή του ανοσοποιητικού συστήματος είναι αυτό που διαφοροποιεί τις τροφικές αλλεργίες από άλλους τύπους τροφικών ευαισθησιών (Poms et al., 2004).

Ενώ ερευνητικά γίνονται προσπάθειες ανάπτυξης στρατηγικών πρόληψης και θεραπείας, οι τροφικές αλλεργίες δεν μπορούν προς το παρόν να θεραπευτούν. Έτσι, προκειμένου να προστατευθούν τα άτομα με τροφικές αλλεργίες και να αποφευχθούν σημαντικές επιπτώσεις στην υγεία τους, θα πρέπει να έχουν επαρκή πληροφόρηση ώστε να καταστεί δυνατή η έγκαιρη αναγνώριση και αποφυγή των αλλεργιογόνων τροφίμων. Η επισήμανση των τροφίμων διαδραματίζει ιδιαίτερα κρίσιμο ρόλο στην προστασία των καταναλωτών με τροφικές αλλεργίες, καθώς τους παρέχει την πρόσβαση στις απαραίτητες πληροφορίες.

Ως εκ τούτου, απαιτούνται αναλυτικές μέθοδοι ικανές να ανιχνεύσουν και να ποσοτικοποιήσουν ίχνη αλλεργιογόνων στα τρόφιμα ώστε να προσδιορίσουν την παρουσία τους ως συστατικών ή ως διασταυρούμενους μολυσματικούς παράγοντες και να επαληθεύσουν τη συμμόρφωση με την επισήμανση. Είναι σημαντικό να αναφερθεί, ότι δεν έχει καθοριστεί κατώτερη ποσότητα αλλεργιογόνου πρωτεΐνης ή τροφίμου που δύναται να είναι επιβλαβής για έναν οργανισμό, εφόσον ακόμη και ίχνη μιας αλλεργιογόνου ουσίας είναι ικανά να προκαλέσουν αλλεργική απόκριση (Taylor & Hefle, 2005).

Ο αναλυτικός εντοπισμός ιχνών αλλεργιογόνων συστατικών μπορεί να καταστεί αρκετά περίπλοκος λόγω δυσκολιών στην απομόνωσή τους, είτε λόγω της παρουσίας άλλων, συχνά άφθονων συστατικών των τροφίμων, που μπορούν να «καλύψουν» το αλλεργιογόνο, ενώ επίσης είναι γνωστό, ότι το είδος του τροφίμου επηρεάζει την ανάκτηση των αλλεργιογόνων. Η επιλογή της μεθόδου εξαρτάται κυρίως από το τρόφιμο που θα αναλυθεί και το ιστορικό επεξεργασίας του κατά την παραγωγή (Poms et al., 2004).

2.2. Αλλεργία στο Γάλα

Τα γαλακτοκομικά προϊόντα αποτελούν σημαντικό κομμάτι της διατροφής του σύγχρονου ανθρώπου, παρέχοντάς του πληθώρα θρεπτικών συστατικών, κυρίως πρωτεϊνών και ασβεστίου. Η σύσταση του αγελαδινού γάλακτος είναι η εξής: 3,6% λίπος, 3,2% ολικές πρωτεΐνες, 2,6% καζεΐνη, 4,7% λακτόζη, 0,7% τέφρα (Park et al., 2007). Οι πρωτεΐνες του γάλακτος διακρίνονται στις καζεΐνες και τις πρωτεΐνες του ορού, με τις πρώτες να αποτελούν το 80% του συνόλου. Αποτελούνται από τις α₁-, α₂-, κ-, και β-καζεΐνες, ενώ οι κυριότερες πρωτεΐνες ορού είναι οι: β-λακτοσφαιρίνη, α-λακταλβουμίνη, οι ανοσοσφαιρίνες, η οροαλβουμίνη. Μια από τις πιο κοινές τροφικές αλλεργίες στην παιδική ηλικία είναι η αλλεργία στο γάλα αγελάδας – Cow's Milk Allergy (CMA). Αναπτύσσεται συνήθως κατά το 1^ο έτος ζωής του ατόμου, και το 15% των αλλεργικών παιδιών παραμένουν αλλεργικά ως ενήλικες. Τα δύο βασικά αλλεργιογόνα του γάλακτος είναι η καζεΐνη και η β-λακτοσφαιρίνη (β-Lg) (Monaci et al., 2005).

3. ΜΗΤΡΙΚΟ ΓΑΛΑ

Το μητρικό γάλα αποτελεί τη βασική τροφή του βρέφους κατά τους πρώτους μήνες της ζωής του, εξασφαλίζοντας την ιδανική σωματική, νοητική και ψυχική ανάπτυξή του. Η πληθώρα των θρεπτικών συστατικών που περιέχει, το καθιστά ιδανική πηγή θρεπτικών συστατικών για το βρέφος. Σε μια κρίσιμη περίοδο ανοσολογικής ανάπτυξης, δρα επικουρικά, καθώς περιέχει πολλά ανοσοενεργά συστατικά (Ramsay et al., 1994). Συγκεκριμένα, στην ανάπτυξη του ανοσοποιητικού συστήματος συμβάλλουν οι ανοσοσφαιρίνες IgA και οι κυτοκίνες ή κυτταροκίνες. Επίσης, περιλαμβάνει μεγάλη ποικιλία πρωτεϊνών, οι οποίες διευκολύνουν την πέψη και την απορρόφηση θρεπτικών συστατικών, όπως λιπάσες, λακτοφερίνη και Βιταμίνη B12 (Lönnerdal, 2004). Επιπλέον, ο θηλασμός συμβάλλει στην άμυνα του οργανισμού ενάντια σε λοιμώξεις. Ωστόσο, αξίζει να αναφερθεί ότι η σύσταση του μητρικού γάλακτος μεταβάλλεται στο πέρασμα των μηνών γαλουχίας και προσαρμόζεται στις απαιτήσεις του βρέφους. Για παράδειγμα, το πρωτόγαλα περιέχει μεγαλύτερη ποσότητα πρωτεϊνών (σχεδόν διπλάσια) σε σχέση με το γάλα της μητέρας που θηλάζει το μωρό της 6 μήνες (Picariello et al, 2016).

3.1. Σύνθεση Μητρικού Γάλακτος

Το μητρικό γάλα παράγεται με τη βοήθεια δύο ορμονών, της προλακτίνης και της οξυτοκίνης, οι οποίες παράγονται στην υπόφυση του εγκεφάλου. Μετά τον τοκετό, οι ορμόνες αυτές μεταφέρονται μέσω του αίματος, στο μαστό. Με την προλακτίνη παράγεται το γάλα στις κυψελίδες, ενώ η οξυτοκίνη το προωθεί στους γαλακτοφόρους πόρους και στη θηλή. Το κύριο συστατικό του είναι το νερό το οποίο βρίσκεται σε ποσοστό που αγγίζει το 85 - 90% (Jenness, 1979). Σε αυτό το σημείο είναι χρήσιμο να γίνει πιο αναλυτική αναφορά στην σύσταση του μητρικού γάλακτος.

Πίνακας 1

Σύνθεση	Μητρικό Γάλα
Λίπος (%)	4,0
Στερεά χωρίς λίπος (%)	8,9
Ολικές πρωτεΐνες (%)	1,2
Καζεΐνη (%)	0,4
Υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες (%)	0,7
Λακτόζη (%)	6,9
Τέφρα (%)	0,3
Μη πρωτεϊνικό άζωτο (%)	0,5
Θερμίδες/100 ml	68,0

(Park et al., 2007)

3.1.1. Λίπος

Το λίπος βρίσκεται στο μητρικό γάλα σε περιεκτικότητα περίπου 3-5% και αποτελεί τη μεγαλύτερη πηγή ενέργειας σε αυτό, συνεισφέροντας το 40–55% της συνολικής ενέργειάς του (Koletzko et al, 2001). Η συντριπτική πλειοψηφία (98%) των λιπιδίων που εκκρίνονται, είναι τριακυλογλυκερίδια. Το υπόλοιπο 2% αποτελείται από διακυλογλυκερίδια, μονοακυλογλυκερίδια, ελεύθερα λιπαρά οξέα, φωσφολιπίδια και χοληστερόλη. Τα λιπίδια συμβάλλουν στην ανάπτυξη του νεογνού, καθώς αποτελούν συστατικά ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη του κεντρικού νευρικού συστήματός του, και τα οποία το ίδιο δεν μπορεί να συνθέσει (Lauritzen & Carlson, 2011). Τα λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας που βρίσκονται στο μητρικό γάλα είναι επίσης σημαντική πηγή ενέργειας, καθώς και απαραίτητα για τη φυσιολογική

ανάπτυξη του γαστρεντερικού σωλήνα του βρέφους (Peng et al. 2009). Επιπλέον, έχει βρεθεί *in vitro* ότι τα λιπίδια του μητρικού γάλακτος αδρανοποιούν αριθμό παθογόνων μικροοργανισμών, υποδηλώνοντας ότι δρουν προστατευτικά ενάντια σε λοιμώξεις του βλεννογόνου. Τη δράση αυτή επιτελούν κυρίως τα μονογλυκερίδια μέσης αλυσίδας (Isaacs et al., 1995). Η περιεκτικότητα σε λίπος του μητρικού γάλακτος παρουσιάζει σημαντικές διακυμάνσεις από μητέρα σε μητέρα, ανάλογα με το χρόνο γαλουχίας και τη διατροφή που εκείνη ακολουθεί (Schanler, 2001). Υπάρχουν ενδείξεις, ότι μητέρες που καταναλώνουν επαρκείς ποσότητες γευμάτων και έχουν ικανοποιητικό ποσοστό σωματικού λίπους, παράγουν γάλα πλούσιο σε λίπος, σε αντίθεση με εκείνες που διαθέτουν χαμηλό ποσοστό σωματικού λίπους (Hachey et al., 1989). Μια άλλη παράμετρος που φαίνεται να επηρεάζει το ποσοστό του λίπους του μητρικού γάλακτος, είναι η ύπαρξη προηγούμενων τοκετών. Το ποσοστό λίπους σε πρωτότοκες γυναίκες στο 12ο μήνα της γαλουχίας φαίνεται να είναι σημαντικά μεγαλύτερο σε σχέση με πολυτόκες, στην αντίστοιχη χρονική περίοδο (Nommsen et al., 1991).

3.1.2. Υδατάνθρακες

Μεγάλη ποικιλία διαφορετικών υδατανθράκων εντοπίζεται στο μητρικό γάλα. Η λακτόζη είναι ο επικρατέστερος εξ αυτών. Πρόκειται για έναν δισακχαρίτη που αποτελείται από ένα μόριο γλυκόζης συνδεδεμένο με ένα μόριο γαλακτόζης. Υπάρχουν ακόμα 30 ή και περισσότεροι, οι οποίοι είναι δύσπεπτοι και η λειτουργία τους είναι να θρέφουν τη γαστρεντερική μικροχλωρίδα (Corra et al., 1993). Λειτουργούν δηλαδή σαν πρεβιοτικά, προστατεύοντας τον γαστρεντερικό σωλήνα του βρέφους από τα παθογόνα βακτήρια. Αυτό συμβαίνει διότι οι ολιγοσακχαρίτες του μητρικού γάλακτος έχοντας ανάλογο σχήμα με τους υδατάνθρακες που υπάρχουν στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου, δρουν ως δόλωμα για τους παθογόνους μικροοργανισμούς, εμποδίζοντας την σύνδεση τους με τους υδατάνθρακες των επιθηλιακών κυττάρων (Andreas et al., 2015).

3.1.3. Πρωτεΐνες

Η περιεκτικότητα του μητρικού γάλακτος σε πρωτεϊνικό περιεχόμενο κυμαίνεται σε ποσοστό 12-14 %. Κάθε πρωτεΐνη εκτελεί κάποια διαφορετική λειτουργία, ενώ υπάρχουν αναφορές για την παρουσία περισσότερων από 400 διαφορετικών πρωτεϊνών. Κάποιες προσφέρονται για τις δομικές ανάγκες, άλλες έχουν αντιμικροβιακή και ανοσορρυθμιστική δράση και άλλες βοηθούν στην απορρόφηση θρεπτικών συστατικών. Οι κυριότερες πρωτεΐνες του μητρικού γάλακτος είναι οι καζεΐνες, η α-λακταλβουμίνη, η β-λακτοσφαιρίνη (πρωτεΐνη ορού), η λακτοφερίνη, η λυσοζύμη, η αλβουμίνη ορού, καθώς και πολλά ακόμα ένζυμα και πρωτεΐνες σε μικρές έως αμελητέες ποσότητες. Οι περισσότερες από τις παραπάνω πρωτεΐνες παράγονται από τα γαλακτοκύτταρα της μητέρας (Andreas et al., 2015).

Στο ανθρώπινο γάλα συναντώνται τρεις κατηγορίες καζεϊνών. Η α-, η β- και η κ-καζεΐνη. Η κ-καζεΐνη σταθεροποιεί τις αδιάλυτες στο νερό α- και β-καζεΐνες, σχηματίζοντας ένα κολλοειδές εναιώρημα, την μικέλλη καζεΐνης (Dalglish et al., 2004). Ειδικότερα, η δομή των καζεϊνών αποτελείται από κολλοειδή διεσπαρμένα σωματίδια που είναι ενωμένα μεταξύ τους, και ονομάζονται μικέλλες (micelles). Οι μικέλλες έχουν σχεδόν σφαιρικό σχήμα και αποτελούνται από μικρότερα σωματίδια που είναι γνωστά ως υπομικέλλες (submicelles). Το κολλοειδές φωσφορικό ασβέστιο είναι ο παράγοντας που διατηρεί τη δομή των μικελλών, κρατώντας αυτές ενωμένες μεταξύ τους. Η περιεκτικότητα σε καζεΐνες είναι περίπου το 40% του συνολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου (Antonakou, 2012), αποτελώντας τη χαμηλότερη συγκέντρωση καζεΐνης από όλα τα μελετημένα είδη. Το γεγονός αυτό αντικατοπτρίζεται στον αργό ρυθμό ανάπτυξης των βρεφών του ανθρώπινου είδους (Andreas et al., 2015).

Η β-καζεΐνη είναι το κύριο συστατικό της μικέλλης της ανθρώπινης καζεΐνης, (Greenberg et al., 1984). Κατά την πέψη της β-καζεΐνης σχηματίζονται μικρά φωσφοπεπτίδια τα οποία προσφέρουν υψηλή βιοδιαθεσιμότητα του Ca^{2+} , στο ανθρώπινο γάλα, καθώς και άλλων δισθενών κατιόντων, όπως του ψευδαργύρου και του σιδήρου (Harmsen et al., 1995). Η κ-καζεΐνη, μια δευτερεύουσα ομάδα καζεΐνης στο ανθρώπινο γάλα, έχει αποδειχθεί ότι προστατεύει αποτρέποντας την προσκόλληση

παθογόνων βακτηρίων στον εντερικό σωλήνα (Newburg, 1997). Όσο αφορά στις ασ-καζεΐνες, ιδιαίτερη αναφορά αξίζει να γίνει στην ασ1-καζεΐνη που απομονώθηκε και βρέθηκε στο μητρικό γάλα μόλις το 1994 από τον Cavaletto (Lønnerdal, 2004). Ωστόσο, περιέχεται σε μεγαλύτερη αναλογία σε σύγκριση με τις άλλες ασ-καζεΐνες.

3.1.4. Αντισώματα στο μητρικό γάλα

Οι ανοσοσφαιρίνες, που υπάρχουν σε ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις από νωρίς στη γαλακτική περίοδο, βρίσκονται στο μητρικό γάλα καταρχήν υπό τη μορφή εκκριντικής ανοσοσφαιρίνης A (SIgA), και δευτερευόντως υπό τη μορφή ανοσοσφαιρίνης G (IgG) (Andreas et al., 2015). Αυτές παρέχουν στο βρέφος ανοσολογική προστασία, όσο το δικό του ανοσοποιητικό σύστημα ακόμη διαμορφώνεται. Καθώς αυτό καθίσταται πιο λειτουργικό, η ποσότητα των αντισωμάτων στο γάλα μειώνεται, αντικατοπτρίζοντας τις μειωμένες απαιτήσεις.

3.1.5. Βιταμίνες

Μια επίσης σημαντική κατηγορία θρεπτικών συστατικών είναι οι βιταμίνες, οι οποίες διακρίνονται σε υδατοδιαλυτές και λιποδιαλυτές. Στο ανθρώπινο γάλα φαίνεται να συναντώνται όλες έκτος από την Βιταμίνη Κ (Jenness, 1979). Όσο αφορά στις υδατοδιαλυτές βιταμίνες, σε ικανοποιητικές αναλογίες εντοπίζονται οι εξής: οι βιταμίνες του συμπλέγματος Β, δηλαδή η θειαμίνη, η ριβοφλαβίνη, η νιασίνη, η πυριδοξίνη, το φυλλικό οξύ, η Βιταμίνη Β12, το παντοθενικό οξύ και η βιοτίνη καθώς και η βιταμίνη C (Romeu-Nadal et al., 2006). Σημαντικές για τον βιολογικό τους ρόλο είναι οι λιποδιαλυτές Βιταμίνες Α και Ε, που περιέχονται μάλιστα σε μεγάλες ποσότητες. Η α-τοκοφερόλη εκ των οκτώ τύπων Βιταμίνης Ε, αποτρέπει το οξειδωτικό στρες που μπορεί να υποστούν τα νεογέννητα όταν ξαφνικά βρίσκονται εκτεθειμένα σε υψηλότερα επίπεδα οξυγόνου σε σχέση με το ενδομήτριο περιβάλλον. Η Βιταμίνη Α, είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη, την διαφοροποίηση και την ακεραιότητα του επιθηλιακού ιστού και βοηθάει επιπλέον στην όραση, στην ανοσοποιητική δράση του

οργανισμού, και στην οστική ανάπλαση και αναγέννηση, ενώ διαθέτει επίσης αντιοξειδωτική δράση (Olson, 1996).

3.1.6. Μέταλλα & Ιχνοστοιχεία

Τα κυριότερα ανόργανα στοιχεία που απαντώνται στο μητρικό γάλα είναι το Νάτριο (Na), το Κάλιο (K), το Ασβέστιο (Ca), το μαγνήσιο (Mg), ο Φώσφορος (P) και το Χλώριο (Cl). Υπάρχουν και άλλα στοιχεία όπως ο Σίδηρος (Fe), ο Χαλκός (Cu) και ο Ψευδάργυρος (Zn) των οποίων οι συγκεντρώσεις ποικίλουν σημαντικά από μητέρα σε μητέρα. Σε μεγαλύτερες περιεκτικότητες καθώς και μεγαλύτερης σημασίας φαίνεται να είναι το Ασβέστιο, το Κάλιο και ο Χαλκός (Antonakou, 2012).

3.2. Επίδραση του Θηλασμού στην Ανάπτυξη Τροφικών Αλλεργιών

Το πρωτόγαλα και το ανθρώπινο γάλα περιέχουν πλήθος δυνητικά ανοσολογικά ενεργών συστατικών όπως λευκοκύτταρα, κυτοκίνες και ανοσοσφαιρίνες, τα οποία δύναται να βελτιώσουν ή να επάγουν το ανοσοποιητικό σύστημα του βρέφους που βρίσκεται ακόμη υπό ανάπτυξη (Järvinen & Suomalainen, 2001). Τα μητρικά κύτταρα μπορούν να επιβιώνουν βιολογικά άθικτα στο έντερο του βρέφους που θηλάζει, λόγω της ικανότητάς τους να αντιστέκονται στη θρυψινοποίηση – διαδικασία αποχωρισμού κυτάρρων μέσω διάσπασης δεσμών από τη θρυψίνη – και να ανέχονται μεγάλες διακυμάνσεις στο pH του περιβάλλοντός τους, στη θερμοκρασία και στις συνθήκες ώσμωσης. Το γεγονός οφείλεται επίσης στο ουδέτερο pH του στομαχιού ενός νεογέννητου και στη ρυθμιστική ικανότητα του γάλακτος (Paxson & Cress, 1979).

Σε αρκετές μελέτες, ο παρατεταμένος και αποκλειστικός θηλασμός φαίνεται να εμποδίζει ή να καθυστερεί την ανάπτυξη ατοπίας και/ ή ατοπικού εκζέματος στο ξεκίνημα της ζωής, ενώ άλλες δεν επιβεβαιώνουν αυτό τον ισχυρισμό. Παράλληλα, υπάρχουν και αναφορές αυξημένου κινδύνου ανάπτυξης ατοπικού εκζέματος και τροφικών αλλεργιών σε βρέφη που θηλάζουν (Järvinen & Suomalainen, 2001).

Οι Järvinen & Suomalainen (2001) αναφέρουν συμπερασματικά έπειτα από σχετική μελέτη, ότι ο αποκλειστικός θηλασμός δεν φαίνεται γενικά να προστατεύει ενάντια στην αλλεργική ευαισθητοποίηση, καθώς και ότι η επίδραση του θηλασμού στην ανάπτυξη αλλεργιών φαίνεται να επηρεάζεται από τη σύνθεση του γάλακτος της μητέρας. Επιπλέον, αναφέρουν ότι διακυμάνσεις στα επίπεδα ανοσολογικά ενεργών συστατικών του ανθρώπινου γάλακτος, πιθανόν να δίνουν ερμηνεία στα αντιφατικά αποτελέσματα σχετικά με τον προστατευτικό ρόλο του θηλασμού, όσο αφορά στην ανάπτυξη αλλεργιών.

Η αλλεργία στις πρωτεΐνες του αγελαδινού γάλακτος (cow's milk protein allergy – CMPA) αποτελεί την πρώτη αλλεργία που πλήττει τα βρέφη, με το ποσοστό περιπτώσεων να φτάνει το 7,5%. Αυτό πιθανόν οφείλεται στο γεγονός ότι οι πρωτεΐνες του αγελαδινού γάλακτος είναι οι πρώτες ξένες πρωτεΐνες τις οποίες

καταναλώνει το νεογνό σε μεγάλες ποσότητες (Järvinen & Suomalainen, 2001). Τα κλινικά συμπτώματα κάνουν την εμφάνισή τους από την 1η εβδομάδα ζωής έως τους 2 μήνες. Παρόμοια συμπτώματα εμφανίζονται επίσης σε βρέφη που τρέφονται αποκλειστικά με μητρικό γάλα, με ποσοστό περιπτώσεων 0,4 - 0,5%. Ωστόσο, η σειρά εμφάνισης των συμπτωμάτων κατά τον αποκλειστικό θηλασμό είναι συχνά χαρακτηριστική: γαστρεντερικά συμπτώματα, όπως παλινδρόμηση και κολικοί, εμφανίζονται πρώτα, και λίγο αργότερα ακολουθεί έκζεμα στην ηλικία 2 – 3 μηνών (Järvinen, 2000). Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, οι κύριες πρωτεΐνες που κατηγορούνται για αλλεργικές αντιδράσεις στο μητρικό γάλα είναι οι β- και οι αs-καζεΐνες και εκ των πρωτεϊνών του ορού, η β- λακτοσφαιρίνη.

Τα συμπτώματα της CMPA εμφανίζονται κυρίως στο δερματικό, το γαστρεντερικό και το αναπνευστικό σύστημα. Η πλειονότητα των νεογνών εμφανίζει πάνω από ένα σύμπτωμα. Τα συμπτώματα που έχουν καταγραφεί σε βρέφη που θηλάζουν, ως αντίδραση στην παρουσία πρωτεϊνών αγελαδινού γάλακτος στο μητρικό γάλα είναι τα εξής: έκζεμα, κολικοί, διάρροια, κολίτιδα με αιμορραγία από το ορθό, παλινδρόμηση και/ ή εμετός, δυσκοιλιότητα, ρινόρροια, φτέρνισμα και βήχας, απειλητική για τη ζωή βραδυκαρδία και υποτονία, καθώς και αναφυλακτικό σοκ (Järvinen & Suomalainen, 2001).

Σε κάποιες περιπτώσεις, και ειδικότερα όταν τα ανεπιθύμητα συμπτώματα περιλαμβάνουν εμφάνιση αίματος και βλέννας στα κόπρανα και κεννώσεις, αυτά αποδίδονται σε Αλλεργική Πρωκτοκολίτιδα. Πρόκειται για ένα τύπο τροφικής αλλεργίας που ανήκει σε μία ομάδα υπερευαισθησιών στις οποίες δεν εμπλέκεται η ανοσοσφαιρίνη IgE. Καλείται επίσης Ηωσινοφιλική Πρωκτοκολίτιδα. Χαρακτηρίζεται ως παροδική ασθένεια που επηρεάζει κυρίως τα βρέφη κατά τους πρώτους μήνες της ζωής τους και συνήθως υποχωρεί εντός του πρώτου έτους. Κύρια αιτία φαίνεται να είναι η ανοσοαπόκριση που προκαλούν οι πρωτεΐνες του αγελαδινού γάλακτος (Camargo et al. 2016). Υπάρχουν ισχυρισμοί ότι οι πρωτεΐνες αυτές περνούν στο θηλάζον βρέφος μέσω του μητρικού γάλακτος, το οποίο είναι γνωστό ότι επηρεάζεται από τις διατροφικές συνήθειες της μητέρας. Στην προκειμένη περίπτωση, αποδίδεται ευθύνη στην κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων. Ενώ δεν έχει ακόμη

αποσαφηνιστεί ο τρόπος με τον οποίο οι πρωτεΐνες γάλακτος αγελαδινής προέλευσης μπορούν να εισχωρήσουν στο μητρικό γάλα, πολλοί παιδίατροι συστήνουν τον αποκλεισμό των γαλακτοκομικών από τη διατροφή της μητέρας όταν το νεογνό παρουσιάσει συμπτώματα.

Τα παραπάνω δημιουργούν προβληματισμό σχετικά με την ευαισθητοποίηση στις πρωτεΐνες του αγελαδινού γάλακτος, μέσω του μητρικού. Όμως η μεταφορά των πρωτεϊνών αυτών, όπως είναι η β-λακτοσφαιρίνη, στο μητρικό γάλα, είναι αμφιλεγόμενη. Ενώ κάποιοι ερευνητές έχουν ανιχνεύσει πρωτεΐνες αγελαδινού σε ανθρώπινο γάλα, άλλοι το αποδίδουν σε διασταυρούμενη αντίδραση μεταξύ των δύο ειδών πρωτεΐνης, της ανθρώπινης και της αγελαδινής. Άλλοι, θεωρούν πιθανή τη μεταφορά πρωτεϊνών ανθεκτικών στην πέψη, μέσω της αιματοροχής της μητέρας, ωστόσο οι μηχανισμοί βρίσκονται ακόμη υπό μελέτη (Denis et al., 2012). Παρακάτω γίνεται αναφορά στα σχετικά ερευνητικά δεδομένα που υπάρχουν διαθέσιμα στη βιβλιογραφία.

4. ΑΠΕΚΚΡΙΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΓΕΛΑΔΙΝΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΣΤΟ ΜΗΤΡΙΚΟ ΓΑΛΑ

Σε ανοσοχημικά δεδομένα και κλινικές έρευνες που πραγματοποιήθηκαν τις δεκαετίες του '80 και του '90, στηρίζεται ο ισχυρισμός ότι το μητρικό γάλα περιέχει αντιγονικά ενεργά τροφικά αλλεργιογόνα που προέρχονται από τη δίαιτα της μητέρας. Ειδικότερα, σε έρευνα των *Stuart et al. (1984)* στην οποία εξετάστηκαν δείγματα από 28 θηλάζουσες μητέρες, με τη χρήση ενζυμικά συνδεδεμένης ανοσοδοκιμασίας, β-λακτοσφαιρίνη αγελαδινού γάλακτος βρέθηκε σε 5 από τα 28 δείγματα, ενώ καζεΐνη αγελαδινού γάλακτος σε 13 από τα 28 δείγματα. Οι συγγραφείς ωστόσο άφησαν ανοιχτό το ενδεχόμενο διασταυρούμενης αντίδρασης μεταξύ της προαναφερθείσας καζεΐνης και της ανθρώπινης.

Άθικτη αγελαδινή α_s1-καζεΐνη διατροφικής προέλευσης έχει ανιχνευθεί σε ανθρώπινο γάλα με τη χρήση φασματομετρίας μάζας (*Coscia et al., 2012*). Ωστόσο, τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε σύγκρουση με *in vivo* παρατηρήσεις που υποδεικνύουν ότι η β-Lg μπορεί να είναι μερικώς άθικτη ακόμα και στο έντερο της μητέρας, ενώ οι καζεΐνες διασπώνται εντελώς στον άνω γαστρεντερικό σωλήνα (*Sanchón et al., 2018*). Από την άλλη, θα πρέπει να αποδειχθεί εάν άθικτα ή μερικώς υδρολυμένα τροφικά αντιγόνα θα μπορούσαν να απορροφηθούν και στη συνέχεια να απεκκριθούν στο μητρικό γάλα, μέσω άλλων οδών εκτός της εντερικής (*Bernard et al., 2014*).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα πεπτιδια της β-καζεΐνης είναι ακολουθίες πλούσιες σε προλίνη, οι οποίες δεν υδρολύονται εύκολα από τα γαστρεντερικά ένζυμα (*Miner-Williams et al., 2014*). Η β-Lg μετατοπίζεται επίσης εν μέρει σε προσομοιώσεις του εντερικού επιθηλίου, υποδηλώνοντας ότι θα μπορούσε να απορροφηθεί και να φτάσει στην πυλαία κυκλοφορία του αίματος (*Boirie et al., 1997*).

Πιο σύγχρονα, σε έρευνα των *Picariello et al. 2019* κατά μέσο όρο, περισσότερα από 1200 πεπτιδια προερχόμενα από ενδογενείς πρωτεΐνες ταυτοποιήθηκαν με HPLC-MS/MS (Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Αποδόσης - Φασματομετρία Μάζας). Τα περισσότερα από αυτά ήταν θραύσματα υδρόλυσης της

ανθρώπινης β-καζεΐνης και άλλων καζεϊνών. Συνολικά, 21 πεπτίδια προερχόμενα αποκλειστικά από αγελαδινές καζεΐνες και πρωτεΐνες ορού με καμία αντιστοιχισή στο πρωτέωμα του ανθρώπινου γάλακτος, ταυτοποιήθηκαν σε δείγματα μητρικού γάλακτος.

Τα ευρήματα των Picariello et al. (2019) έδειξαν ότι τα πεπτίδια που προέρχονται από τη μητρική διατροφή εμφανίστηκαν σε πολύ χαμηλή ποσότητα σε σύγκριση με τα ενδογενή πεπτίδια του μητρικού γάλακτος, τα οποία με τη σειρά τους αντιπροσωπεύουν μόνο ένα κλάσμα της περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες / πολυπεπτίδια του ανθρώπινου γάλακτος.

Επιπλέον, παρά την παραδοσιακή ταξινόμηση των διαιτητικών πρωτεϊνών με βάση τους ρυθμούς πέψης και απορρόφησης, σε «ταχείας» (πρωτεΐνες ορού) και «αργής» (καζεΐνες) (Boirie et al., 1997), τα πεπτίδια που εμφανίστηκαν άμεσα στο πείραμα των Picariello et al. (2019) προέρχονταν και από τις δύο οικογένειες πρωτεϊνών. Σύμφωνα με τους ίδιους, αυτό υποδεικνύει ότι υδρολυτικά θραύσματα τόσο των καζεϊνών, όσο και των πρωτεϊνών του ορού μπορούν να αφομοιωθούν, διανεμηθούν και απεκκριθούν ιδιαίτερα γρήγορα στο μητρικό γάλα.

Οι Miner – Williams et al. (2014) πραγματοποίησαν μία ανασκόπηση με σκοπό να αξιολογήσουν τα υπάρχοντα επιστημονικά στοιχεία σχετικά με τον ισχυρισμό ότι πεπτίδια / πρωτεΐνες μπορούν να απορροφηθούν από το υγιές εντερικό επιθήλιο και να περάσουν άθικτα στο πυλαίο ηπατικό σύστημα. Συνολικά, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι υπάρχουν ελάχιστες κατηγορηματικές ενδείξεις ότι διαιτητικά βιοενεργά πεπτίδια, εκτός από δι- και τριπεπτίδια, μπορούν να διαπεράσουν άθικτα το εντερικό τοίχωμα και να εισέλθουν στο ηπατικό σύστημα. Πιο αναλυτικά, σύμφωνα με την παραπάνω έρευνα, ενώ για πάνω από έναν αιώνα πιστεύονταν ότι οι διαιτητικές πρωτεΐνες πρέπει να υδρολυθούν πλήρως πριν τα αμινοξέα απορροφηθούν μέσω ειδικών συστημάτων μεταφοράς αμινοξέων, σήμερα είναι γνωστό ότι δι- και τριπεπτίδια μπορούν να μεταφερθούν μέσω του εντερικού ενδοθηλίου από τον συν-μεταφορέα PerT1 H+ / πεπτιδίου.

Σε πείραμα που πραγματοποιήθηκε από τους Sanchón et al. (2018), προϊόν πέψης του ανθρώπου μετά την από στόματος λήψη καζεΐνης και πρωτεΐνης ορού

γάλακτος, συλλέχθηκαν με ρινογαστρικό σωλήνα και συγκρίθηκε η αποικοδόμηση των πρωτεϊνών και η απελευθέρωση πεπτιδίων, με εκείνη που βρέθηκε σε προϊόν πέψης του ίδιου υποστρώματος με τη χρήση τυποποιημένου πρωτοκόλλου. Άθικτη καζεΐνη δεν ανιχνεύτηκε σε καμία από τις δύο περιπτώσεις, ενώ β-λακτοσφαιρίνη βρέθηκε σε δείγματα μίας ώρας, σε συμφωνία και με την *in vitro* πέψη. Οι πέψεις *in vivo* και *in vitro* έδειξαν συγκρίσιμα προφίλ πεπτιδίων καθώς και μεγάλο αριθμό κοινών αλληλουχιών. Επιπλέον, ταυτοποιήθηκαν κοινές περιοχές ανθεκτικές στην πέψη, υποδεικνύοντας ότι το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε αποτελεί μία καλή προσομοίωση της φυσιολογικής γαστρεντερικής πέψης των πρωτεϊνών του γάλακτος.

Οι Picariello et al. (2016) χρησιμοποιώντας υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (high performance liquid chromatography – HPLC) και φασματομετρία μάζας (mass spectrometry – MS), προσδιόρισαν και σύγκριναν το πεπτιδικό περιεχόμενο μητρικού γάλακτος από 12 θηλάζουσες μητέρες. Εξ αυτών, οι 6 καταλάωναν ένα ποτήρι γάλα καθημερινά, ενώ οι άλλες 6 ήταν σε αυστηρό αποκλεισμό των γαλακτοκομικών προϊόντων από τη διατροφή τους. Τα ευρήματα ήταν τα εξής. Όσο αφορά στα δείγματα από τις μητέρες που καταλάωναν γάλα, σε 2 από τα 6 ταυτοποιήθηκαν τμήματα β-λακτοσφαιρίνης αγελαδινού γάλακτος, και σε 1 από τα 6 δείγματα, βρέθηκαν τμήματα α_s1-καζεΐνης αγελαδινού γάλακτος. Τα ευρήματα αυτά απουσίαζαν από τα 6 δείγματα που λήφθηκαν από τις μητέρες που απείχαν από τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι πεπτίδια προερχόμενα από τις πρωτεΐνες του αγελαδινού γάλακτος, και όχι άθικτες πρωτεΐνες, είναι πιθανό να ευαισθητοποιούν ή να προκαλούν αλλεργικές αποκρίσεις στο νεογνό μέσω του μητρικού γάλακτος. Ωστόσο, δεν υπάρχουν επαρκείς πληροφορίες που να αναφέρουν εάν τα μικρά αυτά πεπτίδια είναι ικανά να προκαλέσουν αλλεργικές αντιδράσεις.

Ένας ακόμη λόγος που τα στοιχεία για τα τροφικά αλλεργιογόνα στο μητρικό γάλα παραμένουν αμφιλεγόμενα, είναι το γεγονός ότι οι ανοσοχημικές μέθοδοι θα μπορούσαν να είναι προκατειλημμένες από μια σειρά “παγίδων” που σχετίζονται με

την αναγνώριση αντισωμάτων των πρωτεϊνικών στόχων και τις επιδράσεις παρεμβολών της μήτρας του τροφίμου (Picariello et al., 2019).

5. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΛΛΕΡΓΙΟΓΟΝΩΝ ΣΤΟ ΓΑΛΑ

Η αξία του μητρικού γάλακτος για την ανάπτυξη ενός βρέφους κατά τους πρώτους μήνες της ζωής του, και δεδομένου ότι σε πολλές περιπτώσεις αποτελεί τη μοναδική τροφή που λαμβάνει, είναι γνωστή. Ωστόσο, όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, κάποιες φορές φαίνεται να προκαλεί δυσάρεστα συμπτώματα στο βρέφος. Συνεπώς, είναι πολύ σημαντικό να αποσαφηνιστούν οι αιτιολογικοί παράγοντες που προκαλούν αυτά τα συμπτώματα. Με τον τρόπο αυτό, θα καταστεί πιο εύκολη η πρόληψη, με στόχο την αποφυγή τέτοιων φαινομένων. Για να μπορέσουν να εντοπιστούν οι υπεύθυνες ουσίες και να κατηγορηθούν με βεβαιότητα, είναι φυσικά απαραίτητη η ανίχνευση των αλλεργιογόνων ουσιών που μπορεί να βρίσκονται στο μητρικό γάλα.

Εκτός από την ανίχνευση, εξαιρετικής σημασίας είναι και η ποσοτικοποίηση των αλλεργιογόνων, καθώς η εμφάνιση και η σοβαρότητα των αλλεργικών αντιδράσεων εξαρτώνται τόσο από την ποσότητα καταναλισκόμενου τροφίμου, όσο και από την περιεκτικότητα του τροφίμου σε αλλεργιογόνο (Taylor & Hefle, 2006).

5.1. Μέθοδοι Ανίχνευσης Αλλεργιογόνων στο Γάλα

Έως σήμερα, έχουν σχεδιαστεί πολλαπλές τεχνικές ανίχνευσης της παρουσίας αλλεργιογόνων συστατικών στα τρόφιμα. Αυτές μπορεί να στοχεύουν στην ανίχνευση είτε πρωτεΐνης, είτε DNA. Οι μέθοδοι που βασίζονται στην ανίχνευση πρωτεΐνης είναι συνήθως ανοσολογικές τεχνικές που στηρίζονται στα αντισώματα. Οι μέθοδοι DNA βασίζονται στον πολλαπλασιασμό συγκεκριμένων τμημάτων DNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction – PCR) με την χρήση εκκινητών που διευκολύνουν τον πολλαπλασιασμό DNA που προέρχεται από το αλλεργιογόνο τρόφιμο. Η πλειονότητα ωστόσο των μεθόδων βασίζεται σε ανοσολογική ανίχνευση των αλλεργιογόνων συστατικών (van Hengel, 2007).

Μέχρι τώρα, η ανίχνευση των αλλεργιογόνων του γάλακτος πραγματοποιούνται κυρίως με πρωτεϊνική ανάλυση, με τη χρήση φασματομετρίας μάζας (MS) και της μεθόδου ELISA. Πρόσφατα, μέθοδοι βασισμένες στην ανίχνευση DNA αποδεικνύονται και αυτές χρήσιμες τεχνικές στον τομέα της ανίχνευσης τροφικών αλλεργιογόνων, λόγω της μεγάλης θερμικής σταθερότητας των μορίων DNA σε σύγκριση με τις πρωτεΐνες. Στα επεξεργασμένα τρόφιμα πολύ χρήσιμη εναλλακτική λύση έναντι των ανοσοχημικών μεθόδων είναι και η χρήση της τεχνικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) (Villa et al., 2019).

Παρόλα αυτά, οι πιο κοινές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση αλλεργιογόνων πρωτεϊνών στο γάλα είναι οι μέθοδοι SDS – PAGE, HPLC και ELISA.

5.1.1. SDS- PAGE

Η SDS – PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis / Ηλεκτροφόρηση πηκτής δοδεκυλοθειϊκού νατρίου – πολυακρυλαμιδίου) αντιπροσωπεύει την πρότυπη διαδικασία για το διαχωρισμό και την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών / αλλεργιογόνων. Το SDS μετουσιώνει και επικαλύπτει τις πρωτεΐνες αποδίδοντάς τους ένα ισχυρό αρνητικό φορτίο. Οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση τη μοριακή τους μάζα, ανεξάρτητα από το αρχικό τους ηλεκτροχημικό φορτίο. Στη συνέχεια οι διαχωρισμένες πρωτεΐνες μεταφέρονται σε μια μεμβράνη και ανιχνεύονται με ράδιο – ή ένζυμο – σεσημασμένα αντισώματα. Η μέθοδος αυτή έχει χρησιμοποιηθεί για τον ποιοτικό προσδιορισμό δυνητικά αλλεργιογόνων τροφίμων, με όριο ανίχνευσης < 5 mg/kg (Schäppi et al., 2001, Burks et al., 1991).

5.1.2. HPLC

Η HPLC (High Performance Liquid Chromatography – Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης) είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος για τον αναλυτικό και προπαρασκευαστικό διαχωρισμό πρωτεϊνών που βρίσκονται στο γάλα. Έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι υγρής χρωματογραφίας οι οποίες ανάλογα με την στήλη που χρησιμοποιείται διακρίνονται σε χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής, χρωματογραφία αντίστροφης φάσης και χρωματογραφία μοριακής διήθησης. Η πιο διαδεδομένη μέθοδος για μόρια με υδρόφοβο χαρακτήρα, όπως οι πρωτεΐνες, είναι η χρωματογραφία αντίστροφης φάσης υψηλής απόδοσης (RP-HPLC), η οποία παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία στον προσδιορισμό καζεϊνών (Ashoor & Stiles, 1987). Η υψηλή ικανότητα διαχωρισμού, όσο και η αυτοματοποίηση των συστημάτων υγρής χρωματογραφίας, καθιστούν τα συστήματα αυτά κατάλληλα για σύνδεση με πιο προηγμένες τεχνικές ανίχνευσης, όπως η φασματομετρία μάζας (MS) (Ding et al., 2011).

5.1.3. ELISA

Η ELISA είναι πιθανόν η πλέον χρησιμοποιούμενη μέθοδος από τη βιομηχανία τροφίμων, αλλά και από τις επίσημες υπηρεσίες ελέγχου των τροφίμων (van Hengel, 2007). Το πλήρες όνομά της είναι Enzyme – Linked ImmunoSorbent Assay και συνεπώς πρόκειται για μία ενζυμική ανοσοδοκιμασία. Αποτελεί βιοχημική μέθοδο ανίχνευσης της παρουσίας ενός αντισώματος ή ενός αντιγόνου σε ένα δείγμα. Με την δοκιμασία ELISA μπορούν να ανιχνευτούν αλλεργιογόνα ή συγκεκριμένες πρωτεΐνες – δείκτες με χρωματομετρική αντίδραση, μετά από σύνδεση με ένα ειδικό αντίσωμα, συνδεδεμένο με ένα ένζυμο. Η συγκέντρωση αυτού του συμπλόκου αντιγόνου – αντισώματος μπορεί να προσδιοριστεί στη συνέχεια με βάση μία πρότυπη καμπύλη που προκύπτει από πρότυπα δείγματα αναφοράς. Υπάρχουν δύο είδη ELISA για την ποσοτικοποίηση των αλλεργιογόνων πρωτεϊνών. Η ανταγωνιστική ELISA και η ELISA τύπου sandwich. Το δεύτερο είδος, αποτελεί την πιο κοινή ανοσοδοκιμασία για την ανίχνευση πιθανών τροφικών αλλεργιογόνων (Poms et al., 2004).

6. ΣΚΟΠΟΣ

Από την παραπάνω βιβλιογραφική ανασκόπηση φαίνεται πως τα δεδομένα που υπάρχουν έως σήμερα σχετικά με την απέκκριση των πρωτεϊνών του αγελαδινού γάλακτος στο μητρικό γάλα, έρχονται συχνά σε σύγκρουση μεταξύ τους, ενώ παρουσιάζουν και κενά που αποτρέπουν την πλήρη κατανόηση του φαινομένου αυτού. Τα παραπάνω ερευνητικά κενά μας έδωσαν την ώθηση να συμμετέχουμε στην ερευνητική προσπάθεια, μέσω της ανάλυσης δειγμάτων μητρικού γάλακτος, με σκοπό τον έλεγχο για την παρουσία σε αυτά, καζεϊνών αγελαδινού γάλακτος. Η επιλογή της ανίχνευσης συγκεκριμένα καζεϊνών, έγκειται στη γνωστή αλλεργιογόνο δράση τους.

7. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Για τη διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκε το kit δοκιμασίας ELISA Πρωτεΐνης Καζεΐνης Βοοειδών της εταιρίας 3M™, για την ποσοτική ανάλυση των καζεϊνών αγελαδινής προέλευσης. Το συγκεκριμένο kit χρησιμοποιεί ELISA τύπου sandwich. Οι καζεΐνες που υπάρχουν στο δείγμα αντιδρούν με το αντίσωμα αντικαζεΐνης που είναι απορροφημένο στην επιφάνεια των φρεατίων (wells). Μετά την απομάκρυνση των αδέσμευτων πρωτεϊνών με πλύση, προστίθενται αντισώματα αντικαζεΐνης βοοειδών συζευγμένα με υπεροξειδάση αγριοράπανου (horseradish peroxidase – HRP). Αυτά τα σεσημασμένα με ένζυμο αντισώματα σχηματίζουν σύμπλοκα με την προηγουμένως δεσμευμένη καζεΐνη. Μετά από μία δεύτερη έκπλυση το ένζυμο που είναι δεσμευμένο στον ανοσοπροσροφητή ανιχνεύεται μέσω της προσθήκης χρωμογόνου υποστρώματος, του 3,3',5,5' – τετραμεθυλοβενζιδίνης (3,3',5,5'- tetramethylbenzidine – TMB). Η ανάπτυξη χρώματος από αυτή την ενζυμική αντίδραση ποικίλει ανάλογα με τη συγκέντρωση πρωτεΐνης στο εξεταζόμενο δείγμα. Συνεπώς, η απορρόφηση στα 450 nm αποτελεί ένα μέτρο της συγκέντρωσης της καζεΐνης στο δείγμα.

7.1. Αντιδραστήρια, Υλικά & Όργανα

Χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια που περιέχονταν στο kit, καθώς και αραιωμένα αντιδραστήρια που παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο. Χρησιμοποιήθηκε επίσης απιονισμένο νερό.

Τα αντιδραστήρια που περιλαμβάνονταν στο kit είναι τα εξής:

- Σύζευγμα καζεΐνης βοοειδών HRP (10X)
- Συμπύκνωμα προτύπου καζεΐνης βοοειδών
- Αραιωτικό διάλυμα (5X)
- Διάλυμα έκπλυσης (20X)
- Ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης E26 (4X)
- Διάλυμα χρωμογόνου υποστρώματος (TMB)
- Διάλυμα διακοπής αντίδρασης (Stop Solution)

Αντιδραστήρια που παρήχθησαν στο εργαστήριο και η παρασκευή τους:

- Αραιωτικό διάλυμα (1X): με αραιώση 1 μέρους διαλύματος 5X σε 4 μέρη απιονισμένου νερού
- Σύζευγμα καζεΐνης βοοειδών HRP (1X): με αραιώση 1 μέρους HRP 10X σε 9 μέρη απιονισμένου νερού
- Διάλυμα έκπλυσης (1X): με αραιώση 1 μέρους διαλύματος 20X σε 19 μέρη απιονισμένου νερού
- Ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης E26 (1X): με αραιώση 1 μέρους διαλύματος 4X σε 3 μέρη απιονισμένου νερού

Όλα τα αντιδραστήρια αφέθηκαν να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου (20-25 °C) πριν τη χρήση τους.

Υλικά & Όργανα που δεν περιέχονταν στο kit:

- πιπέτες αυτόματης πληρώσεως για λήψη 10 έως 100 µL
- ρύγχη πιπετών (tips)
- απιονισμένο νερό
- σωλήνες τύπου falcon
- σωλήνες τύπου erpendorf
- φασματοφωτόμετρο για μικροπλάκες ELISA
- διάφορα σκεύη εργαστηρίου για την παρασκευή των αντιδραστηρίων
- χρονόμετρο
- αναδευτήρας τύπου Vortex
- υδατόλουτρο
- ανακινητήρας ελλειψοειδούς κινήσεως
- συσκευή φυγοκέντρωσης

7.2. Πειραματική Πορεία

7.2.1. Προπαρασκευή Δείγματος

Χρησιμοποιήθηκαν 42 δείγματα μητρικού γάλακτος που διατηρούνταν υπό συνθήκες βαθιάς κατάψυξης (-40°C). Πριν τη χρήση τους, αποψύχθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου.

Όλα τα δείγματα εκχυλίστηκαν με το ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης 1X ενώ αυτό ήταν προ-θερμασμένο στους 50 - 60 °C.

1. Προκειμένου να παρασκευαστεί το τελικό προς ανάλυση δείγμα, έγινε λήψη 0,5 mL από κάθε αρχικό δείγμα και η ποσότητα αυτή αραιώθηκε σε 4,5 mL 1X ρυθμιστικού διαλύματος εκχύλισης σε falcon των 50 mL
2. Στη συνέχεια, το δείγμα επώαστηκε σε υδατόλουτρο στους 50-60 °C για 25 min. Κατά το χρονικό διάστημα αυτό, τα δείγματα ανακινούνταν χειροκίνητα για 1 min ανά 5 min
3. Μετά την επώαση, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν σε 3000 x g για 30 sec
4. Λήφθηκαν 100 μL από την μεσαία (υδατική) στιβάδα κάθε δείγματος, αραιώθηκαν σε 900 μL αραιωτικού διαλύματος 1X, και αναδεύτηκαν με τη χρήση αναδευτήρα τύπου Vortex

7.2.2. Παρασκευή Προτύπων Διαλυμάτων

Για την παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε το Συμπύκνωμα προτύπου καζεΐνης βοοειδών που περιεχόταν στο kit. Από αυτό παρασκευάστηκε ένα σετ 4 προτύπων αραιωμένων σε αραιωτικό διάλυμα 1X ως εξής:

Πίνακας 2

Αριθμός Προτύπου	Συγκέντρωση Προτύπου (ng/mL)	Όγκος προτύπου που προστέθηκε στο Αραιωτικό 1X	Όγκος Αραιωτικού 1X
4	120	10 μL Συμπυκνώματος Προτύπου Πρωτεΐνης Καζεΐνης Βοοειδών	990 μL
3	40	200 μL προτύπου 4	400 μL
2	13,3	200 μL προτύπου 3	400 μL
1	4,4	200 μL προτύπου 2	400 μL
0	0	0	400 μL

Αναλυτικά, 10 μL Συμπυκνώματος Προτύπου Καζεΐνης Βοοειδών αραιώθηκαν σε 990 μL αραιωτικού διαλύματος 1X (Πρότυπο 4). Το πρότυπο 4 που προέκυψε αναδεύτηκε σε αναδευτήρα τύπου Vortex, και 200 μL από αυτό αραιώθηκαν σε 400 μL αραιωτικού διαλύματος 1X (Πρότυπο 3). Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε για την παρασκευή των προτύπων 2 και 1 λαμβάνοντας κάθε φορά 200 μL από το προηγούμενο πρότυπο διάλυμα, ενώ το Πρότυπο 0 περιείχε μόνο 400 mL αραιωτικού 1X.

7.2.3. Διαδικασία ELISA:

1. Με πιπέτα αυτόματης πλήρωσεως μεταφέρθηκαν 100 μL από κάθε πρότυπο σε πηγαδάκια (wells) της πλάκας ELISA
2. Παράλληλα μεταφέρθηκαν 100 μL από κάθε εκχυλισμένο δείγμα που παρασκευάστηκε στο βήμα 4 της προπαρασκευής του δείγματος σε πηγαδάκια (wells) της πλάκας ELISA
3. Τα wells επώασθησαν σε ανακινητήρα ελλειψοειδούς κινήσεως ρυθμισμένο σε 400 rpm σε θερμοκρασία δωματίου, καλυμμένα προς αποφυγή εξάτμισης, στο σκοτάδι και σε επίπεδη θέση για 30 min
4. Μετά την επώαση, τα wells αδειάστηκαν σχολαστικά
5. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν συνολικά τέσσερις εκπλύσεις ως εξής: κάθε well γεμίστηκε με διάλυμα έκπλυσης 1X και αδειάστηκε ξανά σχολαστικά
6. 100 μL Συζεύγματος Καζεΐνης Βοοειδών HRP μεταφέρθηκαν σε κάθε well και επώασθησαν ξανά σε ανακινητήρα ελλειψοειδούς κινήσεως, στις ίδιες συνθήκες για 10 min
7. Επαναλήφθηκε το βήμα 5 για ένα ακόμα σύνολο τεσσάρων εκπλύσεων με το διάλυμα έκπλυσης 1X
8. Σε κάθε well προστέθηκαν 100 μL χρωμογόνου υποστρώματος TMB
9. Έγινε ξανά επώαση σε ανακινητήρα ελλειψοειδούς κινήσεως, στις ίδιες συνθήκες για 10 min
10. Μετά την επώαση, προστέθηκαν 100 μL διαλύματος διακοπής της σε κάθε well προκειμένου να σταματήσει η αντίδραση, και προσδιορίστηκε η απορρόφηση στα 450 nm με τη χρήση Epoch φασματοφωτόμετρου για μικροπλάκες ELISA της εταιρίας BioTek

7.3. Προσομοίωση Συνθηκών Στομαχιού

Προκειμένου να ελεγχθεί η συμπεριφορά των καζεϊνών του αγελαδινού γάλακτος σε συνθήκες παρόμοιες με αυτές του στομαχιού, καθώς και η ανιχνευσιμότητά τους με τη μέθοδο ELISA μετά την παραμονή τους στις συνθήκες αυτές, πραγματοποιήθηκε συμπληρωματικά ένα ακόμη πείραμα.

Ακολουθήθηκε μία απλουστευμένη προσέγγιση προσομοίωσης συνθηκών στομαχιού, η οποία όμως διατηρούσε τις ακραίες συνθήκες του. Για την παρασκευή του προσομοιωμένου γαστρικού υγρού χρησιμοποιήθηκε η σύνθεση που προτείνεται στο πρωτόκολλο προσομοίωσης συνθηκών ανθρώπινου στομαχιού (Riddet Model) των M.J. Ferrua και R.P. Singh (2015) στο βιβλίο “The Impact of Food Bioactives on Health”. Δείγματα από αγελαδινό γάλα εμπορίου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποβλήθηκαν στις προσομοιωμένες συνθήκες στομαχιού και σε τέσσερις διαφορετικούς χρόνους λήφθηκαν δείγματα από το καθένα, τα οποία στη συνέχεια αναλύθηκαν με την μέθοδο ELISA για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης καζεϊνών σε αυτά.

Το pH του ανθρώπινου στομάχου μπορεί να κυμανθεί μεταξύ ενός εύρους τιμών (1-3) και εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως η διατομική διακύμανση ή το αν βρίσκεται σε κατάσταση πείνας ο οργανισμός (Gardner et al., 2006). Στο παρόν πείραμα, η τιμή του pH ρυθμίστηκε στο 2.

7.3.1. Αντιδραστήρια, Υλικά & Όργανα

Τα αντιδραστήρια και τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του γαστρικού υγρού στο εργαστήριο καθώς και του προς ανάλυση δείγματος είναι τα εξής:

- απιονισμένο νερό
- αναλυτικός ζυγός
- πυκνό HCl 10M
- πεψίνη από γαστρικό βλεννογόνο χοίρου
- βλεννίνη (mucin) από στομάχι χοίρου
- NaCl
- κωνική φιάλη
- γυάλινη ράβδος ανάδευσης
- ογκομετρικό σιφώνιο 5 mL
- πεχαμετρικό χαρτί
- σωλήνες τύπου falcon
- υδατόλουτρο
- αγελαδινό γάλα εμπορίου

7.3.2. Πειραματική Πορεία

Παρασκευή Γαστρικού Υγρού:

Προκειμένου να παρασκευαστεί στο εργαστήριο γαστρικό υγρό που να προσομοιάζει το πραγματικό ανθρώπινο γαστρικό υγρό, στηριχθήκαμε στο προαναφερθέν πρωτόκολλο των M.J. Ferrua και R.P. Singh (2015).

1. Σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων ζυγίστηκαν: 0,1094 g πεψίνης, 0,1532 g γαστρικής βλεννίνης (mucin) της εταιρίας SIGMA και 0,8154 g NaCl (χλωριούχου νατρίου) και τοποθετήθηκαν σε κωνική φιάλη
2. Οι ποσότητες αυτές διαλύθηκαν σε 100 mL απεσταγμένου νερού
3. Στη συνέχεια, το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε στο 2 με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας διαλύματος HCl 2M, που παρασκευάστηκε με αραιώση 1:5 πυκνού HCl 10M
4. Το pH ελέγχθηκε με τη χρήση πεχαμετρικού χαρτιού

Πίνακας 3

Σύνθεση Γαστρικού Υγρού	
(σε 1 L απεσταγμένου νερού)	
Πεψίνη	1 g
γαστρική μυκίνη	1,5 g
NaCl	8,775 g

M.J. Ferrua και R.P. Singh (2015)

Παρασκευάστηκαν τέσσερα δείγματα με αγελαδινό γάλα εμπορίου σε τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις ως εξής. 0,5 mL (Δ1), 1,5 mL (Δ2), 2,5 mL (Δ3) και 3,5 mL (Δ4) αγελαδινού γάλακτος προστέθηκαν σε διαφορετικούς δοκιμαστικούς σωλήνες τύπου falcon, μαζί με 4,5 mL από το γαστρικό υγρό που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο με βάση το προαναφερθέν πρωτόκολλο. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε υδρατόλουτρο σε σταθερή θερμοκρασία 37 °C και σε τρεις

διαφορετικούς χρόνους (45', 90' και 135') έγινε λήψη 1 mL από κάθε ένα προς περαιτέρω ανάλυση. Το δείγμα Δ3 παρέμεινε παραπάνω στο υδατόλουτρο, για ένα σύνολο 24 ωρών (1440'), μετά το πέρας των οποίων έγινε ξανά λήψη 1 mL. Στη συνέχεια, όλα τα προς ανάλυση δείγματα υποβλήθηκαν στην διαδικασία ELISA όπως αυτή έχει περιγραφεί παραπάνω.

8. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

8.1. Ανίχνευση Καζεϊνών Αγελαδινού Γάλακτος σε Δείγματα Μητρικού Γάλακτος

Όλα τα δείγματα που αναλύθηκαν προέρχονται από μητέρες που συμπεριλαμβάνουν στη διατροφή τους το αγελαδινό γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα.

Από τις απορροφήσεις των προτύπων συναρτήσεως των γνωστών τους συγκεντρώσεων έγινε η εξαγωγή των πρότυπων καμπυλών, οι οποίες στην προκειμένη είναι πολυωνυμικές εξισώσεις 2^{ου} βαθμού, έπειτα από υπόδειξη του φυλλαδίου οδηγιών του kit που χρησιμοποιήθηκε.

Οι συγκεντρώσεις καζεΐνης στα δείγματα υπολογίστηκαν από την επίλυση της πολυωνυμικής εξίσωσης 2^{ου} δευτέρου βαθμού της αντίστοιχης κάθε φορά πρότυπης καμπύλης, αντικαθιστώντας το y με την αντίστοιχη απορρόφηση του εκάστοτε δείγματος και λύνοντας ως προς x , με τη χρήση του προγράμματος υπολογιστικών φύλλων Excel.

Οι τελικές συγκεντρώσεις αφορούν τις συγκεντρώσεις που προκύπτουν μετά και τον υπολογισμό των αραιώσεων που πραγματοποιήθηκαν κατά το πείραμα. Συγκεκριμένα, έγιναν δύο αραιώσεις. Η πρώτη όταν 0,5 mL δείγματος αραιώθηκε σε 4,5 mL ρυθμιστικού διαλύματος εκχύλισης (1/10), και η δεύτερη όταν 100 μ L από το δείγμα που είχε επωασθεί και φυγοκεντρηθεί αραιώθηκαν σε 900 μ L Διαλυτικού (1/10). Η συνολική αραιώση που πραγματοποιήθηκε ήταν 1/100. Συνεπώς, προκειμένου να υπολογίσουμε την συγκέντρωση στο αρχικό δείγμα πολλαπλασιάσαμε τις συγκεντρώσεις που προέκυψαν από την πρότυπη καμπύλη, επί 100.

Το kit που χρησιμοποιήθηκε έχει Όριο Ανίχνευσης (LOD – Limit of Detection) 1,7 ppb, και Όριο Ποσοτικοποίησης (LOQ – Limit of Quantification) 0,5 ppm ή 500 ppb. Συνεπώς, οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων μεταξύ των τιμών αυτών

θεωρούνται ίχνη και επιπλέον οι συγκεντρώσεις που βρίσκονται μεταξύ των ορίων αυτών χαρακτηρίζονται από μεγάλη αβεβαιότητα.

Παρακάτω παρατίθενται οι μετρήσεις των απορροφήσεων των προτύπων και των δειγμάτων, οι πρότυπες καμπύλες που εξήχθησαν, καθώς και οι τελικές συγκεντρώσεις καζεΐνης στα δείγματα μητρικού γάλακτος που προέκυψαν έπειτα από κατάλληλους υπολογισμούς.

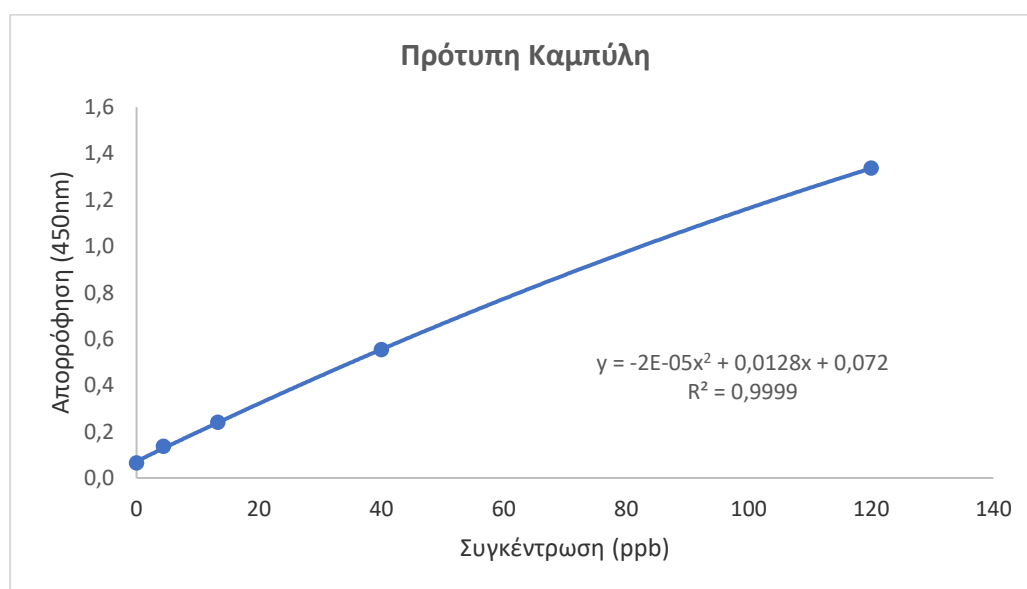
Πίνακας 17

Συνοπτικά Αποτελέσματα	
Ανιχνεύσιμη Ποσότητα	42,86%
Ίχνη	38,10%
Θετικά	4,80%

8.1.1. ΠΕΙΡΑΜΑ 1

Πίνακας 4

Απορροφήσεις Προτύπων	Συγκεντρώσεις Προτύπων (ppb)
0,064	0
0,137	4,4
0,24	13,3
0,553	40
1,336	120



Διάγραμμα 1

Πίνακας 5

A/A	Δείγματα	Απορροφήσεις Δειγμάτων	Συγκεντρώσεις Δειγμάτων (ng/mL ή ppb)	Τελικές Συγκεντρώσεις Δειγμάτων (ppm)	Τελικές Συγκεντρώσεις Δειγμάτων (ppb)
1	Μητρικό	0,058	-1,092	0	0
	Αγελαδινό	1,856	205,067	20,507	20506,685
	Μητρικό επιμόλ. με αγελαδ.	1,784	190,374	19,037	19037,358

Κατά την 1^η ημέρα στο εργαστήριο αναλύσαμε με τη μέθοδο ELISA ένα δείγμα μητρικού γάλακτος (Δείγμα 1), ένα δείγμα αγελαδινού γάλακτος εμπορίου, και επιπλέον επιμολύναμε το ίδιο δείγμα μητρικού με το αγελαδινό, επιμολύνοντας το τμή της πιπέτας που χρησιμοποιήσαμε για τη μεταφορά του.

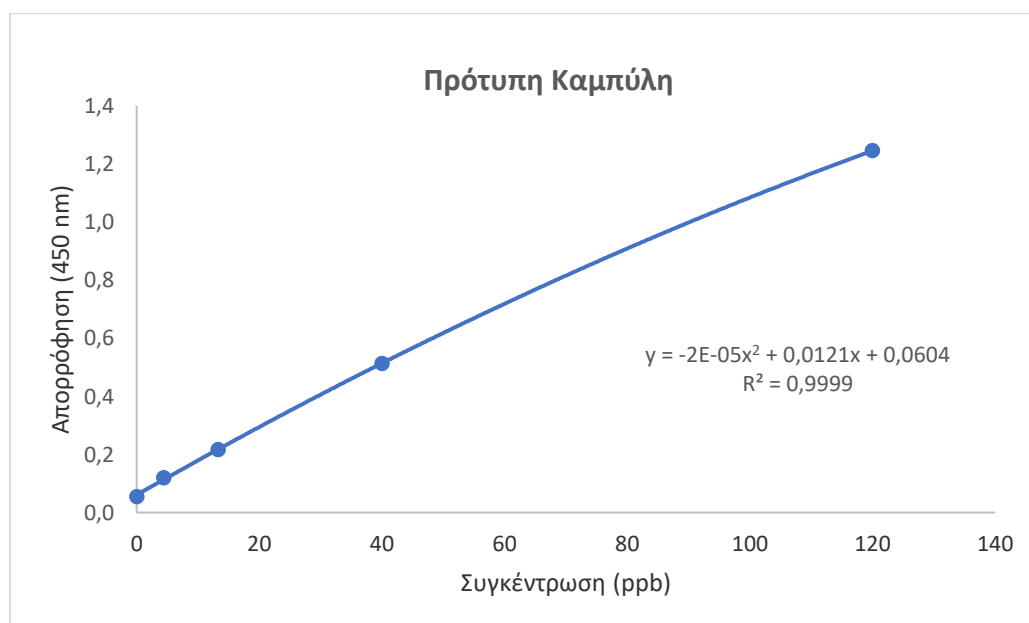
Από τα αποτελέσματα παρατηρούμε ότι η επιμόλυνση αυτή ήταν αρκετή για να δώσει μία πολύ μεγάλη συγκέντρωση καζεΐνης (19.037 ppb), σε σύγκριση με αυτή του Δείγματος 1 που αποτελεί καθαρό μητρικό γάλα, και η οποία ήταν μηδενική. Η τιμή ήταν μηδενική, διότι η απορρόφηση του δείγματος ήταν κάτω από αυτή του μηδενικού προτύπου.

Η μεγάλη αύξηση της συγκέντρωσης με την επιμόλυνση δείχνει και την ευαισθησία της ανάλυσης, καθώς μία τόσο μικρή ποσότητα γάλακτος ήταν ικανή να δώσει τόσο μεγάλη τιμή στη συγκέντρωση. Η επιμόλυνση αυτή, θα αποτελέσει μέτρο σύγκρισης για τις τιμές των συγκεντρώσεων των δειγμάτων μητρικού γάλακτος. Τέλος, η συγκέντρωση καζεΐνης στο αγελαδινό γάλα εμπορίου βρέθηκε ελαφρώς μεγαλύτερη από εκείνη του επιμολυσμένου μητρικού, και συγκεκριμένα ίση με 20.506 ppb. Η τιμή αυτή είναι εντός λογικών πλαισίων.

8.1.2. ΠΕΙΡΑΜΑ 2

Πίνακας 6

Απορροφήσεις Προτύπων	Συγκεντρώσεις Προτύπων (ppb)
0,055	0
0,120	4,4
0,217	13,3
0,513	40
1,245	120



Διάγραμμα 2

Πίνακας 7

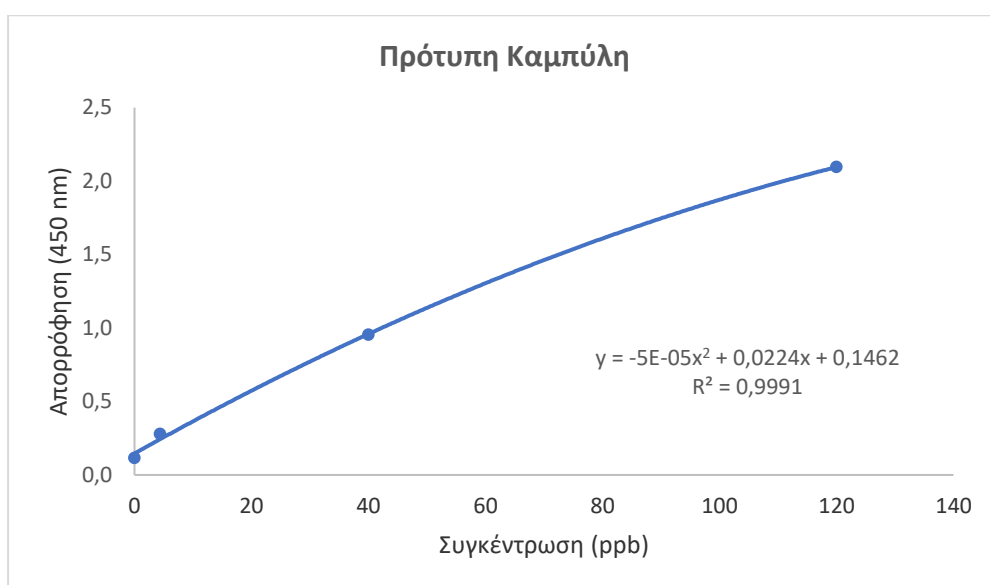
A/A	Δείγματα	Απορροφήσεις Δειγμάτων	Συγκεντρώσεις Δειγμάτων (ng/mL ή ppb)	Τελικές Συγκεντρώσεις Δειγμάτων (ppm)	Τελικές Συγκεντρώσεις Δειγμάτων (ppb)
2	Μητρικό	0,058	-0,198	0,000	0,000
3	Μητρικό	0,067	0,546	0,055	54,578
4	Μητρικό	0,059	-0,110	0,000	0,000
5	Μητρικό	0,108	3,956	0,396	395,633
6	Μητρικό	0,073	1,043	0,104	104,272

Τη 2^η ημέρα πειράματος αναλύθηκαν πέντε δείγματα μητρικού γάλακτος. Από αυτά, τα δύο (Δείγμα 2 και 4) είχαν μηδενική συγκέντρωση καζεΐνης, καθώς έδωσαν απορρόφηση μικρότερη από 0,055, δηλαδή την απορρόφηση του μηδενικού προτύπου. Τα υπόλοιπα τρία (Δείγμα 3, 5 και 6) βρέθηκαν να έχουν 54,6, 395,6 και 104,3 ppb καζεΐνης αντίστοιχα. Οι συγκεντρώσεις αυτές βρίσκονται μεταξύ των ορίων LOD και LOQ, και συνεπώς θεωρούνται ίχνη. Μάλιστα, οι απορροφήσεις των δειγμάτων 3 και 6 βρίσκονται πολύ κοντά στην απορρόφηση του μηδενικού προτύπου.

8.1.3. ΠΕΙΡΑΜΑ 3

Πίνακας 8

Απορροφήσεις Προτύπων	Συγκεντρώσεις Προτύπων (ppb)
0,116	0
0,279	4,4
0,954	40
2,096	120



Διάγραμμα 3

Πίνακας 9

A/A	Δείγματα	Απορροφήσεις Δειγμάτων	Συγκεντρώσεις Δειγμάτων (ng/mL ή ppb)	Τελικές Συγκεντρώσεις Δειγμάτων (ppm)	Τελικές Συγκεντρώσεις Δειγμάτων (ppb)
7	Μητρικό	0,103	-1,921	0,000	0,000
8	Μητρικό	0,165	0,841	0,084	84,071
9	Μητρικό	0,100	-2,055	0,000	0,000
10	Μητρικό	0,128	-0,811	0,000	0,000
	Μητρικό με επιμόλυνση	2,653	218,434	21,843	21843,427

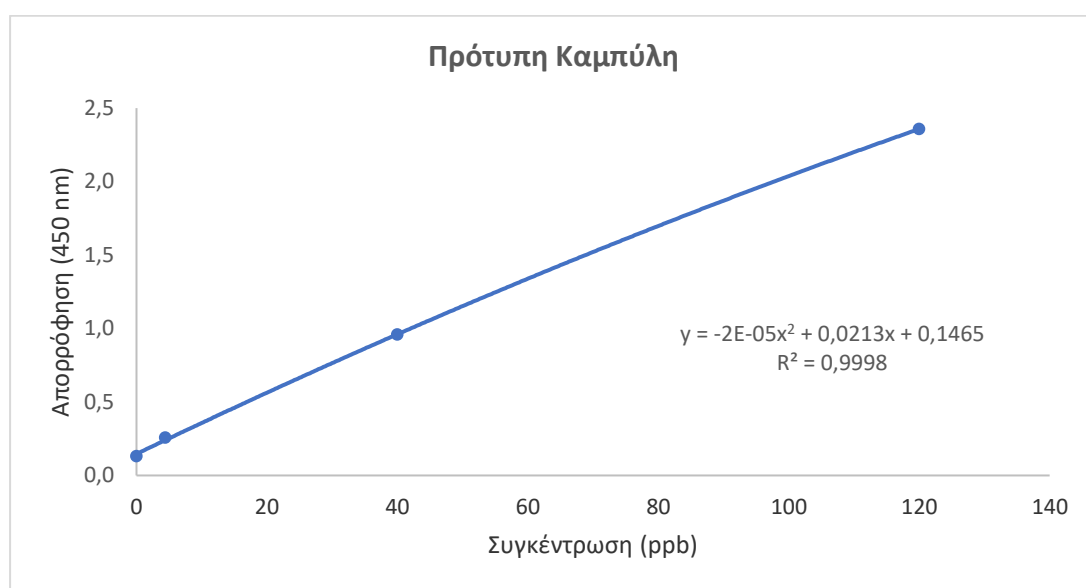
Την 3^η ημέρα αναλύθηκαν τέσσερα δείγματα μητρικού γάλακτος, και έγινε μία ακόμη επιμόλυνση με αγελαδινό γάλα, αυτή τη φορά του δείγματος 7. Από τα τέσσερα δείγματα, ένα μόνο βρέθηκε να έχει συγκέντρωση άνω του μηδενός. Πιο συγκεκριμένα το δείγμα 8 έδωσε συγκέντρωση 84,1 ppb αγελαδινής καζεΐνης. Ωστόσο, η απορρόφηση του δείγματος (0,165) βρίσκεται αρκετά κοντά σε εκείνη του μηδενικού προτύπου η οποία είναι 0,116, και ανάμεσα στα όρια LOD και LOQ. Επομένως πρόκειται για ίχνη. Τα υπόλοιπα τρία είχαν μηδενικές συγκεντρώσεις καθώς οι απορροφήσεις τους ήταν κάτω από αυτή του μηδενικού προτύπου.

Η συγκέντρωση που βρέθηκε στο επιμολυσμένο δείγμα ήταν 21.843,427 ppb. Η τιμή αυτή συμφωνεί με εκείνη της επιμόλυνσης που πραγματοποιήθηκε στο πείραμα 1. Επιπλέον, η τιμή είναι και πάλι πολύ μεγαλύτερη από εκείνη του καθαρού δείγματος μητρικού γάλακτος.

8.1.4. ΠΕΙΡΑΜΑ 4

Πίνακας 11

Απορροφήσεις Προτύπων	Συγκεντρώσεις Προτύπων (ppb)
0,131	0
0,258	4,4
0,958	40
2,358	120



Διάγραμμα 4

Πίνακας 12

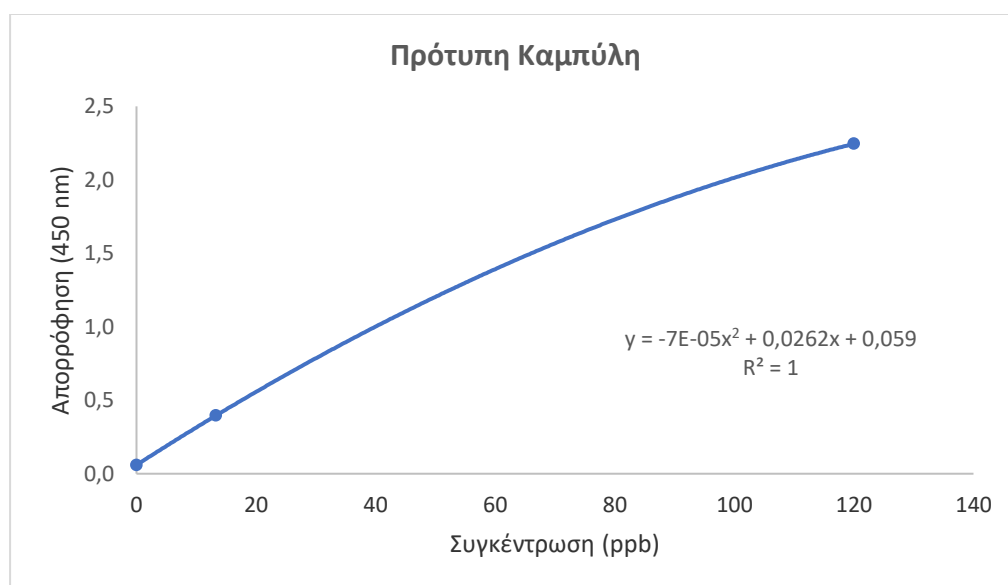
A/A	Δείγματα	Απορροφήσεις Δειγμάτων	Συγκεντρώσεις Δειγμάτων (ng/mL ή ppb)	Τελικές Συγκεντρώσεις Δειγμάτων (ppm)	Τελικές Συγκεντρώσεις Δειγμάτων (ppb)
11	Μητρικό	0,201	2,563	0,256	256,302
12	Μητρικό	0,134	-0,587	0,000	0,000
13	Μητρικό	0,111	-1,664	0,000	0,000
14	Μητρικό	0,158	0,540	0,054	54,009
15	Μητρικό	0,124	-1,056	0,000	0,000
16	Μητρικό	0,117	-1,384	0,000	0,000
17	Μητρικό	0,144	-0,110	0,000	0,000

Την 4^η ημέρα εξετάστηκαν επτά δείγματα μητρικού γάλακτος, εκ των οποίων τα πέντε είχαν μηδενική συγκέντρωση καζεΐνης, λόγω απορρόφησης μικρότερης εκείνης του μηδενικού προτύπου. Τα υπόλοιπα δύο δείγματα (Δείγμα 11 και 14) βρέθηκε ότι περιείχαν καζεΐνη σε συγκεντρώσεις 256,3 και 54 ppb αντίστοιχα. Οι συγκεντρώσεις αυτές βρίσκονται μεταξύ των ορίων LOD και LOQ, οπότε αποτελούν ίχνη.

8.1.5. ΠΕΙΡΑΜΑ 5

Πίνακας 13

Απορροφήσεις Προτύπων	Συγκεντρώσεις Προτύπων (ppb)
0,059	0
0,396	13,3
2,245	120



Διάγραμμα 5

Πίνακας 14

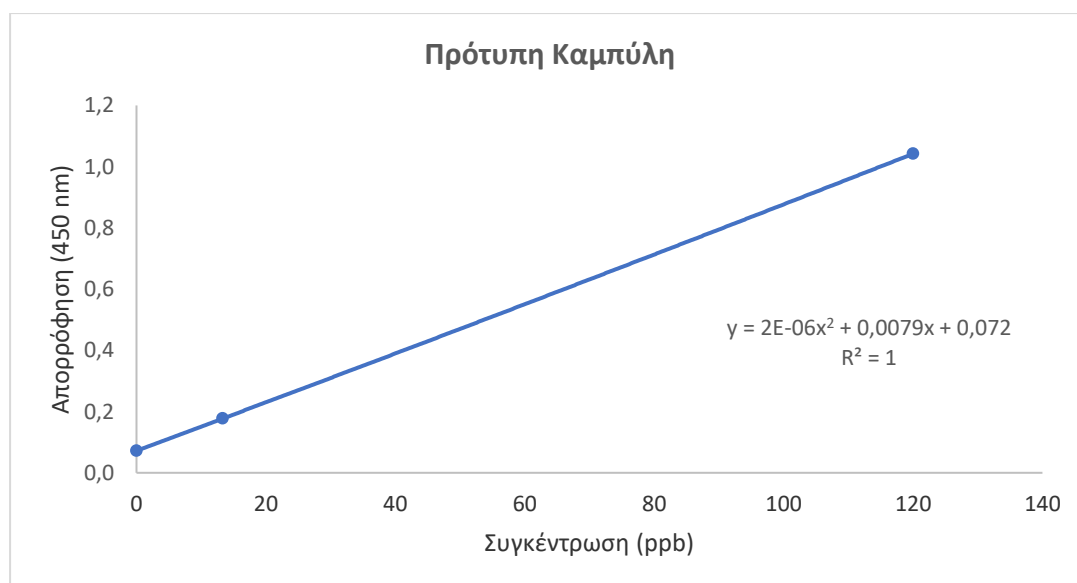
A/A	Δείγματα	Απορροφήσεις Δειγμάτων	Συγκεντρώσεις Δειγμάτων (ng/mL ή ppb)	Τελικές Συγκεντρώσεις Δειγμάτων (ppm)	Τελικές Συγκετρώσεις Δειγμάτων (ppb)
18	Μητρικό	0,088	1,109	0,111	110,931
19	Μητρικό	0,055	-0,153	0,000	0,000
20	Μητρικό	0,065	0,229	0,023	22,908
21	Μητρικό	0,063	0,153	0,015	15,272
22	Μητρικό	0,087	1,071	0,107	107,103
23	Μητρικό	0,062	0,110	0,011	11,000
24	Μητρικό	0,057	-0,076	0,000	0,000
25	Μητρικό	0,104	1,724	0,172	172,436
26	Μητρικό	0,068	0,344	0,034	34,361
27	Μητρικό	0,051	-0,310	0,000	0,000
28	Μητρικό	0,056	-0,110	0,000	0,000
29	Μητρικό	0,096	1,415	0,142	141,548
30	Μητρικό	0,064	0,191	0,019	19,090

Την 5^η ημέρα πειράματος πραγματοποιήθηκε ανάλυση σε 13 δείγματα μητρικού γάλακτος. Από αυτά, τέσσερα είχαν μηδενική συγκέντρωση καζεΐνης (Δείγμα 19, 24, 27 και 28). Το μηδενικό πρότυπο έδωσε απορρόφηση 0,059. Τα υπόλοιπα εννιά δείγματα έδωσαν συγκεντρώσεις ανάμεσα στα όρια LOD και LOQ, επομένως χαρακτηρίζονται ίχνη. Τα δείγματα 20, 21, 26 και 30 έχουν δώσει απορροφήσεις πολύ κοντά σε εκείνη του μηδενικού προτύπου.

8.1.6. ΠΕΙΡΑΜΑ 6

Πίνακας 15

Απορροφήσεις Προτύπων	Συγκεντρώσεις Προτύπων (ppb)
0,072	0
0,177	13,3
1,042	120



Διάγραμμα 6

Πίνακας 16

A/A	Δείγματα	Απορροφήσεις Δειγμάτων	Συγκεντρώσεις Δειγμάτων (ng/mL ή ppb)	Τελικές Συγκεντρώσεις Δειγμάτων (ppm)	Τελικές Συγκεντρώσεις Δειγμάτων (ppb)
31	Μητρικό	0,062	-1,266	0,000	0,000
32	Μητρικό	0,133	7,708	0,771	770,810
33	Μητρικό	0,066	-0,710	0,000	0,000
34	Μητρικό	0,063	-1,139	0,000	0,000
35	Μητρικό	0,072	0,010	0,001	1,000
36	Μητρικό	0,067	-0,633	0,000	0,000
37	Μητρικό	0,066	-0,710	0,000	0,000
38	Μητρικό	0,070	-0,253	0,000	0,000
39	Μητρικό	0,061	-1,393	0,000	0,000
40	Μητρικό	0,066	-0,710	0,000	0,000
41	Μητρικό	0,092	2,530	0,253	253,049
42	Μητρικό	0,122	6,319	0,632	631,933

Την 6^η ημέρα στο εργαστήριο έγινε ανάλυση 12 δειγμάτων μητρικού γάλακτος. Από αυτά, οκτώ βρέθηκε ότι είχαν μηδενική συγκέντρωση καζεΐνης (Δείγματα 31, 33, 34, 37, 38, 39 και 40). Το μηδενικό πρότυπο έδωσε απορρόφηση 0,072. Το δείγμα 35 έχει συγκέντρωση 1 ppb, οπότε βρίσκεται κάτω από το Όριο Ανίχνευσης (LOD). Το δείγμα 41, με συγκέντρωση 235 ppb βρίσκεται εντός των LOD και LOQ. Συνεπώς πρόκειται για ίχνη. Τα άλλα δύο δείγματα 32 και 42 είχαν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις καζεΐνης, συγκεκριμένα 770,8 και 631,9 ppb αντιστοίχως. Είναι τα μοναδικά που βρίσκονται πάνω από το όριο Ποσοτικού Προσδιορισμού (LOQ).

Αξίζει να παρατηρηθεί ότι οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων 32 και 42 εμφανίζονται ιδιαίτερα αυξημένες σε σχέση με αυτές των υπόλοιπων δειγμάτων. Ωστόσο, πρέπει να αναφέρουμε ότι όλες οι τιμές είναι αρκετά μικρές συγκρινόμενες με τις συγκεντρώσεις που μετρήθηκαν στα επιμολυσμένα δείγματα.

Το kit που χρησιμοποιήθηκε έχει Όριο Ανίχνευσης (LOD – Limit of Detection) 1,7 ppb, και Όριο Ποσοτικοποίησης (LOQ – Limit of Quantification) 0,5 ppm ή 500 ppb. Συνεπώς, οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων μεταξύ των τιμών αυτών θεωρούνται ίχνη και επιπλέον οι συγκεντρώσεις που βρίσκονται μεταξύ των ορίων αυτών χαρακτηρίζονται από μεγάλη αβεβαιότητα. Εκτός των ορίων, πάνω από το LOQ βρίσκονται οι συγκεντρώσεις καζεΐνης των δειγμάτων 32 και 42, οι οποίες είναι 770,810 και 631,933 ppb αντίστοιχα.

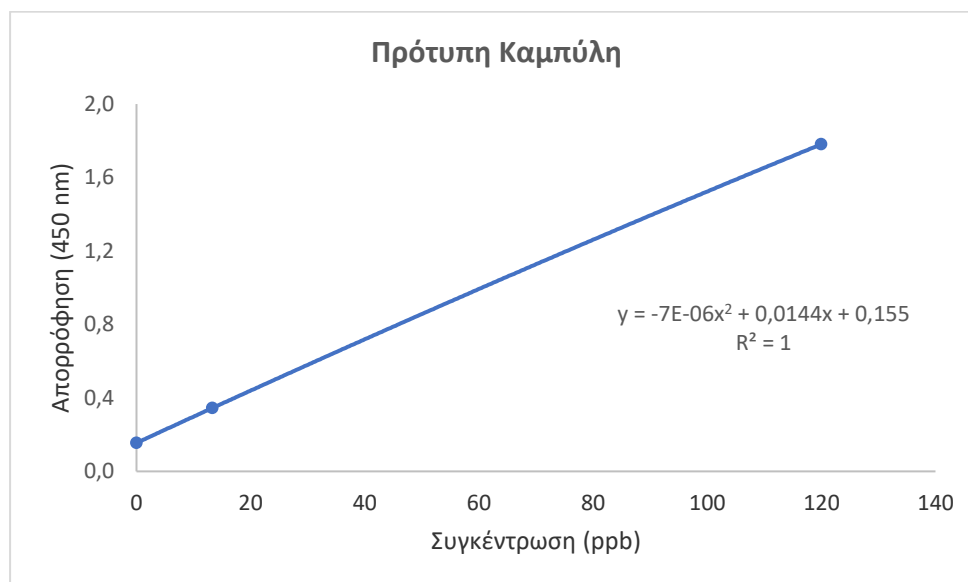
Μετά την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν, βρέθηκε ότι 18 από το σύνολο των 42 δειγμάτων είχαν κάποια ανιχνεύσιμη ποσότητα καζεΐνης, 16 από τα 42 δείγματα περιείχαν ίχνη, ενώ 2 δείγματα είχαν συγκεντρώσεις πάνω από το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ). Συνεπώς το 42,86% των δειγμάτων είχε ανιχνεύσιμη ποσότητα, το 38,1% περιείχε ίχνη και το 4,8% υπολογίσιμη ποσότητα καζεΐνης αγελαδινής προέλευσης. Ωστόσο, θα πρέπει να συνυπολογιστεί το ενδεχόμενο, κάποια άλλη ουσία που βρίσκεται στο μητρικό γάλα, να προκαλεί διασταυρούμενη αντίδραση, η οποία να αντιστοιχεί στις απορροφήσεις των δειγμάτων με ίχνη.

8.2. Προσομοίωση Συνθηκών Στομαχιού

ΠΕΙΡΑΜΑ 7

Πίνακας 17

Απορροφήσεις Προτύπων	Συγκεντρώσεις Προτύπων (ppb)
0,155	0
0,345	13,3
1,781	120



Διάγραμμα 7

Πίνακας 18

Δείγματα / Προσομοίωση στομαχιού					
	Συγκεντρώσεις	0,5	1,5	2,5	3,5
Απορροφήσεις Δειγμάτων	45'	1,428	3,181	3,638	3,694
	90'	0,969	2,666	3,584	3,548
	135'	1,101	2,178	3,545	3,463
	1440'	-	-	3,543	-

Πίνακας 19

Συγκεντρώσεις Δειγμάτων (ppb)				Τελικές Συγκεντρώσεις Δειγμάτων (ppb)			
0,5	1,5	2,5	3,5	0,5	1,5	2,5	3,5
92,538	237,615	279,979	285,341	9253,781	23761,456	27997,907	28534,107
58,172	192,361	274,845	271,441	5817,239	19236,143	27484,459	27144,090
67,935	151,678	271,158	263,464	6793,500	15167,815	27115,795	26346,436
-	-	270,969	-	-	-	27096,937	-

Κατά την 7^η πειραματική ημέρα πραγματοποιήθηκε το πείραμα προσομοίωσης συνθηκών στομαχιού. Αναλύθηκε δείγμα αγελαδινού γάλακτος εμπορίου, σε τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις. Συγκεκριμένα σε 4,5 mL προσομοιωμένου γαστρικού υγρού προστέθηκαν 0,5, 1,5, 2,5 και 3,5 mL γάλακτος αντίστοιχα. Λήφθηκαν και αναλύθηκαν δείγματα από την κάθε συγκέντρωση σε τρεις διαφορετικές χρονικές στιγμές (45', 90', 135'), ενώ το δείγμα με τα 2,5 mL γάλακτος παρέμεινε συνολικά για 24 ώρες, όταν και έγινε ξανά λήψη δείγματος προς ανάλυση σε μία τέταρτη χρονική στιγμή.

Παρατηρούμε ότι αποτελέσματα ακολουθούν λογική συνέχεια, καθώς αυξανόμενης της ποσότητας γάλακτος που προστέθηκε στα δείγματα, αυξάνεται και η υπολογιζόμενη συγκέντρωση καζεϊνών.

Και στα 4 δείγματα διαφορετικών συγκεντρώσεων παρατηρήθηκε ελαφριά μείωση της συγκέντρωσης των καζεϊνών, ωστόσο αυτή παρέμεινε υψηλή παρά τις ακραίες συνθήκες, λόγω χαμηλού pH (2) και της παρουσίας ενζύμων, στις οποίες υποβλήθηκε. Ακόμη και στην περίπτωση που το δείγμα παρέμεινε στις συνθήκες αυτές για 24 ώρες, η συγκέντρωση των καζεϊνών δεν παρουσίασε κάποια σημαντική μείωση.

Το γεγονός αυτό, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι εφόσον οι καζεΐνες ανιχνεύονται κανονικά, ακόμη και μετά την παραμονή τους στις ανωτέρω ακραίες συνθήκες, οι αντιγονικοί επίτοποι δεν έχουν καταστραφεί. Συνεπώς, θα μπορούν να ανιχνευθούν αντιστοίχως και στο μητρικό γάλα, εάν υπάρχουν.

9. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά, 2 από τα συνολικά 42 δείγματα μητρικού γάλακτος που εξετάστηκαν βρέθηκαν θετικά. Σε ακόμη 16 δείγματα εντοπίστηκαν ίχνη, τα οποία συνοδεύονται από αυξημένη αβεβαιότητα, καθώς οι συγκεντρώσεις τους βρίσκονται μεταξύ των ορίων LOD και LOQ. Ακόμη, αξίζει να παρατηρηθεί ότι και τα θετικά δείγματα είχαν συγκεντρώσεις καζεΐνης ιδιαίτερος μικρές συγκριτικά με αυτές του αγελαδινού και του επιμολυσμένου μητρικού γάλακτος.

Σχετικά με το πείραμα προσομοίωσης συνθηκών στομάχου, εκ του αποτελέσματος συμπεραίνουμε ότι οι ακραίες συνθήκες, λόγω χαμηλού pH και της παρουσίας ενζύμων, τις οποίες υπέστησαν τα δείγματα αγελαδινού γάλακτος, δεν κατόρθωσαν να καταστρέψουν τους αντιγονικούς επιτόπους των καζεϊνών του. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι οι απορροφήσεις και οι συγκεντρώσεις τους καταγράφονταν υψηλές παρά την καταπόνηση. Αντιστοίχως, θα μπορούσαν να επιβιώνουν και οι αντιγονικοί επίτοποι των καζεϊνών στο μητρικό γάλα, εάν υπήρχαν.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί επιπλέον, ότι ο αριθμός των δειγμάτων ήταν περιορισμένος (42) και η επαναληψιμότητα ήταν χαμηλή, καθώς λόγω περιορισμένου αριθμού φρεατίων (wells) κάθε δείγμα αναλύθηκε μία φορά. Επιπλέον, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη το ενδεχόμενο διασταυρούμενης αντίδρασης κάποιας άλλης ουσίας που βρίσκεται στο μητρικό γάλα, που να αντιστοιχεί στις απορροφήσεις των δειγμάτων που βρέθηκε ότι περιείχαν ίχνη καζεΐνης. Ενδέχεται επίσης τα αποτελέσματα να περιέχουν τυχαία σφάλματα που πιθανόν να προέκυψαν κατά τη διεξαγωγή του πειράματος. Συνεπώς, θα πρέπει να υπάρχει μια επιφύλαξη κατά την αξιολόγηση της ακρίβειας των αποτελεσμάτων.

Το 1984 οι *Stuart et al.* εντοπίζουν αγελαδινή καζεΐνη σε 13 από τα 28 συνολικά εξεταζόμενα δείγματα μητρικού γάλακτος. Αυτό αντιστοιχεί σε ποσοστό θετικότητας 46,4%, το οποίο είναι αρκετά μεγάλο συγκριτικά με το 4,8% της παρούσας εργασίας. Ωστόσο, πρέπει να αναφερθεί ότι οι συγγραφείς αφήνουν το ενδεχόμενο διασταυρούμενης αντίδρασης της αγελαδινής με την ανθρώπινη

καζεΐνηη, που περιέχεται φυσικά στο μητρικό γάλα. Το γεγονός αυτό δικαιολογείται από την παλαιότητα της έρευνας, λόγω των περιορισμένων μέσων της εποχής.

Οι *Coscia et al.* το 2012 εξέτασαν δείγματα πρωτογάλακτος από 62 μητέρες που γέννησαν στον αναμενόμενο χρόνο και από 11 μητέρες που γέννησαν πρόωρα. Εν τέλει, από τα 73 δείγματα, ανίχνευσαν σε 1 μόλις δείγμα άθικτη αS1-καζεΐνη αγελαδινού γάλακτος. Η μέθοδος που χρησιμοποίησαν στην έρευνά τους ήταν η φασματομετρία μάζας (MS). Το ποσοστό είναι πολύ μικρό, ωστόσο προκαλεί προβληματισμό το γεγονός ότι η αS1-καζεΐνη εντοπίστηκε άθικτη.

Το 2016 οι *Picariello et al.* πραγματοποίησαν ένα πείραμα με ενδιαφέρουσα προσέγγιση. Ειδικότερα, εξέτασαν δείγματα μητρικού γάλακτος από 12 μητέρες. Οι 6 από αυτές κατανάλωναν γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα, ενώ οι υπόλοιπες 6 τα είχαν αποκλείσει αυστηρά από τη διατροφή τους για τουλάχιστον μία εβδομάδα πριν από τη λήψη του δείγματος. Αναλύοντας τα δείγματα με τις μεθόδους HPLC – Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης, και MS – Φασματομετρία Μάζας, έλαβαν το εξής αποτέλεσμα. Από το σύνολο των 12 δειγμάτων εντοπίστηκε αS1-καζεΐνη μόνο σε 1, το οποίο προερχόταν από μητέρα που συμπεριλάμβανε το γάλα και τα γαλακτοκομικά στη διατροφή της. Στο αποτέλεσμα του παραπάνω πειράματος, προβληματισμό προκαλεί το γεγονός ότι το μόνο θετικό δείγμα προερχόταν από μητέρα που κατανάλωνε γαλακτοκομικά, ενώ επίσης το ποσοστό θετικότητας (1/12) δεν είναι αμελητέο αναλογικά με το σύνολο των δειγμάτων, ωστόσο πρέπει να τονιστεί ότι ο αριθμός των δειγμάτων ήταν αρκετά περιορισμένος.

Οι *Picariello et al.* το 2019 πραγματοποίησαν ένα ακόμη πείραμα, κατά το οποίο ανέλυσαν συνολικά 10 δείγματα, που προέρχονταν από μία μόνο μητέρα, αφού εκείνη είχε καταναλώσει 200 mL αγελαδινού γάλακτος. Πιο αναλυτικά, η δειγματοληψία έγινε σε 2 διαφορετικές μέρες, κατά τις οποίες έγινε λήψη σε 5 χρονικές στιγμές μετά την κατανάλωση του αγελαδινού γάλακτος από τη μητέρα, σε μία περίοδο 6 ωρών. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η Διαδοχική Φασματομετρία Μάζας (MS/MS) και η Nanoflow HPLC. Οι ερευνητές ανίχνευσαν συνολικά 1200 πεπτίδια. Από αυτά, 21 πεπτίδια προέρχονταν από καζεΐνες και πρωτεΐνες ορού αγελαδινού γάλακτος, και δεν είχαν καμία αντιστοιχία στο

πρωτέωμα του ανθρώπινου γάλακτος. Τα πεπτίδια αυτά προέρχονται κυρίως από β-καζεΐνη και β-λακτοσφαιρίνη, αν και ταυτοποιήθηκαν και ίχνη από άλλες καζεΐνες (όπως οι αS1- και κ- καζεΐνη) και λακτοφερρίνη. Επιπλέον, αξίζει να αναφερθεί ότι τα παραπάνω πεπτίδια απουσίαζαν από 3 δείγματα που εξετάστηκαν αργότερα, τα οποία προέρχονται από την ίδια μητέρα, αφού πρώτα είχε ακολουθήσει παρατεταμένη δίαιτα απαλλαγμένη από γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα. Τα ανωτέρω ευρήματα είναι αξιοσημείωτα, ωστόσο δεν έχει ξεκαθαριστεί εάν τόσο μικρές ποσότητες διαιτητικών πεπτιδίων είναι ικανές να προκαλέσουν αλλεργικές αποκρίσεις στα θηλάζοντα βρέφη.

Μετά από την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας αλλά και της ανασκόπησης των βιβλιογραφικών δεδομένων, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι σε όλα τα πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί σχετικά με την απέκκριση των πρωτεϊνών αγελαδινού γάλακτος στο μητρικό γάλα, υπάρχει ένα μικρό ποσοστό θετικότητας. Συνεπώς, δεν μπορεί να αποκλειστεί το ενδεχόμενο μετανάστευσης των πρωτεϊνών που προέρχονται από την διατροφή της μητέρας στο μητρικό γάλα, ωστόσο δεν έχει αποσαφηνιστεί ο μηχανισμός με τον οποίο αυτό μπορεί να συμβεί. Παράλληλα, οι ποσότητες που εντοπίστηκαν στην παρούσα εργασία αλλά και οι αναφερόμενες στη βιβλιογραφία είναι ιδιαίτερως μικρές, και θα μπορούσαν να θεωρηθούν αμελητέες. Παρόλα αυτά, δεν υπάρχει κάποιο προκαθορισμένο όριο για την ποσότητα που θα ήταν ικανή να προκαλέσει ανοσολογική απόκριση.

Λόγω των παραπάνω διαπιστώσεων, το θέμα χρήζει περαιτέρω επιστημονικής έρευνας, καθώς μένει να αποδειχθεί εάν οι ελάχιστες ποσότητες καζεΐνης που ανιχνεύθηκαν ή τα μικρά πεπτίδια που αναφέρονται στη βιβλιογραφία είναι ικανά να προκαλέσουν αλλεργική αντίδραση στον οργανισμό των νεογνών. Επιπλέον, θα πρέπει να ερευνηθεί το ενδεχόμενο, τις αλλεργικές αντιδράσεις να προκαλούν οι πρωτεΐνες του ορού του γάλακτος και συγκεκριμένα η β - λακτοσφαιρίνη, η οποία είναι γνωστή για την αλλεργιογόνο δράση της.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξένη Βιβλιογραφία

Andreas, N. J., Kampmann, B., & Le-Doare, K. M. (2015). Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early human development*, 91(11), 629-635.

Ashoor, S. H., & Stiles, P. G. (1987). Determination of soy protein, whey protein, and casein in unheated meats by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 393(2), 321-328.

Bernard, H., Ah-Leung, S., Drumare, M. F., Feraudet-Tarisse, C., Verhasselt, V., Wal, J. M., ... & Adel-Patient, K. (2014). Peanut allergens are rapidly transferred in human breast milk and can prevent sensitization in mice. *Allergy*, 69(7), 888-897.

Boirie, Y., Dangin, M., Gachon, P., Vasson, M. P., Maubois, J. L., & Beaufrère, B. (1997). Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. *Proceedings of the national academy of sciences*, 94(26), 14930-14935.

Burks, A. W., Williams, L. W., Helm, R. M., Connaughton, C., Cockrell, G., & O'Brien, T. (1991). Identification of a major peanut allergen, Ara h I, in patients with atopic dermatitis and positive peanut challenges. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 88(2), 172-179.

Camargo, L. S., Silveira, J. A., Taddei, J. A., & FAGUNDES, U. (2016). ALLERGIC PROCTOCOLITIS IN INFANTS: analysis of the evolution of the nutritional status. *Arquivos de gastroenterologia*, 53, 262-266.

Coscia, A., Orrù, S., Di Nicola, P., Giuliani, F., Varalda, A., Peila, C., ... & Bertino, E. (2012). Detection of cow's milk proteins and minor components in human milk using proteomics techniques. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 25(sup4), 49-51.

Dalgleish, D. G., Spagnuolo, P. A., & Goff, H. D. (2004). A possible structure of the casein micelle based on high-resolution field-emission scanning electron microscopy. *International Dairy Journal*, 14(12), 1025-1031.

Denis, M., Loras-Duclaux, I., & Lachaux, A. (2012). Cow's milk protein allergy through human milk. *Archives de pédiatrie: organe officiel de la société française de pédiatrie*, 19(3), 305-312.

Ding, X., Yang, Y., Zhao, S., Li, Y., & Wang, Z. (2011). Analysis of α -lactalbumin, β -lactoglobulin A and B in whey protein powder, colostrum, raw milk, and infant formula by CE and LC. *Dairy science & technology*, 91(2), 213-225.

Ferrua, M. J., & Singh, R. P. (2015). Human gastric simulator (Riddet model). The impact of food bioactives on health, 61-71.

Greenberg, R., Groves, M. L., & Dower, H. J. (1984). Human beta-casein. Amino acid sequence and identification of phosphorylation sites. *Journal of Biological Chemistry*, 259(8), 5132-5138.

Hachey, D. L., Silber, G. H., Wong, W. W., & Garza, C. (1989). Human lactation II: endogenous fatty acid synthesis by the mammary gland. *Pediatric research*, 25(1), 63-68.

Harmsen, M. C., Swart, P. J., Béthune, M. P. D., Pauwels, R., Clercq, E. D., The, T. B., & Meijer, D. K. (1995). Antiviral effects of plasma and milk proteins: lactoferrin shows potent activity against both human immunodeficiency virus and human cytomegalovirus replication in vitro. *Journal of Infectious Diseases*, 172(2), 380-388.

- Isaacs, C. E., Litov, R. E., & Thormar, H. (1995). Antimicrobial activity of lipids added to human milk, infant formula, and bovine milk. *The Journal of nutritional biochemistry*, 6(7), 362-366.
- Järvinen, K. M., & Suomalainen, H. (2001). Development of cow's milk allergy in breast-fed infants. *Clinical & Experimental Allergy*, 31(7), 978-987.
- Jenness, R. (1979, July). The composition of human milk. In *Seminars in perinatology* (Vol. 3, No. 3, pp. 225-239).
- Koletzko, B., Rodriguez-Palmero, M., Demmelmair, H., Fidler, N., Jensen, R., & Sauerwald, T. (2001). Physiological aspects of human milk lipids. *Early human development*, 65, S3-S18.
- Lauritzen, L., & Carlson, S. E. (2011). Maternal fatty acid status during pregnancy and lactation and relation to newborn and infant status. *Maternal & child nutrition*, 7, 41-58.
- Lönnerdal, B. (2004). Human milk proteins. *Protecting Infants through Human Milk*, 11-25.
- Miner-Williams, W. M., Stevens, B. R., & Moughan, P. J. (2014). Are intact peptides absorbed from the healthy gut in the adult human?. *Nutrition research reviews*, 27(2), 308-329.
- Monaci, L., Treggoat, V., van Hengel, A. J., & Anklam, E. (2006). Milk allergens, their characteristics and their detection in food: a review. *European Food Research and Technology*, 223(2), 149-179.
- Munblit, D., Boyle, R. J., & Warner, J. O. (2015). Factors affecting breast milk composition and potential consequences for development of the allergic phenotype. *Clinical & Experimental Allergy*, 45(3), 583-601.
- Newburg, D.S. (1997). Do the binding properties of oligosaccharides in milk protect human infants from gastrointestinal bacteria? *Journal of nutrition*, 127(5), 980S-984S.
- Nommsen, L. A., Lovelady, C. A., Heinig, M. J., Lönnerdal, B., & Dewey, K. G. (1991). Determinants of energy, protein, lipid, and lactose concentrations in human milk during the first 12 mo of lactation: the DARLING Study. *The American journal of clinical nutrition*, 53(2), 457-465.
- Olson, J. A. (1996). Benefits and liabilities of vitamin A and carotenoids. *The Journal of nutrition*, 126(suppl_4), 1208S-1212S.
- Park, Y. W., Juárez, M., Ramos, M., & Haenlein, G. F. W. (2007). Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small ruminant research*, 68(1-2), 88-113.
- Paxson Jr, C. L., & Cress, C. C. (1979). Survival of human milk leukocytes. *Journal of Pediatrics*, 94(1), 61-64.
- Peng, L., Li, Z. R., Green, R. S., Holzman, I. R., & Lin, J. (2009). Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers. *The Journal of nutrition*, 139(9), 1619-1625.
- Picariello, G., Addeo, F., Ferranti, P., Nocerino, R., Paparo, L., Passariello, A., ... & Canani, R. B. (2016). Antibody-independent identification of bovine milk-derived peptides in breast-milk. *Food & function*, 7(8), 3402-3409.
- Picariello, G., De Cicco, M., Nocerino, R., Paparo, L., Mamone, G., Addeo, F., & Berni Canani, R. (2019). Excretion of dietary cow's milk derived peptides into breast milk. *Frontiers in nutrition*, 6, 25.
- Poms, R. E., Klein, C. L., & Anklam, E. (2004). Methods for allergen analysis in food: a review. *Food additives and contaminants*, 21(1), 1-31.

Ramsay, A. J., Leong, K. H., Boyle, D., Ruby, J., & Ramshaw, I. A. (1994). Enhancement of mucosal IgA responses by interleukins 5 and 6 encoded in recombinant vaccine vectors. *Reproduction, fertility and development*, 6(3), 389-392.

Ring J. (2014). What is allergy. In *European Academy of Allergy and Clinical Immunology, Global Atlas of Allergy*, (pp. 2-3).

Romeu-Nadal, M., Morera-Pons, S., Castellote, A. I., & Lopez-Sabater, M. C. (2006). Rapid high-performance liquid chromatographic method for Vitamin C determination in human milk versus an enzymatic method. *Journal of Chromatography B*, 830(1), 41-46.

Sanchón, J., Fernández-Tomé, S., Miralles, B., Hernández-Ledesma, B., Tomé, D., Gaudichon, C., & Recio, I. (2018). Protein degradation and peptide release from milk proteins in human jejunum. Comparison with in vitro gastrointestinal simulation. *Food chemistry*, 239, 486-494.

Schäppi, G. F., Konrad, V., Imhof, D., Etter, R., & Wüthrich, B. (2001). Hidden peanut allergens detected in various foods: findings and legal measures. *Allergy*, 56(12), 1216-1220.

Sicherer, S. H., & Sampson, H. A. (2018). Food allergy: a review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and management. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 141(1), 41-58.

Stuart, C. A., Twiselton, R., Nicholas, M. K., & Hide, D. W. (1984). Passage of cows' milk protein in breast milk. *Clinical & Experimental Allergy*, 14(6), 533-535.

Taylor, S. L., & Hefle, S. L. (2005). Allergen control.

Taylor, S. L., & Hefle, S. L. (2006). Food allergen labeling in the USA and Europe. *Current opinion in allergy and clinical immunology*, 6(3), 186-190.

van Hengel, A. J. (2007). Food allergen detection methods and the challenge to protect food-allergic consumers. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 389(1), 111-118.

Villa, C., Costa, J., & Mafra, I. (2019). Detection and quantification of milk ingredients as hidden allergens in meat products by a novel specific real-time PCR method. *Biomolecules*, 9(12), 804.

Ελληνική Βιβλιογραφία

Αγγελοπούλου, Μ. (2017). Οπτικοί ανοσοαισθητήρες για την ταυτόχρονη ανίχνευση αλλεργιογόνων ουσιών σε τρόφιμα (Doctoral dissertation, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ). Σχολή Θετικών Επιστημών. Τμήμα Χημείας. Τομέας ΙΙ. Εργαστήριο Βιοχημείας).

Αντωνάκου, Α. (2012). Η σύσταση του μητρικού γάλακτος Ελληνίδων μητέρων και πώς αυτή επηρεάζεται από τη διατροφή τους πρώτους έξι μήνες της γαλουχίας (Doctoral dissertation, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο. Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής).

Χρήστος Κεχαγιάς, Τσάκαλη Ευσταθία. (2017). Συστατικά και Ιδιότητες, Επιστήμη και Τεχνολογία Γάλακτος και Γαλακτοκομικών Προϊόντων. *Εκδόσεις Νέων Τεχνολογιών*, 33 – 69.