



Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής
Σχολή Επιστημών Τροφίμων
Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Πτυχιακή Εργασία
Οι πολυμορφισμοί της δυσανεξίας στην λακτόζη
English Title
Polymorphisms of lactose intolerance



ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΩΝ / NAME OF STUDENTS

Έλι Κωνσταντίνα – Λορεντάνα / Καμπούτση Δημητρούλα
Eli Constantina – Loredana / Kabuci Dimitrula

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

Χούγουλα Δήμητρα
Houhoula Dimitra

Αιγάλεω, 2024

Επιτροπή Αξιολόγησης

Οι υπογράφωντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη πτυχιακή εργασία με τίτλο «Οι πολυμορφισμοί της Δυσανεξίας στην Λακτόζη» που παρουσιάστηκε από την Ίλι Κωνσταντίνα – Λορεντάνα και Καμπούτση Δημητρούλα, υποψήφιος για τον πτυχιακό τίτλο σπουδών Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

α/α	Ονοματεπώνυμο	Ψηφιακή Υπογραφή
1.	Χούχουλα Δήμητρα	
2.	Μπατρίνου Ανθιμία	
3.	Τσάκαλη Ευσταθία	

Δήλωση Περί Λογοκλοπής / Copyright

Έχοντας πλήρη επίγνωση των συνεπειών του νόμου περί πνευματικής ιδιοκτησίας, δηλώνουμε ότι είμαστε αποκλειστικοί συγγραφείς της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Δηλώνουμε, επίσης, ότι αναλαμβάνουμε όλες τις συνέπειες, όπως αυτές νομίμως ορίζονται, στην περίπτωση που διαπιστωθεί διαχρονικά ότι η εργασία μας αυτή ή τμήμα αυτής αποτελεί προϊόν λογοκλοπής.

Έλι Κωνσταντίνα – Λορεντάνα , Καμπούτση Δημητρούλα

Ευχαριστίες

Η πτυχιακή αυτή εργασία εκπονήθηκε υπό την επίβλεψη της κ. Δήμητρας Χούγουλα, καθηγήτριας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής (ΠΑΔΑ) της σχολής Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων στην οποία οφείλουμε ιδιαίτερες ευχαριστίες για την πολύτιμη βοήθεια και στήριξή της σε όλη την διάρκεια του έτους. Τέλος, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε τις οικογένειές μας για την εμπύχωση και την υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μας.

Αθήνα, 2024
ΊΛΙ, ΚΑΜΠΟΥΤΣΗ

Περίληψη

Η λακτόζη είναι ένας δισακχαρίτης, ο οποίος αποτελείται από την γλυκόζη και την γαλακτόζη, βρίσκεται στο γάλα των θηλαστικών και χαρακτηρίζεται ως ένα σημαντικό δισακχαρίτης για τον άνθρωπο. Η λακτόζη υδρολύεται από ένα ένζυμο, την λακτάση. Η δραστηριότητα της είναι σημαντική, καθώς το γάλα αποτελεί κύρια πηγή διατροφής από την βρεφική ηλικία, και στους υγιείς ανθρώπους βοηθά να αφομοιώσουν τον δισακχαρίτη. Ωστόσο, μερικοί άνθρωποι δεν εμφανίζουν το ένζυμο με αποτέλεσμα να έχουν χαμηλότερη ικανότητα πέψης της λακτόζης και να περιορίζονται στην κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων. Αυτή η ανικανότητα πέψης και έλλειψης της λακτάσης χαρακτηρίζεται ως δυσανεξία στην λακτόζη και χωρίζεται σε τέσσερις κατηγορίες, στην συγγενή ανεπάρκεια της λακτάσης, αναπτυξιακή, πρωτογενής ανεπάρκεια ή υπολακτασία αλλά και δευτερογενής ανεπάρκεια. Είναι αντιληπτό ότι οι διαφορές στην λακτάση οφείλονται σε γεντικούς πολυμορφισμούς και υπάρχουν τρία είδη, ο ομόζυγος, ο ετερόζυγος αλλά και ο ομόζυγος για την ανεκτικότητα στην λακτόζη.

Στην παρούσα πτυχιακή, η ανίχνευση της δυσανεξίας έγινε με το τεστ gb GENETIC LACTO, και λήφθηκαν 30 δείγματα, των οποίων η καταγωγή ήταν από βαλκάνια. Οι εθελοντές επίσης, απάντησαν σε ένα ερωτηματολόγιο σχετικά με τα προσωπικά τους στοιχεία, τα συμπτώματα, και την συχνότητα κατανάλωσης των γαλακτοκομικών. Για την επίτευξη της διαδικασίας λήφθηκαν δείγματα σάλιου, αίματος, έγινε απομόνωση DNA από αυτά και στην συνέχεια εξετάστηκε εάν έχουν δυσανεξία με Real Time PCR. Τα αποτελέσματα έδειξαν, πως τα περισσότερα άτομα είναι ετεροζυγωτικά ως προς το μεταλλαγμένο γονίδιο, και λίγα ομοζυγωτικά. Επίσης, το μεταλλαγμένο γονίδιο είναι επικρατέστερο σε σχέση με το φυσιολογικό. Τέλος, οι περισσότεροι σύμφωνα με τις απαντήσεις στο ερωτηματολόγιο εμφανίζουν συμπτώματα, κάποιιο ηπιότερα και κάποιιο εντονότερα, ωστόσο, μερικοί βρέθηκαν αρνητικοί ενώ παρουσίαζαν τα ίδια συμπτώματα κατά την κατανάλωση γαλακτοκομικών.

ΛΕΞΕΙΣ – ΚΛΕΙΔΙΑ:

Δυσανεξία στην λακτόζη, λακτόζη, λακτάση, γενετικοί πολυμορφισμοί, απομόνωση DNA, real time PCR

Summary

Lactose is a disaccharide, which consists of glucose and galactose, is found in the milk of mammals and is characterized as an important disaccharide for humans. Lactose is hydrolyzed by an enzyme, lactase. Its activity is important, since milk is the main source of nutrition from infancy, and in healthy people it helps to assimilate the disaccharide. However, some people do not develop the enzyme and as a result have a lower ability to digest lactose and limit their consumption of dairy products. This inability to digest and lack lactase is characterized as lactose intolerance and is divided into four categories, congenital lactase deficiency, developmental, primary deficiency or hypolactasia and secondary deficiency. It is understood that the differences in lactase are due to genetic polymorphisms and there are three types, the homozygous, the heterozygous and the homozygous for lactose tolerance.

In this thesis, the intolerance was detected with the gb GENETIC LACTO test, and 30 samples were taken, whose origin was from the Balkans. The volunteers also answered a questionnaire about their personal information, symptoms, and frequency of dairy consumption. To achieve the procedure, saliva and blood samples were taken, DNA was isolated from them and then examined if they have intolerance with Real Time PCR. The results showed that most individuals are heterozygous for the mutated gene, and few are homozygous. Also, the mutated gene is more dominant than the normal one. Finally, according to the answers to the questionnaire, most of them show symptoms, some milder and some more intense, however, some were found to be negative while presenting the same symptoms when consuming dairy products.

KEYWORDS:

Lactose intolerance, lactose, lactase, genetic polymorphisms, DNA isolation, real time PCR

Πίνακας περιεχομένων

1. Εισαγωγή	9
2. Σκοπός Εργασίας.....	12
3. Θεωρητικό Υπόβαθρο – Ανασκόπηση Βιβλιογραφίας.....	13
1. Λακτόζη.....	13
1.1. Εισαγωγή	13
1.2. Βιοχημική σύνθεση λακτόζης.....	13
1.3. Σχηματισμός λακτόζης στο γάλα των θηλαστικών	14
1.4. Η λακτόζη στα γαλακτοκομικά προϊόντα	14
1.5. Οι χρήσεις της λακτόζης στην βιομηχανία	16
1.6. Παραγωγή Lactose-Free προϊόντων.....	17
1.7. Οφέλη λακτόζης στον ανθρώπινο οργανισμό.....	19
2. Λακτάση.....	21
2.1. Εισαγωγικά περί των ενζύμων	21
2.2. Β –γαλακτοσιδάση	22
2.3. Γενικές πληροφορίες σχετικά με την λακτάση.....	22
2.4. Βιοχημεία της λακτάσης	23
2.5. Παραγωγή του ενζύμου λακτάσης.....	24
3. Δυσανεξία στην Λακτόζη	26
3.1. Εισαγωγή	26
3.2. Εθνολογικά στοιχεία	26
3.3. Πολυμορφισμοί λακτόζης.....	28
3.4. Μορφές δυσανεξίας στη λακτόζη	31
3.5. Συμπτώματα δυσανεξίας της λακτόζης.....	36
3.6. Θεραπευτικές επιλογές της δυσανεξίας της λακτόζης.....	38
3.7. Συσχέτιση δυσανεξίας στη λακτόζη με άλλες παθήσεις	41
3.8. Μέθοδοι ανίχνευσης δυσανεξίας της λακτόζης.....	43
3. Πειραματικό μέρος	49
Απομόνωση DNA.....	49
Γενικές πληροφορίες για το DNA.....	49
Γενικές πληροφορίες για απομόνωση DNA	51
Πηγές λήψης δειγμάτων DNA	54
Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction PCR)	56
Ποσοτική Real Time PCR	59
Πειραματική διαδικασία απομόνωσης DNA	60
Όργανα	63
Μεθοδολογία για την απομόνωση DNA	67
ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ - gb Genetic Lacto (generi biotech).....	69

Αποτελέσματα	71
Συζήτηση.....	83
Συμπέρασμα	85
Βιβλιογραφίες.....	87

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1: Δομή λακτόζης	14
Εικόνα 2: Μηχανισμός ενζυμικής δραστηριότητας (National Human Genome Research Institute)	21
Εικόνα 3: Δυσανεξία της λακτόζης ανά ηλικία και εθνικότητα	27
Εικόνα 4: Πολυμορφισμοί της λακτάσης - Μοριακή Γενετική	29
Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση φυσιολογικής πέψης λακτόζης (αριστερά) και δυσανεξίας της λακτόζης (δεξιά)	37
Εικόνα 6: Λακτουλόζη	40
Εικόνα 7: Αίτια και συμπτώματα δυσανεξίας στην λακτόζη	41
Εικόνα 8: Γαξιλόζη.....	44
Εικόνα 9: Προϊόντα αποφυγής για πάσχοντες απο δυσανεξία στη λακτόζη.....	48
Εικόνα 10: Δομή διπλής έλικας DNA.....	50
Εικόνα 11: Διαδικασία απομόνωσης DNA	51
Εικόνα 12: Φυγόκεντρος.....	63
Εικόνα 13: Φθορισμόμετρο	64
Εικόνα 14: DNA extractor.....	65
Εικόνα 15: Thermo - Shaker	66
Εικόνα 16: Real Time PCR Cyclor	68
Εικόνα 17: Αναπαράσταση της διαδικασίας του πρωτόκολλου	70
Εικόνα 18: Διάγραμμα HEX για τα πρότυπα δείγματα.....	71
Εικόνα 19: Διάγραμμα FAM για τα πρότυπα δείγματα.....	72
Εικόνα 20: Διάγραμμα FAM για τα δείγματα 4 και 5	74
Εικόνα 21: Διάγραμμα HEX για τα δείγματα 4 και 5	74
Εικόνα 22: Διάγραμμα FAM για τα δείγματα 6 και 7	76
Εικόνα 23: Διάγραμμα HEX για τα δείγματα 6 και 7	76
Εικόνα 24: Διάγραμμα FAM για τα δείγματα 8 και 9	78
Εικόνα 25: Διάγραμμα HEX για δείγματα 8 και 9.....	79
Εικόνα 26: Διάγραμμα HEX για το δείγμα 10.....	81
Εικόνα 27: Διάγραμμα FAM για το δείγμα 10.....	81

1. Εισαγωγή

Τα θηλαστικά χαρακτηρίζονται για την παρουσία μαστικών αδένων, δηλαδή οργάνων που παράγουν γάλα για να ταΐσουν τα μικρά τους και μαζί με αυτή την δυνατότητα προέκυψε η ανάγκη για τα νεογέννητα να διασπάσουν το σάκχαρο που περιέχεται μέσα στο γάλα, δηλαδή την λακτόζη. (Séguirel, Laure, and Céline Bon, 2017) Ωστόσο, το ανθρώπινο σώμα ορισμένες φορές δεν παράγει σε επαρκή ποσότητα ενζύμων για να διασπάσουν τους υδατάνθρακες στο παχύ έντερο, (Thompson, Manore, Vaughan, 2021) με αποτέλεσμα να παρατηρείται ένα μεγάλο μέρος ανθρώπων όταν καταναλώνουν γαλακτοκομικά προϊόντα να δυσκολεύονται να αφομοιώσουν σημαντικές ποσότητες λακτόζης λόγω γενετικά ανεπαρκούς ποσότητας του ενζύμου λακτάσης, παρουσιάζοντας ενοχλήσεις κατά την κατανάλωση τους. (Swagerty Jr, Daniel L., Anne D. Walling, and Robert M. Klein, 2002) Η νόσος αυτή χαρακτηρίζεται ως δυσανεξία στην λακτόζη και είναι ευρέως διαδεδομένη στον κόσμο, και τα άτομα που νοσούν από αυτήν, αποφεύγουν την κατανάλωση γάλακτος αλλά και των προϊόντων του.

Ο δισακχαρίτης λακτόζη είναι ένας μοναδικός υδατάνθρακας που υπάρχει μόνο στο γάλα των θηλαστικών, με 7,2g/100mL στο μητρικό γάλα και 4,7g/100mL στο αγελαδινό, αλλά αμελητέος σε κάποιων θαλάσσιων θηλαστικών. Κατά την βρεφική ηλικία η λακτόζη παρέχει μια εξαιρετική πηγή ενέργειας στην περίοδο ανάπτυξης. (Lomer, Miranda CE, G. C. Parkes, and J. D. Sanderson, 2008). Ο δισακχαρίτης υδρολύεται από την λακτάση σε γλυκόζη, η οποία αποτελεί πηγή ενέργειας αλλά και σε γαλακτόζη, η οποία είναι απαραίτητο συστατικό των γλυκολιπιδίων αλλά και γλυκοπρωτεϊνών. Τα σάκχαρα αυτά, απορροφώνται από τα εντερικά κύτταρα του λεπτού εντέρου μέσω της κυκλοφορίας του αίματος. (Lomer, Miranda CE, G. C. Parkes, and J. D. Sanderson, 2008). Η δυσανεξία διαχωρίζεται σε δύο κατηγορίες, στην πρωτοπαθή ανεπάρκεια (μερική ή ολική) του ενζύμου, οι οποίοι πάσχοντες μπορούν να ανέχονται σε μικρές ποσότητες γαλακτοκομικά ή και προϊόντα όπως η γιαούρτη, το τυρί, κατά τα οποία τα βακτήρια και οι μύκητες έχουν καταναλώσει την λακτόζη για την ζύμωση. Από την άλλη πλευρά, η δευτεροπαθή, στην οποία υπάρχει βλάβη στο λεπτό έντερο π.χ. οξεία λοίμωξη, η οποία υποκείμενη λοίμωξη πρέπει να θεραπευτεί και η κατανάλωση γαλακτοκομικών μπορεί να ξεκινήσει εκ νέου μετά το πέρας της θεραπείας. (Judith E. Brown, 2016)

Στα υγιή βρέφη εμφανίζεται συνεχής δραστηριότητα της λακτάσης, Βέβαια, παρατηρείται και στα θηλάζοντα βρέφη, δυσανεξία στην λακτόζη, η οποία είναι λιγότερο

συχνή. Λακτόζη περιέχεται στο μητρικό, αλλά όσα βρέφη δεν μπορούν να την διασπάσουν, έχουν παρασκευαστεί ειδικές φόρμουλες βρεφικές χωρίς λακτόζη, η οποία έχει αντικατασταθεί από τροποποιημένο άμυλο καλαμποκιού, ή σακχαρόζη, ή η ίδια λακτόζη να έχει διασπαστεί σε μονοσακχαρίτες όπως σε κάποια γάλατα των ενηλίκων. Στην περίπτωση αυτή των βρεφών που καταναλώνουν βρεφικές τέτοιες φόρμουλες, θα μπορέσουν να καταναλώσουν κανονικά γαλακτοκομικά στα επόμενα χρόνια. Παρ' όλα αυτά δεν χρειάζεται η κατάργηση της κατανάλωσης των γαλακτοκομικών, λόγω της υψηλής διατροφικής και θρεπτικής αξίας τους. (Judith E. Brown, 2016). Μετά τον απογαλακτισμό παρουσιάζονται δύο φαινότυποι, ο ένας είναι η ανεπάρκεια λακτάσης, η οποία εμφανίζεται σε κάποια περίοδο της παιδικής ηλικίας, και μπορεί να είναι από 2 έτη μέχρι και 9 έτη, καθώς στην παιδική ηλικία ελαττώνεται η κατανάλωση της λακτόζης σταδιακά λόγω της έλλειψης ικανότητας να αφομοιωθεί. (Forsgård, Richard A, 2019). Ο άλλος φαινότυπος που επικρατεί είναι η επιμονή της λακτάσης, κατά την οποία έχει υψηλή δραστηριότητα, επομένως, γίνεται φυσιολογική πέψη της λακτόζης. (Forsgård, Richard A, 2019). Παρεμπιπτόντως, αξίζει να σημειωθεί πως μετά τον απογαλακτισμό είναι φυσιολογικό να ελαττώνεται η παραγωγή της λακτάσης, η οποία φθίνει, αφού τα παιδιά όταν απογαλακτίζονται το γάλα καθίσταται λιγότερο σημαντικό στην διατροφή. (J.M.Berg, J.L. Tymoczko, G.J. Gatto, L.Stryer, 2021)

Τα συμπτώματα τα οποία εμφανίζονται σε άτομα με δυσανεξία στην λακτόζη είναι κυρίως: κοιλιακό άλγος, διάρροια, μετεωρισμός, δυσφορία, βορβορυγμό καθώς και ναυτία ή εμετός. (Lomer, Miranda CE, G. C. Parkes, and J. D. Sanderson, 2008) Πολλές φορές, συγχέεται με την αλλεργία στο γάλα, στην οποία κάποια συμπτώματα είναι παρόμοια με αυτά της δυσανεξίας, αλλά ακολουθούνται και δερματικές αντιδράσεις όπως εξανθήματα, αναπνευστικές διαταραχές δηλαδή ρινική καταρροή, στομαχικές διαταραχές καθώς και σε σπάνιες περιπτώσεις αναφυλικτικό σοκ, τα οποία επιμένουν ενώ στην δυσανεξία τα συμπτώματα αποχωρούν μετά από κάποιες ώρες. (Thompson, Manore, Vaughan, 2021) Τα συμπτώματα στην δυσανεξία οφείλεται στην λακτόζη που δεν διασπάται και αποτελεί καλή πηγή ενέργειας για τους μικροοργανισμούς. Ζυμώνουν το γαλακτικό οξύ και παράγουν μεθάνιο και υδρογόνο, γι' αυτό και το αίσθημα της δυσφορίας. Το γαλακτικό που παράγεται από τους μικροοργανισμούς είναι ωσμωτικά ενεργό προκαλώντας είσοδο του νερού στο έντερο όπως κάνει και η άπεπτη λακτόζη οδηγώντας στην διάρροια. Σε σοβαρές περιπτώσεις, τα αέρια και η

διάρροια δυσκολεύουν την απορρόφηση θρεπτικών ουσιών όπως τα λίπη και οι πρωτεΐνες. (J.M.Berg, J.L. Tymoczko, G.J. Gatto, L.Stryer, 2021)

Το 70% του πληθυσμού των ενήλικων χάνει την ικανότητα πέψης της λακτόζης, το οποίο αποτελεί πρόβλημα διότι τα γαλακτοκομικά προϊόντα αποτελούν πηγή ασβεστίου. Για να αποφευχθεί αυτό, καταφεύγουν στην αγορά ειδικά επεξεργασμένων γαλατών με μικρή ποσότητα λακτόζης ή και καθόλου. Επίσης, χορηγούνται και χάπια ή και σταγόνες λακτάσης, τα οποία συνδυάζονται με τα προϊόντα γάλατος, ώστε να χωνέψουν την λακτόζη. Μια άλλη λύση είναι το ενισχυμένο ρόφημα σόγιας με ασβέστιο ή και ο χυμός πορτοκάλι. Επίσης, πολλοί δεν εμφανίζουν πρόβλημα στην κατανάλωση γιαούρτης και τυριού λόγω του γεγονότος ότι την καταναλώνουν τα βακτήρια και οι μύκητες για την διαδικασία της ζύμωσης. (Thompson, Manore, Vaughan, 2021)

Η δυσανεξία στην λακτόζη έχει αποδειχθεί πως οφείλεται σε SNP, δηλαδή σε μονοκλεοτιδικό πολυμορφισμό. Τα SNPs αποτελούν οι κύριες μεταβολές στην αλληλουχία του DNA, και επιδρούν στην ικανότητα να καταναλώνουν και να αφομοιώνουν συστατικά τροφίμων όπως βιταμίνες, μέταλλα, λιπίδια αλλά και υδατάνθρακες όπως στην περίπτωση αυτή η λακτόζη. (Trinugroho, Joko Pebrianto, et al, 2023). Ο επιπολασμός της δυσανεξίας της λακτόζης σύμφωνα με αναφορές είναι 57% παγκοσμίως αλλά κατανέμεται ανάλογα στις ηπείρους, στην Αφρική 100%, Αμερική 50%, Ασία 70% και Ευρώπη 28%. Οι διαφορές που παρουσιάζονται οφείλονται στις διατροφικές συνήθειες του κάθε λαού. Επίσης, διαφορετική καταγωγή μπορεί να έχει διαφορετικά SNP που συσχετίζονται με τη δυσανεξία στη λακτόζη. Αποτελεί μια απειλή καθώς το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα αποτελούν πηγή θρεπτικών υλικών για τον άνθρωπο. (Trinugroho, Joko Pebrianto, et al, 2023).

2. Σκοπός Εργασίας

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν τα γονίδια (πολυμορφισμοί) που ευθύνονται για την εμφάνιση της δυσανεξίας στη λακτόζη καθώς και οι παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των συγκεκριμένων γονιδίων.

Τα δείγματα τα οποία εξετάστηκαν είναι 30 με τα 6 από αυτά να εξετάζονται εκτενέστερα ενώ, οι ηλικιακές ομάδες διαθέτουν εύρος 20 έως 70 έτη από διάφορες χώρες των Βαλκανίων. Η διαδικασία παραλαβής των δειγμάτων εκτελέστηκε μέσω της λήψης δείγματος σιέλου.

Η συμπεριφορά των δειγμάτων μελετήθηκε με την χρήση του οργάνου Real Time PCR. Τα δείγματα λήφθηκαν μέσω σιελολογικής διαδικασίας για χρονικό διάστημα έως και 250 ημερών.

3. Θεωρητικό Υπόβαθρο – Ανασκόπηση Βιβλιογραφίας

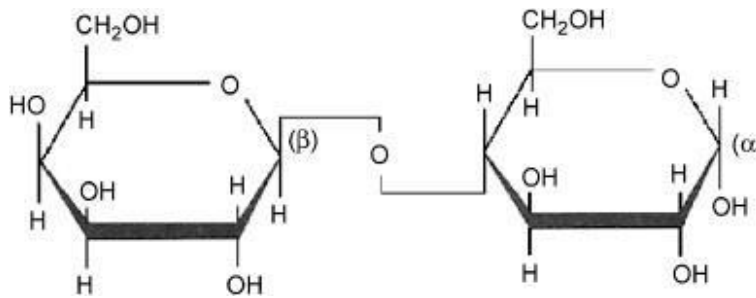
1. Λακτόζη

1.1. Εισαγωγή

Οι δισακχαρίτες αποτελούνται από δύο σάκχαρα που ενώνονται με γλυκοζιτικό δεσμό. Οι τρεις δισακχαρίτες είναι η σακχαρόζη, η μαλτόζη και η λακτόζη. Η σακχαρόζη αποτελείται από γλυκόζη και φρουκτόζη και η μαλτόζη από δύο μόρια γλυκόζης. Ο δισακχαρίτης που θα συζητηθεί περαιτέρω είναι η λακτόζη (β -d-galactosyl-d-glucose), η οποία αποτελείται από μόρια γλυκόζης και γαλακτόζης, που συνδέονται με β -1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς. Στον άνθρωπο υδρολύεται από το ένζυμο λακτάση και στα βακτήρια από την β -γαλακτοζιδάση. (J.M.Berg, J.L. Tymoczko, G.J. Gatto, L.Stryer, 2021).

1.2. Βιοχημική σύνθεση λακτόζης

Χημικά, αποτελείται από ένα μόριο γαλακτόζης β -D-Glc_p και ένα γλυκόζης α -D-Glc_p ενωμένα με γλυκοζιτικό δεσμό, ο οποίος χαρακτηρίζεται ως $\beta(1\rightarrow4)$. (Ανδρινακόπουλος N., 2015). Σχηματίζεται μεταξύ του 1-C της ημιακεταλικής ομάδας της β -γαλακτόζης και του OH του 4-C της α - γλυκόζης. Με την δημιουργία του δισακχαρίτη, ο μονοσακχαρίτης β - γαλακτόζη δεν έχει πλέον ημιακεταλική δομή, και η κλειστή δομή δεν μπορεί να μετατραπεί σε ανοιχτή, ενώ η γλυκόζη διατηρεί την ημιακεταλική δομή στην λακτόζη και μπορεί να μετατραπεί σε ανοιχτή. (Σπηλιόπουλος, Βάκρος, 2023). Συνεπώς, είναι ανάγον σάκχαρο γιατί έχει ελεύθερο ημιακεταλικό άκρο –OH. (Ανδρινακόπουλος N., 2015). Πιο αναλυτικά, έχει δύο ανωμερή. (Matilde Portnoy, David M. Barbano, 2021). Τα ανωμερή είναι μορφές του ίδιου μορίου υδατάνθρακα που προκύπτουν όταν ο μονοσακχαριδικός δακτύλιος ανοίγει και κλείνει την δομή συντονισμού. (Matilde Portnoy, David M. Barbano, 2021). Η διαφορά των δύο ανωμερών μορφών, α - και β -, βρίσκεται στην θέση του υδροξυλίου –OH, στην θέση του τμήματος της γλυκόζης. (Matilde Portnoy, David M. Barbano, 2021). Σε θερμοκρασία δωματίου, και οι δύο μορφές μπορούν να αλλάξουν αυθόρμητα από τη μία στην άλλη εντός του διαλύματος φτάνοντας σε δυναμική ισορροπία σε αναλογία 40% α :60% β . Η ταχύτητα της περιστροφής επηρεάζεται από παράγοντες όπως ο διαλύτης, η συγκέντρωση, το pH και η θερμοκρασία. (Shi, Chuting et al , 2023)



Εικόνα 1: Δομή λακτόζης

1.3. Σχηματισμός λακτόζης στο γάλα των θηλαστικών

Η λακτόζη ανακαλύφθηκε στο γάλα, η οποία υπάρχει μόνο σε αυτό, τον 17^ο αιώνα και χρειάστηκαν άλλα 300 χρόνια για την σύνθεση της σε εργαστήριο. (Vandenplas, Yvan, 2015). Το ανθρώπινο γάλα διαθέτει παραπάνω απ' ό,τι το αγελαδινό γάλα, γι' αυτό είναι και γλυκύτερο. (Thompson, Manore, Vaughan, 2021). Εμβαθύνοντας, αποτελεί το πιο άφθονο στερεό συστατικό στο γάλα. Για την σύνθεση της απαιτεί μεγάλη ποσότητα διατροφικής ενέργειας και συμμετέχουν τα δύο σάκχαρα γλυκόζη και γαλακτόζη, στο σύμπλεγμα Golgi των εκκριτικών κυττάρων γάλακτος. Το ένζυμο που την καταλύει την αντίδραση είναι η συνθετάση της λακτόζης, η οποία αποτελείται από την α-λακταλβουμίνη και την galactosyl transferase. Η γλυκόζη αποτελεί έναν σημαντικό πρόδρομο για την σύνθεση της λακτόζης, και γενικά, για την υποστήριξη της σύνθεσης του γάλακτος. Η αγελάδα χρησιμοποιεί την γλυκόζη για την υποστήριξη της απόκρισης του ανοσοποιητικού συστήματος της, αλλά αυτή που θα απομείνει δεν θα είναι επαρκής για τον σχηματισμό της λακτόζης και γι' αυτό τον λόγο η παραγωγή της θα μειωθεί. (Matilde Portnoy, David M. Barbano, 2021). Η συγκέντρωση της λακτόζης και των διαλυτών ορυκτών οδηγεί την είσοδο νερού στη συσκευή golgi από το κυτταρόπλασμα των εκκριτικών κυττάρων για τη διατήρηση της οσμωτικής ισορροπίας μεταξύ της συσκευής golgi, της κυτοσόλης των εκκριτικών κυττάρων και της ροής του αίματος. (Pollott, 2004) Συνεπώς, το βάρος του γάλακτος σε μια αγελάδα που θα παραχθεί είναι άμεσο συνδεδεμένο με την ποσότητα λακτόζης που θα συντεθεί. (Matilde Portnoy, David M. Barbano, 2021).

1.4. Η λακτόζη στα γαλακτοκομικά προϊόντα

Η περιεκτικότητα της λακτόζης στα γαλακτοκομικά προϊόντα ποικίλλει σημαντικά. Το παραδοσιακό γάλα αλλά και τα συμβατικά γιαούρτια περιέχουν την μεγαλύτερη ποσότητα, άθικτη αλλά και υδρολυμένη. Τα ελληνικά γιαούρτια αλλά και τα τυριά διαθέτουν μειωμένη ποσότητα λόγω της αποστράγγισης του ορού του γάλακτος. Το πλήρες, το αποβουτυρωμένο, το βουτυρόγαλα σε σκόνη αλλά και η σκόνη ορού έ-

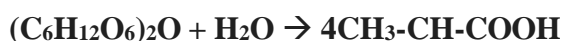
χουν αρκετή ποσότητα λακτόζης. (Matilde Portnoy, David M. Barbano, 2021). Στο κατσικίσιο γάλα βρίσκεται σε μικρότερη ποσότητα από το αγελαδινό. Στο γάλα, γενικά εντοπίζεται η λακτόζη και άλλα ίχνη σακχάρων σε ποσοστό 5-6%, και είναι ο λόγος που κατά την συμύκνωση του καθώς χρησιμοποιείται θέρμανση εμφανίζει καστανό χρώμα διότι αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες. (Ανδρινακόπουλος, 2015)

Παρακάτω παρατίθεται ενδεικτικός πίνακας με τα ποσοστά λακτόζης που περιέχεται στα άλλα είδη γάλατος:

Είδος	Λακτόζη %
Μητρικό	6.8
Αγελαδίσιο	4.9
Πρόβειο	4.5
Κατσικίσιο	4.2
Βουβαλίσιο	4.3
Φοράδας	6.1
Καμήλας	5.2

Στο τυρί, η λακτόζη ζυμώνεται και παράγεται ποσότητα γαλακτικού οξέος, γι' αυτό και παρατηρείται μείωση των επιπέδων της στα τυριά. Το ίδιο ισχύει και στα γιαούρτια, η οποία η ποσότητα της λακτόζης μειώνεται επειδή τα βακτήρια που είναι εγγενή στο γιαούρτι βοηθούν στην διάσπαση της. (Szilagyí, Andrew, and Norma Ishayek, 2018). Ωστόσο, ανάλογα με το μικροβιακό υπόστρωμα υπάρχουν δύο είδη ζυμώσεων που πραγματοποιούνται κατά της παρασκευής γιαουρτιού.

Η μία είναι η γαλακτική ζύμωση, όπου η λακτόζη μετατρέπεται σε γαλακτικό οξύ με την παρακάτω αντίδραση:



Και η άλλη είναι η αλκοολική ζύμωση η οποία πραγματοποιείται σύμφωνα με τις παρακάτω αντιδράσεις:



1.5. Οι χρήσεις της λακτόζης στην βιομηχανία

Η λακτόζη έχει πολλές χρήσεις στην βιομηχανία των τροφίμων, η οποία αξιοποιείται για την παραγωγή διαφορετικών ειδών τροφίμων. Χρησιμοποιείται ως γλυκαντική ουσία σε αρκετές περιπτώσεις στην ζαχαροπλαστική, ως συστατικό για την επικάλυψη της καραμέλας έως την χρήση της στο γλάσο για την αποφυγή του θρυμματισματος. Σκοπός της είναι να ενισχύσει την γεύση, την υφή, το χρώμα αλλά και την σταθερότητα. Η γλυκύτητα της λακτόζης είναι το ένα έκτο αυτής της σακχαρόζης, γι' αυτό μπορούν να προστεθούν σημαντικές ποσότητες στα παρασκευάσματα τροφίμων, αυξάνοντας το βάρος του προϊόντος χωρίς να επηρεάζεται η γλυκύτητα όπως κάνουν άλλα κοινά σάκχαρα. Η λακτόζη χρησιμοποιείται επίσης στη βιομηχανία μύρας. Αυτό οφείλεται στην ικανότητα της λακτόζης να γλυκαίνει τη μύρα και να βελτιώνει την αίσθηση του στόματος. (Dominici, Simona, et al., 2022)

Η λακτόζη ως ανάγον σάκχαρο συμμετέχει στην αντίδραση Mallard και λόγω της μειωτικής δραστηριότητας του τμήματος γλυκόζης ενισχύει το χαρακτηριστικό μαύρισμα αλλά και την γεύση και το άρωμα στα αρτοσκευάσματα. Επίσης, κατά την διάρκεια του φουσκώματος της ζύμης, οι μικροοργανισμοί καταναλώνουν τα σάκχαρα, ωστόσο, μερικοί δεν την χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας με αποτέλεσμα να παραμείνει στην τελική μάζα. Αυτό έχει ως συνέπεια, να οδηγήσει στην ενίσχυση του ροδίσματος του ψωμιού κατά το ψήσιμο, να αυξήσει τον όγκο, και να βελτιώσει την τρυφερότητα του. Η προσθήκη λακτόζης κατά την παρασκευή των αρτοσκευασμάτων αυξάνει τη δυνατότητα παράτασης της διάρκειας ζωής τους χάρη στην ικανότητά της να προσροφά πτητικές και χρωστικές ουσίες. (Shi, Chuting et al , 2023).

Η λακτόζη παίζει σημαντικό ρόλο ως αντιψυκτικός παράγοντας όπως στην παραγωγή παγωτού. Η κατάψυξη είναι μια κρίσιμη φάση στην παρασκευή παγωτού, καθώς επηρεάζει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος. Γενικά, όσο περισσότερη λακτόζη προστίθεται στο παρασκεύασμα του, τόσο χαμηλότερη είναι η θερμοκρασία που απαιτείται για τη σωστή κατάψυξη του. Αυτό το φαινόμενο επηρεάζει τη σκληρότητα του, επειδή η προσθήκη λακτόζης σε αυτό παράγει ένα πιο απαλό παγωτό από ένα παγωτό με λιγότερη λακτόζη στην ίδια θερμοκρασία. (Shi, Chuting et al , 2023)

Παρ' όλα αυτά, ως πιθανό υποστρώμα ζύμωσης, η λακτόζη μπορεί να είναι είτε μέρος του γάλακτος που χρησιμοποιείται για τη λήψη του τελικού προϊόντος, όπως στο γιαούρτι και το κεφίρ, είτε μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρόσθετο, όπως στα αλλαντικά. Προστίθεται και χρησιμοποιείται από τους επιλεγμένους αρχικούς

μικροοργανισμούς ως πηγή ενέργειας για τη δραστηριότητα ζύμωσης τους σε αλλα-
ντικά για να αποκτηθούν συγκεκριμένες οργανοληπτικές ιδιότητες. (Shi, Chuting et al
, 2023)

Η λακτόζη πέρα από την χρήση της στην βιομηχανία των τροφίμων, χρησιμοποιείται
ευρέως και ως φαρμακευτικό συστατικό, λόγω των φυσικοχημικών ιδιοτήτων του,
όπως η χημική αδράνεια, η σταθερότητα του αλλά και η μη τοξικότητα του. (Shi,
Chuting et al , 2023) Περίπου το 60–70% των φαρμακευτικών σκευασμάτων περιέ-
χουν λακτόζη και αυτό είναι ένα από τα υψηλότερα ποσοστά χρήσης σε φαρμακευτι-
κά έκδοχα. Στα δισκία, η λακτόζη δρα ως προστατευτικός παράγοντας για την προ-
στασία των πολλαπλών σωματιδίων, ως γλυκαντικός παράγοντας για την ενίσχυση
της γεύσης και ως παράγοντας φόρτωσης του φαρμάκου με φυσική προσρόφηση και
φόρτωση με βάση διαλύτες (Shi, Chuting et al , 2023). Είναι σημαντική η αποδοχή
της ως συστατικό στα φάρμακα λόγω των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών της,
όπως το λευκό χρώμα, η γλυκιά γεύσης της και ότι είναι άοσμη. Βρίσκεται στο 20%
περίπου των συνταγογραφούμενων φαρμάκων και στο 6% των φαρμάκων που χορη-
γούνται χωρίς ιατρική συνταγή. Τα δισκία είναι η πιο κοινή φαρμακευτική μορφή
στην αγορά που περιέχουν λακτόζη. Η περιεκτικότητα σε λακτόζη στα φάρμακα κυ-
μαίνεται από 100 έως 200 mg, συνήθως δεν υπερβαίνει τα 400 mg ανά δισκίο ή κά-
ψουλα. Ωστόσο, αυτή η ποσότητα μπορεί να έχει επιθύμητες ενέργειες σε ασθενείς
που πάσχουν από δυσανεξία της λακτόζης. (Shi, Chuting et al , 2023)

1.6. Παραγωγή Lactose-Free προϊόντων

Τα γαλακτοκομικά προϊόντα χωρίς λακτόζη έχουν παρασκευαστεί με τέτοιο τρόπο
ώστε να παρέχουν τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά που υπάρχουν στα κανονικά σε
άτομα που δυσκολεύονται να αφομοιώσουν την λακτόζη. Τα προϊόντα αυτά αποτε-
λούν την ταχύτερη αναπτυσσόμενη αγορά στην γαλακτοβιομηχανία. Χρησιμοποιού-
νται δύο είδη λακτάσεων στην βιομηχανία, η μια κατηγορία είναι οι ουδέτερες λα-
κτάσεις που χρησιμοποιούνται κυρίως για την παραγωγή γαλακτοκομικών χωρίς λα-
κτόζη, αλλά σε πολλές χώρες επιτρέπεται να προσφέρονται σε καταναλωτές για την
επεξεργασία του γάλακτος στο σπίτι. Η άλλη κατηγορία λακτάσεων, είναι οι όξινες,
οι οποίες χρησιμοποιούνται ως συμπληρώματα διατροφής που λαμβάνονται μαζί με
την κατανάλωση γαλακτοκομικών και διασπάζουν την λακτόζη στο γάλα. Ως ένζυμο χρη-
σιμοποιείται η β – γαλακτοζιδάση που απομονώνεται από το *Kluyveromyces lactis*.
(Dekker, Peter JT, Damiet Koenders, and Maaike J. Bruins, 2019)

Η διαδικασία παραγωγής γαλακτοκομικών προϊόντων χωρίς λακτόζη γίνονται με κάποιες διαδικασίες όπως:

1. **Διαχωρισμός Λακτόζης:** Χρησιμοποιούνται ως μέθοδοι διαχωρισμού λακτόζης με μεμβράνη όπως υπερδιήθηση, νανοδιήθηση, αντίστροφη ώσμωση και ηλεκτροδιάλυση. Οι μεμβράνες παρατείνουν την διάρκεια ζωής του γάλακτος. Το βασικό πρόβλημα του διαχωρισμού είναι ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών και λακτόζης λόγω της ευρείας κατανομής του μεγέθους των σωματιδίων της πρωτεΐνης στο γάλα. Άλλες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι η χρωματογραφία αλλά και η συμπύκνωση κατάψυξης. Η συμπύκνωση κατάψυξης συστήνεται για αποδοτική διατήρηση θερμοευαίσθητων προϊόντων με υψηλή θρεπτική αξία όπως το γάλα. (Li, Aili, et al.,2023)
2. **Ενζυματική υδρόλυση της λακτόζης:** Αποτελείται από δύο διαδικασίες, η μια είναι η παρτίδα, κατά την οποία η ουδέτερη λακτάση προστίθεται στο γάλα καθώς αναδεύεται αργά μέχρι να υδρολυθεί πλήρως η λακτόζη, στην συνέχεια παστεριώνεται, ομογενοποιείται και τέλος, συσκευάζεται. Η άλλη διαδικασία είναι η άσηπτη, κατά την οποία το γάλα αποστειρώνεται (UHT) και μετά προστίθεται το ένζυμο. Η διαδικασία της άσηπτης απαιτεί ειδικό εξοπλισμό. Ως λακτάση χρησιμοποιείται η β-γαλακτοζιδάση, η οποία έχει πλεονεκτήματα απόδοσης και παραγωγής, και απομονώνεται από τους μικροοργανισμούς *Aspergillus niger*, *Escherichia coli*, *Kluyveromyces lactis* και *Kluyveromyces fragilis*. Η έκφραση της λακτάσης με καλά ενζυματικά χαρακτηριστικά πραγματοποιείται με τεχνολογία γενετικής μηχανικής. (Li, Aili, et al.,2023)
3. **Ζύμωση:** Στην ζύμωση υδρολύεται το 20-30% της λακτόζης, των πρωτεϊνών σε πεπτίδια και αμινοξέα αλλά και λίπους σε λιπαρά οξέα. Στο παραδοσιακό γιαούρτι συμμετέχουν για την ζύμωση *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* , και η λακτόζη μειώνεται και κυμαίνεται στο εύρος 3,7-4,6%. Οι μικροοργανισμοί παράγουν το ένζυμο β-γαλακτοζιδάση που υδρολύει την λακτόζη. Το κεφίρ διαθέτει γύρω στο ποσοστό 3,1%, το οποίο ανακουφίζει τα συμπτώματα της δυσανεξίας και διατηρεί την ισορροπία της εντερικής χλωρίδας. Στο τυρί, η λακτόζη μετατρέπεται σε γαλακτικό οξύ κατά την ωρίμανση. Η διαδικασία της προ-υδρόλυσης είναι μια αποτελεσματική τεχνική ελέγχου περιεκτικότητας λακτόζης στο τελικό προϊόν. Η διαδικασία αυτή διατηρεί την γεύση και τα χαρακτηριστικά της ζύμωσης αλλά και τα τελικά

προϊόντα κατ' αυτήν την διαδικασία έχει χαμηλότερη περιεκτικότητα λακτόζης. (Li, Aili, et al., 2023)

1.7. Οφέλη λακτόζης στον ανθρώπινο οργανισμό

Η λακτόζη προσφέρει πολλά οφέλη στην υγεία των βρεφών και είναι επίσης, μια πολύ σημαντική πηγή ενέργειας. Έρευνες έδειξαν ότι στα βρεφικά παρασκευάσματα που περιέχουν λακτόζη βοηθούν στην καλύτερη απορρόφηση του ασβεστίου. (del Carmen Toca, M, 2022) Επιπλέον, οι μονοσακχαρίτες που την δομούν, εμπλέκονται στην σύνθεση διάφορων σημαντικών μακρομορίων, όπως ολιγοσακχαρίτες, γλυκοπρωτεΐνες αλλά και γλυκολιπίδια, έχει ρυθμιστική δράση στο έντερο και υδρολύεται σε μονοσακχαρίτες, το οποίο έχει επανυδατωτική δράση στο λεπτό έντερο. (Szilagyi A., 2004)

Η λακτόζη έχει πολύ κρίσιμο θρεπτικό ρόλο στην μικροχλωρίδα του εντέρου σε μικρή ηλικία, επειδή είναι ένα δομικό τμήμα των ολιγοσακχαρίτων. Έχει αποδειχθεί ότι η από του στόματος χορήγηση λακτόζης μπορεί να αυξήσει σημαντικά τον εντερικό πληθυσμό των γαλακτοβακίλλων και των *bifidobacteria*. (del Carmen Toca, M, 2022) Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει ότι η λακτόζη επάγει την έκφραση του γονιδίου του αντιμικροβιακού πεπτιδίου καθελιδίνης, το οποίο κωδικοποιεί την μοναδική ανθρώπινη καθελιδίνη, η οποία είναι αντιμικροβιακό πεπτίδιο στα επιθηλιακά κύτταρα του παχέος εντέρου, ανεξάρτητα από τη δόσολογία και τη διάρκεια. Αυτή η μελέτη δείχνει την επίδραση στην έμφυτη ανοσία μέσω της θετικής ρύθμισης των γαστρεντερικών αντιμικροβιακών πεπτιδίων, η οποία μπορεί να οδηγήσει στην προστασία του νεογνικού εντέρου από παθογόνα και στη ρύθμιση της βρεφικής μικροχλωρίδας. (Cederlund A, Kai-Larsen Y, Printz G, Yoshio H, et al., 2022)

Η λακτόζη έχει ερευνηθεί πως είναι ωφέλιμη προς τους αθλητές πριν την άσκηση, λόγω του χαμηλότερου γλυκαιμικού δείκτη σε σχέση με τα υπόλοιπα σάκχαρα, καθώς αποτελεί βιώσιμη εξωγενής πηγή αλλά και αποδίδει καλύτερη διατήρηση διαθεσιμότητας υδατανθράκων κατά την διάρκεια της άσκησης. Επομένως, μπορεί να αποτελεί μέρος διατροφής με υδατάνθρακες πριν ή και μετά την άσκηση. Επίσης, είναι η κύρια πηγή της διατροφικής γαλακτόζης, η οποία αποδείχθηκε ότι είναι υπεύθυνη για την αύξηση της επανασύνθεσης του γλυκογόνου στο ήπαρ έπειτα από την σωματική άσκηση. Έρευνες έχουν δείξει ότι το γάλα αλλά και το σοκολατούχο δείχνουν πως η λακτόζη ενδεχομένως να είναι υπόστρωμα για την σύνθεση του μυϊκού γλυκογόνου, το οποίο έχει ίδιο αποτέλεσμα στην απόδοση με τα αντίστοιχα ποτά με υδατάνθρακες.

Ωστόσο, διαφέρει για τα άτομα που δυσκολεύονται να την αφομοιώσουν. (Odell, Oliver Joseph, and Gareth Anthony Wallis., 2021).

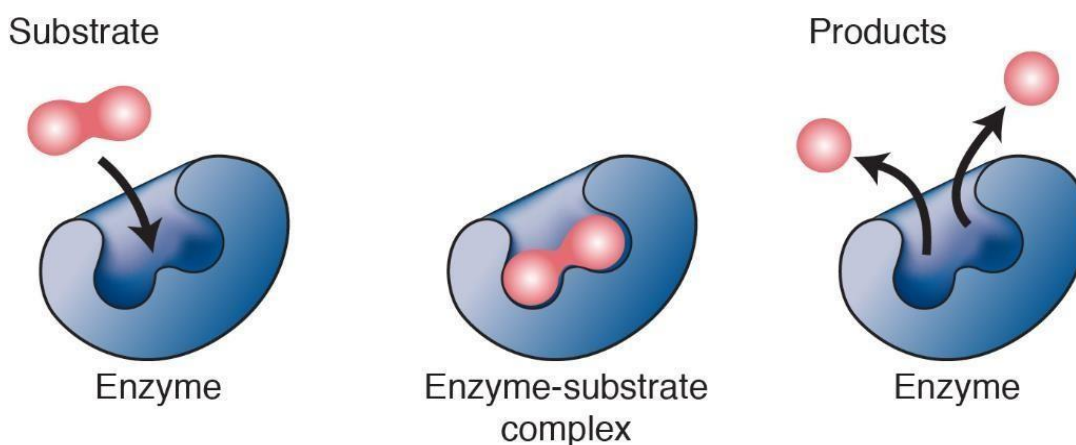
Συνεπώς, η λακτόζη έχει μεταβολικά πλεονεκτήματα, λόγω του χαμηλού γλυκαιμικού δείκτη, γι' αυτό και είναι λιγότερη γλυκιά από άλλα σάκχαρα. Τα πλεονεκτήματα της είναι κυρίως η διαμόρφωση εντερικής χλωρίδας, η καλή λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος αλλά και η διευκόλυνση απορρόφησης μετάλλων. (Romero-Velarde, Enrique, et al. , 2019) Διαχωρίζεται από το γάλα ή του ορού του γάλακτος σε περισσότερο ή λιγότερο καθαρή μορφή και αποτελεί ως συστατικό σε ζωοτροφές, τρόφιμα, και φαρμακευτικά προϊόντα. (Schaafsma, Gertjan, 2008).

2. Λακτάση

2.1. Εισαγωγικά περί των ενζύμων

Τα ένζυμα αποτελούν σφαιρικές πρωτεΐνες που κυμαίνονται συνήθως σε μέγεθος λιγότερο από 100 έως και 2000 κατάλοιπα αμινοξέων. Αυτά τα αμινοξέα μπορεί να παρουσιάζονται διατεταγμένα ως μια ή και περισσότερες πολυπεπτιδικές αλυσίδες που διπλώνονται και κάμπτονται για να σχηματίζουν μια συγκεκριμένη τρισδιάστατη δομή, η οποία περιλαμβάνει μια μικρή περιοχή που καλείται ενεργό κέντρο. Το ενεργό κέντρο είναι η θέση που δεσμεύεται το υπόστρωμα. Αποτελείται από έναν μικρό αριθμό αμινοξέων ίσως και λιγότερο από δέκα. Το σχήμα καθώς και οι ιδιότητες του δίνουν την δυνατότητα να συνδεθεί μόνο με έναν τύπο μορίου υποστρώματος ώστε, το ένζυμο να είναι σε θέση να επιδεικνύει σημαντική εξειδίκευση στην καταλυτική του δραστηριότητα. Το υπόλοιπο μέρος του μορίου χρησιμεύει στην σταθεροποίηση του ενεργού κέντρου και ταυτόχρονα παρέχει το κατάλληλο περιβάλλον για την αλληλεπίδραση του κέντρου με το μόριο του υποστρώματος. Συνεπώς, το ενεργό κέντρο είναι αδύνατον να διαχωριστεί από την υπόλοιπη πρωτεΐνη χωρίς απώλεια της καταλυτικής δραστηριότητας. Τα ένζυμα αποτελούν βιώσιμοι καταλύτες της φύσης. Είναι βιοσυμβατά, βιοδιασπώμενα και προέρχονται από ανανεώσιμες πηγές.

Mechanism of enzyme activity



Εικόνα 2: Μηχανισμός ενζυμικής δραστηριότητας (National Human Genome Research Institute)

Οι ενζυμικές διεργασίες διεξάγονται υπό ήπιες συνθήκες που είναι συνήθως στη θερμοκρασία περιβάλλοντος, την ατμοσφαιρική πίεση καθώς και το φυσιολογικό pH. Οι

ενζυμικές διεργασίες διεξάγονται στο νερό με υψηλούς ρυθμούς και εκλεκτικότητες. Μάλιστα, προσφέρουν πιο οικονομικές διαδρομές, παράγουν λιγότερα απόβλητα και αποδίδουν περισσότερη ενέργεια συγκριτικά με τις συμβατικές οργανικές συνθέσεις. Συνεπώς, η χρήση ενζύμων καταργεί την ανάγκη της προστασίας ή ενεργοποίησης λειτουργικών ομάδων. Ως εκ τούτου, οι ενζυμικές διεργασίες δεν αφήνουν περιβαλλοντικό αποτύπωμα, είναι αποδοτικές και συγχρόνως πιο βιώσιμες.

2.2. Β-γαλακτοσιδάση

Οι β-γαλακτοσιδάσες που χρησιμοποιούνται για υδρόλυση της λακτόζης εξάγονται από ζυμομύκητες με χαρακτηριστικό τον *Kluyveromyces* ή από μύκητες όπως ο *Aspergillus oryzae*. Η β-γαλακτοσιδάση που παράγεται από τον *Kluyveromyces* είναι τετραμερές ένζυμο, με μοριακή μάζα που υπολογίζεται περίπου στα 135kDa, με ισοηλεκτρικό σημείο 4,5. Το ένζυμο βρίσκεται σε ενεργή κατάσταση στην διμερή και τετραμερή του μορφή. Οι συνθήκες ανάλυσης όπως το pH και η θερμοκρασία καθορίζουν την μορφή που θα υπερισχύει στις διάφορες περιπτώσεις. Οι πειραματικές συνθήκες διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην ισχύ της αλληλεπίδρασης της υπομονάδας. Μάλιστα, η τιμή του pH αποτελεί μια από τις σημαντικότερες παραμέτρους για την αδρανοποίηση πολυμερών ενζύμων. Όταν το pH λαμβάνει την καταλληλότερη και σταθερότερη τιμή τα πολυμερή ένζυμα παραμένουν δραστικά ενώ, όταν το pH λαμβάνει ακραίες τιμές πιθανότατα να οδηγήσει ακόμη και στην πλήρη αδρανοποίησή τους.

2.3. Γενικές πληροφορίες σχετικά με την λακτάση

Η δραστηριότητα της λακτάσης είναι υψηλή και ζωτικής σημασίας καθώς, το γάλα αποτελεί κύρια πηγή διατροφής ήδη από την βρεφική ηλικία. Στους υγιείς ανθρώπους η λακτάση παραμένει σε υψηλά επίπεδα σε όλη την διάρκεια της ζωής του, με αποτέλεσμα να μην εμφανίζουν δυσανεξία στην λακτόζη. Άνθρωποι που είναι ανθεκτικοί στην λακτάση μπορούν να υδρολύσουν μεγάλες ποσότητες λακτόζης καταναλώνοντας μεγάλες ποσότητες γάλακτος χωρίς επιπλοκές. Αντιθέτως, άνθρωποι που εμφανίζουν δυσανεξία στην λακτόζη έχουν χαμηλότερη ικανότητα πέψης στη λακτόζη επομένως, συχνά εμφανίζουν συμπτώματα ύστερα από την κατανάλωση γάλακτος. Η κατανομή αυτών των διαφορετικών φαινοτύπων λακτάσης στους ανθρώπινους πληθυσμούς είναι εξαιρετικά μεταβλητή.

Το συγκεκριμένο ένζυμο δεν εκφράζεται συστηματικά στο λεπτό έντερο των θηλαστικών. Στα περισσότερα θηλαστικά η δραστηριότητα της λακτάσης σταδιακά μειώ-

νεται όπως θα αναλυθεί και παρακάτω ήδη μετά την φάση του απογαλακτισμού στην πλειονότητα των ανθρώπων. Οι μητέρες δεν παράγουν γάλα την πρώτη ημέρα ενώ, ξεκινούν την παραγωγή με 50ml γάλακτος από την δεύτερη μέρα και μετέπειτα, αυξάνοντας σταδιακά την παραγωγή κατά 50ml καθημερινά. Ταυτόχρονα με την παραγωγή γάλακτος της μητέρας συμβαίνει και η ανάπτυξη της έκφρασης της λακτάσης στο έντερο του νεογνού.

2.4. Βιοχημεία της λακτάσης

Όπως είναι ήδη γνωστό, η λακτόζη συντίθεται από γλυκόζη και γαλακτόζη με την βοήθεια του ενζύμου λακτάση. Η λακτάση αποτελείται από δύο υπομονάδες η μια από τις οποίες διαθέτει καταλυτική δράση γαλακτοζυλο-τρανσφεράσης και η δεύτερη που διαθέτει ρυθμιστικές λειτουργίες. Οι δύο αυτές υπομονάδες βοηθούν στον σχηματισμό του δεσμού γλυκόζης-γαλακτόζης με αποτέλεσμα τον σχηματισμό του δισακχαρίτη. Από βιοχημική άποψη ο μεταβολισμός της λακτόζης καθίσταται ιδιαίτερα ενδιαφέρον. Η ανθρώπινη γαλακτοζυλοτρανσφεράση δεν παρουσιάζει κάποια ομοιότητα με την γλυκόζη ώστε να επιτρέψει την σύνθεση της λακτόζης. Είναι αναγκαία η παρουσία της υπομονάδας Β με σκοπό να δεχτεί το ένζυμο την γλυκόζη. Μάλιστα, στις γυναίκες χρειάζεται να γίνουν οι απαραίτητες ορμονικές αναπροσαρμογές (αύξηση ποσοστού προλακτίνης και μείωση προγεστερόνης) έτσι ώστε να επιτραπεί η σύνθεση της λακτόζης. Ο μαστικός αδένας παράγει ποικίλες βιοδραστικές πρωτεΐνες και αυξητικούς παράγοντες που βοηθούν στις λειτουργίες των νεογνών. Η ωρίμανση των εντερικών ενζύμων συμπεριλαμβανομένης και της λακτάσης συμβαίνει με την βοήθεια του αυξητικού παράγοντα ινοβλαστών 21. Ο παράγοντας ινοβλαστών λειτουργεί με την βοήθεια ενός πυρήνα- υποδοχέα ο οποίος, παρουσιάζει υψηλή εντερική έκφραση. Ο συγκεκριμένος δεσμός γλυκόζης-γαλακτόζης με χημική δομή γαλακτόζη-β1,4-γλυκόζη, έχει διατηρηθεί σχεδόν σε όλα τα γάλατα στον πλακούντα των θηλαστικών σε διαφορετικές συγκεντρώσεις που εξαρτάται ανάλογα με το είδος. Συναντάται σπανιότατα στην φύση παρόλο που βρίσκεται εντός της χιτίνης και της κυτταρίνης.

Η λακτάση εμφανίζεται εξωτερικά της επιφάνειας των εντεροκυττάρων που συνορεύουν με μια μεμβράνη. Είναι μια μεγάλη γλυκοπρωτεΐνη, με δύο ενεργές θέσεις που μπορεί να καταλύσει την υδρόλυση μιας ποικιλίας β-γλυκοζιδίων, συμπεριλαμβανομένης της φλοριζίνης, των φλαβονοειδών γλυκοζιτών, της πυροξιδίλης-50-β-D γλυκοζίτη και β-γαλακτοσιδασών επιπροσθέτως της λακτόζης.

Η μέγιστη δραστηριότητα της λακτάσης εμφανίζεται σε pH 6.5 στους 40° C. Οποιαδήποτε άλλη τιμή η οποία διαφέρει από τις βέλτιστες, οδηγεί σε πολύ χαμηλή έως και ανύπαρκτη δραστηριότητα της λακτάσης.

2.5. Παραγωγή του ενζύμου λακτάσης

Η λακτάση κωδικοποιείται από ένα μόνο γονίδιο, το LCT που έχει μήκος περίπου 50kb και βρίσκεται στο χρωμόσωμα 2, θέση 2q21. Το συγκεκριμένο γονίδιο υπόκειται σε ορισμένες μεταλλάξεις, οι οποίες πιθανολογούνται ότι σχετίζονται με το γονίδιο. Το γονίδιο έχει 17 εξώνια και κωδικοποιεί ένα αγγελιοφόρο RNA, το mRNA το οποίο είναι λίγο μεγαλύτερο από 6kb. Από το mRNA, λαμβάνεται μια προ-πρωτεΐνη 1927 αμινοξικών καταλοίπων, που διαμορφώνει ένα πλήρες μεταφραστικό προϊόν. Αυτό με την σειρά του, αποτελείται από ένα θεωρητικό πεπτίδιο 19 αμινοξικών καταλοίπων, ένα μεγάλο προ-τμήμα 849 αμινοξέων καθώς και μια ώριμη πρωτεΐνη που αποτελείται από δύο καταλυτικές θέσεις και στο C-τελικό άκρο, την περιοχή που εμπεριέχεται σε μεμβράνη και την βραχεία κυτταροπλασματική περιοχή. Οι αναλύσεις που διεξήχθησαν αρχικά στο γονίδιο εντόπισαν πλήθος γενετικών παραλλαγών στην περιοχή που υφίστανται κωδικοποίηση αλλά και στην 5' περιοχή. Συνεπώς, η πλειοψηφία των ρυθμιστικών στοιχείων της LCT πιθανόν να βρίσκονται γύρω από τις περιοχές που προαναφέρθηκαν. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την λακτάση παρουσιάζει μια τετραπλή εσωτερική ομολογία που υποδηλώνει ότι, προέκυψε από δύο διαδικασίες πολλαπλασιασμού. Η προ-λακτάση υποβάλλεται με πρωτεολυτική επεξεργασία σε μια μικρότερη πρωτεΐνη και οι δύο από τις τέσσερις ομόλογες περιοχές εμφανίζονται στην περιοχή πριν από το τμήμα του μορίου η οποία είναι διεσπαρμένη και δεν παρέχει κάποια καταλυτική λειτουργία παρά μόνο βοηθητική καθώς, παρέχει στήριξη για την μεταφορά του μορίου στην κυτταρική επιφάνεια. Συνεπώς, η επεξεργασία της λακτάσης σε προ και μετέπειτα σε ώριμη περιληπτικά διαθέτει τα στάδια της διάσπασης του πεπτιδίου-σήματος, το σχηματισμό ομοδιμερών και την γλυκοζυλίωση στο σύμπλεγμα ER/Golgi. Υπάρχει αποκλειστικά μια ενεργή θέση σε καθένα από τα τμήματα της ώριμης πρωτεΐνης. Χαρακτηριστικά, το ενεργό κέντρο που εντοπίζεται στο Glu1273 στην περιοχή III είναι υπεύθυνο για την υδρόλυση γλυκοζιτών όπως η φλοριζίνη ενώ, το άλλο ενεργό κέντρο βρίσκεται στην περιοχή IV, στο Glu1749, και είναι υπεύθυνο να καταλύει την υδρόλυση των γαλακτοζιτών με χαρακτηριστικό παράδειγμα την λακτόζη. Έχει αναφερθεί ότι η λακτάση είναι O- γλυκοζυλιωμένη μέσω σερινών και θρεονινών καθώς και N-γλυκοζυλιωμένη. Μάλιστα, η N-γλυκοζυλίωση έχει

διαπιστωθεί ότι, πιθανότατα επηρεάζει την ενζυμική δραστηριότητα, την αναδίπλωση άλλα και την ενδοκυτταρική μεταφορά. Μια N- και O- γλυκοζυλιωμένη υδρολάση λακτάσης-φλωριζίνης (LPH) παρουσιάζει σχεδόν τέσσερις φορές μεγαλύτερη δραστηριότητα από το N-γλυκοζυλιωμένο ένζυμο. Η μειωμένη γλυκοζυλίωση οδηγεί σε λιγότερη έκθεση της LPH στην επιφάνεια των κυττάρων. Η έκφραση της ώριμης λακτάσης περιορίζεται εντός των εντεροκύτταρων του λεπτού εντέρου, στο υψηλότερο επίπεδο που βρίσκεται στο μέσο του.

3. Δυσανεξία στην Λακτόζη

3.1. Εισαγωγή

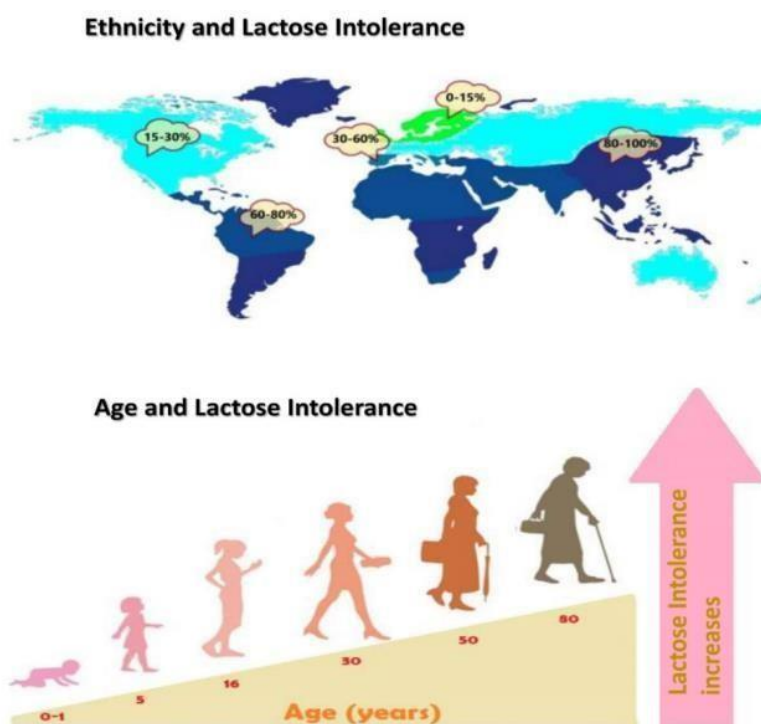
Τα άτομα που πάσχουν από δυσανεξία στην λακτόζη, δεν μπορούν να απορροφήσουν σημαντικές ποσότητες λόγω γενετικής ανεπαρκούς ποσότητας του ενζύμου λακτάσης, το οποίο είναι υπεύθυνο στην διάσπαση της λακτόζης. (Swagerty Jr, Daniel L., Anne D. Walling, and Robert M. Klein., 2002) Οι πάσχοντες εμφανίζουν και κάποια κοινά συμπτώματα ή και καθόλου, τα συμπτώματα συνήθως είναι μετεωρισμός, κοιλιακό άλγος, υδαρή κόπρανα, μετά την κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν λακτόζη. (Swagerty Jr, Daniel L., Anne D. Walling, and Robert M. Klein., 2002) Ο Ιπποκράτης περιέγραψε την δυσανεξία γύρω το 400π.Χ. αλλά τα συμπτώματα αναγνωρίστηκαν γύρω στα 50 χρόνια. Το 70% παρουσιάζει μη επιμονή της λακτάσης αλλά δεν έχουν όλοι δυσανεξία. Η σταδιακή μείωση έκφρασης της λακτάσης εμφανίζεται κατά την παιδική ηλικία, αλλά ποικίλλει ανάλογα εθνικότητας και κληρονομικούς παράγοντες (Lomer, Miranda CE, G. C. Parkes, and J. D. Sanderson, 2008) Τα αίτια της ουσιαστικά, είναι σε σπάνιες περιπτώσεις οι γενετικές μεταλλάξεις, σε πρόωρα νεογνά η εντερική λακτάση μπορεί να μην έχει αναπτυχθεί πλήρως, το πιο σύνηθες είναι η υπολακτασία στους ενήλικες και τέλος, είναι οι ασθένειες όπως η απώλεια ή ο τραυματισμός στο λεπτό έντερο. (Szilagyi, Andrew, and Norma Ishayek.,2018) Γενικά, είναι μια κληρονομική πάθηση και πρέπει να αναγνωρίζεται καθώς τα συμπτώματα μπορούν να ελαχιστοποιηθούν με εναλλαγές στην διατροφική συνήθεια. (Swagerty Jr, Daniel L., Anne D. Walling, and Robert M. Klein., 2002) Ωστόσο, δεν πρέπει να συγχέεται με την αλλεργία στο γάλα, που χαρακτηρίζεται από ανώμαλη ανοσολογική απόκριση που μπορεί να εξελιχθεί σε σοβαρή απειλητική για τη ζωή αναφυλαξία. (Porzi, Millie, et al., 2021)

3.2. Εθνολογικά στοιχεία

Η νεολιθική μετάβαση, η περίοδος δηλαδή που ορίζει μια στροφή από την αναζήτηση της τροφής στην παραγωγή της, συνδέεται με δραματικές αλλαγές σε όλους τους τομείς της ζωής, συμπεριλαμβανομένης και της διατροφής. Μεταξύ αυτών των αλλαγών εντάσσεται η αύξηση των υδατανθράκων, η μείωση του ποσοστού πρόσληψης της πρωτεΐνης καθώς και των μικροθρεπτικών συστατικών. Μπορεί λοιπόν να υποτεθεί ότι ύστερα από την εξημέρωση των ζώων που υφίστανται άλμεξη, η κατανάλωση γάλακτος καθώς και των προϊόντων του πρόσφερε αρκετά θρεπτικά συστατικά που

δεν λαμβάνονταν από άλλες τροφές λόγω της αποτυχίας των καλλιεργειών και της εποχικής καλλιέργειας των δημητριακών.

Πάνω στην έλλειψη πηγών άντλησης τροφής βασίστηκε η θεωρία που εξηγεί το ελάχιστο ποσοστό που εμφανίζουν οι λαοί της βόρειας Ευρώπης σε δυσανεξία στην λακτόζη. Οι ιστορικοί υποστηρίζουν ότι, το γάλα των θηλαστικών έγινε σημαντικό συστατικό της διατροφής σε περιόδους φτώχης συγκομιδής. Το γάλα παρείχε μια καθαρή πηγή υγρών, ενέργειας και θρεπτικών συστατικών οδηγώντας σε ένα ισχυρό επιλεκτικό πλεονέκτημα για όσους είχαν την δυνατότητα να το αφομοιώσουν. Με την επέκταση έως και σήμερα της γαλακτοβιομηχανίας και την μετανάστευση πληθυσμών, πλήθος ενηλίκων με δυσανεξία στην λακτόζη ζει σε χώρες όπου τα τρόφιμα που περιέχουν λακτόζη αποτελούν τακτικό μέρος της διατροφής.



Εικόνα 3: Δυσανεξία της λακτόζης ανά ηλικία και εθνικότητα

Το DNA όλων των ανθρώπων είναι σχεδόν πανομοιότυπο και αποτελείται από τέσσερα διαφορετικά νουκλεοτίδια που χαρακτηρίζονται ως A,T,C,G τα οποία είναι τοποθετημένα σε συγκεκριμένες αλληλουχίες κατά μήκος ενός διπλού ελικοειδούς μοριακού σκελετού. Οι αλληλουχίες DNA είναι κατά 99% πανομοιότυπες ωστόσο, υπάρχει μια συγκεκριμένη θέση στην αλληλουχία που το νουκλεοτίδιο διαφοροποιείται. Το φαινόμενο αυτό ορίζεται ως μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός. Οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί χρησιμοποιούνται ως κατευθυντήριες γραμμές στο

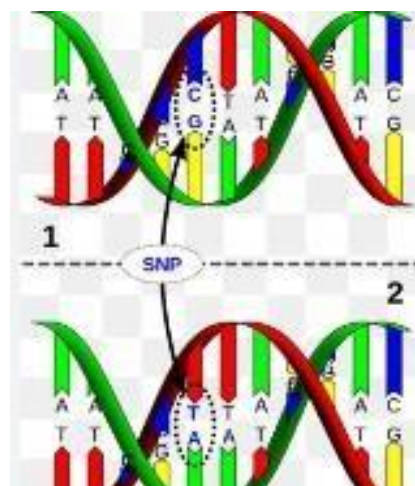
γονιδίωμα, το οποίο, αποτελεί το σύνολο του DNA που περιέχεται σε ένα κύτταρο. Οι δύο μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί που σχετίζονται με την παρουσία της λακτάσης, παρουσιάζονται σε σχεδόν τρία τέταρτα του δείγματος των Ευρωπαίων Αμερικανών, στους Αφροαμερικανούς παρουσιάζεται σε ποσοστό 13% ενώ, απουσιάζει από το Ανατολικοασιατικό δείγμα που εξετάστηκε. Το δείγμα του πληθυσμού της Νότιας Ευρώπης, παρουσιάζει σε μεγαλύτερο ποσοστό δυσανεξία στην λακτόζη συγκριτικά με τον πληθυσμό της Βόρειας Ευρώπης και των Βάσκων. Η αλλαγή στο DNA που ελέγχει το γονίδιο της λακτάσης που προέκυψε στη βόρεια Ευρώπη, οφείλεται στη την μετανάστευση των ανθρώπων εκεί. Η αλλαγή αυτή, κυριάρχησε στον πληθυσμό λόγω του πλεονεκτήματος επιβίωσης που παρείχε καθώς, όταν υπήρχε έλλειψη οποιασδήποτε άλλης τροφής, άνθρωποι που διέθεταν το γονίδιο ήταν ικανοί να συνεχίσουν να κερδίζουν την τροφή τους από το γάλα. Με βάση τις συγκεκριμένες έρευνες, αποτυπώθηκε η άποψη ότι, οι άνθρωποι που δεν εμφανίζουν δυσανεξία στην λακτόζη αποτελούν απόγονοι των βόρειων Ευρωπαίων.

Όπως ήδη ειπώθηκε οι περισσότεροι λαοί με εξαίρεση τους βόρειους ευρωπαίους και ορισμένες εθνοτικές ομάδες παρουσιάζουν δυσανεξία στην λακτόζη λόγω της μείωσης σταδιακά του ενζύμου λακτάσης κατά 75%-90% ύστερα από τον απογαλακτισμό τους. Συγκεκριμένα, οι Κινέζοι και οι Ιάπωνες χάνουν το 80%-90% του ενζύμου της λακτάσης ενώ, οι Ασιάτες και οι Εβραίοι διατηρούν το 20%-30% παραμένοντας στάσιμοι σε αυτά τα επίπεδα για μεγάλο χρονικό διάστημα. Στην Κίνα και στην Ιαπωνία η λακτάση μειώνεται ραγδιαία ύστερα από την ηλικία των δύο με τριών ετών φτάνοντας στο ναδίρ στην ηλικία των πέντε με δέκα ετών. Στους Ασιάτες ο ρυθμός μείωσης της λακτάσης είναι βραδύτερος ωστόσο, η συγκεκριμένη ομάδα έχει χάσει περίπου το 75% του ενζύμου ήδη από την εφηβεία.

3.3. Πολυμορφισμοί λακτόζης

Είναι σαφές ότι, οι διαφορές στην λακτάση οφείλονται σε γενετικό πολυμορφισμό. Υπάρχουν τρία είδη γονότυπων για την δυσανεξία στην λακτόζη, ο ομόζυγος, ο ετερόζυγος και ο ομόζυγος για την ανεκτικότητα στην λακτόζη. Η ενδιάμεση ενζυμική δραστηριότητα στους ετεροζυγώτες, υποδηλώνει ότι οι *cis* αλληλόμορφες παραλλαγές, που δρουν ως ρυθμιστικός παράγοντας που γειτνιάζει με το γονίδιο της λακτάσης, είναι υπεύθυνες για τον πολυμορφισμό. Ο γονότυπος CC υποδεικνύει υπολακτασία και εμφανίζεται συχνά στους Καυκάσιους πληθυσμούς. Αντίστοιχα, ο γονότυπος TT είναι κυρίαρχος και υποδεικνύει την ικανότητα να μεταβολίζουν το ένζυμο της

λακτάσης ενώ, ο ετεροζυγώτης CT σχετίζεται με ενδιάμεσο επίπεδο δραστηριότητας της λακτάσης που επαρκεί για την πέψη της και ευθύνεται για τον πολυμορφισμό. Τα ετερόζυγα άτομα παρουσίαζαν ορισμένες ενδείξεις αδυναμίας απορρόφησης της λακτόζης με υψηλότερα επίπεδα υδρογόνου στην αναπνοή, περισσότερο φούσκωμα και μετεωρισμό έπειτα από φορτίο λακτόζης 50g συγκριτικά με τα ομόζυγα άτομα. Στα ενήλικα άτομα που δεν εμφανίζουν δυσανεξία στην λακτόζη, τα επίπεδα ενζύμων στο όριο του λεπτού εντέρου είναι δέκα φορές υψηλότερα από τα άτομα που εμφανίζουν. Στους Καυκάσιους πληθυσμούς η έκφραση ή μη της λακτάσης σχετίζεται αυστηρά με τον πολυμορφισμό ενός νουκλεοτιδίου (SNP) C-T-13910 που εντοπίζεται προς τα πάνω κοντά στο γονίδιο που κωδικοποιεί την λακτάση με rs4988235. Πιο συγκεκριμένα, η ρυθμιστική αυτή μετάλλαξη βρίσκεται 14kb πάνω από το γονίδιο της λακτάσης, στο ιντρόνιο 13 του γονιδίου του συστατικού που περιέχεται στο σύμπλεγμα συντήρησης του μικροχρωμοσώματος 6 (MCM6) και όχι εντός του γονιδίου της λακτάσης ή πάνω από αυτό. Μια άλλη μελέτη ανέδειξε ότι η παραλλαγή -13.910:T δημιουργεί μια νέα θέση πρόσδεσης για την οκταμερή δεσμευτική πρωτεΐνη 1 (Oct -1). Η πρωτεΐνη αυτή αποτελεί έναν μεταγραφικό παράγοντα που αλληλεπιδρά με τον πυρηνικό παράγοντα των ηπατοκυττάρων του ανθρώπου, 1α (HNF1α) για να συνδεθεί στο γονίδιο της λακτάσης. Το συγκεκριμένο αλληλόμορφο οδηγεί επομένως σε μια εναλλακτική διαδρομή για την έκφραση του γονιδίου της λακτάσης, η οποία δεν ρυθμίζεται όπως η αρχική διαδρομή. Οι μελέτες in vivo αποκάλυψαν ότι παρόλο που ο φαινότυπος της δυσανεξίας στη λακτόζη θεωρείται ένα δυαδικό χαρακτηριστικό το οποίο κωδικοποιείται με κυρίαρχο τρόπο, η δραστηριότητα της λακτάσης είναι αντίθετα ένα συνεπικρατές ποσοτικό χαρακτηριστικό με κυρίαρχη τριμέλη κατανομή. Καθώς, η αδυναμία απορρόφησης της λακτόζης είναι υπολειπόμενη κατάσταση, ένας ετερόζυγος γονότυπος θα παρουσιάζει αδυναμία εκδήλωσης συμπτωμάτων της συγκεκριμένης πάθησης. Έχει διερευνηθεί ότι, η πλειονότητα του mRNA της λακτάσης που εμφανίζεται σε ετερόζυγα άτομα με ανθεκτικότητα στο ένζυμο προέρχεται μόνο



Εικόνα 4: Πολυμορφισμοί της λακτάσης
- Μοριακή Γενετική

από ένα αλληλόμορφο. Το αποτέλεσμα αυτό, αποδεικνύει ότι η υπολακτασία των ενηλίκων προκαλείται από μια μεταγραφική σίγαση που ενεργεί μέσω *cis* μηχανισμού στο γονίδιο της λακτάσης και ότι τα μεμονωμένα αλληλόμορφα λακτάσης δρουν ανεξάρτητα.

Εκτός από την αλλαγή στο C13910 γονίδιο της λακτάσης, αλλαγή συμβαίνει και στο σημείο G στη θέση 22018 σε ποσοστό 95% που συνδέεται με την απουσία της λακτάσης και υπερτερεί μάλιστα στον πληθυσμό της Φινλανδίας. Οι παραλλαγές T13910 και A22018 υπερτερούν με την παρουσία της λακτάσης. Είναι γνωστό ότι, με την χρήση SNPs στην περιοχή κωδικοποίησης ότι, το γονίδιο της λακτάσης που βρίσκεται στο ίδιο χρωμόσωμα με τα αλληλόμορφα T13910 και A22018 μεταγράφεται σε υψηλό επίπεδο σε ετερόζυγα άτομα, ενώ το γονίδιο της λακτάσης που σχετίζεται με τα C13910 και G22018 μεταγράφεται σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα σε ενήλικα άτομα. Ο πολυμορφισμός T/C13910 σε ορισμένες περιπτώσεις δεν ακολούθησε το φαινότυπο της λακτάσης και παρουσίασε έλλειψη αλληλόμορφων T13910 σε ορισμένους αφρικανικούς και βεδουϊνικούς πληθυσμούς όπου, η παρουσία της λακτάσης στο γονίδιο είναι κοινή.

Σε άτομα ευρωπαϊκής καταγωγής η παραλλαγή του γονιδίου LCT-13910C>T σχετίζεται πλήρως με την ανθεκτικότητα στο γονίδιο της λακτάσης και παρουσιάζεται πλήρως σε διάφορες χώρες της Ευρώπης, της Ασίας καθώς και της Αμερικής. Δύο ακόμη γονότυποι που σχετίστηκαν με τον φαινότυπο ανθεκτικότητας στην λακτάση είναι ο *LCT-13910CT* και *LCT-13910TT* υποδεικνύοντας ότι η παρουσία ενός μεμονωμένου αλληλόμορφου σε ετερόζυγη κατάσταση είναι επικρατέστερο καθιστώντας, το άτομο ικανό να αφομοιώσει την λακτόζη. Αντίθετα, ο γονότυπος LCT13910CC επικρατεί όταν το άτομο παρουσιάζει δυσανεξία στην λακτόζη. Ο προσδιορισμός του γονότυπου LCT -13910 C >T έναντι του LCT-22018 G>A έδειξαν σχεδόν πλήρη συμφωνία. Άτομα με γονίδιο LCT13910CC παρουσιάζονταν ταυτόχρονα ως LCT22018GG ενώ, τα άτομα με LCT-13910CT είχαν γονότυπο LCT-22018GA . Ο γονότυπος LCT-13910TT συσχετίστηκε με τον LCT-22018AA με εξαίρεση τις περιπτώσεις που αφορούν τους κατοίκους ορισμένων χωρών με χαρακτηριστικές την Φινλανδία, την Βραζιλία, την Κίνα καθώς και την Ιαπωνία.

Μελέτες έχουν αναδείξει ότι, η αλλαγή στο γονίδιο *C-T-13910* πιθανόν να επηρεάζει τη δραστηριότητα του τον υποκινητή του γονιδίου της λακτάσης ενώ, παράλληλα αυξάνει την παραγωγή mRNA της υδρολάσης λακτάσης- φλωριζίνης στον εντερικό βλεννογόνο.

3.4. Μορφές δυσανεξίας στη λακτόζη

Η δυσανεξία στη λακτόζη έχει κατηγοριοποιηθεί σε τέσσερις τύπους ανάλογα με την προέλευσή της.

- Συγγενής ανεπάρκεια λακτάσης

- Αναπτυξιακή ανεπάρκεια λακτάσης

- Πρωτογενής ανεπάρκεια λακτάσης ή υπολακτασία ενηλίκων

- Δευτερογενής ανεπάρκεια λακτάσης

- **Συγγενής ανεπάρκεια λακτάσης**

Η συγγενής ανεπάρκεια της λακτάσης αποτελεί μια σπάνια αυτοσωμική υπολειπόμενη πάθηση, που προκύπτει από μεταβολές που συμβαίνουν στην περιοχή που κωδικοποιείται το γονίδιο της λακτάσης. Η εκδήλωσή της εκφράζεται ως διάρροια εντός κάποιων ημερών ύστερα από την γέννηση με την κατανάλωση ανθρώπινου γάλακτος ή γάλακτος που περιέχει λακτόζη, σε συνδυασμό με εκδήλωση υδαρών κενώσεων. Η παθολογική αυτή κατάσταση παραμένει σε όλη την διάρκεια της ζωής και ο μόνος τρόπος εξάλειψής της είναι η απόρριψη όλων των πηγών λακτόζης. Η συγγενής ανεπάρκεια λακτάσης έχει καταγραφεί σε 40 περίπου περιπτώσεις όπου η αδυναμία δραστηριότητας της λακτάσης οφειλόταν σε μη αισθητό mRNA. Η απουσία θρεπτικών συστατικών όπως η λακτόζη, παρεμποδίζει την ανάπτυξη σε συνδυασμό με εμφάνιση αλκάλωσης και αφυδάτωσης. Η διάγνωση της συγγενής ανεπάρκειας λακτάσης επιτυγχάνεται με γενετικό τεστ ή ενδοσκόπηση του ανώτερου γαστρικού συστήματος κατά την οποία λαμβάνεται δείγμα εντερικής βιοψίας και μετέπειτα καταγραφή της δραστηριότητας της λακτάσης ανά γραμμάριο ιστού στον βλεννογόνο του δωδεκαδάχτυλου. Η δοκιμή αναπνοής υδρογόνου (HBT) αποτελεί μια ακόμη μέθοδο για την διάγνωση της συγγενής ανεπάρκειας λακτόζης. Η απουσία του ενζύμου της λακτάσης οδηγεί σε δυσαπορρόφηση του δισακχαρίτη ο οποίος λόγω της αδυναμίας του να απορροφηθεί, επιλέγει να ζυμωθεί με την βοήθεια εντερικών μικροοργανισμών, συμβάλλοντας με αυτό τον τρόπο στην εμφάνιση κλινικών συμπτωμάτων που αποτελούν χαρακτηριστικές για την πάθηση. Εάν δεν αναγνωριστεί εγκαίρως και δεν ληφθούν τα κατάλληλα μέτρα ταχύτατα, η κατάσταση χαρακτηρίζεται ως απειλητική για την ζωή

λόγω της αφυδάτωσης και των απωλειών των ηλεκτρολυτών. Η θεραπεία που χρησιμοποιείται στην συγκεκριμένη περίπτωση, είναι η αφαίρεση της λακτόζης η οποία θα αντικατασταθεί με εμπορικό χημικό ή φυσικό τύπο (φόρμουλα) που δεν θα διαθέτει λακτόζη. Ο φαινότυπος της συγγενής ανεπάρκειας λακτόζης παρουσιάζει τελείως διαφορετικό φαινότυπο από εκείνον της πρωτογενής ανεπάρκειας λακτόζης που σχετίζεται φυσιολογική υπορύθμιση της δραστηριότητας της λακτάσης και παράγει πολύ ήπια έως μηδαμινά συμπτώματα. Οι δύο αυτές περιπτώσεις παρουσιάζουν παρεμφερείς τιμές της δραστηριότητας της λακτάσης παρά το γεγονός ότι διαθέτουν διαφορετικούς υποκείμενους μοριακούς μηχανισμούς, με τα συμπτώματα της συγγενής ανεπάρκειας λακτόζης να εμφανίζει εντονότερα και πολύ πιο σοβαρά συμπτώματα από την πρωτογενή ανεπάρκεια λακτόζης.

➤ **Αναπτυξιακή ανεπάρκεια λακτάσης**

Η αναπτυξιακή ανεπάρκεια λακτάσης οφείλεται σε χαμηλά επίπεδα λακτάσης και αποτελεί συνέπεια της πρόωρης γέννησης των εμβρύων. Η δραστηριότητα της λακτάσης εμφανίζεται στο τέλος της κύησης στα έμβρυα με αποκορύφωμα την γέννησή τους. Συνεπώς, τα πρόωρα βρέφη, δηλαδή εκείνα που γεννιούνται στις 28 έως 32 εβδομάδες εμφανίζουν μειωμένη δραστηριότητα λακτάσης. Απαραίτητη προϋπόθεση ώστε τα βρέφη να αποφύγουν δυσάρεστες καταστάσεις όπως η διάρροια αλλά και ο υποσιτισμός είναι να μην εμφανίζουν οποιαδήποτε άλλη επιπλοκή ως προς την κατάσταση της υγείας τους ώστε, το παχύ τους έντερο να έχει την δυνατότητα να διασώσει τους μη απορριφθέντες υδατάνθρακες. Η παθολογική αυτή κατάσταση σταδιακά βελτιώνεται καθώς, ωριμάζει ο εντερικός βλεννογόνο του βρέφους.

Μια μελέτη ανέδειξε ότι η χρήση της τεχνολογίας σταθερών ισοτόπων και η απέκκριση υδρογόνου σε πρόωρα βρέφη επικύρωσε την αναπτυξιακή ανεπάρκεια λακτάσης. Σύμφωνα με την έρευνα, η ζύμωση που λαμβάνει χώρα στο παχύ έντερο ύστερα από την άφιξη της λακτόζης έχει ευεργετικά αποτελέσματα. Το πόρισμα της έρευνας ήταν ότι παρά το μικρότερο ποσοστό από 100% σε αποτελεσματικότητα της πέψης της λακτόζης, η αντικατάστασή της με άλλα σάκχαρα δεν κρίνεται απαραίτητη για την σίτιση των πρόωρων βρεφών. Σε άλλη μελέτη που διεξήχθηκε, η δραστηριότητα της λακτάσης αυξήθηκε σημαντικά με την πάροδο του χρόνου. Παρατηρήθηκε διαφορά στην δραστηριότητα της λακτάσης στα βρέφη που ξεκίνησαν νωρίς την εντερική σίτιση (10 ημέρες, 100%), με την ομάδα των βρεφών που ξεκίνησαν μετέπειτα (28

ημέρες, 60%). Συμπεραίνεται επομένως, ότι η πρόωμη σίτιση αυξάνει την δραστηριότητα της εντερικής λακτάσης στα πρώιμα βρέφη.

➤ Πρωτογενής ανεπάρκεια λακτάσης ή υπολακτασία ενηλίκων

Η πλειονότητα του παγκόσμιου πληθυσμού δεν παρουσιάζει δραστηριότητα της λακτάσης κατά την διάρκεια της ενήλικης ζωής. Η ανεπάρκεια της λακτάσης μετά την βρεφική ηλικία, είναι αποτέλεσμα μιας γενετικά προκαθορισμένης κατάστασης η οποία καλείται υπολακτασία τύπου ενηλίκου ή πρωτογενής ανεπάρκεια λακτόζης. Η παθολογική αυτή κατάσταση αποτελεί κύρια αιτία της δυσανεξίας στη λακτόζη. Η πρωτογενής ανεπάρκεια λακτάσης αποτελεί τον συνηθέστερο τύπο πρωτοπαθούς ενζυμικής ανεπάρκειας, που ξεκινάει σταδιακά από την ηλικία των τεσσάρων με πέντε ετών και θεωρείται υπεύθυνος για τη μείωση της δραστηριότητας της λακτάσης του εντερικού ενζύμου λακτάση. Το ποσοστό των ανθρώπων που εμφανίζει πρωτογενή ανεπάρκεια λακτάσης εκτιμάται στο 65-70%. Συχνά συνοδεύεται από συμπτώματα όπως το κοιλιακό άλγος, ναυτία και μετεωρισμός. Η ποσότητα της λακτόζης που προκαλεί τα συμπτώματα ποικίλει μεταξύ του πληθυσμού ανάλογα με το βαθμό ανεπάρκειας της λακτάσης, την ποσότητα της λακτόζης που καταναλώνεται καθώς, και τη μορφή της τροφής με την οποία προσλαμβάνεται ο δισακχαρίτης. Οι άνθρωποι που πάσχουν από υπολακτασία, εμφανίζουν προβλήματα σχετικά με την βέλτιστη μεταλλοποίηση των οστών. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας της ανεπάρκειας ασβεστίου που περιέχεται σε όλα τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Η υπολακτασία τύπου ενηλίκων κληρονομείται από αυτοσωμικό υπολειπόμενο γονίδιο με τους φορείς να χάνουν την ικανότητα πέψης της λακτόζης κατά την διαδικασία της ανάπτυξης με τελικό αποτέλεσμα την ενήλικη ζωή. Η δραστηριότητα του δισακχαρίτη μειώνεται σε ποσοστό 5 έως 10% της αρχικής λειτουργικής ικανότητας ύστερα από την περίοδο απογαλακτισμού. Η πλειονότητα των παιδιών στην Ταϊλάνδη καθίσταται υπολακτασική στην ηλικία των 2 με 4 ετών ενώ, οι Καυκάσιοι πληθυσμοί σπάνια εκδηλώνουν την πάθηση πριν την συμπλήρωση των 5 ετών. Στις χώρες της Αφρικής εμφανίζεται σε ηλικία 1 έως 8 έτη, στην Ινδία μεταξύ 3 με 8 χρονών και ακολούθως, στον φιλανδικό πληθυσμό κυμαίνεται σε εύρος 5 με 20 χρονών.

Η ανεπάρκεια λακτάσης μπορεί να εμφανιστεί ως επίκτητη κατάσταση ύστερα από σοβαρή βλάβη του βλεννογόνου του εντέρου λόγω κοιλιοκάκης και φλεγμονωδών νόσων του εντέρου, υποσιτισμό, βακτηριακή ή ιογενή εντερίτιδα, παρασιτική νόσο, ακτινική εντερίτιδα, φάρμακα, γαστρεντερική χειρουργική επέμβαση, σύνδρομο βρα-

χέος εντέρου καθώς και βακτηριακή υπερανάπτυξη του λεπτού εντέρου. Οι διάφορες λοιμώξεις, έχουν την ικανότητα να προκαλέσουν βλάβη στα επιθηλιακά κύτταρα που περιέχουν λακτάση. Τα κύτταρα αντικαθιστούν τα τραυματισμένα ωστόσο, είναι ανώριμα και ανεπαρκή σε λακτάση συγκριτικά με τα αρχικά προκαλώντας με αυτό τον τρόπο την δευτερογενή ανεπάρκεια λακτάσης. Συνεπώς, όλες οι προαναφερθείσες καταστάσεις είναι πιθανόν να οδηγήσουν σε μείωση της ικανότητας απορρόφησης της λακτόζης καθώς και σε υπορύθμιση της έκφρασης της λακτάσης στο λεπτό έντερο. Εκτός από τα κλασσικά συμπτώματα της δυσανεξίας στη λακτόζη, έχουν διαπιστωθεί και ορισμένα εξω-εντερικά όπως η κόπωση, ο πονοκέφαλος καθώς επίσης και ο μυϊκός πόνος.

➤ Δευτερογενής ανεπάρκεια λακτόζης

Στην περίπτωση δευτερογενούς ανεπάρκειας λακτάσης, δεν είναι αναγκαίο να αποκλειστεί η λακτόζη από την διατροφή. Η συγκεκριμένη λοίμωξη προσβάλλει συχνά τα παιδιά ιδιαίτερα στις αναπτυσσόμενες χώρες όπου τέτοιες παθήσεις αποτελούν συχνό φαινόμενο. Ύστερα από την κατάποση, το ένζυμο λακτάση που βρίσκεται στις μικρολάχνες των εντεροκυττάρων του λεπτού εντέρου, διέρχεται μέσω της κυτταρικής μεμβράνης. Για την διευκόλυνση της διέλευσής της από αυτήν, η λακτόζη διασπάται στους μονοσακχαρίτες γλυκόζη και γαλακτόζη. Η ανεπαρκής δραστηριότητα της λακτάσης επιτρέπει στη λακτόζη να φτάσει στο παχύ έντερο. Στο σημείο αυτό, η χλωρίδα του εντέρου παρέχει μια κατεύθυνση για την πέψη της λακτόζης όπου επιτυγχάνεται με διάσπαση της λακτόζης σε λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας (SCFA) και αέριο κυρίως υδρογόνο (H_2), διοξείδιο του άνθρακα (CO_2) καθώς και μεθάνιο (CH_4). Η λακτόζη που δεν έχει απορροφηθεί μπορεί να προκαλέσει οσμωτική διάρροια. Τα προϊόντα της βακτηριακής πέψης μπορεί να οδηγήσουν σε εκκριτική διάρροια και αέρια που διαστέλλουν τα έντερα.

➤ Συσχέτιση δυσανεξίας στην λακτόζη με αλλεργία

Υπάρχουν αρκετές ενδείξεις σύγχυσης μεταξύ δυσανεξίας στη λακτόζη και της αλλεργίας στο γάλα που προέρχονται ακόμη και από γιατρούς. Η παρανόηση αυτών των δύο εννοιών μπορεί να οδηγήσει σε περιττό διατροφικό περιορισμό ή ακόμη και σε αντιδράσεις που υπό άλλες συνθήκες θα μπορούσαν να αποφευχθούν. Ο όρος αλλεργία στο γάλα, δυσανεξία στην λακτόζη, δυσανεξία στο γάλα χρησιμοποιούνται συχνά χωρίς σαφή αίσθηση των διαφορετικών σημασιών αλλά και κατανόηση των διαφορε-

τικών μηχανισμών που τα διέπουν ή ακόμη και των διατροφικών επιπτώσεων της εκάστοτε διάγνωσης. Η καθεμία από τις παραπάνω περιπτώσεις που προαναφέρθηκαν χρήζει σαφώς διαφορετικής αντιμετώπισης ενώ, η ακατάλληλη αναγνώριση και διαχείριση μπορεί να έχει σημαντικές επιπτώσεις για τον ασθενή. Τα τελευταία 15 χρόνια, έχουν γίνει διάφορες συζητήσεις σχετικά με την ονοματολογία των αντιδράσεων που προέρχονται από το γάλα.

➤ Τροφική αλλεργία

Η τροφική αλλεργία που προκαλείται από ανασοσφαιρίνη E (IgE) προκαλεί αντίδραση εντός 2 ωρών έκθεσης σε αλλεργιογόνα. Τα κλινικά συμπτώματα εξηγούνται από μεσολαβητές που απελευθερώνονται από ιστιοκύτταρα αλλά και βασεόφιλα. Η οξεία κνίδωση και το αγγειοοίδημα αποτελούν τα πιο χαρακτηριστικά συμπτώματα της αλλεργίας που προκαλείται από IgE. Οι αντιδράσεις ποικίλουν και μπορεί να εμφανίζονται ως συστηματικές (αναφυλαξία), που αφορούν το δέρμα, το γαστρεντερικό, το αναπνευστικό καθώς και το καρδιαγγειακό σύστημα. Η μεμονωμένη ρινοεπιπεφυκίτιδα ως αντίδραση σε τροφική αλλεργία είναι πολύ σπάνια στα παιδιά, αλλά μπορεί να συνοδεύεται από άλλα συμπτώματα όπως η κνίδωση, που αφορά παιδιά τα οποία είναι επιρρεπή σε τροφική αναφυλαξία. Οι αλλεργίες που προκαλούνται από μη μεσολαβούμενο IgE, καθυστερούν και χρειάζονται έως και 48 ώρες για να αναπτυχθούν, ωστόσο εξακολουθούν να περιλαμβάνουν το ανοσοποιητικό σύστημα. Στο διάστημα των δύο τελευταίων δεκαετιών σημειώθηκε αύξηση των παιδιών με τροφικές αλλεργίες σε σημαντικό βαθμό.

➤ Αλλεργία στο γάλα

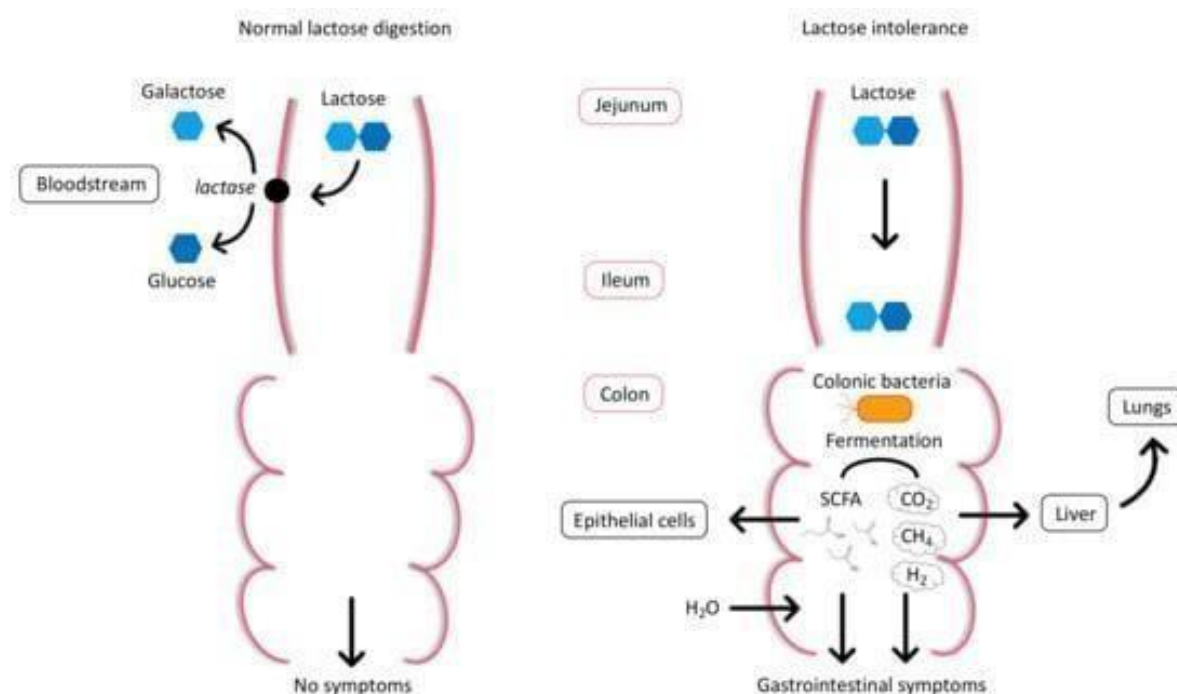
Η αλλεργία στο γάλα έχει αυξηθεί σε νήπια και βρέφη σε ποσοστό που κυμαίνεται στο 0,5%-3% περίπου στην ηλικία του ενός έτους στον δυτικό κόσμο αλλά και στον υπόλοιπο κόσμο. Ορισμένα παιδιά εμφανίζουν σοβαρές αντιδράσεις και επιπλοκές ακόμη και σε ίχνη γάλακτος. Οι πρωτεΐνες του αγελαδινού γάλακτος περιλαμβάνουν δύο κλάσματα που είναι η καζεΐνη σε ποσοστό 76-86% και ο ορός γάλακτος σε ποσοστό 14-24%. Ο ορός γάλακτος περιλαμβάνει β-γαλακτοσφαιρίνη σε ποσοστό 7% έως 12%, α-λακταλβουμίνη σε ποσοστό 2% με 5%, αλβουμίνη ορού σε ποσοστό 0,7% με 1,3% καθώς επίσης και τις ανοσοσφαιρίνες ορού σε ποσοστό 1,4% έως 2,8%. Η β-λακτοσφαιρίνη και η καζεΐνη είναι οι πιο αλλεργιογόνες πρωτεΐνες συγκριτικά με τις υπόλοιπες. Οι πρωτεΐνες του αγελαδινού γάλακτος πέπτονται από τα

γαστρικά και παγκρεατικά πρωτεολυτικά ένζυμα και απορροφώνται από τον εντερικό βλεννογόνο. Τα πεπτίδια υψηλού μοριακού βάρους που προκύπτουν, σε συνδυασμό με τη διαπερατότητα στον βλεννογόνο του εντέρου αλλά και την γενετική προδιάθεση που εμφανίζει κάποιος στην αλλεργία, διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη αλλεργίας με την έκθεση σε αγελαδινό γάλα.

3.5. Συμπτώματα δυσανεξίας της λακτόζης

Τα τυπικά συμπτώματα είναι κοιλιακό άλγος, διάρροια, μετεωρισμός, βορβορυγμοί και σε άλλες περιπτώσεις ναυτία, δυσκοιλιότητα ή και εμετός. (Lomer, Miranda CE, G. C. Parkes, and J. D. Sanderson, 2008) Οφείλονται στις οσμωτικές δυνάμεις που εξαρτώνται από την ταχύτητα και την ποσότητα της λακτόζης που είναι άπεπτη όταν εισέρχεται στο λεπτό και στο παχύ έντερο. Τα βακτήρια ζυμώνουν τον δισακχαρίτη σε αέρια, όπως το υδρογόνο, το μεθάνιο, το άζωτο και σε Λιπαρά Οξέα Βραχείας Αλύσου, τα οποία ευθύνονται και για τα συμπτώματα. (Szilagyi, Andrew, and Norma Ishayek., 2018). Η ένταση των συμπτωμάτων εξαρτάται από την ποσότητα της θρεπτικής ουσίας ή της τροφής που καταναλώνεται. (Vázquez, SE Martínez, et al., 2020) Η διάρροια οφείλεται σε περίπτωση που η μη αφομοιώσιμη λακτόζη υπερβεί την ικανότητα της μικροχλωρίδας του παχέος εντέρου ζύμωσης αλλά και τα λιπαρά οξέα αν υπερβούν την ικανότητα του παχέος εντέρου να τα απορροφήσει. (Misselwitz, Benjamin, et al., 2019) Η λακτόζη η οποία δεν έχει απορροφηθεί δηλαδή, αυξάνει την οξύτητα και το οσμωτικό φορτίο αυξάνοντας με αποτέλεσμα τους ηλεκτρολύτες αλλά και τα υγρά, τα οποία οδηγούν σε χαλαρά και υδαρή κόπρανα. Ο κοιλιακός πόνος και ο μετεωρισμός οφείλεται στον ίδιο λόγο, όπου η μη απορροφηθείσα λακτόζη ζυμώνεται από τα βακτήρια στο παχύ έντερο και οδηγεί στην παραγωγή των ουσιών που προαναφέρθηκαν με συνέπεια την αύξηση χρόνου διέλευσης τους στο έντερο και την ενδοκλονική πίεση. (Lomer, Miranda CE, G. C. Parkes, and J. D. Sanderson, 2008). Ένας άλλος μηχανισμός που περιγράφει τα συμπτώματα είναι η μη απορροφηθείσα λακτόζη να έχει διασπαστεί σε γλυκόζη και γαλακτόζη από την βακτηριακή β-γαλακτοζιδάση που υπάρχει στα βακτήρια γαλακτικού οξέος και γίνονται στην συνέχεια, διαθέσιμοι για την βακτηριακή ζύμωση στο παχύ έντερο, τα οποία ακολουθούν την ίδια διαδικασία που παραπάνω περιγράφηκε. Ο τρίτος μηχανισμός είναι η μείωση

του διοξειδίου του άνθρακα από ορισμένα βακτηριακά σε μεθάνιο που οδηγεί σε δυσκοιλότητα. (Lomer, Miranda CE, G. C. Parkes, and J. D. Sanderson, 2008)



Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση φυσιολογικής πέψης λακτόζης (αριστερά) και δυσανεξίας της λακτόζης (δεξιά)

Η πιθανότητα εμφάνισης συμπτωμάτων μετά την κατανάλωση λακτόζης εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως:

- Εξωγενείς: η ποσότητα λακτόζης που προσλαμβάνεται, αν τα γαλακτοκομικά καταναλώνονται συγχρόνως με άλλα τρόφιμα που επηρεάζουν την εντερική διέλευση και τον ρυθμό παροχής λακτόζης στο παχύ έντερο. (Misselwitz, Benjamin, et al.,2019)
- Ενδογενείς: η έκφραση της λακτάσης στο όριο της βούρτσας του λεπτού εντέρου, το ιστορικό του γαστρεντερικού σωλήνα, ή χειρουργικής επέμβασης στην κοιλιά αλλά και η σύνθεση του εντερικού μικροβιώματος. (Misselwitz, Benjamin, et al.,2019)

Πολλοί ασθενείς έχουν αναφέρει, χωρίς να σχετίζεται άμεσα με την πέψη της λακτόζης, αλλά συνδέονται και αυτά είναι το έντονο άγχος, παρουσία διαταραχών στο γαστρεντερικό σύστημα. Έρευνα επίσης, έχουν δείξει πως ασθενείς με γαστρεντερολογικά προβλήματα εμφανίζουν νευρολογικά συμπτώματα όπως κόπωση, πονοκέφαλος έπειτα από κατανάλωση λακτόζης, το οποίο είναι αβέβαιο εάν συσχετίζεται με την δυσανεξία. (Misselwitz, Benjamin, et al.,2019)

3.6. Θεραπευτικές επιλογές της δυσανεξίας της λακτόζης

Τα πλέον πιο διαδεδομένα και ευρέως γνωστά μέτρα για που μπορεί να χρησιμοποιηθούν για τον χειρισμό της δυσανεξίας στη λακτόζη αλλά και για την μείωση της πρόσληψης της λακτόζης είναι τα εξής:

- Χρήση εναλλακτικών θρεπτικών ουσιών ή υποκατάστατων
- Χορήγηση ενζυμικών συμπληρωμάτων ή υποκατάστατων λακτάσης
- Διατήρηση της ποσότητας του ασβεστίου
- Πρόσληψης βιταμίνης D

Η αντικατάσταση ενζύμων αποτελεί καθοριστική ενέργεια για ασθενείς με δυσανεξία στη λακτόζη που επιθυμεί να καταναλώσει γαλακτοκομικά προϊόντα.

Πιο αναλυτικά, μια λύση για την αντιμετώπιση της δυσανεξίας είναι η αποφυγή των γαλακτοκομικών προϊόντων, το οποίο δεν είναι απαραίτητο. Στην πρωτοπαθή, τα τρόφιμα με δυσανεξία μπορούν να αποφύγουν για 2-4 εβδομάδες για να προκληθεί ύφεση. Μετά από 4 εβδομάδες μπορούν να εισαχθούν στην διατροφή ανάλογα την ανοχή του ανθρώπου. Η πρόσληψη κάτω από 6 γραμμάρια λακτόζης είναι απίθανο να δημιουργήσει θέμα. Στη δευτερογενή δυσανεξία στη λακτόζη, η λακτόζη περιορίζεται μόνο για ορισμένη διάρκεια και μπορεί να επανεισαχθεί με ασφάλεια μετά την ανάρρωση από εντερική βλάβη. Δώδεκα έως 24 γραμμάρια λακτόζης που καταναλώνονται σε μικρές ποσότητες κατά τη διάρκεια της ημέρας, θεωρείται ότι είναι μια ποσότητα που είναι καλά ανεκτή, αν και το όριο για την ανοχή στη λακτόζη και τα συμπτώματα ποικίλλει ευρέως μεταξύ των ατόμων (Morelli, Lorenzo, et al.,2019)

Η σταδιακή εισαγωγή μικρών ποσοτήτων στην διατροφή γάλακτος αλλά και των προϊόντων του, μπορεί να φανεί αποτελεσματικό σε ορισμένα άτομα με ήπια συμπτώματα που προσπαθούν να προσαρμοστούν στην λακτόζη. Συνήθως, πολλοί παθόντες για να ανεχθούν τα γαλακτοκομικά προϊόντα τα συνδυάζουν με άλλα γεύματα, π.χ. το γάλα με δημητριακά. Επίσης, πολλοί είναι πιθανότερο να ανεχθούν το σκληρό τυρί παρά ένα ποτήρι γάλα, καθώς μια μερίδα ώριμου τυριού διαθέτει λιγότερη λακτόζη από ένα ποτήρι γάλα. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι γίνεται διαχωρισμός του τυροπήγματος από τον ορό του γάλακτος, βέβαια δεν είναι πλήρης και γι' αυτό τα τυριά περιέχουν λίγη λακτόζη. Σε 43 g τυριού όπως το cottage cheese διαθέτει 12g

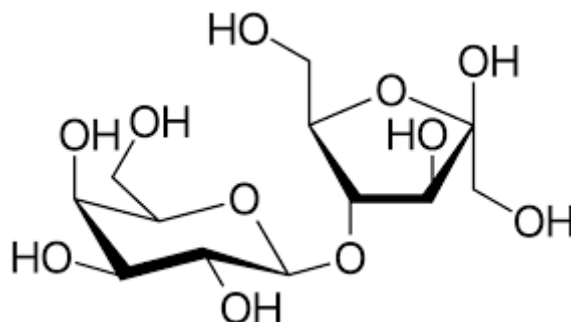
λακτόζη, η οποία βρίσκεται στα όρια ανοχής. Επίσης, τα άτομα με δυσανεξία δεν αντιμετωπίζουν πρόβλημα στο να καταναλώσουν γιαούρτι αλλά ούτε και άλλα προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση όπως το κεφίρ, η ξινή κρέμα, διότι μετατρέπεται η λακτόζη σε γλυκόζη και γαλακτόζη από την βακτηριακή ζύμωση. Επίσης, παράγεται το ένζυμο λακτάση από τις καλλιέργειες των βακτηρίων, κάτι το οποίο μπορεί να βοηθήσει στην πέψη της στο έντερο. Συνεπώς, πέρα από την ευκολία της πέψης αυτών των προϊόντων, χαρακτηρίζονται και προϊόντα υψηλής θρεπτικής αξίας. (Silanikove, Nissim, Gabriel Leitner, and Uzi Merin,2015)

Τα γαλακτοκομικά έχουν μεγάλο σημαντικό ρόλο στην καθημερινή διατροφή καθώς αποτελούν μια σημαντική πηγή βιταμινών, μετάλλων, και υψηλής ποιότητας πρωτεϊνών. Εξάλλου, έχει αποδειχθεί ότι συμβάλλουν στην καθημερινή συνιστώμενη πρόληψη ασβεστίου, το οποίο είναι ωφέλιμο για την υγεία των οστών τόσο των ενηλίκων όσο και των παιδιών, αλλά και έχει δείξει ότι μειώνει τον κίνδυνο μεταβολικού συνδρόμου. (Ohlsson, Jonas A., et al. , 2017) Πολλοί παθόντες καταφεύγουν σε άλλες λύσεις όπως τα προϊόντα με μειωμένη ή και χωρίς λακτόζη, τα οποία υπάρχουν στα περισσότερα σούπερ-μαρκετ και η διατροφική αξία τους δεν διαφέρουν πολύ από τα κανονικά. Οι κατασκευαστές επεξεργάζονται το γάλα με το ένζυμο λακτάση, το οποίο διασπά την λακτόζη σε γλυκόζη και γαλακτόζη αποκτώντας το προϊόν μια πιο γλυκιά γεύση. (Silanikove, Nissim, Gabriel Leitner, and Uzi Merin,2015) Τέλος, πολλοί καταφεύγουν στην κατανάλωση ενισχυμένου ροφήματος σόγιας με ασβέστιο ή και χυμού πορτοκαλιού. (Thompson, Manore, Vaughan,2021)

Μια άλλη λύση αποτελεί η χρήση δισκίων αλλά και σταγόνων λακτάσης για την βελτίωση της πέψης των γαλακτοκομικών. (Silanikove, Nissim, Gabriel Leitner, and Uzi Merin,2015) Η λακτάση σε αυτήν την περίπτωση, παράγεται από μύκητες ή και ζυμομύκητες. (Szilagyi, Andrew, and Norma Ishayek.,2018) Το ένζυμο αυτό σε δισκία αφομοιώνει την λακτόζη της τροφής και μειώνει με αυτόν τον τρόπο τις επιπτώσεις που ενδεχομένως να δημιουργούσε η λακτόζη. Βέβαια, σε αυτήν την περίπτωση είναι απαραίτητη ο πάσχοντας να απευθυνθεί σε γιατρό προτού χρησιμοποιήσει το δισκίο για να αποφευχθούν τυχόν αλλεργικές αντιδράσεις, ιδιαίτερα σε ευπαθή άτομα. (Silanikove, Nissim, Gabriel Leitner, and Uzi Merin,2015)

Έχει μελετηθεί η επίδραση των πρεβιοτικών πως μπορούν να μειώσουν την ένταση των συμπτωμάτων κατά την κατανάλωση λακτόζης. Οι βελτιώσεις στα συμπτώματα και στην ανταπόκριση του υδρογόνου στο τεστ αναπνοής αναπαράχθηκαν στη συνέχεια μετά από τακτική λήψη χαμηλής δόσης λακτουλόζης, ο οποίος είναι δισακχαρί-

της που αποτελείται από την φρουκτόζη και την γαλακτόζη. Σε φαρμακευτική βάση για θεραπεία, η τακτική λήψη του πρεβιοτικού γαλακτο-ολιγοσακχαρίτη έχει αποδειχθεί ότι βελτιώνει τόσο τα συμπτώματα όσο και την απόκριση του υδρογόνου στην αναπνοή.. (Szilagyí, Andrew, and Norma Ishayek., 2018)

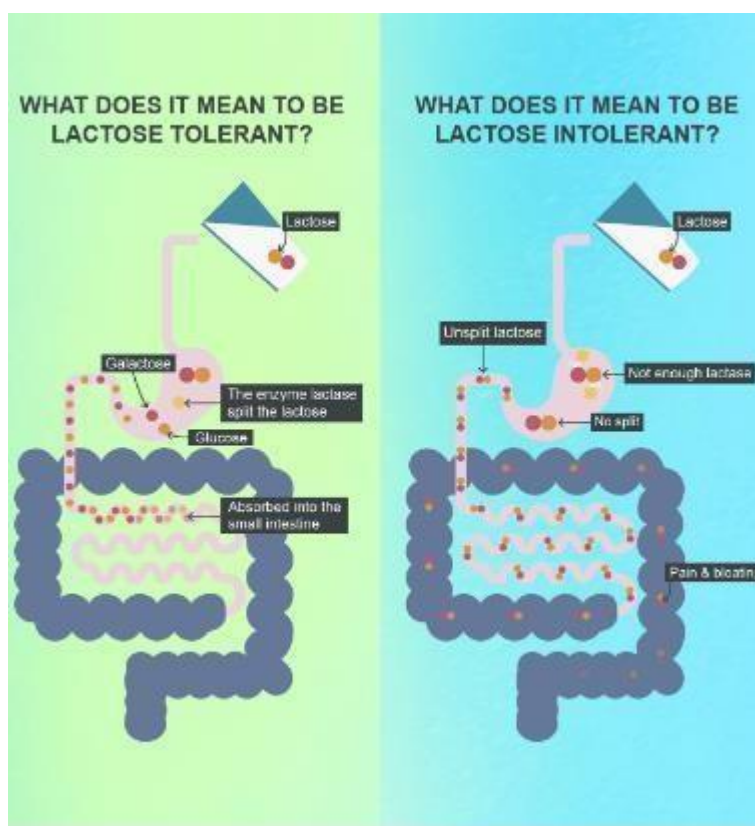


Εικόνα 6: Λακτουλόζη

Συμπερασματικά, όσο ενοχλητικά είναι τα συμπτώματα, δεν είναι κατάσταση που χρήζει ιατρικής θεραπείας σε κοινωνίες που η διατροφή δεν διαθέτει πολλά γαλακτοκομικά προϊόντα. Το κύριο πρόβλημα στα άτομα που δεν μπορούν να καταναλώσουν γαλακτοκομικά, τους εμποδίζει να καταναλώσουν βιταμίνη D αλλά και το ασβέστιο, το οποίο είναι απαραίτητο ιδίως σε μικρές ηλικίες κατά την οποία αναπτύσσονται τα οστά. Γι' αυτό η επιλογή των γαλακτοκομικών χωρίς λακτόζη αποτελεί μια καλή λύση καθώς και η περίπτωση των δισκίων λακτάσης διότι δίνει την δυνατότητα κατάναλωσης τους χωρίς να αναπτύξουν συμπτώματα. Δεδομένου ότι τα περισσότερα άτομα με δυσανεξία μπορούν να ανεχθούν κάποια ποσότητα λακτόζης δεν είναι αναγκαίο να αποφύγουν το γάλα, εξάλλου, αναφέρουν οι ειδικοί ότι τα άτομα με δυσπορρόφηση λακτόζης θα μπορούσαν να καταναλώσουν ημερησίως 12g λακτόζη χωρίς συμπτώματα ή τουλάχιστον θα είναι ήπια. (Silanikove, Nissim, Gabriel Leitner, and Uzi Merin,2015).

3.7. Συσχέτιση δυσανεξίας στη λακτόζη με άλλες παθήσεις

Η τροφική δυσανεξία αποτελεί κοινό φαινόμενο στον σύγχρονο κόσμο, που επηρεάζει σε ποσοστό περίπου 15% έως και 20% του πληθυσμού παγκοσμίως. Ακόμη και πριν από δύο δεκαετίες περίπου το 20% του πληθυσμού είχε αναφέρει τροφική δυσανεξία. Οι άνθρωποι που πάσχουν από τροφική δυσανεξία συχνά αναφέρουν γαστρεντερικά συμπτώματα που καλούνται και γαστρεντερικές διαταραχές. Η πιο συνηθισμένη μορφή αποτελεί το σύνδρομο του ευερέθιστου εντέρου (IBS), με το ποσοστό των ανθρώπων που αντιλαμβάνονται ότι τα συμπτώματά τους σχετίζονται με τροφική δυσανεξία να κυμαίνεται σε ποσοστό 50%-84%. Η διάγνωση της νόσου που προαναφέρθηκε όπως και πολλών ακόμη αντίστοιχων πραγματοποιείται με ευκολία, ωστόσο οι παθήσεις που συνδέονται περισσότερο με την δυσανεξία της λακτόζης καλούνται Λειτουργικές Γαστρεντερικές Διαταραχές (FGID).



Εικόνα 7: Αίτια και συμπτώματα δυσανεξίας στην λακτόζη

- **Κατηγορίες συνδρόμου ευερέθιστου εντέρου**

Το σύνδρομο του ευερέθιστου εντέρου που αποτελεί την κοινή διαταραχή που συγγέεται με τη δυσανεξία στη λακτόζη χωρίζεται σε τέσσερις κατηγορίες :

- IBS- Διάρροια
- IBS-Δυσκοιλιότητα
- IBS-Μεικτό
- IBS-Αδιαφοροποίητο

Οι κατηγορίες αυτές εξαρτώνται από την συχνότητα εμφάνισης κάθε χαρακτηριστικού σε περισσότερο ή λιγότερο από το 25% των περιπτώσεων. Δεδομένου ότι δεν υπάρχει συγκεκριμένη καθοριστική παθολογία αυτή τη δεδομένη στιγμή, οι θεραπείες στηρίζονται με βάση τα συμπτώματα σε μεταβλητά αποτελέσματα. Τα συμπτώματα αποτελούν αμφίδρομη αλληλεπίδραση μεταξύ της εντερικής μικροχλωρίδας, που επικοινωνεί με το εντερικό και στη συνέχεια με το κεντρικό νευρολογικό σύστημα. Συνήθως, συνδέονται με κοιλιακό πόνο που παρουσιάζει επιμονή για μεγάλο χρονικό διάστημα. Άλλα συμπτώματα που παρουσιάζονται αποτελούν οι κοιλιακές κράμπες καθώς και το φούσκωμα. Ο ρυθμός ικανότητας απορρόφησης ή μη της λακτόζης δεν επηρεάζεται από το συγκεκριμένο σύνδρομο ωστόσο, άτομα που πάσχουν και από τα δύο παρουσιάζουν αρκετά υψηλή ευαισθησία.

Θεραπεία για το σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου

Η θεραπεία της δυσανεξίας στη λακτόζη δεν στρέφεται κυρίως προς την μείωση της δυσαπορρόφησης . Αντίθετα, επικεντρώνεται στη βελτίωση των συμπτωμάτων του γαστρεντερικού συστήματος διασφαλίζοντας παράλληλα, επαρκή πρόσληψη θρεπτικών συστατικών. Συνίσταται δίαιτα χαμηλής λακτόζης για ασθενείς που παρουσιάζουν δυσανεξία στη λακτόζη. Οι ασθενείς που πάσχουν από σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου, μπορούν να καταναλώσουν έως και 12g λακτόζης δίχως την παρουσία κάποιου συμπτώματος. Μεγαλύτερες δόσεις λακτόζης (15-16g) μπορούν να γίνουν ανεκτές κατά την κατάποση με την συνοδεία άλλων θρεπτικών συστατικών. Σχεδόν το

85% των ασθενών που πάσχουν από σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου, ανέφεραν ότι εμφάνισαν βελτίωση στην κοιλιακή δυσφορία μετά τον περιορισμό της λακτόζης. Ο περιορισμός μόνο της λακτόζης δεν αποτελεί λύση για την μείωση των νόσων του γαστρεντερικού συστήματος. Η συγκεκριμένη πρακτική αποτελεί λύση μόνο στη περίπτωση δυσανεξίας στη λακτόζη λόγω κατανάλωσης γαλακτοκομικών προϊόντων. Τα περισσότερα άτομα που πάσχουν από σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου εμφανίζουν δυσανεξία στη λακτόζη λόγω ανεπαρκούς απορρόφησης μονοσακχαριτών, δισακχαριτών, ολισακχαριτών και πολυολών που ζυμώνονται.

3.8. Μέθοδοι ανίχνευσης δυσανεξίας της λακτόζης

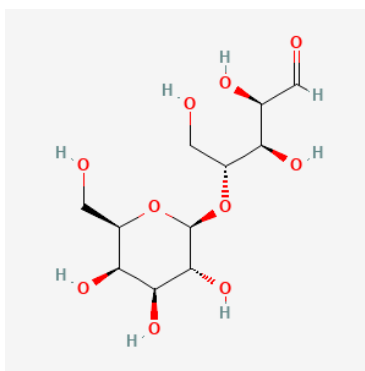
- **Τεστ αναπνοής υδρογόνου**

Τα τεστ αναπνοής βασίζονται στην ιδέα ότι μέρος του αερίου που παράγεται από την ζύμωση βακτηρίων του παχέος εντέρου διαχέεται στο αίμα και εκκρίνεται ταχέως με την αναπνοή όπου εύκολα ποσοτικοποιείται. (Parodi, Aurora, et al., 2009) Το τεστ αναπνοής – H₂ όπως και τα άλλα τεστ διερευνά την φυσιοπαθολογία λειτουργίας των γαστρεντερολογικών διαταραχών όπως η δυσανεξία στην λακτόζη. Είναι μια οικονομική διαδικασία, μη επεμβατικής ικανότητας και διαθέτει υψηλή ευαισθησία. Ανακαλύφθηκε το 1970 από τον Newcomer και τους συνεργάτες του, οι οποίοι μελέτησαν την δυσαπορρόφηση της λακτόζης και παρατηρούσαν τα αέρια υδρογόνο και διοξείδιο του άνθρακα της αναπνοής. Ο Bond και ο Levitt παρατήρησαν ότι ορισμένοι δισακχαρίτες παραμένουν αδιάσπαστοι και μη απορροφημένοι λόγω ατελούς πέψης στο παχύ έντερο. Αναλύθηκαν οι αλλαγές της συγκέντρωσης του υδρογόνου στον εκπνεόμενο αέρα κατά την κατανάλωση του δισακχαρίτη. Η αύξηση της συγκέντρωσης υποδηλώνει δυσπεψία και αντανακλά την ζύμωση της λακτόζης στο κόλον. (Robles, Luelle, Priefer, 2020) Η διαδικασία προϋποθέτει νηστεία για 12 ώρες, και χορηγείται λακτόζη σε συγκέντρωση 1g ανά 1kg σωματικού βάρους διαλυμένη σε διάλυμα 20% με νερό. Συλλέγεται το δείγμα κάθε 20 λεπτά για 3 ώρες. (Morelli, Lorenzo, et al., 2009) Το υδρογόνο παράγεται λόγω βακτηριακής ζύμωσης της μη αφομοιώσιμης λακτόζης στο κόλον και εκτιμάται έμμεσα στην αναπνοή. Η αύξηση της συγκέντρωσης υδρογόνου σε 90' πάνω από 20 ppm επιβεβαιώνει την δυσανεξία. (Morzi, Millie et al., 2021). Εσφαλμένα αρνητικά μπορεί να προκληθεί από σωματική άσκηση, αργή στοματοφυλική διέλευση και όλες εκείνες τις καταστάσεις που αλλάζουν τη φυσιολογική βακτηριακή χλωρίδα, όπως χρήση αντιβιοτικών από το στόμα, κατά-

χρηση καθαρτικών ή επεμβατικές διαδικασίες που απαιτούν προπαρασκευαστικό καθαρισμό του εντέρου με καθαρτικά και /ή κλύσματα. Μπορούν επίσης να ληφθούν ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω υπερβολικής σωματικής δραστηριότητας κοντά στην διενέργεια του τεστ. Μια άλλη προϋπόθεση είναι η πρόσφατη χρήση φαρμάκων όπως η ασπιρίνη ή οι αναστολείς της αντλίας πρωτονίων. Το κάπνισμα μπορεί επίσης να προκαλέσει ψευδώς θετικά, καθώς η καύση του καπνού προκαλεί αύξηση των αερίων, συμπεριλαμβανομένου του υδρογόνου, αλλά και ορισμένα τρόφιμα όπως τα φασόλια ή το καλαμπόκι, τα οποία μπορεί να προκαλέσουν αύξηση της παραγωγής υδρογόνου του οποίου η συγκέντρωση αυξάνεται, κατά συνέπεια, στον εκπνεόμενο αέρα. (Catanzaro, Roberto et al, 2021)

- **Τεστ γαξιλόζης – LacTest**

Το τεστ γαξιλόζης αποτελεί μια μη επεμβατική διαγνωστική μέθοδος. Γίνεται χορήγηση από του στόματος συνθετικού ανάλογου της λακτόζης, 4-γαλακτοσυλξολόζη. (Jiménez, José Luis Domínguez, et al,2017) Η εντερική λακτάση υδρολύει την ένωση της γαξιλόζης σε γαλακτόζη και D-ξυλόζη. (Porzi, Millie et al,2021) Η D-ξυλόζη απορροφάται στο λεπτό έντερο και μετρούνται τα επίπεδα του στο αίμα ή και στα ούρα με χρωματομετρική μέθοδο. Παρουσιάζει εξαιρετική διαγνωστική αποτελεσματικότητα, τα επίπεδα ευαισθησίας και ειδικότητα που ξεπερνά το 90%. Είναι μια διαδικασία εύκολη, χωρίς να προκαλεί κάποια ιδιαίτερη ενόχληση στον εξεταζόμενο. . (Jiménez, José Luis Domínguez, et al,2017) Τέλος, δεν απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμό. (Porzi, Millie et al,2021)



Εικόνα 8: Γαξιλόζη

- **Μέτρηση οξύτητας κόπρανων**

Αυτή η διαδικασία πραγματοποιείται σε βρέφη και σε παιδιά μέχρι την ηλικία των 2 ετών, διότι σε μεγαλύτερες ηλικίες βγάξει ψευδώς αρνητικά τεστ. Στηρίζεται στην μέτρηση αναγωγικών σακχάρων και αποτελεί μια έμμεση διαδικασία ανίχνευσης της δυσανεξίας στην λακτόζη. Εκτός από την λακτόζη, εντοπίζονται και άλλα σάκχαρα όπως η γλυκόζη, η γαλακτόζη, η φρουκτόζη και όχι η σακχαρόζη. Εάν το pH στα κόπρανα στα βρέφη δείξει τιμή κάτω των 5.5 επιβεβαιώνει πως το βρέφος δεν μπορεί να αφομοιώσει την λακτόζη. Επίσης, εάν το ποσοστό των αναγωγικών σακχάρων βρίσκεται πάνω από το 0.25% που είναι η φυσιολογική τιμή να υπάρχει στα κόπρανα των βρεφών, υποδηλώνει επίσης δυσανεξία στην λακτόζη. Ωστόσο, δεν είναι πολύ αξιόπιστη καθώς είναι μια διαδικασία που παρουσιάζει χαμηλή ευαισθησία (Heine, Ralf G., 2017)

- **Γρήγορη εξέταση λακτόζης**

Μια καινούργια μέθοδος που αναπτύχθηκε τον τελευταίο καιρό για την ενδοσκοπική διάγνωση της υπολακτασίας σε έναν ενήλικο. Αυτή η δοκιμή βασίζεται σε μια χρωματομετρική αντίδραση που αναπτύσσεται όταν η ενδοσκοπική βιοψία από το μεταβολικό δωδεκαδάκτυλο επωάζεται με λακτόζη σε μια πλάκα δοκιμής. Η χρωματική αντίδραση αναπτύσσεται εντός 20 λεπτών μετά την υδρόλυση της λακτόζης σε ασθενείς με νορμολακτασία (θετικό αποτέλεσμα), ενώ δεν αναπτύσσεται αντίδραση σε ασθενείς με σοβαρή υπολακτασία (αρνητικό αποτέλεσμα). (Di Renzio, T et al. 2013) Το Quick Test είναι ακριβό για τη Δημόσια Υπηρεσία Υγείας σε σύγκριση με το γενετικό τεστ, καθώς είναι πιο κατάλληλο για δυσπεπτικούς ασθενείς που ήδη υποβάλλονται σε ενδοσκόπηση σε ιδιωτικές κλινικές για κάποια κλινική έρευνα. (Mattar, Rejane, et al., 2013) Ο έλεγχος της δραστηριότητας της λακτάσης σε βιοψίες βλεννογόνου από το δωδεκαδάκτυλο θεωρείται ως το πρότυπο αναφοράς για πρωτογενή και δευτερογενή ανεπάρκεια λακτάσης, ωστόσο, οι περιορισμοί περιλαμβάνουν την ανομοιογενή έκφραση της λακτάσης και την επεμβατικότητα της δοκιμής. (Dang, Yan-yong, 2015)

- **Genetic Test**

Κατά το γενετικό τεστ, γίνεται απομόνωση DNA με δείγματα αίματος και ανάλυση πολυμορφισμών LCT-13910 > T και LCT-22018G > A. Έχει περιορισμούς λόγω παρουσίας προδιαθεσικού πολυμορφισμού (C/C ή G/G) το οποίο δεν υποδηλώνει απαραίτητα δυσανεξία ούτε προβλέπει πότε θα αναπτυχθεί. Επίσης, δεν επιτρέπει την ανίχνευση οποιασδήποτε δευτερογενούς δυσανεξίας και είναι σημαντικό να γίνει διάκριση πρωτοπαθούς από την δευτεροπαθή υπολακτασία προκειμένου να γίνει κατάλληλη θεραπεία. Το γενετικό τεστ θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί αφού διαπιστωθεί η παρουσία δυσανεξίας στην λακτόζη με άλλη μέθοδο για τον αποκλεισμό ή την επιβεβαίωση μιας πρωτοπαθούς μορφής. (Catanzaro, Roberto et al, 2021) Επιπλέον, είναι χρήσιμο συνήθως μόνο σε ευρωπαϊκούς πληθυσμούς καθώς το αλληλόμορφο T-13910 σχετίζεται κατά μέσο όρο με το 90% με την επιμονή της λακτάσης σε ευρωπαϊκούς πληθυσμούς. Βέβαια, σε μελλοντικές δοκιμές θα καλύπτουν μια σειρά γενετικών πολυμορφισμών εξαλείφοντας αυτόν τον περιορισμό. (Deng, Yangyong, 2015).

- **Τεστ ανοχής στη λακτόζη**

Το τεστ ανοχής στη λακτόζη προϋποθέτει από τους ασθενείς να καταναλώσουν 50g λακτόζη και έπειτα να μετρηθούν τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα πριν την λήψη της λακτόζης, και μετά σε 30, 60 και 120 λεπτά. (Di Renzio, T. Et al, 2013) Η πέψη της λακτόζης προκαλεί αύξηση της γλυκαιμίας και η απουσία αυτής της αύξησης υποδηλώνει ότι δεν έχει απορροφηθεί η λακτόζη. Αυτή η δοκιμή πραγματοποιείται σπάνια λόγω χαμηλής ευαισθησίας και ειδικότητας. Τα ψευδώς θετικά και ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα των τεστ εμφανίζονται στο 20% των φυσιολογικών ατόμων. Αυτά τα αλλοιωμένα αποτελέσματα αποδίδονται στον χρόνο γαστρικής εκκένωσης, ο οποίος ποικίλλει από ασθενή σε ασθενή, και στον μεταβολισμό της γλυκόζης, ο οποίος είναι επίσης υποκειμενικός. (Catanzaro, Roberto et al, 2021) Η δοκιμή της λακτόζης μπορεί να χρησιμοποιηθεί παράλληλα με το τεστ αναπνοής. Ωστόσο, η δοκιμή ανοχής στην λακτόζη έχει δείξει εγκυρότητα σε σχέση με το τεστ αναπνοής. Μεταξύ των πλεονεκτημάτων του, υπάρχει και η δυνατότητα διάγνωσης δυσανεξίας στη λακτόζη ακόμη και σε άτομα που έχουν βακτηριακή χλωρίδα που δεν παράγει υδρογόνο και τα οποία, ως εκ τούτου, είναι αρνητικά για τεστ αναπνοής. Βέβαια, ένας σημαντικός περιορισμός αντιπροσωπεύεται από τον σακχαρώδη διαβήτη. Σε διαβητικούς α-

σθeneίς μπορεί να υπάρξει αύξηση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα μετά την κατάποση λακτόζης, ακόμη και με την παρουσία δυσανεξίας. (Catanzaro, Roberto et al, 2021)

Προϊόντα χωρίς λακτόζη

Ο αποκλεισμός τροφίμων με λακτόζη από την διατροφή έχει ως επακόλουθο τον αποκλεισμό της κύριας πηγής υδατανθράκων των γαλακτοκομικών προϊόντων, που είναι η λακτόζη. Κρίνεται λοιπόν αναγκαία η αντικατάσταση με άλλα προϊόντα και η εύρεση εναλλακτικών πηγών λακτόζης. Κατά συνέπεια, μπορεί να γίνει χρήση γαλακτοκομικών προϊόντων επεξεργασμένων με λακτάση ή χορήγηση συμπληρώματος λακτάσης που χρησιμεύει ως υποκατάστατο των τροφίμων που περιέχουν λακτόζη. Τα προβιοτικά αποτελούν την μεγαλύτερη κατηγορία λειτουργικών τροφίμων. Μεταξύ των μη γαλακτοκομικών προϊόντων τα επικρατέστερα είναι τα παρασκευάσματα με σόγια εξαιτίας των πλεονεκτημάτων που προσφέρει γενικότερα στην υγεία των καταναλωτών. Άλλα προϊόντα που χρησιμοποιούνται είναι το κεφίρ, το τυρί και το γιαούρτι.

Τα προβιοτικά είναι ζωντανοί μικροοργανισμοί που όταν προσλαμβάνονται παράγουν ευεργετικά αποτελέσματα στην πρόληψη ή την θεραπεία ασθενειών. Τα προβιοτικά περιέχουν β-γαλακτοσιδάση και η κατανάλωση προβιοτικών μπορεί να είναι βοηθητική σε διάφορες ανθρώπινες ασθένειες, όπως η δυσανεξία στην λακτόζη. Εκείνα που είναι ευρέως γνωστά στην βιομηχανία των τροφίμων είναι οι λακτοβάκιλλοι που περιέχονται στο γιαούρτι. Η μείωση της δυσφορίας της πάθησης με τη χρήση προβιοτικών είναι ευρέως διαδεδομένη. Ο αυξημένος αριθμός βακτηρίων στο γιαούρτι έχει βελτιώσει την πέψη της λακτόζης. Έχουν γίνει έρευνες ότι η κατανάλωση ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων είναι ανεκτή από άτομα που πάσχουν από δυσανεξία λακτόζης ενώ, τα μη ζυμώμενα γαλακτοκομικά προϊόντα προκάλεσαν συμπτώματα δυσανεξίας. Η λακτόζη που προσλαμβάνεται μέσω του γιαουρτιού προκαλεί χαμηλές ποσότητες απέκκρισης υδρογόνου συγκριτικά με την πρόσληψη της ίδιας ποσότητας λακτόζης σε νερό ή γάλα. Έχει παρατηρηθεί καλύτερη πέψη της λακτόζης μετά την κατάποση γιαουρτιού που περιέχει ζωντανά βακτήρια από ό,τι μετά την κατάποση γιαουρτιού που έχει θερμανθεί. Παρατηρήθηκε χαμηλότερο επίπεδο υδρογόνου στην αναπνοή καθώς και αμετάβλητη δραστηριότητα β-γαλακτοσιδάσης σε άτομα που καταναλώνουν γιαούρτι που περιέχει ζωντανά βακτήρια σε σύγκριση με εκείνα που καταναλώνουν παστεριωμένο γιαούρτι. Τα υψηλότερα επίπεδα ενζυμικής δραστηριότητας στα κόπρανα υποδεικνύουν σημαντικές ποσότητες λακτόζης στο παχύ έντερο έ-

πειτα από την κατάποση θερμαινόμενου γιαουρτιού. Η επίδραση του γιαουρτιού παραμένει η ίδια ανεξάρτητα από το στέλεχος των βακτηρίων. Τα βακτήρια του γιαουρτιού που περιέχουν υψηλά επίπεδα λακτάσης απελευθερώνονται ταχέως όταν τα βακτήρια λύνονται από τα χολικά άλατα στον γαστρεντερικό σωλήνα. Ο *L.acidophilus* είναι πιθανόν να βρίσκεται σε ενεργή μορφή ωστόσο, η αντίσταση στα χολικά άλατα τον καθιστά λιγότερο αποτελεσματικό από τα άλλα βακτήρια γιαουρτιού.

Η αγορά προσφέρει ποικιλία διαθέσιμων παρασκευασμάτων ζύμης ή μυκήτων που αποτελούν εναλλακτικές λύσεις της λακτάσης. Η δυσανεξία της λακτόζης μπορεί να αντιμετωπιστεί με την ένταξη της β-γαλακτοσιδάσης στην διατροφή. Ορισμένες μελέτες ανέδειξαν ότι, η κατανάλωση β-γαλακτοσιδάσης περιορίζει τα συμπτώματα της δυσανεξίας ταυτόχρονα, βελτιώνει την πέψη χωρίς ωστόσο να είναι αποτελεσματικό για όλους τους ανθρώπους. Οι προαναφερθείσες κατηγορίες παρασκευασμάτων είναι παρόμοιες με το γιαούρτι που περιέχει λακτόζη και το προυδρολυμένο γάλα ενώ, διαφοροποιούνται στην συσκευασία καθώς, είναι μικρότερη.

Το ποσοστό της λακτόζης σε ζωικό και ανθρώπινο γάλα είναι υψηλό επομένως, ο αποκλεισμός της λακτόζης από την διατροφή πιθανότατα να οδηγήσει σε αντίθετα αποτελέσματα από τα επιθυμητά καθώς, η έλλειψη στον συγκεκριμένο υδατάνθρακα οδηγεί σε έλλειψη ασβεστίου. Το ασβέστιο διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο για τα οστά και γενικότερα για την υγεία. Ως εκ τούτου, επηρεάζεται η διαμόρφωση και η ποιότητα τους.



Εικόνα 9: Προϊόντα αποφυγής για πάσχοντες από δυσανεξία στη λακτόζη

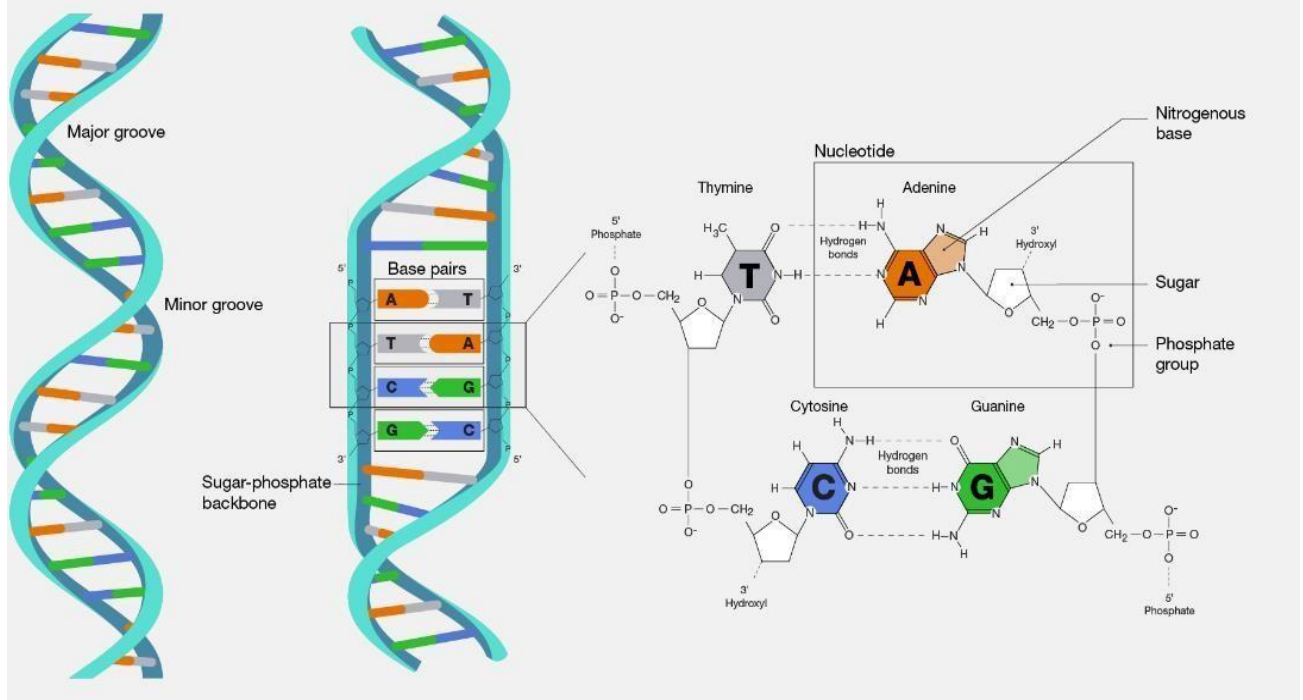
3. Πειραματικό μέρος

Απομόνωση DNA

Γενικές πληροφορίες για το DNA

Το DNA είναι ένα εξαιρετικά σταθερό μόριο, ωστόσο τα ένζυμα που καταλύουν τη διάσπαση των νουκλεϊκών οξέων βρίσκονται σε όλα τα κύτταρα. Σε άθικτα κύτταρα το DNA βρίσκεται στον πυρήνα και έτσι προστατεύεται από τη δράση των νουκλεασών οι οποίες είναι άφθονες στα λυσοσώματα που βρίσκονται στην περιοχή του κυτταροπλάσματος. Συνεπώς, προκειμένου να απομονωθεί το γονιδιωματικό DNA από το ανθρώπινο αίμα, το κύτταρο σπάει πρώτα με το άνοιγμα της μεμβράνης του κυττάρου και έπειτα της μεμβράνης του πυρήνα. Ωστόσο, όταν τα κύτταρα λύνονται, οι μεμβράνες των κυτταρικών θαλάμων διατάσσονται, επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο στις νουκλεάσες (DNAases) να έρθουν σε επαφή με το DNA που απελευθερώνεται από τον πυρήνα, υποβιβάζοντάς τον με αυτόν τον τρόπο. Ως εκ τούτου, είναι αναγκαία η εύρεση τρόπων προστασίας του DNA του κυττάρου από τα ένζυμα DNAases. Έτσι, κατά το πρώτο στάδιο της εξαγωγής DNA, χρησιμοποιούνται ρυθμιστικά διαλύματα που περιέχουν αναστολείς της δραστηριότητας της DNA νουκλεάσης. Τέλος, το DNA διαχωρίζεται από τα υπόλοιπα συστατικά όπως τα λιπίδια, οι πρωτεΐνες, οι υδατάνθρακες, τα λιπαρά οξέα, τα αμινοξέα, το RNA αλλά και διάφορα κυτταρικά μόρια. Η καθαρότητα του DNA είναι απαραίτητη καθώς, ελαφροί επιμολυντές είναι σε θέση να αναστείλουν περαιτέρω πειραματικές διαδικασίες όπως, η πέψη με ένζυμα περιορισμού, η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, η ανάλυση RFLP και αφήνοντας επίσης το DNA ακατάλληλο για ποσοτικοποίηση. (Madhad, V. J., & Sentheil, K. P. (2014))

Deoxyribonucleic acid (DNA)



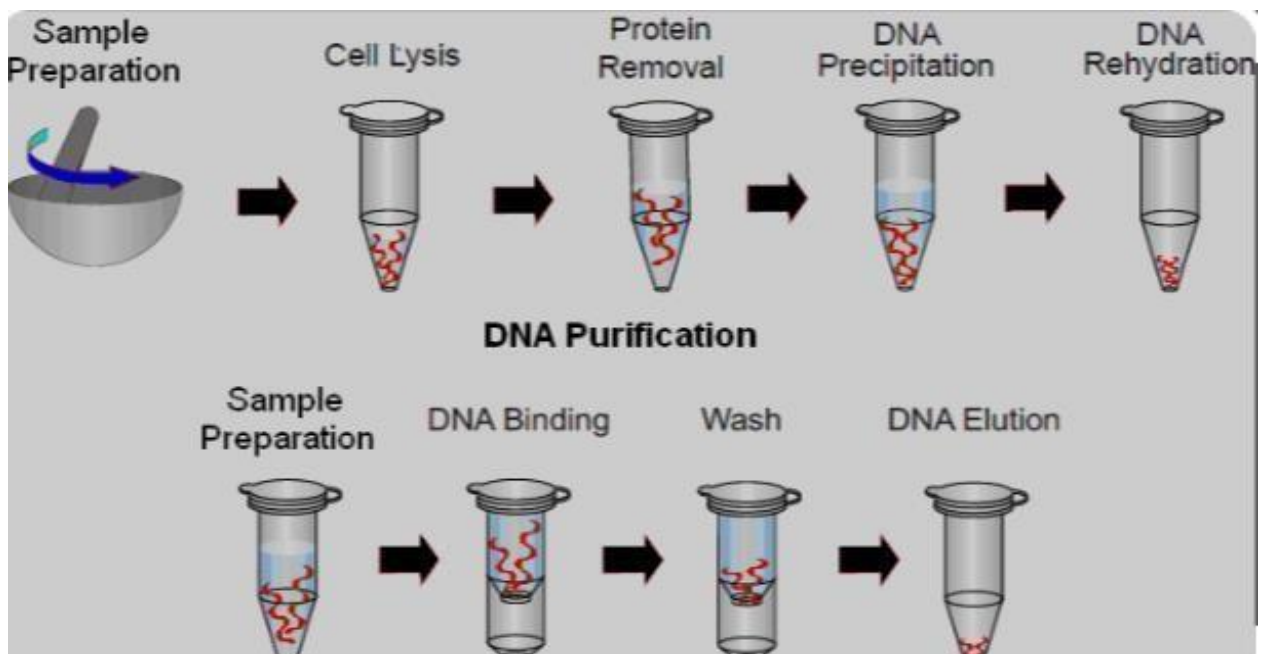
Εικόνα 10: Δομή διπλής έλικας DNA

Το πρωτόκολλο φυγοκέντρησης με βάση την πυκνότητα ήταν το πρώτο πρωτόκολλο που περιγράφηκε για την απομόνωση του DNA από βακτήρια *E.coli*. Οι Lahiri και Nirenberger το 1991 ανέπτυξαν ένα πρωτόκολλο εκχύλισης DNA με πρωτεΐνωση K. Επιπλέον, τροποποίησαν το πρωτόκολλο χρησιμοποιώντας και SDS ως επιφανειοδραστική ουσία. Η μέθοδος φαινόλης – χλωροφορμίου ισοαμυλικής αλκοόλης είναι ακόμη μια μέθοδος η οποία χρησιμοποιείται συχνά και αναπτύχθηκε από τους Joseph Sambrook και David W. Russell. Ακόμη μια γνωστή μέθοδος για την απομόνωση DNA είναι η PCL (Phenol, Chloroform, Isoamyl alcohol). (Χαρβάλου, Χούχουλα, 2020)

Οι μέθοδοι εξαγωγής του DNA ακολουθούν ορισμένες κοινές διαδικασίες που στοχεύουν στην επίτευξη αποτελεσματικής διάσπασης των κυττάρων, τη μετουσίωση συμπλεγμάτων νουκλεοπρωτεϊνών καθώς και άλλων ενζύμων, την αφαίρεση βιολογικών και χημικών ρύπων και τέλος την κατακρήμιση του DNA. Στις περισσότερες περιπτώσεις τα βασικά βήματα είναι παρόμοια και περιλαμβάνουν τη χρήση οργανικών και μη οργανικών αντιδραστηρίων καθώς και μεθόδων φυγοκέντρησης. Σήμερα, οι μέθοδοι εξαγωγής DNA έχουν εξελιχθεί σε μια ποικιλία αυτοματοποιημένων διαδικασιών. (Chacon-Cortes, D., & Griffiths, L. R. (2014))

Για να αναπτυχθεί ένα γρήγορο, αποδοτικό και οικονομικό πρωτόκολλο εξαγωγής γονιδιωματικού DNA για διαφορετικά υλικά είναι πολύ σημαντική η μοριακή βιολογία, καθώς επίσης η ποιότητα αλλά και η ποσότητα του προτύπου DNA που επηρεάζουν το αποτέλεσμα και την επιτυχία των πειραματικών διαδικασιών όπως, της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Η ανάπτυξη ενός απλού χρονικά και οικονομικά αποδοτικού πρωτόκολλου για την εξαγωγή διαφορετικών DNA δεν είναι μόνο απαραίτητη για τις μοριακές μελέτες αλλά είναι ευρέως επιθυμητή όταν πρόκειται να υποστεί επεξεργασία μεγάλου αριθμού δειγμάτων. (Wang, T. Y., Wang, et al, (2011))

Γενικές πληροφορίες για απομόνωση DNA



Εικόνα 11: Διαδικασία απομόνωσης DNA

Το DNA απομονώθηκε για πρώτη φορά από τον Ελβετό γιατρό Friedrich Miescher, το 1869. Η απομόνωση αποτέλεσε μέσω έρευνας με σκοπό τον προσδιορισμό της χημικής σύνθεσης των κυττάρων που θεωρούσε ως το μέσο για την αρχή της χαρτογράφησης της ζωής των κυττάρων. Η έρευνα αρχικά ξεκίνησε με τη χρήση λεμφοκυττάρων που προέρχονταν από λεμφαδένες, ωστόσο η ποσότητα του δείγματος που λήφθηκε δεν ήταν ικανοποιητική συνεπώς, λήφθηκε δείγμα από λευκά αιμοσφαίρια από πύον που βρέθηκε σε χειρουργικούς επιδέσμους. Η προσθήκη οξέος οδήγησε σε καθίζηση μιας ουσίας η οποία ονομάστηκε νουκλεΐνη, εξαιτίας της παρουσία της στους πυρήνες του κυττάρου και διαλύθηκε με την προσθήκη αλκαλικής ουσίας. (Χαρβάλου, Χούχουλα, 2020)

Η εκχύλιση βιομορίων DNA, RNA καθώς και πρωτεϊνών αποτελεί την πιο κρίσιμη μέθοδο που χρησιμοποιείται στη μοριακή βιολογία. Αποτελεί το σημείο εκκίνησης για τις μετέπειτα διεργασίες και την ανάπτυξη προϊόντων, συμπεριλαμβανομένων των διαγνωστικών κιτ. Το DNA, το RNA και οι πρωτεΐνες μπορούν να απομονωθούν από οποιοδήποτε βιολογικό υλικό, με χαρακτηριστικό παράδειγμα τους ζωντανούς οργανισμούς, τους διατηρημένους ιστούς, τα κύτταρα, τα σωματίδια ιών καθώς επίσης και άλλα δείγματα για αναλυτικούς ή και προπαρασκευαστικούς σκοπούς. Οι δύο κατηγορίες που αφορούν τον καθορισμό του DNA περιλαμβάνουν την απομόνωση ανασυνδυασμένων δομών DNA, όπως πλασμιδίων ή βακτηριοφάγων αλλά και την απομόνωση χρωμοσωμικού ή γονιδιωματικού DNA από ευκαριωτικούς και προκαρυωτικούς οργανισμούς αντίστοιχα. Σε γενικά πλαίσια, για να θεωρηθεί επιτυχής ο καθαρισμός των νουκλεϊκών οξέων απαιτούνται τέσσερα βήματα τα οποία είναι καθοριστικά. Σύμφωνα με τα βήματα αυτά, αρχικά το μόριο υπόκειται σε αποτελεσματική διάσπαση των κυττάρων ή του ιστού και στη συνέχεια επιτυγχάνεται η διαδικασία της μετουσίωσης των νουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων, γεγονός που οδηγεί σε αδρανοποίηση των νουκλεασών. Με την αδρανοποίηση του ενζύμου DNAασης συμβαίνει η διαδικασία εκχύλισης του DNA, υπό συνθήκες που εμποδίζουν τις επιμολύνσεις. Το νουκλεϊκό οξύ που αποτελεί στόχος πρέπει να είναι απαλλαγμένο από οποιαδήποτε πρόσμιξη συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών, των υδατανθράκων, των λιπιδίων ή άλλων νουκλεϊκών οξέων (DNA απαλλαγμένο από RNA και αντιστρόφως). Η ποιότητα καθώς επίσης και η ακεραιότητα του απομονωμένου νουκλεϊκού οξέος θα αλλοιώσει σε αρκετό βαθμό τα αποτελέσματα των επιστημονικών ερευνών. (Tan, S. C., & Yip, B. C. (2009))

Συνεπώς, η ροή διεργασίας που ακολουθείται για την απομόνωση DNA περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

- Προετοιμασία
- Διαχωρισμό
- Καθαρισμό
- Απομόνωση

Προετοιμασία

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η απομόνωση επιτυγχάνεται με την απελευθέρωση του DNA σε μορφή διαλύματος μέσω διάρρηξης αλλά και λύσης της κυτταρικής μεμβράνης, τη μετουσίωση των πρωτεϊνών, την απενεργοποίηση νουκλεασών αλλά και τον συγχρονισμό των διαφορετικών ιδιοτήτων που κατέχουν τα διαλύματα, με σκοπό την επίτευξη των βέλτιστων συνθηκών για την διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας.

Οι μέθοδοι σύνθλιψης του DNA χωρίζονται σε :

- Φυσικές

- Χημικές

- Ενζυμικές

Φυσικές :

Οι φυσικές μέθοδοι συνήθως περιλαμβάνουν την διάρρηξη των κυτταρικών τοιχωμάτων ή του σκληρού ιστού. Μια χαρακτηριστική μέθοδος είναι η κατάψυξη σε υγρό άζωτο με κονιοποίηση του γενετικού υλικού. Έπειτα γίνεται λύση της κυτταρικής μεμβράνης με χημικές ή ενζυμικές μεθόδους. Οι φυσικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται συχνά σε ζωϊκούς ή φυτικούς ιστούς. Συχνά, η διάρρηξη των κυτταρικών τοιχωμάτων γίνεται με την βοήθεια μεταλλικών σφαιριδίων ή υπέρηχων.

Χημικές :

Οι χημικές ουσίες περιλαμβάνουν επιφανειοδραστικές ουσίες (π.χ SDS) καθώς και χαιοτροπικά διαλύματα (άλατα γουανιδίνης, αλκαλικά διαλύματα). Το SDS βοηθάει στη μετουσίωση των πρωτεϊνών. Η πρωτεϊνάση K υδρολύει πρωτεΐνες που συνδέονται με κυτταρικές μεμβράνες που προκαλούν λύση. Άλλες χημικές μέθοδοι περιλαμβάνουν άλατα όπως για παράδειγμα η θειοκυανιούχα γουανίνη που προκαλεί οσμωτικό σοκ στα κύτταρα.

Ενζυμικές :

Γίνεται συνδυασμός των ενζυμικών μεθόδων με άλλες μεθόδους. Τα ένζυμα ζυμολάση, K πρωτεϊνάση, κολλαγενάση, λιτικάση, επιλέγονται με βάση την αρχική μέθοδο.

Διαχωρισμός

Ο διαχωρισμός του DNA από τα υπόλοιπα συστατικά γίνεται με φυγοκέντρηση. Τα προϊόντα κυτταρικής λύσης δεν είναι απαραίτητο να φυγοκεντρηθούν σε κάθε περίπτωση ώστε να αφαιρεθούν τα κυτταρικά υπολείμματα πριν από τον καθαρισμό νου-

κλεικίου οξέος, αυτό εξαρτάται από το αρχικό προϊόν. Η κατακρήμνιση του DNA συμβαίνει με απόλυτη αιθανόλη καθώς, απομακρύνει τα υδρόφιλα συστατικά που χαρακτηρίζονται ως χαμηλού μοριακού βάρους. Έπειτα, μπορεί να γίνει διαχωρισμός και μέσω δέσμευσης του DNA με σύνδεση σε κυτταρίνη και ανταλλαγή ιόντων.

Οι μέθοδοι δέσμευσης του DNA χωρίζονται σε :

- Δέσμευση με διοξείδιο του πυριτίου

- Ανταλλαγής ιόντων

Δέσμευση με διοξείδιο του πυριτίου

Η σύνδεση του DNA με διοξείδιο του πυριτίου γίνεται σε συνδυασμό με υψηλές συνθήκες άλατος καθώς και την παρουσία χαοτροπικού άλατος. Οι υψηλές ποσότητες σε χαοτροπικά άλατα μπορούν να απενεργοποιήσουν τις νουκλεάσες και να επιτρέψουν στο νουκλεϊκό οξύ να συνδεθεί με τη σίλικα.

Ανταλλαγής Ιόντων

Η δέσμευση του DNA με τη συγκεκριμένη μέθοδο, βασίζεται στην αλληλεπίδραση θετικά φορτισμένων σωματιδίων και αρνητικά φορτισμένων φωσφορικών που περιέχονται στο DNA. Το DNA δεσμεύεται υπό συνθήκες χαμηλού άλατος ενώ, οι πρωτεΐνες και το RNA, υφίστανται έκπλυση με διαλύματα υψηλότερης συγκέντρωσης άλατος.

Έκπλυση

Τα ρυθμιστικά διαλύματα έκπλυσης περιέχουν αλκοόλες και χρησιμοποιούνται για την απομάκρυνση πρωτεϊνών, αλάτων και άλλων συστατικών από το δείγμα. (Χαρβάλου, Χούχουλα, 2020)

Πηγές λήψης δειγμάτων DNA

Το DNA για διαγνωστικούς σκοπούς μπορεί να ληφθεί από ποικίλα βιολογικά υλικά. Το φλεβικό αίμα ως παραδοσιακή πηγή γονιδιωματικού DNA χρησιμοποιείται συχνά για τον σκοπό αυτό. (Durdiakonά, J., Kamodyonά, N., et el (2012)). Όλες οι γενετικές εξετάσεις ξεκινούν με την συλλογή κυττάρων και την εξαγωγή DNA όπως είναι ήδη γνωστό. Το αίμα αποτελεί την πιο προσβάσιμη πηγή DNA στο κλινικό και στο ερευνητικό περιβάλλον. Ωστόσο, η διεξαγωγή μιας αιμοληψίας αποτρέπει στις περισσότερες περιπτώσεις την συμμετοχή των ανθρώπων εξαιτίας της επεμβατικής δειγματοληψίας αίματος που συνοδεύεται από τον σχετικό πόνο σε συνδυασμό με την δυσφο-

ρία. Υπάρχουν επίσης ανησυχίες σχετικά με το κόστος μεταφοράς και αποθήκευσης του αίματος καθώς, τα δείγματα απαιτούν την κατάλληλη θερμοκρασία και πιο συγκεκριμένα ψύξη ενώ, ταυτόχρονα πρέπει να υποβληθούν άμεσα σε επεξεργασία ώστε να αποφευχθεί η αλλοίωση των αποτελεσμάτων. Συνεπώς, η ανάγκη για εύρεση συγκρίσιμης πηγής γενετικού υλικού που θα ήταν πιο οικονομική, σταθερή και θα ωφελούσε το κλινικό ερευνητικό περιβάλλον έφερε στο φως την μέθοδο λήψης DNA από δείγμα σάλιου. (Looi, M. L., Zakaria, et al (2012))

Το πεδίο της σιελολογικής διάγνωσης και το DNA του σάλιου έχει διερευνηθεί για τις δυνατότητες που προσφέρει ως διαγνωστικό υλικό. Ένα μεγάλο μέρος από βιολογικά δραστικές ουσίες, όπως ένζυμα, ορμόνες, ανοσοσφαιρίνες και ξένα αντιβιοτικά έχουν ποσοτικοποιηθεί με μεγάλη επιτυχία. (Solomon, S. M., Matei, M. N., et al 2015). Το σάλιο περιέχει σε ποσοστό 98% νερό καθώς και πολλά άλλα σημαντικά θρεπτικά συστατικά συμπεριλαμβανομένων ηλεκτρολυτών, βλέννας, αντιβακτηριακών ενώσεων αλλά και πλήθος ενζύμων. Το DNA στο σάλιο προέρχεται από κύτταρα που απορρέουν από το εσωτερικό μέρος του στόματος και από τα λευκά αιμοσφαίρια. (Looi, M. L., Zakaria, et al (2012)). Η μέθοδος λήψης DNA από δείγμα σάλιου έχει έρθει να αντικαταστήσει την παραδοσιακή μέθοδο. Αυτό συμβαίνει γιατί η μέθοδος λήψης DNA μέσω του σάλιου αποτελεί απλή, εύκολη, ανώδυνη, γρήγορη και μη επεμβατική χωρίς την ενόχληση που σχετίζεται με την διαδικασία λήψης αίματος. Διατίθεται ακόμη και για παιδιά, ηλικιωμένους αλλά και για άτομα με αναπηρία ενώ, μπορεί να επαναληφθεί εύκολα σύμφωνα με τις πειραματικές απαιτήσεις. Η στοματική κοιλότητα παρέχει πολλές πιθανές πηγές για απομόνωση DNA. Το DNA που απομονώθηκε από το σάλιο αποτελεί συνδυασμό μείγματος ανθρώπινου γονιδιωματικού, μιτοχονδριακού DNA αλλά και DNA από την μικροχλωρίδα του στόματος. (Durdiaková, J., Kamodyoná, N., et al(2012)). Ο μέσος αριθμός επιθηλιακών κυττάρων ανά 1mL σάλιου είναι $4,3 \times 10^5$ ενώ, ο αριθμός των εμπύρηνων κυττάρων σε 1mL πλήρους αίματος είναι περίπου $4,5-11 \times 10^5$. Ο κύκλος εργασιών των στοματικών επιθηλιακών κυττάρων είναι αρκετά δυναμικός καθώς, το επιφανειακό τους στρώμα αντικαθίσταται κάθε 2,7 ώρες κατά μέσο όρο, υποδηλώνοντας με αυτόν τον τρόπο ότι υπάρχει υψηλή πιθανότητα να απομονωθεί άθικτο γονιδιωματικό DNA από το σάλιο οποιαδήποτε στιγμή. Η περιεκτικότητα του σάλιου είναι περίπου $1,7 \times 10^7$ ανά mL σάλιου. (Solomon, S. M., Matei, M. N., et al 2015). Το μικροβιακό DNA μειώνει την ποιότητα και τη χρησιμότητα του DNA του σάλιου ως πρότυπο για τον προσδιορισμό του γονότυπου του ανθρώπινου DNA. Υπάρχει πλήθος πρωτοκόλλων και προσεγγίσεις που

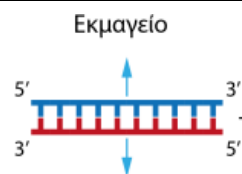
είναι διαθέσιμα για την επεξεργασία των δειγμάτων και την επακόλουθη εξαγωγή του DNA. (Durdiaková, J., Kamodyová, N., et al (2012)).

Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction PCR)

Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction PCR) ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά από τον Mullis κοντά στο 1990, το οποίο μεταμόρφωσε ριζικά την επιστήμη της βιολογίας. Οι στρατηγικές που βασίζονται στην PCR έχουν προωθήσει τεράστιες προσπάθειες όπως το έργο του ανθρώπινου γονιδιώματος. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται από γιατρούς και ερευνητές για την διεξαγωγή ασθενειών, κλωνοποίηση, αλληλουχία γονιδίων και την διεξαγωγή εξελιγμένων ποσοτικών και γονιδιωματικών μελετών με ταχύ και πολύ ευαίσθητο τρόπο. (Garibyan, Lilit, and Nidhi Avashia., 2013) Η PCR ανήκει σε μια γενικότερη κατηγορία μεθόδων πολλαπλασιασμού του DNA-στόχου. Είναι μια απλή και ταχεία μέθοδος βασισμένη στο πρότυπο αντιγραφής DNA, που επιτρέπει την δημιουργία απεριόριστων αντιγραφών γενετικού υλικού από ένα μόνο κύτταρο. Με την μέθοδο PCR γίνεται σύνθεση in vitro μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας βάσεων του DNA, σε τέτοια ποσότητα ώστε να μπορεί να ανιχνευθεί και να ταυτοποιηθεί εύκολα. Το τελικό προϊόν της αντίδρασης είναι πιστό αντίγραφο του DNA που αποτελεί το στόχο. (Χαρβάλου, Χούχουλα, 2020) Τα συστατικά που απαιτούνται περιλαμβάνουν το πρότυπο DNA, τους εκκινητές, τα νουκλεοτίδια (dNTPs), τη θερμοσταθερή DNA πολυμεράση, το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης και Mg^{2+} (Artika, I. Made, et al. , 2022). Η PCR χρησιμοποιεί ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές για κατευθύνει τον θερμικό πολλαπλασιασμό της αλληλουχίας – στόχου μέσω επανειλημμένων γύρων αποδιάταξης υβριδισμού με εκκινητές και επιμήκυνσης (Χαρβάλου, Χούχουλα, 2020). Λόγω της ευρείας χρήσης της, είναι σημαντικό να κατανοήσουμε τις βασικές αρχές της PCR και πώς μπορεί να τροποποιηθεί ώστε να παρέχει περίπλοκη ανάλυση των γονιδίων και του γονιδιώματος (Garibyan, Lilit, and Nidhi Avashia., 2013).

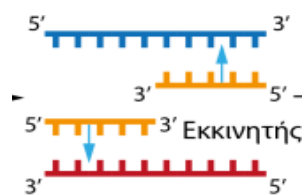
Ένας κύκλος PCR χωρίζεται σε τρία στάδια:

1. Διαχωρισμός των αλυσίδων: Οι δύο αλυσίδες του γονικού μορίου DNA διαχωρίζονται με θέρμανση του διαλύματος στους 95°C για 15 δευτερόλεπτα. (J.M. Berg, J.L. Tymoczko, G.J. Gatto, L. Stryer.,2021)

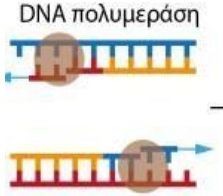
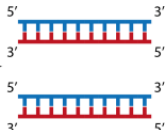


1. Αποδιάταξη

2. Υβριδοποίηση των εκκινητών: Το διάλυμα ψύχεται στους 54°C προκειμένου κάθε εκκινητής να υβριδοποιηθεί με μια από τις αλυσίδες του DNA. Ο ένας εκκινητής υβριδοποιείται στο άκρο 3' της μίας αλυσίδας του στόχου και ο άλλος στο άκρο 3' της συμπληρωματικής αλυσίδας του στόχου. Προσθέτοντας εκκινητές σε περίσσεια αποφεύγεται η υβριδοποίηση του γονικού DNA με τον εαυτό του. Οι εκκινητές συνήθως έχουν μήκος από 20 έως 30 νουκλεοτίδια. (J.M. Berg, J.L. Tymoczko, G.J. Gatto, L. Stryer.,2021)



2. Υβριδισμός των εκκινητών

<p>3. Σύνθεση του DNA: Στην συνέχεια, το διάλυμα θερμαίνεται στους 72°C, στη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης των θερμοανθεκτικών πολυμερασών. Ένα τέτοιο ένζυμο είναι η <i>Taq DNA πολυμεράση</i>**, η οποία προέρχεται από το <i>Thermus Aquaticus</i>, ένα θερμοφίλο βακτήριο που ζει σε θερμές πηγές. Η πολυμεράση επιμηκώνει και τους δύο εκκινητές προς την κατεύθυνση της αλληλουχίας - στόχου, διότι η κατεύθυνση της σύνθεσης του DNA είναι από το 5' άκρο προς το άκρο 3'. Η σύνθεση του DNA πραγματοποιείται και στις δύο αλυσίδες αλλά προεκτείνεται και πέρα από την αλληλουχία - στόχο σε αυτόν τον πρώτο κύκλο. (J.M. Berg, J.L. Tymoczko, G.J. Gatto, L. Stryer.,2021)</p>	 <p>DNA πολυμεράση</p> <p>3. Επιμήκυνση</p>
<p>Ο πρώτος κύκλος ολοκληρώνεται: Έχουν σχηματιστεί δύο μόρια DNA</p>	 <p>Τέλος του 1ου κύκλου</p>

(ΕΙΚΟΝΕΣ: Παπανικολάου, 2015)

** Χρειάστηκε η ανακάλυψη ενός βακτηρίου που ζει σε θερμές πηγές και παράγει μια σπάνια μορφή της πολυμεράσης του DNA ανθεκτική στην θερμότητα, η οποία μπορεί να αντέξει στις υψηλές θερμοκρασίες που εφαρμόζονται στην αρχή του κάθε κύκλου καθώς αν γινόταν χρήση μιας συνηθισμένης – όχι θερμοσταθερής - πολυμεράσης του DNA τότε με κάθε θέρμανση στο πρώτο βήμα του κύκλου δεν θα αποδιατασσόταν μόνο το DNA αλλά και το μόριο του ενζύμου μετά από κάθε κύκλο, θα έπρεπε να αντικαθιστούμε την πολυμεράση του DNA. (Campbell, Reece, 2010)

Στον 2^ο κύκλο παράγονται 4 μόρια DNA, και στον 3^ο κύκλο παράγονται 8 μόρια, κατά τον οποίον δύο μόρια είναι πανομοιότυπα με την αλληλουχία – στόχο ως προς το μήκος της. (Campbell, Reece, 2010) Τα στάδια επαναλαμβάνονται 25 – 50 φορές και πραγματοποιείται η διαδικασία στον θερμικό κυκλοποιητή τον Thermal Cycler. (Παπανικολάου, Γ., 2015)

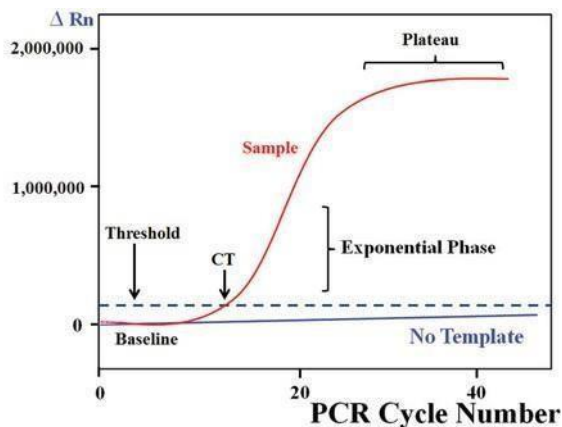
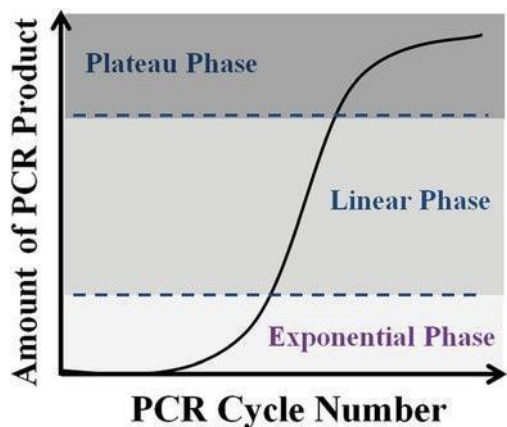
Αξίζει να σημειωθεί πως υπάρχουν αρκετά είδη PCR, όπως Multiplex PCR, Nested PCR, Ligation mediated PCR, RT-PCR, Ασύμμετρη PCR, LAMP, και qRT-PCR η οποία θα αναλυθεί παρακάτω (Χαρβάλου, Χούγουλα, 2020):

Ποσοτική Real Time PCR

Η qRT-PCR χρησιμοποιείται για να μετρήσει με ακρίβεια την συγκέντρωση μιας DNA αλληλουχίας στόχου σε ένα δείγμα, όπως μιας γενετικά τροποποιημένης αλληλουχίας, στην περίπτωση αυτή της δυσανεξίας της λακτόζης σ' έναν άνθρωπο που την έχει. Η PCR γίνεται παρουσία μιας ένωσης που φθορίζει (συνήθως SYBR Green) μόνο όταν δεσμεύεται σε δίκλωνο DNA και επομένως όσο περισσότερο συντίθεται η συγκεκριμένη αλληλουχία - στόχος DNA στο δείγμα, τόσο αυξάνεται ο φθορισμός. Ο φθορισμός που εκπέμπεται αυξάνεται ανάλογα με την συγκέντρωση του νεοσυντιθέμενου DNA και καταγράφεται στον υπολογιστή. Σχεδιάζεται μια πρότυπη καμπύλη της ποσότητας φθορισμού σε συνάρτηση με τους κύκλους PCR με δείγματα γνωστής αρχικής συγκέντρωσης DNA και ορίζεται ένα όριο φωσφορισμού. Γίνεται μέτρηση του αριθμού των κύκλων PCR που χρειάζεται ένα δείγμα ώστε να περάσει το όριο φθορισμού και ορίζεται ως C_i . Συγκρίνοντας την πρότυπη καμπύλη γνωστών συγκεντρώσεων DNA προκύπτει η ποσότητα της συγκεκριμένης αλληλουχίας στόχου του υπό εξέταση δείγματος. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται εντός 20' έως και 2 ωρών. (Μπατρίνου Α, 2011).

Η καμπύλη ενίσχυσης διακρίνεται σε τρεις φάσεις:

- 1. Εκθετική Φάση (Exponential Phase):** Σε κάθε κύκλο γίνεται διπλασιασμός του προϊόντος, καθώς όλα τα απαραίτητα συστατικά για την PCR βρίσκονται σε περίσσεια (100% απόδοση).
- 2. Γραμμική Φάση (Linear Phase):** Τα αντιδραστήρια εξαντλούνται, η αντίδραση ενίσχυσης πραγματοποιείται με βραδύτερο ρυθμό και μειώνεται η απόδοση.
- 3. Φάση Κορεσμού (Plateau Phase):** Η αντίδραση ολοκληρώνεται. (Χαρβάλου, Χούγουλα, 2020)



(https://www.researchgate.net/figure/Amplification-curve-in-real-time-PCR_fig3_312350842)

Πειραματική διαδικασία απομόνωσης DNA

Υλικά

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτέλεση της πειραματικής διαδικασίας δίνονται παρακάτω:

- Δείγμα σάλιου, δείγμα αίματος
- Στηλαιοί
- Dulbecco's Phosphate Buffered saline
- Proteinase K
- Εμπορικό kit απομόνωσης γενωματικού DNA, Sample Tube, RCBioscience
- Πιπέτες 500μL, 20μL
- Αυτοματοποιημένο σύστημα απομόνωσης DNA, MagCore Pluss II
- Φθοροόμετρο, Quantus FLUOROMETER

Περιγραφή προϊόντων

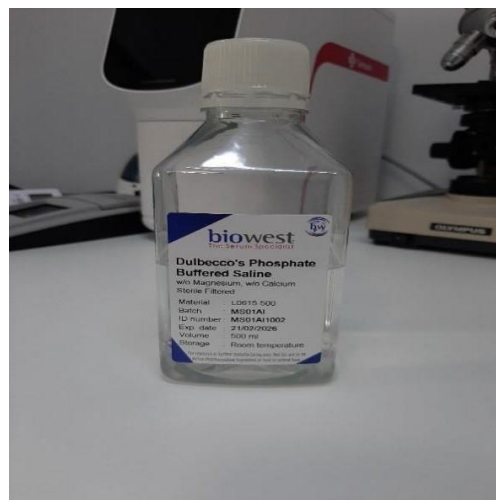
Dulbecco's Phosphate Buffered saline :

Η χρήση ενός ισορροπημένου διαλύματος άλατος (BSS) στην ιστοκαλλιέργεια αποδίδεται γενικά στους πρώτους εργαζομένους στον συγκεκριμένο τομέα. Το 1885, ο

Sydney Ringer ανέπτυξε ένα διάλυμα ανόργανων αλάτων για να διατηρεί τη συσταλτικότητα του καρδιακού ιστού των θηλαστικών. Ένα λιγότερο ειδικό διάλυμα αλατιού σχεδιάστηκε από τον Tyrode για την γενικότερη επεξεργασία θηλαστικών κυττάρων. Το διάλυμα άλατος του Tyrode έγινε αποδεκτό ως το υγρό που χρησιμοποιείται για την αραίωση πρωτεϊνικών συστατικών μέσων που είναι φυσικής προέλευσης. Έκτοτε, πολλά άλλα ισορροπημένα διαλύματα αλάτων έχουν αναπτυχθεί για χρήση σε καλλιέργεια ιστών.

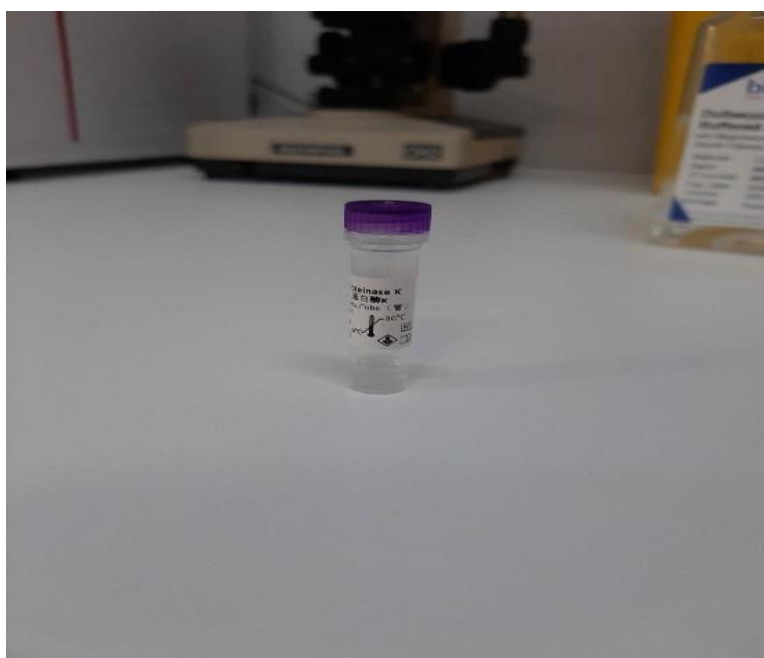
Ο τρέχων ρόλος ενός ισορροπημένου διαλύματος άλατος στην κυτταροκαλλιέργεια είναι πολύπλευρος και μπορεί να χωριστεί σε τέσσερις κύριες λειτουργίες :

- Χρησιμεύει ως αρδευτικό, μεταφορικό και αραιωτικό υγρό ενώ, διατηρεί την ενδοκυτταρική και εξωκυτταρική ωσμωτική ισορροπία.
- Παρέχει στα κύτταρα νερό και ορισμένα χύδη ανόργανα ιόντα, που είναι απαραίτητα για τον φυσιολογικό μεταβολισμό των κυττάρων.
- Σε συνδυασμό με υδατάνθρακες, όπως για παράδειγμα η γλυκόζη, παρέχει την κύρια πηγή ενέργειας για τον μεταβολισμό των κυττάρων.
- Παρέχει ένα ρυθμιστικό σύστημα για την διατήρηση της τιμής του pH εντός του φυσιολογικού εύρους. (Dulbecco, R., and Vogt, M., (1954)



Proteinase K :

Η πρωτεϊνάση K, είναι μια πρωτεάση ευρέος φάσματος, διαδραματίζει καταλυτικό και είναι υπεύθυνη για την πέψη όλων των πρωτεϊνών στο κυτταρικό προϊόν. Αυτός είναι και ο κυριότερος λόγος για τον οποίο μια κατάλληλη συγκέντρωση αυτού του ενζύμου είναι απαραίτητη στο προϊόν λύσης. Η θερμοκρασία επώασης αποτελεί επίσης σημαντικό κομμάτι. Σύμφωνα με μελέτες έχει αποδειχθεί ότι, η θερμοκρασία επώασης στους 55°C φαίνεται να επηρεάζει αρνητικά τις δραστηριότητες της πρωτεϊνάσης K καθώς, είναι πολύ πιθανό να προκληθεί μόλυνση του δείγματος DNA από πρωτεΐνες. Στους 50°C η πρωτεϊνάση K, που είναι από το ίδιο απόθεμα αφομοιώνει αποτελεσματικότερα όλες τις πρωτεΐνες. Ο χρόνος αποθήκευσης και οι πολυάριθμες επαναλήψεις κατάψυξης αλλά και απόψυξης του αποθέματος πρωτεϊνάσης K επηρεά-



ζουν επίσης την αποτελεσματικότητα του ενζύμου. (Qamar, W., Khan, et el M. R., (2017))

Πιπέτες :

Οι πιπέτες χρησιμοποιούνται για την ακριβή μέτρηση και μεταφορά μικρών όγκων υγρών, επιτρέποντάς τους να αναρροφηθούν στο ένα άκρο. Είναι κατάλληλες επίσης και για την αποβολή υγρών. (By Lisa A. Seidman, Cynthia J. Moore, 2000)

Όργανα

1. Φυγόκεντρος



Εικόνα 12: Φυγόκεντρος

ΜΟΝΤΕΛΟ	Mini Centrifuge
ΕΤΑΙΡΙΑ	Neya 16
ΧΩΡΑ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ	India

Η φυγοκέντρωση αποτελεί μέθοδο διαχωρισμού μειγμάτων, η οποία αξιοποιεί τη φυγόκεντρο δύναμη στην κυκλική κίνηση. Για να διατηρηθεί ένα σωματίδιο σε κυκλική κίνηση με σταθερή ακτίνα και ταχύτητα, η δύναμη που απαιτείται εξαρτάται από την μάζα του. Επομένως, ο διαχωρισμός των σωματιδίων επιτυγχάνεται με βάση διαφορές στο μέγεθος, στο σχήμα και στην πυκνότητά τους. Η φυγοκέντρωση χρησιμοποιείται για να διαχωρίσει και να απομονώσει σωματίδια και μακρομόρια, όπως κύτταρα, υποκυτταρικά οργανίδια, πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα. (Φούντος, Γ., & Κουνάδη, Ε. (2023)).

2. Φθορισμόμετρο



Εικόνα 13: Φθορισμόμετρο

ΜΟΝΤΕΛΟ	Fluoremeter
ΕΤΑΙΡΙΑ	Promega Quantus™
ΧΩΡΑ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ	USA

Το φθορισμόμετρο Quantus™ είναι ένα συμπαγές φθορισμόμετρο δύο καναλιών και παρέχει ευαίσθητη ανίχνευση φθορισμού κατά τον ποσοτικό προσδιορισμό των νουκλεϊκών οξέων. Το φθορισμόμετρο χρησιμοποιεί φθορίζουσες χρωστικές για τον ποσοτικό προσδιορισμό των νουκλεϊκών οξέων (dsDNA, RNA αλλά και πρωτεϊνών). Η φθορισμομετρία χρησιμοποιείται σήμερα πολύ συχνά για τον ποσοτικό προσδιορισμό των νουκλεϊκών οξέων στο εργαστήριο. Αποτελεί μια πολύ ευαίσθητη μέθοδος καθώς μπορούν να υπολογιστούν συγκεντρώσεις δειγμάτων DNA μέχρι και 10pg/μL και RNA μέχρι 250pg/μL. Στα νεότερα φθορισμόμετρα χρησιμοποιούν φθορίζουσες χρωστικές που προσδέονται εκλεκτικά στο μόριο που πρόκειται να ποσοτικοποιηθεί και φθορίζουν μόνο όταν είναι προσδεμένες σε αυτό. Αξίζει να σημειωθεί πως οι

φθορίζουσες χρωστικές δεν δεσμεύονται στο αποδιαταγμένο DNA ή RNA. Το πλεονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι ότι δεν απαιτείται τυφλό δείγμα για το μηδενισμό του συστήματος, και χρησιμοποιείται μικρή αρχική ποσότητα δείγματος (1-10μL). Το μειονέκτημα βέβαια, είναι ότι δεν παρέχονται πληροφορίες για τυχόν προσμίξεις από άλλες ουσίες π.χ. πρωτεΐνες ή φαινόλη αλλά και το αυξημένο κόστος (διαλύματα και φθορίζουσες χρωστικές. (Παπανικολάου, Γ., & Παλαιολόγου, Δ. (2015))

3. Automated Nucleic Acid Extractor



Εικόνα 14: DNA extractor

ΜΟΝΤΕΛΟ	Magcore plus ii
ΕΤΑΙΡΙΑ	RBC Bioscience
ΧΩΡΑ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ	Taiwann

Το MagCore® Plus II είναι ένας ρομποτικός πάγκος εργασίας για γρήγορη και υψηλής απόδοσης απομόνωση νουκλεϊκού οξέος από σχεδόν όλους τους τύπους μοριακών διαγνωστικών, βιολογικών, κλινικών και ιατροδικαστικών δειγμάτων. Δίνει την δυνατότητα να απομονωθούν 1-16 δείγματα ταυτόχρονα. Παρέχει πλήρη ιχνηλασιμότητα κιτ και δειγμάτων, μέσω παρακολούθησης από κινητό σε πραγματικό χρόνο και μιας πλήρους αναφοράς που μπορεί να ληφθεί σε υπολογιστή στο τέλος κάθε εκτέλεσης.

4. Thermo-shaker



Εικόνα 15: Thermo - Shaker

ΜΟΝΤΕΛΟ	TS-100
ΕΤΑΙΡΙΑ	Biosan
ΧΩΡΑ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ	Latvia

Το Thermo-Shaker TS-100 παρέχει εντατική ανάμειξη και έλεγχο θερμοκρασίας δειγμάτων σε σωλήνες μικροδοκιμών ή πλάκα PCR. Οι λειτουργίες θέρμανσης (έως +100°C) και ανάμειξης μπορούν να εκτελεστούν ταυτόχρονα και ανεξάρτητα. Το TS-100 χρησιμοποιείται για την προετοιμασία δειγμάτων ανάλυσης DNA, για την εκχύλιση πρωτεϊνών, πολυσακχαριτών, λιπιδίων και άλλων κυτταρικών συστατικών. Το όργανο εφαρμόζεται σε:

- Γενετική ανάλυση — στην εκχύλιση DNA, RNA και περαιτέρω προετοιμασία δειγμάτων.
- Βιοχημική μελέτη ενζυματικών αντιδράσεων και διεργασιών.
- Εκχύλιση μεταβολιτών από κυτταρικό υλικό.
- Λειτουργία βαθμονόμησης θερμοκρασίας

Μεθοδολογία για την απομόνωση DNA

Βήμα 1 : Λήψη δείγματος

Για την απομόνωση DNA λήφθηκε δείγμα σαλίου με στηλαιό και σε ορισμένες περιπτώσεις δείγμα αίματος. Είναι αναγκαίο το δείγμα να περιέχει επαρκή αριθμόν επιθηλιακών κυττάρων ώστε, η πειραματική διαδικασία να εκτελεστεί ορθά. Συνεπώς, λαμβάνεται υλικό από το βλεννογόνο των παρειών της στοματικής κοιλότητας με χρονική διάρκεια τουλάχιστον 2min.

Βήμα 2 : Λύση των κυττάρων

Σε εμπορικό kit απομόνωσης DNA προστίθεται με μικροπιπέτα των 500μl Dulbecco's Phosphate Buffered saline, έπειτα τοποθετείται ο στηλαιός με το δείγμα και τέλος με μικροπιπέτα των 20μl προστίθεται πρωτεΐνάση K. Γίνεται ανάμιξη του στηλαιού με τα υπόλοιπα συστατικά καθώς, στα τοιχώματα των kit μπορεί να βρίσκονται επιπλέον κάποια προσκολλημένα κύτταρα. Τα δείγματα αφήνονται σε ηρεμία υπό θερμοκρασία δωματίου για περίπου 10min και στη συνέχεια τοποθετούνται σε Thermoshaker (θερμαντική πλάκα) όπου και επωάζονται για 15min στους 55°C.

Βήμα 3 : Απομόνωση DNA και ποσοτικοποίηση των δειγμάτων

Τα δείγματα τοποθετούνται σε αυτοματοποιημένο σύστημα απομόνωσης DNA με την διαδικασία να διαρκεί περίπου 55min. Τέλος, γίνεται μέτρηση της ποσότητας DNA (calibrate), με συσκευή φθορομέτρου όπου και καταγράφηκαν οι μετρήσεις των δειγμάτων σε ng/ul.

Όργανο που χρησιμοποιήθηκε κατά την PCR



Εικόνα 16: Real Time PCR Cycler

ΜΟΝΤΕΛΟ	Sa Cycler 96
ΕΤΑΙΡΙΑ	Sacace Biotechnologies
ΧΩΡΑ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ	Italy

Είναι ένα όργανο ενίσχυσης και ανάλυσης τήξης σε πραγματικό χρόνο κατάλληλο τόσο για ερευνητικές μελέτες όσο και για διαγνωστικές εφαρμογές. Δύο θερμοηλεκτρικά στοιχεία Peltier εξασφαλίζουν υψηλή ακρίβεια ρύθμισης της θερμοκρασίας και αθόρυβη λειτουργία. Ο σχεδιασμός και το έργο του θερμικού μπλοκ επιτρέπει τη φόρτωση και εκφόρτωση των δειγμάτων δοκιμής με έναν πλήρως αυτοματοποιημένο τρόπο, ελεγχόμενο από λογισμικό.

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ - gb Genetic Lacto (generi biotech)

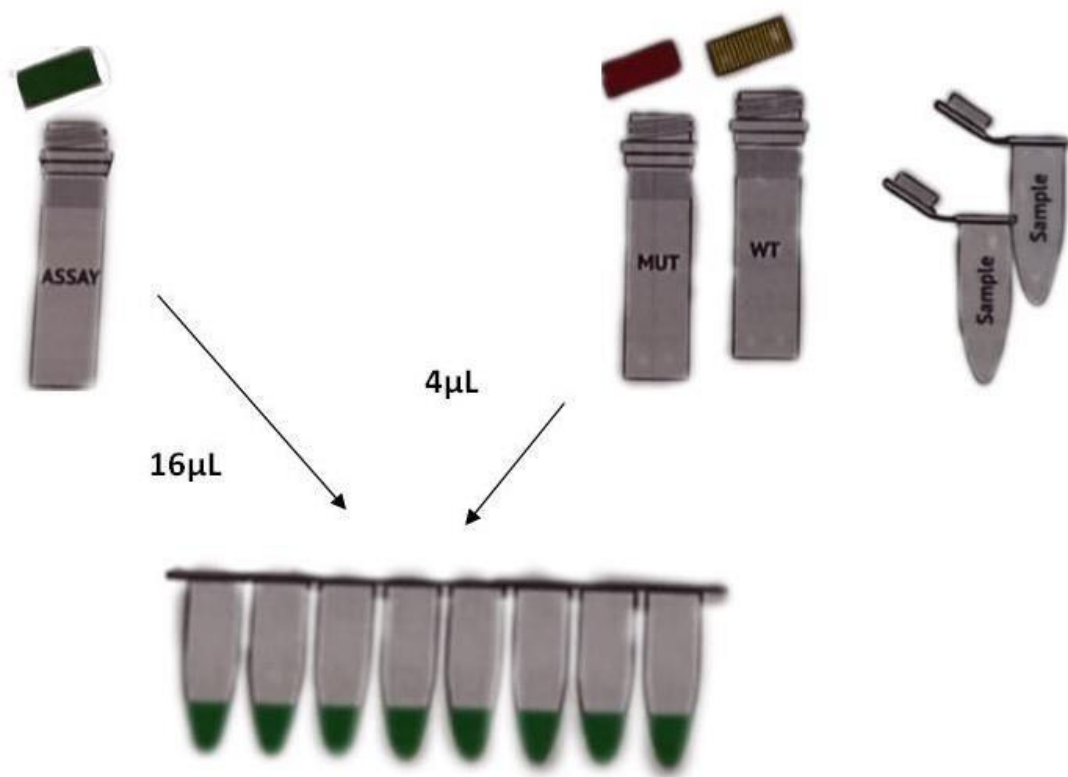
Το Gb Genetic Lacto kit επιτρέπει τον προσδιορισμό του γονότυπου DNA για τους πολυμορφισμούς στην κωδικοποίηση του γονιδίου LCT (βλ. παρακάτω πίνακα). Το kit προορίζεται για in vitro διαγνώσεις. Είναι βασισμένο σε real-time PCR χρησιμοποιώντας ανιχνευτές σημασμένους με φθορισμό και συγκεκριμένα στην αρχή της αλληλόμορφης διάκρισης.

Αλληλόμορφο	ID SNP	WT παραλλαγή	MUT παραλλαγή
13910T	rs4988235	C	T
22018A	rs182549	G	A

- 1) Αφαιρείται ο αντίστοιχος αριθμός κλασμάτων αντιδραστηρίων από το κουτί και αφήνονται να ξεπαγώσουν εντελώς.
- 2) Ανακινούνται καλά τα αντιδραστήρια και περιστρέφονται για λίγο.
- 3) Διανέμεται ο προσδιορισμός ανίχνευσης με 16 μL σε μικροσωλήνες ή σε τοιχώματα πλακών
- 4) Προστίθεται 4 μl ενός προτύπου στον προσδιορισμό και περιστρέφεται για λίγο:
-Κάθε μεμονωμένη εκτέλεση απαιτεί ανάλυση των προτύπων WT και MUT. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η σωστή αξιολόγηση, συνιστάται ανάλυση HET Standard και Ανάλυση Απιονισμένου Νερού ως έλεγχος NTC.
-Το kit προορίζεται για την ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονιδιωματικό DNA. Η συνολική ποσότητα gDNA σε μια αντίδραση θα πρέπει να είναι μεταξύ 4-400 ng, που ισούται με τη συγκέντρωση δείγματος εισόδου 1-100 ng/μl.
- 5) Εκτελείται ανάλυση δείγματος αμέσως μετά την προετοιμασία του μείγματος αντίδρασης. Το μείγμα αντίδρασης μπορεί να αποθηκευτεί σε ψυγείο για 1 ώρα το μέγιστο, πριν εισαχθεί στον κυκλοποιητή.
- 6) Τίθεται ο κυκλοποιητής PCR στις ακόλουθες θερμοκρασίες:

Αρχική Μετουσίωση	95°C	3 min	
Μετουσίωση	95°C	10sec	50 κύκλοι
Ανόπτηση + Επιμήκυνση (+ Απόκτηση Φθορισμού)	60°C	20 sec	

Πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι κατά τη ρύθμιση της εφαρμογής. Ο συνολικός όγκος μιας αντίδρασης PCR είναι 20 μl,



Εικόνα 17: Αναπαράσταση της διαδικασίας του πρωτόκολλου

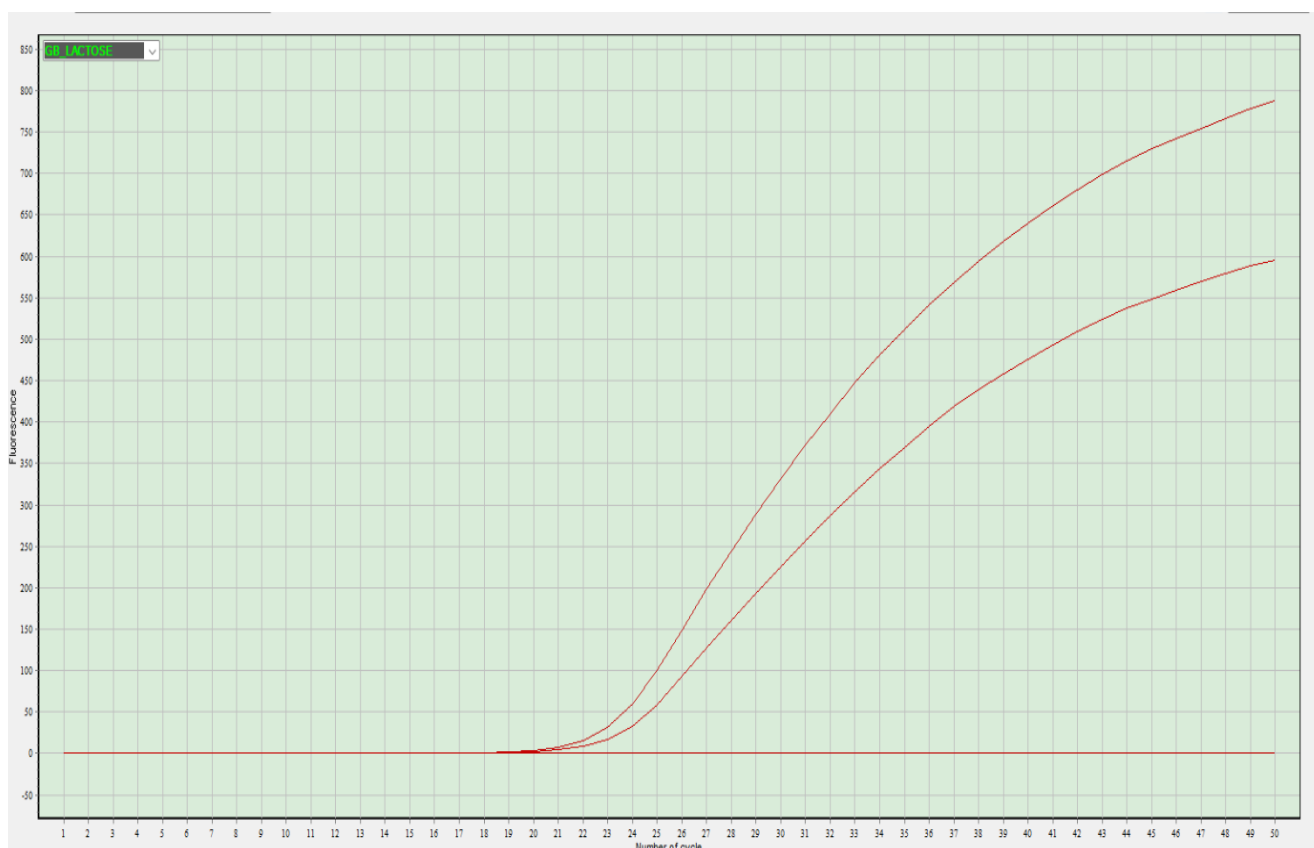
Αποτελέσματα

Το τελικό αποτέλεσμα, σύμφωνα με το πρωτόκολλο, της ανάλυσης είναι να προσδιοριστεί ένας γονότυπος άγριου τύπου (WT), μεταλλαγμένος (MUT), και ετεροζυγωτικός (HET) για τις μεταλλάξεις rs4988235 (LCT C13910T) και rs182549 (LCT G22018A).

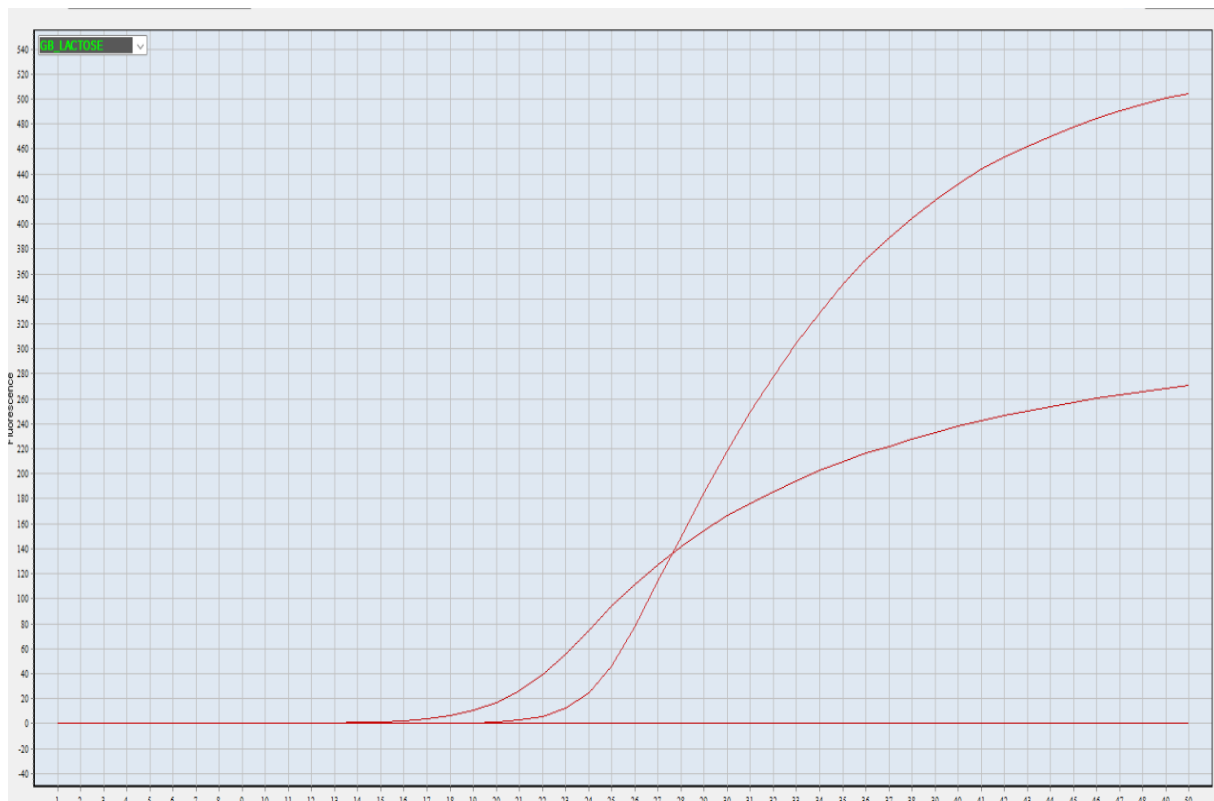
- Τυπικό σήμα WT εμφανίζεται στο FAM/SYBR
- Τυπικό σήμα MUT εμφανίζεται στο HEX/JOE/VIC
- Τυπικό σήμα HET σε FAM/SYBR και HEX/JOE/VIC

1.1. Πρότυπα Δείγματα

Αριθμός Δείγματος	ID δείγματος	FAM	HEX
1	216	20.0	
2	C+A/A		22.8
3	C+G/A	23.7	23.3



Εικόνα 18: Διάγραμμα HEX για τα πρότυπα δείγματα



Εικόνα 19: Διάγραμμα FAM για τα πρότυπα δείγματα

Παρατηρείται στο Δείγμα 1 το σήμα WT που εμφανίζεται στο FAM, πως το γονίδιο είναι «φυσιολογικό» και δεν υπάρχει ένδειξη δυσανεξίας της λακτόζης, ενώ στο δείγμα 2 εμφανίζεται σήμα MUT, δηλαδή στο HEX, το οποίο υποδεικνύει δυσανεξία, και ο ασθενής είναι ομοζυγώτης, σε αντίθεση με το δείγμα 3. Στο δείγμα 3, το σήμα HET που εμφανίζεται στο FAM και στο HEX δείχνει πως είναι ετεροζυγώτης ως προς το γονίδιο. Βάση τα πρότυπα δείγματα, θα συζητηθούν και θα αναλυθούν τα αποτελέσματα των δειγμάτων που λήφθηκαν από άτομα που εμφανίζουν το γονίδιο της δυσανεξίας της λακτόζης.

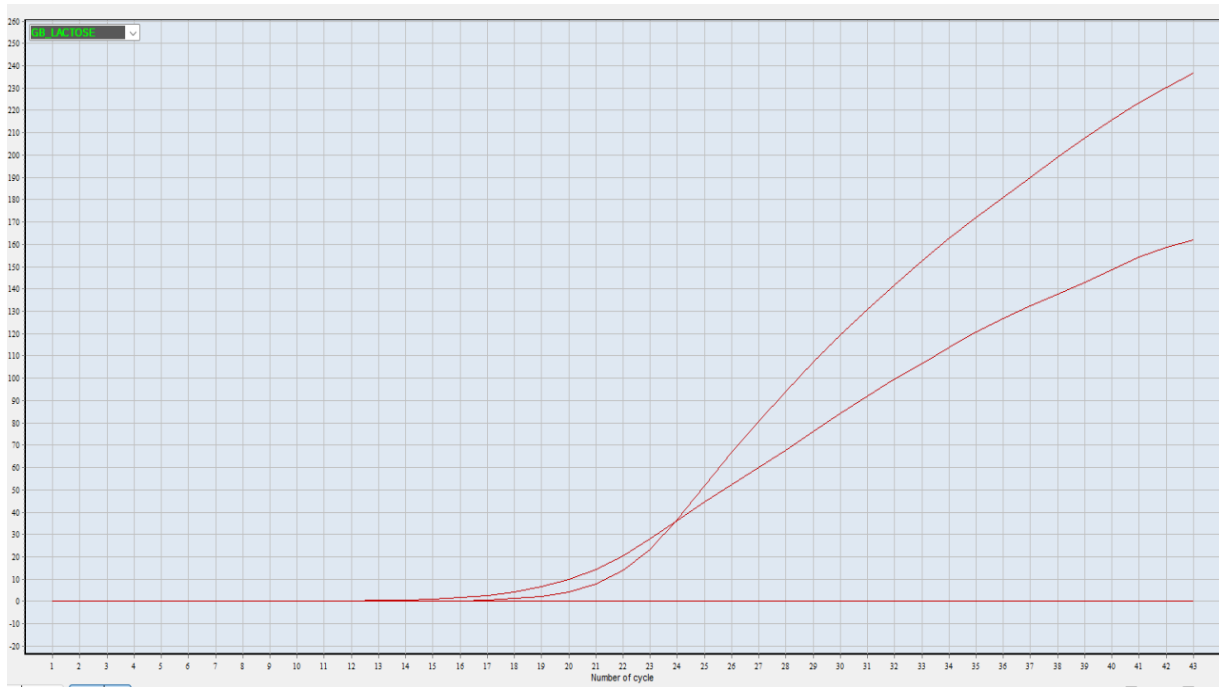
1.2. Δείγμα 4

Απαντήσεις στο ερωτηματολόγιο

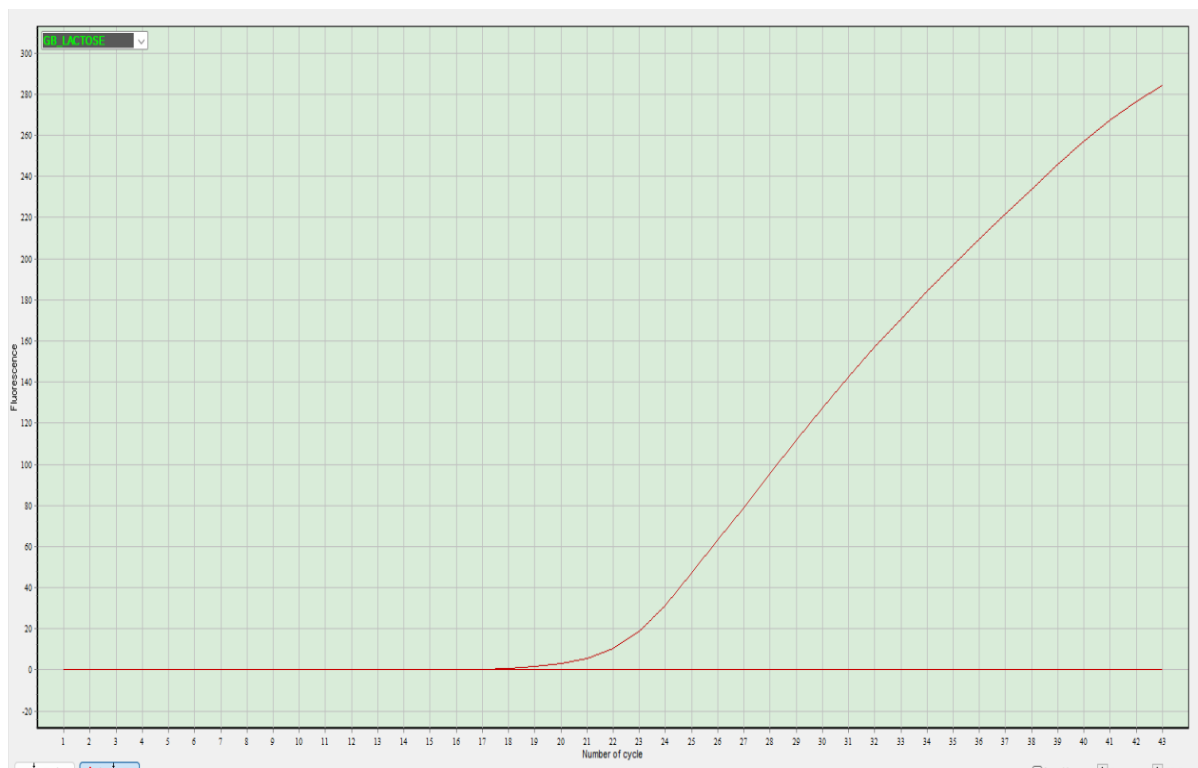
Φύλο	Γυναίκα
Ηλικία	22
Γωρινή Απασχόληση	Φοιτήτρια
Καταγωγή	Μολδαβία
Κατανάλωση Γαλακτομικών	Ναι
Αν ναι, πόσο συχνά;	Καθημερινά
Τι είδους;	Τυρί, γιαούρτι και άλλα είδη με βάση το

	γάλα
Έχει παρατηρηθεί κάποιο είδος ενόχλησης στην κατανάλωση τους;	Ναι
Αν ναι, σε ποια;	Γάλα
Τι συμπτώματα παρατήρησε;	Μετεωρισμός, άλγος, ναυτία, σπασμούς στην κοιλιακή χώρα
Έχει επίγνωση της δυσανεξίας της λακτόζης;	Ναι
Έχει διαγνωστεί;	Ναι
Υπάρχει κάποιος κληρονομικός παράγοντας;	Ναι
Πότε παρατήρησε ότι υπάρχει πιθανότητα δυσανεξίας;	Σε μικρή ηλικία.
Έχει προχωρήσει σε πιο εξειδικευμένη εξέταση;	Ναι.

Αριθμός Δείγματος	ID δείγματος	FAM	HEX
4	C+_C/T (GB_LACTOSE)	21.5	22.0
5	216 (GB_LACTOSE)	19.4	



Εικόνα 20: Διάγραμμα FAM για τα δείγματα 4 και 5



Εικόνα 21: Διάγραμμα HEX για τα δείγματα 4 και 5

Το άτομο (Δείγμα 4) με την δυσανεξία στην λακτόζη παρατηρείται πως είναι ετεροζυγώτης καθώς εμφανίζει σήμα MUT, το οποίο είναι εμφανισμένο και στο FAM και στο HEX. Πιο αναλυτικά, η καμπύλη μεταβάλλεται και συγκεκριμένα αυξάνεται και στο FAM και στο HEX, σε σύγκριση με το άτομο (Δείγμα 5) που διαθέτει το φυσιο-

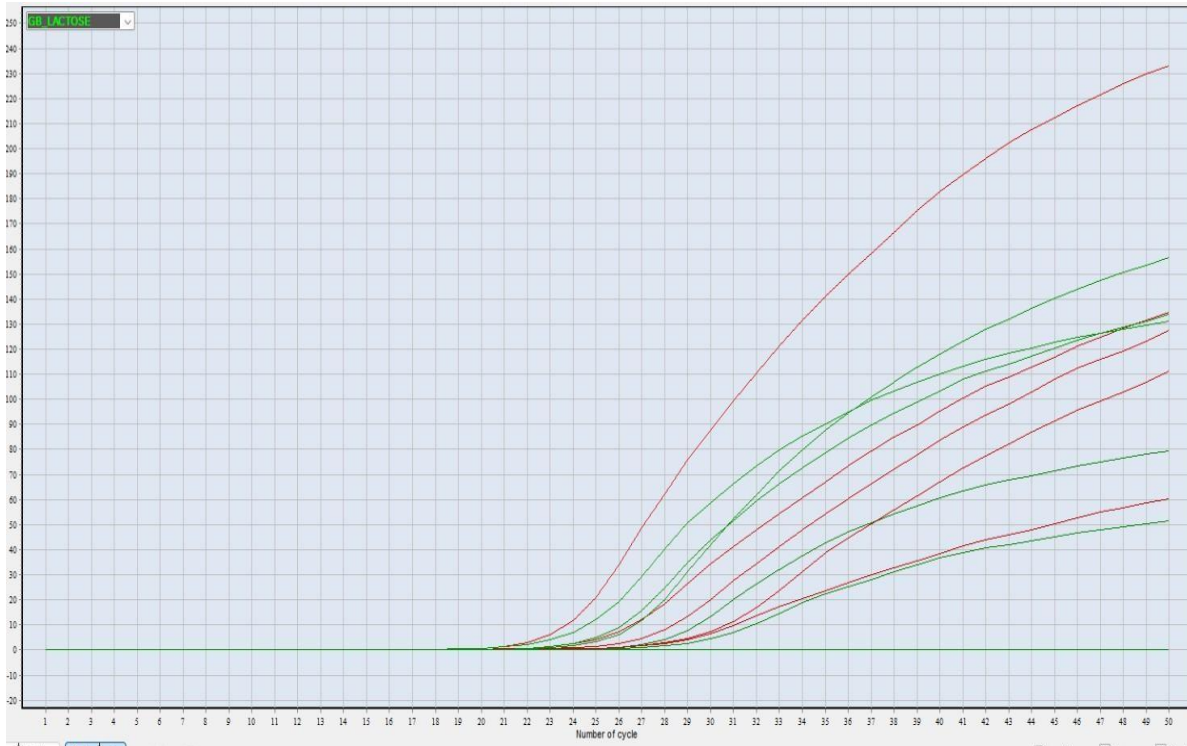
λογικό γονίδιο και η καμπύλη μεταβάλλεται μόνο στο FAM. Επομένως, το άτομο με το μεταλλαγμένο γονίδιο που είναι ετεροζυγωτικό ως προς την δυσανεξία στην λακτόζη, δείχνει πως το γονίδιο αυτό επικρατέστερο, και μόνο ένας από τους δύο γονείς ενδεχομένως του το έχει κληροδοτήσει.

1.3. Δείγμα 6 και 7

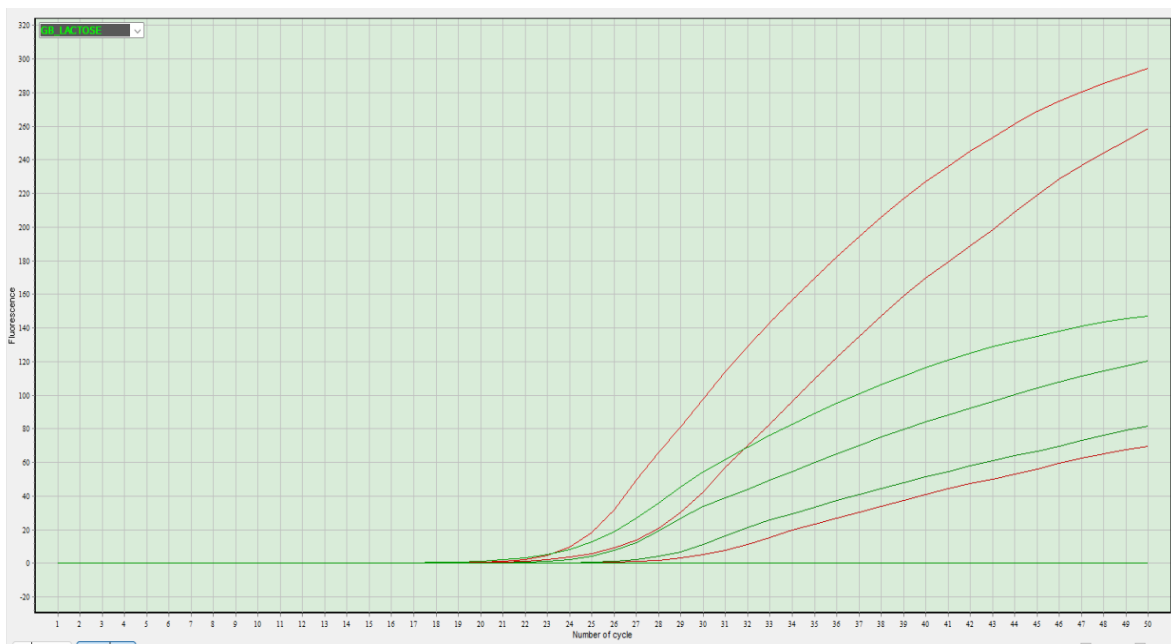
Απαντήσεις στο ερωτηματολόγιο

Φύλο	Γυναίκα	Άντρας
Ηλικία	50	60
Τωρινή Απασχόληση	Πλήρης	Πλήρης
Καταγωγή	Μολδαβία	Άλμυρος Βόλου, Ελλάδα
Κατανάλωση Γαλακτομικών	Ναι	Ναι
Αν ναι, πόσο συχνά;	Καθημερινά	Καθημερινά
Τι είδους;	Γάλα, Τυρί, γιαούρτι και άλλα είδη με βάση το γάλα	Τυρί
Έχει παρατηρηθεί κάποιο είδος ενόχλησης στην κατανάλωση τους;	Όχι	Ναι
Αν ναι, σε ποια;	Πουθενά	Γάλα, γιαούρτι και σε προϊόντα με βάση το γάλα
Τι συμπτώματα παρατήρησε;	-	Μετεωρισμός, κοιλιακό άλγος, ναυτία, σπασμούς
Έχει επίγνωση της δυσανεξίας της λακτόζης;	Ναι	Ναι
Έχει διαγνωστεί;	Ναι	Ναι
Υπάρχει κάποιος κληρονομικός παράγοντας;	Ναι	Δεν γνωρίζω
Πότε παρατήρησε ότι υπάρχει πιθανότητα δυσανεξίας;	Εμφανίστηκε σε τυχαία περίοδο της ζωής του	Εμφανίστηκε σε τυχαία περίοδο της ζωής του
Έχει προχωρήσει σε πιο εξειδικευμένη εξέταση;	Ναι	Ναι

Αριθμός Δείγματος	ID δείγματος	FAM	HEX
6	(GB_LACTOSE)	28.2	29.2
7	(GB_LACTOSE)		26.8



Εικόνα 22: Διάγραμμα FAM για τα δείγματα 6 και 7



Εικόνα 23: Διάγραμμα HEX για τα δείγματα 6 και 7

Σε αυτές τις περιπτώσεις παρατηρούνται δύο άτομα με το μεταλλαγμένο γονίδιο που εκφράζει την δυσανεξία στην λακτόζη, με την διαφορά ότι το ένα είναι ετεροζυγωτικό και το άλλο ομοζυγωτικό. Το άτομο (Δείγμα 6) είναι ετεροζυγώτης ως προς την έκφραση του γονιδίου καθώς δίνει σήμα MUT, το οποίο εμφανίζεται στο FAM και στο HEX, αφού η καμπύλη μεταβάλλεται και στα δύο διαγράμματα. Ενώ, το άτομο (Δείγμα 7), παρατηρείται ότι δίνει σήμα HET, το οποίο εμφανίζεται μόνο στο HEX, αποδεικνύει ότι το άτομο είναι ομοζυγώτης, ως προς το γονίδιο και το έχει κληρονομήσει και από τους δύο γονείς του. Το άλλο που αξίζει να σημειωθεί είναι ότι, το Δείγμα 6, το οποίο είναι ετεροζυγώτης δεν παρουσιάζει συμπτώματα ή παρουσιάζει πιο ήπια χωρίς γίνονται αντιληπτά από τον ίδιο συγκριτικά με το Δείγμα 7, ο οποίος έχει αποκλείσει από την διατροφή του όλα σχεδόν τα γαλακτοκομικά, αφού ύστερα από την κατανάλωση τους εμφανίζει συμπτώματα.

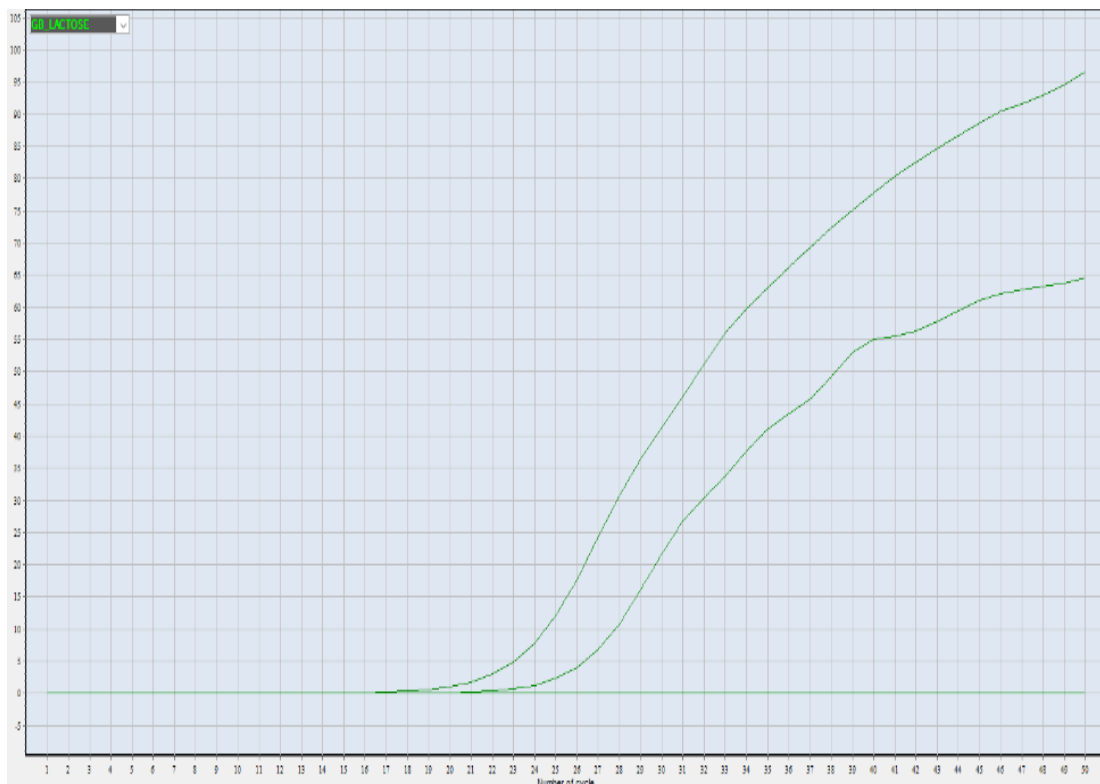
1.4. Δείγμα 8 και 9

Απαντήσεις στο ερωτηματολόγιο

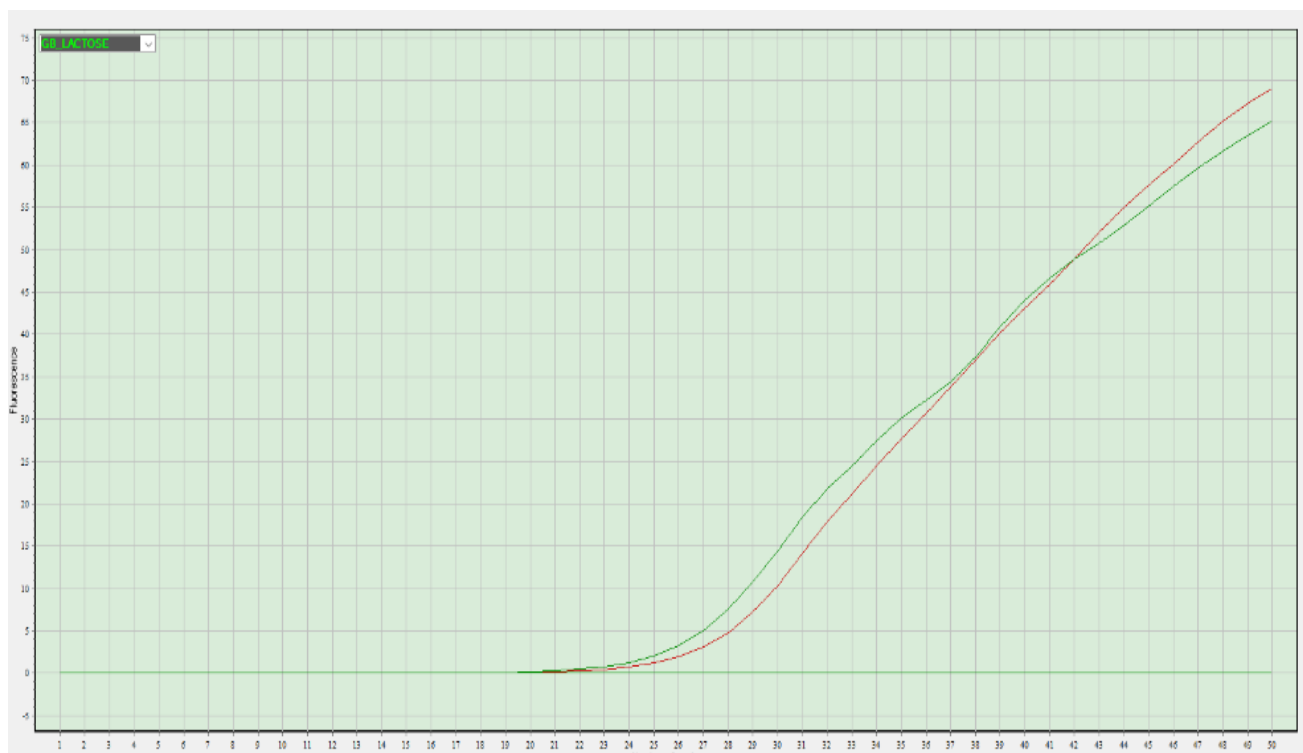
Φύλο	Γυναίκα	Άντρας
Ηλικία	30	40
Τωρινή Απασχόληση	Πλήρης	Πλήρης
Καταγωγή	Ελλάδα	Ελλάδα
Κατανάλωση Γαλακτομικών	Ναι	Ναι
Αν ναι, πόσο συχνά;	Συχνά (2-3 φορές την εβδομ)	Καθημερινά
Τι είδους;	Τυρί	Τυρί, γάλα γιαούρτι και άλλα είδη με βάση το γάλα
Έχει παρατηρηθεί κάποιο είδος ενόχλησης στην κατανάλωση τους;	Ναι	Ναι
Αν ναι, σε ποια;	Γάλα, γιαούρτι και σε προϊόντα με βάση το γάλα	Γάλα
Τι συμπτώματα παρατήρησε;	Μετεωρισμός, κοιλιακό άλγος, ναυτία, σπασμούς	Σπάνια κοιλιακό άλγος
Έχει επίγνωση της δυσανεξίας;	Ναι	Ναι

νεξίας της λακτόζης;		
Έχει διαγνωστεί;	Ναι	Όχι
Υπάρχει κάποιος κληρονομικός παράγοντας;	Ναι	Δεν γνωρίζω
Πότε παρατήρησε ότι υπάρχει πιθανότητα δυσανεξίας;	Εμφανίστηκε σε τυχαία περίοδο της ζωής του	Εμφανίστηκε σε τυχαία περίοδο της ζωής του
Έχει προχωρήσει σε πιο εξειδικευμένη εξέταση;	Ναι	Όχι

Αριθμός Δείγματος	ID δείγματος	FAM	HEX
8	4 (GB_LACTOSE)		27.1
9	9 (GB_LACTOSE)	26.0	26.0



Εικόνα 24: Διάγραμμα FAM για τα δείγματα 8 και 9



Εικόνα 25: Διάγραμμα HEX για δείγματα 8 και 9

Με βάση τα παραπάνω διαγράμματα, παρατηρείται ότι και τα δύο άτομα παρουσιάζουν δυσανεξία στην λακτόζη. Το δείγμα 8 χαρακτηρίζεται ως ομοζυγώτης καθώς, η ανάλυση δίνει σήμα ελέγχου MUT, το οποίο εμφανίζει μόνο την καμπύλη HEX, καθιστώντας με αυτόν τον τρόπο το άτομο ομοζυγωτικό. Αντίθετα, το δείγμα 9 χαρακτηρίζεται ως ετεροζυγωτικό, με την ανάλυση να δίνει σήμα ελέγχου HET, το οποίο εμφανίζει τις καμπύλες FAM και HEX, αποδεικνύοντας ότι το άτομο είναι ετεροζυγωτικό. Τα αποτελέσματα δικαιολογούν τα συμπτώματα που εμφανίζονται στους ασθενείς όπου είναι σπανιότερα στο ετεροζυγωτικό άτομο συγκριτικά με το ομοζυγωτικό που εμφανίζονται τακτικά και σε όλες τις μορφές.

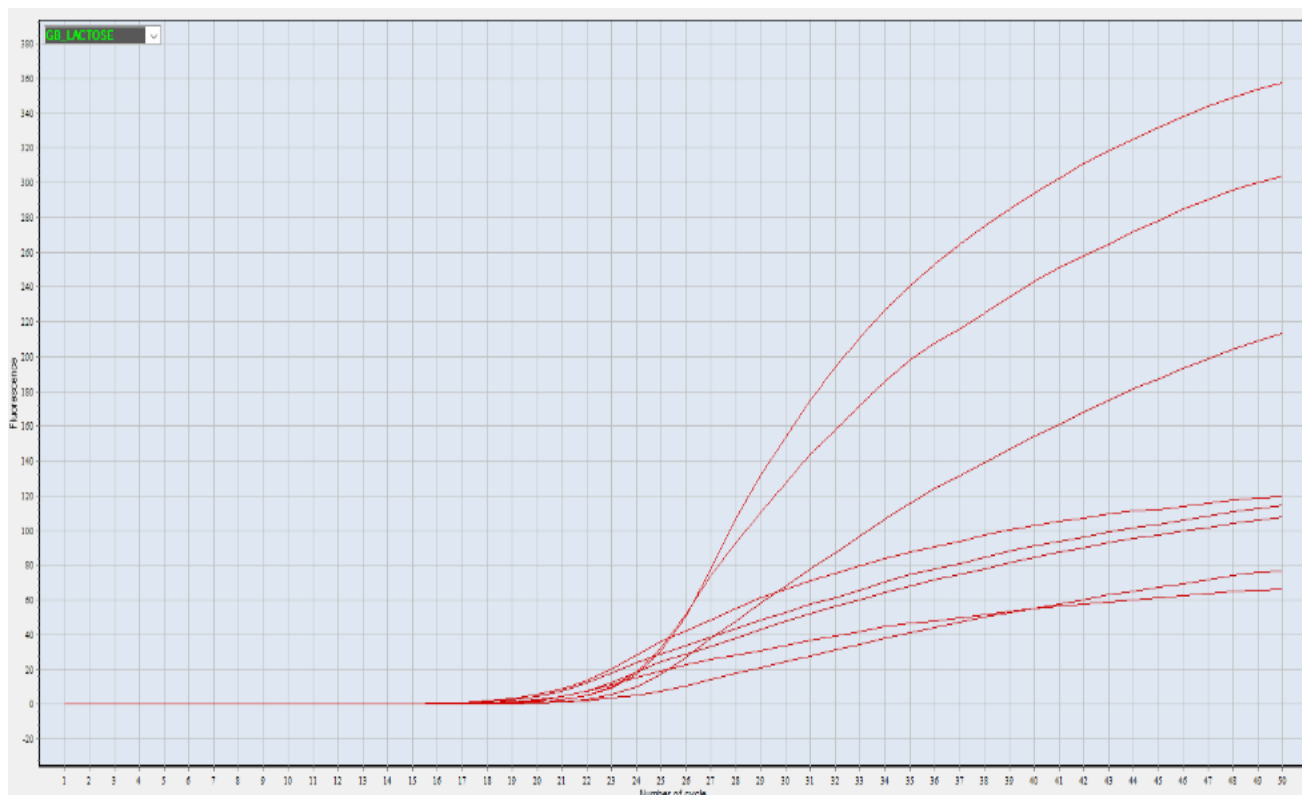
1.5. Δείγμα 10

Απαντήσεις στο ερωτηματολόγιο

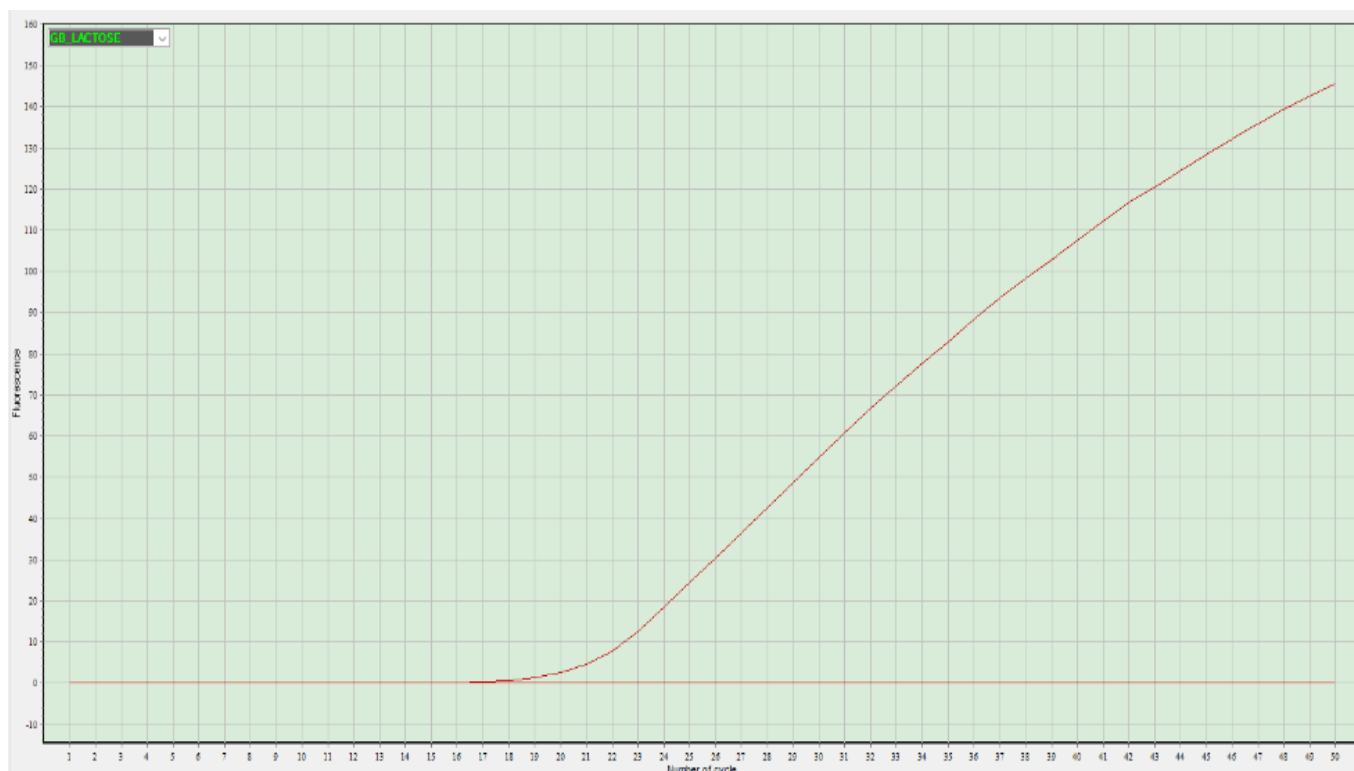
Φύλο	Γυναίκα
Ηλικία	70
Τωρινή Απασχόληση	Συνταξιούχος
Καταγωγή	Βουλγαρία
Κατανάλωση Γαλακτομικών	Ναι
Αν ναι, πόσο συχνά;	Συχνά (3-4 φορές την εβδομάδα)
Τι είδους;	Τυρί, γιαούρτι και άλλα είδη με

	βάση το γάλα
Έχει παρατηρηθεί κάποιο είδος ενόχλησης στην κατανάλωση τους;	Μερικές φορές
Αν ναι, σε ποια;	Γάλα και ορισμένες φορές τυρί
Τι συμπτώματα παρατήρησε;	Μετεωρισμός, κοιλιακό άλγος
Έχει επίγνωση της δυσανεξίας της λακτόζης;	Ναι
Έχει διαγνωστεί;	Όχι
Υπάρχει κάποιος κληρονομικός παράγοντας;	Δεν γνωρίζω
Πότε παρατήρησε ότι υπάρχει πιθανότητα δυσανεξίας;	Εμφανίστηκε σε τυχαία περίοδο της ζωής του
Έχει προχωρήσει σε πιο εξειδικευμένη εξέταση;	Όχι

Αριθμός Δείγματος	ID του δείγματος	FAM	HEX
10	1 (GB_LACTOSE)	20.8	20.8



Εικόνα 27: Διάγραμμα FAM για το δείγμα 10



Εικόνα 26: Διάγραμμα HEX για το δείγμα 10

Με βάση τα παραπάνω διαγράμματα, παρατηρείται ότι το δείγμα 10 παρουσιάζει δυσανεξία στην λακτόζη. Ο ασθενής χαρακτηρίζεται ως ετεροζυγώτης, με την ανάλυση να δίνει σήμα ελέγχου HET, το οποίο εμφανίζει τις καμπύλες FAM και HEX, αποδεικνύοντας ότι το άτομο είναι ετεροζυγωτικό. Τα αποτελέσματα δικαιολογούν τα συμπτώματα που εμφανίζονται στον ασθενή όπου είναι σπανιότερα καθώς επίσης και ηπιότερα στις περισσότερες περιπτώσεις στο ετεροζυγωτικό άτομο.

Συζήτηση

Κατά την πειραματική διαδικασία εξετάστηκαν 30 δείγματα και από αυτά μελετήθηκαν αναλυτικότερα τα 7. Από τα 7 δείγματα τα 6 φαίνεται να μην διαθέτουν το γονίδιο που κωδικοποιεί την λακτάση και το 1 παρουσιάζεται ως κανονικό. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν ερμηνεύτηκαν με βάση τα πρότυπα (Διάγραμμα 1 και 2). Σύμφωνα με το πρωτόκολλο ο άγριος τύπος- κανονικός (WT) εμφανίζεται στο FAM/SYBR, ο μεταλλαγμένος τύπος ο οποίος χαρακτηρίζεται ως ομοζυγωτικός, MUT εμφανίζεται στο HEX/JOE/VIC και τέλος ο μεταλλαγμένος ετεροζυγωτικός τύπος HET που εμφανίζεται στο FAM/SYBR και HEX/JOE/VIC, όπως φαίνεται στα διαγράμματα 1 και 2. Το 4^ο δείγμα χαρακτηρίστηκε ως ετεροζυγωτικό με ενόχληση σε ένα μόνο γαλακτοκομικό προϊόν, το γάλα στην κατανάλωση του οποίου παρουσιάζει όλα τα συμπτώματα της δυσανεξίας στην λακτόζη. Το 6^ο δείγμα χαρακτηρίζεται ως ετεροζυγωτικό χωρίς ωστόσο να εμφανίζει κάποια ενόχληση ως προς την κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων. Παράλληλα τα προαναφερθέντα δείγματα παρουσιάζουν συγγένεια, δικαιολογώντας συνεπώς τον τρόπο κληρονομής του χαρακτηριστικού. Το 7^ο δείγμα χαρακτηρίζεται ως ομοζυγωτικός ενώ, εμφανίζει συμπτώματα της ασθένειας σε όλα τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Το 8^ο δείγμα είναι ομοζυγωτικό και εμφανίζει συμπτώματα ενόχλησης σε όλα τα γαλακτοκομικά εκτός του τυριού. Το 9^ο δείγμα είναι ετεροζυγωτικό με εμφάνιση συμπτωμάτων κατά την κατανάλωση γάλακτος και σπανιότερα άλλων ενοχλήσεων. Ενώ, το 10^ο δείγμα εμφανίζεται ως ετεροζυγωτικό με μερικές ενοχλήσεις στο γάλα και ορισμένες φορές στο τυρί. Με βάση τα πειραματικά αποτελέσματα, παρατηρήθηκε ότι η πλειοψηφία των 30 δειγμάτων που λήφθηκαν, χαρακτηρίζονται ως ετεροζυγωτικά συγκριτικά με τα ομοζυγωτικά που παρουσιάζονται σε μικρότερο ποσοστό. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα έξι δείγματα που αναλύθηκαν εκτενέστερα με τα τέσσερα να από αυτά να χαρακτηρίζονται ως ετεροζυγωτικά και τα δύο ως ομοζυγωτικά. Τα συμπτώματα στα ετεροζυγωτικά δείγματα είναι ηπιότερα συγκριτικά με τα ομοζυγωτικά, το οποίο μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι τα ομοζυγωτικά δεν διαθέτουν κανένα γονίδιο που κωδικοποιεί την λακτάση. Αντίθετα, τα ετεροζυγωτικά διαθέτουν το ένα γονίδιο που κωδικοποιεί την λακτάση. Όλα τα δείγματα που ελέγχθηκαν παρουσιάζουν κυρίως ενόχληση στο γάλα σε συγκριτικά με τα άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα, καθώς το γάλα εμφανίζει την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε λακτόζη. Οι άνθρωποι που εξετάστηκαν δυσανεξία στην λακτόζη κατάγονται από χώρες των Βαλκανίων γεγονός, που

δικαιολογεί την απουσία του συγκεκριμένου ενζύμου με βάση τα γεωγραφικά δεδομένα που αναφέρθηκαν παραπάνω και αποδεικνύουν ότι οι περισσότεροι λαοί της Ευρώπης με εξαίρεση τους βόρειους Ευρωπαίους πάσχουν από δυσανεξία στην λακτόζη. Αυτό παρατηρήθηκε και στην πλειοψηφία των υπόλοιπων δειγμάτων που μελετήθηκαν.

Ακόμη ένα χαρακτηριστικό που γίνεται ήδη αντιληπτό από τα αποτελέσματα είναι το γεγονός ότι στους περισσότερους εμφανίστηκε σε τυχαία διάρκεια της ζωής τους συγκριτικά με εκείνους που εμφάνισαν συμπτώματα από μικρή ηλικία. Αυτό αποδεικνύεται και από τα έξι δείγματα που εξετάστηκαν με το πρώτο να εμφανίζει συμπτώματα από μικρή ηλικία και τα υπόλοιπα να εμφανίζουν συμπτώματα της πάθησης σε κάποια τυχαία διάρκεια της ζωής τους. Δεν είναι γνωστά τα αίτια που δικαιολογούν την εμφάνιση των συμπτωμάτων σε διαφορετικές χρονικές περιόδους ωστόσο, μπορεί να συνέβη εξαιτίας αλλαγών στις διατροφικές συνήθειες, στην αλλαγή των ποσοτήτων λήψης των συγκεκριμένων προϊόντων και πιθανότατα στην αλλαγή περιβάλλοντος που δύναται να επηρεάσει την εμφάνιση της ασθένειας. Τέλος, κατά την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας εξετάστηκαν άτομα τα οποία εμφάνιζαν συμπτώματα χωρίς ωστόσο να παρουσιάζουν κάποια μορφή μετάλλαξης. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην ομοιότητα των συμπτωμάτων που εμφανίζει η δυσανεξία στην λακτόζη με άλλες παθήσεις που ήδη αναφέρθηκαν.

Συμπέρασμα

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι, η δυσανεξία στην λακτόζη αποτελεί ένα επίκτητο κληρονομικό χαρακτηριστικό που εξαρτάται ωστόσο και από άλλους παράγοντες. Η γεωγραφική τοποθεσία, η διατροφή και η συχνότητα κατανάλωσης γαλακτοκομικών προϊόντων αποτελούν κρίσιμα σημεία που ευθύνονται για την εμφάνιση της πάθησης χωρίς όμως να είναι και απόλυτα καθώς, μεταβάλλονται στη διάρκεια των χρόνων. Παιδιά με γονείς που έχουν δυσανεξία στην λακτόζη είναι ικανά να κληρονομήσουν το συγκεκριμένο γονίδιο ενώ, άνθρωποι οι οποίοι μέχρι ορισμένη χρονική περίοδο της ζωής τους δεν εμφάνιζαν κανένα σύμπτωμα της πάθησης, με την συνεχή κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων τα δεδομένα μεταβλήθηκαν. Τα δείγματα τα οποία αναλύθηκαν είχαν καταγωγή κυρίως ελληνική ενώ άλλα προέρχονταν από χώρες των Βαλκανίων γεγονός, που δικαιολογεί την εμφάνιση της ασθένειας σε αρκετά υψηλά ποσοστά. Οι περισσότεροι ασθενείς που παρουσίασαν δυσανεξία στην λακτόζη σε ετερόζυγη μορφή είχαν ηπιότερα συμπτώματα σύμφωνα με το ερωτηματολόγιο συγκριτικά με τους ομόζυγους ασθενείς. Οι πλειοψηφία των ασθενών εμφάνισαν ενόχληση στο γάλα ιδίως οι ομόζυγοι, που απέκλεισαν μάλιστα ορισμένα γαλακτοκομικά από το διαιτολόγιο τους ενώ, ορισμένοι ετερόζυγοι είτε απέκλεισαν επιλεκτικά κάποια προϊόντα είτε δεν εμφάνισαν καμία ενόχληση. Η διαδικασία λήψης των δειγμάτων χαρακτηρίζεται ως εύκολη διαδικασία η οποία όμως χρειάζεται ακρίβεια. Η διαδικασία εξαγωγής των αποτελεσμάτων εκτελέστηκε με PCR η οποία αποτελεί σύγχρονη και μη χρονοβόρα διαδικασία. Τα αποτελέσματα είναι ακριβή ενώ, οι καμπύλες σε συνδυασμό με το πρωτόκολλο δίνουν την δυνατότητα λήψης αποτελεσμάτων σε σύντομο χρονικό διάστημα. Παρόλο που τα άτομα που πάσχουν από δυσανεξία στην λακτόζη δεν έχουν την δυνατότητα να καταναλώσουν ορισμένα από τα γαλακτοκομικά προϊόντα ακόμη και κανένα από αυτά, η τεχνολογία παρέχει διάφορες λύσεις στο πρόβλημα. Τα άτομα με δυσανεξία στην λακτόζη δεν είναι αναγκαίο να στερηθούν τις ευεργετικές δράσεις που προσφέρουν τα συγκεκριμένα προϊόντα. Συνεπώς, η παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων επεξεργασμένων με λακτάση ή χορήγηση συμπληρώματος λακτάσης που λειτουργεί ως υποκατάστατο των τροφίμων που περιέχουν λακτόζη αποτελεί λύση για το συγκεκριμένο πρόβλημα. Μεταξύ των μη γαλακτοκομικών προϊόντων τα επικρατέστερα είναι τα παρασκευάσματα με σόγια και άλλα προϊόντα που χρησιμοποιούνται είναι το κεφίρ, το τυρί και το γιαούρτι. Τέλος, άτομα που παρουσιάζουν ορισμένα συμπτώματα

ενόχλησης σε γαλακτοκομικά προϊόντα είναι απαραίτητο να υποβληθούν σε εξέταση καθώς, συχνά η δυσανεξία στην λακτόζη συγγέεται με διάφορες άλλες παθήσεις όπως, τροφική αλλεργία, αλλεργία στο γάλα, σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου και πολλά ακόμη που ήδη αναλύθηκαν. Η διάγνωση, αποτελεί το καταλληλότερο μέσο για την εξάλειψη των συμπτωμάτων.

Βιβλιογραφίες

1. A. Lisa. Seidman and Cynthia J. Moore, copyright 2000 Prentice-Hall, Inc. *Basic Laboratory Methods for Biotechnology, Textbook and Laboratory Reference.*, By
2. Ambrogi, V., Bottacini, F., O'Callaghan, J., Casey, E., Van Breen, J., Schoemaker, B., ... & van Sinderen, D. (2021). Infant-Associated bifidobacterial β -Galactosidases and their ability to synthesize galacto-oligosaccharides. *Frontiers in Microbiology*, 12, 662959.
3. Anguita-Ruiz, A., Aguilera, C. M., & Gil, Á. (2020). Genetics of lactose intolerance: an updated review and online interactive world maps of phenotype and genotype frequencies. *Nutrients*, 12(9), 2689.
4. Arora, S., & Singla, N. LACTOSE INTOLERANCE IN INFANTS, CHILDREN, AND ADOLESCENTS. *age*, 7, 8.
5. Artika, I. Made, et al. "Real-time polymerase chain reaction: Current techniques, applications, and role in COVID-19 diagnosis." *Genes* 13.12 (2022): 2387.
6. Bayless, T. M., Brown, E., & Paige, D. M. (2017). Lactase non-persistence and lactose intolerance. *Current gastroenterology reports*, 19, 1-11.
7. Boudreau, F., Rings, E. H., van Wering, H. M., Kim, R. K., Swain, G. P., Krasinski, S. D., ... & Traber, P. G. (2002). Hepatocyte nuclear factor-1 α , GATA-4, and caudal related homeodomain protein Cdx2 interact functionally to modulate intestinal gene transcription: Implication for the developmental regulation of the sucrase-isomaltase gene. *Journal of Biological Chemistry*, 277(35), 31909-31917.
8. Brüssow, H. (2013). Nutrition, population growth and disease: a short history of lactose. *Environmental microbiology*, 15(8), 2154-2161.
9. Campbell, A. K., Waud, J. P., & Matthews, S. B. (2009). The molecular basis of lactose intolerance. *Science progress*, 92(3-4), 241-287.
10. Campbell, Reece, «Βιολογία, Η χημεία της ζωής – το κύτταρο - γενετική» Εκδόσεις Κρήτης, Αθήνα, 2010
11. Canania, M. D. (2018). Lactose intolerance: common misunderstandings. *Ann Nutr Metab*, 73, 30-37.
12. Canani, R. B., & Terrin, G. (2011). Recent progress in congenital diarrheal disorders. *Current gastroenterology reports*, 13, 257-264
13. Catanzaro, R., Sciuto, M., & Marotta, F. (2021). Lactose intolerance: An update on its pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Nutrition Research*, 89, 23-34.
14. Catanzaro, Roberto, Morena Sciuto, and Francesco Marotta. "Lactose intolerance: An update on its pathogenesis, diagnosis, and treatment." *Nutrition Research* 89 (2021): 23-34.
15. Cederlund A, Kai-Larsen Y, Printz G, Yoshio H, et al. Lactose in Human Breast Milk an Inducer of Innate Immunity with Implications for a Role in Intestinal Homeostasis. *PLoS One*. 2013; 8(1):e53876.
16. Chacon-Cortes, D., & Griffiths, L. R. (2014). Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives. *Journal of Biorepository Science for Applied Medicine*, 1-9.

17. Coluccia, E., Iardino, P., Pappalardo, D., Brigida, A. L., Formicola, V., De Felice, B., ... & De Magistris, L. (2019). Congruency of genetic predisposition to lactase persistence and lactose breath test. *Nutrients*, *11*(6), 1383.
18. Darma, A., Sumitro, K. R., Jo, J., & Sitorus, N. (2024). Lactose Intolerance versus Cow's Milk Allergy in Infants: A Clinical Dilemma. *Nutrients*, *16*(3), 414.
19. Dekker, Peter JT, Damiet Koenders, and Maaïke J. Bruins. "Lactose-free dairy products: Market developments, production, nutrition and health benefits." *Nutrients* *11.3* (2019): 551.
20. del Carmen Toca, M., Fernándezb, A., Orsic, M., Tabacco, O., & Vinderola, G. (2022). Lactose intolerance: myths and facts. An update. *Arch. Argent. Pediatr*, *120*, 59-66.
21. Deng, Yanyong, et al. "Lactose intolerance in adults: biological mechanism and dietary management." *Nutrients* *7.9* (2015): 8020-8035.
22. Di Costanzo, M., & Canani, R. B. (2018). Lactose intolerance: common misunderstandings. *Annals of Nutrition and Metabolism*, *73*(4), 30-37.
23. Di Rienzo, T., D'angelo, G., D'aversa, F., Campanale, M. C., Cesario, V., Montalto, M., ... & Ojetti, V. (2013). Lactose intolerance: from diagnosis to correct management. *European Review for Medical & Pharmacological Sciences*, *17*.
24. Dominici, Simona, et al. "Lactose: Characteristics, food and drug-related applications, and its possible substitutions in meeting the needs of people with lactose intolerance." *Foods* *11.10* (2022): 1486.
25. Domżał-Magrowska, D., Kowalski, M. K., & Małeczka-Wojcieszko, E. (2023). The incidence of adult type hypolactasia in patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology Review/Przegląd Gastroenterologiczny*, *18*(1), 110-114.
26. Dulbecco, R., and Vogt, M., Plaque Formation and Isolation of Pure Lines with Poliomyelitis Viruses. *J. Exp. Med.*, *99*, 167-182 (1954).
27. Durdiaková, J., Kamodyová, N., Ostatníková, D., Vlčková, B., & Čelec, P. (2012). Comparison of different collection procedures and two methods for DNA isolation from saliva. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, *50*(4), 643-647.
28. Fassio, F., Facioni, M. S., & Guagnini, F. (2018). Lactose maldigestion, malabsorption, and intolerance: a comprehensive review with a focus on current management and future perspectives. *Nutrients*, *10*(11), 1599.
29. Fernandez-Lafuente, R. (2009). Stabilization of multimeric enzymes: Strategies to prevent subunit dissociation. *Enzyme and microbial technology*, *45*(6-7), 405-418.
30. Fiocchi, A., Brozek, J., Schünemann, H., Bahna, S. L., von Berg, A., Beyer, K., ... & Vieths, S. (2010). World Allergy Organization (WAO) diagnosis and rationale for action against cow's milk allergy (DRACMA) guidelines. *World Allergy Organization Journal*, *3*(4), 57-161.
31. Forsgård, Richard A. "Lactose digestion in humans: intestinal lactase appears to be constitutive whereas the colonic microbiome is adaptable." *The American journal of clinical nutrition* *110.2* (2019): 273-279.

32. Garibyan, Lilit, and Nidhi Avashia. "Research techniques made simple: polymerase chain reaction (PCR)." *The Journal of investigative dermatology* 133.3 (2013): e6.
33. Hammer, H. F., & Högenauer, C. (2022). Lactose intolerance and malabsorption: Clinical manifestations, diagnosis, and management. *Waltham (MA): UpToDate, 11*.
34. Heine, R. G., AlRefaee, F., Bachina, P., De Leon, J. C., Geng, L., Gong, S., ... & Rogacion, J. M. (2017). Lactose intolerance and gastrointestinal cow's milk allergy in infants and children—common misconceptions revisited. *World Allergy Organization Journal, 10*, 1-8.
35. Hourigan, J. A., et al. "Lactose: chemistry, processing, and utilization." *Advances in dairy ingredients* (2013): 21-41.
36. Ibrahim, S. A., & Gyawali, R. (2013). Lactose intolerance. *Milk and dairy products in human nutrition: Production, composition and health*, 246-260.
37. Itan, Y., Jones, B. L., Ingram, C. J., Swallow, D. M., & Thomas, M. G. (2010). A worldwide correlation of lactase persistence phenotype and genotypes. *BMC evolutionary biology, 10*, 1-11.
38. Jiménez, José Luis Domínguez, et al. "Primary hypolactasia diagnosis: Comparison between the gaxilose test, shortened lactose tolerance test, and clinical parameters corresponding to the C/T-13910 polymorphism." *Clinical nutrition* 36.2 (2017): 471-476.
39. J.M. Berg, J.L. Tymoczko, G.J. Gatto, L. Stryer, «Βιοχημεία», Εκδόσεις Κρήτη, Αθήνα, 2021
40. Judith E. Brown, «Η διατροφή στο κύκλο της ζωής» Ιατρικές Εκδόσεις, Λαγός Δημήτριος, Αθήνα, 2016
41. Khabarova, Y. (2013). Adult-type Hypolactasia in North-West Russia.
42. Khan, M. M. U., Ali, M. S., Khan, S., & Amir, M. (2023). Analysis Of Lactose Tolerance Significance, Diagnosis, And Therapy. *Journal of Namibian Studies: History Politics Culture, 37*, 1-24.
43. Kuchay, R. A. H. (2020). New insights into the molecular basis of lactase non-persistence/persistence: A brief review. *Drug Discoveries & Therapeutics, 14*(1), 1-7.
44. Leis, R., de Castro, M. J., de Lamas, C., Picáns, R., & Couce, M. L. (2020). Effects of prebiotic and probiotic supplementation on lactase deficiency and lactose intolerance: a systematic review of controlled trials. *Nutrients, 12*(5), 1487.
45. Li, Aili, et al. "Advances in Low-Lactose/Lactose-Free Dairy Products and Their Production." *Foods* 12.13 (2023): 2553.
46. Looi, M. L., Zakaria, H., Osman, J., & Jamal, R. (2012). Quantity and quality assessment of DNA extracted from saliva and blood. *Clinical laboratory, 58*(3), 307.
47. Lomer, Miranda CE, G. C. Parkes, and J. D. Sanderson. "lactose intolerance in clinical practice—myths and realities." *Alimentary pharmacology & therapeutics* 27.2 (2008): 93-103.
48. Lomer, M. C. (2015). The aetiology, diagnosis, mechanisms and clinical evidence for food intolerance. *Alimentary pharmacology & therapeutics, 41*(3), 262-275.

49. Lonkar, S. A., Khatkar, A. B., Chandla, N. K., Singh, P. K., Kumar, S., Sain, M., & Khatkar, S. K. (2022). Lactose intolerance: A review for facts and fictions. *Environment Conservation Journal*, 23(3), 479-485.
50. Mądry, E., Lisowska, A., Kwiecień, J., Marciniak, R., Korzon-Burakowska, A., Drzymała-Czyż, S., ... & Walkowiak, J. (2010). Adult-type hypolactasia and lactose malabsorption in Poland. *Acta Biochimica Polonica*, 57(4).
51. Madhad, V. J., & Sentheil, K. P. (2014). The Rapid & Non-Enzymatic isolation of DNA from the Human peripheral whole blood suitable for Genotyping. *Eur J Biotechnol Biosci*, 1(3), 01-16.
52. Manuyakorn, W., & Tanpowpong, P. (2019). Cow milk protein allergy and other common food allergies and intolerances. *Paediatrics and international child health*, 39(1), 32-40.
53. Mattar, Rejane, et al. "Comparison of Quick Lactose Intolerance Test in duodenal biopsies of dyspeptic patients with single nucleotide polymorphism LCT-13910C> T associated with primary hypolactasia/lactase-persistence." *Acta Cirúrgica Brasileira* 28 (2013): 77-82.
54. Mattar, R., de Campos Mazo, D. F., & Carrilho, F. J. (2012). Lactose intolerance: diagnosis, genetic, and clinical factors. *Clinical and experimental gastroenterology*, 113-121.
55. Matthews, S. B., Waud, J. P., Roberts, A. G., & Campbell, A. K. (2005). Systemic lactose intolerance: a new perspective on an old problem. *Postgraduate medical journal*, 81(953), 167-173.
56. Micic, D., Rao, V. L., & Rubin, D. T. (2019). Clinical approach to lactose intolerance. *JAMA*, 322(16), 1600-1601.
57. Morelli, L., Amrani, N., Goulet, O., & Lukito, W. (2019). Lactose intolerance: clinical symptoms, diagnosis and treatment. *Global Diabetes Open Access Journal*, 1(1), 1-10.
58. Misselwitz, B., Pohl, D., Frühauf, H., Fried, M., Vavricka, S. R., & Fox, M. (2013). Lactose malabsorption and intolerance: pathogenesis, diagnosis and treatment. *United European gastroenterology journal*, 1(3), 151-159.
59. Misselwitz, Benjamin, et al. "Update on lactose malabsorption and intolerance: pathogenesis, diagnosis and clinical management." *Gut* 68.11 (2019): 2080-2091.
60. Morelli, Lorenzo, et al. "Lactose intolerance: clinical symptoms, diagnosis and treatment." *Global Diabetes Open Access Journal* 1.1 (2019): 1-10.
61. Nagy, D. (2012). *Genetic testing of adult-type hypolactasia in present-day and ancient samples* (Doctoral dissertation, Szegedi Tudományegyetem (Hungary)).
62. Ohlsson, Jonas A., et al. "Lactose, glucose and galactose content in milk, fermented milk and lactose-free milk products." *International Dairy Journal* 73 (2017): 151-154.
63. Parodi, Aurora, et al. "Methodology and indications of H2-breath testing in gastrointestinal diseases: the Rome Consensus Conference." *Aliment. Pharmacol. Ther* 29 (2009): 1-49.
64. Pollott, G. E. "Deconstructing milk yield and composition during lactation using biologically based lactation models." *Journal of dairy science* 87.8 (2004): 2375-2387.

65. Pohl, D., Savarino, E., Hersberger, M., Behlis, Z., Stutz, B., Goetze, O., ... & Tutuian, R. (2010). Excellent agreement between genetic and hydrogen breath tests for lactase deficiency and the role of extended symptom assessment. *British journal of nutrition*, 104(6), 900-907.
66. Portnoy, Matilde, and David M. Barbano. "Lactose: Use, measurement, and expression of results." *Journal of dairy science* 104.7 (2021): 8314-8325
67. Porzi, Millie, et al. "Development of personalized nutrition: applications in lactose intolerance diagnosis and management." *Nutrients* 13.5 (2021): 1503.
68. Qamar, W., Khan, M. R., & Arafah, A. (2017). Optimization of conditions to extract high quality DNA for PCR analysis from whole blood using SDS-proteinase K method. *Saudi journal of biological sciences*, 24(7), 1465-1469.
69. Robinson, P. K. (2015). Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in biochemistry*, 59, 1.
70. Robles, Luelle, and Ronny Priefer. "Lactose intolerance: What your breath can tell you." *Diagnostics* 10.6 (2020): 412.
71. Romero-Velarde, Enrique, et al. "The importance of lactose in the human diet: Outcomes of a Mexican consensus meeting." *Nutrients* 11.11 (2019): 2737.
72. Schaafsma, Gertjan. "Lactose and lactose derivatives as bioactive ingredients in human nutrition." *International Dairy Journal* 18.5 (2008): 458-465.
73. Scheindlin, B. (2007). Lactose intolerance and evolution: No use crying over undigested milk. *Gastronomica*, 7(2), 59-63.
74. Ségurel, L., & Bon, C. (2017). On the evolution of lactase persistence in humans. *Annual review of genomics and human genetics*, 18, 297-319.
75. Sequeira, E., Kaur, G., Chintamaneni, M., & Buttar, H. S. (2014). Lactose intolerance: genetics of lactase polymorphisms, diagnosis and novel therapy. *Biomedical Reviews*, 25, 35-44.
76. Silanikove, Nissim, Gabriel Leitner, and Uzi Merin. "The interrelationships between lactose intolerance and the modern dairy industry: global perspectives in evolutionary and historical backgrounds." *Nutrients* 7.9 (2015): 7312-7331.
77. Shafi, A., & Husain, Q. (2022). Intolerance to milk lactose, diagnostic tests and dietary management: A recent update. *Avicenna Journal of Medical Biochemistry*, 10(1), 71-81.
78. Sheldon, R. A., & van Pelt, S. (2013). Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chemical society reviews*, 42(15), 6223-6235.
79. Shi, Chuting, et al. "Lactose in tablets: functionality, critical material attributes, applications, modifications and co-processed excipients." *Drug Discovery Today* (2023): 103696.
80. Solomon, S. M., Matei, M. N., Badescu, A. C., Jelihovschi, I., Martu-Stefanache, A., Teusan, A., ... & Iancu, L. S. (2015). Evaluation of DNA extraction methods from saliva as a source of PCR-amplifiable genomic DNA. *Rev. Chim.(Bucharest)*, 66(12), 2101-2103.
81. Souza, C. J., Garcia-Rojas, E. E., & Favaro-Trindade, C. S. (2018). Lactase (β -galactosidase) immobilization by complex formation: Impact of biopolymers on enzyme activity. *Food Hydrocolloids*, 83, 88-96.
82. Suri, S., Kumar, V., Prasad, R., Tanwar, B., Goyal, A., Kaur, S., ... & Singh, D. (2019). Considerations for development of lactose-free food. *Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism*, 15, 27-34.

83. Swallow, D. M. (2003). Genetics of lactase persistence and lactose intolerance. *Annual review of genetics*, 37(1), 197-219.
84. Swagerty Jr, Daniel L., Anne D. Walling, and Robert M. Klein. "Lactose intolerance." *American family physician* 65.9 (2002): 1845-1851.
85. Szilagyi, A., & Ishayek, N. (2018). Lactose intolerance, dairy avoidance, and treatment options. *Nutrients*, 10(12), 1994.
86. Szilagyi, A., Walker, C., & Thomas, M. G. (2019). Lactose intolerance and other related food sensitivities. In *Lactose* (pp. 113-153). Academic Press.
87. Szilagyi A. Redefining lactose as a conditional prebiotic. *Can J Gastroenterol*. 2004; 18(3):163-7.
88. Thompson, Manore, Vaughan, «Η επιστήμη της διατροφής» Ιατρικές Εκδόσεις, Λαγός Δημήτριος, 2021
89. Trinugroho, Joko Pebrianto, et al. "Machine Learning Approach for Single Nucleotide Polymorphism Selection in Genetic Testing Results." *Procedia Computer Science* 227 (2023): 46-54.
90. Troelsen, J. T. (2005). Adult-type hypolactasia and regulation of lactase expression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1723(1-3), 19-32.
91. Ugidos-Rodríguez, S., Matallana-González, M. C., & Sánchez-Mata, M. C. (2018). Lactose malabsorption and intolerance: a review. *Food & function*, 9(8), 4056-4068.
92. Vandenplas, Yvan. "Lactose intolerance." *Asia Pacific journal of clinical nutrition* 24.Supplement (2015).
93. van Neerven, R. J., & Savelkoul, H. F. (2019). The two faces of cow's milk and allergy: Induction of cow's milk allergy vs. Prevention of asthma. *Nutrients*, 11(8), 1945.
94. Vázquez, SE Martínez, et al. "The importance of lactose intolerance in individuals with gastrointestinal symptoms." *Revista de Gastroenterología de México (English Edition)* 85.3 (2020): 321-331.
95. Venter, C., Brown, T., Meyer, R., Walsh, J., Shah, N., Nowak-Węgrzyn, A., ... & Fox, A. T. (2017). Better recognition, diagnosis and management of non-IgE-mediated cow's milk allergy in infancy: iMAP—an international interpretation of the MAP (Milk Allergy in Primary Care) guideline. *Clinical and Translational Allergy*, 7, 1-9
96. Walsh, J., Meyer, R., Shah, N., Quekett, J., & Fox, A. T. (2016). Differentiating milk allergy (IgE and non-IgE mediated) from lactose intolerance: understanding the underlying mechanisms and presentations. *British Journal of General Practice*, 66(649), e609-e611.
97. Wanes, D., Husein, D. M., & Naim, H. Y. (2019). Congenital lactase deficiency: mutations, functional and biochemical implications, and future perspectives. *Nutrients*, 11(2), 461.
98. Wang, T. Y., Wang, L., Zhang, J. H., & Dong, W. H. (2011). A simplified universal genomic DNA extraction protocol suitable for PCR. *Genet Mol Res*, 10(1), 519-525.
99. Wortmann, A. C., Simon, D., Mazzoleni, L. E., Sander, G. B., Francesconi, C. F. D. M., Nabinger, D. D., ... & Silveira, T. R. D. (2018). The association between adult-type hypolactasia and symptoms of functional dyspepsia. *Genetics and Molecular Biology*, 41, 92-97.

100. Yeo, N. M. (2017). Lactose Intolerance: An Overview of the Facts and Their Implications.
101. Ανδρικόπουλος, Ν. (2015). *Τροφογνωσία* [Προπτυχιακό εγχειρίδιο]. Κάλλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις. <https://dx.doi.org/10.57713/kallipos-559>
102. Μπατρίνου Α., «Βιοτεχνολογία Τροφίμων, γενετικά τροποποιημένα τρόφιμα», Εκδόσεις Πασχαλίδης, Αθήνα, 2011
103. Παπανικολάου, Γ., Παλαιολόγου, Δ., Κατσαρέλη, Ε., Κατσίδα, Θ., Τσαρουχά, Χ., Τζέτη, Μ., Λιλάκος, Κ., & Δούκισσας, Λ. (2015). *Εργαστηριακές ασκήσεις γενετικής του ανθρώπου* [Εργαστηριακός Οδηγός]. Κάλλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις.
104. Παπανικολάου, Γ., & Παλαιολόγου, Δ. (2015). *Έλεγχος της ποιότητας και μέτρηση της συγκέντρωσης των νουκλεϊκών οξέων* [Κεφάλαιο]. Στο Παπανικολάου, Γ., Παλαιολόγου, Δ., Κατσαρέλη, Ε., Κατσίδα, Θ., Τσαρουχά, Χ., Τζέτη, Μ., Λιλάκος, Κ., & Δούκισσας, Λ. 2015. *Εργαστηριακές ασκήσεις γενετικής του ανθρώπου* [Εργαστηριακός Οδηγός]. Κάλλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις.
105. Σπηλιόπουλος, Ι., & Βάκρος, Ι. (2023). *Ιδιότητες Υδατανθράκων* [Κεφάλαιο]. Στο Σπηλιόπουλος, Ι., & Βάκρος, Ι. 2023. *Χημεία - Εργαστηριακές Ασκήσεις* [Εργαστηριακός Οδηγός]. Κάλλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις.
106. Φούντος, Γ., & Κουνάδη, Ε. (2023). *Φυσικές μέθοδοι μελέτης βιοφυσικής στο επίπεδο κυττάρων και ιστών* [Κεφάλαιο]. Στο Φούντος, Γ., & Κουνάδη, Ε. 2023. *Βιοφυσική* [Προπτυχιακό εγχειρίδιο]. Κάλλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις.
107. Χαρθάλου Αικατερινή, Χούχουλα Δήμητρα, «Εισαγωγή στις αρχές της μοριακής βιολογίας και διαγνωστικής προσέγγισης», Αθήνα, 2020
108. https://www.researchgate.net/publication/321315604_The_Evolution_of_Lactose_Tolerance_in_Dairying
109. <https://worldwide.promega.com/products/microplate-readers-fluorometers-luminometers/fluorometers/quantus-fluorometer/?catNum=E6150>
110. <https://biosan.lv/products/ts-100-thermo-shaker-for-microtubes-and-pcr-plates/>
111. <https://www.rbcbioscienceusa.com/product/magcore-plus-ii/>
112. <https://sacace.com/sacycler-96-new-real-time.htm>