



ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Προσδιορισμός Ολικών Πρωτεϊνών Αγελαδινού Γάλακτος στο Μητρικό

Γεωργία Μαυρέλη - Βασιλική Γρούμπα

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Δήμητρα Χούχουλα

ΑΙΓΑΛΕΩ 2022

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΩΝ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι κάτωθι υπογεγραμμένες Μαυρέλη Γεωργία του Δημητρίου με αριθμό μητρώου 16062 και Γρούμπα Βασιλική του Παναγιώτη με αριθμό μητρώου 17017 φοιτήτριες του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, δηλώνουμε υπεύθυνα ότι:

«Είμαστε συγγραφείς αυτής της διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχαμε για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες κάναμε χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνουμε ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από εμάς αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μας, όσο και του Ιδρύματος.

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

Η Δηλούσα

Γεωργία Μαυρέλη



Η Δηλούσα

Βασιλική Γρούμπα



ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΕΞΕΤΑΣΗΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η πτυχιακή εργασία αξιολογήθηκε και έγινε δεκτή από την κάτωθι εξεταστική επιτροπή:

	ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ	ΥΠΟΓΡΑΦΗ
1	Χούχουλα Δήμητρα	
2	Κανέλλου Αναστασία	
3	Αντωνόπουλος Διονύσιος	

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε την κυρία Χούχουλα, επιβλέπουσα καθηγήτρια, για την συνεργασία και την σημαντική συμβολή της στην εκπόνηση της εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ	7
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	8
ABSTRACT	9
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
1. ΤΟ ΜΗΤΡΙΚΟ ΓΑΛΑ	12
1.1 Αξία Μητρικού Γάλακτος	12
1.2 Σύσταση μητρικού γάλακτος	14
1.2.1. Λακτόζη και λοιποί υδατάνθρακες.....	15
1.2.2. Λίπη	15
1.2.3. Πρωτεΐνες	16
1.2.4. Βιταμίνες, Μέταλλα και Ιχνοστοιχεία.....	20
2. ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΑΓΕΛΑΔΙΝΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ	21
2.1 Καζεΐνες.....	23
2.2 Πρωτεΐνες του ορού	24
3. ΑΛΛΕΡΓΙΑ ΣΤΟ ΑΓΕΛΑΔΙΝΟ ΓΑΛΑ	25
4. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΠΟ ΤΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	28
4.1 Παρουσία πρωτεϊνών αγελαδινού γάλακτος στο μητρικό γάλα	28
4.2 Μηχανισμός μετανάστευσης πρωτεϊνών αγελαδινού γάλακτος στο μητρικό	34
5. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΛΛΕΡΓΙΟΓΟΝΩΝ	36
5.1 Μέθοδοι ανίχνευσης αλλεριογόνων.....	36
5.2 Ανίχνευση βόειων πρωτεϊνών στο μητρικό γάλα.....	38
6. ΣΚΟΠΟΣ	40
7. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ: Υλικά και Μέθοδοι	41
7.1 Υλικά και Όργανα	42
7.2 Πειραματική πορεία.....	43
7.2.1 Παρασκευή Αντιδραστηρίων.....	43
7.2.2 Προετοιμασία Δειγμάτων	43
7.2.3 Παρασκευή Προτύπων	44
7.3.4 Διαδικασία Ανάλυσης.....	45

8. ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	46
8.1 Πρότυπη Καμπύλη 1	47
8.2 Πρότυπη Καμπύλη 2	49
8.3 Πρότυπη Καμπύλη 3	51
9. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	53
10. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	55
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	57

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Γενική σύσταση μητρικού γάλακτος.....	13
Πίνακας 2. Βιολογικές λειτουργίες πρωτεϊνών ανθρώπινου γάλακτος.....	17
Πίνακας 3. Πρωτεΐνες ανθρώπινου γάλακτος συσχετισμένες με βιολογικές λειτουργίες.....	17
Πίνακας 4. Πρωτεϊνικό προφίλ αγελαδινού γάλακτος.....	18
Πίνακας 5. Σύνθεση μικελλών καζεΐνης του αγελαδινού γάλακτος σε θερμοκρασία δωματίου.....	19
Πίνακας 6. Αντιδραστήρια και υλικά που περιέχονταν στο κιτ.....	35
Πίνακας 7. Προετοιμασία Προτύπων Διαλυμάτων.....	37
Πίνακας 8. Δεδομένα Πρότυπης Καμπύλης 1.....	40
Πίνακας 9. Συγκεντρώσεις Δειγμάτων 1 έως 8.....	41
Πίνακας 10. Δεδομένα Πρότυπης Καμπύλης 2.....	42
Πίνακας 11. Συγκεντρώσεις Δειγμάτων 9 έως 34.....	43
Πίνακας 12. Δεδομένα Πρότυπης Καμπύλης 3.....	44
Πίνακας 13. Συγκεντρώσεις Δειγμάτων 35 έως 55.....	45

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι αλλεργικές αποκρίσεις που εμφανίζονται σε βρέφη τα οποία τρέφονται αποκλειστικά με θηλασμό, αποτελεί εδώ και χρόνια αντικείμενο προβληματισμού για την επιστημονική κοινότητα. Δείγματα μητρικού γάλακτος από 55 θηλάζουσες μητέρες αναλύθηκαν, για την παρουσία σε αυτά ολικών πρωτεϊνών αγελαδινού γάλακτος. Η επιλογή της ανίχνευσης των ολικών πρωτεϊνών έγινε προκειμένου να καλύφθει όλο το εύρος των πρωτεϊνών, που δύναται να προκαλέσουν αλλεργικές αντιδράσεις. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε είναι η ELISA τύπου sandwich. Οι μητέρες από τις οποίες προέρχονταν τα δείγματα, ακολουθούσαν διατροφή που περιείχε την κατανάλωση γάλακτος και των παραγώγων του. Σκοπός ήταν να αποσαφηνιστεί εάν είναι δυνατό οι πρωτεΐνες του αγελαδινού γάλακτος που καταναλώνει η μητέρα, να μεταφερθούν στο βρέφος της μέσω του μητρικού γάλακτος. Από τα αποτελέσματα της έρευνας προέκυψε ότι μόνο σε 2 από τα 55 δείγματα ανιχνεύτηκαν κάποια ίχνη πρωτεΐνης αγελαδινής προέλευσης, τα οποία θεωρούνται αμελητέα λόγω εξαιρετικά χαμηλής συγκέντρωσης. Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δεν επιβεβαιώνουν ότι οι πρωτεΐνες του αγελαδινού γάλακτος μεταφέρονται στο μητρικό γάλα. Ενδεχομένως άλλα συστατικά πέραν της βόειας β-λακτοσφαιρίνης ή των καζεϊνών να εμπλέκονται στην εμφάνιση αλλεργικών συμπτωμάτων σε αποκλειστικά θηλαζόμενα βρέφη.

Λέξεις – κλειδιά: μητρικό γάλα, αλλεργία, ολικές βόειες πρωτεΐνες, ELISA

ABSTRACT

Allergic reactions that occur in exclusively breastfed infants have been a matter of concern for scientists for years. Breast milk samples from 55 breastfeeding mothers were analyzed for the presence of total cow's milk proteins. The choice of total protein detection was made in order to cover the full range of proteins that can cause allergic reactions. The method used is sandwich type ELISA. The donor mothers follow a diet that contains the consumption of milk and its derivatives. The purpose was to clarify whether it is possible for the cow's milk proteins consumed by the mother to be transferred to her infant through breast milk. The results of this research showed that only in 2 of the 55 samples some traces of cow milk protein were detected, which are considered negligible due to the extremely low concentration. In conclusion, the results of the present study do not confirm that cow milk proteins are transferred into breast milk. Components other than bovine β -lactoglobulin or caseins could be involved in the induction of allergic symptoms in exclusively breast-fed children.

Keywords: human milk, allergy, total bovine proteins, ELISA

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το μητρικό γάλα αποτελεί εξαιρετική τροφή για τα νεογνά, καθώς μπορεί να τους προσφέρει όλα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά που απαιτούνται για την υγιή ανάπτυξή τους, ενώ παράλληλα η σύνθεσή του μεταβάλλεται στα διάφορα στάδια γαλουχίας, προκειμένου να ταιριάζει ιδανικά στις ανάγκες του βρέφους. Η περιεκτικότητά του σε αντιμικροβιακούς και ανοσοτροποποιητικούς παράγοντες, πρωτεΐνες, λιπίδια, υδατάνθρακες και βιοενεργά συστατικά, καλύπτει τις ανάγκες του υπό ανάπτυξη βρεφικού ανοσοποιητικού συστήματος.

Ανά τα χρόνια έχουν αναφερθεί διάφορες περιπτώσεις εμφάνισης αλλεργικών συμπτωμάτων σε βρέφη που τρέφονται αποκλειστικά με το θηλασμό. Τα συμπτώματα που έχουν καταγραφεί σε θηλάζοντα βρέφη ως αντίδραση στην παρουσία πρωτεϊνών αγελαδινού γάλακτος στο μητρικό γάλα, είναι τα εξής: έκζεμα, κολικοί, διάρροια, κολίτιδα με αιμορραγία από το ορθό, παλινδρόμηση, εμετός, δυσκοιλιότητα, ρινόρροια, βραδυκαρδία, καθώς και αναφυλακτικό σοκ (Järvinen & Suomalainen, 2001).

Για τον λόγο αυτό, δημιουργήθηκε ο προβληματισμός σχετικά με το αν οι πρωτεΐνες του αγελαδινού γάλακτος και των παραγώγων του μπορούν να μεταφερθούν στο γάλα της μητέρας μέσω της διατροφής της, και μέσω αυτού στο βρέφος.

Υπάρχουν επίσης αναφορές ότι ο αποκλεισμός ορισμένων τροφών από τη διατροφή της μητέρας κατά την περίοδο του θηλασμού, επιφέρει σημαντική βελτίωση στα θηλάζοντα βρέφη που έχουν εμφανίσει συμπτώματα αλλεργικής αντίδρασης. Οι πρωτεΐνες που έχουν κατηγορηθεί περισσότερο για την πρόκληση αλλεργικών αποκρίσεων είναι οι καζεΐνες και η β-λακτοσφαιρίνη, λόγω της γνωστής αλλεργιογόνου δράσης τους.

Πλήθος ερευνών έχει διεξαχθεί στο πέρασμα των χρόνων, ωστόσο τα αποτελέσματά τους βρίσκονται συχνά σε αντίθεση, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να προκύψει ένα καθολικό συμπέρασμα. Ενώ σε αρκετές μελέτες έχει βρεθεί η παρουσία πρωτεϊνών τροφίμων στο ανθρώπινο γάλα, καμία μελέτη δεν μπόρεσε να συσχετίσει αναμφίβολα την παρουσία αυτών των αλλεργιογόνων στο ανθρώπινο γάλα με την ευαισθητοποίηση των νεογνών. Η σημασία

όμως της επίλυσης του ζητήματος είναι πολύ μεγάλη, λόγω της εξαιρετικής σημασίας του μητρικού γάλακτος για τα βρέφη, αλλά και προς την πρόληψη της εμφάνισης των δυσάρεστων συμπτωμάτων στα νεογνά. Για το λόγο αυτό καθίσταται απαραίτητη η περαιτέρω σχετική έρευνα.

1. ΤΟ ΜΗΤΡΙΚΟ ΓΑΛΑ

1.1 Αξία Μητρικού Γάλακτος

Το μητρικό γάλα, αποτελεί την ιδανική τροφή για τα βρέφη, και έχει προκύψει μετά από εκατομμύρια χρόνια εξέλιξης, ταιριάζοντας ιδανικά στις απαιτήσεις του οργανισμού του βρέφους. Πρόκειται για ένα εξαιρετικά σύνθετο βιολογικό υγρό που χαρακτηρίζεται από μεγάλη ποικιλομορφία. Η σύνθεσή του αλλάζει με βάση διάφορους παράγοντες, ταιριάζοντας στις ανάγκες του βρέφους ανάλογα με την ηλικία του, καθώς και άλλα χαρακτηριστικά. Για τον λόγο αυτό πιστεύεται ότι η σύνθεση είναι συγκεκριμένα φτιαγμένη από τον οργανισμό κάθε μητέρας, ώστε να ταιριάζει στο βρέφος της.

Το πλήθος αντιμικροβιακών και ανοσοτροποποιητικών παραγόντων που περιέχονται στο μητρικό γάλα φαίνεται να διορθώνει τις ανεπάρκειες του βρεφικού ανοσοποιητικού συστήματος. Το μητρικό γάλα περιέχει επίσης πλήθος σύνθετων πρωτεϊνών, λιπιδίων και υδατανθράκων, οι συγκεντρώσεις των οποίων μπορούν να μεταβληθούν δραματικά κατά την γαλακτική περίοδο, ώστε να αντικατοπτρίζουν τις ανάγκες του βρέφους. Εκτός από την παροχή θρεπτικών συστατικών, το μητρικό γάλα περιέχει πολλά βιολογικά ενεργά συστατικά όπως ορμόνες, κυτοκίνες, χημειοκίνες και αντιμικροβιακούς παράγοντες (*Martin et al., 2016*). Τα μόρια αυτά επιτελούν διάφορες λειτουργίες, καθοδηγώντας την ανάπτυξη του ανοσοποιητικού συστήματος του νεογνού, καθώς και του εντερικού μικροβιώματός του (*Andreas et al., 2015*).

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ) και η UNICEF, έχοντας αναγνωρίσει το μητρικό γάλα ως την ιδανική διατροφή για ένα νεογέννητο βρέφος, συστήνουν αποκλειστικό θηλασμό για τους πρώτους 6 μήνες της ζωής του, και συνέχιση έως και τα δύο πρώτα έτη ή και περισσότερο, συνδυαστικά με κατάλληλες συμπληρωματικές τροφές (*Garwolińska et al., 2018*).

Το μητρικό γάλα χωρίζεται σε 3 διαφορετικά είδη, με βάση το στάδιο της γαλακτικής περιόδου. Τις πρώτες ημέρες μετά την γέννα (περίπου 5 ημέρες) παράγεται το πρωτόγαλα. Πρόκειται για ένα κιτρινωπό υγρό, μεγάλης αξίας για το βρέφος, καθώς περιέχει σε μεγάλη συγκέντρωση ανοσολογικά συστατικά και παράγοντες ανάπτυξης. Η συγκέντρωση αυτών των συστατικών είναι χαμηλότερη στο ώριμο γάλα. Μεταβατικό, ονομάζεται το γάλα που παράγεται

μεταξύ της 6ης και της 15ης ημέρας μετά τη γέννα. Το γάλα αυτό παράγεται σε μεγαλύτερες ποσότητες και περιέχει πιο αυξημένες συγκεντρώσεις λακτόζης, λίπους και υδατοδιαλυτών βιταμινών. Σχεδόν ώριμο θεωρείται το γάλα από την 15η ημέρα της γαλουχίας, ενώ πλήρως ώριμο στις 4 με 6 εβδομάδες μετά την γέννα (*Garwolińska et al., 2018*).

1.2 Σύσταση μητρικού γάλακτος

Το μητρικό γάλα αποτελείται κατά κύριο λόγο από νερό σε πολύ μεγάλο ποσοστό, λίπη, πρωτεΐνες και λακτόζη. Τα συστατικά αυτά παρουσιάζονται παρακάτω ποσοστιαία μέσα στο μητρικό γάλα (βλ. Πιν. 1).

Πίνακας 1. Γενική σύσταση μητρικού γάλακτος

Συστατικά	% στο μητρικό γάλα
Νερό	87
Λίπος	3,8
Πρωτεΐνες	1,0
Λακτόζη	7

Camilia R. Martin et al. 2016

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η σύσταση αυτή είναι δυναμική, δηλαδή μεταβάλλεται, ώστε να προσαρμοστεί στις ανάγκες του βρέφους, που αλλάζουν με το πέρασμα του χρόνου. Επιπλέον, κατά τη διάρκεια κάθε θηλασμού το γάλα που εκκρίνεται ποικίλει. Στην αρχή είναι πιο λεπτόρρευστο και με υψηλότερη περιεκτικότητα σε λακτόζη, ώστε να ικανοποιήσει την δίψα του βρέφους, ενώ στη συνέχεια γίνεται πιο παχύρρευστο με υψηλότερη περιεκτικότητα σε λίπος για να καλύψει τις θρεπτικές του ανάγκες (*Martin et al., 2016*).

Επιπλέον παράγοντες που επηρεάζουν την σύσταση του μητρικού γάλακτος αποτελούν: η ηλικία της μητέρας, η διατροφή της, η εθνικότητά της, η αύξηση του βάρους της κατά τη διάρκεια της κύησης, καθώς και το βάρος του νεογνού κατά την γέννησή του (*Garwolińska et al., 2018*).

1.2.1. Λακτόζη και λοιποί υδατάνθρακες

Στο μητρικό γάλα περιέχεται μία μεγάλη ποικιλία διαφορετικών και σύνθετων υδατανθράκων, ενώ η λακτόζη πλεονάζει κατά πολύ. Η λακτόζη είναι ένας δισακχαρίτης αποτελούμενος από ένα μόριο γλυκόζης συνδεδεμένο με ένα μόριο γαλακτόζης (Corra et al., 1993). Οι ολιγοσακχαρίτες του ανθρώπινου γάλακτος αποτελούν επίσης ένα αξιοσημείωτο μέρος των συνολικών υδατανθράκων του μητρικού γάλακτος. Πιο συγκεκριμένα, είναι το τρίτο πολυπληθέστερο συστατικό του. Οι μονοσακχαρίτες που τους συνθέτουν είναι οι εξής: L-φουκόζη, D-γλυκόζη, D-γαλακτόζη, -ακετυλογλυκοζαμίνη και N-ακετυλονευραμινικό οξύ. Υπάρχουν πάνω από 200 διαφορετικοί τύποι ολιγοσακχαριτών που είναι γνωστό ότι υπάρχουν στο ανθρώπινο γάλα, όλοι εκ των οποίων έχουν λακτόζη στο αναγωγικό άκρο (German et al., 2008). Η κύρια λειτουργία τους είναι να θρέφουν το γαστρεντερικό μικροβίωμα του νεογνού, λειτουργώντας σαν πρεβιοτικά, αν και δεν είναι αφομιώσιμοι από το ίδιο (Andreas et al., 2015).

1.2.2. Λίπη

Τα λιπίδια αποτελούν την κύρια πηγή ενέργειας για τα αναπτυσσόμενα βρέφη και παρέχουν το 45 με 50 % της συνολικής ενέργειας του γάλακτος (Martin et al., 2016). Η πλειοψηφία (98%) των λιπιδίων που εκκρίνονται, είναι τριακυλογλυκερίδια. Το υπόλοιπο 2% αποτελείται από διακυλογλυκερίδια, μονοακυλογλυκερίδια, ελεύθερα λιπαρά οξέα, φωσφολιπίδια και χοληστερόλη.

Τα λιπίδια αποτελούν συστατικά ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη του κεντρικού νευρικού συστήματος του νεογνού, τα οποία το ίδιο δεν μπορεί να συνθέσει (Lauritzen & Carlson, 2011). Προκειμένου να μπορούν να παρέχονται τα λιπίδια στο βρέφος, έχει αναπτυχθεί ένα μοναδικό σύστημα μεταφοράς στο μητρικό γάλα, τα λιποσφαιρίδια γάλακτος. Μέχρι σήμερα, το πιο μελετημένο λιπιδικό κλάσμα του μητρικού γάλακτος είναι ένας πυρήνας πλούσιος σε τριακυλογλυκερόλη (TG) που περιέχει περίπου το 99% των λιπιδίων του μητρικού γάλακτος (Garwolińska et al., 2018).

1.2.3. Πρωτεΐνες

Το ανθρώπινο γάλα περιέχει ένα μεγάλο πλήθος πρωτεϊνών, οι οποίες επιτελούν ένα εύρος λειτουργιών που κυμαίνεται από αντιμικροβιακές δράσεις έως ανοσοερεθιστικές λειτουργίες. Πρωτεΐνες όπως η λακτοφερίνη, η εκκριτική IgA, η κ-καζεΐνη, η λακτοϋπεροξειδάση, καθώς και πεπτίδια που προκύπτουν από τις πρωτεΐνες του μητρικού γάλακτος κατά την πέψη, είναι ικανές να παρεμποδίσουν την ανάπτυξη παθογόνων βακτηρίων και ιών. Παράλληλα, πρωτεΐνες όπως η λακτοφερίνη, η απτοκορίνη, η κ-καζεΐνη και η πρωτεΐνη δέσμησης φολικού οξέος, μπορούν να διευκολύνουν την απορρόφηση θρεπτικών συστατικών από το έντερο του βρέφους. Επιπλέον, οι πρωτεΐνες του ανθρώπινου γάλακτος παρέχουν επαρκείς ποσότητες απαραίτητων αμινοξέων στο αναπτυσσόμενο νεογνό (Lönnerdal B., 2004).

Τα πολυπεπτίδια του γάλακτος ταξινομούνται γενικά σε τέσσερις κύριες κατηγορίες: καζεΐνες, πεπτόνες (πεπτίδια χαμηλού μοριακού βάρους), πρωτεΐνες ορού γάλακτος και πρωτεΐνες μεμβράνης λίπους γάλακτος (MFGM). Με βάση τη σχετική τους αφθονία, οι καζεΐνες (α S1, α S2, β και κ) και οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος (β -λακτοσφαιρίνη, α -λακταλβουμίνη, αλβουμίνη ορού, ανοσοσφαιρίνες, λακτοφερρίνη και άλλες), οι οποίες γενικά αντιπροσωπεύουν το 80 και 16% του συνολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου αντίστοιχα, έχουν διερευνηθεί ευρέως, με συνδυασμένες προσεγγίσεις ηλεκτροφορητικής και φασματοσκοπίας μάζας (MS) (D'Alessandro A. et al., 2010).

Οι καζεΐνες γίνονται θρόμβοι και πήζουν στο περιβάλλον του στομαχιού, ενώ οι πρωτεΐνες του ορού παραμένουν σε υγρή μορφή και έτσι είναι ευκολότερο να γίνει η πέψη τους. Ανάλογα με το στάδιο της γαλουχίας, οι πρωτεΐνες του ορού αποτελούν το 50 – 80% του συνόλου του πρωτεϊνικού περιεχομένου. Η γλουταμίνη είναι σημαντική για την παροχή κετογλουταρικού οξέος στον κύκλο του κιτρικού οξέος, δρώντας πιθανότατα ως νευροδιαβιβαστής στον εγκέφαλο και σαν υποκατάστατο ενέργειας για τα εντερικά κύτταρα.

Οι κυριότερες πρωτεΐνες ορού είναι οι εξής: α-λακταλβουμίνη, λακτοφερρίνη και εκκριτική IgA. Άλλες πρωτεΐνες περιλαμβάνουν: λυσοζύμη, πρωτεΐνη δέσμευσης φολικού οξέος, παράγοντα bifidus, καζεΐνη, λιπάση και αμυλάση, α1-αντιθρυψίνη και αντιχυμοθρυψίνη και απτοκορίνη (Guo, 2014). Μετά την κατάποση, αυτές οι πρωτεΐνες διασπώνται ταχύτατα σε ελεύθερα αμινοξέα, έτοιμα για απορρόφηση. Η λακτοφερρίνη και η λυσοζύμη εμποδίζουν την εξάπλωση δυνητικά παθογόνων βακτηρίων, αποτρέποντας ασθένειες στα βρέφη. Το αντίσωμα IgA καταστρέφει τα βακτήρια και προστατεύει την επιφάνεια του βλεννογόνου του εντέρου του νεογνού (Martin et al., 2016).

Στο ανθρώπινο γάλα συναντώνται τρεις κατηγορίες καζεϊνών. Η α-, η β- και η κ-καζεΐνη. Η κ-καζεΐνη σταθεροποιεί τις αδιάλυτες στο νερό α- και β-καζεΐνες, σχηματίζοντας ένα κolloειδές εναιώρημα, την μικέλλη καζεΐνης (Dalglish et al., 2004).

Οι πρωτεΐνες του ανθρώπινου γάλακτος επιτελούν μια σειρά από λειτουργίες που περιλαμβάνουν (βλ. Πιν.2):

- Χρήση ως πηγή αμινοξέων
- Βελτίωση της βιοδιαθεσιμότητας μικροθρεπτικών συστατικών
- Τόνωση της εντερικής ανάπτυξης και ωρίμανσης
- Υποστήριξη ανοσολογικής άμυνας
- Διαμόρφωση του μικροβιώματος
- Ενίσχυση της μάθησης και της μνήμης

Ορισμένες πρωτεΐνες του μητρικού γάλακτος επιτελούν δραστηριότητες σε περισσότερες από μία κατηγορίες (Πίνακας 3). Για παράδειγμα, η λακτοφερρίνη εμπλέκεται ως μεταφορέας θρεπτικών συστατικών, στην άμυνα του οργανισμού και στην προαγωγή των εντερικών, γνωστικών και ανοσολογικών λειτουργιών. Επιπλέον, βιοενεργά πεπτίδια σχηματίζονται κατά την πέψη της καζεΐνης και των πρωτεϊνών ορού γάλακτος και οι γλυκάνες που απελευθερώνονται από τις γλυκοπρωτεΐνες του ανθρώπινου γάλακτος από μικροβιακές γλυκοσιδάσες είναι μπιφιδογόνες, προσθέτοντας περαιτέρω πολυπλοκότητα στις λειτουργικές ιδιότητες των πρωτεϊνών του ανθρώπινου γάλακτος (Donovan, S. M. 2019).

Λόγω του πολυλειτουργικού τους ρόλου, τρεις βιοδραστικές πρωτεΐνες, η λακτοφερρίνη, η οστεοποντίνη και οι πρωτεΐνες μεμβράνης λίπους γάλακτος (MFGM), έχουν απομονωθεί από το βόειο γάλα και έχουν δοκιμαστεί για βιοδραστικότητα σε προκλινικές μελέτες και κλινικές δοκιμές σε ανθρώπους (Donovan, S. M. 2019).

Πίνακας 2. Βιολογικές λειτουργίες πρωτεϊνών ανθρώπινου γάλακτος

Βιολογικές Λειτουργίες
Θρέψη (αμινοξέα)
Πέψη και Απορρόφηση Θρεπτικών Συστατικών
Ανάπτυξη Γαστρεντερικού Συστήματος
Άμυνα του Οργανισμού → Αντιμικροβιακή Δράση, Ανοσοϊκανότητα
Πρεβιοτικά / Μικροβίωμα
Γνωστική Λειτουργία

Donovan S.M. (2019)

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι διάφορες βιολογικές λειτουργίες τις οποίες επιτελούν οι πρωτεΐνες του μητρικού γάλακτος συσχετισμένες με τις αντίστοιχες πρωτεΐνες, καθώς επίσης απεικονίζεται ο πολυλειτουργικός τους ρόλος.

Πίνακας 3. Πρωτεΐνες ανθρώπινου γάλακτος συσχετισμένες με βιολογικές λειτουργίες

Βιολογική Λειτουργία	Πρωτεΐνη
Θρέψη	α-λακτοσφαιρίνη α-καζεΐνη β-καζεΐνη κ-καζεΐνη
Πέψη και Απορρόφηση Θρεπτικών Συστατικών Ένζυμα Πρωτεΐνες – μεταφορείς Θρ. Συστατικών	α1-αντιθρυψίνη αμυλάση α-λακτοσαιρίνη (ασβέστιο, ψευδάργυρο) β-καζεΐνη (ασβέστιο, φώσφορος) απτοκορρίνη (βιταμίνη B12) λακτοφερρίνη (σίδηρος)
Ανάπτυξη γαστρεντερικού συστήματος	παράγοντες ανάπτυξης λακτοφερρίνη
Άμυνα του Οργανισμού	α-λακτοσφαιρίνη κυτοκίνες απτοκορρίνη κ-καζεΐνη λακτοφερρίνη λακτοϋπεροξειδάση λυσοζύμη οστεοποντίνη εκκριτική IgA
Πρεβιοτικά	α-λακτοσφαιρίνη λακτοφερρίνη γλυκάνες γάλακτος MFGM
Γνωστική Λειτουργία	λακτοφερρίνη MFGM

Donovan S.M. (2019)

1.2.4. Βιταμίνες, Μέταλλα και Ιχνοστοιχεία

Το ανθρώπινο γάλα περιέχει επίσης επαρκείς ποσότητες από τις περισσότερες βιταμίνες, ώστε να μπορέσει να υποστηρίξει την φυσιολογική ανάπτυξη του βρέφους, με εξαίρεση τις βιταμίνες D και K. Σε αυτή την περίπτωση, βοηθητική μπορεί να είναι η λήψη αντίστοιχων συμπληρωμάτων από τη μητέρα, καθώς και η ελεγχόμενη έκθεση στο ηλιακό φως, όσο αφορά στη βιταμίνη D. Τα κυριότερα ανόργανα στοιχεία που περιέχονται στο μητρικό γάλα είναι το Νάτριο (Na), το Κάλιο (K), το Μαγνήσιο (Mg), το Ασβέστιο (Ca) , ο Φώσφορος (P) και το Χλώριο (Cl) (*Martin et al., 2016*).

2. ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΑΓΕΛΑΔΙΝΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

Το αγελαδινό γάλα περιέχει περίπου 32 γραμμάρια πρωτεΐνης ανά λίτρο γάλακτος. Πρόκειται για πρωτεΐνες υψηλής βιολογικής αξίας, και αποτελούν καλή πηγή των απαραίτητων αμινοξέων για τον ανθρώπινο οργανισμό. Επιπλέον, περιέχει ένα μεγάλο εύρος πρωτεϊνών με βιολογικές δραστηριότητες, όπως αντιμικροβιακές ιδιότητες, συνδρομή στην απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών, καθώς επίσης λειτουργούν σαν παράγοντες ανάπτυξης, ορμόνες, ένζυμα και αντισώματα (*Haug et al., 2007*).

Το πρωτεϊνικό σύστημα του γάλακτος αποτελείται από δύο βασικές οικογένειες πρωτεϊνών: τις καζεΐνες (αδιάλυτες) και τις πρωτεΐνες του ορού (διαλυτές). Οι καζεΐνες αποτελούν το 80% των συνολικών πρωτεϊνών. Η βιολογική τους λειτουργία είναι να μεταφέρουν ασβέστιο και φώσφορο και να σχηματίζουν θρόμβους στο στομάχι, διευκολύνοντας την πέψη. Το 90% της ποσότητας της καζεΐνης απαντάται στο γάλα με την μορφή μικκυλίων ενώ το υπόλοιπο 10% εντοπίζεται σε διαλυτή μορφή. Οι πρωτεΐνες του ορού είναι σφαιρικές πρωτεΐνες, που είναι πιο υδατοδιαλυτές από τις καζεΐνες, και είναι κυρίως οι εξής: η β-λακτοσφαιρίνη, η α-λακταλβουμίνη, η αλβουμίνη ορού γάλακτος και οι ανοσοσφαιρίνες. Ο ρυθμός με τον οποίο τα αμινοξέα ελευθερώνονται κατά την πέψη και απορροφούνται στην κυκλοφορία, διαφέρει από πρωτεΐνη σε πρωτεΐνη. Οι πρωτεΐνες του ορού είναι άμεσα απορροφήσιμες (*Haug et al., 2007*).

Πίνακας 4. Πρωτεϊνικό προφίλ αγελαδινού γάλακτος

Πρωτεΐνες	g/L γάλακτος
ολική καζεΐνη	24,6-28
α _s 1-καζεΐνη	8,0-10,7
α _s 2-καζεΐνη	2,8-3,4
β-καζεΐνη	8,6-9,3
κ-καζεΐνη	2,3-3,3
γ-καζεΐνη	0,8
ολικές πρωτεΐνες ορού	5,5-7,0
β-λακτοσφαιρίνη	3,2-3,3
α-λακτοσφαιρίνη	1,2-1,3
οροαλβουμίνη	0,3-0,4
λακτοφερίνη	0,02-0,5
λυσοζύμη	(70-600) × 10 ⁻⁶
ανοσοσφαιρίνες	0,5-1,0

Crowley 2016

2.1 Καζεΐνες

Για πρώτη φορά μέσω της ηλεκτροφόρησης, οι καζεΐνες διαφοροποιήθηκαν και ταξινομήθηκαν σε τρία είδη, που ονομάστηκαν α , β , και γ λόγω της μειούμενης ηλεκτροφορητικής κινητικότητας που παρουσίαζαν. Οι α s1-, α s2-, β - και κ -καζεΐνες αντιπροσωπεύουν περίπου το 38%, 10%, 35% και 12%, αντίστοιχα, της συνολικής καζεΐνης βοοειδών (Goulding et al., 2020). Η σύνθεση των καζεϊνών σε αμινοξέα δε διαφέρει σημαντικά από εκείνη των πρωτεϊνών του ορού. Οι καζεΐνες είναι λίγο πιο υδρόφοβες από τις πρωτεΐνες του ορού. Η σημαντικότερη διαφορά μεταξύ τους είναι ότι οι πρώτες περιέχουν φώσφορο στο μόριό τους. Οι καζεΐνες του αγελαδινού γάλακτος είναι ενωμένες μεταξύ τους με τη μορφή κolloειδών διασπαρμένων σωματιδίων, τα οποία είναι γνωστά με τον όρο μικέλλες. Ένα μικρό ποσοστό όμως (5-10%) και κυρίως οι β - και δευτερευόντως οι κ -καζεΐνες, βρίσκονται σε χωριστά μόρια ή μικρά συσσωματώματα και είναι γνωστές σαν διαλυτές καζεΐνες.

Πίνακας 5. Σύνθεση μικελλών καζεΐνης του αγελαδινού γάλακτος σε θερμοκρασία δωματίου

Συστατικά	Περιεκτικότητα (g/100g μικελλών)
α s1-καζεΐνη	35,6
α s2-καζεΐνη	9,9
β -καζεΐνη	33,6
κ -καζεΐνη	11,9
γ -καζεΐνη	2,3
όλες οι καζεΐνες	93,3

Schmidt, 1982

2.2 Πρωτεΐνες του ορού

- Η β-λακτοσφαιρίνη αντιπροσωπεύει το 50% των πρωτεϊνών του ορού, ενώ πρόκειται για μία τυπική σφαιρική πρωτεΐνη.
- Η α-λακταλβουμίνη αποτελεί περίπου το 20% της πρωτεΐνης του αγελαδινού ορού. Είναι μία μικρή πρωτεΐνη και περιέχει τέσσερις δισουλφιδικούς δεσμούς σε κάθε μόριο.
- Η οροαλβουμίνη προέρχεται από το αίμα των γαλακτοφόρων ζώων και γι'αυτό μοιάζει, όσο αφορά στην σύνθεση, με την αλβουμίνη του αίματος. Αποτελείται από μία και μόνη πολυπεπτιδική αλυσίδα πολύ μεγάλου μήκους.
- Ο όρος ανοσογλοβουλίνες (IgG) περιλαμβάνει μια ετερογενή οικογένεια πρωτεϊνών που έχουν σαν κοινό χαρακτηριστικό τον εφοδιασμό των νεαρών ζώων με αντισώματα για την προστασία από τους παθογόνους μικροοργανισμούς.

3. ΑΛΛΕΡΓΙΑ ΣΤΟ ΑΓΕΛΑΔΙΝΟ ΓΑΛΑ

Μια από τις κυριότερες τροφικές αλλεργίες είναι η υπερευαισθησία στις πρωτεΐνες του αγελαδινού γάλακτος. Επηρεάζει κυρίως τα βρέφη, αλλά όχι αποκλειστικά, ενώ μάλιστα μπορεί να επιμείνει μέχρι και κατά την ενήλικη ζωή και μπορεί να είναι πολύ σοβαρή. Έχουν καταγραφεί ποικίλα σχετικά κλινικά συμπτώματα. Η διάγνωσή της, ωστόσο, μπορεί να είναι δύσκολη λόγω της περιπλοκότητας και του βαθμού των συμπτωμάτων, και μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω δοκιμών στο δέρμα ή το αίμα.

Η λέξη αλλεργία προσδιορίζει μία αλλοιωμένη ή ασυνήθιστη αντίδραση του οργανισμού. Μια τέτοια αντίδραση μπορεί να συμβεί με την επαφή μιας ξένης πρωτεΐνης - ενός αλλεργιογόνου - με ιστούς του οργανισμού, που είναι ευαίσθητοι σε αυτό. Πιο συγκεκριμένα, μπορεί να οφείλεται στην αλληλεπίδραση μεταξύ μιας ή περισσότερων πρωτεϊνών του γάλακτος και ενός ή περισσότερων ανοσολογικών μηχανισμών, και να έχει ως αποτέλεσμα άμεσες αντιδράσεις που προκαλούνται από το αντίσωμα IgE. Αντίθετα, αξίζει να αναφερθεί ότι οι αντιδράσεις στις οποίες δεν συμμετέχει το ανοσοποιητικό σύστημα ορίζονται ως δυσανεξία σε πρωτεΐνη αγελαδινού γάλακτος.

Οι αλλεργικές αντιδράσεις ταξινομούνται σε δύο τύπους:

- Τον τύπο άμεσης αντίδρασης κατά τον οποίο οι αλλεργικές εκδηλώσεις εμφανίζονται μέσα σε λίγες ώρες από την επαφή του ασθενούς με το αλλεργιογόνο και συχνά μέσα σε δευτερόλεπτα ή λεπτά. Σε αυτή τη μορφή αλλεργίας τα δερματικά τεστ είναι σχεδόν πάντα θετικά.
- Τον τύπο καθυστερημένης αντίδρασης κατά τον οποίο οι εκδηλώσεις μπορεί να μην εμφανίζονται για πολλές ώρες ή ακόμη και για 2 ή 3 ημέρες. Σε αυτόν τον τύπο τα δερματικά τεστ είναι συνήθως αρνητικά.

Το αγελαδινό γάλα περιέχει περισσότερες από 20 πρωτεΐνες - αλλεργιογόνα, που μπορούν να προκαλέσουν αλλεργικές αντιδράσεις (*E.I. El-Agamy, 2006*). Οι κύριες πρωτεΐνες είναι η καζεΐνη και η πρωτεΐνες ορού γάλακτος. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η καζεΐνη είναι κλασματοποιημένη σε α-, β-, και κ-καζεΐνη και πρωτεΐνες ορού γάλακτος περιλαμβάνουν τις εξής: α-λακτοσφαιρίνη(α-Ig), β-λακτοσφαιρίνη (β-Ig), οροαλβουμίνη (BSA) και ανοσοσφαιρίνη (IgS). Υπάρχουν επίσης και αρκετές δευτερεύουσες πρωτεΐνες στο αγελαδινό γάλα. Οι περισσότερες μελέτες δείχνουν ότι η καζεΐνη και η β-Ig είναι τα κύρια αλλεργιογόνα στο αγελαδινό γάλα (*Goldman et al., 1963; Docena et al., 1996; Bernard et al., 1998; Busse et al., 2002*). Οι *Jarvinen et al. (2002)* βρήκαν ότι πέντε επίτοποι που δεσμεύουν IgE (2 σε α-s1-καζεΐνη, 1 σε α-s2-καζεΐνη και 2 σε κ-καζεΐνη) εντοπίστηκαν σε ασθενείς με επίμονη αλλεργία. Αλλεργικές αντιδράσεις σημειώθηκαν επίσης σε BSA, IgG βαριάς αλυσίδας και α-Lg (*Järvinen et al., 2001*).

Αλλεργικές αντιδράσεις στη λακτοφερρίνη και σε ορισμένα ένζυμα του αγελαδινού γάλακτος έχουν ανιχνευθεί σε κάποιους ασθενείς με CMA (*Taylor, 1986; Sharma et al., 2001*).

Η πιο κοινή μορφή CMA είναι αυτή που γίνεται με τη μεσολάβηση IgE αντισωμάτων, όπου οι κλινικές εκδηλώσεις καθιστούν τη διάγνωση σχετικά απλή. Τα συμπτώματα αναπτύσσονται στα προσβεβλημένα βρέφη εντός 2 ωρών από την έκθεση στο αλλεργιογόνο και μπορεί να περιλαμβάνουν έμετο, ερύθημα, κνίδωση, αγγειοοίδημα, λήθαργο ή αναπνευστικά συμπτώματα. Τα συμπτώματα συνήθως υποχωρούν μέσα σε λίγες ώρες και μπορούν να επανέλθουν με εκ νέου έκθεση σε πρωτεΐνη αγελαδινού γάλακτος (*Munblit et al., 2020*).

Στα βρέφη με CMA στην οποία δεν μεσολαβεί το αντίσωμα IgE, η αλλεργική αντίδραση μπορεί να εκδηλωθεί με διαφορετικούς τρόπους. Μπορεί να έχουν εμετούς, και πάλι συνήθως μετά την πρώτη έκθεση στο γάλα (σύνδρομο εντεροκολίτιδας που προκαλείται από πρωτεΐνη). Μπορεί επίσης να εμφανιστεί με αίμα στα κόπρανα (αλλεργική πρωκτοκολίτιδα) ή με χρόνια δερματικά ή γαστρεντερικά συμπτώματα όπως διάρροια, αδυναμία πρόσληψης βάρους, κλάμα ή έμετο. Η τελευταία, είναι η κύρια ομάδα CMA όπου τα συμπτώματα επικαλύπτονται με κοινά συμπτώματα της βρεφικής ηλικίας. Αυτά τα συμπτώματα μπορεί να προκληθούν από

ηωσινοφιλική οισοφαγίτιδα, τροφο-πρωτεϊνική εντεροπάθεια ή άλλες αλλεργικές γαστροεντεροπάθειες. Η μη προκαλούμενη από IgE αντισώματα CMA ποικίλλει στην κλινική εικόνα (*Munblit et al., 2020*).

Έχουν καταγραφεί αναφορές, ότι συμπτώματα της CMA έχουν εμφανιστεί σε βρέφη που τρέφονται αποκλειστικά μέσω του θηλασμού. Τα συμπτώματα που έχουν καταγραφεί σε βρέφη που θηλάζουν, ως αντίδραση στην παρουσία πρωτεϊνών αγελαδινού γάλακτος στο μητρικό γάλα είναι τα εξής: έκζεμα, κολικοί, διάρροια, κολίτιδα με αιμορραγία από το ορθό, παλινδρόμιση και εμετός, δυσκοιλιότητα, ρινόρροια, βραδυκαρδία, καθώς και αναφυλακτικό σοκ (*Järvinen & Suomalainen, 2001*).

Το γεγονός αυτό προκαλεί προβληματισμό, σχετικά με το αν οι πρωτεΐνες του αγελαδινού γάλακτος μπορούν να περάσουν στο νεογνό από τη διατροφή της μητέρας, μέσω του θηλασμού. Ο προβληματισμός ενισχύεται από το γεγονός ότι θηλάζουσες μητέρες των οποίων τα βρέφη παρουσίασαν σχετικά συμπτώματα, δηλώνουν πως μετά τον αποκλεισμό του γάλακτος και των γαλακτοκομικών από την διατροφή τους, τα συμπτώματα υποχώρησαν. Προκειμένου να αποσαφηνισθεί το ανωτέρω ζήτημα, αρκετές μελέτες της διεθνούς βιβλιογραφίας έχουν ασχοληθεί με αυτό.

Γενικά πιστεύεται ότι ο αποκλεισμός ορισμένων τροφών από τη διατροφή της μητέρας κατά την περίοδο της γαλουχίας, προκαλεί σημαντική βελτίωση στα θηλάζοντα παιδιά που αναπτύσσουν συμπτώματα αλλεργικής αντίδρασης. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει την παρουσία πρωτεϊνών τροφίμων στο ανθρώπινο γάλα. Από την άλλη πλευρά, καμία μελέτη δεν μπόρεσε να συσχετίσει αναμφίβολα την παρουσία αυτών των αλλεργιογόνων στο ανθρώπινο γάλα με την ευαισθητοποίηση των νεογνών (*Restani et al., 2000*).

4. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΠΟ ΤΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

4.1 Παρουσία πρωτεϊνών αγελαδινού γάλακτος στο μητρικό γάλα

Με μια καλή ανασκόπηση της σχετικής με το ζήτημα βιβλιογραφίας, διαπιστώνεται ότι τα αποτελέσματα των ερευνών που έχουν πραγματοποιηθεί δεν καλύπτουν όλες τις πλευρές του θέματος, και δεν καταλήγουν σε κάποιο αναμφίβολο συμπέρασμα, καθώς επίσης έρχονται συχνά σε αντίθεση μεταξύ τους.

Οι *Jakobsson et al.* το 1985 πραγματοποίησαν μία έρευνα με τη συμμετοχή 38 θηλάζουσων μητέρων. Ανθρώπινο γάλα από τις μητέρες αυτές αναλύθηκε μέσω ραδιοανοσολογικής μεθόδου, για την περιεκτικότητά του σε βόεια β-λακτοσφαιρίνη. Στα μισά περίπου, τυχαία επιλεγμένα, δείγματα ανθρώπινου γάλακτος ανιχνεύτηκε ανοσοδραστική β-λακτοσφαιρίνη (> 5μg/L). Πιο συγκεκριμένα, από τα 38 δείγματα, σε 18 βρέθηκαν ανιχνεύσιμες ποσότητες ανοσοδραστικής β-λακτοσφαιρίνης (5 – 33 μg/L). Το γάλα από τρεις μητέρες, των οποίων τα βρέφη έπασχαν από βρεφικό κολικό, περιείχε υψηλές ποσότητες β-λακτοσφαιρίνης (32, 18 και 14 μg/L αντίστοιχα). Όταν οι μητέρες αυτές εισήλθαν σε δίαιτα χωρίς αγελαδινό γάλα, το περιεχόμενο μειώθηκε σε μη ανιχνεύσιμες ποσότητες για τις δύο από τις τρεις μητέρες, ενώ στην τρίτη μειώθηκε στα 6 μg/L. Και τα τρία βρέφη απαλλάχθηκαν από τους κολικούς που είχαν παρουσιάσει.

Λίγο αργότερα, το 1986, οι *Axelsson et al.* διεξήγαγαν έρευνα με σκοπό τον προσδιορισμό του περιεχομένου βόειας λακτοσφαιρίνης σε δείγματα ανθρώπινου γάλακτος. Τα δείγματα αυτά είχαν συλλεχθεί κατά τη διάρκεια ολόκληρης της γαλακτικής περιόδου, από μητέρες με και χωρίς αλλεργικό ιστορικό. Στόχος ήταν να συσχετιστεί η ποσότητα β-λακτοσφαιρίνης στα δείγματα, με την κατανάλωση αγελαδινού γάλακτος από τις μητέρες, καθώς και με την παρουσία συμπτωμάτων στα βρέφη. Ειδικότερα, συλλέχθηκαν 232 δείγματα από 25 υγιείς Σουηδές μητέρες καθ'όλη τη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου, και αναλύθηκαν με ραδιοανοσολογική μέθοδο για την περιεκτικότητά τους σε βόεια β-λακτοσφαιρίνη. Σε 93 από τα 232 δείγματα γάλακτος (40%) βρέθηκαν ανιχνεύσιμες ποσότητες (5 – 800 μg/L). Σε 6 μητέρες, δεν υπήρχε σε καμία περίπτωση ανιχνεύσιμη ποσότητα β-λακτοσφαιρίνης. Δύο μητέρες είχαν

μετρήσιμη β-λακτοσφαιρίνη σε όλα τα δείγματα γάλακτός τους. Ωστόσο, δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ της ημερήσιας πρόσληψης αγελαδινού γάλακτος και της συγκέντρωσης β-λακτοσφαιρίνης στα δείγματα. Έξι μητέρες με αλλεργικά συμπτώματα όπως άσθμα, αλλεργικό πυρετό, έκζεμα, είχαν όλες ανιχνεύσιμες ποσότητες στο γάλα τους. Από 19 μητέρες χωρίς αλλεργία, οι 13 βρέθηκε να έχουν ανιχνεύσιμες ποσότητες β-λακτοσφαιρίνης. Η διαφορά αυτή όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Η παρουσία συμπτωμάτων στο βρέφος όπως διάρροια, εμετός, κολικοί εξάνθημα, συσχετίστηκε με υψηλά επίπεδα β-λακτοσφαιρίνης στο μητρικό γάλα. Η βόεια β-λακτοσφαιρίνη ανιχνεύτηκε επίσης σε 7 από τα 13 δείγματα ορού γάλακτος. Οι δύο μητέρες με ανιχνεύσιμη β-λακτοσφαιρίνη σε όλα τα δείγματα γάλακτός τους, είχαν τις υψηλότερες τιμές ορού και τα βρέφη τους υπέφεραν από γαστρεντερικά συμπτώματα, μείωση βάρους και εξάνθημα.

Στα πλαίσια έρευνας των *Host, Husby και Osterballe (1988)*, μια ομάδα 1749 νεογνών παρακολούθηθηκε για ενδεχόμενη ανάπτυξη αλλεργίας στο αγελαδινό γάλα (CMA) κατά το πρώτο έτος της ζωής τους. Συνολικά 39 βρέφη πληρούσαν τα κριτήρια για CMA (2,2%). Είκοσι δύο ανέπτυξαν αλλεργία στο αγελαδινό γάλα μετά την εισαγωγή φόρμουλας αγελαδινού γάλακτος ή γάλακτος για εμπορική κατανάλωση στον οργανισμό τους. Από τα 39 βρέφη, τα 17 (8 κορίτσια και 9 αγόρια) εμφάνισαν συμπτώματα που υποδήλωναν αλλεργία στο αγελαδινό γάλα κατά τη διάρκεια του θηλασμού, και σε όλες τις περιπτώσεις, πριν από την ηλικία των τριών μηνών.

Εννέα από τα βρέφη αυτά θήλαζαν αποκλειστικά κατά τη στιγμή της διάγνωσης. Σύμφωνα με τους *Host et al.* κανένα από τα βρέφη δεν είχε σημάδια CMA κατά τη νεογνική περίοδο. Η ανασκόπηση των αρχείων από το βρεφονηπιακό σταθμό, που πραγματοποίησαν, αποκάλυψε ότι και τα εννέα βρέφη είχαν εκτεθεί σε φόρμουλα αγελαδινού γάλακτος σε ποσότητες που αντιστοιχούν σε περίπου 0,4 – 3,0 g β-λακτοσφαιρίνης κατά τις τρεις πρώτες μέρες ζωής τους. Σε επόμενο στάδιο της έρευνας, δείγματα ανθρώπινου γάλακτος από τις μητέρες των εννέα βρεφών αναλύθηκαν με την μέθοδο ELISA για την περιεκτικότητά τους σε βόεια β-Ig. Σε 3 από τα 9 δείγματα βρέθηκαν ανιχνεύσιμες ποσότητες (0,545 ng/mL) έναντι των οποίων τα βρέφη αντέδρασαν κλινικά. Έτσι, η συχνότητα εμφάνισης CMA στις πρωτεΐνες βοείου γάλακτος στο μητρικό γάλα ήταν της τάξης του 0,5% (9/1749) - 1% (17/1749) στον πληθυσμό της

μελέτης, στον οποίο το 52% θήλαζε αποκλειστικά στην ηλικία των τριών μηνών. Η ανάλυση κατανομής μεγέθους με χρωματογραφία διήθησης σε πηκτή που πραγματοποίησαν, σε συνδυασμό με ELISA έδειξαν ένα μοριακό βάρος β-Lg που αντιστοιχεί σε αυτό του μονομερούς β-Lg (18 kD).

Οι εν λόγω επιστήμονες, κατάληξαν στο συμπέρασμα ότι η πρώιμη, περιστασιακή έκθεση σε πρωτεΐνες αγελαδινού γάλακτος, μπορεί να προκαλέσει ευαισθητοποίηση σε νεογνά με προδιάθεση. Η επακόλουθη έκθεση σε μικρές ποσότητες πρωτεϊνών βοείου γάλακτος στο ανθρώπινο γάλα μπορεί να λειτουργήσει ως αναμνηστική δόση προκαλώντας αλλεργικές αντιδράσεις (*Host et al. 1988*).

Οι *Host et al.* επέστρεψαν στην ενασχόληση με το εν λόγω ζήτημα το 1990. Ανέλυσαν τότε 300 δείγματα μητρικού γάλακτος από 10 υγιείς και 10 ατοπικές μητέρες, των οποίων όλα τα παιδιά ήταν υγιή και ακολουθούσαν αποκλειστικό θηλασμό. Τα δείγματα συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια μιας περιόδου 3 εβδομάδων, και αναλύθηκαν με ενζυμική ανοσοπροσροφητική διαδικασία (ELISA) για την περιεκτικότητά τους σε βόεια β-λακτοσφαιρίνη.

Στα πλαίσια ενός cross-over σχεδίου, οι ατοπικές και μη ατοπικές μητέρες ενάλλαξαν την πρόσληψη γάλακτος μεταξύ ομογενοποιημένου και μη ομογενοποιημένου γάλακτος κάθε εβδομάδα. Την 7η ημέρα, κάθε εβδομάδα, λαμβάνονταν διαδοχικά δείγματα γάλακτος πριν και 4, 8, 12 και 24 ώρες μετά από μία εφάπαξ κατάποση 500 ml ομογενοποιημένου ή μη ομογενοποιημένου γάλακτος. Ανιχνεύσιμες ποσότητες β-Lg (0,9 – 150 μg/L, με μέση τιμή 4,2 μg/L) βρέθηκαν σε 19 από τις 20 μητέρες (95%). Πιο συγκεκριμένα, σε 9 από τις 10 ατοπικές μητέρες και σε 10 στις 10 μη ατοπικές μητέρες. Δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ του τύπου παρασκευής γάλακτος (ομογενοποιημένο ή μη) και της παρουσίας του επιπέδου της β-Lg στο ανθρώπινο γάλα. Βρέθηκε μεγάλη διακύμανση του επιπέδου της β-λακτοσφαιρίνης μεταξύ των ατόμων και δεν παρατηρήθηκε σχέση μεταξύ των επιπέδων β-Lg και της ατοπικής κατάστασης των μητέρων. Το διάστημα μεταξύ της κατάποσης 500 ml γάλακτος και της μέγιστης συγκέντρωσης β-Lg σε δίαιτα χωρίς γάλα, κυμαινόταν μεταξύ 4 και 24 ωρών, με μέση τιμή τις 8 ώρες. Η παρουσία β-λακτοσφαιρίνης στο ανθρώπινο γάλα ωστόσο, ήταν ένα κοινό εύρημα τόσο στις ατοπικές όσο και στις μη ατοπικές μητέρες (*Host et al. 1990*).

Οι *Restani et al.* το 2000 διεξήγαγαν μια μελέτη, η οποία είχε ως στόχο να αξιολογήσει την παρουσία πρωτεϊνών βοοειδών στο μητρικό γάλα. Στην έρευνα αυτή συμπεριλήφθηκαν τρεις μητέρες. Μία από αυτές (μητέρα 1, M1) απέκλεισε τα παράγωγα γάλακτος από τη διατροφή της κατά την περίοδο της γαλουχίας (30η ημέρα) αφού το μωρό της εμφάνισε σοβαρά αλλεργικά συμπτώματα. Η μητέρα 2 (M2) ακολουθούσε μικτή δίαιτα και η μητέρα 3 (M3) είχε μια διατροφή πολύ πλούσια σε γάλα και παράγωγα γάλακτος. Τα δείγματα γάλακτος διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση γέλης πολυακρυλαμιδίου δωδεκυλοθεικού νατρίου (SDS-PAGE). Για την ανίχνευση πρωτεϊνών βοοειδών στο ανθρώπινο γάλα, πραγματοποιήθηκε ανοσοσύτρωση χρησιμοποιώντας μονοκλωνικά αντισώματα (MA) ειδικά για β-λακτοσφαιρίνη και βόειες καζεΐνες. Σύμφωνα με τους *Restani et al.* τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης δεν επιβεβαιώνουν την παρουσία πρωτεϊνών βοοειδών στο μητρικό γάλα, που προτείνεται από άλλους συγγραφείς, και δείχνει αναμφίβολα ότι τα αντικρουόμενα αποτελέσματα που αναφέρονται στη βιβλιογραφία σχετικά με την παρουσία β-λακτοσφαιρίνης στο ανθρώπινο γάλα, οφείλονται σε διασταυρούμενη αντιδραστικότητα μεταξύ βόειων πρωτεϊνών γάλακτος και ανθρώπινων πρωτεϊνών. Οι προαναφερθέντες επιστήμονες συμπεραίνουν, ότι συστατικά εκτός από τη βόεια λακτοσφαιρίνη ή τις καζεΐνες θα μπορούσαν να εμπλέκονται στην πρόκληση αλλεργικών συμπτωμάτων σε παιδιά που δεχονται αποκλειστικό θηλασμό.

Δεδομένου ότι η β-λακτοσφαιρίνη είναι η πρωτεΐνη που σχετίζεται συχνότερα με την πρόκληση αλλεργικών συμπτωμάτων σε παιδιά που θηλάζουν αποκλειστικά, αυτή η πρωτεΐνη ορού γάλακτος ήταν η πρώτη που ελήφθη υπόψη στη μελέτη τους. Για να ενισχύσουν τη δυνατότητα ανίχνευσης β-λακτοσφαιρίνης στο ανθρώπινο γάλα, εμπλούτισαν τα δείγματα ανθρώπινου γάλακτος με πρωτεΐνες ορού γάλακτος, κατακρημνίζοντας την καζεΐνη στο ισοηλεκτρικό τους σημείο (pH 4,6).

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη χρήση των τεσσάρων διαφορετικών αντισωμάτων λακτοσφαιρίνης MA φαίνεται να αποκλείουν την παρουσία αυτής της πρωτεΐνης σε μητρικό γάλα για τους εξής λόγους:

- Ένας στα τέσσερα MA (MA33) δεν αναγνωρίζει καμία ζώνη πρωτεΐνης στην περιοχή της β-λακτοσφαιρίνης.
- Τρία MA έδειξαν θετική ανταπόκριση, αλλά αυτό θα μπορούσε να οφείλεται σε διασταυρούμενη αντιδραστικότητα που παρατηρήθηκε με την ανθρώπινη λυσοζύμη.
- Το Rf του ανοσοσυμπλέγματος που παρατηρείται στη μεμβράνη, είναι συγκρίσιμο με αυτό της ανθρώπινης λυσοζύμης (Rf 0,7), το οποίο είναι πολύ κοντά αλλά όχι πανομοιότυπο με αυτό της β-λακτοσφαιρίνης (Rf 0,67).
- Πυκνομετρήσεις γέλης και μεμβράνης δειγμάτων γάλακτος M1 πριν και μετά τη δίαιτα αποκλεισμού του αγελαδινού γάλακτος, δεν έδειξαν διαφορά όσο αφορά στην αφθονία. Όταν η διαφορά είναι εμφανής, υποδηλώνει αύξηση της αντιδραστικότητας μετά την έναρξη της δίαιτας αποκλεισμού του γάλακτος.

Τα παραπάνω δεδομένα δεν επιβεβαιώνουν την παρουσία β-λακτοσφαιρίνης (η χαμηλότερη ανιχνεύσιμη ποσότητα ήταν 0,1 ppm) στο ανθρώπινο γάλα, λόγω των αρνητικών αποτελεσμάτων που ελήφθησαν με ένα MA και της ομοιογένειας της ανοσοαντίδρασης πριν και μετά τον αποκλεισμό του γάλακτος από τη δίαιτα της μητέρας M1. Στις περιπτώσεις των M2 και M3, το πρότυπο της ανοσοαπόκρισης συσχετίζεται άμεσα με την αφθονία της ζώνης που έχει Rf 0,67 (ανθρώπινη λυσοζύμη).

Στο δεύτερο μέρος της μελέτης τους οι *Restani et al.* στόχευσαν στην την παρουσία καζεϊνών αγελαδινής προέλευσης στο μητρικό γάλα. Ωστόσο, όπως και στην περίπτωση των αποτελεσμάτων για την β-λακτοσφαιρίνη, καμία ανοσοαντίδραση δεν θα μπορούσε να συσχετιστεί με ίχνη καζεϊνών βοοειδών. Και εκεί, σύμφωνα με τους συγγραφείς, η διασταυρούμενη αντίδραση με τις πρωτεΐνες του ανθρώπινου γάλακτος είναι εμφανής. Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι δεν είναι δυνατό να επιβεβαιωθεί η παρουσία πρωτεϊνών βοείου γάλακτος στο ανθρώπινο γάλα, ακόμη και μετά από εμπλουτισμό των δειγμάτων. Αυτό υποστηρίζεται επίσης από την έλλειψη συσχέτισης μεταξύ της μητρικής κατάποσης αγελαδινού

γάλακτος και της ανίχνευσης πρωτεϊνών βοοειδών στο μητρικό γάλα, όταν δείγματα από το ίδιο άτομο εξετάστηκαν πριν και μετά τη διακοπή της πρόσληψης αγελαδινού γάλακτος.

Η διασταυρούμενη αντιδραστικότητα έχει προταθεί από διαφορετικούς συγγραφείς οι οποίοι αμφισβήτησαν τη χρησιμότητα της χρήσης μονοκλωνικών αντισωμάτων για τον προσδιορισμό της πραγματικής ποσότητας β-λακτοσφαιρίνης στο ανθρώπινο γάλα. Συγκεκριμένα, οι Bertino et al. το 1996 αναγνώρισαν με τον προσδιορισμό της αλληλουχίας αμινοξέων, ορισμένες πρωτεΐνες ανθρώπινου γάλακτος ικανές να δεσμεύουν τα αντισώματα κατά της β-λακτοσφαιρίνης: λακτοφερρίνη, β-καζεΐνη και α-λακταλβουμίνη (Bertino et al., 1996).

4.2 Μηχανισμός μετανάστευσης πρωτεϊνών αγελαδινού γάλακτος στο μητρικό

Τα βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με κάποιο πιθανό μηχανισμό με τον οποίο να μπορούν οι πρωτεΐνες του αγελαδινού γάλακτος να περάσουν στο μητρικό γάλα, είναι αρκετά περιορισμένα.

Το 2016 οι *Zempleni et al.* προτείνουν έναν τέτοιο μηχανισμό, τα εξωκυτταρικά κυστίδια (EVs), χωρίς η πρόταση αυτή να οδηγεί σε επιβεβαιωμένη διαλεύκανση του ζητήματος. Τα εξωκυτταρικά κυστίδια στο γάλα φιλοξενούν μια ποικιλία ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων λιπιδίων, πρωτεϊνών και μη κωδικοποιημένων RNA και mRNA. Μεταξύ των διαφόρων κατηγοριών ηλεκτρικών οχημάτων, τα εξωσώματα παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, επειδή η ταξινόμηση φορτίου σε εξωσώματα είναι μια ρυθμιζόμενη, μη τυχαία διαδικασία και τα εξωσώματα διαδραματίζουν ουσιαστικούς ρόλους στην επικοινωνία από κύτταρο σε κύτταρο.

Η ενθυσάλκωση σε εξωσώματα παρέχει προστασία έναντι της ενζυματικής και μη ενζυματικής αποικοδόμησης των φορτίων και παρέχει μια οδό για την κυτταρική πρόσληψη φορτίων μέσω ενδοκυττάρωσης των εξωσωμάτων.

Στοιχεία υποδηλώνουν ότι τα εξωσώματα στο βόειο γάλα μεταφέρονται από εντερικά κύτταρα, αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα και μακροφάγα, σε καλλιέργειες ανθρώπινων κυττάρων και τρωκτικών, και τα εξωσώματα βοείου γάλακτος μεταφέρονται σε περιφερειακούς ιστούς σε ποντίκια. Τα στοιχεία υποδηλώνουν επίσης, ότι τα φορτία στα εξωσώματα του βοείου γάλακτος, ιδιαίτερα τα RNA, παραδίδονται στα κυκλοφορούντα ανοσοκύτταρα στον άνθρωπο. Ορισμένα microRNA και mRNA σε εξωσώματα βοείου γάλακτος μπορεί να ρυθμίζουν την έκφραση των ανθρώπινων γονιδίων και να μεταφράζονται σε πρωτεΐνη, αντίστοιχα. Ορισμένα φορτία εξωσώματος είναι ποσοτικά ελάχιστα στη διατροφή σε σύγκριση με την ενδογενή σύνθεση.

Αν και αυξάνονται οι ενδείξεις ότι τα εξωσώματα και τα φορτία τους στο γάλα και σε άλλες διατροφικές πηγές είναι βιοδιαθέσιμα και προκαλούν φαινότυπους σε ανθρώπους και ζώα, εξακολουθούν να υπάρχουν επιστήμονες που αμφισβητούν τη θεωρία ότι τα διατροφικά εξωσώματα και τα φορτία τους απορροφώνται και αλλάζουν την έκφραση γονιδίων, μέσω της

δέσμευσης στο mRNA. Για το λόγο αυτό, απαιτείται να διεξαχθούν περαιτέρω μελέτες ώστε να δοθούν πειστικές απαντήσεις (Zempleni et al., 2000).

5. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΛΛΕΡΓΙΟΓΟΝΩΝ

5.1 Μέθοδοι ανίχνευσης αλλεργιογόνων

Στη βιομηχανία τροφίμων και ποτών, υπάρχει μεγάλη ζήτηση για γρήγορο προσδιορισμό πρωτεϊνών με χαμηλό κόστος. Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες δοκιμές βασίζονται σε χρωματομετρικές διαδικασίες, στις οποίες οι πρωτεΐνες αντιδρούν για να παράγουν έγχρωμα σύμπλοκα. Αυτές οι μέθοδοι εξαρτώνται από έναν αριθμό παραγόντων. Από την απόλυτη ποσότητα πρωτεΐνης, τη σύνθεση των αμινοξέων, την καθαρότητα πρωτεΐνης και την κατάσταση συσχέτισης. Η επιτυχής εφαρμογή αυτών των μεθόδων βασίζεται στη χρήση αντιπροσωπευτικών προτύπων βαθμονόμησης. Υπάρχουν επίσης χρονοβόρες και πολύπλοκες μεθοδολογίες, όπως η τεχνική Kjeldahl και οι διαδικασίες ποσοτικής ανάλυσης αμινοξέων. Εκτός από αυτές τις μεθόδους, και οι βιοαισθητήρες είναι ενδιαφέροντα εργαλεία που προσφέρουν ορισμένα λειτουργικά πλεονεκτήματα έναντι των τυπικών φωτομετρικών μεθόδων, ιδίως όσο αφορά στην ταχύτητα, την ευκολία χρήσης, το κόστος, την απλότητα και την φορητότητα. Με την κατάλληλη επιλογή στοιχείων αναγνώρισης, είναι δυνατό να ανιχνευθεί είτε μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη στόχος, είτε ένα ευρύ φάσμα πρωτεϊνών (*Leca-Bouvier, B., & Blum, L. J. 2005*).

Οι πρωτεΐνες υπάρχουν σε διάφορες συγκεντρώσεις σε δείγματα από ποικίλες προελεύσεις. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο προσδιορισμός της συγκέντρωσής τους. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν διαφορετικές μέθοδοι για την ανίχνευση πρωτεΐνης. Ορισμένες χημικές μέθοδοι βασίζονται στον προσδιορισμό της ποσότητας αζώτου που απελευθερώνεται από την υδρόλυση πρωτεΐνης, η οποία γίνεται διαλυτή παρουσία ενός παράγοντα καθίζησης (π.χ. τριχλωροξικού οξέος). Η τεχνική Kjeldahl βασίζεται στην ανοργανοποίηση του θειικού οξέος και στη μέτρηση της εκλυόμενης αμμωνίας. Αυτή η μέθοδος ρουτίνας, φυσικά δίνει θετικά αποτελέσματα για πολλές αζωτούχες ενώσεις (*Leca-Bouvier, B., & Blum, L. J. 2005*).

Ωστόσο, η ανίχνευση αλλεργιογόνων στα τρόφιμα μπορεί να είναι πολύ δύσκολη, καθώς συχνά υπάρχουν μόνο σε ίχνη ή καλύπτονται από τη μήτρα των τροφίμων. Ένα άλλο ερώτημα που δεν έχει ακόμη απαντηθεί είναι το πόσο ευαίσθητες πρέπει να είναι οι μέθοδοι ανίχνευσης. Υπάρχει γενική συμφωνία, ότι τα όρια ανίχνευσης για διαφορετικά προϊόντα διατροφής πρέπει να είναι κάπου μεταξύ 1 και 100 ppm, ανάλογα με το αντίστοιχο τρόφιμο. Σχεδόν όλα τα αλλεργιογόνα (αντιγόνα) είναι πρωτεΐνες ή γλυκοπρωτεΐνες. Επί του παρόντος, υπάρχουν πολλές τεχνικές δυνατότητες για την ανίχνευση πιθανών αλλεργιογόνων σε προϊόντα διατροφής (*Poms et al., 2004*).

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στοχεύουν είτε στο ίδιο το αλλεργιογόνο (πρωτεΐνη) είτε σε έναν δείκτη που υποδεικνύει την παρουσία της αλλεργιογόνου τροφής. Ενώ προς το παρόν, ο ιδανικός δείκτης είναι η προσβλητική αλλεργιογόνος πρωτεΐνη, η ανίχνευση του αλλεργιογόνου από μόνη της δεν είναι πάντα εφικτή, καθώς οι χημικές ιδιότητες μπορεί να μην είναι καλά χαρακτηρισμένες ή το όριο ανίχνευσης της χρησιμοποιούμενης μεθοδολογίας να είναι ανεπαρκές. Επιπλέον, πολλά αλλεργιογόνα τρόφιμα περιέχουν πολλαπλές αλλεργιογόνες πρωτεΐνες που μπορεί να ποικίλουν σε ποσότητα (*Poms et al., 2004*).

Ως δείκτες για την παρουσία δυνητικά αλλεργιογόνων προϊόντων ή συστατικών τροφίμων, στοχεύονται συγκεκριμένες πρωτεΐνες ή θραύσματα DNA. Οι μέθοδοι που βασίζονται σε πρωτεΐνες συνήθως περιλαμβάνουν πρωτόκολλα ανοσοχημικής ανίχνευσης, όπως η μέθοδος RAST, η μέθοδος αλλεργιορροφητικού ενζύμου (EAST), η ανοσο-ηλεκτροφόρηση RIE, η ανοσοσύπωση (immunoblotting) και η ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία (ELISA). Ενώ οι RIE και ανοσοσύπωση αποδίδουν μόνο ποιοτικά ή ημιποσοτικά αποτελέσματα, οι RAST, EAST και ELISA είναι ποσοτικές μέθοδοι. Προς το παρόν, μόνο η τεχνική ELISA χρησιμοποιείται συνήθως στην ανάλυση τροφίμων λόγω της υψηλής ακρίβειας, του απλού χειρισμού και των καλών δυνατοτήτων τυποποίησης που προσφέρει. Οι μέθοδοι που λειτουργούν σε επίπεδο DNA βασίζονται σε ενίσχυση ενός συγκεκριμένου θραύσματος DNA με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Με την Real Time PCR μπορούν να ληφθούν ποσοτικά αποτελέσματα υψηλής ακρίβειας (*Poms et al., 2004*).

Η επιλογή της μεθόδου εξαρτάται κυρίως από το σχετικό τρόφιμο (διαθεσιμότητα ειδικών αντισωμάτων/ εκκινητών DNA και το εφικτό όριο ανίχνευσης) και από το ιστορικό της επεξεργασίας κατά την παραγωγή των τροφίμων.

5.2 Ανίχνευση βόειων πρωτεϊνών στο μητρικό γάλα

Πρόκειμενου να διαπιστωθεί εάν υπάρχει πιθανότητα να διαρρέουν οι πρωτεΐνες του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων που καταναλώνει η θηλάζουσα μητέρα, στο βρέφος, μέσω του γάλακτος αυτής, είναι απαραίτητη η τόσο η ανίχνευση, όσο και η ποσοτικοποίηση των αλλεργιογόνων που πιθανόν να βρίσκονται στο μητρικό γάλα. Η διαπίστωση αυτή είναι εξαιρετικά σημαντική εάν αναλογιστεί κανείς την πολύ μεγάλη σημασία του μητρικού γάλακτος για την ανάπτυξη των νεογνών, δεδομένου ότι στις περισσότερες περιπτώσεις αποτελεί την μοναδική τροφή τους. Η αξία αυτή φυσικά μειώνεται, όταν το μητρικό γάλα προκαλεί προβλήματα στα βρέφη, τα οποία απορρέουν από κάποια αλλεργική απόκριση του οργανισμού τους.

Η πλέον χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την ανίχνευση αλλεργιογόνων όχι μόνο στο γάλα αλλά και στα περισσότερα τρόφιμα είναι η μέθοδος ELISA.

Γενικά ενζυμικές ανοσοδοκιμές [enzyme immunoassay (EIA), ενζυμικά - συνδεδεμένη ανοσοπροσοφνητική δοκιμασία (ELISA)] ονομάζονται οι ποσοτικές αναλυτικές μέθοδοι που δείχνουν αντιδράσεις αντιγόνου-αντισώματος μέσω της αλλαγής χρώματος που λαμβάνεται με τη χρήση ενός ενζυμικού συζεύγματος και ενζυματικού υποστρώματος και που χρησιμεύουν για τον εντοπισμό της παρουσίας και της συγκέντρωσης μορίων σε βιολογικά υγρά (Aydin S., 2015).

Μόρια πολύ χαμηλά σε συγκέντρωση όπως πεπτίδια/πρωτεΐνες, ορμόνες, βιταμίνες και φάρμακα εμφανίζουν υψηλό επίπεδο ειδικότητας έναντι αντισωμάτων ή αντιγόνων που έχουν αναπτυχθεί για αυτά (Evgall E., 2010; Lequin RM., 2005). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι είναι σχεδόν αδύνατο για το αντισώμα να συνδεθεί με μόριο διαφορετικό από το δικό του αντιγόνο. Έτσι, αυτή η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση ακόμη και ουσιών σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, χωρίς σχεδόν κανέναν κίνδυνο παρεμβολής (Aydin S., 2015).

Με άλλα λόγια, όταν έχουμε ένα αντιγόνο που γνωρίζουμε ότι είναι ειδικό για μια συγκεκριμένη ουσία, μπορούμε να ταυτοποιήσουμε τον τύπο και την ποσότητα του αντισώματός του και όταν έχουμε ένα αντίσωμα, μπορούμε να εντοπίσουμε το ειδικό του αντιγόνο καθώς και την ποσότητά του, χρησιμοποιώντας αυτή τη μέθοδο. Όλες οι τεχνικές και οι μέθοδοι ανάλυσης που χρησιμοποιούν ένζυμα για την εμφάνιση αντιδράσεων αντιγόνου-αντισώματος αναφέρονται γενικά ως ενζυμικές ανοσοδοκιμές (*Evgal E., 2010; Horbeck P., 2001*).

6. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανίχνευση ολικών πρωτεϊνών αγελαδινού γάλακτος σε δείγματα μητρικού γάλακτος, καθώς και η ποσοτικοποίησή τους, εφόσον υπάρχουν. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η ενδεχόμενη παρουσία των πρωτεϊνών αυτών στο μητρικό γάλα, επιφέρει σε μερικές περιπτώσεις δυσάρεστα συμπτώματα στα βρέφη, και για τον λόγο αυτό είναι σημαντικό να αποσαφηνιστούν οι αιτίες που προκαλούν τα συμπτώματα αυτά. Επιπλέον, από την βιβλιογραφική ανασκόπηση που πραγματοποιήθηκε προκύπτει ότι τα δεδομένα προς τον σκοπό αυτό, δεν είναι επαρκή.

7. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ: Υλικά και Μέθοδοι

Για την πραγματοποίηση του παρόντος πειράματος, έγινε χρήση του kit ELISA Ολικών Πρωτεϊνών Γάλακτος Βοοειδών της εταιρίας 3M™, για την ποσοτική ανάλυση των ολικών πρωτεϊνών αγελαδινής προέλευσης. Ο τύπος ELISA που χρησιμοποιεί το kit αυτό είναι η ELISA τύπου sandwich. Οι ολικές πρωτεΐνες γάλακτος βοοειδών που υπάρχουν στο δείγμα αντιδρούν με το αντίστοιχο αντίσωμα, το οποίο έχει προσρροφηθεί στην επιφάνεια των φρεατίων μικροτιτλοδότησης πολυστυρενίου. Μετά την απομάκρυνση των μη δεσμευμένων πρωτεϊνών με πλύσιμο, προστίθενται αντισώματα συζευγμένα με υπεροξειδάση χρένου (HRP). Αυτά τα σεσημασμένα με ένζυμα αντισώματα σχηματίζουν σύμπλοκα με τις προηγουμένως δεσμευμένες πρωτεΐνες. Μετά από ένα δεύτερο στάδιο πλύσης, το ένζυμο που είναι δεσμευμένο στο ανοσορροφητικό ανιχνεύεται με την προσθήκη ενός χρωμογόνου υποστρώματος, της 3,3',5,5'-τετραμεθυλοβενζιδίνης (TMB). Η ανάπτυξη χρώματος από αυτήν την ενζυματική αντίδραση ποικίλλει, ανάλογα με τη συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης γάλακτος βοοειδών στο δείγμα που εξετάστηκε. Έτσι, η απορρόφηση, στα 450 nm, είναι ένα μέτρο της συγκέντρωσης της ολικής πρωτεΐνης γάλακτος βοοειδών στο δείγμα δοκιμής. Η ποσότητα της ολικής πρωτεΐνης γάλακτος βοοειδών στο δείγμα δοκιμής μπορεί να προσδιοριστεί από την πρότυπη καμπύλη, κατασκευασμένη από πρότυπα γνωστής συγκέντρωσης λαμβάνοντας υπόψη την αραίωση του δείγματος.

7.1 Υλικά και Όργανα

Πίνακας 6: Αντιδραστήρια και υλικά που περιέχονταν στο kit

Αντιδραστήριο/Υλικό	Ποσότητα
Βοθρία ELISA ολικών πρωτεϊνών γάλακτος βοοειδών	96 βοθρία
Σύζευγμα ολικών πρωτεϊνών HRP (10X)	1,5 mL
Συμπύκνωμα προτύπου ολικών πρωτεϊνών βοοειδών	1 φιαλίδιο
Αραιωτικό διάλυμα (5X)	50 mL
Διάλυμα έκπλυσης (20X)	50 mL
Ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης E26 (4X)	120 mL
Διάλυμα χρωμογόνου υποστρώματος (TMB)	12 mL
Διάλυμα διακοπής αντίδρασης (Stop Solution)	12 mL

Υλικά και Όργανα που δεν περιέχονταν στο kit:

- αναδευτήρας τύπου Vortex
- υδατόλουτρο
- πλανητικός ανακινητήρας πλακών (planet shaker)
- συσκευή φυγοκέντρησης
- φασματοφωτόμετρο για μικροπλάκες ELISA
- πιπέτες αυτόματης πλήρωσης
- απιονισμένο νερό
- σωλήνες τύπου falcon
- σωλήνες τύπου erpendorf
- διάφορα σκεύη εργαστηρίου για την παρασκευή των αντιδραστηρίων
- χρονόμετρο

7.2 Πειραματική πορεία

7.2.1. Παρασκευή Αντιδραστηρίων

Όλα τα αντιδραστήρια ήρθαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (20-25°C) πριν από τη χρήση.

Έγιναν οι εξής αραιώσεις:

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

7.2.2. Προετοιμασία Δειγμάτων

Δείγματα από 55 θηλάζουσες μητέρες, τα οποία διατηρούνταν σε βαθιά κατάψυξη, χρησιμοποιήθηκαν στο παρόν πείραμα.

1. Αφαίρεση δειγμάτων από την βαθιά κατάψυξη και απόψυξη σε θερμοκρασία δωματίου
2. Προθέρμανση του ρυθμιστικού διαλύματος εκχύλισης στους 50 – 60 °C
3. 0,5 mL δείγματος + 4,5 mL ρυθμιστικού διαλύματος εκχύλισης για την εκχύλιση των πρωτεϊνών
4. Επώαση στους 50 – 60 °C για 25 min σε υδατόλουτρο και ανακίνηση κάθε 5 min για 1 min
5. Φυγοκέντρωση σε 3000 x g για 30 sec
6. Λήψη 100 μL από την μεσαία υδατική στοιβάδα από κάθε δείγμα
7. Αραιώση με 900 μL αραιωτικού διαλύματος και ανάδευση στο Vortex

7.2.3 Παρασκευή Προτύπων

Παρασκευή αραιωμένων προτύπων αμέσως πριν από τη χρήση, ως εξής:

- 10 μL Συμπύκνωματος προτύπου ολικών πρωτεϊνών βοοειδών αραιώθηκαν σε 990 μL αραιωτικού διαλύματος 1X (Πρότυπο 7).
- Το πρότυπο 7 που προέκυψε αναδεύτηκε σε αναδευτήρα τύπου Vortex, και 200 μL από αυτό αραιώθηκαν σε 400 μL αραιωτικού διαλύματος 1X (Πρότυπο 6).
- Ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για την παρασκευή των προτύπων 5, 4, 3, 2 και 1 λαμβάνοντας κάθε φορά 200 μL από το προηγούμενο πρότυπο διάλυμα, ενώ το Πρότυπο 0 περιείχε μόνο 400 mL αραιωτικού 1X.

Πίνακας 7: Προετοιμασία Προτύπων Διαλυμάτων

Αριθμός Προτύπου	Συγκέντρωση Προτύπου (ng/mL)	Όγκος Προτύπου που προστέθηκε στο Αραιωτικό (μL)	Όγκος Αραιωτικού Διαλύματος (μL)
7	810	10 από το αρχικό πρότυπο	990
6	270	200 του 7	400
5	90	200 του 6	400
4	30	200 του 5	400
3	10	200 του 4	400
2	3,3	200 του 3	400
1	1,1	200 του 2	400
0	0	0	400

7.3.4. Διαδικασία Ανάλυσης

1. Εναπόθεση 100 μL από κάθε πρότυπο και 100 μL από κάθε δείγμα σε wells ELISA
2. Επώαση για 30 min στο σκοτάδι, σε επίπεδη θέση και καλυμμένα για αποφυγή εξάτμισης
3. Άδειασμα wells και 4 εκπλύσεις με διάλυμα έκπλυσης
4. Προσθήκη 100 μL HRP σε κάθε well και επώαση για 10 min
5. Επανάληψη 4 εκπλύσεων
6. Προσθήκη 100 μL TMB σε κάθε well και επώαση για 10 min
7. Προσθήκη 100 μL Wash Solution σε κάθε well
8. Προσδιορισμός απορρόφησης στα 450 nm εντός 30 min

8. ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Οι συγκεντρώσεις ολικών πρωτεϊνών αγελαδινού γάλακτος υπολογίστηκαν μέσω της επίλυσης δευτεροβάθμιων εξισώσεων, που προέκυψαν από τις πρότυπες καμπύλες που αντιστοιχούν στις ημέρες εργασίας.

Για τον υπολογισμό των τελικών συγκεντρώσεων ολικών πρωτεϊνών αγελαδινού γάλακτος στα δείγματα μητρικού γάλακτος, λήφθησαν υπόψη και υπολογίστηκαν οι αραιώσεις που έγιναν κατά την πραγματοποίηση του πειράματος. Ειδικότερα, πραγματοποιήθηκαν δύο αραιώσεις. Η κάθε μία 1:10. Συνεπώς, η συνολική αραιώση ήταν 1:100. Αφού λοιπόν υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις από τις τυπικές καμπύλες σε ng/mL, πολλαπλασιάστηκαν με τον συντελεστή αραιώσης, δηλαδή το 100, προκειμένου να ληφθούν οι συγκεντρώσεις στο αρχικό δείγμα.

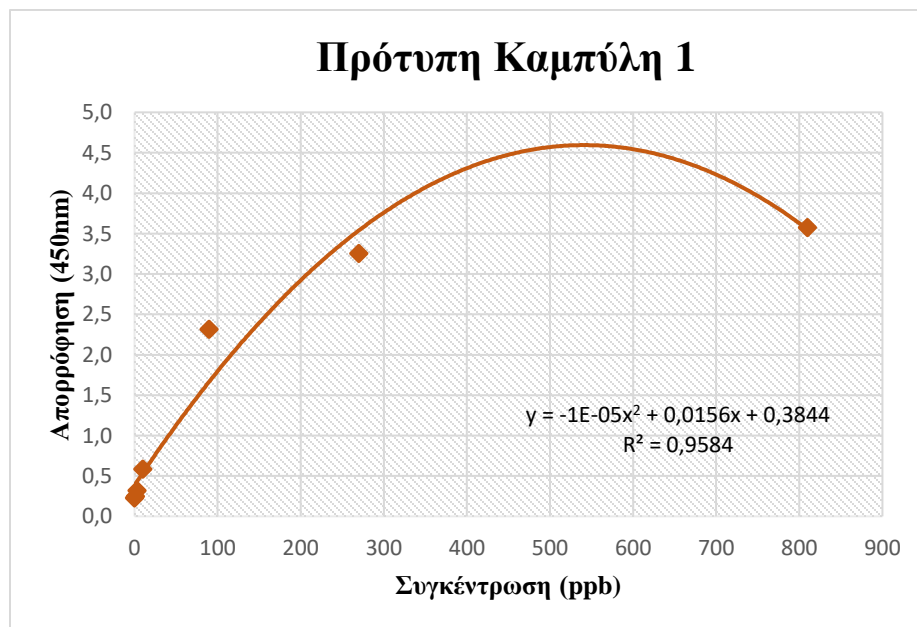
Οι θηλάζουσες μητέρες που παρείχαν τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν κατανάλωναν όλες αγελαδινό γάλα και παράγωγα αυτού στην διατροφή τους κατά την περίοδο της λήψης των δειγμάτων.

Στη συνέχεια, παρατίθενται οι απορροφήσεις των προτύπων και των δειγμάτων που αναλύθηκαν, οι πρότυπες καμπύλες που προέκυψαν, καθώς και οι τελικές συγκεντρώσεις πρωτεϊνών αγελαδινού γάλακτος στα δείγματα μητρικού γάλακτος, που προέκυψαν έπειτα από υπολογισμούς (βλ. Πιν.8 έως Πιν.13).

8.1 Πρότυπη Καμπύλη 1

Πίνακας 8: Δεδομένα Πρότυπης Καμπύλης 1

Απορροφήσεις (450 nm)	Συγκεντρώσεις (ng/mL)
0,228	0
0,249	1,1
0,317	3,3
0,584	10
2,313	90
3,253	270
3,576	810



Εξίσωση Πρότυπης Καμπύλης 1: $y = -1E-05x^2 + 0,0156x + 0,3844$

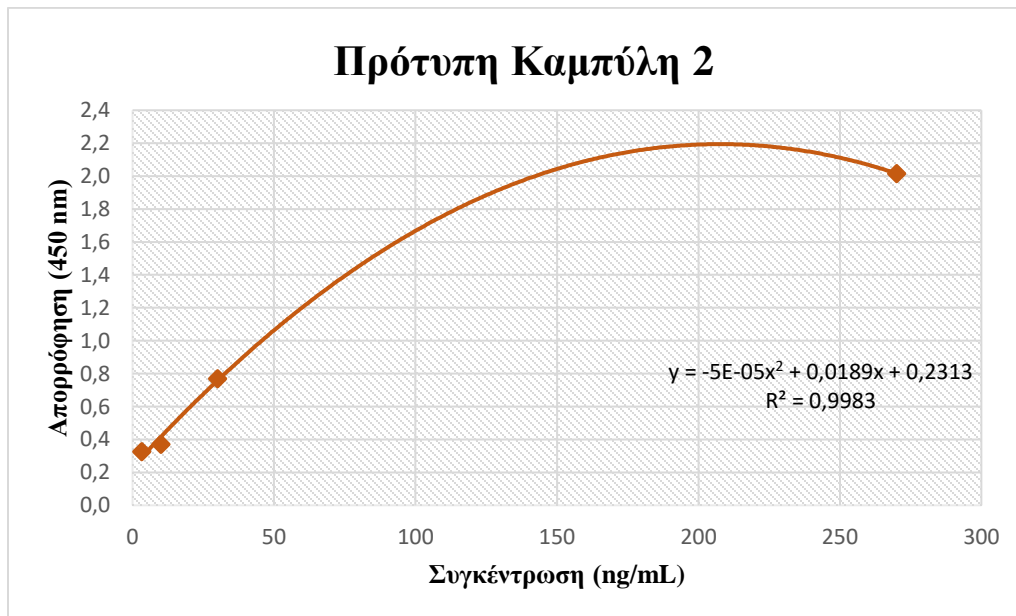
Πίνακας 9: Συγκεντρώσεις Δειγμάτων 1 έως 8

Δείγματα	Απορροφήσεις (450 nm)	Αρχικές Συγκεντρώσεις Δειγμάτων (ng/mL)	Τελικές Συγκεντρώσεις Δειγμάτων (ng/mL)
1	0,139	-15,592	0,000
2	0,287	-6,228	0,000
3	0,199	-11,826	0,000
4	0,199	-11,826	0,000
5	0,172	-13,502	0,000
6	0,168	-13,755	0,000
7	0,292	-5,909	0,000
8	0,349	-2,267	0,000

8.2 Πρότυπη Καμπύλη 2

Πίνακας 10: Δεδομένα Πρότυπης Καμπύλης 2

Απορροφήσεις (450 nm)	Συγκεντρώσεις (ng/mL)
0,326	3,3
0,371	10
0,770	30
2,016	270



Εξίσωση Πρότυπης Καμπύλης 2: $y = -5E-05x^2 + 0,0189x + 0,2313$

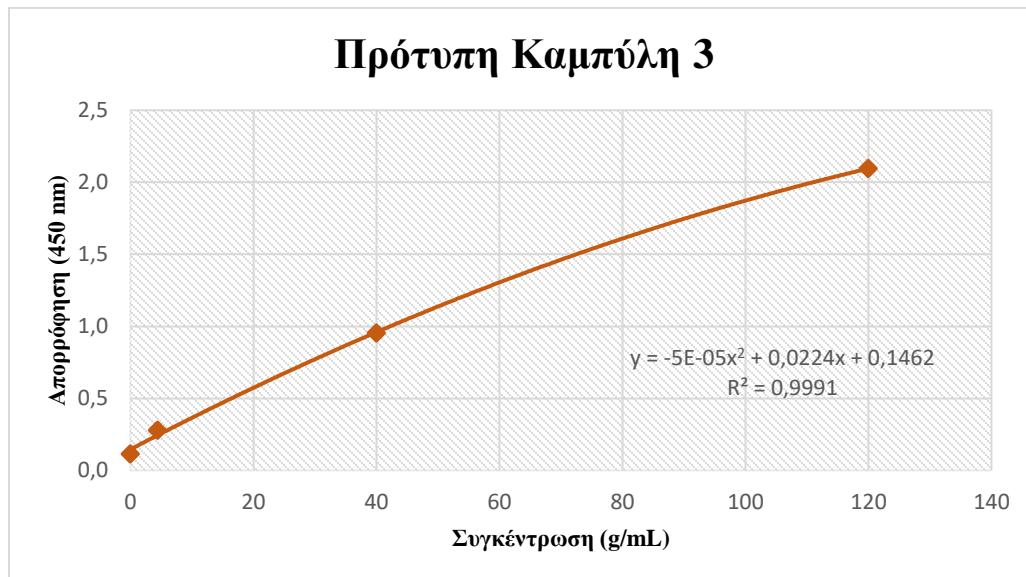
Πίνακας 11: Συγκεντρώσεις Δειγμάτων 9 έως 34

Δείγματα	Απορροφήσεις (450 nm)	Αρχικές Συγκεντρώσεις Δειγμάτων (ng/mL)	Τελικές Συγκεντρώσεις Δειγμάτων (ng/mL)
9	0,109	-6,374	0,000
10	0,089	-7,396	0,000
11	0,084	-7,663	0,000
12	0,075	-8,094	0,000
13	0,245	0,726	72,610
14	0,140	-4,785	0,000
15	0,206	-1,336	0,000
16	0,156	-3,948	0,000
17	0,106	-6,519	0,000
18	0,077	-8,016	0,000
19	0,068	-8,429	0,000
20	0,081	-7,810	0,000
21	0,107	-6,491	0,000
22	0,104	-6,597	0,000
23	0,102	-6,703	0,000
24	0,100	-6,809	0,000
25	0,098	-6,915	0,000
26	0,096	-7,020	0,000
27	0,094	-7,126	0,000
28	0,092	-7,232	0,000
29	0,090	-7,338	0,000
30	0,088	-7,444	0,000
31	0,086	-7,549	0,000
32	0,084	-7,655	0,000
33	0,082	-7,761	0,000
34	0,080	-7,867	0,000

8.3 Πρότυπη Καμπύλη 3

Πίνακας 12: Δεδομένα Πρότυπης Καμπύλης 3

Απορροφήσεις (450 nm)	Συγκεντρώσεις (ng/mL)
0,116	0
0,279	4,4
0,954	40
2,096	120



Εξίσωση Πρότυπης Καμπύλης 3: $y = -5E-05x^2 + 0,0224x + 0,1462$

Πίνακας 13: Συγκεντρώσεις Δειγμάτων 35 έως 55

Δείγματα	Απορροφήσεις (450 nm)	Αρχικές Συγκεντρώσεις Δειγμάτων (ng/mL)	Τελικές Συγκεντρώσεις Δειγμάτων (ng/mL)
35	0,109	-6,374	0,000
36	0,089	-7,396	0,000
37	0,084	-7,663	0,000
38	0,075	-8,094	0,000
39	0,245	0,726	72,610
40	0,140	-4,785	0,000
41	0,206	-1,336	0,000
42	0,156	-3,948	0,000
43	0,106	-6,519	0,000
44	0,077	-8,016	0,000
45	0,068	-8,429	0,000
46	0,081	-7,810	0,000
47	0,107	-6,491	0,000
48	0,104	-6,597	0,000
49	0,102	-6,703	0,000
50	0,100	-6,809	0,000
51	0,098	-6,915	0,000
52	0,096	-7,020	0,000
53	0,094	-7,126	0,000
54	0,092	-7,232	0,000
55	0,090	-7,338	0,000

9. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Διάφορες μελέτες στο παρελθόν ανέφεραν ότι η εμφάνιση ατοπικής δερματίτιδας σε παιδιά που θηλάζουν αποκλειστικά, οφειλόταν στην υπερευαισθησία του παιδιού σε τροφές που περιλαμβάνονται στη διατροφή της μητέρας, όπως σοκολάτα, αγελαδινό γάλα, αυγό, ψάρι και/ή βρώμη.

Ο άμεσος προσδιορισμός των ιχνών αλλεργιογόνων στο ανθρώπινο γάλα, που προέρχονται από τη διατροφή της μητέρας, βελτιώθηκε σημαντικά από την πρόοδο που επιτεύχθηκε στην ανοσοχημική ανάλυση στις αρχές του 21ου αιώνα. Αρκετά έγγραφα ανέφεραν την παρουσία πρωτεϊνών αυγού, γάλακτος και δημητριακών στο γάλα των μητέρων που κατανάλωναν αυτές τις τροφές.

Διάφοροι συγγραφείς έχουν μελετήσει την παρουσία της β-λακτοσφαιρίνης στο ανθρώπινο γάλα, καθώς και τον ρόλο του στην ευαισθητοποίηση στο αγελαδινό γάλα, παιδιών που έχουν λάβει αποκλειστικά μητρικό γάλα. Μέχρι σήμερα, τα διαθέσιμα δεδομένα δεν έχουν καταφέρει να συσχετίσουν την παρουσία του εν λόγω αλλεργιογόνου στο ανθρώπινο γάλα, με την ευαισθητοποίηση των νεογνών (*Restani et al., 2000*).

Τα δεδομένα αυτά μας οδήγησαν στην ενασχόληση με το συγκεκριμένο θέμα. Στην παρούσα έρευνα συμμετείχαν 55 θηλάζουσες μητέρες, οι οποίες συμπεριλάμβαναν στην διατροφή τους το αγελαδινό γάλα και τα παράγωγά του κατά την περίοδο της λήψης των δειγμάτων. Τα δείγματα αυτά αναλύθηκαν με τη μέθοδο ανοσοπροσοφητικής διαδικασίας ELISA για την παρουσία σε αυτά ολικών πρωτεϊνών αγελαδινού γάλακτος. Επιλέχθηκε η ανίχνευση των ολικών πρωτεϊνών, ώστε η έρευνα να καλύψει όλο το φάσμα πρωτεϊνών του αγελαδινού γάλακτος που δύναται να προκαλέσουν αλλεργική απόκριση, προσπαθώντας να ρίξει φως στο ζήτημα αυτό, που προβληματίζει για χρόνια την επιστημονική κοινότητα, την οποία αφορά.

Το Όριο Ανίχνευσης (LOD – Limit of Detection) του ELISA kit που χρησιμοποιήθηκε είναι 5,8 ng/mL και το Όριο Ποσοτικοποίησης (LOQ – Limit of Quantification) 1000 ng/mL. Για το λόγο αυτό οι συγκεντρώσεις που βρίσκονται μεταξύ των ορίων αυτών θεωρούνται αμελητέες.

- Ως Όριο Ανίχνευσης ορίζεται η χαμηλότερη συγκέντρωση του αλλεργιογόνου σε ένα δείγμα που μπορεί να διακριθεί από ένα πραγματικό τυφλό δείγμα σε ένα καθορισμένο επίπεδο πιθανότητας.
- Ως Όριο Ποσοτικοποίησης ορίζεται το χαμηλότερο επίπεδο αλλεργιογόνου σε ένα δείγμα που μπορεί εύλογα να ποσοτικοποιηθεί σε ένα συγκεκριμένο επίπεδο ακρίβειας.

Στους πίνακες 9, 11 και 13 παρατηρούμε ότι από τα 55 δείγματα που αναλύθηκαν, μόνο 2 έχουν δείξει, κατά την ανάλυση, κάποια ποσότητα πρωτεΐνης αγελαδινής προέλευσης. Πρόκειται για τα δείγματα 13 και 39, που και στα δύο βρέθηκε συγκέντρωση 72,610 ng/mL πρωτεΐνη αγελαδινού γάλακτος. Ωστόσο, οι συγκεντρώσεις αυτές λόγω του ότι βρίσκονται κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης, θεωρούνται αμελητέες.

10.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Καταλήγοντας, μόνο σε 2 από τα 55 δείγματα εντοπίστηκαν ίχνη βόειων πρωτεϊνών γάλακτος, σε τόσο μικρές συγκεντρώσεις που θεωρούνται αμελητέες. Επιπλέον, δεν θα πρέπει να παραβλεφθεί το γεγονός, ότι ο αριθμός των δειγμάτων ήταν περιορισμένος, και ότι κάθε δείγμα αναλύθηκε μία φορά. Επίσης, στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων οφείλουν να συνυπολογιστούν πιθανές διασταυρούμενες αντιδράσεις καθώς και τυχαία σφάλματα.

Το μητρικό γάλα αποτελεί εξαιρετική τροφή για τα νεογνά καθώς μπορεί να τους προσφέρει όλα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά που απαιτούνται για την υγιή ανάπτυξή τους. Για τον λόγο αυτό, είναι πολύ σημαντικό να διαλευκανθούν οι αιτίες που προκαλούν τα δυσάρεστα συμπτώματα αλλεργίας στα νεογνά που θηλάζουν κατ' αποκλειστικότητα. Με αυτό τον τρόπο, η επιστήμη θα μπορέσει να προχωρήσει προς την πρόληψη αυτών των καταστάσεων, και την βελτίωση της ποιότητας των πρώτων μηνών ζωής των βρεφών που εμφανίζουν τις ανωτέρω αλλεργικές αντιδράσεις.

Πλήθος επιστημόνων έχει ασχοληθεί στις έρευνές του με αυτό το ζήτημα. Ωστόσο, από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας φαίνεται πως τα αποτελέσματα των πραγματοποιημένων ερευνών ποικίλουν, και ενώ κάποια συμπίπτουν με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, άλλα αντιτίθενται σε αυτά.

Τα αποτελέσματα των Jakobsson et al. οι οποίοι εντόπισαν σε 18 από ένα σύνολο 38 δειγμάτων ανιχνεύσιμες ποσότητες ανοσοδραστικής β-λακτοσφαιρίνης, και των Axelsson et al που ανίχνευσαν βόεια β-λακτοσφαιρίνη στο 40% των δειγμάτων που εξέτασαν, έρχονται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Αντίθετα, το συμπέρασμα των Restani et al, ότι τα αποτελέσματά τους δεν επιβεβαιώνουν την παρουσία πρωτεϊνών βοοειδών στο μητρικό γάλα, συμπίπτει με τα αποτελέσματα και το συμπέρασμα του παρόντος πειράματος.

Οι Restani et al, επιπλέον ισχυρίζονται πως τα αντικρουόμενα αποτελέσματα που αναφέρονται στη βιβλιογραφία σχετικά με την παρουσία β-λακτοσφαιρίνης στο ανθρώπινο γάλα, οφείλονται σε διασταυρούμενη αντιδραστικότητα μεταξύ βόειων πρωτεϊνών γάλακτος και ανθρώπινων πρωτεϊνών, και συμπεραίνουν πως συστατικά εκτός από τη βόεια

λακτοσφαιρίνη ή τις καζεΐνες θα μπορούσαν να εμπλέκονται στην πρόκληση αλλεργικών συμπτωμάτων σε παιδιά που διατρέφονται αποκλειστικά με το θηλασμό. Οι Host et al. συμπέραναν ότι η πρώιμη, περιστασιακή έκθεση σε πρωτεΐνες αγελαδινού γάλακτος, μπορεί να προκαλέσει ευαισθητοποίηση σε νεογνά με προδιάθεση και ότι η επακόλουθη έκθεση σε μικρές ποσότητες πρωτεϊνών βοείου γάλακτος στο ανθρώπινο γάλα, μπορεί να λειτουργήσει ως αναμνηστική δόση προκαλώντας αλλεργικές αντιδράσεις.

Συμπερασματικά, έπειτα από την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας, αλλά και της ανασκόπησης των βιβλιογραφικών δεδομένων, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η μετανάστευση των πρωτεϊνών του αγελαδινού γάλακτος από την διατροφή της μητέρας, στο νεογνό, μέσω του μητρικού γάλακτος δεν επιβεβαιώνεται. Από την άλλη πλευρά, δεδομένου ότι τα συμπτώματα ορισμένων θηλανζόντων παιδιών με ατοπικές αντιδράσεις βελτιώνονται όταν οι μητέρες ξεκινούν μια δίαιτα αποκλεισμού του γάλακτος και των παραγόντων του, πρέπει να συμπεράνουμε ότι συστατικά άλλα από τη βόεια λακτοσφαιρίνη ή τις καζεΐνες, και γενικότερα των πρωτεϊνών του αγελαδινού γάλακτος εμπλέκονται στην πρόκληση των κλινικών συμπτωμάτων.

Λόγω των ανωτέρω διαπιστώσεων, περαιτέρω έρευνα θα πρέπει να επικεντρωθεί σε άλλα συστατικά του γάλακτος, ή και άλλων τροφών που καταναλώνει η μητέρα στη διατροφή της, καθώς και στον εντοπισμό πιθανών μηχανισμών μετανάστευσης των συστατικών αυτών στο γάλα της μητέρας.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Andreas, N. J., Kampmann, B., & Le-Doare, K. M. (2015). Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early human development*, 91(11), 629-635.
- AXELSSON, I., JAKOBSSON, I., LINDBERG, T., & BENEDIKTSSON, B. (1986). Bovine β -lactoglobulin in the human milk: a longitudinal study during the whole lactation period. *Acta Paediatrica*, 75(5), 702-707.
- Aydin, S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, 72, 4-15.
- Bernard, A., Delamarche, E., Schmid, H., Michel, B., Bosshard, H. R., & Biebuyck, H. (1998). Printing patterns of proteins. *Langmuir*, 14(9), 2225-2229.
- Bertino E, Prandi GM, Fabris C, et al. Human milk proteins may interfere in ELISA measurements of bovine -lactoglobulin in human milk. *Acta Paediatr* 1996;85:543–549.
- Busse, P. J., Razvi, S., & Cunningham-Rundles, C. (2002). Efficacy of intravenous immunoglobulin in the prevention of pneumonia in patients with common variable immunodeficiency. *Journal of allergy and clinical immunology*, 109(6), 1001-1004.
- Coppa GV, Gabrielli O, Pierani P, Catassi C, Carlucci A, Giorgi PL. Changes in carbohydrate composition in human milk over 4 months of lactation. *Pediatrics* 1993;91(3):637–41.
- Crowley, S. V. (2016). Physicochemical characterisation of protein ingredients prepared from milk by ultrafiltration or microfiltration for application in formulated nutritional products.
- Dalgleish, D. G., Spagnuolo, P. A., & Goff, H. D. (2004). A possible structure of the casein micelle based on high-resolution field-emission scanning electron microscopy. *International Dairy Journal*, 14(12), 1025-1031.
- Docena, G. H., Fernandez, R., Chirido, F. G., & Fossati, C. A. (1996). Identification of casein as the major allergenic and antigenic protein of cow's milk. *Allergy*, 51(6), 412-416.
- El-Agamy, E. I. (2007). The challenge of cow milk protein allergy. *Small Ruminant Research*, 68(1-2), 64-72.
- Engvall, E. (2010). The ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay. *Clinical Chemistry*, 56(2), 319-320.
- Garwolińska, D., Namieśnik, J., Kot-Wasik, A., & Hewelt-Belka, W. (2018). Chemistry of human breast milk—A comprehensive review of the composition and role of milk metabolites in child development. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(45), 11881-11896.
- German JB, Freeman SL, Lebrilla CB, Mills DA. Human milk oligosaccharides: evolution, structures and bioselectivity as substrates for intestinal bacteria. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program* 2008;62:205–18 [discussion 18–22].
- Goldman, A. S., Anderson Jr, D. W., Sellers, W. A., Saperstein, S., Kniker, W. T., & Halpern, S. R. (1963). Milk allergy: I. Oral challenge with milk and isolated milk proteins in allergic children. *Pediatrics*, 32(3), 425-443.
- Goulding, D. A., Fox, P. F., & O'Mahony, J. A. (2020). Milk proteins: An overview. *Milk proteins*, 21-98.
- Guo, M. Human Milk Biochemistry and Infant Formula. In *Manufacturing Technology*; Elsevier: Cambridge, UK, 2014

- Haug, A., Høstmark, A. T., & Harstad, O. M. (2007). Bovine milk in human nutrition—a review. *Lipids in health and disease*, 6(1), 1-16.
- HØST, A., HUSBY, S., & ØSTERBALLE, O. (1988). A prospective study of cow's milk allergy in exclusively breast-fed infants: incidence, pathogenetic role of early inadvertent exposure to cow's milk formula, and characterization of bovine milk protein in human milk. *Acta Pædiatrica*, 77(5), 663-670.
- Høst, A., Husby, S., Hansen, L. G., & Østerballe, O. (1990). Bovine β -1actoglobulin in human milk from atopic and non-atopic mothers. Relationship to maternal intake of homogenized and unhomogenized milk. *Clinical & Experimental Allergy*, 20(4), 383-387.
- JAKOBSSON, I., LINDBERG, T., BENEDIKTSSON, B., & HANSSON, B. G. (1985). Dietary Bovine β Mactoglobulin is Transferred to Human Milk. *Acta Paediatrica*, 74(3), 342-345.
- Järvinen, K. M., Beyer, K., Vila, L., Chatchatee, P., Busse, P. J., & Sampson, H. A. (2002). B-cell epitopes as a screening instrument for persistent cow's milk allergy. *Journal of allergy and clinical immunology*, 110(2), 293-297.
- Järvinen, K. M., Chatchatee, P., Bardina, L., Beyer, K., & Sampson, H. A. (2001). IgE and IgG binding epitopes on α -lactalbumin and β -lactoglobulin in cow's milk allergy. *International archives of allergy and immunology*, 126(2), 111-118.
- Lauritzen, L., & Carlson, S. E. (2011). Maternal fatty acid status during pregnancy and lactation and relation to newborn and infant status. *Maternal & child nutrition*, 7, 41-58.
- Leca-Bouvier, B., & Blum, L. J. (2005). Biosensors for protein detection: a review. *Analytical Letters*, 38(10), 1491-1517.
- Lequin, R. M. (2005). Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clinical chemistry*, 51(12), 2415-2418.
- Lønnerdal, B. (2004). Human milk proteins. *Protecting Infants through Human Milk*, 11-25.
- Martin, C. R., Ling, P. R., & Blackburn, G. L. (2016). Review of infant feeding: key features of breast milk and infant formula. *Nutrients*, 8(5), 279.
- Munblit, D., Perkin, M. R., Palmer, D. J., Allen, K. J., & Boyle, R. J. (2020). Assessment of evidence about common infant symptoms and cow's milk allergy. *JAMA pediatrics*, 174(6), 599-608.
- Poms, R. E., Klein, C. L., & Anklam, E. (2004). Methods for allergen analysis in food: a review. *Food additives and contaminants*, 21(1), 1-31.
- Restani, P., Gaiaschi, A., Plebani, A., Beretta, B., Velona, T., Cavagni, G., ... & Galli, C. L. (2000). Evaluation of the presence of bovine proteins in human milk as a possible cause of allergic symptoms in breast-fed children. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 84(3), 353-360.
- Schmidt, D. G. (1982). Association of caseins and casein micelle structure. *Developments in dairy chemistry*, 1, 61-86.
- Sharma, R., Chisti, Y., & Banerjee, U. C. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology advances*, 19(8), 627-662.
- Taylor, W. R. (1986). Identification of protein sequence homology by consensus template alignment. *Journal of molecular biology*, 188(2), 233-258.
- Zempleni, J., Aguilar-Lozano, A., Sadri, M., Sukreet, S., Manca, S., Wu, D., ... & Mutai, E. (2017). Biological activities of extracellular vesicles and their cargos from bovine and human milk in humans and implications for infants. *The Journal of nutrition*, 147(1), 3-10.

D'Alessandro, A., Scaloni, A., & Zolla, L. (2010). Human milk proteins: an interactomics and updated functional overview. *Journal of proteome research*, 9(7), 3339-3373.

Donovan, S. M. (2019). Human milk proteins: composition and physiological significance. In *Human milk: composition, clinical benefits and future opportunities* (Vol. 90, pp. 93-101). Karger Publishers.