

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΑΓΡΟΤΙΚΩΝ ΖΩΩΝ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΕΠΙΠΕΔΟΥ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΩΝ ΜΗΤΕΡΩΝ ΣΤΟ  
ΤΕΛΟΣ ΤΗΣ ΚΥΗΣΗΣ ΚΑΙ ΚΑΤΑ ΤΗ ΓΑΛΟΥΧΙΑ ΣΕ  
ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΤΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ ΤΩΝ ΑΠΟΓΟΝΩΝ ΣΤΟ  
ΠΡΟΒΑΤΟ**

***ΚΑΤΣΑΦΑΛΟΥ ΑΓΓΕΛΙΚΗ***

*Κτηνίατρος*

**Εξεταστική Επιτροπή:**

Χαδιώ Σ., Αν. Καθηγήτρια  
Μπαλάσκας Χ. Επ. Καθηγητής  
Χάγερ Α. Επ. Καθηγήτρια

**Αθήνα, Ιανουάριος 2013**

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΑΓΡΟΤΙΚΩΝ ΖΩΩΝ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΕΠΙΠΕΔΟΥ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΩΝ ΜΗΤΕΡΩΝ ΣΤΟ  
ΤΕΛΟΣ ΤΗΣ ΚΥΗΣΗΣ ΚΑΙ ΚΑΤΑ ΤΗ ΓΑΛΟΥΧΙΑ ΣΕ  
ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΤΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ ΤΩΝ ΑΠΟΓΟΝΩΝ ΣΤΟ  
ΠΡΟΒΑΤΟ**

***ΚΑΤΣΑΦΑΛΟΥ ΑΓΓΕΛΙΚΗ***

*Κτηνίατρος*

**Εξεταστική Επιτροπή:**

Χαδιώ Σ., Αν. Καθηγήτρια  
Μπαλάσκας Χ. Επ. Καθηγητής  
Χάγερ Α. Επ. Καθηγήτρια

**Αθήνα, Ιανουάριος 2013**

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν στην υλοποίηση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής.

Καταρχάς, την επιβλέπουσα της μεταπτυχιακής εργασίας μου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα. Στυλιανή Χαδιώ, για την ανάθεση του θέματος της μελέτης, την επιστημονική καθοδήγηση, τη παροχή βιβλιογραφίας και τη συνεχή συμπαράστασή της καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της μελέτης μου.

Τον Τακτικό Ερευνητή, δόκτορα κ. Βλαδίμηρο Χριστοδούλου και την Δόκιμη Ερευνήτρια, δόκτορα κ. Βασιλική Κοτσάμπαση για τη διεκπεραίωση της πειραματικής διαδικασίας στο Ινστιτούτο Κτηνοτροφίας Γιαννιτσών, ΕΛΓΟ- ΔΗΜΗΤΡΑ και για τη συνεχή βοήθεια και καθοδήγηση στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

Τον Επίκουρο Καθηγητή της Γεωπονικής Σχολής Θεσσαλονίκης, κ. Γεώργιο Μιχαηλίδη για τις πολύτιμες υποδείξεις του και τη βοήθειά του στον προσδιορισμό της έκφρασης των Toll like υποδοχέων.

Τον Επίκουρο Καθηγητή Κωνσταντίνο Μουντζούρη για την καθοδήγησή του και τις χρήσιμες υποδείξεις του, ιδιαίτερα σε ό,τι αφορά την αντιοξειδωτική ικανότητα, η εκτίμηση της οποίας έγινε σε συνεργασία με το εργαστήριο Φυσιολογίας Θρέψεως και Διατροφής του Τμήματος Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών, καθώς και τον υποψήφιο διδάκτορα του παραπάνω εργαστηρίου κ. Βασίλη Παρασκευά για την πολύτιμη βοήθεια κατά τη διάρκεια των μετρήσεων.

Την Καθηγήτρια κ.. Έφη Τσακαλίδου, Διευθύντρια του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών που μου έδωσε τη δυνατότητα να χρησιμοποιήσω τον εξοπλισμό του Εργαστηρίου για τη χημική ανάλυση των δειγμάτων γάλακτος καθώς και το μέλος ΕΤΕΠ κ. Πάσχο Θεόδωρο για τη καθοδήγηση του στη χρήση του Milcoscan.

Επίσης τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Χρήστο Μπαλάσκα και την Επίκουρη Καθηγήτρια κα. Αριάδνη Χάγερ για τις πολύτιμες συμβουλές και υποδείξεις τους κατά τη συγγραφή της μελέτης.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη ΕΕΔΠ κ. Δημήτριο Καλογιάννη για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση που μου πρόσφερε στη διεξαγωγή των εργαστηριακών αναλύσεων, καθώς και ΕΤΕΠ κ. Θεόδωρο Βαγγελή για τη βοήθειά του σε ό,τι και αν χρειάστηκα στους χώρους του εργαστηρίου.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>A.</b>	<b>Περίληψη</b>	<b>1</b>
<b>B.</b>	<b>Abstract</b>	<b>2</b>
<b>Γ</b>	<b>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	<b>4</b>
<b>1.</b>	<b>Εισαγωγή</b>	<b>5</b>
<b>2.</b>	<b>Διατροφή και Ανοσία</b>	<b>6</b>
<b>3.</b>	<b>Έμφυτη και Επίκτητη ανοσία</b>	<b>8</b>
3.1	Ανοσοσφαιρίνες	10
3.2	Υποδοχείς Toll- like (TLRs)	11
3.3	Κυτταροκίνες	14
3.4	Θύμος αδένας	16
<b>4.</b>	<b>Μηχανισμοί μεταφοράς ανοσίας- Ρόλος πρωτογάλακτος</b>	<b>17</b>
4.1.	Μεταφορά ανοσίας στον απόγονο	17
4.2.	Πρωτόγαλα- Σύσταση	18
4.3	Μετάβαση πρωτογάλακτος σε γάλα	23
4.4	Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα πρωτογάλακτος και γάλακτος	24
<b>5.</b>	<b>« Προγραμματισμός» του ανοσοποιητικού συστήματος - ο ρόλος της μητρικής διατροφής</b>	<b>25</b>

<b>Δ.</b>	<b>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	<b>27</b>
<b>1.</b>	<b>Σκοπός</b>	<b>28</b>
<b>2.</b>	<b>Υλικά και μέθοδοι</b>	<b>28</b>
2.1	Πειραματικός σχεδιασμός	28
2.2	Προσδιορισμοί	30
2.3	Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων	32
<b>3.</b>	<b>Αποτελέσματα- Σχολιασμός</b>	<b>32</b>
<b>Ε.</b>	<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>	<b>47</b>
<b>ΣΤ.</b>	<b>ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ</b>	<b>47</b>
<b>Ζ.</b>	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ</b>	<b>48</b>

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΕΠΙΠΕΔΟΥ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΩΝ ΜΗΤΕΡΩΝ ΣΤΟ ΤΕΛΟΣ  
ΤΗΣ ΚΥΗΣΗΣ ΚΑΙ ΚΑΤΑ ΤΗ ΓΑΛΟΥΧΙΑ ΣΕ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ΤΗΣ  
ΑΝΟΣΙΑΣ ΤΩΝ ΑΠΟΓΟΝΩΝ ΣΤΟ ΠΡΟΒΑΤΟ**

**ΚΑΤΣΑΦΑΛΟΥ ΑΓΓΕΛΙΚΗ**

*Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών, Εργαστήριο  
Ανατομίας και Φυσιολογίας Αγροτικών Ζώων, Ιερά Οδός 75, Αθήνα, 11855, email:  
shad@aua.gr*

***Περίληψη***

Σκοπός της μελέτης ήταν να εξεταστεί η επίδραση της διατροφής κατά το τέλος της κύησης ή/ και κατά τη γαλουχία στη σύσταση του πρωτογάλακτος σε ανοσολογικούς παράγοντες καθώς και σε παραμέτρους ανοσίας στους απογόνους στο πρόβατο.

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν έγκυες προβατίνες φυλής Χίου, που χωρίστηκαν σε τρεις ομοιόμορφες ομάδες, ως προς το Σ.Β., την ετήσια γαλακτοπαραγωγή και τον αριθμό των προηγούμενων τοκετών. Η μία ομάδα (μάρτυρας) διατράφηκε στο 100% των αναγκών της καθ' όλη τη διάρκεια της κύησης και της γαλουχίας, η 2<sup>η</sup> ομάδα (Y1) στο 50% των αναγκών της σε ενέργεια και ΟΑΟ κατά τη γαλουχία μέχρι τον απογαλακτισμό και η 3<sup>η</sup> ομάδα (Y2) στο 50% σε ενέργεια και ΟΑΟ κατά τις 20 τελευταίες ημέρες της κύησης και κατά τη γαλουχία. Μετά τον τοκετό διατηρήθηκαν στην πειραματική διαδικασία μόνον όσες γέννησαν δύο αμνούς, M(n=10), Y1 (n=10) και Y2 (n=13). Δείγματα πρωτογάλακτος ελήφθησαν 3, 10 και 18 ώρες μετά τον τοκετό για τον προσδιορισμό: α) της χημικής σύστασης, β) της αντιοξειδωτικής ικανότητας, γ) της συγκέντρωσης της γ- ανοσοσφαιρίνης και δ) της ιντερλευκίνης 10. Επίσης ελήφθησαν δείγματα γάλακτος μία εβδομάδα μετά τον τοκετό καθώς και κατά τον απογαλακτισμό με στόχο τον προσδιορισμό της χημικής σύστασης και της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Οι αμνοί, σε ηλικία πέντε περίπου μηνών θυσιάστηκαν, M (n=19), Y1 (n=20) και Y2 (n=25) και ελήφθησαν δείγματα ιστών για τον προσδιορισμό των Toll- like υποδοχέων.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το βάρος των μητέρων, κατά τον απογαλακτισμό, ήταν σημαντικά μικρότερο ( $P<0.05$ ) στην Y2 ομάδα. Το βάρος γέννησης των αμνών δεν διέφερε στις ομάδες επέμβασης, ενώ η Μ.Η.Α.Σ.Β. ήταν σημαντικά μειωμένη ( $p<0.05$ ) στους αρσενικούς της Y1 ομάδας και στους θηλυκούς και των δύο υποσιτισμένων ομάδων. Σημαντική μείωση ( $p<0.05$ ) της λακτόζης παρατηρήθηκε στα δείγματα πρωτογάλακτος των 18 ωρών της Y2 ομάδας, ενώ καμία άλλη παράμετρος της χημικής σύστασης δεν επηρεάστηκε. Όσον αφορά τη συγκέντρωση των ανοσοσφαιρινών, παρουσιάστηκε τάση αύξησης της συγκέντρωσής τους ( $p>0.05$ ) και στις δύο ομάδες των υποσιτισμένων ζώων, αύξηση η οποία έγινε σημαντική ( $p<0.05$ ) στο πρωτόγαλα των 3 ωρών της Y2 ομάδας, όταν οι IgG εκφράστηκαν ως προς τις ολικές πρωτεΐνες. Η συγκέντρωση της ιντερλευκίνης 10 δεν επηρεάστηκε από τον υποσιτισμό αλλά παρουσίασε σημαντική θετική συσχέτιση με τις IgG ( $p<0.05$ ) στο

πρωτόγαλα των 18 ωρών της ομάδας M. Επιπρόσθετα, ούτε η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πρωτογάλακτος και γάλακτος επηρεάστηκε από τον υποσιτισμό. Στους απογόνους, εκφράστηκαν όλοι οι υποδοχείς toll- like σε δείγματα ιστών του θύμου αδένα, εκτός του TLR10, ενώ οι TLR2, TLR4, TLR9 εμφάνισαν σημαντική αύξηση ( $p < 0.05$ ) στις υποσιτισμένες ομάδες.

*Λέξεις Κλειδιά:* ανοσία, γάλα, προγραμματισμός, πρόβατο, πρωτόγαλα

## **Abstract**

Accumulating data support the hypothesis of ‘developmental programming’, which proposes that alterations in maternal nutrition and endocrine status lead to permanent adaptations in fetal homeostatic mechanisms, producing long-term changes in physiology and determine susceptibility to later disease. The developing immune system may be particularly vulnerable. Apart from effects of nutrition *in utero*, another programming pathway involves placental or colostrum transfer of maternal immune factors with immunomodulatory functions (e.g. cytokines).

The aim of the present study was to examine the effects of maternal nutrient restriction imposed during late gestation or/and during lactation on colostrum synthesis and on some immunological parameters in the offspring. Pregnant ewes were fed to 100% of Metabolizable Energy and Crude Protein requirements throughout pregnancy and lactation, (Control) or to 50% during lactation (R1) and to 50% during the last 20 days of pregnancy and lactation (R2).

Colostrum samples were obtained at 3, 10 and 18 hours after parturition for the determination of chemical synthesis and antioxidant capacity, as well as for IgG and interleukin 10 concentrations. At the age of 5 months, lambs from each group C (n=19), R1 (n=20), R2 (n=25) were sacrificed and a number of tissues (thymus, liver, gonads) were collected.

Maternal body weight at weaning was significantly lower in R2 compared to other two groups ( $p < 0.05$ ). Lamb birth weight did not differ between groups, while daily weight gain was significantly lower ( $p < 0.05$ ) in males of R1 group and females of both undernourished groups. A significant reduction ( $p < 0.05$ ) in the percentage of lactose was detected in the 18 hrs colostrum, while no other parameter of the colostrum composition was affected. Total antioxidant capacity of the colostrum was not influenced by the undernutrition. Concerning IgG concentration a tendency for an increase was observed in both groups of underfed animals, which reached significance ( $p < 0.05$ ), after expressed as percentage of total protein in the 3 hrs colostrum samples of R2 group. Interleukin 10 concentration was not affected by different nutritional perturbations, but a positive correlation between inteleukin 10 and IgG levels was detected in 18 hrs samples. In specimens of thymus gland all toll like receptors were



expressed, except for TRL 10. A significant increase ( $p < 0.05$ ) in the expression of TLR2, TLR4 and TLR9 was evident in both groups of undernourished lambs.

***Key Words:*** *colostrum, programming, immunity, milk, sheep*

## ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Είναι σήμερα αποδεκτό ότι το ενδομήτριο περιβάλλον μπορεί να επηρεάσει καθοριστικά το φαινότυπο του ενήλικου οργανισμού. Μια σειρά από πειραματικά και επιδημιολογικά δεδομένα υποστηρίζουν τη θεωρία του «εμβρυϊκού προγραμματισμού», σύμφωνα με την οποία δυσμενείς επιδράσεις κατά την ενδομήτριο ζωή μπορεί επηρεάσουν διάφορα στάδια ανάπτυξης και να προγραμματίσουν μια σειρά από δομικές και φυσιολογικές προσαρμογές του εμβρύου, που μπορεί να οδηγήσουν σε μόνιμες αλλαγές κατά την ενήλικη ζωή (Barker et al. 1989). Περιβαλλοντικά, ορμονικά, αλλά και διατροφικά αίτια μπορεί να δράσουν ως παράγοντες προγραμματισμού. Η διατροφή της μητέρας κατά την κύηση θεωρείται ως ένας σημαντικός πυροδοτικός μηχανισμός εμβρυϊκού προγραμματισμού. Το έμβρυο «αντιλαμβάνεται» το περιβάλλον στο οποίο αναπτύσσεται και προδιαγράφει το περιβάλλον στο οποίο θα γεννηθεί και θα αναπτυχθεί. Πιθανή όμως δυσαρμονία μεταξύ ενδο- και εξωμητρίου περιβάλλοντος ως προς τη διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών μπορεί να οδηγήσει σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις. Τα κρίσιμα στάδια ανάπτυξης μπορεί να εκτείνονται από την περί τη σύλληψη περίοδο μέχρι και την περίοδο μετά τον τοκετό και κατά τη γαλουχία.

Ο εμβρυϊκός προγραμματισμός μπορεί να περιλαμβάνει δομικές και λειτουργικές αλλαγές σε γονίδια, κύτταρα, ιστούς ή και ολόκληρα όργανα και συστήματα. Οι μοριακοί μηχανισμοί που διέπουν τα φαινόμενα αυτά αποτελούν πεδίο έντονης ερευνητικής δραστηριότητας τα τελευταία χρόνια. Η μητρική διατροφή μπορεί να προκαλέσει επιγενετικές μεταβολές (π.χ. μεθυλίωση DNA) και τροποποίηση της έκφρασης των γονιδίων, με αποτέλεσμα αλλαγές στην κυτταρική δομή και λειτουργία και τελικά στη μορφολογία και τη φυσιολογία ιστών και οργάνων (Langley- Evans 2004).

Μέχρι σήμερα οι επιδράσεις του εμβρυϊκού προγραμματισμού έχουν μελετηθεί κυρίως ως προς τα αποτελέσματα τους στην εκδήλωση καρδιοαγγειακών (Barker et al. 1993a, Ozaki et al. 2001), μεταβολικών νοσημάτων και νεφρικής δυσλειτουργίας (Bertram and Hanson 2011) στους απογόνους, όπως στεφανιαία νόσο (Barker et al. 1989), υπέρταση (Barker et al. 1990), σακχαρώδη διαβήτη τύπου II (Hales et al. 1991, Barker et al. 1993b) και μεταβολικό σύνδρομο (Barker et al. 1993b, McMillen and Robinson 2005).

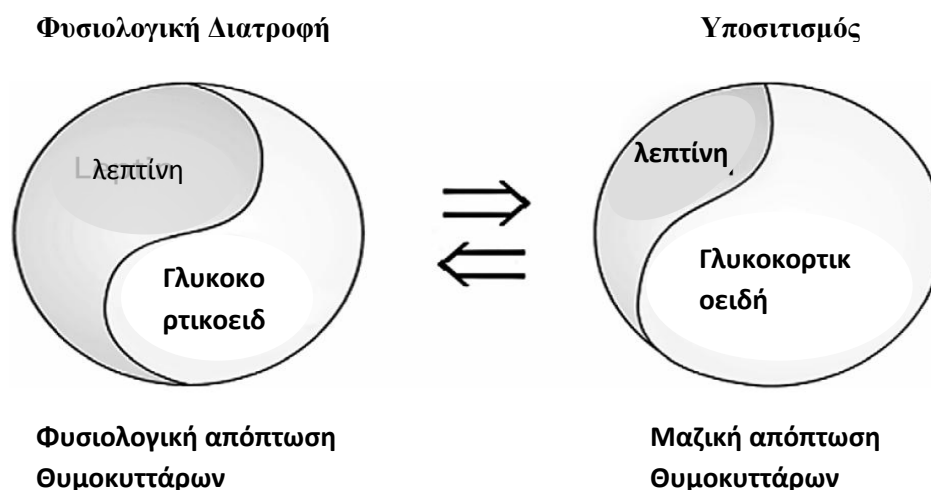
Εκτός από τις παραπάνω επιδράσεις, ο εμβρυϊκός προγραμματισμός επηρεάζει επίσης την ανάπτυξη και λειτουργία του αναπαραγωγικού συστήματος των απογόνων, επιδρώντας τελικά στη γονιμότητα (Kotsampasi et al. 2009a, 2009b, Chadio and Kotsampasi 2011). Επίσης μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη των ζώων μετά τη γέννηση, επιδρώντας στην ποιότητα των παραγομένων προϊόντων (Greenwood et al., 2000).

Πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν ακόμη ότι το ανοσοποιητικό σύστημα των απογόνων μπορεί να επηρεαστεί από τη διατροφή κατά την ενδομήτριο ζωή (Langley-Evans et al. 2003, Palmer 2011).

## 2. ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΑΝΟΣΙΑ

Η σχέση της διατροφής με την ανοσία είναι γνωστή εδώ και αιώνες. Μόνο όμως τα τελευταία χρόνια συστηματικές μελέτες έδειξαν ότι ανεπάρκεια στη διατροφή μπορεί να επηρεάσει την ανοσοαπόκριση. Η έλλειψη θρεπτικών συστατικών ή/και ιχνοστοιχείων επιδρά και στο ανοσοποιητικό σύστημα, καθώς ο υποσιτισμός μπορεί να καθορίσει την ανάπτυξη του θύμου αδένου και των λεμφικών ιστών (McDade et al. 2001). Γι' αυτό το λόγο, ο θύμος αδένου έχει χαρακτηριστεί ως 'βαρόμετρο υποσιτισμού' (Prentice 1999). Ο υποσιτισμός οδηγεί σε μειωμένη παραγωγή ορμονών του θύμου αδένου, η οποία οφείλεται στο μαζικό θάνατο των κυττάρων του, ειδικά αυτών που επιδρούν στην ωρίμανση των CD4<sup>+</sup> και CD8<sup>+</sup> κυττάρων (Chandra 1992, Calder and Yaqoob 2000, Langley-Evans et al. 2002). Οι πιο ανεπαίσθητες αλλαγές, που αφορούν την ιστολογική μορφολογία του αδένου, μπορούν να υπαγορεύσουν μακροπρόθεσμα εξειδικευμένες λειτουργίες στο ανοσοποιητικό σύστημα (Prentice et al. 1999). Παράλληλα, παρόμοια εικόνα ατροφίας μπορεί να εμφανιστεί και ως αποτέλεσμα λοιμωδών ασθενειών (Savino 2006).

Η λεπτίνη, η ορμόνη που εκκρίνεται από το λιπώδη ιστό και ρυθμίζει το βάρος του σώματος, ρυθμίζει και τη λειτουργία του θύμου αδένου προάγοντας την παραγωγή των κυττάρων αυτού και αναστέλλοντας την απόπτωση τους (Mito et al. 2004) (Εικόνα 2.1.). Ζώα στα οποία λείπει η λεπτίνη ή οι υποδοχείς της παρουσίασαν ατροφία λεμφικών ιστών και κυρίως του θύμου αδένου, η οποία όμως αντιστράφηκε με εξωγενή χορήγηση της ορμόνης (Howard et al. 1999). Η λεπτίνη μπόρεσε επίσης να αποτρέψει την ατροφία του θύμου αδένου που προκλήθηκε από τον υποσιτισμό (Howard et al. 1999, Mito et al. 2004), κάτι που θεωρήθηκε ένδειξη ότι η λεπτίνη είναι διαμεσολαβητής της επαγωγής της ατροφίας του θύμου αδένου, λόγω του υποσιτισμού. Όμως, ενώ η λεπτίνη μειώθηκε με τον υποσιτισμό, η συγκέντρωση των γλυκοκορτικοειδών αυξήθηκε, όπως έχει αποδειχθεί σε υποσιτισμένους επίμυες. Ο συνδυασμός αυτός θεωρήθηκε ότι αποτελεί μηχανισμό-κλειδί που εμπλέκεται στην απώλεια των θυμοκυττάρων, άρα στην ατροφία του θύμου αδένου κατά τον υποσιτισμό (Mito et al. 2004). Παρόμοιος μηχανισμός παρατηρήθηκε και στην ανταπόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος σε οξείες λοιμώξεις, στις οποίες επίσης σημειώθηκε αύξηση της συγκέντρωσης γλυκοκορτικοειδών στο αίμα, ως αποτέλεσμα της καταπόνησης του οργανισμού.



**Εικόνα 2.1.** Υποθετικός ορμονικός μηχανισμός που εμπλέκεται στη μείωση του αριθμού των κυττάρων του θύμου αδένος σε άτομα που υποσιτίζονται (Savino et al. 2007).

Επαρκείς ποσότητες βιταμινών προωθούν την ακεραιότητα του βλεννογόνου του εντέρου και τη λειτουργία του ανοσοποιητικού σε νεογνά, ενώ ελλείψεις αυτών ή και σε συνδυασμό με διάφορα ιχνοστοιχεία μπορούν να προκαλέσουν διαταραχή της ανοσολογικής απόκρισης του οργανισμού. Παράδειγμα αποτελεί η μη έγκαιρη ανάπτυξη των λεμφοκυττάρων του λεμφικού ιστού του γαστρεντερικού σωλήνα (GALT, gastrointestinal tract associated lymphoid tissue), όπως είναι οι πλάκες του Peyer, του χορίου και του εντερικού επιθηλίου (Mora 2008). Τα ιχνοστοιχεία έχουν σημαντικές επιπτώσεις στην ανοσολογική απόκριση μέσω των αντιοξειδωτικών δράσεων και της ρύθμισης της έκφρασης των κυτταροκινών. Το σελήνιο (Se) και η βιταμίνη E είναι ισχυροί αντιοξειδωτικοί παράγοντες. Το σελήνιο είναι σημαντικό συστατικό του ενζύμου γλουταθειονική υπεροξειδάση, το οποίο συμμετέχει στο αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα του οργανισμού επηρεάζοντας τη λειτουργία των λευκοκυττάρων και των Φυσικών Φονικών κυττάρων (NK). Το σελήνιο επίσης επηρεάζει την ενδοκυτταρική μεταβίβαση των TLRs μέσω της αναστολής του παράγοντα NF-kB, μειώνοντας την ανοσοαπάντηση στη φλεγμονή (Youn et al., 2008), ενώ η βιταμίνη E ενισχύει την ανταπόκριση των μονοκυττάρων του αίματος ή των μακροφάγων των ιστών αντίστοιχα.

Ο μεταβολίτης της βιταμίνης A, το ρετινοϊκό οξύ (RA), είναι ένας επαγωγέας για τη μεταφορά στο έντερο T- λεμφοκυττάρων (Iwata et al., 2004). Το ρετινοϊκό οξύ έχει επίσης βρεθεί ότι συνεργάζεται με τα δενδριτικά κύτταρα για την παραγωγή των ιντερλευκινών IL-6 ή IL-5 και επάγει την έκκριση IgA (Mora et al., 2006). Επαρκείς ποσότητες βιταμίνης A και βιταμίνης D προωθούν την ακεραιότητα του βλεννογόνου του εντέρου και τη λειτουργία του ανοσοποιητικού σε νεογνά, ενώ ελλείψεις αυτών των ουσιών μπορεί να προκαλέσουν διαταραχή της ανοσιακής απόκρισης του οργανισμού. Η βιταμίνη C είναι δεσμευτής των ελεύθερων ριζών και αποτελεί σημαντικό

αντιοξειδωτικό παράγοντα. Η συγκέντρωση της βιταμίνης C στο πλάσμα και στα λευκοκύτταρα μειώνονται κατά τη διάρκεια λοιμώξεων και στρες. Η συμπληρωματική χορήγηση αύξησε τη φαγοκυττάρωση και τη δραστηριότητα των φυσικών φονικών κυττάρων (Wintergerst et al., 2006) με την αύξηση των επιπέδων της γλουταθειόνης του πλάσματος.

Το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει στραφεί τελευταία στις ανοσορρυθμιστικές επιδράσεις των λιπιδίων. Έχει βρεθεί δηλαδή, ότι η διαφορετική αναλογία λιπαρών οξέων στο γάλα μεταβάλλει την ισορροπία των κυκλοφορούντων στο αίμα υποπληθυσμών κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος και την ανταπόκριση των κυτταροκινών στο αρχικό στάδιο της ζωής (Field et al. 2008). Πιο συγκεκριμένα μελετήθηκαν όμως, οι ιδιότητες των n-3 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA), τα οποία βρέθηκε ότι ενεργοποιούν το ανοσοποιητικό σύστημα σε διάφορες περιπτώσεις (Calder 2008). Δοκιμές χορήγησης συμπληρωμάτων n-3 PUFA, που είναι παρόντα σε ιχθυέλαιο, έχουν καταδείξει διαφορετικές, και ενίοτε αντιφατικές, επιπτώσεις στη λειτουργία του ανοσοποιητικού. Στις περισσότερες μελέτες εμφανίζονται να είναι κυρίως ανοσοκατασταλτικά, με μειωμένη τη λειτουργία των NK και T (ειδικά των Th1) κυττάρων και καθυστερημένου τύπου αντιδράσεις υπερευαισθησίας, αν και μερικές μελέτες έχουν δείξει τα αντίθετα αποτελέσματα δηλαδή αύξηση της ανταπόκρισης των λεμφοκυττάρων (Calder and, Grimble 2002).

Τα νεογέννητα βασίζονται κυρίως στο έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα. Θρεπτικά συστατικά και αυξητικοί παράγοντες στο πρωτόγαλα είναι ειδικοί ρυθμιστές και επαγωγοί της έμφυτης ανοσιακής απάντησης (LeBouder et al. 2006).

### **3. ΈΜΦΥΤΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΤΗΤΗ ΑΝΟΣΙΑ**

Εξελικτικά, η έμφυτη ανοσία θεωρείται ότι προϋπήρχε της επίκτητης. Καταρχήν, έμφυτες ανοσιακές αποκρίσεις έχουν ανιχνευτεί σε όλους τους πολυκύτταρους οργανισμούς, ενώ η επίκτητη παρατηρείται μόνο στα σπονδυλωτά ζώα. Επίσης στην έμφυτη ανοσία χρησιμοποιούνται υποδοχείς αρχαίας καταγωγής, ενώ στην επίκτητη χρησιμοποιούνται πιο πρόσφατοι εξελικτικά μηχανισμοί (Πίνακας 3.α) (Medzhitov and Janeway 1997b).

**Πίνακας 3.α.** Σύγκριση της έμφυτης και της επίκτητης ανοσίας (Tizard 2004).

	<b>Έμφυτη ανοσία</b>	<b>Επίκτητη ανοσία</b>
<b>Εμπλεκόμενα κύτταρα</b>	Μακροφάγα, Δενδριτικά, Ουδετερόφιλα, Φυσικά Φονικά κύτταρα	T και B λεμφοκύτταρα
<b>Εξελικτικό ιστορικό</b>	Αρχαία	Πρόσφατη
<b>Εγκατάσταση</b>	Ταχεία (λεπτά - ώρες)	Αργή (ημέρες - εβδομάδες)
<b>Ειδικότητα</b>	Συνήθεις μικροβιακοί παράγοντες	Μονικά αντιγόνα

Η έμφυτη ανοσολογική άμυνα είναι ζωτικής σημασίας για την επιβίωση του νεογνού τις πρώτες ημέρες και εβδομάδες της ζωής του. Κατά τη γέννηση, τα νεογνά βρίσκονται αντιμέτωπα με ένα ευρύ φάσμα δυνητικά παθογόνων μικροοργανισμών, που δεν συναντώνται στη μήτρα. Σε αυτήν την ηλικία, τα κυτταρικά συστατικά του επίκτητου ανοσοποιητικού συστήματος δεν έχουν ωριμάσει και αργούν να ανταποκριθούν. Αντισώματα που προσλαμβάνονται από τη μητέρα είναι απαραίτητα για την άμυνα του οργανισμού, αλλά αντιπροσωπεύονται σε πεπερασμένη και σταδιακά μειούμενη ποσότητα. Τα στοιχεία του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος ανιχνεύουν παθογόνους μικροοργανισμούς αναγνωρίζοντας μοριακά πρότυπα σχετιζόμενα με παθογόνα (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) (και τα προϊόντα τους) μέσω των υποδοχέων αναγνώρισης προτύπου (pattern recognition receptor, PRRs). Διαλυτά στοιχεία του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος, όπως οι πρωτεΐνες του συμπληρώματος, οι κολλεκτίνες, οι ντεφενσίνες, η λακτοφερίνη, η λυσοζύμη κ.λπ., μπορούν να προσδεθούν σε σημεία των παθογόνων μικροοργανισμών και να οδηγηθούν σε συγκόλληση, εμπόδιση της σύνδεσης με τον υποδοχέα, οψωνοποίηση, εξουδετέρωση, άμεση βλάβη της κυτταρικής μεμβράνης και πρόσληψη επιπλέον διαλυτών και κυτταρικών στοιχείων μέσω της φλεγμονής. Κυτταρικοί υποδοχείς, όπως οι Toll-like (TLRs), μπορούν να ενεργοποιήσουν κύτταρα και να συντονίσουν τις αντιδράσεις τους (τόσο στην έμφυτη όσο και στην επίκτητη ανοσία) (Firth et al. 2005).

Η επίκτητη ανοσία ενεργοποιείται μετά τη γέννηση. Εμφανίζει μνήμη και οργανώνει αποτελεσματική άμυνα εναντίον κάποιου παθογόνου μικροοργανισμού. Παρόλο που το έμφυτο ανοσοποιητικό χρησιμοποιεί προϋπάρχοντες υποδοχείς, που συνδέουν μόρια με προσδέματα, το επίκτητο ανοσοποιητικό δημιουργεί τυχαία τεράστιο αριθμό δομικά μοναδικών υποδοχέων οι οποίοι συνδέονται με μια μεγάλη συλλογή ξένων μορίων. Το επίκτητο ανοσοποιητικό σύστημα αποτελείται από δύο βασικούς τύπους που αμύνονται κατά κάθε μίας κατηγορίες των εισβολέων, οι οποίοι είναι οι εξωκυτταρικοί και οι ενδοκυτταρικοί μικροοργανισμοί. Ο τύπος που κατευθύνεται κατά των εξωκυτταρικών μικροοργανισμών αποτελείται από πρωτεΐνες

που καλούνται αντισώματα και καταστρέφουν τους εισβολείς αυτούς. Αυτός ο τύπος ανοσοαπόκρισης συχνά αποκαλείται ‘χυμική ανοσοαπόκριση’, καθώς τα αντισώματα βρίσκονται στα σωματικά υγρά. Ο άλλος τύπος επίκτητης ανοσίας που κατευθύνεται ενάντια σε ενδοκυτταρικούς ή ενδογενείς εισβολείς, αποτελείται από εξειδικευμένα κύτταρα που καταστρέφουν τα προσβεβλημένα ή μη φυσιολογικά κύτταρα. Αυτός ο τύπος ανοσοαπόκρισης ονομάζεται ‘κυτταροεξαρτώμενη ή κυτταρική ανοσοαπόκριση’ (Tizard 2004).

### 3.1. Ανοσοσφαιρίνες

Οι ανοσοσφαιρίνες αποτελούν μέρος της χυμικής ανοσίας και διαχωρίζονται σε διάφορες τάξεις, συμπεριλαμβανομένων των M, A, G, E και D (Mix et al. 2006). Οι κυριότερες ανοσοσφαιρίνες στο μαστικό έκκριμα είναι οι IgG, IgA και IgM. Οι ανοσοσφαιρίνες τάξης M είναι αυτές που εμφανίζονται όταν ο οργανισμός εκτίθεται στο αντιγόνο για πρώτη φορά (πρωταρχική μόλυνση). Αν και παράγονται σε μικρές ποσότητες, οι IgM είναι αξιοσημείωτα πιο αποτελεσματικές (σε μοριακή βάση) από τις IgG. Οι ανοσοσφαιρίνες τάξης A κυριαρχούν στις εκκρίσεις των βλεννογόνων και προλαμβάνουν μολύνσεις από μικρόβια, ενώ οι ανοσοσφαιρίνες τάξης G κυριαρχούν στο πρωτόγαλα και το γάλα των μηρυκαστικών. Υπάρχουν διάφορες υποκατηγορίες των IgG, με κυρίαρχες τις IgG1 και IgG2 στον ορό του αίματος (Tizard 2004).

Όλες οι μονομερείς ανοσοσφαιρίνες έχουν την ίδια βασική μοριακή δομή, η οποία αποτελείται από δύο βαριές αλυσίδες και δύο ελαφρές αλυσίδες (Εικόνα 1.1.) με συνολική μοριακή μάζα περίπου 160 kD (Hurley 2003), οι οποίες είναι ίδιες μεταξύ τους και περιλαμβάνουν σταθερές και μεταβλητές περιοχές. Οι βαριές και οι ελαφριές αλυσίδες συνδέονται με δισουλφιδικούς δεσμούς, με αποτέλεσμα το μόριο της ανοσοσφαιρίνης να παίρνει σχήμα Y (Mix et al. 2006). Ο αριθμός και η θέση των δισουλφιδικών δεσμών εξαρτώνται από την τάξη των ανοσοσφαιρινών. Κάθε μόριο ανοσοσφαιρίνης περιλαμβάνει δύο περιοχές πρόσδεσης με αντιγόνο οι οποίες αποτελούν την περιοχή πρόσδεσης αντιγόνου-αντισώματος (Fab). Η περιοχή πρόσδεσης περιλαμβάνει τη μεταβλητή περιοχή αμινοξέων. Στο άλλο άκρο του μορίου βρίσκεται η σταθερή περιοχή (Fc), η οποία συνίσταται από μια σταθερή αλληλουχία αμινοξέων, ίδια για όλα τα μόρια της υποκλάσης και η οποία αποτελεί την ταυτότητα της ανοσοσφαιρίνης.

Σε περιπτώσεις πολυμερών ανοσοσφαιρινών, συμπεριλαμβανομένων και των πολυμερών μορφών των IgA και IgM που βρίσκονται στο γάλα, οι μονομερείς μορφές των ανοσοσφαιρινών συνδέονται μεταξύ τους με ομοιοπολικούς δεσμούς με μια συνδετική αλυσίδα (J) (Mix et al. 2006, Woof 2007). Το αποτέλεσμα είναι μια διμερής μορφή στην IgA και μια πενταμερής μορφή στην IgM. Η σύνδεση αυτών των ανοσοσφαιρινών με την αλυσίδα J, τους προσδίδει επίσης πολλές ιδιαιτερότητες, όπως αυξημένη ισχύ των αντιγόνου-δεσμευτικών περιοχών, περιορισμένη ενεργοποίηση του συστήματος του συμπληρώματος και μεγάλη συγγένεια με τον πολυμερή υποδοχέα των



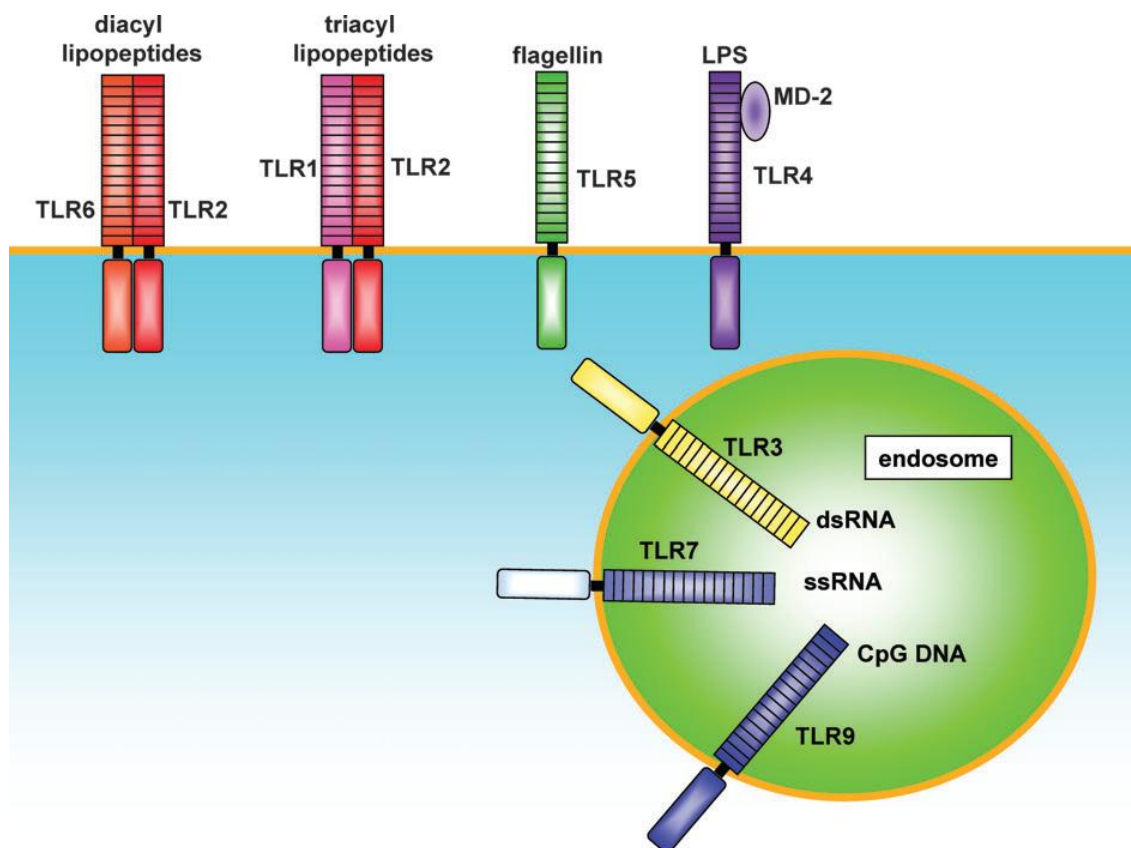


Διαφορετικοί TLRs ενεργοποιούν την παραγωγή διαφορετικών συνδυασμών κυτταροκινών και διαφορετικά μικροβιακά προϊόντα ενεργοποιούν διαφορετικές αντιδράσεις (Akira and Takeda 2004). Για παράδειγμα, οι TLRs που αναγνωρίζουν βακτηριακά μόρια θα ενεργοποιήσουν την παραγωγή των πιο κατάλληλων κυτταροκινών για την καταπολέμηση των βακτηρίων, ενώ εκείνοι που αναγνωρίζουν μόρια από ιούς θα ενεργοποιήσουν την παραγωγή κυτταροκινών έναντι των ιών (Saitoh et al. 2004).

Οι Toll-like υποδοχείς ενεργοποιούν την έμφυτη ανοσία και επιπλέον αρχίζουν τη διαδικασία ενεργοποίησης της επίκτητης ανοσίας. Για παράδειγμα, διέγερση του TLR4 οδηγεί τα μακροφάγα και τους στενούς συγγενείς τους, τα δενδριτικά κύτταρα, στην παραγωγή μορίων κυτταροκίνης, που είναι κι ισχυροί διεγέρτες της κυτταρικής ανοσίας (Kobayashi et al. 2003). Η ασθενέστερη ανταπόκριση των μονοκυττάρων και των μακροφάγων στους υποδοχείς Toll-like (TLR) σχετίστηκε με αυξημένο κίνδυνο μόλυνσης (Marodi 2006).

Οι Toll-like υποδοχείς των θηλαστικών συγκροτούν μια μεγάλη ομάδα που αποτελείται από τουλάχιστον 11 μέλη. Οι TLR 1-9 ανευρίσκονται σε ανθρώπους και ποντικούς (Εικόνα 3.ΙΙ.), ο TLR 10 φαίνεται ότι είναι λειτουργικός μόνο σε ανθρώπους και ο TLR 11 μόνο σε ποντικούς (Zhang et al. 2004) (Πίνακας 3.β.).

Όσον αφορά στη λειτουργία των υποδοχέων αυτών ειδικότερα, ο TLR 4 συνδέεται με επιφανειακούς λιποπολυσακχαρίτες των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, ο TLR 2 αναγνωρίζει πολλά διαφορετικά συστατικά των βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένων των πεπτιδογλυκανών, των λιποπρωτεϊνών και ενός γλυκολιπιδίου. Επιπλέον, ο TLR 5, συνδέεται με τη φλαγελίνη, την πρωτεΐνη των μαστιγίων των βακτηρίων, ενώ ο TLR 9 είναι κυτταροπλασματικός υποδοχέας για βακτηριακό DNA. Πρέπει συνεπώς να προηγηθεί καταστροφή των βακτηρίων, ώστε να αναγνωριστεί το DNA αυτών (Tizard 2004). Ο TLR 11, που προσδιορίστηκε πρόσφατα, βρέθηκε να εκφράζεται σε επιθηλιακά κύτταρα της ουροδόχου κύστης και συμμετέχει στην ανοσοαπόκριση της λοίμωξης από παθογόνα βακτήρια του ουροποιητικού συστήματος σε ποντικούς (Zhang et al. 2004).



Εικόνα 3.Π. TLRs και τα προσδέματά τους. (Takeda and Akira, 2005).

**Πίνακας 3.β.** Ουσίες που αναγνωρίζονται από τους toll like υποδοχείς (TLRs) των θηλαστικών (Tizard 2004, Zhang et al. 2004).

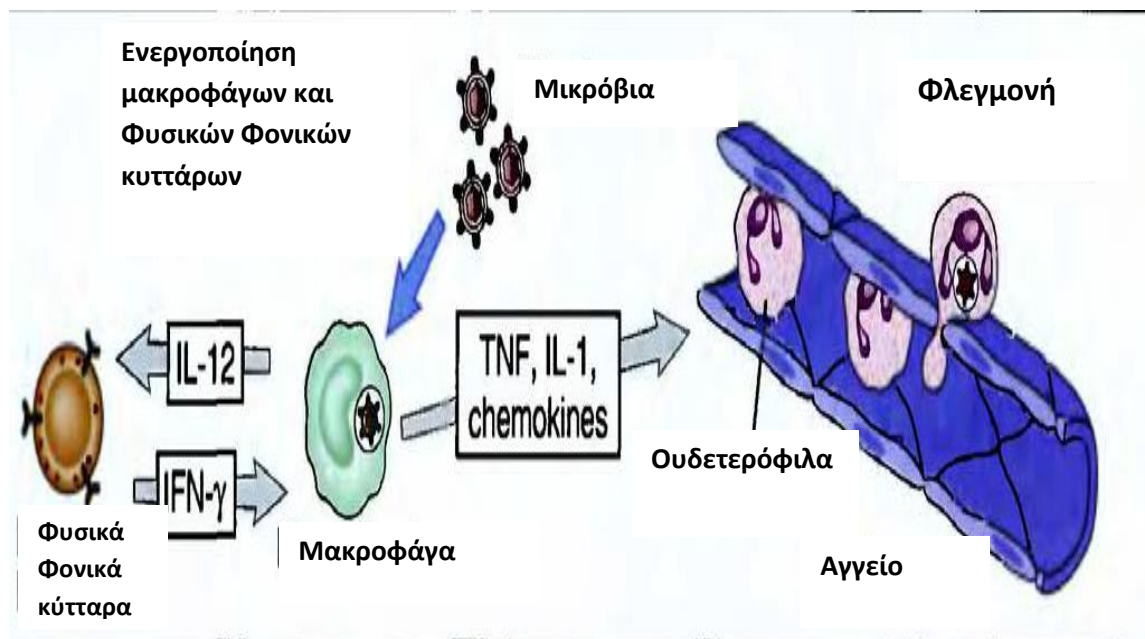
TLR	Φυσικά προσδέματα
TLR 1	Διακυλιωμένες λιποπρωτεΐνες
TLR 2	Πεπτιδογλυκάνες, βακτηριακές λιποπρωτεΐνες, μερικοί λιποπολυσακχαρίτες, σπειροχαΐτες, μυκοβακτηρίδια, λιποτειχοϊκό οξύ, πρωτεΐνες θερμικής καταπόνησης, νεκρωτικά κύτταρα
TLR 3	Διπλής έλικας RNA ιών
TLR 4	LPS, λιποτειχοϊκό οξύ
TLR 5	Φλαγελίνη, μαστιγοφόρα βακτήρια
TLR 6	Νεκρωτικά κύτταρα, δακτυλιωμένες λιποπρωτεΐνες, πεπτιδογλυκάνες (σε συνεργασία με TLR 2)
TLR 7	Μικρά αντι-ιικά μόρια
TLR 8	Μικρά αντι-ιικά μόρια
TLR 9	Μη μεθυλιωμένη κυτοσίνη-γουανίνη βακτηριακού DNA
TLR 10	A ψευδογονίδιο
TLR 11	Παθογόνα βακτήρια του ουροποιητικού συστήματος

### 3.3. Κυτταροκίνες

Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος εκκρίνουν μεγάλη ποικιλία πρωτεϊνών, η λειτουργία των οποίων έγκειται στη ρύθμιση των ανοσοαντιδράσεων με την επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων. Οι πρωτεΐνες αυτές ονομάζονται κυτταροκίνες. Οι κυτταροκίνες διαφέρουν από τις ορμόνες σε διάφορα σημαντικά σημεία. Για παράδειγμα, αντίθετα με τις ορμόνες, οι οποίες έχουν την τάση να επηρεάζουν μόνο ένα όργανο στόχο, οι κυτταροκίνες επηρεάζουν μεγάλη ποικιλία κυττάρων και οργάνων. Επιπλέον, τα κύτταρα σπανίως εκκρίνουν μόνο μία κυτταροκίνη τη φορά, και τέλος, οι βιολογικές ιδιότητες των κυτταροκινών φαίνεται να μην είναι εξειδικευμένες, διότι πολλές και διαφορετικές κυτταροκίνες μπορεί να έχουν παρόμοιες δραστηριότητες (Tizard, 2004).

Οι κυτταροκίνες προάγουν ανοσολογικές και φλεγμονώδεις αντιδράσεις και είναι υπεύθυνες για την επικοινωνία των λευκοκυττάρων μεταξύ τους, καθώς και των λευκοκυττάρων με άλλα κύτταρα. Παράγονται σε μικρές ποσότητες και εμφανίζουν αυτοκρινή δράση (δρουν στα κύτταρα από τα οποία παράγονται) ή παρακρινή δράση (δρουν σε κύτταρα πέραν αυτών των κυττάρων από τα οποία παράγονται). Οι περισσότερες από τις μοριακά καθορισμένες κυτταροκίνες ονομάζονται ιντερλευκίνες, υποδηλώνοντας ότι τα μόρια αυτά παράγονται από λευκοκύτταρα και δρουν σε λευκοκύτταρα (Abbas and Lichtman 2004).

Στην έμφυτη ανοσία, οι κύριες πηγές κυτταροκινών είναι τα μακροφάγα, τα οποία ενεργοποιούνται έπειτα από αναγνώριση μικροβίων (Εικόνα 3.ΙΙΙ.). Για παράδειγμα, η σύνδεση των λιποπολυσακχαριτών με τους υποδοχείς τους στα μακροφάγα αποτελεί ισχυρό ερέθισμα για παραγωγή κυτταροκινών από τα μακροφάγα. Τα βακτήρια προκαλούν περίπου την ίδια αντίδραση μέσω των υποδοχέων των μακροφάγων, πολλοί από τους οποίους είναι μέλη της οικογένειας των Toll- like υποδοχέων. Οι κυτταροκίνες παράγονται επίσης και στην κυτταρική ανοσία, κατά την οποία κύριες πηγές είναι τα βοηθητικά Τ λεμφοκύτταρα (Abbas and Lichtman 2004).



Εικόνα 2.ΙΙΙ. Παραγωγή κυτταροκινών από μακροφάγα (Abbas and Lichtman, 2004).

Οι κυτταροκίνες του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος (Πίνακας 3.γ.) εξυπηρετούν πολλές λειτουργίες στο αμυντικό σύστημα του ξενιστή. Οι κυρίαρχες κυτταροκίνες TNF-α και IL-1 καθώς και οι χημειοκίνες συμβάλλουν στη μετάβαση ουδετερόφιλων και μονοκυττάρων σε περιοχές όπου εισβάλλουν μικροοργανισμοί. Οι κυτταροκίνες ταξινομούνται σε προ-φλεγμονώδεις και αντι-φλεγμονώδεις ή κατασταλτικές. Στις κυριότερες προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες περιλαμβάνονται η ιντερφερόνη γ (IFN-γ), οι ιντερλευκίνες 1, 6, 8 και 12 (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12) και ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων-α (TNF-α) (Mosmann et al. 1986). Αντι-

φλεγμονώδεις ή κατασταλτικές κυτταροκίνες ονομάζονται αυτές που παράγονται από Th2 λεμφοκύτταρα και κυριότερες είναι οι ιντερλευκίνες 4 και 10 (IL-4, IL-10) και ο μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας β (TGF-β). Είναι ικανοί αναστολείς των Th1 κυτταροκινών, καταστέλλουν τη δραστηριότητα των T λεμφοκυττάρων και απενεργοποιούν τα μακροφάγα (Ho et al. 1992, Mullins et al. 2001).

**Πίνακας 3.γ.** Οι σημαντικότερες κυτταροκίνες (Tizard 2004).

Κυτταροκίνη	Σημαντικότερες πηγές	Σημαντικότεροι Στόχοι
<b>IL-1</b>	Μακροφάγα	Th2 κύτταρα, B λεμφοκύτταρα
<b>IL-4</b>	Th2 κύτταρα	T λεμφοκύτταρα, B λεμφοκύτταρα, σιτευτικά κύτταρα
<b>IL-6</b>	Ινοβλάστες, T λεμφοκύτταρα	B λεμφοκύτταρα (πολλά)
<b>IL-7</b>	Στρωματικά κύτταρα	Ανώριμα λεμφοκύτταρα
<b>IL-10</b>	Th2 κύτταρα, B λεμφοκύτταρα	Th1 κύτταρα
<b>IL-12</b>	Μακροφάγα, B λεμφοκύτταρα	Th1 κύτταρα, NK κύτταρα
<b>TNF-a</b>	Μακροφάγα, άλλα κύτταρα	Ενδοθήλιο
<b>TGF-b</b>	Αιμοπετάλια, εμπύρηνα κύτταρα	Διάφοροι στόχοι

Από τις κυτταροκίνες που ανευρίσκονται στο γάλα (4.3.1), σημαντικότερες είναι η IL-10 και η IL-12. Η IL-10 είναι ανοσορρυθμιστική κυτταροκίνη, η οποία παράγεται από διάφορα κύτταρα, όπως τα μονοκύτταρα/μακροφάγα και τα T ή B λεμφοκύτταρα. Η κυτταροκίνη αυτή παίζει σημαντικό ρόλο στις ανοσοαποκρίσεις, καταστέλλοντας την ενεργοποίηση των μακροφάγων και την αντιμικροβιακή δραστηριότητα αυτών. Επίσης, καταστέλλει τις τύπου Th1 ανοσολογικές ανταποκρίσεις και ενισχύει τις τύπου Th2. Ο μηχανισμός με τον οποίο προκαλεί καταστολή στις τύπου Th1 ανοσολογικές ανταποκρίσεις είναι με παρεμπόδιση της παραγωγής της IL-12 από τα μακροφάγα (Haddad et al. 2003).

### 3.4. Θύμος αδένας

Ο θύμος αδένας είναι ένα πρωτογενές λεμφικό όργανο, στο οποίο πρόδρομα T-κύτταρα προερχόμενα από το μυελό των οστών ή το ήπαρ κατά την εμβρυογένεση υφίστανται διαφοροποίηση και ωρίμανση, ώστε τελικά οδηγούνται σε μετανάστευση σε περιφερικά λεμφικά όργανα επιλεγμένα T-κύτταρα. Μια τέτοια διαδικασία

περιλαμβάνει διαδοχική έκφραση διαφόρων πρωτεϊνών και αναδιατάξεις γονιδίων των υποδοχέων των T- κυττάρων (TCR). Η πλειονότητα των ώρων θυμοκυττάρων δεν εκφράζει τα TCR γονίδια ούτε τα βοηθητικά μόρια CD4 ή CD8. Τέτοια κύτταρα χαρακτηρίζονται ως διπλώς αρνητικά και αντιπροσωπεύουν το 5% των συνολικών θυμοκυττάρων. Η διαδικασία της ωρίμανσης προχωρεί με την εμφάνιση των CD4 και CD8 στην επιφάνεια των κυττάρων, δημιουργώντας τα CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> διπλώς θετικά θυμοκύτταρα τα οποία αποτελούν το 80% του συνολικού πληθυσμού. Τα θυμοκύτταρα που δεν υφίστανται παραγωγική αναδιάταξη των γονιδίων TCR απορρίπτονται κατά τη θετική επιλογή. Όσα αναγνωρίζουν αυτοαντιγόνα απορρίπτονται λόγω της αρνητικής επιλογής και ενεργοποιείται σε αυτά ο μηχανισμός της απόπτωσης οδηγώντας στον κυτταρικό θάνατο. Έτσι μετά το πέρας της θετικής και αρνητικής επιλογής επιβιώνουν και πολλαπλασιάζονται μόνο όσα θυμοκύτταρα έχουν λειτουργικό TCR που δεν αναγνωρίζει αυτοαντιγόνα. Η διαφοροποίηση λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια της μετανάστευσης των κυττάρων εντός των λοβίων του θύμου, με τα ώρα να ανευρίσκονται τελικώς στο φλοίο του αδένου και τα ώριμα στο μυελό. Κατά τη διάρκεια αυτής της μετανάστευσης, τα θυμοκύτταρα αλληλεπιδρούν με διάφορα συστατικά του θυμικού μικροπεριβάλλοντος, όπως το τρισδιάστατο δίκτυο των επιθηλιακών κυττάρων (TEC) του αδένου, μακροφάγα, δένδριτικά κύτταρα και ινοβλάστες. Επίσης τα κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος ρυθμίζουν τη διαφοροποίηση των θυμοκυττάρων και με διαλυτά πολυπεπίδια που περιλαμβάνουν: α) κυτταροκίνες, όπως τις ιντερλευκίνες (IL)-1, IL-3, IL-6, IL-7, IL-8, β) χημειοκίνες, γ) ορμόνες του θύμου, όπως θυμίνη, θυμοποιητίνη και θυμοσίνη-α (Dhur et al. 1991). Ο θύμος αδένου είναι πολύ κοινός στόχος υποσιτισμού και μολύνσεων (Savino et al. 2007).

## **4. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΑΝΟΣΙΑΣ- ΡΟΛΟΣ ΠΡΩΤΟΓΑΛΑΚΤΟΣ**

### **4.1. Μεταφορά ανοσίας στον απόγονο**

Στα μικρά μηρυκαστικά, ο συνδετικοχοριακός πλακούντας (Wooding et al., 1986) δεν επιτρέπει την επικοινωνία των τριχοειδών αγγείων της μητριάας μοίρας του πλακούντα με τα τριχοειδή αγγεία στην εμβρυϊκή μοίρα αυτού, οπότε η διαπλακούντια μεταφορά ανοσοσφαιρινών δεν είναι εφικτή. Συνακόλουθα, τα νεογέννητα αρνιά γεννιούνται χωρίς μητρικές ανοσοσφαιρίνες (Halliday and Williams 1979, Argüello et al. 2004, Castro et al. 2005), αν και υπάρχουν μελέτες που αναφέρουν μικρή συγκέντρωση IgG στο ορό του αίματος νεογέννητων εριφίων (Rabbani et al. 1990, Sherman et al. 1990), η οποία όμως δεν είναι αρκετή ώστε να τα προστατέψει έναντι μολύνσεων. Έτσι γίνεται ζωτικής σημασίας η χορήγηση πρωτογάλακτος στις πρώτες ώρες μετά τη γέννηση, καθώς το πρωτόγαλα είναι η κύρια πηγή γ- ανοσοσφαιρίνης (IgG) για το νεογέννητο αρνί (Vihan 1988, Argüello et al. 2004). Επίσης το πρωτόγαλα

εκτός από θρεπτικά συστατικά, περιέχει ανοσορρυθμιστικούς παράγοντες (Biswas et al. 2007), που μπορούν να προγραμματίσουν την ανοσία του απογόνου, και παράγοντες που συμμετέχουν στην ωρίμανση της γαστρεντερικής οδού των νεογέννητων (Sauter et al 2004).

## 4.2. Πρωτόγαλα- Σύσταση

Πρωτόγαλα είναι το έκκριμα του μαστικού αδένου των ζώων κατά τις πρώτες ημέρες από τον τοκετό. Το πρωτόγαλα έχει χρώμα κιτρινωπό, με μεγάλο ιξώδες και υπόπικρη και υφάλμυρη γεύση. Η χημική του σύσταση διαφέρει από εκείνη του γάλακτος. Έχει μεγάλη αναλογία στερεών συστατικών, που οφείλονται κυρίως στην αυξημένη συγκέντρωση λίπους και πρωτεϊνών. Από τις πρωτεΐνες, οι καζεΐνες βρίσκονται σε διπλάσια αναλογία και οι πρωτεΐνες του ορού σε δεκαπλάσια από εκείνην του γάλακτος. Η παραγωγή πρωτογάλακτος λαμβάνει χώρα κατά τον τελευταίο μήνα της εγκυμοσύνης (Besser and Gay 1985), αν και η πρώτη σύνθεση της λακτόζης στο μαστικό αδένου παρατηρείται ήδη από την 90ή-100ή ημέρα της εγκυμοσύνης (Denamur, 1964).

Λόγω της σημασίας του πρωτογάλακτος, είναι απαραίτητη η γνώση των συστατικών και των μηχανισμών σύνθεσής του. Το πρωτόγαλα περιλαμβάνει ένα μείγμα διαφόρων συστατικών, μερικά από τα οποία, όπως το λίπος, οι πρωτεΐνες, η λακτόζη και τα ιχνοστοιχεία, είναι σημαντικής διατροφικής σημασίας (Ontsouka et al. 2003). Επιπλέον, το πρωτόγαλα περιέχει βιταμίνες, ανοσοσφαιρίνες, ορμόνες, αυξητικούς παράγοντες, κυτταροκίνες, ένζυμα και πολλά άλλα πεπτίδια (Koldovsky 1980, Campana and Baumrucker 1995, Blum and Hammon 2000). Παράγοντες που επιδρούν στη σύσταση του πρωτογάλακτος, σύμφωνα με μελέτες σε αγελάδες, είναι η φυλή, η ηλικία, η διατροφή, το μέγεθος της τοκετομάδας, η διάρκεια της ξηρής περιόδου και η κατάσταση της υγείας των ζώων (Csapó et al. 1994, Awadehet et al. 1998, Maunsell et al. 1998). Η έκκριση των συστατικών του πρωτογάλακτος γίνεται με διαφορετικούς μηχανισμούς (Patton and Jensen 1975) και ρυθμίζεται από τοπικούς ή συστηματικούς παράγοντες. Ωστόσο, οι περισσότεροι μηχανισμοί δεν είναι απόλυτα διευκρινισμένοι μέχρι σήμερα (Dembiski and Shiu 1987, Barrington et al. 2001).

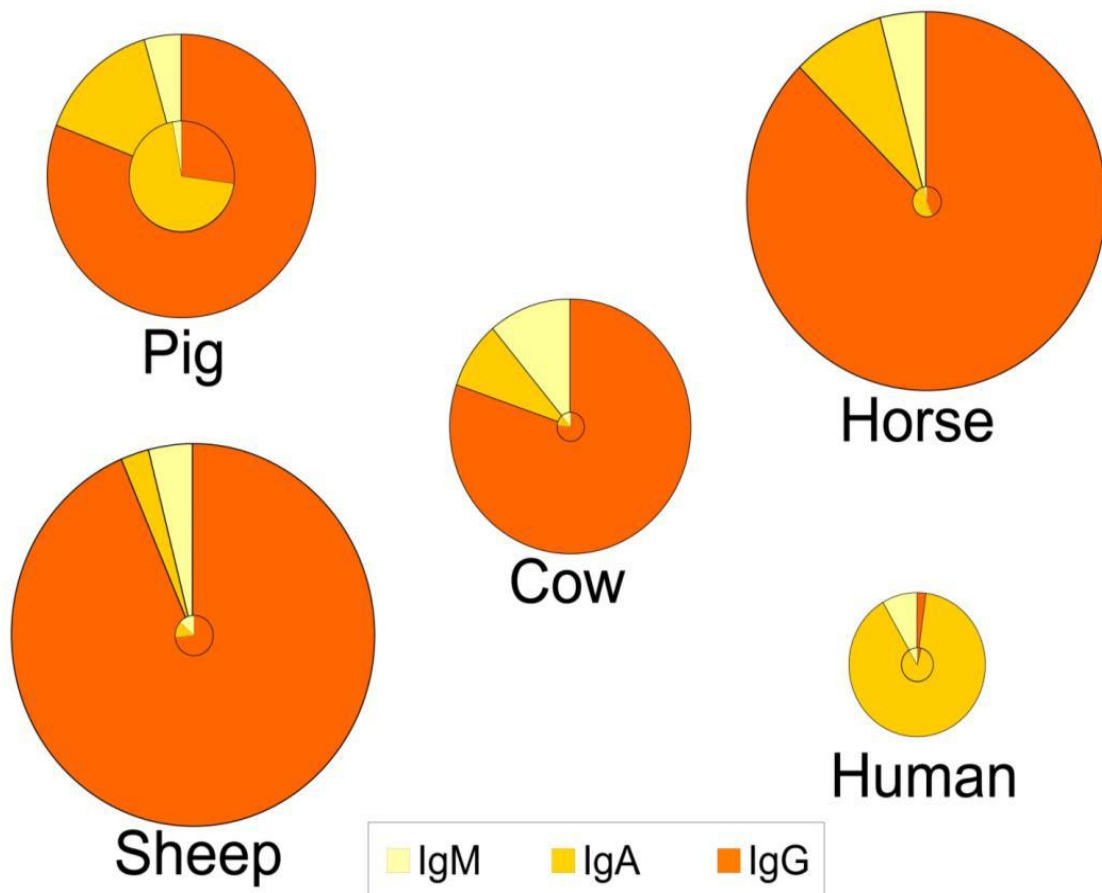
Στο πρωτόγαλα, και λιγότερο στο γάλα, έχει εντοπιστεί μεγάλη ποικιλία συστατικών που συνδέονται τόσο με την έμφυτη όσο και με την επίκτητη ανοσία. Αυτά περιλαμβάνουν ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα, μακροφάγα, ανοσοσφαιρίνες, το σύστημα του συμπληρώματος, ολιγοσακχαρίτες, ενεργές ρίζες οξυγόνου, πρωτεΐνες οξειδωτικής φάσης, ανοσορρυθμιστικούς παράγοντες (συμπεριλαμβανομένων αρκετών προ- και αντι-φλεγμονωδών κυτταροκινών), ριβονουκλεάσες (RNase) και μια σειρά από πεπτίδια και πρωτεΐνες με άμεση αντιμικροβιακή δράση (Gopal and Gill 2000, Rainard and Riollet 2006, Oviedo-Boysso et al. 2007). Πολλά από αυτά τα συστατικά παράγονται από εξειδικευμένα κύτταρα του μαστικού αδένου, όπως για παράδειγμα τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή πολλών



κυτταροκινών, ελεύθερων ριζών οξυγόνου και αντιμικροβιακών πεπτιδίων. Επίσης εμφανίζονται στο πρωτόγαλα και εκκρίματα του επιθηλίου του μαστικού αδένου που παίζουν ενεργό ρόλο στην τοπική άμυνα όπως λακτοφερίνη (Sanchez et al. 1992), β-ντεφενσίνη (Swanson et al. 2004), και πολυάριθμα πεπτίδια, πρωτεΐνες και λιπίδια (Sprong et al. 2001, Smolenski et al. 2007).

#### 4.2.1. Ανοσοσφαιρίνες

Τα κύρια συστατικά του επίκτητου ανοσοποιητικού συστήματος τα οποία υπάρχουν στο πρωτόγαλα και το γάλα είναι οι ανοσοσφαιρίνες. Η κύρια τάξη ανοσοσφαιρινών στο γάλα των μηρυκαστικών είναι οι IgG. Οι IgA και IgM βρίσκονται σε μειωμένες συγκεντρώσεις στο πρωτόγαλα και στο γάλα των μηρυκαστικών, σε αντίθεση με άλλα ζωικά είδη όπως ο άνθρωπος, στο μαστικό έκκριμα του οποίου κυριαρχούν οι IgA (Tizard 2004) (Εικ. 4.Ι.).



**Εικόνα 4.Ι.** Αναλογία IgG, IgA και IgM στο πρωτόγαλα (εξωτερικός κύκλος) και το γάλα (εσωτερικός κύκλος) πέντε ειδών θηλαστικών (Hurley and Theil 2011).

Οι ανοσοσφαιρίνες μπορεί να προέρχονται από την αιματική κυκλοφορία ή να παράγονται τοπικά από ενδομαστικά πλασμοκύτταρα κατά τον τελευταίο μήνα της

εγκυμοσύνης (Besser and Gay 1985). Ο μαστικός αδένας διαδραματίζει ενεργητικό ρόλο στη ρύθμιση της συγκέντρωσης των διαφόρων ανοσοσφαιρινών στο πρωτόγαλα και το γάλα, αν και το μαστικό επιθήλιο δεν συνθέτει από μόνο του ανοσοσφαιρίνες. Η μεγαλύτερη ποσότητα ανοσοσφαιρινών εισχωρεί στα κύτταρα μέσω ειδικών υποδοχέων, ακολουθώντας την ενδοκυτταρική οδό. Μολαταύτα, μικρή ποσότητα ανοσοσφαιρινών μπορεί να εισχωρήσει στο πρωτόγαλα και το γάλα από τον ορό του αίματος μέσω της παρακυτταρικής οδού ως αποτέλεσμα 'διαρροής' μεταξύ των μεσοκυττάρων συνδέσεων (Lacy-Hulbert et al. 1999).

Στα μηρυκαστικά, στα οποία κυριαρχεί η κλάση των IgG, οι ανοσοσφαιρίνες του πρωτογάλακτος προέρχονται από την αιματική κυκλοφορία (Micusan and Borduas 1977, Butler 1983, Barrington et al. 2001, Castro et al. 2006). Ωστόσο, στο πρωτόγαλα των αιγών η συγκέντρωση των IgG είναι περίπου 2,8 φορές μεγαλύτερη απ' ό τι στον ορό του αίματος αυτών (Micusan and Borduas 1977, Butler 1983, Castro et al. 2006). Αν και η συγκέντρωση IgG<sub>1</sub> και IgG<sub>2</sub> στο αίμα των αιγών είναι σχεδόν ίση μεταξύ τους, η συγκέντρωση IgG<sub>1</sub> στο πρωτόγαλα είναι 95-98% αυτών (Micusan and Borduas 1977). Αυτά τα αποτελέσματα οδηγούν στην υπόθεση ότι για το μηχανισμό μετακίνησης IgG<sub>1</sub> από την αιματική κυκλοφορία στο πρωτόγαλα στα μικρά μηρυκαστικά, όπως και στα βοοειδή, είναι απαραίτητο να υπάρχουν ειδικοί υποδοχείς IgG<sub>1</sub> (Barrington et al. 2001) στη μεμβράνη των εκκριτικών κυττάρων του μαστικού αδένου, όπως είναι ο νεογενικός Fc υποδοχέας που έχει αναφερθεί σε διάφορα είδη θηλαστικών (Adamski et al. 2000, Schnulle and Hurley 2003) ότι παίζει ενεργό ρόλο στη μεταφορά IgG στο γαλακτοπαραγωγό μαστικό αδένου (Mayer et al. 2005).

Στα μηρυκαστικά η μεταφορά των IgG από τη μητρική κυκλοφορία στο μαστικό έκκριμα αρχίζει στο τελικό στάδιο της εγκυμοσύνης και παύει απότομα αμέσως πριν από τον τοκετό (Brandon et al. 1971). Αυτό σημαίνει ότι η παραγωγή του πρωτογάλακτος εμφανίζεται πριν από την παραγωγή γάλακτος (γαλακτογένεση). Στα έγκυα πρόβατα, η συγκέντρωση IgG στον ορό του αίματος παραμένει σταθερή μέχρι 15 ημέρες πριν τον τοκετό, οπότε μειώνεται απότομα (Ciupercescu, 1977). Στις έγκυες αίγες, αντίστοιχα, η συγκέντρωση IgG στον ορό του αίματος αρχίζει να μειώνεται απότομα περίπου τέσσερις εβδομάδες πριν από τον αναμενόμενο τοκετό και οι αλλαγές που παρατηρούνται στη συνολική συγκέντρωση των IgG σχετίζονται με ταυτόχρονες αλλαγές της IgG<sub>1</sub> (Micusan and Borduas 1977). Μετά τον τοκετό, λαμβάνει χώρα αύξηση της συγκέντρωσης IgG στον ορό του αίματος σε προβατίνες και αίγες (Ciupercescu 1977, Micusan and Borduas 1977, Castro et al. 2006).

Οι ανοσοσφαιρίνες IgA στο πρωτόγαλα και το γάλα των μηρυκαστικών παράγονται τοπικά από ενδομαστικά πλασμοκύτταρα. Τα πλασμοκύτταρα αυτά μεταφέρονται στο μαστικό αδένου μέσω της αιματικής κυκλοφορίας, ως αποτέλεσμα της διαμεσολάβησης τοπικά παραγόμενων χημειοκινών (Wilson and Butcher 2004).

Όλη η διαδικασία υπόκειται σε ορμονικό έλεγχο. Η έκφραση και η ρύθμιση των υποδοχέων, που συμμετέχουν στην μεταφορά IgG και IgA στο μαστικό αδένου των μηρυκαστικών, φαίνεται ότι ρυθμίζεται από ενδοκρινικές αλλαγές που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της περιτοκιαίας περιόδου (Barrington et al. 2001, Rincheval-Arnold

et al. 2002). Η έναρξη της παραγωγής του πρωτόγαλατος ρυθμίζεται από την οιστραδιόλη και την προγεστερόνη, ενώ η παύση της από γαλακτογόνες ορμόνες, αν και, σύμφωνα με τους Barrington et al. (1999), η προλακτίνη μείωσε στην αρχή της γαλακτογένεσης την έκφραση των υποδοχέων των IgG<sub>1</sub> στο μαστικό αδένα των αγελάδων.

Οι συγκεντρώσεις των διαφόρων ανοσοσφαιρινών στο πρωτόγαλα και το γάλα διαφόρων θηλαστικών παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.α.

**Πίνακας 4.α.** Συγκέντρωση ανοσοσφαιρινών στο πρωτόγαλα και το γάλα διαφόρων θηλαστικών (Mickleson and Moriarty 1982, Tizard 2004).

Θηλαστικό		Ανοσοσφαιρίνη (mg/ml)		
		IgA	IgM	IgG
<b>Φοράδα</b>	Πρωτόγαλα	5-15	1-3,5	15-50
	Γάλα	0,5-1	0,05-0,1	0,2-0,5
<b>Αγελάδα</b>	Πρωτόγαλα	1-7	3-13	24-80
	Γάλα	0,1-0,5	0,1-0,2	0,5-7,5
<b>Προβατίνα</b>	Πρωτόγαλα	1-7	4-12	40-60
	Γάλα	0,05-0,12	0-0,07	0,6-1
<b>Συς</b>	Πρωτόγαλα	9,5-10,5	2,5-3,2	30-70
	Γάλα	-	-	-
<b>Σκύλα</b>	Πρωτόγαλα	5-22	0,14-0,57	1,2-3
	Γάλα	1,1-6,2	0,1-0,54	0,01-0,03
<b>Γάτα</b>	Πρωτόγαλα	1,5-3,4	0,47-0,58	44-32,5
	Γάλα	2,4-6,2	0	1-4,4
<b>Γυναίκα</b>	Πρωτόγαλα	32	11,3	5,3
	Γάλα	7,5-8,3	1-2	3-4

## **Επιδράσεις στη συγκέντρωση των ανοσοσφαιρινών**

Επειδή η σύνθεση του πρωτογάλακτος αρχίζει λίγες εβδομάδες πριν τον τοκετό, η διατροφή των εγκύων ζώων εκείνη την περίοδο είναι σημαντική για την ποιότητα και για την ποσότητα αυτού (Miranda et al. 1983). Προβατίνες που έχουν λάβει φυσιολογική διατροφή έχουν παράξει μεγαλύτερες ποσότητες πρωτογάλακτος (Mellor and Murray 1985, Swanson et al. 2008) καθώς και μεγαλύτερη συνολική συγκέντρωση IgG σε σύγκριση με υποσιτισμένες (Swanson et al. 2008). Αντίθετα, η συνολική συγκέντρωση των IgG στο πρωτόγαλα μειώθηκε όταν στις προβατίνες χορηγήθηκε μεγαλύτερη ποσότητα τροφής από το φυσιολογικό (Wallace et al. 2006). Άλλη μελέτη έδειξε ότι η συγκέντρωση των IgG στο πρωτόγαλα αυξήθηκε όταν χορηγήθηκε συμπλήρωμα σεληνίου προς το τέλος της εγκυμοσύνης (Awadeh et al. 1998), αν και στα πρόβατα δεν φάνηκε κάποια επίδραση (Swanson et al. 2008). Οι Castro et al. (2006) απέδειξαν ότι όταν συμπεριληφθεί συζευγμένο λινοϊικό οξύ (Conjugated linoleic acid, CLA) στην τροφή των ζώων αυξάνεται η συγκέντρωση των IgG στον ορό του αίματος και το πρωτόγαλα των αιγών. Το CLA είναι ένα φυσικό προϊόν, το οποίο βελτιώνει τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, μειώνοντας τις αρνητικές επιδράσεις των φλεγμονωδών απαντήσεων. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με μελέτες σε επίμυες (Sugano et al. 1999). Ωστόσο, σύμφωνα με πιο πρόσφατες μελέτες (Castro et al. 2011), δεν υπήρχε επίδραση του CLA στη συγκέντρωση IgG στο πρωτόγαλα.

Ο όγκος του παραγόμενου πρωτογάλακτος μπορεί να επηρεάσει αρνητικά τη συγκέντρωση IgG στο πρωτόγαλα (Pritchett et al. 1991, Swanson et al. 2008), αν και άλλες μελέτες δείχνουν ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του όγκου του πρωτογάλακτος και της συγκέντρωσης των ανοσοσφαιρινών (Quigley et al. 1994, Foisnet et al., 2010).

Σημαντική είναι η επίδραση της χρονικής διάρκειας της εγκυμοσύνης, διότι όσο μεγαλώνει η περίοδος της εγκυμοσύνης, τόσο αυξάνεται η συγκέντρωση IgG στο πρωτόγαλα (Argüello et al. 1999, Swanson et al. 2008). Ο αυξανόμενος αριθμός της γαλακτικής περιόδου αυξάνει επίσης τη συγκέντρωση των IgG στο πρωτόγαλα αγελάδων (Oyeniyi and Hunter 1978), χωρίς να είναι σαφές αν ισχύει το ίδιο και για τα μικρά μηρυκαστικά. Μελέτες της επίδρασης της ηλικίας των ζώων σε μικρά μηρυκαστικά έδειξαν ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση IgG στο πρωτόγαλα με την αύξηση της ηλικίας (Argüello et al. 2006). Ομοίως, δεν υπάρχουν σημαντικές αναφορές που να υποδεικνύουν την επίδραση του μεγέθους της τοκετοομάδας. Παλαιότερες μελέτες έδειχναν ότι αίγες με διδυμία παρήγαγαν μεγαλύτερη ποσότητα πρωτογάλακτος και αυξημένη συγκέντρωση ανοσοσφαιρινών (Knight and Peaker 1982, Csapó et al. 1994), αλλά πιο πρόσφατες μελέτες ανέφεραν ότι δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση των ανοσοσφαιρινών σε πρωτόγαλα από μονόδυμους ή δίδυμους τοκετούς (Argüello et al. 2006).

Επίσης βρέθηκε ότι η πρόωμη αύξηση της προλακτίνης μειώνει τη συγκέντρωση IgG στο πρωτόγαλα (Castro et al. 2011), μειώνοντας την έκφραση των IgG1 υποδοχέων

στην αρχή της γαλακτογένεσης (Barrington et al. 1999), όταν χορηγήθηκε προσταγλανδίνη F2a για πρόκληση τοκετού σε αίγες (Castro et al. 2011).

Αυτές οι διαφορές μεταξύ των μελετών μπορεί να εξηγηθούν και από το γεγονός ότι έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες, διαφορετικές μεταξύ τους φυλές σε κάθε μελέτη, δεδομένου ότι η φυλή του ζώου επηρεάζει σημαντικά τη συγκέντρωση IgG στο πρωτόγαλα (Ha et al. 1986).

#### **4.2.2. Κυτταροκίνες**

Τα τελευταία χρόνια σημαντικές μελέτες αυξάνουν τον αριθμό των ανιχνευθεισών κυτταροκινών στο υγιές γάλα (Garofalo 2010), με τη συγκέντρωσή τους να είναι σημαντικά αυξημένη σε δείγματα πρωτογάλακτος και να μειώνεται σταδιακά κατά τη μετάβασή του μαστικού εκκρίματος σε γάλα. Προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες που λειτουργούν συνεργικά για την ενεργοποίηση της φλεγμονής και έχουν ανευρεθεί στο πρωτόγαλα είναι ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων- α (TNF-α), οι ιντερλευκίνες 1, 6, 8 (IL-1, IL-6, IL-8) και η ιντερφερόνη γ (IFN-γ) (Hagiwara et al. 2000). Στις αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες που έχουν ανευρεθεί στο πρωτόγαλα περιλαμβάνονται η ιντερλευκίνη 10 (IL-10) και ο μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας β (TGF-β) (Yilmaz et al. 2007).

Σε μελέτες σε ανθρώπινο γάλα βρέθηκαν αυξημένες συγκεντρώσεις της αντιφλεγμονώδους κυτταροκίνης 10, η οποία αποτελεί ισχυρό ανοσορυθμιστικό παράγοντα, σε δείγματα γάλακτος των πρώτων 80 ωρών μετά τον τοκετό (Garofalo et al. 1995). Η IL-10 είναι παρούσα στην υδατική και στη λιπιδική φάση του γάλακτος (Garofalo 2010) και προκαλεί την έκκριση των ανοσοσφαιρινών IgM, IgG και IgA σε συγκεντρώσεις που δεν είχαν παρατηρηθεί από την επίδραση κάποιας κυτταροκίνης ή συνδυασμού τους (Rousset et al. 1992). Επιπλέον, καταστέλλει τη συμμετοχή των Th1 κυττάρων στην καθυστερημένη αντίδραση υπερευαισθησίας, προσελκύει τα CD8<sup>+</sup> T λεμφοκύτταρα και ενισχύει την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση της σύνθεσης ανοσοσφαιρινών από τα B λεμφοκύτταρα. Επίσης, δρα ως συμπαράγοντας, μαζί με τον TGF-β, για την αύξηση της παραγωγής των ανοσοσφαιρινών IgA<sub>1</sub> και IgA<sub>2</sub>. Τέλος, ρυθμίζει την άμυνα του βλεννογόνου και περιορίζει τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις στην πεπτική και στην αναπνευστική οδό (Yilmaz et al. 2007).

#### **4.3. Μετάβαση πρωτογάλακτος σε γάλα**

Το γάλα είναι το φυσιολογικό έκκριμα του μαστού 4-6 ημέρες μετά από τον τοκετό (Μάντης 2005). Η χημική σύστασή του διαφέρει από εκείνη του πρωτογάλακτος. Συγκεκριμένα, έχει μικρότερη αναλογία στερεών συστατικών, λόγω μικρότερου κλάσματος πρωτεϊνών. Από το κλάσμα των πρωτεϊνών, η συγκέντρωση καζεϊνών είναι μειωμένη σημαντικά και η συγκέντρωση των πρωτεϊνών του ορού

υποδεκαπλασιάζεται λόγω της μείωσης των ανοσοσφαιρινών, οι οποίες βρίσκονται σε πολύ μικρή συγκέντρωση. Επιπλέον, το γάλα περιέχει πολύ μεγαλύτερη συγκέντρωση λακτόζης σε σχέση με το πρωτόγαλα.

Το γάλα των προβατινών είναι πιο πλούσιο σε στερεά συστατικά σε σύγκριση με το γάλα των αγελάδων και των αιγών, αλλά η αναλογία των διαφόρων συστατικών αυτού παρουσιάζει σημαντικές διακυμάνσεις ανάλογα με τη φυλή, τη γαλακτική περίοδο και τη διατροφή (Μάντης 2005).

Η σύσταση του πρόβειου γάλακτος παρουσιάζει αξιόλογη διακύμανση στη σύνθεσή του στη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου, ιδιαίτερα δε σε λίπος και πρωτεΐνες. Η συγκέντρωση λίπους μειώνεται μέχρι την 3η εβδομάδα της γαλακτικής περιόδου και στη συνέχεια αυξάνεται. Την ίδια πορεία ακολουθεί και η συγκέντρωση των ολικών στερεών, ενώ η συγκέντρωση πρωτεϊνών, ύστερα από μία μικρή μείωση κατά την 1η-3η εβδομάδα της γαλακτικής περιόδου, αυξάνεται σε 5,5%-6,5% και παραμένει σχεδόν σταθερή για την υπόλοιπη γαλακτική περίοδο. Τέλος, η λακτόζη, ύστερα από μία μικρή αρχική άνοδο (2η εβδομάδα) μειώνεται ελαφρά και παραμένει σταθερή σε όλη την υπόλοιπη γαλακτική περίοδο (Μάντης 2005).

#### **4.4. Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα πρωτογάλακτος και γάλακτος**

Το πρωτόγαλα και το γάλα περιέχουν πολλά συστατικά με αντιοξειδωτικές ικανότητες. Τα σημαντικότερα είναι οι υπομονάδες της καζεΐνης του γάλακτος (α-καζεΐνη, β-καζεΐνη, κ-καζεΐνη) (Cervato et al. 1999). Επίσης, αντιοξειδωτικές ιδιότητες εμφανίζουν και πεπτίδια που προέρχονται από τις καζεΐνες, μέσω της διάσπασής τους από πρωτεολυτικά ένζυμα (πεψίνη, θρυψίνη) και β-γαλακτοσφαιρίνες (κορολάση PP) (Kitts and Weiler 2003).

Άλλοι μη ενζυματικοί αντιοξειδωτικοί παράγοντες που υπάρχουν στο γάλα είναι η βιταμίνη E, τα καροτενοειδή και ενεργές μορφές του συνενζύμου Q10. Αυτοί οι παράγοντες δρουν ως εξουδετερωτές των ελεύθερων ριζών στη λιπιδική φάση, ενώ η βιταμίνη C δρα στην υδατική φάση. Άλλοι αντιοξειδωτικοί παράγοντες, όπως μερικά φλαβονοειδή, μπορούν να δράσουν στη λιπιδική και στην υδατική φάση ως δεσμευτές ελεύθερων ριζών ιόντων μετάλλων (Lindmark-Mansson and Akesson 2000). Αυτά τα αντιοξειδωτικά συστατικά δραστηριοποιούνται στην πρόληψη υπεροξειδωσίας των λιπιδίων και στη διατήρηση της ποιότητας του γάλακτος και μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν ως συστατικά, σε τρόφιμα και φαρμακευτικά προϊόντα, για την παρασκευή προϊόντων που ενισχύουν την υγεία των καταναλωτών.

Γενικά, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πρωτογάλακτος παρουσιάζει μεγαλύτερες τιμές από αυτή του γάλακτος (Quiles et al. 2006).

## 5. «ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΟΣ» ΤΟΥ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ - Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΜΗΤΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

Μια σειρά από ερευνητικά δεδομένα υποστηρίζει την άποψη ότι το αναδύομενο ανοσοποιητικό σύστημα είναι ευάλωτο σε δυσμενείς συνθήκες, όπως ο υποσιτισμός κατά την εμβρυική ή και νεογνική ηλικία και αποτελεί στόχο προγραμματισμού. Διατάραξη του ανοσοποιητικού συστήματος ως αποτέλεσμα μη ισόρροπης διατροφής κατά την εμβρυική και νεογνική ηλικία μπορεί να έχει αφενός άμεσες επιδράσεις στην ευαισθησία του νεογνού στις μολύνσεις, αλλά και μακροπρόθεσμες επιδράσεις στην υγεία μέσω μόνιμης διαταραχής της λειτουργίας το ανοσοποιητικού συστήματος.

Πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι ο υποσιτισμός σε κρίσιμες περιόδους κατά την κύηση ή τη γαλουχία προκαλεί διαταραχές στην ανάπτυξη της φυσικής ανοσίας με αύξηση των κινδύνων για λοιμώξεις και ελάττωση της ανοσιακής απάντησης (Barja-Fidalgo et al. 2003, Landgraf et al. 2005,2007). Χορήγηση ελλιπούς σε πρωτεΐνη διαίτας σε επίμυες κατά την κύηση είχε ως αποτέλεσμα μειωμένη ανταπόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος του απογόνου σε ενδοτοξίνες (Langley et al., 1994), μειωμένη παραγωγή προ- φλεγμονωδών κυτταροκινών από μακροφάγα (Tarrpia et al., 1994), αλλά και μειωμένο μέγεθος του θύμου αδένος των απογόνων, κυρίως όταν ο υποσιτισμός λαμβάνει χώρα κατά τα αρχικά στάδια της κύησης (Langley-Evans et al. 2002). Παράλληλα, η αλλαγή του επιπέδου των πρωτεϊνών αλλά και του τύπου του λίπους στη διαίτα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης σε επίμυες επηρέασε την ανταπόκριση και τον πολλαπλασιασμό των φυσικών φονικών κυττάρων (NK) που απομονώθηκαν από απόγονους, κατά τη νεογνική ηλικία μέχρι τον απογαλακτισμό (Calder and Yaqoob 2000). Νεότερα δεδομένα σε επίμυες έδειξαν ότι ο υποσιτισμός των μητέρων ως προς την πρωτεΐνη είχε ως αποτέλεσμα ελαττωμένη φαγοκυτταρική ικανότητα των ουδετερόφιλων των απογόνων, όπως και αναστολή της μετανάστευσής τους μετά από φλεγμονή. Επίσης προκάλεσε αύξηση των επιπέδων του TNF-α στους απογόνους (Silva et al. 2010).

Ακόμη ανεπαρκής διατροφή σε ορισμένα ιχνοστοιχεία σε κρίσιμες περιόδους, όπως π.χ. η περιτοκαΐα περίοδος, μπορεί να προκαλέσει διαταραχές της ανάπτυξης και λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος των απογόνων, οι οποίες μάλιστα μπορεί να παραμείνουν και στις επόμενες γενιές, υποδηλώνοντας ότι ο προγραμματισμός των λειτουργιών αυτών θα μπορούσε να μεταδοθεί μέσω των γαμετών, πιθανώς μέσω επιγενετικών μηχανισμών. Αυτό αποδείχθηκε με τον περιορισμό του ψευδαργύρου σε επίμυες κατά την εγκυμοσύνη (Beach et al. 1982), στα οποία μειώθηκαν οι λειτουργίες του ανοσοποιητικού συστήματος των απογόνων. Ειδικότερα, μειώθηκαν τα βοηθητικά T- λεμφοκύτταρα και τα φυσικά φονικά κύτταρα (NK), τα οποία έχουν παρουσιάσει μείωση και ύστερα από έλλειψη της μητέρας σε σίδηρο (Fe) (Coe et al. 2007). Επίσης εμφανίστηκε μειωμένη και η ανταπόκριση των κυτταροκινών, η οποία παρέμεινε όμως μειωμένη και μετά την αναπλήρωση του ψευδαργύρου (Beach et al. 1983). Το ενδιαφέρον των αποτελεσμάτων αυτών ήταν ότι οι συνέπειες του υποσιτισμού αυτού διήρκησαν, σε διαφορετικό βαθμό, για τρεις γενιές (Beach et al., 1982). Η έλλειψη του

ψευδαργύρου επίσης προκάλεσε αυξημένη παραγωγή γλυκοκορτικοειδών και τον επαναπρογραμματισμό του ανοσοποιητικού συστήματος στο επίπεδο του μυελού των οστών η οποία χαρακτηρίστηκε κλινικά από ατροφία του θύμου αδένου, εργαστηριακά από λεμφοκυτταροπενία, και πειραματικά από μειωμένη ανταπόκριση της ανοσίας (κυτταρικής και χυμικής) σε λοιμώξεις (Fraker and King 2004).

Επιδημιολογικές μελέτες στον άνθρωπο, όπου το βάρος γέννησης λαμβάνεται ως ένας παράγοντας εκτίμησης της επάρκειας των διατροφικών συνθηκών κατά την ενδομήτρια ζωή, έδειξαν ότι αυξημένη συχνότητα ατροφίας του θύμου αδένου και μεγαλύτερο κίνδυνο λοιμώξεων, όπως και μικρότερο αριθμό Β και Τ λεμφοκυττάρων, διαταραχές που παρέμειναν για μήνες ή χρόνια μετά τη γέννηση, υποδηλώνοντας μακροπρόθεσμα αποτελέσματα (Langley- Evans and Carrington 2006).

Πειραματικά δεδομένα από προγραμματισμό του ανοσοποιητικού συστήματος σε παραγωγικά ζώα και ιδιαίτερα στο πρόβατο, το οποίο αποτελεί και μοντέλο μελέτης του φαινομένου του προγραμματισμού, δεν υπάρχουν. Με δεδομένη τη σημασία της μεταφοράς της ανοσίας μέσω του θηλασμού και της ωρίμανσης του ανοσοποιητικού συστήματος του νεογνού έχει ενδιαφέρον να μελετηθεί η επίδραση του υποσιτισμού κατά το τέλος της κύησης και κατά τη γαλουχία, που αποτελεί το αντικείμενο αυτής της μελέτης.



## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## 1. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσης μελέτης είναι να διερευνηθεί ο ρόλος της μητρικής διατροφής και συγκεκριμένα του μητρικού υποσιτισμού κατά το τελευταίο διάστημα της κύησης και κατά τη γαλουχία στη συγκέντρωση ορισμένων ανοσολογικών παραμέτρων του πρωτογάλακτος και σε παραμέτρους ανοσίας των απογόνων προβάτου.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1. Πειραματικός σχεδιασμός

Για τη διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν 60 έγκυες προβατίνες φυλής Χίου οι οποίες χωρίστηκαν σε τρεις ομοιόμορφες ομάδες, ως προς το σωματικό βάρος, την ετήσια γαλακτοπαραγωγή και τον αριθμό των προηγούμενων τοκετών όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.α. Η φροντίδα και ο χειρισμός των ζώων που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία έγιναν σύμφωνα με τις συστάσεις του National Research Council (1996).

**Πίνακας 2.α.** Μέσο σωματικό βάρος, μέση ετήσια γαλακτοπαραγωγή και μέσος αριθμός τοκετών ανά πειραματική ομάδα

Ομάδα	Μέσο	Μέση Ετήσια	Αριθμός Προηγούμενων Τοκετών
	Σωματικό Βάρος (Kg)	γαλακτοπαραγωγή (Kg)	
<b>M</b> (Μάρτυρας) (n=20)	75,1±7,31	292,35±55,897	2,5±0,51
<b>Y1</b> (n =20)	74,5±5,12	290,63±57,570	2,5±0,51
<b>Y2</b> (n =20)	74,7±5,81	289,46±60,277	2,5±0,51

#### 2.1.1. Διατροφή εγκύων προβατινών

Η πειραματική διαδικασία ξεκίνησε 20±3 ημέρες πριν τον αναμενόμενο τοκετό. Στην ομάδα του μάρτυρα M και στην ομάδα Y1 χορηγήθηκε σιτηρέσιο, μέχρι τον τοκετό, το οποίο κάλυπτε το 100% των αναγκών των ζώων σε ενέργεια και αζωτούχες ουσίες, λαμβάνοντας υπόψη τις ανάγκες κυοφορίας δύο εμβρύων (NRC, 1985). Στην

ομάδα Y2 χορηγήθηκε σιτηρέσιο, μέχρι τον τοκετό, το οποίο κάλυπτε το 50% των αναγκών των ζώων σε ενέργεια και αζωτούχες ουσίες.

### **2.1.2. Διατροφή προβατινών μετά τον τοκετό**

Μετά τον τοκετό διατηρήθηκαν στην πειραματική διαδικασία μόνο οι προβατίνες που γέννησαν δύο αμνούς και ο αριθμός σε κάθε πειραματική ομάδα διαμορφώθηκε ως εξής : (M: n=10, Y1: n=10, Y2: n=13). Στην ομάδα του μάρτυρα (M) χορηγήθηκε σιτηρέσιο που κάλυπτε το 100% των αναγκών σε ενέργεια και αζωτούχες ουσίες λαμβάνοντας υπόψη τις ανάγκες θηλασμού δύο αμνών. Στις ομάδες Y1 και Y2 χορηγήθηκε σιτηρέσιο που κάλυπτε το 50% των αναγκών σε ενέργεια και αζωτούχες ουσίες, λαμβάνοντας υπόψη τις ανάγκες θηλασμού δύο αμνών.

### **2.1.3. Χειρισμοί προβατινών και δειγματοληψίες**

Καθόλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, το σιτηρέσιο χορηγείτο στις προβατίνες ατομικά, σε δύο ισόποσα γεύματα, στις 8:00πμ και στις 16:00μμ και αποτελείτο από μείγμα συμπυκνωμένων ζωοτροφών, χόρτο μηδικής και άχυρο σίτου. Στο τέλος κάθε γεύματος υπολογίζονταν τα υπολείμματα της τροφής.

Τα ζώα ζυγίζονταν μία φορά την εβδομάδα. Δείγματα πρωτογάλακτος ελήφθησαν στις 3, 10 και 18 ώρες μετά τον τοκετό, καταψύχθηκαν και συντηρήθηκαν στους -20° C και αποψύχονταν για την πραγματοποίηση των προσδιορισμών. Δείγματα γάλακτος λαμβάνονταν εβδομαδιαία μετά τον τοκετό μέχρι τον απογαλακτισμό, και συντηρήθηκαν με τον ίδιο τρόπο όπως τα δείγματα πρωτογάλακτος. Επίσης λήφθηκαν και δείγματα αίματος εβδομαδιαία από τις προβατίνες, από την αρχή μέχρι το τέλος της πειραματικής διαδικασίας, και από τα αρνιά κατά την περίοδο του απογαλακτισμού.

### **2.1.4. Τοκετοί-Χειρισμός απογόνων**

Οι τοκετοί πραγματοποιήθηκαν φυσιολογικά. Τα νεογνά, αμέσως μετά τη γέννησή τους σημάνθηκαν και τους χορηγήθηκε ενδομυϊκά 3ml διαλύματος βιταμίνης E και Se. Από τη 2<sup>η</sup> εβδομάδα της ηλικίας τους και μέχρι τον απογαλακτισμό οι αμνοί είχαν στη διάθεση τους όλη την ημέρα χόρτο μηδικής και μείγμα συμπυκνωμένων ζωοτροφών πάχυνσης αμνών Α' ηλικίας ώστε να εθιστούν στην κατανάλωση του. Από την 4<sup>η</sup> εβδομάδα μέχρι την ηλικία των 2,5 μηνών εχορηγείτο προς κατά βούληση κατανάλωση χόρτο μηδικής και μείγμα συμπυκνωμένων ζωοτροφών πάχυνσης αμνών Β' ηλικίας και μέχρι την ηλικία των 5,5 μηνών εχορηγείτο προς κατά βούληση κατανάλωση χόρτο μηδικής και βασικό μείγμα συμπυκνωμένων ζωοτροφών.

Οι αμνοί ζυγίστηκαν τόσο κατά τη γέννηση όσο και την ημέρα του απογαλακτισμού (50<sup>η</sup> ημέρα).

Στην ηλικία των 5,5 περίπου μηνών οι αμνοί θυσιάστηκαν σύμφωνα με το Προεδρικό Διάταγμα 160/1991 και τον νόμο 2015/2001 και ελήφθησαν δείγματα ήπατος, σπλήνα, θύμου αδένου και γεννητικών οργάνων.

Στον **Πίνακα 2.β.** παρουσιάζεται ο αριθμός των θηλυκών και αρσενικών αμνών ανά επέμβαση, όπως διαμορφώθηκε έως το τέλος της πειραματικής διαδικασίας μετά από τις φυσικές απώλειες.

**Πίνακας 2.β.** Αριθμός αμνών ανά επέμβαση

Επέμβαση	Σύνολο αμνών	♂	♀
M	19	14	5
Y1	20	13	7
Y2	25	10	15

## 2.2 Προσδιορισμοί

### 2.2.1 Χημική σύσταση πρωτογάλακτος και γάλακτος

Η χημική σύσταση του πρωτογάλακτος των 3 και 18 ωρών και του γάλακτος της 1<sup>ης</sup> και της 7<sup>ης</sup> εβδομάδας προσδιορίστηκε με τη χρήση του Milkoscan 133 (A/S N. Foss Electronic, Denmark). Για τη μέτρηση των δειγμάτων πρωτογάλακτος με το Milkoscan 133, ήταν απαραίτητη η αραιώση με αναλογία 1:1.

### 2.2.2 Συγκέντρωση γ-ανοσοσφαιρινών (IgG) πρωτογάλακτος

Η συγκέντρωση των IgG του πρωτογάλακτος των 3 και 18 ωρών μετρήθηκε με τη μέθοδο ELISA. Για τη μέτρηση χρησιμοποιήθηκε εμπορικό kit (Sheep IgG ELISA kit, ALPHA DIAGNOSTIC INTERNATIONAL), μετά από αραιώση 1: 1.500.000 των δειγμάτων με ευαισθησία <5ng/ml.

### 2.2.3 Συγκέντρωση ιντερλευκίνης 10 (IL-10) πρωτογάλακτος

Η συγκέντρωση της ιντερλευκίνης 10 (IL- 10) στον ορό του πρωτογάλακτος των 3 και 18 ωρών μετρήθηκε με τη μέθοδο ELISA. (Sheep IL- 10 ELISA kit, CUSABIO, Κίνα) με ευαισθησία 2 pg/ml.

### 2.2.4 Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα πρωτογάλακτος και γάλακτος

Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πρωτογάλακτος των 3 και 18 ωρών και του γάλακτος της 1<sup>ης</sup> και της 7<sup>ης</sup> εβδομάδας, έγινε με τη μέθοδο ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity, ORAC) (Cao and Prior, 1999) και ο υπολογισμός των τιμών ORAC έγινε με τη χρήση της τιμής 1000 ή 500 (πρωτόγαλα ή γάλα, αντίστοιχα) ως παράγοντα αραιώσης του δείγματος και της τιμής 125 ως παράγοντα αραιώσης του δείγματος μάρτυρα. Οι τιμές του ORAC εκφράζονται σε μολι ισοδύναμα του Trolox (TE) / L πλάσματος (μM TE). Για τον υπολογισμό των τελικών αποτελεσμάτων (τιμές ORAC) χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω εξισώσεις:

ORAC value (μM) =  $1000 \times (S_{\text{δείγμα}} - S_{\text{τυφλό δείγμα}}) / (S_{\text{δείγμα}} - S_{\text{δείγμα μάρτυρας}})$  (1), για τα δείγματα πρωτογάλακτος

ORAC value (μM) =  $500 \times (S_{\text{δείγμα}} - S_{\text{τυφλό δείγμα}}) / (S_{\text{δείγμα}} - S_{\text{δείγμα μάρτυρας}})$  (2), για τα δείγματα γάλακτος,

όπου  $S$  αναφέρεται στην περιοχή βαθμιαίας μείωσης του φθορισμού του δείγματος και υπολογίζεται ως εξής:  $S = (0,5 + F_1/F_0 + F_2/F_0 + \dots + F_n/F_0) \times 5$  (καθόσον δείγματα λαμβάνονταν ανά 5 min).

### 2.2.5 Έκφραση υποδοχέων Toll- like

Για τον έλεγχο της έκφρασης των υποδοχέων toll- like απομονώθηκε RNA από ιστούς θύμου αδένων των αμνών που θυσιάστηκαν. Στη συνέχεια στο RNA αυτό διενεργήθηκε αντίστροφη μεταγραφή (Reverse Transcription, RT), με χρήση εμπορικού kit (SuperScript II Reverse Transcriptase kit, Invitrogen), και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR), χρησιμοποιώντας τις κατάλληλες συνθήκες καθώς και εκκινητές (Πίνακας 2.γ), ώστε να πολλαπλασιαστούν τα γονίδια των TLR.

Επίσης διενεργήθηκε ανάλυση της ποσοτικής έκφρασης των γονιδίων των TLR2, TLR4, TLR9 με PCR πραγματικού χρόνου (real- time), με τη χρήση του κυκλοποιητή LightCycler real-timePCR (Roche Molecular Biochemicals), για την πραγματοποίηση της οποίας χρησιμοποιήθηκε εμπορικό kit (KAPPA SYBR FAST qPCR kit, Kappa Biosystems). Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων ποσοτικοποιήθηκαν μέσω της χρήσης του γονιδίου αναφοράς GAPDH.

**Πίνακας 2.γ.** Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τη real- time RT-PCR.

Γονίδιο	Εκκινητές
	Αλληλουχία
TLR1	L actttgccaccacaatctc
	R actctctccttgggccatt
TLR2	L agcactcaaccctcccttt
	R agtgggagaagtccagctca
TLR3	L cggtcagctgtgtcacagt
	R tgtttgtgggaggtcatca
TLR4	L tgctggctgcaaaaagtatg
	R ccctgtagtgaaggcagagc
TLR5	L cctcgaagccttcagttacg
	R accctctgatggactgatgc
TLR6	L caaagcaggaacaatccat
	R ggggttcctttagctttc
TLR7	L aggtctgtggcagttctgt
	R ggtcacgtgattgtctgtgg
TLR8	L ccttgcaaggctaattggag
	R ctctgccaaaacaagccttc
TLR9	L gacctgtcacggaacaacct
	R ccatggtacaggtccagctt
TLR10	L gacatggctcagggttagga
	R ttccctcatgaaggcaaatc
GAPDH	L tgacccttcattgaccttc
	R cacgtactcagcaccagcat

### 2.3 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  τυπικό σφάλμα. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με ανάλυση διακύμανσης (ANOVA, Analysis Of Variance) με σταθερή επίδραση την επέμβαση. Για τον έλεγχο της συσχέτισης της συγκέντρωσης των IgG και της IL- 10 χρησιμοποιήθηκε το κριτήριο κατά Pearson. Η σύγκριση των μέσων όρων έγινε με το κριτήριο κατά Duncan, σε επίπεδο σημαντικότητας 0.05. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα Statistical Package for the Social Sciences version 13.0 (SPSS Inc., Chicago, Ill, USA).

## 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ

### 3.1. Σωματικό βάρος των θηλυκών ζώων

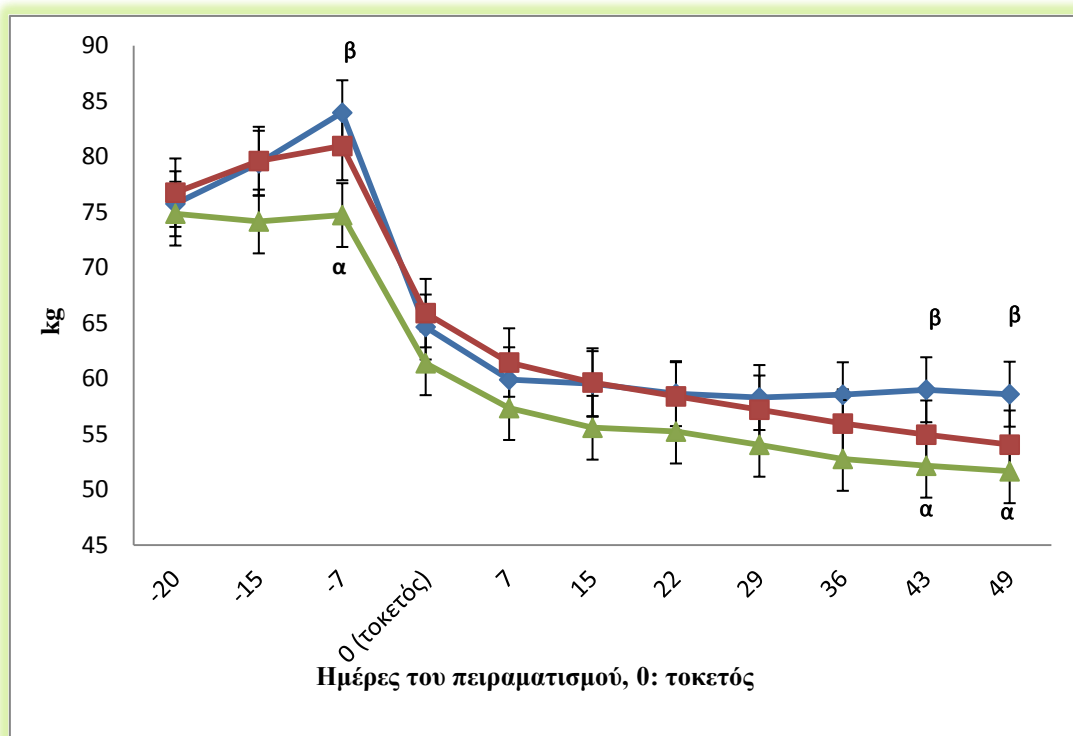
Τα αποτελέσματα (Πίνακας 3.α., Εικόνα 3.Ι.) έδειξαν αύξηση του σωματικού βάρους των θηλυκών ζώων στην ομάδα Μ και Y1 κατά την εγκυμοσύνη, κατά τη διάρκεια της οποίας χορηγείτο σιτηρέσιο που κάλυπτε το 100% των αναγκών τους σε ενέργεια και πρωτεΐνες. Ωστόσο, στην ομάδα Y2, στην οποία ξεκίνησε ο υποσιτισμός 20 ημέρες πριν το τέλος της εγκυμοσύνης, δεν παρατηρήθηκε αύξηση του σωματικού βάρους των ζώων κατά την κύηση, διαφορά η οποία ήταν στατιστικά σημαντική ( $P<0,05$ ) σε σχέση με την ομάδα Μ, σύμφωνα με τη μέτρηση που πραγματοποιήθηκε μία εβδομάδα πριν τον τοκετό.

Μετά τον τοκετό, το σωματικό βάρος των προβατίνων στις ομάδες Y1 και Y2, που υποσιτίζονταν εξίσου σε αυτό το στάδιο, παρουσίαζε συνεχή μείωση η οποία έγινε στατιστικά σημαντική ( $P<0,05$ ) μόνο στην ομάδα Y2 κατά την τελευταία εβδομάδα της γαλουχίας.

**Πίνακας 3.α.** Μέσο σωματικό βάρος (kg) των θηλυκών ζώων στη διάρκεια του πειραματισμού.

Ημέρα σε σχέση με τον τοκετό (D0)	Ομάδα			
	M (n=10)	Y1 (n=10)	Y2 (n=13)	P
D-20	75,8± 2,6	76,7± 1,9	74,9± 1,8	MΣ
D-15	79,4± 2,6	79,6± 2,1	74,2± 1,6	MΣ
D-7	83,9 <sup>β</sup> ± 2,5	80,9 <sup>αβ</sup> ± 3,3	74,7 <sup>α</sup> ± 1,6	<b>0,03</b>
D0	64,6± 2,3	65,9± 2,3	61,4± 1,5	MΣ
D7	59,9± 2,4	61,4± 2,3	57,3± 1,2	MΣ
D15	59,5± 2,3	59,6± 2,0	55,6± 1,5	MΣ
D22	58,6± 2,4	58,4± 2,1	55,2± 1,4	MΣ
D29	58,3± 2,1	57,2± 2,0	54,0± 1,5	MΣ
D36	58,5± 2,1	55,9± 2,0	52,8± 1,5	MΣ
D43	59,0 <sup>β</sup> ± 2,3	54,9 <sup>αβ</sup> ± 2,0	52,1 <sup>α</sup> ± 1,5	<b>0,05</b>
D49	58,6 <sup>β</sup> ± 2,3	54,1 <sup>αβ</sup> ± 1,9	51,6 <sup>α</sup> ± 1,5	<b>0,039</b>

M: μάρτυρες, Y1: υποσιτισμός στη διάρκεια της γαλουχίας μέχρι τον απογαλακτισμό, Y2: υποσιτισμός στη διάρκεια των τελευταίων 20 ημερών της εγκυμοσύνης και της γαλουχίας μέχρι τον απογαλακτισμό. Τιμές με διαφορετικούς εκθέτες διαφέρουν σημαντικά ( $P<0.05$ ).



**Εικόνα 3.I.** Μέσο σωματικό βάρος (kg) των θηλυκών ζώων στη διάρκεια του πειραματισμού.

M: μάρτυρες (γαλάζια γραμμή), Y1: υποσιτισμός στη διάρκεια της γαλουχίας μέχρι τον απογαλακτισμό (κόκκινη γραμμή), Y2: υποσιτισμός στη διάρκεια των τελευταίων 20 ημερών της εγκυμοσύνης και της γαλουχίας μέχρι τον απογαλακτισμό (πράσινη γραμμή).

### 3.2. Σωματικό βάρος των αρνιών

Ο αριθμός των αρνιών που γεννήθηκαν και διατηρήθηκαν στην πειραματική διαδικασία ήταν για την ομάδα του Μάρτυρα 14 αρσενικά και 5 θηλυκά, για την ομάδα Y1 13 αρσενικά και 5 θηλυκά και για την ομάδα Y2 10 αρσενικά και 5 θηλυκά αντίστοιχα.

Στη γέννηση, το σωματικό βάρος των αρνιών (Πίνακας 3.δ.) δεν εμφάνιζε διαφορά μεταξύ των ομάδων ( $P > 0,05$ ). Ωστόσο, η μέση ημερήσια αύξηση σωματικού βάρους (Εικόνα 3.II.) σημείωσε σημαντική μείωση ( $P < 0,05$ ), σε σχέση με την ομάδα μάρτυρα στα αρσενικά αρνιά που γεννήθηκαν από προβατίνες της ομάδας Y1, οι οποίες υποσιτίστηκαν κατά τη γαλουχία, και στα θηλυκά αρνιά που προέκυψαν από προβατίνες και των δύο υποσιτισμένων ομάδων.

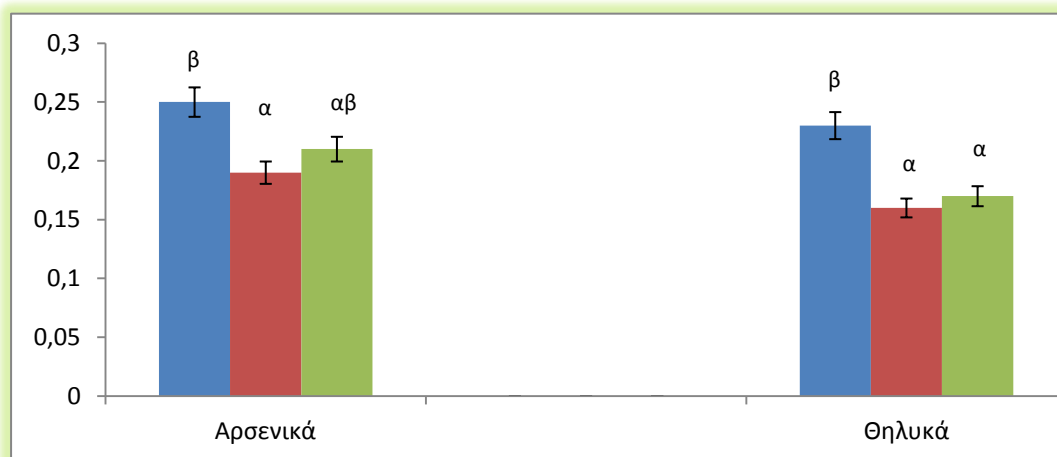


**Πίνακας 3.δ.** Σωματικό βάρος των αρνιών στη γέννηση (kg) και η Μέση Ημερήσια Αύξηση Σωματικού Βάρους (kg) στη διάρκεια του πειραματισμού.

Ομάδα				
Αρσενικά αρνιά	M (n=14)	Y1 (n=13)	Y2 (n=10)	P
Σωματικό βάρος στη γέννηση	4,4±0,2	4,1±0,1	4,1±0,1	MΣ
M.H.A.Σ.B.	0,25 <sup>β</sup> ±0,01	0,19 <sup>α</sup> ±0,02	0,21 <sup>αβ</sup> ±0,03	<b>0,028</b>
Θηλυκά αρνιά	M (n=5)	Y1 (n=7)	Y2 (n=15)	P
Σωματικό βάρος στη γέννηση	4,0±0,3	4,0±0,2	4,3±0,1	MΣ
M.H.A.Σ.B.	0,23 <sup>β</sup> ±0,02	0,16 <sup>α</sup> ±0,01	0,17 <sup>α</sup> ±0,01	<b>0,024</b>

M: μάρτυρες, Y1: υποσιτισμός στη διάρκεια της γαλουχίας μέχρι τον απογαλακτισμό, Y2: υποσιτισμός στη διάρκεια των τελευταίων 20 ημερών της εγκυμοσύνης και της γαλουχίας μέχρι τον απογαλακτισμό. Τιμές με διαφορετικούς εκθέτες διαφέρουν σημαντικά ( $P<0.05$ ).

**Εικόνα 3.Π.** Μέση Ημερήσια Αύξηση Σωματικού Βάρους (kg) των αρνιών στη διάρκεια του πειραματισμού.



M: μάρτυρες (γαλάζιο χρώμα), Y1: υποσιτισμός στη διάρκεια της γαλουχίας μέχρι τον απογαλακτισμό (κόκκινο χρώμα), Y2: υποσιτισμός στη διάρκεια των τελευταίων 20 ημερών της εγκυμοσύνης και της γαλουχίας μέχρι τον απογαλακτισμό (πράσινο χρώμα).

### 3.3. Χημική σύνθεση πρωτογάλακτος και γάλακτος

Τα αποτελέσματα του προσδιορισμού της χημικής σύνθεσης του πρωτογάλακτος και του γάλακτος έδειξαν ότι η περιεκτικότητα σε λακτόζη -εκφρασμένη σε ποσοστό %- μειώθηκε σημαντικά ( $P<0,05$ ) στο πρωτόγαλα των 18 ωρών της ομάδας Y2 που υποσιτίστηκε κατά την κύηση και τη γαλουχία σε σχέση με την ομάδα του μάρτυρα. Επίσης στατιστικά σημαντικές διαφορές στην περιεκτικότητα του πρωτογάλακτος και του γάλακτος- εκφρασμένες πάλι σε ποσοστό %- σε πρωτεΐνες ( $P<0,05$ ), στερεό υπόλειμμα άνευ λίπους ( $P<0,05$ ) και ολικά στερεά ( $P<0,05$ ) παρατηρήθηκαν μεταξύ

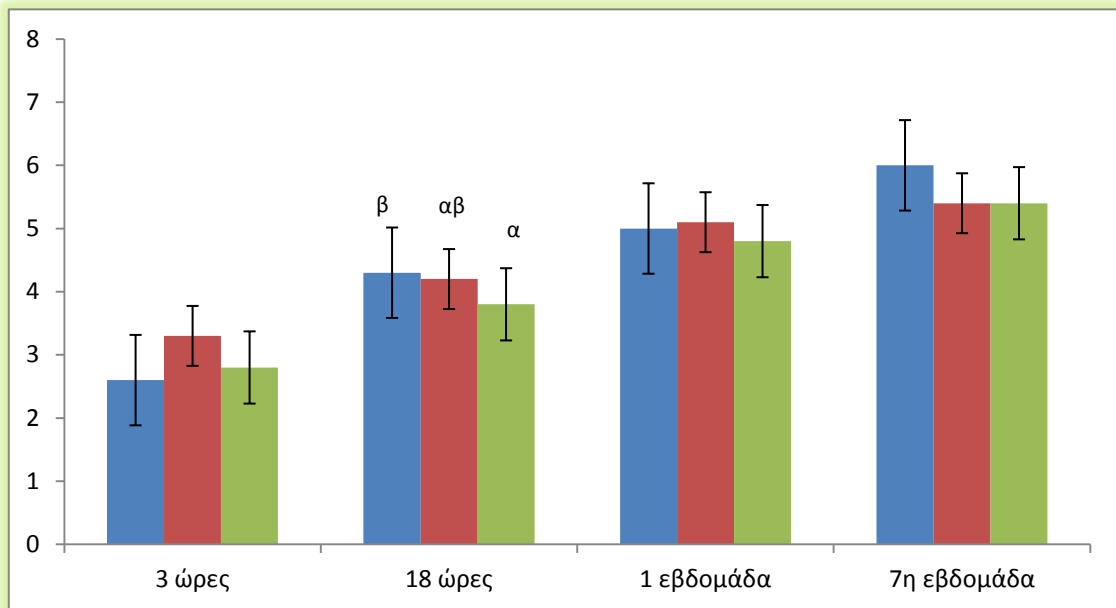
των δύο υποσιτισμένων ομάδων στο πρωτόγαλα και το γάλα στην αρχή της γαλακτικής περιόδου. Ειδικότερα, η πρωτεΐνη της Y2 ομάδας, που υποσιτίστηκε και στα δύο στάδια, εμφανίστηκε σημαντικά μειωμένη ( $P<0,05$ ) στο πρωτόγαλα των 18 ωρών σε σχέση με την Y1 ομάδα. Ίδια εικόνα εμφανίζουν και τα ολικά στερεά άνευ λίπους στο πρωτόγαλα των 18 ωρών, ενώ στα ολικά στερεά παρατηρήθηκε σημαντική μείωσή τους στο γάλα της 1<sup>ης</sup> εβδομάδας της Y1, που υποσιτίστηκε μόνο στη γαλουχία, σε σχέση με την Y2. Παράλληλα, η περιεκτικότητα σε λίπος, πρωτεΐνες, στερεό υπόλειμμα άνευ λίπους και ολικά στερεά μειώθηκε προοδευτικά με την πρόοδο της γαλακτικής περιόδου, ενώ αντίθετα η περιεκτικότητα σε λακτόζη αυξήθηκε, όπως ακριβώς συμβαίνει κατά τη μετάβαση του πρωτογάλακτος σε γάλα υπό φυσιολογικές συνθήκες (Μάντης 2005). Λεπτομερή αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.ε. και τις Εικόνες 3.III-3.IV.

**Πίνακας 3.ε.** Χημική σύνθεση του πρωτογάλακτος και του γάλακτος στη διάρκεια του πειραματισμού.

Χρόνος δειγματοληψίας μετά τον τοκετό (D0)	Ομάδα			P
	M (n=10)	Y1 (n=10)	Y2 (n=13)	
Περιεκτικότητα σε λίπος (%)				
3 ώρες	11,4± 1,7	13,2± 1,8	11,7± 0,9	MΣ
18 ώρες	9,6± 1,0	10,5± 0,6	10,9± 1,0	MΣ
1 εβδομάδα	8,4± 0,6	6,9± 1,6	10,0± 0,5	MΣ
7 εβδομάδες	7,0± 0,6	6,9± 0,4	7,1± 0,2	MΣ
Περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες (%)				
3 ώρες	17,6± 1,7	20,1± 1,2	16,2± 1,0	MΣ
18 ώρες	9,8 <sup>ab</sup> ± 0,9	11,9 <sup>b</sup> ± 0,8	8,8 <sup>a</sup> ± 0,8	<b>0,047</b>
1 εβδομάδα	5,3± 0,2	5,0± 0,2	5,2± 0,1	MΣ
7 εβδομάδες	5,0± 0,4	4,5± 0,1	5,0± 0,1	MΣ
Περιεκτικότητα σε λακτόζη (%)				
3 ώρες	2,6± 0,3	3,3± 0,8	2,8± 0,2	MΣ
18 ώρες	4,3 <sup>b</sup> ± 0,2	4,2 <sup>ab</sup> ± 0,1	3,8 <sup>a</sup> ± 0,1	<b>0,028</b>
1 εβδομάδα	5,0± 0,2	5,1± 0,2	4,8± 0,1	MΣ
7 εβδομάδες	6,0± 0,3	5,4± 0,1	5,4 ± 0,2	MΣ
Περιεκτικότητα σε στερεό υπόλειμμα άνευ λίπους (%)				
3 ώρες	21,8± 1,4	25,0± 1,8	20,5± 0,8	MΣ
18 ώρες	15,7 <sup>ab</sup> ± 0,8	17,8 <sup>b</sup> ± 0,8	14,2 <sup>a</sup> ± 0,7	<b>0,014</b>
1 εβδομάδα	11,1± 0,1	10,9± 0,3	10,8± 0,2	MΣ
7 εβδομάδες	11,7± 0,7	10,7± 0,1	11,2± 0,1	MΣ
Περιεκτικότητα σε ολικά στερεά (%)				
3 ώρες	33,2± 2,3	38,3± 2,8	32,3± 1,0	MΣ
18 ώρες	25,3± 1,1	28,2± 1,1	25,0± 0,8	MΣ
1 εβδομάδα	19,5 <sup>ab</sup> ± 0,5	17,9 <sup>a</sup> ± 1,4	20,8 <sup>b</sup> ± 0,4	<b>0,045</b>
7 εβδομάδες	18,7± 0,3	17,6± 0,4	18,2± 0,3	MΣ

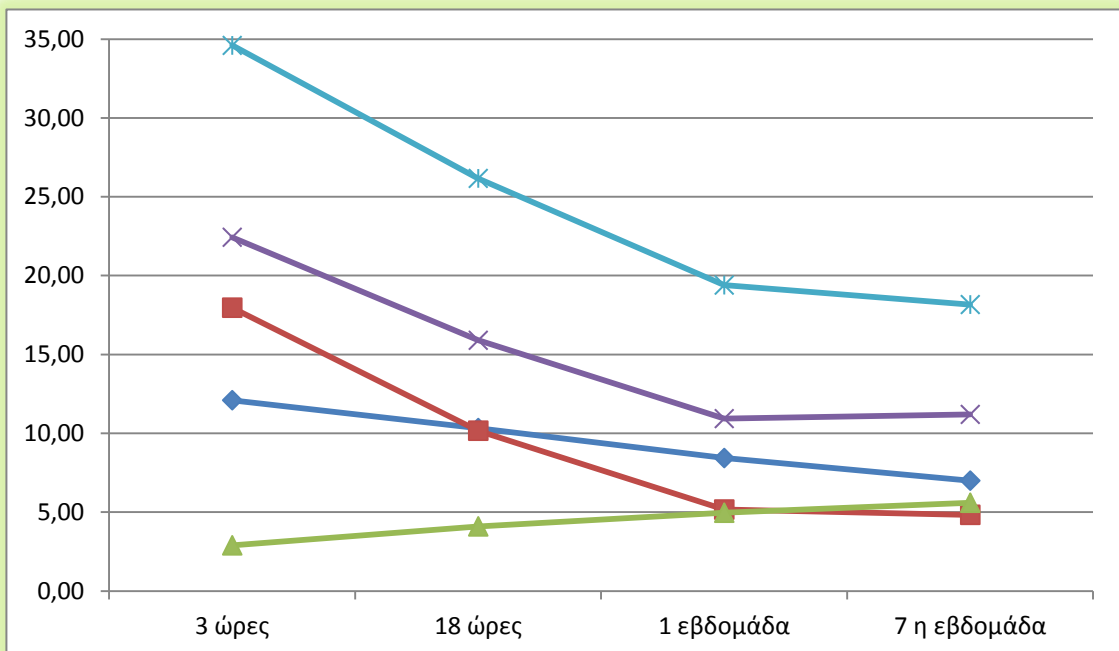
M: μάρτυρες, Y1: υποσιτισμός στη διάρκεια της γαλουχίας μέχρι τον απογαλακτισμό, Y2: υποσιτισμός στη διάρκεια των τελευταίων 20 ημερών της εγκυμοσύνης και της γαλουχίας μέχρι τον απογαλακτισμό. Τιμές με διαφορετικούς εκθέτες διαφέρουν σημαντικά ( $P<0.05$ ).

**Εικόνα 3.III.** Περιεκτικότητα (%) του πρωτογάλακτος και του γάλακτος σε λακτόζη σε δειγματοληψίες στη γαλακτική περίοδο.



M: μάρτυρες (γαλάζιο χρώμα), Y1: υποσιτισμός στη διάρκεια της γαλουχίας μέχρι τον απογαλακτισμό (κόκκινο χρώμα), Y2: υποσιτισμός στη διάρκεια των τελευταίων 20 ημερών της εγκυμοσύνης και της γαλουχίας μέχρι τον απογαλακτισμό (πράσινο χρώμα).

**Εικόνα 3.IV.** Περιεκτικότητα (%) του πρωτογάλακτος και γάλακτος σε λίπος, πρωτεΐνη, λακτόζη, στερεό υπόλειμμα άνευ λίπους και ολικά στερεά κατά τη γαλακτική περίοδο.



Λίπος (μπλε χρώμα), Πρωτεΐνη (κόκκινο χρώμα), Λακτόζη (πράσινο χρώμα), Στερεό υπόλειμμα άνευ λίπους (μωβ), Ολικά στερεά (γαλάζιο χρώμα).

Προηγούμενες μελέτες σε πρόβατα (Swanson et al. 2008, Meyer et al. 2011), κατά τις οποίες πραγματοποιήθηκε υποσιτισμός από τα αρχικά στάδια της κύησης (40<sup>η</sup>-50<sup>η</sup> ημέρα της κύησης) αλλά όχι κατά τη γαλουχία, έδειξαν ότι δεν επηρεάζονται οι παράμετροι της χημικής σύστασης του πρωτογάλακτος των 3 ωρών, όταν είναι εκφρασμένες σε ποσοστό %. Παρουσιάζουν όμως σημαντική μείωση όλης, εκτός του λίπους (Meyer et al. 2011), όταν εκφραστούν ως προς τον ολικό όγκο του πρωτογάλακτος του ζώου. Επειδή σε αυτή τη μελέτη δεν υπολογίστηκε ο συνολικός όγκος του πρωτογάλακτος, δεν δύναται να πραγματοποιηθεί ανάλογη σύγκριση. Επίσης, το γεγονός ότι στη δική μας μελέτη ο υποσιτισμός διήρκησε λιγότερο από ότι στις προηγούμενες μελέτες, πιθανόν να αποτελεί βασικό λόγο που άλλες παράμετροι της χημικής σύστασης δεν παρουσίασαν μεταβολές.

Ωστόσο, το σημαντικά μειωμένο ποσοστό λακτόζης, το οποίο παρουσιάστηκε στο πρωτόγαλα των 18 ωρών της ομάδας Y2, ενδεχομένως να οφείλεται στη μειωμένη συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα των κυοφορούντων ζώων, ως άμεσο αποτέλεσμα του υποσιτισμού τους, καθώς είναι γνωστό ότι η λακτόζη συντίθεται στο μαστικό αδένα μέσω της γλυκόζης που προέρχεται από την αιματική κυκλοφορία. Σε επόμενες δειγματοληψίες, δεν παρατηρήθηκαν ανάλογα ευρήματα, πιθανώς λόγω αντισταθμιστικών μηχανισμών που αναπτύχθηκαν στα ζώα. Αυτοί οι μηχανισμοί πιθανώς να αφορούν στη γλυκονεογένεση από το ήπαρ, καθώς και στη μειωμένη χρήση γλυκόζης από μυς και λιπώδη ιστό (Bell and Bauman 1997), με αποτέλεσμα να αυξάνεται η σύνθεση της λακτόζης στο μαστικό αδένα και η περιεκτικότητα αυτής στο γάλα.

#### **3.4. Συγκέντρωση γ-ανοσοσφαιρινών (IgG) πρωτογάλακτος**

Τα αποτελέσματα του προσδιορισμού της συγκέντρωσης των ανοσοσφαιρινών IgG σε δείγματα πρωτογάλακτος, τα οποία απεικονίζονται στον Πίνακα 3.στ., έδειξαν μία τάση αύξησης ( $P>0,05$ ) της συγκέντρωσης αυτών στις ομάδες Y1 και Y2. Όταν αυτές εκφράστηκαν ως ποσοστό επί των πρωτεϊνών, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική ( $P<0,05$ ) αύξηση στο πρωτόγαλα των 3 ωρών της ομάδας Y2 η οποία υποσιτίστηκε κατά την κύηση και κατά τη γαλουχία.

**Πίνακας 3.στ.** Περιεκτικότητα του πρωτογάλακτος σε IgG.

Χρόνος δειγματοληψίας μετά τον τοκετό (D0)	Ομάδα			P
	M (n=10)	Y1 (n=10)	Y2 (n=13)	
Περιεκτικότητα σε IgG (mg/ml)				
3 ώρες	24,6±3,0	30,4±3,4	32,8±2,6	MΣ
18 ώρες	9,6±1,2	13,3±1,7	13,8±3,0	MΣ
Λόγος ανοσοσφαιρινών ως προς ολικές πρωτεΐνες (%)				
3 ώρες	13,4 <sup>a</sup> ±1,5	14,8 <sup>a,β</sup> ±2,3	20,3 <sup>β</sup> ±1,9	<b>0,029</b>
18 ώρες	8,9±9,5	14,6±3,7	19,5±6,9	MΣ

M: μάρτυρες, Y1: υποσιτισμός στη διάρκεια της γαλουχίας μέχρι τον απογαλακτισμό, Y2: υποσιτισμός στη διάρκεια των τελευταίων 20 ημερών της εγκυμοσύνης και της γαλουχίας μέχρι τον απογαλακτισμό. Τιμές με διαφορετικούς εκθέτες διαφέρουν σημαντικά ( $P<0.05$ ).

Μελέτες σε αγελάδες, στις οποίες χορηγήθηκε σιτηρέσιο περιορισμένο σε πρωτεΐνες κατά το τελευταίο στάδιο της κυοφορίας, εμφάνισαν αντικρουόμενα αποτελέσματα. Ορισμένες έδειξαν ότι δεν επηρεάστηκε η συγκέντρωση των IgG από τον υποσιτισμό (Fishwick and Clifford 1975, DeLong et al. 1979, Burton et al. 1984), ενώ άλλες, παρουσίασαν μια τάση αύξησης των IgG ( $P>0,05$ ) (Blecha et al. 1981). Τάση αύξησης της συγκέντρωσης των IgG σε αγελάδες επισημαίνουν και οι Hough et al. (1990), στη μελέτη των οποίων χορηγήθηκε σιτηρέσιο που κάλυπτε το 57% των αναγκών σε ενέργεια και αζωτούχες ουσίες κατά το τελευταίο τρίμηνο της κύησης. Οι Butler et al. (1983) αναφέρουν ότι στις αγελάδες, για τη μεταφορά των IgG από την αιματική κυκλοφορία στο μαστικό αδένα, πρέπει να μεσολαβήσουν ειδικοί υποδοχείς για να επιτευχθεί αυτή η διαδικασία. Υπάρχει λοιπόν το ενδεχόμενο, η αλλαγή στη διατροφή των ζώων και ο περιορισμός των θρεπτικών συστατικών κατά τον υποσιτισμό, να αύξησε τη συγκέντρωση των υποδοχέων IgG στο μαστικό αδένα με αποτέλεσμα και την τάση αύξησης της συγκέντρωσής τους στο μαστικό έκκριμα.

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε πρόβατα που υποσιτίστηκαν από την 50<sup>η</sup> ημέρα της κύησης μέχρι τον τοκετό βρέθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση ( $P<0,01$ ) της συγκέντρωσης των IgG σε δείγματα πρωτογάλακτος 3 ωρών. Η αύξηση όμως αυτή αποδόθηκε στο μειωμένο ( $P<0,01$ ), όγκο πρωτογάλακτος (Swanson et al. 2008). Στην παρούσα μελέτη δεν μετρήθηκε ο συνολικός όγκος του πρωτογάλακτος από κάθε ζώο οπότε δεν μπορεί να γίνει η συγκεκριμένη εκτίμηση, όταν όμως εκφράστηκαν ως ποσοστό επί των συνολικών πρωτεϊνών του γάλακτος, παρατηρήθηκε όπως αναφέρθηκε, αύξηση στις ομάδες Y1 και Y2, πράγμα που μπορεί να οφείλεται σε αυξημένη απορρόφησή τους από το έντερο των νεογέννητων αμνών. Όπως είναι γνωστό το έντερο των νεογέννητων αρνιών είναι διαπερατό σε μακρομόρια τις πρώτες ώρες της ζωής του, ώστε να το διαπερνούν ακέραιες πρωτεΐνες, όπως οι ανοσοσφαιρίνες (Halliday and Williams 1979, Vihan 1988). Η αύξηση λοιπόν των IgG

ως προς τις ολικές πρωτεΐνες που παρατηρήθηκε στα δείγματα πρωτογάλακτος της ομάδας που υποσιτίστηκε κατά την κύηση και κατά τη γαλουχία (Y2), ενδέχεται να οφείλεται σε αυξημένη απορρόφηση ανοσοσφαιρινών από το έντερο των αμνών που γεννήθηκαν από τις προβατίνες της Y2 ομάδας.

Αντίστοιχες μελέτες σε ανθρώπους που εξέτασαν τη συγκέντρωση της κύριας κλάσης ανοσοσφαιρινών (IgA για τους ανθρώπους) στο πρωτόγαλα μητέρων που είτε γέννησαν κανονικά είτε πρόωρα, έδειξαν αυξημένες συγκεντρώσεις των IgA στο πρωτόγαλα των μητέρων με πρόωρα βρέφη, πιθανόν λόγω ανάπτυξης αντισταθμιστικών μηχανισμών (Araújo et al. 2005, Castellote et al. 2011).

### 3.5. Συγκέντρωση ιντερλευκίνης 10 (IL-10) πρωτογάλακτος

Τα αποτελέσματα από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της ιντερλευκίνης 10 σε δείγματα πρωτογάλακτος παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.ζ. Σύμφωνα με αυτά η περιορισμένη διατροφή των μητέρων δεν φαίνεται να επηρεάζει τη συγκέντρωσή της στο πρωτόγαλα. Ο έλεγχος όμως για συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης των IgG και της συγκέντρωσης της ιντερλευκίνης 10 έδειξε ότι υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ των δύο παραμέτρων στα δείγματα της ομάδας- Μάρτυρα στο πρωτόγαλα των 18 ωρών ( $P < 0,05$ ) όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.η.

**Πίνακας 3.ζ.** Περιεκτικότητα (pg/mL) του πρωτογάλακτος σε ιντερλευκίνη 10.

Χρόνος δειγματοληψίας μετά τον τοκετό (D0)	Ομάδα			P
	M (n=10)	Y1 (n=10)	Y2 (n=13)	
Περιεκτικότητα σε IL- 10 (pg/ml)				
3 ώρες	5,9±0,4	6,9±0,4	5,4±0,3	MΣ
18 ώρες	3,3±0,2	4,0±0,4	3,8±0,4	MΣ

M: μάρτυρες, Y1: υποσιτισμός στη διάρκεια της γαλουχίας μέχρι τον απογαλακτισμό, Y2: υποσιτισμός στη διάρκεια των τελευταίων 20 ημερών της εγκυμοσύνης και της γαλουχίας μέχρι τον απογαλακτισμό. Τιμές με διαφορετικούς εκθέτες διαφέρουν σημαντικά ( $P < 0.05$ ).

**Πίνακας 3.η.** Συσχετισμός Ανοσοσφαιρινών με Ιντερλευκίνη 10.

Χρόνος δειγματοληψίας μετά τον τοκετό (D0)	Ομάδα		
	M (n=10)	Y1 (n=10)	Y2 (n=13)
Συσχετισμός IgG με IL- 10			
3 ώρες	0,565	0,266	0,308
18 ώρες	0,801* (0,03)	0,005	-0,276

M: μάρτυρες, Y1: υποσιτισμός στη διάρκεια της γαλουχίας μέχρι τον απογαλακτισμό, Y2: υποσιτισμός στη διάρκεια των τελευταίων 20 ημερών της εγκυμοσύνης και της γαλουχίας μέχρι τον απογαλακτισμό. Τιμές με εκθέτες \* αντιστοιχούν σε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση ( $P<0.05$ ).

Ο έλεγχος για τον προσδιορισμό της ιντερλευκίνης 10 στο μαστικό έκκριμα παρουσιάζει σημαντικό ενδιαφέρον γιατί η κυτταροκίνη αυτή προκαλεί τη διαφοροποίηση των B λεμφοκυττάρων και ενισχύει την παραγωγή ανοσοσφαιρινών από τα B κύτταρα, καθώς και αναστέλλει την παραγωγή άλλων κυτταροκινών από τα Th1 κύτταρα, αποτελώντας έτσι σημαντικό ανοσορρυθμιστικό παράγοντα (Rousset et al. 1992, Yilmaz et al. 2007). Επίσης, έχει αναφερθεί ανίχνευση mRNA ιντερλευκίνης 10 σε καλλιέργειες ανθρώπινων επιθηλιακών κυττάρων μαστού, υποστηρίζοντας την αποκρινή έκκριση ως πιθανή πηγή του μορίου (Garofalo et al. 1995). Στις αγελάδες υπάρχουν λίγα αποτελέσματα προσδιορισμού κυτταροκινών σε πρωτόγαλα, τα οποία έχουν ανιχνεύσει τις IL-1β, IL-6, TNF-α και INF-γ (Hagiwara et al. 2000) αλλά και την ιντερλευκίνη 10 τόσο σε πρωτόγαλα όσο και σε γάλα (Britti et al. 2005). Επίσης υπάρχουν και μελέτες που έχουν προσπαθήσει να συσχετίσουν τη συγκέντρωση της IL-10 με βακτηριακή μόλυνση στο μαστικό αδένιο (Peli et al. 2004).

Μελέτες σε άνθρωπο εξετάζουν κυρίως τη συγκέντρωση ιντερλευκινών στο πρωτόγαλα μητέρων που γέννησαν πρόωρα (ίσως ενδεικτικό καθυστέρησης της ανάπτυξης *in utero*) ή κανονικά. Σε έκκριμα αυτών των γυναικών βρέθηκε μειωμένη συγκέντρωση κυτταροκινών σε όσες γέννησαν πρόωρα (Ustundag et al. 2005), ενώ η συγκέντρωση της ιντερλευκίνης 10 δεν φάνηκε να επηρεάστηκε από τον πρόωρο τοκετό (Fituch et al. 2004, Castellote et al. 2011). Άλλη μελέτη ωστόσο, παρουσιάζει τη συγκέντρωση της IL-10 αυξημένη σε μεταβατικό γάλα γυναικών που γέννησαν πολύ πρόωρα (Mehta and Petrova 2011). Τα αποτελέσματα αυτά εμφανίζουν ποικίλες παραλλαγές οι οποίες πιθανόν να οφείλονται στα διαφορετικά διαστήματα υποσιτισμού, στους πιθανούς περιορισμένους αριθμούς δειγμάτων, στις διαφορές κατά τη συλλογή των δειγμάτων και την έλλειψη τυποποιημένων μεθόδων προσδιορισμού, έτσι ώστε εμφανίζονται αποκλίσεις στα αποτελέσματα μεταξύ των διαφορετικών τεχνικών προσδιορισμού. Έλεγχος για την ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ ανοσοσφαιρινών και IL-10 έχει πραγματοποιηθεί και στο παρελθόν σε ανθρώπινα δείγματα πρωτογάλακτος από μελέτη σε γυναίκες με πρόωρους τοκετούς (Castellote et al. 2011). Στη μελέτη αυτή οι ερευνητές είχαν επισημάνει στατιστικά σημαντική ( $P<0,01$ ) θετική συσχέτιση μεταξύ



της κύριας κλάσης των ανοσοσφαιρινών του ανθρώπου (IgA) και της IL- 10 τόσο σε πρωτόγαλα από μητέρες που γέννησαν πρόωρα όσο και σε εκείνες που γέννησαν φυσιολογικά. Τα αποτελέσματα αυτά οδήγησαν τους ερευνητές στο συμπέρασμα ότι η IL- 10 συμμετέχει στο σχηματισμό της σύνθεσης της IgA στο μαστικό αδένα.

Στη δική μας μελέτη παρουσιάστηκε σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ της IgG και της IL- 10 μόνο στο πρωτόγαλα των ζώων στα οποία χορηγήθηκε σιτηρέσιο που κάλυπτε το 100% των αναγκών τους καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Σύμφωνα όμως με τους Rousset et al. (1992) η IL- 10 μπορεί να προκαλέσει την παραγωγή τόσο των IgA αλλά και των IgG και IgM, άρα είναι πιθανό στα φυσιολογικώς σιτιζόμενα ζώα η IL- 10 να παράγει την έκκριση των IgG, φαινόμενο που δεν παρατηρείται κατά τον υποσιτισμό στο τελευταίο στάδιο της κύησης ή/ και κατά τη γαλουχία. Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι η IL- 10 παρουσιάζει σημαντικό ενδιαφέρον για περαιτέρω μελέτη σε ζώα κατά τον υποσιτισμό, καθώς δεν έχουν διευκρινιστεί με σαφήνεια οι τρόποι πρόκλησης της ανοσορρυθμιστικής της λειτουργίας.

### 3.6. Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα πρωτογάλακτος και γάλακτος

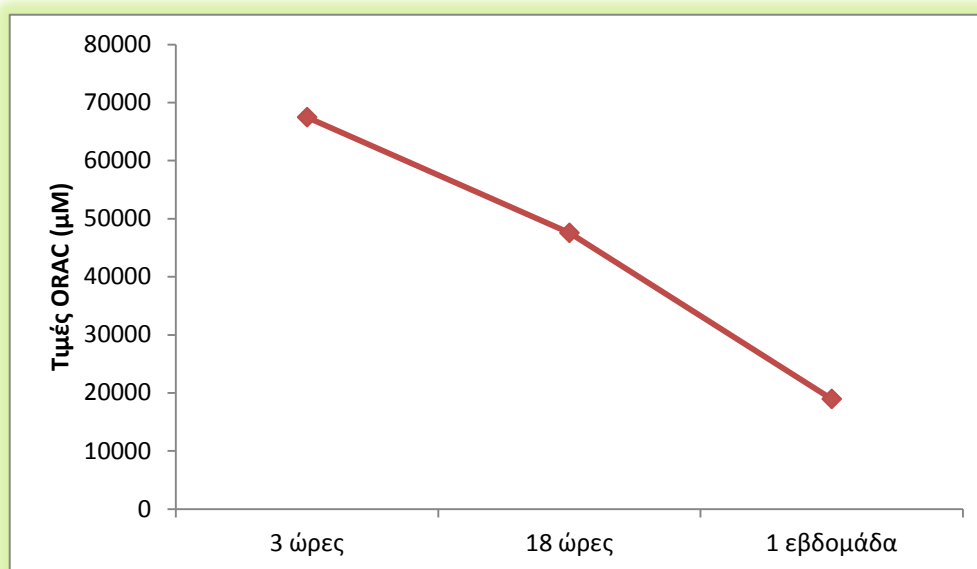
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.θ., ο υποσιτισμός κατά την κύηση ή/και τη γαλουχία δεν επηρέασε την αντιοξειδωτική ικανότητα του μαστικού εκκρίματος των προβάτων. Παρατηρήθηκε όμως, στατιστικά σημαντική ( $P<0,001$ ) γραμμική μείωση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του πρωτογάλακτος και γάλακτος με την πάροδο του χρόνου όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.V.

**Πίνακας 3.θ.** Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (τιμές ORAC  $\mu\text{M}$ ) πρωτογάλακτος και γάλακτος.

Χρόνος δειγματοληψίας μετά τον τοκετό (D0)	Ομάδα			P
	M (n=10)	Y1 (n=10)	Y2 (n=13)	
3 ώρες	62730	74103	65556	MΣ
18 ώρες	54191	50838	37605	MΣ
1 εβδομάδα	16901	18890	21044	MΣ

M: μάρτυρες, Y1: υποσιτισμός στη διάρκεια της γαλουχίας μέχρι τον απογαλακτισμό, Y2: υποσιτισμός στη διάρκεια των τελευταίων 20 ημερών της εγκυμοσύνης και της γαλουχίας μέχρι τον απογαλακτισμό. Τιμές με διαφορετικούς εκθέτες διαφέρουν σημαντικά ( $P<0.05$ ).

**Εικόνα 3.V.** Γραμμική μείωση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του πρωτογάλακτος και του γάλακτος των προβατίνων με την πρόοδο της γαλακτικής περιόδου.



Τα αποτελέσματα αυτά είναι τα πρώτα που παρουσιάζονται σε δείγματα από μαστικό έκκριμα προβατίνων. Μελέτες για τον προσδιορισμό της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του πρωτογάλακτος και γάλακτος έχουν πραγματοποιηθεί κυρίως σε άνθρωπο, ενώ ελάχιστες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί σε γάλα αγελάδων (Zulueta et al. 2009, Simos et al. 2011), αιγών και γαϊδουριών (Simos et al. 2011).

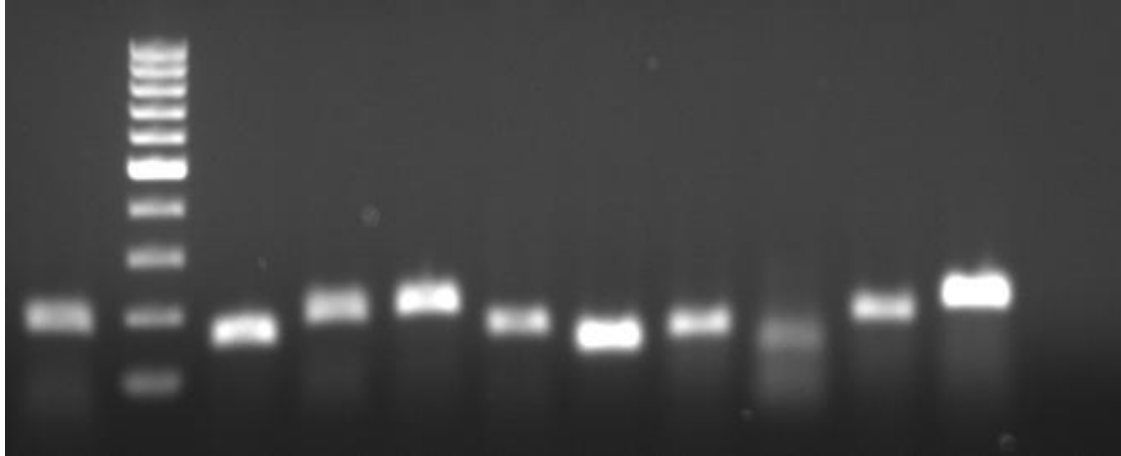
Μελέτες σε γυναίκες με πρόωπους τοκετούς έδειξαν μειωμένη ( $P < 0,05$ ) αντιοξειδωτική ικανότητα του πρωτογάλακτος σε σχέση με αυτές που γέννησαν κανονικά (Quiles et al. (2006). Στην ίδια έρευνα παρατηρήθηκε και στατιστικά σημαντική μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του γάλακτος σε σχέση με το πρωτόγαλα. Παρόμοια εικόνα μείωσης, η οποία σημείωσε μάλιστα και μοτίβο γραμμικής μείωσης ( $P < 0,001$ ) με το χρόνο (Εικ. 3.V.), παρατηρήθηκε στη δική μας μελέτη, ενισχύοντας την άποψη ότι το πρωτόγαλα των πρώτων ωρών είναι πλουσιότερο σε ευεργετικά συστατικά.

### 3.7. Έκφραση υποδοχέων Toll- like

Κατά τον έλεγχο για την έκφραση των υποδοχέων toll- like σε ιστούς θύμου αδένα αμνών, γεννηθέντων από προβατίνες που σιτίστηκαν φυσιολογικά (ομάδα-μάρτυρας), εκφράζονται όλοι οι υποδοχείς εκτός από το TLR10. Επίσης ο TLR7 εμφανίζει χαμηλά επίπεδα έκφρασης (Εικόνα 3.VI.). Κατά τον ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση ( $P < 0,05$ ) της έκφρασης του TLR2 υποδοχέα στους αμνούς που γεννήθηκαν από προβατίνες της ομάδας Y2, η οποία υποσιτίστηκε κατά την κύηση και κατά τη γαλουχία, ενώ στους TLR4 και TLR9

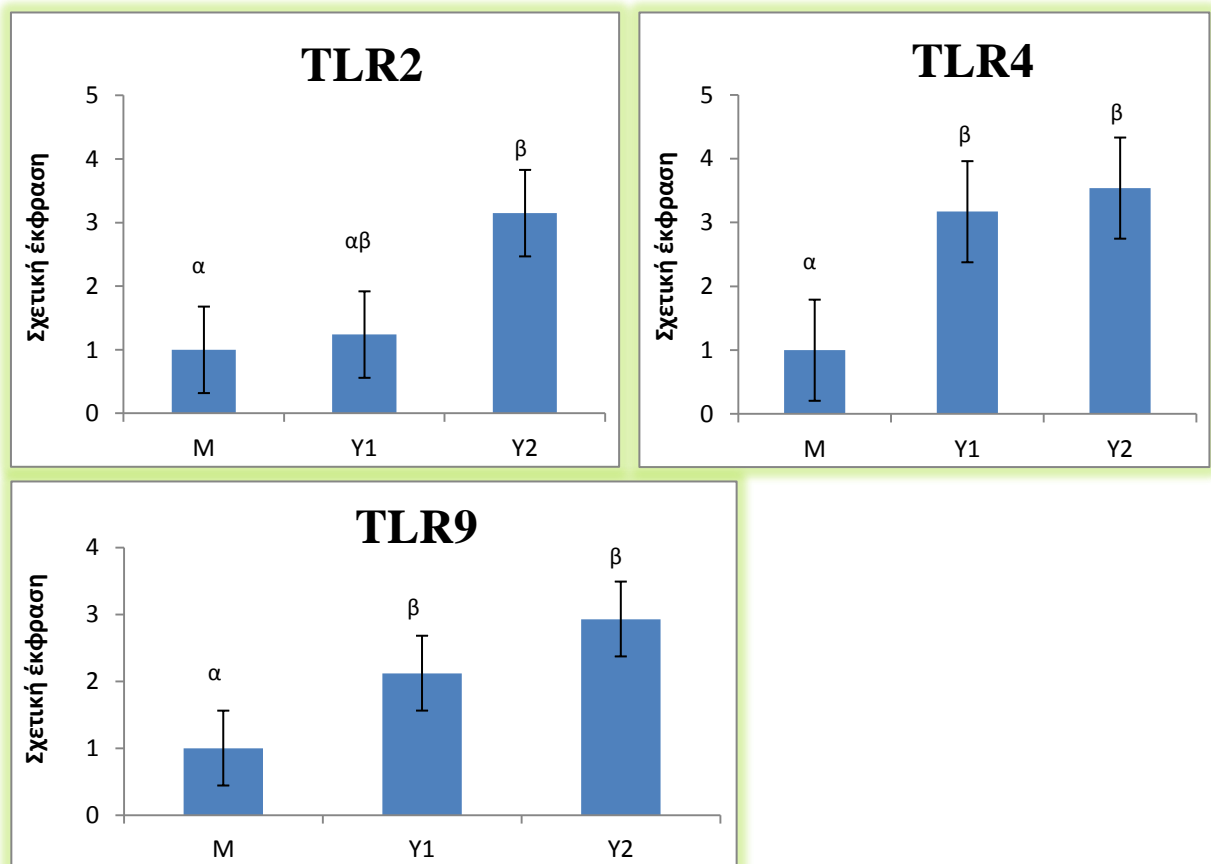
παρατηρήθηκε αύξηση ( $P < 0,05$ ) της έκφρασης στους αμνούς που γεννήθηκαν και από τις δύο υποσιτισμένες ομάδες (Εικόνα 3.VII.).

**Εικόνα 3.VI.** Έκφραση υποδοχέων Toll- like.



GAPDH, Ladder, TLR 1, TLR 2, TLR 3, TLR 4, TLR 5, TLR 6, TLR 7, TLR 8, TLR 9, TLR 10

**Εικόνα 3.VII.** Ποσοτικός προσδιορισμός της έκφρασης ορισμένων TLRs.



M: μάρτυρες, Y1: υποσιτισμός στη διάρκεια της γαλουχίας μέχρι τον απογαλακτισμό, Y2: υποσιτισμός στη διάρκεια των τελευταίων 20 ημερών της εγκυμοσύνης και της γαλουχίας μέχρι τον απογαλακτισμό.  $n=3$ . Τιμές με διαφορετικούς εκθέτες διαφέρουν σημαντικά ( $P < 0,05$ ).

Οι υποδοχείς Toll- like (TLRs) διαδραματίζουν πρωτεύοντα ρόλο στην αναγνώριση των εισβαλόντων μικροοργανισμών και στην ενεργοποίηση του μηχανισμού της φλεγμονής (Medzhitov et al. 1997a). Οι υποδοχείς αυτοί εκφράζονται στα μακροφάγα, στα σιτευτικά κύτταρα και στα δενδριτικά σε πολλά είδη ιστών. Ο θύμος αδένας είναι ένα πρωτογενές λεμφικό όργανο το οποίο επηρεάζεται σε μεγάλο ποσοστό από τη διατροφή με αποτέλεσμα να έχει χαρακτηριστεί ως 'βαρόμετρο υποσιτισμού' (Prentice 1999). Αποτελεί λοιπόν σημαντικό εργαλείο μελέτης κατά τον υποσιτισμό.

Ελάχιστες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για την έκφραση των toll- like υποδοχέων σε πρόβατα. Αυτές αφορούν δείγματα από μονοκύτταρα του αίματος, μακροφάγα του πνεύμονα, των λεμφογαγγλίων ή και του δέρματος (Chang et al. 2008). Όσον αφορά τις αίγες είναι γνωστή μόνο μία μελέτη κατά την οποία ελήφθησαν δείγματα από μονοκύτταρα του αίματος (Raja et al. 2011). Στις προηγούμενες μελέτες και στα δύο είδη ζώων έχουν εκφραστεί και τα 10 είδη TLRs στα μακροφάγα των ιστών που αναφέρθηκαν (αίμα, πνεύμονα, λεμφογάγγλια και δέρμα). Εντούτοις, έλεγχος για την έκφραση των υποδοχέων toll- like σε θύμο αδένα υγιών προβάτων δεν έχει πραγματοποιηθεί, και τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, όσον αφορά την έκφραση, είναι τα πρώτα που παρουσιάζονται. Οι Kuyperset et al. (2012) ωστόσο, ύστερα από πειραματική φλεγμονή των εμβρυϊκών υμένων προβατίνων με λιποπολισακχαρίτες (LPS), έδειξαν ότι παρατηρείται αυξημένη έκφραση του TLR4 σε ιστούς θύμου αδένα εμβρύων προβάτων. Η πειραματική μόλυνση, όπως και ο υποσιτισμός κατά την κύηση είναι στρεσοτικοί παράγοντες για το έμβρυο, και πιθανώς να είναι αυτή η εξήγηση που παρατηρείται αυξημένη έκφραση του TLR4 και στην παρούσα μελέτη.

Αντίστοιχες μελέτες σε αγελάδες, οι οποίες υπέστησαν επίδραση από στρεσογόνους παράγοντες (Eicher et al. 2004), έδειξαν αντίθετα αποτελέσματα, όπως μείωση της έκφρασης των TLR2 και TLR4 σε μακροφάγα του πνεύμονα, και καμία επίδραση σε αυτά του σπλήνα ή του θύμου αδένα. Επίσης αποτελέσματα μελέτης σε επίμυες, οι οποίοι υποβλήθηκαν σε υποσιτισμό κατά τη διάρκεια της κύησης (Equils et al. 2005), έδειξαν μειωμένη έκφραση του TLR4 στο ήπαρ, όχι όμως και στο σπλήνα ή το έντερο. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η έκφραση των υποδοχέων toll- like είναι ειδική του ιστού και ίσως και ειδική για κάθε είδος ζώου. Ο μικρός όμως αριθμός ζώων που χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης των TLRs στην παρούσα μελέτη, καθώς και οι περιορισμένες γνώσεις στο κομμάτι των TLRs δεν μας επιτρέπουν την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων. Ανοίγουν όμως το δρόμο και προκαλούν το ενδιαφέρον για περαιτέρω διερεύνηση.

## **E. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

Ο υποσιτισμός προβατίνων στο τελευταίο διάστημα της κύησης ή/ και κατά τη γαλουχία εμφάνισε επίδραση στη χημική σύσταση και στην έκφραση των υποδοχέων toll- like, ενώ μόνο μια τάση αύξησης στη συγκέντρωση των IgG. Η συγκέντρωση της ιντερλευκίνης 10 και της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας δεν μεταβλήθηκαν από τον υποσιτισμό σε αυτά τα στάδια. Επίσης στα ζώα που διατράφηκαν στο 100% των αναγκών τους (M), εμφανίστηκε θετική συσχέτιση των IgG και IL-10 στο πρωτόγαλα των 18 ωρών και στους απογόνους εκφράστηκαν όλοι οι υποδοχείς toll- like εκτός του TLR10. Αναλυτικότερα για τα στάδια στα οποία εφαρμόστηκε ο υποσιτισμός, οι προβατίνες που υποσιτίστηκαν μόνο κατά τη γαλουχία μέχρι τον απογαλακτισμό (Y1), εμφάνισαν αύξηση της έκφρασης των TLR4 και TLR9 στους απογόνους, ενώ καμία άλλη παράμετρος δεν μεταβλήθηκε. Αντίθετα αυτές που υποσιτίστηκαν και στα δύο στάδια, δηλαδή κατά το τέλος της κύησης και τη γαλουχία μέχρι τον απογαλακτισμό (Y2), παρουσίασαν μείωση της συγκέντρωσης της λακτόζης στο πρωτόγαλα των 18 ωρών όσον αφορά τη χημική σύσταση, αύξηση της συγκέντρωσης των IgG όταν εκφράστηκαν ως ποσοστό επί των πρωτεϊνών στο πρωτόγαλα των 3 ωρών και αύξηση της έκφρασης των TLR2, TLR4 και TLR9 στους απογόνους. Παρατηρούνται δηλαδή διαφορετικές μεταβολές στις ανοσολογικές παραμέτρους του πρωτογάλακτος των προβατίνων, και των TLRs των απογόνων ανάλογα με το στάδιο στο οποίο έχει πραγματοποιηθεί ο υποσιτισμός.

## **ΣΤ. ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ**

Προκειμένου να διευκρινιστεί η επίδραση της διατροφής των προβατινών στο τελικό στάδιο της εγκυμοσύνης και κατά τη γαλουχία σε παραμέτρους της ανοσολογικής ικανότητας των αρνιών τους έχουν προγραμματιστεί και άλλοι προσδιορισμοί οι οποίοι όμως δεν αποτελούν αντικείμενο της παρούσας μελέτης. Σε αυτούς περιλαμβάνονται προσδιορισμός επιπλέον κυτταροκινών όπως του TNF-α και της ιντερλευκίνης 7 στο πρωτόγαλα. Επίσης από τα δείγματα του θύμου αδένος των απογόνων, έχει προγραμματιστεί να διενεργηθεί ποσοτικός προσδιορισμός των υπόλοιπων TLRs που εκφράστηκαν και προσδιορισμός της ορμόνης θυμίνης.

## Z. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- Abbas A.K., Lichtman A.H. (2004). Innate Immunity. In “Basic Immunology, Functions and Disorders of the Immune System”, Publ. Elsevier, USA, pp. 21-39.
- Adamski F. M., King A. T. Demmer J. (2000). Expression of the Fc receptor in the mammary gland during lactation in the marsupial *Trichosurus vulpecula* (brushtail possum). *Molecular Immunology*, 37:435–444.
- Akira S., Takeda K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*, 4:499.
- Araújo E. D., Gonçalves A. K., Cornetta M. C., Cunha H., Cardoso M. L., Morais S. S., Giraldo P. C. (2005). Evaluation of the Secretory Immunoglobulin A Levels in the Colostrum and Milk of Mothers of Term and Pre-Term Newborns. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 2005;9 (5):357-362
- Argüello A, Castro N, Zamorano M.J., Castroalonso A., Capote J. (2004). Passive transfer of immunity in kid goats fed refrigerated and frozen goat colostrum and commercial sheep colostrum. *Small Ruminant Research*, 54:237-241.
- Argüello A., Castro N., Álvarez S., Capote J. (2006). Effect of the number of lactations and litter size on chemical composition and physical characteristics of goat colostrum, *Small Ruminant Research*, 64:53 -59.
- Argüello A., Castro N., Marichal A., Capote J., Ginés R., López J.L. (1999). Effects of the length of gestation and litter size on colostrum quality. *O. médico Veterinario*, 61:29-32.
- Awadeh F.T., Kincaid R.L., Johnson K.A. (1998). Effect of level and source of dietary selenium on concentrations of thyroid hormones and immunoglobulins in beef cows and calves, *Journal of Animal Science*, 76:1204-1215.
- Barja-Fidalgo C., Souza E.P., Silva S.V., Rodrigues A.L., Anjos-Valotta E.A., Sannomyia P., DeFreitas M.S., Moura A.S. (2003). Impairment of inflammatory response in adult rats submitted to maternal undernutrition during early lactation: Role of insulin and glucocorticoid. *Inflammation Research*. 52(11): 470–476.
- Barker D.J., Bull AR, Osmond C, Simmonds SJ. (1990). Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. *British Medical Journal*, 301: 259–266.
- Barker D.J., Gluckman P.D., Godfrey K.M., Harding J.E., Owens J.A., Robinson J.S., (1993a). Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet*, 341(8850):938–941.
- Barker D.J., Hales C.N., Fall C.H., Osmond C., Phipps K., Clark P.M. (1993b). Type 2 non-insulin-dependent diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia syndrome X: relation to reduced fetal growth. *Diabetologia*, 36: 62–67.
- Barker D.J., Winter P.D., Osmond C., Margetts B., Simmonds S.J. (1989). Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet*, 2: 577–580.
- Barrington G.M., Besser T.E., Gay C.C., Davis W.C., Reeves J.J., McFadden T.B., Akers R.M. (1999). Regulation of the immunoglobulin G1 receptor: effect of prolactin on in vivo expression of the bovine mammary immunoglobulin G1 receptor. *Journal of Endocrinology*, 163:25-31.
- Barrington G.M., McFadden T.B., Huyler M.T., Besser T.E. (2001). Regulation of colostrogenesis in cattle. *Livestock Production Science*, 70:95-104.

- Beach R.S., Gershwin M.E., Hurley L.S. (1982). Gestational zinc deprivation in mice: persistence of immunodeficiency for three generations. *Science*, 218: 469–471.
- Beach R.S., Gershwin M.E., Hurley L.S. (1983). Persistent immunological consequences of gestation zinc deprivation. *American Journal of Clinical Nutrition*, 38:579–590.
- Bell A.W., Bauman D.E. (1997). Adaptations of Glucose Metabolism During Pregnancy and Lactation. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 2(3): 265- 278.
- Bertram C.E., Hanson M.A. (2001). Animal models and programming of the metabolic syndrome, *British Medical Bulletin*, 60: 103–121.
- Besser T.E., Gay C.C. (1985). Septicaemic colibacillosis and failure of passive transfer of colostral immunoglobulins in calves. *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*, 1: 445-473.
- Biswas P., Vecchi A., Mantegani P., Mantelli B., Fortis C., Lazzarin A. (2007). Immunomodulatory effects of bovine colostrum in human peripheral blood mononuclear cells. *New Microbiologica*, 30(4):447-54.
- Blecha F., Bull R.C., Olson D.P., Ross R.H., Curtis S. (1981). Effects of Prepartum Protein Restriction in the Beef Cow on Immunoglobulin Content in Blood and Colostral Whey and Subsequent Immunoglobulin Absorption by the Neonatal Calf. *Journal of Animal Science*, 53:1174-1180.
- Blum J.W., Hammon H.M. (2000). Colostrum effects on the gastrointestinal tract, and on nutritional, endocrine and metabolic parameters in neonatal calves. *Livestock Production Science*, 66:151-159.
- Brandon M.R., Watson D.L., Lascelles A.K. (1971). The mechanism of transfer of immunoglobulin into mammary secretion of cows. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, 49:613-623.
- Britti D., Peli A., Massimini G., Polci A., Luciani A., Famigli-Bergamini P. (2005). Evaluation of TNF- $\alpha$ , IL-8 and IL-10 Transcriptional Activity in Milk from Healthy Dairy Cows During Lactation Period. *Veterinary Research Communications*, 29(Suppl. 2): 281–284.
- Burton J.H., Hosein A.A., MCMillan L., Grieve D.G., Wilkie B.N. (1984). Immunoglobulin absorption in calves as influenced by dietary protein intakes of their dams. *Canadian Journal of Animal Science*, 64 (Suppl.): r85-186.
- Butler J.E. (1983). Bovine immunoglobulins: an argued review. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 4:43-152.
- Butler, J.E. (1983). Bovine immunoglobulins: an augmented re- the Biological Fluids. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 4: 43.
- Calder P.C. (2008). The relationship between the fatty acid composition of immune cells and their function. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*, 79:101–8.
- Calder P.C., Grimble R.F. (2002). Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56(Suppl 3):S14–9.
- Calder P.C., Yaqoob P. (2000). The level of protein and type of fat in the diet of pregnant rats both affect lymphocyte function in the offspring. *Nutrition Research*, 20: 995–1005.
- Campana W.M., Baumrucker C.R. (1995). Growthfactors in bovine milk. In: “Handbook of milk composition” Ed. Jensen RG, Publ. Academic Press, San Diego (CA). p. 474-494.

- Castellote C., Casillas R., Ramírez-Santana C., Pérez-Cano F. J., Castell M., Moretones M. G., López-Sabater M. C., Franch A. (2011). Premature Delivery Influences the Immunological Composition of Colostrum and Transitional and Mature Human Milk. *Journal of Nutrition*, 141: 1181–1187.
- Castro N., Capote J., Álvarez S., Argüello A. (2005). Effects of lyophilized colostrum and different colostrum feeding regimens on passive transfer of immunoglobulin G in Majorera goat kids. *Journal of Dairy Science*, 88:3650-3654.
- Castro N., Capote J., Bruckmaier R.M., Argüello A. (2011): Management effects on colostrogenesis in small ruminants: a review, *Journal of Applied Animal Research*, 39:2, 85-93.
- Castro N., Capote J., Martín D., Argüello A. (2006). The influence of dietary conjugated linoleic acid on blood serum and colostrum immunoglobulin G concentration in female goats before and after parturition. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 90:429-431.
- Cervato G., Cazzola R., Cestaro B., (1999). Studies on the antioxidant activity of caseins. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 50: 291–296.
- Chadio S., Kotsampasi B., (2011). Reproductive programming: The role of early life nutrition, In: “Undernutrition”, Editor Lee J.E., Publ. Nova Science, pp. 1-30.
- Chandra R.K. (1992). Protein-energy malnutrition and immunological responses. *Journal of Nutrition*, 122: (Suppl. 3), 597–600.
- Chang J. S., Russell G.C. , Jann O., Glass E.J. , Werling D. , Haig D.M. (2009). Molecular cloning and characterization of Toll-like receptors 1-10 in sheep, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 127:94-105.
- Ciupercescu DD. (1977). Dynamics of serum immunoglobulin concentrations in sheep during pregnancy and lactation. *Research in Veterinary Science*, 22:23-27.
- Coe C.L., Lubach G.R., Shirtcliff E.A. (2007). Maternal stress during pregnancy predisposes for iron deficiency in infant monkeys impacting innate immunity. *Pediatric Research*, 61:520–524.
- Csapó J., Csapó -Kiss Z., Martin T.G., Szentpeteri J., Wolf G. (1994). Composition of colostrum from goats, ewes and cows producing twins. *International Dairy Journal*, 54:445- 458.
- Delong W. J., Waldhalm D. R., Hall R. F., Everson D. O. (1979). Restricted dietary protein in pregnant beef cows: II. Effect on the immune response. *Theriogenology*, 12: 69-77.
- Dembiski T.C, Shiu R.P.C. (1987). Growth factors in the mammary gland development and function. In: “The mammary gland development, regulation and function”, Eds. Neville MC, Daniels CW, Publ. Plenum Press, New York (NY), p. 355.
- Denamur R. (1964). Nucleic acids and free nucleotides of the mammary gland during lactogenesis and galactopoiesis. *Excerpta Medica of the International Congress Series Part I*, 83: 434-462.
- Dhur A., Galan P., Christides J.P., Polier de Courcy G., Preziosi P., Hercberg S. (1991). Effect of folic acid deficiency upon lymphocyte subsets from lymphoid organs in mice. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 98:235–240.



- Eichera S.D., McMunna K.A., Hammonb H.M., Donkin S.S. (2004). Toll-like receptors 2 and 4, and acute phase cytokine gene expression in dexamethasone and growth hormone treated dairy calves, *Veterinary Immunology and Immunopathology* 98:115–125.
- Equils O., Singh S., Karaburun S., Lu D., Thamocharan M., Devaskar S.U. (2005). Intra-uterine growth restriction downregulates the hepatic toll like receptor-4 expression and function, *Clinical & Developmental Immunology*, 12(1): 59–66.
- Field C.J., Van Aerde J.E., Robinson L.E., Clandinin M.T. (2008). Effect of providing a formula supplemented with long-chain polyunsaturated fatty acids on immunity in full-term neonates. *British Journal of Nutrition*, 99:91–99.
- Firth M.A., Shewen P.E., Hodgins D.C. (2005). Passive and active components of neonatal innate immune defenses. *Animal Health Research Reviews*, 6 (2): 143-158.
- Fishwick G., Clifford D. (1975). The effects of low protein intake by beef cows during pregnancy on the voluntary intake of roughage, the composition of the colostrum and serum immunoglobulin concentration of their calves. *Proceedings of the Nutrition Society*, 34: 74A-75A.
- Fituch C.C., Palkowetz K.H., Goldman A.S., Schanler R.J. (2004). Concentrations of IL-10 in preterm human milk and in milk from mothers of infants with necrotizing enterocolitis. *Acta Paediatrica*, 93(11):1496-500.
- Foisnet A., Farmer C., David C., Quesnel H. (2010). Relationships between colostrum production by primiparous sows and sow physiology around parturition *Journal of Animal Science*, 88:1672-1683.
- Fraker P.J., King L.E. (2004). Reprogramming of the immune system during zinc deficiency. *Annual Review of Nutrition*, 24:277-98.
- Garofalo R. (2010). Cytokines in human milk, *The Journal of Pediatrics*, 156 (2): S36-S40.
- Garofalo R., Chheda S., Mei F., Palkowetz K.H., Rudloff H.E., Schmalstieg F.C., Rassin D.K., Goldman A.S. (1995). Interleukin-10 in human milk. *Pediatric Research*, 37:444-9.
- Gopal P.K., Gill H.S (2000).Oligosaccharides and glycoconjugates in bovine colostrum and milk. *British Journal of Nutrition*, 84:S69–S74.
- Greenwood P.L., Hunt A.S., Hermanson J.W., Bell A.W. (2000). Effects of birth weight and postnatal nutrition on neonatal sheep: II. Skeletal muscle growth and development. *Journal of Animal Science*, 78: 50-61.
- Ha W.K., Lim J.W., Choi C.K. (1986). A study on the immunoglobulin G concentration in milk and blood serum of Korean native goats. I. Changes of IgG concentration on the lactation period of Korean native goats. *Korean Journal of Animal Science*, 28:679- 683.
- Haddad J.J., Saade N.E., Safieh-Garanedian B. (2003). Interleukin- 10 and the regulation of mitogen-activated protein kinases: are these signaling modules targets for the anti-inflammatory action of this cytokine? *Cell Signal*, 15:255–267.
- Hagiwara K., Kataoka S., Yamanaka H., Kirisawa R., Iwai H. (2000). Detection of cytokines in bovine colostrum. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 76: 183-190.
- Hales C.N., Barker D.J.P., Clark P.M.S., Cox L.J., Fall C., Osmond C., Winter P.D. (1991). Fetal and infant growth and impaired glucose-tolerance at age 64. *British Medical Journal*, 303: 1019–1022.

- Halliday R., Williams M.R. (1979). The absorption of immunoglobulin from colostrum by bottle-fed lambs. *Annales de recherches veterinaries*, 10:549-556.
- Ho J.L., He S.H., Rios M.J., Wick, E.A., (1992). Interleukin-4 inhibits human macrophage activation by tumor necrosis factor, granulocyte- monocyte colony-stimulating factor, and interleukin-3 for antileishmanial activity and oxidative burst capacity. *Journal of Infectious Diseases*. 165:344–351.
- Hough R.L., McCarthy F.D., Kent H.D., Eversole D.E., Wahlberg M.L. (1990). Influence of nutritional restriction during late gestation on production measures and passive immunity in beef cattle. *Journal of Animal Science*, 68:2622-2627.
- Howard J.K., Lord G.M., Matarese G., Vendetti S., Ghatei M.A., Ritter M.A., Lechler R.I., Bloom S.R., Vendetti S., Ghatei M.A., Ritter M.A., Lechler R.I., Bloom S.R. (1999). Leptin protects mice from starvation-induced lymphoid atrophy and increases thymic cellularity in ob/ob mice. *Journal of Clinical Investigation*, 104: 1051–1059.
- Hurley W.L. (2003). Immunoglobulins of the mammary secretions. In “Advanced Dairy Chemistry: Proteins”, Eds. Fox P.F., McSweeney P.L.H., Publ. Kluwer Academic/Plenum, New York, NY, USA, pp. 421–447.
- Hurley W.L., Theil P.T. (2011). Perspectives on Immunoglobulins in Colostrum and Milk. *Nutrients*, 3: 442-474.
- Iwata M., Hirakiyama A., Eshima Y., Kagechika H., Kato C., Song S.Y. (2004). Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity*. 21:527–538.
- Johansen F.E., Braathen R., Brandtzaeg, P. (2000). Role of J chain in secretory immunoglobulin formation. *Scandinavian Journal of Immunology*, 52: 240–248.
- Kitts D.D., Weiler K., (2003). Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design*, 9: 1309–1323.
- Knight C.H., Peaker N. (1982). Development of the mammary gland. *Journal of Reproduction and Fertility*, 65:621- 626.
- Kobayashi M., Kweon M., Kuwata H., Kiyono H., Takeda K. Akira S. (2003). Toll-like receptor-dependent IL-12p40 production causes chronic enterocolitis in myeloid cell-specific Stat3-deficient mice. *Journal of Clinical Investigation*, 111:1297.
- Koldovsky O. (1980). Hormones in milk. *Journal of Dairy Science*, 26:1833-1836.
- Kotsampasi, B., Balaskas, C., Papadomichelakis, G., Chadio. S. E. (2009b). Reduced Sertoli cell number and altered pituitary responsiveness in male lambs undernourished in utero. *Animal Reproduction Science*, 114 (1) 135-147.
- Kotsampasi, B., Chadio, S., Papadomichelakis, G., Deligeorgis, S., Kalogiannis, D., Menegatos, I. and Zervas, G. (2009a). Effects of maternal undernutrition on the hypothalamic-pituitary-gonadal axis function in female sheep offspring, *Reproduction in Domestic Animals*, 44(4), 677-684.
- Kuypers E., Collins J.J.P., Jellema R.K., Wolfs T.G.A.M., Kemp M.W., Nitsos I., Pillow J. J., Polglase G. R., Newnham J. P., Germeraad W. T. V., Kallapur S. G., Jobe A. H., Kramer B.W. (2012). Ovine Fetal Thymus Response to Lipopolysaccharide-Induced Chorioamnionitis and Antenatal Corticosteroids. *Plos one* 7(5): e38257

- Lacy-Hulbert S.J., Woolford M.W., Nicholas G., Prosser C. G., Stelwagen K. (1999). Effect of milking frequency and pasture intake on milk yield and composition of late lactation cows. *Journal of Dairy Science*, 82:1232–1239.
- Landgraf M.A., C. Tostes R de, Borelli P., Zorn T.M., Nigro D., Carvalho M.H., Fortes Z.B. (2007). Mechanisms involved in the reduced leukocyte migration in intrauterine undernourishment. *Nutrition*. 23(2): 145–156.
- Landgraf M.A., Martinez L.L., Rastelli V.M., Franco M do C., Soto-Suazo M., Tostes R de C., Carvalho MH. Nigro D., Fortes Z.B. (2005). Intrauterine undernutrition in rats interferes with leukocyte migration, decreasing adhesion molecule expression in leukocytes and endothelial cells. *Journal of Nutrition*. 135(6): 1480–1485.
- Langley S.C., Seakins M., Grimble R.F., Jackson A.A. (1994). The acute phase response of adult rats is altered by in utero exposure to maternal low protein diets. *Journal of Nutrition*, 124: 1588–1596.
- Langley-Evans S.C., Buttery P.J., Wakelin D. (2002). Fetal exposure to a maternal low protein diet and the immune system. *Proceedings of the Nutrition Society*, 61: 121A.
- Langley-Evans S.C. (2004). Fetal programming of adult disease: an overview. In: “Fetal nutrition and adult disease: Programming of chronic disease through fetal exposure to undernutrition” Ed. Langley-Evans S.C. Publ. CABI, p.1–20.
- Langley-Evans S.C., Carrington L.J. (2006). Diet and the developing immune system, *Lupus*, 15(11):746-52.
- Langley-Evans S.C., Wakelin D., Buttery P.J. (2003). Undernutrition during fetal life programmes immune function in the rat. *Pediatric Research*, 53: P104.
- LeBouder E., Rey-Nores J.E., Raby A.C., Affolter M., Vidal K., Thornton C.A., Labéta M.O. (2006). Modulation of neonatal microbial recognition: TLR-mediated innate immune responses are specifically and differentially modulated by human milk. *Journal of Immunology*, 176:3742–3752.
- Lemaitre B., Nicolas E., Michaut, L., Reichhart, J.-M. Hoffmann J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, 86:973.
- Lindmark-Mansson, H., Akesson, B., (2000). Antioxidative factors in milk. *British Journal of Nutrition*, 84 (Suppl. 1): S103–S110.
- Marodi L. (2006). Innate cellular immune responses in newborns. *Clinical Immunology*, 118:137–144.
- Maunsell F.P., Morin D.E., Constable P.D., Hurley W.L., McCoy G.C., Kakoma I., Isaacson R.E. (1998). Effects of mastitis on the volume and composition of colostrums produced by Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 81:1291-1299.
- Mayer, B., Doleschall M., Bender B., Bartyik J., Bosze Z., Frenyo L. V., Kacsokovics I. (2005). Expression of the neonatal Fc receptor (FcRn) in the bovine mammary gland. *Journal of Dairy Research*, 72(Special Issue):107–112.
- McDade T.W., Beck M.A., Kuzawa C., Adair L.S. (2001). Prenatal undernutrition, postnatal environments, and antibody response to vaccination in adolescence. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 74:543– 548.

- McMillen I.C., Robinson J.S. (2005). Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiological Reviews*, 85, 571–633.
- Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Janeway C. A. Jr. (1997a). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394.
- Medzhitov R., Janeway C.A. Jr (1997b). Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Current Opinion in Immunology*, 9: 4-9.
- Mehta R., Petrova A. (2011). Very Preterm Gestation and Breastmilk Cytokine Content During the First Month of Lactation, *Breastfeeding Medicine*, 6 (1): 21-24.
- Mellor D.J., Murray L. (1985). Effects of maternal nutrition on udder development during late pregnancy and on colostrum production in Scottish Blackface with twin lambs. *Research in Veterinary Science*, 39:230- 234.
- Mickleson K.N.P., Moriaty K.M. (1982). Immunoglobulin Levels in Human Colostrum and Milk. *Journal of pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 1(3):381-384.
- Micusan V.V., Borduas A.G. (1977). Biological properties of goat immunoglobulins G. *Journal of Immunology*, 32:373-381.
- Miranda R., Saravia N.G., Ackerman R., Murphy N., Berman S., McMurray D.N. (1983). Effect of the maternal nutritional status on immunological substances in human colostrum and milk. *American Journal of Clinical Nutrition*, 37:632-640.
- Mito N., Yoshino H., Hosoda T., Sato K. (2004). Analysis of the effect of leptin on immune function in vivo using diet-induced obese mice. *Journal of Endocrinology*, 180: 167–173.
- Mix E., Goertsches R. Zettl U.K. (2006). Immunoglobulins—basic considerations. *Journal of Neurology*, 253: V/9–V/17.
- Mora J.R. (2008). Homing imprinting and immunomodulation in the gut: role of dendritic cells and retinoids. *Inflammatory Bowel Diseases*, 4:275–289.
- Mosmann T.R., Cherwinski H., Bond M.W., Giedlin M.A., Coffman R.L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. 1. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of Immunology*, 136, 2348–2357.
- Mullins D.W., Martins R.S., Burger C.J., Elgert, K.D., 2001. Tumor cell-derived TGF-beta and IL-10 dysregulate paclitaxel-induced macrophage activation. *Journal of Leukocyte Biology*, 69: 129–137.
- National Research Council (1996). In “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”, National Academy Press, Washington, DC.
- National Research Council (NCR) (1985). In “Nutrient Requirements of Sheep”. National Academy Press, Washington, DC.
- Ontsouka C.E., Bruckmaier R.M., Blum J.W. (2003). Fractionized milk composition during removal of colostrums and mature milk, *Journal of Dairy Science*, 86:2005- 2011.
- Oviedo-Boyso J., Valdes-Alarcon J.J., Cajero-Juarez M., Ochoa-Zarzosa A., Lopez-Meza J.E., Bravo-Patino A., Baizabal-Aguirre V.M. (2007). Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *Journal of Infection*, 54:399–409.
- Oyeniya O.O., Hunter A.G. (1978). Colostral constituents including immunoglobulins in the first three milkings postpartum. *Journal of Dairy Science*, 61:44- 48.

- Ozaki T., Nishina H., Hanson M.A., Poston L. (2001). Dietary restriction in pregnant rats causes gender-related hypertension and vascular dysfunction in offspring. *Journal of Physiology*, 530:141- 152.
- Palmer A.C. (2011). Nutritionally mediated programming of the developing immune system. *American Society of Nutrition Advances in Nutrition*, 2: 377-395.
- Patton S., Jensen R.G. (1975). Lipid metabolism and membrane functions of the mammary gland. In: "Progress in the chemistry of fats and other lipids" Ed. Holman RT, Vol. 14. Publ. Pergamon Press Oxford, Oxford (UK), p. 193-210.
- Peli A., Luciani A., De Santis P., Polci A., Britti D. (2004). Quantitation of the Cytokines TNF- $\alpha$ , IL-8 and IL-10 in Bovine Milk Using Real-Time TaqManA PCR, *Veterinary Research Communications*, 28:359–362.
- Prentice A.M. (1999). The thymus: a barometer of malnutrition. *British Journal of Nutrition*, 81: 345–347.
- Prentice A.M., Cole T.J., Moore S.E., Colinson A.C. (1999). Programming the adult immune system. In: "Fetal programming influences on development and disease in later life", Eds. O'Brien P.M.S., Wheeler T., Barker D.J., Publ. RCOG Press, pp. 399–413.
- Pritchett L.C., Gay C.C., Besser T.E., Hancock D. (1991). Management and production factors influencing immunoglobulin G1 concentration in colostrum from Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 74:2336–2341.
- Quigley J.D., Martin K.R., Dowlen H.H., Wallis L.B., Lamar K. (1994). Immunoglobulin concentration, specific gravity, and nitrogen fractions of colostrum from Jersey cattle. *Journal of Dairy Science*, 77:264–269.
- Quiles J.L., Ochoa J.J., Ramirez-Tortosa M.C., Linde J., Bompadre S., BATTINO M., Narbona E., Maldonado J. , Mataix J. (2006). Coenzyme Q concentration and total antioxidant capacity of human milk at different stages of lactation in mothers of preterm and full-term infants. *Free Radical Research*, 40(2): 199–206.
- Rabbani S., Irfan M., Muhammad K., Ahmed Z.Q., (1990). Studies on the transfer of maternal immunoglobulins in kids. *Journal Archiva Veterinary Bucaresti*, 19:53-59.
- Rainard P., Riollet C., (2006). Innate immunity of the bovine mammary gland. *Veterinary Research*, 37:369–400.
- Raja A., Vignesh A.R., AnnMary B., Tirumurugaan K.G., DhinakarRaj G., Kataria R., Mishra B.P., Kumanan K. (2011). Sequence analysis of Toll-likereceptorgenes1–10 of goat (*Capra hircus*), *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 140: 252–258.
- Reynolds L. P., Redmer D. A., Luther J. S., Hammer C. J., Vonnahme K. A. Caton J. S., Meyer A. M., Reed J. J., Neville T. L., Thorson J. F., Maddock-Carlin K. R., Taylor J. B., (2011). Nutritional plane and selenium supply during gestation affect yield and nutrient composition of colostrum and milk in primiparous ewes, *Journal of Animal Science*, 89:1627-1639.
- Rincheval-Arnold A., Belair L., Djiane J. (2002). Developmental expression of pIgR gene in sheep mammary gland and hormonal regulation. *Journal of Dairy Resources*, 69:13–26.
- Rousset F., Garcia E., Banchereau J. (1991). Cytokine-induced Proliferation and Immunoglobulin Production of Human B Lymphocytes Triggered through Their CD40 Antigen. *Journal of Experimental Medicine*, 173: 705-710.

- Saitoh S., Akashi S., Yamada T., Tanimura N., Kobayashi M., Konno K., Matsumoto F., Fukase K., Kusumoto S., Nagai Y., Kusumoto Y., Kosugi A., Miyake K. (2004). Lipid A antagonist, lipid IVa, is distinct from lipid A in interaction with Toll-like receptor 4 (TLR4)- MD-2 and ligand-induced TLR4 oligomerization. *International Immunology*, 16:961.
- Sanchez L., Lujan L., Oria R., Castillo H., Perez D., Ena J.M., Calvo M. (1992). Synthesis of lactoferrin and transport of transferrin in the lactating mammary gland of sheep. *Journal of Dairy Science*, 75:1257–1262.
- Sauter S.N., Roffler B., Philipona C., Morel C., Romé V., Guilloteau P., Blum J.W., Hammon H.M. (2004). Intestinal development in neonatal calves: effects of glucocorticoids and dependence of colostrum feeding. *Biology of the Neonate*, 85(2):94-104.
- Savino W, Dardenne M., Velloso L. A., Silva-Barbosa S.D. (2007). The thymus is a common target in malnutrition and infection. *British Journal of Nutrition*, 98: (Suppl. 1) S11–S16.
- Savino W. (2006). The thymus is a common target organ in infectious diseases. *PLoS Pathogens*, 2: 472–483.
- Schnulle P. M., Hurley W. L. (2003). Sequence and expression of the FCRn in the porcine mammary gland. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 91:227–231.
- Sherman D.M., Arendt T.D., Gay J.M., Maefsky V.A. (1990). Comparing the effects of four colostrum preparations on serum Ig levels of newborn kids. *Veterinary Medicine*, 85:908-913.
- Silva S.V., Garcia-Souza E.P., Moura A.S., Barja-Fidalgo C. (2010). Maternal protein restriction during early lactation induces changes on neutrophil activation and TNF-alpha production of adult offspring. *Inflammation*, 33(2):65-75.
- Smolenski G., Haines S., Kwan F. Y., Bond J., Farr V., Davis S. R., Stelwagen K., Wheeler T.T. (2007). Characterisation of host defence proteins in milk using a proteomics approach. *Journal of Proteome Research*, 6:207–215.
- Sprong R.C., Hulstein M.F.E., Van der Meer R. (2001). Bactericidal activities of milk lipids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45:1298–1301.
- Sugano M., Yamasaki M., Yamada K., Huang Y.S. (1999). Effect of conjugated linoleic acid on polyunsaturated fatty acid metabolism and immune function. In: “Advances in conjugated linoleic acid research”, Eds. Yurawecz MP et al. Publ. AOCS Press, p. 327- 329, Champaign.
- Swanson K., Gorodetsky S., Good L., Davis S., Musgrave D., Stelwagen K., Farr V., Molenaar A. (2004). Expression of a  $\beta$ -defensin mRNA, lingual antimicrobial peptide, in bovine mammary epithelial tissue is induced with mastitis. *Infection and Immunity*, 72:7311–7314.
- Swanson T.J., Hammer C.J., Luther J.S., Carlson D.B., Taylor J.B., Redmer D.A., Neville T.L., Reed J.J., Reynolds L.P., Caton J.S., Vonnahme K.A. ( 2008). Effect of gestational plane of nutrition and selenium supplementation on mammary development and colostrum quality in pregnant ewe lambs. *Journal of Animal Science*, 86:2415- 2423.
- Takeda K., Akira S (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology*, 17 :1- 14.

- Tappia P.S., McCarthy H.D., Langley-Evans S.C., Jackson A.A., Grimble R.F. (1994). Prenatal nutritional adequacy and gender influence the ability of adult rats to produce interleukins 1, 6 and tumour necrosis alpha. *Proceedings of the Nutrition Society*, 53: 182A.
- Tizard I. R., (2004). In: *Veterinary Immunology: An Introduction*, Publ. Elsevier, New York, USA.
- Ustundag B., E. Yilmaz, Dogan Y., Akarsu S., Canatan H., Halifeoglu I., Cikim G., Aygun D. A. (2005). Levels of Cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ) and Trace Elements (Zn, Cu) in Breast Milk From Mothers of Preterm and Term Infants, *Mediators of Inflammation*, 6: 331–336.
- Vihan V.S. (1988). Immunoglobulin levels and their effect on neonatal survival in sheep and goats. *Small Ruminant Research*, 1:135-144.
- Wallace J.M., Milne J.S., Redmer D.A., Aitken R.P. (2006). Effect of diet composition on pregnancy outcome in overnourished rapidly growing adolescent sheep. *British Journal of Nutrition*, 96:1060- 1068.
- Wilson E., Butcher C.E. (2004). CCL28 controls immunoglobulin (Ig)A plasma cell accumulation in the lactating mammary gland and IgA antibody transfer to the neonate. *Journal of Experimental Medicine*, 200:805–809.
- Wintergerst E.S., Maggini S., Hornig D.H. (2006). Immune-enhancing role of vitamin C and zinc and effect on clinical conditions. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 50:85–94.
- Wooding F.B.P., Flint A.P.F., Heap R.B., Morgan G., Buttle H.L., Young I.R. (1986). Control of binucleate cell immigration in the placenta of ruminants. *Journal of Reproduction and Fertility*, 76:499-512.
- Woof J.M. (2007). The structure of IgA. In: “Mucosal Immune Defense: Immunoglobulin A” Ed. Kaetzel, C.S., Publ. Springer, New York, NY, USA, pp. 1–24.
- Yilmaz H. L., Saygili-Yilmaz E. S., Gunesacar R. (2007). Interleukin-10 and -12 in Human Milk at 3 Stages of Lactation: A Longitudinal Study, *Advances in Therapy*, 24(3): 603-610.
- Youn H.S., Lim H.J., Choi Y.J., Lee J.Y., Lee M.Y., Ryu J.H. (2008). Selenium suppresses the activation of transcription factor NF-kappa B and IRF3 induced by TLR3 or TLR4 agonists. *International Immunopharmacology*, 8:495–501.
- Zhang D., Zhang G., Hayden M.S., Greenblatt M.B., Bussey C., Flavell R.A. Ghosh S. (2004). A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science*, 303:1522.
- Αντωνίου Δ. (2012). Η δομή της ανοσοσφαιρίνης IgG. Οι ελαφριές και οι βαριές της αλυσίδες (φωτογραφία), <http://commons.wikimedia.org>.
- Μάντης Α. Ι. (2005). Υγιεινή και Τεχνολογία του γάλακτος και των προϊόντων του. Εκδοτικός οίκος Αδελ. Κυριακίδη.