

ĐÁNH GIÁ TÍNH GÂY DỊ ỨNG CỦA SỮA DÊ VỚI CÁC BIỂU HIỆN KHÁC NHAU CỦA ALPHA S1-CASEIN TRÊN CÁC BỆNH NHÂN DỊ ỨNG SỮA BÒ

Nguyễn Thị Huyền¹, Phan Thị Minh Phương¹, Grazia Galleri²

(1) Trường Đại học Y Dược - Đại học Huế

(2) Đại học Sassari, Ý

Tóm tắt

Đặt vấn đề: Dị ứng protein sữa bò (CMPA) là dị ứng thực phẩm phổ biến nhất, đặc biệt là ở trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ. Trong trường hợp này, sữa từ các loài động vật có vú khác được đề xuất như là một sự thay thế dinh dưỡng cho sữa bò. Trong số đó, sữa dê được sử dụng khá phổ biến để thay thế. Trong các loài dê, α S1-casein (α S1-CN) được mã hóa bởi gen CSN1S1, được đặc trưng cho tính đa dạng về kiểu hình của số lượng. Mục đích của nghiên cứu này là đánh giá tính gây dị ứng của sữa dê có biểu hiện khác nhau của α S1-CN. **Đối tượng và phương pháp:** 26 mẫu sữa dê được chọn từ các loài dê có kiểu gen CSN1S1 khác nhau đã được phân tích bởi SDS-PAGE và Immunoblotting sử dụng huyết thanh của các trẻ bị dị ứng với sữa bò với IgE đặc hiệu cho CN và/hoặc protein huyết thanh của sữa. **Kết quả:** Không có phản ứng miễn dịch xảy ra đối với α S1-CN ở tất cả các mẫu sữa dê thông qua kỹ thuật Immunoblotting. **Kết luận:** Sữa dê có các gen CSN1S1 cụ thể có thể được sử dụng như một nguồn thay thế protein nguồn trong trường hợp nhận thức với α S1-CN. Hơn nữa, các kỹ thuật này có thể hữu ích để đánh giá phản ứng của bệnh nhân dị ứng với sữa bò đối với protein của sữa dê để xác định tính an toàn cho từng chủ thể cụ thể.

Từ khóa: Dị ứng, protein sữa, dê, α S1-Casein, CSN1S1 gen

Abstract

ALLERGENICITY ASSESSMENT OF GOAT'S MILK WITH DIFFERENT EXPRESSIONS OF ALPHA S1-CASEIN IN PATIENTS ALLERGIC TO COW'S MILK

Nguyen Thi Huyen¹, Phan Thi Minh Phuong¹, Grazia Galleri²

(1) Hue University of Medicine and Pharmacy - Hue University

(2) Sassari University, Italia

Background: Cow's milk protein allergy (CMPA) is the most common food allergy, especially, in infants and young children. In this case, milk from other mammalian species has been suggested as a possible nutritional alternative to cow's milk. Goat's milk is used quite popular to replace for cow's milk. In the goat species, α S1-casein (α S₁-CN), coded by the CSN1S1 gene, is characterized by qualitative and quantitative polymorphisms extensively. This aim of this study is to evaluate allergenicity of goat's milk containing different kinds of α S₁-CN. **Methods:** Individual milk samples from 26 selected goats with different CSN1S1 genotypes were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting by using sera from children allergic to cow's milk with IgE specific to CN and/or serum protein. **Results:** The absence of reactivity for the α S1-CN highlighted with immunoblotting for all goat milk samples. **Conclusions:** The goat's milk with particular genotype for CSN1S1 could be used as a source protein alternative in the case of α S1-CN awareness. Furthermore, these tests could be useful for evaluating from time to time the reactivity of patients with CMPA against milk proteins of these goats selected to establish the safety of its use in the specific subject.

Key words: Allergenicity, milk protein, goat, α S1-Casein, CSN1S1 gene

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Dị ứng thức ăn là một trong những bệnh lý phức tạp nhất trong lĩnh vực dị ứng. Đó không chỉ ảnh hưởng tới sức khỏe cá nhân bị dị ứng thực phẩm mà còn là gánh nặng cho sức khỏe cộng đồng ở hầu hết các nước trong vài thập kỷ gần đây [1]. Khoảng 2-4% dân số trên toàn thế giới [2,3], trong đó khoảng 5-8% trẻ em và tới 3% người lớn có dị ứng với thực phẩm⁴.

Một trong số đó, dị ứng sữa là dị ứng thực phẩm phổ biến ở trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ, đặc biệt là dị ứng với protein của sữa bò phổ biến nhất. Gần 3-7% trẻ em dưới 8 tuổi bị ảnh hưởng bởi dị ứng với protein sữa bò. Có rất nhiều loại protein trong thành phần của sữa bò liên quan đến dị ứng nhưng chủ yếu bao gồm caseins (CN: α S1-CN, α S2-CN, κ -CN and β -CN) và đạm whey (alpha-lactalbumin (α -La), beta-lactoglobulin (β -Lg), immunoglobulin (Ig), lactoferrin (Lf)) [5], đặc biệt là α S1-CN là một dị nguyên của sữa có vai trò quan trọng trong dị ứng.

Trong trường hợp dị ứng với sữa bò, các đối tượng dị ứng cần một nguồn thay thế khác với các nguồn protein khác, thường dựa trên các protein sữa thủy phân (CN hoặc whey protein). Sữa từ các loài động vật có vú khác nhau (ngựa, lừa, dê) đã được gợi ý như là một sự thay thế cho sữa bò, nhưng sự an toàn của nó đối với các chủ thể bị dị ứng vẫn đang còn tranh cãi [6].

Ngày nay, sữa dê được sử dụng rộng rãi ở nhiều nước trên thế giới như là nguồn thay thế cho sữa bò ở trẻ bị dị ứng hoặc không dung nạp [7].

Một nghiên cứu trên 31 trẻ bị dị ứng sữa bò đã cho thấy tác động tích cực của thay thế với sữa

dê, giảm triệu chứng trong 74,2% trường hợp. Tuy nhiên, một số báo cáo khác mô tả phản ứng phản ứng phản vệ với sữa dê ngay sau khi tiếp xúc với sữa dê ở bệnh nhân bị dị ứng sữa bò [8] cũng như không dung nạp ở trẻ em bị dị ứng [9].

Tính gây dị ứng của sữa dê với các biểu hiện khác nhau của α S1-CN qua việc chọn lựa kiểu gen CSN1S1 được nghiên cứu một thử nghiệm lâm sàng đã được thực hiện trên chuột lang [10]. Kết quả cho thấy rằng sự giảm nồng độ α S1-CN trong sữa dê ít gây dị ứng hơn so với sữa dê khác, có thể do tỉ lệ β -LG: α S1-CN bị thay đổi đối.

Từ các vấn đề liên quan đến các kết quả của sữa dê còn gây tranh cãi trong các nghiên cứu lâm sàng, chúng tôi đã tiến hành một nghiên cứu ***“Đánh giá tính gây dị ứng của sữa dê với các sự biểu hiện khác nhau của alpha s1-CN trên bệnh nhân dị ứng sữa bò”*** với mục tiêu:

- Xác định kiểu hình từ các kiểu gen CSN1S1 đã chọn.

- Đánh giá tính dị ứng của sữa dê với những biểu hiện khác nhau của α S1-CN.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Mẫu sữa dê

26 mẫu sữa dê được thu thập với các biểu hiện khác nhau của α S1-CN dựa vào các kiểu gen CSN1S1.

Các mẫu sữa dê được đánh số thứ tự từ 1 đến 26 và được chia làm 3 nhóm: gen mạnh tương ứng với kiểu gen đồng hợp tử AA, gen trung bình và gen yếu tương ứng với kiểu gen đồng hợp tử FF, 0101 và gen dị hợp tử F01.

Bảng 2.1. Các mẫu sữa dê với các biểu hiện khác nhau của kiểu gen α S1-CN

Nhóm có gen yếu	Nhóm có gen trung bình		Nhóm có gen mạnh
2	1	16	4
7	3	17	5
9	6	18	8
11	10	19	15
21	12	20	24
23	13	22	25
	14	26	

Các mẫu sữa dê được thu thập được ly tâm lạnh 3000 RPM ở 4°C trong 10 phút, sau đó loại bỏ chất béo ở phía trên. Sữa tách béo tiếp tục được thêm vào acid acetic 10% và acetate natri 1N để tách chiết CN và huyết thanh. Các mẫu này được giữ ở -70°C để phân tích bằng kỹ thuật điện di SDS-PAGE.

2.2. Chủ thể dị ứng

3 bệnh nhân có độ tuổi từ 9 tháng đến 13 tuổi đã được chọn (trẻ em) được chẩn đoán dị ứng với sữa bò dựa trên kết quả thu được từ đo IgE đặc hiệu với protein sữa (α -La, β -Lg và CN); Nồng độ IgE đặc hiệu trên 0,1 kUA/L cho thấy có sự nhạy cảm.

Bảng 2.2. Nồng độ IgE đặc hiệu với các thành phần trong sữa bò

Chủ thể	CAP (Ig/E đặc hiệu kUA/l)			
	α -LA	β -LG	CN	Milk
ID 26	>100	27,9	>100	>100
ID 27	6,19	5,21	1,21	8,6
ID 29	0,58	1,33	2,68	16,7

2.3. SDS-PAGE

Các thành phần CN đã được phân tách bằng kỹ thuật điện di SDS-PAGE trên gel acrylamide. Thành phần của gel phân tách gồm: 15% acrylamide, 1.5M Tris-HCl, pH 8,8, 6% of glycerol, 10% SDS, 10% of ammonium persulfate (APS), N,N,N',N' Tetramethylethylenediamine (TEMED). Thành phần của gel gom gồm: 30% Acrylamide, Tris-HCl buffer 0.5 M, pH 6,8, 10% SDS, 10% APS, TEMED.

Sau khi chạy điện di với hệ thống Hoefer SE300 miniVE ở 100 V trong khoảng 6 giờ, các gel được nhuộm với Coomassie Brilliant Blue r-250 (Methanol 40%, Acid acetic 10%, Coomassie 0,1% and nước).

2.4. Immunoblotting

Sau khi chạy xong SDS-PAGE, các protein ở trên gel được chuyển qua màng nitrocellulose (GE Healthcare Bio-Sciences, LittleChalfont, UK) bằng hệ thống Hoefer SE300 ở 25V (300 -400mA) trong 90 phút.

Để ngăn sự hấp thụ của các protein không đặc hiệu, các màng được ủ qua đêm với dung dịch bao

gồm TBS 1X, BSA 3%. Rửa sạch ba lần với dung dịch rửa (TBS 1X, BSA, Tween 20, nước khử ion) mỗi lần 5 phút. Các màng tiếp tục được ủ với huyết thanh của các chủ thể dị ứng với sữa bò. Các phức hợp kháng nguyên - IgE được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể IgE của dê chống lại kháng thể IgE của người có gắn alkaline phosphatase (Sigma-Aldrich, St. Louis).

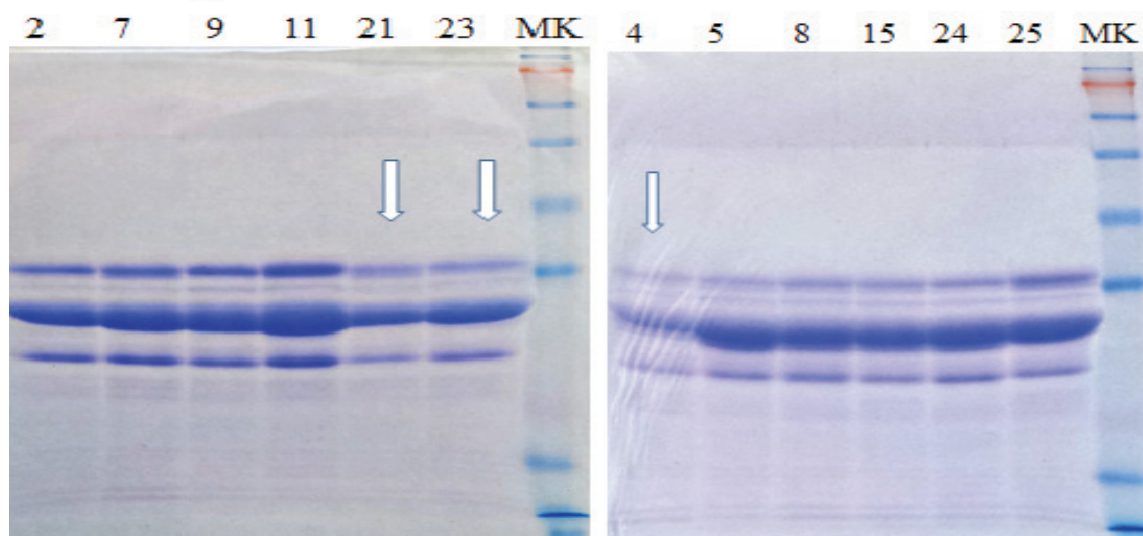
Cuối cùng ủ ở nhiệt độ phòng với BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate)/NBT (nitro blue tetrazolium) để phát hiện sự hiện diện của phức hợp kháng nguyên/IgE/anti-IgE/enzyme.

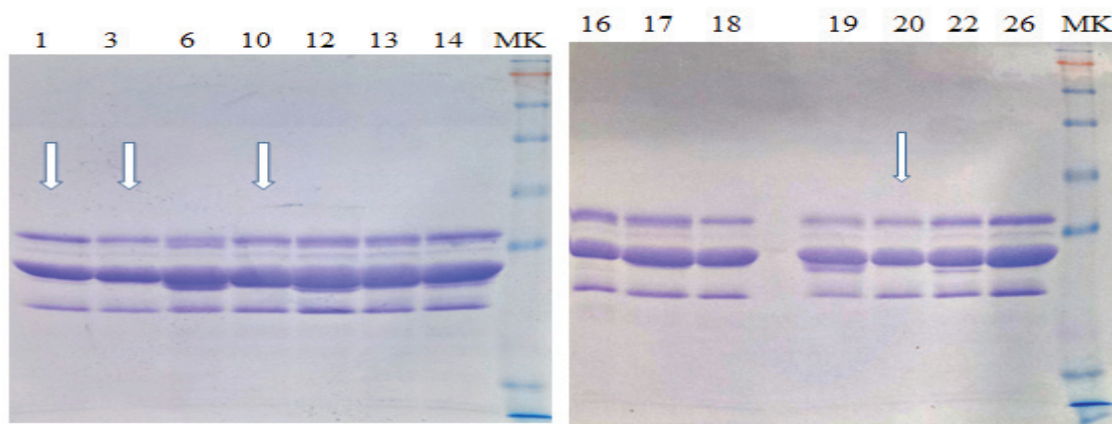
3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Kết quả chạy SDS-PAGE của CN

26 mẫu sữa dê được điện di đã phân tách các dải CN với các vị trí khác nhau: α s1-CN (24kDa), β -CN (24 kDa), κ -CN (21kDa), và α s2-CN (26 kDa). Đặc biệt, với kỹ thuật SDS-PAGE đã cho thấy sự biểu hiện khác nhau của các dải α s1-CN ở 3 nhóm gen mạnh, trung bình và yếu.

Hình 3.1. SDS-PAGE của các mẫu CN ở 3 nhóm gen khác nhau





Dựa vào kết quả này, chúng tôi đã chọn ra 7 mẫu CN (1, 3, 4, 10, 20, 21, 23) với sự biểu hiện nồng độ α S1- CN thấp nhất để đánh giá tính gây dị ứng của chúng với các chủ thể dị ứng sữa bò bằng kỹ thuật Immunoblotting.

3.2. Kết quả Immunoblotting

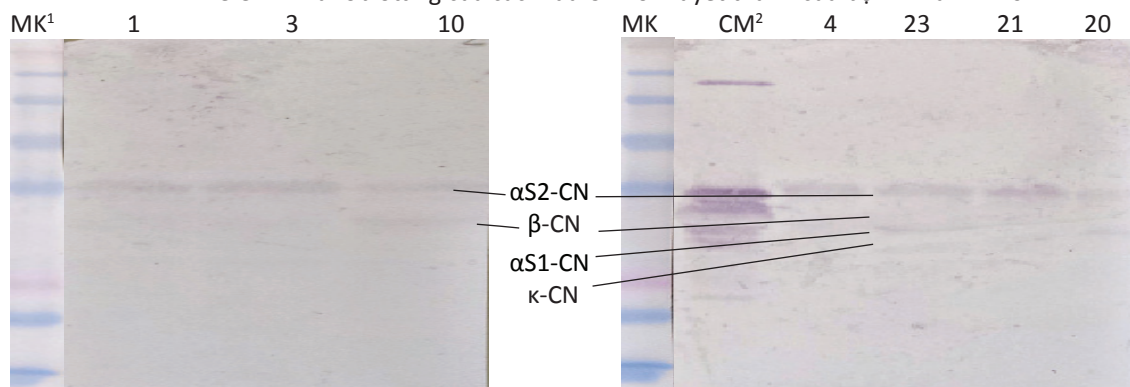
Như kết quả mong đợi, phản ứng với miễn dịch xảy ra mạnh mẽ với các α -CN của sữa bò, đặc biệt là với α S1-CN và không có phản ứng miễn dịch xảy ra với α S1-CN của sữa dê. Phản ứng xảy ra chủ yếu là chống lại α S2-CN ở tất cả các mẫu và một số phản ứng với β -CN

Hình 3.2. Immunoblotting của các mẫu CN với huyết thanh của bệnh nhân ID 29

MK 20 10 3 1 4 23 21 CM¹



Hình 3.3. Immunoblotting của các mẫu CN với huyết thanh của bệnh nhân ID 26



1. Marker 2. Sữa bò

4. BÀN LUẬN

Với kỹ thuật điện di SDS-PAGE đã chỉ ra cho chúng ta thấy rằng các biểu hiện kiểu hình của α S1-CN của các mẫu dê phụ thuộc vào kiểu gen CSN1S1.

Các mẫu 21 và 23 thuộc nhóm gen yếu cho thấy biểu hiện thấp hoặc vắng mặt của dải α S1-CN. Kết quả này là phù hợp với kiểu gen yếu đồng hợp tử FF và 0101 và dị hợp tử F01.

Mẫu 4 của nhóm gen mạnh cho thấy sự giảm biểu hiện của tất cả các CN so với các mẫu khác có cùng kiểu gen, đặc biệt là sự giảm biểu hiện của dải α S1-CN. Trong khi đó sự biểu hiện α S1-CN cho thấy cao ở tất cả các mẫu sữa dê thuộc nhóm gen mạnh đồng hợp tử AA này.

Các mẫu 1, 3, 10 và 20 của nhóm gen trung bình có sự vắng mặt hoặc biểu hiện α S1-CN thấp. Sự thay đổi biểu hiện của dải α S1-CN này không đáng ngạc nhiên vì đây là kiểu gen trung bình.

Kỹ thuật điện di SDS-PAGE giúp cho việc lựa chọn các mẫu sữa dê có biểu hiện α S1-CN thấp hoặc vắng mặt thông qua lựa chọn kiểu gen để sử dụng thay thế cho sữa bò ở các đối tượng bị dị ứng sữa bò với dị nguyên phổ biến là α S1-CN.

Chúng tôi đã sử dụng hai mẫu huyết thanh của bệnh nhân dị ứng với sữa bò với hàm lượng IgE đặc hiệu cao dành cho CN (ID26), (ID29) để đánh giá tính gây dị ứng của CN của 3 nhóm gen khác nhau. Kết quả là phản ứng miễn dịch của tất cả các mẫu CN sữa dê được lựa chọn đã không xảy ra ở vị trí của dải α S1-CN là điều mong đợi. Phản ứng miễn dịch xảy ra chủ yếu ở vị trí của β -CN và α S2-CN. Trong khi đó, ở mẫu sữa bò, phản ứng miễn dịch xảy mạnh mẽ ở vị trí α S1-CN, α S2-CN, β -CN và κ -CN. Kết quả này cũng tương tự như kết quả nghiên cứu của Ballabio và cộng sự (2011)[6]. Từ kết quả của việc thử nghiệm này, SDS-PAGE và immunoblotting chỉ ra rằng gen CSN1S1 đã ảnh hưởng đến biểu hiện kiểu hình của α S1-CN và đánh giá tính gây dị ứng trên các chủ thể dị ứng sữa bò.

Sữa dê với nồng độ α S1-CN thấp (allen yếu) đã làm giảm sự nhạy cảm của sữa ở một số người không dung nạp được sữa bò [11], do đó kết quả này cung cấp cơ sở cho việc sản xuất sữa dựa trên thành phần dinh dưỡng. Theo Sánchez và cộng sự (2005), sự lựa chọn kiểu gen tốt nhất về hàm lượng protein bằng cách sử dụng thông tin kiểu gen cho α S1-CN cho các chương trình chọn giống [12] có thể dẫn đến sự cải thiện di truyền trong quần thể dê sữa.

Việc xác định nguồn protein phù hợp hơn cho trẻ em bị dị ứng với sữa bò là một mục tiêu quan trọng cho bác sĩ nhi khoa và chuyên gia dinh dưỡng. Tuy nhiên, chế độ ăn uống thay thế tốt nhất cho trẻ bị dị ứng với các protein sữa bò vẫn cần được xác

định [13]. Kết quả từ nghiên cứu này, bao gồm kết quả immunoblotting, cho thấy rằng sữa dê với các kiểu gen CSN1S1 cụ thể có thể được sử dụng để lựa chọn ra một nguồn protein thay thế trong trường hợp nhạy cảm với α S1-CN cụ thể.

Tuy nhiên, những khác biệt phát hiện trong phản ứng dị ứng với sữa dê có cùng kiểu gen của CSN1S1, cũng như phản ứng của mẫu huyết thanh, cho thấy tính gây dị ứng sữa có thể bị ảnh hưởng bởi các yếu tố khác cần được nghiên cứu.

Trong trường hợp sữa dê có lượng α S2-CN thấp cũng ảnh hưởng tới phản ứng dị ứng của sữa (Marletta và cộng sự, 2004). Tương tự, sự tương tác với các thành phần whey protein hoặc các phân số CN khác có thể là nguyên nhân gây ra sự khác biệt về tính dị ứng giữa các mẫu sữa dê được phân tích. Cần phải nghiên cứu thêm để giải thích sự thay đổi cụ thể của các mẫu này, để đánh giá rõ ràng mối quan hệ giữa các kiểu gen CN dê và khả năng dung nạp protein sữa.

Trong mọi trường hợp, phản ứng chéo của các mẫu sữa dê ở một số trẻ em có thể xảy ra và điều này không đảm bảo rằng sữa này có thể được coi là nguồn protein an toàn cho các đối tượng dị ứng. Mức độ nghiêm trọng của phản ứng dị ứng sữa dê ở một số trẻ cho thấy cần thận trọng trước khi xem xét sữa dê là chất thay thế phù hợp và an toàn cho trẻ bú mẹ. Phương pháp tiếp cận thận trọng này không loại trừ việc điều tra thêm về khả năng dung nạp sữa dê ở những đối tượng dễ uống sữa bò. Việc phát hiện phản ứng chéo ở những trẻ này cần được thiết lập và cần phải có các ứng dụng chế độ ăn kiêng mới đối với sữa dê (Restani, 2004).

5. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu của chúng tôi, SDS-PAGE và immunoblotting chỉ ra sự ảnh hưởng của gen CSN1S1 đến các biểu hiện khác nhau của α S1-CN. Sự đa hình của các gen mã hóa cho các protein sữa tạo ra các biến thể khác nhau cho mỗi loại protein. Sự vắng mặt của phản ứng ở dải α S1-CN trên hình ảnh immunoblotting của tất cả các mẫu sữa dê được lựa chọn từ kết quả SDS-PAGE gợi ý rằng sữa với kiểu gen CSN1S1 cụ thể có thể được sử dụng thay thế protein trong trường hợp dị ứng α S1-CN ở các đối tượng dị ứng sữa bò.

SDS-PAGE kết hợp với immunoblotting rất hữu ích trong việc giải quyết các lựa chọn các mẫu sữa. Hơn nữa, các kỹ thuật này còn hữu ích để đánh giá phản ứng của bệnh nhân dị ứng sữa bò đối với protein sữa dê của những con dê được chọn để xác định tính an toàn của việc sử dụng nó cho từng đối tượng cụ thể.

Bên cạnh đó cũng cần phải đánh giá tính dị nguyên của các protein khác được mã hóa từ tất cả các gen CN để kết hợp các CN tìm ra nguồn sữa thay thế ít gây dị ứng nhất. Đồng thời cũng cần phải xem xét để loại trừ các trường hợp có phản ứng chéo của các mẫu sữa dê ở các trẻ bị dị ứng với sữa bò. Các phương pháp tiếp cận khoa học này phức tạp bởi đòi hỏi nhiều xét nghiệm di truyền và lâm sàng trước khi chọn và nhân giống dê thích hợp để hình thành các sữa công thức an toàn cho các trẻ sơ sinh

cũng như ở các đối tượng khác dị ứng với sữa bò.

6. KIẾN NGHỊ

Trong một số trường hợp có thể có phản ứng chéo xảy ra giữa CN sữa dê và sữa bò nên cần làm thêm các kỹ thuật khác để loại trừ, chẳng hạn như test lấy da (SPT- Skin prick test). Để tìm ra một nguồn sữa dê thay thế cho sữa bò an toàn cho các đối tượng dị ứng với sữa bò cần nghiên cứu tính dị ứng của các thành phần protein khác ở trong sữa dê.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Gelincik, A. *et al.* Confirmed prevalence of food allergy and non-allergic food hypersensitivity in a Mediterranean population. *Clin. Exp. Allergy* 38, 1333–1341 (2008).
2. Baumert, J. L. *Detecting and Measuring Allergens in Food. Risk Management for Food Allergy* (Elsevier, 2013). doi:10.1016/B978-0-12-381988-8.00013-0
3. Rona, R. J. *et al.* The prevalence of food allergy: A meta-analysis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 120, 638–646 (2007).
4. Eigenmann, P. A. The spectrum of cow's milk allergy. *Pediatr. Allergy Immunol.* 18, 265–271 (2007).
5. Sicherer, S. H. Clinical implications of cross-reactive food allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 108, 881–890 (2001).
6. Ballabio, C. *et al.* Goat milk allergenicity as a function of α s₁-casein genetic polymorphism. *J. Dairy Sci.* 94, 998–1004 (2011).
7. Carroccio, A. *et al.* Intolerance to hydrolysed cow's milk proteins in infants: clinical characteristics and dietary treatment. *Clin Exp Allergy* 30, 1602,1597-1603. (2000).
8. Martins P, B. L. Sheep and goat's milk allergy: a case study. *Allergy. Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 60, 129,129-130 (2005).
9. Eigenmann, P. A. The spectrum of cow's milk allergy. *Pediatr. Allergy Immunol.* 18, 267,265-271 (2007).
10. Caroli, A. *et al.* Characterization of the casein gene complex in West African goats and description of a new alpha(s1)-casein polymorphism. *J. Dairy Sci.* 90, 2989,2989-2996 (2007).
11. Bevilacqua, C. *et al.* Goats' milk of defective alpha(s1)-casein genotype decreases intestinal and systemic sensitization to beta-lactoglobulin in guinea pigs. *J. Dairy Res.* 68, 217,217-227 (2001).
12. Sánchez, a, Ilahi, H., Manfredi, E. & Serradilla, J. M. Potential benefit from using the alpha(s1)-casein genotype information in a selection scheme for dairy goats. *J. Anim. Breed. Genet.* 122, 21–29 (2005).
13. Docena, G. H., Fernandez, R., Chirido, F. G. & Fossati, C. a. Identification of casein as the major allergenic and antigenic protein of cow's milk. *Allergy* 51, 412,412-416 (1996).