



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ ΣΕ ΜΗΤΡΙΚΟ ΠΡΩΤΟΓΑΛΑ ΜΕ ΧΡΗΣΗ
ΑΕΡΙΑΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΗΣ ΜΕ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ ΙΟΝΤΙΣΜΟΥ
ΦΛΟΓΑΣ (GC-FID)

DETERMINATION OF FATTY ACIDS IN HUMAN COLOSTRUM USING GAS
CHROMATOGRAPHY COUPLED WITH FLAME IONIZATION DETECTOR
(GC-FID)

Πασχοπούλου Μαρία - Παππά Λυδία
Paschoroulou Maria – Pappa Lydia

Επιβλέπων καθηγητής: Ζουμπουλάκης Παναγιώτης
Supervisor: Zoumpoulakis Panagiotis

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2023

Μέλη Εξεταστικής Επιτροπής συμπεριλαμβανομένου και του Εισηγητή

Οι υπογράφοντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη πτυχιακή εργασία με τίτλο «Προσδιορισμός λιπαρών οξέων σε μητρικό πρωτόγαλα με χρήση αέριας χρωματογραφίας συζευγμένη με ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας (GC-FID)» που παρουσιάσθηκε από τις Παππά Λυδία και Πασχοπούλου Μαρία και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

Ημερομηνία παρουσίασης: 04-10-23	Όνομα επιβλέποντος Παναγιώτης Ζουμπουλάκης Καθηγητής	
	Όνομα μέλους επιτροπής Βασιλεία Σινάνογλου Καθηγήτρια	
	Όνομα μέλους επιτροπής Ειρήνη Στρατή Επικ. Καθηγήτρια	

Δήλωση συγγραφέων πτυχιακής εργασίας περί λογοκλοπής/ Copyright

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

Η Δηλούσα

Πασχοπούλου Μαρία



Η Δηλούσα

Παππά Λυδία



Ευχαριστίες

Θα θέλαμε να εκφράσουμε τις θερμές μας ευχαριστίες στον επιβλέποντα καθηγητή κ. Ζουμπουλάκη Παναγιώτη, για την εμπιστοσύνη που μας έδειξε, για την εκπόνηση της παρούσας εργασίας και για τη καθοδήγηση που μας πρόσφερε κατά το διάστημα της συγγραφής της. Οφείλουμε επίσης να ευχαριστήσουμε τον Τσιάντα Κωνσταντίνο, υποψήφιο διδάκτορα του τμήματος «Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων», για την άριστη συνεργασία, την πολύτιμη βοήθεια και την πολύτιμη στήριξή του καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής αλλά και της συγγραφικής μας πορείας.

Τελειώνοντας, οφείλουμε και οι δύο ένα μεγάλο ευχαριστώ στις οικογένειές μας αλλά και στους φίλους μας, για την ενθάρρυνση και τη στήριξή τους καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μας, καθώς και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας.

Περίληψη

Το μητρικό γάλα αποτελεί τη βέλτιστη επιλογή για τη διατροφή των νεογνών λόγω της σύστασης και της επίδρασής του στην υγεία, την ανάπτυξη και τη λειτουργία του ανοσοποιητικού τους συστήματος. Η σύνθεση του μητρικού γάλακτος υφίσταται δυναμικές μεταβολές καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης του βρέφους, ώστε να ικανοποιεί τις διατροφικές και ανοσολογικές απαιτήσεις του σε κάθε στάδιο της γαλουχίας, με τις αντίστοιχες ονομασίες του: πρωτόγαλα, μεταβατικό και ώριμο γάλα. Το πρωτόγαλα ξεχωρίζει από τους άλλους τύπους γάλακτος, διαδραματίζοντας καθοριστικό ρόλο στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος του νεογέννητου. Σχετικά χαμηλή είναι η περιεκτικότητα του σε λακτόζη, γεγονός που υποδηλώνει ότι στο στάδιο αυτό προτεραιότητα έχουν οι λειτουργίες υποστήριξης του εντερικού μικροβιόκοσμου και η ανάπτυξη ανοσίας του βρέφους. Στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε μια ολοκληρωμένη ανάλυση δειγμάτων μητρικού πρωτογάλακτος με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (FID), σε συνδυασμό με πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση και συγκεκριμένα ανάλυση κύριων συνιστωσών (Principal Component Analysis – PCA) και ανάλυση διάκρισης ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Square Discriminant Analysis – PLS-DA). Η προσέγγιση αυτή εμβάθυνε στο προφίλ και τη σύσταση των λιπαρών οξέων που απαντώνται στο πρωτόγαλα και διερεύνησε τους παράγοντες που επηρεάζουν τη σύνθεση του κατά τη διάρκεια της γαλουχίας. Η πλήρης κατανόηση της σύστασης του μητρικού πρωτογάλακτος και των λειτουργιών των συστατικών του προσφέρει τη δυνατότητα να βελτιώσει τις κλινικές διαδικασίες, να προωθήσει τις πρακτικές νεογνικής διατροφής και να προωθήσει τη δημιουργία εναλλακτικών προϊόντων βρεφικής διατροφής για περιπτώσεις που το μητρικό γάλα δεν είναι διαθέσιμο. Τα αποτελέσματα αποκάλυψαν ότι τα κύρια λιπαρά οξέα που περιέχει είναι το παλμιτικό, το στεαρικό, το ελαϊκό και το λινελαϊκό οξύ, ενώ οι πιο σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη σύστασή του είναι η εθνικότητα της μητέρας, η ηλικία της και ο δείκτης μάζας σώματός της.

Λέξεις - κλειδιά: μητρικό πρωτόγαλα, λιπαρά οξέα, GC-FID, παράγοντες

Abstract

Breast milk is the optimal choice for the nutrition of newborns thanks to its composition and effect on the health, development and functioning of their immune system. The composition of breast milk undergoes dynamic changes throughout the development of the infant, in order to meet its nutritional and immunological requirements at each stage of lactation, with its respective names: colostrum, transitional and mature milk. Colostrum stands out from other types of milk, playing a key role in strengthening the newborn's immune system. Its lactose content is relatively low, which indicates that at this stage, the functions of supporting the intestinal microbiome and the development of immunity of the infant have priority. In the present study, a comprehensive analysis of breast colostrum samples was performed using gas chromatography coupled with flame ionization detector (FID) along with multivariate statistical analysis and more specifically Principal Component Analysis (PCA) and Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS-DA). This approach deepened the profile and composition of fatty acids found in colostrum and investigated the factors influencing its composition during lactation. Full understanding of the composition of human colostrum and the functions of its components has the potential to improve clinical procedures, advance neonatal feeding practices, and promote the creation of alternative infant formula products for situations when human milk is not available. The results revealed that the main fatty acids it contains are palmitic, stearic, oleic and linoleic acids, while the most major factors influencing its composition are the ethnicity of the mother, her age and body mass index.

Keywords: human colostrum, fatty acids, GC-FID, factors

Περιεχόμενα

Δήλωση συγγραφέων πτυχιακής εργασίας περί λογοκλοπής/ Copyright.....	2
Ευχαριστίες.....	4
Περίληψη.....	5
Abstract.....	6
Κεφάλαιο 1. Το μητρικό πρωτόγαλα (Colostrum).....	11
1.1. Ορισμός.....	11
1.2. Σημαντικότητα – Λειτουργικές ιδιότητες.....	12
1.2.1. Ανοσολογικά οφέλη.....	13
1.2.2. Γνωστική λειτουργία και νευροανάπτυξη.....	15
1.3. Σύσταση μητρικού πρωτογάλακτος.....	16
1.3.1. Νερό.....	17
1.3.2. Μακροθρεπτικά συστατικά.....	17
1.3.2.1. Πρωτεΐνες.....	18
1.3.2.2. Υδατάνθρακες.....	19
1.3.2.3. Λιπίδια.....	19
1.3.3. Μικροθρεπτικά συστατικά.....	21
1.4. Παράγοντες που επηρεάζουν τη σύσταση του μητρικού πρωτογάλακτος.....	22
1.4.1. Διατροφικές συνήθειες.....	22
1.4.2. Ηλικία της μητέρας.....	23
1.4.3. Εβδομάδα κύησης.....	24
1.4.4. Δείκτης Μάζας Σώματος (BMI).....	26
1.5. Σύγκριση μητρικού πρωτογάλακτος με βρεφικές φόρμουλες.....	28
1.5.1. Σύνθεση βρεφικής φόρμουλας.....	29
Κεφάλαιο 2. Ανάλυση λιπαρών οξέων μητρικού πρωτογάλακτος.....	31
2.1. Σύνθεση λιπιδικού προφίλ πρωτογάλακτος.....	31
2.2. Συνεισφορά των σημαντικότερων λιπαρών οξέων στο νεογνό.....	34
2.2.1. Λιπαρά οξέα μικρής και μέσης αλυσίδας.....	35
2.2.2. Λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας.....	36
2.2.2.1. ω-3 λιπαρά οξέα.....	38
2.2.2.2. ω-6 λιπαρά οξέα.....	39
2.3. Αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού των λιπαρών οξέων.....	39
2.3.1. Φασματοσκοπία Υπέρυθρης Ακτινοβολίας (IR).....	40

2.3.2. Αέρια χρωματογραφία.....	41
2.3.2.1. Ανιχνευτής ιονισμού φλόγας (GC-FID).....	43
2.3.2.2. Φασματομετρία Μάζας (GC-MS)	45
Κεφάλαιο 3. Σκοπός εργασίας.....	46
Κεφάλαιο 4. Υλικά-Μέθοδοι.....	47
4.1. Δειγματοληψία πρωτογάλακτος.....	47
4.2. Προετοιμασία δειγμάτων.....	48
4.2.1. Ολική Εκχύλιση Λιπιδίων – Μέθοδος Folch.....	48
4.2.2. Μετεστεροποίηση λιπαρών οξέων	49
4.3. Αντιδραστήρια, Υλικά και Όργανα.....	49
4.4. Επιλογή συνθηκών και προετοιμασία αέριου χρωματογράφου.....	50
4.5. Ανάλυση - Ταυτοποίηση λιπαρών οξέων με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας.....	51
4.6. Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.....	54
4.6.1. Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA).....	55
4.6.2. Ανάλυση διάκρισης ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA)	55
4.6.3. Αξιολόγηση και επικύρωση πολυπαραμετρικών στατιστικών αναλύσεων	55
Κεφάλαιο 5. Αποτελέσματα-Συζήτηση.....	56
5.1. Γενικό προφίλ λιπαρών οξέων δειγμάτων.....	56
5.2. Διερεύνηση της επίδρασης βιομετρικών παραγόντων στο λιπιδικό προφίλ...57	
5.2.1. Εθνικότητα.....	57
5.2.2. Ηλικία.....	59
5.2.3. BMI μητέρας.....	61
5.2.4. Εβδομάδα κήσης.....	62
5.2.5. Φύλο.....	63
5.2.6. Είδος τοκετού	63
5.3. Συζήτηση	65
5.3.1. Αξιολόγηση του προφίλ των δειγμάτων με αυτό άλλων μελετών	65
5.3.2. Διερεύνηση της επίδρασης ανθρωπομετρικών χαρακτηριστικών στο λιπιδικό προφίλ.....	65
Κεφάλαιο 6. Συμπεράσματα.....	68
Βιβλιογραφία.....	69

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Σύνθεση ανά 100ml πρωτογάλακτος και ώριμου γάλακτος.....	17
Πίνακας 2: Μακροθρεπτικά και μικροθρεπτικά συστατικά πρωτογάλακτος	21
Πίνακας 3: Σύνθεση ανθρώπινου γάλακτος και υποκατάστατου	29
Πίνακας 4: Κύρια λιπαρά οξέα και περιεκτικότητές τους στο ανθρώπινο γάλα κατά τα στάδια της γαλουχίας σε διάστημα 1 ^{ος} μήνα (διάμεσες τιμές και τυπική απόκλιση).....	32
Πίνακας 5: Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά μητέρων, φύλο νεογνού και είδος τοκετού..	47
Πίνακας 6: Υλικά και αντιδραστήρια	49
Πίνακας 7: Παράμετροι αέριου χρωματογράφου.....	51
Πίνακας 8: Χρόνος κατακράτησης και συντελεστές απόκρισης FAME	52
Πίνακας 9: Χρόνος κατακράτησης FAME.....	53
Πίνακας 10: Μέσοι όροι λιπαρών οξέων 38 μετρήσεων μητρικού πρωτογάλακτος (% w/w) και τυπική απόκλιση (standard deviation) (n=38 δείγματα).	57

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1: Γραφική απεικόνιση του ανθρώπινου μητρικού γάλακτος.....	16
Εικόνα 2: Δομή της τριακυλογλυκερόλης και οι θέσεις sn.....	34
Εικόνα 3: Θέση παλμιτικού οξέος και ελαϊκού οξέος στη τριακυλογλυκερόλη.....	34
Εικόνα 4: Μεταβολισμός βασικών λιπαρών οξέων λινολεϊκού οξέος (18:2 n-6) και λινολενικού οξέος (18:3 n-3) σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας (LC-PUFA)	37
Εικόνα 5: Αέριος χρωματογράφος.....	42
Εικόνα 6: Αέριος χρωματογράφος με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας.....	43
Εικόνα 7: Αέριος χρωματογράφος εργαστηρίου.....	50
Εικόνα 8: Στατιστικό μοντέλο PCA (αριστερά) και PLS-DA (δεξιά) με βασική παράμετρο την εθνικότητα των εξεταζόμενων μητέρων.....	57
Εικόνα 9: Διάγραμμα VIP Scores κυριότερων λιπαρών οξέων που οφείλονται για τον διαχωρισμό με βάση την εθνικότητα των μητέρων. Παράμετροι: ακρίβεια του μοντέλου (accuracy), δείκτης καλής προσαρμογής των δεδομένων (R^2) και δείκτης προβλεψιμότητας (Q^2).....	58
Εικόνα 10: Πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση PCA με βασική παράμετρο την ηλικία των εξεταζόμενων μητέρων (3 κατηγορίες)	59
Εικόνα 11: Στατιστικό μοντέλο PCA (αριστερά) και PLS-DA (δεξιά) με βασική παράμετρο την ηλικία των εξεταζόμενων μητέρων (2 κατηγορίες)	60
Εικόνα 12: Διάγραμμα VIP Scores κυριότερων λιπαρών οξέων που οφείλονται για τον διαχωρισμό με βάση την ηλικία των μητέρων. Παράμετροι: ακρίβεια του μοντέλου (accuracy), δείκτης καλής προσαρμογής των δεδομένων (R^2) και δείκτης προβλεψιμότητας (Q^2).....	60
Εικόνα 13: Στατιστικά μοντέλα PCA με βασική παράμετρο τον δείκτη μάζας σώματος (BMI) των εξεταζόμενων μητέρων ομαδοποιημένες σε 3 κατηγορίες (αριστερά) και σε 2 κατηγορίες (δεξιά).....	61
Εικόνα 14: Στατιστικό μοντέλο PLS-DA με βασική παράμετρο τον δείκτη μάζας σώματος (BMI) των εξεταζόμενων μητέρων	61
Εικόνα 15: Διάγραμμα VIP Scores κυριότερων λιπαρών οξέων που οφείλονται για τον διαχωρισμό με βάση τον δείκτη μάζας σώματος των μητέρων. Παράμετροι: ακρίβεια του μοντέλου (accuracy), δείκτης καλής προσαρμογής των δεδομένων (R^2) και δείκτης προβλεψιμότητας (Q^2)	62
Εικόνα 16: Διάγραμμα δύο συνιστωσών PCA με βασική παράμετρο την εβδομάδα κήσης των εξεταζόμενων μητέρων	62
Εικόνα 17: Στατιστικό μοντέλο PCA με βασική παράμετρο το φύλο του νεογνού	63
Εικόνα 18: Στατιστικό μοντέλο PLS-DA με βασική παράμετρο το είδος του τοκετού	64
Εικόνα 19: Παράμετροι: ακρίβεια του μοντέλου (accuracy), δείκτης καλής προσαρμογής των δεδομένων (R^2) και δείκτης προβλεψιμότητας (Q^2)	64

Κεφάλαιο 1. Το μητρικό πρωτόγαλα (Colostrum)

1.1. Ορισμός

Το μητρικό γάλα αποτελεί τη βέλτιστη πηγή διατροφής για ένα νεογέννητο και είναι ένας σημαντικός παράγοντας που βοηθά την προσαρμογή του στο νέο εξωμήτριο περιβάλλον. Το μητρικό γάλα χωρίζεται σε τρεις βασικές διακριτές φάσεις, βάσει του σταδίου της γαλακτικής περιόδου, οι οποίες είναι το πρωτόγαλα (colostrum), το μεταβατικό γάλα (transitional) και το ώριμο γάλα (mature). Στο καθένα από τα στάδια αυτά, το μητρικό γάλα υφίσταται μεταβολές στη σύνθεση του, τέτοιες ώστε να προσαρμόζεται στις ειδικές ανάγκες και απαιτήσεις του νεογνού σε κάθε ηλικιακή φάση. Συγκεκριμένα το πρωτόγαλα, ή αλλιώς πύαρ, αποτελεί το πρώτο υγρό που παράγεται από τους μαστικούς αδένες των θηλαστικών, όπου ανήκει και ο άνθρωπος, λίγες μέρες μετά τον τοκετό. Τυπικά, το πρωτόγαλα παρουσιάζει σημαντικές διαφορές συγκριτικά με το ώριμο γάλα ως προς την σύσταση, την ποσότητα και την εμφάνιση. Πρόκειται για ένα αραιό, υποκίτρινο, γαλακτώδες υγρό, πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά, που παράγεται κατά τις πρώτες πέντε ημέρες μετά τη γέννηση του βρέφους. Κύρια διαφορά κρίνεται να είναι η υψηλή περιεκτικότητα του σε ανοσοσφαιρίνη Α (IgA), η οποία βοηθά στην προστασία του βρέφους από λοιμώξεις. Επιπλέον, είναι πλούσιο σε ανοσολογικά συστατικά, όπως τα ένζυμα λυσοζύμη και λακτοφερίνη, τα λευκοκύτταρα, καθώς και ορισμένοι παράγοντες που σχετίζονται με την ανάπτυξη όπως η αυξητική ορμόνη. Έπειτα από συνεχόμενες αλληλεπιδράσεις αυτών των ανοσολογικών χαρακτηριστικών, με τους βλεννογόνους της αναπνευστικής οδού του βρέφους επιτυγχάνεται αυτό που ονομάζουμε ως παθητική ανοσία (Lyons et al., 2020). Το πρωτόγαλα βοηθά επίσης στη δημιουργία ενός φυσιολογικού εντερικού μικροβιώματος στο βρέφος, καθώς έως και το 30% της σύστασης της χλωρίδας του εντέρου οφείλεται σε αυτό. Εκτός από τις αυξημένες συγκεντρώσεις σε προστατευτικούς παράγοντες, παρατηρούνται κι άλλες διαφορές στο πρωτόγαλα, έναντι του ώριμου γάλακτος, που αφορούν την υψηλότερη συγκέντρωση σε πρωτεΐνες, τριγλυκερίδια, μεταλλικά στοιχεία, λιποδιαλυτές βιταμίνες και ηλεκτρολύτες. Έτσι, πρωταρχική λειτουργία του πρωτογάλακτος υποδεικνύεται να είναι η ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος του νεογνού και σε δεύτερο στάδιο, η ανάπτυξη και η θρέψη του (Fujimori et al., 2016, Kaingade et al., 2017).

1.2. Σημαντικότητα – Λειτουργικές ιδιότητες

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας και η UNICEF έχουν ανακηρύξει το ανθρώπινο μητρικό γάλα ως χρυσό πρότυπο για τη διατροφή των βρεφών. Η μοναδικότητα της σύνθεσής του το καθιστά τη μοναδική τροφή που μπορεί να ικανοποιήσει όλες τις θρεπτικές και βιολογικές απαιτήσεις κατά τους πρώτους έξι μήνες της βρεφικής ζωής, γι' αυτό και οι παγκόσμιες συστάσεις, όπως ορίζεται στην Παγκόσμια Στρατηγική για τη βέλτιστη βρεφική διατροφή, είναι ο αποκλειστικός θηλασμός. Αυτό σημαίνει ότι το βρέφος λαμβάνει μόνο μητρικό γάλα από τη μητέρα του και όχι άλλα υγρά ή στερεά, ούτε καν νερό, με εξαίρεση το στοματικό διάλυμα επανυδάτωσης, σταγόνες ή σιρόπια που αποτελούνται από βιταμίνες, συμπληρώματα μετάλλων ή φάρμακα, ενώ συνίσταται η συνέχιση του θηλασμού για έως δύο έτη ή και περισσότερο (Binns et al., 2016).

Ένας αυξανόμενος όγκος συσσωρευμένης επιδημιολογικής βιβλιογραφίας καταδεικνύει τα προστατευτικά οφέλη του ανθρώπινου γάλακτος για τα βρέφη. Ολοένα και μεγαλύτερος αριθμός βιοδραστικών παραγόντων εντοπίζεται και μετράται στο μητρικό γάλα, κατά την περίοδο της γαλουχίας. Οι παράγοντες αυτοί μπορούν να διαδραματίσουν πολλαπλούς λειτουργικούς ρόλους στο βρέφος: διατροφικούς, ρυθμιστικούς, μεταβολικούς, αλλά και αντιφλεγμονώδεις. Τα βιοδραστικά συστατικά του πρωτογάλακτος περιλαμβάνουν: i) αντιμικροβιακούς παράγοντες, ii) πεπτίδια που διεγείρουν την ανοσοενίσχυση και iii) αυξητικούς παράγοντες (Stelwagen et al., 2009). Οι αντιμικροβιακοί παράγοντες παρέχουν παθητική ανοσία και προστατεύουν από λοιμώξεις, ιδίως κατά τις πρώτες εβδομάδες μετά το τοκετό. Η αντιμικροβιακή δράση του πρωτογάλακτος μπορεί να είναι άμεση ενός παθογόνους μικροοργανισμούς ή έμμεση ενόσω της ενεργούς της ανενόξησης ενός υγιούς εντερικού μικροβιόκοσμου, πλούσιου σε ωφέλιμα βακτήρια του γένους *Bifidobacterium* και *Lactobacillus* (Lawrence & Pane, 2007, Benson et al., 2012). Το πρωτόγαλα παρέχει σήματα στο ανοσοποιητικό σύστημα, προκαλώντας ανοχή στα τρόφιμα και στα μη επεμβατικά αντιγόνα, αποφεύγοντας έτσι την έναρξη μιας μη φυσιολογικής ανοσολογικής απόκρισης, ενώ ταυτόχρονα προάγει την ωρίμανσή και μια επαρκή ανοσολογική απόκριση έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών (Wheeler et al., 2007). Ενδιαφέρον αποτελεί πως ορισμένα συστατικά όπως κολοστρινίνη, οι κυτταροκίνες, η λακτοφερρίνη, η β-λακτοσφαιρίνη, η α-λακταλβουμίνη και το γλυκομακροπεπτίδιο είναι σε θέση να προάγουν την άμεση ωρίμανση και τη διαμόρφωση του ανοσοποιητικού συστήματος ενώ συστατικά όπως όπως οι ολιγοσακχαρίτες, οι γαγγλιοσίδες και οι νουκλεοζίτες ευνοούν την ανάπτυξη ωφέλιμων ειδών βακτηρίων (Lønnerdal, 2013, René Liang Shen et al., 2015).

Επιδημιολογικές μελέτες αναδεικνύουν τις διαρκείς προστατευτικές επιδράσεις του ανθρώπινου πρωτογάλακτος έναντι αυτοάνοσων διαταραχών, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 και 2, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η κούλιοκάκη, η ελκώδης κολίτιδα και η νόσος του Crohn ή το νεόπλασμα (Hanson, 2007, Griffiths et al., 2018). Επιπλέον, σχετικές έρευνες δείχνουν ότι ο θηλασμός προσφέρει άμυνα έναντι χρόνιων αγγειακών παθήσεων, όπως η υπέρταση, η παχυσαρκία και η αντίσταση στην ινσουλίνη (Singhal & Lucas, 2004, Martin, 2005, Patel et al., 2013). Μια μετα-ανάλυση υπογράμμισε πως ο θηλασμός δρα ως προστασία έναντι των παιδικών όγκων, που περιλαμβάνουν την οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία, τη νόσο του Hodgkin και το νευροβλάστωμα (Su et al., 2021). Επιπλέον, σημαντική είναι η συμβολή του στη θεραπεία εύρους γαστρεντερικών παθήσεων, συμπεριλαμβανομένης της βλάβης του εντέρου, που προκαλείται από μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα, της διάρροιας, που σχετίζεται με την ανοσοανεπάρκεια καθώς και της μολυσματικής διάρροιας (Chandwe & Kelly, 2021). Ένα πλεονέκτημα ακόμη, είναι η αύξηση κατά 4,5 μονάδες IQ σε βρέφη που θηλάζουν, σε σύγκριση με βρέφη που δεν θηλάζουν (Koletzko, 2017, Visentainer et al., 2018).

Συλλογικά, τα ευρήματα αυτά υπογραμμίζουν τον ζωτικό και διαρκή ρόλο του ανθρώπινου γάλακτος στη μείωση του κινδύνου εμφάνισης παθολογικών καταστάσεων. Παρόλο που απαιτείται περαιτέρω έρευνα για να προσδιοριστούν τα άμεσα και έμμεσα οφέλη του μητρικού πρωτογάλακτος στην υγεία των βρεφών, τα έως τώρα δεδομένα καταδεικνύουν ότι διαμορφώνει το εντερικό μικροβίωμα, λόγω των μικροβιακών και ανοσοενισχυτικών συστατικών του και είναι επίσης συνδεδεμένο με τη μείωση της βραχυπρόθεσμης θνησιμότητας από γαστρεντερικές και αναπνευστικές παθήσεις, αλλά και από το σύνδρομο του αιφνίδιου βρεφικού θανάτου. (Chung et al., 2007, Kramer et al., 2010, Witkowska-Zimny et al., 2019).

1.2.1. Ανοσολογικά οφέλη

Μία από τις σημαντικότερες γνώσεις που αποκτήσαμε αναφορικά με τον θηλασμό τις τελευταίες δεκαετίες είναι η ικανότητα του ανθρώπινου γάλακτος να παρέχει προστασία έναντι των λοιμώξεων. Τα T- και B- λεμφοκύτταρα, οι εκκριτικές ανοσοσφαιρίνες (sIgA, sIgM, sIgG, sIgD, sIgE), οι πρωτεΐνες-φορείς (λακτοφερρίνη, τρανσφερίνη), τα ένζυμα (λυσοζύμη, λιποπρωτεϊνική λιπάση, λευκοκυτταρικά ένζυμα) είναι συστατικά του γάλακτος που προσδίδουν ανοσολογικά οφέλη (Hodgkinson et al., 2022).

Το πρωτόγαλα είναι ιδιαίτερα πλούσιο σε ανοσοσφαιρίνες (Ig), οι οποίες είναι αντισώματα που παρέχουν παθητική ανοσία στο νεογνήτο και βοηθούν στην προστασία του μωρού

από λοιμώξεις. Αποτελούν περίπου το 70-80% της συνολικής πρωτεΐνης και είναι παρούσες σε συγκεντρώσεις από 30 έως 200 g/L, οι οποίες μειώνονται σε 0,4 έως 1,0 g/L, λίγο μετά τον τοκετό (Boyer et al., 2016). Η ανοσοσφαιρίνη Α (IgA) είναι από τους κύριους τύπους ανοσοσφαιρινών που βρίσκονται στο πρωτόγαλα. Τα αντισώματα IgA είναι σχετικά σταθερά και ανθεκτικά στα πεπτικά ένζυμα του γαστρεντερικού σωλήνα, γεγονός που της επιτρέπει να διέρχονται από το έντερο χωρίς να παρεμποδίζεται η λειτουργία της (Puppel et al., 2019). Διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην παροχή αντιμικροβιακής άμυνας στο νεογνικό γαστρεντερικό σωλήνα, εμποδίζοντας την προσκόλληση των παθογόνων στις επιφάνειες του βλεννογόνου, εξουδετερώνοντας τις μικροβιακές τοξίνες και έτσι επιτυγχάνει παθητική ανοσία.

Ενώ οι IgM και IgG είναι λιγότερο διαδεδομένες στο ανθρώπινο γάλα, συμβάλλουν επίσης στην ανοσολογική επιτήρηση, εμποδίζοντας τον αποικισμό του πεπτικού από μικροοργανισμούς και περιορίζοντας τον αριθμό των αντιγόνων που διέρχονται από το βλεννογονικό φραγμό. Έρευνα διεξάχθηκε σχετικά με το ρόλο της sIgA του μητρικού γάλακτος στην παθογένεια της νεκρωτικής εντεροκολίτιδας, μιας σοβαρής γαστρεντερικής νόσου που επικρατεί στα πρόωρα βρέφη και συνδέεται με υψηλά ποσοστά θνησιμότητας (Neu & Walker, 2011). Τα πρόωρα βρέφη που τρέφονταν αποκλειστικά με φόρμουλα παρουσίαζαν ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα εντερικών βακτηρίων που σχετίζονται με IgA. Επιπλέον, τα βρέφη που έπασχαν από νεκρωτική εντεροκολίτιδα παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα εντεροβακτηριδίων που δεν είχαν συνδεθεί με IgA σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες αντίστοιχης ηλικίας. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι οι ανεπαρκείς συγκεντρώσεις IgA και τα μειωμένα επίπεδα IgA-δεσμευμένων βακτηρίων στο έντερο μπορεί να συμβάλλουν στην ανεπαρκή ποικιλομορφία του μικροβιώματος και στον αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης νεκρωτικής εντεροκολίτιδας (Gopalakrishna et al., 2019).

Στο μητρικό πρωτόγαλα περιλαμβάνονται επίσης αντιμικροβιακά πεπτίδια, με κυριότερα, την λακτοφερίνη και την λακτοπεροξειδάση, που συμβάλλουν στην πρόληψη της ανάπτυξης επιβλαβών βακτηρίων και μυκήτων στο έντερο του νεογνού, με τη λακτοφερίνη να βοηθά επιπλέον και στην απορρόφηση του σιδήρου. Μια άλλη αντιμικροβιακή πρωτεΐνη, η λυσοζύμη, βοηθά στην καταστροφή των βακτηρίων, διασπώντας τα κυτταρικά της τοιχώματα (Trend et al., 2016).

Μετά από εκτεταμένες έρευνες, έχει αποδειχθεί πως ο θηλασμός προστατεύει από την πρώιμη απόκτηση του ελικοβακτηριδίου του πυλωρού, κι αυτό οφείλεται κυρίως στην ανοσολογική δράση του πρωτογάλακτος. Η λοίμωξη αυτή έχει αναγνωρισθεί ως η κύρια αιτία του πεπτικού έλκους και ενέχει τον κίνδυνο για την ανάπτυξη καρκίνου του στομάχου.

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας είναι καρκινογόνο πρώτης κατηγορίας. Πιο αναλυτικά, το *Helicobacter pylori* είναι ένα ενδογενές βακτηρίδιο που υπάρχει στο στομάχι, που σε ορισμένα άτομα είναι δυνατόν να προκαλέσει πόνο, έλκος, φούσκωμα ή ακόμη και ναυτία, και για να συνδεθεί με το γαστρικό βλεννογόνο απαιτεί την ύπαρξη λιπιδίων. Το πρωτόγαλα όμως, εμποδίζει την προσκόλληση αυτού του μικροοργανισμού στις θέσεις πρόσδεσης των λιπιδίων του γαστρεντερικού σωλήνα, επομένως είναι ικανό να αποτρέψει την εμφάνιση πεπτικού έλκους. Μέσω αυτής της προσέγγισης, ανάγεται το συμπέρασμα ότι το πρωτόγαλα λειτουργεί φυσικά ως μία εναλλακτική μορφή πρόληψης για την λοίμωξη του στομάχου από το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού (Tanriverdi et al., 2006, Baltierra-Uribe et al., 2021).

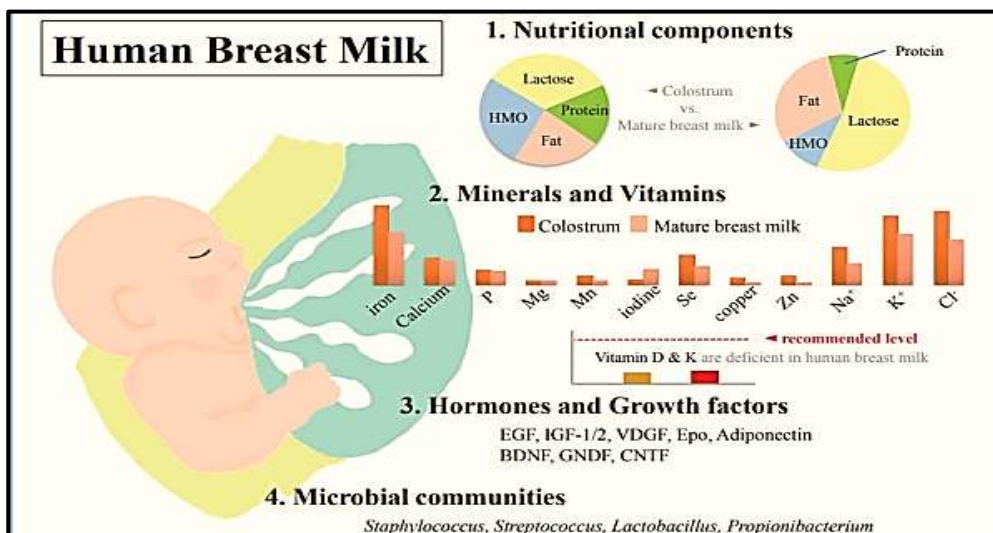
1.2.2. Γνωστική λειτουργία και νευροανάπτυξη

Έρευνες που έχουν διεξαχθεί δείχνουν μια θετική συσχέτιση ανάμεσα στον μητρικό θηλασμό και τη γνωστική ανάπτυξη των παιδιών, που περιλαμβάνει τη βελτίωση της μνήμης, των γλωσσικών δεξιοτήτων και της νοημοσύνης (Mortensen et al., 2002, Oddy et al., 2004, Daniels & Adair, 2005, Kramer et al., 2008). Μελέτες φανέρωσαν ότι η μεγαλύτερη συχνότητα των γευμάτων με θηλασμό και η μεγαλύτερη διάρκεια αποκλειστικού θηλασμού κατά τον πρώτο χρόνο συσχετίστηκε θετικά όσον αφορά τα αποτελέσματα μετρήσεων ανάπτυξης του βρέφους, συμπεριλαμβανομένης της μνήμης, της ομιλίας και των κινητικών δεξιοτήτων (Guxens et al., 2011, Leventakou et al., 2013).

Ένας πιθανός μηχανισμός που διέπει αυτές τις επιδράσεις μπορεί να σχετίζεται με συγκεκριμένα θρεπτικά συστατικά, όπως τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας (LCPUFAs), τα οποία υπάρχουν στο ανθρώπινο γάλα αλλά συνήθως απουσιάζουν από τα σκευάσματα (Drover et al., 2009). Τα LCPUFAs συμβάλλουν στη νευροανάπτυξη, ιδίως κατά τη μυελίνωση, η οποία λαμβάνει χώρα κυρίως μεταγεννητικά εντός των πρώτων 18 μηνών της ζωής (Guesnet & Alessandri, 2011, Deoni et al., 2013). Υπάρχουν στοιχεία που υποστηρίζουν τη σημασία των LCPUFAs ως συντελεστών της γνωστικής ανάπτυξης. Σε μία έρευνα μελετήθηκε πώς οι ατομικές διαφορές στην ικανότητα μεταβολισμού και παραγωγής LCPUFAs επηρεάζουν την επίδραση του θηλασμού στη γνωστική ανάπτυξη. Τα παιδιά που είχαν θηλάσει εμφάνισαν υψηλότερες βαθμολογίες νοημοσύνης (Caspi et al., 2007).

1.3. Σύσταση μητρικού πρωτογάλακτος

Το πρωτόγαλα είναι ένα εξαιρετικά σύνθετο υγρό, που αποτελεί την μοναδική τροφή που χρειάζονται τα υγιή νεογνά, στην πλειοψηφία τους, για περίπου έξι μήνες. Αυτό που το ξεχωρίζει από το ώριμο γάλα είναι ότι περιέχει αυξητικούς παράγοντες, αντιμικροβιακές ενώσεις και συστατικά που ρυθμίζουν το ανοσοποιητικό σύστημα, τα οποία είτε δεν υπάρχουν στο μεταβατικό και το ώριμο γάλα είτε υπάρχουν σε σημαντικά χαμηλότερη συγκέντρωση. Αξίζει να σημειωθεί ότι, τα βρέφη καταναλώνουν μόνο 2 έως 10 ml πρωτογάλακτος ανά γεύμα, τις πρώτες ημέρες της ζωής τους. Το πολύπλοκο αυτό μίγμα παρέχει 580 έως 700 kcal/L και περιέχει περισσότερη πρωτεΐνη και λιγότερους υδατάνθρακες και λίπος από το ώριμο γάλα. Το πρωτόγαλα αποτελείται κυρίως από μακροθρεπτικά συστατικά, όπως το λίπος, οι υδατάνθρακες και οι πρωτεΐνες, καθώς και από μικροθρεπτικά όπως μέταλλα, βιταμίνες και ανόργανα άλατα. Τα συστατικά αυτά, καθώς και η συνολική σύνθεση του πρωτογάλακτος αλλά και του ώριμου γάλακτος, παρατίθενται πιο αναλυτικά στον Πίνακα 1 και απεικονίζονται στη Εικόνα 1 που ακολουθεί. Εκτός από τα θρεπτικά (λιπίδια, υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, αμινοξέα, ανόργανα άλατα και βιταμίνες), περιέχει και μη θρεπτικά συστατικά (ένζυμα, ανοσοσφαιρίνες, νουκλεϊκά οξέα, ορμόνες, αυξητικούς παράγοντες και κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των μακροφάγων, των λεμφοκυττάρων και των επιθηλιακών κυττάρων), που συμβάλλουν αμφότερα στην ευημερία του βρέφους. Το κυριότερο συστατικό του ανθρώπινου γάλακτος είναι το νερό, στο οποίο όλα τα άλλα συστατικά είναι διαλυμένα ή αιωρούμενα. Κατά την διάρκεια των σταδίων του θηλασμού, η βιοχημεία του ανθρώπινου γάλακτος αλλάζει, σε συνάρτηση με της ανάγκες και τις απαιτήσεις του βρέφους (Lawrence, 1999).



Εικόνα 1: Γραφική απεικόνιση του ανθρώπινου μητρικού γάλακτος
Πηγή: Kim, S. Y., & Yi, D. Y. (2020). *Components of human breast milk. Clinical and Experimental Pediatrics.*

Πίνακας 1: Σύνθεση ανά 100ml πρωτογάλακτος και ώριμου γάλακτος

Πηγή: Prentice A. *Constituents of human milk. Food and Nutrition Bulletin* 17(4), The United Nations University Press. December 1996.

Περιεχόμενο	Πρωτόγαλα	Ώριμο Γάλα
Θερμίδες	55	67
Λίπος (γρ.)	2,9	4,2
Λακτόζη (γρ.)	5,3	7,0
Ολική πρωτεΐνη (γρ.)	2,0	1,1
Εκκριτική IgA	0,5	0,1
Λακτοφερρίνη	0,5	0,2
Καζεΐνη	0,5	0,4
Ασβέστιο (mg)	28	30
Νάτριο (mg)	48	15
Βιταμίνη A (μg, ισοδύναμα ρετινόλης)	151	75
Βιταμίνη B ₁ (μg)	2	14
Βιταμίνη B ₂ (μg)	30	40

1.3.1. Νερό

Το ανθρώπινο γάλα είναι ισότονο με το πλάσμα. Αυτός ο βιολογικός σχεδιασμός του γάλακτος σημαίνει ότι τα βρέφη δεν χρειάζονται νερό ή άλλα υγρά για να διατηρήσουν την ενυδάτωση της. Η περιεκτικότητα σε νερό στο πρωτόγαλα είναι μεταβλητή και εξαρτάται από παράγοντες όπως η ενυδάτωση της μητέρας, η διατροφή και το συγκεκριμένο στάδιο της γαλουχίας. Η ενυδάτωση είναι ζωτικής σημασίας για την ευημερία του νεογέννητου, καθώς το νερό βοηθά στην ρύθμιση της θερμοκρασίας του σώματος του νεογνού, ακόμη και όταν βρίσκεται σε θερμό περιβάλλον. Ως μείζον συστατικό το νερό επιτρέπει την εναιώρηση σακχάρων, πρωτεϊνών, ανοσοσφαιρίνης A, μετάλλων και υδατοδιαλυτών βιταμινών και ως συνέπεια υποστηρίζει την πέψη και την απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών από το πρωτόγαλα. Τέλος, συμβάλλει στη διατήρηση της υγιούς λειτουργίας των νεφρών, αφού υποστηρίζει την αποβολή μη χρήσιμων ουσιών, των παραπροϊόντων του μεταβολισμού και των τοξινών από το σώμα.

1.3.2. Μακροθρεπτικά συστατικά

Η σύνθεση των μακροθρεπτικών συστατικών του ανθρώπινου πρωτογάλακτος παρουσιάζει διακυμάνσεις μεταξύ των θηλαζουσών μητέρων, αλλά παραμένει σε μεγάλο βαθμό σταθερή σε διάφορους πληθυσμούς παρά της διατροφικές διαφορές των μητέρων. Το ώριμο, τελειόμηνο γάλα υπολογίζεται ότι περιέχει περίπου 1 g/dL πρωτεΐνης, 3,5 g/dL λίπους και 7 g/dL λακτόζης, ενώ οι αποδόσεις σε ενέργεια εκτιμώνται γύρω στις 70 kcal/dL και συνδέονται

στενά με την περιεκτικότητα σε λίπος. Από την άλλη πλευρά, το πρωτόγαλα διαφέρει στη σύνθεση, καθώς είναι υψηλότερο σε πρωτεΐνες, περιέχει περίπου 2,0 g/dL πρωτεΐνης, ενώ το λίπος και η λακτόζη εμφανίζονται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις περίπου 3,0 g/dL λίπους και 5 g/dL λακτόζης, αντίστοιχα. Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη σύνθεση του γάλακτος αφορούν το σωματικό βάρος της μητέρας, την διατροφική πρόσληψη πρωτεϊνών και λιπών, την επιστροφή της εμμήνου ρύσεως και τη συχνότητα θηλασμού.

1.3.2.1. Πρωτεΐνες

Υπάρχουν δύο κατηγορίες πρωτεϊνών στο μητρικό γάλα, που χωρίζονται σε σύμπλοκα ορού γάλακτος και καζεΐνης. Η καζεΐνη μετατρέπεται σε κροκιδώματα ή πηγμένο γάλα στο στομάχι, ενώ ο ορός γάλακτος παραμένει σε υδατική μορφή και είναι πιο εύπεπτος. Οι πρωτεΐνες του ανθρώπινου γάλακτος περιλαμβάνουν την καζεΐνη, την α-γαλακταλβουμίνη, τη λακτοφερίνη, την ανοσοσφαιρίνη A (IgA), τη λυσοζύμη και την αλβουμίνη του ορού. Η αναλογία πρωτεϊνών ορού γάλακτος της καζεΐνης είναι 80:20 στο πρωτόγαλα, ενώ στο ώριμο γάλα είναι 60:40 και 50:50 στο τέλος της γαλακτοπαραγωγής. Οι πρωτεΐνες του πρωτογάλακτος διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην παροχή βασικών θρεπτικών συστατικών, στην ενίσχυση της ανοσολογικής προστασίας και της σύνθεση αυξητικών παραγόντων στα νεογνήτα. Το πρόωρο γάλα τείνει να έχει υψηλότερα επίπεδα πρωτεϊνών και η συνολική περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες μειώνεται κατά τη διάρκεια των πρώτων 4 έως 6 εβδομάδων μετά τον τοκετό. Η δίαιτα της μητέρας δεν επηρεάζει σημαντικά τη συγκέντρωση πρωτεΐνης, αλλά αυξάνεται με την αύξηση του σωματικού βάρους της μητέρας (Ballard & Morrow, 2013).

Ταυτόχρονα, στο πρωτόγαλα συναντώνται και ορισμένοι αυξητικοί παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων του ινσουλινόμορφου αυξητικού παράγοντα 1 (IGF-1) και του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF), που προσφέρουν ενίσχυση ευρέος φάσματος στον οργανισμό και συνεισφέρουν στην επούλωση των φλεγμονών. Αυτοί οι αυξητικοί παράγοντες είναι απαραίτητοι για την ανάπτυξη και την ωρίμανση διαφόρων ιστών και οργάνων στο νεογνήτο (Elfstrand et al., 2002).

Σημαντικά θεωρούνται και τα ένζυμα του πρωτογάλακτος καθώς συμβάλλουν στην πέψη των πρωτεϊνών, των λιπών και των υδατανθράκων, βοηθώντας έτσι το νεογνήτο να επεξεργαστεί και να αφομοιώσει όλα τα θρεπτικά συστατικά που λαμβάνει. Χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιου ενζύμου είναι η λιπάση, η οποία ανιχνεύεται σε αυξημένες ποσότητες στο πρωτόγαλα σε σχέση με το ώριμο γάλα. Διαδραματίζει ποικίλο ρόλο και η συνεργιστική της επίδραση μαζί με ορισμένες πρωτεΐνες παρέχει αντιμικροβιακή δράση.

Τα μη-πρωτεϊνικά αζωτούχα παράγωγα (NPN) αντιπροσωπεύουν περίπου το 25-30% του συνολικού αζώτου του μητρικού πρωτογάλακτος και περιλαμβάνουν την ουρία, το ουρικό οξύ, την κρεατίνη, την κρεατινίνη, τα νουκλεοτίδια και άλλα ελεύθερα αμινοξέα, της η ταυρίνη, η αργινίνη και η γλουταμίνη. Τα νουκλεοτίδια και οι νουκλεοζίτες είναι συστατικά του μη πρωτεϊνικού αζώτου (NPN) του γάλακτος, τα οποία απαντώνται σε συγκεντρώσεις κάτω από ένα χιλιοστόγραμμα ανά λίτρο (Schlimme et al., 2000).

1.3.2.2. Υδατάνθρακες

Ο κύριος υδατάνθρακας που βρίσκεται στο ανθρώπινο πρωτόγαλα είναι η λακτόζη. Χρησιμεύει ως η κύρια πηγή ενέργειας για το νεογέννητο, παρέχοντας θερμίδες για την υποστήριξη της πρώιμης και μετέπειτα ανάπτυξης του. Εκτός από την παροχή ενέργειας, παίζει της ρόλο στη ρύθμιση της ωσμωτικής πίεσης κατά την παραγωγή γάλακτος, καθώς και στην αύξηση της απορρόφησης των ανόργανων συστατικών, ιδίως του ασβεστίου. Η λακτόζη έχει κρίσιμο ρόλο στην προώθηση της ανάπτυξης ωφέλιμων βακτηρίων στο έντερο του μωρού, υποστηρίζοντας τη δημιουργία της υγιούς εντερικού μικροβιώματος.

Παράλληλα, το μητρικό πρωτόγαλα περιέχει σημαντικά επίπεδα ολιγοσακχαριτών (HMOs). Οι ελεύθεροι ολιγοσακχαρίτες δομούνται από πέντε μονοσακχαρίτες: γλυκόζη, γαλακτόζη, Ν-ακετυλογλυκοζαμίνη, φουκόζη και σιαλικό οξύ, με μεγάλη δομική ποικιλομορφία. Η συγκέντρωση των ολικών ολιγοσακχαριτών στο πρωτόγαλα μπορεί να φτάσει τα 25 g/L, ενώ μειώνεται σε 5-20 g/L στο ώριμο γάλα (Morozon et al., 2018). Οι ολιγοσακχαρίτες αποτελούν σημαντικούς βιοδραστικούς παράγοντες, μέσω της άμεσης μεταβολής της γονιδιακής έκφρασης στα ανοσοποιητικά κύτταρα, ή μέσω της τροποποίησης του μικροβιόκοσμου στο γαστρεντερικό σύστημα ως πρεβιοτικά, επηρεάζοντας έτσι έμμεσα το ανοσοποιητικό σύστημα των βρεφών (Tottem et al., 2012, Ray et al., 2019). Ως εκ τούτου, μπορούν να φτάσουν στο παχύ έντερο για να χρησιμεύσουν ως υποστρώματα για τον βακτηριακό μεταβολισμό, που σημαίνει ότι δεν πέπτονται, αλλά αντίθετα χρησιμεύουν ως πηγή τροφής για τα ωφέλιμα βακτήρια στο έντερο του βρέφους (Gao et al., 2020).

1.3.2.3. Λιπίδια

Τα λιπίδια είναι το δεύτερο σε συγκέντρωση συστατικό του ανθρώπινου πρωτογάλακτος. Το λίπος είναι εξαιρετικά μεταβλητό, με το οπίσθιο γάλα (hindmilk) να περιέχει περισσότερο λίπος από το πρόσθιο γάλα (handmilk). Ο όρος "πρόσθιο γάλα" αφορά το αρχικό και μεσαίο γάλα που παράγεται κατά τη διάρκεια του θηλασμού, ενώ ο όρος "οπίσθιο γάλα" αφορά το γάλα που παράγεται προς το τέλος της περιόδου θηλασμού. Η σύνθεση των λιπιδίων του πρωτογάλακτος αλλάζει με την πάροδο του χρόνου καθώς αυτό μεταπίπτει σε ώριμο γάλα.

Αυτή η υψηλότερη συγκέντρωση λιπιδίων είναι ζωτικής σημασίας, καθώς παρέχεται στο νεογέννητο η απαιτούμενη ενέργεια και τα θρεπτικά συστατικά που είναι απαραίτητα, για την υποστήριξη της ταχείας ανάπτυξής του κατά την πρώιμη μεταγεννητική περίοδο. Ωστόσο, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η ακριβής λιπιδική σύνθεση του πρωτογάλακτος εξαρτάται από παράγοντες όπως είναι η διατροφή της μητέρας, το στάδιο της γαλουχίας και άλλα (Fidler & Koletzko, 2000).

Το κύριο κλάσμα λιπιδίων είναι τα τριγλυκερίδια, τα οποία αντιπροσωπεύουν περίπου το 95% των συνολικών λιπιδίων, ενώ τα φωσφολιπίδια και η χοληστερόλη αποτελούν πολύ μικρό ποσοστό. Τα φωσφολιπίδια στο γάλα κυμαίνονται περίπου στα 25 mg/dL και συνεισφέρουν κάτω από 1% των συνολικών λιπιδίων. Οι κύριες κατηγορίες φωσφολιπιδίων είναι η φωσφατιδυλοχολίνη, η φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, η φωσφατιδυλοσερίνη, η φωσφατιδυλολινοσιτόλη και η σφιγγομυελίνη. Είναι βασικά συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών και παίζουν βασικό ρόλο σε μια ποικιλία βιολογικών διεργασιών. Οι φωσφολιπιδικές μεμβράνες είναι πηγή αραχιδονικού οξέος, το οποίο απαιτείται για τον σχηματισμό μεσολαβητών λιπιδίων, της λευκοτριένια, προσταγλανδίνες και ενδοκανναβινοειδή. Οι σφιγγομυελίνες, που υπάρχουν στη μεμβράνη των σφαιριδίων του λίπους του γάλακτος, είναι ιδιαίτερα σημαντικές για το κεντρικού νευρικού σύστημα και για βελτίωση της νευρο-συμπεριφορικής ανάπτυξης των βρεφών με χαμηλό βάρος γέννησης. Τα φωσφολιπίδια διαθέτουν διπολικές ιδιότητες, δρώντας ως γαλακτωματοποιητές που συμβάλλουν στη διατήρηση του γαλακτώματος των λιποσφαιρίων (Demmelmair & Koletzko, 2018). Έχουν επίσης αναφερθεί ότι προστατεύουν από γαστρεντερικές λοιμώξεις και διάρροια κατά την πρώιμη παιδική ηλικία (Zavaleta et al., 2011, Veereman-Wauters et al., 2012).

Η χοληστερόλη, περιέχεται στο πρωτόγαλα περίπου στα 15 mg/dL. Μεταξύ των στερολών του γάλακτος, η χοληστερόλη είναι το κυρίαρχο συστατικό, συνεισφέροντας περίπου 90% στη συνολική περιεκτικότητα σε στερόλες, ενώ η δεσμοστερόλη αντιπροσωπεύει περίπου το 8,5% και η φυτοστερόλη είναι ελάχιστη. Τα επίπεδα χοληστερόλης στο γάλα παραμένουν ανεπηρέαστα από τη διατροφή και σχετίζονται με την περιεκτικότητα του γάλακτος σε λιπίδια. Τα βρέφη καταναλώνουν σχετικά υψηλότερες ποσότητες χοληστερόλης σε σύγκριση με της ενήλικες. Παρόλο που τα βρέφη που θηλάζουν παρουσιάζουν υψηλότερες τιμές χοληστερόλης στο πλάσμα σε σύγκριση με τα βρέφη που τρέφονται με φόρμουλα, δεν έχει παρατηρηθεί σημαντική διαφοροποίηση στα λιπίδια του πλάσματος μεταξύ των βρεφών που έχουν προηγουμένως θηλάσει και εκείνων που τρέφονται με φόρμουλα μετά τον απογαλακτισμό (Tamás Decsi et al., 1997).

1.3.3. Μικροθρεπτικά συστατικά

Ενώ το ανθρώπινο γάλα χρησιμεύει ως πρότυπο για τη διατροφή των βρεφών, η περιεκτικότητα σε μικροθρεπτικά συστατικά ίσως διαφέρει ανάλογα με τη διατροφή της μητέρας και της υπάρχουσες αποθήκες του οργανισμού. Οι βιταμίνες A, B1, B2, B6, B12, D και το ιώδιο, είναι μεταξύ αυτών που επηρεάζονται από αυτές της διακυμάνσεις. Για να διασφαλιστεί η επαρκής πρόσληψη, συνιστάται της θηλάζουσες μητέρες να συνεχίσουν να λαμβάνουν πολυβιταμίνες (Greer, 2001). Η βιταμίνη K είναι αξιοσημείωτα χαμηλή στο ανθρώπινο γάλα, γεγονός που οδηγεί στη επιπλέον χορήγηση βιταμίνης K για την πρόληψη της αιμορραγικής νόσου του νεογνού. Ομοίως, η βιταμίνη D βρίσκεται συχνά σε χαμηλές ποσότητες, ιδίως όταν η έκθεση της μητέρας στο ηλιακό φως είναι περιορισμένη, μια συνήθης κατάσταση παγκοσμίως. Ενώ η έρευνα εξετάζει τον αντίκτυπο της συμπλήρωσης της μητρικής βιταμίνης D στη σύνθεση του γάλακτος, οι τρέχουσες συστάσεις επικεντρώνονται στην παροχή μεταγεννητικής συμπλήρωσης βιταμίνης D στα βρέφη που θηλάζουν (Dawodu et al., 2012). Η βιταμίνη B₆ θεωρείται της, ως μία βιταμίνη με μεγάλη πιθανότητα ανεπάρκειας στο γάλα, καθώς τα επίπεδα της αντανακλούν ευθέως τα επίπεδα πρόσληψης της μητέρας (Allen, 2012).

Ο Πίνακας 2 παρουσιάζει συγκεντρωτικά όλα τα μακροθρεπτικά και μικροθρεπτικά συστατικά που περιέχονται στο πρωτόγαλα.

Πίνακας 2: Μακροθρεπτικά και μικροθρεπτικά συστατικά πρωτογάλακτος

Πηγή: Πηγή: Kim, S. Y., & Yi, D. Y. (2020). *Components of human breast milk: from macronutrient to microbiome and microRNA*. *Clinical and Experimental Pediatrics*, 63(8), 301–309.

Μακροθρεπτικά			
Υδατάνθρακες	Πρωτεΐνες	Μη πρωτεϊνικό άζωτο	Λίπος
Λακτόζη, ολιγοσακχαρίτες	Καζεΐνη, ορός γάλακτος, βλεννίνες, α-λεκταλβουμίνη, λακτοφερρίνη, εκκριτική IgA, λυσοζύμη	Ουρία, κρεατινίνη, νουκλεοτίδια, ελεύθερα αμινοξέα, πεπτίδια	Τριακυλογλυκερίδια διακυλογλυκερίδια, μονοακυλογλυκερίδια, ελεύθερα λιπαρά οξέα, φωσφολιπίδια, χοληστερόλη
Μικροθρεπτικά			
Βιταμίνες		Μέταλλα	
Παντοθενικό οξύ, ριβοφλαβίνη, θειαμίνη, ασκορβικό οξύ, φυλλικό οξύ, βιταμίνη B6, 12, K, D και E, βιοτίνη, νιασίνη, ρετινόλη, καροτενοειδή		Ασβέστιο, μαγνήσιο, φώσφορος, Ηλεκτρολύτες (νάτριο, κάλιο, χλωρίδιο), Ίχνη μετάλλων (σίδηρος, ψευδάργυρος, χαλκός, μαγγάνιο, σελήνιο, ιώδιο, φθόριο)	

1.4. Παράγοντες που επηρεάζουν τη σύσταση του μητρικού πρωτογάλακτος

Διάφοροι παράγοντες επηρεάζουν την σύνθεση του ανθρώπινου πρωτογάλακτος. Η σύνθεση του ανθρώπινου γάλακτος υφίσταται σημαντικές μεταβολές ανάλογα με το στάδιο της γαλουχίας, ακόμη και κατά τη διάρκεια μεμονωμένων θηλασμών. Παρατηρούνται σημαντικές διακυμάνσεις μεταξύ των δειγμάτων γάλακτος που συλλέγονται πριν, κατά τη διάρκεια και μετά από ένα κύκλο σίτισης (Ballard & Morrow, 2013). Κατά τη διάρκεια ενός τυπικού θηλασμού, το μητρικό γάλα, μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε δύο κύρια τμήματα: το "πρόσθιο" και το "οπίσθιο γάλα". Αυτοί οι δύο τύποι γάλακτος παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στη σύνθεση. Συγκεκριμένα, το "πρόσθιο γάλα" χαρακτηρίζεται από υψηλότερο ποσοστό περιεκτικότητας σε λακτόζη, ενώ το "οπίσθιο γάλα" περιέχει σταθερά αυξημένα επίπεδα λίπους. Σημαντική παρατήρηση αποτελεί επίσης ότι η περιεκτικότητα σε λίπος τείνει να είναι αισθητά χαμηλότερη σε ταΐσματα που λαμβάνουν χώρα κατά τη νύχτα και πολύ νωρίς το πρωί σε σύγκριση με εκείνα που λαμβάνουν χώρα το απόγευμα ή το βράδυ (Eriksen et al., 2018, Takumi et al., 2022).

1.4.1. Διατροφικές συνήθειες

Η σύνθεση της σύστασης του ανθρώπινου πρωτογάλακτος επηρεάζεται σημαντικά από τις διατροφικές συνήθειες της μητέρας. Σύμφωνα με μελέτες που αναφέρονται στη σύνθεση των λιπαρών οξέων του μητρικού πρωτογάλακτος που έγιναν με βάση γεωγραφικά κριτήρια, οι διαφορές στο προφίλ των απαραίτητων λιπαρών οξέων φαίνεται να αντανakλούν στη διατροφή της εκάστοτε θηλάζουσας (Fidler & Koletzko, 2000). Πιο συγκεκριμένα, η διατροφή έχει βρεθεί ότι επηρεάζει περισσότερο τα λιπαρά οξέα, τόσο το είδος όσο και τις ποσοτικές αναλογίες τους, τα οποία με τη σειρά τους συμμετέχουν στον σχηματισμό τριγλυκεριδίων (Jensen et al., 1999). Όταν η διατροφή είναι πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, τότε και το γάλα θα έχει μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Όταν η μητέρα χάνει βάρος, τότε η σύνθεση των λιπαρών οξέων των αποθηκών λίπους αντανakλάται στη σύσταση του γάλακτος. Όταν η μητέρα υιοθετεί διατροφή πολύ χαμηλή σε λιπαρά, αλλά με επαρκή επίπεδα θερμίδων από πρωτεΐνη και υδατάνθρακες, τότε παράγονται στο μαστό περισσότερα λιπαρά οξέα μέσης αλυσού.

Πολλές μελέτες παρατήρησης (observational studies), διερεύνησαν τις συσχετίσεις αυτές, μεταξύ της διατροφικής πρόσληψης της μητέρας και της παρουσίας διαφόρων λιπαρών οξέων στο μητρικό γάλα. Διαπιστώθηκε, σχεδόν καθολικά, θετική συσχέτιση μεταξύ των ολικών PUFAs του μητρικού γάλακτος και της μητρικής πρόσληψης ολικών PUFAs.

Η περιεκτικότητα του μητρικού γάλακτος σε ω -6 PUFAs συσχετίστηκε θετικά με τα MUFAs της μητρικής διατροφής. Οι μητέρες που κατανάλωναν ψάρια, είχαν υψηλότερη περιεκτικότητα εικοσαπεντανοϊκού οξέος (EPA) και εικοσιδιεξανοϊκού οξέος (DHA) στο μητρικό γάλα και υψηλότερη περιεκτικότητα σε ω -3 PUFAs (Lauritzen et al., 2002, Novak & Inpiss, 2011, Lee et al., 2013). Έχει βρεθεί επίσης θετική συσχέτιση μεταξύ του EPA στο μητρικό γάλα και της συνολικής πρόσληψης PUFAs από τη μητέρα (Olafsdottir et al., 2006, Olang et al., 2012, Antonakou et al., 2012).

Η διατροφή λοιπόν, επηρεάζει σαφώς το λιπιδικό προφίλ του ανθρώπινου γάλακτος, διαμορφώνοντας τη συγκέντρωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων μακράς αλυσίδας και την αναλογία ω -3 προς ω -6 (Peng et al., 2009, Nishimura et al., 2014). Αυτά τα λιπαρά οξέα έχουν ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες στα θηλάζοντα παιδιά (Horpu et al., 2012), ενώ πρόσφατα αποδείχθηκε ότι είναι σε θέση να διαμορφώνουν τη σύνθεση του εντερικού μικροβιόκοσμου στην πρώιμη ηλικία (Pusceddu et al., 2015).

1.4.2. Ηλικία της μητέρας

Λίγα είναι γνωστά για την επίδραση της ηλικίας της μητέρας στη σύνθεση του ανθρώπινου γάλακτος. Τα ερευνητικά αποτελέσματα που είναι διαθέσιμα μέχρι στιγμής, φαίνεται να μην συμφωνούν απολύτως μεταξύ τους. Μια μελέτη, που διεξήχθη σε μια ομάδα 72 θηλαζουσών μητέρων, είχε σκοπό να συγκριθεί η περιεκτικότητα σε λίπος του ανθρώπινου γάλακτος από γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας (> 35 ετών) σε σχέση με αυτό από νεότερες (< 35 ετών) γυναίκες. Κατά τη διάρκεια των 2 πρώτων εβδομάδων του θηλασμού, αποδείχθηκε ότι, τα επίπεδα περιεκτικότητας σε λίπος και θερμίδες, των δειγμάτων πρωτογάλακτος που ελήφθησαν, ήταν σημαντικά υψηλότερα στην ομάδα των μεγαλύτερων σε ηλικία γυναικών. Ωστόσο, μεταβλητή όπως ο δείκτης μάζας σώματος της μητέρας, ο οποίος από μόνος του συσχετίζεται με την ηλικία της μητέρας, δεν επηρέασε σημαντικά τη σύνθεση του λίπους του πρωτογάλακτος (Hausman Kedem et al., 2013).

Σε μια άλλη μελέτη εξετάστηκε η περιεκτικότητα σε μακροθρεπτικά συστατικά στο ανθρώπινο γάλα, κατά τη διάρκεια των δύο πρώτων εβδομάδων της γαλουχίας, και αποδείχθηκε ότι, η περιεκτικότητα σε λίπος στο πρωτόγαλα και σε υδατάνθρακες στο ώριμο γάλα, είναι υψηλότερη σε δείγματα γάλακτος που λαμβάνονται από μητέρες μεγαλύτερης ηλικίας (>35 ετών), σε σύγκριση με νεότερες μητέρες (<35 ετών). Τα αποτελέσματα σχετικά με την περιεκτικότητα του πρωτογάλακτος σε λίπος, στην παραπάνω μελέτη, συνάδουν με μια άλλη προηγούμενη έκθεση στην οποία αποδείχθηκε ότι οι τιμές του κρεματοκρίτη, οι οποίες συσχετίζονται σε μεγάλο βαθμό με τις βιοχημικές μετρήσεις των ολικών λιπιδίων,

είναι υψηλότερες στο πρωτόγαλα από μητέρες μεγαλύτερης ηλικίας σε σύγκριση με τις νεότερες (García-Lara et al., 2012, Lubetzky et al., 2015).

Αντίθετα, μια άλλη μελέτη, παρουσίαζε μεν σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της σύνθεσης του μητρικού γάλακτος και της ηλικίας κύησης, αλλά διαφωνούσε με τα παραπάνω ευρήματα. Τα δείγματα πρωτογάλακτος και μεταβατικού γάλακτος φαίνεται να ήταν σε συμφωνία, υποδεικνύοντας ότι οι θηλάζουσες ηλικίας 37 ετών και άνω, παρουσίαζαν αξιολογώτερες διαφοροποιήσεις στα κύρια βιοδραστικά λιπαρά οξέα, σε σύγκριση με τις νεότερες γυναίκες. Παρόλο που το διατροφικό προφίλ των γυναικών δεν έδειξε διαφορές στη συνολική κατανάλωση λίπους ή PUFA, οι διαφορές στη σύνθεση του γάλακτος πιθανότατα οφείλονταν σε μεταβολικές και φυσιολογικές διαδικασίες και όχι σε διατροφικές προτιμήσεις. Για παράδειγμα, η συγκέντρωση του C22:2 ω-6, ενός μεταβολίτη που προέρχεται από το απαραίτητο PUFA λινολεϊκό οξύ (C18:2 ω-6), ήταν περίπου 10 φορές υψηλότερη στο γάλα της νεότερης ομάδας. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι παρόμοιες προσλήψεις PUFA υποδηλώνουν ότι οι διαφορές στις συγκεντρώσεις των μακράς αλυσίδας ωμέγα-6 PUFA οφείλονται κυρίως σε διαφορές στις διαδικασίες επιμήκυνσης και αποκορεσμού μεταξύ των ομάδων (Argov-Argaman et al., 2016).

1.4.3. Εβδομάδα κύησης

Τα τελευταία χρόνια οι έρευνες έχουν διαπιστώσει ότι το ανθρώπινο γάλα που παράγεται από μητέρες που γεννούν πρόωρα διαφέρει σε αρκετά από τα θρεπτικά συστατικά του σε σύγκριση με το γάλα από μητέρες που γεννούν τελειόμηνα. Οι πρώτες παρατηρήσεις που αναφέρονται σε συγκριτική ανάλυση του πρόωρου και του τελειόμηνου γάλακτος περιέγραψαν υψηλότερη συγκέντρωση πρωτεϊνών στο πρόωρο γάλα κατά τη διάρκεια της γαλουχίας. Συγκρίνοντας άλλα προφίλ θρεπτικών συστατικών από το πρόωρο γάλα με εκείνα του τελειόμηνου γάλακτος, όπως υδατάνθρακες, ανοσοσφαιρίνες, λίπος και ενεργειακή πυκνότητα, υπάρχει μια έντονη τάση ότι τα μακροθρεπτικά συστατικά αυξάνονται στο πρόωρο γάλα κατά τη διάρκεια της γαλουχίας με αποτέλεσμα να είναι κατάλληλα για τα ταχύτατα αναπτυσσόμενα πρόωρα βρέφη (Bauer & Gerss, 2011, Zhang et al., 2013, Bauer, 2013, Bobiński et al., 2014, Groer et al., 2016).

Μια πρόσφατη μελέτη αξιολόγησε τη σύνθεση, το πρωτεϊνικό προφίλ του γάλακτος από μητέρες που γέννησαν βρέφη σε διαφορετικές ηλικίες κύησης. Οι διαφορές στη σύνθεση ήταν μεγαλύτερες όσον αφορά την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, η οποία παρουσίασε τόσο ποιοτικές όσο και ποσοτικές διαφορές, καθώς και διαφορά στην πρωτεολυτική δραστηριότητα. Παρουσιάστηκαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα πρωτεϊνών σε δείγματα

πρόωρου γάλακτος στις 0-7 ημέρες. Οι πρωτεΐνες αυτές, αφορούν πρωτίστως την ανοσολογική ενίσχυση του οργανισμού, γεγονός που εξηγεί την φυσική προσαρμογή του γάλακτος στις ανάγκες των πρόωρων βρεφών (Caldeo et al., 2021). Σε συμφωνία με την παραπάνω έρευνα ήταν και το αποτέλεσμα άλλων επιστημόνων που βρήκαν αυξημένη δραστηριότητα της πλασμίνης σε δείγματα πρόωρου γάλακτος. Η πρωτεόλυση στο γάλα από μητέρες πρόωρων βρεφών θα μπορούσε να αντανakλά, είτε έναν σκόπιμο βιολογικό μηχανισμό για την παραγωγή ενός γάλακτος που είναι πιο εύπεπτο για τα βρέφη με λιγότερο ανεπτυγμένο πεπτικό σύστημα, είτε να αποτελεί έμμεση συνέπεια του γεγονότος ότι οι μητέρες τέτοιων βρεφών παράγουν γάλα σε μια περίοδο κατά την οποία ο μαστικός αδένας μπορεί να μην είναι προετοιμασμένος για μια τέτοια έκκριση, ενώ η μητέρα βρίσκεται συχνά σε κατάσταση στρες (Armaforte et al., 2010).

Έχουν υπάρξει περισσότερες αναφορές σχετικά με τις διαφορές στις εν λόγω πρωτεΐνες μεταξύ μητέρων τελειόμηνων και πρόωρων βρεφών. Σχετική έρευνα ανέφερε ότι τα επίπεδα της λακτοφερίνης ήταν υψηλότερα στο γάλα των μητέρων των πρόωρων βρεφών σε σχέση με εκείνο των τελειόμηνων μητέρων (Albenzio et al., 2016), ενώ από άλλη έρευνα διαπιστώθηκε ότι η μεγαλύτερη διαφορά στο πρωτεϊνικό προφίλ ήταν στο επίπεδο της α-γαλακταλβουμίνης, η οποία ήταν κι αυτή σημαντικά υψηλότερη στο γάλα των πρόωρων βρεφών (Garcia-Rodenas et al., 2019).

Άλλο ένα σημαντικό προς διερεύνηση συστατικό του πρωτογάλακτος είναι τα φωσφολιπίδια, συμπεριλαμβανομένων των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων μακράς αλυσίδας (LCPUFAs) και της χολίνης, που είναι ζωτικής σημασίας για τη νευρική και οπτική ανάπτυξη. Έρευνες που έχουν γίνει υποδηλώνουν ότι το γάλα των μητέρων που γέννησαν πρόωρα (<37 εβδομάδες) μπορεί να μην καλύπτει πλήρως τις διατροφικές απαιτήσεις για τη βέλτιστη ανάπτυξη του βρέφους. Εξήχθη λοιπόν το αποτέλεσμα ότι ενώ η εβδομάδα κύησης επηρεάζει την περιεκτικότητα του πρωτογάλακτος σε φωσφολιπίδια, ωστόσο, η επίδραση αυτή μπορεί να μειώνεται καθώς το γάλα μεταβαίνει σε ώριμη κατάσταση (Ingvordsen Lindahl et al., 2019, Pérez-Gálvez et al., 2020).

Σε άλλη έρευνα διερευνήθηκαν οι μεταβολές στην περιεκτικότητα του γάλακτος σε λίπος και στις αναλογίες λιπαρών οξέων κατά την εβδομάδα κύησης, εστιάζοντας σε δείγματα πρωτογάλακτος, μεταβατικού και ώριμου γάλακτος από μητέρες που γέννησαν μεταξύ 25 και 42 εβδομάδων ηλικίας κύησης. Η ανάλυση έδειξε ότι το πρόωρο πρωτόγαλα παρουσίασε υψηλότερες αναλογίες κορεσμένων λιπαρών οξέων μέσης αλυσίδας (MCSFAs) σε σύγκριση με το τελειόμηνο πρωτόγαλα. Αυτό θα μπορούσε να παρέχει στα βρέφη εύκολα απορροφήσιμη ενέργεια, αντιμικροβιακή δράση, απορρόφηση ασβεστίου και να

βελτιστοποιήσει τη χρήση των LCPUFAs για το σχηματισμό μεμβρανών (Moltó-Puigmartí et al., 2011). Επιπλέον, από μελέτες σχετικά με τα LCPUFAs, συμπεριλαμβανομένου του αραχιδονικού οξέος (AA) και του δοκοσαεξανοϊκού οξέος (DHA), οι τιμές τείνουν να είναι οι υψηλότερες για το πρόωρο γάλα στο πρωτόγαλα (Kuipers et al., 2012). Βρέθηκε επιπλέον όχι μόνο ότι οι ποσότητες δοκοσαεξανοϊκού οξέος (DHA) και δοκοσαπεντανοϊκού οξέος (DPA) στο πρόωρο γάλα ήταν σημαντικά υψηλότερες αλλά και ότι παρέμειναν υψηλές για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα συγκριτικά με το πρωτόγαλα των τελειόμηνων βρεφών (Floris et al., 2020).

1.4.4. Δείκτης Μάζας Σώματος (BMI)

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας έχει ταξινομήσει τον Δείκτη Μάζας Σώματος (ΔΜΣ) σε φυσιολογικό βάρος (ΔΜΣ: 18,5-24,9), υπέρβαρο (ΔΜΣ: 25-29,9), παχύσαρκο (ΔΜΣ: $\geq 30,0$) (Parveen et al., 2018). Η παχυσαρκία είναι ένα πρόβλημα δημόσιας υγείας, που δείχνει να επιδεινώνεται και απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή. Λόγω της σημασίας του παγκόσμιου επιπολασμού της παχυσαρκίας, πολλές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στο θέμα αυτό και καταδεικνύουν ότι η μητρική παχυσαρκία έχει αρνητική επίδραση στη διάρκεια του θηλασμού, καθώς και επιβραδύνει το ρυθμό της γαλακτογένεσης (Ballesta-Castillejos et al., 2020).

Μία μελέτη εξέτασε την επίδραση της παχυσαρκίας της μητέρας στον θηλασμό και έδειξε ότι παχύσαρκες και εξαιρετικά παχύσαρκες γυναίκες εμφάνιζαν περισσότερες πιθανότητες να μην μπορούν να θηλάσουν ή να έχουν μειωμένη διάρκεια θηλασμού, σε σύγκριση με γυναίκες φυσιολογικού βάρους (Wojcicki, 2011). Το πόρισμα αυτό επιβεβαιώνεται και από άλλες αντίστοιχες μελέτες, που φανερώνουν ότι αυξημένος ΔΜΣ και ποσοστό λίπους, κατά τα αρχικά στάδια της εγκυμοσύνης, σχετίζονται με χαμηλότερη ικανότητα αποκλειστικού θηλασμού μετά τον τοκετό, αλλά και με πρόωρη διακοπή του θηλασμού, συνήθως πριν από τους έξι μήνες (Baker et al., 2007, Marshall et al., 2018). Έχει παρατηρηθεί ότι οι υπέρβαρες και παχύσαρκες γυναίκες παρουσιάζουν μείωση της απόκρισης της προλακτίνης στον θηλασμό (Bever Babendure et al., 2015). Η αντίσταση στην ινσουλίνη, η οποία είναι γνωστό ότι αυξάνεται με την παχυσαρκία, μπορεί να καθυστερήσει το χρόνο που απαιτείται για να φτάσει η συγκέντρωση που είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της έκκρισης και την παραγωγή γάλακτος (Nommsen-Rivers, 2016, Badillo-Suárez et al., 2017).

Η αυξημένη μάζα σωματικού λίπους της μητέρας, καθώς και ο Δείκτης Μάζας Σώματος (εκφρασμένος σε kg/m^2), έχουν συσχετισθεί με αυξημένες συγκεντρώσεις πρωτεϊνών και λίπους στο ανθρώπινο γάλα, σύμφωνα με ορισμένες έρευνες (Kuganathan et al., 2017, Hahn et al., 2017, Bzikowska-Jura et al., 2018). Ωστόσο, σε άλλες μελέτες έχουν αναφερθεί αντιφατικά ευρήματα (Bachour et al., 2012, A. De Luca et al., 2016).

Το σωματικό βάρος της μητέρας αποτελεί σημαντικό παράγοντα της παρατηρούμενης διακύμανσης στη σύνθεση του μητρικού γάλακτος (Ballard & Morrow, 2013). Ο ΔΜΣ της μητέρας έχει συνδεθεί σταθερά με την αύξηση των παραγόντων που ευνοούν την λιπογένεση, συμπεριλαμβανομένων των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων μακράς αλυσίδας ω -6 (LCPUFAs). Πρόσφατη έρευνα, διερεύνησε τη σχέση μεταξύ το βάρος της μητέρας και της σύνθεσης του μητρικού γάλακτος, συμπεριλαμβανομένων διαφόρων συστατικών, όπως τα μακροθρεπτικά συστατικά, τα λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας, η αναλογία των ω -6 προς ω -3 LCPUFAs και τα επίπεδα ινσουλίνης. Η μελέτη περιλάμβανε μια ομάδα 32 δυάδων μητέρας-βρέφους, από τις οποίες ελήφθησαν δείγματα γάλακτος κατά τις πρώτες εβδομάδες του θηλασμού. Τα ευρήματα έδειξαν ότι δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στο λόγο ω 6/ ω 3 LCPUFAs. Ωστόσο, όταν εξετάστηκαν μεμονωμένα LCFAs, παρατηρήθηκε ότι, ορισμένα παρουσίαζαν υψηλότερες συγκεντρώσεις στο μητρικό γάλα των παχύσαρκων μητέρων. Σε αυτά περιλαμβάνονταν το παλμιτικό οξύ (C16:0), το διομο- γ -λινολενικό οξύ (C20:3) και το αδρενικό οξύ (C22:4). Αντίθετα, το ελαϊκό οξύ και το συζευγμένο λινολεϊκό οξύ βρέθηκαν υψηλότερα σε μητέρες με φυσιολογικό βάρος. Συμπερασματικά, η σύνθεση των μακροθρεπτικών συστατικών παρέμεινε αρκετά σταθερή μεταξύ των δύο ομάδων μητέρων, με εξαίρεση τα υψηλότερα επίπεδα ινσουλίνης στο γάλα των μητέρων που χαρακτηρίστηκαν ως υπέρβαρες (Ellsworth et al., 2020).

Η σύσταση του σώματος της μητέρας επηρεάζει, επιπλέον, τα μη θρεπτικά βιοδραστικά συστατικά που βρίσκονται στο ανθρώπινο γάλα, τα οποία πιστεύεται ευρέως ότι έχουν επιπτώσεις στην ανάπτυξη του βρέφους (Young et al., 2017, Fields et al., 2017). Τα συστατικά αυτά περιλαμβάνουν τη λεπτίνη και τις κυτταροκίνες. Οι αυξημένες συγκεντρώσεις λεπτίνης που ανιχνεύονται στο μητρικό γάλα από υπέρβαρες ή παχύσαρκες μητέρες, μπορεί να σχετίζονται με την ταχύτερη αύξηση του βάρους των βρεφών τους. Καθώς η λεπτίνη αναγνωρίζεται ως ορμόνη που ρυθμίζει την όρεξη και την ενεργειακή ισορροπία, η παρουσία της στο μητρικό γάλα συνεπάγεται πιθανώς την επακόλουθη ευαισθησία του βρέφους στην παχυσαρκία και τις μεταβολικές διαταραχές. Ερευνητικά στοιχεία έχουν επισημάνει θετική συσχέτιση μεταξύ της παχυσαρκίας της μητέρας και της συγκέντρωσης της λεπτίνης στο ανθρώπινο γάλα (A. De Luca et al., 2016, Kuganathan et al., 2017).

1.5. Σύγκριση μητρικού πρωτογάλακτος με βρεφικές φόρμουλες

Ο θηλασμός αποτελεί τη βέλτιστη διατροφή για τα νεογνά. Ορισμένες μητέρες όμως, δεν μπορούν να θηλάσουν για φυσικούς ή εργασιακούς λόγους. Επιπλέον, υπάρχουν ορισμένες δυσμενείς καταστάσεις που εμποδίζουν τον θηλασμό, όπως τα βρέφη με κλασική γαλακτοζαιμία, μία διαταραχή που οφείλεται στην ανεπάρκεια του μεταβολισμού της γαλακτόζης (Bridge, 2021). Όταν λοιπόν ο μητρικός θηλασμός δεν είναι εφικτός, τα βρεφικά υποκατάστατα μπορούν να χρησιμεύσουν ως κατάλληλη διατροφική εναλλακτική λύση. Αν και είναι αδύνατο να παραχθεί ένα προϊόν πανομοιότυπο με το μητρικό γάλα, έχουν καταβληθεί σημαντικές προσπάθειες για τη μίμηση του διατροφικού προφίλ και της σύνθεσης του ανθρώπινου μητρικού γάλακτος, ώστε να καλύπτονται οι αναπτυξιακές απαιτήσεις των βρεφών (Barreiro et al., 2018).

Τα βρεφικά παρασκευάσματα που κυκλοφορούν στην αγορά σήμερα, κατατάσσονται με βάση το στάδιο της βρεφικής ηλικίας. Υποκατάστατο που να μιμείται αμιγώς τη σύσταση του μητρικού πρωτογάλακτος δεν υπάρχει στο εμπόριο, οπότε αυτό που ενδείκνυται για την πρώτη εβδομάδα σίτισης είναι η βρεφική φόρμουλα πρώτου σταδίου, που απευθύνεται σε νεογνά από την γέννηση έως και τον 6^ο μήνα ζωής. Οι βρεφικές φόρμουλες έως και σήμερα μπορούν να χωριστούν σε τυπικές φόρμουλες, με βάση το γάλα βοοειδών, και σε ειδικές φόρμουλες. Με τον όρο ειδικές, νοείται μία ομάδα που περιλαμβάνει φόρμουλες για πρόωρα βρέφη, οι οποίες διαφέρουν ως προς τη σύνθεση υδατανθράκων, πρωτεϊνών και λιπών, όπως φόρμουλες χωρίς λακτόζη, με υδρολυμένες πρωτεΐνες, φόρμουλες με βάση τη σόγια ή με βάση τα αμινοξέα. Οι τυποποιημένες φόρμουλες μπορούν να καλύψουν τις βασικές διατροφικές απαιτήσεις των περισσότερων βρεφών, ενώ οι ειδικές φόρμουλες είναι πιο κατάλληλες για βρέφη με ειδικές διατροφικές απαιτήσεις. Για παράδειγμα, οι υποαλλεργικές βρεφικές φόρμουλες χρησιμοποιούνται συνήθως για νεογνά με αλλεργία στο γάλα βοοειδών, τα παρασκευάσματα χωρίς λακτόζη χρησιμοποιούνται για βρέφη με δυσανεξία στη λακτόζη και τα παρασκευάσματα με δομημένα λιπίδια χρησιμοποιούνται για τη βελτίωση της γαστρικής κένωσης και της ικανότητας απορρόφησης. Επιπλέον, οι φόρμουλες με βάση τα αμινοξέα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη θεραπεία βρεφών με χαμηλό βάρος γέννησης, πρόωρων και βαρέως πασχόντων βρεφών (Flom & Sicherer, 2019, Masum et al., 2020).

1.5.1. Σύνθεση βρεφικής φόρμουλας

Η σύνθεση των βρεφικών τροφών ρυθμίζεται αυστηρά από διάφορες κατευθυντήριες γραμμές που έχουν θεσπιστεί από φορείς όπως ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) στις ΗΠΑ, η ΕΕ στην Ευρώπη και διεθνώς και η Επιτροπή Codex Alimentarius. (FAO/WHO (1981), Commission Directive (2006/141/EC)). Παρακάτω φαίνονται σε αντιδιαστολή οι διαφορές στη σύσταση πρωτογάλακτος και υποκατάστατου/εμπορικής φόρμουλας (Πίνακας 3).

Πίνακας 3: Σύνθεση ανθρώπινου γάλακτος και υποκατάστατου

Πηγή: Από USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 22, 2009.

Θρεπτικό Συστατικό	Μονάδες	Πρωτόγαλα (30ml)	Υποκατάστατο Ανθρώπινου γάλακτος (Nestle Good Start, 30ml)
Νερό	γρ.	26.95	26.69
Ενέργεια	Kcal	22	20
Πρωτεΐνη	γρ.	0.32	0.44
Ολικά λιπίδια	γρ.	1.35	1.03
Υδατάνθρακες	γρ.	2.12	2.25
Ολικά σάκχαρα	γρ.	0.0	0
Ολικές φυτικές ίνες	γρ.	2.12	1.52
<i>Λιπίδια</i>			
Κορεσμένα λιπαρά οξέα, ολικά	γρ.	0.619	0.448
Βουτυρικό οξύ (C4:0)	γρ.	0.000	0.00
Καπροϊκό οξύ (C6:0)	γρ.	0.000	0.00
Καπρυλικό οξύ (C8:0)	γρ.	0.000	0.015
Καπρικό οξύ (C10:0)	γρ.	0.019	0.012
Λαυρικό οξύ (C12:0)	γρ.	0.079	0.104
Μυριστικό οξύ (C14:0)	γρ.	0.099	0.043
Παλμιτικό οξύ (C16:0)	γρ.	0.283	0.238
Στεαρικό οξύ (C18:0)	γρ.	0.090	0.037
Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, ολικά	γρ.	0.511	0.329
Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, ολικά	γρ.	0.153	0.226
Χοληστερόλη	mg	4	1

Τα λιπίδια του γάλακτος είναι υπεύθυνα για το μεγαλύτερο μέρος των θερμίδων (50-60 %) που είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη των νεογέννητων, επομένως η σύνθεση και η πέψη των λιπιδίων είναι ουσιώδεις για τη διατροφή τους (Lindquist & Hernell, 2010). Για να εξασφαλιστεί η βέλτιστη πέψη και να ελαχιστοποιηθούν οι αρνητικές επιπτώσεις στο πεπτικό σύστημα του βρέφους, το γάλα βοοειδών που χρησιμοποιείται για βρεφικές φόρμουλες υφίσταται επεξεργασία, τα λιπίδια του οποίου αντικαθίστανται με μείγματα φυτικών ελαίων, προκειμένου να τροποποιηθεί το προφίλ των λιπαρών οξέων και να μιμηθεί στενά τη σύνθεση του μητρικού γάλακτος (Hageman et al., 2019).

Όσον αφορά το λιπιδικό κλάσμα, ο κανονισμός της ΕΕ συνιστά περιεκτικότητα σε λιπαρά μεταξύ 4,4 και 6,0 g/kcal. Καθορίζονται επίσης ελάχιστες απαιτήσεις για τα απαραίτητα λιπαρά οξέα, το λινολεϊκό οξύ (LA) (C18:2 ω-6) και το α-λινολενικό οξύ (ALA) (C18:3 ω-3), τα οποία το βρέφος δεν είναι σε θέση να συνθέσει και, επομένως, πρέπει να παρέχονται από τη διατροφή.

Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν ότι η παρουσία των LCPUFAs, όπως το αραχιδονικό οξύ (AA) και το δοκοσαεξαενοϊκό οξύ (DHA), τα οποία στερούνται τα μείγματα των φυτικών ελαίων, προσφέρουν βελτιωμένη γνωστική λειτουργία σε βρέφη που θηλάζουν σε σχέση με βρέφη που τρέφονται με φόρμουλα. Επί του παρόντος, ορισμένα σκευάσματα περιέχουν συμπληρωματικά πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας πληρώντας ωστόσο συγκεκριμένους ανώτερους περιορισμούς καθώς η νομοθεσία ορίζει ότι θα πρέπει να περιέχουν 20-50 mg/100 kcal DHA (Regulation (EU) No 609/2013).

Βασικά θρεπτικά συστατικά, όπως πρωτεΐνες, λιπίδια, βιταμίνες A, C, D, E, K, θειαμίνη, ριβοφλαβίνη, B6, B12, νιασίνη, φυλλικό οξύ, παντοθενικό οξύ, και μέταλλα (ασβέστιο, μαγνήσιο, σίδηρος, ψευδάργυρος, μαγγάνιο, χαλκός, φώσφορος, ιώδιο, νάτριο, χλώριο, κάλιο, σελήνιο) προστίθενται συχνά στα παρασκευάσματα για βρέφη για να παρέχουν μία ολοκληρωμένη διατροφή στα βρέφη (Skolnick et al., 2020).

Κεφάλαιο 2. Ανάλυση λιπαρών οξέων μητρικού πρωτογάλακτος

2.1. Σύνθεση λιπιδικού προφίλ πρωτογάλακτος

Το λίπος συντελεί περί το 1,9-2,3% του μητρικού πρωτογάλακτος και είναι υψηλή πηγή ενέργειας, η οποία είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος του βρέφους (LaKind et al., 2004), ενώ σημαντική είναι και η συμβολή του (45 με 50%) στη συνολική ενεργειακή πρόσληψη μέχρι και τους πρώτους έξι μήνες ζωής του νεογνού (Martin et al., 2016, Abrahamse et al., 2012, Belkind-Gerson et al., 2008). Η συνιστώμενη ημερήσια πρόσληψή του είναι 25 g (Grote et al., 2016). Έχει επίσης βρεθεί ότι το ποσοστό λίπους είναι σχετικά υψηλότερο κατά τη διάρκεια της ημέρας και χαμηλότερο κατά τη νύχτα (Demmelmaier & Koletzko, 2018). Λόγω της δομικής τους πολυπλοκότητας, μπορούν να ταξινομηθούν σε οκτώ κατηγορίες σύμφωνα με το σύστημα ταξινόμησης του Λιπιδικού Χάρτη, συγκεκριμένα, λιπαρά οξέα (FAs), γλυκερολιπίδια (GLs), σφιγγολιπίδια (SPs), γλυκεροφωσfolιπίδια (GPs), σακχαρολιπίδια (SLs), λιπίδια στερόλης (STs), πολυκετίδια (PKs) και λιπίδια πρενόλης (PRs). Οι κύριες κατηγορίες λιπιδίων στο γάλα είναι FAs, GLs, GPs και SPs (Liu et al., 2018).

Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 4, το λιπιδικό προφίλ του μητρικού γάλακτος αλλάζει σημαντικά για κάθε στάδιο της γαλουχίας, εξαρτώμενο φυσικά από πολλούς παράγοντες όπως τον τρόπο ζωής της μητέρας (διατροφή, άσκηση, κάπνισμα, άγχος), την ηλικία ή και πιθανές παθολογικές καταστάσεις (παχυσαρκία, θυροειδής, διαβήτης κα). Πιο συγκεκριμένα, στο νεογνό παρέχονται μεταξύ των άλλων και πολυακόρεστα οξέα όπως το αλινολενικό (C18:3 ω-3), το αραχιδονικό (C20:4 ω-6) και το εικοσιδυαεξανικό οξύ (C22:6 ω-3). Έχει βρεθεί ότι δεν υπάρχουν αξιοσημείωτες διαφορές στη σύσταση των λιπιδίων στα γάλατα τελειόμηνων και πρόωρων μητέρων, με τη μόνη διαφορά να εντοπίζεται στα λιπαρά οξέα μέσης αλυσίδας (10:0–14:0) όπου βρίσκονται σε μεγαλύτερες ποσότητες σε πρόωρα γάλατα σε σύγκριση με τελειόμηνα (Koletzko et al., 2001).

Το μεγαλύτερο ποσοστό του λίπους του μητρικού γάλακτος, πάνω από 98% του ολικού λίπους καταλαμβάνουν τα τριγλυκερίδια (TGs), ενώ τα φωσfolιπίδια (PLs) και η χοληστερόλη λιγότερο από 1% (Andreas et al., 2015). Οι κυριότερες κατηγορίες PLs στο ανθρώπινο γάλα, όπως έχει ήδη αναφερθεί και σε προηγούμενη ενότητα, είναι η σφιγγομυελίνη (37,5%), η φωσφατιδυλοχολίνη (28,4%), η φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (27,7%), η φωσφατιδυλοσερίνη (8,8%) και η φωσφατιδυλική ινοσιτόλη (6,1%) και προμηθεύουν το βρέφος με πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας και με χολίνη.

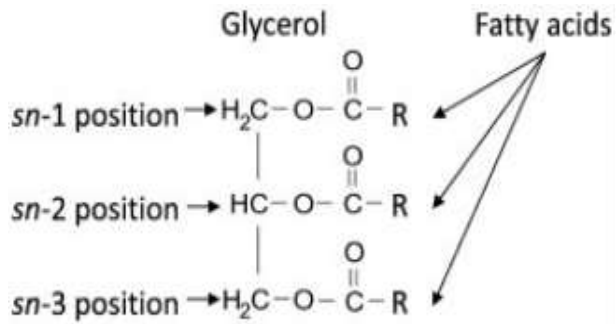
Πίνακας 4: Κύρια λιπαρά οξέα και περιεκτικότητές τους στο ανθρώπινο γάλα κατά τα στάδια της γαλουχίας σε διάστημα 1^ος μήνα (διάμεσες τιμές και τυπική απόκλιση)
 Πηγή: Genzel-Boroviczény, O., Wahle, J., & Koletzko, B. (1997). *Fatty acid composition of human milk during the 1st month after term and preterm delivery. European journal of pediatrics.*

Λιπαρά Οξέα	Πρωτόγαλα (5 μέρες)	Μεταβατικό (10 μέρες)	Ώριμο (30 μέρες)
Κορεσμένα			
Σύνολο	43.65 (3.55)	43.05 (3.67)	44.30 (5.00)
Μονοακόρεστα			
C18:1 ω9	32.1 (1.87)	32.10 (2.61)	31.50 (2.49)
Πολυακόρεστα			
ω6 PUFA			
C18:2 ω6	8.86 (1.30)	10.30 (2.15)	11.33 (2.17)
C18:3 ω6	0.14 (0.31)	0.15 (0.08)	0.18 (0.10)
C20:2 ω6	0.57 (0.12)	0.42 (0.06)	0.30 (0.07)
C20:3 ω6	0.53 (0.13)	0.43 (0.11)	0.38 (0.08)
C20:4 ω6	0.72 (0.07)	0.59 (0.09)	0.45 (0.07)
C22:4 ω6	0.23 (6.00)	0.15 (0.03)	0.08 (0.02)
ω6 LCPUFA	2.15 (0.34)	1.59 (0.20)	1.28 (0.19)
ω3 PUFA			
C18:3 ω3	0.65 (0.07)	0.81 (0.17)	0.90 (0.20)
C20:3 ω3	0.09 (0.03)	0.05 (0.03)	0.05 (0.04)
C20:5 ω3	0.04 (0.08)	0.00 (0.03)	0.05 (0.07)
C22:5 ω3	0.22 (0.05)	0.18 (0.04)	0.15 (0.03)
C22:6 ω3	0.46 (0.08)	0.39 (0.06)	0.23 (0.06)
ω3 LCPUFA	0.80 (0.21)	0.66 (0.11)	0.48 (0.16)

Το μητρικό γάλα εμπεριέχει περισσότερα από 200 λιπαρά οξέα. Ωστόσο, αρκετά υπάρχουν σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (ίχνη), με κάποια άλλα να κυριαρχούν. Για παράδειγμα, το ελαϊκό οξύ (C18:1 ω-9) αντιπροσωπεύει περίπου 30–40 g/100 g λίπους. Τα μακράς αλυσίδας πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (LCPUFAs) (μόρια με μήκος αλυσίδας άνω των 20 ατόμων άνθρακα με 2 ή περισσότερους διπλούς δεσμούς) παραδείγματος χάριν ω-6, όπως είναι το αραχιδονικό οξύ (C20:4) και ω-3, όπως το εικοσαπεντανοϊκό (C20:5), όπου μετατρέπεται περαιτέρω σε εικοσιδυαεξανοϊκό οξύ (C22:6), και τα οποία παράγονται από τα πρόδρομα απαραίτητα λιπαρά οξέα: λινολεϊκό (C18:2 ω6) και α-λινολενικό οξύ (C18:3 ω3) αντίστοιχα, εμφανίζονται στο πρωτόγαλα σε μειωμένη περιεκτικότητα, σε σύγκριση με το ώριμο γάλα. Το κυριότερο κι από άποψη αφθονίας κορεσμένο λιπαρό οξύ στο ανθρώπινο γάλα είναι το παλμιτικό οξύ (C16:0), ενώ άλλα κορεσμένα λιπαρά οξέα που υπάρχουν στο μητρικό γάλα είναι το βουτυρικό (C4:0), το καπροϊκό (C6:0) -πολύ σπάνια-, το καπρυλικό (C8:0), το καπρικό (C10:0), το λαυρικό (C12:0), μυριστικό (C14:0) και το στεαρικό (C18:0) (Visentainer et al., 2018).

2.1.1. Θέσεις πρόσδεσης λιπαρών οξέων

Οι θέσεις που καταλαμβάνονται από τα λιπαρά οξέα κατά μήκος της γλυκερόλης όπως φαίνεται και από τη δομή της είναι συγκεκριμένες (Εικόνα 2). Παραδείγματος χάριν, τα λιπαρά οξέα που υπερισχύουν στο μητρικό γάλα: το ελαϊκό, το παλμιτικό και το λινολεϊκό οξύ, βρίσκονται συνήθως στις θέσεις sn-1, sn-2 και sn-3, αντίστοιχα. Η θέση του παλμιτικού οξέος επηρεάζει τα επίπεδα ανανδαμίδης, η οποία παρουσιάζει αναλγητικά αποτελέσματα συμβάλλοντας στη ερμηνεία της σχέσης που συνδέει τη θέση του παλμιτικού οξέος και της απόκρισης του βρέφους στο κλάμα (Demmelmaier & Koletzko, 2018). Έτσι, όπως προαναφέρθηκε, το παλμιτικό οξύ (palmitic acid, PA) βρίσκεται κυρίως στη θέση sn-2 (>60 mol/100 mol), καθώς διευκολύνει τη δράση της παγκρεατικής λιπάσης (Innis et al., 2011), ενώ οι θέσεις sn-1,3 καταλαμβάνονται κυρίως από ελαϊκά οξέα (oleic acids, OA), όπως απεικονίζονται και στην Εικόνα 3. Συνεπώς, η πλειονότητα των TAGs του ανθρώπινου γάλακτος είναι η 1,3-διολεοϋλ-2-παλμιτοϋλογλυκερόλη (Pons et al., 1998), για την οποία, σύμφωνα με πολυάριθμες μελέτες, η κατανομή του παλμιτικού οξέος στη θέση sn-2 έχει μεγάλη σημασία για την απορρόφηση λίπους και μετάλλων στα βρέφη (Carnielli et al., 1996, López-López et al., 2001).



Εικόνα 2: Δομή της τριακυλογλυκερόλης και οι θέσεις sn
 Πηγή: <https://doi.org/10.1533/9780857097866.3>



Εικόνα 3: Θέση παλμιτικού οξέος και ελαϊκού οξέος στη τριακυλογλυκερόλη
 Πηγή: <https://hcp.biostime.com/resource-centre/what-is-sn-2-palmitate/>

2.2. Συνεισφορά των σημαντικότερων λιπαρών οξέων στο νεογνό

Μέχρι σήμερα, κανένα άλλο τρόφιμο δεν έχει καταφέρει να ανταποκριθεί επαρκώς συγκριτικά με τις ευεργετικές ιδιότητες αυτού του μοναδικού βιολογικού υγρού. Έτσι, ο θηλασμός είναι ο καλύτερος και συνιστώμενος τρόπος σίτισης των νεογέννητων παιδιών (Koletzko et al., 2008). Γενικά, όλα τα συστατικά του μητρικού γάλακτος είναι απαραίτητα για τα μωρά που θηλάζουν, με κυρίαρχα τα λιπίδια, προάγοντας την υγιή ανάπτυξη των βρεφών (Horta et al., 2007). Το πιο μελετημένο λιπιδικό κλάσμα του μητρικού γάλακτος είναι τα τριγλυκερίδια (TGs), τα οποία βρίσκονται και σε μεγάλη αφθονία (Garwolińska et al., 2018) και των οποίων η κύρια λειτουργία είναι να παρέχουν και να αποθηκεύουν ενέργεια για δομικές και ρυθμιστικές λειτουργίες (Uauy et al., 2000) των νεογνών. Στις διαδικασίες αυτές τα λιπαρά οξέα, που αποτελούν και αντικαρκινογόνους παράγοντες και προσφέρουν αντιδιαβητικά αποτελέσματα (Yao et al., 2016), είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη του κεντρικού νευρικού συστήματός τους, τα οποία τα ίδια τα νεογνά αδυνατούν να συνθέσουν (Lauritzen et al., 2011). Για να μπορούν λοιπόν να εφοδιάζονται με αυτά τα λιπίδια, διαθέτουν ένα μοναδικό σύστημα μεταφοράς στο οποίο εμπλέκονται τα φωσφολιπίδια (PLs) του γάλακτος, τα οποία παίζουν καθοριστικό ρόλο ως βιοενεργά μόρια που εμπλέκονται σε ένα ευρύ φάσμα βιολογικών διεργασιών, όπως η έκκριση, ο προγραμματισμένος κυτταρικός

θάνατος, η αυτοφαγία, η αντίδραση στο στρες και οι αλληλεπιδράσεις κυττάρου-κυττάρου (Tumanov & Kamphorst, 2017).

2.2.1. Λιπαρά οξέα μικρής και μέσης αλυσίδας

Το ανθρώπινο πρωτόγαλα έχει 4–27% λιπαρά οξέα μέσης αλυσίδας τα οποία συντίθενται στον μαστικό αδένα (Innis et al., 2014). Τα λιπαρά οξέα μικρής (short-chain fatty acids, SCFAs) και μέσης αλυσίδας (medium-chain fatty acids, MCFAs) δεν αποτελούν μονάχα μια πλούσια πηγή ενέργειας, αλλά η παρουσία τους κρίνεται απαραίτητη για τη φυσιολογική ωρίμανση του γαστρεντερικού σωλήνα (Andreas et al., 2015).

Μερικά από τα πιο σημαντικά λιπαρά οξέα μικρής αλυσίδας που συναντάμε στο μητρικό πρωτόγαλα είναι το καπρικό, το λαυρικό και το μυριστικό τα οποία συνδέονται με αντιμικροβιακές βιολογικές δραστηριότητες (Gardner et al., 2017). Αξιοσημείωτη είναι επίσης η συνεισφορά ορισμένων κορεσμένων και μονοακόρεστων λιπαρών οξέων στην ανάπτυξη του εντερικού συστήματος του νεογνού, επηρεάζοντας την σύσταση και τον αριθμό των μικροβίων του ανθρώπινου μητρικού γάλακτος. Συγκεκριμένα, τα υψηλότερα επίπεδα μονοακόρεστων λιπαρών οξέων στο μητρικό γάλα ευθύνονται για τη μείωση των *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*, ενώ το επίπεδο των κορεσμένων λιπαρών οξέων στο μητρικό γάλα έχει αντιστρόφως ανάλογη σχέση με τον *Streptococcus* (Ramiro-Cortijo et al., 2020).

Επίσης, η υψηλή περιεκτικότητα σε παλμιτικό οξύ, που αποτελεί πάνω από το 50% του συνόλου των κορεσμένων λιπαρών οξέων στο ανθρώπινο πρωτόγαλα, οφείλεται για την προσφορά μεγάλης ενέργειας στον οργανισμό (Barnes et al., 1974). Ειδικότερα, απλοποιεί τη πολύπλοκη δράση της παγκρεατικής λιπάσης και μετατρέπεται σε μονογλυκερίδιο, το οποίο γενικά απορροφάται καλύτερα όπως και το ασβέστιο και άλλα μέταλλα με αποτέλεσμα τη μείωση της εντερικής ενόχλησης, των κολικών και της δυσφορίας του βρέφους (Mehrotra et al., 2019).

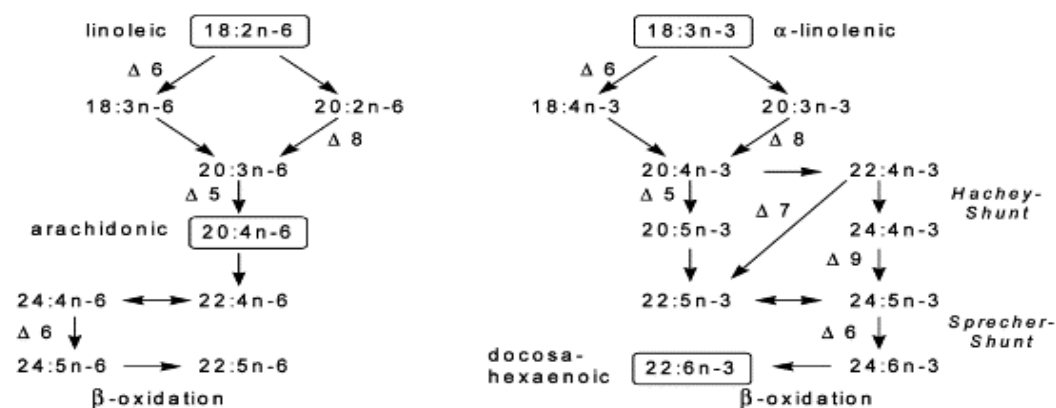
Παλαιότερα, τα κορεσμένα λίπη θεωρούνταν υπαίτια για την ανάπτυξη της καρδιαγγειακής νόσου. Παρ' όλα αυτά, τελευταία εκτιμάται ότι η σχέση μεταξύ τους μπορεί να μην είναι τόσο σαφής όσο είχε προηγουμένως υποθεθεί. Γενικώς, στα τρόφιμα εμπεριέχεται μια σειρά από κορεσμένα και ακόρεστα λιπαρά οξέα, τα οποία μπορούν να επηρεάσουν διαφορετικά τον μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών, συνεισφέροντας σε σημαντικές ποσότητες άλλων θρεπτικών συστατικών που μπορεί να μεταβάλλουν ή ακόμη και να περιορίσουν τον κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου (Lordan & Zabetakis, 2017, Huth & Park, 2012).

2.2.2. Λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας

Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας (long-chain unsaturated fatty acids, LCPUFAs) εμπεριέχονται στο μητρικό πρωτόγαλα και αποτελούν σημαντικά δομικά συστατικά συστημάτων μεμβρανικών ιστών αλλά και μεμβρανών νευρικών κυττάρων, περίπου το 60% του ανθρώπινου εγκεφάλου (Iranpour et al., 2013). Τα κύρια λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας περιλαμβάνουν το αραχιδονικό (AA) οξύ, εικοσαπεντανοϊκό οξύ (EPA) και το εικοσιδιεξανοϊκό (DHA), τα οποία είναι σημαντικά για πολλές ανθρώπινες φυσιολογικές διεργασίες, όπως η ανάπτυξη του αμφιβληστροειδούς τόσο στα πρόωρα όσο και στα τελειόμηνα βρέφη (Uauy et al., 1990, Fang et al., 2005), η ανάπτυξη του φλοιού του εγκεφάλου, η μεταφορά σημάτων, η γονιδιακή έκφραση, η δομή και λειτουργία των μεμβρανών μεταξύ άλλων. Τα AA, EPA και DHA είναι επίσης σημαντικά για τη ρύθμιση της ανάπτυξης, των φλεγμονωδών αντιδράσεων, της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος, της γνωστικής ανάπτυξης και των κινητικών συστημάτων στα νεογέννητα. Αυτό το μοτίβο των κυρίαρχων λιπαρών οξέων μακράς αλυσίδας είναι παρόμοιο με εκείνο του ώριμου ανθρώπινου γάλακτος, αν και με περίπου διπλάσια ποσοστιαία περιεκτικότητα στο πρωτόγαλα σε σύγκριση με το ώριμο γάλα (Sala-Vila et al., 2005, Kim et al., 2017, Sinanoglou et al., 2017).

Τα DHA και AA, αν και δε θεωρούνται απαραίτητα για τους ενήλικες, είναι τα μόνα λιπαρά οξέα που χρησιμοποιούνται από τον εγκέφαλο και είναι βασικά δομικά συστατικά των μεμβρανών όλων των ιστών (Sinanoglou et al., 2017). Εναποτίθενται στα λιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών που σχηματίζουν τη φαιά ουσία που αντιπροσωπεύει περίπου το 25% της συνολικής περιεκτικότητας σε λιπαρά οξέα του εγκεφάλου. Και τα δύο λιπαρά οξέα έχουν επιδράσεις στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση των νευρώνων μέσω της διαμόρφωσης των φυσικών ιδιοτήτων των νευρωνικών μεμβρανών, της μεταγωγής σήματος και της γονιδιακής έκφρασης. Διαδραματίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στη νευροπροστασία έναντι νευροεκφυλιστικών παθήσεων, όπως οι νόσοι Alzheimer και Parkinson, που σχετίζονται με χαρακτηριστικές παθολογικές εκφράσεις, όπως η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, η νευροφλεγμονή και το οξειδωτικό στρες (González-Domínguez et al., 2014, Sambra et al., 2021).

Στα νεογνά, τα AA και DHA μπορούν να συντεθούν με επιμήκυνση της αλυσίδας και αποκορεσμό των βασικών λιπαρών οξέων, όπως το λινολεϊκό οξύ και το λινολενικό οξύ, αντίστοιχα, όπως απεικονίζεται και στην Εικόνα 4. Αυτή η διαδικασία, ωστόσο, αλλάζει με την ανάπτυξη επειδή οι ενζυμικές δραστηριότητες μειώνονται με την ανάπτυξη και την ωρίμανση (Young et al., 1997). Τα περισσότερα βρέφη είναι ανίκανα να συνθέσουν αυτές τις ενώσεις από πρόδρομα λιπαρά οξέα. Επομένως, είναι εξαιρετικά σημαντικό να παρέχονται επαρκείς ποσότητες AA και DHA στη διατροφή από την πρώιμη βρεφική ηλικία (Antonakou et al., 2013). Τα πρόδρομα λιπαρά οξέα για την παραγωγή αραχιδονικού και εικοσαπεντανοϊκού οξέος, παρουσιάζουν κι αυτά κρίσιμη λειτουργία στην οπτική (Carlson et al., 1996), ανοσοποιητική, γνωστική και κινητική ανάπτυξη στα νεογνά όπως επίσης και για την ανάπτυξη του εγκεφάλου τους (Glaser et al., 2011, Keim et al., 2012).



Εικόνα 4: Μεταβολισμός βασικών λιπαρών οξέων λινολεϊκού οξέος (18:2 n-6) και λινολενικού οξέος (18:3 n-3) σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας (LC-PUFA)

Πηγή: B. Koletzko et al. / *Early Human Development* 65 Suppl. (2001) S3-S18

Η διάταξη των λιπαρών οξέων επηρεάζει επίσης τη λειτουργικότητά τους. Η cis διαμόρφωση χαρακτηρίζει κυρίως τα λιπαρά οξέα του μητρικού γάλακτος η οποία όμως επηρεάζεται από διαφορετικούς παράγοντες. Από την άλλη, τα trans λιπαρά οξέα (TFAs) στο ανθρώπινο γάλα έχουν εγείρει ανησυχίες λόγω των πιθανών δυσμενών επιπτώσεων στην ανάπτυξη των βρεφών. Τα TFAs έχουν συσχετιστεί με δυσμενείς επιδράσεις στον μεταβολισμό των LCPUFAs και των βασικών λιπαρών οξέων (LA, 18:2 ω-6 και ALA, 18:3 ω-3), το οξειδωτικό στρες και τα επίπεδα χοληστερόλης και λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (Mueller et al., 2010).

Υψηλές ποσότητες PUFAs υπάρχουν στον αμφιβληστροειδή και τον εγκέφαλο των βρεφών και η αφθονία τους αυξάνεται σταθερά κατά το πρώτο έτος της ζωής (Carlson, 2001). Η μέση παροχή πολυακόρεστων λιπαρών οξέων μακράς αλυσίδας (LCPUFAs) σε βρέφη που θηλάζουν πλήρως, με βάση τη μέση σύνθεση του ανθρώπινου γάλακτος, είναι περίπου 100 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα. Στο έντερο, τα μη υδρολυμένα TAGs, ιδιαίτερα τα τριγλυκερίδια μακράς αλυσίδας, υφίστανται τη δράση των χολικών αλάτων και του παγκρεατικού ενζύμου και διασπώνται σε λιπαρά οξέα και γλυκερόλη, τα οποία απορροφώνται, κατανέμονται και χρησιμοποιούνται από τους διάφορους ιστούς (Berry, 2009).

Η επικράτηση της ατοπικής νόσου (ένα σύνολο ασθενειών όπως η ατοπική δερματίτιδα, το άσθμα και η ρινίτιδα κα.) στην παιδική ηλικία γενικώς αυξάνεται και μελέτες υποδεικνύουν την πιθανότητα ο θηλασμός να μπορεί να μειώσει τις αλλεργικές εκδηλώσεις σε άτομα υψηλού κινδύνου (Glaser and Johnstone, 1953, Oddy, 2017). Αυτή η συσχέτιση είναι πιθανή να συνδέεται με τα PUFAs του μητρικού γάλακτος. Έχει βρεθεί επίσης ότι η πρώιμη κατανάλωση τους μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη καθώς και τις νευρολογικές και ανοσοποιητικές λειτουργίες στη μετέπειτα ζωή (Koletzko et al., 2014).

2.2.2.1. ω-3 λιπαρά οξέα

Πιο συγκεκριμένα, τα ωμέγα-3 λιπαρά οξέα, ιδιαίτερα το εικοσιδυεξαενοϊκό οξύ (DHA), το αλινολενικό οξύ (ALA) και το εικοσαπεντανοϊκό οξύ (EPA), ευθύνονται πρωτίστως για την ανάπτυξη του εγκεφάλου και των ματιών στα βρέφη. Είναι επίσης σημαντικά για τη σωστή λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και πιθανόν να έχουν και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Hurtado et al., 2015). Το DHA, το πιο άφθονο, βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα αμινοφωσφολιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών και προέρχεται από το αλινολενικό οξύ (ALA) μέσω της ενζυμικής βιοσύνθεσης. Το ALA μαζί με το αντίστοιχο λινολεϊκό οξύ (ω-6 LA) πρέπει να λαμβάνεται από τη διατροφή επειδή το ανθρώπινο σώμα αδυνατεί να τα συνθέσει. Το DHA έχει επιδείξει σταθερά ευεργετικά αποτελέσματα για την υγεία των νεογνών, συμπεριλαμβανομένων των αντιφλεγμονωδών, αντιπολλαπλασιαστικών και αντιοξειδωτικών του ιδιοτήτων, καθώς και σημαντική συμμετοχή στους υποκείμενους μηχανισμούς της εμβρυϊκής νευροανάπτυξης και της ανοσολογικής τους λειτουργίας (Kim et al., 2017, Sinanoglou et al., 2017).

Σε μια τυχαιοποιημένη μελέτη, παρατηρήθηκε βελτιωμένη όραση τόσο στις 16 όσο και στις 30 εβδομάδες σε βρέφη που θηλάζονταν και σε εκείνα που τρέφονταν με φόρμουλα με συμπλήρωμα ιχθυελαίου σε σύγκριση με βρέφη που τρέφονταν χωρίς συμπλήρωμα. Το DHA ήταν ο προγνωστικός παράγοντας των διαφορών στην όραση, καθώς το DHA ήταν το μόνο λιπαρό οξύ που συσχετίστηκε με αυτήν σε όλα τα βρέφη σε οποιαδήποτε ηλικία που εξετάστηκαν (Makrides et al., 2008).

2.2.2.2. ω-6 λιπαρά οξέα

Το λινολεϊκό οξύ (LA) και το αραχιδονικό οξύ (AA) είναι απαραίτητα ωμέγα-6 λιπαρά οξέα τα οποία παίζουν καθοριστικό ρόλο στη λειτουργία του δέρματος και της κυτταρικής μεμβράνης. Το αραχιδονικό οξύ είναι το κυρίαρχο πολυακόρεστο λιπαρό οξύ μακράς αλυσίδας στο ανθρώπινο πρωτόγαλα, παρ' ότι βρίσκεται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις συγκριτικά με άλλα λιπαρά οξέα. Έχει αποδειχθεί ότι το αραχιδονικό οξύ διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική ανάπτυξη και τις διάφορες λειτουργίες του νεογνού κατά τα αρχικά στάδια της πρώιμης διατροφής. Αποτελεί επομένως, ένα σημαντικό θρεπτικό συστατικό για τη βρεφική ηλικία και γι' αυτό, απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή όσον αφορά την παρουσία του ή μη στη διατροφή του μωρού (Salem & Van Dael, 2020).

Η αναλογία ω-3 και ω-6 λιπαρών οξέων μακράς αλυσίδας στη διατροφή είναι κρίσιμη επειδή οι δύο οικογένειες ανταγωνίζονται για την ίδια ενζυματική οδό. Τα AA και DHA συσσωρεύονται στον εγκέφαλο και στον αμφιβληστροειδή πιο γρήγορα κατά το τελευταίο τρίμηνο της εγκυμοσύνης και κατά τους πρώτους μήνες μετά τον τοκετό, ενώ τα αποθέματά τους είναι περιορισμένα κατά τη γέννηση, ειδικά στα πρόωρα βρέφη (Rogers et al., 2013).

2.3. Αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού των λιπαρών οξέων

Τα λιπίδια στο πρωτόγαλα είναι ένα σημαντικό μέσο για την παροχή ορισμένων από τις ευεργετικά βιολογικές δραστικές ουσίες του (Pavlíková et al., 2010). Ωστόσο, οι βιολογικές λειτουργίες των λιπιδίων ποικίλλουν ανάλογα την πηγή του πρωτογάλακτος και των συστατικών του. Αν και μερικές μελέτες έχουν περιγράψει τις συνθέσεις τριακυλογλυκερόλης και λιπαρών οξέων του ανθρώπινου πρωτογάλακτος (Zhao et al., 2018), τα ολοκληρωμένα προφίλ των λιπιδίων δεν έχουν αξιολογηθεί διεξοδικά για το ανθρώπινο γάλα στο στάδιο του πρωτογάλακτος.

2.3.1. Φασματοσκοπία Υπέρυθρης Ακτινοβολίας (IR)

Η υπέρυθρη φασματοσκοπία (Infrared, IR) είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη αναλυτική τεχνική για τον προσδιορισμό των λιπαρών οξέων στο ανθρώπινο πρωτόγαλα. Η φασματοσκοπία IR είναι μια μη καταστροφική, ταχεία μέθοδος και απαιτεί ελάχιστη προετοιμασία δείγματος. Οι εντάσεις IR έχουν γραμμική σχέση με την συγκέντρωση της μοριακής απορρόφησης, παίρνοντας πληροφορίες σχετικές με την ποσότητα των λιπιδίων (Van de Voort & Sedman, 2000). Κάθε λιπαρό οξύ έχει ένα μοναδικό υπέρυθρο φάσμα, που επιτρέπει την αναγνώρισή του, ενώ τα προκύπτοντα φάσματα μπορούν να αναλυθούν για να προσδιοριστεί η σύνθεση λιπαρών οξέων του δείγματος. Η χρήση της φασματοσκοπίας IR έγκειται συνήθως στον καθορισμό της παρουσίας και της περιεκτικότητας της ακορεστότητας και συγκεκριμένα της trans ακορεστότητας. Διπλοί δεσμοί σε θέση trans παρουσιάζουν χαρακτηριστική συχνότητα στα 968 cm^{-1} , και δεν αλλάζει για επιπλέον διπλούς δεσμούς μόνο αν αυτοί είναι συζευγμένοι. Ωστόσο, δεν υπάρχει σχετική διαγνωστική συχνότητα απορρόφησης IR για την cis ακορεστότητα (Kuksis et al., 1991).

Μία από τις κοινές εφαρμογές της φασματοσκοπίας IR στην ανάλυση λιπαρών οξέων είναι η φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR), η οποία παρέχει πολλά πλεονεκτήματα, όπως το ότι διαθέτει υψηλή ευαισθησία, προσφέρει ταχεία ανάλυση και είναι μη καταστροφική (Van de Voort & Sedman, 2000, Blum & John, 2012). Το FT-IR έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των λιπαρών οξέων στο ανθρώπινο πρωτόγαλα μέσω διαφορετικών μεθόδων προετοιμασίας δειγμάτων, όπως η άμεση μετάδοση, η εξασθενημένη ολική ανάκλαση (Attenuated Total Reflectance, ATR) και η διάχυτη ανάκλαση.

Στην άμεση μετάδοση FT-IR, το δείγμα πρωτογάλακτος διαλύεται σε κατάλληλο διαλύτη και το προκύπτον διάλυμα τοποθετείται μεταξύ δύο διαφανών παραθύρων για ανάλυση. Το ATR-FT-IR, από την άλλη πλευρά, περιλαμβάνει την άμεση μέτρηση του δείγματος πρωτογάλακτος που τοποθετείται σε έναν κρύσταλλο ATR, που επιτρέπει μια γρήγορη και εύκολη ανάλυση χωρίς την ανάγκη διάλυσης του δείγματος. Η μέθοδος αντικατοπτρίζει τη συνολική περιεκτικότητα σε trans λιπαρά οξέα στο μόριο ανεξαρτήτως της θέσης των διπλών δεσμών (Azizian et al., 2004). Η ανάλυση του γάλακτος από το FT-IR έχει αποδειχθεί ότι είναι τόσο ακριβής όσο οι αναλύσεις που βασίζονται σε φίλτρα όπως Milkoscan, Multispec (Van de Voort, 1992). Η διάχυτη ανάκλαση FT-IR, γνωστή και ως Φωτοακουστική Φασματοσκοπία Μετασχηματισμού Φουριέ (FT-IR-PAS), μετρά την ανακλώμενη ακτινοβολία IR από την επιφάνεια του δείγματος παρέχοντας πλεονεκτήματα όπως η ελάχιστη απαιτούμενη ποσότητα και προετοιμασία δείγματος και η δυνατότητα ανάλυσης στερεών δειγμάτων.

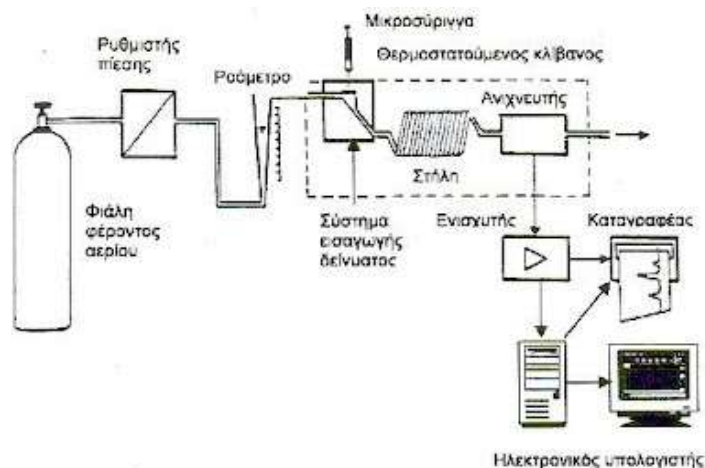
Από τα βασικότερα πλεονεκτήματα του FT-IR είναι η ικανότητα να παρέχει ποιοτικές και ποσοτικές πληροφορίες σχετικά με διάφορες λειτουργικές ομάδες στα μόρια λιπαρών οξέων, όπως η δόνηση τάσης καρβονυλίου (C=O) στα περίπου 1740 cm^{-1} , η δόνηση τάσης μεθυλενίου (CH₂) περίπου μεταξύ 2850 cm^{-1} και 2920 cm^{-1} και η δόνηση κάμψης καρβονυλίου (C=O) στα 720 cm^{-1} περίπου. Αυτές οι χαρακτηριστικές κορυφές χρησιμοποιούνται για την αναγνώριση και τον ποσοτικό προσδιορισμό διαφορετικών ειδών λιπαρών οξέων στο ανθρώπινο πρωτόγαλα (Van de Voort, 1992, Bērziņš et al., 2021).

2.3.2. Αέρια χρωματογραφία

Η ανάλυση των λιπιδίων με αέρια χρωματογραφία (gas chromatography, GC) περιλαμβάνει το διαχωρισμό των συστατικών του μείγματος των λιπιδίων μεταξύ μιας κινητής αέριας κατάστασης και μιας στατικής αμετάβλητης φάσης (Smith & Marton, 1997). Τα λιπαρά οξέα πρέπει να μετατραπούν σε μεθυλεστέρες (fatty acid methyl esters, FAMES) πριν από την ανάλυση με GC ώστε να αυξηθεί η πτητικότητα και η αποτελεσματικότητα του διαχωρισμού. Η μετατροπή αυτή του εκχυλιζόμενου λιπιδίου γίνεται συνήθως από αντιδράσεις με υδροξείδιο του νατρίου-μεθανόλη ή τριφθοριούχο βόριο-μεθανόλη. Ερευνητές παρατήρησαν ελαφρώς καλύτερη ανάκτηση των λιπαρών οξέων του ανθρώπινου γάλακτος με μία άμεση διαδικασία μετεστεροποίησης που ανέπτυξαν (Lepage & Roy, 1984), όπου δεν χρησιμοποιούνται διαλύτες. Πολλοί ερευνητές προσθέτουν αντιοξειδωτικά στους διαλύτες για την πρόληψη πιθανής απώλειας PUFAs μέσω οξείδωσης (Jensen et al., 1996).

Η ανάλυση των TAGs των λιπιδίων με αέρια χρωματογραφία παρέχει επιπλέον πληροφορίες όσον αφορά την κατανομή των λιπαρών οξέων στις διάφορες θέσεις του μορίου. Το υδρογόνο και το ήλιο ως φέροντα αέρια, για τον διαχωρισμό των TAGs στις στήλες, απαιτούν γενικώς πιο υψηλές θερμοκρασίες σε σύγκριση με αυτές που χρησιμοποιούνται για τον διαχωρισμό των μεθυλεστέρων. Επίσης, τα παράγωγα των εστέρων της γλυκερόλης, που διαχωρίζονται κι αυτά στην GC, υποβάλλονται πολλές φορές σε περαιτέρω ανάλυση με φασματομετρία μάζας (MS), ώστε να ληφθούν πληροφορίες για την μοριακή τους δομή (Kuksis, 1994).

Η διάταξη ενός αέριου χρωματογράφου δίνεται στην Εικόνα 5 που ακολουθεί.



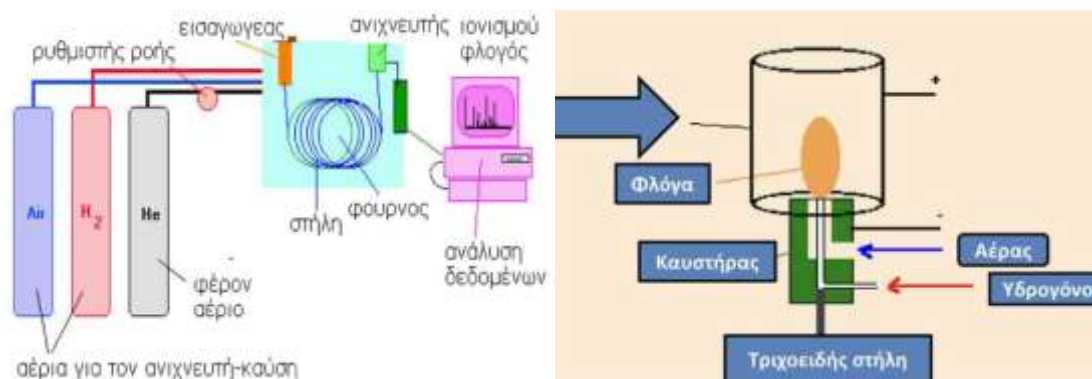
Εικόνα 5: Αέριος χρωματογράφος

Πηγή: <http://chimikoergastirio.blogspot.com/2009/11/s.html>

Το φέρον αέριο, που είναι συνήθως He, H₂, N₂ ή Ar, από τη φιάλη υψηλής πίεσης, οδηγείται στη στήλη μέσα από ρυθμιστές παροχής πίεσης. Η επιλογή του φέροντος αερίου εξαρτάται κατά κύριο λόγο από τον τύπο του ανιχνευτή που χρησιμοποιείται. Είναι ιδιαίτερα σημαντική η επιλογή του και πρέπει να πληροί ορισμένα κριτήρια και προδιαγραφές. Χρησιμοποιείται γενικά οποιοδήποτε αέριο σε πλήρη καθαρότητα, το οποίο διαφοροποιείται από τα διάφορα συστατικά του μίγματος στον ανιχνευτή. Οφείλει να είναι αδρανές και απαλλαγμένο από άλλες προσμίξεις. Επιπλέον, πρέπει να διασφαλίζεται η απουσία οξυγόνου, το οποίο οξειδώνει τη στατική φάση κι έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή της στήλης. Όσον αφορά την υγρασία, έχει βρεθεί ότι μέχρι και ίχνη απενεργοποιούν τη στατική φάση (Κυριάκου, 2016). Επόμενο βήμα είναι το δείγμα να εισαχθεί με μικροσύριγγα από την κορυφή της στήλης. Η στήλη βρίσκεται μέσα σε ένα θερμοστατούμενο κλίβανο ώστε τα συστατικά να παραμένουν στην αέρια φάση τους, τα οποία στη συνέχεια συμπαρασύρονται μέσω του φέροντος αερίου κατά μήκος της στήλης και γίνεται ο διαχωρισμός. Δύο είδη στηλών είναι ευρέως γνωστές, οι πληρωμένες και οι τριχοειδείς, με τις δεύτερες να χρησιμοποιούνται κυρίως σήμερα λόγω της καλύτερης απόδοσης τους. Ουσιαστικά η στήλη αποτελείται από έναν επιμήκη σωλήνα και κατασκευάζεται συνήθως από ανοξείδωτο χάλυβα, χαλκό, αργίλιο, γυαλί ή πλαστικό, μήκους μερικών μόνο μέτρων για τις πληρωμένες στήλες και μέχρις εκατοντάδων μέτρων για τις τριχοειδείς (Κυριάκου, 2016). Στην έξοδο της στήλης υπάρχει ο ανιχνευτής ο οποίος ανιχνεύει τα κλάσματα μέσω της ανάλογης απόκρισης που δίνει και τα οποία στην πορεία μεταφέρονται μέσω καταγραφέα σε ηλεκτρονικό υπολογιστή. Σε κάποιες περιπτώσεις, δύναται να υπάρχει μια διάταξη η οποία συλλέγει τα διάφορα κλάσματα καθώς και ένα ροόμετρο για να ελέγχει την ταχύτητα ροής του φέροντος αερίου (Feng et al., 2008). Στη συνέχεια αναλύονται δύο από τους πιο συχνά χρησιμοποιούμενους ανιχνευτές της αέριας χρωματογραφίας.

2.3.2.1. Ανιχνευτής ιονισμού φλόγας (GC-FID)

Ο ανιχνευτής ιονισμού φλόγας (flame ionization detector, FID) είναι ενδεχομένως ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος ανιχνευτής στην αέρια χρωματογραφία για τον προσδιορισμό λιπαρών οξέων στο πρωτόγαλα (Cruz-Hernandez et al., 2013). Πρόκειται για έναν εξαιρετικά ευαίσθητο (ικανός να ανιχνεύει λιπαρά οξέα σε χαμηλές συγκεντρώσεις) και επιλεκτικό ανιχνευτή που ανταποκρίνεται στην καύση οργανικών μορίων με φλόγα υδρογόνου, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ιόντων. Σε αυτή τη μέθοδο, τα λιπαρά οξέα στο ανθρώπινο πρωτόγαλα αρχικά εκχυλίζονται και στη συνέχεια παραγωγοποιούνται για να σχηματίσουν μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων (FAMES). Αξίζει να σημειωθεί ότι, τα ουδέτερα και τα πολικά λιπίδια (π.χ. τριγλυκερίδια, στερόλες, φωσφολιπίδια) δε μπορούν να διαχωριστούν με αέρια χρωματογραφία (GC) χωρίς κλασματοποίηση, σαπωνοποίηση, παραγωγοποίηση ή άλλες μεθόδους προεπεξεργασίας (Sinanoglou et al., 2013). Οι μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων μπορούν να παρασκευαστούν μέσω διαφόρων τεχνικών διαμεθυλίωσης και στη συνέχεια να διαχωριστούν στις GC στήλες και να εντοπιστούν από τον ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (FID) (Aguilar et al., 2014). Η ταυτοποίηση στη συνέχεια των χρωματογραφικών κορυφών στηρίζεται στη σύγκριση των χρόνων κατακράτησης με εκείνες προτύπων δειγμάτων.



Εικόνα 6: Αέριος χρωματογράφος με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας

Πηγή: <https://slideplayer.gr/amp/12053868/>

Τα βασικά στοιχεία ενός ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (FID) συζευγμένου με αέριο χρωματογράφο φαίνονται στην Εικόνα 6 και περιλαμβάνουν μια φλόγα υδρογόνου/αέρα, μια θύρα έγχυσης δείγματος (εισαγωγέας), μια χρωματογραφική στήλη, ένα ηλεκτρόδιο συλλέκτη και ένα ηλεκτρόδιο εκπομπής. Η ταχύτητα αλλά και η ικανότητα του διαχωρισμού επηρεάζονται από τη θερμοκρασία, για το λόγο αυτό η στήλη βρίσκεται σε θερμικά ελεγχόμενο φούρνο. Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται εξαιτίας των διαφόρων δυνάμεων συγκράτησης και έκλυσης μεταξύ των συστατικών του μίγματος, το υλικό κατασκευής της

στήλης και της ροής του φέροντος αερίου. Η στήλη είναι συνήθως μια τριχοειδής στήλη επικαλυμμένη με μια στατική φάση που διαχωρίζει τα συστατικά του δείγματος βάσει τις φυσικές και χημικές τους ιδιότητες, όπως σημείο βρασμού, πτητικότητα, πολικότητα και μοριακά μεγέθη. Καθώς οι αναλυόμενες ουσίες εκλούνται από τη στήλη, εισέρχονται στη φλόγα υδρογόνου-αέρα, όπου ιονίζονται και καίγονται για να παράγουν θετικά φορτισμένα ιόντα (κατιόντα) και αρνητικά φορτισμένα ιόντα (ανιόντα), ηλεκτρόνια και θερμότητα. Τα κατιόντα έλκονται προς ένα αρνητικά φορτισμένο ηλεκτρόδιο, γνωστό ως ηλεκτρόδιο συλλέκτη, ενώ τα ανιόντα έλκονται προς ένα θετικά φορτισμένο ηλεκτρόδιο, γνωστό ως ηλεκτρόδιο εκπομπής. Καθώς τα ιόντα φτάνουν στα ηλεκτρόδια, δημιουργούν ένα ηλεκτρικό ρεύμα που είναι ανάλογο με τη συγκέντρωση των αναλυτών στο δείγμα. Αυτό το ηλεκτρικό ρεύμα στη συνέχεια ενισχύεται και μετράται από τον FID και το σήμα που προκύπτει χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό των αναλυτών. Το ρεύμα στη συνέχεια ενισχύεται από το ηλεκτρόμετρο και καταγράφεται ως χρωματογράφημα, το οποίο είναι μια γραφική αναπαράσταση της συγκέντρωσης της αναλυόμενης ουσίας σε συνάρτηση με το χρόνο. Η περιοχή κάτω από τις κορυφές στο χρωματογράφημα είναι ανάλογη με την ποσότητα των αναλυτών που υπάρχουν στο δείγμα. Τα ληφθέντα φάσματα αναλύονται χρησιμοποιώντας κατάλληλο λογισμικό για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των λιπαρών οξέων που υπάρχουν στο δείγμα του πρωτογάλακτος. Τα φάσματα αναλύονται τυπικά συγκρίνοντάς τα με φάσματα αναφοράς γνωστών λιπαρών οξέων ή χρησιμοποιώντας φασματικές βιβλιοθήκες. Τα ύψη κορυφής ή οι περιοχές κορυφών συγκεκριμένων ζωνών στα φάσματα χρησιμοποιούνται για τον ποσοτικοποίηση των λιπαρών οξέων.

Ο FID προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα για την ανάλυση των λιπαρών οξέων στο ανθρώπινο πρωτόγαλα. Έχει υψηλή ευαισθησία, καθώς μπορεί να ανιχνεύσει αναλύτες σε επίπεδα πικογραμμαρίων και νανογραμμαρίων. Έχει υψηλή επιλεκτικότητα, μιας και μπορεί να διακρίνει διαφορετικά είδη λιπαρών οξέων με βάση τα χαρακτηριστικά καύσης τους. Έχει ένα γραμμικό δυναμικό εύρος, που επιτρέπει τον ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό ενός μεγάλου φάσματος συγκεντρώσεων μιας αναλυόμενης ουσίας. Έχει επίσης καλή αναπαραγωγικότητα, καθώς δεν επηρεάζεται τόσο από αλλαγές στους ρυθμούς ροής, τις θερμοκρασίες και άλλες παραμέτρους σε σύγκριση με άλλους ανιχνευτές και είναι συμβατό με μια ποικιλία χρωματογραφικών στηλών, επιτρέποντας ευελιξία στην ανάπτυξη της μεθόδου.

2.3.2.2. Φασματομετρία Μάζας (GC-MS)

Η αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (GC-MS) αποτελεί μια εξαιρετικά ευαίσθητη και επιλεκτική αναλυτική τεχνική που έχει χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της σύνθεσης των λιπαρών οξέων στο ανθρώπινο πρωτόγαλα, συμβάλλοντας σημαντικά στην ανίχνευση σημαντικών διαφοροποιήσεων στο λιπιδικό του προφίλ. Περιλαμβάνει τον διαχωρισμό των συστατικών στο δείγμα χρησιμοποιώντας αέρια χρωματογραφία, που ακολουθείται από την ανίχνευση και την ταυτοποίηση των διαχωρισμένων συστατικών με φασματομετρία μάζας. Η αρχή λειτουργίας της φασματομετρίας μαζών βασίζεται στη δημιουργία (θετικών κυρίως) ιόντων μιας ένωσης και το διαχωρισμό τους με βάση το λόγο της μάζας προς φορτίο (m/z). Έτσι, είναι εφικτό να προσδιοριστεί το μοριακό βάρος της ένωσης και ο τρόπος με τον οποίο συνδέονται οι διάφορες ομάδες μεταξύ τους. Όσον αφορά την οργανολογία, το φασματόμετρο μάζας μπορεί να παρέχει χρήσιμες πληροφορίες τόσο για το μοριακό βάρος όσο και για τη δομή των λιπαρών οξέων (Köfele et al., 2012). Είναι διαθέσιμοι στη αγορά αεριοχρωματογράφοι, οι οποίοι μπορούν να συζευχθούν άμεσα με φασματόμετρα μαζών (MS) ταχείας σάρωσης.

Σε μια μελέτη χρησιμοποιήθηκε GC-MS για τον προσδιορισμό των λιπαρών οξέων σε δείγματα πρωτογάλακτος από καμήλες κι έδειξε ότι ήταν μια ευαίσθητη και αξιόπιστη μέθοδος (Aghwan et al., 2015). Μια άλλη μελέτη, χρησιμοποίησε GC-MS για να αξιολογήσει τη σύνθεση λιπαρών οξέων του ανθρώπινου πρωτογάλακτος, στην οποία και πάλι αξιολογήθηκε ως μια ακριβής μέθοδος για την ανάλυση των λιπαρών οξέων στο πρωτόγαλα (Kaczmariski et al., 2017).

Συνολικά, η σύζευξη της αέριας χρωματογραφίας με τη φασματομετρία μαζών είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για τον προσδιορισμό της δομής της αλυσίδας, όπως οι διακλαδώσεις ή η παρουσία δακτυλίων. Η μέτρηση του φάσματος της μάζας έχει πολλά πλεονεκτήματα, με κυριότερο το ότι δεν απαιτείται προηγούμενος σχηματισμός παραγώγων του δείγματος για την ενίσχυση της πτητικότητας των λιπιδίων. Η MS σε συνδυασμό με τη GC μπορεί επίσης να ανιχνεύει λιπαρά οξέα σε χαμηλές συγκεντρώσεις και να παρέχει λεπτομερείς πληροφορίες όσον αφορά τη σύνθεση λιπαρών οξέων του δείγματος, συμπεριλαμβανομένης της αναγνώρισης μεμονωμένων λιπαρών οξέων και της σχετικής αφθονίας τους.

Συνοπτικά, οι IR, GC-FID και GC-MS είναι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται συνήθως για τον προσδιορισμό και την ανάλυση λιπαρών οξέων. Το ποια μέθοδος θα επιλεγεί εξαρτάται από τη συγκεκριμένη εφαρμογή και το επίπεδο ευαισθησίας που απαιτείται.

Κεφάλαιο 3. Σκοπός εργασίας

Σύμφωνα με την παραπάνω βιβλιογραφική ανασκόπηση φαίνεται πως τα υπάρχοντα δεδομένα σχετικά με το προφίλ των λιπαρών οξέων στο μητρικό πρωτόγαλα και τη συσχέτιση αυτών με τις ήδη υπάρχουσες φόρμουλες του εμπορίου, έρχονται συχνά σε ασυμφωνία λόγω της μεγάλης ποικιλομορφίας και της μοναδικότητας των παραγόντων που μπορούν να επηρεάσουν τη σύσταση τους. Σκοπός της παρούσας έρευνας είναι αφενός να αναλύσει και να συσχετίσει το προφίλ λιπαρών οξέων σε επιλεγμένα δείγματα πρωτογάλακτος από μητέρες με πολύ καλά χαρακτηρισμένα βιομετρικά χαρακτηριστικά (π.χ., η εθνικότητα της μητέρας, ο δείκτης μάζας σώματος (ΔΜΣ), η εβδομάδα κύησης κ.α.) και αφετέρου να προσπαθήσει να προσδώσει χρήσιμες πληροφορίες έτσι ώστε να υπάρξουν φόρμουλες που να τείνουν να προσομοιάσουν όσο το δυνατό καλύτερα το μητρικό πρωτόγαλα.

Τα παραπάνω μας ώθησαν στο να συμμετέχουμε στην ερευνητική προσπάθεια, μέσω της ανάλυσης δειγμάτων μητρικού πρωτογάλακτος μέσω της χρήσης GC-FID, με σκοπό τον πλήρη προσδιορισμό των λιπαρών οξέων. Η μελέτη αυτή περιλαμβάνει ανίχνευση, ταυτοποίηση και ημιποσοτικοποίηση των λιπαρών οξέων. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε συσχέτιση των λιπαρών οξέων με άλλες σημαντικές και μη μεταβλητές, όπως τα βιομετρικά χαρακτηριστικά των μητέρων και οι συνήθειές τους, μέσω της χρήσης επιβλεπόμενων ή μη στατιστικών προσεγγίσεων (PCA και PLS-DA).

Κεφάλαιο 4. Υλικά-Μέθοδοι

Η προετοιμασία του δείγματος είναι ένα κρίσιμο βήμα στην ανάλυση των λιπαρών οξέων στο ανθρώπινο πρωτόγαλα. Περιλαμβάνει πολλά στάδια, συμπεριλαμβανομένης της συλλογής δειγμάτων, της εκχύλισης λιπιδίων και της παραγωγοποίησης. Η σωστή συλλογή και χειρισμός των δειγμάτων είναι απαραίτητα για τη διασφάλιση ακριβών και αξιόπιστων αποτελεσμάτων.

4.1. Δειγματοληψία πρωτογάλακτος

Δείγματα μητρικού πρωτογάλακτος παραλήφθηκαν στα πλαίσια μίας ευρύτερης ερευνητικής μελέτης για να αναλυθούν ως προς τα λιπαρά οξέα με χρήση αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με ανιχνευτή φλόγας (GC-FID). 38 μοναδικά δείγματα συλλέχθηκαν με τη συγκατάθεση των μητέρων. Οι μητέρες, κατά κύριο λόγο ελληνικής εθνικότητας, είχαν εύρος ηλικιών από 25 έως 52 ετών. Για τα συγκεκριμένα δείγματα δόθηκαν πληροφορίες σχετικά με το είδος του τοκετού, την εβδομάδα κύησης, το φύλο του μωρού αλλά και τον δείκτη μάζας σώματος των μητέρων, τα οποία παρουσιάζονται αναλυτικότερα στον Πίνακα 5 που ακολουθεί.

Πίνακας 5: Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά μητέρων, φύλο νεογνού και είδος τοκετού

Παράμετρος	Δείγματα	%	Παράμετρος	Δείγματα	%
Εθνικότητα			Ηλικία		
Ελληνίδες	28	73,6	25-35	31	81,6
Άλλες	10	26,4	Άνω των 40	7	18,4
BMI			Εβδομάδα κύησης		
Φυσιολογική	18	47,4	>37	30	78,9
Υπέρβαρη/Παχύσαρκη	20	52,6	<37	8	21,1
Φύλο			Είδος τοκετού		
Αγόρι	20	52,6	Φυσιολογικός	34	89,5
Κορίτσι	18	47,4	Καισαρική τομή	4	10,5

Το πρωτόγαλα συλλέχθηκε από τις θηλάζουσες στο Αρεταίειο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο, εντός των πρώτων τεσσάρων εικοσιτετράωρων μετά τον τοκετό, τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένα σωληνάρια και ακολούθησε άμεση κατάψυξη των δειγμάτων σε θερμοκρασία -40°C μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία τους για να αποφευχθεί η οξειδωση και η αποικοδόμηση των λιπιδίων. Για την περαιτέρω ανάλυση ακολουθεί απόψυξη για μισή ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.

4.2. Προετοιμασία δειγμάτων

Για τον προσδιορισμό των λιπαρών οξέων των δειγμάτων του μητρικού πρωτογάλακτος πρέπει να γίνει πρωτίστως σωστή προετοιμασία των δειγμάτων, για να πραγματοποιηθεί ο διαχωρισμός των λιπιδίων από τα υπόλοιπα συστατικά όπως πρωτεΐνες, αμινοξέα, υδρογονάνθρακες κα. Αυτό συνιστά μεγάλη προσοχή, για την αποφυγή μόλυνσης του δείγματος από ξένες ουσίες, αλλά και της ποσοτικής και ποιοτικής υποβάθμισής του.

4.2.1. Ολική Εκχύλιση Λιπιδίων – Μέθοδος Folch

Το χλωροφόρμιο ύστερα από ανάμιξη με μεθανόλη χρησιμοποιείται γενικώς για την εκχύλιση λίπους. Έτσι και στο πείραμά μας, τα ολικά λιπίδια των ομογενοποιημένων δειγμάτων νωπού γάλακτος εκχυλίστηκαν σύμφωνα με μια τροποποίηση της μεθόδου Folch. Αναλυτικότερα, με βάση το πρωτόκολλο, ισχύει ότι σε ένα σωληνάριο Falcon με 1,2 mL γάλακτος προστίθενται 10 mL διαλύματος χλωροφορμίου-μεθανόλης (2:1 κατ' όγκο). Στο πείραμα μετρήθηκαν τα ml του κάθε δείγματος ξεχωριστά και με βάση την αναλογία του πρωτοκόλλου υπολογίστηκαν οι απαιτούμενες ποσότητες διαλύτη.

Στη συνέχεια, το μείγμα ομογενοποιήθηκε σε Vortex για 5 λεπτά και έπειτα φυγοκεντρήθηκε για 15 λεπτά (3.000 rpm) στους 5°C. Λήφθηκε το ανώτερο στρώμα και επαναλήφθηκε η διαδικασία για τα δείγματα που δεν είχαν διακριτό σημείο διαφοράς φάσης. Τα συνδυασμένα υπερκείμενα μεταφέρθηκαν σε σωληνάκια τύπου Falcon και προστέθηκε κατάλληλος όγκος υπερκάθαρου νερού (HPLC grade) σε τελική αναλογία 2:1:0,6 (κατ' όγκο) σε χλωροφόρμιο-μεθανόλη-νερό ή σε τελική αναλογία ώστε το νερό να αποτελεί το 20% της ποσότητας του διαλύτη. Το νέο μείγμα ομογενοποιήθηκε σε Vortex για 5 λεπτά και έπειτα τα σωληνάκια Falcon καλύφθηκαν με parafilm και αφέθηκαν να παραμείνουν σε ηρεμία για ένα εικοσιτετράωρο. Το προκύπτον μίγμα διαχωρίζεται σε δύο διακριτές φάσεις. Η κατώτερη φάση είναι το ολικό καθαρό εκχύλισμα λιπιδίων, το οποίο λαμβάνεται ποσοτικά με τη χρήση πιπέτας και τοποθετείται σε erpendorf tubes των 2ml. Ακολουθεί η εξάτμιση της λιπιδικής στιβάδας μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου. Αφού απομακρυνθεί πλήρως ο πτητικός οργανικός διαλύτης και επιτευχθεί σταθερό βάρος, τότε προσδιορίζεται η περιεκτικότητα σε λιπίδια βαρυμετρικά και τέλος τα δείγματα αποθηκεύονται στους -18°C μέχρι περαιτέρω χρήση.

4.2.2. Μετεστεροποίηση λιπαρών οξέων

Για την ανάλυση με τη συγκεκριμένη μέθοδο, οι προς ανάλυση ουσίες πρέπει να είναι αρκετά πτητικές και σταθερές σε υψηλές θερμοκρασίες. Σε αντίθετη περίπτωση διασπώνται ή και εμφανίζουν πολικότητα και αυτό δυσκολεύει σε μεγάλο βαθμό το διαχωρισμό τους. Έτσι, τα προσδιοριζόμενα λιπαρά οξέα πρέπει αρχικά να μετατραπούν σε πτητικά συστατικά, δηλαδή χρειάζεται πλήρης μετατροπή σε μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων (Fatty Acids Methyl Esters - FAMES). Σαν αποτέλεσμα λαμβάνονται μικρότερα, πτητικά και απλούστερα στη δομή τους λιπίδια.

Για την παραγωγή μεθυλεστέρων, επιλέχθηκε η αλκαλική υδρόλυση των δειγμάτων με χρήση μεθανολικού διαλύματος υδροξειδίου του καλίου (KOH/MeOH). Λήφθηκε ποσότητα της τάξεως των 50 mg λίπους από κάθε δείγμα και σε αυτό προστέθηκε: 0,1 ml διαβρωτικού διαλύματος υδροξειδίου του καλίου σε μεθανόλη, 0,5 ml εξάνιο (μη πολικός πτητικός διαλύτης) και το διάλυμα αναμίχθηκε για 2 λεπτά σε αναδευτήρα στροβιλισμού τύπου Vortex. Προστέθηκε ελάχιστη ποσότητα άνυδρου θειικού νατρίου (Na_2SO_4), που χρησιμοποιείται ως αδρανές ξηραντικό για την αφαίρεση νερού από οργανικό διάλυμα και αφήθηκε για 25 λεπτά. 1ml από το παραγόμενο διάλυμα εισάγεται στον αέριο χρωματογράφο (GC-FID) και ακολουθεί ο προσδιορισμός και η επακόλουθη ταυτοποίηση των λιπαρών οξέων μετά από σύγκριση με πρότυπες ουσίες (Sinanoglou & Miniadis-Meimaroglou, 1998).

4.3. Αντιδραστήρια, Υλικά και Όργανα

Πίνακας 6: Υλικά και αντιδραστήρια

Υλικά και Αντιδραστήρια	Ποσότητες
Χλωροφόρμιο	73.5 mL
Μεθανόλη	36.5 mL
Υπερκάθαρο νερό HPLC	22.0 mL
Μεθανολικό διάλυμα υδροξειδίου του καλίου KOH	0.10 mL
Εξάνιο	0.75 mL
Θειικό Νάτριο (άνυδρο)	ελάχιστη

Υλικά και όργανα:

- Αέριος χρωματογράφος συζευγμένος με ανιχνευτή φλόγας GC – FID
- Συσκευή φυγοκέντρωσης
- Αναδευτήρας τύπου vortex
- Πιπέτες αυτόματης πλήρωσεως 10-100μl και 100-1000μl
- Ρύγχη πιπετών (tips)
- Σωλήνες τύπου falcon
- Σωλήνες τύπου erpendorf
- Ταινία parafilm

4.4. Επιλογή συνθηκών και προετοιμασία αέριου χρωματογράφου

Όσον αφορά τη διάταξη του αέριου χρωματογράφου αυτή αφορούσε τη σύζευξη του με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (GC-FID) της εταιρίας Agilent Technologies, ενώ για τον διαχωρισμό των λιπαρών οξέων χρησιμοποιήθηκε τριχοειδής στήλη DB- 23 (60m × 0,25 mm i.d. 0,15μm^o 1m). Η διάταξη GC-FID που χρησιμοποιήθηκε είναι της εταιρίας Agilent Technologies, με αριθμό μοντέλου 6890N και σειριακό αριθμό CN10546090, που φαίνεται στην Εικόνα 8.



Εικόνα 7: Αέριος χρωματογράφος εργαστηρίου

Στη συνέχεια, έγινε η επιλογή του θερμοκρασιακού προγράμματος του φούρνου. Πιο συγκεκριμένα, εφαρμόστηκε θερμοκρασιακό πρόγραμμα με αρχική θερμοκρασία ίση με 100°C, η οποία αυξήθηκε στους 150°C, με ρυθμό 10°C/min. Έπειτα, αυξήθηκε μέχρι τους 195°C με ρυθμό 2°C/min και διατηρήθηκε σταθερή για 5 λεπτά. Ύστερα αυξήθηκε στους 240°C με ρυθμό 10°C/min όπου διατηρήθηκε σταθερή για άλλα 5 λεπτά. Η ροή του φέροντος αερίου (ήλιο) ήταν ίση με 2 mL/min. Η συνολική διάρκεια της ανάλυσης για κάθε δείγμα, αφού πρώτα το όργανο παρέμεινε σε εξισορρόπηση των συνθηκών του, ήταν περισσότερα από 55 λεπτά, ωστόσο η ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε εντός τριών εβδομάδων σε σταθερές συνθήκες. Οι παράμετροι του αερίου χρωματογράφου που αναφέρθηκαν στην παρούσα παράγραφο, παρατίθενται συγκεντρωμένοι στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7: Παράμετροι αερίου χρωματογράφου

Παράμετρος	Τιμή
Αρχική θερμοκρασία στο φούρνο (°C)	100
Τελική θερμοκρασία στο φούρνο (°C)	240
Ρυθμός εναλλαγής θερμοκρασίας 1 (°C/min)	10
Ρυθμός εναλλαγής θερμοκρασίας 2 (°C/min)	2
Ρυθμός εναλλαγής θερμοκρασίας 3 (°C/min)	10
Ροή φέροντος αερίου (mL/min)	2
Διάρκεια κάθε ανάλυσης (min)	55

4.5. Ανάλυση - Ταυτοποίηση λιπαρών οξέων με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας

Η ταυτοποίηση των λιπαρών οξέων βασίστηκε σε 2 διαφορετικές προσεγγίσεις, οι οποίες συνολικά επιβεβαίωσαν την παρουσία των λιπαρών οξέων στα δείγματα. Αρχικά, συγκρίθηκε ο χρόνος έκλουσης των οξέων με αυτούς του Πίνακα 8, που επισυνάπτεται παρακάτω (Sinanoglou, 2013). Ωστόσο, επειδή με την πάροδο των ετών το όργανο συντηρείται μειώνοντας το μήκος της στήλης ενδεχομένως ο χρόνος έκλουσης σε ορισμένα λιπαρά οξέα να μειώνεται ελαφρώς. Έτσι σε δεύτερη φάση, μέσω in-house αξιολόγησης με δείγμα αναφοράς, συγκρίθηκαν οι νέοι χρόνοι με αυτούς του Πίνακα 8 και καταγράφηκαν οι αποκλίσεις όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 9. Αυτή η δεύτερη σύγκριση ήταν ιδιαίτερα σημαντική καθώς το κόσψιμο της στήλης κατά την ανά διαστήματα συντήρηση του οργάνου μείωσε το συνολικό μήκος της και ενδεχομένως να μετατόπισε ελαφρώς τα λιπαρά οξέα σε μικρότερους χρόνους έκλουσης. Συνολικά στα δείγματα ανιχνεύθηκαν και ταυτοποιήθηκαν τριάντα (32) διαφορετικά λιπαρά οξέα συμπεριλαμβανομένων 12 κορεσμένων (SFAs), 10 μονοακόρεστων (MUFAs) και 10 πολυακόρεστων (PUFAs).

Όσον αφορά τη σειρά έκλουσης των λιπαρών οξέων, αυτή είναι ανάλογη του μήκους της ανθρακικής τους αλυσίδας. Πιο συγκεκριμένα, τα περισσότερα πολικά λιπαρά οξέα (μικρό μήκος ανθρακικής αλυσίδας) εκλύονται πρώτα και στη συνέχεια ακολουθούν τα λιγότερα πολικά (μεγαλύτερο μήκος ανθρακικής αλυσίδας). Στο διαχωρισμό ωστόσο συνεισφέρει και το θερμοκρασιακό πρόγραμμα το οποίο επιλέχθηκε καθώς τα λιπαρά οξέα μεγαλύτερης αλυσίδας απαιτούν αύξηση της θερμοκρασίας έτσι ώστε να περάσουν στην αέρια φάση (Sinanoglou et al., 2013).

Πίνακας 8: Χρόνος κατακράτησης και συντελεστές απόκρισης FAME

Πηγή: Sinanoglou, V. J., Strati, I. F., Bratakos, S. M., Proestos, C., Zoumpoulakis, P., & Miniadis-Meimaroglou, S. (2013). On the combined application of Iatroscan TLC-FID and GC-FID to identify total, neutral, and polar lipids and their fatty acids extracted from foods. *International Scholarly Research Notices*, 2013.

A/A	FAME	Rt (min)	Rf (split ratio 1 : 2)				
1	C4:0	4.200-4.405	0.37369 ± 0.00613	26	C18:1 ω-7 cis	22.749-22.909	0.32299 ± 0.00323
2	C6:0	4.580-4.760	0.37436 ± 0.00628	27	C18:2 ω-6 cla	23.011-23.301	0.32597 ± 0.00337
3	C8:0	5.438-5.808	0.38637 ± 0.00043	28	C18:2 ω-6 t9, t11	23.314-23.301	0.32597 ± 0.00337
4	C10:0	6.897-7.158	0.35074 ± 0.00134	29	C18:2 ω-6 cis	23.671-23.951	0.32122 ± 0.00311
5	C10:1	7.325-7.579	0.35074 ± 0.00134	30	C18:3 ω-6 cis	24.488-24.764	0.32818 ± 0.00318
6	C11:0	7.877-8.088	0.34422 ± 0.00189	31	C18:3 ω-3 cis	25.434-25.721	0.29582 ± 0.00282
7	C12:0	9.064-9.251	0.33555 ± 0.00149	32	C18:4 ω-3 cis	26.305-26.515	0.29582 ± 0.00282
8	C13:0	10.484-10.641	0.32852 ± 0.00054	33	C19:0	27.336-27.492	0.34611 ± 0.00491
9	C14:0	12.168-12.398	0.32561 ± 0.00068	34	C20:0	27.492-27.653	0.34611 ± 0.00491
10	C14:1	12.954-13.131	0.32998 ± 0.00015	35	C20:1 ω-9 cis	28.042-28.485	0.33910 ± 0.00490
11	Iso-C15:0	13.556-13.685	0.33183 ± 0.00018	36	C20:2 ω-6 cis	29.660-29.867	0.32028 ± 0.00444
12	Anteiso-C15:0	13.782-13.956	0.33183 ± 0.00018	37	C20:3 ω-6 cis	30.528-30.660	0.33346 ± 0.00356
13	C15:0	14.148-14.354	0.33183 ± 0.00018	38	C20:4 ω-6 cis	31.235-31.508	0.34295 ± 0.00620
14	C15:1 ω-5	15.064-15.274	0.32497 ± 0.00054	39	C20:3 ω-3 cis	31.888-32.037	0.33598 ± 0.00527
15	C16:0	16.400-16.791	0.32226 ± 0.00096	40	C21:0	32.964-33.282	0.37696 ± 0.00544
16	Iso-C16:0	16.978-17.162	0.32226 ± 0.00096	41	C20:5 ω-3 cis	33.675-34.151	0.33962 ± 0.00476
17	C16:1 ω-9 (cis)	17.212-17.394	0.32717 ± 0.00102	42	C22:0	34.329-34.598	0.36969 ± 0.00904
18	Iso-C17:0	18.465-18.588	0.41283 ± 0.00352	43	C22:1 ω-9 cis	36.285-36.361	0.34866 ± 0.00589
19	Anteiso-C17:0	18.612-18.688	0.41283 ± 0.00352	44	C22:1 ω-11 cis	36.534-36.892	0.34866 ± 0.00589
20	Cyclo-C17:0	18.705-18.855	0.41283 ± 0.00352	45	C22:2 ω-6 cis	37.633-37.753	0.34738 ± 0.00604
21	C17:0	18.948-19.100	0.41283 ± 0.00352	46	C23:0	37.979-38.308	0.38454 ± 0.00781
22	C17:1 ω-7	19.728-19.994	0.31718 ± 0.00197	47	C22:4 ω-6 cis	38.527-38.743	0.34295 ± 0.00620
23	C18:0	21.573-22.000	0.33312 ± 0.00352	48	C22:5 ω-6 cis	39.855-40.198	0.34295 ± 0.00620
24	C18:1 ω-9 trans	22.000-22.285	0.32846 ± 0.00342	49	C22:5 ω-3 cis	40.386-40.822	0.34295 ± 0.00620
25	C18:1 ω-9 cis	22.285-22.668	0.32299 ± 0.00323	50	C24:0	42.544-42.703	0.40016 ± 0.00753
				51	C22:6 ω-3 cis	43.255-44.162	0.34295 ± 0.00620
				52	C24:1 ω-9 cis	44.162-44.392	0.35047 ± 0.00748

Πίνακας 9: Χρόνος κατακράτησης FAME

A/A	FAME	RT	A/A	FAME	RT
1	C8:0	5.8-6	21	C18:1 ω-7	22.2-22.3
2	C10:0	6.1-7.2	22	C18:2 ω-6 cis	23.3-23.9
3	C10:1	7.3-7.6	23	C18:3 ω-6 cis	24.4-24.7
4	C11:0	7.8-8.1	24	C18:3 ω-3 cis	25-25.7
5	C12:0	9-9.8	25	C18:4 ω-3 cis	26.3-26.5
6	C13:0	10.3-10.8	26	C19:0	27-27.4
7	C14:0	11.8-12.3	27	C20:0	27.5-27.8
8	C14:1	12.4-12.6	28	C20:1 ω-9	28-28.5
9	Anteiso-C15:0	13.7-14	29	C20:2 ω-6 cis	29.2-29.8
10	C15:0	14.1-14.7	30	C20:3 ω-6 cis	30.5-30.6
11	C15:1 ω-5	15-15.3	31	C20:4 ω-6 cis	31.2-31.5
12	C16:0	16.1-16.5	32	C20:5 ω-3 cis	33.6-34.1
13	iso-C16:0	16.5-16.7	33	C22:0	34.3-34.6
14	C16:1 ω-9	16.8-17.1	34	C22:1 ω-11 cis	36.5-36.8
15	iso-C17:0	18.2-18.6	35	C22:2 ω-6 cis	37.6-37.7
16	anteiso -C17:0	18.6-18.7	36	C23:0	37.9-38.3
17	C17:0	18.9-19.3	37	C22:4 ω-6 cis	38.5-38.7
18	C17:1 ω-7	19.7-19.9	38	C22:5 ω-6 cis	39.4-40.2
19	C18:0	20.7-21.6	39	C24:0	42.3-42.7
20	C18:1 ω-9	22.0-22.2	40	C22:6 ω-3 cis	43.0-44.1
			41	C24:1 ω-9 cis	44.1-44.5

Μετά την ανάλυση, ακολούθησε η εξαγωγή των δεδομένων από το μηχάνημα. Τα προκύπτοντα αρχεία έχουν τη μορφή CSV και τα δεδομένα που λαμβάνονται αφορούν όλα τα σήματα που καταγράφονται από τον ανιχνευτή. Πιο συγκεκριμένα, τα δεδομένα αφορούν το χρόνο έκλουσης του σήματος, το εμβαδό κορυφής καθώς και την έναρξη, το μέσο και το τέλος του εύρους κάθε κορυφής. Στο ίδιο αρχείο, εφαρμόζοντας τη προσέγγιση ταυτοποίησης που αναφέρθηκε παραπάνω ταυτοποιούνται οι χρόνοι έκλουσης και στη συνέχεια ποσοτικοποιείται κάθε κορυφή. Πιο συγκεκριμένα, ο προσδιορισμός είναι ημι-ποσοτικός καθώς εξάγεται η % περιεκτικότητα κάθε λιπαρού οξέος. Για τον υπολογισμό εκτός από το εμβαδό κορυφής λαμβάνονται υπόψη και οι τιμές Response Factor, οι οποίοι είναι μοναδικοί για κάθε οξύ και έχουν προέλθει από μια επίπονη διαδικασία κατασκευής πρότυπων καμπυλών για το κάθε οξύ. Οι τιμές Rf ελήφθησαν από τον Πίνακα 8 (Sinanoglou et al., 2013).

4.6. Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Στο σύνολο τους, οι πληροφορίες που μπορούν να προκύψουν από την GC-FID ανάλυση, είναι ογκώδεις, σύνθετες, ενώ ο χειρισμός και η εξαγωγή αποτελεσμάτων μπορεί να είναι δύσκολη και ιδιαίτερα απαιτητική. Για αυτό το λόγο σε τέτοιου είδους δεδομένα εφαρμόζονται στατιστικές προσεγγίσεις που ανήκουν στο κλάδο της Χημειομετρίας. Τέτοιες προσεγγίσεις είναι και οι πολυπαραμετρικές στατιστικές αναλύσεις (multivariate statistical analysis) που ως στόχο έχουν τον εντοπισμό διαφοροποιήσεων εντός των πληροφοριών βρίσκοντας όχι μόνο ένα μοτίβο συσχέτισης αλλά και ενδεχομένως κάποιο βιολογικό νόημα πίσω από αυτό. Οι δυο βασικότερες προσεγγίσεις στις οποίες μπορεί να βασιστεί η πολυπαραμετρική ανάλυση είναι οι μη επιβλεπόμενες (unsupervised) και οι επιβλεπόμενες (supervised). Οι διαφορές των δυο αυτών προσεγγίσεων έγκειται στη συλλογή και αξιοποίηση πληροφοριών που σχετίζονται με τα δείγματα. Πιο συγκεκριμένα, στις μη επιβλεπόμενες προσεγγίσεις κατά την ανάλυση δεν παρέχεται καμία πληροφορία για τα δείγματα και ενδεχομένως θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό τους, ενώ αντίθετα στις επιβλεπόμενες προσεγγίσεις υπάρχουν διαθέσιμες πληροφορίες για τα δείγματα, οι οποίες εισάγονται εκ των προτέρων με σκοπό το διαχωρισμό τους.

Με πιο απλά λόγια, οι μη επιβλεπόμενες τεχνικές χρησιμοποιούνται για τον εντοπισμό τάσεων ή την αποκάλυψη ακραίων τιμών, ενώ οι επιβλεπόμενες τεχνικές πάνε ένα βήμα παραπέρα προσπαθώντας να συσχετίσουν τις διαθέσιμες πληροφορίες με πρόσθετα δεδομένα έχοντας ως βασικό στόχο το διαχωρισμό τους. Γενικά, πριν την εκτέλεση τέτοιων πολυπαραμετρικών αναλύσεων συνίσταται η μετατροπή των δεδομένων σε όσο το δυνατόν πιο συγκρίσιμη κλίμακα (scaling). Αν και δεν υπάρχει κάποιος γενικός κανόνας ή συγκεκριμένη οδηγία, στη περίπτωση των GC-FID δεδομένων εφαρμόσθηκε μια αυτόματη τέτοιου είδους παραμετροποίηση (auto scaling). Τέλος τόσο οι μη-επιβλεπόμενες όσο και οι επιβλεπόμενες προσεγγίσεις πραγματοποιήθηκαν στη δωρεάν και διαδικτυακά διαθέσιμη πλατφόρμα του MetaboAnalyst 5.0.

4.6.1. Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA)

Η συγκεκριμένη προσέγγιση γνωστή και ως Principal Component Analysis (PCA) εντάσσεται στις μη επιβλεπόμενες πολυπαραμετρικές τεχνικές. Στόχος της είναι τα δεδομένα που χρησιμοποιούνται και περιέχουν το σύνολο των ενδιαφερόμενων μεταβλητών (στη δική μας περίπτωση τα λιπαρά οξέα) να αποτυπωθούν υπό τη μορφή βασικών συνιστωσών. Ουσιαστικά οι συνιστώσες αυτές αντικατοπτρίζουν το ποσοστό διακύμανσης μέσα στο οποίο μπορούν να εξηγηθούν οι συλλεγόμενες πληροφορίες με τη κύρια συνιστώσα να χαρακτηρίζεται από υψηλότερη τιμή.

4.6.2. Ανάλυση διάκρισης ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA)

Σε αντίθεση με τη PCA, πρόκειται για μια επιβλεπόμενη τεχνική όπου παρέχονται πληροφορίες συνήθως για τη κατηγοριοποίηση των δειγμάτων (π.χ. τελειόμηνα vs πρόωρα νεογνά) θέτοντας ως στόχο τη βέλτιστη διάκριση των επιλεγμένων ομάδων.

4.6.3. Αξιολόγηση και επικύρωση πολυπαραμετρικών στατιστικών αναλύσεων

Η επικύρωση των παραγόμενων στατιστικών μοντέλων πραγματοποιείται μέσω της αξιολόγησης συγκεκριμένων ποιοτικών παραμέτρων που τα συνοδεύουν. Βασική παράμετρος αποτελεί η ακρίβεια του μοντέλου, η οποία είναι επιθυμητό να έχει τιμές μεγαλύτερες του 0,85 δηλαδή του 85%. Δυο ακόμη σημαντικές παράμετροι οι οποίες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο είναι το Q^2 και το R^2 . Η πρώτη παράμετρος ουσιαστικά αφορά τη προβλεψιμότητα του μοντέλου, δηλαδή το ποσοστό επιτυχίας του μοντέλου αναφορικά με τη κατάταξη ενός άγνωστου δείγματος βάσει μόνο των τιμών των μεταβλητών του (π.χ. των λιπαρών οξέων). Η δεύτερη παράμετρος αφορά το δείκτη καλής προσαρμογής των δεδομένων μας (goodness of fit). Αξιόπιστα και επικυρωμένα θεωρούνται τα στατιστικά μοντέλα των οποίων οι τιμές Q^2 και R^2 είναι μεγαλύτερες από 0,5 ενώ η μεταξύ τους διαφορά δεν υπερβαίνει το 0,3.

Κεφάλαιο 5. Αποτελέσματα-Συζήτηση

5.1. Γενικό προφίλ λιπαρών οξέων δειγμάτων

Η ανάλυση με GC-FID των ολικών λιπιδίων του πρωτογάλακτος αποκάλυψε την παρουσία 32 λιπαρών οξέων (FAs). Τα κύρια λιπαρά οξέα που προσδιορίστηκαν ήταν το παλμιτικό, το στεαρικό, το ελαϊκό και το λινολεϊκό. Τα κορεσμένα λιπαρά οξέα (SFAs) αποτέλεσαν περίπου το 41,66% των συνολικών λιπαρών οξέων, με το μεγαλύτερο ποσοστό να κατέχουν το παλμιτικό οξύ με 24,7% και το στεαρικό με 4,65%. Άλλα κορεσμένα λιπαρά οξέα που εντοπίστηκαν σε μικρές όμως αναλογίες ήταν τα C15:0 (0,26%), iso C16:0 (0,39%) και anteiso C17:0 (0,17), ενώ ενδιαφέρον αποτελεί και η ανίχνευση σημαντικής ποσότητας (2,21%) του iso C17:0 λιπαρού οξέος. Επιπλέον, τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFAs) ήταν και αυτά σε αφθονία αντιπροσωπεύοντας το 41,52% του ολικού ποσοστού των λιπαρών οξέων με κυρίαρχο το ελαϊκό C18:1 ω-9 λιπαρό οξύ (35,9%). Συνολικά, MUFAs και SFAs φαίνεται πως δεν έχουν σημαντικές διαφορές ως προς το τοις % τους περιεχόμενο.

Αναφορικά με τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs), αυτά βρέθηκαν σε ποσοστό 11,16%, με τα βασικότερα να είναι το λινελαϊκό οξύ (7,98%) και το δοκοσαεξανοϊκό οξύ (περίπου 1%).

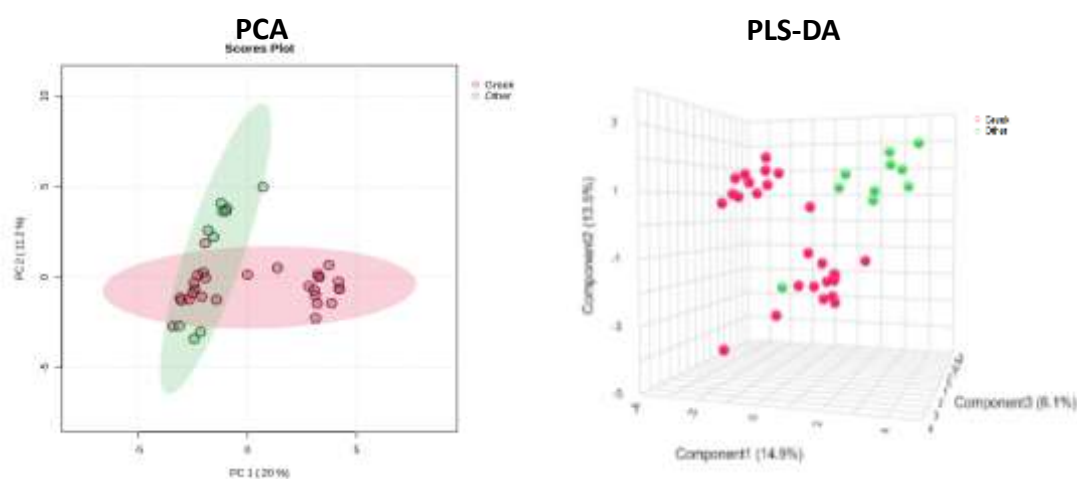
Το ποσοστό των ω-6 λιπαρών οξέων υπολογίστηκε στο 9,66%, ενώ των ω-3 λιπαρών οξέων στο 1,49%. Οι αναλογίες ω-6 προς ω-3 ήταν περίπου 6,5%, μονοακόρεστων προς κορεσμένων (MUFAs/SFAs) 1,0%, πολυακόρεστων προς κορεσμένων (PUFAs/SFAs) 0,27% όπως και των μονοακόρεστων προς πολυακόρεστων (MUFAs/PUFAs) 3,72%. Όλα τα παραπάνω απεικονίζονται αναλυτικά στον Πίνακα 10.

Πίνακας 10: Μέσοι όροι λιπαρών οξέων 38 μετρήσεων μητρικού πρωτογάλακτος (% w/w) και τυπική απόκλιση (standard deviation) (n=38 δείγματα).

Λιπαρό Οξύ	% w:w	Τυπική Απόκλιση	Λιπαρό Οξύ	% w:w	Τυπική Απόκλιση
C10:0	1,82	0,92	C20:0	0,97	0,10
C12:0	2,33	0,08	C20:1 ω9 cis	0,42	0,10
C14:0	3,87	0,09	C20:2 ω6 cis	0,34	0,05
C14:1	0,12	0,00	C20:3 ω6 cis	0,57	0,03
iso C15:0	0,00	0,00	C20:4 ω6 cis	0,70	0,00
C15:0	0,26	0,06	C20:5 ω3 cis	0,02	0,00
C15:1 ω5	0,46	0,32	C22:1 ω9 cis	0,04	0,00
C16:0	24,70	1,97	C22:1 ω11 cis	0,15	0,05
iso C16:0	0,39	0,42	C22:4 ω6 cis	0,03	0,01
C16:1 ω9	0,72	0,11	C22:5 ω6 cis	0,05	0,00
iso C17:0	2,21	0,09	C24:0	1,23	0,00
anteiso C17:0	0,17	0,01	C22:6 ω3 cis	1,16	0,23
C17:1 ω7 cis	0,19	0,01	SFA	41,66	2,26
C18:0	4,65	0,73	MUFA	41,52	0,84
C18:1 ω9 trans	2,22	0,80	PUFA	11,16	0,56
C18:1 ω9 cis	35,90	1,55	ω6	9,66	0,08
C18:1 ω7 cis	1,31	0,17	ω3	1,49	0,05
C18:2 ω6 cis	7,98	0,45	ω6/ω3	6,50	
C18:3 ω3 cis	0,24	0,02	MUFA/SFA	1,00	
C18:4 ω3 cis	0,08	0,02	PUFA/SFA	0,27	
C19:0	0,02	0,00	MUFA/PUFA	3,72	

5.2. Διερεύνηση της επίδρασης βιομετρικών παραγόντων στο λιπιδικό προφίλ

5.2.1. Εθνικότητα

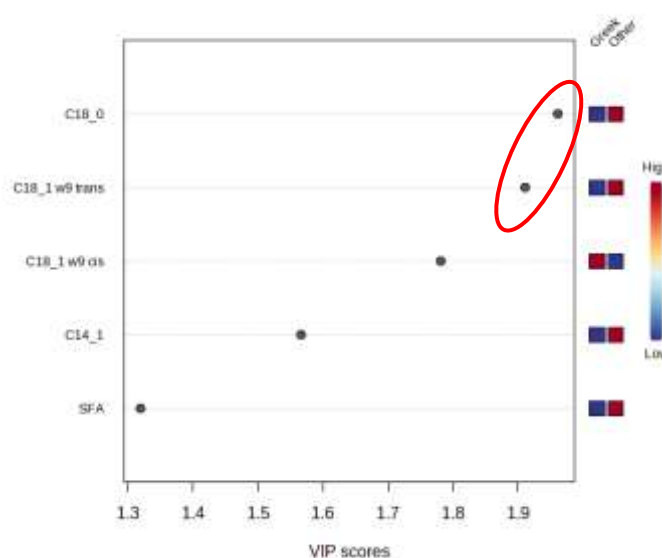


Εικόνα 8: Στατιστικό μοντέλο PCA (αριστερά) και PLS-DA (δεξιά) με βασική παράμετρο την εθνικότητα των εξεταζόμενων μητέρων

Στο γράφημα της PCA, τα δείγματα με κόκκινο χρώμα αντιστοιχούν σε μητέρες ελληνικής καταγωγής (N=28) ενώ τα πράσινα σε μητέρες άλλων εθνικοτήτων (N=10). Λόγω του μικρού αριθμού των δειγμάτων άλλων εθνικοτήτων, θεωρήθηκε καλύτερο να μην υποδιαιρεθούν σε επιμέρους κατηγορίες (5 αλβανικής, 3 φιλιπινέζικης και 2 ρουμανικής), καθώς θα ήταν πιο δύσκολη η εξαγωγή συμπερασμάτων. Στην Εικόνα 8, όπου παρατηρούμε αριστερά το διάγραμμα της PCA, φαίνεται ότι υπάρχει μια τάση διαχωρισμού των δειγμάτων ως προς την πρώτη κύρια συνιστώσα (PC1) (δεξιά και αριστερά του 0). Για το λόγο αυτό, προχωρήσαμε σε περαιτέρω με εφαρμογή διαχωριστικής ανάλυσης (Εικόνα 8 δεξιό γράφημα), η οποία επαλήθευσε την προηγούμενη τάση σχετικά με τη διαφορά των δειγμάτων με βάση τον παράγοντα της εθνικότητας.

PLS-DA cross validation details:

Measure	1 comps	2 comps	3 comps	4 comps	5 comps
Accuracy	0.87143	0.92143	0.82143	0.82143	0.82143
R ²	0.60412	0.76631	0.88702	0.92794	0.94678
Q ²	0.28808	0.39344	0.42535	0.39782	0.40272

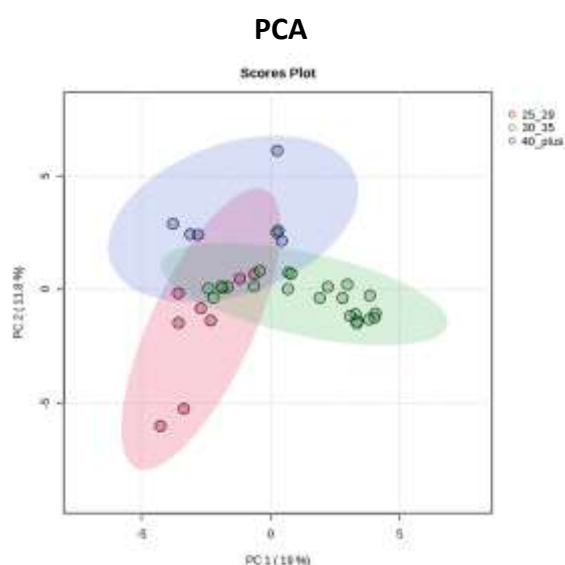


Εικόνα 9: Διάγραμμα VIP Scores κυριότερων λιπαρών οξέων που οφείλονται για τον διαχωρισμό με βάση την εθνικότητα των μητέρων. Παράμετροι: ακρίβεια του μοντέλου (accuracy), δείκτης καλής προσαρμογής των δεδομένων (R²) και δείκτης προβλεψιμότητας (Q²)

Το τρισδιάστατο μοντέλο επικυρώνεται με βάση τα ποιοτικά χαρακτηριστικά που παρουσιάζονται στο πάνω αριστερά μέρος της Εικόνας 9 (Ακρίβεια 82%, R² 0,88 και Q² 0,42). Συνεχίζοντας, ο διαχωρισμός των δειγμάτων οφείλεται κυρίως σε δύο λιπαρά οξέα, το στεαρικό (C18:0) και το trans-9-δεκαοκταενοϊκό οξύ (C18:1 ω9 trans) όπως φαίνεται και από την Εικόνα 9 (δεξιά) που δείχνει τα χαρακτηριστικά οξέα που έχουν τον μεγαλύτερο αντίκτυπο στον διαχωρισμό. Πιο συγκεκριμένα, τόσο το C18:0 όσο και το C18:1 ω-9 trans βρίσκονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στα δείγματα των θηλαζουσών μη ελληνικής καταγωγής σε σχέση με των Ελληνίδων.

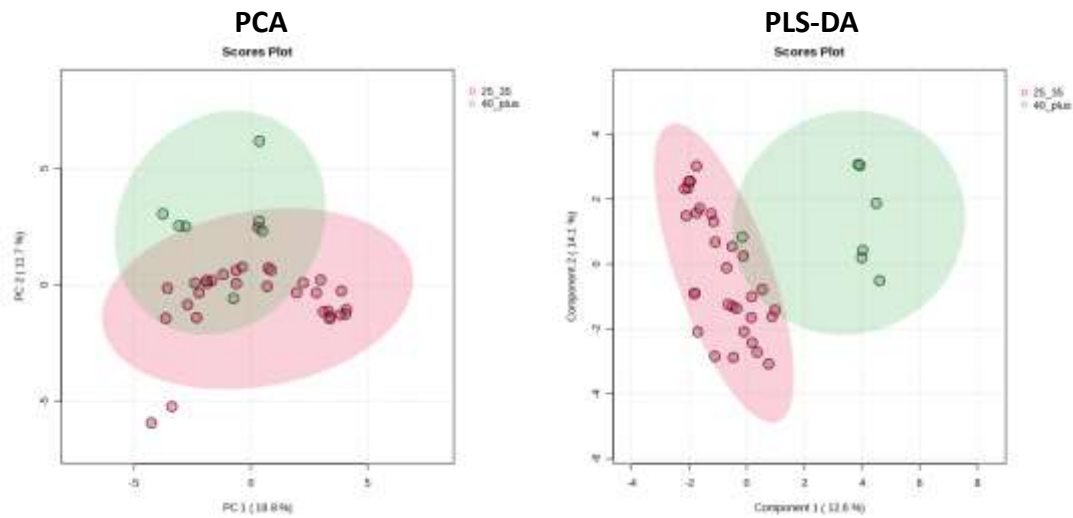
5.2.2. Ηλικία

Η μήτρα δεδομένων αναφορικά με την επίδραση της ηλικίας στο προφίλ των λιπαρών οξέων είχε αρχικά διακριθεί σε 3 ομάδες. Από την πρώτη λοιπόν δοκιμή ανάλυσης κύριων συνιστωσών (Εικόνα 10) όπου τα δείγματα χωρίστηκαν σε τρεις κατηγορίες ηλικιακών ομάδων, παρατηρούμε πως αν τα δείγματα από μητέρες με ηλικία μεταξύ 25-29 (κόκκινα) και 30-35 (πράσινα) γίνουν μία ομάδα ενδεχομένως να υπάρχει καλύτερος διαχωρισμός με τα υπόλοιπα δείγματα των άνω των 40 ετών (μπλε). Επομένως, δημιουργήθηκε μια νέα μήτρα δεδομένων με δυο ομάδες αυτή τη φορά, συμπεριλαμβάνοντας τις γυναίκες 25-35 (N=31) ως μια ομάδα και αυτές άνω των 40 ως μια δεύτερη διαφορετική (N=7).



Εικόνα 10: Πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση PCA με βασική παράμετρο την ηλικία των εξεταζόμενων μητέρων (3 κατηγορίες)

Τα νέα μοντέλα PCA και PLS-DA παρουσιάζονται στην Εικόνα 11. Αυτή τη φορά εστιάζοντας στην PCA (αριστερά) παρατηρείται ένα ισχυρό μοτίβο διαφοροποίησης ως προς τη δεύτερη κύρια συνιστώσα δηλαδή εκατέρωθεν του οριζόντιου άξονα γεγονός που υποδηλώνει ότι η κατηγοριοποίηση σε 2 ομάδες ευνόησε την ισχυροποίηση του μοντέλου. Πιο συγκεκριμένα, οι γυναίκες άνω των 40 (πράσινες κουκίδες) τοποθετήθηκαν άνω του 0, ενώ αυτές μεταξύ 25_35 (κόκκινες κουκίδες) κάτω του 0. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε διαχωριστική ανάλυση από την οποία προέκυψε ξανά ο διαχωρισμός. Συγκεκριμένα, με εξαίρεση ένα δείγμα, επιτυγχάνεται πλήρης διαχωρισμός των δύο ομάδων.

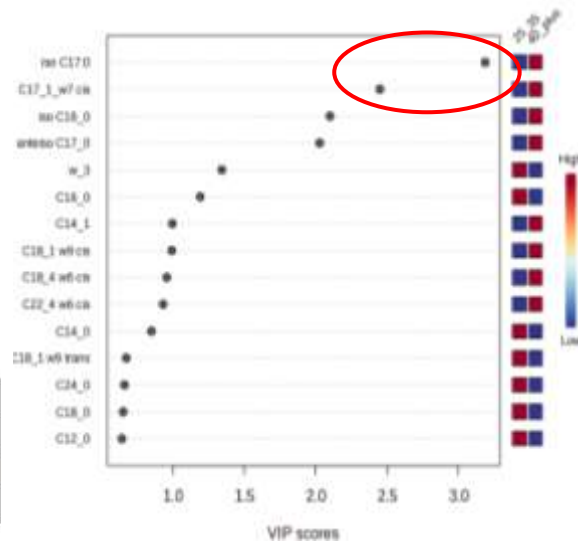


Εικόνα 11: Στατιστικό μοντέλο PCA (αριστερά) και PLS-DA (δεξιά) με βασική παράμετρο την ηλικία των εξεταζόμενων μητέρων (2 κατηγορίες)

Συνολικά το μοντέλο επικυρώνεται με ακρίβεια άνω του 90% και ικανοποιητικές τιμές για Q^2 και R^2 . Παρόλο που στις τιμές VIP plot υπάρχουν περισσότερα από 10 λιπαρά οξέα με τιμή πάνω από 1, ξεχωρίζουν το iso C17:0 και το C17:1 ω-7, τα οποία εμφάνισαν τιμές μεγαλύτερες του 2,5. Και τα δύο αυτά λιπαρά οξέα όπως φαίνεται από διάγραμμα στα δεξιά της Εικόνας 12 διαδραμάτισαν σημαντικότερο ρόλο στη ταξινόμηση των δειγμάτων των μητέρων άνω των 40 ετών. Πράγματι αυτό επιβεβαιώνεται και από τις ενδιάμεσες μέσες τιμές σε αυτά τα λιπαρά οξέα, καθώς τόσο το iso C17:0 όσο και το C17:1 ήταν σημαντικά υψηλότερα σε αυτές.

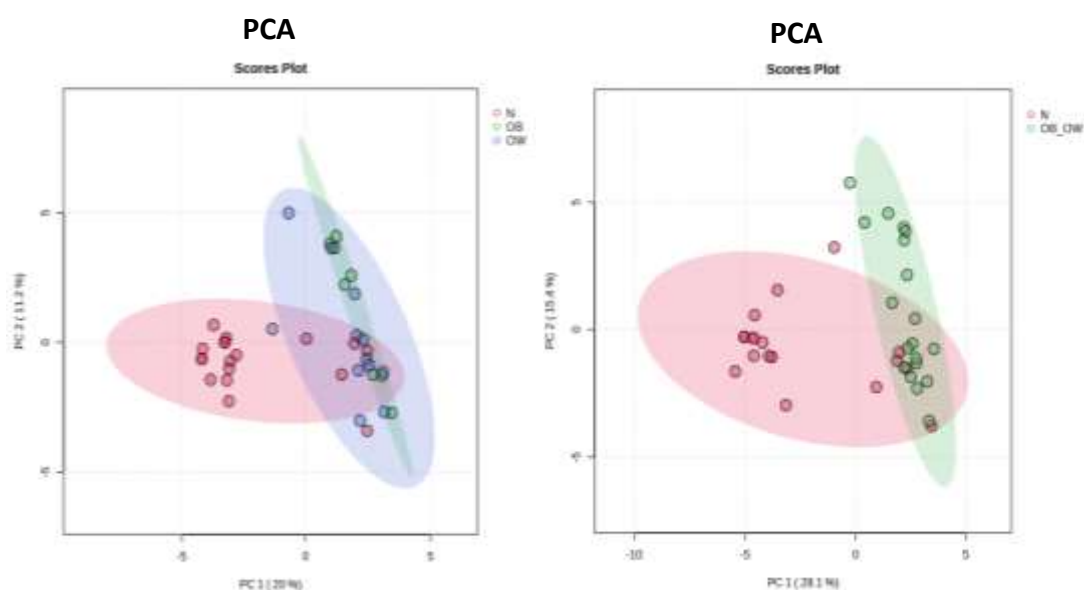
PLS-DA cross validation details:

Measure	1 comps	2 comps	3 comps	4 comps	5 comps
Accuracy	0.94643	0.94286	0.91786	0.91786	0.91786
R2	0.69961	0.80325	0.88426	0.92776	0.95863
Q2	0.46921	0.5727	0.58404	0.58359	0.57516



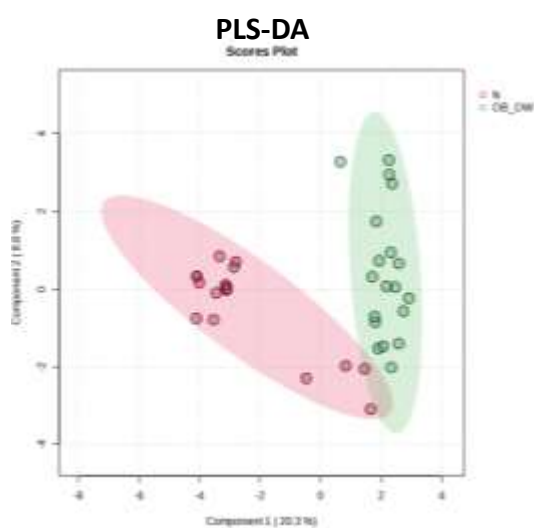
Εικόνα 12: Διάγραμμα VIP Scores κυριότερων λιπαρών οξέων που οφείλονται για τον διαχωρισμό με βάση την ηλικία των μητέρων. Παράμετροι: ακρίβεια του μοντέλου (accuracy), δείκτης καλής προσαρμογής των δεδομένων (R^2) και δείκτης προβλεψιμότητας (Q^2)

5.2.3. BMI μητέρας



Εικόνα 13: Στατιστικά μοντέλα PCA με βασική παράμετρο τον δείκτη μάζας σώματος (BMI) των εξεταζόμενων μητέρων ομαδοποιημένες σε 3 κατηγορίες (αριστερά) και σε 2 κατηγορίες (δεξιά)

Όπως παρατηρούμε στην Εικόνα 13, οι χαρακτηριζόμενες ως παχύσαρκες με BMI: >30 (πράσινα, OB) και οι υπέρβαρες μητέρες με BMI: 25-30 (μπλε, OW) ομαδοποιούνται μαζί και επομένως ενσωματώνουμε τα δείγματα σε μια ομάδα. Έτσι, στο δεύτερο μοντέλο της PCA παρουσιάζεται μία πιο ξεκάθαρη τάση διαχωρισμού των μητέρων με φυσιολογικό βάρος σε σύγκριση με της υπέρβαρες ή παχύσαρκες μητέρες με BMI μεγαλύτερο του 25. Όπως φαίνεται, ο διαχωρισμός πραγματοποιείται στην πρώτη κύρια συνιστώσα, δηλαδή δεξιά ή αριστερά του 0. Πιο συγκεκριμένα, οι μητέρες με φυσιολογικό BMI ομαδοποιούνται στα αριστερά και οι μητέρες με αυξημένο στα δεξιά.

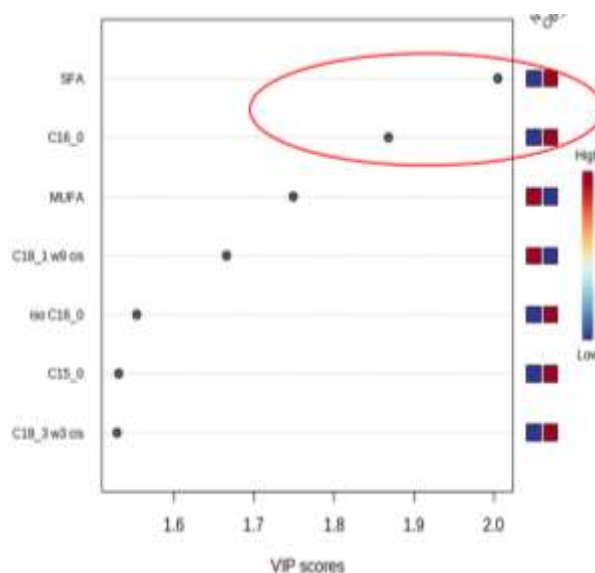


Εικόνα 14: Στατιστικό μοντέλο PLS-DA με βασική παράμετρο τον δείκτη μάζας σώματος (BMI) των εξεταζόμενων μητέρων

Όπως ήταν αναμενόμενο, το διάγραμμα της PLS-DA επιβεβαιώνει την τάση διαχωρισμού που έδειξε η PCA προηγουμένως και οι δύο ομάδες δειγμάτων διακρίνονται ευκρινώς (Εικόνα 14). Το στατιστικό μοντέλο επικυρώνεται ικανοποιητικά με ακρίβεια μεγαλύτερη του 90%, δείκτη καλής προσαρμογής των δεδομένων (R^2) μεγαλύτερη του 80% και δείκτη προβλεψιμότητας (Q^2) πάνω από 50%. Ανάμεσα στα λιπαρά οξέα που ξεχωρίζουν για τη συνεισφορά τους στο διαχωρισμό βρίσκονται τόσο τα κορεσμένα, όσο και το παλμιτικό οξύ (Εικόνα 15).

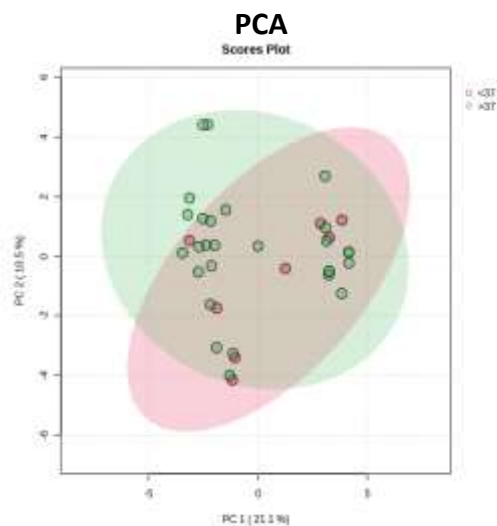
PLS-DA cross validation details:

Measure	1 comps	2 comps	3 comps	4 comps	5 comps
Accuracy	0.88452	0.9131	0.88452	0.82738	0.76071
R^2	0.73755	0.82496	0.87071	0.90115	0.92306
Q^2	0.62756	0.57237	0.47896	0.23213	0.088565



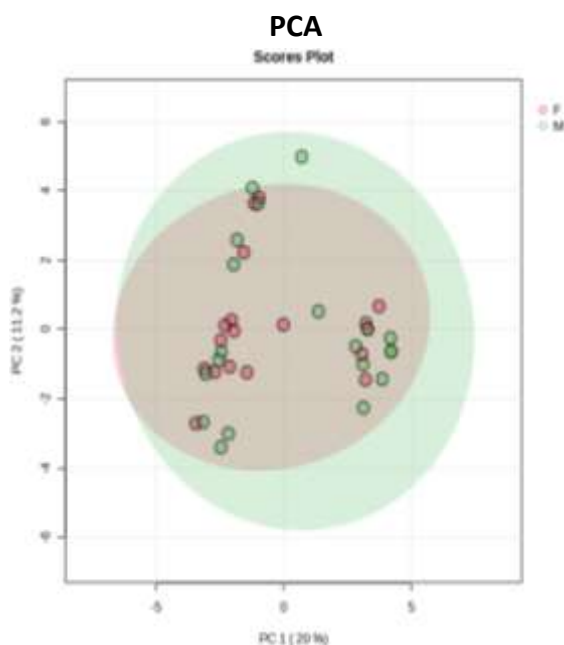
Εικόνα 15: Διάγραμμα VIP Scores κυριότερων λιπαρών οξέων που οφείλονται για τον διαχωρισμό με βάση τον δείκτη μάζας σώματος των μητέρων. Παράμετροι: ακρίβεια του μοντέλου (accuracy), δείκτης καλής προσαρμογής των δεδομένων (R^2) και δείκτης προβλεψιμότητας (Q^2)

5.2.4. Εβδομάδα κήσης



Εικόνα 16: Διάγραμμα δύο συνιστωσών PCA με βασική παράμετρο την εβδομάδα κήσης των εξεταζόμενων μητέρων. Η PCA δεν δίνει καμία τάση ομαδοποίησης (Εικόνα 16). Γι' αυτό και δεν προχωρήσαμε και σε PLS-DA ανάλυση.

5.2.5. Φύλο

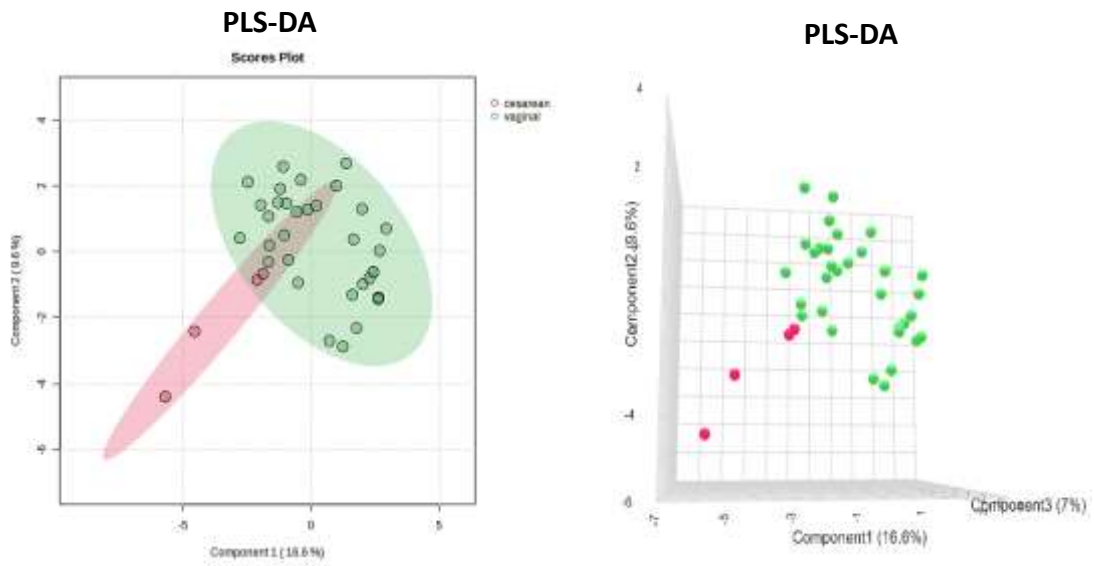


Εικόνα 17: Στατιστικό μοντέλο PCA με βασική παράμετρο το φύλο του νεογνού

Ήδη από την PCA (Εικόνα 17) δεν υπάρχει κάποια σημαντική ένδειξη τάσης διαχωρισμού των δειγμάτων ώστε να εφαρμόσουμε PLS-DA.

5.2.6. Είδος τοκετού

Η ανάλυση PCA (Εικόνα 18, αριστερά) έδειξε πως υπάρχει (ελαφρώς) μια τάση διαχωρισμού και γι' αυτό προχωρήσαμε σε επιβλεπόμενη ανάλυση διάκρισης, έτσι ώστε να αποκτήσουμε μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα. Όπως φαίνεται στα δεξιά της Εικόνας 18, επιτυγχάνεται ικανοποιητικός διαχωρισμός. Ωστόσο, τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του στατιστικού μοντέλου δεν είναι σε θέση να το επικυρώσουν (Εικόνα 19), καθώς μπορεί η ακρίβεια να φτάνει και το 80% αλλά ο δείκτης προβλεψιμότητας προκύπτει αρνητικός, δείχνοντας ότι ένα τυχαίο δείγμα δεν θα μπορούσε να ταξινομηθεί σε μία από τις δύο ομάδες, κάτι το οποίο προκύπτει από τον πολύ μικρό αριθμό δειγμάτων (4) για της μητέρες που γέννησαν με καισαρική τομή.



Εικόνα 18: Στατιστικό μοντέλο PLS-DA με βασική παράμετρο το είδος του τοκετού

PLS-DA cross validation details:

Measure	1 comps	2 comps	3 comps	4 comps
Accuracy	0.89643	0.84643	0.79643	0.79643
R2	0.33161	0.51749	0.61306	0.69469
Q2	0.011372	-0.080134	-0.30736	-0.7247

Εικόνα 19: Παράμετροι: ακρίβεια του μοντέλου (accuracy), δείκτης καλής προσαρμογής των δεδομένων (R^2) και δείκτης προβλεψιμότητας (Q^2)

5.3. Συζήτηση

5.3.1. Αξιολόγηση του προφίλ των δειγμάτων με αυτό άλλων μελετών

Η μέθοδος που εφαρμόστηκε για τον ημι-ποσοτικό προσδιορισμό των λιπαρών οξέων από δείγματα πρωτογάλακτος αποδείχθηκε αρκετά αξιόπιστη και ακριβής, καθώς τα αποτελέσματα συμφωνούν με αυτά της βιβλιογραφίας. Παραδείγματος χάριν, σε αντίστοιχη μελέτη των Sinanoglou et al., 2017, βρέθηκαν τα ίδια κύρια από άποψη συγκέντρωσης λιπαρά οξέα: παλμιτικό, στεαρικό, ελαϊκό και λινελαϊκό και σε παραπλήσιες ποσότητες.

Το ποσοστό των SFAs είχε προσδιοριστεί σχετικά υψηλότερο (47%) σε σχέση με αυτό που υπολογίστηκε στην παρούσα μελέτη (41%). Επίσης, στη μελέτη εκείνη προσδιορίστηκαν περισσότερα κορεσμένα λιπαρά οξέα, όπως το C8:0, C10:1, C13:0, C21:0, C22:0 και C23:0.

Αντίθετα, τα MUFAs, PUFAs, ω6, ω3 και οι αναλογίες αυτών βρέθηκαν με πολύ μικρές διαφορές στη συγκέντρωσή τους, με εξαίρεση μόνο την αναλογία ω6 προς ω3 που στην παρούσα μελέτη υπολογίστηκε ίση με 6,5%, ενώ στην προηγούμενη από τη βιβλιογραφία υπολογίστηκε στο 8,5%.

5.3.2. Διερεύνηση της επίδρασης ανθρωπομετρικών χαρακτηριστικών στο λιπιδικό προφίλ

Όσον αφορά στους παράγοντες που εξετάστηκαν σχετικά με τον βαθμό στον οποίο επηρεάζουν τη σύνθεση των λιπαρών οξέων στο πρωτόγαλα, εξήχθησαν τα παρακάτω συμπεράσματα.

Με κριτήριο την εθνικότητα των μητέρων που εξετάστηκαν μπορούμε να διακρίνουμε δύο λιπαρά οξέα που οφείλονται κυρίως για το διαχωρισμό των δειγμάτων, το C18:0 και το C18:1 ω9 trans. Αυτό πιθανώς σχετίζεται με τη μεσογειακή διατροφή, η οποία περιέχει χαμηλή αναλογία κορεσμένων λιπαρών οξέων (SFAs) λόγω της υψηλής πρόσληψης λαχανικών, δημητριακών και οσπρίων. Η παρουσία επίσης του C18:1 ω9 trans λιπαρού οξέος οφείλεται κι αυτή κατά κύριο λόγο στη διατροφή της μητέρας. Πιο συγκεκριμένα, οφείλεται στην κατανάλωση μερικώς υδρογονωμένων λιπαρών, επεξεργασμένων και τηγανητών τροφίμων καθώς και γαλακτοκομικών προϊόντων. Η συγκέντρωσή τους στα δείγματα των Ελληνίδων είναι μικρότερη λόγω μειωμένης κατανάλωσης trans λιπαρών οξέων στο καθημερινό τους διαιτολόγιο. Τα ευρήματα αυτά μπορούμε να τα χαρακτηρίσουμε ως αξιόπιστα, καθώς τα χαρακτηριστικά επικύρωσης του μοντέλου είναι ικανοποιητικά (ακρίβεια>0,82, συσχέτιση>0,88 και προβλεψιμότητα>0,42). Σε σχετικές μελέτες βρέθηκε ότι γυναίκες διαφορετικής καταγωγής είχαν και διαφορετική ποσότητα συγκεκριμένων λιπαρών οξέων, όπως το ελαϊκό και το λινελαϊκό, τα οποία ήταν σε μεγαλύτερη ποσότητα στις Ελληνίδες

μητέρες, αποτέλεσμα της μεγαλύτερης κατανάλωσης εξαιρετικά παρθένου ελαιόλαδου που είναι πλούσιο σε αυτά τα οξέα (Sinanoglou et al., 2017, Ανδριάς, 2022).

Με βάση την ηλικία των μητέρων βρήκαμε τα δύο κύρια λιπαρά οξέα τα οποία είναι υπεύθυνα για τον διαχωρισμό των δύο ομάδων δειγμάτων (25-35 και >40 ετών). Αυτά είναι το iso C17:0 και το C17:1 ω7 cis. Το iso C17:0 βρέθηκε σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στα δείγματα των θηλαζουσών μητέρων άνω των 40 ετών. Αυτό το εύρημα είναι ενδιαφέρον, καθώς υπάρχουν στοιχεία ότι το C17:0, το οποίο πιθανότατα προέρχεται από την κατανάλωση γαλακτοκομικών λιπαρών, μπορεί να αντιστρέψει τα πρώιμα στάδια του διαβήτη στους ανθρώπους (Jenkins et al., 2015). Τα αποτελέσματα αυτά μπορούμε να τα χαρακτηρίσουμε ως αξιόπιστα, καθώς τα χαρακτηριστικά επικύρωσης του μοντέλου είναι αρκετά ικανοποιητικά (ακρίβεια>0,91, συσχέτιση>0,88 και προβλεψιμότητα>0,58). Σε άλλες επίσης έρευνες βρέθηκαν υψηλότερα ποσοστά λιπαρών οξέων στο πρωτόγαλα μεγαλύτερων σε ηλικία μητέρων το οποίο σχετίζεται με τη γενική διατροφή τους (Sinanoglou et al., 2017, Ανδριάς, 2022).

Αναφορικά με τον δείκτη μάζας σώματος (BMI) των εξεταζόμενων μητέρων, τα κορεσμένα λιπαρά οξέα (SFAs) και πιο συγκεκριμένα το παλμιτικό οξύ, φαίνεται να επηρεάζουν τον διαχωρισμό ανάμεσα σε φυσιολογικές και αυξημένου βάρους γυναίκες. Το C16:0 αποτελεί σημαντικό δείκτη της κατανάλωσης κόκκινου κρέατος, πουλερικών και γαλακτοκομικών προϊόντων από τις μητέρες. Τα συμπεράσματα αυτά μπορούμε να τα χαρακτηρίσουμε ως αξιόπιστα, καθώς τα χαρακτηριστικά επικύρωσης του μοντέλου είναι επίσης αρκετά ικανοποιητικά (ακρίβεια>0,91, συσχέτιση>0,82 και προβλεψιμότητα>0,57). Σε αντίστοιχη έρευνα βρέθηκαν σημαντικά μεγαλύτερες ποσότητες ω3 PUFAs στο πρωτόγαλα παχύσαρκων μητέρων σε σύγκριση με αυτών φυσιολογικού βάρους, ενώ το C22:2 ω6 βρέθηκε σε μεγαλύτερη ποσότητα στις δεύτερες. Αξίζει να αναφέρουμε ότι η αυξημένη συγκέντρωση των λιπαρών οξέων σε μητέρες με υψηλότερο BMI οφείλεται πιθανώς στα μέτρα πρόληψης που λαμβάνει ο οργανισμός των υπέρβαρων-παχύσαρκων μητέρων, ώστε να παραχθούν μεγαλύτερες ποσότητες πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, τα οποία βοηθούν στη μείωση των καρδιαγγειακών παθήσεων (Sinanoglou et al., 2017). Λαμβάνοντας υπόψιν λοιπόν και άλλες έρευνες μπορούμε να εξάγουμε το συμπέρασμα ότι ο δείκτης μάζας σώματος των μητέρων αποτελεί έναν καλό παράγοντα πρόβλεψης και κατηγοριοποίησης των εξεταζόμενων κάθε φορά δειγμάτων μητρικού πρωτογάλακτος (Ανδριάς, 2022).

Όσον αφορά την εβδομάδα κύησης παρατηρήσαμε ότι δεν αποτελεί παράγοντα διάκρισης. Αυτό μπορεί να οφείλεται κατά κύριο λόγο στην έλλειψη πολλών δειγμάτων, μόλις 8 για εβδομάδα κύησης < 37. Ωστόσο, η αντίστοιχη έρευνα που έγινε με τη χρήση ATR-FTIR έδειξε ότι η εβδομάδα κύησης θεωρήθηκε σημαντικός παράγοντας για τη πρόβλεψη της σύνθεσης του μητρικού πρωτογάλακτος και της αναλογίας των λιπαρών οξέων του (Ανδριάς, 2022). Επιπλέον, σε άλλη έρευνα βρέθηκε υψηλότερη αναλογία PUFAs μακριάς αλυσίδας στο πρωτόγαλα πρόωρων νεογνών σε σύγκριση με των τελειόμηνων. Η παραπάνω παρατήρηση είναι σημαντική, επειδή γενικώς τα πρόωρα βρέφη έχουν περιορισμένη ικανότητα αποκορεσμού των λινολεϊκών και α-λινολενικών οξέων σε μακριάς αλυσίδας PUFAs και υπάρχουν αμελητέα αποθέματα αυτών στον λιπώδη ιστό τους. Αυτό το εύρημα καταδεικνύει τη διαφορετική ανταπόκριση του οργανισμού εν όψει ενός παράγοντα κινδύνου, αυξάνοντας την ποσότητα αυτή για την κάλυψη συγκεκριμένων αναγκών των πρόωρων βρεφών (Sinanoglou et al., 2017).

Ούτε και το φύλο των νεογνών αποτέλεσε παράγοντα διάκρισης. Το ίδιο συμπέρασμα εξήχθη και από αντίστοιχη έρευνα, με τη μόνη διαφορά να παρατηρείται στα C22:4 ω6 και C15:1 ω5 οξέα που βρέθηκαν σε μεγαλύτερες ποσότητες στα θηλυκά νεογνά (Sinanoglou et al., 2017).

Τέλος, αναφορικά με τον παράγοντα του είδους τοκετού επιτυγχάνεται ικανοποιητικός διαχωρισμός των δειγμάτων, ωστόσο τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του δεν είναι σε θέση να το επικυρώσουν οπότε τα εξαγόμενα αποτελέσματα δεν θεωρούνται αξιόπιστα, καθώς διαθέτουμε 4 μόνο δείγματα με καισαρική τομή. Ο ίδιος παράγοντας που εξετάστηκε σε άλλη μελέτη, κατέληξε στο συμπέρασμα ότι τα περισσότερα οξέα βρίσκονταν σε αρκετά μικρότερες συγκεντρώσεις στο πρωτόγαλα μητέρων που γέννησαν με καισαρική, από ότι αυτών που γέννησαν με φυσιολογικό τοκετό, με εξαίρεση το C18:1 ω9 και τις αναλογίες MUFA/SFA και MUFA/PUFA (Sinanoglou et al., 2017).

Κεφάλαιο 6. Συμπεράσματα

Η παρούσα μελέτη επικεντρώθηκε στην ανάλυση της σύστασης των λιπαρών οξέων μητρικού πρωτογάλακτος καθώς και στην επίδραση σε αυτήν διάφορων βιομετρικών παραγόντων. Χρησιμοποιώντας αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας GC-FID εξετάστηκε το λιπιδικό προφίλ δειγμάτων μητρικού πρωτογάλακτος από θηλάζουσες μητέρες. Τα κυρίαρχα λιπαρά οξέα στα δείγματα που αναλύθηκαν είναι το παλμιτικό (24,7%), το στεαρικό (4,65%), το ελαϊκό (35,9%) και το λινολεϊκό οξύ ($\approx 8\%$) και συνολικά αντιπροσωπεύουν σχεδόν το 73,25% των ολικών λιπαρών οξέων. Σε δεύτερη φάση, πραγματοποιήθηκε μια ολιστική προσέγγιση διερεύνησης των διαφόρων παραμέτρων που επηρεάζουν τη σύνθεση του μητρικού πρωτογάλακτος, μέσω της εφαρμογής πολυπαραμετρικών στατιστικών προσεγγίσεων. Αυτές οι προσεγγίσεις περιελάμβαναν τόσο μη επιβλεπόμενες (PCA) όσο και επιβλεπόμενες (PLS-DA) τεχνικές.

Συνολικά το λιπιδικό προφίλ που αναλύθηκε συνάδει με τη σχετική βιβλιογραφία. Από την παρούσα μελέτη διαπιστώθηκε ότι η εθνικότητα, η ηλικία της μητέρας και ο δείκτης μάζας σώματος άσκησαν διακριτές επιδράσεις στο συνολικό προφίλ των λιπαρών οξέων του πρωτογάλακτος. Με κριτήριο την εθνικότητα τα κύρια λιπαρά οξέα που επηρέασαν τον διαχωρισμό είναι το C18:0 όσο και το C18:1 ω -9 trans που βρέθηκαν σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στα δείγματα των θηλαζουσών μη ελληνικής καταγωγής. Στα δείγματα μητέρων άνω των 40 ετών βρέθηκαν σε σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις τα οξέα iso C17:0 και C17:1. Στον δείκτη μάζας σώματος η διαφορά στην ταξινόμηση προέκυψε με βάση τόσο τα κορεσμένα λιπαρά οξέα όσο και το παλμιτικό οξύ. Αντίθετα, παράγοντες όπως η εβδομάδα κύησης και το φύλο των νεογνών δεν είχαν σημαντική συμβολή στη σύνθεσή του. Σχετικά με το είδος του τοκετού, παρόλο που υπάρχει διαχωρισμός των δειγμάτων, λόγω της ανομοιόμορφης κατανομής του αριθμού των ομάδων (οι φυσιολογικοί τοκετοί ήταν 8 φορές περισσότεροι από αυτούς με καισαρική), δεν μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα.

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας αφενός μπορούν να αποτελέσουν σημείο αναφοράς για τη διενέργεια μεγαλύτερων τέτοιων μελετών και αφετέρου να συνδυαστούν και με άλλες τεχνικές όπως η φασματοσκοπία NMR, έτσι ώστε ενδεχομένως να πραγματοποιηθεί μια προσπάθεια βιολογικής/μεταβολικής ερμηνείας των αλληλεπιδράσεων που παρουσιάστηκαν.

Βιβλιογραφία

- A. De Luca, M. Frasquet-Darrieux, Gaud, M., Christin, P., Clair-Yves Boquien, Millet, C., Manon Herviou, Darmaun, D., Robins, R. J., Ingrand, P., & R. Hankard. (2016). Higher Leptin but Not Human Milk Macronutrient Concentration Distinguishes Normal-Weight from Obese Mothers at 1-Month Postpartum. *PLOS ONE*, 11(12), e0168568–e0168568. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168568>
- Agostoni, Carlo, et al. "Enteral nutrient supply for preterm infants: commentary from the European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Committee on Nutrition." *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 50.1 (2010): 85-91.
- Aguilar, S. C., Cottica, S. M., Boeing, J. S., Samensari, R. B., Santos, G. T., Visentainer, J. V., & Zeoula, L. M. (2014). Effect of feeding phenolic compounds from propolis extracts to dairy cows on milk production, milk fatty acid composition, and the antioxidant capacity of milk. *Animal Feed Science and Technology*, 193, 148-154.
- Ahern, G. J., Hennessy, A. A., Ryan, C. A., Ross, R. P., & Stanton, C. (2019). Advances in Infant Formula Science. *Annual Review of Food Science and Technology*, 10(1), 75–102. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-081318-104308>
- Albenzio, M., Santillo, A., Stolfi, I., Manzoni, P., Iliceto, A., Rinaldi, M., & Magaldi, R. (2016). Lactoferrin Levels in Human Milk after Preterm and Term Delivery. *American Journal of Perinatology*, 33(11), 1085–1089. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1586105>
- Allen, L. H. (2012). B Vitamins in Breast Milk: Relative Importance of Maternal Status and Intake, and Effects on Infant Status and function. *Advances in Nutrition*, 3(3), 362–369. <https://doi.org/10.3945/an.111.001172>
- Andreas, Nicholas J., Beate Kampmann, and Kirsty Mehring Le-Doare. "Human breast milk: A review on its composition and bioactivity." *Early human development* 91.11 (2015): 629-635.
- Antonakou, A., Skenderi, K. P., Chiou, A., Anastasiou, C. A., Bakoula, C., & Matalas, A.-L. (2012). Breast milk fat concentration and fatty acid pattern during the first six months in exclusively breastfeeding Greek women. *European Journal of Nutrition*, 52(3), 963–973. <https://doi.org/10.1007/s00394-012-0403-8>
- Argov-Argaman, N., Mandel, D., Lubetzky, R., Hausman Kedem, M., Cohen, B.-H., Berkovitz, Z., & Reifen, R. (2016). Human Milk Fatty acids composition is affected by maternal age. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 1-16, 1–16. <https://doi.org/10.3109/14767058.2016.1140142>
- Armaforte, E., Curran, E., Huppertz, T., Ryan, C. A., Caboni, M. F., O'Connor, P. M., Ross, R. P., Hirtz, C., Sommerer, N., Chevalier, F., & Kelly, A. L. (2010). Proteins and proteolysis in pre-term and term human milk and possible implications for infant formulae. *International Dairy Journal*, 20(10), 715–723. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.03.008>
- Azizian, H., Kamalian, A. R., Winsborough, S. L., Kramer, J. K. G., Hernandez, M., & Mossoba, M. M. (2004). Quantification of trans fatty acids in food products by GC, ATR-FTIR and FT-NIR methods. *Lipid Technology*, 16(10), 229-231.

- Bachour, P., Yafawi, R., Jaber, F., Choueiri, E., & Abdel-Razzak, Z. (2012). Effects of Smoking, Mother's Age, Body Mass Index, and Parity Number on Lipid, Protein, and Secretory Immunoglobulin A Concentrations of Human Milk. *Breastfeeding Medicine*, 7(3), 179–188. <https://doi.org/10.1089/bfm.2011.0038>
- Badillo-Suárez, P. A., Rodríguez-Cruz, M., & Nieves-Morales, X. (2017). Impact of Metabolic Hormones Secreted in Human Breast Milk on Nutritional Programming in Childhood Obesity. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 22(3), 171–191. <https://doi.org/10.1007/s10911-017-9382-y>
- Baker, J. L., Michaelsen, K. F., Sørensen, T. I., & Rasmussen, K. M. (2007). High prepregnant body mass index is associated with early termination of full and any breastfeeding in Danish women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 86(2), 404–411. <https://doi.org/10.1093/ajcn/86.2.404>
- Ballard, O., & Morrow, A. L. (2013). Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors. *Pediatric Clinics of North America*, 60(1), 49–74. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2012.10.002>
- Ballesta-Castillejos, A., Gomez-Salgado, J., Rodriguez-Almagro, J., Ortiz-Esquinas, I., & Hernandez-Martinez, A. (2020). Relationship between maternal body mass index with the onset of breastfeeding and its associated problems: an online survey. *International Breastfeeding Journal*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s13006-020-00298-5>
- Baltierrra-Urbe, S. L., Montañez-Barragán, A., Romero-Ramírez, H., Klimov-Kravtchenko, K., Martínez-Pedro, K. I., Sánchez-Salguero, E., Camorlinga-Ponce, M., Torres, J., & Santos-Argumedo, L. (2021). Colostrum IgA1 antibodies recognize antigens from *Helicobacter pylori* and prevent cytoskeletal changes in human epithelial cells. *European Journal of Immunology*, 51(11), 2641–2650. <https://doi.org/10.1002/eji.202049117>
- Barnes, L. A., Morrow III, G., Silverio, J., Finnegan, L. P., & Heitman, S. E. (1974). Calcium and fat absorption from infant formulas with different fat blends. *Pediatrics*, 54(2), 217–221.
- Barreiro, R., Regal, P., López-Racamonge, O., Cepeda, A., & Fente, C. A. (2017). Comparison of the fatty acid profile of Spanish infant formulas and Galician women breast milk. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 74(1), 127–138. <https://doi.org/10.1007/s13105-017-0580-2>
- Bauer, J. (2013). Longitudinal composition of breast milk with extremely preterm infants compared to premature to term milk. Wageningen Academic Publishers EBooks, 83–98. https://doi.org/10.3920/978-90-8686-764-6_4
- Bauer, J., & Gerss, J. (2011). Longitudinal analysis of macronutrients and minerals in human milk produced by mothers of preterm infants. *Clinical Nutrition*, 30(2), 215–220. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2010.08.003>
- Belkind-Gerson, J., Carreón-Rodríguez, A., Contreras-Ochoa, C. O., Estrada-Mondaca, S., & Parra-Cabrera, M. S. (2008). Fatty acids and neurodevelopment. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 47, S7-S9.
- Benson, K. F., Carter, S. G., Patterson, K. M., Patel, D., & Jensen, G. S. (2012). A novel extract from bovine colostrum whey supports anti-bacterial and anti-viral innate immune

- functions in vitro and in vivo. *Preventive Medicine*, 54, S116–S123. <https://doi.org/10.1016/j.ypmed.2011.12.023>
- Berry, S. E. (2009). Triacylglycerol structure and interesterification of palmitic and stearic acid-rich fats: an overview and implications for cardiovascular disease. *Nutrition research reviews*, 22(1), 3-17.
- Bērziņš, K., Harrison, S. D., Leong, C., Fraser-Miller, S. J., Harper, M. J., Diana, A., ... & Gordon, K. C. (2021). Qualitative and quantitative vibrational spectroscopic analysis of macronutrients in breast milk. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 246, 118982.
- Bever Babendure, J., Reifsnider, E., Mendias, E., Moramarco, M. W., & Davila, Y. R. (2015). Reduced breastfeeding rates among obese mothers: a review of contributing factors, clinical considerations and future directions. *International Breastfeeding Journal*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s13006-015-0046-5>
- Binns, C., Lee, M., & Low, W. Y. (2016). The long-term public health benefits of breastfeeding. *Asia Pacific Journal of Public Health*, 28(1), 7-14.
- Blum, M. M., & John, H. (2012). Historical perspective and modern applications of attenuated total reflectance–Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR). *Drug testing and analysis*, 4(3-4), 298-302.
- Bobiński, R., Mikulska, M., Mojska, H., & Ulman-Włodarz, I. (2014). The Dietary Composition of Women Who Delivered Healthy Full-Term Infants, Preterm Infants, and Full-Term Infants Who Were Small for Gestational Age. *Biological Research for Nursing*, 17(5), 495–502. <https://doi.org/10.1177/1099800414556529>
- Boquien, C. Y. (2018). Human milk: an ideal food for nutrition of preterm newborn. *Frontiers in pediatrics*, 6, 295.
- Boye, J., Wijesinha-Bettoni, R., & Burlingame, B. (2012). Protein quality evaluation twenty years after the introduction of the protein digestibility corrected amino acid score method. *British Journal of Nutrition*, 108(S2), S183–S211. <https://doi.org/10.1017/s0007114512002309>
- Boyer, S., Iwuji, C., Gosset, A., Protopopescu, C., Okesola, N., Plazy, M., Spire, B., Orne-Gliemann, J., McGrath, N., Pillay, D., Dabis, F., & Larmarange, J. (2016). Factors associated with antiretroviral treatment initiation amongst HIV-positive individuals linked to care within a universal test and treat programme: early findings of the ANRS 12249 TasP trial in rural South Africa. *AIDS Care*, 28(sup3), 39–51. <https://doi.org/10.1080/09540121.2016.1164808>
- Bridge, G. (2021). Consider the Whole Picture When Discussing Infant Formula and Breast Milk. *The Journal of Nutrition*, 151(6), 1375–1377. <https://doi.org/10.1093/jn/nxab132>
- Byrne, M. E., O'Mahony, J. A., & O'Callaghan, T. F. (2021). Compositional and Functional Considerations for Bovine-, Caprine- and Plant-Based Infant Formulas. *Dairy*, 2(4), 695–715. <https://doi.org/10.3390/dairy2040054>
- Bzikowska-Jura, A., Czerwonogrodzka-Senczyna, A., Olędzka, G., Szostak-Węgierek, D., Weker, H., & Wesołowska, A. (2018). Maternal Nutrition and Body Composition During Breastfeeding: Association with Human Milk Composition. *Nutrients*, 10(10), 1379. <https://doi.org/10.3390/nu10101379>

- Caldeo, V., Downey, E., O'Shea, C.-A., Affolter, M., Volger, S., Courtet-Compondu, M.-C., De Castros, C. A., O'Mahony, J. A., Ryan, C. A., & Kelly, A. L. (2021). Protein levels and protease activity in milk from mothers of pre-term infants: A prospective longitudinal study of human milk macronutrient composition. *Clinical Nutrition*, 40(5), 3567–3577. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2020.12.013>
- Carlson, S. E. (2001). Docosahexaenoic acid and arachidonic acid in infant development. In *Seminars in Neonatology* (Vol. 6, No. 5, pp. 437-449). WB Saunders.
- Carlson, S. E., Ford, A. J., Werkman, S. H., Peebles, J. M., & Koo, W. W. (1996). Visual acuity and fatty acid status of term infants fed human milk and formulas with and without docosahexaenoate and arachidonate from egg yolk lecithin. *Pediatric Research*, 39(5), 882-888.
- Carnielli, V. P., Luijendijk, I. H., Van Goudoever, J. B., Sulkers, E. J., Boerlage, A. A., Degenhart, H. J., & Sauer, P. J. (1996). Structural position and amount of palmitic acid in infant formulas: effects on fat, fatty acid, and mineral balance. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 23(5), 553-560.
- Caspi, A., Williams, B., Kim-Cohen, J., Craig, I. W., Milne, B. J., Poulton, R., Schalkwyk, L. C., Taylor, A., Werts, H., & Moffitt, T. E. (2007). Moderation of breastfeeding effects on the IQ by genetic variation in fatty acid metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(47), 18860–18865. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704292104>
- Castillo, F., Castillo-Ferrer, F. J., Cordobilla, B., & Domingo, J. C. (2021). Inadequate content of docosahexaenoic acid (DHA) of donor human milk for feeding preterm infants: A comparison with mother's own milk at different stages of lactation. *Nutrients*, 13(4), 1300.
- Codex Alimentarius Commission (1981) Codex standard for infant formula, Codex Stan. 72-1981, as amended in 1983, 1985, 1987 and 1997. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization, Rome.
- Commission of the European Communities (2006) Commission directive of 22 Dec 2006 on infant formulae and follow-on formulae and amending Directive 1999/21/EC. *Official Journal of the European Communities* L401/1, 1–33
- Cruz-Hernandez, C., Goeuriot, S., Giuffrida, F., Thakkar, S. K., & Destailats, F. (2013). Direct quantification of fatty acids in human milk by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1284, 174-179.
- Daniels, M. C., & Adair, L. S. (2005). Breast-Feeding Influences Cognitive Development in Filipino Children. *The Journal of Nutrition*, 135(11), 2589–2595. <https://doi.org/10.1093/jn/135.11.2589>
- Dao, X., Zhang, D., Wang, L., & Wang, L. (2023). Analysis of human milk fatty acid composition and its correlation with diet pattern (A study in Tibetan population gathering area). *Journal of Food Composition and Analysis*, 116, 105046.
- Davis, A. M., Harris, B. J., Lien, E. L., Pramuk, K., & Trabulsi, J. (2007). α -Lactalbumin-rich infant formula fed to healthy term infants in a multicenter study: plasma essential amino acids and gastrointestinal tolerance. *European Journal of Clinical Nutrition*, 62(11), 1294–1301. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602848>
- Dawodu, A., Zalla, L., Woo, J. G., Herbers, P. M., Davidson, B. S., Heubi, J. E., & Morrow, A. L. (2012). Heightened attention to supplementation is needed to improve the vitamin D

- status of breastfeeding mothers and infants when sunshine exposure is restricted. *Maternal & Child Nutrition*, 10(3), 383–397. <https://doi.org/10.1111/j.1740-8709.2012.00422.x>
- Demmelmaier, H., & Koletzko, B. (2018). Lipids in human milk. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 32(1), 57–68. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2017.11.002>
- Deoni, S. C. L., Dean, D. C., Piryatinsky, I., O’Muircheartaigh, J., Waskiewicz, N., Lehman, K., Han, M., & Dirks, H. (2013). Breastfeeding and early white matter development: A cross-sectional study. *NeuroImage*, 82, 77–86. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.05.090>
- Dodds, E. D., McCoy, M. R., Rea, L. D., & Kennish, J. M. (2005). Gas chromatographic quantification of fatty acid methyl esters: flame ionization detection vs. electron impact mass spectrometry. *Lipids*, 40(4), 419–428.
- Drapala, K. P., Auty, M. A. E., Mulvihill, D. M., & O’Mahony, J. A. (2017). Influence of emulsifier type on the spray-drying properties of model infant formula emulsions. *Food Hydrocolloids*, 69, 56–66. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.12.024>
- Drover, J., Hoffman, D. R., Castañeda, Y. S., Morale, S. E., & Birch, E. E. (2009). Three Randomized Controlled Trials of Early Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acid Supplementation on Means-End Problem Solving in 9-Month-Olds. *Child Development*, 80(5), 1376–1384. <https://doi.org/10.1111/j.1467-8624.2009.01339.x>
- Efigênia, M., Lasekan, J. B., Baggs, G., Medrado, C., Menezes-Filho, J. A., Pontes, M., Janice Izabel Druzian, Danile Leal Barreto, Oliveira, C., Peixoto, Â., & Costa-Ribeiro, H. (2013). Calcium and fat metabolic balance, and gastrointestinal tolerance in term infants fed milk-based formulas with and without palm olein and palm kernel oils: a randomized blinded crossover study. *BMC Pediatrics*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2431-13-215>
- Elfstrand, L., Lindmark-Månsson, H., Paulsson, M., Nyberg, L., & Åkesson, B. (2002). Immunoglobulins, growth factors and growth hormone in bovine colostrum and the effects of processing. *International Dairy Journal*, 12(11), 879–887. [https://doi.org/10.1016/s0958-6946\(02\)00089-4](https://doi.org/10.1016/s0958-6946(02)00089-4)
- Ellsworth, L., Perng, W., Harman, E., Das, A., Pennathur, S., & Gregg, B. (2020). Impact of maternal overweight and obesity on milk composition and infant growth. *Maternal & Child Nutrition*, 16(3). <https://doi.org/10.1111/mcn.12979>
- Eriksen, K. G., Christensen, S. H., Lind, M. V., & Michaelsen, K. F. (2018). Human milk composition and infant growth. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 21(3), 200–206. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000466>
- European Union. Commission Delegated Regulation (EU) 2016/127 of 25th September 2015 Supplementing Regulation (EU) No 609/2013 of the European Parliament and of the Council as Regards the Specific Compositional and Information Requirements for Infant Formula and Follow-On Formula and as Regards Requirements on Information Relating to Infant and Young Child Feeding. Available online: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:02016R0127-20190612&from=EN>

- Fang, P., Kuo, H., Huang, C., Ko, T., Chen, C., & Chung, M. (2005). The effect of supplementation of docosahexaenoic acid and arachidonic acid on visual acuity and neurodevelopment in larger preterm infants. *Chang Gung medical journal*, 28(10), 708.
- Fasse, S., Alarinta, J., Frahm, B., & Wirtanen, G. (2021). Bovine Colostrum for Human Consumption—Improving Microbial Quality and Maintaining Bioactive Characteristics through Processing. *Dairy*, 2(4), 556–575. <https://doi.org/10.3390/dairy2040044>
- Feng, L., Huang, Y., & Wang, H. (2008). Solid-phase microextraction in combination with GC—FID for quantification of the volatile free fatty acids in wastewater from constructed wetlands. *Journal of chromatographic science*, 46(7), 577-584.
- Fidler, N., & Koletzko, B. (2000). The fatty acid composition of human colostrum. *European Journal of Nutrition*, 39(1), 31–37. <https://doi.org/10.1007/s003940050073>
- Fields, D. A., George, B., Williams, M., Whitaker, K., Allison, D. B., Teague, A., & Demerath, E. W. (2017). Associations between human breast milk hormones and adipocytokines and infant growth and body composition in the first 6 months of life. *Pediatric Obesity*, 12, 78–85. <https://doi.org/10.1111/ijpo.12182>
- Flom, J. D., & Sicherer, S. H. (2019). Epidemiology of Cow’s Milk Allergy. *Nutrients*, 11(5), 1051. <https://doi.org/10.3390/nu11051051>
- Floris, L. M., Stahl, B., Abrahamse-Berkeveld, M., & Teller, I. C. (2020). Human milk fatty acid profile across lactational stages after term and preterm delivery: A pooled data analysis. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 156, 102023. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2019.102023>
- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*, 226(1), 497-509.
- Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations, Title 21, Chapter 21, Subchapter B, Part 107—Infant Formula
- Fujimori, M., França, E. L., Morais, T. C., Fiorin, V., de Abreu, L. C., & Honório-França, A. C. (2016). Cytokine and adipokine are biofactors can act in blood and colostrum of obese mothers. *BioFactors*, 43(2), 243–250. <https://doi.org/10.1002/biof.1339>
- Gao, X., Wu, D., Wen, Y., Gao, L., Liu, D., Zhong, R., Yang, C., & Zhao, C. (2020). Antiviral effects of human milk oligosaccharides: A review. *International Dairy Journal*, 110, 104784. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104784>
- García-Lara, N. R., Escuder-Vieco, D., García-Algar, O., De la Cruz, J., Lora, D., & Pallás-Alonso, C. (2012). Effect of Freezing Time on Macronutrients and Energy Content of Breastmilk. *Breastfeeding Medicine*, 7(4), 295–301. <https://doi.org/10.1089/bfm.2011.0079>
- Garcia-Rodenas, C. L., De Castro, C. A., Jenni, R., Thakkar, S. K., Beauport, L., Tolsa, J.-F., Fischer-Fumeaux, C. J., & Affolter, M. (2019). Temporal changes of major protein concentrations in preterm and term human milk. A prospective cohort study. *Clinical Nutrition*, 38(4), 1844–1852. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2018.07.016>
- Gardner, A. S., Rahman, I. A., Lai, C. T., Hepworth, A., Trengove, N., Hartmann, P. E., & Geddes, D. T. (2017). Changes in fatty acid composition of human milk in response to cold-like symptoms in the lactating mother and infant. *Nutrients*, 9(9), 1034.
- Garwolińska D., Namieśnik, J., Kot-Wasik, A., & Hewelt-Belka, W. (2018). Chemistry of human breast milk—A comprehensive review of the composition and role of milk metabolites

- in child development. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(45), 11881-11896.
- Genzel-Boroviczeny, O., Wahle, J., & Koletzko, B. (1997). Fatty acid composition of human milk during the 1st month after term and preterm delivery. *European journal of pediatrics*, 156, 142-147.
- Gibson, R. A., & Kneebone, G. M. (1981). Fatty acid composition of human colostrum and mature breast milk. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 34(2), 252–257.
- Glaser, C., Lattka, E., Rzehak, P., Steer, C., & Koletzko, B. (2011). Genetic variation in polyunsaturated fatty acid metabolism and its potential relevance for human development and health. *Maternal & child nutrition*, 7, 27-40.
- Glaser, J., & Johnstone, D. E. (1953). Prophylaxis of allergic disease in the newborn. *Journal of the American Medical Association*, 153(7), 620-622.
- Golay, P. A., Giuffrida, F., Dionisi, F., & Destailats, F. (2009). Streamlined methods for the resolution and quantification of fatty acids including trans fatty acid isomers in food products by gas chromatography. *Journal of AOAC International*, 92(5), 1301-1309.
- González-Domínguez, R., García-Barrera, T., & Gómez-Ariza, J. L. (2014). Combination of metabolomic and phospholipid-profiling approaches for the study of Alzheimer's disease. *Journal of proteomics*, 104, 37-47.
- Gopalakrishna, K. P., Macadangdang, B. R., Rogers, M. B., Tometich, J. T., Firek, B. A., Baker, R., Ji, J., Burr, A. H. P., Ma, C., Good, M., Morowitz, M. J., & Hand, T. W. (2019). Maternal IgA protects against the development of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Nature Medicine*, 25(7), 1110–1115. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0480-9>
- Greer, F. R. (2001). DO BREASTFED INFANTS NEED SUPPLEMENTAL VITAMINS? *Pediatric Clinics of North America*, 48(2), 415–423. [https://doi.org/10.1016/s0031-3955\(08\)70034-8](https://doi.org/10.1016/s0031-3955(08)70034-8)
- Griffiths, J., Jenkins, P., Vargova, M., Bowler, U., Juszczak, E., King, A., Linsell, L., Murray, D., Partlett, C., Patel, M., Berrington, J., Embleton, N., Dorling, J., Heath, P. T., McGuire, W., & Oddie, S. (2018). Enteral lactoferrin to prevent infection for very preterm infants: the ELFIN RCT. *Health Technology Assessment*, 22(74), 1–60. <https://doi.org/10.3310/hta22740>
- Groer, M., Ashmeade, T., Duffy, A., Morse, S., & Zaritt, J. (2016). Changes in the Immune Components of Preterm Human Milk and Associations With Maternal and Infant Characteristics. *Journal of Obstetric, Gynecologic & Neonatal Nursing*, 45(5), 639–648. <https://doi.org/10.1016/j.jogn.2016.04.009>
- Grote, V., Verduci, E., Scaglioni, S., Vecchi, F., Contarini, G., Giovannini, M., ... & Agostoni, C. (2016). Breast milk composition and infant nutrient intakes during the first 12 months of life. *European journal of clinical nutrition*, 70(2), 250-256.
- Guesnet, P., & Alessandri, J.-M. (2011). Docosahexaenoic acid (DHA) and the developing central nervous system (CNS) - Implications for dietary recommendations. *Biochimie*, 93(1), 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.05.005>
- Guo M. *Manufacturing Technology*. Elsevier, Cambridge, UK: (2014). *Human Milk Biochemistry and Infant Formula*.
- Guxens, M., Mendez, M. A., Molto-Puigmarti, C., Julvez, J., Garcia-Esteban, R., Forn, J., Ferrer, M., Vrijheid, M., Lopez-Sabater, M. C., & Sunyer, J. (2011). Breastfeeding, Long-Chain

- Polyunsaturated Fatty Acids in Colostrum, and Infant Mental Development. *PEDIATRICS*, 128(4), e880–e889. <https://doi.org/10.1542/peds.2010-1633>
- Hageman, J. H. J., Keijer, J., Dalsgaard, T. K., Zeper, L. W., Carrière, F., Feitsma, A. L., & Nieuwenhuizen, A. G. (2019). Free fatty acid release from vegetable and bovine milk fat-based infant formulas and human milk during two-phase in vitro digestion. *Food & Function*, 10(4), 2102–2113. <https://doi.org/10.1039/c8fo01940a>
- Hahn, W.-H., Jeong, T., Park, S., Song, S., & Kang, N. M. (2017). Content fat and calorie of human milk is affected by interactions between maternal age and body mass index. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 31(10), 1385–1388. <https://doi.org/10.1080/14767058.2017.1315660>
- Hanson, L. Å. (2007). Session 1: Feeding and infant development Breast-feeding and immune function. *Proceedings of the Nutrition Society*, 66(3), 384–396. <https://doi.org/10.1017/s0029665107005654>
- Hausman Kedem, M., Mandel, D., Domani, K. A., Mimouni, F. B., Shay, V., Marom, R., Dollberg, S., Herman, L., & Lubetzky, R. (2013). The Effect of Advanced Maternal Age upon Human Milk Fat Content. *Breastfeeding Medicine*, 8(1), 116–119. <https://doi.org/10.1089/bfm.2012.0035>
- Hodgkinson, A., Wall, C., Wang, W., Szeto, I. M., Ye, W., & Day, L. (2022). Nucleotides: an updated review of their concentration in breast milk. *Nutrition Research*, 99, 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2021.09.004>
- Hoppu, U., Isolauri, E., Laakso, P., Matomäki, J., & Laitinen, K. (2012). Probiotics and dietary counselling targeting maternal dietary fat intake modifies breast milk fatty acids and cytokines. *European Journal of Nutrition*, 51(2), 211–219. <https://doi.org/10.1007/s00394-011-0209-0>
- Horta, B. L., Bahl, R., Martinés, J. C., Victora, C. G., & World Health Organization. (2007). Evidence on the long-term effects of breastfeeding: systematic review and meta-analyses.
- Hsu, F. F., & Turk, J. (2009). Electrospray ionization with low-energy collisionally activated dissociation tandem mass spectrometry of glycerophospholipids: mechanisms of fragmentation and structural characterization. *Journal of Chromatography B*, 877(26), 2673–2695.
- Hurtado, J. A., Iznaola, C., Peña, M., Ruíz, J., Peña-Quintana, L., Kajarabille, N., ... & NUGELA Group. (2015). Effects of maternal Ω -3 supplementation on fatty acids and on visual and cognitive development. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 61(4), 472–480.
- Huth, P. J., & Park, K. M. (2012). Influence of dairy product and milk fat consumption on cardiovascular disease risk: a review of the evidence. *Advances in nutrition*, 3(3), 266–285.
- Ingvordsen Lindahl, I. E., Artegoitia, V. M., Downey, E., O'Mahony, J. A., O'Shea, C.-A., Ryan, C. A., Kelly, A. L., Bertram, H. C., & Sundekilde, U. K. (2019). Quantification of Human Milk Phospholipids: the Effect of Gestational and Lactational Age on Phospholipid Composition. *Nutrients*, 11(2), 222. <https://doi.org/10.3390/nu11020222>
- Innis, S. M. (2011). Dietary Triacylglycerol Structure and Its Role in Infant Nutrition. *Advances in Nutrition*, 2(3), 275–283. <https://doi.org/10.3945/an.111.000448>

- Innis, S. M. (2014). Impact of maternal diet on human milk composition and neurological development of infants. *The American journal of clinical nutrition*, 99(3), 734S-741S.
- Innis, Sheila M. "Essential fatty acids in growth and development." *Progress in lipid research* 30.1 (1991): 39-103.
- Iranpour, R., Kelishadi, R., Babaie, S., Khosravi-Darani, K., & Farajian, S. (2013). Comparison of long chain polyunsaturated fatty acid content in human milk in preterm and term deliveries and its correlation with mothers' diet. *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 18(1), 1.
- Ismail, A. A., Van de Voort, F. R., Emo, G., & Sedman, J. (1993). Rapid quantitative determination of free fatty acids in fats and oils by Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 70, 335-341.
- Jenkins B, West JA, Koulman A. A Review of Odd-Chain Fatty Acid Metabolism and the Role of Pentadecanoic Acid (C15:0) and Heptadecanoic Acid (C17:0) in Health and Disease. *Molecules*. 2015; 20(2):2425-2444. <https://doi.org/10.3390/molecules20022425>
- Jensen, R. G. (1996). The lipids in human milk. *Progress in lipid research*, 35(1), 53-92.
- Jiang, Chenyu, et al. "Comprehensive lipidomic analysis of milk polar lipids using ultraperformance supercritical fluid chromatography-mass spectrometry." *Food Chemistry* (2022): 133336.
- Judge, M. P., Harel, O., & Lammi-Keefe, C. J. (2007). Maternal consumption of a docosahexaenoic acid-containing functional food during pregnancy: benefit for infant performance on problem-solving but not on recognition memory tasks at age 9 mo. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85(6), 1572–1577. <https://doi.org/10.1093/ajcn/85.6.1572>
- Kaingade P., Somasundaram, I., Nikam, A., Behera, P., Kulkarni, S., & Patel, J. (2017). Breast milk cell components and its beneficial effects on neonates: need for breast milk cell banking. *Journal of Pediatric and Neonatal Individualized Medicine (JPNIM)*, 6(1), e060115-e060115.
- Keim, S. A., Daniels, J. L., Siega-Riz, A. M., Herring, A. H., Dole, N., & Scheidt, P. C. (2012). Breastfeeding and long-chain polyunsaturated fatty acid intake in the first 4 post-natal months and infant cognitive development: an observational study. *Maternal & child nutrition*, 8(4), 471-482.
- Kim, H., Kang, S., Jung, B.-M., Yi, H., Jung, J. A., & Chang, N. (2017). Breast milk fatty acid composition and fatty acid intake of lactating mothers in South Korea. *British Journal of Nutrition*, 117(4), 556–561. <https://doi.org/10.1017/s0007114517000253>
- Köfeler, H. C., Fauland, A., Rechberger, G. N., & Trötzmüller, M. (2012). Mass spectrometry based lipidomics: an overview of technological platforms. *Metabolites*, 2(1), 19-38.
- Koletzko, B. (2017). Human milk lipids. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 69(Suppl. 2), 27-40.
- Koletzko, B., Boey, C. C., Campoy, C., Carlson, S. E., Chang, N., Guillermo-Tuazon, M. A., ... & Osendarp, S. J. (2014). Current information and Asian perspectives on long-chain polyunsaturated fatty acids in pregnancy, lactation, and infancy: systematic review and practice recommendations from an early nutrition academy workshop. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 65(1), 49-80.

- Koletzko, B., Lien, E., Agostoni, C., Böhles, H., Campoy, C., Cetin, I., ... & Uauy, R. (2008). The roles of long-chain polyunsaturated fatty acids in pregnancy, lactation and infancy: review of current knowledge and consensus recommendations.
- Koletzko, Berthold, et al. "Physiological aspects of human milk lipids." *Early human development* 65 (2001): S3-S18.
- Kramer, M. S., Aboud, F., Mironova, E., Vanilovich, I., Platt, R. W., Matush, L., Igumnov, S., Fombonne, E., Bogdanovich, N., Ducruet, T., Collet, J.-P., Chalmers, B., Hodnett, E., Davidovsky, S., Skugarevsky, O., Trofimovich, O., Kozlova, L., & Shapiro, S. (2008). Breastfeeding and child cognitive development: new evidence from a large randomized trial. *Archives of General Psychiatry*, 65(5), 578–584. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.65.5.578>
- Kuganathan, S., Gridneva, Z., Lai, C., Hepworth, A., Mark, P., Kakulas, F., & Geddes, D. (2017). Associations between Maternal Body Composition and Appetite Hormones and Macronutrients in Human Milk. *Nutrients*, 9(3), 252. <https://doi.org/10.3390/nu9030252>
- Kuipers, R. S., Luxwolda, M. F., Dijck-Brouwer, D. A. J., & Muskiet, F. A. J. (2012). Fatty acid compositions of preterm and term colostrum, transitional and mature milks in a sub-Saharan population with high fish intakes. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 86(4-5), 201–207. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2012.02.006>
- Kuksis, A. (1994). GLC and HPLC of neutral glycerolipids (pp. 177-22). Marcel Dekker, New York.
- Kuksis, A., L. Marai, J. J. Myher, Y. Habashi, and S. Pind. (1991). Applications of GC/MS, LC/MS and FAB/MS to determination of molecular species of glycerolipids. *Analysis of Fats, oils and lipoproteins*, 464-495.
- Lægreid, A., & Otnæss, A. B. K. (1987). Trace amounts of ganglioside GM1 in human milk inhibit enterotoxins from *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. *Life sciences*, 40(1), 55-62.
- LaKind, J. S., Wilkins, A. A., & Berlin Jr, C. M. (2004). Environmental chemicals in human milk: a review of levels, infant exposures and health, and guidance for future research. *Toxicology and applied pharmacology*, 198(2), 184-208.
- Lauritzen, L., Jørgensen, M. H., Hansen, H. S., & Michaelsen, K. F. (2002). Fluctuations in human milk long-chain PUFA levels in relation to dietary fish intake. *Lipids*, 37(3), 237–244. <https://doi.org/10.1007/s11745-002-0886-2>
- Lauritzen, Lotte, and Susan E. Carlson. "Maternal fatty acid status during pregnancy and lactation and relation to newborn and infant status." *Maternal & child nutrition* 7 (2011): 41-58.
- Lawrence, R. M., & Pane, C. A. (2007). Human Breast Milk: Current Concepts of Immunology and Infectious Diseases. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*, 37(1), 7–36. <https://doi.org/10.1016/j.cppeds.2006.10.002>
- Lee, P. S., Pujitha Wickramasinghe, Lamabadusuriya, S. P., Duncan, A., Wainscott, G., J. D. S. K. Weeraman, A. Wijekoon, & Wong, K. (2013). Breast milk DHA levels in Sri Lankan mothers vary significantly in three locations that have different access to dietary fish. *Ceylon Medical Journal*, 58(2), 51–51. <https://doi.org/10.4038/cmj.v58i2.5679>

- Lepage, G., & Roy, C. C. (1984). Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. *Journal of Lipid research*, 25(12), 1391-1396.
- Leventakou, V., Roumeliotaki, T., Koutra, K., Vassilaki, M., Mantzouranis, E., Bitsios, P., Kogevinas, M., & Chatzi, L. (2013). Breastfeeding duration and cognitive, language and motor development at 18 months of age: Rhea mother–child cohort in Crete, Greece. *Journal of Epidemiology and Community Health*, 69(3), 232–239. <https://doi.org/10.1136/jech-2013-202500>
- Li, P., Chen, X., Teng, T., Fan, X., Tang, T., Wang, R., Zhao, Y., & Qi, K. (2021). DHA-rich n-3 PUFAs intake from the early- and mid-pregnancy decreases the weight gain by affecting the DNA methylation status among Chinese Han infants. *Food & Nutrition Research*, 65. <https://doi.org/10.29219/fnr.v65.7548>
- Lindquist, S., & Hernell, O. (2010). Lipid digestion and absorption in early life: an update. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 13(3), 314–320. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e328337bbf0>
- LIPID MAPS: <https://www.lipidmaps.org/>
- Liu, Z., Rochfort, S., & Cocks, B. (2018). Milk lipidomics: What we know and what we don't. *Progress in lipid research*, 71, 70-85.
- Lönnerdal, B. (2013). Bioactive proteins in breast milk. *Journal of Paediatrics and Child Health*, 49(Suppl1), 1–7. <https://doi.org/10.1111/jpc.12104>
- Lönnerdal, B., & Lien, E. L. (2003). Nutritional and Physiologic Significance of α -Lactalbumin in Infants. *Nutrition Reviews*, 61(9), 295–305. <https://doi.org/10.1301/nr.2003.sept.295-305>
- López-López, A., Castellote-Bargalló, A. I., Campoy-Folgoso, C., Rivero-Urgel, M., Tormo-Carnicé, R., Infante-Pina, D., & López-Sabater, M. C. (2001). The influence of dietary palmitic acid triacylglyceride position on the fatty acid, calcium and magnesium contents of at term newborn faeces. *Early human development*, 65, S83-S94.
- Lordan, R., & Zabetakis, I. (2017). Invited review: The anti-inflammatory properties of dairy lipids. *Journal of dairy science*, 100(6), 4197-4212.
- Lubetzky, R., Sever, O., Mimouni, F. B., & Mandel, D. (2015). Human Milk Macronutrients Content: Effect of Advanced Maternal Age. *Breastfeeding Medicine*, 10(9), 433–436. <https://doi.org/10.1089/bfm.2015.0072>
- Lyons K. E., Ryan, C. A., Dempsey, E. M., Ross, R. P., & Stanton, C. (2020). Breast milk, a source of beneficial microbes and associated benefits for infant health. *Nutrients*, 12(4), 1039.
- Makrides, M, Smithers, L. G., Gibson, R. A., McPhee, A., &. (2008). Higher dose of docosahexaenoic acid in the neonatal period improves visual acuity of preterm infants: results of a randomized controlled trial. *The American journal of clinical nutrition*, 88(4), 1049-1056.
- Mandel, D. (2006). Fat Content in Human Milk According to Duration of Lactation: In Reply. *PEDIATRICS*, 117(3), 989–990. <https://doi.org/10.1542/peds.2005-3063>
- Marshall, N. E., Lau, B., Purnell, J. Q., & Thornburg, K. L. (2018). Impact of maternal obesity and breastfeeding intention on lactation intensity and duration. *Maternal & Child Nutrition*, 15(2), e12732. <https://doi.org/10.1111/mcn.12732>

- Martin, C. R., Ling, P. R., & Blackburn, G. L. (2016). Review of infant feeding: key features of breast milk and infant formula. *Nutrients*, 8(5), 279.
- Martin, R. M. (2005). Breastfeeding in Infancy and Blood Pressure in Later Life: Systematic Review and Meta-Analysis. *American Journal of Epidemiology*, 161(1), 15–26. <https://doi.org/10.1093/aje/kwh338>
- Masum, A. K. M., Chandrapala, J., Huppertz, T., Adhikari, B., & Zisu, B. (2020). Production and characterization of infant milk formula powders: A review. *Drying Technology*, 1–21. <https://doi.org/10.1080/07373937.2020.1767645>
- McCann, J. C., & Ames, B. N. (2005). Is docosahexaenoic acid, an n– 3 long-chain polyunsaturated fatty acid, required for development of normal brain function? An overview of evidence from cognitive and behavioral tests in humans and animals– . *The American journal of clinical nutrition*, 82(2), 281-295.
- McSweeney, S. L., O'Regan, J., & O'Callaghan, D. J. (2013). *Nutritional Formulae for Infants and Young Children*. John Wiley & Sons eBooks, 458–476. <https://doi.org/10.1002/9781118534168.ch21>
- Mehrotra, V., Sehgal, S. K., & Bangale, N. R. (2019). Fat structure and composition in human milk and infant formulas: Implications in infant health. *Clinical Epidemiology and Global Health*, 7(2), 153-159.
- Mehrotra, V., Sehgal, S. K., & Bangale, N. R. (2019). Fat structure and composition in human milk and infant formulas: Implications in infant health. *Clinical Epidemiology and Global Health*, 7(2), 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.cegh.2018.03.005>
- Meng, F., Uniacke-Lowe, T., Ryan, A. C., & Kelly, A. L. (2021). The composition and physico-chemical properties of human milk: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 112, 608–621. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.03.040>
- Moltó-Puigmartí, C., Castellote, A. I., Carbonell-Estrany, X., & López-Sabater, M. C. (2011). Differences in fat content and fatty acid proportions among colostrum, transitional, and mature milk from women delivering very preterm, preterm, and term infants. *Clinical Nutrition*, 30(1), 116–123. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2010.07.013>
- Morozov, V., Hansman, G., Hanisch, F.-G., Schrotten, H., & Kunz, C. (2018). Human Milk Oligosaccharides as Promising Antivirals. *Molecular Nutrition & Food Research*, 62(6), 1700679. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700679>
- Mortensen, E. L., Michaelsen, K. F., Sanders, S. A., & Reinisch, J. M. (2002). The Association Between Duration of Breastfeeding and Adult Intelligence. *Obstetrical & Gynecological Survey*, 57(10), 659–661. <https://doi.org/10.1097/00006254-200210000-00009>
- Mueller, A., Thijs, C., Rist, L., Simões-Wüst, A. P., Huber, M., & Steinhart, H. (2010). Trans fatty acids in human milk are an indicator of different maternal dietary sources containing trans fatty acids. *Lipids*, 45, 245-251.
- Murphy, E. G., Roos, Y. H., Hogan, S. A., Maher, P. G., Flynn, C. G., & Fenelon, M. A. (2015). Physical stability of infant milk formula made with selectively hydrolysed whey proteins. *International Dairy Journal*, 40, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.08.012>
- Neu, J., & Walker, W. A. (2011). Necrotizing Enterocolitis. *New England Journal of Medicine*, 364(3), 255–264. <https://doi.org/10.1056/nejmra1005408>

- Nishimura, R. Y., Barbieiri, P., de Castro, G. S. F., Jordão, A. A., da Silva Castro Perdoná, G., & Sartorelli, D. S. (2014). Dietary polyunsaturated fatty acid intake during late pregnancy affects fatty acid composition of mature breast milk. *Nutrition*, 30(6), 685–689. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.11.002>
- Nommsen-Rivers, L. A. (2016). Does Insulin Explain the Relation between Maternal Obesity and Poor Lactation Outcomes? An Overview of the Literature. *Advances in Nutrition*, 7(2), 407–414. <https://doi.org/10.3945/an.115.011007>
- Novak, E. M., & Innis, S. M. (2011). Impact of maternal dietary n-3 and n-6 fatty acids on milk medium-chain fatty acids and the implications for neonatal liver metabolism. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 301(5), E807–E817. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00225.2011>
- Oddy, W. H. (2017). Breastfeeding, childhood asthma, and allergic disease. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 70(Suppl. 2), 26-36.
- Oddy, W. H., Kendall, G. E., Blair, E., de Klerk, N. H., Silburn, S., & Zubrick, S. (2004). Breastfeeding and Cognitive Development in Children. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 365–369. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-4242-8_42
- Olafsdottir, A. S., Thorsdottir, I., Wagner, K. H., & Elmadfa, I. (2006). Polyunsaturated Fatty Acids in the Diet and Breast Milk of Lactating Icelandic Women with Traditional Fish and Cod Liver Oil Consumption. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 50(3), 270–276. <https://doi.org/10.1159/000091685>
- Olang, B., Hajifaraji, M., Ali, M. A., Hellstrand, S., Palesh, M., Azadnyia, E., Kamali, Z., Strandvik, B., & Yngve, A. (2012). Docosahexaenoic Acid in Breast Milk Reflects Maternal Fish Intake in Iranian Mothers. *Food and Nutrition Sciences*, 03(04), 441–446. <https://doi.org/10.4236/fns.2012.34063>
- Parveen, T., Hameed, F., Khan, J., & Khan, J. (2018). The impact of maternal obesity on neonatal Apgar score and neonatal intensive care unit admissions in a tertiary care hospital. *Pak J Surg*, 34(2), 161–165. http://www.pjs.com.pk/journal_pdfs/apr_jun18/161.pdf
- Patel, R., Oken, E., Bogdanovich, N., Matush, L., Sevkovskaya, Z., Chalmers, B., Hodnett, E. D., Vilchuck, K., Kramer, M. S., & Martin, R. M. (2013). Cohort Profile: The Promotion of Breastfeeding Intervention Trial (PROBIT). *International Journal of Epidemiology*, 43(3), 679–690. <https://doi.org/10.1093/ije/dyt003>
- Pavlíková, E., Blaško, J., Górová, R., Addová, G., Kubinec, R., Margetín, M., & Soják, L. (2010). Variation in fatty acid composition of ewes' colostrum and mature milk fat. *International dairy journal*, 20(9), 637-641.
- Peng, Y., Zhou, T., Wang, Q., Liu, P., Zhang, T., Zetterström, R., & Strandvik, B. (2009). Fatty acid composition of diet, cord blood and breast milk in Chinese mothers with different dietary habits. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 81(5-6), 325–330. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2009.07.004>
- Pérez-Gálvez, A., Calvo, M. V., Megino-Tello, J., Aguayo-Maldonado, J., Jiménez-Flores, R., & Fontecha, J. (2020). Effect of gestational age (preterm or full term) on lipid composition of the milk fat globule and its membrane in human colostrum. *Journal of Dairy Science*, 103(9), 7742–7751. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18428>

- PLAYFORD, R. (2001). Peptide therapy and the gastroenterologist: colostrum and milk-derived growth factors. *Clinical Nutrition*, 20(Suppl 1), 101–106. <https://doi.org/10.1054/clnu.2001.0434>
- Pons, S. M., Bargalló, A. C., & Sabater, M. L. (1998). Analysis of human milk triacylglycerols by high-performance liquid chromatography with light-scattering detection. *Journal of Chromatography A*, 823(1-2), 475-482.
- Puppel, K., Gołębiewski, M., Grodkowski, G., Słószarz, J., Kunowska-Słószarz, M., Solarczyk, P., Łukasiewicz, M., Balcerak, M., & Przysucha, T. (2019). Composition and Factors Affecting Quality of Bovine Colostrum: A Review. *Animals : An Open Access Journal from MDPI*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/ani9121070>
- Pusceddu, M. M., El Aidy, S., Crispie, F., O’Sullivan, O., Cotter, P., Stanton, C., Kelly, P., Cryan, J. F., & Dinan, T. G. (2015). N-3 Polyunsaturated Fatty Acids (PUFAs) Reverse the Impact of Early-Life Stress on the Gut Microbiota. *PLOS ONE*, 10(10), e0139721. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139721>
- Ramiro-Cortijo, D., Singh, P., Liu, Y., Medina-Morales, E., Yakah, W., Freedman, S. D., & Martin, C. R. (2020). Breast milk lipids and fatty acids in regulating neonatal intestinal development and protecting against intestinal injury. *Nutrients*, 12(2), 534.
- Ran-Ressler, R. R., Khailova, L., Arganbright, K. M., Adkins-Rieck, C. K., Jouni, Z. E., Koren, O., Ley, R. E., Brenna, J. T., & Dvorak, B. (2011). Branched Chain Fatty Acids Reduce the Incidence of Necrotizing Enterocolitis and Alter Gastrointestinal Microbial Ecology in a Neonatal Rat Model. *PLoS ONE*, 6(12), e29032. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029032>
- Ray, C., Kerketta, J. A., Rao, S., Patel, S., Dutt, S., Arora, K., Pournami, F., & Bhushan, P. (2019). Human Milk Oligosaccharides: The Journey Ahead. *International Journal of Pediatrics*, 2019, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2019/2390240>
- René Liang Shen, Thymann, T., Østergaard, M. V., Cathrine, A., Krych, L., Dennis Sandris Nielsen, Lauridsen, C., Hartmann, B., Holst, J. J., Burrin, D. G., & Sangild, P. T. (2015). Early gradual feeding with bovine colostrum improves gut function and NEC resistance relative to infant formula in preterm pigs. *AMJ Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 309(5), G310–G323. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00163.2015>
- Robles, A., Jiménez, M. J., Esteban, L., González, P. A., Martín, L., Rodríguez, A., & Molina, E. (2011). Enzymatic production of human milk fat substitutes containing palmitic and docosahexaenoic acids at sn-2 position and oleic acid at sn-1, 3 positions. *LWT-Food Science and Technology*, 44(10), 1986-1992.
- Rogers, L. K., Valentine, C. J., & Keim, S. A. (2013). DHA supplementation: current implications in pregnancy and childhood. *Pharmacological research*, 70(1), 13-19.
- Salem Jr, N., & Van Dael, P. (2020). Arachidonic acid in human milk. *Nutrients*, 12(3), 626.
- Sambra, V., Echeverria, F., Valenzuela, A., Chouinard-Watkins, R., & Valenzuela, R. (2021). Docosahexaenoic and arachidonic acids as neuroprotective nutrients throughout the life cycle. *Nutrients*, 13(3), 986.
- Schlimme, E., Martin, D., & Meisel, H. (2000). Nucleosides and nucleotides: natural bioactive substances in milk and colostrum. *British Journal of Nutrition*, 84(S1), 59–68. <https://doi.org/10.1017/S0007114500002269>
- Sinanoglou, V. J., & Miniadis-Meimaroglou, S. (1998). Fatty acid of neutral and polar lipids of (edible) Mediterranean cephalopods. *Food Research International*, 31(6-7), 467-473.

- Sinanoglou, V. J., Cavouras, D., Boutsikou, T., Briana, D. D., Lantzouraki, D. Z., Paliatsiou, S., Volaki, P., Bratakos, S., Malamitsi-Puchner, A., & Zoumpoulakis, P. (2017). Factors affecting human colostrum fatty acid profile: A case study. *PLOS ONE*, 12(4), e0175817. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175817>
- Sinanoglou, V. J., Strati, I. F., Bratakos, S. M., Proestos, C., Zoumpoulakis, P., & Miniadis-Meimaroglou, S. (2013). On the combined application of Iatroscan TLC-FID and GC-FID to identify total, neutral, and polar lipids and their fatty acids extracted from foods. *International Scholarly Research Notices*, 2013.
- Singhal, A., & Lucas, A. (2004). Early origins of cardiovascular disease: is there a unifying hypothesis? *The Lancet*, 363(9421), 1642–1645. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16210-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16210-7)
- Skolnick, J., Chou, C., & Miklavcic, J. (2020). Insights into Novel Infant Milk Formula Bioactives. *Nutrition and Dietary Supplements*, Volume 12, 11–19. <https://doi.org/10.2147/nds.s192099>
- Smith, R. M., & Marton, A. (1997). Classification and characterization of stationary phases for liquid chromatography: Part I. Descriptive terminology (IUPAC Recommendations 1997). *Pure and applied chemistry*, 69(7), 1475-1480.
- Stark, K. D., Van Elswyk, M. E., Higgins, M. R., Weatherford, C. A., & Salem, N. (2016). Global survey of the omega-3 fatty acids, docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid in the blood stream of healthy adults. *Progress in Lipid Research*, 63, 132–152. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2016.05.001>
- Stelwagen, K., Carpenter, E., Haigh, B., Hodgkinson, A., & Wheeler, T. T. (2009). Immune components of bovine colostrum and milk1. *Journal of Animal Science*, 87(suppl_13), 3–9. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1377>
- Su, Q., Sun, X., Zhu, L., Yan, Q., Zheng, P., Mao, Y., & Ye, D. (2021). Breastfeeding and the risk of childhood cancer: a systematic review and dose-response meta-analysis. *BMC Medicine*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12916-021-01950-5>
- Taguchi, Ryo, and Masaki Ishikawa. "Precise and global identification of phospholipid molecular species by an Orbitrap mass spectrometer and automated search engine Lipid Search." *Journal of Chromatography A* 1217.25 (2010): 4229-4239.
- Takumi, H., Kato, K., Nakanishi, H., Tamura, M., Ohto-N, T., Nagao, S., & Hirose, J. (2022). Comprehensive Analysis of Lipid Composition in Human Foremilk and Hindmilk. *Journal of Oleo Science*, 71(7), 947–957. <https://doi.org/10.5650/jos.ess21449>
- Tamás Decsi, Fekete, M., & Berthold Koletzko. (1997). Plasma lipid and apolipoprotein concentrations in full term infants fed formula supplemented with long-chain polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *European Journal of Pediatrics*, 156(5), 397–400. <https://doi.org/10.1007/s004310050624>
- Thompkinson, D. K., & Kharb, S. (2007). Aspects of Infant Food Formulation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 6(4), 79–102. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2007.00020.x>
- Toikkanen, O., Outinen, M., Malafrente, L., & Rojas, O. J. (2018). Formation and structure of insoluble particles in reconstituted model infant formula powders. *International Dairy Journal*, 82, 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.03.001>
- Totten, S. M., Zivkovic, A. M., Wu, S., Ngyuen, U., Freeman, S. L., Ruhaak, L. R., Darboe, M. K., German, J. B., Prentice, A. M., & Lebrilla, C. B. (2012). *Comprehensive Profiles of*

- Human Milk Oligosaccharides Yield Highly Sensitive and Specific Markers for Determining Secretor Status in Lactating Mothers. *Journal of Proteome Research*, 11(12), 6124–6133. <https://doi.org/10.1021/pr300769g>
- Trend, S., Strunk, T., Lloyd, M. L., Kok, C. H., Metcalfe, J., Geddes, D. T., Lai, C. T., Richmond, P., Doherty, D. A., Simmer, K., & Currie, A. (2016). Levels of innate immune factors in preterm and term mothers' breast milk during the 1st month postpartum. *British Journal of Nutrition*, 115(7), 1178–1193. <https://doi.org/10.1017/s0007114516000234>
- Tumanov, S., & Kamphorst, J. J. (2017). Recent advances in expanding the coverage of the lipidome. *Current opinion in biotechnology*, 43, 127-133.
- Uauy, R. D., Birch, D. G., Birch, E. E., Tyson, J. E., & Hoffman, D. R. (1990). Effect of dietary omega-3 fatty acids on retinal function of very-low-birth-weight neonates. *Pediatric research*, 28(5), 485-492.
- Uauy, R., Mize, C. E., & Castillo-Duran, C. (2000). Fat intake during childhood: metabolic responses and effects on growth. *The American journal of clinical nutrition*, 72(5), 1354s-1360s.
- Uauy, Ricardo, et al. "Essential fatty acids in visual and brain development." *Lipids* 36.9 (2001): 885-895.
- Ulfman, L. H., Leusen, J. H. W., Savelkoul, H. F. J., Warner, J. O., & van Neerven, R. J. J. (2018). Effects of Bovine Immunoglobulins on Immune Function, Allergy, and Infection. *Frontiers in Nutrition*, 5. <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00052>
- Van de Voort, F. R. & J. Sedman. FTIR spectroscopy: The next generation of oil analysis methodologies? *Inform* 11:614-620 (2000).
- Van de Voort, F. R. (1992). Fourier transform infrared spectroscopy applied to food analysis. *Food Research International*, 25(5), 397-403.
- Van de Voort, F. R. V., Sedman, J., & Hussain Sherazi, S. T. (2007). Improved determination of isolated trans isomers in edible oils by Fourier transform infrared spectroscopy using spectral reconstitution. *Journal of AOAC International*, 90(2), 446-451.
- Van Elten, T. M., van Rossem, L., Wijga, A. H., Brunekreef, B., De Jongste, J. C., Koppelman, G. H., & Smit, H. A. (2015). Breast milk fatty acid composition has a long-term effect on the risk of asthma, eczema, and sensitization. *Allergy*, 70(11), 1468-1476.
- van Sadelhoff, J., Mastorakou, D., Weenen, H., Stahl, B., Garsen, J., & Hartog, A. (2018). Short Communication: Differences in Levels of Free Amino Acids and Total Protein in Human Foremilk and Hindmilk. *Nutrients*, 10(12), 1828. <https://doi.org/10.3390/nu10121828>
- Visentainer, J. V., Santos, O. O., Maldaner, L., Zappiello, C., Neia, V., Visentainer, L., ... & Visentainer, J. L. (2018). Lipids and fatty acids in human milk: benefits and analysis. *Biochemistry and health benefits of fatty acids*.
- Wang, Shuangshuang, et al. "Characterization and comparison of lipids from human and ewe colostrum based on lipidomics analysis." *Food Chemistry* 400 (2023): 133998.
- Wheeler, T. T., Hodgkinson, A. J., Prosser, C. G., & Davis, S. R. (2007). Immune Components of Colostrum and Milk—A Historical Perspective. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 12(4), 237–247. <https://doi.org/10.1007/s10911-007-9051-7>
- Wilms, J. N., Hare, K. S., Fischer-Tlustos, A. J., Vahmani, P., Dugan, M. E. R., Leal, L. N., & Steele, M. A. (2022). Fatty acid profile characterization in colostrum, transition milk, and

- mature milk of primi- and multiparous cows during the first week of lactation. *Journal of Dairy Science*, 105(5), 4692–4710.
- Witkowska-Zimny, M., Kamińska-El-Hassan, E., & Wróbel, E. (2019). Witkowska-Zimny, M., Kamińska-El-Hassan, E., & Wróbel, E. Milk therapy: unexpected uses for human breast milk. *Nutrients*, 11 (5), 944.
- Wojcicki, J. M. (2011). Maternal Prepregnancy Body Mass Index and Initiation and Duration of Breastfeeding: A Review of the Literature. *Journal of Women's Health*, 20(3), 341–347. <https://doi.org/10.1089/jwh.2010.2248>
- World Health Organization. (2009). *Infant and young child feeding: model chapter for textbooks for medical students and allied health professionals*.
- Yao, M., Lien, E. L., Capeding, M. R. Z., Fitzgerald, M., Ramanujam, K., Yuhas, R., Northington, R., Lebumfacil, J., Wang, L., & DeRusso, P. A. (2014). Effects of Term Infant Formulas Containing High sn-2 Palmitate with and Without Oligofructose on Stool Composition, Stool Characteristics, and Bifidogenicity. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 59(4), 440–448. <https://doi.org/10.1097/mpg.0000000000000443>
- Yao, Y., Zhao, G., Yan, Y., Mu, H., Jin, Q., Zou, X., & Wang, X. (2016). Milk fat globules by confocal Raman microscopy: Differences in human, bovine and caprine milk. *Food Research International*, 80, 61-69.
- Young, B. E., Patinkin, Z. W., Pyle, L., de la Houssaye, B., Davidson, B. S., Geraghty, S., Morrow, A. L., & Krebs, N. (2017). Markers of Oxidative Stress in Human Milk do not Differ by Maternal BMI But are Related to Infant Growth Trajectories. *Maternal and Child Health Journal*, 21(6), 1367–1376. <https://doi.org/10.1007/s10995-016-2243-2>
- Young, C., Hikita, T., Kaneko, S., Shimizu, Y., Hanaka, S., Abe, T., ... & Nakajima, A. (1997). Fatty acid compositions of colostrum, cord blood, maternal blood and major infant formulas in Japan. *Pediatrics International*, 39(3), 299-304.
- Yuan, T., Qi, C., Dai, X., Xia, Y., Sun, C., Sun, J., ... & Wang, X. (2019). Triacylglycerol composition of breast milk during different lactation stages. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(8), 2272-2278.
- Zhang, Xinhao, et al. "Comparative lipidomics profiling of donkey milk with cow and human milk by UHPLC-Q-Exactive Orbitrap mass spectrometry." *Journal of Food Composition and Analysis* 101 (2021): 103988.
- Zhang, Z., Adelman, A., Rai, D., Boettcher, J., & Lönnerdal, B. (2013). Amino Acid Profiles in Term and Preterm Human Milk through Lactation: A Systematic Review. *Nutrients*, 5(12), 4800–4821. <https://doi.org/10.3390/nu5124800>
- Zhao, P., Zhang, S., Liu, L., Pang, X., Yang, Y., Lu, J., & Lv, J. (2018). Differences in the triacylglycerol and fatty acid compositions of human colostrum and mature milk. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(17), 4571-4579.
- Ανδριάς-Σταματόπουλος, Κ. (2022). Ολιστική ανάλυση μητρικού πρωτογάλακτος με φασματοσκοπία υπέρυθρου.
- Βιδάλη, Δέσποινα. "Χαρακτηρισμός μικροβιώματος στο μητρικό γάλα." (2022).
- Δημητροπούλου, Γεωργία, and Αικατερίνη Γεωργαράκη. "Προσδιορισμός IgA αντισωμάτων στο μητρικό γάλα." (2022).

- Κυριάκου, Γ. (2016). Ανάπτυξη μεθόδου αέριας χρωματογραφίας μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (GC-SPME) για τον προσδιορισμό πτητικών οξεών σε φυσικά προϊόντα και σκευάσματα (Doctoral dissertation, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης).
- Μαυρέλη, Γεωργία, and Βασιλική Γρούμπα. "Προσδιορισμός ολικών πρωτεϊνών αγελαδινού γάλακτος στο μητρικό." (2022).
- Μπρατσιώτης, Νικόλαος. "Ανάλυση και εκχύλιση λιπών." (2015).
- Παπαδογιάννης, Ι. Ν., & Σαμανίδου, Β. Φ. (2001). Ενόργανη χημική ανάλυση. Εκδόσεις Πήγασος, Θεσσαλονίκη.

Διαδίκτυο

<https://doi.org/10.1533/9780857097866.3>

<https://hcp.biostime.com/resource-centre/what-is-sn-2-palmitate/>

<http://chimikoergastirio.blogspot.com/2009/11/s.html>

<https://slideplayer.gr/amp/12053868/>