



Σχολή Επιστημών Τροφίμων
Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων
Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

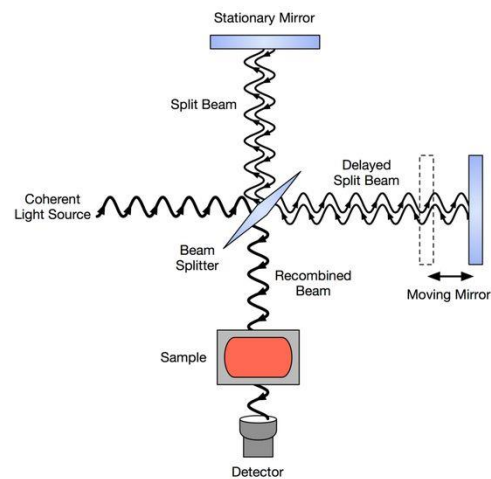
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ, ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
«Ολιστική ανάλυση μητρικού πρωτογάλακτος με Φασματοσκοπία Υπερύθρου»

MSc Thesis
«Holistic analysis of maternal colostrum using FT-IR spectroscopy»

Διευθυντής

Καθ. Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων (ΠΑ.Δ.Α) Ιωάννης Τσάκνης



ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ/NAME OF STUDENT

Ανδριάς Σταματόπουλος Κωνσταντίνος (20001)

Andrias Stamatopoulos Konstantinos (20001)

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF SUPERVISOR:

Ζουμπουλάκης Παναγιώτης

Zoumpoulakis Panagiotis

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2022

Έγινε δεκτή

Ο Διευθυντής του ΠΜΣ:

Οι υπογράφοντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία (master thesis) με τίτλο «**Ολιστική ανάλυση μητρικού πρωτογάλακτος με Φασματοσκοπία Υπερύθρου**» που παρουσιάστηκε από τον **ΑΝΔΡΙΑ ΣΤΑΜΑΤΟΠΟΥΛΟ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟ**, υποψηφίου για τον μεταπτυχιακό τίτλο σπουδών στην ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ, ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

Ημερομηνία

Όνομα επιβλέποντος

Ημερομηνία

Όνομα μέλους επιτροπής

Ημερομηνία

Όνομα μέλους επιτροπής

Δήλωση συγγραφέων πτυχιακής εργασίας περί λογοκλοπής/ Copyright

Έχοντας πλήρη επίγνωση των συνεπειών του νόμου περί πνευματικής ιδιοκτησίας, δηλώνω ότι είμαι αποκλειστικός συγγραφέας της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Δηλώνω, επίσης, ότι αναλαμβάνω όλες τις συνέπειες, όπως αυτές νομίμως ορίζονται, στην περίπτωση που διαπιστωθεί διαχρονικά ότι η εργασία μου αυτή ή τμήμα αυτής αποτελεί προϊόν λογοκλοπής.

Ανδριάς Σταματόπουλος Κωνσταντίνος



Ευχαριστίες

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον επιβλέπων καθηγητή κ. Ζουμπουλάκη Παναγιώτη, για την ευκαιρία και την εμπιστοσύνη που μου έδωσε, για την εκπόνηση της παρούσας εργασίας και για τη καθοδήγηση και τις συμβουλές που μου χάρισε κατά το διάστημα της συγγραφής της.

Οφείλω να ευχαριστήσω τον Τσιάντα Κωνσταντίνο, υποψήφιο διδάκτορα του τμήματος «Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων», για την συνεργασία, συμβουλευτική βοήθεια και στήριξη που μου έδειξε κατά την συγγραφή της εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω, επιπλέον, τους συναδέλφους μεταπτυχιακούς φοιτητές με τους οποίους συνεργάστηκα, και ιδιαίτερα, αυτούς με τους οποίους εξακολουθώ να συνεργάζομαι, για την συνεργασία, την ιδιαίτερη οργάνωση που παρουσίασαν, και την βοήθεια που μου πρόσφερα, κατά τη διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος, παρά τις αντίξοες συνθήκες που αναγκαστήκαμε να αντιμετωπίσουμε, λόγω της πανδημίας του COVID-19.

Τελειώνοντας, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια και στους φίλους μου, για την ενθάρρυνση και στήριξη που μου έδειξαν κατά την διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος, καθώς και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας.

Αφιερώσεις

Αφιερώνω στον εαυτό μου, και σε αυτή την εργασία, το παρακάτω απόσπασμα των στίχων του ποιήματος «Dies Irae»:

Confutatis maledictis,
Flammis acribus addictis,
Voca me cum benedictis.

-Dies Irae

Περίληψη

Το μητρικό γάλα είναι ο ιδανικός τρόπος θρέψης για τα νεογνά, όπως είναι εμφανές από τις διάφορες αναλυτικές έρευνες που έχουν διεξαχθεί για τη σύνθεσή του και την επίδρασή του στην ανάπτυξη, υγεία και φυσιολογική λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος των νεογνών. Η σύνθεση του μητρικού γάλακτος αλλάζει δραματικά κατά τη συνολική διάρκεια της βρεφικής θρέψης, ώστε να καλύψει τις διατροφικές και ανοσολογικές ανάγκες του νεογνού, ανά πάσα περίοδο της γαλουχίας. Λόγω αυτού, απαραίτητη είναι η ανάπτυξη μεθόδων που θα επιτρέψουν την γρήγορη, ορθή και ακριβή διάκριση των διάφορων ειδών μητρικού γάλακτος, όπως το πρωτόγαλα, το μεταβατικό και το ώριμο γάλα. Το πρωτόγαλα, από τη φύση του, διακρίνεται από τα άλλα είδη γάλακτος, κατέχοντας σημαντικό ρόλο στην ενίσχυση και τη καλή διαμόρφωση του ανοσοποιητικού συστήματος του νεογνού. Σε αντίθεση με το ώριμο γάλα, περιέχει περισσότερους ανοσολογικούς παράγοντες, όπως οι ανοσογλοβουλίνες, παρά διατροφικούς, όπως πολλά απαραίτητα αμινοξέα. Σημαντικό ρόλο, επιπλέον, στη διαμόρφωση της μικροχλωρίδας του εντέρου, και κατ' επέκταση στην ανάπτυξη του ανοσοποιητικού συστήματος, παίζουν οι Ολιγοσακχαρίτες Μητρικού Γάλακτος (Human Milk Oligosaccharides, HMO), με τις πολυποίκιλες λειτουργίες τους, όπως τις ανοσολογικές και τις αντισυγκολλητικές. Σε αυτή την εργασία, έγινε ολιστική ανάλυση δειγμάτων μητρικού πρωτογάλακτος με τη χρήση της φασματοσκοπίας Αποσβένουσας Ολικής Ανάκλασης-Υπέρυθρης Ακτινοβολίας Μετασχηματισμού Fourier (Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared, ATR-FTIR) σε συνδυασμό με την στατιστική Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA), με σκοπό την ανάλυση της σύνθεσης των μακροθρεπτικών συστατικών τους, καθώς και την διερεύνηση των παραγόντων που επηρεάζουν τη σύνθεσή τους, κατά τη διάρκεια της γαλουχίας. Η κατανόηση της σύνθεσης του μητρικού πρωτογάλακτος, και των λειτουργιών των συστατικών του, θα επιτρέψει τη βελτίωση των κλινικών πρακτικών, τη βελτίωση της διατροφής των νεογνών και την ανάπτυξη εναλλακτικών προϊόντων βρεφικής φόρμουλας, ώστε να είναι δυνατή η θρέψη, σε περίπτωση που το μητρικό γάλα δεν είναι διαθέσιμο. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ηλικία κύησης, η εθνικότητα, το κάπνισμα και ο Δείκτης Μάζας Σώματος (Body Mass Index, BMI) έπαιξαν σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση της σύνθεσης του μητρικού πρωτογάλακτος, ενώ η ηλικία της μητέρας και ο αριθμός τόκου, παρότι που εκδήλωσαν μεταβολές στη σύνθεσή του, αυτές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές.

Abstract

Maternal or Breast milk is the ideal source of food for neonates, as evidenced by the various detailed studies that were conducted on its composition and its effect on growth, development and health of the infant's immune system. The composition of breast milk changes dramatically during the entirety of infant feeding, in order to fulfill the nutritional and immunological needs of the neonate. Because of this, it is necessary to develop methods that will allow fast, precise and accurate distinction of the different types of breast milk, such as colostrum, transitional and mature milk. Colostrum, by nature, is distinguished from other types of milk, playing an important role in the growth and development of the neonate's immune system. Unlike mature milk, it mostly contains immunological factors, such as immunoglobulins, rather than nutrients, such as essential amino acids. In addition, Human Milk Oligosaccharides (HMO) play an important role in the formation of gut microbiota and in the development of the immune system, due to their numerous immunological and anti-adhesive factors. In this dissertation, a descriptive analysis of maternal colostrum samples was performed using Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) spectroscopy, in combination with Principal Component Analysis (PCA), in order to analyze the composition of their macronutrients, as well as to investigate the factors that affect their composition, during lactation. Better understanding of the composition of breast milk, and the functions of its components, will greatly improve clinical practices, infant nutrition and the development of products based on infant formula, so that adequate nutrition can be provided if breast milk is unavailable. Results suggest that colostrum composition was mainly dependent on gestational age, ethnicity, smoking and Body Mass Index (BMI) rather than on maternal age or parity number, even if the latter exhibited changes in the overall colostrum macronutrient profile.

Περιεχόμενα

Δήλωση συγγραφέων πτυχιακής εργασίας περί λογοκλοπής/ Copyright.....	3
Ευχαριστίες.....	4
Αφιερώσεις.....	5
Περίληψη.....	6
Abstract	7
Περιεχόμενα.....	8
Κατάλογος Διαγραμμάτων	9
Κατάλογος Πινάκων	10
Κατάλογος Εικόνων	11
Εισαγωγή.....	12
Κεφάλαιο 1: Μητρικό Πρωτόγαλα.....	14
1.1 Ορισμός.....	14
1.2 Σημαντικότητα, χρήσεις και μελλοντικές επιπτώσεις του μητρικού γάλακτος.....	14
1.2.1 Βραχυπρόθεσμες και μακροπρόθεσμες επιδράσεις	14
1.2.2 Χρήσεις του μητρικού γάλακτος	15
1.3 Σύνθεση μητρικού γάλακτος.....	16
1.3.1 Ενδογενή συστατικά μητρικού γάλακτος.....	17
1.3.2 Μακροθρεπτικά συστατικά.....	17
1.3.2.1 Λίπος.....	18
1.3.2.2 Πρωτεΐνες και μη-πρωτεϊνικά αζωτούχα παράγωγα.....	20
1.3.2.3 Υδατάνθρακες	21
1.3.3 Μικροθρεπτικά συστατικά.....	23
1.3.3.1 Θειαμίνη (B1)	24
1.3.3.2 Ριβοφλαβίνη (B2)	24
1.3.3.3 Νιασίνη (B3)	25
1.3.3.4 Παντοθενικό οξύ (B5).....	25
1.3.3.5 Βιταμίνη B6.....	25
1.3.3.6 Βιταμίνη B7.....	26
1.3.3.7 Βιταμίνη B9.....	26
1.3.3.8 Κοβαλαμίνη (B12).....	26
1.3.3.9 Βιταμίνη Α.....	27
1.3.3.10 Βιταμίνη D	27
1.3.3.11 Βιταμίνη Ε.....	27
1.3.3.12 Άλλα μικροθρεπτικά συστατικά	27
1.3.4 Εξωγενή συστατικά μητρικού γάλακτος	29
1.3.5 Οργανοχλωριούχα φυτοφάρμακα και μεταβολίτες τους.....	30
1.4 Παράγοντες που Επηρεάζουν την Σύσταση του Μητρικού Γάλακτος.....	30
1.5 Σύνθεση Βρεφικής Φόρμουλας – Επιπτώσεις	32
1.6 Σημαντικοί Βιοχημικοί Δείκτες.....	35
1.6.1 Μεταβολές κατά τη Πρώιμη Γαλουχία	35
1.6.2 Σημαντικότητα για τη Μεταφορά Βιοχημικών Μηνυμάτων.....	36
1.6.3 Βιοενεργοί Παράγοντες στο Μητρικό Γάλα	36
1.6.2.1 Αυξητικοί Παράγοντες (Growth Hormones)	37
1.6.2.2 Ανοσολογικοί παράγοντες (Immunological Factors)	38
Κεφάλαιο 2: Φασματομετρία Υπερύθρου – Βιβλιογραφική Ανασκόπηση	40
2.1 Η ανάλυση μητρικού πρωτογάλακτος με φασματομετρία υπερύθρου.....	40

2.2	Βιβλιογραφική ανασκόπηση	40
2.2.1	Ανάλυση της σύνθεσης του μητρικού γάλακτος με ATR-FTIR φασματοσκοπία.....	41
2.2.1.1	Προσδιορισμός χοληστερόλης.....	42
2.2.2	Η χρήση της ATR-FTIR φασματοσκοπίας για την ανάλυση και τη σύγκριση των διαφορών του μητρικού γάλακτος με γάλατα άλλων θηλαστικών.....	43
2.2.2.1	Διαφορά στη περιεκτικότητα του λίπους	43
2.2.2.2	Διαφορές στα λιπαρά οξέα	44
2.3	Σύγκριση ATR-FTIR φασματοσκοπίας με άλλες αναλυτικές μεθόδους.....	45
2.3.1	Νέες προσεγγίσεις με την FTIR φασματοσκοπία	47
2.3.1.1	Κρυογονική IR φασματοσκοπία	47
2.3.1.2	Αναλυτές IR Μητρικού Γάλακτος	48
2.3.1.3	Φασματοσκοπία εγγύς-IR	49
Κεφάλαιο 3:	Πειραματικό Μέρος	50
3.1	Μέθοδοι και Υλικά	50
3.1.1	Προκατεργασία των δειγμάτων	50
3.1.2	Φασματοσκοπία αποσβένουσας ολικής ανάκλασης-υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier (ATR-FTIR)	50
3.1.3	Προκατεργασία των δεδομένων	51
3.1.4	Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA)	52
Κεφάλαιο 4:	Αποτελέσματα - Συζήτηση.....	53
4.1	Επισκόπηση Δειγματοχώρου (Metadata) Δειγμάτων.....	53
4.2	Αποτίμηση φασμάτων υπερύθρου	54
4.3	Πολυμεταβλητή Στατιστική ανάλυση	58
4.3.1	Ερμηνεία αποτελεσμάτων.....	60
4.3.2	Εξέταση παραγόντων δειγματοχώρου	61
4.3.2.1	Παράγοντας ηλικίας κύησης	61
4.3.2.2	Παράγοντας ηλικίας της μητέρας	63
4.3.2.3	Παράγοντας εθνικότητας	65
4.3.2.4	Παράγοντας καπνίσματος.....	66
4.3.2.5	Παράγοντας αριθμού τόκου (parity number).....	67
4.3.2.6	Παράγοντας δείκτη μάζας σώματος (BMI)	68
4.3.3	Σημαντικότητα μελέτης, περιορισμοί και προκλήσεις	71
4.3.4	Υποδείξεις για περαιτέρω έρευνα	72
4.4	Συμπεράσματα	73
Βιβλιογραφία		75
Παράρτημα.....		94

Κατάλογος Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: Ανάλυση PCA – απεικόνιση κορυφών (μεταβλητών, variables) στο επίπεδο των παραγόντων (factor-plane)	59
Διάγραμμα 2: Ανάλυση PCA – απεικόνιση δειγμάτων (cases) στο επίπεδο των παραγόντων (factor-plane).....	60
Διάγραμμα 3: Ανάλυση PCA – Κόκκινοι κύκλοι: Τάση ομαδοποίησης δειγμάτων πρόωρης κύησης (preterm birth)	62

Διάγραμμα 4: Ανάλυση PCA – Μπλε κύκλοι: Τάση δειγμάτων ηλικίας 25-29 ετών	63
Διάγραμμα 5: Ανάλυση PCA – Πράσινοι κύκλοι: Διασπορά δειγμάτων ηλικίας 30-34 ετών.....	64
Διάγραμμα 6: Ανάλυση PCA – Κίτρινοι κύκλοι: Τάση δειγμάτων ηλικίας 35-39 ετών	64
Διάγραμμα 7: Ανάλυση PCA – Πορτοκαλί κύκλοι: Διασπορά δειγμάτων ηλικίας 40-45 ετών.....	65
Διάγραμμα 8: Ανάλυση PCA – Τάσεις μητέρων με μη-Ελληνική εθνικότητα. Μπλε κύκλος: Ιρακινή. Κόκκινος κύκλος: Αλβανική. Πορτοκαλί κύκλος: Ουκρανική. Κίτρινος κύκλος: Φιλιπινέζικη.....	66
Διάγραμμα 9: Ανάλυση PCA – Τάσεις καπνίσματος. Κόκκινοι κύκλοι: Κάπνισμα κατά την εγκυμοσύνη. Πράσινοι κύκλοι: διακοπή προ κύησης. Μπλε κύκλοι: Διακοπή στη κύηση.....	67
Διάγραμμα 10: Ανάλυση PCA – Τάσεις αριθμού τόκου. Κόκκινοι κύκλοι: ένας (1) τοκετός. Μπλε κύκλοι: δύο (2) τοκετοί. Πράσινοι κύκλοι: τρεις (3) τοκετοί. Κίτρινος κύκλος: τέσσερεις (4) τοκετοί.	68
Διάγραμμα 11: Ανάλυση PCA – Τάσεις BMI μητέρων προ κύησης. Μπλε κύκλοι: κάτω από 18,5. Πράσινοι κύκλοι: 18,5-24,9. Πορτοκαλί κύκλοι: 25-29,9. Κόκκινοι κύκλοι: πάνω από 30.....	70
Διάγραμμα 12: Ανάλυση PCA – Τάσεις BMI μητέρων μετά κύησης. Πράσινοι κύκλοι: 18,5-24,9. Πορτοκαλί κύκλοι: 25-29,9. Κόκκινοι κύκλοι: πάνω από 30.....	70

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Μακροθρεπτικά συστατικά (g/dL) και ενέργεια (kcal/dL) μητρικού γάλακτος (Ballard and Morrow 2013)	18
Πίνακας 2: Άλλα μικροθρεπτικά συστατικά στο μητρικό γάλα (Dumrongwongsiri, et al. 2021)	29
Πίνακας 3: Πρώτοι βιοενεργοί παράγοντες στο μητρικό γάλα (Bernt and Walker 1999)	38
Πίνακας 4: Σύγχρονοι βιοενεργοί παράγοντες στο μητρικό γάλα (2) (Ballard and Morrow 2013).....	39
Πίνακας 5: Σύγχρονοι βιοενεργοί παράγοντες στο μητρικό γάλα (1) (Ballard and Morrow 2013).....	39
Πίνακας 6: Σύγχρονοι βιοενεργοί παράγοντες στο μητρικό γάλα (3) (Ballard and Morrow 2013).....	39
Πίνακας 7: Μέσο Ποσοστό Λίπους σε Γάλατα Θηλαστικών (Pietrzak-Fiećko and Kamelska-Sadowska 2020).....	44
Πίνακας 8: Κατάταξη και ποσοστά ηλικιών των μητέρων	53
Πίνακας 9: Κατάταξη και ποσοστά ηλικιών κύησης (σε βδομάδες) των νεογνών	53
Πίνακας 10: Κατάταξη και ποσοστά πρόωρης και τελειόμηνης κύησης των νεογνών	53
Πίνακας 11: Κατάταξη και ποσοστά εθνικότητας των μητέρων.....	53
Πίνακας 12: Κατάταξη και ποσοστά καπνίζοντων και μη-καπνίζοντων μητέρων	54
Πίνακας 13: Κατάταξη και ποσοστά αριθμών τοκετών των μητέρων	54

Πίνακας 14: Κατάταξη και ποσοστά δείκτη μάζας σώματος (BMI) προ κύησης των νεογνών	54
Πίνακας 15: Κατάταξη και ποσοστά δείκτη μάζας σώματος (BMI) μετά κύησης των νεογνών	54
Πίνακας 16: Αντιστοιχεία κορυφών (cm^{-1}) και δειγμάτων	57
Πίνακας 17: Εντάσεις κορυφών ανά δείγμα	58
Πίνακας 18: Ποσοστό νόσησης	94
Πίνακας 19: Ποσοστά φύλων	94
Πίνακας 20: Ποσοστά επιπλοκών κύησης.....	94
Πίνακας 21: Ποσοστά διδύμου κύησης	94
Πίνακας 22: Ποσοστά υποκείμενης νόσησης	95
Πίνακας 23: Ποσοστά εμβολιασμού κατά του COVID-19	95
Πίνακας 24: Ποσοστά φαρμακευτικής αγωγής προ κύησης	95
Πίνακας 25: Ποσοστά φαρμακευτικής αγωγής μετά κύησης δειγμάτων.....	96
Πίνακας 26: Ποσοστά ημέρας λήψης δειγμάτων	96

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση των εν δυνάμει ωφελειών των HMO (Jantscher-Krenn and Bode 2012).....	22
Εικόνα 2: Γνωστοί HMO ανά είδος.....	23
Εικόνα 3: Επιπτώσεις βρεφικής φόρμουλας έναντι μητρικού γάλακτος	33

Εισαγωγή

Το μητρικό γάλα εκτός από τη βασική τροφή του νεογνού, αποτελεί και ένα πολύ ιδιαίτερο βιοχημικό σύστημα που περιέχει μακροθρεπτικά συστατικά όπως οι πρωτεΐνες, οι υδατάνθρακες, τα λιπίδια, αλλά και άλλα βιολειτουργικά συστατικά, όπως, οι ολιγοσακχαρίτες του μητρικού γάλακτος, οι ορμόνες, οι ανοσολογικοί παράγοντες και μικροθρεπτικά συστατικά όπως οι βιταμίνες, τα ιχνοστοιχεία και τα μέταλλα. Παρέχει, επομένως, όλους τους θρεπτικούς παράγοντες που είναι απαραίτητοι για την ανάπτυξη των νεογνών για τους πρώτους 6 μήνες της ζωής τους (WHO 2022). Τα βιολειτουργικά συστατικά που περιέχει βοηθούν να ενισχυθεί το ανοσοποιητικό τους σύστημα και να διασφαλιστεί η περιγεννητική υγεία του αναπτυσσόμενου οργανισμού τους (Cacho and Lawrence 2017).

Σε αντίθεση με τη βρεφική φόρμουλα, η οποία έχει τυποποιημένη και μη μεταβαλλόμενη σύνθεση, η σύνθεση του μητρικού γάλακτος μεταβάλλεται δυναμικά κατά τη περίοδο της γαλουχίας, σε καθημερινή βάση, μέχρι και κατά τη διάρκεια μεμονωμένων θηλασμών (Ballard and Morrow 2013). Η σύνθεσή του, τυπικά προσεγγίζει αυτή του γάλακτος άλλων θηλαστικών, όπου, τυπικά, το 0,8-1,2% w/w αποτελεί πρωτεΐνες, το 3-5% w/w αποτελεί ολικό λίπος και το 6-7% w/w αποτελεί τους υδατάνθρακες, με κύριο εκπρόσωπο την λακτόζη. Η υπόλοιπη σύνθεση συγκαταλέγεται στο νερό (>85%) και στους βιολειτουργικούς παράγοντες (ορμόνες, ανοσολογικοί παράγοντες, ιχνοστοιχεία μέταλλα κ.α.) (Boquien 2018).

Κατά τη μεταβολή του μητρικού γάλακτος από πρωτόγαλα σε ώριμο γάλα, το περιεχόμενο των πρωτεϊνών και του ολικού λίπους ελαττώνεται, έτσι ώστε να προσαρμοστεί στις διατροφικές ανάγκες του νεογνού (Sever, et al. 2015). Οι εξωγενείς παράγοντες που επηρεάζουν τη σύνθεση του μητρικού γάλακτος είναι επίσης σημαντικοί διότι μπορούν, όταν αναλυθούν, να δώσουν μια ακριβή πρόβλεψη για τα ποσοστά των μακρο- και μικροθρεπτικών συστατικών των θηλάζουσων γυναικών. Οι παράγοντες αυτοί περιλαμβάνουν, μεταξύ άλλων, τη διατροφή, τον δείκτη μάζας σώματος, την ηλικία, την εθνικότητα, το ιστορικό νόσησης και τις προσωπικές συνήθειες, όπως το κάπνισμα (Bērziņš, et al. 2021).

Τα τελευταία χρόνια, οι δονητικές φασματοσκοπικές τεχνικές, όπως η φασματοσκοπία μέσης υπέρυθρης ακτινοβολίας, έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση της σύνθεσης του μητρικού γάλακτος (Ramos-Garcia, et al. 2021, Bērziņš, et al. 2021, Kamelska, Pietrzak-Fiećko and Bryl 2013). Αυτές οι τεχνικές περιλαμβάνουν πληροφορίες σχετικά με τη δόνηση των δεσμών των χαρακτηριστικών ομάδων των ενώσεων που περιέχονται στο μητρικό γάλα. Αυτό τις καθιστά υψηλά ευαίσθητες τεχνικές, εφόσον μικρές αλλαγές στη σύνθεση συνεπάγεται μεγάλες αλλαγές

στα υπό μελέτη φάσματά τους. Οι μετρήσεις των τεχνικών αυτών είναι τυπικά ταχείες, απλές και μη-καταστρεπτικές (Diem 2015).

Σε αυτή τη μελέτη ερευνήθηκε πως οι δονητικές πληροφορίες που παρέχουν τα φάσματα της φασματοσκοπίας μέσης υπέρυθρης ακτινοβολίας συσχετίζονται με τα συστατικά του μητρικού πρωτογάλακτος, τις αναλογίες μεταξύ αυτών και τους εξωγενείς παράγοντες των θηλάζουσων μητέρων που τα επηρεάζουν. Συγκεκριμένα αναλύθηκαν δείγματα από 44 διαφορετικές θηλάζουσες μητέρες και, επιπλέον, εφαρμόστηκαν χημειομετρικές μέθοδοι (στατιστικές αναλύσεις με τη χρήση Ανάλυσης Κύριων Συνιστωσών) για την ταυτοποίηση και την συσχέτιση των τάσεων σχετικά με τους παράγοντες του δειγματοχώρου των δειγμάτων (metadata), και για την εξαγωγή αποτελεσμάτων από τις αναλογίες των μακροθρεπτικών συστατικών τους.

Κεφάλαιο 1: Μητρικό Πρωτόγαλα

1.1 Ορισμός

Το πρωτόγαλα είναι η πρώτη μορφή του γάλακτος που εκκρίνεται από τους μαστικούς αδένες των γαλακτοφόρων θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου, αμέσως μετά τη γέννηση του νεογνού (Ballard and Morrow 2013). Το πρωτόγαλα είναι διαφορετικό σε όγκο, εμφάνιση και σύσταση από το ώριμο γάλα. Τυπικά, σε αντίθεση με το κανονικό γάλα, το πρωτόγαλα είναι πλούσιο σε ουσίες του ανοσολογικού συστήματος, όπως η ανοσοσφαιρίνη Α (IgA), η λακτοφερίνη, τα λευκοκύτταρα, καθώς και παράγοντες ανάπτυξης όπως η αυξητική ορμόνη (Castellote, et al. 2011). Αυτό υποδεικνύει ότι η πρωταρχική χρήση του πρωτογάλακτος είναι η ανοσολογική ενίσχυση του νεογνού και όχι η θρέψη του. Άλλες διαφορές του πρωτογάλακτος, έναντι του κανονικού, συμπεριλαμβάνουν την υψηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και τριγλυκερίδια ακόρεστων λιπαρών οξέων, σε ηλεκτρολύτες, όπως το νάτριο το μαγνήσιο και το χλώριο, και τη χαμηλότερη περιεκτικότητα σε κάλιο και ασβέστιο (Kulski and Hartmann 1981, Cregan, et al. 2002, Zhao, et al. 2018).

1.2 Σημαντικότητα, χρήσεις και μελλοντικές επιπτώσεις του μητρικού γάλακτος

Το μητρικό γάλα παρέχει τα απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία στο νεογνό, ενισχύοντας την υγεία και την ανάπτυξή του. Τα τελευταία χρόνια, έρευνες γίνονται για την κλινική και φαρμακευτική χρήση του μητρικού γάλακτος, με ιδιαίτερη έμφαση στις ενισχυτικές και τη θεραπευτικές του ιδιότητες, πράγμα που αποτελεί σημαντικό παράγοντα χρήσης του σε περιοχές όπου δεν υπάρχει ευχερής πρόσβαση σε φαρμακευτική αγωγή και περίθαλψη (Witkowska-Zimny, Kaminska-El-Hassan and Wrobel 2019).

1.2.1 Βραχυπρόθεσμες και μακροπρόθεσμες επιδράσεις

Το μητρικό γάλα έχει συνδεθεί με μειωμένη βραχυπρόθεσμη θνησιμότητα από γαστρεντερικές και αναπνευστικές παθήσεις, από το σύνδρομο του αιφνίδιου βρεφικού θανάτου (sudden infant death syndrome) και από τη νεκρωτική εντεροκολίτιδα (Chung, et al. 2007, Kramer 2010, Witkowska-Zimny, Kaminska-El-Hassan and Wrobel 2019, Chandwe and Kelly 2021). Οι μακροπρόθεσμες επιδράσεις του μητρικού γάλακτος είναι πολύ δυσκολότερο να προσδιοριστούν, καθώς η συσχέτισή του με την υγεία αποτελεί πρόκληση, η οποία μόλις πρόσφατα έχει αρχίσει να αντιμετωπίζεται (Witkowska-Zimny, Kaminska-El-Hassan and Wrobel 2019, Kramer 2010). Αυτό οφείλεται στον μεγάλο αριθμό παραγόντων που συνεισφέρουν στην συνολική υγεία των ατόμων,

και στην δυσκολία της απομόνωσής και συσχέτισής τους με την παρουσία ή την απουσία κάποιας πάθησης.

Ο Kramer (2010), σε έρευνα που μελέτησε τις μακροπρόθεσμες επιπτώσεις (έως και τα 6,5 πρώτα χρόνια ζωής του παιδιού) του μητρικού γάλακτος στην υγεία νεογνών/παιδιών, δε βρήκε συσχέτιση μεταξύ θηλασμού και μειωμένης αρτηριακής πίεσης, μειωμένης πιθανότητας αλλεργιών και άσθματος ή παθήσεις των δοντιών. Η μόνη μακροπρόθεσμη επίδραση που παρατηρήθηκε είναι η υψηλότερη ακαδημαϊκή απόδοση και το υψηλότερο IQ, υποδεικνύοντας ότι ο θηλασμός συσχετίζεται με την ταχύτερη ανάπτυξη του εγκεφάλου, και έτσι, τις υψηλότερες νοητικές ικανότητες (Kramer 2010).

Σε έρευνα του Schanler (2011), που μελέτησε τα αποτελέσματα στην βραχυπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη υγεία και τη φυσιολογία νεογνών που τους χορηγήθηκε μητρικό γάλα, βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ μητρικού γάλακτος και μειωμένης θνησιμότητας των νεογνών λόγω λοιμωδών παθήσεων, καθώς και μειωμένης πιθανότητας επανεκδήλωσης ασθενειών μετά από ανάρρωση. Μακροπρόθεσμα, η κατανάλωση μητρικού γάλακτος σε βρεφική ηλικία συσχετίστηκε με την αυξημένη νοητική και κινητική ανάπτυξη, καθώς και με τη βελτιωμένη οπτική ικανότητα και τον αυξημένο δείκτη νοημοσύνης, κατά τη διάρκεια της εφηβείας (Schanler 2011).

1.2.2 Χρήσεις του μητρικού γάλακτος

Τα τελευταία χρόνια, εντατική έρευνα έχει πραγματοποιηθεί στη χρήση συστατικών βιολογικά όμοιων με αυτά που υπάρχουν στο μητρικό γάλα για την παραγωγή βρεφικών φόρμουλων, με σκοπό να παρέχουν ανάλογα οφέλη στα βρέφη κατά τους πρώτους μήνες της ζωής τους (Pérez-Escalante, et al. 2020, Guo 2021, Wiciński, et al. 2020, Zhu, Zhang and Mu 2022). Συγκεκριμένα, οι ολιγοσακχαρίτες του μητρικού γάλακτος (Human Milk Oligosaccharides, HMO), οι οποίοι έχουν συσχετιστεί, μεταξύ άλλων, με αντισυγκολλητικές ιδιότητες, με δράση κατά των παθογόνων μικροοργανισμών (Hegar, et al. 2019), με αντιαλλεργικές ιδιότητες (Castillo-Courtade, et al. 2015), με δράσεις κατά της δυσκοιλιότητας (Wang, et al. 2017), υπέρ της ανάπτυξης των οστών (Bryk, et al. 2015) και υπέρ της ανάπτυξης της μικροχλωρίδας του εντέρου (Šuligoj, et al. 2020), χρησιμοποιούνται εκτενώς για την ανάπτυξη προϊόντων βρεφικής φόρμουλας, καθώς και φαρμακευτικών προϊόντων (Wiciński, et al. 2020).

Πιο συγκεκριμένα, έρευνα που περιελάμβανε 100 υγιείς ενήλικες αξιολόγησε την πρεβιοτική δράση των ολιγοσακχαριτών του μητρικού γάλακτος. Η έρευνα αφορούσε τη χορήγηση της 2'-Ο-φουκοσυλακτόζης (2'-O-fucosyllactose, 2'FL), και λακτο-N-νεοτετραόζης (lacto-N-

neotetraose, LNnT), δύο χαρακτηριστικών ολιγοσακχαριτών του μητρικού γάλακτος, σε ποικίλες ημερήσιες δόσεις, ή δόση εικονικού φαρμάκου «πλασέμπο», για 2 εβδομάδες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι ημερήσιες δόσεις μέχρι 20 g ήταν ασφαλείς και ανεκτές από τον ανθρώπινο οργανισμό. Στο διάστημα των 2 εβδομάδων, η μικροχλωρίδα του εντέρου των ατόμων που τους είχαν χορηγηθεί οι ολιγοσακχαρίτες είχε μεταβληθεί. Η χορήγηση των ολιγοσακχαριτών θεωρείται ότι αύξησε τους πληθυσμούς των βακτηρίων του γένους *Actinobacterium*, καθώς και του γένους *Bifidobacterium*, ενισχύοντας έτσι τη προβιοτική τους δράση. Προκλήθηκε, από την άλλη, μείωση γενών βακτηρίων όπως το *Proteobacterium*. Λόγω των αποτελεσμάτων, η χρήση των ολιγοσακχαριτών του μητρικού γάλακτος ως συμπληρώματα διατροφής μπορούν να προάγουν την καλή υγεία των ατόμων στα οποία χορηγούνται (Wiciński, et al. 2020).

Πολλά συστατικά του μητρικού γάλακτος έχουν μελετηθεί, και ελέγχονται μέχρι σήμερα, κλινικά, ως προς τις θεραπευτικές τους ιδιότητες (Kasrae, AmiriFarahani and Yousefi 2015, Chaumeil, Liotet and Kogbe 1994, Mohammadzadeh, Farhat and Esmaeily 2005). Σε μετα-έρευνα που διεξάχθηκε από τους Witkowska-Zimny et al. (2019), προτάθηκε η μελλοντική χρήση και έρευνα του μητρικού γάλακτος σαν καινοτόμο θεραπευτικό εργαλείο για διάφορες ασθένειες (ατοπικό έκζεμα, δερματίτιδα, ασθένεια της οφθαλμικής επιφάνειας). Τονίστηκε, επιπλέον, ότι οι θεραπευτικές ιδιότητες του μητρικού γάλακτος οφείλονται σε μεμονωμένες ουσίες (σύμπλοκο HAMLET, ελαϊκό οξύ (C18:1, n-9), α-λακταλβουμίνη) που περιέχονται σε αυτό και όχι στο σύνολό του (Witkowska-Zimny, Kaminska-El-Hassan and Wrobel 2019).

Σε έρευνα των Rath et al. (2015), ένα σύμπλοκο της α-λακταλβουμίνης και του ελαϊκού οξέος, το οποίο βρίσκεται στο μητρικό γάλα, προκάλεσε απόπτωση (κυτταρικό θάνατο) σε καρκινικά κύτταρα χωρίς να επηρεάζει τα υγιή (Rath, et al. 2015). Συγκεκριμένα, σε 9 ασθενείς που ανάμεναν χειρουργική επέμβαση για την καταπολέμηση του καρκίνου της ουροδόχου κύστης, χορηγήθηκαν ενσταλάξεις του συμπλόκου με καθετήρα για 5 συνεχόμενες μέρες. Παρατηρήθηκε μεγάλη αποβολή καρκινικών κυττάρων, ενώ δεν εντοπίστηκε κυτταρικός θάνατος στις βιοψίες των υγιών ιστών που βρίσκονταν κοντά σε καρκινικά κύτταρα (Mossberg, et al. 2007). Παρά την εμφανή αντικαρκινική δράση που διαθέτουν πολλά συστατικά του μητρικού γάλακτος, περισσότερη έρευνα πρέπει να διεξαχθεί για να γίνουν κατανοητοί οι μηχανισμοί δράσης τους.

1.3 Σύνθεση μητρικού γάλακτος

Το μητρικό (ανθρώπινο) γάλα είναι ένα πολύπλοκο μίγμα συστατικών που αποτελείται από «ενδογενείς» και «εξωγενείς» ουσίες. Οι ενδογενείς αποτελούν τις ουσίες που παράγονται από το

ίδιο το σώμα τις μητέρας, ενώ οι εξωγενείς μπορούν να εισαχθούν στο ανθρώπινο σώμα με τη πέψη τροφίμων, ποτών, φαρμάκων ή ναρκωτικών ουσιών. Μπορούν επίσης να εισαχθούν στο σώμα με την εισπνοή πτητικών χημικών, όπως αυτά που εισπνέονται με το κάπνισμα, ή με άμεση δερματική έκθεση σε ουσίες, όπως είναι τα αντηλιακά (LaKind, Wilkins and Berlin Jr. 2004).

1.3.1 Ενδογενή συστατικά μητρικού γάλακτος

Το μητρικό γάλα περιέχει συστατικά που συμβάλλουν στην ανάπτυξη του νεογνού. Πολλά ενδογενή συστατικά, επομένως αποτελούν και θρεπτικά. Τα θρεπτικά συστατικά περιλαμβάνουν τα λιπίδια τους υδατάνθρακες, τις πρωτεΐνες, τα αμινοξέα, τα μέταλλα και τις βιταμίνες. Τα μη-θρεπτικά συστατικά που εντοπίζονται στο μητρικό γάλα περιλαμβάνουν τα ένζυμα, τις ανοσοσφαιρίνες, τα νουκλεϊκά οξέα, τις ορμόνες, τα κύτταρα, εκ των οποίων μακροφάγα, λεμφοκύτταρα, ουδετερόφιλα και επιθηλιακά. Αξίζει να σημειωθεί ότι όλα τα συστατικά του μητρικού γάλακτος είναι διαλυμένα, ή αιωρούμενα σε νερό (R. G. Jensen 1995, Lawrence and Lawrence 2016).

1.3.2 Μακροθρεπτικά συστατικά

Τα μακροθρεπτικά συστατικά αποτελούν τα λιπίδια τους υδατάνθρακες και τις πρωτεΐνες και είναι υπεύθυνα για την ανάπτυξη του νεογνού. Η σύνθεση των μακροθρεπτικών συστατικών διαφέρει μεταξύ πρόωρου και ώριμου γάλακτος, με το πρόωρο γάλα να τείνει να είναι υψηλότερο σε πρωτεΐνες και λίπος (βλ. Πίνακας 1). Οι συγκεντρώσεις των μακροθρεπτικών συστατικών, μεταβάλλονται κατά τα στάδια της γαλουχίας. Το μητρικό γάλα έχει μελετηθεί εκτενώς τους πρώτους 6 μήνες της γαλουχίας, αλλά υπάρχουν περιορισμένα δεδομένα σχετικά με τη σύνθεση του γάλακτος πέραν του 1^{ου} ή του 2^{ου} έτους μετά τον τοκετό. Οι παρατηρούμενες μεταβολές των συγκεντρώσεων μακροθρεπτικών συστατικών από τον 1^ο έως τον 4^ο μήνα της γαλουχίας πιθανότατα σχετίζονται με την προσαρμογή της σύνθεσης του γάλακτος στην αυξημένη ενεργειακή ζήτηση του εντατικά αναπτυσσόμενου παιδιού.

Πίνακας 1: Μακροθρεπτικά συστατικά (g/dL) και ενέργεια (kcal/dL) μητρικού γάλακτος (Ballard and Morrow 2013)

Συγγραφέας, (χρονολογία), n	Πρωτεΐνες Μ.Ο ± 2 SD	Λίπος Μ.Ο ± 2 SD	Λακτόζη Μ.Ο ± 2 SD	Ενέργεια Μ.Ο ± 2 SD
Τελειόμηνα νεογνά, 24-ωρη παραλαβή, ώριμο γάλα				
Nommsen et al. (1991), n = 58	1,2	3,6	7,4	70
Δείγματα δότη μητρικού γάλακτος				
Wojeik et al. (2000), n = 415	1,2	3,2	7,8	65
Michaelsen et al. (1990), n = 2553	0,9	3,6	7,2	67
Αντιπροσωπευτικές τιμές ώριμου γάλακτος, τελειόμηνα νεογνά				
Πρότυπο αναφοράς	0,9	3,5	6,7	65-70
Πρώωρα νεογνά, 24-ωρη παραλαβή, πρώτες 8 εβδομάδες ζωής				
Bauer & Gerstl (2011)	2,2	4,4	7,6	78
<29 εβδομάδες n = 52	1,9	4,8	7,5	77
32-33 εβδομάδες n = 20				
Γάλα πρόωρου δότη				
Hartmann (2012) n = 47	1,4	4,2	6,7	70

1.3.2.1 Λίπος

Το λίπος συντελεί περί το 3 – 5% του μητρικού γάλακτος και είναι υψηλή πηγή ενέργειας, η οποία απαιτείται για την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος του νεογνού (R. G. Jensen 1995, LaKind, Wilkins and Berlin Jr. 2004), ενώ συμβάλλει σημαντικά (κατά 50% περίπου) στην ολική ενεργειακή πρόσληψη μέχρι και τους 6 μήνες της ηλικίας του νεογνού. Η συνιστώμενη πρόσληψη είναι 25 g/ημέρα (Grote, et al. 2016). Το λιπιδικό προφίλ του ώριμου μητρικού γάλακτος δεν αλλάζει σημαντικά για κάθε στάδιο της γαλουχίας, αλλά υπάρχει υψηλή ποικιλομορφία του λιπιδικού περιεχομένου ανά άτομο. Κατά κύριο λόγο, τα λιπίδια του γάλακτος παρέχουν στο νεογνό απαραίτητα θρεπτικά συστατικά όπως λιποδιαλυτές βιταμίνες και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Συγκεκριμένα, στο νεογνό παρέχονται οξέα όπως α-λινολενικό (C18:3, n-3), αραχιδονικό (C20:4, n-6) και εικοσιδυαεξανικό οξύ (C22:6, n-3) (Koletzko, et al. 2001).

Το μεγαλύτερο μέρος του λίπους του μητρικού γάλακτος αποτελείται από τριγλυκερίδια που αντιπροσωπεύουν περισσότερο από 98% του συνολικού λίπους. Τα φωσφολιπίδια συνεισφέρουν περίπου 0,7% και η χοληστερόλη 0,5%. Το φρέσκο μητρικό γάλα περιέχει μικρές ποσότητες προϊόντων λιπόλυσης, συμπεριλαμβανομένων ελεύθερων λιπαρών οξέων, μονο- και διακυλογλυκερολών.

Δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές στη σύσταση των λιπιδίων στα γάλατα από τελειόμηνες και πρόωρες μητέρες, αν και περισσότερα λιπαρά οξέα μέσης και ενδιάμεσης αλυσίδας (10:0–14:0) βρίσκονται σε πρόωρα από ό,τι σε τελειόμηνα γάλατα (Bitman, et al. 1983, Koletzko, et al. 2001).

Τα φωσφολιπίδια γάλακτος συνεισφέρουν περίπου 25 mg/dL ή 0,6%/100 g λιπιδίων. Οι κύριες κατηγορίες φωσφολιπιδίων είναι η φωσφατιδυλοχολίνη (28,4%), η φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (27,7%), η φωσφατιδυλοσερίνη (8,8%) η φωσφατιδυλική ινοσιτόλη (6,1%) και η σφιγγομυελίνη (37,5%). Τα φωσφολιπίδια έχουν γαλακτωματοποιητικές ιδιότητες και συμβάλλουν στη διατήρηση του γαλακτώματος με σταθεροποίηση των σφαιριδίων λίπους. Μεταξύ των πολλών κατηγοριών σφιγγο- και γλυκολιπιδίων είναι οι γαγγλιοσίδες, μερικοί από τους οποίους φαίνεται να συμβάλλουν στην ανοσολογική άμυνα του ξενιστή, δεσμεύοντας βακτηριακές τοξίνες (Laegreid and Kolsto 1987).

Το αραχιδονικό οξύ είναι το πλέον κυρίαρχο πολυακόρεστο λιπαρό οξύ μακράς αλυσίδας στο ανθρώπινο γάλα, αν και σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με άλλα λιπαρά οξέα. Αποδείχθηκε ότι το αραχιδονικό οξύ παίζει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική ανάπτυξη και τις σχετικές λειτουργίες του νεογνού κατά τη διάρκεια της πρώιμης διατροφής. Επομένως, είναι ένα σημαντικό θρεπτικό συστατικό κατά τη βρεφική και παιδική ηλικία και, ως εκ τούτου, απαιτείται κατάλληλη προσοχή όσον αφορά τη διατροφική του κατάσταση και την παρουσία του στη βρεφική διατροφή (Salem and Van Dael 2020).

Το δοκοσαεξανοϊκό οξύ είναι απαραίτητο για την καλή λειτουργία του αμφιβληστροειδούς τόσο στα πρόωρα (Uauy, et al. 1990) όσο και στα τελειόμηνα βρέφη (Carlson, et al. 1993). Η αύξηση της συσσώρευσης του δοκοσαεξανοϊκού οξέος στο τρίτο τρίμηνο συμπίπτει με την ωρίμανση του εγκεφάλου και του αμφιβληστροειδούς (Rogers, Valentine and Kaim 2013).

Τα κορεσμένα και τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα παρέχουν μια μεγάλη δόση ενέργειας στον οργανισμό. Αυτό οφείλεται στην υψηλή περιεκτικότητα σε παλμιτικό οξύ στο γάλα, που αποτελεί το 50.8% του συνόλου των κορεσμένων λιπαρών οξέων που αντιστοιχεί στη μεγάλη του παροχή σε ενέργεια (Barness, et al. 1974). Τα κορεσμένα λίπη θεωρούνταν προηγουμένως ως παράγοντας για την ανάπτυξη της καρδιαγγειακής νόσου. Ωστόσο, πρόσφατα ευρήματα έδειξαν ότι η σχέση μεταξύ κορεσμένων λιπαρών οξέων και καρδιαγγειακής νόσου μπορεί να είναι λιγότερο σαφής από ό,τι είχε προηγουμένως υποθεθεί. Τα τρόφιμα αποτελούνται από μια σειρά από κορεσμένα και ακόρεστα λιπαρά οξέα, καθένα από τα οποία μπορεί να επηρεάσει διαφορετικά τον μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών, καθώς και να συνεισφέρει σε σημαντικές ποσότητες άλλων

θρεπτικών συστατικών που μπορεί να μεταβάλλουν τον κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου (Lordan and Zabetakis 2017, Huth and Park 2012).

1.3.2.2 Πρωτεΐνες και μη-πρωτεϊνικά αζωτούχα παράγωγα

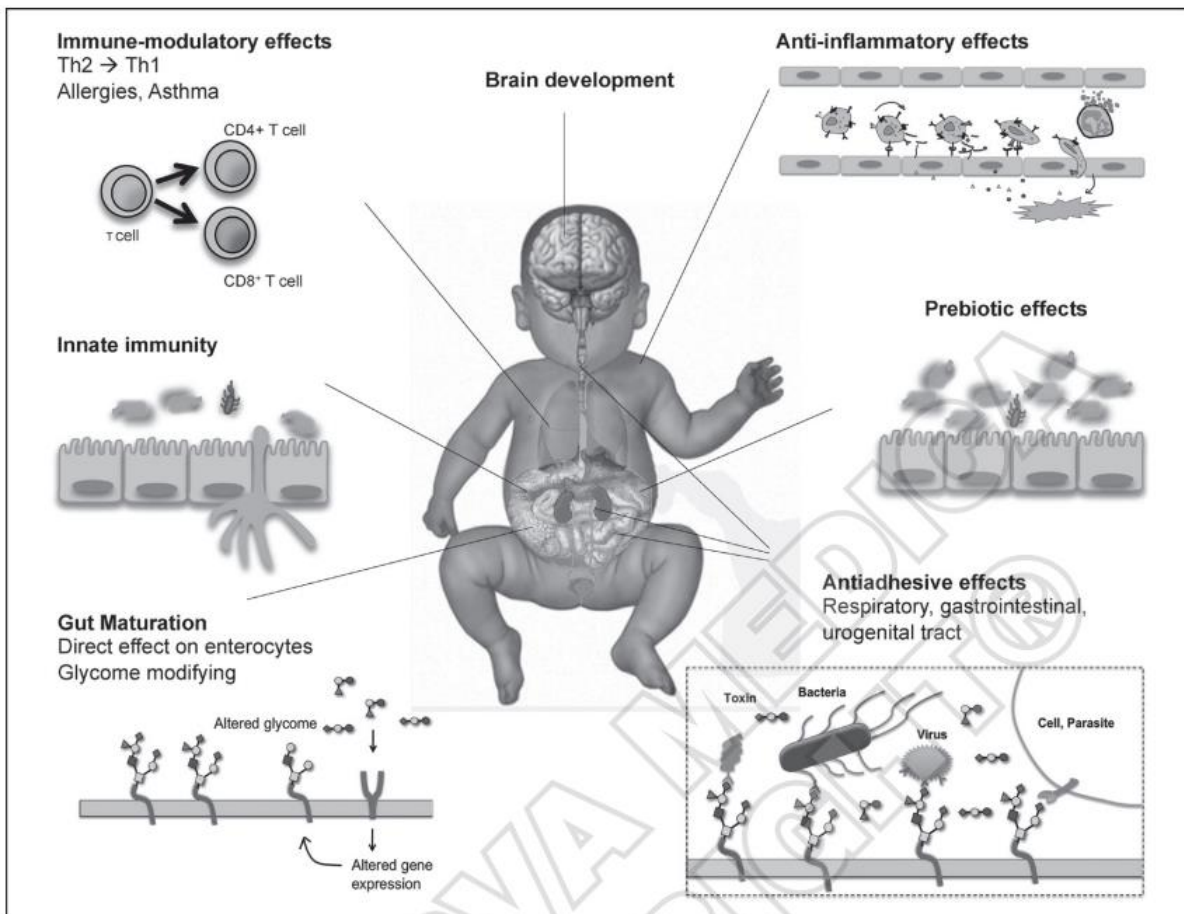
Οι πρωτεΐνες του μητρικού γάλακτος, αποτελούν περί το 0,8 – 0,9% w/v της σύνθεσής του, και χωρίζονται σε πρωτεΐνες του ορού και στα καζεϊνικά παράγωγα ή σύμπλοκα, τα οποία αποτελούνται από μία μεγάλη ποικιλία ειδικών πρωτεϊνών και πεπτιδίων (Liao, et al. 2011, Gao, et al. 2012, Jenness 1979). Οι πιο συνήθεις είναι η καζεΐνη, η α-λακταλβουμίνη, η λακτοφερίνη, η ανοσοσφαιρίνη IgA, η λυσοζύμη και η αλβουμίνη του ορού (Lonnerdal 2004). Μη-πρωτεϊνικά αζωτούχα παράγωγα περιλαμβάνουν την ουρία, το ουρικό οξύ, την κρεατίνη, την κρεατινίνη, τα αμινοξέα, και τα νουκλεοτίδια, αποτελώντας το 25% του συνολικού αζώτου του μητρικού γάλακτος. Τα επίπεδα των πρωτεϊνών των μητέρων που γενούν πρόωρα είναι σημαντικά υψηλότερα από αυτές που γενούν στην ώρα τους. Τα επίπεδα των πρωτεϊνών μειώνονται στο μητρικό γάλα στο διάστημα των πρώτων 4-6 ημερών μετά τον τοκετό (Ballard and Morrow 2013).

Μία από τις πιο σημαντικές σύγχρονες ανακαλύψεις σχετικά με τη σύνθεση του μητρικού γάλακτος αποτελεί το σύμπλεγμα HAMLET (Human α -lactalbumin Made LEthal to Tumor cells). Το σύμπλεγμα HAMLET προέρχεται αποκλειστικά από το μητρικό γάλα και θανατώνει τα καρκινικά κύτταρα με μία διαδικασία που μοιάζει με τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Το σύμπλεγμα αποτελείται από μερικώς ξεδιπλωμένη α-λακταλβουμίνη και ελαϊκό οξύ, δύο συστατικά απαραίτητα για τον κυτταρικό θάνατο. Το HAMLET έχει ευρείες αντικαρκινικές ιδιότητες *in vitro*, αλλά και *in vivo*, ειδικά σε ανθρώπους με καρκίνο της ουροδόχου κύστης (Hallgren, et al. 2008). Όταν το σύμπλεγμα έρθει σε επαφή με καρκινικά κύτταρα, εισάγεται σε αυτά και προκαλεί αποπόλωση των μεμβράνων των μιτοχονδρίων, απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, έκθεση σε φωσφατιδυλοσερίνη και απόκριση των κασπασών (πρωτεάσες κυστεΐνης-ασπαρτικού οξέος). Λόγω των τελευταίων, ένα κλάσμα του κυττάρου υπόκειται μορφολογικές αλλαγές, χαρακτηριστικές αυτών της απόπτωσης (Hallgren, et al. 2008). Κύριο προτέρημα του συμπλέγματος είναι ότι προκαλεί επιλεκτικά κυτταρικό θάνατο στα καρκινικά κύτταρα, και όχι στα υγιή. Θεωρείται, πλέον, ότι το HAMLET είναι ένα φυσικό μόριο απομάκρυνσης ανεπιθύμητων κυττάρων από τα τοπικά υγιή, το οποίο οδηγεί τους ιστούς στην ορθή ανάπτυξη. Με την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων το σύμπλεγμα μειώνει τα κακοήγη καρκινικά κύτταρα, που θα μπορούσαν να λειτουργήσουν ως πυρήνες για μελλοντική ανάπτυξη όγκων, και εξηγεί, εν δυνάμει, την μειωμένη συχνότητα καρκίνου σε νεογνά που τους έχει χορηγηθεί μητρικό γάλα (Svensson, et al. 2002).

1.3.2.3 Υδατάνθρακες

Ο κύριος υδατάνθρακας του μητρικού γάλακτος είναι ο δισακχαρίτης λακτόζη. Η συγκέντρωση της λακτόζης στο μητρικό γάλα αποτελεί περί το 7% w/v της συνολικής του σύστασης και είναι ανάλογη της παραγόμενης ποσότητάς του. Έτσι, μητέρες που παράγουν γάλα σε μεγαλύτερες ποσότητες αποδίδουν και μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε λακτόζη (Nommsen, et al. 1991, Stahl, et al. 1999). Οι υπόλοιποι σημαντικοί υδατάνθρακες του μητρικού γάλακτος είναι οι ολιγοσακχαρίτες, οι οποίοι κυμαίνονται σε συγκεντρώσεις 10-15 g/L στο μητρικό γάλα, ανάλογα με το στάδιο της γαλουχίας (Gabrielli, et al. 2011, Thurl, et al. 2017). Οι ολιγοσακχαρίτες του μητρικού γάλακτος (Human Milk Oligosaccharides, HMO), απαρτίζονται από τους ουδέτερους ολιγοσακχαρίτες (1% w/v) και τους όξινους ολιγοσακχαρίτες (0,1% w/v). Οι HMO βρίσκονται αποκλειστικά στο μητρικό γάλα χωρίς να έχουν χρησιμοποιηθεί σε βρεφικές φόρμουλες (Bode 2012). 1 L γάλακτος περιέχει 10 g HMO, ποσότητα που υπερβαίνει αυτή των πρωτεϊνών αλλά και αποτελεί 100 με 1000 φορές μεγαλύτερη αυτής του αγελαδινού γάλακτος που τυπικά χρησιμοποιείται για την σύνθεση των βρεφικών φόρμουλων. Ακόμα μεγαλύτερες συγκεντρώσεις HMO βρίσκονται στο πρωτόγαλα (Bode 2015, Bode 2012). Οι HMO χρησιμεύουν ως μεταβολικό υπόστρωμα ορισμένων βακτηρίων του εντέρου του γένους *Bifidobacterium*, και, ως αποτέλεσμα, προάγουν την ανάπτυξή τους. Λόγω των βιολειτουργικών τους ιδιοτήτων, οι HMO συνοδεύονται από μία ποικιλία οφελών Εικόνα 1 για την υγεία των νεογνών:

- Ανάπτυξη και ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος (Immune-modulatory effects)
- Αντιφλεγμονώδεις δράσεις (Anti-inflammatory effects)
- Πρεβιοτικές δράσεις (Prebiotic effects)
- Συμβολή στην ανάπτυξη και συντήρηση της μικροχλωρίδας του εντέρου (Gut Maturation)
- Συμβολή στην ανάπτυξη του εγκεφάλου (Brain development)
- Αντισυγκολλητικές ιδιότητες προς παθογόνους μικροοργανισμούς (Antiadhesive effects)



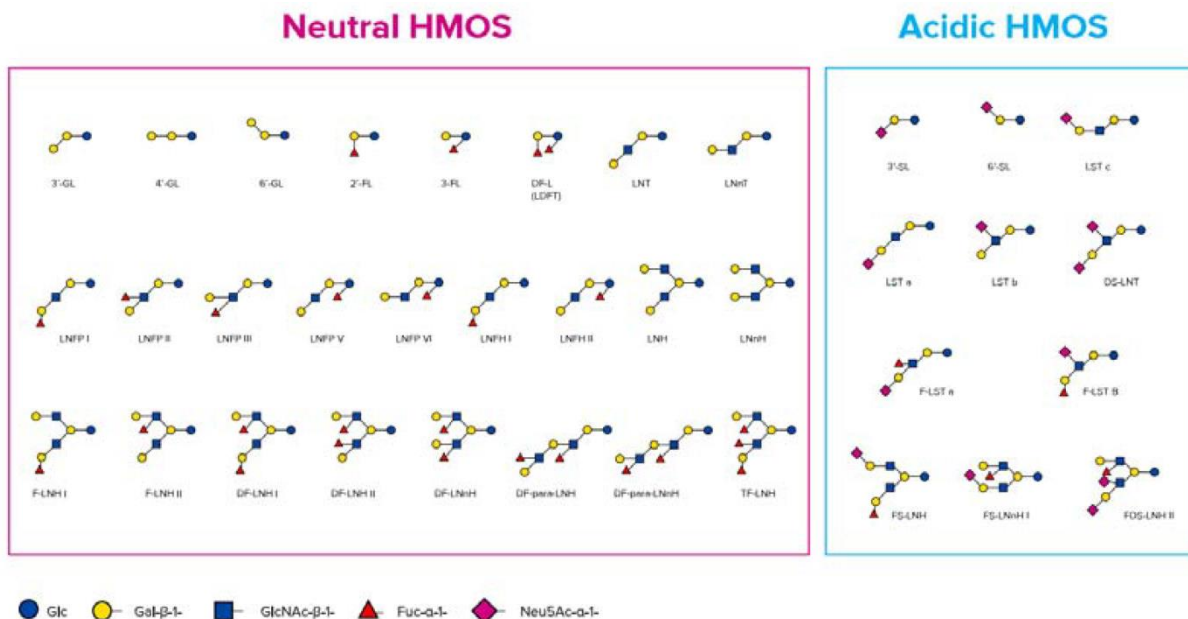
Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση των εν δυνάμει ωφελειών των ΗΜΟ (Jantscher-Krenn and Bode 2012)

Οι ΗΜΟ είναι σύνθετοι υδατάνθρακες και το τρίτο πιο άφθονο συστατικό του ανθρώπινου γάλακτος, ενώ αποτελούν ένα παράδειγμα φυσικών «πρεβιοτικών» (Wegh, et al. 2019). Αν και αρχικά χαρακτηρίστηκαν ως ΗΜΟ, υπάρχουν επίσης στο αμνιακό υγρό, και έτσι το έμβρυο είναι ήδη εκτεθειμένο σε ΗΜΟ πριν από τη γέννηση κατά την κατάποση του αμνιακού υγρού (Wise, et al. 2018, Hirschmugl, et al. 2019, Jantscher-Krenn, et al. 2019).

Υπάρχουν περισσότεροι από 200 δομικά διαφορετικοί ΗΜΟ που συνεργάζονται για να προσφέρουν ένα συνδυασμένο ευεργετικό αποτέλεσμα, από τα οποία σήμερα έχουν χαρακτηριστεί λεπτομερώς περισσότεροι από 160 τύποι που κατηγοριοποιούνται σε ουδέτερους (Neutral HMOs) και όξινους (Acidic HMOs), ανάλογα με τη λειτουργικότητά τους (Urashima, et al. 2018). Οι περισσότεροι ΗΜΟ δεν αποικοδομούνται κατά την πέψη και καταλήγουν στο λεπτό έντερο (Engfer, et al. 2000), όπου προχωρούν στο κόλον, ενεργώντας ως «μόρια-δολώματα» δεσμεύοντας τους παθογόνους μικροοργανισμούς και λειτουργούν ως υπόστρωμα για την ανάπτυξη των βακτηρίων του εντέρου (Bode 2012), όπως τα *Bifidobacteria* και τα γαλακτικά βακτήρια, επιτρέποντας σε αυτούς τους βακτηριακούς πληθυσμούς να ευδοκιμήσουν (Walker and Lyengar 2014).

Εκτός από την πρεβιοτική τους δράση, οι ΗΜΟ έχουν επίσης άμεσες επιδράσεις στα κύτταρα του ανοσοποιητικού (Χiao, et al. 2019), παρέχουν δομικά στοιχεία για τον εγκέφαλο (Wang, et al. 2018) και διεγείρουν τις λειτουργίες «φραγμού» του εντέρου, όπως έχει αναφερθεί από τους Cheng et al. (2020), σε έρευνα για τις ευεγερτικές δράσεις των ενεργών ΗΜΟ (Cheng, et al. 2020).

Οι ΗΜΟ συντίθενται στον μαστικό αδένα με την ένωση της λακτόζης με άλλους μονοσακχαρίτες σχηματίζοντας έτσι άπεπτους τρισακχαρίτες ή τετρασακχαρίτες. Η προσθήκη σιαλικών οξέων οδηγεί σε δύο διαφορετικές σιαλυλακτόζες (Sialyllactoses, SL), την 3'-SL και τη 6'-SL, ενώ η προσθήκη φουκόζης οδηγεί σε δύο διαφορετικές φουκοσυλλακτόζες (Fucosyllactoses, FL), τη 2'-FL και τη 3'-FL, καθώς και διφουκοσυλλακτόζη (Thurl, et al. 2017).



Εικόνα 2: Γνωστοί ΗΜΟ ανά είδος

1.3.3 Μικροθρεπτικά συστατικά

Τα μικροθρεπτικά συστατικά αποτελούν τις βιταμίνες, τα μέταλλα και τα ιχνοστοιχεία και προάγουν τη σωστή ανάπτυξη του νεογνού. Πολλά μικροθρεπτικά συστατικά του γάλακτος ποικίλουν ανάλογα με την διατροφή της μητέρας, συμπεριλαμβανομένων των βιταμινών του συμπλέγματος Β (Β1, Β2, Β3, Β5, Β6, Β7, Β9, Β12), Α, D, Ε και Κ καθώς και του ιωδίου, του σιδήρου, του χαλκού, του ψευδαργύρου και του σεληνίου. Μία διατροφή υψηλή σε βιταμίνες είναι απαραίτητη για την σωστή ρύθμιση των επιπέδων τους στο μητρικό γάλα (Greer 2001, Hampel, Dror and Allen 2018).

1.3.3.1 Θειαμίνη (B1)

Η θειαμίνη αποτελεί μια υδατοδιαλυτή βιταμίνη (διαλυτότητα στο νερό $S_w = 100\text{g}/100\text{mL}$), ενώ είναι ένα απαραίτητο μικροθρεπτικό συστατικό που παίζει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή ενέργειας κατά τον μεταβολισμό και στην ανάπτυξη και βιολογική λειτουργία πολλών κυττάρων (Lonsdale 2006, Hampel and Allen 2015). Όντας ένα απαραίτητο μικροθρεπτικό συστατικό, δεν μπορεί να συντεθεί στο ανθρώπινο σώμα και είναι απαραίτητο να προσληφθεί από την διατροφή (Lonsdale 2006, Bettendorff 2020).

Η θειαμίνη υπάρχει στο μητρικό γάλα κατά περίπου 30 % ως θειαμίνη και περίπου 70 % ως μονοφωσφορική θειαμίνη (φωσφορικός εστέρας θειαμίνης) (Stuetz, et al. 2011). Σε γάλα από γυναίκες με ισορροπημένη διατροφή, η συγκέντρωση της θειαμίνης, η οποία χρησιμεύει στον υπολογισμό της Συνιστώμενης Ημερήσιας Πρόσληψης (ΣΗΠ) από τον FAO, είναι $0,21 \pm 0,04 \text{ mg/L}$. Η ΣΗΠ για τα νεογνά είναι $0,2 \text{ mg/ημέρα}$, για τους πρώτους 6 μήνες της θρέψης, με την προϋπόθεση ότι καταναλώνουν 780 mL γάλακτος/ημέρα. (Allen 2012). Έρευνα των Kodentsova & Vrzhesinskaya (2006), έδειξε ότι το ακριβές εύρος της θειαμίνης στο μητρικό γάλα κυμαίνεται από $0,02$ έως $0,35 \text{ mg/L}$, εξαρτώμενο κυρίως από την πρόσληψη της βιταμίνης από τις μητέρες (Kodentsova and Vrzhesinskaya 2006). Σε σύγχρονη έρευνα των Whitfield et al. (2020), το μέσο εύρος της βιταμίνης, σε γάλα 3-27 εβδομάδων μετά την κύηση, βρέθηκε ότι είναι $172-203 \text{ }\mu\text{g/L}$ (Whitfield, et al. 2020).

1.3.3.2 Ριβοφλαβίνη (B2)

Η ριβοφλαβίνη, ή βιταμίνη B2, όπως όλες οι βιταμίνες του συμπλέγματος B είναι υδατοδιαλυτή βιταμίνη, απαραίτητη για τη σύνθεση των συνενζύμων, φλαβινο-μονονουκλεοτίδιο (Flavin Mononucleotide) και φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (Flavin Adenine Dinucleotide). Αυτά τα συνένζυμα συμμετέχουν στην παραγωγή ενέργειας κατά τον μεταβολισμό, στη κυτταρική αναπνοή και στη παραγωγή αντισωμάτων (Office of Dietary Supplements 2018). Η βιταμίνη B2 είναι επίσης απαραίτητη για την επιδιόρθωση του DNA, τη σύνθεση λιπαρών οξέων, την ενεργοποίηση του φολικού οξέος, την μείωση των ελεύθερων ριζών και τη μετατροπή της τρυπτοφάνης σε νιασίνη στο συκώτι. Καθώς δεν συντίθεται στον ανθρώπινο οργανισμό, είναι απαραίτητο να λαμβάνεται από τη διατροφή (Hampel and Allen 2015).

Η ριβοφλαβίνη βρίσκεται στο μητρικό γάλα ως ριβοφλαβίνη κατά 39 %, ως φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο κατά 54 % και ως άλλες φλαβίνες κατά 7 % (Allen 2012). Το εύρος του έχει αναφερθεί ότι κυμαίνεται στα $180-800 \text{ }\mu\text{g/L}$ (Roughead and McCormick 1990). Σε σύγχρονη έρευνα,

όμως, των Whitfield et al. (2020), το μέσο εύρος της βιταμίνης, σε γάλα 3-27 εβδομάδων, μετά την κύηση, βρέθηκε ότι είναι 59,4 – 62,2 µg/L (Whitfield, et al. 2020).

1.3.3.3 Νιασίνη (B3)

Η νιασίνη, ή βιταμίνη B3, είναι απαραίτητο μικροθρεπτικό συστατικό για τον άνθρωπο αποτελώντας συστατικό των συνενζύμων νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (Nicotinamide adenine dinucleotide, NAD) και φωσφορικό νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADP) (Kirkland 2012). Σε ποσότητες που υπερβαίνουν την συνιστώμενη ημερήσια πρόσληψη, προκαλείται μείωση των επιπέδων των τριγλυκεριδίων στο αίμα και της λιποπρωτεΐνης (χοληστερόλης) χαμηλής πυκνότητας (LDL), ενώ προκαλείται αύξηση στη λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας (HDL).

Σε πρόσφατη έρευνα των Whitfield et al. (2020), το μέσο εύρος της βιταμίνης, σε γάλα 3-27 εβδομάδων μετά την κύηση, βρέθηκε ότι είναι 421-468 µg/L (Whitfield, et al. 2020).

1.3.3.4 Παντοθενικό οξύ (B5)

Το παντοθενικό οξύ (ή αλλιώς βιταμίνη B5) είναι ένα απαραίτητο υδατοδιαλυτό μικροθρεπτικό συστατικό. Η κύρια λειτουργία του είναι η σύνθεση του συνενζύμου A (CoA) και της ακυλ-φέρουσας πρωτεΐνης (acyl carrier protein) (Sweetman 2012) Το CoA είναι απαραίτητο για την σύνθεση και αποσύνθεση των λιπαρών οξέων, τη μεταφορά ακυλ- και ακετυλομάδων, καθώς και για άλλων αναβολικών και καταβολικών διεργασιών (Trumbo 2014).

Σε πρόσφατη έρευνα των Whitfield et al. (2020), το μέσο εύρος της βιταμίνης, σε γάλα 3-27 εβδομάδων μετά την κύηση, βρέθηκε ότι είναι 1,70-1,93 mg/L (Whitfield, et al. 2020).

1.3.3.5 Βιταμίνη B6

Ο όρος «βιταμίνη B6» αναφέρεται στα βιολογικώς ενεργά ισοδύναμα πυριδοξίνη (pyridoxine, PN), πυριδοξάλη (pyridoxal, PL) και πυριδοξαμίνη (pyridoxamine, PM). Τα φωσφορικά τους άλατα χρησιμεύουν ως συνένζυμα σε πάνω από 140 ενζυματικές αντιδράσεις στο μεταβολισμό των αμινοξέων, της γλυκόζης και των λιπιδίων (Da Silva and Gregory III 2020).

Στο μητρικό γάλα η κυρίαρχη μορφή της βιταμίνης B6 είναι η PL (76 % της συνολικής B6), με μικρά ποσοστά φωσφορικής PL, PM και PN (Allen 2012). Η μέση συγκέντρωσή της στο μητρικό γάλα, η οποία χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της ΣΗΠ των νεογνών, είναι 0,13 mg/L,

βασισμένη σε μία δημοσίευση του 1976 σε γυναίκες από τις Η.Π.Α. με προσλήψεις μικρότερες των 2,5 mg/ημέρα (West and Kirksey 1976). Σε σύγχρονη έρευνα των Whitfield et al. (2020), το μέσο εύρος της βιταμίνης, σε γάλα 3-27 εβδομάδων μετά την κύηση, βρέθηκε ότι είναι 80,4-87,8 μg/L (Whitfield, et al. 2020).

1.3.3.6 Βιταμίνη B7

Η βιταμίνη B7, ή αλλιώς βιοτίνη, είναι ένα θρεπτικό στοιχείο απαραίτητο για τα θλαστικά, καθώς συμμετέχει στην σύνθεση και βιολογική λειτουργία των λιπαρών οξέων, των υδατανθράκων και των αμινοξέων (Marriott, et al. 2020). Σε πρόσφατη μελέτη των Whitfield et al. (2020), το μέσο εύρος της βιταμίνης, σε γάλα 3-27 εβδομάδων μετά την κύηση, βρέθηκε ότι είναι 4,84-6,29 μg/L (Whitfield, et al. 2020).

1.3.3.7 Βιταμίνη B9

Η κυρίαρχη μορφή της βιταμίνης B9 στο μητρικό γάλα είναι το 5-μεθυλ-τετραϋδροφολικό οξύ. Ο υπολογισμός της ΣΗΠ υποθέτει ότι η μέση τιμή της βιταμίνης στο μητρικό γάλα είναι 85 μg/L, βασισμένη σε αναφορές του 1986 και 1991 (Institute of Medicine 1998). Η τιμή των 81 μg/L που αναφέρθηκε το 2009 επιβεβαίωσε την τάξη μεγέθους της πρωτεΐνης στο μητρικό γάλα (Houghton, Yang and O'Connor 2009).

1.3.3.8 Κοβαλαμίνη (B12)

Η βιταμίνη B12 είναι ο συλλογικός όρος των καρροτενοειδών που φέρουν κοβάλτιο. Η επικρατούσα μορφή της βιταμίνης B12 είναι το συνένζυμο B12. Αυτό εμπλέκεται στη μεθυλίωση της φολικο-εξαρτόμενης ομοκυστεΐνης σε μεθειονίνη και τη μετατροπή του μεθυλμαλονυλ-συνενζύμου A σε σουκκινυλ-συνένζυμο A (Gibson 1990).

Δεν υπάρχει κοινά αποδεκτή έρευνα που να τεκμηριώνει τη μέση τιμή της βιταμίνης B12 στο μητρικό γάλα (Allen 2012). Το Ινστιτούτο της Ιατρικής χρησιμοποιεί για τους υπολογισμούς του τη τιμή 0,43 μg/L από τους Donangelo et al. (1989), που χρησιμοποίησαν μία σχετικά παλιά αναλυτική μέθοδο (Donangelo, et al. 1989). Πιο σύγχρονες έρευνες έχουν βρεί ότι η μέση τιμή προσεγγίζει περισσότερο τα 1,2 μg/L, ενώ άλλες έχουν δείξει ότι, σε μητέρες που δεν προμηθεύτηκαν συμπληρώματα βιταμίνης B12, η τιμή μπορεί να είναι κάτω του ανιχνεύσιμου ορίου των 50 pmol/L (Deegan, et al. 2012). Σε πρόσφατη μελέτη των Whitfield et al. (2020), το μέσο

εύρος της βιταμίνης, σε γάλα 3-27 εβδομάδων μετά την κύηση, βρέθηκε ότι είναι 215-316 pmol/L (Whitfield, et al. 2020)

1.3.3.9 Βιταμίνη Α

Οι μορφές της βιταμίνης Α στο μητρικό γάλα περιλαμβάνουν την ρετινόλη, τους εστέρες της ρετινόλης και το Β-καροτένιο (Hampel, Dror and Allen 2018). Σε πρόσφατη μελέτη των Whitfield et al. (2020), το μέσο εύρος της βιταμίνης, σε γάλα 3-27 εβδομάδων μετά την κύηση, βρέθηκε ότι είναι 0,37-0,46 mg/L (Whitfield, et al. 2020).

1.3.3.10 Βιταμίνη D

Η βιταμίνη D στο μητρικό γάλα υπάρχει κυρίως ως βιταμίνη D2 (εργοκαλσιφερόλη) και βιταμίνη D3 (χοληκαλσιφερόλη), με συνεισφορές από τους 25-υδροξυ-μεταβολίτες τους και πιθανώς την 24,25-διυδροξυ-βιταμίνη D και 1,15-διυδροξυ-βιταμίνη D. Αυτές οι στερόλες εκκρίνονται στο γάλα ενώ συνδέονται με τις πρωτεΐνες που δεσμεύουν το πλάσμα ή το κυτταρόλυμα, αλλά, με τη πάροδο του χρόνου, μεταναστεύουν στο λιπιδικό τμήμα (Hollis, et al. 1981).

1.3.3.11 Βιταμίνη Ε

Η βιταμίνη Ε αναφέρεται στις 8 χημικά συγγενείς α-, β-, γ- και δ-τοκοφερόλες και στις α-, β-, γ- και δ-τοκοτριενόλες, οι οποίες διαφέρουν ως προς τη δομή και τη βιοδιαθεσιμότητα. Η α-τοκοφερόλη είναι η μόνη βιολογικά ενεργή μορφή βιταμίνης Ε, ενώ τα άλλα βιταμερή δεν μετατρέπονται στην ενεργό μορφή (Martysiak-Żurowska, Szlagatys-Sidorkiewicz and Zagierski 2013).

Σε πρόσφατη έρευνα των Whitfield et al. (2020), το μέσο εύρος της βιταμίνης, σε γάλα 3-27 εβδομάδων μετά την κύηση, βρέθηκε ότι είναι 2,03-2,97 mg/L (Whitfield, et al. 2020).

1.3.3.12 Άλλα μικροθρεπτικά συστατικά

Άλλα μικροθρεπτικά συστατικά στο μητρικό γάλα περιλαμβάνουν ιχνοστοιχεία, όπως το ασβέσιο, τον χαλκό, τον σίδηρο και τον ψευδάργυρο. Τα μικροθρεπτικά συστατικά αυτά είναι χαμηλότερης σημασίας από τις βιταμίνες, καθώς δεν έχει βρεθεί συσχέτιση της πρόσληψής τους από την θηλάζουσα γυναίκα με το επίπεδό τους στο μητρικό γάλα (Dumrongwongsiri, et al. 2021). Οι μέσες τιμές τους, σε μητρικό γάλα, σε mg/L, φαίνονται στον

Πίνακας 2.

Πίνακας 2: Άλλα μικροθρεπτικά συστατικά στο μητρικό γάλα (Dumrongwongsiri, et al. 2021)

Μικροθρεπτικό συστατικό (mg/L)	Δείγματα			p-value
	Σύνολο δειγμάτων (n = 34)	Δείγματα από γυναίκες που θήλαζαν εξ' ολοκλήρου (n = 19)	Δείγματα από γυναίκες που θήλαζαν μερικώς (n = 15)	
Ασβέστιο	243.45 ± 44.55	244.32 ± 45.44	242.35 ± 45.04	0.901
Χαλκός	0.20 ± 0.08	0.21 ± 0.08	0.18 ± 0.07	0.901
Σίδηρος	0.20 ± 0.04	0.19 ± 0.04	0.21 ± 0.04	0.251
Ψευδάργυρος	1.56 ± 0.61	1.67 ± 0.50	1.43 ± 0.73	0.277

1.3.4 Εξωγενή συστατικά μητρικού γάλακτος

Από τις αρχές της δεκαετίας του 1950, οι ερευνητές συλλέγουν πληροφορίες για τα επίπεδα των τοξικών και βιοσυσσωρευτικών εξωγενών συστατικών στο γάλα. Αυτές οι πληροφορίες προέρχονται από πολλές χώρες και έχουν συλλεχθεί για διαφορετικούς λόγους. Σε ορισμένες περιπτώσεις, το ενδιαφέρον για τα συστατικά αυτά στο γάλα προήλθε από συγκεκριμένα συμβάντα οξείας τοξικότητας, ενώ σε άλλες περιπτώσεις, η έρευνα ήταν διερευνητική ως μέρος μιας συλλογικής προσπάθειας αξιολόγησης της προέλευσης μιας χημικής ουσίας στο μητρικό γάλα ενός δείγματος πληθυσμού.

Σε ορισμένες έρευνες, όπως αυτές του WHO (2000), τα δεδομένα έχουν συλλεχθεί χρησιμοποιώντας ένα τυποποιημένο πρωτόκολλο και τα αποτελέσματα αυτών των μελετών μπορούν να συγκριθούν για να προσδιοριστούν οι τάσεις στα επίπεδα των διαφορετικών εξωγενών συστατικών με την πάροδο του χρόνου ή μεταξύ των χωρών (World Health Organization 2000). Σε πολλές άλλες περιπτώσεις, ωστόσο, έχουν διεξαχθεί μελέτες με ευρέως διαφορετικά πρωτόκολλα, καθιστώντας τη σύγκριση μεταξύ των μελετών αρκετά δύσκολη (LaKind and Berlin Jr. 2002).

Τυπικά, τα αποτελέσματα των μελετών των εξωγενών συστατικών στο μητρικό γάλα παρουσιάζεται σε λιπιδική βάση, ήτοι, ποσότητα χημικού ανά γραμμάριο λίπους που βρίσκεται στο μητρικό γάλα.

1.3.5 Οργανοχλωριούχα φυτοφάρμακα και μεταβολίτες τους

Τα οργανοχλωρικά φυτοφάρμακα των οποίων είναι διαθέσιμα δεδομένα τα επίπεδα στο μητρικό γάλα περιλαμβάνουν το χλωρδάνιο, οι ενώσεις DDT, η διελδρίνη, το επτάχλωρο, το εξαχλωροβενζόλιο και το εξαχλωροκυκλοεξάνιο (LaKind, Wilkins and Berlin Jr. 2004). Αν και δεν υπάρχουν πρόσφατα δεδομένα για το ανθρώπινο γάλα για οργανοχλωρικά φυτοφάρμακα, υπάρχουν διαθέσιμες πληροφορίες των τάσεων για ορισμένες από αυτές τις χημικές ουσίες στις έρευνες των περασμένων δεκαετιών (Berlin Jr. and Kacew 1997). Τα επίπεδα και οι τάσεις για τις παραπάνω χημικές ουσίες περιγράφονται στις ακόλουθες υποενότητες. Τα επίπεδα των ενώσεων DDT στο ανθρώπινο γάλα έχουν μειωθεί σημαντικά σε χώρες όπου η χρήση αυτών των ενώσεων έχει περιοριστεί ή απαγορευτεί για πολλά χρόνια. Σε χώρες που έχουν περιορίσει τη χρήση των ενώσεων DDT σχετικά πρόσφατα ή εξακολουθούν να χρησιμοποιούν αυτές τις ενώσεις για τον έλεγχο της ελονοσίας, τα επίπεδα στο μητρικό γάλα παραμένουν υψηλά (Smith 1999).

1.4 Παράγοντες που Επηρεάζουν την Σύσταση του Μητρικού Γάλακτος

Η αποκλειστική θρέψη των νεογνών με μητρικό γάλα για τους πρώτους 6 μήνες της ζωής, ακολουθούμενη από μητρικό γάλα με άλλες, συμπληρωματικές τροφές για τα πρώτα 1-2 χρόνια, ή περισσότερο, είναι το πρότυπο για τη θρέψη και τη διατροφή των νεογνών που συνιστάται από την Αμερικανική Ακαδημία Παιδιατρικής και τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO 2022). Ωστόσο, σε αντίθεση με τις βρεφικές φόρμουλες, που είναι τυποποιημένες με αυστηρά και νομοθετικά κριτήρια σύστασης, η σύνθεση του ανθρώπινου γάλακτος είναι δυναμική και μεταβλητή κατά τη διάρκεια της γαλουχίας και μεταξύ των μητέρων. Επομένως, η κατανόηση αυτών των μεταβλητών είναι σημαντική για τη διατροφή των νεογνών, ειδικά για τα ελλιποβαρή και για εκείνα που βρίσκονται σε υψηλό κίνδυνο υγείας.

Γενικά, το πρωτόγαλα είναι πλούσιο σε αυξητικούς παράγοντες και ανοσολογικά συστατικά όπως η εκκριτική ανοσοσφαιρίνη A (secretory Immunoglobulin A, sIgA), η λακτοφερρίνη και τα λευκοκύτταρα και περιέχει σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις λακτόζης, λιπιδίων και ενέργειας. Αυτό δείχνει ότι η κύρια λειτουργία του πρωτογάλακτος είναι ανοσολογική παρά θρεπτική. Στη μελέτη των Ronayne de Ferrer et al. (2000), τα επίπεδα λακτοφερρίνης στο πρόωρο ανθρώπινο γάλα φάνηκαν να παραμένουν υψηλότερα και σταθερά την 1^η εβδομάδα γαλουχίας, όπως και στη μελέτη των Hsu et al. (2014). Ωστόσο, οι Hsu et al. διαπίστωσαν σημαντική μείωση της συγκέντρωσης της εκκριτικής ανοσοσφαιρίνης και όχι διαφορές στο επίπεδο του ασβεστίου, της λακτοφερρίνης, της λεπτίνης, και της λυσοζύμης, ανάμεσα στα διαφορετικά στάδια της γαλουχίας,

κάτι που δεν συμφωνεί με τη μελέτη των Mehta και Petrova (2011) (Ronayne de Ferrer, et al. 2000, Hsu, et al. 2014, Mehta and Petrova 2011).

Οι Bauer και Gerstl (2011) ανέφεραν ότι οι συγκεντρώσεις υδατανθράκων, λιπών, πρωτεϊνών και ενέργειας ήταν σημαντικά υψηλότερες στο πρόωρο μητρικό γάλα. Ειδικότερα, τα επίπεδα πρωτεΐνης ήταν σημαντικά υψηλότερα στο εξαιρετικά πρόωρο γάλα (λιγότερες από 28 εβδομάδες) από ό,τι στο μέτρια πρόωρο και το ώριμο γάλα. Σε σύγκριση με το ώριμο γάλα, το πρόωρο γάλα χαρακτηρίζεται από υψηλότερες συγκεντρώσεις ανοσολογικών πρωτεϊνών και χαμηλότερες συγκεντρώσεις θρεπτικών πρωτεϊνών (Bauer and Gerstl 2011). Επομένως, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ο χρόνος γαλουχίας ως παράγοντας που επηρεάζει την σύσταση του μητρικού γάλακτος.

Πολλοί άλλοι παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν τη σύνθεση του ανθρώπινου γάλακτος. Το μητρικό γάλα κατά τη διάρκεια ενός τυπικού θηλασμού μπορεί να χωριστεί σε δύο μέρη: στο «πρόσθιο» γάλα (foremilk) και στο «οπίσθιο» γάλα (hindmilk). Το «πρόσθιο» γάλα αναφέρεται στο γάλα που εκκρίνεται κατά την αρχή και την μέση του θηλασμού, ενώ το «οπίσθιο» γάλα αναφέρεται στο γάλα που εκκρίνεται στο τέλος του θηλασμού. Τα δύο είδη γάλακτος έχουν σημαντικές διαφορές στη σύνθεσή τους, με το «πρόσθιο» γάλα να περιέχει μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε λακτόζη και το «οπίσθιο» γάλα να περιέχει σταθερά υψηλότερη περιεκτικότητα σε λίπος (Charpak and Ruiz 2007). Η περιεκτικότητα του λίπους είναι επίσης σημαντικά χαμηλότερη στις θρέψεις που γίνονται κατά τις νυχτερινές και πρωινές ώρες σε σύγκριση με αυτές των απογευματινών ή βραδινών. Η συγκέντρωση των λιπιδίων έχει επίσης αποδειχθεί ότι αυξάνεται με την αύξηση του αριθμού των τοκετών της μητέρας (Bachour, et al. 2012, Eriksen, et al. 2018).

Η ηλικία και η περιοχή κατοικίας της μητέρας έχει επίσης παρατηρηθεί ότι επηρεάζουν, αν και οι μελέτες που έχουν ερευνήσει τις παραμέτρους αυτές δεν έχουν φτάσει σε σαφή συμπεράσματα (Bachour, et al. 2012, Eriksen, et al. 2018). Οι υπέρβαρες μητέρες έχουν αναφερθεί ότι εκκρίνουν μητρικό γάλα με σημαντικά χαμηλότερη συγκέντρωση πρωτεϊνών (Bachour, et al. 2012, Eriksen, et al. 2018), ενώ το γάλα των καπνιζόντων μητέρων έχει αναφερθεί ότι περιέχει χαμηλότερη περιεκτικότητα σε λιπίδια, πρωτεΐνες και sIgA, αν και οι διαφορές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές (Bachour, et al. 2012).

Η διατροφή της μητέρας επηρεάζει άμεσα τη σύνθεση του παραγόμενου γάλακτος. Συγκεκριμένα, η πρόσληψη πρωτεϊνών έχει αναφερθεί ότι επηρεάζει τη συγκέντρωση των λιπιδίων στο μητρικό γάλα (Eriksen, et al. 2018). Πολλά άλλα μικροθρεπτικά συστατικά,

συμπεριλαμβανομένων βιταμινών και ιχνοστοιχείων, ποικίλλουν στο ανθρώπινο γάλα ανάλογα με τη διατροφή της μητέρας και τα αποθέματα του σώματός της.

Επειδή δεν γνωρίζουμε εάν οι αλλαγές στη διατροφή της μητέρας έχουν άμεσο αποτέλεσμα, η συμπλήρωση πολυβιταμινών στις μητέρες κατά τη διάρκεια της γαλουχίας συνιστάται ιδιαίτερα. Η επεξεργασία που μπορεί να λάβει το μητρικό γάλα επηρεάζει επίσης τη σύνθεση του. Η περιεκτικότητα σε λιπαρά μειώνεται σημαντικά μετά από διαδικασίες αποθήκευσης, κατάψυξης και απόψυξης, ωστόσο, οι συγκεντρώσεις πρωτεϊνών και υδατανθράκων αυξάνονται σημαντικά σε αυτές τις περιπτώσεις (Chang, Chen and Lin 2012). Επιπλέον, η λακτοφερρίνη και η sIgA έχουν αναφερθεί ότι μειώνονται σημαντικά στο παστεριωμένο γάλα (J. C. Chang, et al. 2013). Η τυποποίηση των παραμέτρων όπως του χρόνου, της μεθόδου συλλογής, του τρόπου επεξεργασίας και της μεθόδου συντήρησης του μητρικού γάλακτος είναι πολύ σημαντική κατά τη διεξαγωγή μελετών σχετικά με τη σύνθεση του.

1.5 Σύνθεση Βρεφικής Φόρμουλας – Επιπτώσεις

Το ανθρώπινο γάλα περιέχει πολλές βιοδραστικές ενώσεις όπως ολιγοσακχαρίτες, κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και διάφορα οφέλημα βακτήρια και μεταβολίτες τους. Παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του εντέρου του νεογνού, υποστηρίζοντας και διαμορφώνοντας την εντερική μικροχλωρίδα και το ανοσοποιητικό σύστημα του νεογνού (Ayechu-Muruzabel, et al. 2018).

Η πρόσφατη βιβλιογραφία δίνει ιδιαίτερη έμφαση στην ποικιλία των ΗΜΟ στο μητρικό γάλα, τονίζοντας τη σημασία της επιστημονικής αξιολόγησης του ρόλου τόσο των δευτερευόντων όσο και των κύριων ολιγοσακχαριτών στην προαγωγή της υγείας των νεογνών, πριν από την προσθήκη τους στη βρεφική φόρμουλα. Ως επί του παρόντος, μόνο η 2'-FL και η LNnT είναι διαθέσιμες για εμπορική χρήση ως πρόσθετα σε βρεφικές φόρμουλες (Bych, et al. 2019). Ωστόσο, ερευνούνται άλλα είδη βιοενεργών ΗΜΟ, όπως οι γαλακτοσυλακτόζες (galactosyllactoses, GL), που θα μπορούσαν, εν δυνάμει, να αποτελέσουν συστατικά σε βρεφικές φόρμουλες, μόνον αφού επαληθευτεί και εγκριθεί η λειτουργία τους (Salminen, et al. 2020).

Η σύνθεση της βρεφικής φόρμουλας τείνει να μιμηθεί τη σύνθεση του μητρικού γάλακτος. Συγκεκριμένα περιλαμβάνει:

Πρωτεΐνες, οι οποίες παραλαμβάνονται κατά κύριο λόγο από αγελαδινό γάλα και είναι χαμηλότερης ποιότητας από αυτές του μητρικού γάλακτος. Αυτό συμβαίνει διότι έχουν σημαντικά μικρότερη ποικιλομορφία στα ποσοστά των αμινοξέων. Για να καλυφθεί αυτό το πρόβλημα, η

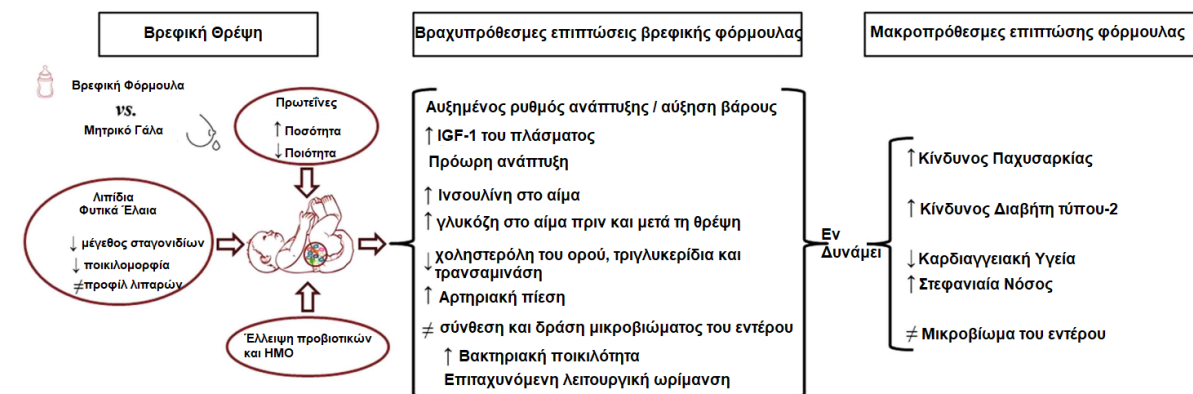
βρεφική φόρμουλα εμπλουτίζεται με μεγαλύτερο ποσοστό πρωτεϊνών ανά 100 kcal, σε σύγκριση με το μητρικό γάλα, το οποίο περιέχει 1,29-1,38 g/100kcal (Gidrewicz and Fenton 2014). Το «ιδανικό» ποσοστό πρωτεϊνών στις βρεφικές φόρμουλες έχει καθιερωθεί από το 2009, έως σήμερα, στα 1,8 g/100kcal, το οποίο αποτελεί πρότυπο για την παραγωγή τους (Koletzko, Von Kries, et al. 2009, Lemaire, et al. 2018).

Λίπος, το οποίο διαμορφώνεται με την μίξη φυτικών ελαίων. Αυτό γίνεται με σκοπό να πληρωθούν οι ανάγκες των νεογνών σε μονο- και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Οι βρεφικές φόρμουλες περιέχουν περισσότερα λιπαρά οξέα μακράς ανθρακικής αλυσίδας των οικογενειών των ω-6 και ω-3, λόγω αυτής της πρακτικής (Lemaire, et al. 2018).

Υδατάνθρακες, από τους οποίους κύριος είναι η λακτόζη. Λόγω της σύνδεσης των υδατανθράκων, και κυρίως των σακχάρων, με χρόνιες μη-λοιμώδεις παθήσεις, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης, η προσθήκη τους αποφεύγεται στην παρασκευή των βρεφικών φόρμουλων. Αντί αυτών χρησιμοποιούνται οι διαθέσιμοι HMO (2'-FL και LNnT). Η ελλιπής γνώση μας για τους HMO καθιστούν τις βρεφικές φόρμουλες ένα ατελές προϊόν, με τις συνέπειες της απουσίας των HMO να είναι άγνωστες (Bode 2015, Lemaire, et al. 2018).

Προβιοτικά, τα οποία βρέθηκαν στο μητρικό γάλα (βακτήρια του γένους *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium* και *Lactobacillus*), καταρρίπτοντας την υπόθεση ότι το μητρικό γάλα ήταν ένα στείρο βιολογικό υγρό (Jost, Lacroix and Braegger 2015). Η προέλευση των βακτηρίων που υπάρχουν στο μητρικό γάλα δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως, αλλά η τρέχουσα υπόθεση είναι ότι βακτήρια από το έντερο της μητέρας μπορεί να παγιδευτούν από δενδριτικά κύτταρα και να εξαπλωθούν στον μαστικό αδένα μέσω της λεμφικής οδού και της κυκλοφορίας του αίματος (Jost, Lacroix and Braegger 2015).

Οι επιπτώσεις της βρεφικής φόρμουλας έναντι του μητρικού γάλακτος παρατίθενται στην Εικόνα 3:



Εικόνα 3: Επιπτώσεις βρεφικής φόρμουλας έναντι μητρικού γάλακτος

Όσον αφορά τη μεταβολική υγεία των νεογνών, ένα βελτιωμένο πρότυπο για τη παρασκευή βρεφικής φόρμουλας θα γινόταν με τη ρύθμιση σε:

- Τις πρωτεΐνες ώστε να μειωθεί η ποσότητα αλλά να αυξηθεί η ποιότητά τους,
- Τα λιπίδια, ώστε να μοιάζουν με το μέγεθος, τη δομή και τη σύνθεση του λιπώδους σφαιριδίου του μητρικού γάλακτος και να υπάρχει ισορροπία στην αναλογία των ω-3 και των ω-6 λιπαρών οξέων.
- Τα πρεβιοτικά, προβιοτικά και συμβιοτικά, ώστε να προσεγγίζεται η μικροχλωρίδα του εντέρου που διαμορφώνεται με το μητρικό γάλα. Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για τη βελτίωση της σύνθεσης της βρεφικής φόρμουλας και την κατανόηση του τρόπου με τον οποίο μπορεί να ρυθμιστεί η αλληλεπίδραση μεταξύ του μεταβολισμού του ξενιστή και του μικροβιώματος του εντέρου ώστε αυτό να έχει μακροπρόθεσμα οφέλη για την υγεία.

Η ανάπτυξη της μικροχλωρίδας του εντέρου παίζει βασικό ρόλο, αλλά λόγω της πολυπλοκότητάς της, τα «υποκείμενα μονοπάτια» που επηρεάζουν τη βιολογία των νεογνών παραμένουν σε μεγάλο βαθμό άγνωστα. Ζώα όπως ο ανθρωποειδής πίθηκος και το χοιρίδιο, τα οποία είναι εξαιρετικά προκλινικά μοντέλα για τον άνθρωπο (Donovan 2016), αποδείχθηκαν χρήσιμα για τον έλεγχο και την αντιμετώπιση ορισμένων αμφισβητήσιμων παραγόντων που βρέθηκαν σε ανθρώπινες μελέτες, καθώς και για τη διερεύνηση των μηχανισμών που εμπλέκονται στις μακροπρόθεσμες επιπτώσεις της βρεφικής θρέψης. Επιτρέπουν τη μελέτη των ποικίλων διατροφικών παραγόντων και την επιλογή των πιο υποσχόμενων. Ωστόσο, εξακολουθεί να υπάρχει ανάγκη για περισσότερα πρότυπα στην θρέψη και στην ανάπτυξη των νεογνών. Παρ' όλα αυτά, τα πρότυπα δεν παύουν να παραμένουν θεωρητικά μοντέλα στα οποία πρέπει να διεξαχθούν μακροχρόνιες καλοσχεδιασμένες μελέτες σε ανθρώπους για τη διερεύνηση των επιδράσεων της σύνθεσης της βρεφικής φόρμουλας στον μεταβολισμό του ξενιστή στη μετέπειτα ζωή του (Lemaire, et al. 2018).

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας συνιστά θρέψη αποκλειστικά με θηλασμό για τους πρώτους 6 μήνες της ζωής για τις ανεπτυγμένες χώρες, ενώ για τις αναπτυσσόμενες συνιστάται για 2 χρόνια. Το αγελαδινό και το πρόβειο γάλα δεν συνιστάται για βρέφη και σε καμία περίπτωση δε θα πρέπει να τους χορηγείται. Οι σύγχρονες εξελίξεις των βρεφικών φόρμουλων έχουν εστιάσει στην όσο το δυνατότερο πιο ακριβή προσέγγιση της σύνθεσης του μητρικού γάλακτος, αφαιρώντας εν δυνάμει αλλεργιογόνα. Παρά τις συστάσεις για θρέψη μέσω θηλασμού, τα περισσότερα βρέφη τρέφονται με βρεφική φόρμουλα για κάποια χρονική περίοδο εντός του πρώτου χρόνου της ζωής τους (WHO 2022).

1.6 Σημαντικοί Βιοχημικοί Δείκτες

Το μητρικό γάλα είναι ένα εξαιρετικά πολύπλοκο βιολογικό υγρό θρεπτικών συστατικών για την ανάπτυξη των νεογνών, που αποτελείται κυρίως από λίπος, υδατάνθρακες και πρωτεΐνες, καθώς και μέταλλα, βιταμίνες και άλλα θρεπτικά συστατικά. Η λεπτή ισορροπία των θρεπτικών συστατικών και η δυναμική διαδικασία γαλουχίας καθιστούν το ανθρώπινο γάλα τη μόνη τροφή κατά τη διάρκεια της ζωής που είναι επαρκής ως μοναδική πηγή διατροφής για μια χρονική περίοδο στη ζωή ενός βρέφους. Η βιοχημική σύσταση του ανθρώπινου γάλακτος αλλάζει σε όλα τα στάδια του θηλασμού και σε συνάρτηση με τις ανάγκες και τις απαιτήσεις του βρέφους για ανάπτυξη και ανάπτυξη. Απουσιάζουν πολλά στοιχεία σχετικά με την αλληλεπίδραση των μακρο- και μικροθρεπτικών συστατικών, αλλά και βιοενεργών παραγόντων στο ανθρώπινο γάλα η οποία καθιστά το μητρικό γάλα τη βέλτιστη διατροφή για ένα ανθρώπινο βρέφος (Lawrence 2022).

1.6.1 Μεταβολές κατά τη Πρώιμη Γαλουχία

Υπάρχουν λίγες σύγχρονες έρευνες που να επιβεβαιώνουν τα ευρήματα των παλαιότερων μελετών πάνω στις μεταβολές των βιοχημικών δεικτών.

Σε έρευνα των Harzer et al. (1986), στην οποία αναλύθηκαν πάνω από 550 δείγματα μητρικού γάλακτος βρέθηκε ότι τα τριγλυκερίδια, τα οποία αντιστοιχούν στο 96–99 % του συνολικού λίπους στο μητρικό γάλα, αυξήθηκαν από 2 σε 3,5 g/100 ml κυρίως κατά την πρώτη εβδομάδα μετά τον τοκετό και παρέμειναν σταθερά στη συνέχεια. Αντίθετα, οι συγκεντρώσεις τόσο της χοληστερόλης όσο και της βιταμίνης E μειώθηκαν από 35 σε 20 mg/100 ml και από 1,7 σε 0,30 mg/100 ml, αντίστοιχα. Τα φωσφολιπίδια παρέμειναν σταθερά στα 40 mg/100 ml. Επίσης η σύνθεση των λιπαρών οξέων του ολικού λίπους μεταβλήθηκε. Τα λιπαρά οξέα μέσης ανθρακικής αλυσίδας (C:10, C:12, C:14) αυξήθηκαν, ενώ τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας μειώθηκαν.

Η μέση περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη του μητρικού γάλακτος μειώθηκε από περίπου 2 g/100 ml την 2^η μέρα σε περίπου 1 g/100 ml την 36^η ημέρα της γαλουχίας. Η περιεκτικότητα σε κάθε μεμονωμένο αμινοξύ μειώθηκε ομοίως. Οι τιμές των αμινοξέων, όμως, σε σχέση με την τιμή της πρωτεΐνης, δηλαδή ως g αμινοξέος ανά g πρωτεΐνης, παρουσίασαν ποικίλες μεταβολές. Μερικές παρέμειναν σταθερές και άλλες αυξήθηκαν, υποδεικνύοντας ότι το προφίλ των πρωτεϊνών είναι υψηλά μεταβαλλόμενο. Υπολογίστηκε μια απότομη μείωση στην περιεκτικότητα της ανοσοσφαιρίνης IgA, μια μέτρια μείωση της περιεκτικότητας της λακτοφερρίνη και καμία μείωση στις ποσότητες της καζεΐνης και της α-λακταλβουμίνης.

Η λακτόζη αυξήθηκε από περίπου 4 g/100 ml σε 6 g/100 ml κατά τις πρώτες ημέρες της γαλουχίας. Η περιεκτικότητα σε ασβέστιο αυξήθηκε από μια μέση τιμή 25 mg/100 ml την 1^η ημέρα σε 32 mg/100 ml την 5^η ημέρα και παρέμεινε σταθερή στα 30 mg/100 ml μέχρι την 36^η ημέρα. Η περιεκτικότητα σε φώσφορο αυξήθηκε από 10 mg/100 ml την 1^η ημέρα έως 17 mg/100 ml την 8^η ημέρα και στη συνέχεια μειώθηκε με συνεχή ρυθμό σε 13 mg/100 ml την 36^η ημέρα.

Το πρωτεϊνικά-δεσμευμένο μέρος του ασβεστίου παρέμεινε σταθερό κατά την περίοδο της έρευνας, ενώ το λιπιδικά-συσχετιζόμενο τμήμα αυξήθηκε από 11 % σε 26 %. Ο πρωτεϊνικά-δεσμευμένος φωσφόρος μειώθηκε από 45 % στο πρωτόγαλα σε 29 % στο μεταβατικό γάλα και 23 % στο ώριμο γάλα (Harzer, Haug and Bindels 1986).

1.6.2 Σημαντικότητα για τη Μεταφορά Βιοχημικών Μηνυμάτων

Το μητρικό γάλα όχι μόνο παρέχει μια ιδανική θρεπτική σύνθεση για το νεογνό, αλλά περιέχει επίσης μια ποικιλία συστατικών που μπορούν να επηρεάσουν ενεργά την ανάπτυξη του και να διεγείρουν την προστασία του από γαστρεντερικές παθήσεις. Οι ορμόνες, οι αυξητικοί παράγοντες, οι κυτοκίνες, ακόμη και ολόκληρα κύτταρα υπάρχουν στο μητρικό γάλα και δρουν για να δημιουργήσουν μια βιοχημική και ανοσολογική επικοινωνία μεταξύ της μητέρας και του νεογνού. Επιπλέον, τα συστατικά του γάλακτος όπως τα νουκλεοτίδια, η γλουταμίνη και η λακτοφερρίνη έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζουν τη γαστρεντερική ανάπτυξη και την άμυνα του ξενιστή.

Το μητρικό γάλα περιέχει πολλές ουσίες που λειτουργούν ως μεσολαβητές μεταξύ μητέρας και παιδιού και δημιουργούν μια βιοχημική και φυσιολογική επικοινωνία. Υπό αυτή την έννοια, το μητρικό γάλα μπορεί να θεωρηθεί ως μερική και προσωρινή επέκταση του ενδομήτριου περιβάλλοντος στην εξωμήτρια ζωή.

1.6.3 Βιοενεργοί Παράγοντες στο Μητρικό Γάλα

Τα συστατικά του γάλακτος που είναι σε θέση να μεταδώσουν βιοχημικά μηνύματα περιλαμβάνουν τις κυτοκίνες, τους αυξητικούς παράγοντες, τις ορμόνες, ειδικές για το γάλα ουσίες όπως η λακτοφερρίνη, αλλά ακόμη και κυτταρικά συστατικά. Η απομόνωση αυτών των παραγόντων από το γάλα είναι σχετικά εύκολη. Ωστόσο, η απόδειξη της αποτελεσματικότητάς τους είναι πιο προβληματική. Είναι εύκολο να υποτεθεί ότι η παρουσία ενός παράγοντα στο μητρικό γάλα, με γνωστές επιδράσεις στο νεογνό, αποτελεί ερέθισμα για τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος. Ωστόσο, για να αποδειχθεί ότι μια ουσία έχει φυσιολογικές επιδράσεις ή ακόμη και κλινική σημασία, πρέπει να πληρούνται ορισμένες βασικές απαιτήσεις (Bernt and Walker 1999).

Αυτές συμπεριλαμβάνουν:

1. Ένας παράγοντας πρέπει να παρουσιάζεται σε επαρκή ποσότητα και να βρίσκεται στην ενεργή του κατάσταση. Πρέπει, επίσης, να ληφθούν υπόψιν οι ανταγωνιστικές ουσίες που μπορούν, εν δυνάμει, να αναστείλουν τη λειτουργία του παράγοντα.
2. Ο παράγοντας πρέπει να παρεβρίσκεται στη περιοχή δράσης του, το οποίο και θα πρέπει να αποδουκνύεται. Λ.χ. μερικές κυτοκίνες και ορμόνες πληρούν τη δράση τους στο έντερο, αλλά πρέπει να παρευρεθούν εκεί ακέραιες για να είναι αποτελεσματικές.
3. Ο παράγοντας πρέπει να εκφράζει τη δράση του στο νεογνό, καθώς η παρουσία ενός παράγοντα δεν αποδεικνύει την βιολογική του επίδραση ή τη κλινική του σημασία.

Μερικοί από τους γνωστούς βιοενεργούς παράγοντες, με αποδεδειγμένη δράση, παρουσιάζονται στον Πίνακας 3.

Σε αντίθεση με τις μεταβολές των βιοχημικών παραγόντων στο μητρικό γάλα, η σύγχρονη έρευνα για την εκτίμηση των βιοενεργών συστατικών είναι πολύ εκτενής (Gila-Diaz, et al. 2019, Morceli, et al. 2011, Ballard and Morrow 2013, Thai and Gregory 2020)

1.6.2.1 Αυξητικοί Παράγοντες (*Growth Hormones*)

Το ανθρώπινο γάλα περιέχει πολυάριθμους αυξητικούς παράγοντες που έχουν ευρείες επιδράσεις στο στο γαστρεντερικό σύστημα, στα αγγεία, στο νευρικό σύστημα και στο ενδοκρινικό σύστημα (Ballard and Morrow 2013).

Περιλαμβάνουν τους εξής:

- Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας που ρυθμίζει την εντερική ωρίμανση και αποκατάσταση
- Παράγοντες νευρωνικής ανάπτυξης που ρυθμίζουν την ανάπτυξη του εντερικού νευρικού συστήματος
- Παράγοντες ανάπτυξης των ιστών
- Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας που συμβάλλει στην ανάπτυξη του αγγειακού συστήματος
- Η ερυθροποιητίνη (Erythropoietin) που ρυθμίζει την ανάπτυξη του εντέρου και συμβάλλει στη προληψη της αναιμίας
- Η καλσιτονίνη (Calcitonin) και η σωματοστατίνη που συντελούν τις κύριες αυξητικές ορμόνες
- Η αδιπονεκτίνη (Adiponectin) που ρυθμίζει τον μεταβολισμό και τη σύνθεση του σώματος

Πίνακας 3: Πρώτοι βιοενεργοί παράγοντες στο μητρικό γάλα (Bernt and Walker 1999)

Ορμόνες		Κυτοκίνες	
Υποθαλαμικές	GRH	Ιντερλευκίνες	IL-1 α/β
Βλεννογόνου	Somatostatin	Άλλες Κυτοκίνες	IL-2
	TSH		IL-4
	Dopamine		IL-6
	Growth hormone		IL-8
	ACTH		IL-10
Θυροειδούς	TSH		TNF- α
	FSH/LH		IFN- γ
	Prolactin		TGF- β
Παραθυροειδούς επιπεφυκιδίου	Triiodothyronin		RANTES
	Thyroxin		GRO α
	Calcitonin	MCP-1	
	PTH and PTH related peptides	MIP-1 α	
	Cortisol		
Γαστρεντερικού	Progesterone	GM-CSF	
	Estradiol/Estriol	G-CSF	
	Testosterone	M-CSF	
	Gastrin		
	Cholecystokinin		
	GIP	Νουκλεοτίδια	
	VIP	Γλουταμίνη	
Peptide YY	Λακτοφερρίνη		
Erythropoietin (EPO)			
Αυξητικοί Παράγοντες	IGF		
	EGF		
	NGF		
	MGF		
	bFGF		

1.6.2.2 Ανοσολογικοί παράγοντες (Immunological Factors)

Η διατροφή με μητρικό γάλα προστατεύει αποδεδειγμένα από λοιμώξεις και φλεγμονές, ενώ το πρώιμο γάλα είναι εμπλουτισμένο με ανοσολογικούς παράγοντες που βοηθούν στη διασφάλιση της επιβίωσης του νεογνού. Τα συγκεκριμένα προστατευτικά συστατικά του ανθρώπινου γάλακτος είναι τόσο πολυάριθμα και πολυλειτουργικά που η επιστήμη μόλις έχει αρχίσει να κατανοεί τις λειτουργίες τους (Ballard and Morrow 2013).

Περιλαμβάνουν τα εξής:

- Κύτταρα του ανθρώπινου γάλακτος που είναι υπεύθυνα για τη προστασία και τον κυτταρικό «προγραμματισμό» του σώματος
- Οι κυτοκίνες (cytokines) και οι χημοκίνες που είναι υπεύθυνες για την ενδο- και διακυτταρική «επικοινωνία»
- Επίκτητοι και έμφυτοι προστατευτικοί παράγοντες που προστατεύουν από λοιμώξεις
- Ολιγοσακχαρίτες που χρησιμεύουν στην επιλεκτική ανάπτυξη των ωφέλιμων μικροοργανισμών του εντέρου

Πίνακας 4: Σύγχρονοι βιοενεργόι παράγοντες στο μητρικό γάλα (2) (Ballard and Morrow 2013)

Ουσίες	Πηγή
TNF- α	Rudloff, ¹⁷⁸ 1992; Ustundag, ¹¹¹ 2005; Erbağcı, ¹¹⁴ 2005; Meki, ¹¹⁵ 2003; Agarwal, ⁹⁴ 2011; Castellote, ⁴ 2011
Χημοκίνες	
G-CSF	Gilmore, ¹⁰⁵ 1994; Gersting, ¹⁰⁶ 2003; Calhoun, ¹⁰⁷ 2003; Gersting, ¹⁰⁸ 2004
MIF	Magi, ¹⁷⁹ 2002; Vigh, ¹⁸⁰ 2011
Ανοσοαλιζή Κυτοκίνων	
TNFR I and II	Buescher, ¹¹² 1998; Buescher, ¹¹³ 1996; Meki, ¹¹⁵ 2003; Castellote, ⁴ 2011
EGF	Patki, ⁷⁷ 2012; Kobata, ³⁶ 2008; Hirai, ³⁸ 2002; Wagner, ⁴⁰ 2008; Dvorak, ⁴⁵ 2003; Dvorak, ⁴⁶ 2004; Chang, ⁴² 2002; Khailova, ⁴³ 2009; Coursodon, ¹⁸¹ 2012; Clark, ¹⁸² 2004; Castellote, ⁴ 2011; Untalan, ¹⁸³ 2009
HB-EGF	Radulescu, ⁴⁴ 2011
VEGF	Loui, ⁶⁴ 2012; Ozgurtas, ¹⁸⁴ 2011
NGF	Rodrigues, ⁴⁷ 2011; Boesmans, ⁴⁸ 2008; Sánchez, ⁴⁹ 1996; Fichter, ⁵¹ 2011
IGF	Chellakooty, ¹⁸⁵ 2006; Blum, ⁵² 2002; Burrin, ⁵³ 1997; Philipps, ⁵⁴ 2002; Milsom, ⁵⁵ 2008; Prosser, ⁵⁶ 1996; Elmlinger, ⁵⁷ 2007; Peterson, ⁵⁸ 2000; Murali, ⁵⁹ 2005; Corpeleijn, ⁶⁰ 2008; Baregamian, ¹⁸⁶ 2006; Baregamian, ¹⁸⁷ 2012; Büyükkayhan, ⁶¹ 2003; Philipps, ⁶² 2000; Kling, ⁶³ 2006
Ευρωβοταπίνη	Carbonell-Estrany, ⁶⁹ 2000; Juul, ¹⁸⁸ 2003; Kling, ⁷⁰ 2008; Miller-Gilbert, ¹⁸⁹ 2001; Pasha, ⁷¹ 2008; Soubasi, ⁶⁸ 1995; Shiou, ⁷² 2011; Arsenault, ⁷³ 2010; Miller, ¹⁹⁰ 2002; Untalan, ¹⁸³ 2009

Πίνακας 5: Σύγχρονοι βιοενεργόι παράγοντες στο μητρικό γάλα (1) (Ballard and Morrow 2013)

Ουσίες	Πηγή
Κύτταρα	
Μακροφάγα	Jarvinen, ⁸⁷ 2002; Yagi, ⁹³ 2010; Ichikawa, ⁹⁹ 2003
Λεμφοκύτταρα	Indumathi, ⁹⁰ 2012
Ανοσοσφαιρίνες	
IgA/IgA	Van de Perre, ³⁵ 2003; Cianga, ¹⁶⁸ 1999; Brandtzaeg, ¹²⁴ 2010; Kadaoui, ¹²⁵ 2007; Corthésy, ¹²⁶ 2009; Hurley, ¹²⁷ 2011; Agarwal, ⁹⁴ 2011; Castellote, ⁴ 2011
IgG	Cianga, ¹⁶⁸ 1999; Agarwal, ⁹⁴ 2011
IgM	Brandtzaeg, ¹²⁴ 2010; Van de Perre, ¹⁶⁹ 1993; Agarwal, ⁹⁴ 2011
Κυτοκίνες	
IL-6	Ustundag, ¹¹¹ 2005; Meki, ¹¹⁵ 2003; Mizuno, ¹¹⁹ 2012; Agarwal, ⁹⁴ 2011; Castellote, ⁴ 2011
IL-7	Aspinal, ¹¹⁰ 2011; Ngom, ¹⁰⁹ 2004
IL-8	Claud, ²⁴ 2003; Ustundag, ¹¹¹ 2005; Meki, ¹¹⁵ 2003; Maheshwari, ¹¹⁶ 2002; Maheshwari, ¹¹⁸ 2003; Maheshwari, ¹¹⁷ 2004; Hunt, ¹²⁰ 2012; Agarwal, ⁹⁴ 2011; Castellote, ⁴ 2011; Mehta, ¹⁷⁰ 2011
IL-10	Meki, ¹¹⁵ 2003; Agarwal, ⁹⁴ 2011; Castellote, ⁴ 2011; Mehta, ¹⁷⁰ 2011
IFN- γ	Hrdý, ¹²¹ 2012; Agarwal, ⁹⁴ 2011
TGF- β	Penttilä, ⁹⁷ 2010; Kalliomäki, ⁹⁸ 1999; Saito, ⁹⁹ 1993; Nakamura, ¹⁰⁰ 2009; Letterio, ¹⁰¹ 1994; Ando, ¹⁰² 2007; Ozawa, ¹⁰³ 2009; Donnet-Hughes, ¹⁰⁴ 2000; Verhasselt, ¹⁷¹ 2008; Verhasselt, ¹⁷² 2010; Penttilä, ¹⁷³ 2003; Mosconi, ¹⁷⁴ 2010; Okamoto, ¹⁷⁵ 2005; Penttilä, ¹⁷⁶ 2006; Peroni, ¹⁶⁰ 2009; McPherson, ¹⁷⁷ 2001; Ewaschuk, ¹⁶² 2011; Castellote, ⁴ 2011

Πίνακας 6: Σύγχρονοι βιοενεργόι παράγοντες στο μητρικό γάλα (3) (Ballard and Morrow 2013)

Ορμόνες	Πηγή
Καλσιτονίνη	Struck, ⁷⁵ 2002; Wookey, ⁷⁶ 2012
Σωματοστατίνη	Rao, ⁷⁷ 1999; Gama, ⁷⁸ 1996
Αντιμικροβιακά	
Λακτοφερρίνη	Adamkin, ¹²⁹ 2012; Sherman, ¹³⁴ 2004; Manzoni, ¹³³ 2009; Hirofani, ¹³¹ 2008; Buccigrossi, ¹³² 2007; Velona, ¹²⁸ 1999
MFG E8	Stubbs, ¹³⁵ 1990; Kusunoki, ¹⁴⁰ 2012; Aziz, ¹³⁸ 2011; Shi, ¹³⁹ 2004; Chogle, ¹⁴¹ 2011; Baghdadi, ¹⁴² 2012; Peterson, ¹³⁶ 1998; Newburg, ¹³⁷ 1998; Shah, ¹⁵³ 2012; Miksa, ¹⁹⁴ 2006; Komura, ¹⁹⁵ 2009; Miksa, ¹⁹⁶ 2009; Wu, ¹⁹⁷ 2012; Matsuda, ¹⁹⁸ 2011; Silvestre, ¹⁹⁹ 2005
Μεταβολικές Ορμόνες	
Αδρονεκτίνη	Martin, ⁸⁰ 2006; Newburg, ⁷⁹ 2010; Woo, ⁸¹ 2009; Woo, ²⁰⁰ 2012; Ley, ²⁰¹ 2011; Dundar, ²⁰² 2010; Ozarda, ²⁰³ 2012; Savino, ⁸³ 2008; Weyermann, ²⁰⁴ 2007
Λεπτίνη	Savino, ⁸³ 2008; Savino, ⁸² 2012; Palou, ⁸⁴ 2009; Weyermann, ²⁰⁴ 2007
Γκρελίνη	Savino, ⁸³ 2008; Savino, ⁸² 2012; Dundar, ⁸⁵ 2010
Ολοσακχαρώδες & Γλυκάνες	
HMO5	Newburg, ²³ 2005; Morrow, ²⁴ 2005; DeLeoz, ¹⁵³ 2012; Marcoba, ²⁰⁵ 2012; Kunz, ²⁰⁶ 2012; Ruhaak, ²⁰⁷ 2012; Bode, ¹⁵² 2012
Γαλλιοσίτες	Wang B, ²⁰⁸ 2012
Γλυκοσαμινολυκάνες	Coppa, ²⁰⁹ 2012; Coppa, ²¹⁰ 2011
Βλεννίνες	
MUC1	Ruvoen-Clouet, ¹⁴⁶ 2006; Liu, ¹⁵¹ 2012; Sando, ²¹¹ 2009; Saeland, ¹⁴⁸ 2009; Yolken, ¹⁴⁹ 1992
MUC4	Ruvoen-Clouet, ¹⁴⁶ 2006; Liu, ¹⁵¹ 2012; Chaturvedi, ²¹² 2008

Κεφάλαιο 2: Φασματομετρία Υπερύθρου – Βιβλιογραφική Ανασκόπηση

2.1 Η ανάλυση μητρικού πρωτογάλακτος με φασματομετρία υπερύθρου

Η φασματομετρία υπέρυθρης ακτινοβολίας (Infrared, IR) παρέχει λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τις περιστροφικές-δονητικές μεταπτώσεις των μορίων, επιτρέποντας την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό ενός ευρέος φάσματος βιοχημικών συστατικών (Schwaighofer, Brandstetter and Lendl 2017). Η φασματομετρία IR κυμαίνεται, τυπικά, σε κυματαριθμούς μεταξύ 4000 και 400 cm^{-1} . Οι συσκευές IR μετασχηματισμού Fourier (Fourier Transform Infrared, FTIR) είναι τα πιο καθιερωμένα και ευρέως διαδεδομένα όργανα που λειτουργούν σε αυτή τη φασματική περιοχή.

Για τον προσδιορισμό της σύνθεσης μακροθρεπτικών συστατικών του μητρικού γάλακτος, συμπεριλαμβανομένης της περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη, λίπος και λακτόζη, είναι τακτικά διαθέσιμες στο εμπόριο συσκευές IR (π.χ. αναλυτής ανθρώπινου γάλακτος MIRIS, Ουψάλα, Σουηδία), που καταγράφουν φάσματα απορρόφησης πλήρους γάλακτος σε λειτουργία μετάδοσης, και χρησιμοποιούνται για αναλύσεις ρουτίνας σε τράπεζες μητρικού γάλακτος. Έχει αποδειχθεί ότι τα αποτελέσματα που λαμβάνονται με τις συσκευές IR είναι αποδεκτά για τις περισσότερες παραμέτρους μέτρησης (Fusch, et al. 2015).

Ως εναλλακτικός τρόπος ανίχνευσης, η αποσβένουσα ολική ανάκλαση (Attenuated Total Reflectance, ATR) χρησιμοποιείται συνήθως στη φασματοσκοπία FTIR. Σε αυτή την προσέγγιση, η δέσμη υπερύθρων διέρχεται από ένα στοιχείο ATR υψηλής οπτικής πυκνότητας, όπου ανακλάται πλήρως στη διεπαφή με ένα οπτικά λιγότερο πυκνό δείγμα. Μέσα από αυτή τη διαδικασία, σχηματίζεται ένα αποσβένον πεδίο που μπορεί να διεισδύσει στα δείγματα σε βάθη μεταξύ 0,5 και 2 μm (Ramer and Lendl 2013). Η φασματοσκοπία ATR-FTIR έχει εφαρμοστεί σε έναν μικρό βαθμό για τον προσδιορισμό της συνολικής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες, λίπος και υδατάνθρακες στο μητρικό γάλα, και σε ακόμα μικρότερο βαθμό στο μητρικό πρωτόγαλα (Bērziņš, et al. 2021, Akhgar, et al. 2022, Ramos-Garcia, et al. 2021).

2.2 Βιβλιογραφική ανασκόπηση

Η τεχνολογία ATR-FTIR άρχισε την τελευταία 20ετία να χρησιμοποιείται ως μία ταχεία μέθοδος για την ανάλυση διαφορετικών υποστρωμάτων τροφίμων, όπως στερεών τροφίμων (Valand, et al. 2020), τροποποιημένων αμύλων (Chen, et al. 2018), αντιμικροβιακών προσθέτων χιτοζάνης (Lagaron, Fernandez-Saiz and Ocio 2007), αιθέριων ελαίων (Valderrama and De 2017), σιροπιών μελάσας (El Darra, et al. 2017), αλεσμένων οσπρίων και γάλακτος (Jaiswal, et al. 2015). Οι

κυριότεροι λόγοι για τους οποίους γίνεται η ανάλυση με ATR-FTIR είναι η ανάλυση νοθείας-αυθεντικότητας, (Valand, et al. 2020, Jaiswal, et al. 2015, Rodriguez-Saona and Allendorf 2011), η εύρεση τόπου προέλευσης (Biancolillo, et al. 2022), η ανάλυση και ταξινόμηση σύνθεσης (Lazzari, et al. 2018) και οι ολιστικές αναλύσεις (Li, Kong and Wu 2013).

2.2.1 Ανάλυση της σύνθεσης του μητρικού γάλακτος με ATR-FTIR φασματοσκοπία

Οι Bērziņš et al (2021) ανέλυσαν τα μακροθρεπτικά συστατικά μητρικού γάλακτος με τη χρήση ATR-FTIR φασματοσκοπίας. Σε αυτή τη μελέτη, πραγματοποιήθηκε ολοκληρωμένη ποιοτική και ποσοτική ανάλυση χρησιμοποιώντας χημειομετρικές μεθόδους: ανάλυση κύριων συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA) και πολυμεταβλητή ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares, PLS). Οι πληροφορίες που ελήφθησαν σχετικά με τα κύρια μακροθρεπτικά συστατικά (πρωτεΐνη, λίπος και υδατάνθρακες) αξιολογήθηκαν κυρίως σε σχέση με τα διαθέσιμα μεταδεδομένα των δειγμάτων, όπου η τοποθεσία κατοικίας (αστική ή αγροτική), καθώς οι πηγές θρέψης των μητέρων αποκάλυψαν ισχυρή διαφοροποίηση στη σύνθεση των λιπαρών οξέων και όχι στην απόλυτη περιεκτικότητά του (Bērziņš, et al. 2021).

Οι Akhgar et al (2022) ήταν οι πρώτοι που χρησιμοποίησαν την ATR-FTIR φασματοσκοπία για να προσδιορίσουν τη σύνθεση των λιπαρών οξέων στο μητρικό γάλα. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε μέτρηση στο μέσο IR φάσμα και συνδυάστηκε με πολυμεταβλητή ανάλυση PLS. Η προβλέπουσα συγκέντρωση των λιπαρών οξέων συγκρίθηκε με μέθοδο αναφοράς (Αέρια Χρωματογραφία, GC, με ανιχνευτή MS). Η πρόβλεψη ήταν ακριβής για σημαντικές ομάδες λιπαρών οξέων όπως τα κορεσμένα, τα μονοακόρεστα, τα πολυακόρεστα καθώς και τα λιπαρά οξέα βραχείας και μακράς ανθρακικής αλυσίδας. Η στατιστική ανάλυση έδειξε μεγάλες δυνατότητες της εφαρμογής της ATR-FTIR φασματοσκοπίας για τον προσδιορισμό της σύνθεσης των λιπαρών οξέων στο μητρικό γάλα (Akhgar, et al. 2022).

Οι Kamelska et al (2012) ανέλυσαν την διακύμανση της χοληστερόλης στο μητρικό γάλα στα πρώιμα στάδια της γαλουχίας με ATR-FTIR φασματοσκοπία. Συγκεκριμένα βράθηκε ότι η συγκέντρωση της χοληστερόλης, διέφερε σημαντικά μεταξύ των ημερών λήψης του μητρικού γάλακτος. Διαπιστώθηκε αρνητική συσχέτιση μεταξύ του βάρους των μητέρων και της συγκέντρωσης της χοληστερόλης στο μητρικό γάλα. Εξάχθηκε επιπλέον, ότι, το συμπέρασμα ότι το στάδιο της γαλουχίας και η διατροφή της μητέρας επηρεάζει τη τελική συγκέντρωση της χοληστερόλης. Η φασματοσκοπία ATR-FTIR κρίθηκε ως μία ταχεία και αποτελεσματική μέθοδος για

τον προσδιορισμό της χοληστερόλης στο μητρικό γάλα σε σύγκριση με άλλες μεθόδους (Kamelska, Pietrzak-Fiećko and Bryl 2012).

2.2.1.1 Προσδιορισμός χοληστερόλης

Ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων της χοληστερόλης στο μητρικό γάλα, σε κάθε στάδιο της γαλουχίας, πραγματοποιείται συχνά τη τελευταία δεκαετία με τη χρήση της ATR-FTIR φασματοσκοπίας (Kamelska, Pietrzak-Fiećko and Bryl 2012, Ramos-Garcia, et al. 2021, Hamdam, et al. 2018, Bard, et al. 2020, Owen, et al. 2008, Kamelska, Pietrzak-Fiećko and Bryl 2013). Οι έρευνες λαμβάνουν χώρα με σκοπό τη χρήση των αποτελεσμάτων από την έρευνα και βιομηχανία τροφίμων ώστε να γίνουν πιο κατανοητές οι διαφορές του προφίλ των στερολών σε μητρικό γάλα και βρεφική φόρμουλα (Hamdam, et al. 2018).

Η περιεκτικότητα σε χοληστερόλη στο μητρικό γάλα μειώνεται κατά τη διάρκεια των σταδίων της γαλουχίας και, σε κάθε περίπτωση, είναι υψηλότερη από αυτή που βρίσκεται στις βρεφικές φόρμουλες (Hamdan, et al. 2018). Έτσι, διαφορετικά ποιοτικά και ποσοτικά προφίλ χοληστερόλης και άλλων στερολών (πρόδρομες ουσίες της χοληστερόλης και φυτικές στερόλες) μπορούν να βρεθούν σε μητρικό γάλα και βρεφική φόρμουλα και να προσδιοριστούν με ATR-FTIR φασματοσκοπία. Το γεγονός αυτό αναγκάζει τα βρέφη που θηλάζουν να καταναλώνουν έως και 5 φορές περισσότερη χοληστερόλη από τα βρέφη που τρέφονται με βρεφική φόρμουλα (18,2 έναντι 3,4 mg/kg/ημέρα σε ηλικία 20 εβδομάδων και με μέσο σωματικό βάρος 6,8 kg).

Οι Claumarchirant et al. (2015) ανέφεραν παρόμοιες προσλήψεις χοληστερόλης (3,7 mg/kg/ημέρα) από βρεφική φόρμουλα σε βρέφη ίδιας ηλικίας και βάρους με τη χρήση ATR-FTIR (Claumarchirant, et al. 2015). Αυτή η αυξημένη πρόσληψη χοληστερόλης από νεογνά που θηλάζουν έχει θεωρηθεί ως ένας πιθανός λόγος για τον οποίο τα επίπεδα χοληστερόλης στον ορό είναι υψηλότερα σε βρέφη που θηλάζουν από ό,τι στα βρέφη που τρέφονται με βρεφική φόρμουλα, ενώ το αντίθετο συμβαίνει με τα επίπεδα φυτικών στερολών (Timby, et al. 2014).

2.2.2 Η χρήση της ATR-FTIR φασματοσκοπίας για την ανάλυση και τη σύγκριση των διαφορών του μητρικού γάλακτος με γάλατα άλλων θηλαστικών

Η διακύμανση στη συγκέντρωση των διαφορετικών συστατικών που βρίσκονται στο γάλα εξαρτάται από το είδος του θηλαστικού, τους γενετικούς και διατροφικούς παράγοντες, καθώς και τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Παρακάτω θα αναλυθεί η περιεκτικότητα σε διαφορετικά συστατικά (συγκέντρωση χοληστερόλης και σύνθεση λιπαρών οξέων καθώς και η συνολική περιεκτικότητα σε λίπος και μέταλλα/ιχνοστοιχεία που προσδιορίστηκαν στη βιβλιογραφία με αναλυτικές μεθόδους, συμπεριλαμβανομένης της φασματοσκοπίας ATR-FTIR) στο γάλα διαφορετικών ειδών θηλαστικών.

Το γάλα αποτελείται από τα ακόλουθα κύρια συστατικά: νερό, λίπος, λακτόζη, πρωτεΐνες ορού γάλακτος και ανόργανα συστατικά (τέφρα) σε ποσότητες εξαρτώμενες με το είδος (Course Hero Inc. 2020). Η σύνθεση του γάλακτος είναι πολύ μεταβλητή και διαφέρει ακόμη και μεταξύ των διαφορετικών ημερών της γαλουχίας. Επιπλέον, οι γενετικοί και οι διατροφικοί παράγοντες, καθώς και οι περιβαλλοντικές συνθήκες, παίζουν σπουδαίο ρόλο στη δημιουργία αυτών των διαφορών (Rutkowska, Adamska and Bialek 2011, Pietrzak-Fiecko 2018). Σημαντικό είναι αυτές οι διαφορές να μπορούν να γίνουν αντιληπτές με τη χρήση των αναλυτικών μεθόδων. Η φασματοσκοπία ATR-FTIR, λόγω των πολύπλευρων πλεονεκτημάτων που προσφέρει έναντι άλλων αναλυτικών τεχνικών χρησιμοποιείται ευρέως στα πλαίσια τέτοιων ερευνών. Συγκεκριμένα, η ιδιότητα της μεθόδου να καλύπτει ένα ευρύ φάσμα μακροθρεπτικών συστατικών, τη θέτει ικανή να χρησιμοποιηθεί στη σύγκριση και στην ανάλυση διάκρισης των γαλάτων διαφορετικής προέλευσης.

2.2.2.1 Διαφορά στη περιεκτικότητα του λίπους

Το λίπος είναι το πιο μεταβλητό συστατικό στο γάλα. Διαφέρει κατά τη διάρκεια της γαλουχίας, κατά τη διάρκεια της ημέρας και εξαρτάται από τα ατομικά χαρακτηριστικά των θηλαζουσών γυναικών ή ζώων (Neville, et al. 1984, Kamelska, Pietrzak-Fiećko and Bryl 2013). Λόγω αυτών των παραμέτρων είναι σημαντικό να αναλύεται με μεθόδους κάτω από μία πληθώρα περιβαλλοντικών και χημικών συνθηκών. Σύμφωνα μελέτη των Pietrzak-Fiećko και Kamelska-Sadowska (2020), η περιεκτικότητα σε λίπος στο βουβαλίσιο γάλα την 3^η ημέρα της γαλουχίας (6,5%) ήταν υψηλότερη από το γάλα άλλων ειδών, ενώ η περιεκτικότητα σε λιπαρά ήταν χαμηλότερη στο αγελαδινό γάλα την 150^η ημέρα της γαλουχίας (2,5%) από ότι στον άνθρωπο, το πρόβειο και το βουβαλίσιο γάλα (Thakore and Jain 2018). Από τα μηρυκαστικά, η μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε λίπος αναφέρθηκε στο βουβαλίσιο γάλα (μέγιστη τιμή 15.0%) και το χαμηλότερο στο αγελαδινό (ελάχιστη τιμή 3,3%). Η χαμηλή περιεκτικότητα σε λίπος βρέθηκε στο γάλα από αίγα και άλογο (Pietrzak-Fiećko and

Kamelska-Sadowska 2020). Η περιεκτικότητα σε λίπος του μητρικού γάλακτος (2,1–4,0%) ήταν μεγαλύτερη από αυτή των μη-μηρυκαστικών, αλλά μικρότερη από αυτή των μηρυκαστικών (Gantner, et al. 2015). Οι σαφείς διαφορές που διακρίνονται με την χρήση της μεθόδου καθιστούν την διάκριση των διαφορετικών γαλάτων δυνατή με τη χρήση μοντέλων ανάλυσης διάκρισης. Οι διαφορές των ποσοστών του λίπους στα γάλατα των θηλαστικών εμφανίζονται στον Πίνακα 7:

Πίνακας 7: Μέσο Ποσοστό Λίπους σε Γάλατα Θηλαστικών (Pietrzak-Fiećko and Kamelska-Sadowska 2020)

Είδος	Μέσο Ποσοστό Λίπους στο Γάλα (%)
Άνθρωπος	3.64
	3.72
	3.80
	3.90
Άλογο	1.21
	4.20
Αγελάδα	2.50
	3.30
	3.30
	3.40
	3.61
	3.80
Πρόβατο	5.90
	6.90
Αίγα	3.10
	3.40
	3.80
	4.20
	5.20
Βούβαλος	6.00
	15.00

2.2.2.2 Διαφορές στα λιπαρά οξέα

Τα λιπαρά οξέα είναι απαραίτητα για τη σωστή ανάπτυξη ενός νεογνού. Τα λιπαρά οξέα στο γάλα προέρχονται από τη διατροφή της μητέρας, τους πόρους λίπους, ή συντίθενται στο ήπαρ και τον μαστικό αδένα (Hayat, Al-Sughayer and Afzal 1999), επομένως η αξία τους θα μπορούσε να εξαρτάται από την κοινωνικοοικονομική κατάσταση των γυναικών (Brasil, et al. 1991).

Το μητρικό γάλα περιέχει και λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας και απαραίτητα λιπαρά οξέα. Το πρωτόγαλα περιέχει υψηλά επίπεδα αραχιδονικού οξέος [C20:4 (n-6)] (περισσότερο από 1% των συνολικών λιπαρών οξέων) και εικοσιδυαεξανοϊκό οξύ [C22:6 (n-3)] (πάνω από 0,50%) (Boersma, et

al. 1991). Στη διατροφή ενός νεογνού, το λινελαϊκό οξύ [C18:2 (η-6)] και το α-λινολενικό οξύ [C18:3 (η-3)] είναι απαραίτητα να λαμβάνονται από τη θρέψη καθώς δεν συντίθενται από τον ίδιο τον οργανισμό. Κατά τη διάρκεια του πρώτου έτους, το επίπεδο του λινελαϊκού οξέος και η τιμή του α-λινολενικού οξέος δεν εμφανίζουν σημαντικές αλλαγές. Το αραχιδονικό οξύ είναι πρόδρομος των εικοσανοειδών, συμπεριλαμβανομένων των λευκοτριενίων (μεσολαβητές της ανοσολογικής απόκρισης), των προσταγλανδινών (ενδοκυτταρικοί παράγοντες), θρομβοξάνες (που ρυθμίζουν τον αγγειακό τόνο) και ενδοκανναβινοειδή (Lands 1986, Salem and Van Dael 2020). Το θετικό της ATR-FTIR φασματοσκοπίας κατά τον προσδιορισμό του προφίλ των λιπαρών οξέων είναι ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με άλλες αναλυτικές μεθόδους για να προσδιοριστεί το ολικό λίπος και τα επιμέρους λιπαρά οξέα με μεγαλύτερη ακρίβεια και αξιοπιστία. Ο πιο συνήθης συνδυασμός αποτελεί την ATR-FTIR φασματοσκοπία με την GC-MS χρωματογραφία (Akhgar, et al. 2022).

Το άθροισμα των κορεσμένων λιπαρών οξέων στο μητρικό γάλα των Ευρωπαίων γυναικών ήταν 44,9% της συνολικής περιεκτικότητας σε λίπος (Koletzko, Thiel and Abiodun, fatty acid composition of human milk in Europe and Africa 1992) σε σύγκριση με εκείνες που ζούσαν σε περιοχές του Κουβέιτ, όπου τα επίπεδα ήταν 43% (Hayat, Al-Sughayer and Afzal 1999). Οι μελέτες του Pytasz (1999) έδειξαν ότι το επίπεδο των κορεσμένων λιπαρών οξέων ήταν μεταξύ 45-50% του συνόλου, συμπεριλαμβανομένων των λιπαρών οξέων μεταξύ C6:0-C12:0 που ήταν 6-8%, και το άθροισμα του μυριστικού οξέος (C14:0) και το παλμιτικό οξύ (C16:0) που αντιπροσώπευε το 40% όλων των λιπαρών οξέων στο ανθρώπινο γάλα (Pytasz 1999). Το ποσοστό των κορεσμένων λιπαρών οξέων που αναφέρθηκε στο αγελαδινό γάλα ήταν υψηλότερο (65.6%) από ό,τι στο μητρικό γάλα (48,2%). Από την άλλη πλευρά, τα μονο- και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα ήταν υψηλότερα στο ανθρώπινο γάλα από ότι στο αγελαδινό γάλα (39,8% και 10,8% έναντι 30,3% και 4,5%). Ομοίως με τη χοληστερόλη, ο προσδιορισμός των λιπαρών οξέων καθίσταται σημαντικός για τη παρασκευή βρεφικών φόρμουλων. Τα προαναφερθέντα πλεονεκτήματα της μεθόδου του ATR-FTIR φασματοσκοπίας, σε συνδυασμό με χρωματογραφικές τεχνικές καθιστούν την ακριβή ανάλυση και τη σύγκριση των διάφορων πηγών των λιπαρών οξέων ταχεία και εύκολη (Campbell 2020).

2.3 Σύγκριση ATR-FTIR φασματοσκοπίας με άλλες αναλυτικές μεθόδους

Η ATR-FTIR φασματοσκοπία είναι μία μη-καταστροφική αναλυτική τεχνική που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την μελέτη μιας ευρείας ποικιλίας διαφορετικών μορίων σε ένα μεγάλο εύρος διαφορετικών συνθηκών. Πλεονεκτεί έναντι των άλλων αναλυτικών τεχνικών λόγω της ταχείας λειτουργίας και εξαγωγής των αποτελεσμάτων της, της δυνατότητας σύγκρισης των

αποτελεσμάτων με αυτά των διαθέσιμων βιβλιοθηκών ATR-FTIR, της μεγάλης ποικιλομορφίας των συστατικών και μορίων που μπορεί να αναλύσει αλλά και λόγω της δυνατότητας της για ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό. Σε αντίθεση, ωστόσο, με άλλες τεχνικές, όπως τις χρωματογραφικές, δε μπορούν να μελετηθούν αναλυτικά τα επιμέρους μακρο- και μικροθρεπτικά συστατικά των υποστρωμάτων τροφίμων. Έτσι, η ανίχνευση συγκεκριμένων υδατανθράκων, αμινοξέων, λιπαρών οξέων, μετάλλων και ιχνοστοιχείων δεν είναι δυνατή με αυτή την αναλυτική τεχνική. Η χρήση της φασματοσκοπίας ATR-FTIR στο μητρικό γάλα χρησιμοποιείται κυρίως για τον προσδιορισμό των μακροθρεπτικών συστατικών, και συγκεκριμένα, ο προσδιορισμός και η σύγκριση της χοληστερόλης του μητρικού γάλακτος με αυτή των βρεφικών φόρμουλων έχει αποτελέσει ανάλυση «ρουτίνας» κατά την παρασκευή των τελευταίων (Bard, et al. 2020, Hamdam, et al. 2018, Hamdam, et al. 2018). Οι Bērzīņš et al. (2021) χρησιμοποίησαν φασματοσκοπία Raman και ATR-FTIR φασματοσκοπία για την ανάλυση 208 δειγμάτων μητρικού γάλακτος ως μέρος μιας ευρύτερης ερευνητικής μελέτης. Συγκεκριμένα, στα πλαίσια της έρευνας πραγματοποιήθηκε ολοκληρωμένη ποιοτική και ποσοτική ανάλυση χρησιμοποιώντας χημειομετρικές μεθόδους: ανάλυση PCA και ανάλυση PLS. Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στους περιορισμούς και στις προκλήσεις της χρήσης των δύο φασματοσκοπικών τεχνικών για αυτό το είδος ανάλυσης (Bērzīņš, et al. 2021).

Οι περιορισμοί των τεχνικών κατά την ανάλυση του μητρικού γάλακτος είναι ένα σημαντικό ζήτημα, καθώς ακόμη και οι περισσότερες σύγχρονες εξειδικευμένες συσκευές όπως οι φασματοσκοπικοί αναλυτές μητρικού γάλακτος μπορεί να μην έχουν την απαραίτητη ακρίβεια και την απαραίτητη αξιοπιστία ώστε να παρέχουν ορθά αποτελέσματα. Ενώ και οι δύο μέθοδοι έδειξαν ότι είχαν εγγενώς διαφορετική ευαισθησία σε καθένα από τα μακροθρεπτικά συστατικά (δηλαδή, χαρακτηριστικές κορυφές δόνησης), οι μεγαλύτερες επιπλοκές προκύπτουν από την πολυπλοκότητα του ίδιου του υποστρώματος του γάλακτος. Όπως παρατηρήθηκε, είναι σημαντικό να διασφαλιστεί η ομοιογένεια των δειγμάτων κατά τη διάρκεια των μετρήσεων, κάτι που μπορεί να απαιτήσει συγκεκριμένες τροποποιήσεις στην πειραματική διάταξη και μπορεί να μην είναι πάντα εφικτό (όπως στην περίπτωση του ATR-FTIR). Επιπλέον, ο προσδιορισμός των πρωτεϊνών διακυβεύεται λόγω της έλλειψης ευαισθησίας στο εύρος χαμηλών συγκεντρώσεων, το οποίο είναι χαρακτηριστικό του μητρικού γάλακτος. Σύμφωνα με τη μελέτη, ο τεράστιος αριθμός συστατικών και η παρουσία αλληλεπικαλυπτόμενων φασματικών χαρακτηριστικών καθιστούν επίσης την εφαρμογή απλών μονομεταβλητών στατιστικών μεθόδων σχεδόν «απαρχαιωμένη» για την ανάλυση των δεδομένων. Επομένως, είναι δύσκολο να εκτιμηθεί σε ποιο βαθμό αυτοί οι παράγοντες έχουν ληφθεί υπόψη σε όργανα του εμπορίου, καθώς οι μετρήσεις

πραγματοποιούνται συνήθως σε πρότυπα δείγματα χρησιμοποιώντας συγκεκριμένο λογισμικό συλλογής και ανάλυσης δεδομένων (Bērzīņš, et al. 2021).

Οι Akhgar et al. (2022) μελέτησαν τη σύνθεση της περιεκτικότητας των λιπαρών οξέων στο μητρικό γάλα. Συγκεκριμένα, εφαρμόστηκε φασματοσκοπία ATR-FTIR για την καταγραφή φασμάτων απορρόφησης αμιγούς λίπους γάλακτος. Τα ληφθέντα φάσματα συγκρίθηκαν με τα φάσματα μετάδοσης πλήρους ανθρώπινου γάλακτος, αποκαλύπτοντας τον σημαντικά υψηλότερο βαθμό φασματικών χαρακτηριστικών που σχετίζονται με λιπαρά οξέα στα φάσματα ATR-FTIR. Επιπλέον, εφαρμόστηκαν εξισώσεις πολυμεταβλητής παλινδρόμησης που βασίζονται σε ανάλυση PLS, συνδέοντας τα φάσματα ATR-FTIR με τις συγκεντρώσεις αναφοράς λιπαρών οξέων, που ελήφθησαν με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS) Συγκρίθηκαν έτσι τα φασματικά αποτελέσματα της ATR-FTIR μεθόδου με τα χρωματογραφικά της GC-MS.

2.3.1 Νέες προσεγγίσεις με την FTIR φασματοσκοπία

2.3.1.1 Κρυογονική IR φασματοσκοπία

Οι Khanal et al. (2018) ανέλυσαν τους HMO του μητρικού γάλακτος με κρυογονική IR φασματοσκοπία σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (MS). Συγκεκριμένα αναλύθηκαν από τρισακχαρίτες έως και εξασακχαρίτες. Η IR φασματοσκοπία έδωσε αρκετές πληροφορίες για τις δονήσεις τάσεις των αμινομάδων (NH) και των υδροξυλομάδων (OH), πράγμα που η φασματομετρία MS δεν μπορούσε να διαθέσει. Αυτό καθιστά τον συνδυασμό των μεθόδων ικανό να προσδιορίσει ένα ευρύ φάσμα απειροελάχιστων διαφορών στις δομικές ιδιότητες των συστατικών του γάλακτος, οι οποίες θα μπορούσαν να διαθέτουν βιολογική σημασία. Η εξαιρετικά δομημένη φύση των φασμάτων δόνησης που προκύπτει από την κρυογονική ψύξη των ιόντων αυξάνει την ικανότητά διάκρισης διαφορετικών ισομερών με υψηλή εκλεκτικότητα. Η IR φασματοσκοπία, επομένως, σε όλες της τις μορφές μπορεί να αποτελέσει σημαντικό παράγοντα στην δόμηση μίας οικουμενικής βάσης δεδομένων που περιέχει πληροφορίες φασμάτων δόνησης και φασμάτων μάζας, ώστε να διαμορφωθούν πρότυπα αναφοράς. Αυτό θα επιτρέψει τον προσδιορισμό των HMO σε δείγματα μητρικού γάλακτος πάσης φύσης, μετατρέποντας την ανίχνευσή τους από ερευνητικό πρόβλημα σε ανάλυση ρουτίνας (Khanal, et al. 2018).

2.3.1.2 Αναλυτές IR Μητρικού Γάλακτος

Μία από τις πιο σημαντικές μεθόδους για την ταχεία ανάλυση μητρικού γάλακτος με τη χρήση φασματομετρίας IR είναι η χρήση των εξειδικευμένων IR αναλυτών μητρικού γάλακτος (Human Milk Infrared Analyzers, HMIA). Οι Perrin et al. (2019) μελέτησαν την ακρίβεια και την αξιοπιστία των HMIA σε μητρικά γάλατα μίας τράπεζας μητρικού γάλακτος. Συγκεκριμένα, παρέιχαν κιτ δοκιμών μητρικού γάλακτος σε τρεις μη κερδοσκοπικές τράπεζες γάλακτος, τα οποία είχαν αξιολογηθεί χρησιμοποιώντας μεθόδους αναφοράς. Τέσσερα όργανα υπερύθρων χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση μακροθρεπτικών συστατικών: ATR-FTIR φασματοσκοπία, φιλτραρισμένη φασματοσκοπία μέσου-IR και φασματοσκοπία εγγύς-IR. Είκοσι πέντε δείγματα εκτιμήθηκαν ταυτόχρονα ως προς την ακρίβειά τους. Για την τήρηση της αξιοπιστίας, ένα όμοιο δείγμα εκτιμήθηκε με τις μεθόδους αναφοράς. Τα αποτελέσματα της έρευνας ήταν ακριβή και αξιόπιστα ως προς τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών και του ολικού λίπους στα πλαίσια της έρευνας. Η μέτρηση των υδατανθρακών, ωστόσο ήταν λιγότερο ακριβή και με σημαντικές αποκλίσεις μεταξύ των οργάνων, το οποίο θα οδηγήσει σε διαφορές στο εκτιμώμενο θερμιδικό περιεχόμενο των δειγμάτων. Η μελέτη αυτή τόνισε ένα σημαντικό πλεονέκτημα των αναλυτών μητρικού γάλακτος και ένα σημαντικό μειονέκτημα: Αποτελεί μία ευκολόχρηστη και ταχεία μέθοδο προσδιορισμού των μακροθρεπτικών συστατικών του μητρικού γάλακτος, γεγονός που διαπράττεται εύκολα με την IR φασματοσκοπία. Ωστόσο, η χαμηλή ακρίβεια και η εξειδικευμένη φύση των αναλυτών τα καθιστούν δύσκολα στην πρόσβαση, στην αγορά και στην αξιόπιστη χρήση ώστε να αποτελέσουν διαδεδομένες συσκευές ανάλυσης του μητρικού γάλακτος (Perrin, et al. 2019).

Σε άλλη μελέτη των Giuffrida et al. (2019) πραγματοποιήθηκε σύγκριση του περιεχομένου των μακροθρεπτικών συστατικών με τη χρήση HMIA, με μεθόδους αναφοράς. Συγκεκριμένα, η σύγκριση έγινε με χρωματογραφία ιοντανταλλαγής υψηλής απόδοσης (High Performance Anion Exchange Chromatography, HPAEC) με παλμικό αμπερομετρικό ανιχνευτή (Pulsed Amperometric Detection, PAD) και με μέθοδο Kjeldahl, για τον προσδιορισμό του ολικού λίπους, της περιεκτικότητας της λακτόζης και των πρωτεϊνών. Τα αποτελέσματα της μελέτης δεν έδειξαν σημαντικές διαφορές μεταξύ το περιεχόμενο της λακτόζης μεταξύ του HMIA και του HPAEC-PAD. Διαφορές, ωστόσο, διαπιστώθηκαν στο περιεχόμενο λίπος και στις πρωτεΐνες μεταξύ των HMIA και των μεθόδων αναφοράς. Η διαφορά στο λίπος θεωρήθηκε εντός των προβλεπόμενων αποκλίσεων και δεν θεωρήθηκε σημαντική. Η διαφορά των πρωτεϊνών θεωρήθηκε σημαντική, καθώς δεν υπήρχε διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων που έδωσαν οι μέθοδοι αναφοράς, αλλά υπήρχαν

μεταξύ αυτών και του ΗΜΙΑ. Αυτό προδιαγράφει την αναξιοπιστία του συγκεκριμένου αναλυτή στον προσδιορισμό του πρωτεϊνικού περιεχομένου. Τα δεδομένα μεταξύ των διάφορων μελετών επιβεβαιώνουν ότι η αναξιοπιστία των αναλυτών ΗΜΙΑ αποτελεί βασικό μειονέκτημα που παρεμποδίζει την ανάδυσή τους ως καθιερωμένη μέθοδος προσδιορισμού των μακροθρεπτικών συστατικών του μητρικού γάλακτος (Giuffrida, et al. 2018).

2.3.1.3 Φασματοσκοπία εγγύς-IR

Όμοιας σημαντικότητας με τους αναλυτές ΗΜΙΑ, στη σύγχρονη περίοδο, αποτελούν οι αναλυτές χειρός φάσματος εγγύς-IR. Οι Dos Santos et al. (2021) εκτίμησαν τις φάσεις της γαλουχίας του μητρικού γάλακτος μέσω φασματοσκοπίας εγγύς-IR και πολυμεταβλητής ανάλυσης PLS. Η έρευνα στόχευσε στην ανάπτυξη μοντέλων που βασίζονται σε αυτές τις μεθόδους για να ταξινομήσει το μητρικό γάλα στις διαφορετικές μορφές του (πρωτόγατα, μεταβατική φάση, ώριμο γάλα), ανάλογα το στάδιο της γαλουχίας του κάθε δείγματος.

Συνολικά, 198 δείγματα παστεριώθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για την αποτίμηση των φασμάτων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ευαισθησία και η εκλεκτικότητα θεωρήθηκαν ικανοποιητικές για την ταξινόμηση των φάσεων. Με βάση τα μοντέλα PLS, τα σκορ ευαισθησίας για το πρωτόγαλα και το ώριμο γάλα ήταν 87,5% και 90,3%, αντίστοιχα, ενώ για την εκλεκτικότητα ήταν 90,3% και 93,8%, αντίστοιχα. Αυτές οι βαθμολογίες έδειξαν ότι, για τη μοντελοποίηση των φάσεων του πρωτογάλακτος, οι σημαντικές περιοχές του φάσματος σχετίζονται με το πρωτεϊνικό περιεχόμενο, ενώ για το ώριμο γάλα μεγαλύτερο ρόλο έπαιξαν οι περιοχές του λιπιδικού περιεχομένου. Διαπιστώθηκε επίσης ότι η μεταβατική φάση του μητρικού γάλακτος έχει κοινές ιδιότητες με το πρωτόγαλα και το ώριμο γάλα, γεγονός που συνέλαβε στην μη-ικανοποιητική κατάταξή του. Ο συνδυασμός της εγγύς-IR φασματοσκοπίας σε συνδυασμό με πολυμεταβλητές μεθόδους PLS είναι επαρκής για την κατηγοριοποίηση των φάσεων του μητρικού γάλακτος μέσω του προσδιορισμού των μακροθρεπτικών συστατικών του. Τα πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι το χαμηλό κόστος και η υψηλή ταχύτητα της ανάλυσης, προδιαγράφοντας έτσι τα πλεονεκτήματα της IR φασματοσκοπίας στην ανάλυση μητρικού γάλακτος.

Η μέθοδος έδειξε ικανή για μελλοντική χρήση σε τράπεζες μητρικού γάλακτος, για τον προσδιορισμό και την κατηγοριοποίηση γάλακτος άγνωστης προέλευσης, έτσι ώστε να μπορέσει να χορηγηθεί σε νεογνά, ανάλογα με το στάδιο της γαλουχίας που ανταποκρίνεται στις ανάγκες τους (Dos Santos, et al. 2021).

Κεφάλαιο 3: Πειραματικό Μέρος

3.1 Μέθοδοι και Υλικά

Δείγματα μητρικού γάλακτος παραλήφθηκαν ως μέρος ενός μεγαλύτερου ερευνητικού έργου για να αναλυθούν ολιστικά με τη χρήση φασματοσκοπίας αποσβένουσας ολικής ανάκλασης-υπέρυθρης ακτινοβολίας μετασχηματισμού Fourier (ATR-FTIR). Σαράντα τέσσερα (44) μοναδικά δείγματα από θηλάζουσες και, κατά κύριο λόγο, Ελληνικής εθνικότητας (84,09%) μητέρες παραλήφθηκαν, με εύρος ηλικιών από 27-52 ετών, δεικτών μάζας-σώματος (Body Mass Index, BMI) προ (17,24-40,3) και μετά (21,6-44,29) κύησης, με ή χωρίς υποκείμενα νοσήματα, με ή χωρίς επιπλοκές κύηση και με ή χωρίς φαρμακευτική αγωγή κατά τη κύηση. Σημειώνεται ότι τα δείγματα δεν συνοδεύονταν από κανένα στοιχείο ταυτοποίησης των εθελοντών ή άλλα προσωπικά δεδομένα. Για κάθε δείγμα δόθηκαν πληροφορίες σχετικά με τη διακοπή ή μη- του καπνίσματος στη, ή προ κύησης, ο αριθμός των τόκων της μητέρας, καθώς και οι αντίστοιχες ηλικίες κύησης. Εκ των 44 δειγμάτων, δύο (2) δείγματα παραλήφθηκαν και υποβλήθηκαν σε ανάλυση εις τριπλούν και άλλα τρία (3) εις διπλούν, αυξάνοντας τον αριθμό των μετρήσεων στις πενήντα μία (51). Η συλλογή των δειγμάτων του μητρικού γάλακτος πραγματοποιήθηκε στο Αρεταίειο Νοσοκομείο ενώ ακολούθησε η μεταφορά τους στον τόπο ανάλυσης μέσα σε ειδικά μονωμένα δοχεία (cryo-boxes) παρουσία ξηρού πάγου. Το ερευνητικό έργο στο οποίο εντάσσεται η παρούσα μελέτη έχει λάβει τις απαραίτητες εγκρίσεις από την αρμόδια επιτροπή Βιοηθικής.

3.1.1 Προκατεργασία των δειγμάτων

Αφού τα δείγματα ξεπάγωσαν σταδιακά σε διάστημα μικρότερο της μιας ώρας, 500 μL από το σύνολο μεταφέρθηκε σε Eppendorf tube των 2 mL τα οποία καλύφθηκαν με parafilm. Σε κάθε parafilm έγιναν 3-4 τρύπες έτσι ώστε να είναι δυνατή η απομάκρυνση της υγρασίας. Η κρυοξήρανση υπό κατάψυξη (λυοφιλίωση) πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γάλακτος του τμήματος Επιστημών Τροφίμων σε ειδικό ξηραντήρα εξοπλισμένο με θερμοστατούμενη αντλία κενού (Thermo Electron Corporation, Thermo Fischer, Waltham, MA, USA).

3.1.2 Φασματοσκοπία αποσβένουσας ολικής ανάκλασης-υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier (ATR-FTIR)

Η φασματοσκοπία ATR-FTIR πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου ($\sim 20^\circ\text{C}$) με φασματογράφο Shimadzu, IRAffinity-1S FTIR Spectrometer, Japan. Πριν την ανάλυση, τα δείγματα ομογενοποιήθηκαν σε vortex (Falc Instruments, Bergamo, Italy) για περίπου 30 δευτερόλεπτα. Για

κάθε δείγμα, μικρή ποσότητα του ομογενοποιημένου και αποξηραμένου μητρικού γάλακτος τοποθετήθηκε στην εισδοχή του μηχανήματος, γεμίζοντάς την πλήρως, και ασφαλίστηκε με την οπτική ακίδα που περιείχε κοίλη επιφάνεια επαφής. Κάθε δείγμα αναλύθηκε μεταξύ 400 και 4000 cm^{-1} . Τα φασματικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων, συμπεριλαμβανομένου του διαγράμματος του φάσματος και των εντάσεων, καταγράφηκαν άμεσα, υπό συνεχή λειτουργία του μηχανήματος, εντός χρονικού διαστήματος όχι μεγαλύτερου των 60 δευτερολέπτων.

3.1.3 Προκατεργασία των δεδομένων

Τα φάσματα που συλλέχθηκαν μετατράπηκαν σε αρχεία JCAMP (επέκτασης .dx) από CSV αρχεία (επέκτασης .csv) με τη χρήση του λογισμικού LabSolutions IR . Τα δεδομένα των φασμάτων, για κάθε δείγμα, επεξεργάστηκαν με τη χρήση του λογισμικού IR SearchMaster 6.0 από την εταιρεία Bio-Rad Laboratories, Sadtler Software and Databases, Φιλαδέλφεια, Πενσυλβάνια, Η.Π.Α. Οι κατεργασίες που ακολούθησαν ήταν οι εξής:

- Επεξεργασία «ευθείας γραμμής» (flatline processing), η οποία χρησιμοποιήθηκε για να μετατραπεί η περιοχή του διαγράμματος των φασμάτων IR, από τα 2600 έως τα 1800 cm^{-1} σε ευθεία γραμμή, καθώς αυτή η περιοχή δεν περιείχε χρήσιμα οπτικά δεδομένα.
- Επεξεργασία «περικοπής» (truncation processing), η οποία χρησιμοποιήθηκε για να αφαιρέσει τις περιοχές άνω των 3600 και κάτω των 500 cm^{-1} , καθώς αυτές δεν περιείχαν χρήσιμες οπτικές πληροφορίες
- Κανονικοποίηση
- Διόρθωση «βασικής γραμμής» (Baseline correction)
- Διόρθωση ATR (ATR correction)
- Διαλογή «κορυφών» (Peak picking). Σε αυτήν, το ελάχιστο ποσοστό έντασης ή αλλιώς «global threshold» τέθηκε στο 4% και το επίπεδο θορύβου (noise level) τέθηκε στο 1%. Με αυτές τις παραμέτρους, η διαλογή των κορυφών έγινε μόνο για εντάσεις άνω των 4%. Εντάσεις μικρότερες του 1% των τοπικών γειτονικών τιμών θεωρήθηκαν θόρυβος, επομένως οι αντίστοιχες περιοχές κυματαριθμών δεν θεωρήθηκαν κορυφές. Συνολικά, καταγράφηκαν 17 κορυφές, η κάθε μία από τις οποίες εμφανίστηκε τουλάχιστον σε δέκα (10) δείγματα, έτσι ώστε να εξασφαλιστεί η επαναληψιμότητα των κορυφών στις καθορισμένες παραμέτρους ελάχιστου ποσοστού έντασης και επιπέδου θορύβου.

3.1.4 Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA)

Εφαρμόστηκε ανάλυση PCA στα επεξεργασμένα δεδομένα των εντάσεων, των κορυφών που επιλέχθηκαν, με σκοπό την διάκριση των δειγμάτων. Η στατιστική επεξεργασία εφαρμόστηκε με το λογισμικό STATISTICA (12.6. StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA). Για την προβολή των μεταβλητών επιλέχθηκε η σύγκριση του παράγοντα 1 (Factor 1 – Φασματικής Διακύμανσης [Spectral Variance] 48,37%) και του παράγοντα 2 (Factor 2 – Φασματικής Διακύμανσης 25,08%), καθώς περιείχαν τα μεγαλύτερα ποσοστά φασματικής διακύμανσης μεταξύ των 7 παραγόντων που υπολογίστηκαν από το λογισμικό.

Κεφάλαιο 4: Αποτελέσματα - Συζήτηση

4.1 Επισκόπηση Δειγματοχώρου (Metadata) Δειγμάτων

Μία εκτενής λίστα δεδομένων ήταν διαθέσιμη για κάθε δείγμα μητρικού γάλακτος που αναλύθηκε, συμπεριλαμβανομένων των δεδομένων για την ημέρα λήψης του μητρικού γάλακτος, την ηλικία της μητέρας, την εθνικότητα, το BMI προ και στο τέλος της κύησης, την ύπαρξη ή μη- υποκείμενων νοσημάτων, την λήψη ή μη- φαρμακευτικής αγωγής προ και μετά κύησης, των επιπλοκών της κύησης, του αριθμού των τοκετών, του καπνίσματος και της ηλικίας κύησης. Οι πιο σημαντικοί παράγοντες που έχουν βρεθεί ότι επηρεάζουν σε σημαντικό βαθμό την σύνθεση του μητρικού γάλακτος, σύμφωνα με τη διαθέσιμη βιβλιογραφία, είναι η ηλικία της μητέρας, η ηλικία κύησης, η εθνικότητα, το κάπνισμα, ο αριθμός των τοκετών, και ο BMI της μητέρας (βλ. Πίνακες 8-15) (M. -Y. Chung 2014, Bachour, et al. 2012, Ballard and Morrow 2013, Sinanoglou, et al. 2017).

Πίνακας 8: Κατάταξη και ποσοστά ηλικιών των μητέρων

Ηλικία Μητέρας	Αριθμός δειγμάτων	Ποσοστό Δειγμάτων
25-29 χρονών	4	9.09%
30-34 χρονών	14	31.82%
35-39 χρονών	21	47.73%
40-44 χρονών	4	9.09%
45< χρονών	1	2.27%
Σύνολο	44	100.00%

Πίνακας 9: Κατάταξη και ποσοστά ηλικιών κύησης (σε εβδομάδες) των νεογνών

Βδομάδα Κύησης (1)	Αριθμός δειγμάτων	Ποσοστό Δειγμάτων
36η	2	4.55%
37η	5	11.36%
38η	10	22.73%
39η	17	38.64%
40η	10	22.73%
Σύνολο	44	100.00%

Πίνακας 10: Κατάταξη και ποσοστά πρόωρης και τελειόμηνης κύησης των νεογνών

Βδομάδα Κύησης (2)	Αριθμός δειγμάτων	Ποσοστό Δειγμάτων
Πρόωρη κύηση (36-37 βδ.)	7	15.91%
Τελειόμηνη κύηση (38-40 βδ.)	37	84.09%
Σύνολο	44	100.00%

Πίνακας 11: Κατάταξη και ποσοστά εθνικότητας των μητέρων

Εθνικότητα Μητέρας	Αριθμός δειγμάτων	Ποσοστό Δειγμάτων
Ελληνική	37	84.09%
Ουκρανική	2	4.55%
Φιλιππινέζικη	1	2.27%
Αλβανική	3	6.82%
Ιρακινή	1	2.27%
Σύνολο	44	100.00%

Πίνακας 12: Κατάταξη και ποσοστά καπνίζοντων και μη-καπνίζοντων μητέρων

Κάπνισμα	Αριθμός δειγμάτων	Ποσοστό Δειγμάτων
Όχι	21	47.73%
Διακοπή Στη Κύηση	15	34.09%
Διακοπή Προ Κύησης	5	11.36%
5-7 τσιγάρα/μέρα	3	6.82%
Σύνολο	44	100.00%

Πίνακας 13: Κατάταξη και ποσοστά αριθμών τοκετών των μητέρων

Αριθμός τοκετών	Αριθμός δειγμάτων	Ποσοστό Δειγμάτων
1	22	50.00%
2	17	38.64%
3	4	9.09%
4	1	2.27%
Σύνολο	44	100.00%

Πίνακας 14: Κατάταξη και ποσοστά δείκτη μάζας σώματος (BMI) προ κύησης των νεογνών

BMI προ κύησης	Αριθμός δειγμάτων	Ποσοστό Δειγμάτων
<18,5 (ελλιποβαρής)	3	6.82%
18,5-24,9 (φυσιολογικός)	27	61.36%
25-29,9 (υπέρβαρος)	8	18.18%
30< (παχύσαρκος)	6	13.64%
Σύνολο	44	100.00%

Πίνακας 15: Κατάταξη και ποσοστά δείκτη μάζας σώματος (BMI) μετά κύησης των νεογνών

BMI μετά κύησης	Αριθμός δειγμάτων	Ποσοστό Δειγμάτων
<18,5 (ελλιποβαρής)	0	0.00%
18,5-24,9 (φυσιολογικός)	11	25.00%
25-29,9 (υπέρβαρος)	13	29.55%
30< (παχύσαρκος)	19	43.18%
Σύνολο	43	97.73%

4.2 Αποτίμηση φασμάτων υπερύθρου

Η αποτίμηση των δειγμάτων του μητρικού γάλακτος με τη χρήση της ATR-FTIR φασματοσκοπίας έχει ως αρχικό στόχο την ποιοτική εκτίμηση των μοριακών συστατικών τους. Για να αποφευχθεί η παρεμβολή φασματικών δεδομένων που αφορούν το νερό στα φάσματα (κορυφές μεταξύ των 570-1645 cm^{-1} και στα 3300 cm^{-1}), τα προς ανάλυση δείγματα υπέστησαν λυοφιλίωση. Για την καλύτερη απεικόνιση των φασμάτων καθώς και για τη σύγκριση της μορφής τους με αντίστοιχα φάσματα της βιβλιογραφίας, εφαρμόστηκαν οι επεξεργασίες που αναλύθηκαν στο κεφάλαιο 3.1.3.

Στα φάσματα υπερύθρου των 51 δειγμάτων που αναλύθηκαν αναγνωρίστηκαν 17 διαφορετικές φασματικές κορυφές. Οι 17 κορυφές, με εξαίρεση τις κορυφές μεταξύ 3010-3007 cm^{-1} , 1309-1307 cm^{-1} , 702-700 cm^{-1} και 560-534 cm^{-1} αποτιμήθηκαν και ταυτοποιήθηκαν ως προς τα είδη των δονήσεων, τα είδη των δεσμών και ως προς τα είδη των χαρακτηριστικών ομάδων, σύμφωνα με τη διαθέσιμη βιβλιογραφία. Στη συνέχεια, αντιστοιχίστηκαν τα δείγματα με τις κορυφές που αυτά περιείχαν και καταγράφηκαν οι εντάσεις για κάθε συνδυασμό (βλ. Πίνακας 16 και Πίνακας 17).

Η περιοχή 3350-3250 cm^{-1} , αποδίδεται στη δόνηση τάσης του δεσμού της υδροξυλομάδας (-OH) των καρβοξυλικών οξέων (λιπαρών οξέων), και, ενδεχομένως, των μικρών ποσοστών νερού

που εμπεριέχονται στα δείγματα (Balan, et al. 2020, De Luca, et al. 2019, De Marchi, et al. 2009). Η περιοχή αυτή επικαλύπτει, ενδεχομένως, τη δόνηση τάσης της αμιδομάδας (N-H) των αμινοξέων, των πεπτιδίων και των πρωτεϊνών των δειγμάτων (ζώνη Αμιδίου Α) (Amide A Band) με την περιοχή της «ζώνης Αμιδίου Α» (Amide A band). Δεν δίνει σημαντικά χαρακτηριστικά για τη δομή των αζωτούχων ουσιών και είναι πολύ ευαίσθητη στις μεταβολές της ισχύος των διαμοριακών δεσμών υδρογόνου (Jabs 2005).

Οι περιοχές $3000-2900\text{ cm}^{-1}$ και $2930-2850\text{ cm}^{-1}$, οι οποίες περιέχουν δύο ισχυρές κορυφές, με κέντρα περί τα 2924 και 2852 cm^{-1} , αποδίδονται στην ασύμμετρη και στη συμμετρική δόνηση τάσης των απλών δεσμών των αλειφατικών ανθράκων και των υδρογόνων, των μεθυλενομάδων ($-\text{CH}_2-$), που βρίσκονται στα λιπαρά οξέα των δειγμάτων. Αυτή η περιοχή είναι χαρακτηριστική για τον προσδιορισμό της χοληστερόλης στο μητρικό γάλα (Balan, et al. 2020, De Luca, et al. 2019, De Marchi, et al. 2009, Kamelska, Pietrzak-Fiećko and Bryl 2013).

Η περιοχή $1745-1743\text{ cm}^{-1}$ αποδίδεται στη δόνηση τάσης του καρβονυλίου ($\text{C}=\text{O}$), της εστερομάδας των τριγλυκεριδίων (Sanadgol Nezami, Feizbakhsh and Bagheri Garmarudi 2021, Balan, et al. 2020, De Luca, et al. 2019, Luinge, et al. 1993, De Marchi, et al. 2009).

Η περιοχή $1680-1630\text{ cm}^{-1}$ αποτελεί την «ζώνη Αμιδίου Ι» (Amide I band), και οφείλεται στη δόνηση τάσης του διπλού δεσμού μεταξύ άνθρακα και οξυγόνου ($\text{C}=\text{O}$), της καρβοξυλομάδας των αμινοξέων, των πεπτιδίων και των πρωτεϊνών, των δειγμάτων. (Sanadgol Nezami, Feizbakhsh and Bagheri Garmarudi 2021, Balan, et al. 2020, De Luca, et al. 2019, Kong and Yu 2007, Luinge, et al. 1993, Carbonaro and Nucara 2010, Perkins, et al. 1994). Η περιοχή αυτή είναι ενδεικτική της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών (Kong and Yu 2007, Carbonaro and Nucara 2010, Perkins, et al. 1994).

Η περιοχή των $1570-1510\text{ cm}^{-1}$, αποδίδεται στη δόνηση κάμψης των μεθυλενομάδων ($-\text{CH}_2-$) των αμινοξέων, των πεπτιδίων και των πρωτεϊνών (De Luca, et al. 2019, De Marchi, et al. 2009). Η τελική διαμόρφωση της περιοχής οφείλεται, επιπλέον, στην δόνηση κάμψης της αμινομάδας (N-H) των αμινοξέων, των πεπτιδίων και των πρωτεϊνών (Balan, et al. 2020). Η περιοχή αποτελεί την «ζώνη Αμιδίου ΙΙ» (Amide II band), και περιέχει, εν δυνάμει, πληροφορίες για τη δευτεροταγών δομή των πρωτεϊνών του μητρικού γάλακτος (μορφή α-έλικας, β-πτυχωτής επιφάνειας κτλ.) (Jabs 2005, Wilcox, Blanch and Doig 2016).

Η περιοχή $1470-1450\text{ cm}^{-1}$ αποδίδεται στη δόνηση τάσης του δεσμού άνθρακα και αζώτου ($\text{C}-\text{N}$) των αμινοξέων, των πεπτιδίων και των πρωτεϊνών (Botelho, et al. 2015, Sanadgol Nezami, Feizbakhsh and Bagheri Garmarudi 2021). Οφείλεται, επίσης στις δονήσεις κάμψης του μεθυλίου

και μεθυλενίου (-CH₂ και -CH₂-, αντίστοιχα) (Balan, et al. 2020, Luinge, et al. 1993). (Jabs 2005, Wilcox, Blanch and Doig 2016).

Η περιοχή 1377-1307 cm⁻¹ αποδίδεται, επίσης, στη δόνηση τάσης απλών δεσμών μεταξύ άνθρακα και αζώτου (C-N) των αμινοξέων, των πεπτιδίων και των πρωτεϊνών (Sanadgol Nezami, Feizbakhsh and Bagheri Garmarudi 2021).

Η περιοχή 1238-1232 cm⁻¹ αποτελεί την «ζώνη Αμιδίου III» (Amide III band), και οφείλεται στη δόνηση τάσης του απλού δεσμού μεταξύ άνθρακα και αζώτου (C-N), καθώς και σε δονήσεις κάμψης του αζώτου και του υδρογόνου (N-H), στα αμινοξέα, στα πεπτίδια και στις πρωτεΐνες. Η περιοχή αυτή είναι ενδεικτική της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών (Kong and Yu 2007, Carbonaro and Nucara 2010).

Οι περιοχές 1160-1140 cm⁻¹, 1100-1000 cm⁻¹, 785-765 cm⁻¹, καθώς και η κορυφή στα 893 cm⁻¹, αποδίδονται στις δονήσεις υδατανθράκων (Sanadgol Nezami, Feizbakhsh and Bagheri Garmarudi 2021, De Luca, et al. 2019, Balan, et al. 2020). Αυτές συμπεριλαμβάνουν τις δονήσεις τάσης μεταξύ του ακεταλικού άνθρακα και του οξυγόνου (C-O), τις δονήσεις τάσης του δεσμού μεταξύ του ακεταλικού άνθρακα και του αλειφατικού άνθρακα (C-C), καθώς και τις δονήσεις τάσης του αλειφατικού άνθρακα και του οξυγόνου (C-O) (Sanadgol Nezami, Feizbakhsh and Bagheri Garmarudi 2021). Αυτές οι δονήσεις αναφέρονται ως «σακχαρο-ειδικές δονήσεις συσχετιζόμενες με τους δεσμούς C-O-C» (Botelho, et al. 2015, Sanadgol Nezami, Feizbakhsh and Bagheri Garmarudi 2021).

Η ισχυρή ταινία στα 1030 cm⁻¹, καθώς και η κορυφή στα 893 cm⁻¹ σχετίζονται με την παρουσία λακτόζης στα δείγματα, και αποδίδονται σε δονήσεις κάμψης συστρεφόμενες (wagging) και παλλόμενες (rocking), αντίστοιχα, των μεθυλενομάδων (-CH₂-) της λακτόζης (Balan, et al. 2020, Solís-Oba, et al. 2011, Botelho, et al. 2015, De Marchi, et al. 2009). Ενδεχομένως, η κορυφή στα 1147 cm⁻¹, καθώς και η κορυφή στα 771 cm⁻¹, οι οποίες είναι πιο εμφανείς σε ορισμένα δείγματα, να οφείλονται στις αντίστοιχες δονήσεις των όλιγο- και πολυσακχαριτών των δειγμάτων (Sanadgol Nezami, Feizbakhsh and Bagheri Garmarudi 2021).

Οι κορυφές των 702-700 cm⁻¹ και των 560-535 cm⁻¹ ανήκουν στο «δακτυλικό αποτύπωμα» του φάσματος, και ενδεχομένως να περιέχουν πληροφορίες για τη δομή ορισμένων συστατικών, όπως τις διαμορφώσεις cis- και trans- των ακόρεστων λιπαρών οξέων (Merck 2022).

Στον Πίνακα 16 παρατίθενται τα αποτελέσματα της αποτίμησης των φασμάτων υπερύθρου: κάθε δείγμα διερευνήθηκε από το λογισμικό για την παρουσία ή απουσία των 17 κορυφών αναφοράς, σύμφωνα με την διαδικασία της διαλογής των κορυφών που περιγράφηκε στο κεφάλαιο 3.1.3. Στον Πίνακα 17 αναγράφονται οι εντάσεις που απέδωσε το κάθε δείγμα για κάθε κορυφή, θέτοντας τις τιμές των κορυφών που παρουσίαζαν ως 0. Οι εντάσεις του Πίνακα 17, σε συνδυασμό με τις κορυφές και τα δείγματα, θα αποτελέσουν τα απαραίτητα δεδομένα για την στατιστική επεξεργασία που ακολούθησε, όπως αυτή περιγράφεται αργότερα στο κεφάλαιο 4.3.

Πίνακας 16: Αντιστοιχεία κορυφών (cm⁻¹) και δειγμάτων

Κορυφή / Δείγμα	3350-3250	3010-3007	3000-2900	2930-2850	1745-1743	1680-1630	1570-1510	1470-1450	1377-1375	1309-1307	1238-1232	1160-1140	1100-1000	893	785-765	702-700	560-534
3	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
5	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
6	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
7	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	-	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓
7a	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
7b	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
8a	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	-	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓
8b	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
10a	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	-	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓
10b	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
11	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
11a	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	-	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓
11b	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	-	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓
12	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	-	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓
13a	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	-	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓
13b	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	-	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓
15	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
16	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	-	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓
18	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
19	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	-	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓
20	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
27	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	-	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓
29	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	-	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓
30	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	-	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓
31	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	-	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓
33	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	-	✓	-	✓	✓	✓	-	✓
34	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
36	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
37	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
38	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓
39	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
40	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
41	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
42	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
43	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
44	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓
45	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓
46	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	-	✓	-	✓	✓	✓	-	✓
47	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	-	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓
48	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	-	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓
49	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	-	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓
51	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	-	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓
52	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	-	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓
53	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	-	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓
54	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	-	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓
55	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
56	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
57	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	✓	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓
58	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	-	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓
59	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	-	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓
60	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	-	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓

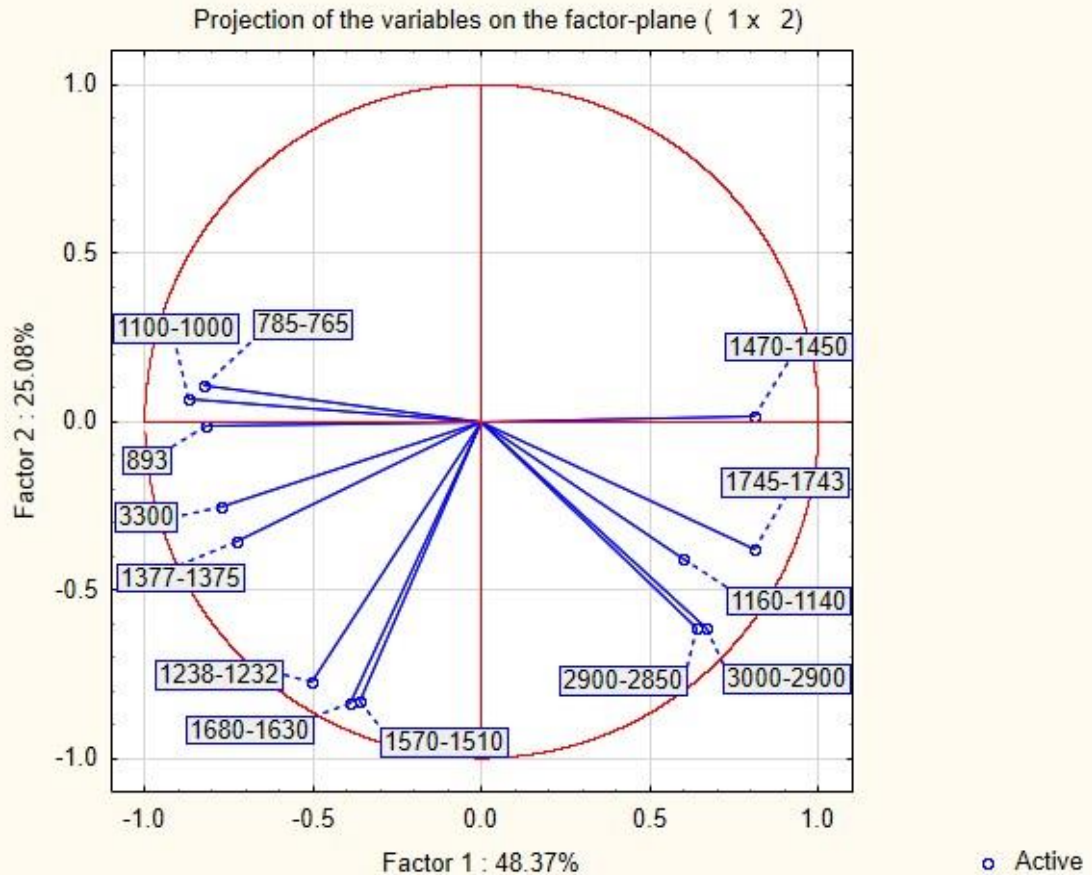
Πίνακας 17: Εντάσεις κορυφών ανά δείγμα

Κορυφή/ Δείγμα	3300	3007	2922	2854	1745	1647	1543	1456	1375	1309	1232	1143	1022	893	771	700	534
3	0.763	0.242	1.000	0.718	0.404	0.352	0.256	0.328	0.357	-	0.307	0.447	0.838	0.295	0.258	0.318	0.388
5	0.290	0.199	0.502	0.370	0.364	0.271	0.207	0.286	0.322	-	0.304	0.518	1.017	0.343	0.356	0.487	0.733
6	0.877	-	0.867	0.619	0.278	0.418	0.275	-	0.352	-	0.266	0.435	1.000	0.251	0.241	0.296	0.363
7	1.000	-	0.658	0.473	0.159	0.432	0.291	-	0.330	-	0.235	-	0.968	0.238	0.250	0.307	0.379
7a	0.844	0.229	0.836	0.593	0.305	0.378	0.241	0.271	0.345	0.269	0.256	0.436	1.000	0.242	0.231	0.281	0.338
7b	0.838	0.247	1.000	0.714	0.306	0.370	0.239	0.282	0.351	0.272	0.268	0.472	0.969	0.243	0.228	0.280	0.323
8a	1.000	0.304	0.863	0.634	0.287	0.561	0.374	-	0.422	-	0.337	-	0.990	0.302	0.278	0.328	0.378
8b	0.768	0.235	0.942	0.671	0.373	0.498	0.331	0.311	0.379	0.299	0.291	0.468	1.000	0.260	0.238	0.290	0.338
10a	0.925	-	0.579	0.579	0.242	0.454	0.315	-	0.388	-	0.300	-	1.000	0.280	0.255	0.301	0.354
10b	0.976	0.275	0.987	0.712	0.324	0.455	0.309	-	0.395	-	0.314	0.496	1.000	0.282	0.254	0.308	0.365
11	0.879	0.246	1.000	0.713	0.365	0.426	0.274	-	0.373	-	0.301	0.477	0.996	0.267	0.242	0.301	0.355
11a	0.995	0.290	0.967	0.707	0.314	0.490	0.345	-	0.429	-	0.331	-	1.013	0.309	0.277	0.325	0.373
11b	0.879	-	0.807	0.578	0.257	0.404	0.272	-	0.352	-	0.269	-	1.000	0.250	0.229	0.280	0.353
12	0.908	-	0.738	0.535	0.220	0.374	0.252	-	0.351	-	0.261	-	1.000	0.264	0.246	0.289	0.350
13a	0.904	-	0.750	0.538	0.223	0.371	0.244	-	0.329	-	0.249	-	1.000	0.244	0.228	0.280	0.341
13b	0.948	0.246	0.801	0.584	0.236	0.391	0.297	-	0.371	-	0.286	-	1.000	0.283	0.251	0.294	0.344
15	0.900	0.241	0.941	0.678	0.345	0.422	0.274	-	0.375	-	0.292	0.473	1.000	0.262	0.237	0.287	0.341
16	0.925	0.267	0.804	0.592	0.245	0.448	0.316	-	0.390	-	0.299	-	1.000	0.281	0.249	0.295	0.345
18	0.866	0.283	1.000	0.708	0.369	0.664	0.465	-	0.416	0.347	0.343	0.474	0.894	0.244	0.235	0.293	0.341
19	0.806	0.233	0.810	0.587	0.276	0.481	0.347	-	0.392	-	0.311	-	1.000	0.284	0.267	0.315	0.374
20	0.854	0.218	0.926	0.660	0.324	0.365	0.254	-	0.346	-	0.269	0.436	1.000	0.247	0.227	0.280	0.338
27	0.930	-	0.852	0.622	0.268	0.539	0.366	-	0.400	-	0.313	-	1.000	0.276	0.255	0.305	0.364
29	0.988	0.337	1.000	0.726	0.400	0.691	0.484	-	0.467	-	0.384	0.497	0.929	0.303	0.221	0.282	0.390
30	1.000	-	0.866	0.633	0.312	0.497	0.340	-	0.409	-	0.321	-	0.925	0.302	0.274	0.317	0.380
31	0.916	0.251	0.873	0.624	0.299	0.422	0.290	-	0.371	-	0.283	-	1.000	0.264	0.248	0.301	0.365
33	1.000	0.343	0.949	0.672	0.337	0.791	0.570	-	0.474	0.387	0.380	0.480	0.904	0.264	0.257	-	0.381
34	0.568	0.193	1.000	0.691	0.420	0.323	0.227	0.262	0.266	-	0.227	0.385	0.652	0.154	0.155	0.216	0.239
36	0.849	0.247	1.000	0.709	0.389	0.418	0.282	0.312	0.372	-	0.292	0.470	0.977	0.257	0.242	0.303	0.374
37	0.929	0.240	0.917	0.654	0.320	0.426	0.281	-	0.356	-	0.278	0.441	1.000	0.256	0.243	0.302	0.368
38	0.712	0.276	1.000	0.704	0.427	0.621	0.473	0.354	0.088	0.303	0.318	0.386	0.644	0.202	0.193	-	0.290
39	0.567	0.201	1.000	0.711	0.448	0.265	0.209	0.238	0.269	0.198	0.212	0.329	0.538	0.183	0.162	0.202	0.233
40	0.650	0.239	1.000	0.723	0.421	0.342	0.245	0.290	0.320	-	0.265	0.410	0.749	0.230	0.211	0.254	0.295
41	0.551	0.200	1.000	0.726	0.428	0.290	0.212	0.266	0.282	-	0.241	0.376	0.678	0.211	0.189	0.233	0.260
42	0.482	0.176	1.000	0.695	0.409	0.259	0.178	0.237	0.238	-	0.211	0.354	0.609	0.155	0.150	0.205	0.234
43	0.527	0.202	1.000	0.728	0.444	0.254	0.189	0.257	0.273	-	0.233	0.367	0.645	0.224	0.194	0.232	0.257
44	0.630	0.233	1.002	0.704	0.413	0.548	0.376	0.323	0.333	-	0.287	0.405	0.677	0.192	0.190	-	0.265
45	0.890	-	0.972	0.690	0.347	0.454	0.311	-	0.384	-	0.291	0.452	1.000	0.249	0.236	-	0.351
46	0.962	0.265	0.879	0.641	0.241	0.383	0.257	-	0.376	-	0.293	-	1.000	0.296	0.268	0.316	0.367
47	0.915	-	0.743	0.538	0.227	0.395	0.276	-	0.360	-	0.268	-	1.000	0.266	0.239	0.283	0.348
48	1.011	-	0.785	0.569	0.244	0.379	0.264	-	0.358	-	0.269	-	0.920	0.273	0.256	0.302	0.362
49	1.010	-	0.739	0.543	0.214	0.460	0.331	-	0.364	-	0.269	-	0.846	0.266	0.263	0.309	0.360
51	1.011	-	0.865	0.622	0.252	0.405	0.268	-	0.384	-	0.281	-	0.990	0.285	0.268	0.321	0.384
52	1.000	-	0.795	0.571	0.261	0.549	0.390	-	0.419	-	0.312	-	0.927	0.286	0.270	0.318	0.376
53	1.000	0.264	0.847	0.602	0.259	0.436	0.312	-	0.375	-	0.277	-	0.984	0.267	0.257	0.313	0.378
54	1.000	-	0.896	0.631	0.210	0.579	0.430	-	0.389	0.309	0.287	-	0.985	0.231	0.237	0.304	0.365
55	0.752	0.237	1.000	0.687	0.420	0.561	0.407	0.332	0.380	0.293	0.303	0.444	0.825	0.208	0.201	0.259	0.303
56	0.915	0.274	0.965	0.690	0.396	0.493	0.373	-	0.428	0.341	0.329	0.476	1.013	0.302	0.265	0.319	0.386
57	1.011	0.305	0.896	0.655	0.324	0.471	0.364	-	0.431	0.337	0.312	-	1.001	0.313	0.275	0.321	0.391
58	0.985	-	0.763	0.550	0.253	0.450	0.325	-	0.387	-	0.277	-	1.006	0.276	0.255	0.307	0.375
59	1.003	-	0.776	0.554	0.241	0.470	0.341	-	0.377	-	0.268	-	0.962	0.254	0.247	0.302	0.364
60	0.969	-	0.760	0.542	0.230	0.405	0.297	-	0.361	-	0.258	-	1.016	0.255	0.239	0.292	0.360

4.3 Πολυμεταβλητή Στατιστική ανάλυση

Τα δεδομένα που συλλέχθηκαν από τα δείγματα του μητρικού πρωτογάλακτος αναλύθηκαν περαιτέρω με τη χρήση Ανάλυσης Κύριων Συνιστωσών (PCA). Η PCA χρησιμοποιείται ευραίως για την ολιστική ανάλυση υποστρωμάτων τροφίμων και, πρόσφατα, άρχισε να χρησιμοποιείται σε μητρικό γάλα, σε συνδυασμό με ενόργανες τεχνικές ανάλυσης όπως η ATR-FTIR φασματοσκοπία (Balan, et al. 2020, Βεργιζή, et al. 2021). Αυτή η στατιστική ανάλυση επέτρεψε τη μείωση των πολυάριθμων δεδομένων, για κάθε δείγμα και για κάθε περιοχή κυματαριθμού-κορυφής, που λήφθηκαν από την ανάλυση της ATR-FTIR φασματοσκοπίας. Οι τρεις παράγοντες (δείγμα-κορυφή-ένταση, βλ. Πίνακας 17) συγχωνεύτηκαν σε μία κύρια συνιστώσα (Principal Component, PC), χωρίς κάποια απώλεια στις φασματικές πληροφορίες τους. Κατ' αυτόν τον τρόπο, θεωρήθηκε ότι τα

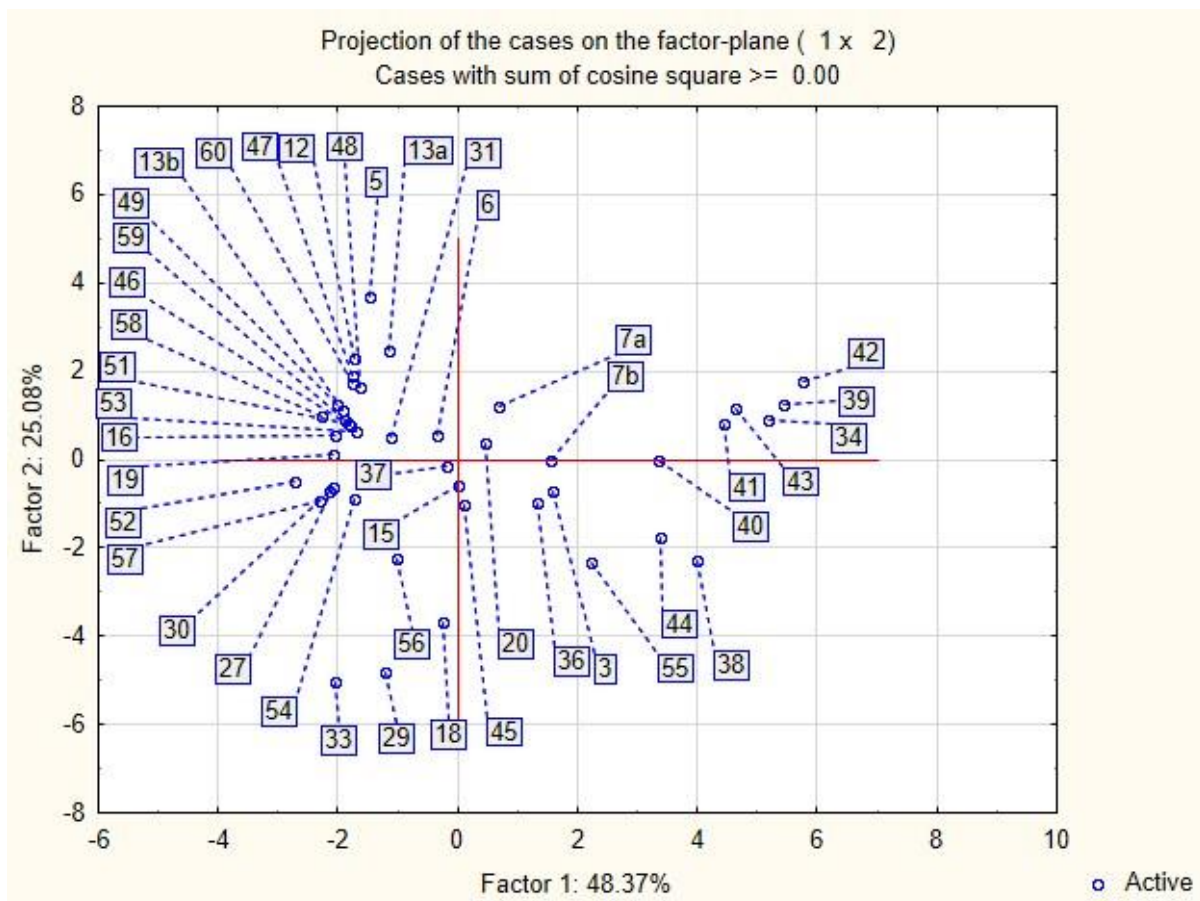
δείγματα με όμοιες τιμές PC περιείχαν σχετικές οπτικές ιδιότητες, κατά την υπέρυθη φασματοσκοπία. Εξαιρέθηκαν από τη στατιστική επεξεργασία οι κορυφές $3010-3007\text{ cm}^{-1}$, $1309-1307\text{ cm}^{-1}$, $702-700\text{ cm}^{-1}$ και $560-534\text{ cm}^{-1}$, καθώς δεν βρέθηκαν οπτικές πληροφορίες που να αντιστοιχούν σε αυτούς τους κυματάρθμους (βλ. κεφάλαιο **Error! Reference source not found.**). Για την καλύτερη απεικόνιση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων επιλέχθηκαν οι παράγοντες 1 και 2, λόγω των μεγαλύτερων ποσοστών φασματικής διακύμανσης (48,37 και 25,08%, αντίστοιχα, βλ.



Διάγραμμα 1: Ανάλυση PCA – απεικόνιση κορυφών (μεταβλητών, variables) στο επίπεδο των παραγόντων (factor-plane)

Διάγραμμα 1).

Κατά την απεικόνιση των δειγμάτων στο επίπεδο παραγόντων (factor-plane) αναλύθηκαν όλοι οι παράγοντες του διαθέσιμου δειγματοχώρου (metadata) (βλ. Παράρτημα), αλλά προβάλλονται μόνο οι σημαντικότεροι, σύμφωνα με τη διαθέσιμη βιβλιογραφία (ηλικία της μητέρας, ηλικία κύησης, εθνικότητα, κάπνισμα, αριθμός των τοκετών και BMI της μητέρας). Για την καλύτερη εύρεση των τάσεων των δειγμάτων, ως προς τη σχετικότητα των οπτικών ιδιοτήτων τους, εξαιρέθηκαν οι τιμές της έντασης των δειγμάτων που θεωρήθηκαν έκτροπες (outliers).



Διάγραμμα 2: Ανάλυση PCA – απεικόνιση δειγμάτων (cases) στο επίπεδο των παραγόντων (factor-plane)

4.3.1 Ερμηνεία αποτελεσμάτων

Παρατηρήθηκε στο Διάγραμμα 2 ότι η πλειονότητα των δειγμάτων βρισκόταν στο 2^ο τεταρτημόριο. Η απεικόνιση των κορυφών (Διάγραμμα 1) έδειξε ότι η ομοιότητα των δειγμάτων του 2^{ου} τεταρτημορίου οφείλεται σε ομοιότητες φασματικών χαρακτηριστικών ως προς τους υδατάνθρακες και, συγκεκριμένα, ως προς τη λακτόζη (κορυφές 785-765, 893 και 1100-1000 cm^{-1}). Τα περισσότερα δείγματα είχαν την υψηλότερη τιμή της έντασής τους στη κορυφή 1100-1000 cm^{-1} , γεγονός που προδιαγράφει ότι οι υδατάνθρακες, και συγκεκριμένα η λακτόζη, είναι το πιο άφθονο μακροθρεπτικό συστατικό στο μητρικό πρωτόγαλα.

Οι διακυμάνσεις των κορυφών 1745-1743, 2900-2850 και 3000-2900 cm^{-1} έπαιξαν καθοριστικό ρόλο στην ομαδοποίηση των δειγμάτων του 4^{ου} τεταρτημορίου. Όπως αναλύθηκε στο κεφάλαιο **Error! Reference source not found.**, οι κορυφές αυτές οφείλονται στα λιπαρά οξέα των δειγμάτων. Δεν είναι δυνατή η κατηγοριοποίηση των διαφορετικών ειδών των λιπαρών οξέων με αποκλειστική χρήση ATR-FTIR φασματοσκοπίας, επομένως οι μόνες πληροφορίες που οι κορυφές

αυτές μπορούν να μας δώσουν είναι η αναλογία των λιπαρών οξέων σε σύγκριση με τα υπόλοιπα μακροθρεπτικά συστατικά.

Οι διακυμάνσεις της κορυφής των $1470-1450\text{ cm}^{-1}$, που παρουσίασαν τα δείγματα, ήταν ο κύριος παράγοντας του σημαντικού διαχωρισμού των δειγμάτων του 1^{ου} τεταρτημορίου (Διάγραμμα 2). Αυτό υποδεικνύει ότι μικρές μεταβολές στο ηλεκτρομαγνητικό πεδίο της ακτινοβολίας IR που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση, καθώς και όλοι οι λοιποί παράμετροι, που συνδέονται με τα δείγματα και επηρεάζουν την ισχύ των δεσμών άνθρακα-αζώτου (C-N), έχουν σημαντική επίδραση στη διαμόρφωση του συνολικού φάσματος και της παρουσίας ή μη της κορυφής αυτής.

Οι διακυμάνσεις των κορυφών $1238-1232, 1377-1375, 1570-1510, 1680-1630$ και 3300 cm^{-1} ήταν ο κύριος παράγοντας της ομαδοποίησης των δειγμάτων του 3^{ου} τεταρτημορίου. Συγκεκριμένα, όσον αφορά τις αναλογίες των εντάσεων των κορυφών $1570-1510$ και $1680-1630\text{ cm}^{-1}$, είναι δυνατόν να προσδιοριστεί η επικρατής δευτεροταγής δομή των πρωτεϊνών κάθε δείγματος. Μεγαλύτερη τιμή του λόγου $1680-1630/1570-1510$ υποδηλώνει ότι μεγαλύτερο ποσοστό των πρωτεϊνών έχει μορφή α - και 3_{10} -έλικας, ενώ μεγαλύτερη τιμή του λόγου $1570-1510/1680-1630$ υποδηλώνει ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των πρωτεϊνών έχει μορφή β -πτυχωτής επιφάνειας και β -στροφής (Jabs 2005, Wilcox, Blanch and Doig 2016, Surewicz, Mantsch and Charman 1993, Kong and Yu 2007). Μια περισσότερο εξιδεικευμένη μελέτη των Ζωνών Αμιδίου (Amide Bands), θα μπορούσε να δώσει με μεγαλύτερη ακρίβεια την τάση των δευτεροταγών δομών των πρωτεϊνών στο μητρικό γάλα με τη χρήση φασματοσκοπίας ATR-FTIR.

4.3.2 Εξέταση παραγόντων δειγματοχώρου

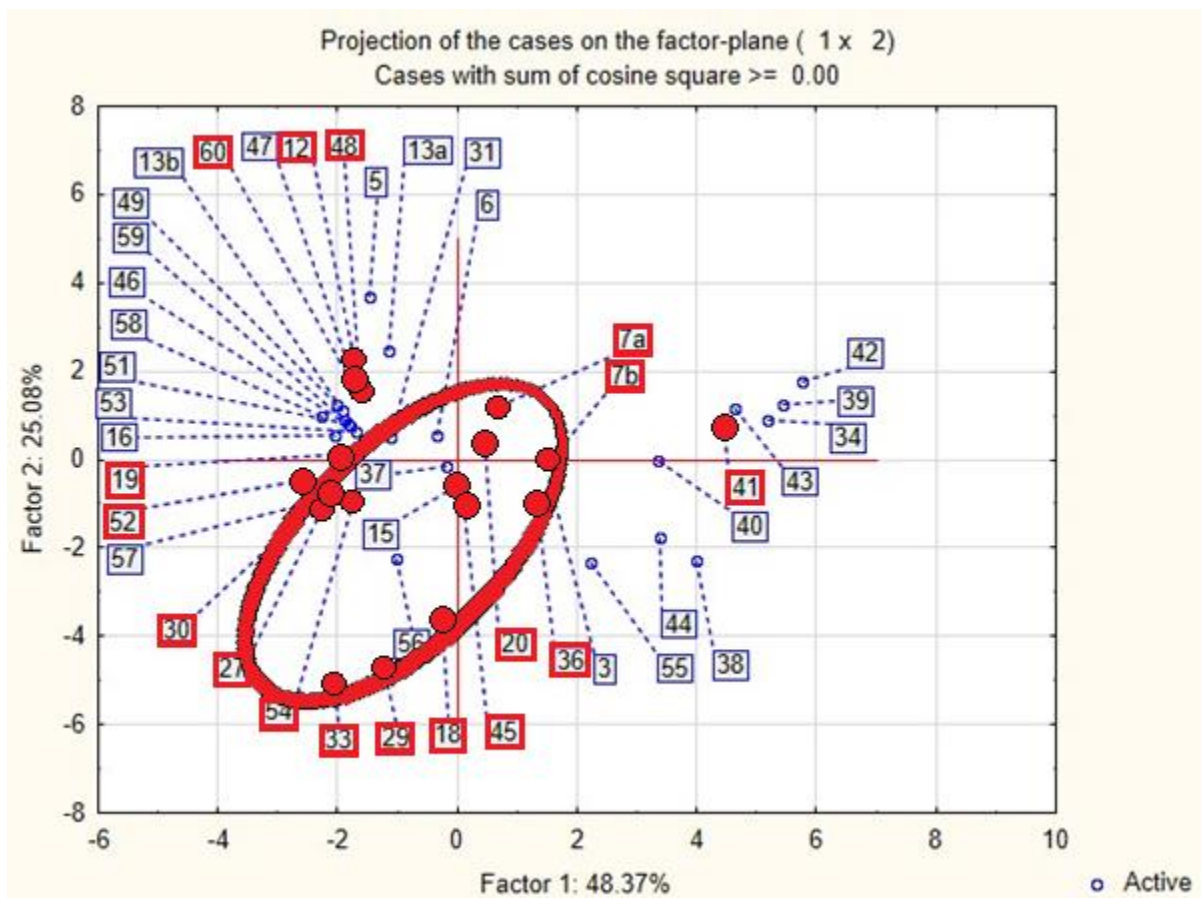
Παρακάτω θα αναλυθούν οι κυριότεροι παράγοντες, που έχουν βρεθεί ότι επηρεάζουν σε σημαντικό βαθμό την σύνθεση του μητρικού γάλακτος, σύμφωνα με τη διαθέσιμη βιβλιογραφία, και οι τάσεις των δειγμάτων ως προς τους παράγοντες αυτούς. Οι παράγοντες που επιλέχθηκαν ήταν η ηλικία της μητέρας, η ηλικία κύησης, η εθνικότητα, το κάπνισμα, ο αριθμός των τόκων, και ο BMI της μητέρας, πριν και μετά την κύηση (βλ. Πίνακες 8-15).

4.3.2.1 Παράγοντας ηλικίας κύησης

Το γάλα από πρόωρες κυήσεις περιέχει αυξημένα ποσοστά πρωτεϊνών και λίπους. Λόγω του συνδυασμού όλων των παραγόντων, η κατηγοριοποίηση των δειγμάτων που προήλθαν από πρόωρες κυήσεις χωρίστηκε σε τρεις υποκατηγορίες (Διάγραμμα 3):

- I. στην υποκατηγορία όπου τα δείγματα ομαδοποιήθηκαν κυρίως στο 2^ο τεταρτημόριο, όπου τα δείγματα διακρίθηκαν με βάση τους υδατάνθρακες,
- II. στην υποκατηγορία όπου τα δείγματα ομαδοποιήθηκαν κυρίως στο 3^ο τεταρτημόριο, όπου τα δείγματα διακρίθηκαν με βάση τις πρωτεΐνες και
- III. στην υποκατηγορία όπου τα δείγματα διακρίθηκαν κατά κύριο λόγο στο κέντρο του διαγράμματος, όπου τα τρία μακροθρεπτικά συστατικά (υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, λίπος) συνέβαλαν ισότιμα στην ομαδοποίηση των δειγμάτων.

Οι τάσεις της πρόωρης κύησης εμφάνισαν καλό διαχωρισμό ως προς αυτόν τον παράγοντα, λαμβάνοντας σαν δεδομένο ότι τα δείγματα των τελειόμηνων κυήσεων διαθέτουν χαμηλότερα ποσοστά πρωτεϊνών και λιπαρών οξέων, γεγονός το οποίο τα ομαδοποιεί, κατά κύριο λόγο, πιο ψηλά στο διάγραμμα και προς την κατεύθυνση του 2^{ου} τεταρτημορίου, σε αντίθεση με τα δείγματα των πρόωρων κυήσεων που ομαδοποιούνται, κατά κύριο λόγο, στο 3^ο τεταρτημόριο και με κατεύθυνση προς το κέντρο του διαγράμματος. Η ηλικία κύησης θεωρήθηκε σημαντικός παράγοντας για τη πρόβλεψη της σύνθεσης του μητρικού πρωτογάλακτος και της αναλογίας των μακροθρεπτικών συστατικών του, γεγονός που επιβεβαιώνεται από την βιβλιογραφία (Bachour, et al. 2012). Στο παρελθόν έχει θεωρηθεί ότι η αυξημένη έκφραση του λίπους στο μητρικό γάλα των πρόωρων κυήσεων συνδέεται με την απόκριση του οργανισμού της μητέρας σε παράγοντες

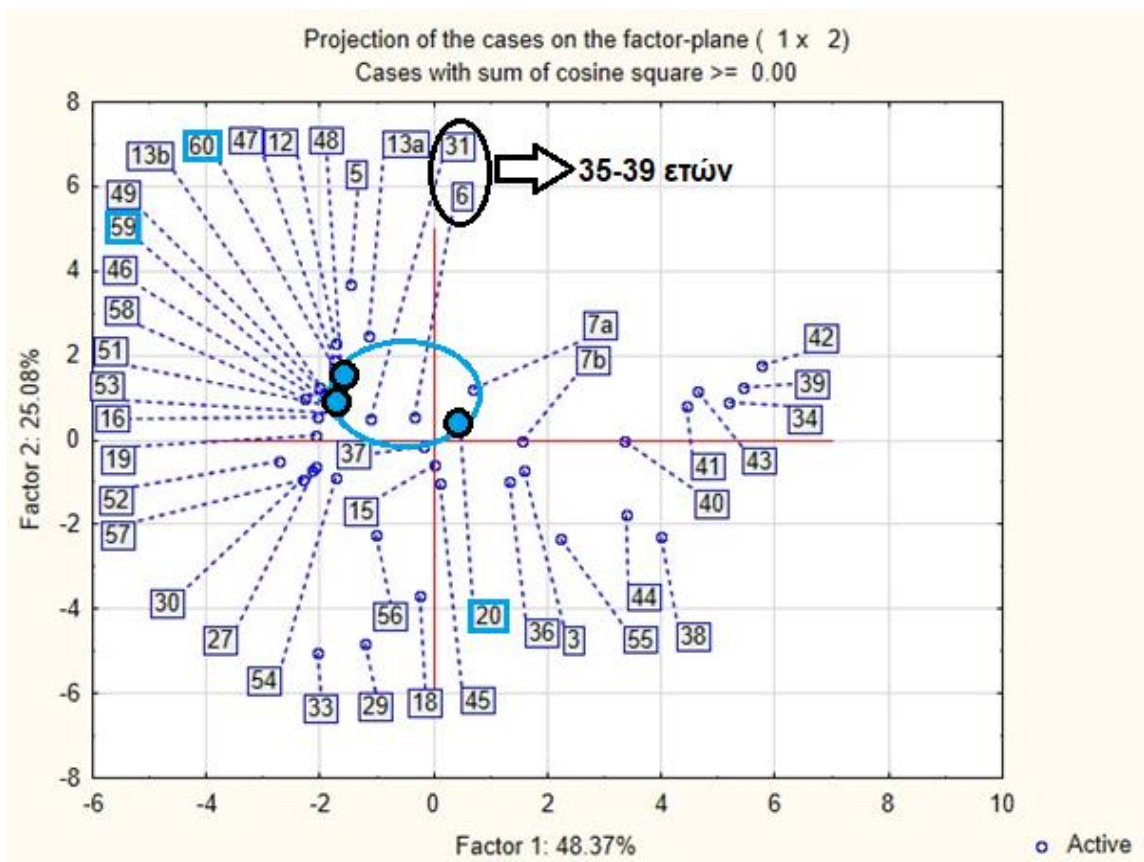


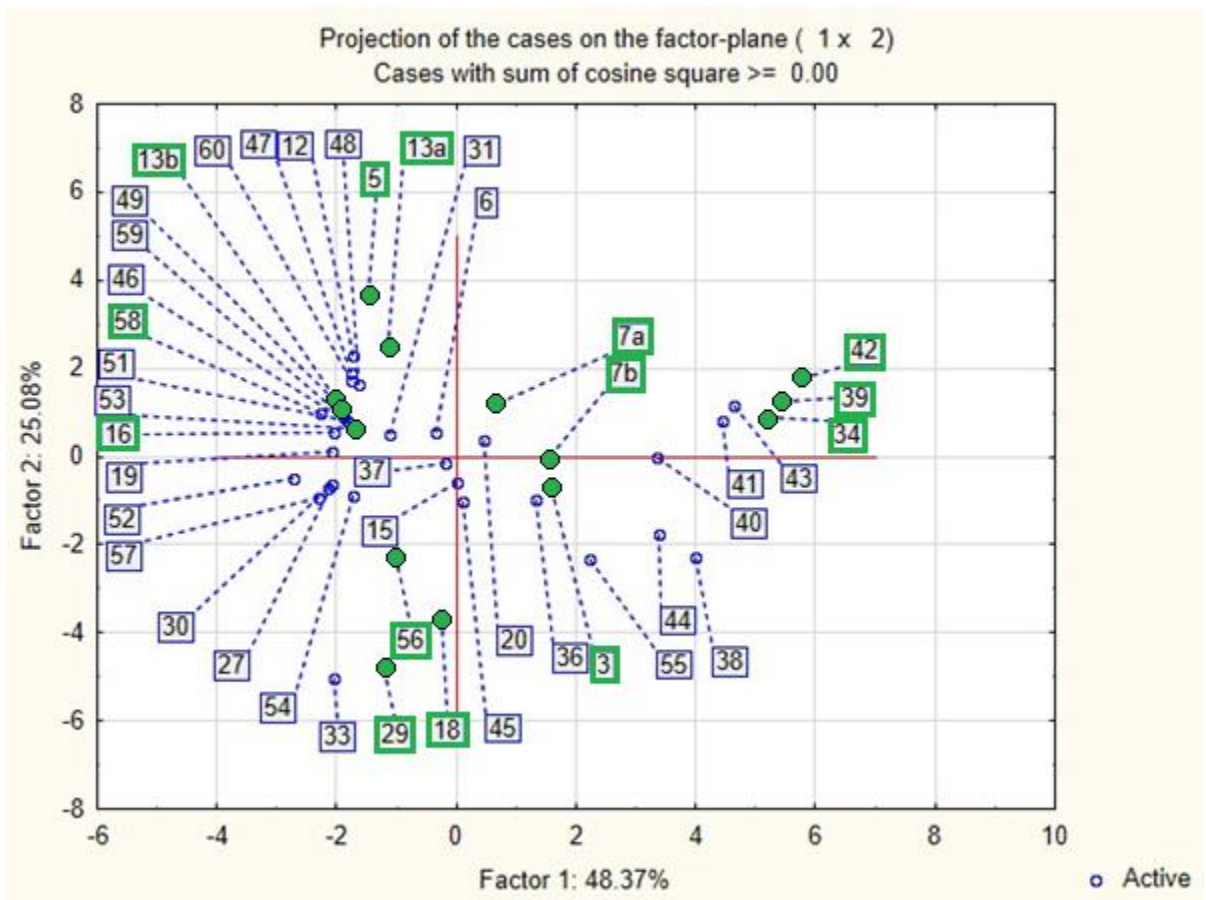
Διάγραμμα 3: Ανάλυση PCA – Κόκκινοι κύκλοι: Τάση ομαδοποίησης δειγμάτων πρόωρης κύησης (preterm birth)

κινδύνου, γεγονός που προκαλεί αυξημένη παραγωγή απαραίτητων λιπαρών οξέων για τη κάλυψη συγκεκριμένων αναγκών των πρόωρων νεογνών (Sinanoglou, et al. 2017).

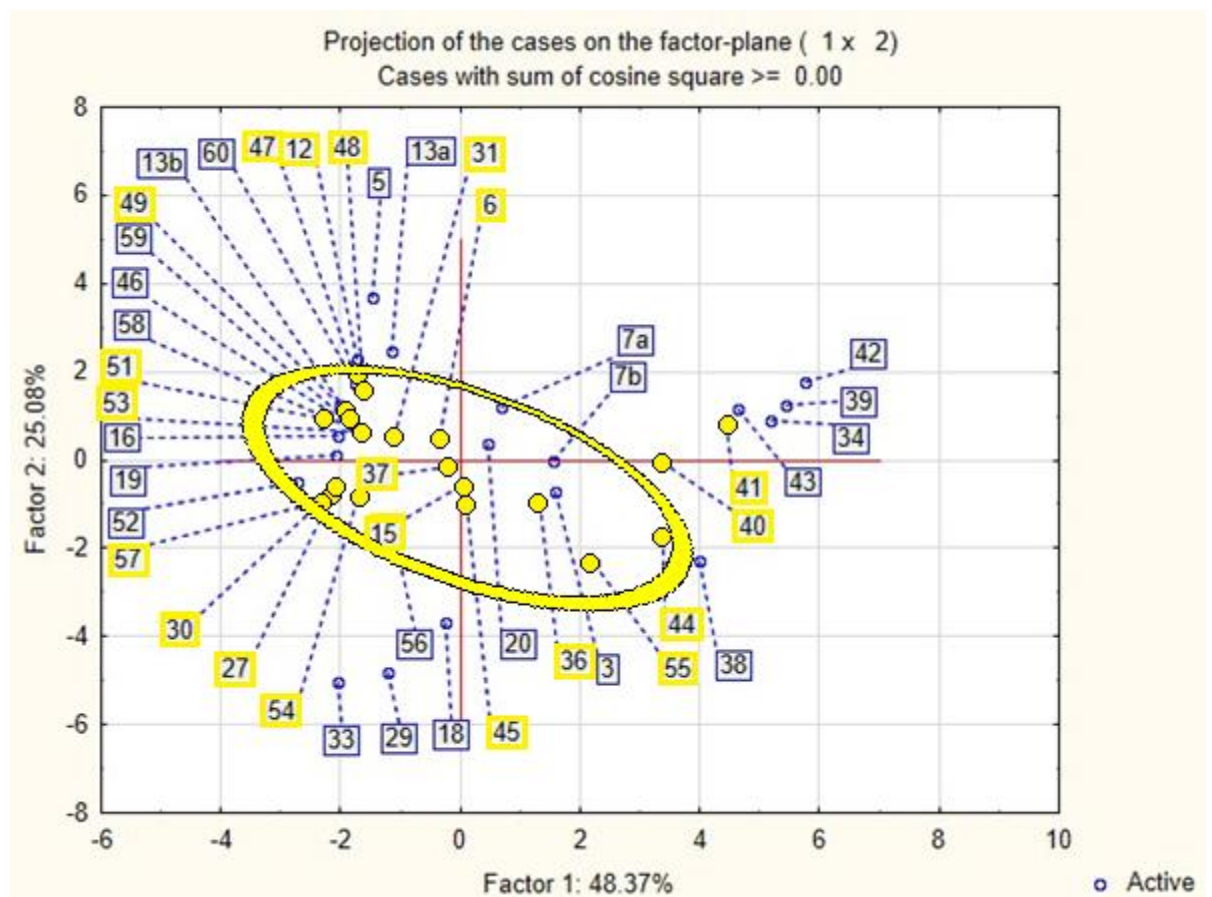
4.3.2.2 Παράγοντας ηλικίας της μητέρας

Αναλύθηκαν τέσσερις ηλικιακές ομάδες των μητέρων για την διάκριση των δειγμάτων: 25-29 ετών, 30-34 ετών, 35-39 και 45 και άνω ετών (Διάγραμμα 4-Διάγραμμα 7). Από τις τέσσερις ομάδες, μόνο αυτές των 25-29 ετών και των 35-39 ετών εμφάνισαν σαφείς διαχωρισμούς. Η ομάδα των 25-29 ετών ομαδοποιήθηκε κοντά στο κέντρο του διαγράμματος και προς την κατεύθυνση του 2^{ου} τεταρτημορίου, το οποίο υποδεικνύει συσχέτιση των δειγμάτων ως προς το ποσοστό των υδατανθράκων, αλλά ο αριθμός των δειγμάτων της ηλικιακής ομάδας ήταν πολύ μικρός για να εξασφαλιστεί η απαραίτητη στατιστική δύναμη της ομάδας αυτής. Η ομάδα των 35-39 ετών παρουσίασε ίδια χαρακτηριστικά ως προς τον παράγοντα της ηλικίας, με ομαδοποίηση στο κέντρο του διαγράμματος και με κατεύθυνση προς το 2^ο τεταρτημόριο. Έτσι η ομάδα διαχωρίζεται από τα δείγματα που βρίσκονται στα υπόλοιπα τεταρτημόρια, υποδεικνύοντας συσχέτιση της ηλικίας με την αναλογία των υδατανθράκων και των υπόλοιπων μακροθρεπτικών συστατικών. Ο ασαφής διαχωρισμός των υπόλοιπων ηλικιακών ομάδων έκανε τον παράγοντα της ηλικίας της μητέρας αναξιόπιστο για την πρόβλεψη της σύνθεσης του μητρικού πρωτογάλακτος και της αναλογίας των μακροθρεπτικών συστατικών του, γεγονός που συμφώνησε με τα ευρήματα της βιβλιογραφίας (Bachour, et al. 2012). Η αυξημένη αναλογία των λιπαρών οξέων στις μεγαλύτερες ηλικίες (>35 έτη), οφείλεται, ενδεχομένως στις σημαντικές διατροφικές διαφορές που διαθέτουν οι μητέρες σε σύγκριση με αυτές μικρότερων ηλικιών (<35 έτη) (Sinanoglou, et al. 2017).

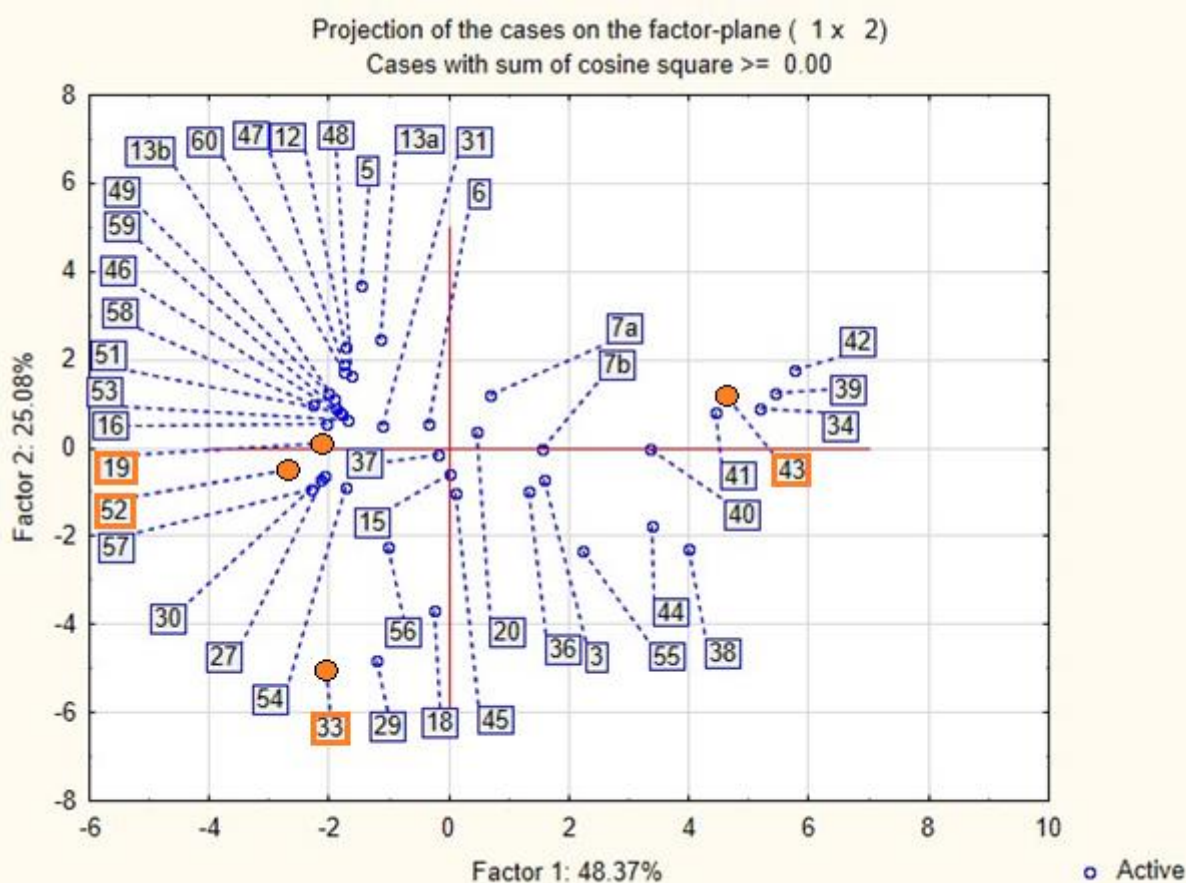




Διάγραμμα 5: Ανάλυση PCA – **Πράσινοι κύκλοι**: Διασπορά δειγμάτων ηλικίας 30-34 ετών



Διάγραμμα 6: Ανάλυση PCA – **Κίτρινοι κύκλοι**: Τάση δειγμάτων ηλικίας 35-39 ετών

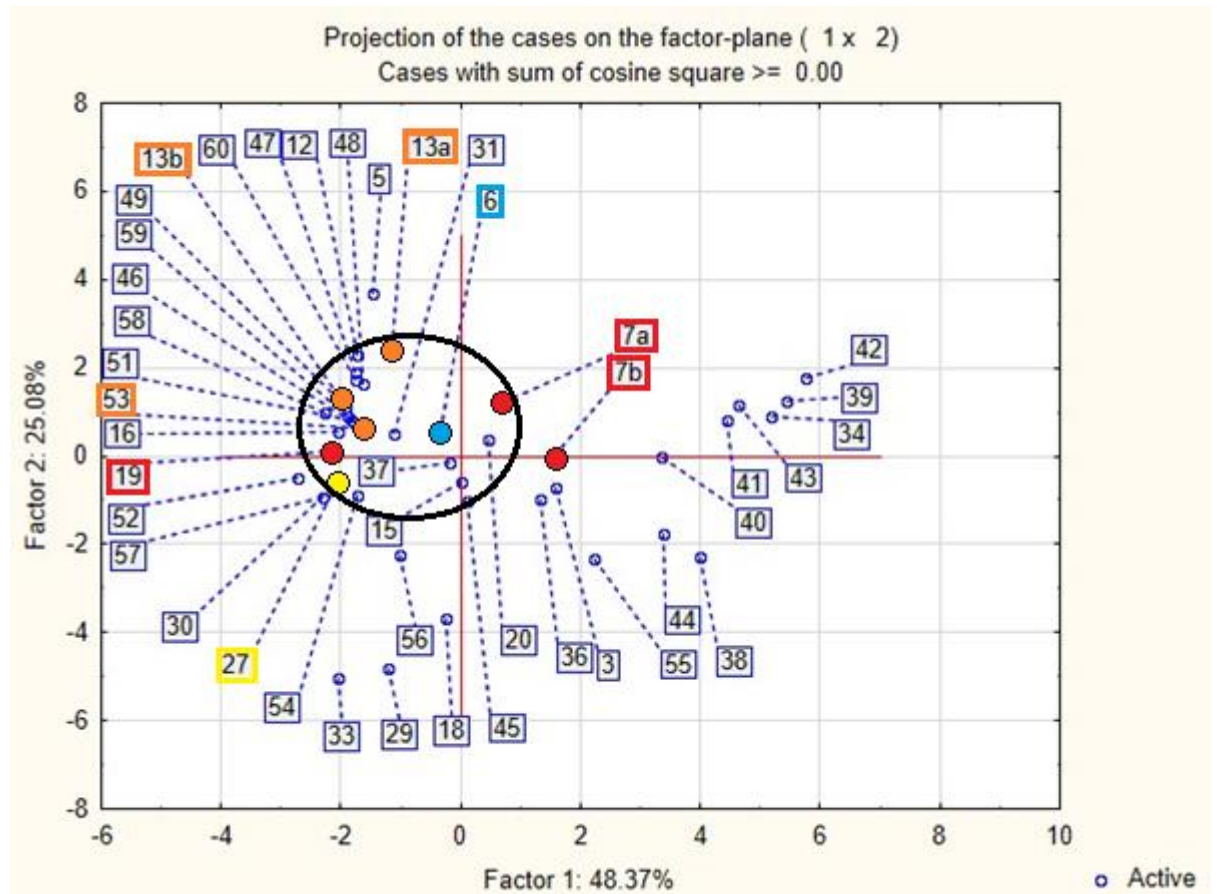


Διάγραμμα 7: Ανάλυση PCA – Πορτοκαλί κύκλοι: Διασπορά δειγμάτων ηλικίας 40-45 ετών

4.3.2.3 Παράγοντας εθνικότητας

Η εθνικότητα είναι ένας σύνθετος παράγοντας, περιλαμβάνοντας μια σειρά άλλων παραγόντων, από γενετικούς μέχρι και διατροφικούς, και, επομένως επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την έκφραση της σύστασης του μητρικού γάλακτος. Ο διαχωρισμός των εθνικοτήτων έγινε μεταξύ Ελληνικής και μη-Ελληνικής εθνικότητας (Διάγραμμα 8). Η Ελληνική εθνικότητα δεν έδειξε σαφή διαχωρισμό κατά την ανάλυση PCA, καθώς τα δείγματα στα οποία η μητέρα ήταν Ελληνικής εθνικότητας υπήρχαν σε ίση αναλογία στο 1^ο, 2^ο, 3^ο και 4^ο τεταρτημόριο. Αντιθέτως οι μη-Ελληνικές εθνικότητες ομαδοποιήθηκαν στο κέντρο του διαγράμματος με κατεύθυνση προς το 2^ο τεταρτημόριο. Αυτό υποδεικνύει ότι η κύρια αιτία ομαδοποίησης των δειγμάτων αυτών ήταν η αναλογία των υδατανθράκων, σε σύγκριση με τα υπόλοιπα μακροθρεπτικά συστατικά. Η εθνικότητα αποτέλεσε καλό παράγοντα στη πρόβλεψη της διάκρισης των δειγμάτων με μητέρες μη-Ελληνικής εθνικότητας, πράγμα που δεν ήταν σαφές στη βιβλιογραφία (Bachour, et al. 2012). Οι σαφείς διαφορές στα μακροθρεπτικά συστατικά μεταξύ των Ελληνικών και μη-Ελληνικών εθνικοτήτων οφείλονται, ενδεχομένως, στις διαφορετικές διατροφικές συνήθειες τους. Λ.χ. διατροφικές

συνήθειες με μεγαλύτερα ποσοστά υδατανθράκων, έχει ως συνέπεια την επιταχυνόμενη παραγωγή λιπαρών οξέων στον μαστικό αδένα της γυναίκας (Sinanoglou, et al. 2017).

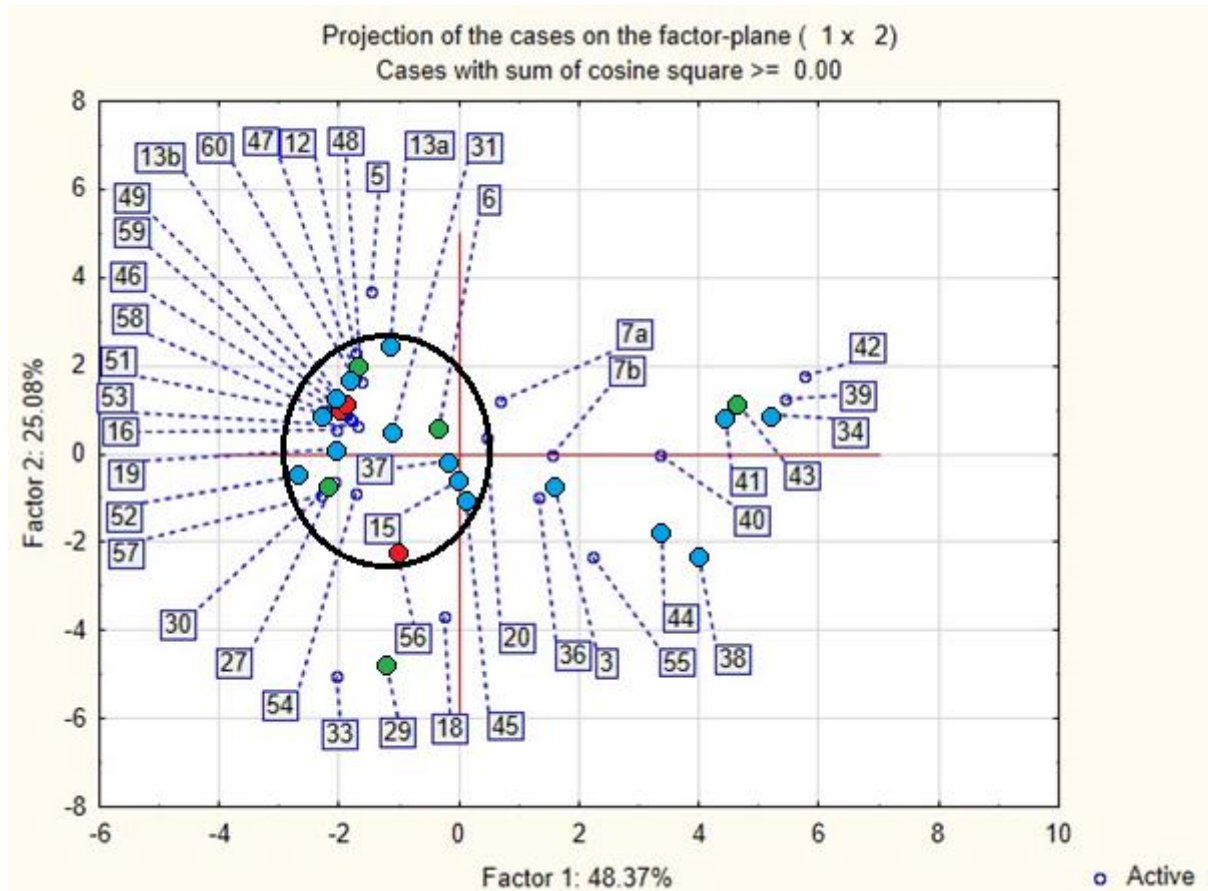


Διάγραμμα 8: Ανάλυση PCA – Τάσεις μητέρων με μη-Ελληνική εθνικότητα. Μπλε κύκλοι: Ιρακινή. Κόκκινοι κύκλοι: Αλβανική. Πορτοκαλί κύκλοι: Ουκρανική. Κίτρινος κύκλος: Φιλιππινέζικη

4.3.2.4 Παράγοντας καπνίσματος

Η διάκριση πραγματοποιήθηκε μεταξύ των δειγμάτων των μητέρων που είχαν ιστορικό καπνίσματος και αυτών που δεν είχαν. Τα δείγματα με ιστορικό καπνίσματος είχαν την τάση να ομαδοποιηθούν στο 2^ο τεταρτημόριο, καθιστώντας τους υδατάνθρακες τον κύριο παράγοντα της διάκρισής τους (Διάγραμμα 9). Τα δείγματα που δεν είχαν ιστορικό καπνίσματος δεν είχαν τάση ομαδοποίησης ως προς αυτόν τον παράγοντα καθώς βρισκόνταν ομοιόμορφα κατανομημένα και στα 4 τεταρτημόρια. Λαμβάνοντας σαν δεδομένο ότι τα δείγματα που είχαν ιστορικό καπνίσματος είχαν μικρότερη αναλογία πρωτεϊνών προς λιπαρών οξέων, όπως είναι εμφανές από την αναλογία των εντάσεών τους, ο παράγοντας του καπνίσματος αποτέλεσε καλόν παράγοντα στη πρόβλεψη της διάκρισης των δειγμάτων με ιστορικό καπνίσματος, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τη βιβλιογραφία (Bachour, et al. 2012). Έχει αναφερθεί, στο παρελθόν, ότι το κάπνισμα επηρεάζει

άμεσα την έκφραση του μητρικού γάλακτος, καθώς εμπλέκεται με τη διαδικασία της έκκρισης των μαστικών αδένων, αλλά ο μηχανισμός δεν έχει γίνει πλήρως κατανοητός (Bachour, et al. 2012).

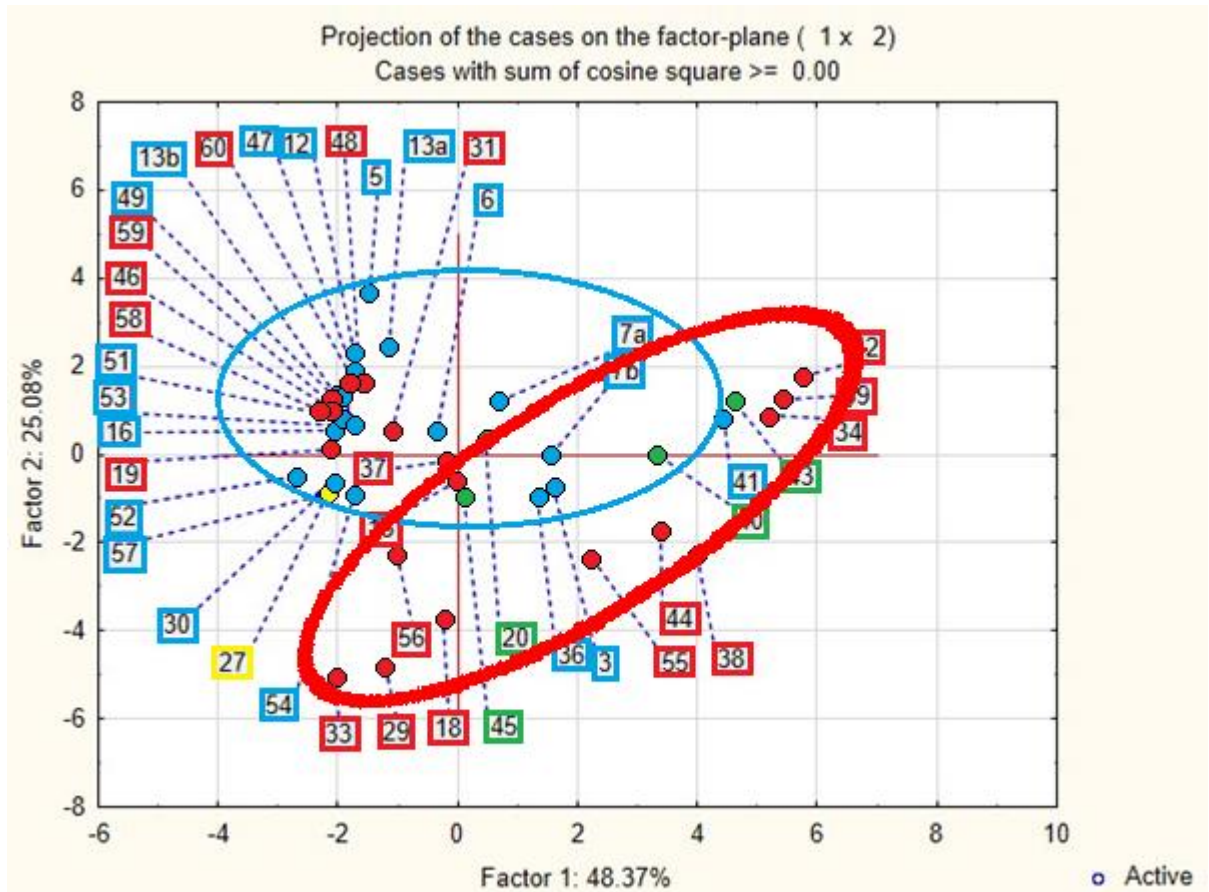


Διάγραμμα 9: Ανάλυση PCA – Τάσεις καπνίσματος. **Κόκκινοι κύκλοι:** Κάπνισμα κατά την εγκυμοσύνη. **Πράσινοι κύκλοι:** διακοπή προ κύησης. **Μπλε κύκλοι:** Διακοπή στη κύηση

4.3.2.5 Παράγοντας αριθμού τόκου (parity number)

Η διάκριση των δειγμάτων ως προς τον παράγοντα του αριθμού τόκου πραγματοποιήθηκε, κατά κύριο λόγο, μεταξύ των δειγμάτων 1^{ου} και 2^{ου} τόκου, καθώς τα δείγματα 3^{ου} και 4^{ου} τόκου δεν ήταν αρκετά σε αριθμό για να παρουσιάσουν κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά (Διάγραμμα 10). Τα δείγματα του 2^{ου} τόκου είχαν την τάση να ομαδοποιηθούν κυρίως στο κέντρο και με κατεύθυνση το 2^ο τεταρτημόριο του διαγράμματος, υποδεικνύοντας ότι ο παράγοντας για τη διάκρισή τους ήταν οι υψηλότερες αναλογίες υδατανθράκων. Τα δείγματα έδειξαν καλό διαχωρισμό έναντι των δειγμάτων του 1^{ου} τόκου, που ομαδοποιήθηκαν, ως επί το πλείστον, στα 1^ο και 3^ο τεταρτημόρια. Ο διαχωρισμός αυτός υπονοεί ότι η αύξηση του αριθμού τόκων συνεπάγεται την αύξηση της αναλογίας των υδατανθράκων και τη μείωση της αναλογίας των λιπαρών οξέων, ωστόσο, σύμφωνα

με τη βιβλιογραφία, θα έπρεπε να συμβαίνει το αντίστροφο. Η συμβολή, επομένως, του αριθμού τόκων στην σύνθεση του μητρικού πρωτογάλακτος θα πρέπει να είναι μικρότερη από αυτή των άλλων παραγόντων, δεδομένου ότι οι υπόλοιποι παράγοντες εμφάνισαν τις προσδοκόμενες επιδράσεις στις αναλογίες των μακροθρεπτικών συστατικών (Bachour, et al. 2012). Ο αριθμός τοκετού, επομένως, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένας αξιόπιστος παράγοντας για τη διάκριση των δειγμάτων.



Διάγραμμα 10: Ανάλυση PCA – Τάσεις αριθμού τόκου. Κόκκινοι κύκλοι: ένας (1) τοκετός. Μπλε κύκλοι: δύο (2) τοκετοί. Πράσινοι κύκλοι: τρεις (3) τοκετοί. Κίτρινος κύκλος: τέσσερις (4) τοκετοί.

4.3.2.6 Παράγοντας δείκτη μάζας σώματος (BMI)

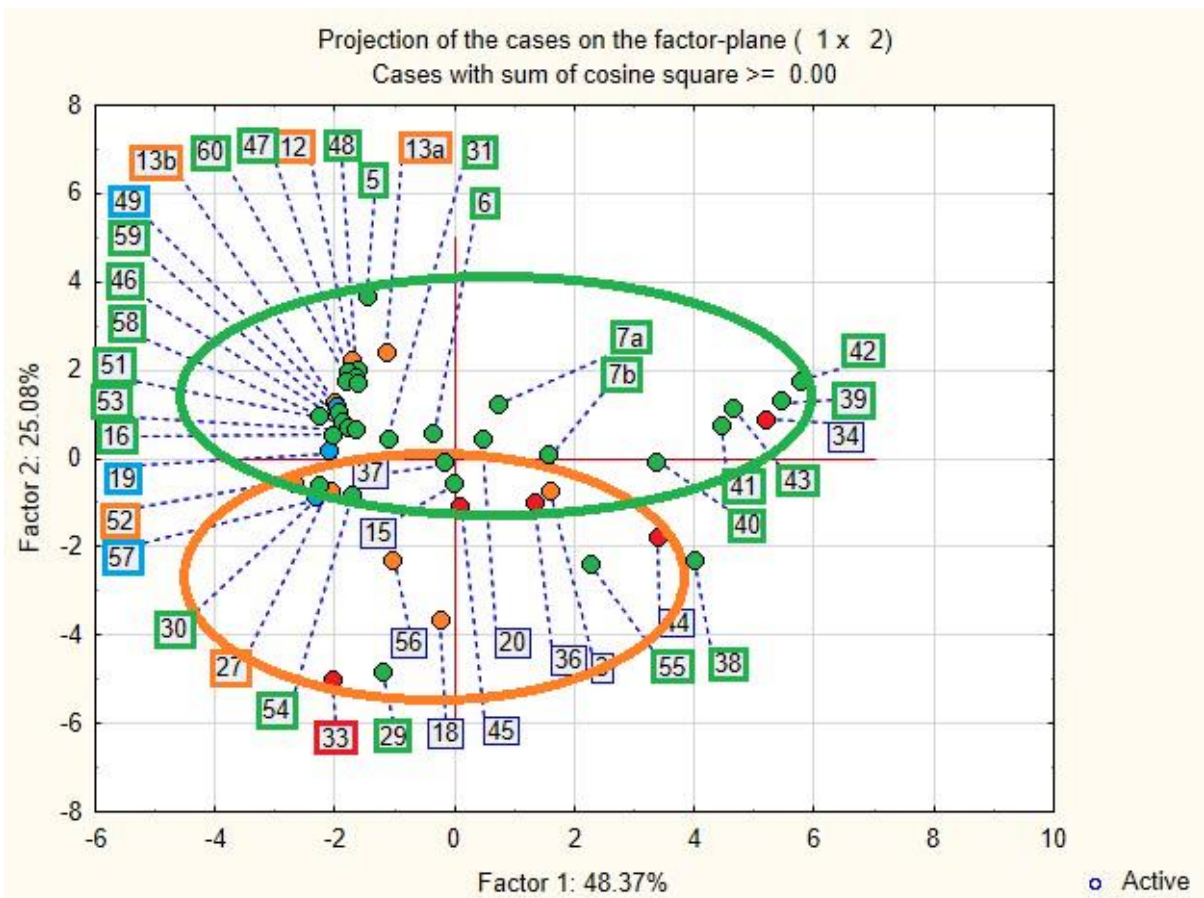
Η συνολική επίδραση του BMI στη σύνθεση του μητρικού γάλακτος αναλύθηκε στην επίδραση που παρουσίασε ο BMI προ κύησης και στην επίδραση που παρουσίασε ο BMI μετά κύησης. Η διάκριση των δειγμάτων ως προς αυτόν τον παράγοντα πραγματοποιήθηκε σε 4 ομάδες BMI:

- I. Κάτω του 18,5, όπου οι μητέρες θεωρήθηκαν «ελλιποβαρείς»

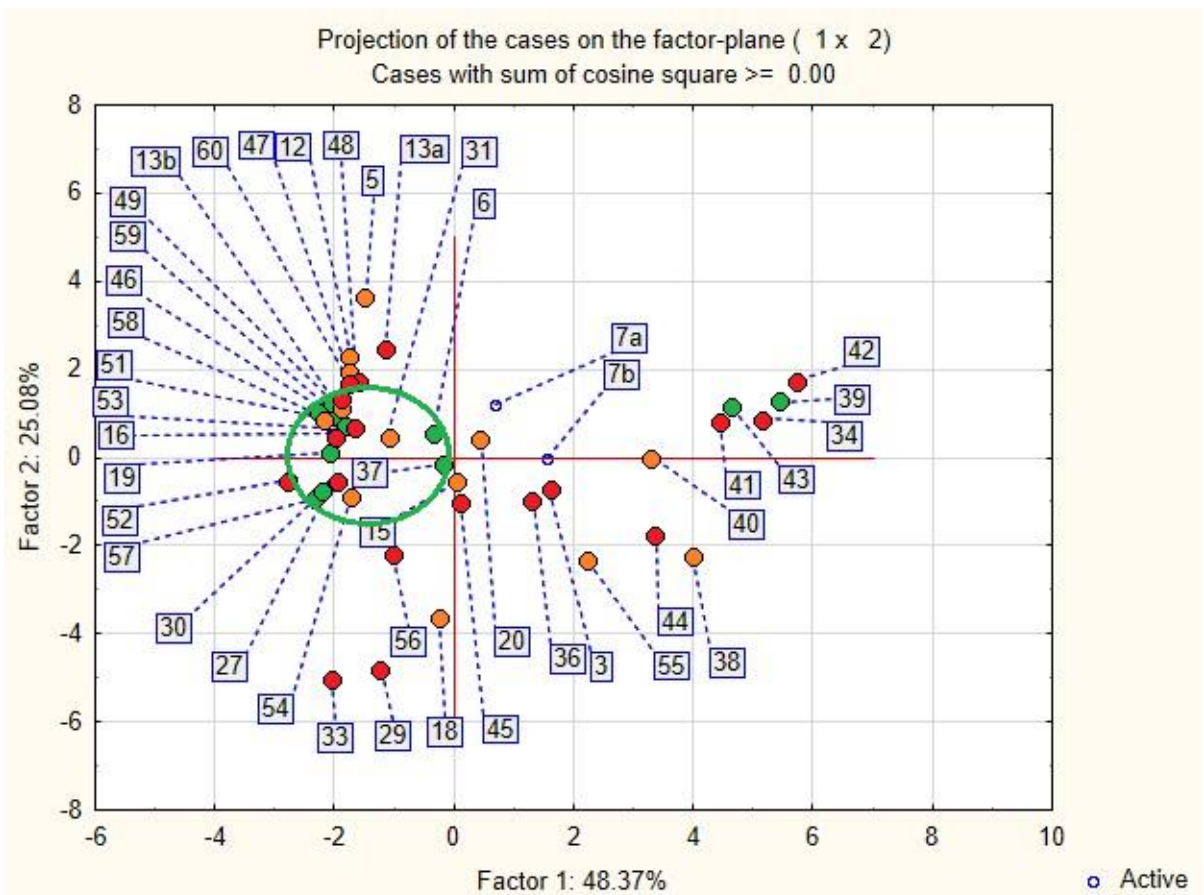
- II. 28,5-24,9, όπου οι μητέρες θεωρήθηκαν «φυσιολογικές»
- III. 25-29,9, όπου οι μητέρες θεωρήθηκαν «υπέρβαρες»
- IV. Άνω του 30, όπου οι μητέρες θεωρήθηκαν «παχύσαρκες»

Στον BMI προ κύησης οι ομάδες I και II ομαδοποιήθηκαν, κατά κύριο λόγο στο 1^ο και 2^ο τεταρτημόριο, θέτωντας τους υδατάνθρακες τον κύριο παράγοντα για την διάκρισή τους. Οι ομάδες III και IV ομαδοποιήθηκαν, κυρίως, στο 3^ο και στο 4^ο τεταρτημόριο, θέτωντας τις πρωτεΐνες και τα λιπαρά οξέα ως τους πρωτεύουσες αιτίες για τη διάκριση των δειγμάτων αυτών των ομάδων (Διάγραμμα 11). Μεταβολές στα λιπαρά οξέα και στις πρωτεΐνες είναι χαρακτηριστικές του μητρικού γάλακτος μητέρων με αυξημένο BMI, θέτωντας την διάκριση σύμφωνη με τα ευρήματα της βιβλιογραφίας (Bachour, et al. 2012). Η διάκριση των δειγμάτων παρουσίασε καλό διαχωρισμό μεταξύ των διαφορετικών ομάδων και, έτσι, ο BMI προ κύησης αποτελεί καλό παράγοντα πρόβλεψης της κατηγοριοποίησης των δειγμάτων μητρικού πρωτογάλακτος, κατά την ανάλυση PCA με φασματοσκοπία ATR-FTIR.

Στον BMI μετά κύησης παρατηρήθηκε τάση των δειγμάτων με μεγαλύτερο BMI (ομάδες III και IV) να βρίσκεται χαμηλότερα στο διάγραμμα, και συγκεκριμένα στο 3^ο και 4^ο τεταρτημόριο, θέτωντας τις πρωτεΐνες και τα λιπαρά οξέα, αντίστοιχα, τους κύριους παράγοντες διάκρισης των δειγμάτων. Αυτή η τάση είναι αναμενόμενη, ειδικά κατά τη σύγκριση του BMI προ κύησης με το BMI μετά κύησης, καθώς οι μεταβολές των πρωτεϊνών και των λιπαρών οξέων είναι αυτές που χαρακτηρίζουν τα δείγματα μητρικού γάλακτος με υψηλό BMI. Αν και υπάρχει μια μεγάλη πληθώρα δειγμάτων με υψηλό BMI που βρίσκονται στο 2^ο τεταρτημόριο, αξίζει να σημειωθεί ότι τα δείγματα αυτά, κατά πάσα πιθανότητα, έχουν μετατοπιστεί με κατεύθυνση προς το 3^ο και το 4^ο τεταρτημόριο, λόγω του υψηλότερου BMI που παρουσίασαν. Αντιθέτως, δείγματα με χαμηλότερο BMI ομαδοποιήθηκαν, σχεδόν αποκλειστικά, στο 2^ο τεταρτημόριο, κάνοντας τον διαχωρισμό τους πιο σαφή. Αυτό καθιστά τον BMI ως έναν από τους σημαντικότερους δείκτες που επιδρούν τη σύνθεση του μητρικού πρωτογάλακτος, και, με αυτόν τον τρόπο τον καθιερώνει ως έναν από τους πρωτεύοντες παράγοντες για την πρόβλεψη της κατηγοριοποίησης των δειγμάτων μητρικού γάλακτος με βάση τις τεχνικές που αναλύθηκαν. Έχει θεωρηθεί, στο παρελθόν, ότι η αυξημένη έκφραση των λιπαρών οξέων σε μητέρες με υψηλότερο BMI οφείλεται στα προληπτικά μέτρα που λαμβάνει ο οργανισμός των υπέρβαρων μητέρων, ώστε να εκφραστούν μεγαλύτερα επίπεδα πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, τα οποία συνδέονται με μείωση των καρδιαγγειακών παθήσεων (Sinanoglou, et al. 2017).



Διάγραμμα 11: Ανάλυση PCA – Τάσεις BMI μητέρων προ κύησης. **Μπλε κύκλοι:** κάτω από 18,5. **Πράσινοι κύκλοι:** 18,5-24,9. **Πορτοκαλί κύκλοι:** 25-29,9. **Κόκκινοι κύκλοι:** πάνω από 30.



Διάγραμμα 12: Ανάλυση PCA – Τάσεις BMI μητέρων μετά κύησης. **Πράσινοι κύκλοι:** 18,5-24,9. **Πορτοκαλί κύκλοι:** 25-29,9. **Κόκκινοι κύκλοι:** πάνω από 30.

4.3.3 Σημαντικότητα μελέτης, περιορισμοί και προκλήσεις

Η παρούσα μελέτη αναδύει τους περιορισμούς και τις προκλήσεις της χρήσης της φασματοσκοπίας ATR-FTIR για την ανάλυση του μητρικού πρωτογάλακτος. Το εύρος των συστατικών που είναι δυνατό να προσδιοριστούν με την φασματοσκοπία ATR-FTIR είναι σημαντικά περιορισμένο, με τις περισσότερες μελέτες να εστιάζουν στα μακροθρεπτικά συστατικά του μητρικού γάλακτος (υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, λιπαρά οξέα) (Bauer and Gerss 2011, Bērziņš, et al. 2021). Όταν συνδυάστηκε με τη στατιστική ανάλυση PCA, η φασματοσκοπία ATR-FTIR μπόρεσε να δώσει πιο σαφή, ακριβή και ορθά αποτελέσματα, έναντι εξειδικευμένων αναλυτών IR χειρός (Fusch, et al. 2015, Giuffrida, et al. 2018, Perrin, et al. 2019). Η περαιτέρω συσχέτιση των αποτελεσμάτων με πληροφορίες του δειγματοχώρου (metadata), των δειγμάτων, έδωσαν τη δυνατότητα της διάκρισης τους με βάση τους παράγοντες που διαθέτουν, ακόμα και όταν δεν υπήρχε σαφής κατηγοριοποίηση αυτών.

Η μεγαλύτερη πρόκληση κατά την ανάλυση πολύπλοκων υποστρωμάτων, όπως το μητρικό πρωτόγαλα, είναι η απομόνωση της επίδρασης των πολυάριθμων παραγόντων που επηρεάζουν την σύνθεσή τους. Μεγάλες διαφορές σε αυτούς τους παράγοντες μεταβάλλουν τη σύνθεση των δειγμάτων σε τέτοιο βαθμό, έτσι ώστε η κατηγοριοποίησή τους με βάση τις πληροφορίες του δειγματοχώρου να μην είναι σαφής. Όπως φάνηκε από τα αποτελέσματα, είναι κρίσιμης σημασίας να διασφαλιστεί η ομοιογένεια των δειγμάτων κατά την ανάλυσή τους, γεγονός το οποίο περιλαμβάνει μεταβολές στη πειραματική διαδικασία, καθώς και στη προκατεργασία τους. Οι μεταβολές αυτές, μπορεί να μην είναι πάντα εφικτές, ειδικά στη περίπτωση πολύπλοκων υποστρωμάτων. Λ.χ. η ξήρανση των δειγμάτων αποτέλεσε μεγαλύτερη πρόκληση για την ομογενοποίησή των δειγμάτων από ότι θα αποτελούσαν εάν αυτά βρίσκονταν σε φάση υδατικού διαλύματος, εναιωρήματος, ή κολλοειδούς συστήματος διασποράς-γαλακτώματος.

Ο μεγάλος αριθμός των συστατικών (μονο- δι- και ολιγοσακχαρίτες για τους υδατάνθρακες, αμινοξέα, ολιγο- και πολυπεπτίδια για τις πρωτεΐνες, κορεσμένα, μονο- και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα για το λίπος) και των παραγόντων (ηλικία, αριθμός τοκετών, BMI, κάπνισμα, εθνικότητα, ηλικία κύησης) που παράγουν αλληλοεπικαλυπτόμενες φασματικές πληροφορίες έθεσαν την κατηγοριοποίηση των δειγμάτων δύσκολη. Ορισμένοι συνδυασμοί παραγόντων έδωσαν όμοια αποτελέσματα κατά τον υπολογισμό των κύριων συνιστωσών (PC), θέτοντας τα δείγματα «πρακτικά όμοια», χωρίς να είναι πραγματικά (Λ.χ. τα δείγματα 5, 12 και 47 βρίσκονται κοντά μεταξύ τους, στο 2^ο τεταρτημόριο, ενώ περιέχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα οπτικά τους

χαρακτηριστικά). Επομένως, η κατηγοριοποίηση έγινε χωριστά, ανά παράγοντα, με σκοπό την απομόνωση των επιδράσεων των παραγόντων στο μεγαλύτερο δυνατό επίπεδο.

Λόγω της χαμηλής ευαισθησίας της φασματοσκοπίας ATR-FTIR σε χαμηλές συγκεντρώσεις, η ανάλυση των πρωτεϊνών δεν επέφερε σαφή αποτελέσματα κατά την ανάλυση διάκρισης. Επομένως, οι παράγοντες για την διάκριση των δειγμάτων, όπως ήταν φανερό στην ανάλυση PCA, ήταν τα λιπαρά οξέα και οι υδατάνθρακες, με κύριο παράγοντα την αναλογία τους.

4.3.4 Υποδείξεις για περαιτέρω έρευνα

Η μελέτη παρουσίασε εκτενώς τους περιορισμούς της ανάλυσης πολύπλοκων υποστρωμάτων τροφίμων με τη χρήση ATR-FTIR φασματοσκοπίας. Συγκεκριμένα, η απομόνωση των παραγόντων που έχουν επίδραση στη σύνθεση του μητρικού πρωτογάλακτος, καθώς και ο βαθμός στον οποίο αυτοί επιδρούν τις αναλογίες των μακροθρεπτικών συστατικών του, πρέπει να μελετηθεί σε έρευνες μεγαλύτερης κλίμακας και περισσότερων δειγμάτων, για μεγαλύτερη στατιστική ακρίβεια.

Η στοχευμένη στους παράγοντες μελέτη, αν και δύσκολη στη πράξη, λόγω ζητημάτων ηθικής, θα επέλυε πολλά προβλήματα που τέτοιου είδους έρευνες συνηθίζουν να αντιμετωπίζουν. Σκοπός των στοχευμένων μελετών θα ήταν να επιλεγθούν δείγματα από μητέρες με μικρό αριθμό διαφορών στους παράγοντες, ώστε αυτοί να μελετηθούν με μεγαλύτερη ορθότητα. Η χρήση πολυμεταβλητών στατιστικών αναλύσεων σε συνδυασμό με άλλες ενόργανες μεθόδους όπως το GC-FID για την ανάλυση του προφίλ των λιπαρών οξέων, θα βοηθούσε περαιτέρω στην διαλογή των παραγόντων που επηρεάζουν σε μεγαλύτερο βαθμό τη σύνθεση του μητρικού γάλακτος από άλλους.

Σημαντικό είναι, επίσης, να αξιολογηθούν περαιτέρω οι μηχανισμοί οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για τη μεταβολή της σύνθεσης του γάλακτος, και να συσχετιστούν με τους ανάλογους παράγοντες που μελετήθηκαν. Μπορούν με αυτόν τον τρόπο να βρεθούν περισσότεροι παράγοντες που επηρεάζουν τη σύνθεση του μητρικού γάλακτος, καθώς και να βρεθούν και άλλοι μηχανισμοί που να αιτιολογούν τη μεταβολή που προκαλεί κάποιος παράγοντας μεμονωμένα ή συνδιαστικά με κάποιον άλλον. Η γνώση για τη συνεργιστική δράση μεταξύ των παραγόντων, στη διαμόρφωση του μακροθρεπτικού προφίλ του μητρικού γάλακτος, είναι περιορισμένη και απαιτεί περαιτέρω μελέτη.

Περισσότερη έμφαση μπορεί να δοθεί στη στατιστική επεξεργασία, έτσι ώστε να γίνει διαλογή του ιδανικού αριθμού δειγμάτων, απορρίπτοντας τις έκτροπες τιμές, και να εξαχθούν περισσότερο σαφείς, ορθοί και ακριβείς διαχωρισμοί των δειγμάτων, ώστε να αναπτυχθούν

μοντέλα διάκρισης του μητρικού γάλακτος, γεγονός που μπορεί να συμβάλει στην κατανόηση των διαφορών της σύνθεσης του μητρικού πρωτογάλακτος με το ώριμο γάλα. Η κατανόηση της σύνθεσης αυτής είναι το πρώτο βήμα για να αναπτυχθούν εναλλακτικοί τρόποι θρέψης των νεογνών, στη περίπτωση όπου η μητέρα δεν είναι σε θέση να θηλάσει. Κατά αυτόν τον τρόπο, η σαφής διάκριση των δειγμάτων μητρικού γάλακτος κάθε ηλικίας κύησης μπορεί, ενδεχομένως, να βοηθήσει στη διαμόρφωση προϊόντων βρεφικής φόρμουλας, για κάθε ηλικιακή περίοδο των νεογνών.

Όσον αφορά τη μελέτη των κορυφών που εμφάνισαν τα φάσματα ATR-FTIR, περαιτέρω έρευνα μπορεί να διεξαχθεί για να μελετηθούν μεμονωμένα με πολλές προσεγγίσεις:

- Εστίαση στα λιπαρά οξέα, και επομένως στις κορυφές που τους αντιστοιχούν, με το συνδυασμό της ATR-FTIR φασματοσκοπίας με άλλες αναλυτικές τεχνικές που μπορούν να ανιχνεύσουν τα λιπαρά οξέα, ανεξαρτήτως του μεγέθους των ανθρακικών αλυσιδών τους.
- Εστίαση στις πρωτεΐνες, και επομένως στις κορυφές που τις αντιστοιχούν, για τον προσδιορισμό των δευτεροταγών δομών τους, με στοχευμένες μελέτες. Είναι δυνατόν να ερευνηθούν και οι εξωτερικοί παράγοντες, οι οποίοι έχουν επίδραση στους δεσμούς αζώτου-υδρογόνου, έτσι ώστε να εξασφαλιστούν οι βέλτιστες συνθήκες για τον προσδιορισμό των μακροθρεπτικών συστατικών στο μητρικό γάλα.
- Εστίαση στους υδατάνθρακες, και συγκεκριμένα, στους ΗΜΟ, επομένως και στις κορυφές που τους αντιστοιχούν, για την ανάπτυξη ταχέων μεθόδων προσδιορισμού τους. Στη περίπτωση που υπάρξει ανάγκη να ερευνηθούν ξεχωριστά, η ATR-FTIR φασματοσκοπία μπορεί να συνδυαστεί με άλλες τεχνικές όπου να δίνουν τη δυνατότητα ανάλυσης των διαφορετικών ΗΜΟ στο μητρικό γάλα.

4.4 Συμπεράσματα

Η μελέτη έφερε στο προσκήνιο τη σημαντικότητα, αλλά και τις προκλήσεις, των διαφορετικών παραμέτρων που επηρεάζουν τη σύνθεση των μακροθρεπτικών συστατικών στο μητρικό πρωτόγαλα, με το συνδυασμό της φασματοσκοπίας ATR-FTIR και της στατιστικής ανάλυσης PCA. Παρουσίασε, συγκεκριμένα ότι η ηλικία κύησης, η εθνικότητα, το κάπνισμα και ο BMI έπαιξαν πρωτεύοντα ρόλο στη διαμόρφωση του συνολικού προφίλ των μακροθρεπτικών συστατικών του μητρικού πρωτογάλακτος. Η μικρότερη ηλικία κύησης συνδέθηκε με μεγαλύτερη αναλογία λιπαρών οξέων, η μη-Ελληνική εθνικότητα με υψηλότερη αναλογία υδατανθράκων, το ιστορικό καπνίσματος με μειωμένη αναλογία πρωτεϊνών και λιπών και ο BMI, προ και μετά της κύησης, με

μεταβολή των αναλογιών των λιπαρών οξέων και των πρωτεϊνών, σε σύγκριση με τα φυσιολογικά. Η ηλικία της μητέρας και ο αριθμός τοκετού παρουσίασαν μεταβολές στη σύνθεση του μητρικού γάλακτος, αλλά σε μικρότερο βαθμό από ότι οι άλλοι παράγοντες, χωρίς τη δυνατότητα σαφούς διάκρισης των δειγμάτων μεταξύ τους. Η διαμόρφωση του προφίλ των μακροθρεπτικών συστατικών έδειξε ότι ήταν άμεσο αποτέλεσμα της συνεργιστικής δράσης μεταξύ των παραγόντων που αναλύθηκαν. Τα ευρήματα αυτής της έρευνας μπορεί να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη μεθόδων που να αναλύουν γρήγορα και αποτελεσματικά το μητρικό πρωτόγαλα με τη χρήση φασματομετρίας ATR-FTIR και χημειομετρικών στατιστικών αναλύσεων, όπως η PCA. Περαιτέρω έρευνα είναι αναγκαία για την επέκταση της γνώσης της σύνθεσης του μητρικού γάλακτος, ώστε να αναπτυχθούν προϊόντα βρεφικής θρέψης, στην περίπτωση όπου ο θηλασμός δεν είναι εφικτός.

Βιβλιογραφία

- Akhgar, C. K., et al. "Fatty Acid Determination in Human Milk Using Attenuated Total Reflection Infrared Spectroscopy and Solvent-Free Lipid Separation." *Applied Spectroscopy*, 2022.
- Allen, L. H. "B Vitamins in Breast Milk: Relative Importance of Maternal Status and Intake, and Effects on Infant Status and function." *Advances in Nutrition* 3, no. 3 (2012): 362-369.
- Ayechu-Muruzabel, V., et al. "Diversity of Human Milk Oligosaccharides and Effects on Early Life Immune Development." *Front. Pediatr.* 6 (2018): 239.
- Bachour, P., R. Yafawi, F. Jaber, E. Choueiri, and Z. Abdel-Razzak. "Effects of smoking, mother's age, body mass index, and parity number on lipid, protein, and secretory immunoglobulin a concentrations of human milk." *Breastfeed Med.* 7 (2012): 179-188.
- Balan, B., et al. "Application of Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) spectroscopy coupled with chemometrics for detection and quantification of formalin in cow milk." *Vibrational Spectroscopy*, 2020.
- Ballard, O., and A. L. Morrow. "Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors." *Pediatr. Clin. North Am.*, 2013: 60(1): 49-74.
- Bard, J. M., et al. "Effect of milk fat on LDL cholesterol and other cardiovascular risk markers in healthy humans: The INNOVALAIT project." *Eur. J. Clin. Nutr.* 74 (2020): 285-296.
- Barness, L. A., G. Morrow, J. Silverio, L. P. Finnegan, and S. E. Heitman. "Calcium and fat absorption from infant formulas with different fat blend." *Pediatrics* 54 (1974): 212-221.
- Barreto, I. M. L. G., A. H. N. Rangel, S. A. Urbano, J. S. Bezerra, and H. A. A. Oliveira. "Equine milk and its potential use in the human diet." *Food Sci. Technol.* 39, no. 1 (2019): 1-7.
- Bauer, J., and J. Gerss. "Longitudinal analysis of macronutrients and minerals in human milk produced by mothers of preterm infants." *Clin. Nutr.* 30 (2011): 215-220.
- Berlin Jr., C. M, και S. Kacew. «Environmental chemicals in human milk.» Στο *Environmental Toxicology and Pharmacology of Human Development*, του/της S. Kacew και G. H. Lambert, 67-93. Washington, DC, U.S.A.: Taylor and Francis, 1997.
- Berlin, C., D. Q. Naiman, and J. S. LaKind. "Infant exposure to chemicals in breast milk in the United States: what we need to learn from a breast milk monitoring program." *Environ. Health Perspect.* 109 (2001): 75-88.
- Bernt, K. M., and W. A. Walker. "Human milk as a carrier of biochemical messages." *Acta Pediatr. Suppl.* 430 (1999): 27-41.

- Bērziņš, K., et al. "Qualitative and Quantitative Vibrational Spectroscopic Analysis of Macronutrients in Breast Milk." *Spectrochim. Acta*, 2021: 246.
- Bettendorff, L. "Thiamine." In *Present Knowledge in Nutrition, Eleventh Edition*, by B. P. Marriott, D. F. Birt, V. A. Stallings and A. A. Yates, 171-188. London, United Kingdom: Academic Press (Elsevier), 2020.
- Biancolillo, A., M. Foschi, M. Di Micco, D. Di Donato, and A. A. D'Archivio. "ATR-FTIR-based rapid solution for the discrimination of lentils from different origins, with a special focus on PGI and Slow Food typical varieties." *Microchemical Journal* 178 (2022).
- Bitman, J., L. Wood, M. Hamosh, P. Hamosh, και N. R. Mehta. «Comparison of the lipid composition of breast milk from mothers of term and preterm infants.» *Am. J. Clin. Nutr.*, 1983: 300-312.
- Blaško, A., R. Kubinec, R. Górová, I. Fábry, W. Lorenz, and L. Soják. "Fatty acid composition of summer and winter cows' milk and butter." *J. Food Nutr. Res.* 49 (2010): 169-177.
- Bode, L. "The functional biology of human milk oligosaccharides." *Early Human Development*, 2015: 91(11): 619-622.
- Boersma, E. R., P. J. Offringa, F. A. J. Muskiet, W. M. Chase, and I. J. Simmons. "Vitamin, E. Lipid fractions, and fatty acid composition of colostrum, transitional milk, and mature milk: An international comparative study." *Am. J. Clin. Nutr.* 53 (1991): 1197-1204.
- Boquien, C. -Y. "Human milk: an ideal food for nutrition of preterm newborn." *Front. Pediatr.* 6 (2018): 295.
- Botelho, B. G., N. Reis, L. S. Oliveira, and M. M. Sena. "Development and analytical validation of a screening method for simultaneous detection of five adulterants in raw milk using mid-infrared spectroscopy and PLS-DA." 181 (2015): 31-37.
- Brasil, A. L. D., M. R. Vitolo, F. A. Lopez, and F. J. De No'brega. "Fat and protein composition of mature milk in adolescents." *J. Adolesc. Health* 12 (1991): 365-371.
- Bryk, G., et al. "Effects of different oligosaccharides at various dosages on the composition of gut microbiota and short-chain fatty acids in mice with constipation." *European Journal of Nutrition*, 2015: 54: 913-923.
- Buckley, D. I., R. Fu, M. Freeman, K. Rogers, and M. Helfand. "C-reactive protein as a risk factor for coronary heart disease: A systematic review and meta-analyses for the U.S. Preventive Services Task Force." *Ann. Intern. Med.* 151 (2009): 483-495.

- Bych, K., M. Mikš-Krajnik, T. Johanson, M. J. Hederos, L. K. Vignæs, and P. Becker. "Production of HMOs using microbial hosts—From cell engineering to large scale production." *Curr. Opin. Biotechnol.* 56 (2019): 130-137.
- Bode, L. "Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama." *Glycobiology*, 2012: 22: 1147-1162.
- Cacho, N. T., and R. M. Lawrence. "Innate immunity and breast milk." *Front. Immunol.* 8 (2017): 584.
- Cambell, T. C. "A Comparison between Human Milk and Cow's Milk." 2020. <https://www.vivahealth.org.uk/resources/white-lies/comparison-between-human-milk-and-cow%E2%80%99s-milk-online> (accessed May 29, 2022).
- Campbell, T. C. A. "A Comparison between Human Milk and Cow's Milk." 2020. <https://www.vivahealth.org.uk/resources/white-lies/comparison-between-human-milk-and-cow%E2%80%99s-milk-online> (accessed May 26, 2022).
- Carbonaro, M., and A. Nucara. "Secondary structure of food proteins by Fourier transform spectroscopy in the mid-infrared region." *Amino Acids* 38 (2010): 679–690.
- Carlson, S. E., S. H. Werman, P. G. Rhodes, and E. Tolley. "Visual acuity development in healthy preterm infants: Effect of marine oil supplementation." *Am. J. Nutr.* 58 (1993): 35-42.
- Castellote, C., et al. "Premature delivery influences the immunological composition of colostrum and transitional and mature human milk." *The Journal of nutrition*, 2011: 141(6): 1181-1187.
- Castillo-Courtade, L., S. Han, S. Lee, F. M. Mian, R. Buck, and P. Forsythe. "Attenuation of food allergy symptoms following treatment with human milk oligosaccharides in a mouse model." *European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2015.
- Chandwe, K., and P. Kelly. "Colostrum Therapy for Human Gastrointestinal Health and Disease." *Nutrients*, 2021: 13(6): 1956.
- Chang, J. C., C. H. Chen, L. J. Fang, C. R. Tsai, Y. C. Chang, and T. M. Wang. "Influence of prolonged storage process, pasteurization, and heat treatment on biologically-active human milk proteins." *Pediatr. Neonatol.* 54 (2013): 360-366.
- Chang, Y. C., C. H. Chen, and M. C. Lin. "The macronutrients in human milk change after storage in various containers." *Pediatr. Neonatol.* 53 (2012): 205-209.

- Charpak, N., and J. G. Ruiz. "Breast milk composition in a cohort of pre-term infants' mothers followed in an ambulatory programme in Colombia." *Acta Paediatr.* 96 (2007): 1755-1759.
- Chaumeil, C., S. Liotet, and O. Kogbe. "Treatment of severe eye dryness and problematic eye lesions with enriched bovine colostrum lactoserum." *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1994: 350: 595-599.
- Chen, L., Y. Tian, B. Sun, C. Cai, R. Ma, and Z. Jin. "Measurement and characterization of external oil in the fried waxy maize starch granules using ATR-FTIR and XRD." *Food Chemistry* 242 (2018): 131-138.
- Cheng, L., R. Akkerman, C. Kong, M. T. C. Walvoort, and P. De Vos. "More than sugar in the milk: Human milk oligosaccharides as essential bioactive molecules in breast milk and current insight in beneficial effects." *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2020: 1-17.
- Chung, I. S., et al. "Breastfeeding and maternal and infant health outcomes in developed countries." *Evidence Report/technology Assessment*, 2007: 153: 1-186.
- Chung, M. -Y. "Factors Affecting Human Milk Composition." *Pediatrics and Neonatology* 55, no. 6 (2014): 421-422.
- Claumarchirant, L., E. Matencio, L. M. Sanchez-Siles, A. Alegria, and M. J. Lagarda. "Sterol composition in infant formulas and estimated intake." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63 (2015): 7245-7251.
- Cone, T. E. *History of infant and child feeding: From the earliest years through the development of scientific concepts*. Academic Press, 1983.
- Course Hero Inc. "Composition of Milk from Different Animals." *Course Hero, Inc Web Site*. 2020. (accessed May 26, 2022).
- Cregan, M. D., T. R. De Mello, D. Kershaw, K. McDougall, and P. E. Hartmann. "Initiation of lactation in women after preterm delivery." *Acta Obstet. Gynecol. Scan.*, 2002: 81(9): 870-877.
- Cruz-Hernandez, C., S. Goeuriot, F. Giuffrida, S. K. Thakkar, and F. Destailats. "Direct quantification of fatty acids in human milk by gas chromatography." *Journal of Chromatography A* 1284 (2013): 174-179.
- Csernák, O., B. Rácz, Á. Alberti, and S. Béni. "Quantitative analysis of 3'- and 6'-sialyllactose in human milk samples by HPLC-MS/MS: A validated method for the comparison of two

- consecutive lactation periods in the same woman." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 184 (2020).
- Da Silva, V. R., and J. F. Gregory III. "Vitamin B6." In *Present Knowledge in Nutrition, Eleventh Edition*, by B. P. Marriott, D. F. Birt, V. A. Stallings and A. A. Yates, 225-238. London, UK: Academic Press (Elsevier), 2020.
 - Dam, H., E. H. Larsne, and P. Plum. "Investigations into the cause of the physiological hypoprothrombinemia in new-born children." *Acta Med. Scand.*, 1942: 210-216.
 - Danesh, J., et al. "Plasma fibrinogen level and the risk of major cardiovascular diseases and nonvascular mortality: An individual participant meta-analysis." *JAMA* 294 (2005): 1799-1809.
 - De Luca, M., G. Ioele, C. Spatari, L. Caruso, M. P. Galasso, and G. Ragno. "Evaluation of human breastmilk adulteration by combining Fourier transform infrared spectroscopy and partial least square modeling." *Food Science & Nutrition* 7, no. 6 (2019): 2194-2201.
 - De Marchi, M., et al. "Prediction of coagulation properties, titratable acidity, and pH of bovine milk using mid-infrared spectroscopy." *Journal of Dairy Science* 92, no. 1 (2009): 423-432.
 - De Wolf, J. R., A. Lenferink, A. Lenferink, C. Otto, and N. Bosschaart. "Evaluation of the changes in human milk lipid composition and conformational state with Raman spectroscopy during a breastfeed." *Biomedical Optics Express* 12, no. 7 (2021): 3934-3947.
 - Deegan, K. L., et al. "Breast milk vitamin B-12 concentrations of Guatemalan women are correlated with maternal but not infant B-12 status at 12 months postpartum." *J. Nutr.* 142 (2012): 112-116.
 - Diem, M. *Modern Vibrational Spectroscopy and Micro-spectroscopy: Theory, Instrumentation and Biomedical Applications, Modern Vibrational Spectroscopy and Micro-spectroscopy*. John Wiley & Sons, 2015.
 - Donangelo, C. M., και συν. «Iron, zinc, folate and vitamin B12 nutritional status and milk composition of low-income Brazilian mothers.» *Eur. J. Clin. Nutr.* 43 (1989): 253-266.
 - Donovan, S. M. "The role of lactoferrin in gastrointestinal and immune development and function: a preclinical perspective." *J. Pediatr.* 173 (2016): 16-28.
 - Dorea, J. G. "Zinc in human milk." *Nutr. Res.* 20 (2000): 1645-1687.

- Dos Santos, V. J., M. R. Baqueta, P. H. Março, P. Valderrama, and J. V. Visentainer. "Human Milk Lactation Phases Evaluation Through Handheld Near-Infrared Spectroscopy and Multivariate Classification." *Food Analytical Methods* 14 (2021): 873–882.
- Dumrongwongsiri, O., et al. "Dietary Intake and Milk Micronutrient Levels in Lactating Women with Full and Partial Breastfeeding." *Maternal and Child Health Journal* 25 (2021): 991-997.
- Dykes, F. *Breastfeeding in Hospital: Mothers, Midwives and the Production Line. 1st Edition.* London, U.K.: Routledge, 2006.
- Dorea, J. G. "Is zinc a first limiting nutrient in human milk?" *Nutr. Res.* 13 (1993): 659-666.
- Eitenmiller, R. R., and S. De Souza. "Niacin." In *Methods of Vitamin Assay*, by J. Augustin, B. P. Klein, D. Becker and P. Venugopal, 385-398. New York, USA: John Wiley & Sons, 1985.
- Eitenmiller, R. R., και W. O. Landen Jr. *Vitamin Analysis for the Health and Food Sciences.* Athens, GA: CRC Press LLC, 1999.
- El Darra, N., H. N. Rajha, F. Saleh, R. Al-Oweini, R. G. Maroun, and N. Louka. "Food fraud detection in commercial pomegranate molasses syrups by UV–VIS spectroscopy, ATR-FTIR spectroscopy and HPLC methods." *Food Control* 78 (2017): 132-137.
- Engfer, M. B., B. Stahl, B. Finke, G. Sawatzki, and H. Daniel. "H. Human milk oligosaccharides are resistant to enzymatic hydrolysis in the upper gastrointestinal tract." *Am. J. Clin. Nutr.* 71 (2000): 1589-1596.
- Eriksen, K. G., S. H. Christensen, M. V. Lind, and K. F. Michaelsen. "Human milk composition and infant growth." *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 21, no. 7 (2018): 200-206.
- Erqou, S., et al. "Apolipoprotein (A) isoforms and the risk of vascular disease: Systematic review of 40 studies involving 58,000 participants." *J. Am. Coll. Cardiol.* 55 (2010): 2160-2167.
- Fernández-Muiño, M. Á., M. T. Sancho-Ortiz, και F. Valls-Garcia. «Water-Soluble Vitamins.» Στο *Methods of analysis for Functional Foods and Nutraceuticals*, του/της J. Hurst, 401-432. Boca Raton, FL: CRC Press, 2008.
- Fusch, G., et al. "Rapid Measurement of Macronutrients in Breast Milk: How Reliable Are Infrared Milk Analyzers?" 34, no. 3 (2015): 465-476.
- Gabrielli, O., et al. "Preterm milk oligosaccharides during the first month of lactation." *Pediatrics*, 2011: 128(6): 1520-1531.

- Gantner, V., P. Mijić, M. Baban, Z. Škrtić, and A. Turalija. "The overall and fat composition of milk of various species." *Mljekarstvo* 65 (2015): 223-231.
- Gao, X., R. J. McMahon, J. G. Woo, B. S. Davidson, A. L. Morrow, and Q. Zhang. "Temporal changes in milk proteomes reveal developing milk functions." *J. Proteome Res.*, 2012: 11(7): 3897-3907.
- Gebre-Medhin, M., A. Vahlquist, Y. Hofvander, L. Uppsall, και Vahlquist B. «Breast milk composition in Ethiopian and Swedish mothers.» *Am. J. Clin. Nutr.*, 1976: 29:441–51.
- Gibson, R. S. *Principles of Nutritional Assessment*. New York, U.S.A.: Oxford University Press, 1990.
- Gidrewicz, D. A., and T. R. Fenton. "A systematic review and meta-analysis of the nutrient content of preterm and term breast milk." *BMC Pediatr.* 14 (2014): 216.
- Gila-Diaz, A., et al. "A Review of Bioactive Factors in Human Breastmilk: A Focus on Prematurity." *Nutrients* 11, no. 6 (2019): 1307.
- Giuffrida, F., et al. "Comparison of macronutrient content in human milk measured by mid-infrared human milk analyzer and reference methods." *journal of perinatology* 39 (2018): 497–503.
- Greer, F. R. "Do breastfed infants need supplemental vitamins?" *Pediatric clinics of North America*, 2001: 48(2): 415-423.
- Grote, V., et al. "Breast milk composition and infant nutrient intakes during the first 12 months of life." *European Journal of Clinical Nutrition*, 2016: 70: 250-256.
- Guo, M. *Human Milk Biochemistry and Infant Formula Manufacturing Technology, Second Edition*. Cambridge, United Kingdom: Woodhead Publishing (Elsevier), 2021.
- Hallgren, O., et al. "Apoptosis and Tumor Cell Death in Response to HAMLET (Human α -Lactalbumin Made Lethal to Tumor Cells)." In *Bioactive Components of Milk. Advances in Experimental Medicine and Biology*, by Z. Bösze, 217-240. New York, U.S.A.: Springer, 2008.
- Hamdam, I. J., L. M. Sanchez-Siles, E. Matencio, G. Garcia-Llatas, and M. J. Lagarda. "Cholesterol content in human milk during lactation: a comparative study of enzymatic and chromatographic methods." *Journal of agricultural and food chemistry* 66, no. 25 (2018): 6373-6381.
- Hampel, D., and L. H. Allen. "Analyzing B-vitamins in Human Milk: Methodological Approaches." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (Taylor & Francis), 2015: 56(3): 494-511.

- Hampel, D., D. K. Dror, and L. H. Allen. "Micronutrients in Human Milk: Analytical Methods." *Advances in Nutrition*, 2018: 9(1) 313-331.
- Harzer, G., M. Haug, and J. G. Bindels. "Biochemistry of human milk in early lactation." *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft* 25 (1986): 77-90.
- Hayat, L., M. Al-Sughayer, and M. Afzal. "A comparative study of fatty acids in human breast milk and breast milk substitutes in Kuwait." *Nutr. Res.* 19 (1999): 827-841.
- Hegar, B., et al. "The Role of Two Human Milk Oligosaccharides, 2'-Fucosyllactose and Lacto-N-Neotetraose, in Infant Nutrition." *Pediatr. Gastroenterol. Hepatol. Nutr.*, 2019: 22(4): 330-340.
- Heiman, H., and R. J. Schanler. "Benefits of maternal and donor human milk for premature infants." *Early Hum. Dev.* 82 (2006): 781-787.
- Hirschmugl, B., et al. "Evidence of Human Milk Oligosaccharides in Cord Blood and Maternal-to-Fetal Transport across the Placenta." *Nutrients* 11 (2019): 2640.
- Hollis, B. W., B. A. Roos, H. H. Draper, and P. W. Lambert. "Vitamin D and its metabolites in human and bovine milk." *J. Nutr.*, 1981: 1240-1248.
- Horwood, L. J., B. A. Darlow, and N. Mogridge. "Breast milk feeding and cognitive ability at 7–8 years." *Arch. Dis. Child Fetal Neonatal Ed.*, 2001: 84: 23-27.
- Houghton, L. A., J. Yang, και D. L. O'Connor. «Unmetabolized folic acid and total folate concentrations in breast milk are unaffected by low-dose folate supplements.» *Am. J. Clin. Nutr.* 89 (2009): 216-220.
- Hsu, Y. C., C. H. Chen, M. C. Lin, C. R. Tsai, J. T. Liang, and T. M. Wang. "Changes in preterm breast milk nutrient content in the first month." *Pediatr. Neonatol.* 55 (2014): 449-454.
- Huth, P. J., and K. M. Park. "Influence of dairy product and milk fat consumption on cardiovascular disease risk: A review of the evidence." *Adv. Nutr.* 3 (2012): 266-285.
- Indrio, F., et al. "Epigenetic matters: the link between early nutrition, microbiome, and long-term health development." *Frontiers in Pediatrics* 5 (2017): 178.
- Indyk, H. E., and D. C. Woollard. "Vitamin K in milk and infant formulas: determination and distribution of phyloquinone and menaquinone-4." *Analyst*, 1997: 465-467.
- Institute of Medicine. *Dietary Reference Intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin, and choline*. Washington DC: Institute of Medicine, 1998.

- Jabs, A. "Determination of Secondary Structure in Proteins by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)." *Jena Library of Biological Macromolecules*, 2005.
- Jacobson, S. W., and J. L. Jacobson. "Breastfeeding and intelligence." *Lancet*, 1992: 339: 926.
- Jaiswal, P., S. N. Jha, A. Borah, A. Gautam, M. K. Grewal, and G. Jindal. "Detection and quantification of soymilk in cow–buffalo milk using Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared spectroscopy (ATR–FTIR)." *Food Chemistry* 168 (2015): 41-47.
- Jantscher-Krenn, E., et al. "Evidence of human milk oligosaccharides in maternal circulation already during pregnancy: A pilot study." *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 316 (2019): 347-357.
- Jantscher-Krenn, E., and L. Bode. "Human milk oligosaccharides and their potential benefits for the breast-fed neonate." *Minerva Pediatr.*, 2012: 64(1): 83-99.
- Jenness, R. "The composition of human milk." *Seminars in Perinatology*, 1979: 3(3): 225-239.
- Jensen, A. A., και S. A. Slorach. «Assessment of infant intake of chemicals via breast milk.» Στο *Chemical Contaminants in Human Milk*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1991.
- Jensen, R. G. *Handbook of Milk Composition*. San Diego, California, USA: Academic Press, 1995.
- Jost, T., C. Lacroix, and C. Braegger. "Impact of human milk bacteria and oligosaccharides on neonatal gut microbiota establishment and gut health." *Nutr. Rev.* 73 (2015): 426-437.
- Kamao, M., et al. "Quantification of fat-soluble vitamins in human breast milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry." *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2007: 192-200.
- Kamelska, A. M., R. Pietrzak-Fiećko, and K. Bryl. "Variation of the cholesterol content in breast milk during 10 days collection at early stages of lactation." *Acta Biochimica Polonica* 59, no. 2 (2012): 243-247.
- Kaptoge, S., et al. "Inflam-matory cytokines and risk of coronary heart disease: New prospectivestudy and updated meta-analysis." *Eur. Heart J.* 35 (2014): 578-589.
- Kasrae, H., L. AmiriFarahani, and P. Yousefi. "Efficacy of topical application of human breast milk on atopic eczema healing among infants: A randomized clinical trial." *Int. J. Dermatol.*, 2015: 54: 966-971.
- Khanal, N., C. Masellis, M. Z. Kamrath, D. E. Clemmer, and T. R. Rizzo. "Cryogenic IR spectroscopy combined with ion mobility spectrometry for the analysis of human milk oligosaccharides." *Analyst* 143 (2018): 1846-1852.

- Kirkland, J. B. "Niacin requirements for genomic stability." *Mutation Research*, 2012: 733(1-2): 14-20.
- Kodentsova, V. M., και O. A. Vrzhesinskaya. «Evaluation of the vitamin status in nursing women by vitamin content in breast milk.» *Bull. Exp. Biol. Med.* 141 (2006): 323-327.
- Koletzko, B., I. Thiel, and P. O. Abiodun. "fatty acid composition of human milk in Europe and Africa." *J. Pediatr.* 120 (1992): 62-70.
- Koletzko, B., M. Rodriguez-Palmero, H. Demmelmair, N. Fidler, R. Jensen, and T. Sauerwald. "Physiological aspects of human milk lipids." *Early Hum. Dev.*, 2001: 65: S3-S18.
- Koletzko, B., R. Von Kries, R. Closa, and . "Can infant feeding choices modulate later obesity risk?" *Am. J. Clin. Nutr.* 89 (2009): 1502-1508.
- Kong, J., and S. Yu. "Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures." *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 39 (2007): 549-559.
- Kramer, M. S. "'Breast is best": The evidence." *Early Human Development*, 2010: 86(11): 729-732.
- Kulski, J. K., and P. E. Hartmann. "CHANGES IN HUMAN MILK COMPOSITION DURING THE INITIATION OF LACTATION." *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, 1981.
- Laegreid, A., και O. A. Kolsto. «Trace amounts of ganglioside GM1 in human milk inhibit enterotoxins from *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*.» *Life Sci.* 40, αρ. 1 (1987): 55-62.
- Lagaron, J. M., P. Fernandez-Saiz, and M. J. Ocio. "Using ATR-FTIR Spectroscopy To Design Active Antimicrobial Food Packaging Structures Based on High Molecular Weight Chitosan Polysaccharide." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, no. 7 (2007): 2554-2562.
- LaKind, J. S., A. A. Wilkins, and C. M. Berlin Jr. "Environmental chemicals in human milk: a review of levels, infant exposures and health, and guidance for future research." *Toxicology and Applied Pharmacology* 198, no. 2 (2004): 184-208.
- LaKind, J. S., A. A. Wilkins, and C. M. Berlin Jr. "Environmental chemicals in human milk: a review of levels, infant exposures and health, and guidance for future research." *Toxicology and Applied Pharmacology* 198, no. 2 (2004): 184-208.
- Lands, W. E. M. "Renewed questions about polyunsaturated fatty acids." *Nutr. Rev.* 44 (1986): 285-294.
- Lawrence, R. A. "Biochemistry of Human Milk." In *Breastfeeding (Ninth Edition) - A Guide for the Medical Profession*, by R. A. Lawrence and R. M. Lawrence, 93-144. Elsevier, 2022.

- Lawrence, R. A. "Biochemistry of Human Milk." In *Breastfeeding (Ninth Edition) - A Guide for the Medical Profession*, by R. A. Lawrence and R. M. Lawrence, 93-144. Elsevier, 2022.
- Lawrence, R. A., and R. M. Lawrence. *Breastfeeding: A guide for the medical profession. Eighth Edition*. Philadelphia: Elsevier, 2016.
- Lazzari, E., et al. "Classification of biomass through their pyrolytic bio-oil composition using FTIR and PCA analysis." *Industrial Crops and Products* 111 (2018): 856-864.
- LaKind, J. S., and C. M. Berlin Jr. "Technical workshop on human milk surveillance and research on environmental chemicals in the United States: an overview." *J. Toxicol. Environ. Health*. 65 (2002): 1829-1838.
- Lemaire, M., I. Le Huërou-Luron, S. Blat, and . "Effects of infant formula composition on long-term." *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 2018: 1-17.
- Li, Y. -Q., D. -X. Kong, and H. Wu. "Analysis and evaluation of essential oil components of cinnamon barks using GC–MS and FTIR spectroscopy." *Industrial Crops and Products*, 2013: 269-278.
- Liao, Y., R. Alvarado, B. Phinney, and B. Lonnerdal. "Proteomic characterization of human milk whey proteins during a twelve-month lactation period." *J. Proteome Res.*, 2011: 10(4): 1746-1754.
- Libby, P., P. M. Ridker, and G. K. Hansson. "Inflammation in atherosclerosis:from pathophysiology to practice." *J. Am. Coll. Cardiol*. 54 (2009): 2129-2138.
- Lonnerdal, B. "Human milk proteins: key components for the biological activity of human milk." *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2004: 554: 11-25.
- Lonsdale, D. "A Review of the biochemistry, metabolism and clinical benefits of thiamin(e) and its derivatives." *J. Evid. Base Complement. Altern. Med.*, 2006: 3: 49-59.
- Lordan, R., and I. Zabetakis. "Invited review: The anti-inflammatory properties of dairy lipids." *J. Dairy Sci*. 100 (2017): 4197-4212.
- Lucas, A., R. Morley, T. J. Cole, G. Lister, and C. Leeson-Payne. "Beast milk and subsequent intelligence quotient in children born preterm." *Lancet*, 1992: 339: 261-264.
- Luinge, H. J., E. Hop, E. T. G. Lutz, J. A. Van Hemert, and E. A. M. De Jong. "Determination of the fat, protein and lactose content of milk using Fourier transform infrared spectrometry." *Anal. Chim. Acta* 284 (1993): 419-433.

- Maayan-Metzger, A., S. Avivi, I. Schushan-Eisen, and J. Kuint. "Human Milk Versus Formula Feeding Among Preterm Infants: Short-Term Outcomes." *American Journal of Perinatology*, 2012: 29(2): 121-126.
- Marriott, B. P., D. F. Birt, V. A. Stallings, και A. A. Yates. *Present Knowledge in Nutrition, Eleventh Edition*. London, UK: Academic Press (Elsevier), 2020.
- Martysiak-Żurowska, D., A. Szlagatys-Sidorkiewicz, and M. Zagierski. "Concentrations of alpha-and gamma-tocopherols in human breast milk during the first months of lactation and in infant formulas." *Matern. Child. Nutr.*, 2013: 473-382.
- Mehta, R., and A. Petrova. "Biologically active breast milk proteins in association with very preterm delivery and stage of lactation." *J. Perinatol.* 31 (2011): 58-62.
- Merck. «IR Spectrum Table & Chart.» *Merck KGaA, Darmstadt Web site*. 2022. <https://www.sigmaaldrich.com/GR/en/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/photometry-and-reflectometry/ir-spectrum-table> (πρόσβαση 4 14, 2022).
- Mohammadzadeh, A., A. Farhat, και H. Esmaeily. «The effect of breast milk and lanolin on sore nipples.» *Saudi Med. J.*, 2005: 26: 1231-1234.
- Morceli, G., et al. "Diabetes induced immunological and biochemical changes in human colostrum." *Acta Paediatrica* 100, no. 4 (2011): 550-556.
- Mossberg, A. K., B. Wult, L. Gustafsson, W. Mansson, E. Ljunggren, and C. Svanborg. "Bladder cancers respond to intravesical instillation of HAMLET (human alpha-lactalbumin made lethal to tumor cells)." *Int. J. Cancer.*, 2007: 121(6): 1352-1359.
- Neville, M. C., R. P. Keller, J. Seacat, C. E. Casey, J. C. Allen, and P. Archer. "Studies on human lactation. I. Within-feed and between-breast variation in selected components of human milk." *Am. J. Clin. Nutr.* 40 (1984): 635-646.
- Nommsen, L. A., C. A. Lovelady, M. J. Heinig, B. Lönnerdal, and K. G. Dewey. "Determinants of energy, protein, lipid, and lactose concentrations in human milk during the first 12 mo of lactation: the DARLING Study." *Am. J. Clin. Nutr.* 53 (1991): 457-465.
- Nommsen, L. A., C. A. Lovelady, M. J. Heinig, B. Lonnerdal, and K. G. Dewey. "Determinants of energy, protein, lipid, and lactose concentrations in human milk during the first 12 mo of lactation: the DARLING Study." *Am. J. Clin. Nutr.*, 1991: 53(2):457-465.
- Norén, K., και D. Meironyté. «Certain organochlorine and organobromine contaminants in Swedish human milk in perspective of past 20–30 years.» *Chemosphere* 40 (2000): 1111-1123.

- Office of Dietary Supplements. "National Institutes of Health." *U.S. Department of Health & Human Services*. August 20, 2018. <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Riboflavin-HealthProfessional/> (accessed February 17, 2022).
- Owen, C. G., et al. "Does initial breastfeeding lead to lower blood cholesterol in adult life? A quantitative review of the evidence." *Am. J. Clin. Nutr.* 88 (2008): 305-314.
- Pérez-Escalante, E., et al. "Human milk oligosaccharides as bioactive compounds in infant formula: recent advances and trends in synthetic methods." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2020: 1-34.
- Perkins, S. J., K. F. Smith, S. C. Williams, P. I. Haris, D. Chapman, and R. B. Sim. "The Secondary Structure of the von Willebrand Factor type A Domain in Factor B of Human Complement by Fourier Transform Infrared Spectroscopy: Its Occurrence in Collagen Types VI, VII, XII and XIV, the Integrins and Other Proteins by Averaged Structure P." *Journal of Molecular Biology* 238, no. 1 (1994): 104-119.
- Perrin, M. T., J. Festival, S. Starks, L. Mondeaux, E. A. Brownell, and A. Vickers. "Accuracy and Reliability of Infrared Analyzers for Measuring Human Milk Macronutrients in a Milk Bank Setting." *Current Developments in Nutrition* 3, no. 11 (2019): 116.
- Pietrzak-Fiecko, R. "The correlation between chlorinated hydrocarbons and the fatty acids composition in milk fat." *J. Vet. Res.* 74 (2018): 71-78.
- Pietrzak-Fiećko, R., and A. M. Kamelska-Sadowska. "The Comparison of Nutritional Value of Human Milk with Other Mammals' Milk." *Nutrients* 12, no. 5 (2020): 1404.
- Plesofsky, N. S. "Pantothenic acid." In *Handbook of Vitamins*, by R. Rucker, J. W. Suttie, D. B. McCormick and L. J. Machlin, 317-338. New York, U.S.A.: Marcel Dekker Inc., 2001.
- Pytasz, U. "The Content of Fatty Acids and Triacylglycerols in Milk of Polish Mothers in Different Stages of Lactation and the Problem of This Content in the Case of Infant Formula Creation." Ph.D. Thesis, Gdańsk University of Technology, Gdańsk, Poland, 1999.
- Radbill, S. X. "Infant feeding through the ages." *Clin. Pediatr. (Phila.)*, 1981: 20(10): 613-621.
- Ramer, G., and B. Lendl. "Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy." In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, by R. Meyers and R. Meyers. Hoboken, U.S.A.: John Wiley & Sons, 2013.
- Ramos-Garcia, V., et al. "ATR-FTIR spectroscopy for the routine quality control of exosome isolations." *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2021.

- Ras, R. T., M. T. Streppel, R. Draijer, and P. L. Zock. "Flow-mediated dilation and cardiovascular risk prediction: A systematic review with meta-analysis." *Int. J. Cardiol.* 168 (2013): 344-351.
- Rath, E. M., et al. "Structure and Potential Cellular Targets of HAMLET-like Anti-Cancer Compounds made from Milk Components." *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 2015: 18(4): 773-824.
- Rodriguez-Saona, L. E., and M. E. Allendorf. "Use of FTIR for Rapid Authentication and Detection of Adulteration of Food." *Annual Review of Food Science and Technology* 2 (2011): 467-483.
- Rogers, L. K., C. J. Valentine, and S. A. Kaim. "DHA supplementation: Current implications in pregnancy and childhood." *Pharmacol. Res.* 70 (2013): 13-19.
- Ronayne de Ferrer, P. A., A. Baroni, M. E. Sambucetti, N. E. López, and J. M. Ceriani Cernadas. "Lactoferrin levels in term and preterm milk." *J. Am. Coll. Nutr.* 19 (2000): 370-373.
- Rosenberg, K. D., C. A. Eastham, L. J. Kasehagen, and A. P. Sandoval. "Marketing Infant Formula Through Hospitals: the Impact of Commercial Hospital Discharge Packs on Breastfeeding." *American Journal of Public Health*, 2008.
- Roughead, Z. K., and D. B. McCormick. "Flavin composition of human milk." *Am. J. Clin. Nutr.* 52 (1990): 854-857.
- Rutkowska, J., A. Adamska, and M. Bialek. "The comparison of fatty acids composition in mare's and cow's milk fat." *Żywn Nauka Technol. Jakość* 74 (2011): 28-38.
- Sakurai, T., M. Furukawa, M. Asoh, T. Kanno, T. Kojima, and A. Yonekubo. "Fat-soluble and water-soluble vitamin contents of breast milk from Japanese women." *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, 2005: 239-247.
- Salem, N. Jr., and P. Van Dael. "Arachidonic acid in human milk." *Nutrients* 12 (2020): 626.
- Salminen, S., B. Stahl, G. Vinderola, and H. Szajewska. "Infant Formula Supplemented with Biotics: Current Knowledge and Future Perspectives." *Nutrients* 12, no. 7 (2020): 1952.
- Sanadgol Nezami, M., A. Feizbakhsh, and A. Bagheri Garmarudi. "Detection of Soybean Powder and Rice Flour Adulterations in Premature Formula by ATR-FTIR Spectroscopy and Chemometrics." 45 (2021): 857-865.
- Schanler, R. J. "Outcomes of Human Milk-Fed Premature Infants." *Seminars in Perinatology*, 2011: 35(1): 29-33.

- Schwaighofer, A., M. Brandstetter, and B. Lendl. "Quantum Cascade Lasers (Qcls) in Biomedical." *Chem. Soc. Rev.* 46, no. 19 (2017): 5903-5924.
- Sever, O., D. Mandel, F. B. Mimouni, R. Marom, S. Cohen, and R. Lubetzky. "Macronutrients in human milk: colostrum lactose but not fat or protein predicts mature human milk content." *Infant Child Adolesc. Nutr.* 7, no. 3 (2015): 162-165.
- Simon, J. F. *De lactis mvliebris ratione chemica et physiologica*. Berlin, Germany: Berolini Reichardt, 1838.
- Sinanoglou, V. J., et al. "Factors affecting human colostrum fatty acid profile: A case study." *PLoS One* 12, no. 4 (2017): e0175817.
- Singh, M., R. Sharma, S. Ranvir, K. Gandhi, and B. Mann. "Profiling and distribution of minerals content in cow, buffalo and goat milk." *Indian J. Dairy Sci.* 72 (2019): 480-488.
- Smith, D. «Worldwide trends in DDT levels in human breast milk.» *Int. J. Epidemiol.* 28 (1999): 179-188.
- Solís-Oba, M., O. Teniza-García, M. Rojas-López, R. Delgado-Macuil, J. Díaz-Reyes, and R. Ruiz. "Application of infrared spectroscopy to the monitoring of lactose and protein from whey after ultra and nano filtration process." *J. Mex. Chem. Soc.*, 2011: 190-193.
- Solomon, G. M., και P. M. Weiss. «Chemical contaminants in breast milk: time trends and regional variability.» *Environ. Health Perspect.* 110 (2002): 339-347.
- Stahl, B., J. Jelinek, H. Bockler, and G. Bochm. "Carbohydrates in human milk and formulas." *Bambini e Nutrizione*, 1999: 6(4): 141-145.
- Stevens, E. E., T. E. Patrick, and R. Pickler. "A History of Infant Feeding." *The Journal of Perinatal Education*, 2009: 18(2).
- Stuetz, W., et al. "Micronutrient status in lactating mothers before and after introduction of fortified flour: cross-sectional surveys in Maela refugee camp." *Eur. J. Nutr. Epub.*, 2011.
- Šuligoj, T., et al. "Effects of Human Milk Oligosaccharides on the Adult Gut Microbiota and Barrier Function." *Nutrients*, 2020: 12(9): 2808.
- Surewicz, W. K., H. H. Mantsch, and D. Chapman. "Determination of Protein Secondary Structure by Fourier Transform Infrared Spectroscopy: A Critical Assessment." *Biochemistry* 32, no. 2 (1993).
- Svensson, M., και συν. «Hamlet--a complex from human milk that induces apoptosis in tumor cells but spares healthy cells.» *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2002: 503: 125-132.

- Sweetman, L. "Pantothenic acid." In *Present Knowledge in Nutrition*, by J. W. Erdman, I. A. Macdonald and S. H. Zeisel, 375-390. Washington DC: Wiley-Blackwell, 2012.
- Ten-Doménech, I., E. Beltran-Iturat, J. M. Herrero-Martínez, J. V. Sancho-Llopis, and E. F. Simo-Alfonso. "Triacylglycerol Analysis in Human Milk and Other Mammalian." *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 63, no. 24 (2015): 5761-5770.
- Thai, J. D., and K. E. Gregory. "Bioactive Factors in Human Breast Milk Attenuate Intestinal Inflammation during Early Life." *Nutrients* 12, no. 2 (2020): 581.
- Thakore, V., and N. K. Jain. "Protein and fat examination from the raw milk of different mammalian species (Cow, buffalo, goat, and human) with successive lactation days." *Pharma Innov.* 7 (2018): 506-510.
- Thurl, S., M. Munzert, G. Boehm, C. Matthews, and B. Stahl. "Systematic review of the concentrations of oligosaccharides in human milk." *Nutr. Rev.* 75 (2017): 920-933.
- Timby, N., E. Domellöf, O. Hernell, B. Lönnerdal, and M. Domellöf. "Neurodevelopment, nutrition, and growth until 12 mo of age in infants fed a low-energy, low-protein formula supplemented with bovine milk fat globule membranes: a randomized controlled trial." *American Journal of Clinical Nutrition* 99 (2014): 860-868.
- Trumbo, P. R. "Pantothenic acid." In *Modern Nutrition in Health and Disease*, by A. C. Ross, B. Caballero and R. J. Cousins, 351-357. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2014.
- Uauy, P. D., D. G. Birch, E. E. Birch, J. E. Tyson, and D. R. Hoffmann. "Effect of dietary fatty acids on retinal function of very-low-birth weight neonates." *Pediatr. Res.* 28 (1990): 485-492.
- Ubbink, J. B. «Vitamin B 6.» Στο *Modern Chromatographic Analysis of Vitamins*, του/της Α. P. De Leenheer, Α. P. Lambert και J. F. Van Bocxlaer, 435 - 478. New York, U.S.A.: Marcel Dekker Inc., 2000.
- Urashima, T., J. Hirabayashi, S. Sato, and A. Kobata. "Human Milk Oligosaccharides as Essential Tools for Basic and Application Studies on Galectins." *Trends Glycosci. Glycotechnol.* 30 (2018): 11-24.
- Valand, R., S. Tanna, G. Lawson, and L. Bengtstrom. "A review of Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy used in food adulteration and authenticity investigations." *Food Additives & Contaminants: Part A* 37, no. 1 (2020): 19-38.

- Valderrama, A. C. S. V., and G. C. R. De. "Traceability of Active Compounds of Essential Oils in Antimicrobial Food Packaging Using a Chemometric Method by ATR-FTIR." *American Journal of Analytical Chemistry* 8, no. 11 (2017): 16.
- Vohr, B. R., B. B. Poindexter, and A. M. Dusick. "Neonatal Research Network. Beneficial effects of breast milk in the neonatal intensive care unit on the developmental outcome of extremely low birth weight infants at 18 months of age." *Pediatrics*, 2006: 118: 115-123.
- Wack, R. P., E. L. Lien, D. Taft, and J. D. Roscelli. "Electrolyte composition of human breast milk beyond the early postpartum period." *Nutrition* 13 (1997): 774-777.
- Walker, W. A., and R. S. Iyengar. "Breast milk, microbiota, and intestinal immune homeostasis." *Pediatr. Res.* 77 (2014): 220-228.
- Wang, L., et al. "Effects of different oligosaccharides at various dosages on the composition of gut microbiota and short-chain fatty acids in mice with constipation." *Food & Function*, 2017: 5.
- Wang, S., et al. "Targeting the gut microbiota to influence brain development and function in early life." *Neurosci. Biobehav. Rev.* 95 (2018): 191-201.
- Wegh, C. A., S. Y. Geerlings, J. Knol, G. Roeselers, and C. Belzer. "Postbiotics and Their Potential Applications in Early Life Nutrition and Beyond." *Int.Mol. Sci.* 20 (2019): 4673.
- West, K. D., and A. Kirksey. "Influence of vitamin B6 intake on the content of the vitamin in human milk." *Am. J. Clin. Nutr.* 29 (1976): 961-969.
- Whitfield, K. C., et al. "Macro- and Micronutrients in Milk from Healthy Cambodian Mothers: Status and Interrelations." *The Journal of Nutrition* 150, no. 6 (2020): 1461-1469.
- WHO. "Breastfeeding." *World Health Organization Web Page*. 2022. www.who.int/health-topics/breastfeeding (accessed March 29, 2022).
- Wiciński, M., E. Sawicka, J. Gębalski, K. Kubiak, and B. Malinowski. "Human Milk Oligosaccharides: Health Benefits, Potential Applications in Infant Formulas, and Pharmacology." *Nutrients*, 2020: 12(1): 266.
- Wilcox, K. E., E. W. Blanch, and A. J. Doig. "Determination of Protein Secondary Structure from Infrared Spectra Using Partial Least-Squares Regression." *Biochemistry* 55, no. 27 (2016): 3794-3802.
- Williams, R. J., C. M. Lyman, G. H. Goodyear, J. H. Truesdail, and D. Holaday. "Pantothenic acid, a growth determinant of universal biological occurrence." *Journal of the American Chemical Society*, 1933: 55: 2912-2927.

- Wise, A., et al. "Infants Are Exposed to Human Milk Oligosaccharides Already in utero." *Front. Pediatr.* 6 (2018): 270.
- Witkowska-Zimny, M., E. Kaminska-El-Hassan, and E. Wrobel. "Milk Therapy: Unexpected Uses for Human Breast Milk." *Nutrients*, 2019: 11(5): 944.
- Wolf, J. B. *Is Breast Best?* New York, U.S.A.: New York University Press, 2010.
- Wolf, J. H. "Low Breastfeeding Rates and Public Health in the United States." *American Journal of Public Health*, 2003.
- World Health Organization. «Levels of PCBs, PCDDs and PCDFs in Human Milk. Protocol for Third Round of Exposure Studies.» *World Health Organization European Centre for Environment and Health*. Geneva, Switzerland, 2000.
- Xiao, L., et al. "The Combination of 2'-Fucosyllactose with Short-Chain Galacto-Oligosaccharides and Long-Chain Fructo-Oligosaccharides that Enhance Influenza Vaccine Responses Is Associated with Mucosal Immune Regulation in Mice." *J. Nutr.* 149 (2019): 856-869.
- Xun, P., Y. Wu, Q. He, and K. He. "Fasting insulin concentrations and incidence of hypertension, stroke, and coronary heart disease: A meta-analysis of prospective cohort studies." *Am. J. Clin. Nutr.* 98 (2013): 1543-1554.
- Zhao, P., et al. "Differences in the Triacylglycerol and Fatty Acid Compositions of Human Colostrum and Mature Milk." *J. Agric. Food Chem.*, 2018: 66(17): 4571-4579.
- Zhu, Y., W. Zhang, and W. Mu. "Zhu, Y., Zhang, W., & Mu, W. (2022). Human Milk Oligosaccharides: The New Gold Standard for Premium Infant Formula." *J. Agric. Food Chem.*, 2022: 70(7): 2061-2063.
- Zwierzchowski, G., and B. N. Ametaj. "Mineral elements in the raw milk of several dairy farms in the Province of Alberta." *Foods* 8 (2019): 345.
- Eitenmiller, R. R., and W. O. Landen Jr. *Vitamin Analysis for the Health and Food Sciences*. Athens, GA: CRC Press LLC, 1999.
- Hamdan, I. J. A., L. M. Sanchez-Siles, G. Garcia-Llatas, and M. J. Lagarda. "Sterols in infant formulas: a bioaccessibility study." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66 (2018): 1377-1385.
- Hampel, D., D. K. Dror, and L. H. Allen. "Micronutrients in Human Milk: Analytical Methods." *Advances in Nutrition*, 2018: 9(1) 313-331.

- Kamelska, A. M., R. Pietrzak-Fiećko, and K. Bryl. "Determination of cholesterol concentration in human milk samples using attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy." *J. Appl. Spectrosc.* 80 (2013): 148-152.

○

Παράρτημα

Πίνακας 18: Ποσοστό νόσησης

Νόσος	Αριθμός δειγμάτων	Ποσοστό Δειγμάτων
Ναι	11	25.00%
Όχι	33	75.00%
Σύνολο	44	100.00%

Πίνακας 19: Ποσοστά φύλων

Φύλο	Αριθμός δειγμάτων	Ποσοστό Δειγμάτων
Άρρεν	26	59.09%
Θήλυ	18	40.91%
Σύνολο	44	100.00%

Πίνακας 20: Ποσοστά επιπλοκών κύησης

Επιπλοκές Κύησης	Αριθμός δειγμάτων	Ποσοστό Δειγμάτων
Όχι	24	54.55%
Σακχαρώδης Διαβήτης Κύησης	9	20.45%
Θυρεοειδοπάθεια Κύησης	9	20.45%
IUGR	1	2.27%
Προεκλαμψία	1	2.27%
Σύνολο	44	100.00%

Πίνακας 21: Ποσοστά διδύμου κύησης

Δίδυμος Κύησης	Αριθμός δειγμάτων	Ποσοστό Δειγμάτων
Ναι	1	2.27%
Όχι	43	97.73%
Σύνολο	44	100.00%

Πίνακας 22: Ποσοστά υποκείμενης νόσησης

Υποκείμενα Νοσήματα	Αριθμός δειγμάτων	Ποσοστό Δειγμάτων
Όχι	28	63.64%
Υποθυρεοειδισμός	9	20.45%
Hashimoto	4	9.09%
Δισλιπιδαιμία	1	2.27%
Ερυθρηματώδες Εξάνθημα	1	2.27%
Ψωρίαση	1	2.27%
Σύνολο	44	100.00%

Πίνακας 23: Ποσοστά εμβολιασμού κατά του COVID-19

Εμβολιασμός	Αριθμός δειγμάτων	Ποσοστό Δειγμάτων
Ναι	32	72.73%
Όχι	12	27.27%
Σύνολο	44	100.00%

Πίνακας 24: Ποσοστά φαρμακευτικής αγωγής προ κύησης

Φαρμακευτική Αγωγή προ Κύησης	Αριθμός δειγμάτων	Ποσοστό Δειγμάτων
Ναι	14	31.82%
Όχι	30	68.18%
Σύνολο	44	100.00%

Πίνακας 25: Ποσοστά φαρμακευτικής αγωγής μετά κύηση δειγμάτων

Φαρμακευτική Αγωγή μετά Κύηση	Αριθμός δειγμάτων	Ποσοστό Δειγμάτων
Ναι	34	77.27%
Όχι	10	22.73%
Σύνολο	44	100.00%

Πίνακας 26: Ποσοστά ημέρας λήψης δειγμάτων

Ημέρα Λήψης Μητρικού Γάλακτος	Αριθμός δειγμάτων	Ποσοστό Δειγμάτων
2η μέρα	1	2.27%
3η μέρα	19	43.18%
4η μέρα	20	45.45%
6η μέρα	1	2.27%
7η μέρα	1	2.27%
Άγνωστο	2	4.55%
Σύνολο	44	100.00%