

VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETO
FIZIOLOGIJOS, BIOCHEMIJOS, MIKROBIOLOGIJOS IR
LABORATORINĖS MEDICINOS KATEDRA

MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS

PASTERIZACIJOS ĮTAKA MOTINOS PIENO BALTYMAMS

Magistrantė AKVILĖ VOSKAITĖ _____
(parašas)

Darbo vadovė

hab. dr., A. Eidukaitė _____
(parašas)

VU MF Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir
laboratorinės medicinos katedros vedėja

Doc. dr. D. Karčiauskaitė leidžiama ginti _____
(parašas)

Darbo įteikimo data _____

Registracijos Nr. _____

2019 m., Vilnius

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju savo darbo vadovei Audronei Eidukaite už suteiktą pagalbą, žinias ir konsultacijas ruošiant baigiamąjį darbą.

Taip pat dėkoju Daivai Dambrauskienei ir Evelinai Gorbikovai už pagalbą atsakant į iškilusius klausimus atliekant baigiamojo darbo tyrimą VšĮ VULSKF Vaikų ligoninėje.

SANTRAUKA

Pasterizacijos įtaka motinos pieno baltymams

Akvilė Voskaitė

Magistro baigiamasis darbas

Darbas atliktas VšĮ VULSKF Vaikų ligoninėje nuo 2018 m. rugsėjo mėn. iki 2019 m. kovo mėn. Darbo apimtis: 50 puslapių, jame panaudoti 58 literatūros šaltiniai ir 24 paveikslai.

Darbo tikslas: išanalizuoti motinų, pagimdžiusių neišnešiotus naujagimius (< 32 sav. gestacinio amžiaus, < 1500 g gimimo svorio) ir išnešiotus naujagimius mikrobiologinę pieno sudėtį, bei jame esančių bioaktyvių baltymų laktoferino ir lizocimo koncentracijų skirtumus ir įvertinti pasterizacijos įtaką šioms medžiagoms.

Darbo uždaviniai:

1. Įvertinti ar bakterijų augimas pieno mėginiuose priklauso nuo kūdikio išnešiojimo laiko.
2. Įvertinti motinos piene esančių baltymų sudėties skirtumus priklausomai nuo kūdikio išnešiojimo laiko.
3. Nustatyti pasterizacijos įtaką laktoferino ir lizocimo koncentracijai motinos piene.

Tyrimo metodika: tyrimo metu buvo surinkti 42 pieno ėminiai, tarp kurių 22 buvo motinų, pagimdžiusių neišnešiotus naujagimius ir 20- pagimdžiusių išnešiotus naujagimius. Tyrimo metu buvo atlikti šių mėginių mikrobiologiniai pasėliai- išsiaiškinti mėginiuose esančių bakterijų augimą ir jų korealiaciją su kūdikio išnešiojimo laiku. Toliau buvo nustatytos laktoferino ir lizocimo koncentracijos, priklausomai nuo kūdikio išnešiojimo laiko, bei pasterizacijos įtaka jiems naudojant imunofermentinį ELISA metodą, atliekant tyrimus su komerciniais Human Lactoferrin ELISA ir CircuLex Human Lysozyme ELISA rinkiniais.

Rezultatai ir išvados: pieno pasėlyje išaugo leistini kiekiai plazmos nekoaguliuojančių *Staphylococcus* spp. (10^3 - 10^4 KSV/ml) ir *Staphylococcus aureus* (iki 10^5 KSV/ml) bakterijų. Jų augimas nėra susijęs su kūdikio išnešiojimo laiku. Laktoferino ($p=0,198$) ir lizocimo ($p=0,375$) koncentracijos nepriklauso nuo naujagimio išnešiojimo laiko. Pasterizacija reikšmingai sumažino laktoferino ir lizocimo koncentracijas pieno mėginiuose. Laktoferino sumažėjo- nuo 2,9 mg/ml iki 0,01 mg/ml (99%, $p<0,0001$). Lizocimo- nuo 12,4 μ g/ml, iki 7,8 μ g/ml (37%, $p<0,0001$).

SUMMARY

Impact of pasteurization on the proteins of breast milk

Akvilė Voskaitė

Master's Thesis

Thesis was completed at VšĮ VULSKF Vaikų ligoninė from September of 2018 to March of 2019. Volume of the work : 50 pages with 58 sources of literature used and 24 pictures included.

Aim of the work: to analyze microbiological content and concentrations of bioactive proteins– lactoferrin and lysozyme of human milk in women who had a preterm birth (<32 weeks, <1500g weight) and in women who had a term birth and to evaluate the impact of pasteurization on analyzed proteins.

Objectives of the work:

1. Evaluate if bacterial growth in human milk depends on pregnancy duration.
2. To analyze differences between proteins of human milk depending on pregnancy duration.
3. To indicate the impact of pasteurization on lactoferrin and lysozyme concentrations in human milk.

Methodology of the work: In this study 42 human milk samples were collected. 22 were from mothers who gave preterm birth and 20 who gave term birth. Milk culture analysis was done to evaluate bacterial growth and its correlation with pregnancy duration. After that concentration dependance on prematurity of birth and impact of pasteurization on lactoferrin and lysozyme was evaluated by using immunoenzymatic method with commercial Human Lactoferrin ELISA ir CircuLex Human Lysozyme ELISA sets.

Results and conclusions: Accepted amount of milk cultures were colonized by coagulase-negative *Staphylococcus* spp. (10^3 - 10^4 CFU/ml) and *Staphylococcus aureus* ($<10^5$ CFU/ml) bacterias. Their growth does not correlate with pregnancy duration. Lactoferrin ($p= 0,198$) and lysozyme ($p= 0,375$) concentrations do not correlate with prematurity of birth. Pasteurization of human milk decreases both lactoferrin and lysozyme concentrations from 2,9 mg/ml to 0,01 mg/ml (99%, $p< 0,0001$) and from 12,4 μ g/ml to 7,8 μ g/ml (37%, $p< 0,0001$) respectively.

TURINYS

SANTRUMPOS.....	7
ĮVADAS	8
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	10
1.1. Motinos pienas	10
1.2. Pieno gamybos ir sekrecijos refleksų lankai	11
1.3. Laktogenezės etapai	11
1.4. Motinos pieno sudėtis	12
1.4.1. Motinos pieno riebalai	13
1.4.2. Motinos pieno angliavandeniai	14
1.4.3. Motinos pieno mikroorganizmai ir kūdikio imuninė sistema	15
1.4.4. Motinos pieno baltymai	17
1.4.4. Motinos pieno vitaminai, biologiškai aktyvūs ir imunologiniai faktoriai	22
1.5. Pieno bankai pasaulyje ir Lietuvoje	24
1.5.1 Donorinis motinos pienas- antro pasirinkimo maistas.....	24
1.5.2. Donorinio pieno kelias.....	25
1.6. Pieno pasterizacija.....	26
1.7. Neišnešiotų naujagimių mityba.....	28
2. Tiriamoji medžiaga ir metodai.....	30
2.1. Tyrimo objektas, vieta ir laikas	30
2.2. Tyrimo kriterijai.....	30
2.3. Tyrimo metodai	31
2.4. Ėminių paruošimas	32
2.4.1. Pieno ėminių paruošimas	32
2.4.2. Laktoferino standartinių mėginių paruošimas	33

2.4.3. Lizocimo standartinių mėginių paruošimas	34
2.4.4. Reagentų paruošimas	34
2.5. Tyrimo atlikimas	34
2.5.1. Pieno pasėlio tyrimo eiga ir vertinimas	34
2.5.2. Laktoferino ir lizocimo tyrimo eiga.....	36
2.6. Tyrimo glaudumo įvertinimas.....	38
2.7. Statistinė duomenų analizė.....	39
3. TYRIMO REZULTATAI.....	40
3.1. Tiriamųjų grupių ypatybės.....	40
3.2. Pieno mikrobiotos nustatymas	40
3.3. Laktoferino koncentracijos nustatymas.....	43
3.4. Lizocimo koncentracijos nustatymas	44
4. REZULTATŲ APTARIMAS.....	47
5. IŠVADOS	49
6. REKOMENDACIJOS	50
LITERATŪROS ŠALTINIAI	51

SANTRUMPOS

ALA- L- alaninas

APA- Amerikos pediatrijos akademija

ARA- arachidono rūgštis

CMV- citomegalo virusas

DHA- dekozaheksaeno rūgštis

HBV- hepatitas B

HCV- hepatitas C

HoP- Holder pasterizacija

HSV- *Herpes simplex* virusas

IgA- imunoglobulinas A

IGF- augimo faktorius

IL-1- interleukinas-1

IMBI- (angl. *The International Milk Bankin Initiative*. liet. *Tarptautinė Pieno Bankų Inicatyva*)

MP- motinos pienas

PRG- pieno-riebalų globulės

PRL- prolaktinas

PSO- Pasaulinė Sveikatos Organizacija

sIgA- sekretinis imunoglobulinas A

VL- Vaikų ligoninė

ŽIV- žmogaus imunodeficito virusas

IVADAS

Motinos pienas- tai vertingiausias maistas kūdikiui. Jo sudėtis yra labai įvairi: maistinės medžiagos- riebalai, angliavandeniai, baltymai, taip pat bioaktyvūs komponentai- imuniniai, augimo faktoriai. Dėl tokios įvairiapusiškos pieno sudėties, jis yra ne tik pagrindinis naujagimio maistas, užtikrinantis kūdikio augimą ir vystymąsi, bet ir vaistas. Motinos piene esantys oligosacharidai padeda suformuoti iš sterilios aplinkos atėjusio vaiko žarnyno mikroflorą. Tik gimusiam naujagimiui motinos pienas suteikia imunitetą, kovoti su galimai pasitaikančiomis bakterijomis ir virusais. Kūdikiai, besimaitinantys motinos pienu, turi mažesnę riziką vėlesniame gyvenime susirgti antro tipo diabetu, širdies ligomis. Taip pat mažesnė rizika pogimdyvinei sepsio infekcijai. Vieni svarbiausių motinos piene esančių baltymų: laktoferinas ir lizocimas pasižymi apsaugine funkcija. Jie veidami tiek atskirai, tiek kartu, užtikrina kūdikio organizmo apsaugą nuo patogenų: bakterijų, virusų, grybų bei užtikrina sveiką žarnyno mikrobiotą. Visų šių medžiagų koncentracijos motinos piene lyginant su kitų žinduolių pienu yra didžiausios, taigi toks pienas kūdikiui yra nepakeičiamas maisto šaltinis.

2017 metų duomenimis pasaulyje iš 10 naujagimių vienas gimsta neišnešiotas. Lietuvoje šie skaičiai siekia 6 kūdikius iš 1000 gimstančiųjų. Neišnešioti naujagimiai- tai gimę anksčiau negu 32 gestacinio amžiaus savaitė ir sveriantys mažiau negu 1500 gramų. Tokiems kūdikiams yra reikalinga speciali priežiūra ir mityba dėl iki galo neišsivysčiusių organizmo sistemų. Dažnai prieš laiką gimdančios moterys patiria didžiulį stresą ir pieno sintezės pradžia užsitęsia, dėl ko kūdikis negali gauti jo vystymuisi reikalingų medžiagų. Tokiu atveju padeda sparčiai populiarėjantys pieno bankai. Lietuvoje pirmasis pieno bankas atidarytas Kaune, 2016 metais, o 2017 m.- Vilniuje. Pieno banko tikslas yra aprūpinti neišnešiotus ir sergančius naujagimius motinos pienu, kol gimdyvė sulauks savojo pieno, arba jeigu dėl tam tikrų priežasčių motina negali maitinti pati. Kad donorių pienas būtų saugus kūdikiams, prieš tai jis yra ištiriamas, apdorojamas- pasterizuojamas. Pasterizacijos poveikis šiomis dienomis yra plačiai aptarinėjama tema, dėl galimo naudingųjų medžiagų koncentracijos sumažėjimo. Be pasterizuoto pieno sudėties pokyčių, dar viena problema susijusi su neišnešiotų naujagimių mityba yra ta, kad nei savos motinos pienas, nei donorinis, dažniausiai gaunamas kaip brandus pienas, nesuteikia kūdikiui reikiamo kiekio medžiagų, kompensuoti jo priešlaikinį gimimą ir medžiagas, kurių jis būtų gavęs per placentą. Todėl kūdikiams į pieną yra pridedami papildomi medžiagų komponentai. Tačiau nežinant kiek ir kokių medžiagų kūdikis suvartoja su motinos pienu yra neįmanoma nustatyti, ko jam trūksta iki

pilnavertės mitybos. Atlikus moterų pieno analizę, galima nustatyti pieno sudėties standartą, įvertinti individualaus kūdikio suvartojamų medžiagų kiekį ir parinkti trūkstamas papildomas medžiagas, taip praturtinant kiekvieno kūdikio mitybą, atsižvelgiant į jo poreikį ir padedant jam augti bei formuoti jo imuninę sistemą bei mikrobiotą. Kadangi vieni svarbiausių baltymų, susijusių su kūdikių apsaugojimu nuo patogenų ir mikrofloros kūrimu yra laktoferinas ir lizocimas, aš, savo magistro baigiamajame darbe, sieksiu išsiaiškinti jų koncentracijas motinos piene išnešiojus ir per anksti pagimdžius naujagimį, o taip pat pasterizacijos poveikį šioms medžiagoms.

Darbo tikslas: išanalizuoti motinų, pagimdžiusių neišnešiotus naujagimius (< 32 sav. gestacinio amžiaus, < 1500 g gimimo svorio) ir išnešiotus naujagimius mikrobiologinę pieno sudėtį, bei jame esančių bioaktyvių baltymų laktoferino ir lizocimo koncentracijų skirtumus ir įvertinti pasterizacijos įtaką šioms medžiagoms.

Uždaviniai:

1. Įvertinti ar bakterijų augimas pieno mėginiuose priklauso nuo kūdikio išnešiojimo laiko.
2. Įvertinti motinos piene esančių baltymų sudėties skirtumus priklausomai nuo kūdikio išnešiojimo laiko.
3. Nustatyti pasterizacijos įtaką laktoferino ir lizocimo koncentracijai motinos piene.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Motinos pienas

Motinos pienas – tai pieno liaukų, esančių moters krūtyse sekretas, kūdikiui maitintis. Praėjus 2-5 dienoms po gimdymo išsiskiria gelsvas, tirštas skystis vadinamas priešpieniu. Jame yra mažai mitybinių, bet daug apsauginių medžiagų, vitaminų ir augimo faktorių. Po jo seka skystesnis, pereinamasis pienas su daug riebiųjų rūgščių, reikalingų nervų sistemos vystymuisi. Šio pieno sudėtis stabilizuojasi 2-3 savaitę ir iki žindymo galo kūdikis maitinasi brandžiu motinos pienu su visais apsauginiais ir brandinančiais faktoriais. Maždaug 2-3 gyvenimo metais prasideda panašaus į priešpienį pieno gaminimas, kuriame dominuoja tik apsauginiai faktoriai. Sveikai motinai per parą pasigamina 1,0-1,5 l pieno. 100 mililitrų energetinė vertė – 60-75kcal, 0,9- 1,2 g baltymų, 3,2-3,6 g riebalų ir 6,7- 7,8 g laktozės [1]. Švedų gydytojas Nils Rosen Rozenstein 1776 m. yra pasakęs: „Vaikas turi gauti pakankamą kiekį gero maisto, kad galėtų gerai augti. Tinkamiausias maistas, be abejo, yra motinos pienas. Jis geriau negu bet kas kitas skatina greitesnį mekonijaus išsiskyrimą, saugo vaiką nuo daugelio negalavimų ir padeda įgyti tikrą moralę ir charakterį.“

Pirmasis pasirodęs pienas yra vadinamas priešpieniu. Nors jo mitybinė vertė nėra svarbiausias šio pieno bruožas (tai parodo mažas laktozės kiekis), dėl jame esančių imunoglobulinų A (IgA), augimo faktorių, leukocitų, laktoferino ir vitaminų, priešpienis yra be galo svarbus kūdikiui formuoti imunitetą, ir apsisaugoti nuo įvairių ligų. Be apsauginės funkcijos priešpienis yra svarbus šalinant mekonijų. Priešpienis skatina pasišalinti pirmosioms naujagimio išmatoms, ko nepadarus kyla grėsmė susirgti gelta [5]. Taip pat priešpienyje yra epidermio augimą skatinančios medžiagos, jos svarbios apsaugant žarnyną bei prisidedant prie jo vystymosi. Lyginant su brandžiu pienu, priešpienyje yra daugiau natrio, chloridų ir magnio, tačiau mažiau kalio ir kalcio.

Brandusis pienas atsiranda 2-3 savaitę ir tęsiasi iki žindymo galo. Kaip ir priešpienyje, brandžiame piene yra gausu imuninių faktorių, formuojančių jo imunitetą. Mamos organizme esantys antikūnai (Ak) jai sergant ar persirgus kokia nors liga, pateks į pieną ir bus perduoti mažyliui. Be imuninių faktorių čia yra hormonų, reikalingų reguliuoti organų veiklą ir daug maistinių medžiagų: riebalų, angliavandenių, baltymų. Šių medžiagų kiekis yra būtent toks, kokio reikia vaikui vystytis ir augti [6].

1.2. Pieno gamybos ir sekrecijos refleksų lankai

Motinai pagimdžius kūdikį, jos krūties liaukiniame audinyje stimuliuojant hormonams, pradeda gamintis pienas. Jis latakais teka iki prieš spenelį esančių alveolių, kur yra kaupiamas. Susikaupus pienui, jis teka iki spenelio mažų angučių, atsiveriančių spenelio viršūnėlėje. Kad taip nutiktų, moters organizme veikia du refleksų lankai, kurie padeda atitekti reikalingam pieno kiekiui, reikiamu metu.

Vos tik kūdikis pradeda žįsti krūtį, hipofizėje esantis hormonas prolaktinas (PRL) skatina pieno gaminimąsi. Žindžiant yra stimuliuojamos spenelyje esančios nervinės galūnės, iš čia nervinis impulsas keliauja į priekinę hipofizės dalį, kur prasideda PRL gamyba. Prolaktinas patenka į kraują, nukeliauja iki krūties, kur bus stimuliuojamas pieno gaminimas. Šis procesas yra vadinamas pieno gamybos- prolaktino refleksu. Antrasis, nemažiau svarbu hormonas- oksitocinas, yra atsakingas už pieno tekėjimo skatinimą. Raumeninės ląstelės, esančios krūtyje aplink liaukutes, išspaudžia pieną. Joms susitraukti yra reikalingas oksitocinas, kuris pradedamas gaminti kartu su PRL hipofizėje, sudirginus spenelyje esančias nervines galūnes. Hormonas patenka į kraują, keliauja iki krūties, kur sužadinas pieno išsiskyrimas. Susikaupęs pienas alveolėse yra stumiamas į latakus iki spenelio, kurį žindžia kūdikis. Šis procesas vadinamas pieno tekėjimo- oksitocino refleksu. Dar viena svarbi oksitocino funkcija yra gimdos raumenų sutraukimas, kuris apsaugo motiną nuo pogimdyvinio nukraujavimo. Išsiskyrus oksitocinui yra pastebimas kūdikio žindymo greičio pasikeitimas. Kol oksitocinas neišsiskyręs, kūdikis žindžia greitais ir trumpais judesiais, kai šie judesiai suletėja, yra žinoma, kad pradėjo tekėti pienas. Kūdikio laikas praleistas prie krūties nenurodo kiek pieno jis išgėrė, nes tai priklauso nuo to, kiek įvyko oksitocino refleksų. Kuo greičiau kūdikis žindžia- tuo lėčiau teka pienas ir atvirkščiai. Jeigu oksitocinas nesukels pieno tekėjimo, kūdikis negalės ištuštinti krūties ir laikui bėgant pienas nebesigamins [3]. Taip pat pieno tekėjimas priklauso ir nuo motinos nervinės sistemos, jai esant pavargusiai, susinervinusiai ar įtampoje pienas gali likti krūtyje nors ir kūdikis žindžia [2].

1.3. Laktogenezės etapai

Laktogenezė- tai pieno gamybą ir kilmę apibūdinantis terminas. Kad būtų paprasčiau išsiaiškinti nėščiųjų ir pogimdyvių hormonų veikimą bei pieno atsiradimo kelią, yra naudojami trys laktogenezės etapai.

Pirmasis laktogenezės etapas prasideda likus maždaug 3 mėnesiams iki gimdymo. Tada pieno gaminimąsi lemia hormoninė sistema. Pieno liaukos gamina priešpienį ir kaupia jį alveolėse-

padidėja moters krūtinė. Dėl aukšto progesterono lygio, pieno gamyba yra slopinama iki pat gimdymo, o pagimdžius progesterono ir estrogeno lygis krenta ir po 30-40 valandų prasideda antrasis laktogenezės etapas. Jo metu prolaktino koncentracija kraujyje lieka aukšta, tai skatina pieno gamybą- laktaciją. Iš priešpienio keičiantis jo sudėčiai, dėl pagreitėjusios kraujotakos ir aprūpinimo maistinėmis medžiagomis, prasideda brandaus pieno gaminimas. Šiame etape svarbu padidinti prolaktino receptorių kiekį, tai padaryti galima itin dažnai žindant kūdikį. Didesnis prolaktino receptorių kiekis turi įtakos trečiam laktogenezės etapui, kuris yra laktacija- brandaus pieno susidarymas. Skirtingai nuo pirmojo etapo, kur pieno gamyba priklauso nuo hormoninės sistemos, čia viskas priklauso nuo to, kiek kūdikis išžįs pieno. Jeigu kūdikis žįs mažai, pieno sumažės, todėl svarbu, kad neišžįstas pienas būtų ištrauktas, jog nesustotų pieno gamyba [4].

1.4. Motinos pieno sudėtis

Motinos piene yra daugiau kaip 400 įvairiausių medžiagų, reikalingų kūdikių augimui ir vystymuisi. Lyginant motinos pieną su ožkos ar karvių pienu yra pastebėta, kad galvijų piene yra 3 kartus mažiau baltymų, pusantro karto mažiau angliavandenių, ožkos piene 4 kartus mažiau vitamino C, mažiau kalcio ir natrio, bet daugiau monosocijų ir polisocijų riebalų. Motinos pienas naujagimiui yra nepakeičiamas maisto šaltinis.

Nors brandaus motinos pieno sudėtis yra ganėtinai stabili ir vienoda, tačiau vis tiek yra stebimi pieno kiekio ir medžiagų koncentracijų skirtumai priklausomai nuo daugelio priežasčių. Pirmiausiai, motinos pieno sudėtis varijuoja priklausomai nuo kūdikio lyties. Pasak dr. Arūno Liubšio, gimus berniukui, motinos pienas turi 25% daugiau kalorijų nei gimus mergaitei. Kiti pieno skirtumų faktoriai yra [7] :

- Nėštumo savaitės (jei buvo gimdyta prieš laiką);
- Laktacijos periodo;
- Laiko tarp maitinimų, paros dalies;
- Genetinių veiksnių;
- Motinos mitybos;

Per anksti gimusio kūdikio motinos pienas yra paruoštas suteikti kūdikiui papildomų medžiagų jo augimui, vystymuisi ir apsaugai, kurias jis turėjo gauti motinos iščiose, todėl šiame piene yra daugiau baltymų, mineralinių medžiagų. Kitas faktorius nuo ko priklauso pieno sudėtis yra laikas tarp maitinimų ir kiekis, kurį vaikas ištraukia. Maitinant kūdikį pirmoje dienos pusėje, o taip pat

visada maitinimo pradžioje, pienas yra skystesnis, vėliau jis tampa riebesniu. Taip yra dėl piene esančių riebalų. Paskutiniai pieno lašai yra riebiausi, kūdikiui baigus žįsti ir po kelių valandų vėl pradėjus- pienas ištraukiamas skystas. Taip yra todėl, kad likęs riebesnis pienas yra praskiedžiamas ką tik išskirtu, skystesniu pienu, nes riebus likę lašai slopina riebalų gamybą. Tačiau pieno sudėtis taip pat skiriasi ir dėl motinos organizmo rezervų, fermentų ir genų. Pasak dr. B. Stahlio: motinai valgant maistą turintį daugiau baltymų, nereikš, kad jos piene bus daugiau baltymų, nes tai priklauso nuo motinos genų, tačiau kitaip yra su riebalais. Jeigu motina vartos daug maisto, turinčio omega-3 riebalų rūgščių, riebalų kiekis piene netrukus padidės. Procentiškai motinos piene yra 4% riebalų, laktozės- 7%, baltymų- 1%, daugiausiai vandens- 88%, kitos medžiagos sudaro 1% [8].

1.4.1. Motinos pieno riebalai

Riebalai yra pagrindinis energijos šaltinis motinos piene. 98% pieno riebalų sudaro trigliceridai, 0,26–0,8%- fosfolipidai, 0,25–0,34%- sterolis (cholesterolis) [13]. Jie taip pat yra svarbūs nepakeičiamųjų riebalų rūgščių gavimui, riebaluose tirpiems vitaminams pasisavinti bei hormonų sintezei vykdyti.

Motinos piene lipidų molekulės sudaro struktūrą, vadinamą pieno-riebalų globules (PRG). Jų branduolį sudaro trigliceridai, o membranos, vadinamos pieno riebalų globulės membranomis- sudarytos iš fosfolipidų, glikolipidų, cholesterolio ir baltymų (membranos transporteriai, receptoriai ir fermentai). Tokia struktūra stabilizuoja lipidus piene, kurį sudaro 88% vandens. Dar svarbiau yra tai, kad jie saugo naujagimį nuo infekcijų, pagerina lipidų virškinimą ir absorbciją žarnyne [13]. Vykstant pieno sintezei, trigliceroliai sudaro lipidų lašelius motinos pieno liaukų ląstelių endoplazminiame tinkle, juos apgaubia vienasluoksnis lipidų sluoksnis. Kad patektų į krūties alveoles, PRG turi pereiti pieno liaukų membraną, taip juos apgaubia dar vienas sluoksnis iš angliavandenių (glikoproteinai ir glikolipidai). Taigi iš viso lipido molekulė turi 4 sluoksnius: triglicerolis pačiame viduryje, vidinis fosfolipidų vienasluoksnis, įsiterpęs citoplazmos sluoksnis ir išorinis fosfolipidų dvisluoksnis su glikoproteinais ir cholesteroliu.

Per dieną naujagimis vidutiniškai gauna apie 25g riebalų, tai sudaro beveik 50% suvartojamos dienos energijos [9]. Pradžioje žįsdamas pieną kūdikis gauna skystesnę, mažiau riebalų turintį pieną, su žindimo pabaiga pienas būna riebesnis 2-3 kartus [12]. Riebalų koncentracija piene skiriasi priklausomai nuo to, kiek kūdikis išgeria pieno. Jeigu jis geria daug, tai motina turės daug pieno su maža koncentracija riebalų, jeigu išgeria mažai- didelė koncentracija riebalų mažame kiekyje pieno. Taip pat riebalų koncentracija priklauso ir nuo dienos laiko.

Didžiausias kiekis riebalų yra randamas dienos metu, mažiausias- naktį [10]. Taip pat yra svarbi ir motinos mityba, jai suvartojusi didesnę kiekį riebalų, ypatingai ilgagrąndinių polinesočiųjų riebalų, kurių gausu žuvyje, kiaušiniuose- piene jų taip pat padaugės.

Trigliceridai sudaro didžiąją dalį riebalų žmogaus piene, jie susidaro iš glicerolio, kurio trys riebalų rūgštys yra esterifikuojamos (3 anglies atomai sn-1, sn-2, sn-3) [14]. Trigliceridai yra gaunami su maistu arba yra susintetinami pieno liaukose. *De novo* sintetinami trigliceridai būna vidutinio ilgio. Su maistu gaunamos trumpųjų grąndinių riebalų rūgštys (n-6- omega-6 ir n-3- omega-3). Kūdikiams yra labai svarbu gauti reikiamą kiekį nepakeičiamųjų riebalų rūgščių: omega-6 tai yra linolo rūgštis (~4,4g/ per dieną) ir omega-3- α- linoleno rūgštis (~0,5g/ per dieną). Tai yra substratas hormonų, arachidono rūgštis ir dokozaheksaeno rūgštis sintezei. Pastarosios riebalų rūgštys yra svarbios tinklainės ir smegenų visapusiškam vystymuisi taip pat įeina į ląstelių membranų sudėtį. Kita svarbi riebalų rūgštis pieno sudėtyje yra palmitino rūgštis. Ji prisideda prie kūdikio virškinimo, absorbcijos ir metabolizmo. Svarbu, kad kūdikis gautų palmitino rūgštį esterifikuotą sn-2 pozicijoje (iš mamos pieno), kitokiu atveju (esterifikuota sn-1,3 pozicijose) palmitino rūgštis taps laisva, susijungs su kalcio ir magnio jonais, sudarys netirpius muilus ir pasišalins iš kūdikio organizmo su išmatomis [13].

Motinos piene esantys riebalai yra reikalingi hormonų sintezei, vitaminų sintezei ir absorbcijai, yra svarbūs metabolizmui bei neurologiniam vystymuisi. Kad kūdikis gautų pakankamą kiekį riebalų rūgščių, yra patariama mamoms valgyti maistą, turintį omega-3, omega-6 riebalų rūgščių, arba vartoti maisto papildus, praturtintus šiais elementais.

1.4.2. Motinos pieno angliavandeniai

Visi angliavandeniai yra sintetinami motinos pieno liaukose. Kitaip nei riebalų, angliavandenių kiekybinės ir kokybinės charakteristikos priklauso nuo motinos genetinių savybių. Svarbiausi genai yra 19p13.3 chromosomoje (FUT3- Lewis genas) ir 19q13.3, (FUT2- sekrecijos genas). Taip pat ir nuo geografinės padėties, kur gyvena motina [19]. Priešpienyje oligosacharidų randama apie 20,9 g/l, o brandžiam piene apie 12,9 g/l. Žmogaus pieno oligosacharidai yra sudaryti iš 3-22 sacharidų vienoje molekulėje. Tai yra: gliukozė, galaktozė, N-acetilgliukozaminas, fukoze ir sialo rūgštis monosacharidai besijungiantys tarpusavyje ir sudarantys apie 200 skirtingų kompozicijų [18].

Pagrindinis motinos pieno angliavandenis yra laktozė, ji piene sudaro apie 7% visos pieno sudėties, didžiausia jos koncentracija yra valgymo pradžioje. Laktozės kaip ir kitų medžiagų

koncentracijos keičiasi su laktacijos periodu. Didžiausia koncentracija randama brandžiame piene 67-70 g/l, mažesnė priešpienyje 30-50 g/l. Ši cukraus rūšis yra randama tik piene. Laktozė- tai disacharidas, kuris suskyla į gliukozę ir galaktozę. Gliukozę kūdikis naudoja kaip energijos šaltinį ir kalorijas augimui ir vystymuisi, o galaktozė yra svarbi centrinės nervų sistemos vystymuisi. Laktozė padeda įsisavinti mineralus, tai pat prisideda prie smegenų vystymosi [15]. Laktozė svarbi palaikant osmosinį slėgį piene, taip pat padeda absorbuoti kalcį.

Prie laktozės dažnai būna prisijungę oligosacharidai. Oligosacharidai- tai keli sujungti monosacharidai, svarbų vaidmenį atliekantys virškinimo trakte, saugant jį nuo infekcijų, kovojant su virusais, mikroorganizmais. Oligosacharidai yra atsakingi už gerųjų bakterijų augimą kūdikio žarnyne. Gimus kūdikiui, į jo organizmą iš motinos patenka pirmosios bakterijos, kurios lemia anaerobinių bakterijų (*Bifidobacteria*, *Clostridia* ir *Bacteriodes*) kolonizaciją. Bakterijų kolonizacija priklauso nuo gimdymo rūšies, higienos ir kūdikio maitinimo. Mamos piene esantys oligosacharidai yra kaip mitybinė medžiaga gerosioms bakterijoms, užtikrinantys kūdikio mikrobiotos formavimąsi. Karev et al. 2016 m. atliktame tyrime buvo įrodyta oligosacharidų ir *Bifidobacteria* augimo koreliacija. Ji yra svarbi, nes mažas kiekis šių bakterijų vėlesniame gyvenimo laikotarpyje yra asocijuotas su atopinėmis ligomis. *Lactobacilli* augimas taip pat yra susijęs su oligosacharidų vartojimu [18] (**2 pav.**). Dar viena svarbi oligosacharidų funkcija yra ta, kad jie elgiasi kaip žarnyno epitelio receptorių analogai, apgaudami patogenus, kurie šiaip jungiasi prie žarnyno epitelio ląstelių (glikokalikso) (**2 pav.**). *Campylobacter jejuni* yra bakterija, sukianti viduriavimą, nuo kurio kūdikiai gali mirti. Ši bakterija yra vienas iš pavyzdžių, kurios prisijungia prie oligosacharidų ir pereina per žarnyną, neprikimbant prie žarnyno gleivinės [17].

Kitaip tariant, oligosacharidai tai prebiotikai- atrenkantys, kurios bakterijos gali augti organizme, o kurių augimą reikia slopinti. Formuoja žarnyno mikrobiotą kūdikiui gimus iš sterilios aplinkos į chaotišką, pilną bakterijų pasaulį.

1.4.3. Motinos pieno mikroorganizmai ir kūdikio imuninė sistema

Ne tik gimdymo būdas ir motinos piene esantys oligosacharidai prisideda prie kūdikio mikrobiotos formavimosi. Dar didesnę įtaką turi MP bakterijos, kurių yra daugiau nei 200 rūšių. Pirmiausiai naujagimio mikrobiota yra sudaryta iš fakultatyvinių anaerobų, tokių kaip *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* ir *Enterobacteriaceae*, kurie sunaudodami deguonį paruošia virškinimo traktą obligatiniams anaerobams, tokiems kaip: *Bifidobacterium*, *Bacteroides*,

ir *Clostridium* [55]. MP sukuria pradinę žarnyno mikrobiotą naujagimiams ir vaidina svarbų vaidmenį kuriant ir darant įtaką jų imuninei sistemai.

Nors specifiniai mechanizmai formuojantys MP mikrobiotą nėra žinomi, kelios hipotezės paaiškinančios tam tikrų mikroorganizmų, pvz.: *Streptococcus* spp. ir *Staphylococcus* spp. atsiradimą piene yra numanomos. Laktacijos metu nuo motinos odos ir kūdikio burnos mikroorganizmai gali patekti atgal į krūtis liaukas. Taip pat MP yra randamos žarnyno bakterijos, kurių atsiradimas yra aiškinamas jų pernaša dendritinių ir CD18+ ląstelių pagalba iš žarnyno į krūtis liaukas. [54] Dažniausiai MP aptinkamos bakterijos yra: plazmos nekoaguliuojantys stafilokokai: *Staph. epidermidis*, *Staph. hominis*, taip pat *Strep. salivarius*, *Strep. mitis*. Taip pat randama *Propionibacterium* ir *Enterococcus* spp. M.P. Heikkilä ir P.E.J. Saris tyrime iš 509 izoliatų iš 40 MP mėginių- 1/5 *Staph. epidermidis* ir 1/2 *Strep. salivarius* gerųjų bakterijų iš izoliatų sumažino patogeninių *Staph. aureus* augimą. Taip pat *Staph. aureus* augimą mažino: *Enterococci* (*Ent. faecalis*) bei *Lactobacillus rhamnosus*, *Lact. crispatus*, *Lactococcus lactis*, *Leuconoctoc mesenteroides* [56]. Dar vienas tyrimas įrodęs šių, gerųjų bakterijų naudą gaunamą su MP yra atliktas 2015 metais Ted Jost *et al.*, kur buvo įrodytas susijęs, mažėjantis patogeninių bakterijų augimas: *Bacillus*, *Clostridium*, *Cronobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Listeria*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella* [57]. Visų šių pagrindinių mikroorganizmų patekimas iš MP į kūdikio žarnyną formuoja jo trumpalaikę mikrobiotą ir stipriai prisideda prie jo imuninės sistemos formavimosi ir apsaugos nuo infekcijų.

Įvairūs tyrimai rodo, kad MP besimaitinantys naujagimiai turi stabilesnę žarnyno bakterijų populiaciją ir geriau subalansuotą gleivinės imuninį atsaką nei tie, kurie yra maitinami pieno mišiniais. Žarnyno bakterijos iš MP prisideda prie limfoidinių elementų stimuliacijos ir įgyto bei įgimto imuniteto formavimosi:

- B limfocitų vystymasis;
- T limfocitų diferenciacija ir Th1, Th2 ląstelių balanso palaikymas (citotoksinių Th1 ląstelių stimuliacija kovai su infekcijomis; Th2 ląstelių išskiriami IL4, IL6, IL21- užtikrinantys humoralinį imunitetą);
- Gleivinės sIgA gamyba, kuris susijungia su maisto antigenais ir apsaugo kūdikį nuo patogeninių virusų ir mikroorganizmų adhezijos prie žarnyno gleivinės;
- Bakterijų ligandų sąveika su gleivinės imuninės sistemos receptoriais, sumažinant patogenų prasiskverbimą pro žarnyno gleivinę;

- Laktacijos metu pro burną patenkančių Ag tolerancijos užtikrinimas, apsaugai nuo alerginių ligų, kvėpavimo bei žarnyno infekcijų kūdikystėje [54].

1.4.4. Motinos pieno baltymai

Kaip ir kitos maistinės medžiagos motinos piene, baltymai yra svarbūs kūdikio augimui ir vystymuisi. Nors jų koncentracija piene siekia tik apie 1%, jie apsaugo naujagimį nuo ligų. Daugiausiai baltymų randama priešpienyje, pereinant į brandųjį pieną, šių medžiagų kiekis mažėja. Pagrindiniai baltymų tipai piene yra kazeinas ir išrūgų baltymai, bei baltymai randami lipidų frakcijoje (membranų baltymai riebalų globulėse pvz.: mucinai).

Motinos piene baltymų kiekis ne tik mažėja su laiku (15,8 g/l priešpienyje ir sumažėja laktogenezės eigoje iki 9,0 g/l brandžiam piene), bet ir keičiasi jų tipų koncentracijos. Priešpienyje randame 70% išrūgų baltymų ir 30% kazeino. Brandžiam piene jų koncentracija pakinta: 50% išrūgų, 50% kazeino [22]. Išrūgų baltymai: antikūnai, laktoferinas, lizocimas, jų funkcija kūdikio organizme yra apsaugoti jį nuo įvairių infekcijų ir ligų. Kazeino baltymai yra kompleksinės, didelės molekulės, kurias suvirškinti yra sunkiau. Virškinant, baltymai skyla iki aminorūgščių, tokių kaip: glutamo rūgštis, cisteinas, lizinas, fenilalaninas, tirozinas, metioninas, taurinas. Viena svarbiausių aminorūgščių yra taurinas. Kartu su tulžies rūgštimi, jis prisideda prie smegenų ir regėjimo vystymosi. Taurino nerasime karvės piene, todėl yra svarbu, kad kūdikis gautų jo iš motinos pieno. Glutaminas yra laisva aminorūgštis, kurios kiekis motinos piene yra vienas didžiausių. Brandžiam piene jo yra net 20 kartų daugiau negu priešpienyje. Ši aminorūgštis yra svarbi teikiant ketoglutarato rūgštį, kurios reikia askorbo rūgšties ciklui. Yra manoma, kad askorbo rūgštis veikia kaip neurotransmiteris smegenyse ir yra energijos šaltinis žarnyno ląstelėms. [22]

Pagrindiniai išrūgų baltymai yra alfa-laktalbuminas, laktoferinas ir sekretinis IgA. Alfa-laktalbuminas yra sintetinamas pieno liaukose ir prisideda prie galimo kalcio bei cinko jonų surišimo [25]. Išrūgų baltymų sudėtyje jo yra labai daug- 20-25%. Plonosiose žarnose jis dalinai virškinamas į įvairius peptidus, jie kurį laiką yra bioaktyvūs, bet galiausiai yra suskaidomi iki amino rūgščių. Tai yra lėtas skaidymas su tarpiniais produktais, atliekančiais svarbias funkcijas kūdikio organizme pvz.: apsaugant nuo *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococci*, ir *Candida albicans* [25]. Motino pieno imunoglobulinų, kurių išrūgų baltymuose yra net 10-15%, didžiąją dalį (90%) sudaro sekretiniai IgA (sIgA), taip pat yra IgG ir IgM ir IgA, IgE, IgD. Jeigu motina kontaktavo su virusais ir bakterijomis, jos organizme pasigaminę antikūnai pereis į pieną ir taip juos gaus ir mažylis. IgA

yra būtent tas antikūnas, kuris jau po kelių valandų po kontakto yra išskiriamas į motinos pieną. sIgA- tai tokie imunoglobulinai, kurie yra atsparūs žarnyno fermentams ir prisitvirtina prie bakterijų ar virusų antigenų ir veikia neleisdami jiems prisitvirtinti prie gleivinės [26]. Šie antikūnai kūdikio organizme pradeda gamintis tik nuo 4-6 savaitės, todėl pradžioje yra svarbu gauti juos su pienu. Taip vaikas yra apsaugomas nuo *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Clostridium difficile* ir *Salmonella* bakterijų, nuo virusų: rotaviruso, citomegalo viruso, ŽIV, gripo viruso ir kovoja prieš *Candida albicans* grybus [25]. sIgA yra nevirškinamas, jį galime rasti kūdikio išmatose. Nors kitas svarbus baltymas laktoferinas yra suvirškinamas, tačiau dalis jo, prisijungusi prie laktoferino receptorių ant žarnyno ląstelių gali patekti į ląstelių vidų ir likti žarnyne. Laktoferinas yra sintetinamas pieno liaukose ir yra svarbus transportuojant geležį organizme, užkertant kelią patogenams plisti kūdikio organizme ir sukelti įvairias ligas. Fermentai, tokie kaip lizocimas, lipazė taip pat yra išrūgų baltymai, jie randami ir motinos piene. Lipazė sudaro 1-2% visų baltymų, randama tik žmogaus piene, nei vieno galvijų piene sudėtis neturi šio fermento. Žarnyne lipazė hidrolizuoja pieno riebalus tokius kaip: trigliceridus, digliceridus, monogliceridus, taip pat vitamino A esterius, cholesterolio esterius. Lizocimas- didelės koncentracijos antibakterinis fermentas motinos piene. Patekęs į bakteriją jis suardo β ,1-4 glikozidinius ryšius ir inaktyvuoja bakteriją.

Svarbiausi kazeinai motinos piene yra β -kazeinas ir κ -kazeinas. β - kazeinas pasižymi aminorūgščių fosforilavimo poveikiu. Gauti maži kazeino fosfopeptidai palengvina kalcio įsisavinimą. κ - kazeinas kartu su sIgA veikia kaip bakterijų adhezijos inhibitorius (pvz.: *Helicobacter pylori*) [26]. Šis kazeinas turi panašią struktūrą kaip gleivinės ląstelių angliavandeniai virškinimo trakte, todėl gali apgauti patogenus.

1.4.4.1. Motinos pieno baltymas laktoferinas

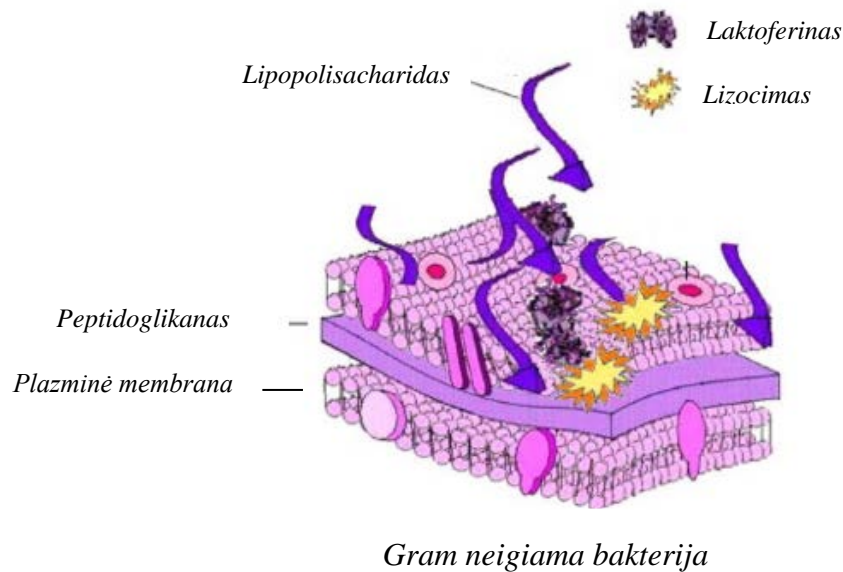
Laktoferinas- tai daugiafunkcis baltymas, priklausantis geležį surišantiems glikoproteinams. Jis yra viena iš priežasčių, kodėl kūdikiai absorbuoja geležį iš motinos piene, ta geležis, kuri nėra pasisavinama kūdikio, prisijungia prie laktoferino, nepaliekant geležies reikalaujantiems patogenams išgyvenamumo. Molinė laktoferino koncentracija brandžiame motinos piene yra ~25 μ M, tai penkis kartus didesnė koncentracija nei geležies- ~5 μ M. Beto, laktoferinas gali prisijungti dvi geležies molekules, taigi jo geležies surišimo galia yra ~50 μ M [37]. Tai yra du kartus didesnė galia nei transferino. Pagal įsotinimą geležimi laktoferinas yra trijų rūšių: apolaktoferinas- neturintis geležies, monomerinis laktoferinas- prisijungęs vieną geležies joną ir

hololaktoferinas- prisijungęs du Fe^{3+} jonus. Nei pieno mišiniuose, nei karvės piene laktoferino koncentracija nėra tokia didelė kaip motinos piene, todėl kūdikio mityboje turi būti motinos pieno.

Pirmiausiai laktoferinas buvo išskirtas iš motinos pieno, čia jis sudaro apie 15-20% visų piene esančių baltymų. Vėliau išskirtas ir iš kitų sekretų, tokių kaip seilės, kasos sultys, nosies, gimdos sekretas, ašaros ir taip pat iš kraujo, kur laktoferinas patenka išsilaisvinęs iš specifinių granuliu neutrofiluose. Glikoproteinas taip pat randamas šlapime, išmatose, bet čia jo koncentracijos gana mažos.

Glikoproteinas pasižymi įvairiomis funkcijomis: geležies metabolizmas, antibakterinio, antivirusinio, antiparazitinio aktyvumo palaikymas, jis yra atsakingas už ląstelių proliferaciją ir diferenciaciją. Jau 1970 metais laktoferinas buvo įvardintas kaip baltymas, turintis bakteriostatinį poveikį prieš *Escherichia coli*, dėl geležies surišimo ir neprieinamumo bakterijai. Lukas Christen su kolegomis 2013 metais atliktame tyrime įrodė statistiškai reikšmingus rezultatus atvirktinei korealicijai tarp *E. coli* ir *S. aureus* kiekio pieno mėginiuose ir laktoferino ($p < 0,001$) bei lizocimo ($p = 0,019$) koncentracijos [23]. Taip pat yra žinoma, kad laktoferinas kovoja su bakterijomis ir tiesiogiai prisijungdamas prie Gram neigiamų organizmų ląstelės paviršiaus lipopolisacharidų ir lizuodamas jos sienelę (**1 pav.**). Be antibakterinio poveikio laktoferinas pasižymi ir antivirusiniu poveikiu prieš citomegalo virusą (CMV), *Herpes simplex* virusą (HSV), žmogaus imunodeficitu virusą (ŽIV), hepatitą C (HCV), ir hepatitą B (HBV). O neseniai atrasta laktoferino nauda kovojant ir su gripo, peršalimo virusais, taip pat ir gastroenterito virusais [41]. Seniai yra žinoma, kad laktoferinas sumažina riziką išsivystyti sepsiui, yra atlikta daugiau nei 11 tyrimų su 6000 naujagimių. Dauguma tyrimų yra atlikti naudojant galvijų laktoferiną, dozuojant jį priklausomai nuo naujagimio svorio (150-300mg/kg/dienai), duodant fiksuotą kiekį arba dozuojant 1mg/100ml pieno. Gydomo trukmei priklausant nuo kūdikio amžiaus po gimimo (4-8 savaitės) arba nuo gestacinio amžiaus (34-36 savaitės). Gauti rezultatai tyrimuose rodo aiškų sepsio infekcijos rizikos sumažėjimą (5,9% sergančiųjų gydant laktoferinu su 17,3%- sergančiųjų negydant), mirčių skaičiaus sumažėjimą (0-0,7% gydant su 4,8% negydant). Itin mažo svorio naujagimiams (<1000g) gydymas laktoferinu turi didžiausią naudą [27]. Taip pat yra atliekami tyrimai dėl laktoferino naudos kovoje su viduriavimą sukeliančiais mikroorganizmais. Yra žinoma, kad laktoferinas apsaugo nuo *Shigella*, *Salmonella*, *E. coli*, rota viruso ir tokių parazitų kaip: *Giardia*, *Entamoeba histolytica*. Japonijoje Egashira et al. tyrė 298 vaikus, sergančius roto virusu. Grupei, gaunančiai laktoferino turinčius produktus, rečiau ir mažiau pasireiškė vėmimas ir viduriavimas.

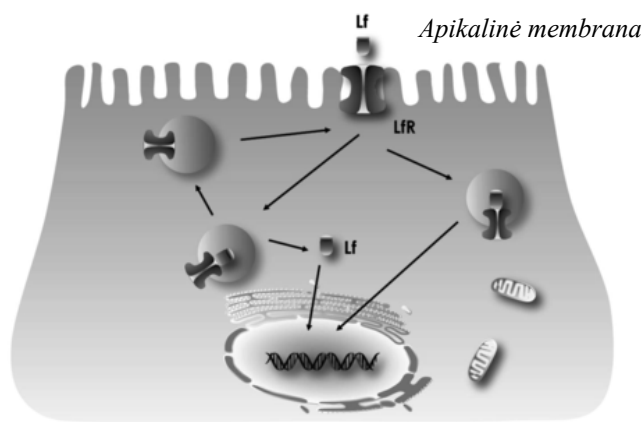
Peru atliktame tyrime su dehidratavusiais ir viduriuojančiais vaikais, rekombinantinio laktoferino ir lizocimo vartojimas sutrumpino viduriavimo laiką (3,67/ 5,21 dienos). O kitame, Peru vykusiame tyrime, kur dalyvavo 555 vaikai, laktoferino vartojimas sumažino viduriavimo trukmę (4,8/ 5,3 dienos, $p=0,046$), viduriavimo sunkumą ir pasikartojimą (1,0%/ 2,6%, $p=0,045$) [55]. Prie daugiafunkcio poveikio laktoferinas prisideda apsaugoje ir nuo *Candida albicans* ir kitų *Candida* rūšių grybų.



1 pav. Laktoferino prisijungimas prie lipopolisacharidų [44]

Dar viena laktoferino funkcija yra susijusi su epitelio proliferacija ir diferenciacija. Didelė koncentracija laktoferino padidina proliferaciją, o maža koncentracija padidina ląstelių diferenciaciją. Nors tai nėra patvirtinta *in vivo* tyrimais, tačiau mechanizmas atitinka biologinę realybę: neseniai pagimdžiusios motinos piene yra daugiau laktoferino, tai reiškias jo daugiau ir pas kūdikį, o tuo laiku vaiko žarnynas formuojasi, auga. Po kiek laiko, brandžiam piene laktoferino koncentracija mažėja, o kadangi kūdikis jau būna šiek tiek paaugęs, baltymų virškinimas efektyvesnis, dėl ko suaktyvėja epitelio diferenciacija [23], kurios metu sumažėja ląstelių apoptozė ir padidėja šarminės fosfatazės bei aminopeptidazės aktyvumas [58].

Dėl laktoferino galimybės pereiti į ląstelės vidų (**2 pav.**), jis gali būti kaip transkripcijos faktorius ir reguliuoti citokinų (IL-1) ir augimo faktorių ekspresiją [26].



Bazolateralinė membrana

2 pav. Laktoferino patekimas į ląstelę [45]

Be naudingų laktoferino savybių reikia žinoti ir nuo ko priklauso jo koncentracija motinos piene. Pirmiausia- tai nuo laktacijos stadijos. Išanalizavus 2724 motinų duomenis, buvo patvirtinta, kad didžiausia laktoferino koncentracija yra priešpienyje, o su jį laiku mažėja [28]. Tuomet kyla klausimas ar motinos mityba prisideda prie šio baltymo kiekio piene. Kol kas laktoferino koncentracijos ir motinos mitybos ryšio paneigti negalima, tačiau didžioji dalis atliktų tyrimų neranda jokios priklausomybės nei padidinus motinos suvartojamų baltymų kiekį, nei padidinus suvartojamų kalorijų skaičių, ar vartojant maisto papildus ir probiotikus. Motinos infekcijų (gripo, ŽIV, virškinimo, šlapimo takų, akių ar ausų) ir laktoferino koncentracijos pokyčių sąryšio nerasta. Tyrimai rodo, kad pagrindinis faktorius, turintis įtakos laktoferino koncentracijai motinos piene yra laktacijos stadija.

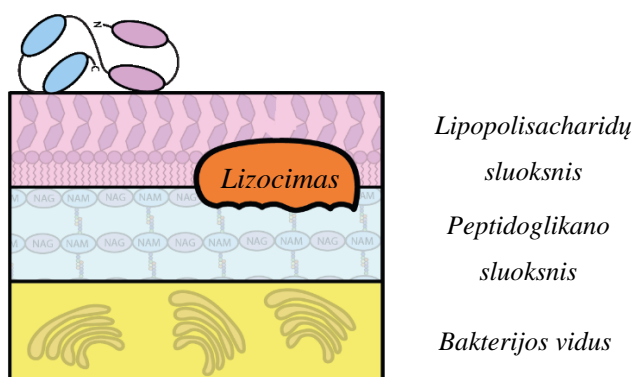
1.4.3.2 Motinos pieno baltymas lizocimas

Lizocimas buvo atrastas kaip medžiaga, lizuojanti tam tikro tipo bakterijas iš nosies sekreto ir buvo pavadintas būtent pagal savo funkciją- „fermentas, lizuojantis bakterijas“. Dar kitaip yra vadinamas- muramidazė ar N-acetilmuramidazė glikanhidrolazė kaip vienas iš lizosominių fermentų, hidrolizuojančių mukopolisacharidus.

Lizocimas taip pat įeina į motinos pieno sudėtį ir yra svarbus antibakterinis fermentas, prisidedantis prie žarnyno mikrofloros kūrimo. Motinos priešpienyje jo koncentracija yra didesnė nei brandžiame piene. Galvijų piene lizocimo koncentracija yra žymiai mažesnė nei moters piene.

Tai reiškia, kad ir veikimas silpnesnis [29]. Kad kūdikiai gautų pakankamą kiekį lizocimo, dažnai jis yra dedamas ir naudojamas kaip priedas kūdikių mityboje.

Pagrindinis lizocimo veikimas pasireiškia katalizuojant β ,1–4 glikozidinio ryšio tarp N-acetilmuramo rūgšties ir N-acetil-D-glukozamino nutraukimu Gram teigiamos bakterijos sienelėje. Taip pat yra atlikti *in vitro* tyrimai lizocimo veikimo kartu su laktoferinu, kur laktoferinas prisitvirtina prie bakterijos išorinės membranos, sukuria intarpus, per kuriuos lizocimas patenka į patogeną ir taip sunaikina Gram neigiamas bakterijas (**3 pav.**). Be tiesioginio bakterijų naikinimo, lizocimas prisideda ir prie uždegiminio atsako formavimo bei mikrofloros kūrimo. Atlikus tyrimą maitinant kiaules žmogaus pienu, turtingu lizocimu, buvo pastebėtas priešuždegiminio citokinus transformuojančio augimo faktoriaus TGF- β 1 didėjimas, žarnyne atsiradusios su žarnyno mikrofloros gerinimu susijusios *Bifidobacteriaceae* ir *Lactobacillaceae* populiacijos ir ligas sukeliančių *Mycobacteriaceae* ir *Campylobacterales* populiacijų sumažėjimas [42]. Naikindamas blogąsias bakterijas ir prisidedamas prie gerųjų augimo, lizocimas sukuria tinkamą mikrobiotą kūdikio žarnyne.



3 pav. Lizocimo patekimas į bakteriją [26]

1.4.4. Motinos pieno vitaminai, biologiškai aktyvūs ir imunologiniai faktoriai

Motinos piene be maistinių medžiagų yra randama ir daugiau komponentų, tokių kaip: vitaminai (A, B1, B2, B6, B12, E, D, K), augimo faktoriai, imunologiniai faktoriai. Vitaminai ir augimo faktoriai prisideda prie pilnaverčio kūdikio vystymosi, imunologiniai faktoriai apsaugo ir kuria naujagimio imuninę sistemą. Vieni bioaktyvūs faktoriai yra gaunami su maistu, kiti atnešami piene esančių ląstelių, dar kiti sintezuojami pieno liaukų. Tačiau visų jų bendras tikslas yra naujagimio sveikata.

Visų vitaminų ir mineralų esančių piene pakanka mažylio vystymuisi, išskyrus vitamino K ir D. Kitaip negu dauguma makromedžiagų, mikromedžiagų koncentracija priklauso nuo motinos mitybos ir jos organizmo sankaupų. Mityba didesnę įtaką lemia vandenyje tirpiems vitaminams.

Vitamino K kiekis motinos piene yra itin mažas, todėl Amerikos Pediatrių akademija pataria suleisti jo dozę naujagimiui taip jį apsaugant nuo galimų hemoraginių ligų [30]. Vitamino D koncentracija taip pat nėra didelė, tad yra patariama vartoti vitamino D papildus motinos pienu besimaitinančioms kūdikiams, kad neatsirastų kaulinio audinio mineralizacijos arba rachito [1]. Geležies kūdikiai gauna 0,2 –0,4 mg/l, tai nėra daug, tačiau išnešioti naujagimiai turi geležies atsargų, gautų iš mamos, kurių užtenka 4-6 mėnesiams [31]. Vitamino A, ypač beta karotino, priešpienyje yra randama dvigubai daugiau nei brandžiame piene. Šio vitamino geram regėjimo vystymuisi motinos piene yra pakankamai. Vitamino C taip pat yra pakankamai, nebent jeigu motina yra rūkanti, šis faktorius mažina vitamino lygį.

Kita svarbi grupė medžiagų, esančių piene, yra biologiškai aktyvūs faktoriai tokie kaip:

- Epidermio augimo faktorius;
- IGF (insulino augimo faktorius);
- Neuronų augimo faktorius;
- Kraujagyslių augimo faktorius;
- Eritropoetinas;
- Kalcitoninas ir somatostatinas;

Epidermio augimo faktorius ir IGF yra didžiausi piene esantys baltyminiai augimo faktoriai. Priešpienyje jų koncentracija yra didžiausia ir su laiku krenta. Epidermio augimo faktorius- svarbus žarnyno gleivinės gyjimui. Jis atsparus rūgštiniam pH ir virškinimo fermentams, todėl iš skrandžio pereina į žarnyną, kur stimuliuoja enterocitus, kad padidintų DNR sintezę, ląstelių dalijimąsi, vandens ir gliukozės pasisavinimą ir baltymų sintezę. Epidermio augimo faktorius yra atsakingas už augimą, diferencijuojant epiteliniuose audiniuose, o neuronų augimo faktorius atsakingas už simpatinių neuronų išgyvenamumą ir vystymąsi.

Kaip ir makromedžiagos, taip ir šios varijuoja priklausomai nuo maitinimo trukmės, laktogenezės stadijos, koncentracijos taip pat yra skirtingos tarp motinų ir populiacijų. Tai yra privalumas prisitaikant prie naujagimio poreikio, tačiau taip pat ir sunkumas norint pritaikyti

mitybą neišnešiotiems naujagimiams, kad šie gautų reikiamą kiekį visų medžiagų. Šiai problemai išspręsti pasaulyje yra kuriami pieno bankai.

1.5. Pieno bankai pasaulyje ir Lietuvoje

Žmogaus pieno bankas – tai įstaiga, užtikrinanti pieno iš krūties tiekimą ir jo priežiūrą medicininiams tikslams. Jis užtikrina donorinio motinos pieno– ne biologinės motinos pieno iš krūties tiekimą. Pieno bankai buvo pradėti kurti XX a. pradžioje. Pirmasis pieno bankas atidarytas 1909 metais Vienoje, Austrijoje. Vėliau atidaryti ir kitose šalyse: JAV, Prancūzijoje, Italijoje. Pieno bankų skaičius didėjo iki kol 1980-aisiais metais buvo nustatyta, kad ŽIV infekcija gali būti perduodama kūdikiui per motinos pieną. Šis faktas paskatino uždaryti nemažą dalį pieno bankų. Tik po daug metų ir daugelio tyrimų buvo įrodyta, kad motinos pienas yra nepakeičiamas ir reikalingas augančiam vaikui. Pasaulinė Sveikatos Organizacija (PSO) ir Amerikos Pediatrijos Akademija (APA) paskelbė, kad gimdyvei negalint maitinti kūdikio savu pienu, geriausia alternatyva yra donorinis motinos pienas.

2005 metais paskelbta Tarptautinė Pieno Bankų Inicijatyva (angl. The International Milk Banking Initiative - IMBI), į kurią prisijungė 33 pasaulio šalys, užtikrinančios, kad realizuos donorinio motinos pieno bankų įsteigimą. Būtent nuo tų metų pieno bankai ir vėl pradėjo kurtis daugelyje šalių.

Viena daugiausiai donorinio pieno surenkančių šalių yra Brazilija. Joje gyvuoja 210 pieno bankų, surenkančių 165 000 litrų pieno, iš 166 000 motinų. Yra pastebėta, kad pieno bankų ir kitų priemonių dėka šalis sumažino kūdikių mirtingumą nuo 1990 metų iki 73%. Europoje 2017 metais donorinių pieno bankų buvo 212, tarp kurių daugiausiai jų Prancūzijoje (36), Italijoje (30), Švedijoje (27), Suomijoje (17), Vokietijoje (16), Didžiojoje Britanijoje (15). Australijoje 2014 metais- 5 pieno bankai, Šiaurės Amerikoje- 20. Lietuvoje pirmasis pieno bankas buvo įkurtas Kaune, 2016 metų gruodžio mėnesį, antrasis- 2017 m. kovo mėnesį- Vilniuje.

1.5.1 Donorinis motinos pienas- antro pasirinkimo maistas

Kad donorinis motinos pienas pasiektų naujagimį, pirmiausiai jis turi būti saugus. Moteris donorės yra ištiriamos dėl galimų infekcijų, pavyzdžiui ŽIV, hepatito. Jeigu moteris yra sveika, ji gali dovanoti savo pieną. Toliau pieno banko užduotis yra ištirti pieno maistinę sudėtį, bakterijų skaičių, rūšis. Tuomet pienas yra pasterizuojamas, sunaikinant jame esančius virusus, bakterijas ir skiriamas neišnešiotiems kūdikiams, kuriuos pagimdžiusios mamos neturi arba turi neužtektinai

savo pieno. Taip pat maitinami išnešioti, tačiau sunkiai sergantys naujagimiai, kūdikiai po chirurginio žarnyno gydymo. Donorinis motinos pienas gali būti užšaldomas (-40°C), tokiu būdu yra išsaugomos jo sudėtinės dalys, bei užtikrinamas sterilumas. Taip paruoštas pienas gali būti saugomas iki 6 mėnesių. **(4 pav.)**

Donorinis motinos pienas yra skiriamas neišnešiotiems naujagimiams, mamų, kurių laktacija neprasidėjo dėl priešlaikinio gimdymo ar kitų priežasčių, pavyzdžiui ŽIV infekcijos arba kai išskiriamos motinos pieno nepakanka kūdikiui pamaitinti. Taip pat šis pienas yra skiriamas ir sunkiai sergantiems išnešiotiems naujagimiams. Ateityje, esant didesnėms donorinio pieno atsargoms, bus žadama pienu siūlyti ir namuose augantiems naujagimiams. Šiuo metu pieno bankui yra ypač svarbu pasirūpinti neišnešiotais kūdikiais dėl jų žarnyno nebrandumo bei imuninės sistemos silpnumo. Tokie vaikai sunkiai virškina ir pasisavina pieno mišinius, o taip pat vartojant motinos pienu yra galimybė išvengti nekrozinio enterokolito, dėl geresnio baltymų, riebalų ir angliavandenių pasisavinimo. Donorinio pieno banko įkūrimo vienas iš tikslų yra sumažinti naujagimių sergamumą žarnyno uždegimu, žarnyno operacijų, taip pat sumažinti ilgalaikį parenterinį maitinimą. Pasak gydytojo A. Liubšio, neišnešiotų kūdikių žarnynas nėra pasiruošęs priimti ir virškinti motinos pieno, todėl dažnai tenka pradėti maitinimą parenteriniu būdu, duodant po kelis lašus motinos arba donorinio pieno. Ir taip didinti lašų skaičių ir atsisakyti maitinimo į veną. Pasak PSO, būtent donorinis motinos pienas neišnešiotiems (<1500 g) naujagimiams yra antro pasirinkimo maistas, jeigu nėra galimybės žindyti savos motinos pienu.

1.5.2. Donorinio pieno kelias

1. Pieno nutraukimas:

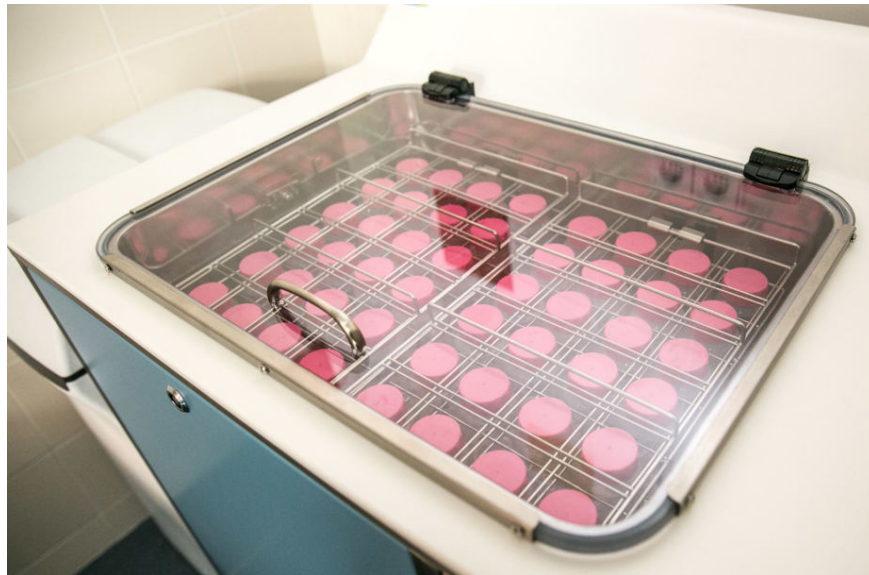
Pieną, kad jis būtų tinkamas donorystei, geriausiai ištraukti elektriniu pientraukiu, Rankomis nutraukti nerekomenduotina, nes nutraukiama mažiau pieno, su mažiau riebalų, o pieno, kuris išsiskiria savaime kol žindoma ar nutraukus kitą krūtį- donuoti negalima. Savaime išsiskyres pienas turi nedaug riebalų ir baltymų ir taip pat didėja rizika bakteriniam užteršimui. Higienos taisyklės- kiekviena donore gauna vienkartinius pieno surinkimo ir laikymo indelius. Pagal galimybes donore taip pat gauna ir elektrinius pientraukius. Motinos, norinčios donuoti pienu, turi susipažinti su taisyklėmis (1 priedas).

2. Pieno surinkimas ir laikymas

Donorinis pienas renkamas į vienkartinius indelius arba šaldymo maišelius, paliekant maždaug 2 cm iki viršaus, kad pienui šalant, jis turėtų vietos plėstis. Surinktas pienas yra laikomas šaldytuve ir tik jam atvėsus maišomas su anksčiau surinktu pienu. Donorinis pienas laikomas šaldytuve 24 valandas ir tada dedamas į šaldiklį (-20°C) iki pasterizavimo.

3. Pieno apdorojimas

Pienas, patekęs į pieno banką visada yra patikrinami dėl mikrobiologinės taršos. Jeigu pienas užterštas- jis yra utilizuojamas. Neužterštas donorinis pienas yra išpilstomas į specialius indus ir užkoduojamas. Tada pienas keliauja į pasterizatorių, ir merkiamas į $62,5^{\circ}\text{C}$ karščio pasterizatoriaus vandens vonią 30 minučių, kompiuteris daviklių dėka stebi ir kontroliuoja pasterizavimo procesą (**5 pav.**). Jam pasibaigus pienas yra greitai atšaldomas iki 4°C temperatūros ir antrą kartą užšaldomas šaldiklyje. Tokiu būdu yra užtikrinama, jog pasterizacijos metu patogeniniai mikroorganizmai buvo sunaikinti, o dėl dvigubo užšaldymo sunaikinamas ir citomegalo virusas (CMV). Toks pienas laikomas -40°C temperatūroje ne ilgiau kaip 6 mėn.



4 pav. Pieno pasterizacija [46]

1.6. Pieno pasterizacija

Donorinis pienas yra geriausia išeitis per anksti gimusiems kūdikiams, kol motina dar neturi savo pieno. Kadangi šviežiu pienu naujagimį maitinti galima tik trumpą laiką, donorinis pienas yra pasterizuojamas, kad būtų išvengiamas bakterijų ir virusų perdavimas.

Holder pasterizacija (HoP), yra pieno pasterizavimo būdas naudojamas pieno bankuose. Pieno buteliukai yra šildomi vandens vonelėje 62,5°C 30 minučių, o tada greitai atšaldomi iki 4°C.

HoP procesas vykta taip:

1. Greito užkaitinimo fazė
2. Pastovios temperatūros palaikymo fazė
3. Greito atvėsimo fazė

2015 metais S. Landers ir K. Updegrave atliko tyrimą, nustatyti piene esančių bakterijų augimą mitybinėse terpėse. Tyrime dalyvavo 1213 pieno mėginių, kurie buvo pasėti į dvi lėkšteles: pirmoji- pasterizuotas pienas, antroji- pienas prieš pasterizaciją. Tokios lėkštelės inkubuotos 48 valandas, leidžiant bakterijoms augti. Tik 7% iš pasterizuoto pieno mėginių išaugino įvairias bakterijų kultūras, kai tuo tarpu 87% nepasterizuoto pieno mėginiuose išaugo *Staphylococcus* (4% *Staphylococcus aureus*) kolonijos. 7% išaugusių bakterijų kolonijų pasterizuotame piene priklausė *Bacillus cereus*, kurių išskiriami toksinai yra nepavojingi žmogui. [43]. Virusai HoP pasterizacija taip pat yra sėkmingai sunaikinami. Tai įrodė italų mokslininkė M. Donalisio ištyrus kaip ŽIV, CMV, ŽPV degradoja pasterizavus pieną. [43] Pieno pasterizacija yra būtina, norint suteikti saugų maistą kūdikiams, tačiau pasterizacija galimai turi ir neigiamą efektą.

Yra atlikta nemažai tyrimų, siekiant išsiaiškinti pasterizacijos įtaką pieno sudėčiai, tačiau gaunama labai įvairūs rezultatai. Štai Michelle L. Baack ir jos kolegų atliktame tyrime JAV, stebint ar pasikeičia riebalų rūgščių koncentracija po pasterizacijos, gauti rezultatai parodė tik ALA rūgšties sumažėjimą 3%. Nei ARA nei DHA pokyčių nebuvo pastebėta [33]. Kitas, panašus tyrimas nustatyti pasterizacijos įtaką pieno sudėčiai, tiksliau angliavandeniams, atliktas Segura ir kolegų taip pat nerodė jokių pokyčių [34]. Matuojant sIgA koncentraciją daugiau tyrimų nurodė koncentracijos sumažėjimą po pasterizacijos, nors kartais tai ir nebuvo statistiškai reikšmingi rezultatai. Kitų klasių antikūnų koncentracijos, tokių kaip IgM, IgG po pasterizacijos stipriai sumažėjo, kartais net išnykdavo. Laktoferino pokyčiai tyrimuose matuoti įvairiais metodais ir dauguma parodė jo 35%- 90% sumažėjimą pasterizavus pieną. Lizocimas taip pat daugeliu atveju sumažėjo nuo 20% iki 85% skirtinguose tyrimuose [35]. Sunku tiksliai ir vienareikšmiškai pasakyti kokią įtaką pasterizacija daro pieno medžiagoms dėl tyrimams naudojamų skirtingų pasterizacijos būdų bei metodų išmatuoti medžiagų koncentracijas.



5 pav. Pieno bankas Vilniuje [46]

1.7. Neišnešiotų naujagimių mityba

Prieš laiką gimusių kūdikių mitybos, imuninės sistemos poreikiai yra kitokie. Jie taip pat yra didesnėje rizikos grupėje vystymosi ir augimo sutrikimams atsirasti, bei susirgti sepsiu. O juos pagimdžiusioms motinoms, pienas pradeda gamintis pieno liaukoms galutinai nesubrendus, tad yra manoma, kad tai gali turėti įtakos pieno sintezei ir sekrecijai, dėl ko gali skirtis baltymų kiekis ir fermentinis aktyvumas lyginant su laiku pagimdžiusiomis moterimis.

Prieš laiką pagimdžiusių (<37 savaičių) moterų piene yra didesnė koncentracija baltymų, riebalų, daugiau natrio, magnio, geležies, mažiau kalcio. Baltymų, riebalų koncentracijos po kelių savaičių susivienodina su laiku gimdžiusių piene esančių medžiagų koncentracijomis. Priešingai yra su laktozės koncentracija: praėjus kelioms savaitėms po gimdymo ji labai stipriai išauga. Bioaktyvių molekulių, tokių kaip citokinų, augimo faktorių koncentracijos neišnešiotų kūdikių motinos piene yra didesnės, ypač priešpienyje, o po 4 savaičių susivienodina su laiku gimdžiusių [38]. Toks medžiagų sudėties skirtumas lemia ir didesnę dėmesį neišnešiotų kūdikių mikrobiotai, kadangi jų žarnyne yra labai daug *Proteobacteria*, *Enterobacteriaceae*, nemažai fakultatyvinių anaerobų, tačiau nedaug *Bifidobacterium* ir *Bacteroides* jiems yra ypač svarbu gauti visas medžiagas, reikalingas suformuoti sveiką mikrobiotą.

Motinos pienas yra pagrindinis maisto šaltinis, aprūpinti neišnešiotą kūdikį reikiamomis maisto medžiagomis ir užkertant kelią galimiems sveikatos sutrikimams. Jeigu nėra galimybės maitinti kūdikį savos motinos pienu, donorinis pienas yra puiki išeitis. Tačiau mokslas įrodė, kad nei motinos pieno, nei donorinio pieno, dėl dažniausiai donuojamo jau subrendusio pieno, kuris

skiriasi savo sudėtimi, nepakanka labai mažo svorio (<1500 g) naujagimiams pilnai aprūpinti maistinėmis medžiagomis ir mikroelementais. Kai to nepakanka, naujagimio galvytė vystosi ir auga lėčiau kaip ir pats naujagimis, dėl skurdžios mitybos galimi prastesni psichomotoriniai gebėjimai, neurologiniai sutrikimai, cerebrinis paralyžiu ir autizmas. Dėl mineralinių medžiagų trūkumo galimi skeleto augimo ir kaulėjimo sutrikimai. Barkerio hipotezė teigia, kad mažo svorio naujagimiai taip pat yra didesnėje rizikos grupėje susirgti koronarinėmis širdies ligomis, hipertenzija ir antro tipo diabetu, vėlesniame gyvenime [39]. Norint užkirsti tam kelią, jų mityboje turi atsirasti ir papildai, praturtinantys pienu. Papildomos medžiagos yra gaunamos iš karvės pieno arba motinos pieno, miltelinio arba skystu pavidalu. Jie yra ypač reikalingi besimaitinantiems donoriniu pienu, kuris būna ne toks kaloringas, turintis mažiau baltymų, mineralų. Kol nėra žinoma pieno sudėtis, negalime tiksliai pasakyti ko reikia, kad naujagimio mityba būtų pilnavertė. Negalime žinoti kokių maistinių medžiagų yra per mažai, o kokių per daug. Dėl to išsivysčiusiose pasaulio šalyse yra taikomas individualus motinos pieno praturtinimas priklausomai nuo atliktos pieno sudėties analizės.

2016 metais VšĮ VULSKF VL Neonatologijos centre pradėtas naudoti motinos pieno sudėties analizatorius „Miris“, veikiantis infraraudonosios spektrofotometrijos principu. Šiuo analizatoriumi yra tiriamas pieno maistinių medžiagų kiekis bei jo energetinė vertė. Neonatologijos skyriuje taip pat yra gydomi prieš laiką gimę kūdikiai, su kuriais guli ir jų mamos. Todėl yra puiki galimybė tirti prieš laiką pagimdžiusių motinų pienu, taip sudarant galimybes ateityje sukurti Lietuvos moterų pieno sudėties „standartą“, pamatyti medžiagų kiekių dėsningumus, bei patikrinti ar kūdikiams skiriamas maitinimas atitinka jų mitybos poreikius. Nors pasaulyje tokios analizės atliekamos gana seniai, Lietuvoje tai yra naujovė, tad prisidėdama prie šio biomedicininio tyrimo, savo baigiamuoju magistro darbu sieksiu nustatyti prieš laiką pagimdžiusių motinų pieno baltymų- laktoferino ir lizocimo koncentracijų skirtumus lyginant su laiku pagimdžiusių motinų. Taip pat nustatysiu ar pasterizacija paveikia ir kaip paveikia jų koncentracijas tiek išnešiotus, tiek neišnešiotus kūdikius pagimdžiusių motinų piene. Tokiu būdu padedant išsiaiškinti, kaip individualiai praturtinti kūdikio mitybą, norint užkirsti kelią ligoms ir padėti jiems tinkamai vystytis.

2. Tiriamoji medžiaga ir metodai

2.1. Tyrimo objektas, vieta ir laikas

Tyrimo vieta- VšĮ VUL Santaros klinikų filialas, Vaikų ligoninė (VL).

Tyrimo laikotarpis- 2018 m. rugsėjo mėn. iki 2019 m. kovo mėn.

Tyrimo populiacija- neišnešiotus (< 32 sav., gimimo svoris < 1500g) naujagimius pagimdžiusios ir savu pienu maitinančios moterys, kurių naujagimiai gydomi VšĮ VL Neonatologijos centre. Ir išnešiotus naujagimius (\geq 37 sav.) pagimdžiusios ir savu pienu maitinančios moterys.

Tyrimo metodas- kiekybinis stebėjimo.

Tyrimo objektas- motinos ir jų pieno mėginiai.

2.2. Tyrimo kriterijai

Įtraukimo į tyrimą kriterijai:

1. Moterys, pagimdžiusios < 32 sav. gestacinio amžiaus ir < 1500 g svorio neišnešiotus naujagimius;
2. Moterys, pagimdžiusios normalaus svorio pagal esamą nėštumo trukmę naujagimius, kai nėštumas truko \geq 37 savaites;
3. Moterys, galinčios nutraukti pienu dažniau nei 4 kartus per parą.

Neįtraukimo į tyrimą kriterijai:

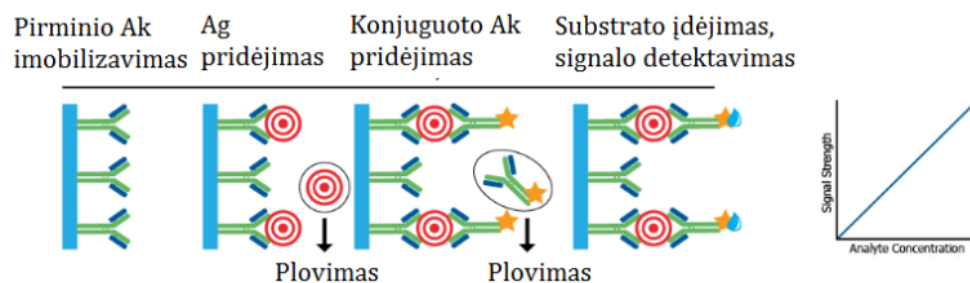
1. Moterys sergančios mastitu, I ir II tipo cukriniu diabetu, onkologinėmis ligomis, lėtinėmis infekcinėmis ligomis (hepatitas B, C, ŽIV, tuberkuloze);
2. Daugiavaisio nėštumo atvejai;
3. Nepatvirtintų dietų besilaikančios moterys;
4. Motinos, kurios negali nutraukti pieno dažniau nei 4 kartus per parą;

2.3. Tyrimo metodai

1. Pirmiausiai buvo siekiama nustatyti motinos pieno mikroorganizmų įvairovę, tai buvo padaryta kiekybiniu mikrobiologiniu pasėlio metodu. Pieno ėminys kalibruota mikrobiologine kilpele išsėjamas ant mitybinių terpių paviršiaus. Po inkubacijos skaičiuojamos išaugusios kolonijos ir identifikuojami mikroorganizmai.

2. Laktoferino ir lizocimo koncentracijoms motinos piene nustatyti buvo naudojamas imunofermentinis ELISA metodas panaudojant komercinius Human Lactoferrin ELISA (BIOVendor, Čekija) ir CircuLex Human Lysozyme ELISA (MBL, Japonija) rinkinius.

ELISA metodo esmė- susidarę Ag- Ak imuniniai kompleksai yra žymimi fermentu žymėtu rūšiai specifiniu izotopiniu antikūnu (konjugatu). Po inkubacijos pridedamas substratas. Fermentas skaido substratą, dėl ko matome spalvinę reakciją, kuri įvertinama matuojant reakcijos tirpalo optinį tankį. Spalvos intensyvumas yra proporcingas antigenui specifinių antikūnų koncentracijai mėginyje. ELISA atliekama specialiose mikroplokštelėse, turinčiose 96 šulinėlius, todėl reikalingi nedideli reakcijos komponentų kiekiai. Yra keletas ELISA variantų: netiesioginė, tiesioginė, „sumuštinio“ (angl. *sandwich*) tipo. Lizocimas ir laktoferinas motinos piene yra nustatomi imunofermentiniu ELISA „sumuštinio“ tipo metodu. Šio metodo metu imobilizavus pirminį Ak, pridedamas Ag, specifinis mėginyje esančiam Ak. Nuplovus Ag pertėklių pridedamas konjuguotas Ak, specifinis prieš tai įdėtam Ag. Pakartotinai nuplovus pertėklių, galiausiai įdedamas substratas, kuris bus skaldomas fermento ir priklausomai nuo susidariusio imuninio komplekso kiekio, bus matoma spalvinė reakcija.



6 pav. ELISA sumuštinio tipo metodas [47]

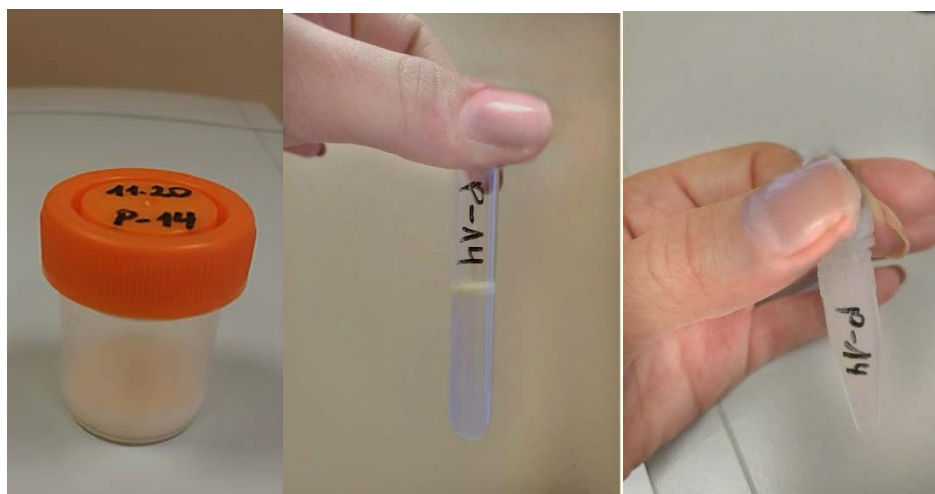
2.4. Ėminių paruošimas

2.4.1. Pieno ėminių paruošimas

- Pieno pasėliui atlikti prieš paimant ėminį, motina šiltu vandeniu ir muilu nusiplauna rankas ir kruopščiai apiplauna krūties spenelius, iš kurių bus imamas pienas. Ėminys steriliame vienkartiniam inde transportuojamas į laboratoriją, kur sutikrinus duomenis galima pradėti tyrimą.
- Pieno baltymų bei pasterizacijos įtakai tirti mėginiai:
 - a) Pieno ėminiai ≤ 10 ml atnešami į laboratoriją ant ledo, nucentrifuguojami $500 \times g$ $4^{\circ}C$ 15 min. Supernatantas užšaldomas $-80^{\circ}C$ iki tyrimo. (7 pav.)
 - b) Prieš tyrimą mėginiai yra atšildomi ir dar kartą nucentrifuguojami $800 \times g$ 10 min. Tyrimams surinkama skystoji frakcija, kilpele nugriebiant susidariusį riebų viršutinį sluoksnį. (8 pav.)



7. pav. Pieno ėminiai



8 pav. Pieno mėginių paruošimas

a) Praskiedžiame pieno mėginius:

I. Laktoferino koncentracijai nustatyti naudotas praskiedimas- 100 000x:

A- 4 μ L mėginio + 396 μ L skiedimo buferio (100x);

B- 4 μ L A mėginio + 396 μ L skiedimo buferio (100x);

C- 24 μ L B mėginio + 216 μ L skiedimo buferio (10x);

II. Lizocimo koncentracijai nustatyti naudotas praskiedimas - 500 000x:

A- 2 μ l mėginio + 48 μ l skiedimo buferio (25x)

B- 2 μ l A mėginio + 198 μ l skiedimo buferio (100x)

C- 1 μ l B mėginio + 199 μ l skiedimo buferio (200x)

2.4.2. Laktoferino standartinių mėginių paruošimas

1 lentelė. Laktoferino standartinių mėginių paruošimas

Standartinio mėginio kiekis	Skiediklio kiekis	Koncentracija
Turimas kiekis	-	80 ng/ml
250 μ L turimo kiekio	250 μ L	40 ng/ml
250 μ L iš 40ng/ml	250 μ L	20 ng/ml
250 μ L iš 20 ng/ml	250 μ L	10 ng/ml
250 μ L iš 10 ng/ml	250 μ L	5 ng/ml
250 μ L iš 2,5 ng/ml	250 μ L	2,5 ng/ml

2.4.3. Lizocimo standartinių mėginių paruošimas

2 lentelė. Lizocimo standartinių mėginių paruošimas

	Standartinio mėginio kiekis	Skiediklio kiekis	Koncentracija
Std.0	50 µL standarto (128 ng/ml)	200 µL	25,6 ng/ml
Std.1	60 µL Std. 0 (25,6 pg/ml)	540 µL	2560 pg/ml
Std.2	300 µL Std. 1 (2,560pg/ml)	300 µL	1280 pg/ml
Std.3	300 µL Std. 2 (1,280pg/ml)	300 µL	640 pg/ml
Std.4	300 µL Std. 3 (640pg/ml)	300 µL	320 pg/ml
Std.5	300 µL Std. 4 (320pg/ml)	300 µL	160 pg/ml
Std.6	300 µL Std. 5 (160pg/ml)	300 µL	80 pg/ml
Std.7	300 µL Std. 6 (80pg/ml)	300 µL	40 pg/ml
Tuščias		300 µL	0 pg/ml

2.4.4. Reagentų paruošimas

1. Pieno pasėlio tyrimui reagentai ir mitybinės terpės yra paruošti naudojimui.
2. Laktoferino nustatymui reikia pasiruošti:
 - a) Biotinu žymėtą antikūnų tirpalą (1 plokštelės stulpeliui: 10 µL biotinu žymėto antikūnų koncentrato+ 990 µL biotino-Ak tirpalo, 6 stulpeliams- 60 µL biotinu žymėto antikūnų koncentrato+ 5,940 µL biotino-Ak tirpalo).
 - b) Plovimo buferį (900ml distiliuoto vandens+ 100ml plovimo tirpalo koncentrato).
3. Lizocimo nustatymui reikia paruošti:
 - a) Plovimo buferį (900ml distiliuoto vandens+ 100ml plovimo tirpalo koncentrato).

2.5. Tyrimo atlikimas

2.5.1. Pieno pasėlio tyrimo eiga ir vertinimas:

a) *Išsėjimas:*

- sterili 1 µl mikrobiologinė kilpelė panardinama į indą su ėminiu, kuris gerai išmaišomas;
- vienas lašas ėminio kilpele užnešamas ant 5% kraujo agarų terpės, braukiant brūkšni per visą Petri lėkštelės diametrą nuo viršaus iki apačios;
- nuo brūkšnio viršaus skresiniais judesiais ėminio lašas išsklaidomas per visą lėkštelę; (9 pav.)
- tuo pačiu metodu užsėjamos MacConkey ir Manitolio-druskos agarų lėkštelės.



9 pav. Sėjimo būdas

b) *Lėkštelių inkubavimas:*

3 lentelė. Lėkštelių inkubavimas

Terpės pavadinimas	Inkubavimo sąlygos	
	Temperatūra	Trukmė
5% kraujo agaras	+35 °C, CO ₂ atmosferoje	24-48 val.
MacConkey agaras	+35 °C	18-24 val.
Manitolio-druskos agaras	+35 °C	24-48 val.

c) *Mikroorganizmų identifikavimas:*

- po inkubacijos apžiūrimos lėkštelės, vertinamas bakterijų augimas, tepinėlis dažomas Gramo būdu, vertinamas:

- Gram(+) judrių lazdelių kolonijos su nedidele beta-hemolize ant kraujo agarų leidžia įtarti *Listeria monocytogenes*, kurios duoda teigiamą katalazės reakciją. Ant Oksfordo listerijų agarų jos auga juodomis kolonijomis. Galutinis bakterijų kultūros patvirtinimas atliekamas mikrobiologiniu analizatoriumi VITEK 2;
- Gram(-) lazdelių augimas ant MacConkey ir kraujo agarų rodo, kad jos priklauso *Enterobacteriaceae* šeimai;
- Gram(+) kokių kolonijos su nedidele beta hemolize ant kraujo agarų leidžia įtarti B grupės streptokokus;

- Gram(+) kokių augimas ant Manitolio druskos ir kraujo agaro leidžia įtarti stafilokokus.

- nustatčius mikroorganizmą, atliekamas jautrumo antibiotikams nustatymas;

d) *Kolonijų skaičiavimas:*

Rezultatas išreiškiamas kolonijas sudarančiais vienetais 1-ame mililitre (KSV/ml):

- jei lėkštelėje yra < 6 kolonijos, tai atitinka < 10 000 (10^3 KSV/ml arba 10^6 KSV/l);

- jei lėkštelėje yra nuo 6 iki 60 kolonijų, tai atitinka 10 000 – 100 000 (10^4 - 10^5 KSV/ml arba 10^7 - 10^8 KSV/l);

- jei lėkštelėje yra > 60 kolonijų, tai atitinka >100 000 KSV/ml (> 10^5 KSV/ml arba > 10^8 KSV/l).

e) *Tyrimo laikas:*

- Neigiamų pieno pasėlių atsakymai atiduodami po 48 val. nuo tyrimo pradžios, teigiamų po 48 -72 val.

f) *Rezultatų vertinimas:*

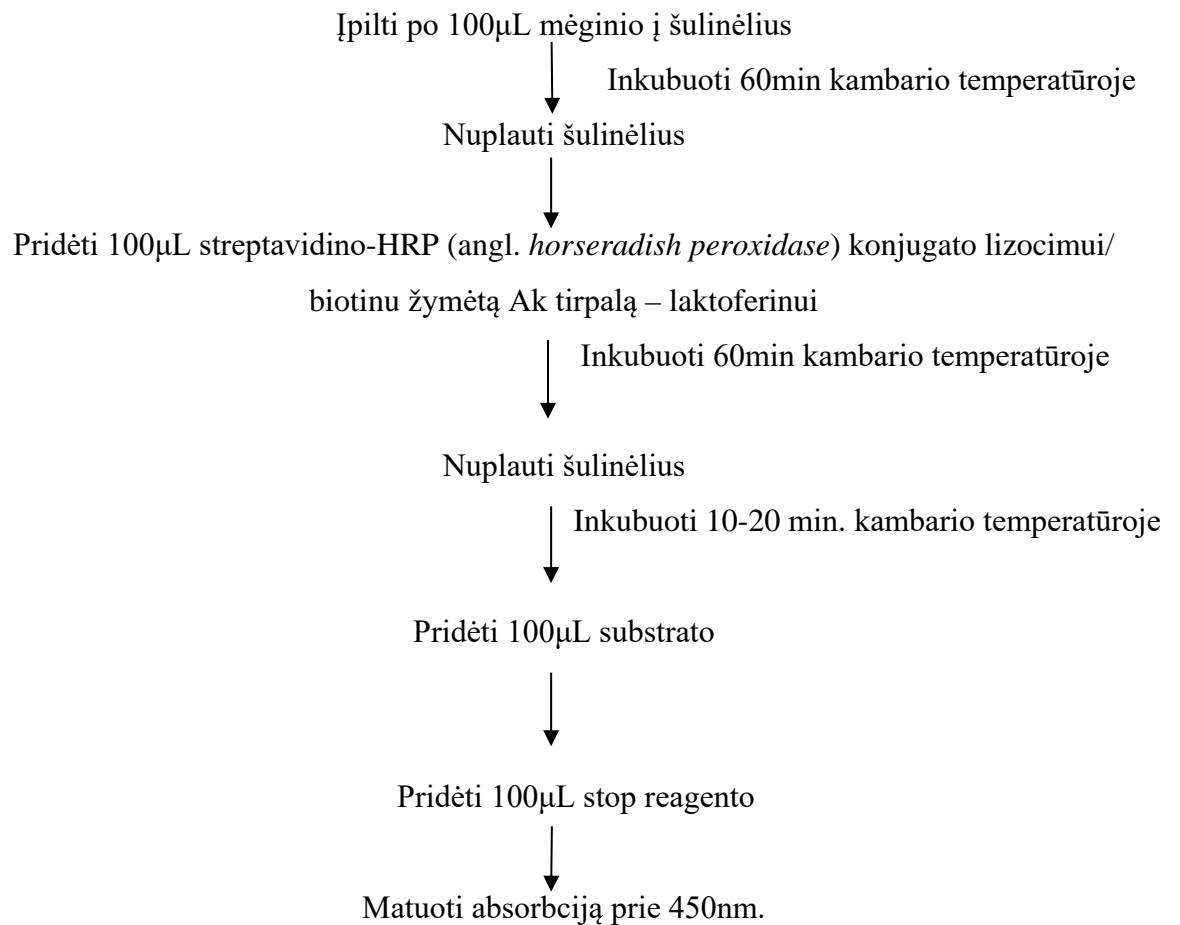
- Motinos piene neturi būti jokių patogeninių bakterijų, tokių kaip B grupės streptokokų, listerijų ar salmonelių.
- Kliniškai svarbu, kai *S. aureus* augimas > 10^5 KSV/ml arba > 10^8 KSV/l.
- Nėra apribojimų bakterijų skaičiui, jei auga vien tik normali odos mikroflora (plazmos nekoaguliuojantis stafilokokas ar alfa-hemolizinis streptokokas).
- Kliniškai svarbu, kai *Enterobacteriaceae* bakterijų augimas > 10^3 KSV/ml arba > 10^5 KSV/l.

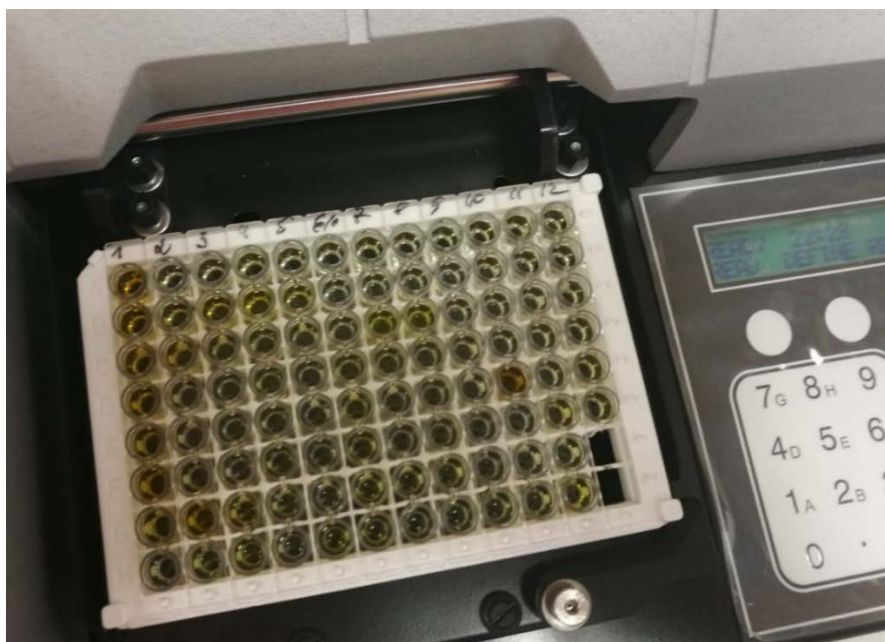
2.5.2. Laktoferino ir lizocimo tyrimo eiga

Laktoferino ir lizocimo tyrimui yra naudojamos plokštelės su 96 šulinėliais, padengtais monokloniniais antikūnais. Viena plokštelė yra padengta antikūnais, specifiniais žmogaus lizocimui, kita- laktoferinui. Standartai ir mėginiai yra įpilami į šulinėlius. Juose esantys antikūnai sukimba su Ag šulinėliuose. Toliau yra nuplaunamos nesulipusios medžiagos ir pridedamas konjugatas, specifinis antikūnui, sukibusiam su Ag. Vykdomas plovimas, pašalinti neprikibusį konjugatą. Į likusį mėginį pridedama H₂O₂-tetrametilbenzidino substrato (10 pav.). Reakcija sustabdoma pridedant rūgštaus tirpalo. Gautas produktas yra matuojamas 450 nm bangos ilgio sugertyje (11 pav.) (priedas 2). Šviesos absorbcija yra proporcinga lizocimo/laktoferino koncentracijai.



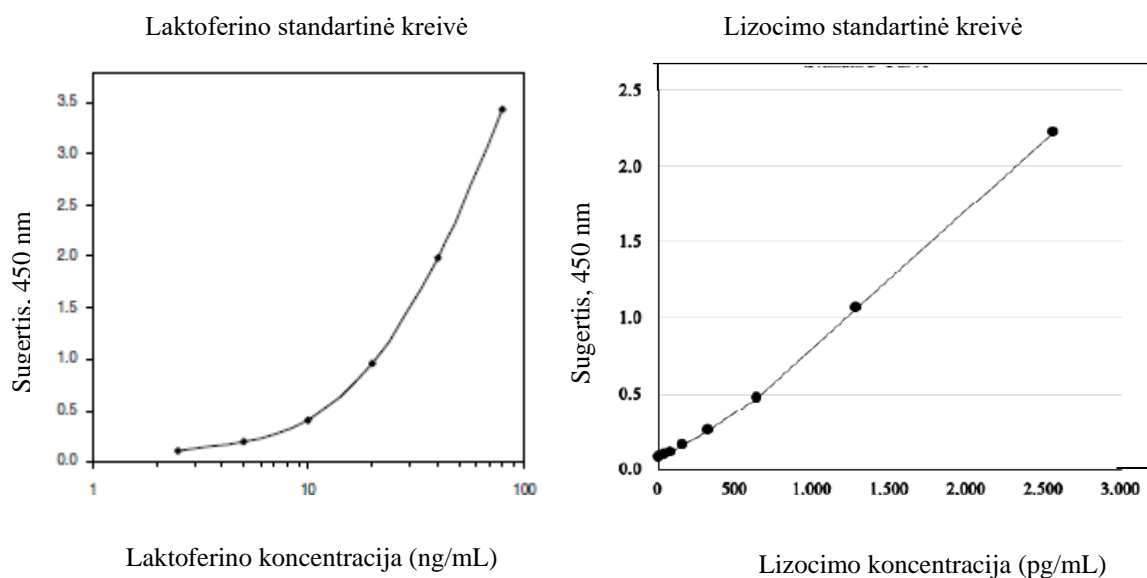
10 pav. Mėginių paruošimas





11 pav. Absorbcijos matavimas

Nustatyti mėginių koncentracijas yra braižoma standartinė kreivė, atidedant absorbcijos (Y) ir lizocimo/laktoferino standartinių mėginių koncentracijų reikšmes (X). (**12 pav.**)



12 pav. Standartinės kreivės [56, 57]

2.6. Tyrimo glaudumo įvertinimas

Tyrimo metu buvo matuojamas tyrimo glaudumas dienoje ir tarp dienų. Glaudumas- tai nepriklausomų tyrimų rezultatų tarpusavio atitikties artumas, gautas nurodytomis sąlygomis.

Glaudumas dienoje įvertintas atliekant 5 mėginių koncentracijų matavimus dublikate. Glaudumas tarp dienų įvertintas atliekant pakartotinį 5 mėginių koncentracijos nustatymą skirtingomis dienomis. Tyrimo, nustatančio laktoferino koncentraciją, glaudumas dienoje (angl. *Intra-assay Precision*) – 3,1 %, tyrimo glaudumas tarp dienų (angl. *Inter-assay Precision*) – 5,6 %. Pagal nurodytas reikšmes tyrimo metodikoje (dienoje- 3,2-3,4%; tarp dienų: 4,5-6,2%), rezultatai atitiko reikalavimus. Tyrimo, nustatančio lizocimo koncentraciją, įvertintas glaudumas dienoje (angl. *Intra-assay Precision*) – 5,7 %, tyrimo glaudumas tarp dienų (angl. *Inter-assay Precision*) – 6,0 %. Palyginus su duotomis glaudumo ribomis tyrimo metodikoje (dienoje: 4,7-8,2%; tarp dienų: 4,1-6,1%), rezultatai atitiko rekomendacijas.

2.7. Statistinė duomenų analizė

Tyrimo duomenų ir rezultatų analizei buvo naudota statistinė R commander programa (3.5.2 versija, 2018 metai). Visi duomenys laikyti statistiškai reikšmingi, kai $p < 0,05$.

Medžiagų koncentracijų pasiskirstymui pavaizduoti buvo pasirinktos stačiakampės (angl. *box plot*) ir taškinės (angl. *dot plot*) diagramos. Stačiakampių diagramų horizontalioje ašyje yra nurodomos tiriamųjų grupės, vertikalioje- kiekybinio kintamojo reikšmės. Stačiakampę diagramą sudaro stačiakampis, apimantis 50% reikšmių aplink medianą ir besitęsiančios vertikalios linijos, kurios parodo visas reikšmes nuo mažiausios iki didžiausios. Stačiakampio pradžia yra pirmasis kintamojo reikšmių kvartilis, pabaiga- trečiasis kvartilis. Horizontali linija stačiakampyje nurodo medianos reikšmę- antrąjį kvartilį. Už stačiakampės diagramos vertikalių linijų esantys taškai yra vadinami išskirtimis.

Palyginti laktoferino ir lizocimo koncentracijoms tarp I ir II grupės motinos pieno buvo pasirinktas neparametrinis Mano-Vitnio-Vilkoksono rangų sumų kriterijus (angl. *two sample Wilcoxon test*). Šis testas atliktas dėl duomenų pasiskirstymo ne pagal normalųjį skirstinį.

Korealiacijai tarp laktoferino ir lizocimo išmatuoti buvo pasirinktas Spirmeno (angl. *Spearman*) korealiacijos koeficientas. Šis koeficientas naudojamas matuoti ryšio stiprumui tarp kintamųjų, kurie netenkina normalumo sąlygų. Grafiniam korealiacijos vaizdavimui nubraižyta taškinė korealiacijos diagrama (angl. *scatter plot*). Pagal šią diagramą galima nustatyti kintamųjų ryšį: koreliacija yra neigiama, kai taškai išsidėsto grupuojantis iš viršutinio kairiojo kampo link apatinio dešiniojo. Koreliacija teigiama- kai taškai grupuojasi iš apatinio kairiojo- į viršutinį dešinįjį kampą. Korealiacijos stiprumas vertinamas pagal koeficientą r , o jo statistinis reikšmingumas pagal p reikšmę.

3. TYRIMO REZULTATAI

3.1. Tiriamųjų grupių ypatybės

Tyrimo metu buvo surinkti 42 motinos pieno mėginiai, kurie tolimesniems tyrimams buvo suskirstyti:

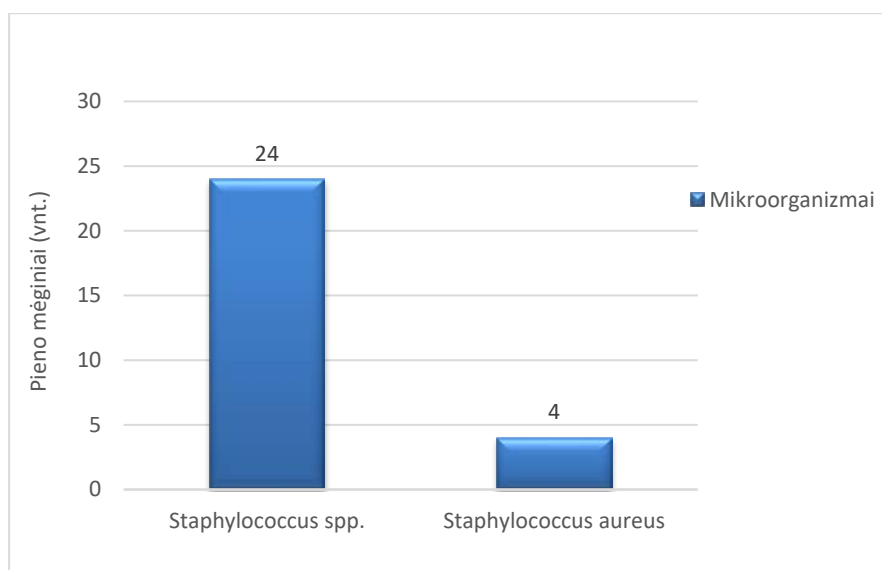
- 1) I gr. motinos, pagimdžiusios neišnešiotus naujagimius (<32 sav) ir jų pieno mėginiai (n= 22); II gr. motinos, pagimdžiusios išnešiotus naujagimius ir jų pieno mėginiai (n= 20) (**13 pav.**)
- 2) Pagal pasterizaciją: prieš pasterizaciją/ po pasterizacijos.



13 pav. Pieno mėinių grupės

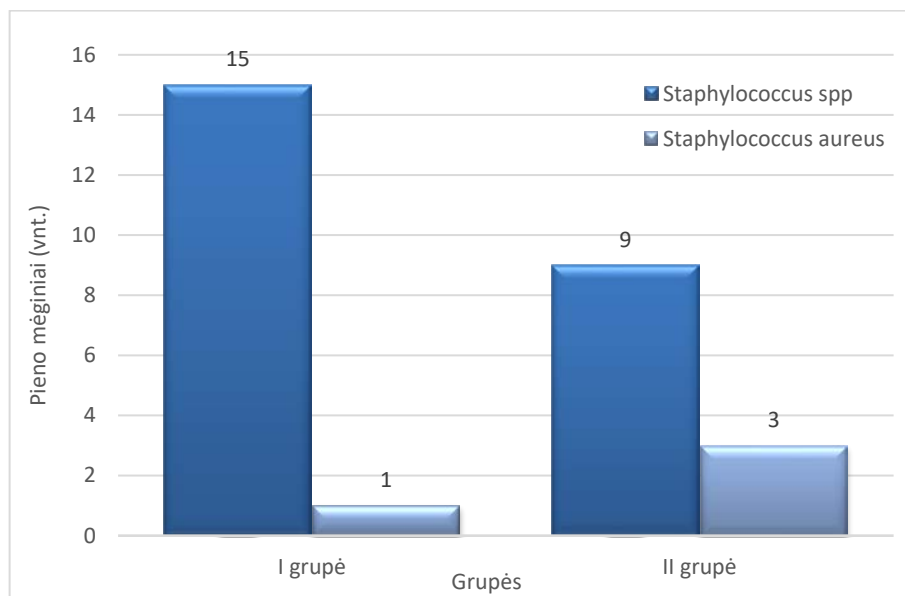
3.2. Pieno mikrobiotos nustatymas

Atlikus pieno pasėlio prieš pasterizaciją tyrimą, buvo rasta: plazmos nekoaguliuojančios *Staphylococcus* spp. bakterijos ir *Staphylococcus aureus*. (14 pav.)



14 pav. Mikroorganizmų rūšys pieno mėginiuose

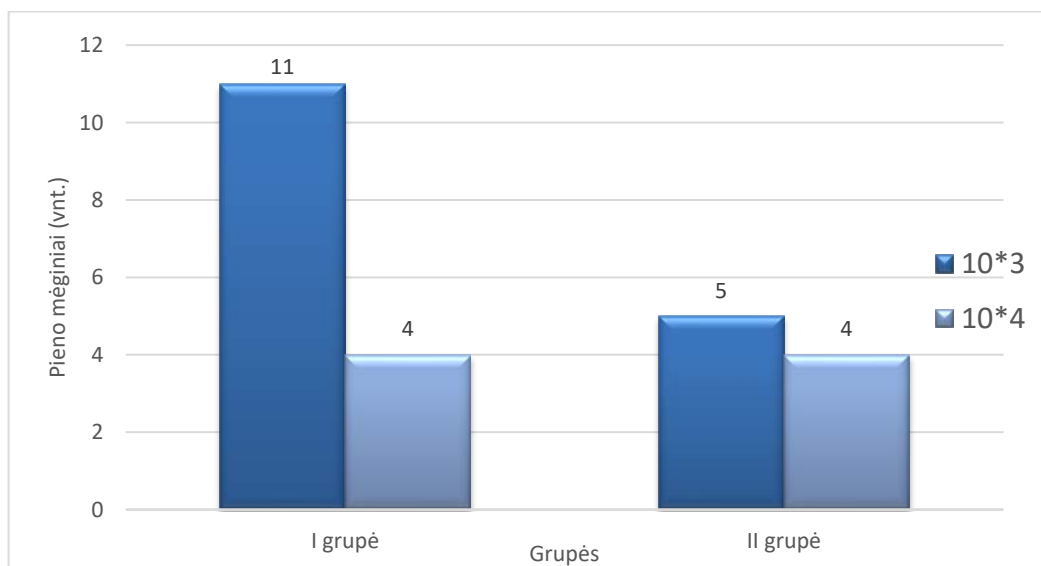
Sugrupavus pieno mėginius į dvi grupes, I grupėje buvo rasta 15 mėginių su plazmos nekoaguliuojančiom *Staphylococcus spp.* bakterijom ir 1 mėginys su *Staphylococcus aureus*. II grupėje buvo rasta 9 mėginiai su plazmos nekoaguliuojančiom *Staphylococcus spp.* bakterijomis ir 3 mėginiai su *Staphylococcus aureus*.(15 pav.)



15 pav. Mikroorganizmų nustatymas I ir II grupėse

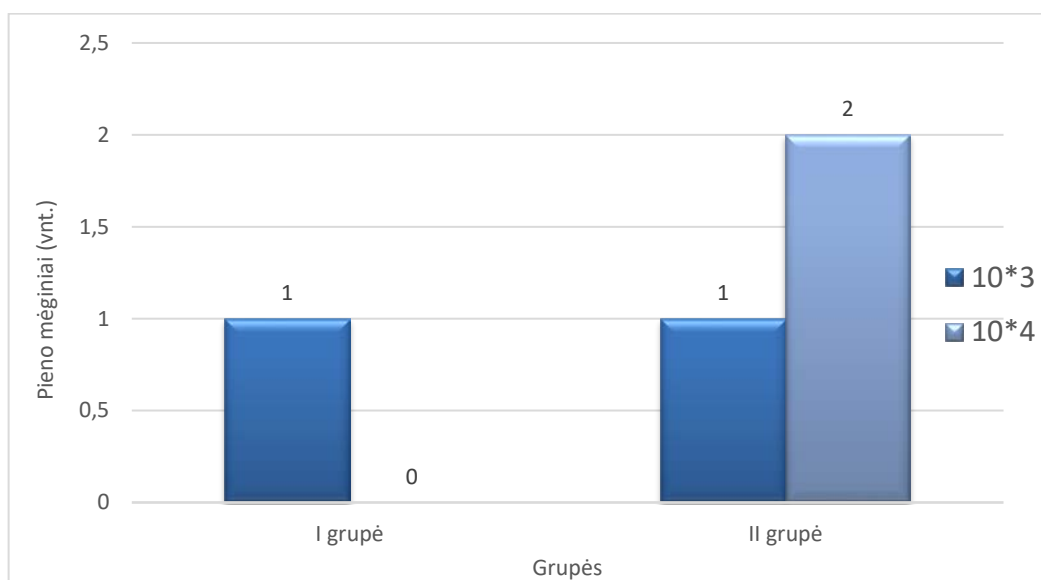
Pieno pasėlio rezultatai buvo įvertinti ir kiekybiškai. Rezultatai parodė, kad iš mėginių, turinčių plazmos nekoaguliuojančias *Staphylococcus spp.* bakterijas, augimas buvo įvertintas arba

10³ KSV/ml, arba 10⁴ KSV/ml. Mėginių su 10³ KSV/ml augimu iš viso buvo 16, iš jų- 11 priklausė I grupei, 5- II grupei. Mėginių su bakterijų augimu įvertintu 10⁴ KSV/ml iš viso buvo 8, tarp jų- 4 I grupės ir 4 II grupės. (16 pav.)



16 pav. Plazmos nekoaguliuojančių *Staphylococcus* spp. bakterijų augimas

S. aureus išaugo 4 mėginiuose: 2 iš jų buvo įvertinti augimu 10³ KSV/ml ir 2- 10⁴ KSV/ml, pastarieji abu priklausė II grupei, o įvertintų 10³ KSV/ml, vienas mėginys I grupės, vienas- II grupės. (17 pav.)



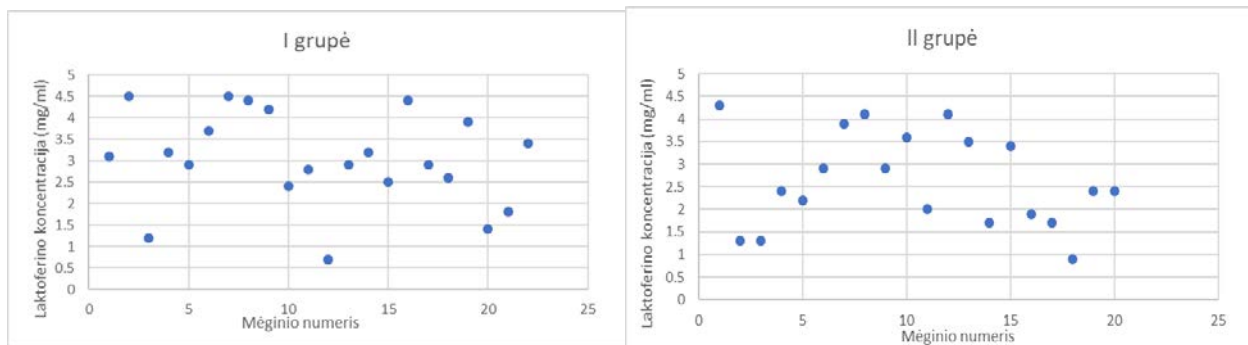
17 pav. *S. aureus* bakterijų augimas

Apskaičiavus bendrą bakterijų augimą pieno mėginiuose buvo gauta, kad 57% visų mėginių prieš pasterizaciją turėjo plazmos nekoaguliuojančias *Staphylococcus* spp. bakterijas. Iš jų 62% buvo I grupės pieno mėginiuose ir 38% - II grupės. 9,5% pieno mėginių išaugo *S. aureus* bakterijos. Iš jų 75% buvo II grupės pieno mėginiuose, 25% - I grupės. Kiekybiškai plazmos nekoaguliuojančios *Staphylococcus* spp. bakterijų augimas 10^4 KSV/ml sudarė ~33% visų *Staphylococcus* spp. bakterijas išauginusių mėginių, o 10^3 KSV/ml ~67%. *S. aureus* augimas pasiskirstė po lygiai: 50% 10^3 KSV/ml ir 50% 10^4 KSV/ml.

Koreliacijos tarp mikrobiologinio bakterijų augimo pieno mėginiuose ir kūdikio išnešiojimo laiko nerasta- $r=0,234$, kai $p=0,1359$.

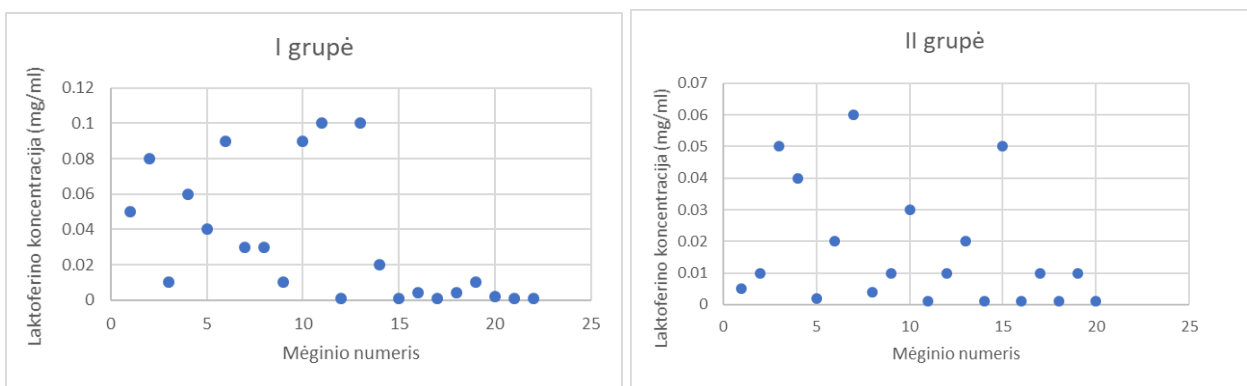
3.3. Laktoferino koncentracijos nustatymas

Ištirus laktoferino koncentraciją pieno mėginiuose buvo nustatyta, kad I grupės mėginiuose laktoferino koncentracija yra didesnė nei II grupės. Tačiau duomenys statistiškai reikšmingai nesiskyrė ($p=0,198$). I grupėje laktoferino koncentracija svyravo nuo 0,7 iki 4,5 mg/ml, kai mediana- 3,0 mg/ml. II grupėje- 0,9- 4,3 mg/ml, kai mediana- 2,4 mg/ml. (18 pav.)



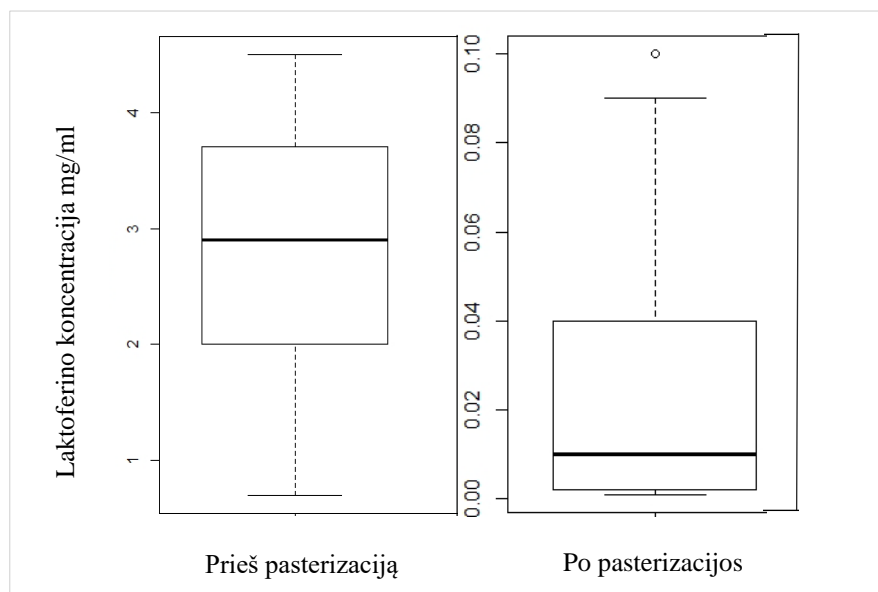
18 pav. Laktoferino koncentracija prieš pasterizaciją

Ištirus pieno mėginius po pasterizacijos buvo nustatyta, kad II grupės mėginiuose laktoferino liko 0,001- 0,06 mg/ml, kai mediana 0,01 mg/ml. I grupės mėginiuose svyravo nuo 0,001 iki 0,1 mg/ml, mediana- 0,015 mg/ml (19 pav.). Duomenų skirstinys tarp laktoferino koncentracijų statistiškai reikšmingai nesiskiria ($p=0,297$).



19 pav. Laktoferino koncentracija po pasterizacijos

Tyrimo metu gauti rezultatai įrodė, kad pasterizacija daro įtaką laktoferino koncentracijai (**20 pav.**). Palyginus laktoferino koncentracijas prieš pasterizaciją ir po, neišskiriant kūdikio išnešiojimo laiko, matomi rezultatai, įrodantys stiprų ir statistiškai reikšmingą ($p < 0,0001$) koncentracijos sumažėjimą po pieno pasterizavimo. Nuo medianos 2,9 mg/ml prieš pasterizavimą iki 0,01 mg/ml po pasterizavimo. Laktoferino koncentracija po pasterizacijos sumažėjo 99%.

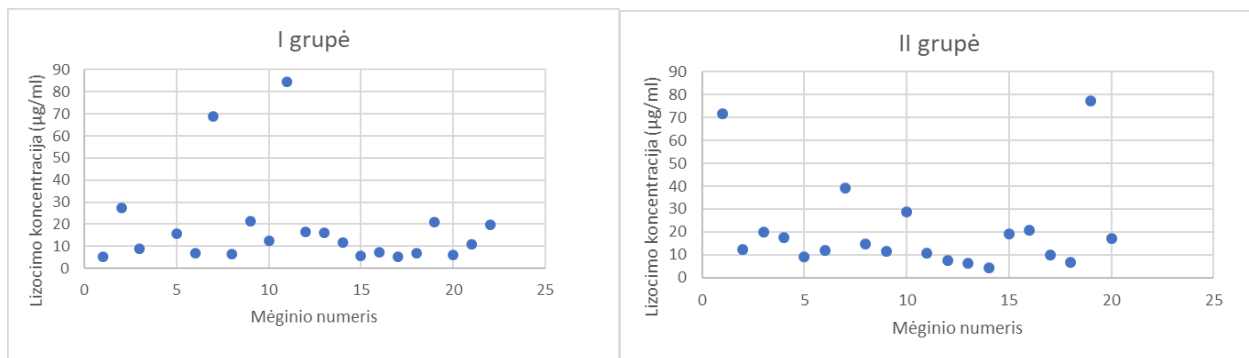


20 pav. Laktoferino koncentracija išnešiotų ir neišnešiotų naujagimių motinos piene

3.4. Lizocimo koncentracijos nustatymas

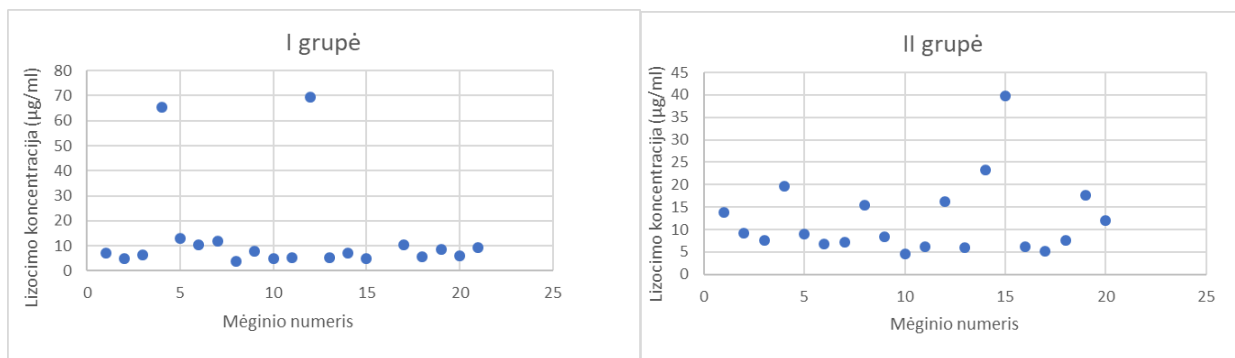
Atsižvelgiant į kūdikių išnešiojimo laiką buvo ištirta ir lizocimo koncentracija motinos piene. Motinų, išnešiojusių kūdikius piene lizocimo koncentracija varijuoja nuo 4,4-77,3 $\mu\text{g/ml}$, kai mediana- 13,65 $\mu\text{g/ml}$. Neišnešiojusių kūdikių- 5,4-84,5 $\mu\text{g/ml}$. Mediana- 11,9 $\mu\text{g/ml}$. (**21 pav.**)

Lizocimo koncentracijos ribos I grupės mėginiuose yra šiek tiek didesnės, nei II grupės, nors rezultatas nėra statistiškai reikšmingas ($p=0,3751$).



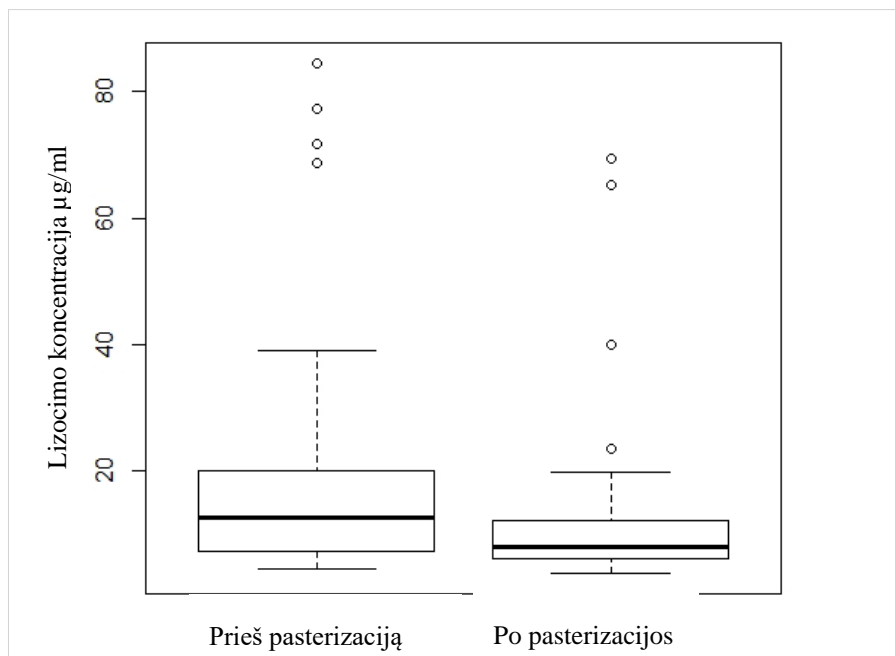
21 pav. Lizocimo koncentracija prieš pasteurizaciją

Pasterizavus pieną, lizocimo koncentracija sumažėjo. Pateiktoje (**22 pav.**) diagramoje matoma, kad išnešiojusių kūdikius motinų piene jo buvo rasta- 4,5- 39,8 µg/ml, mediana- 8,8 µg/ml. Neišnešiojusių- 3,7- 69,5 µg/ml. Mediana- 7,20 µg/ml.



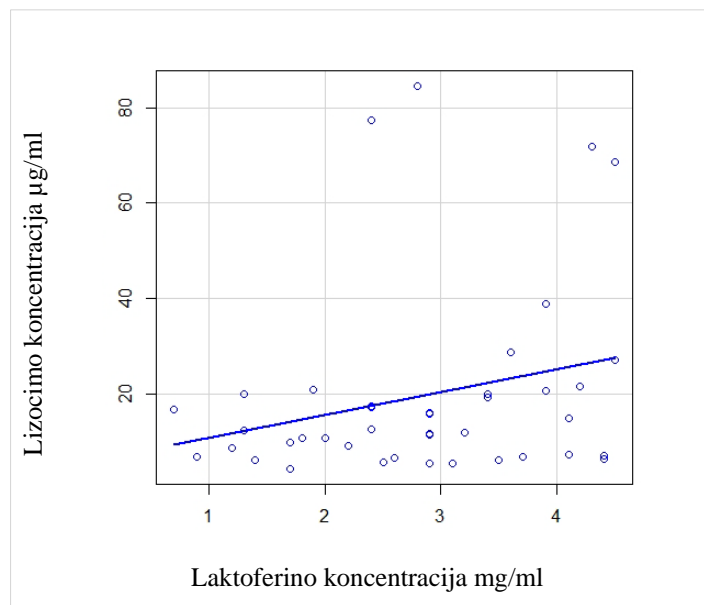
22 pav. Lizocimo koncentracija po pasteurizacijos

Tyrimo duomenimis pasteurizacija sumažino ir lizocimo koncentraciją motinos piene. Iš gautų rezultatų (**23 pav.**) matoma, kad mediana nepasterizuotame piene yra 12,4 µg/ml, o po pasteurizacijos sumažėja iki 7,8 µg/ml. Skirtumai tarp koncentracijų yra statistiškai reikšmingi ($p<0,001$), taigi galime teigti, kad dėl pasteurizacijos piene lizocimo koncentracija sumažėja 37%.



23 pav. Lizocimo koncentracija išnešiotų ir neišnešiotų naujagimių motinos piene

Taip pat tyrime buvo matuota koreliacija tarp nepasterizuotų II grupės mėginių laktoferino ir lizocimo koncentracijų. $r= 0,237$, kai $p= 0,1357$ (statistinės reikšmės neturi). Koreliacijos nėra. **(24 pav.)**



24 pav. Lizocimo ir laktoferino korealiacija

4. REZULTATŲ APITARIMAS

Tyrimo metu buvo siekiama nustatyti kokios bakterijos kolonizuoja motinos pieną ir ar jų augimas priklauso nuo kūdikio išnešiojimo laiko. Ar pasteurizacija daro įtaką motinos pieno baltymų laktoferino ir lizocimo koncentracijai. Taip pat nustatyti šių baltymų kiekybinius skirtumus išnešiotus ir neišnešiotus naujagimius pagimdžiusių motinų piene. Suskirsčius ėminius į dvi grupes: I gr.- motinos, pagimdžiusios neišnešiotus naujagimius (<32 sav.) ir jų pieno mėginiai ir II gr.- motinos, pagimdžiusios išnešiotus naujagimius ir jų pieno mėginiai, medžiagų koncentracijoms išmatuoti buvo panaudotas imunofermentinis ELISA metodas (Human Lactoferrin ELISA ir CircuLex Human Lysozyme ELISA), bakterijų augimui įvertinti- mikrobiologinis pasėlio tyrimas.

Atlikus pieno pasėlio tyrimą, buvo rastos: plazmos nekoaguliuojančios *Staphylococcus* spp. ir *Staphylococcus aureus* bakterijos. Jų augimas varijavo leistinose ribose: *Staphylococcus* spp. 10^3 - 10^4 KSV/ml, o *S. aureus* iki 10^5 KSV/ml. Kitų autorių tyrimuose pvz.: Ted Jost tyrime apie mikroorganizmų perdavimą kūdikiui per motinos pieną ir M.P. Heikkilä ir P.E.J. Saris tyrime apie *Staphylococcus aureus* augimo pieno mėginiuose slopinimą įrodyta, jog sveikos motinos piene daugiausiai ir dažniausiai yra randamos *Staph. epidermidis*, *Strep. salivarius*, *Strep. mitis*, *Propionibacterium* bei *Enterococcus* spp. bakterijos. Mūsų gauti rezultatai sutampa su kitų mokslininkų tyrimais [53, 54]. Apskaičiavus koreliacijos koeficientą tarp šių bakterijų augimo ir naujagimio išnešiojimo laiko koreliacijos rasta nebuvo ($p=0,1359$).

Neišnešiotus naujagimius pagimdžiusių motinų piene (I gr.) rasta laktoferino koncentracija svyravo nuo 0,7 iki 4,5 mg/ml, kai mediana- 3,0 mg/ml. Išnešiotus naujagimius pagimdžiusių motinų piene (II gr.)- 0,9- 4,3 mg/ml, kai mediana- 2,4 mg/ml. Rezultatai rodo tendenciją į didesnę laktoferino koncentraciją I grupės mėginiuose, nei II grupės, tačiau šie duomenys nebuvo statistiškai reikšmingi ($p=0,198$). Panašūs rezultatai gaunami ir kitų mokslininkų tyrimuose, pvz.: Christie G. Turin, *et al.* tyrime apie laktoferino koncentraciją, motinų pagimdžiusių mažo svorio naujagimius. Čia išnešiotus naujagimius pagimdžiusių motinų piene laktoferino koncentracija buvo $2,10\pm 0,87$ mg/ml. O neišnešiotų naujagimių motinos piene- $3,55\pm 0,90$ mg/ml. Koncentracijų skirtumai taip pat nebuvo statistiškai reikšmingi ($p=0,49$), tačiau didesnės koncentracijos tendencija taip pat matoma [51].

Išmatavus lizocimo koncentraciją I ir II grupių mėginiuose gauti rezultatai: neišnešiotų naujagimių motinos piene jo koncentracija buvo 5,4-84,5 μ g/ml, mediana- 11,9 μ g/ml.

Pagimdžiusių išnešiotus naujagimius- 4,4-77,3 $\mu\text{g/ml}$, kai mediana- 13,65 $\mu\text{g/ml}$. Kūdikio išnešiojimo laikas nedaro įtakos lizocimo koncentracijai ($p= 0,375$). Palyginus gautus rezultatus su kitų mokslininkų tyrimais, rezultatai buvo panašūs. Ya-Chi Hsu atliktame tyrime apie pokyčius per anksti gimusių naujagimių motinos piene buvo gauta, jog lizocimo koncentracija prieš laiką gimdžiusių piene- $18,03 \pm 7,88 \mu\text{g/ml}$, laiku gimdžiusių- $15,71 \pm 7,78 \mu\text{g/ml}$. Rezultatas taip pat nebuvo statistiškai reikšmingas ($p= 0,468$). [52]

Kad būtų sunaikintos pieno mėginiuose rastos bakterijos ir pienas būtų saugus, jis buvo pasterizuotas ir tada išmatuoti laktoferino ir lizocimo kiekiai. Pasterizacijos poveikis laktoferinui buvo stiprus: prieš pasterizaciją mediana buvo 2,9 mg/ml, po pasterizacijos- 0,01 mg/ml. Duomenys buvo statistiškai reikšmingi ($p < 0,0001$) ir parodė 99% laktoferino sumažėjimą pasterizavus mėginius. Taip pat pasterizavus pieno mėginius lizocimo koncentracija sumažėjo nuo 12,4 $\mu\text{g/ml}$, iki 7,8 $\mu\text{g/ml}$, tai yra 37% ($p < 0,001$). Kiti duomenų šaltiniai, tokie kaip L. Christen tyrimas 2013 m. Australijoje, parodė, jog dėl pasterizacijos lizocimo koncentracija sumažėjo 75%, tai reiškia, kad sumažėjo dvigubai daugiau, nei mūsų tyrime. Tuo tarpu laktoferino koncentracija sumažėjo iki 90% [32]. Skirtumas tarp šio tyrimo ir L. Christen galimas dėl skirtingo imties dydžio ir motinos laktacijos periodo. Tačiau abiejų tyrimų atsakymai rodo stiprų koncentracijos sumažėjimą.

5. IŠVADOS

1. Bakterijų augimas nesusijęs su kūdikio išnešiojimo laiku. Pieno mėginiuose prieš pasterizaciją buvo rastos plazmos nekoaguliuojančios *Staphylococcus* spp. ir *Staphylococcus aureus* bakterijos. Jų kiekiai mėginiuose neviršėjo leistinos ribos: *Staphylococcus* spp. 10^3 - 10^4 KSV/ml, *S. aureus* iki 10^5 KSV/ml.
2. Laktoferino ir lizocimo koncentracija nepriklauso nuo naujagimio išnešiojimo laiko.
3. Pasterizacija reikšmingai sumažino laktoferino ir lizocimo koncentracijas pieno mėginiuose. Laktoferino koncentracija sumažėjo- nuo 2,9 mg/ml iki 0,01 mg/ml (99%, $p < 0,0001$). Lizocimo- nuo 12,4 μ g/ml, iki 7,8 μ g/ml (37%, $p < 0,001$).

6. REKOMENDACIJOS

Motinos pienas - nepamainomas maistas kūdikiui. Jame esantys mikroorganizmai yra svarbūs kūdikio vystymuisi, imuninės sistemos formavimuisi, o pats žindymas teigiamai veikia ir motiną. Nesant galimybei maitinti kūdikį savu pienu, yra skiriamas donorinis motinos pienas. Kad pienas būtų mikrobiologiškai saugus jis turi būti pasterizuotas. Savo darbe nustaciau, kad dėl pasterizacijos poveikio reikšmingai sumažėja laktoferino ir lizocimo koncentracijos. Nepaisant kiekio sumažėjimo, šių baltymų piene lieka- lizocimo net iki 63%. Tad tiek likęs laktoferinas, tiek lizocimas, kaip buvo aptarta anksčiau, prisideda prie įvairių patogeninių mikroorganizmų augimo slopinimo, gerųjų žarnyno bakterijų dauginimosi, imuninės sistemos kūrimo. Nors ir baltymų koncentracijos sumažėja, yra žinoma, jog pasterizuotas pienas yra saugus naujagimiui maitinti, o likusios medžiagos po pasterizacijos veikia naujagimio naudai. Todėl kūdikio žindymas, arba maitinimas donoriniu motinos pienu yra skatinamas.

LITERATŪROS ŠALTINIAI

1. Ballard, O.; Morrow, A. L. 2013. Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors, *Pediatric Clinics of North America* 60(1): 49-74.
2. *Motinos pienas* [interaktyvus]. MediaPRO; [žiūrėta 2017 m. Sausio 10 d.] Adresas: <https://mediapro.lt/motinos-pienas/>.
3. *Oksitocinas, pieno tekėjimas ir pieno atleidimo refleksas* [interaktyvus]. Sukurta 2016, Rugsjūtis 6 [žiūrėta 2017 m. Sausio 10 d.].
Adresas: <http://www.zindymas.lt/oksitocinas-pieno-tekejimas-ir-pieno-atleidimo-refleksas> .
4. *Nebeturiu pieno, arba kaip iš tikrųjų veikia pieno gamyba motinos organizme* [interaktyvus]. Sukurta 2017m. [žiūrėta 2017 m. sausio 12 d.]
Adresas: <http://www.vaikui.lt/kudikis/kudikio-maitinimas/nebeturiu-pieno-arba-kaip-is-tikruju-veikia-pieno-gamyba-moters-organizme/>
5. *Gyvybės eliksyras slypi mamos piene* [interaktyvus]. Sukurta 2008 m. [žiūrėta 2017 m. sausio 11d.]Adresas:http://sos03.lt/Nestumas_ir_naujagimis/Naujagimio_prieziura/Gyvybes_eliksyras_slypi_mamos_piene
6. *Motinos pieno svarba kūdikiui* [interaktyvus]. Sukurta 2013 m. [žiūrėta 2017 m. sausio 11d.]
Adresas:https://.medguru.lt/sveika-gyvensena/busimoms-mamytams/motinos-pieno-svarba_kudikiui/
7. Bardanzellu, F.; Fanos, V.; Reali, V. 2017. “Omics” in Human Colostrum and Mature Milk: Looking to Old Data with New Eyes, *Nutrients* 9(8): 843.
8. *Mamos pienas nebūna per liesas* [interaktyvus]. Sukurta 2015m. [žiūrėta 2018 m. balandžio 14d.]
Adresas: <http://www.zindymas.lt/mamos-pienas-nebuna-per-liesas>
9. Grote, V., *et al.* 2016. Breast milk composition and infant nutrient intakes during the first 12 months of life, *European journal of clinical nutrition*, 70(2): 250-256.
10. Kent, J.C., *et al.* 2006. Volume and frequency of breastfeedings and fat content of breast milk throughout the day, *Pediatrics*, 117: 387-395.
11. Demmelmair, H.; Koletzko, B. 2018. Lipids in human milk, *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 32(1): 57-68.
12. Saarela, T.; Kokkonen, J.; Koivisto, M. 2005. Macronutrient and energy contents of human milk fractions during the first six months of lactation, *Acta Paediatr.*, 94(9): 1176–1181.

13. Long, Z.; Garima, P.; Casimir, C. A. 2016. Infant Formula Fat Analogs and Human Milk Fat: New Focus on Infant Developmental Needs, *Annual Review of Food Science and Technology*, 7: 139-165.
14. Moukarzel, S., *et al.* 2018. Milk Fat Globule Membrane Supplementation in Formula-fed Rat Pups Improves Reflex Development and May Alter Brain Lipid Composition, *Scientific Reports*, 8.
15. Murray, D. Carbohydrates Found in Breast Milk [interaktyvus]. 2018. Very Well Family [žiūrėta 2017 m. Sausio 10 d.] Adresas: <https://www.verywellfamily.com/the-carbohydrates-found-in-breast-milk-431997>.
16. Gabrielli, O., *et al.* 2011. Preterm milk oligosaccharides during the first month of lactation, *Pediatrics*, 128(6): 1520-1531.
17. Coppa, G.V., *et al.* 2001. Characterization of oligosaccharides in milk and feces of breast-fed infants by high-performance anion-exchange chromatography, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 501: 307-14.
18. *Journal of Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [interaktyvus]. 2018. The Netherlands: University of Groningen [žiūrėta 2019 kovo 25 d.]. Adresas: https://www.rug.nl/research/portal/files/53672674/Non_digestible_carbohydrates_in_infant_formula_as_substitution_for_human_milk_oligosaccharide_functions_Effects_on_microbiota_and_gut_maturation.pdf. ISSN 1040-8398.
19. McGuire, MK., *et al.* 2017. What's normal? Oligosaccharide concentrations and profiles in milk produced by healthy women vary geographically, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 105(5): 1086-1100.
20. *The Protein in Breast Milk* [interaktyvus]. Sukurta 2018 m. [žiūrėta 2019 m. kovo 25d.] Adresas: <https://www.verywellfamily.com/the-protein-in-breast-milk-3860951>
21. Camilia, R., *et al.*, 2016. Review of Infant Feeding: Key Features of Breast Milk and Infant Formula, *Nutrients*, 8(5): 279.
22. Lönnerdal, B., 2016. Bioactive Proteins in Human Milk: Health, Nutrition, and Implications for Infant Formulas, *The Journal of Pediatrics*, 173: 4-9.
23. Adkins, Y.; Lönnerdal B. 2003. Potential host-defense role of a human milk vitamin B-12-binding protein, haptocorrin, in the gastrointestinal tract of breastfed infants, as assessed with porcine haptocorrin in vitro, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77: 1234–1240.

24. Pacheco, L. G. *et al.*, 2014. Functional Aspect of Colostrum and Whey Proteins in Human Milk. *Journal of Human Nutrition and Food Science* [interaktyvus]. Rio de Žaneiras [žiūrėta 2019 m. sausio 10 d.] Adresas: https://www.researchgate.net/publication/266395737_Functional_aspect_of_colostrum_and_whey_proteins_in_human_milk. ISSN 2333-6706.
25. Lönnerdal, B. 2013. Bioactive proteins in breast milk, *Journal of Paediatrics and Child Health*, 49 (1).
26. Lönnerdal, B., 2014. Infant formula and infant nutrition: bioactive proteins of human milk and implications for composition of infant formulas, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 99 (3): 712–717.
27. Turin, C.G., *et al.*, 2014. Lactoferrin for prevention of neonatal sepsis, *Biometals*, 27(5): 1007–1016.
28. Ochoa, T.J., *et al.*, 2015. Factors associated with lactoferrin concentration in breast milk of Peruvian mothers of low-birth-weight infants. *Official XIIth International Conference on Lactoferrin*; 2015 Nov 02–06; Nagoya, Japan. 2015.
29. Yang, B., *et al.*, 2011 Characterization of Bioactive Recombinant Human Lysozyme Expressed in Milk of Cloned Transgenic Cattle, *Journal PLoS ONE*, [interaktyvus]. University of South Florida College of Medicine, United States of America. [žiūrėta 2018 gruodžio 2 d.] Adresas: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0017593>.
30. Allen, L.H., 2012. B vitamins in breast milk: relative importance of maternal status and intake, and effects on infant status and function, *Advances in Nutrition*, 3(3): 362-9.
31. Langienė, V., Drejerienė, V., Kinčinienė, O., 2016. Breastfeeding benefits for the newborn and the mother, factors that could affect breastfeeding: Literature review, *Theory and Practice in Medicine* 22(4): 281-287.
32. Christen, L., *et al.*, 2013. The Effect of UV-C Pasteurization on Bacteriostatic Properties and Immunological Proteins of Donor Human Milk, *Journal PLoS One*, 8(12): e85867 [interaktyvus]. School of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Science, The University of Western Australia. [Žiūrėta 2018 m. gruodžio 2 d.] Adresas: <https://journals.plos.org/plosone/article/authors?id=10.1371/journal.pone.0085867>.
33. Baack, M. L., *et al.*, 2012. Long Chain Polyunsaturated Fatty Acid Levels in U.S. Donor Human Milk: Meeting the Needs of Premature Infants? *Journal of Perinatology*, 32(8): 598–603.

34. Segura, *et al.*, 2012. Heating-induced Bacteriological and Biochemical Modifications in Human Donor Milk After Holder Pasteurisation, *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 54 (2): 197–203.
35. Peila, Ch., *et al.*, 2016. The Effect of Holder Pasteurization on Nutrients and Biologically-Active Components in Donor Human Milk: A Review, *The Nutrients* 8(8).
36. Lönnerdal, B., 2003. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77(6): 1537- 1543.
37. Demmelmair, H., *et al.*, 2017. Benefits of Lactoferrin, Osteopontin and Milk Fat Globule Membranes for Infants, *The Nutrients* 9(8): 817.
38. Underwood, M. A., 2014. Human milk for the premature infant, *The Pediatric Clinics of North America* 60(1): 189–207.
39. Kishore, R., *et al.*, 2017. Optimizing Nutrition in Preterm Low Birth Weight Infants- Consensus Summary, *The Frontiers in Nutrition*, 4: 20.
40. Brown, J. V., *et al.*, 2016. Multi-nutrient fortification of human milk for preterm infants, *Cochrane Database of Systematic Reviews* [interaktyvus]. University of York, York, UK. [žiūrėta 2018 m. gruodžio 15 d.] Adresas: <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD000343.pub3/full#CD000343-abs-0001>.
41. Wakabayashi, H., *et al.*, 2014. Lactoferrin for prevention of common viral infections, *The Journal of Infection and Chemotherapy*, 20 (11): 666-671.
42. Cheng, W. D., *et al.*, 2017. Lactoferrin and lysozyme to reduce environmental enteric dysfunction and stunting in Malawian children: study protocol for a randomized controlled trial, *The Trial* [interaktyvus]. Department of Pediatrics Washington University in St. Louis, One Children's Place Saint Louis USA [žiūrėta 2019 m. sausio 10 d.] Adresas: <https://link.springer.com/article/10.1186/s13063-017-2278-8#aboutcontent>. ISSN 1745-6215.
43. Petherick, A., 2017. Holder Pasteurization Holds Up Well Against Most Germs, *International Milk Genomics Consortium* [interaktyvus]. [Žiūrėta 2019 m. balandžio 1 d.]. Adresas: <http://milkgenomics.org/article/holder-pasteurization-holds-well-germs/>
44. González-Chávez, S.A.; Arévalo-Gallegos, S.; Rascón-Cruz, Q. 2009. Lactoferrin: structure, function and applications, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33(4): 301-301.
45. Sebald, A., *et al.*, 2017. Saliva and oral health, *Maxfacts* [interaktyvus]. United Kingdom. [žiūrėta 2019 m. Kovo 25 d.] Adresas: <https://maxfacts.uk/help/oral-hygiene/saliva-and-teeth-mucosa>.

46. *Vilniuje duris atvėrė donorinio motinos pieno bankas* [interaktyvus]. Sukurta 2017 m. [žiūrėta 2019 m. kovo 25 d.] Adresas: <https://www.15min.lt/gyvenimas/naujiena/mityba/vilniuje-duris-atvere-donorinio-motinos-pieno-bankas-1030-765764>
47. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)* [interaktyvus]. [žiūrėta 2018 m. kovo 26d.] Adresas: <https://rockland-inc.com/elisa.aspx>
48. Turin, C.G., *et. al.*, 2017. Lactoferrin Concentration in Breast Milk of Mothers of Low-Birth-Weight Newborns, *Journal of Perinatology*, 37: 507–512.
49. Ya-Chi Hsu *et al.*, 2014. Changes in Preterm Breast Milk Nutrient Content in the First Month, *Pediatrics & Neonatology*, 55(6): 449-454.
50. Mayayo C., *et. al.*, 2016. Effect of high pressure and heat treatments on IgA immunoreactivity and lysozyme activity in human milk, *European Food Research and Technology*, 242(6): 891-898.
51. Toscano, M., *et al.*, 2017. Role of the Human Breast Milk-Associated Microbiota on the Newborns' Immune System: A Mini Review, *Frontiers in Microbiology* 8: 2100.
52. Davis, E. C., *et al.*, 2017. The Role of Early Life Nutrition in the Establishment of Gastrointestinal Microbial Composition and Function, *The Gut Microbes* 8(2): 143–171.
53. Heikkilä, M.P., Saris, P.E.J., 2003. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk, *Journal of Applied Microbiology* 95(3): 471-478.
54. Jost, T., 2015. Impact of human milk bacteria and oligosaccharides on neonatal gut microbiota establishment and gut health, *The Nutrition Reviews* 73(7): 426-437.
55. Turin, Ch. G., Ochoa, J. Th., 2014. The Role of Maternal Breast Milk in Preventing Infantile Diarrhea in the Developing World, *National Institutes of Health* 1(2): 97–105.
56. *Quantitative Determination of Human Lactoferrin. Human Lactoferrin ELISA* [interaktyvus]. Sukurta 2015. [žiūrėta 2018 m. kovo 26 d.] Adresas: https://www.biovendor.com/file/6362/Human%20Lactoferrin_ELISA_April%202015.pdf?version=201703241251
57. *CircuLex Human Lysozyme ELISA Kit User's Manual* [interaktyvus]. [žiūrėta 2018 m. kovo 26 d.] Adresas: https://www.mblintl.com/assets/CY-8114_W161004.pdf
58. Blais, A. *et al.*, 2014. Effects of lactoferrin on intestinal epithelial cell growth and differentiation: an in vivo and in vitro study, *Biometals* 27 (5): 857–874.

PRIEDAS Nr.1

Kas gali dovanoti piena?

Visos sveikos, per pirmus 6 laktacijos mėnesius, piena gaminančios moterys gali tapti motinos pieno donorėmis, išskyrus šiuos atvejus:

- Rūkymas ar kitų tabako gaminių vartojimas, nepriklausomai nuo kiekio.
- Alkoholio vartojimas.
- Narkotikų vartojimas.
- Vartojant medikamentus, tinkamumas tapti donore svarstomas kiekvienu atveju individualiai.

Užpildžius sveikatos deklaraciją ir sutikimą tapti motinos pieno donore, laboratorijoje atliksime Jūsų kraujo ištyrimą dėl infekcijų.

Moterys negali būti motinos pieno donorėmis, jei:

- vartoja ar vartojo narkotines medžiagas;
- per paskutinius 12 mėnesių buvo perpiltas kraujas ar kraujo produktai;
- per paskutinius 12 mėnesių buvo atlikta organų ar audinių transplantacija;
- per paskutinius 12 mėnesių yra pasidarę tatuiruotė ar įsivėrusios auskarų (išskyrus auskarus į ausis);
- per paskutinius 12 mėnesių turėjo seksualinių santykių su galimais ŽIV, ŽTLV ar hepatito nešiotojais, asmenimis, kurie naudojo švirkštus nelegaliems narkotiniams preparatams leisti ar sergančiais hemofilija;
- yra lėtinių infekcijų nešiotojos, tokių kaip ŽIV, ŽTLV, hepatitas B ar C, maliarija ar aktyvi tuberkuliozė;
- serga vėžiniais susirgimais;
- maitinasi pagal nepatvirtintas dietas, kuriose trūksta svarbių pagrindinių maisto produktų.

PRIEDAS Nr.2

Assay Procedure Summary

