

Comparison of Biological Factors Affecting the Bone and Immuno Activity May of Breast Feeding and Formula Feeding During Infancy

Mandana Rafeey¹, Amir Ghorbanihaghjo^{2*}, Fardad Masoumi¹

¹Liver and Gastrointestinal Disease Research Center, School of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

²Biotechnology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

Received: 18 Mar, 2013 Accepted: 6 Jul, 2013

Abstract

Background and Objectives: Human milk is a complex biologic fluid that contains nutritional and protective factors such as Osteoprotegerin (OPG), at level that is 1000-fold higher than that found in normal human serum. Since OPG and Receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) system are tightly involved in bone remodeling and immuno activity the present study was designated to evaluate the effect of breastfeeding on serum Soluble receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (sRANKL)/ OPG ratio in full term neonates in comparison with those of formula feeding full term neonates.

Materials and Methods: In this cross-sectional study serum levels of OPG and sRANKL in 45 breastfed infants were compared with those of 44 formula-fed full term infants. The levels of serum OPG, sRANKL, were determined by standard techniques using enzyme-linked immunosorbent assay kits (ELISA methods).

Results: The serum levels of OPG were significantly higher in breastfed infants ($P < 0.001$). No marked differences were observed between the serum levels of sRANKL in the two study groups ($p = 0.8$).

Conclusion: High OPG and level in serum of breastfed infants are important factors involved in remodeling of bone and immuno activity may prove superiority of breast feeding over formula feeding during infancy.

Keywords: Osteoprotegerin (OPG), Soluble Receptor Activator of Nuclear Factor-Kappa B Ligand (Srankl)

*Corresponding author:

E-mail: ghorbaniamir@hotmail.com

مقاله پژوهشی

مقایسه فاکتورهای بیولوژیک موثر در استخوانسازی در نوزادان تغذیه کننده با شیر مادر و شیر خشک

ماندانا رفیعی: مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
امیر قربانی حق جو: مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران، نویسنده رابط:

E-mail: ghorbaniamir@hotmail.com

فرداد معصومی: مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

دریافت: ۹۲/۲/۲۸ پذیرش: ۹۲/۴/۱۵

چکیده

زمینه و اهداف: شیر انسان مایع بیولوژیک پیچیده ای است که شامل عوامل تغذیه ای و حفاظتی مانند استئوپروتگرین (OPG) می باشد که در غلظتی با بیش از ۱۰۰۰ برابر بالاتر از آن مقدار طبیعی آن در خون انسان وجود دارد. نقش OPG بخصوص ترمیم و بازسازی استخوان و همچنین سیستم ایمنی در اتصال آن به گیرنده فاکتور هسته ای کاپا B (RANK) می باشد.

مواد و روش ها: در مطالعه مقطعی حاضر سطح سرمی OPG و (serum Soluble receptor activator of nuclear factor-kappa B) sRANKL (ligand) در ۴۵ نوزاد شیرخوار با ۴۴ نوزادان تغذیه شده با شیر خشک مقایسه شده اند.

یافته ها: در نوزادان شیر خوار سطح سرمی OPG به طور معنی داری بالاتر ($P < 0/001$). تفاوت قابل توجهی بین سطوح سرم از sRANKL در دو گروه مورد مطالعه ($p = 0/8$) مشاهده نشد.

نتیجه گیری: سطوح بالای OPG در سرم نوزادان شیرخوار در مقایسه با نوزادان تغذیه شده با شیر خشک می تواند بیانگر نقش OPG در رشد و بازسازی استخوان و فعالیت ایمنی باشد که ممکن است برتری تغذیه با شیر مادر را در دوران شیرخوارگی اثبات کند.

کلید واژه ها: استئوپروتگرین (OPG)، گیرنده محلول فعال کننده فاکتور هسته ای کاپا B لیگاند (sRANKL).

مقدمه

در نوزاد و کودکان می باشد. بررسی ها نشان می دهد که در رشد و بازسازی استخوان علاوه بر فاکتورهای سستی نظیر متابولیسم کلسیم - فسفر - هورمون پاراتیروئید (PTH) که بیشتر مورد توجه و مطالعه قرار گرفته اند، فاکتورهای جدیدتر بخصوص فاکتورهای درگیر در متابولیسم استخوان که عموماً یک سیستم تنظیمی مولکولی سه گانه متشکل از استئوپروتگرین (OPG) / گیرنده فعال فاکتور هسته ای کاپا بینای لیگاند (RANKL) / گیرنده های فعال کننده (RANK) RANKL با اهمیت بیشتری مطرح شده اند (۳-۶). RANKL که می تواند به فرم های متصل به غشاء و یا محلول (sRANKL) وجود داشته باشد در بافت های مختلف نظیر گره

شیر مادر مایع بیولوژیک، پیچیده و حیات بخشی است که حاوی مواد مغذی، هورمون ها، و فاکتورهای رشد می باشد که در رشد، توسعه و وضعیت ایمنی بدن نوزاد نقش بسزایی دارد (۱) اهمیت تغذیه با شیر مادر در پیشگیری از بیماری ها در نوزاد، و رشد و تکامل ارگانهای مختلف در کودک کاملاً اثبات شده است (۲). مطالعات حاکی از آن است که دوران کودکی از مهم ترین زمان های مربوط به فرآیندهای حاکم بر بازسازی استخوان و همچنین توسعه و تکامل پاسخهای ایمنی می باشد. در دوران کودکی، تشکیل استخوان بیش از تحلیل آن می باشد که نتیجه آن تضمین کننده استخوانسازی مناسب به موازات تغییرات سریع در

معیارهای خروج از مطالعه عبارت بودند از: نوزادان مبتلا به سیتی سمی، کم خونی شدید، نیاز به مراقبت های ویژه نوزادان (NICU)، بیماری های همولیتیک، دریافت پلاسما منجمد تازه (FFP) و فراورده های خونی دیگر و هر نوع بیماری و یا استفاده از داروها شناخته شده که توانایی تاثیر بر متابولیسم استخوان داشته باشد. همچنین در مطالعه حاضر مادران سیگاری و معتاد به مواد مخدر نیز از مطالعه حذف گردیدند. سرم موجود در نمونه های خون وریدی به دست آمده از نوزادان بروش سانتریفیوژ با دور پایین جدا و آنالیز کلسیم (Ca)، فسفر (P) و آلکالین فسفاتاز (ALP) بلافاصله انجام و باقی مانده نمونه های سرم در -70°C جهت بررسی ذخیره گردید. سطح سرمی کلسیم، فسفر و آلکالین فسفاتاز بروش استفاده از اتونالیزور با کیت های تجاری پارس آزمون با روش آنزیمی در حضور کنترل و استاندارد های لازم بصورت دوتایی مورد سنجش قرار گرفت. غلظت سطوح سرمی OPG و sRANKL با استفاده از روش تجاری ایمونوسوربت متصل به آنزیم (ELISA) ساخته شده توسط شرکت BioVendor ساخت کشور جمهوری چک و با استفاده از دستورالعمل ارائه شده در هر کیت مورد سنجش قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری

متغیرهای پیوسته به صورت میانگین \pm انحراف معیار استاندارد نشان داده شد. متغیرهایی با گستردگی بالا و عدم توزیع نرمال پس از بررسی با آزمون کولموگروف اسمیرنوف با متد های غیر پارامتریک مورد آنالیز قرار گرفتند. بررسی و مقایسه تفاوت تغییرات قبل و بعد از دریافت مکمل ها بین دو گروه توسط آزمون های *Independent Sample t-test* و *Mann-Whitney U-test* بر حسب پارامتریک و یا غیر پارامتریک بودن مورد بررسی قرار گرفتند. به منظور بررسی ارتباط متغیرهای مطالعه با یکدیگر از آزمون همبستگی پیرسون استفاده شد. سطح $P < 0/5$ در مطالعه حاضر معنی دار در نظر گرفته شد و نتایج با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱۳ تجزیه و تحلیل گردید.

یافته ها

در جدول ۱ خلاصه اطلاعات دموگرافیک و یافته های آزمایشگاهی نوزادان هر دو گروه شرکت کننده در مطالعه بر اساس روش تغذیه از طریق شیر مادر و یا استفاده از شیر خشک نشان داده شده است. نتایج نشان می دهد که تفاوت آماری معنی داری بین دو گروه از نظر سن، وزن، جنس، کلسیم، فسفر، آنزیم الکان فسفاتاز و همچنین sRANKL دیده نمی شود. همانطور که در جدول ۲ نشان داده شده است، اگر چه غلظت OPG سرم در تغذیه با شیر مادر به طور معنی داری بالاتر از آن تغذیه با فرمول (p = ۰/۰۰۱) است، تفاوت معنی داری بین سطوح sRANKL در دو گروه شیر مادر خوار و شیر خشک وجود داشت (p=۰/۷) (جدول ۲).

های لفاوی، طحال، تیموس و سلولهای تشکیل دهنده استخوان وجود دارد (۸ و ۷). RANKL با اتصال به گیرنده های ریشه، RANK، توانایی تحریک استئوکلاست ها و پیش سازهای آنها را دارا می باشد (۹). در مقابل، OPG به عنوان یک مهارکننده بازجذب استخوانی قابلیت اتصال به RANK عمل می کند که این امر می تواند از تشکیل کمپلکس RANKL-RANK جلوگیری و در نهایت از تحلیل استخوان پیشگیری نماید (۶). مطالعات نشان می دهند که تعادل بین OPG و sRANKL در تنظیم و هموستاز استخوان نقش بسزایی را بازی می نماید بطوری که تغییر در این تعادل می تواند با ایجاد اثرات سوء بخصوص با اختلالات مرتبط با افزایش تحلیل استخوان و یا رسوب کلسیم در دیواره عروق همراه باشد که این امر تائیدی بر نقش و دخالت سایر بافت های مختلف، از جمله ریه، قلب، کلیه، و جفت و همچنین در غده پستانی دارد. نشان داده شده است که شیر انسان حاوی مقدار قابل توجهی از OPG می باشد (۱۰-۱۲). مطالعات حاکی از آن است که OPG فعال موجود در نمونه های شیر انسان است در زمان های مختلف در طول دوره شیردهی حتی در غلظت های بالاتر از ۱۰۰۰ برابر مقدار طبیعی آن در سرم وجود دارد (۴). مطالعات نشان داده است که شیر انسان علاوه بر تاثیر مهمی که در ایجاد ایمنی نوزاد دارد در فعالیت های استخوان سازی و در نهایت رشد طبیعی آن نقش بسیار مهمی را ایفا میکند. از انجایی که فاکتور اصلی رشد و هموستاز استخوان سیستم RANK/RANKL/OPG می باشد و با توجه به نقش حفاظتی OPG در استخوان همراه با در نظر گرفتن غلظت بالای آن در شیر مادر، بنظر می رسد که تغذیه از طریق شیر مادر نقش بسزایی در مقایسه با تغذیه از طریق شیر خشک در رشد استخوانی نوزادان داشته باشد که در مطالعه حاضر فرضیه فوق مورد بررسی و مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش ها

مطالعه حاضر به صورت مقطعی در دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تبریز- بیمارستان کودکان و کلینیک شیخ رئیس در سال های ۱۳۸۹-۱۳۹۰ انجام و کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تبریز نحوه انجام آن را تایید نموده است.

نوزادان مورد مطالعه شامل ۲ گروه تغذیه از طریق شیر مادر و یا تغذیه از طریق شیر خشک می باشند که از نظر شرایطی نظیر وزن - وضع مالی خانواده - نحوه نگهداری همسان سازی شده اند. از ۸۹ نوزاد سالم شرکت کننده در مطالعه حاضر ۴۵ نوزاد فقط با شیر مادر از (۳۰ پسر و ۱۵ دختر) به عنوان گروه مورد (گروه A) و ۴۴ نوزاد که به طور انحصاری با شیر فرمول تغذیه شده بودند، به عنوان گروه شاهد (۲۷ پسر و ۱۷ دختر) (گروه B) انتخاب شدند. اطلاعات مربوط به سن، جنس، وزن، نوع تغذیه (شیر مادر و یا فرمولا)، سن حاملگی، و شرح حال دقیق برای تمامی نوزادان ثبت گردید. نمونه گیری از نوزادان پس از موافقت کتبی والدین انجام گردید (۱۳).

جدول ۱: مشخصات نوزادان مورد مطالعه در دو گروه و بررسی نتایج حاصل از تغذیه با شیر مادر و تغذیه با شیر خشک

متغیرها	گروه تغذیه شونده با شیر مادر n=۴۵	گروه تغذیه شونده با شیر خشک n=۴۴	عدم P
سن (روز)	۴۷/۴±۱۲/۶	۴۲/۸±۱۳/۸	۰/۰۶
وزن (gr)	۳۶۸۱/۴±۸۵۵/۶	۳۵۹۸/۶±۷۹۸/۷	۰/۸۵
جنس (دختر/پسر)	۳۰/۱۵	۲۷/۱۷	۰/۶۰
کلسیم (mmol/L)	(۰/۸-۱/۹۰)۰/۱/۱۷	(۰/۶-۱/۹۸)۰/۱/۱۵	۰/۸۹
فسفر (mg/dl)	۵۷±۱/۵	۶/۰±۱/۳	۰/۲۸
آنزیم الکالن فسفاتاز (IU/L)	۹۸۶/۵±۴۳۵/۶	۸۶۳/۴±۳۸۶/۴	۰/۱۶

داده ها بر حسب میانگین ± انحراف معیار نمایش داده شده است.

عدد p کوچکتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شده است

جدول ۲: مقایسه نتایج OPG و RANKL در دو گروه نوزادان تغذیه شده با شیر مادر و تغذیه شده با شیر خشک

متغیرها	گروه تغذیه شونده با شیر مادر n=۴۵	گروه تغذیه شونده با شیر خشک n=۴۴	عدم P
OPG(pg/ml)	۲۷۸/۲(۱۳۶/۶±۹۲۵/۴)	۱۹۷/۴(۷۴/۴±۶۷۴/۸)	۱/۰۰۱
RANKL(pg/ml)	۰/۳(۰/۰۵±۲/۴)	۰/۴۵(۰/۰۵±۲/۶)	۰/۷

اعداد بر حسب (Median(Min-Max) نمایش داده شده است

بحث

در مطالعه حاضر برای نخستین بار، غلظت OPG، sRANKL، به عنوان فاکتورهای مرتبط با فعالیت‌های التهابی و همچنین شاخص‌های مرتبط با هموستاز استخوان در دو گروه نوزادان تغذیه کننده با شیر مادر و شیر خشک مرد مقایسه قرار گرفته اند. هرچند اهمیت تغذیه با شیر مادر و نقش گسترده آن در تقویت سیستم ایمنی نوزاد - افزایش مقاومت در برابر بیماری‌ها - رشد مناسب علاوه بر اثرات روانی مورد مطالعه و بررسی‌های زیادی قرار گرفته است، اما نتایج سال‌های اخیر مبنی بر غلظت‌های بالای OPG در شیر می‌تواند حاکی از نقش موثر آن در استخوان‌سازی و رشد نوزادان باشد که در این بررسی مورد تاکید قرار گرفته است (۱ و ۴ و ۱۴). از سوی دیگر استئوپروزیس یک عامل تهدید کننده سلامتی در تمام دنیا است. شواهد زیادی وجود دارد که توده استخوانی کم با افزایش ریسک پوکی استخوان و شکستگی استئوپروتیک در دوره بزرگسالی همراه است (۲۶). استئوپروتگرین (OPG) از اجزاء محلول سوپر فامیلی رسپتور تومور نکروزیس بوده و به عنوان یک رسپتور محلول با اتصال به OPG و مهار آن، باعث مهار جذب استخوان می‌شود. مطالعات سال‌های اخیر نشان داده‌اند که اختلال در تنظیم سیستم OPG و OPL در پاتوفیزیولوژی جذب و تشکیل مجدد استخوان نقش مهمی ایفا می‌کند (۱۵-۱۷). شواهد متعددی مبنی بر ایجاد آسیب‌های استخوان و غضروف ناشی از اختلال سیستم OPG و OPL وجود دارد و مطالعات متعددی در داخل سلول و یا خارج از سلول نشان داده اند که افزایش OPL یا کاهش OPG می‌تواند در پیشرفت تخریب استخوان نقش داشته باشد، در حالیکه مهار OPL یا افزایش تولید یا درمان با OPG می‌تواند مکانیسم جذب استخوان را بطور قابل توجه کاهش دهد (۱۸-۲۰). یافته‌های مطالعه

حاضر نشان می‌دهد که سطوح بالاتری از OPG در نوزادان شیرخوار در مقایسه با نوزادان تغذیه کننده با شیر خشک وجود دارد هر چند که این تفاوت در سطوح سرمی sRANKL بین دو گروه مورد مطالعه دیده نشد. Granot و همکاران نشان دادند که نوزادان تغذیه کننده با شیر مادر در مقایسه با نوزادان استفاده کننده از شیر خشک میزان و نوع اسیدهای چرب غیر اشباع متفاوتی دارند. که این امر با توجه به اینکه ترکیب اسیدهای چرب غشای سلولی ارتباط بسیار نزدیکی با مصرف اسیدهای چرب موجود در رژیم غذایی دارد و نیز نتایج یافته‌های سال‌های اخیر که نشان داده اند تغییر در ترکیب این اسیدهای چرب با تغییرات پاسخ‌های ایمنی همراهی دارد و اینکه تغییر در ترکیب اسید چرب غشاء با ایجاد تغییرات در تولید سایتوکاین‌ها با ایجاد تغییر در پاسخ ایمنی همراه است تاکید بر اهمیت یافته‌های مطالعه حاضر می‌باشد (۲۱-۲۶). اگر چه بین سطوح سرم کلسیم و فسفر بین دو گروه مورد مطالعه تغییرات چشمگیری مشاهده نگردید و همچنین همبستگی قابل توجهی بین غلظت این ملکول‌های موثر در استخوان سازی با سطح OPG مشاهده نشد، اما بنظر می‌رسد که انجام مطالعات دراز مدت و همچنین سنجش فاکتورهای نظیر اندازه گیری دانسیته استخوان در تصمیم گیری‌های نهایی موثر باشد که در مطالعات آینده مورد توجه قرار خواهد گرفت. همچنین درک بهتر مکانیسم‌های درگیر در این پدیده نیازمند بررسی سایر فاکتورهای موثر نظیر سنجش C-telopeptide و N-telopeptide و procollagen را طلب می‌نماید.

نتیجه گیری

سطوح بالای OPG در سرم نوزادان شیرخوار در مقایسه با نوزادان تغذیه شده با شیر خشک می تواند بیانگر نقش OPG در رشد و بازسازی استخوان و فعالیت ایمنی باشد که ممکن است برتری تغذیه با شیر مادر را در دوران شیرخوارگی اثبات کند.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از مرکز تحقیقات گوارش و بیماریهای کبد که حمایت مالی این طرح را برعهده داشته اند و کلیه مادران و نوزادان شرکت کننده در طرح سپاسگزاریم.

References

1. Donnet-Hughes A, Duc N, Serrant P, Vidal K, Schiffrin EJ. Bioactive molecules in milk and their role in health and disease: the role of transforming growth factor-beta. *Immunol Cell Biol* 2000; **78**: 74-79.
2. Wagner CL, Taylor SN, Hollis BW. Does vitamin D make the world go 'round'? *Breastfeed Med* 2008; **3**: 239-250.
3. Jakobsen MS, Sodemann M, Molbak K, Aaby P. Reason for termination of breastfeeding and the length of breastfeeding. *Int J Epidemiol* 1996; **25**: 115-121.
4. Vidal K, van den Broek P, Lorget F, Donnet-Hughes Osteoprotegerin in human milk: a potential role in the regulation of bone metabolism and immune development. *Pediatr Res* 2004; **55**: 1001-1008.
5. Tat SK, Pelletier JP, Velasco CR, Padrines M, Martel-Pelletier J. New perspective in osteoarthritis: the OPG and RANKL system as a potential therapeutic target? *Keio J Med* 2009; **58**: 29-40.
6. Bolon B, Shalhoub V, Kostenuik PJ, Campagnuolo G, Morony S, Boyle WJ, et al. Osteoprotegerin, an endogenous antiosteoclast factor for protecting bone in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2002; **46**: 3121-3135.
7. Yeung RS. The osteoprotegerin/osteoprotegerin ligand family: role in inflammation and bone loss. *J Rheumatol* 2004; **31**: 844-846.
8. Schett G, Redlich K, Smolen JS. The role of osteoprotegerin in arthritis. *Arthritis Res Ther* 2003; **5**: 239-245.
9. Blair JM, Zheng Y, Dunstan CR. RANK ligand. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; **39**: 1077-1081.
10. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997; **89**: 309-319.
11. Thomas RJ, Guise TA, Yin JJ, Elliott J, Horwood NJ, Martin TJ, et al. Breast cancer cells interact with osteoblasts to support osteoclast formation. *Endocrinology* 1999; **140**: 4451-4458.
12. Naylor KE, Rogers A, Fraser RB, Hall V, Eastell R, Blumsohn A. Serum osteoprotegerin as a determinant of bone metabolism in a longitudinal study of human pregnancy and lactation. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; **88**: 5361-5365.
13. Andrew M, Paes B, Milner R, Johnston M, Mitchell L, Tollefsen DM, et al. Development of the human coagulation system in the full-term infant. *Blood* 1987; **70**: 165-172.
14. Mehta R, Petrova A. Biologically active breast milk proteins in association with very preterm delivery and stage of lactation. *J Perinatol* 2011; **31**: 58-62.
15. Stejskal D, Bartek J, Pastorková R, Růžicka V, Oral I, Horalík D. Osteoprotegerin, RANK, RANKL. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2001; **145**: 61-64.
16. Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther* 2007; **9**: S1.
17. Kwan Tat S, Padrines M, Théoleyre S, Heymann D, Fortun Y. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004; **15**: 49-60.
18. Sainenberg-Kermanac'h N, Cohen-Solal M, Bessis N, De Vernejoul MC, Boissier MC. Role for osteoprotegerin in rheumatoid inflammation. *Joint Bone Spine* 2004; **71**: 9-13.
19. Feige U. Osteoprotegerin. *Ann Rheum Dis* 2001; **60**: 81-84.
20. Granot E, Golan D, Berry EM. Breast-fed and formula-fed infants do not differ in immunocompetent cell cytokine production despite differences in cell membrane fatty acid composition. *Am J Clin Nutr* 2000; **72**: 1202-1205.
21. López-Alarcón M, Garza C, Habicht JP, Martínez L, Pegueros V, Villalpando S. Breastfeeding attenuates reductions in energy intake induced by a mild immunologic stimulus represented by DPTH immunization: possible roles of interleukin-1beta, tumor necrosis factor-alpha and leptin. *J Nutr* 2002; **132**: 1293-1298.

22. Kim MJ, Na B, No SJ, Han HS, Jeong EH, Lee W, et al. Nutritional status of vitamin D and the effect of vitamin D supplementation in Korean breast-fed infants. *J Korean Med Sci* 2010; **25**: 83-89.
23. Poulsen RC, Wolber FM, Moughan PJ, Kruger MC. Long chain polyunsaturated fatty acids alter membrane-bound RANK-L expression and osteoprotegerin secretion by MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediate* 2008; **85**: 42-48.
24. Field CJ. The immunological components of human milk and their effect on immune development in infants. *J Nutr* 2005; **135**: 1-4.
25. Hawkes JS, Bryan DL, James MJ, Gibson RA. Cytokines (IL-1beta, IL-6, TNF-alpha, TGF-beta1, and TGF-beta2) and prostaglandin E2 in human milk during the first three months postpartum. *Pediatric Res* 1999; **46**: 194-199.
26. Heaney RP, Abrams SA, Dawson-Hughes B. Peak bone mass. *Osteoporosis Int* 2000; **11**: 985-1009.