

**Česká zemědělská univerzita v Praze**  
**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**  
**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



**Testování oligosacharidů mateřského mléka v *in vivo***  
**podmínkách**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Nikol Modráčková

Obor studia: Výživa a potraviny

Vedoucí práce: Ing. Šárka Musilová, Ph.D.

Konzultant práce: prof. Ing. Vojtěch Rada, CSc.

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Testování oligosacharidů mateřského mléka v *in vivo* podmínkách" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucí diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne:

---

### **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí mé diplomové práce Ing. Šárce Musilové, Ph.D. za odborné a pečlivé vedení, cenné rady a znalosti, které mi byly předány. Dále bych ráda poděkovala prof. Ing. Vojtěchu Radovi, CSc. a celému kolektivu pracovníků Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky (ČZU v Praze) a zároveň také pracovníkům Laboratoře Gnotobiologie v Novém Hrádku (Mikrobiologický ústav AV ČR, v. v. i.).

# Testování oligosacharidů mateřského mléka v *in vivo* podmínkách

## Souhrn

Mikrobiota gastrointestinálního traktu novorozence je poměrně nestálá a způsob porodu významně ovlivňuje její složení. Porod císařskou sekcí je spojen s detekcí hojně zastoupených klostridií a nízkými počty bifidobakterií. Složení kojenecké střevní mikrobioty může být příznivě ovlivňováno a modifikováno podáváním prebiotik, probiotik a synbiotik. Prebiotika jsou nestravitelné složky potravy, které selektivně stimulují růst a aktivitu prospěšných bakterií v tlustém střevě. Probiotika jsou živé mikrobiální doplňky, které příznivě ovlivňují zdravotní stav hostitele. Synbiotika jsou kombinací prebiotik a probiotik. Prvními prebiotiky ve výživě kojence s bifidogenním účinkem jsou oligosacharidy mateřského mléka (OMM). Právě proto je mateřské mléko považováno za zlatý standard ve výživě kojence. Významná probiotická schopnost utilizace mateřského mléka kojeneckou mikrobiotou byla zjištěna u *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*. Součástí této diplomové práce je přehled aktuálních informací o kojenecké mikrobiotě a možných způsobech její modifikace, zároveň také souhrn informací o *in vivo* testování a gnotobiologii.

Cílem této práce bylo ověření synbiotického účinku *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* s OMM, který byl zjištěn *in vitro*, také v *in vivo* podmínkách. Podáváním synbiotika bylo způsobeno snížení počtů klostridií a gram-negativních bakterií *in vitro* a také *in vivo*. V *in vitro* kompetici bylo zároveň detekováno i významné zvýšení počtu bifidobakterií spolu s významnou produkcí acetátu a laktátu. Výstupem *in vitro* kompetice bylo zjištění, že testovaný bifidobakteriální kmen je potenciálním probiotikem pro kojence a mohl by být použit jako vhodná součást synbiotika spolu s OMM, nebo s mateřským mlékem se schopností snižovat počty potenciálně patogenních bakterií. Synbiotický účinek byl dále testován na myším modelu *in vivo*, ve kterém byly u pokusných skupin (skupina s OMM a *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* a skupina s mateřským mlékem a *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) sníženy počty *Clostridium* spp. U obou pokusných skupin byla zároveň také detekována specifická imunitní odpověď, která byla zprostředkována zvýšením hladiny IL-6. Nicméně, synbiotický účinek *in vivo* nebyl potvrzen. Zvířecí modely pravděpodobně nejsou zcela vhodné pro všestranné testování s nasimulováním komplexních podmínek lidského organismu, ale stále jsou nenahraditelné při testování bezpečnosti funkčních potravin.

**Klíčová slova:** oligosacharidy mateřského mléka, probiotikum, *in vivo*, FISH

# Testing of human milk oligosaccharides *in vivo* conditions

## Summary

The colonization of infant gastrointestinal tract by microorganisms is significantly influenced by the mode of delivery. The newborns born via caesarean section have typical composition of microbiota, which is characterized by the presence of clostridia and low bifidobacterial counts. Infant microbiome is quite unstable and the composition of infant gut can be modified by using of prebiotics, probiotics and synbiotics. Actually, prebiotics are indigestible food components that promote the growth and activity of beneficial bacteria in the colon. Probiotics are live microbial supplements, which favourably influence the host's health by improving intestinal microbial balance. Human milk oligosaccharides (HMOs) are the first bifidogenic prebiotics in infant colon. Moreover, HMOs are contained in human milk (HM), which is the gold standard for nourishment of newborns and infants. Moreover, naturally occurring infant probiotic strain *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* reveals adaptations for milk utilization. Finally, synbiotics are consisted of a combination of prebiotics and probiotics. This study summarises the current knowledge on the infant microbiome and its modifications and also *in vivo* testing and gnotobiology.

The aim of this study was to verify and evaluate detected *in vitro* synbiotic effect of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* and HMOs or HM *in vivo* conditions in humanized mice in presence of faecal microbiota from infants who were born by caesarean section. The administration of synbiotics reduced the counts of *Clostridium* spp. and gram-negative bacteria *in vitro* and also *in vivo*. A significant increase of bifidobacteria and production of acetate and lactate was determined after *in vitro* competition and also it has been proven that tested bifidobacteria is a suitable potential probiotic strain for infants and could act as synbiotics together with HMOs or HM and it also could decrease the counts of potentially pathogenic bacteria in infant gut. Another testing procedure was to confirm the synbiotic effect *in vivo* in the mouse model. Unfortunately, the synbiotic effect found *in vitro* assay did not correlate with *in vivo* findings. However, there were significantly decreased counts of *Clostridium* spp. in both experimental groups (HMOs + *B. longum* subsp. *infantis* and HM + *B. longum* subsp. *infantis*) and there was also a specific immune response detected by the increased level of IL-6. Animal models are probably not ideal perfect replacement for human conditions, but are necessarily for testing the safety of functional food.

**Key words:** human milk oligosaccharides, probiotic, *in vivo*, FISH

## Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod.....</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>Cíl .....</b>	<b>9</b>
2.1	Hypotéza .....	9
<b>3</b>	<b>Literární rešerše.....</b>	<b>10</b>
3.1	Mateřské mléko .....	10
3.1.1	Bifidogenní účinky mateřského mléka.....	12
3.1.2	Oligosacharidy mateřského mléka .....	12
3.2	Vývoj mikrobioty lidského gastrointestinálního traktu .....	14
3.3	Rod <i>Bifidobacterium</i> .....	17
3.4	Rod <i>Clostridium</i> .....	18
3.5	Faktory ovlivňují mikrobiotu kojence .....	20
3.5.1	Vliv způsobu porodu na mikrobiotu kojence .....	22
3.5.2	Vliv výživy na mikrobiotu kojence.....	22
3.5.3	Probiotika, prebiotika, synbiotika .....	25
3.5.3.1	Probiotika .....	25
3.5.3.2	Prebiotika .....	28
3.5.3.3	Synbiotika .....	30
3.6	Testování <i>in vivo</i> .....	31
3.7	Gnotobiologie, gnotobiont .....	32
<b>4</b>	<b>Materiál a metody .....</b>	<b>35</b>
4.1	<i>In vitro</i> kompetice.....	35
4.1.1	Příprava rifampicin-rezistentního mutanta (RRBM) .....	35
4.1.2	Identifikace pomocí biochemických testů .....	36
4.1.2.1	F6PPK.....	36
4.1.2.2	API 50 CHL .....	36
4.1.2.3	APIZYM .....	37

4.1.2.4	RAPID ID 32 A.....	37
4.1.3	Identifikace pomocí molekulárně-genetických testů .....	37
4.1.3.1	Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....	37
4.1.4	Růst RRBM na oligosacharidech mateřského mléka (OMM).....	38
4.1.5	Rozbor stolice kojenců a <i>in vitro</i> kompetice .....	39
4.1.6	Měření koncentrace těkavých mastných kyselin a laktátu .....	39
4.2	<i>In vivo</i> kompetice .....	40
4.2.1	Příprava vzorků kojenecké stolice .....	40
4.2.2	Humanizace bezmikrobních myší.....	40
4.2.2.1	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (FISH) .....	41
4.2.3	Směs OMM a MM s RRBM v humanizovaných myších .....	42
4.2.4	Měření koncentrace těkavých mastných kyselin a laktátu .....	43
4.2.5	Analýza cytokinů .....	43
4.2.6	Statistické vyhodnocení.....	43
<b>5</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>44</b>
5.1	<i>In vitro</i> .....	44
5.1.1	Růst RRBM na OMM .....	44
5.1.2	Kompetice a re-identifikace izolátů .....	44
5.1.3	Měření koncentrace těkavých mastných kyselin a laktátu ( <i>in vitro</i> ) .....	45
5.2	<i>In vivo</i> .....	46
5.2.1	Měření koncentrace těkavých mastných kyselin a laktátu ( <i>in vivo</i> ) .....	49
5.2.2	Analýza cytokinů .....	49
<b>6</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>51</b>
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>55</b>
<b>8</b>	<b>Seznam literatury.....</b>	<b>56</b>
<b>9</b>	<b>Přílohy .....</b>	<b>72</b>

## 1 Úvod

Mateřské mléko je vyváženým a komplexním zdrojem živin pro novorozence, a právě proto je považováno za zlatý standard ve výživě novorozence a kojence. Proteiny, lipidy a sacharidy mateřského mléka – také oligosacharidy mateřského mléka – se zároveň podílejí na správném vývoji imunitního systému novorozence a jeho ochraně před propuknutím řady onemocnění. Tato ochranná funkce mateřského mléka je spojována s obsahem oligosacharidů mateřského mléka, které jsou prvními prebiotiky pro novorozence. Prebiotika jsou nestravitelné složky potravy, které v tlustém střevě selektivně podporují růst prospěšných bakterií. Střevní mikrobiota novorozence je důležitým indikátorem jeho zdravotního stavu, je poměrně nestálá a je ovlivňována řadou faktorů – způsobem porodu a krmení, mikrobiotou matky, délkou hospitalizace a poporodní péčí. Mikrobiotu gastrointestinálního traktu lze dále modulovat také podáváním prebiotik, probiotik a synbiotik.

Vzhledem k příznivým vlastnostem synbiotik testovaných *in vitro* – oligosacharidů mateřského mléka s probiotikem *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* – na novorozeneckou střevní mikrobiotu by měl být prozkoumán mechanismus jejich působení také *in vivo*. Pokud by byl potvrzen synbiotický účinek *in vivo*, lze předpokládat možné použití tohoto synbiotika do budoucna. Jeho použití může vést k ovlivnění střevní mikrobioty novorozence ve prospěch ideálního zastoupení prospěšných bakterií vzhledem k bakteriím potenciálně patogenním. S tím souvisí podpora správného vývoje imunitního systému kojence a zároveň také podpora léčby řady kojeneckých onemocnění.



## 2 Cíl

Cílem práce bylo testování oligosacharidů mateřského mléka v *in vivo* podmínkách na BALB/c myších v kombinaci s probiotickým kmenem – rifampicin-rezistentním mutantem – *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*, tedy ověření, zda bude potvrzen jeden z hlavních *in vitro* závěrů bakalářské práce i v podmínkách *in vivo*, a to vhodnost použití probiotického rifampicin-rezistentního mutanta spolu s prebiotickými oligosacharidy mateřského mléka jako součást synbiotika vhodného pro kojence. Dílčím testováním bylo i ověření možného synbiotického účinku mateřského mléka spolu s probiotikem.

### 2.1 Hypotéza

Oligosacharidy mateřského mléka v kombinaci s probiotikem by měly vykazovat synbiotický účinek. Měly by ovlivnit složení střevní mikrobioty ve prospěch příznivých mikroorganismů potlačením rozvoje bakterií rodu *Clostridium* a jejich nahrazením podávaným probiotickým kmenem, u kterého by měla být selektivně podpořena kolonizace.

### 3 Literární rešerše

#### 3.1 Mateřské mléko

Mateřské mléko (MM) je komplexní druhově specifická heterogenní biologická tekutina, která splňuje výživové požadavky rychle rostoucího kojence, plní funkci podpory rozvoje kojeneckého imunitního systému a zároveň zajišťuje určitou ochranu vůči patogenům (Morrow and Rangel, 2004). Tato sloučenina vznikla a dále se vyvíjela v průběhu evoluce a byla původně jediným zdrojem výživy pro novorozence (Zivkovic et al., 2011), která významně zvyšovala šanci jedince k přežití a navíc snižovala pravděpodobnost propuknutí řady onemocnění (Bode, 2012). Funkční vlastnosti mateřského mléka jsou zajištěny přítomností synergického účinku mnoha bioaktivních molekul obsažených v mlezivu a zralém mléku, včetně imunokompetentních buněk, imunoglobulinů, mastných kyselin, polyaminů, oligosacharidů, lysozymu, laktoferinu a dalších glykoproteinů a antimikrobiálních peptidů (Newburg, 2005). Proteiny, lipidy, sacharidy, vitamíny, minerální a esenciální látky je nutno zmínit jako základní nutriety mateřského mléka (McVea et al., 2000). V mateřském mléce, kompletně přírodní sloučenině, jsou dále obsaženy hormony, protilátky, glykany, glykokonjugáty a antimikrobiální látky (Pacheco et al., 2015).

Nejvýznamnější funkcí mateřského mléka je zajištění nutričních potřeb potomků (Zivkovic et al., 2011), neméně důležitou vlastností je ochrana organismu před infekčními onemocněními (Pacheco et al., 2015) a v neposlední řadě je velmi významnou funkcí mateřského mléka správný rozvoj imunitního systému (Lawrence and Pane, 2007; Smith et al., 2003). Všechny tyto pozitivní vlastnosti mateřského mléka jsou spojovány právě s obsahem oligosacharidů mateřského mléka, které v této sloučenině plní funkci prebiotickou (Kunz et al., 2000). Vzhledem k vysokému obsahu různých variací oligosacharidů mateřského mléka je právě proto mateřské mléko unikátní oproti ostatním savčím mlékům (Kobata, 2010) a je označováno za zlatý standard ve výživě novorozenců (Walker, 2010). Hlavním rozdílem mezi mateřským a kravským mlékem je obsah sacharidů, proteinů, železa a fosforu (Johnson and Versalovic, 2012).

Mateřské mléko je neméně významné jako zdroj energie pro novorozeneckou střevní mikrobiotu, která je právě přijímaným mateřským mlékem značně modifikována (Pacheco et al., 2015). MM je úzce spjato s rozvojem kojenecké střevní mikrobioty, pomocí níž jsou dále zajištěny antiinfekční, imunomodulační a metabolické funkce ovlivňující život kojence (Fernández et al., 2013).

Kojením, či podáváním mateřského mléka je pokryt vyvážený příjem všech základních nutrietů a ideální přísun nezbytných aminokyselin pro novorozence. Bílkoviny mateřského mléka se dále účastní při trávicích procesech a utilizaci nutrietů ( $\beta$ -kasein,  $\alpha_1$ -antitrypsin), absorpci minerálů a vitamínů, imunomodulaci a dalších fyziologických dějích (Lonnerdal, 2003). Bílkoviny v mateřském mléce lze rozdělit na syrovátkový a kaseinový typ. V průběhu trávení dochází v žaludku ke srážení kaseinu, zatímco syrovátkové bílkoviny zůstávají v kapalném stavu a jsou lépe stravitelné. V závislosti na fázi laktace jsou syrovátkové bílkoviny v mateřském mléce zastoupeny až z 80 % (Martin et al., 2016). Kasein je velmi významný z hlediska nutričního, naopak imunoglobuliny A zprostředkovávají správnou funkci novorozenecké imunity (Niers et al., 2007).

Tuk v mateřském mléce je velmi významným zdrojem energie, esenciálních mastných kyselin, nenasycených mastných kyselin, cholesterolu a je velmi důležitým rozpouštědlem vitamínů rozpustných v tucích (Jensen et al., 1978).

Laktóza, jež je v mateřském mléce obsažena v koncentraci až 40–60 g/l, patří mezi hlavní sacharidy mateřského mléka (Kunz et al., 2000). Oligosacharidy mateřského mléka jsou další velmi významnou složkou MM, ve kterém jich bylo identifikováno již více jak 200 druhů; jsou složeny z jedné molekuly laktosy, nebo z jedné či více molekul monosacharidů, jako je D-glukosa, D-galaktosa, L-fukosa, *N*-acetylglukosamin, sialová kyselina (Bode, 2009; LoCascio et al., 2007).

Mateřské mléko, kromě již zmíněných živin, obsahuje také i další antibakteriální sloučeniny – laktoferin, laktoféricin, lysozym, laktoperoxidasy, haptokorin, volné mastné kyseliny a antimikrobiální peptidy (Field, 2005).

Laktoferin má antibakteriální aktivitu vůči spektru různých bakteriálních patogenů, která je způsobována zabavením železa či membránovou destabilizací daného patogenu. Tento mechanismus je způsobován kompetitivní vazbou laktoferinu na železo, jež je zablockováno a stává se tedy dále nepřístupné a nevyužitelné. Laktoferin vykazuje i širokou antivirální aktivitu, která je primárně způsobována blokací heparan sulfátu virové hostitelské buňky nebo interakcí s povrchovým proteinem daného viru (Jenssen and Hancock, 2009).

Další významnou antibakteriální složkou mateřského mléka je enzym lysozym, který má schopnost hydrolyzovat  $\beta$ -1,4-glykosidickou vazbu mezi *N*-acetylmuramovou kyselinou a *N*-acetylglukosaminem v peptidoglykanu buněčné stěny bakterií. Tato hydrolyza vazby inhibuje růst gram-pozitivních bakterií (Paramasivam et al., 2006). Lysozym je přirozeně obsažen v slzách, slinách, neutrofilních granulocytech, vaječném bílku (Lonnerdal, 2003) a v mateřském mléce, v němž dosahuje koncentrací až 400  $\mu$ l/ml (Clare et al., 2003).

Příjmem mateřského mléka, jakožto nejvhodnější volby výživy pro novorozence, je primárně zajištěn růst a vývin kojence. Mateřské mléko je navíc bohaté na protilátky, které zajišťují první rozvoj adaptivní imunity v novorozeneckém gastrointestinálním traktu (Martin et al., 2016).

### **3.1.1 Bifidogenní účinky mateřského mléka**

„Bifidogenní faktor“ mateřského mléka (také oligosacharidů mateřského mléka) byl původně identifikován jako bifidogenní či prebiotický účinek. Od počátku 90. let 20. století bylo dále zjišťováno, že oligosacharidy mateřského mléka nejsou pouze substrátem pro růst žádoucích bakterií kojeneckého střeva, ale mají také imunomodulační účinky, působí jako antiadhezivní antimikrobiální látky, jsou modulátory střevní epiteliální buněčné odpovědi, a také modulátory imunity, dále zajišťují přirozenou ochranu organismu proti propuknutí nekrotizující enterokolitidy, jsou nezbytnými živinami pro rozvoj mozku a ovlivňují i samotnou kojící matku (Bode, 2012).

Z mateřského mléka byla izolována řada peptidů se schopností stimulovat růst bifidobakterií. Mateřské mléko navíc obsahuje i velké množství bifidogenních složek, jako jsou glykoproteiny, glykolipidy, fukosa, neuraminová kyselina, laktosa, *N*-acetylglukosamin a různé oligosacharidy (Coppa et al., 2008). Bifidogenní účinek mateřského mléka je spíše vliv komplexu vzájemně se ovlivňujících dílčích faktorů (Venema, 2012).

### **3.1.2 Oligosacharidy mateřského mléka**

Oligosacharidy mateřského mléka (OMM) jsou strukturně rozmanité nekonjugované glykany, které jsou vysoce zastoupeny v mateřském mléce (MM), v němž svojí přítomností zajišťují unikátnost této přírodní sloučeniny (Bode, 2012). Po laktose a lipidech jsou OMM třetí nejvíce zastoupenou složkou MM (Venema, 2012).

Kolostrum, hustá nažloutlá tekutina vylučována mléčnou žlázou několik dní před a po porodu, obsahuje nejvyšší koncentrace (20–25 g/l) OMM. V průběhu zrání mateřského mléka dochází k postupnému snižování jejich koncentrace až na 5–20 g/l (Coppa et al., 1999; Gabrielli et al., 2011).

Jádro molekuly oligosacharidů mateřského mléka je složeno z pěti monosacharidových jednotek (glukosa, galaktosa, fukosa, *N*-acetylglukosamin a sialová kyselina), které jsou připojeny k mléčnému disacharidu laktose. *N*-acetylneuraminová kyselina je převládající, není i jedinou formou sialové kyseliny (Bode, 2012; Coppa et al., 2004). Vzhledem ke komplexnosti a jedinečnosti OMM je v současné době nemožné vyrobit oligosacharidy se strukturou jim identickou (Boehm et al., 2004). Komerčně dostupná prebiotika, kterými jsou

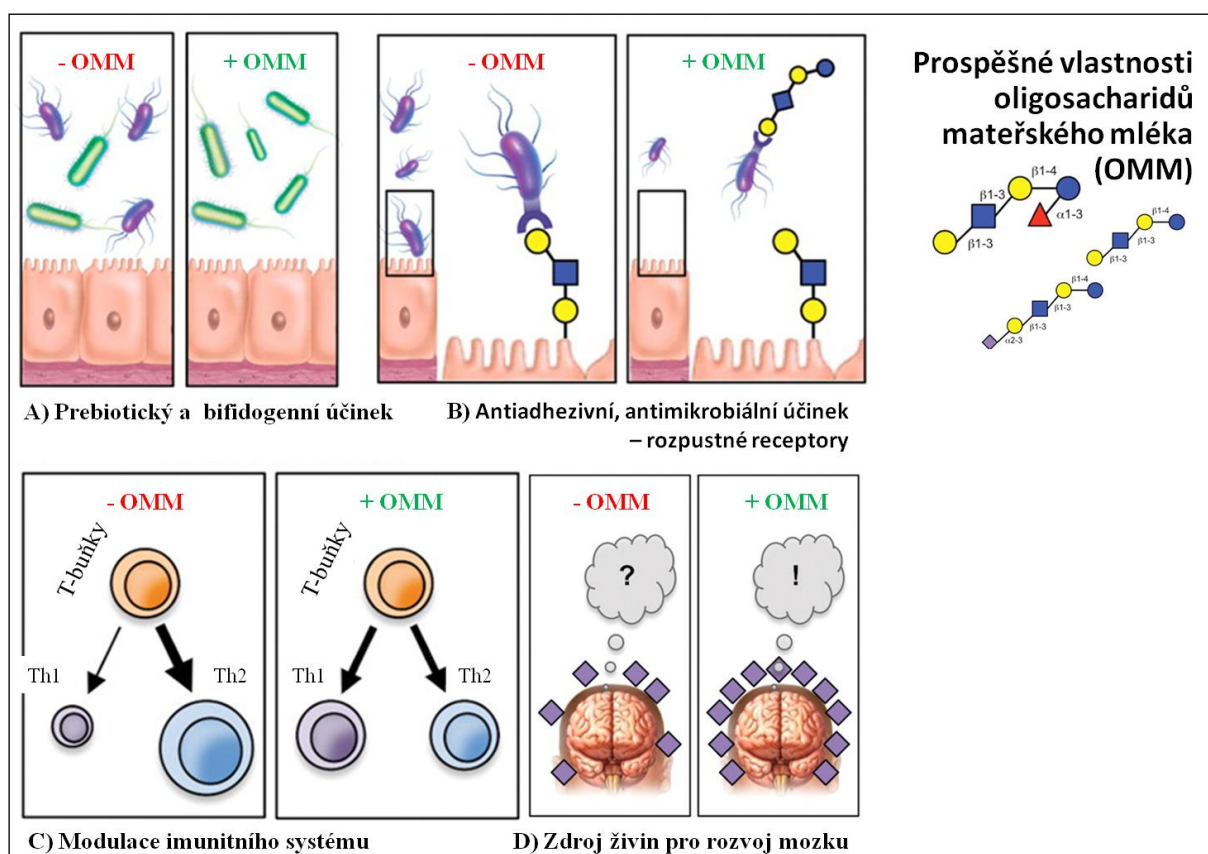
obohacovány kojenecké výživy, jsou limitována rozmanitostí a nestravitelností oligosacharidů v nich obsažených a oproti OMM mají mnohem jednodušší strukturu (Roberfroid, 2007).

Mateřské mléko obsahuje přes 200 struktur nestravitelných oligosacharidů (Barile and Rastall, 2013; Coppa et al., 2006), oproti tomu v kravském mléce nejsou obsaženy oligosacharidy prakticky žádné (Boehm et al., 2003). I v mléce dalších hospodářských zvířat se oligosacharidy vyskytují velmi zřídka a jsou mnohem méně strukturálně komplexní oproti OMM. Neexistují žádné další dostupné přírodní zdroje umožňující příjem oligosacharidů mateřského mléka a z tohoto důvodu jsou kojenecké výživy uměle obohacovány galaktooligosacharidy a fruktooligosacharidy s cílem co nejvíce napodobit složení a s tím související pozitivní vlastnosti oligosacharidů mateřského mléka (Bode, 2012). Nicméně, jak již bylo zmíněno, galaktooligosacharidy, fruktooligosacharidy a další prebiotické glykany jsou značně strukturně odlišné od oligosacharidů přirozeně se vyskytujících v mateřském mléku a vzhledem k tomu, že většina biologických účinků OMM je strukturně specifická, je velmi nepravděpodobné, že by strukturně nejednotné oligosacharidy mohly vykazovat stejné zdravotní výhody jako oligosacharidy v mateřském mléce (Bode and Jantscher-Krenn, 2012).

Dostatečný přísun OMM zajišťuje již zmíněný rozvoj imunitního systému kojence a pozitivně ovlivňuje jeho střevní mikrobiotu zvyšováním počtu zdravých prospěšných bakterií rodu *Bifidobacterium*, které jsou hojně se vyskytující skupinou střevních bakterií u zdravých kojenců kojených mateřským mlékem. Bakterie rodu *Bifidobacterium* jsou často používány jako probiotikum (Euler et al., 2005). Obecně lze tedy konstatovat, že příjmem OMM je zajištěn rozvoj zdravého novorozeneckého střeva a s tím související složení střevní mikrobioty s bifidobakteriální predomancí, a to u vaginálně porozených dětí a dětí kojených (Fallani et al., 2010). U kojenců porozených císařskou sekcí, v jejichž mikrobiotě dominuje rod *Clostridium*, lze v důsledku kojení předpokládat nahrazení klostridií bifidobakteriemi (Musilova et al., 2015).

OMM byly původně identifikovány jako bifidogenní faktor mateřského mléka. V současné době jsou známy již i další prospěšné vlastnosti těchto oligosacharidů – některé z nich jsou demonstrovány na následujícím obrázku (obrázek 1). Oligosacharidy mateřského mléka fungují jako: prebiotický substrát pro růst prospěšných bakterií a zajišťují tak růstovou výhodu proti potenciálně patogenním mikroorganismům (A); antiadhezivní a antimikrobiální látky bránící přilnutí patogenu (B); modulátory intestinálních epitelálních buněk a modulátory imunitního systému (C); zdroj sialové kyseliny – esenciální živiny pro vývoj mozku (D). OMM dále snižují adhezi leukocytů na endotelové buňky, čímž potenciálně snižují slizniční infiltraci (Bode, 2012).

Obrázek 1: Prospěšné vlastnosti oligosacharidů mateřského mléka (Bode, 2012)



### 3.2 Vývoj mikrobioty lidského gastrointestinálního traktu

Střevní mikrobiota je komplexní ekosystém s rozsáhlou metabolickou aktivitou skládající se z  $10^{11}$ – $10^{12}$  bakterií na gram stolice a je v ní obsaženo více než tisíce bakteriálních druhů (Blaut and Clavel, 2007; Qin et al., 2010). Lidské střevo lze přirovnat k anaerobnímu bioreaktoru, který je řízen obrovským množstvím různorodých bakterií. Tato intestinální mikrobiota zajišťuje svými genetickými a metabolickými atributy schopnost získat jinak nepřístupné živiny pro lidský organismus (Bäckhed et al., 2005).

Gastrointestinální mikrobiota má klíčovou roli ve zdraví a nemoci hostitele prostřednictvím jejího vlivu na výživu, patogenezí a imunologii (Young, 2012). Mikrobiální dysbióza gastrointestinálního traktu byla spojena s několika funkčními poruchami, například se zánětlivým onemocněním střev (Tamboli et al., 2004), syndromem dráždivého tračníku (Kassinen et al., 2007), rakovinou žaludku (Parsonnet et al., 1991), obezitou (Turnbaugh et al., 2006) a nekrotizující enterokolitidou (de la Cochetière et al., 2004).

Gastrointestinální mikrobiota může být považována za pomyslný orgán podílející se na výživě hostitele, rozvoji regulace střevní angiogeneze, ochraně před patogeny a rozvoji imunitní odpovědi (Johnson and Versalovic, 2012). Zásadní rolí lidské střevní mikrobioty je

podílení se na udržení zdravého stavu organismu podporováním střevní homeostaze, již zmíněnou stimulací vývoje imunitního systému a účastněním se při zpracování živin a získání energie pro organismus (Maynard et al., 2012; Young, 2012). Zachování lidského zdraví a homeostaze v měnících se okolních podmínkách v průběhu evoluce je pravděpodobně spojeno právě symbiózou mezi mikrobiotou a hostitelem (Rampelli et al., 2016).

Normální složení mikrobioty střevního traktu je velmi významné z hlediska udržení zdraví hostitele. Podílí se na jeho výživě, patogenezí, imunitě a zároveň zajišťuje odolnost daného organismu vůči kolonizaci potenciálně patogenními bakteriemi (Kleessen, 2000).

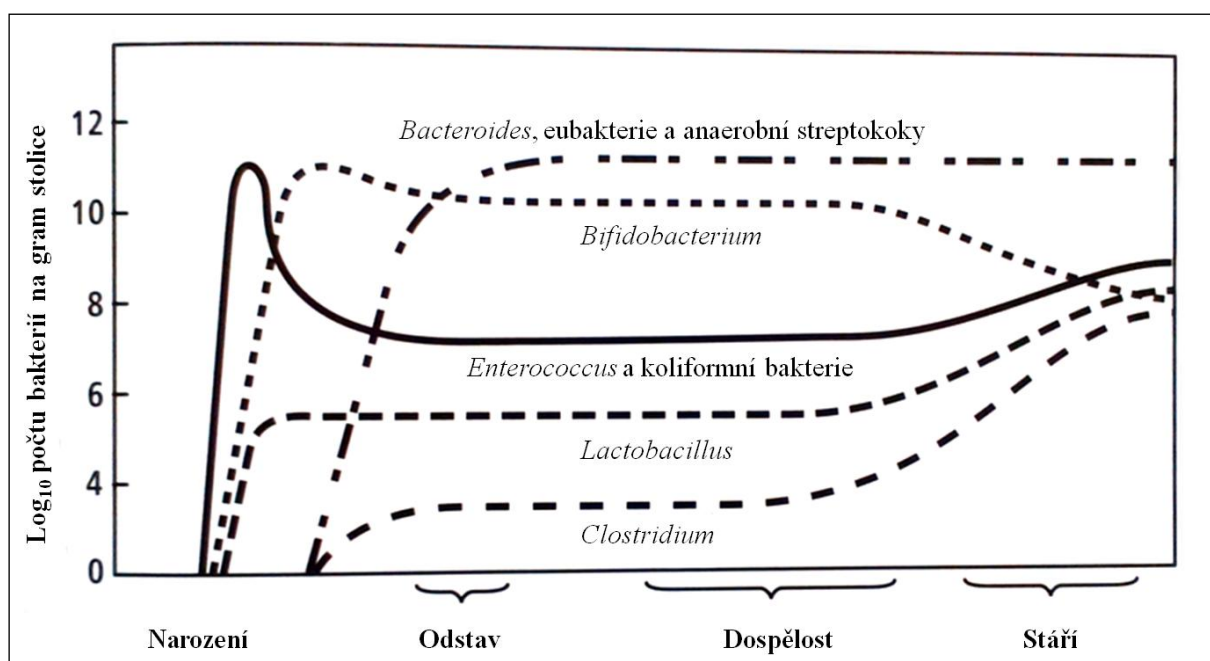
Kolonizace gastrointestinálního traktu kojence je nezbytná pro správnou funkci imunitního systému a vývojovou regulaci střevní fyziologie, čímž dochází ke snížení rizika propuknutí onemocnění během života jedince. První kontakt novorozence s mikroorganismy je zprostředkován porodem, průchodem plodu porodním kanálem matky. Typ výživy a další postnatální faktory dále ovlivňují složení kojenecké mikrobioty (Collado et al., 2012).

Během života člověka dochází k postupným modifikacím střevní mikrobioty. Porod je první fází, při níž je sterilní střevo novorozence kolonizováno mikroorganismy (Di Gioia et al., 2014). Několik hodin poté už je detekována přítomnost prvních bakterií v novorozenecké stolici (Hansen et al., 2012). Dalším velmi podstatným faktorem změny složení střevní mikrobioty je odstav kojence, kdy je kojencem přijímána komplexní strava. Vzhledem k příjmu komplexních sacharidů a živin dohází k ustálení střevní mikrobioty, která se začíná podobat mikrobiotě dospělého jedince. Další modifikace ve střevní mikrobiotě už jsou způsobovány pouze velkými změnami a zásahy do organismu a přirozeně pak také stárnutím organismu (Di Gioia et al., 2014; Koenig et al., 2011; Palmer et al., 2007). Odamaki et al. (2016) na základě výsledků své studie uvádí zřejmou souvislost v příjmu živin a také věku hostitele na složení jeho střevní mikrobioty.

Fakultativní anaerobové *Staphylococcus* spp., *Enterobacteriaceae* a *Streptococcus* spp. jsou prvními bakteriemi objevujícími se ve zdravém střevě kojence první dny po porodu. Novorozenecké střevo je pak dále kolonizováno striktními anaeroby – *Bifidobacterium*, *Bacteroides* a *Clostridium* (Di Gioia et al., 2014; Matamoros et al., 2013).

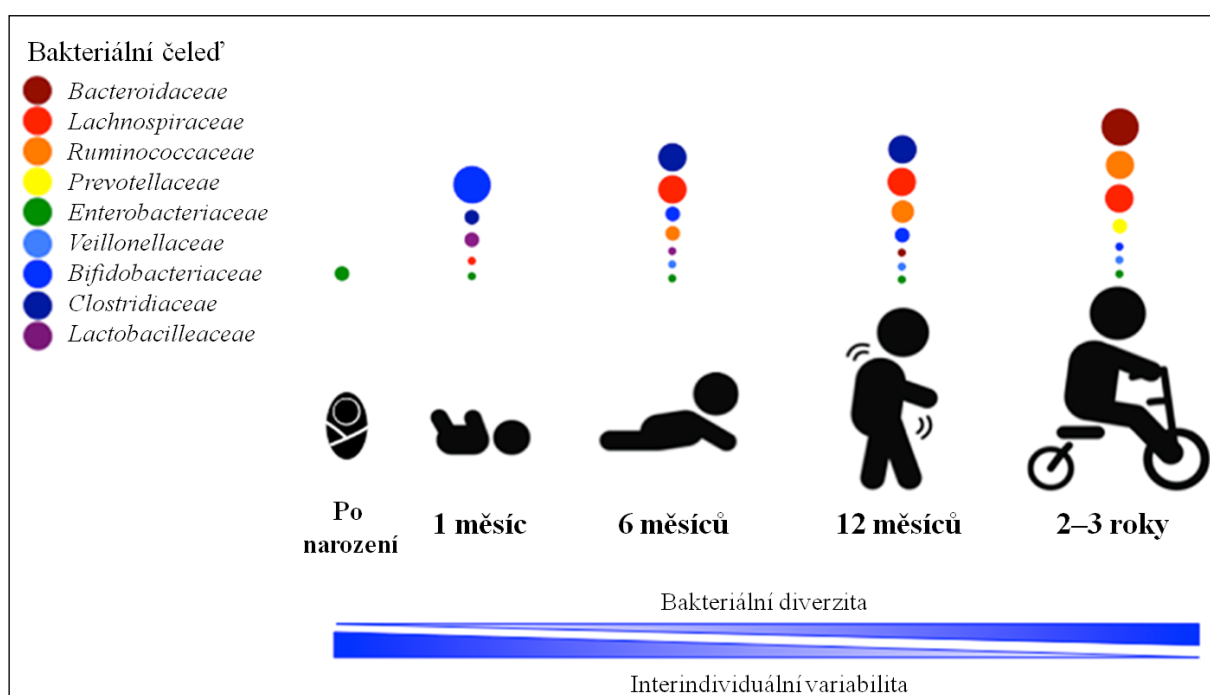
Mikrobiota jedince se v závislosti na čase mění, ať už složením, či počty zastoupení jednotlivých skupin mikroorganismů (obrázek 2). Během stárnutí organismu dochází ke snižování počtu bifidobakterií a s tím k souvisejícímu zvyšování počtu klostridií. Hlavní složkou mikrobioty dospělého gastrointestinálního traktu člověka jsou především kvasinky a bakterie (Kasper, 2001).

Obrázek 2: Složení střevní mikrobioty člověka v závislosti na čase (Mitsuoka, 1982)



Na následujícím obrázku (obrázek 3) jsou graficky znázorněny jednotlivé etapy mikrobiálního osídlení střeva se zastoupením mikroorganismů od porodu do tří let dítěte (Arrieta et al., 2014). Nad každou fází růstu dítěte jsou v jednotlivých kruzích demonstrovány nejvíce zastoupené bakteriální čeledi. Velikost kruhu je přímo úměrná relativní hojnosti zastoupení bakteriálního taxonu v mikrobiotě dítěte.

Obrázek 3: Etapy mikrobiálního osídlení střeva od novorozence po batole (Arrieta et al., 2014)





Střevo novorozence je bezprostředně po porodu osídlováno fakultativními anaeroby *Enterobacteriaceae*. V několika následujících dnech jsou dominantními druhy novorozenecké mikrobioty striktně anaerobní bakterie (Matamoros et al., 2013). Vzhledem k příjmu bifidogenních oligosacharidů mateřského mléka během kojení jsou bifidobakterie v průběhu několika prvních měsíců dominantní skupinou bakterií v kojenecké střevní mikrobiotě (Turroni et al., 2012). K výrazné změně střevní mikrobioty kojence dochází okolo čtvrtého až šestého měsíce jeho života zavedením příkrmů, což je doprovázeno změnou střevní mikrobioty ve prospěch vyššího zastoupení *Clostridiaceae*, *Lachnospiraceae* a poté i *Ruminococcaceae* a zároveň snížení počtu *Bifidobacteriaceae* a *Enterobacteriaceae* (Fallani et al., 2011; Koenig et al., 2011). Složení a zastoupení mikroorganismů v mikrobiotě tříletého dítěte je velmi podobné mikrobiotě dospělého člověka a stává se stabilní až do dospělosti (Palmer et al., 2007). V batolecí mikrobiotě jsou nejvíce zastoupeny skupiny bakterií *Bacteroidaceae*, *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae* a *Prevotellaceae* (Arrieta et al., 2014; Lozupone et al., 2013).

### 3.3 Rod *Bifidobacterium*

Rod *Bifidobacterium* je složen z nesporulujících anaerobních nebo fakultativně anaerobních gram-pozitivních pleomorfních tyčinkovitých bakterií, které se vyskytují samostatně, ve shlucích nebo řetězcích. Některé bifidobakterie jsou schopny tolerovat nízké koncentrace kyslíku v přítomnosti oxidu uhličitého. Teplotní optimum růstu tohoto rodu bakterií se nachází v rozmezí 35–39 °C. Bifidobakterie mají enzym fruktoso-6-fosfát fosfoketolasu, pomocí něhož štěpí fruktosu-6-fosfát na acetyl-fosfát a erytrosu-4-fosfát. Detekce tohoto enzymu je využívána při identifikaci bifidobakterií na úroveň rodu (Vlkova et al., 2002). Rod *Bifidobacterium* se přirozeně vyskytuje ve zvířecích a lidských organismech, je nepatogenní a chemoorganotrofní. Bifidobakterie mají fermentativní typ metabolismu, při kterém produkují kyseliny z široké škály sacharidů a neprodukují plyn (Biavati and Mattarelli, 2006). Právě sacharolytický typ metabolismu je spojován s kompetitivní schopností bifidobakterií v osídlení střevního traktu s ostatními bakteriemi (Milani et al., 2016). Řada dalších konečných metabolických produktů bifidobakterií – těkavé mastné kyseliny, vitamíny, polyenové mastné kyseliny – je spojována se zprostředkováním interakce hostitel–mikrob (Ventura et al., 2014).

V průběhu posledních 10–15 let počet druhů rodu *Bifidobacterium* a příbuzných rodů výrazně vzrostl. Rod *Bifidobacterium* dosud zahrnuje již 48 uznaných druhů a poddruhů izolovaných z rozmanitých stanovišť – z gastrointestinálního traktu většiny obratlovců,

zejména savců v průběhu jejich mléčné výživy; drůbeže a některého hmyzu, který žije sociálním způsobem života (včely a čmeláci); z lidského urogenitálního traktu; ze zubního kazu a také z odpadních vod (Bunesova et al., 2014; Ferrario et al., 2015; Mattarelli et al., 2014). Druhy *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* jsou striktně lidského původu, naopak například druhy *Bifidobacterium gallinarum*, *Bifidobacterium angulatum* a *Bifidobacterium cuniculi* jsou výhradně spojeny s původem zvířecím (Lamendella et al., 2008). *B. longum*, *B. breve* a *B. bifidum* jsou dominantními bifidobakteriálními druhy mikrobioty kojence, zatímco *B. catenulatum* a *B. adolescentis* jsou více zastoupeny v mikrobiotě dospělých (Arbolea et al., 2016).

Podle Taxonomic Outline of the Prokaryotes (Garrity et al., 2004) lze bifidobakterie taxonomicky zařadit do kmene *Actinobacteria*, třídy *Actinobacteria*, podtřídy *Actinobacteriadae*, řádu *Bifidobacteriales*, čeledi *Bifidobacteriaceae* a rodu *Bifidobacterium*.

Rod *Bifidobacterium* je přirozenou, běžně se vyskytující a hojně zastoupenou částí mikrobioty člověka (Biavati and Mattarelli, 2006), je dominantním bakteriálním rodem u plně kojených a přirozeně porozených dětí, zároveň je také významnou součástí mikrobioty dospělých. Důležitou rolí tohoto rodu je zajištění homeostaze mezi střevem a zdravím hostitele (Arbolea et al., 2016).

### 3.4 Rod *Clostridium*

*Clostridium* je velký rod složený z obligátně anaerobních, gram-pozitivních, sporulujících, tyčinkovitých a většinou pohyblivých bakterií s proteolytickou aktivitou (Cato et al., 1986). Součástí tohoto rodu nejsou pouze všeobecně známé patogeny, jako například *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, ale i neškodné a solventogenní druhy, které jsou využívány v biotechnologiích (Dürre, 2005). Rod *Clostridium* lze dále rozdělit na základě své fyziologie na sacharolytické a proteolytické druhy (Van Mellaert et al., 2006).

Mezi solventogenní druhy klostridií, u kterých je využíváno aceton-butanolové kvašení, lze zařadit *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium sacharobutylicum*, kdy při sporulaci za nepříznivých bakteriálních podmínek dochází k tvorbě rozpouštědel, což je využíváno v průmyslové výrobě rozpouštědel kvasným způsobem (Choi et al., 2014; Lee et al., 2008; Patáková et al., 2009). Jsou známy i kmeny klostridií *Clostridium sporogenes* a *Clostridium novyi*, které mají potenciálně antikancerogenní účinky (Dürre, 2005; Heap et al., 2007).

Podle Taxonomic Outline of the Prokaryotes (Garrity et al., 2004) lze klostridie taxonomicky zařadit do kmene *Firmicutes*, třídy *Clostridia*, řádu *Clostridiales*, čeledi *Clostridiaceae* a rodu *Clostridium*.

Hlavním produktem fermentace cukrů mnoha druhů rodu *Clostridium* je máselná kyselina, na základě čehož byl identifikován druh *Clostridium butyricum* a další nepatogenní klostridie. Toto zjištění bylo využito pro komerční produkci kyseliny máselné, butanolu a acetonu. Mezi představitele klostridií produkujících kyselinu máselnou lze zařadit *Cl. butyricum*, *Cl. butylicum*, *Cl. beijerinckii*, *Cl. multif fermentans*, *Cl. iodophilum*, *Cl. fallax*, *Cl. tyrobutyricum*, *Cl. pasteurianum*, *Cl. amylosaccharobutylpropylicum*, *Cl. madisonii*, *Cl. muelleri*, *Cl. amylolyticum*, *Cl. acetobutylicum*, *Cl. saccharoacetoperbutylicum*, *Cl. roseum*, *Cl. aurantibutyricum*, *Cl. rubrum*, *Cl. lacto-acetophilum*, *Cl. felsineum* (McCoy et al., 1926; McCoy et al., 1930).

Výsledky výzkumů, během nichž byl testován butyrát, závisí na jeho koncentracích a biologických modelech, které byly použity, poukazují na silné účinky máselné kyseliny na řadu funkcí střevní mukózy, jako je například inhibice zánětu a karcinogeneze, posílení složky střevní ochranné bariéry a snížení oxidačního stresu. Byl zjištěn i vliv butyrátu na pocit sytosti (Hamer et al., 2008).

Klostridie se běžně vyskytují v půdě, vodě a gastrointestinálním traktu zvířat i lidí (Dürre, 2005). Nejčastěji vyskytujícím se druhem v kojeneckém střevě je *Clostridium butyricum*, který byl až do roku 1986 považován za druh nepatogenní. V roce 1986 byly s tímto druhem spojovány první dva případy kojeneckého botulismu (Aureli et al., 1986). Je známa i spojitost výskytu klostridií u předčasně narozených dětí s propuknutím nekrotizující enterokolitidy (Obladen, 2009). Vzhledem k velkému množství butyrátu produkovaného klostridiami může docházet ke snížení střevní permeability a posílení obranných mechanismů střevní bariéry, jako je podpora epitelové migrace, indukce mucinu, transglutaminasové aktivity a antimikrobiálních peptidů (Hamer et al., 2008).

Řada onemocnění je spojována právě se schopností klostridií přežít uvnitř i vně hostitele a je zprostředkována proteinovými toxiny, enzymy a sporiemi. Velké množství živočišných a lidských onemocnění a otrav, například plynatá sněť, otravy jídlem, průjmy spojené s antibiotickou léčbou, pseudomembránové kolitidy a enterotoxémie je zapříčiněno *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* a *Clostridium spiriforme* (Stiles et al., 2011). Mezi dobře prostudované druhy způsobující lidské nemoci lze zařadit původce tetanu *Clostridium tetani* a původce botulismu a otrav z jídel *Clostridium botulinum*, které mají jedny z nejsilnějších bakteriálních toxinů. Původcem infekce ran

a plynaté sněti je *Clostridium difficile*, který je během antibiotické léčby schopen přerůst ostatní střevní bakterie a způsobit tak pseudomembránové kolitidy. Propuknutí vážných onemocnění končících smrtí u nitrožilních uživatelů drog je spojováno s *Clostridium novyi* typu A (Brazier et al., 2002; Van Mellaert et al., 2006).

### 3.5 Faktory ovlivňují mikrobiotu kojence

Složení a následný vývoj střevní mikrobioty kojence je nejvíce modifikován způsobem porodu, typem přijímané výživy, gestačním věkem, hospitalizací kojence a užíváním antibiotik (Penders et al., 2006). Přirozené chování dětí v průběhu jejich prvních třech let života výrazně přispívá k neustálé expozici mikroorganismům z okolního prostředí, a to dotykem úst s kůží matky, neustálým zaváděním rukou, chodidel a různých předmětů do úst, stykem rukou a podlahy při plazení, lezení a prvních krůčcích. Děti také mnohem častěji trpí infekčními onemocněními oproti dospělým. Na základě všech těchto okolních vlivů lze konstatovat, že mikrobiota dětí do tří let značně kolísá a je velmi variabilní (Koenig et al., 2011).

Vzhledem k intimnímu kontaktu novorozence a jeho matky během porodu, kojení a následného krmení je matka pravděpodobně nejvýznamnějším externím faktorem ovlivňující vývoj novorozeneckého mikrobiomu. Tento vliv je patrný hlavně během prvního roku života kojence. V průběhu prvního měsíce života novorozence je jeho mikrobiota funkčně a fylogeneticky velmi podobná mikrobiotě své matky (Vaishampayan et al., 2010).

Například počáteční bifidobakteriální kolonizace gastrointestinálního traktu (GIT) je závislá na řadě vnějších faktorů. Přenos bifidobakterií je spojen s vaginálním porodem, stykem novorozence s GIT matky, přenosem přes placentu a plodovou vodu (Collado et al., 2016; Makino et al., 2013).

Dalším významným faktorem ovlivňujícím složení kojeneckého střeva je gestační věk novorozence. Srovnáním střevní mikrobioty nedonošených a donošených dětí byly zjištěny významné rozdíly. *Enterobacteriaceae*, *Proteobacteria*, *Staphylococcus* a další potenciálně patogenní bakterie, jako je *Clostridium difficile* či *Klebsiella pneumoniae*, byly nalezeny v mikrobiotě předčasně narozených dětí, kmen *Actinobacteria* byl identifikován v mnohem nižších počtech (Arbolea et al., 2012b). Ve střevě donošených novorozenců bylo dominantní zastoupení bakterií rodu *Bifidobacterium* a *Bacteroides*, které má tendenci dále dominovat v prvních týdnech života. Celkově byla mikrobiota rozmanitější a zastoupena ve vyšších počtech (Arbolea et al., 2012a; Arbolea et al., 2015; Barrett et al., 2013).

Hospitalizace, nedonošenost kojenců a podávání antibiotik je spojováno s vyšším výskytem *Clostridium difficile* a zároveň s nižším počtem bifidobakterií a *Bacteroides*. Střevní mikrobiotu kojence dále ovlivňuje i rodinné prostředí, ve kterém dítě žije. U kojenců majících starší sourozence byly v jejich mikrobiotě detekovány nižší počty mikroorganismů na gram stolice, nicméně byl ale u nich detekován větší podíl bifidobakterií (Penders et al., 2006). Dalším faktorem podílejícím se na modifikaci kojenecké mikrobioty je zeměpisná oblast, ve které kojeneček žije, a také kulturní tradice (Yatsuneneko et al., 2012).

Kontakt kojence s matkou, způsob porodu, krmení a zároveň také kontakt s jinými kojenci jsou považovány za běžné faktory normálního vývoje kojenecké mikrobioty. Střevní mikrobiota může být modifikována i způsobem umělým, zejména propuknutím a průběhem onemocnění a s tím spojenou léčbou. Mikrobiota kojence může být nepřímo ovlivněna i léčbou matky (Matamoros et al., 2013).

Jak již bylo zmíněno, získávání bakterií z kůže matky během kojení je přirozený proces přispívající k osídlení kojeneckého střeva. V současné době existuje hypotéza („*entero-mammary pathway*“), že bakterie přítomné v mléčné žláze původně pocházejí ze střeva matky, odkud se do mléčné žlázy transportovaly přes dendritické buňky a makrofágy (Jost et al., 2014).

Moderní změny životního stylu, jako je zlepšená sanitace, provádění císařských sekcí, užívání antibiotik a imunizace jsou dalšími vlivy modifikujícími mikrobiotu kojence a jsou studovány jako potenciální faktory způsobující náhlé zvýšení imunitních onemocnění v rozvinutém světě. Hypoteticky lze předpokládat, že narušením přirozené mikrobioty v rané fázi života kojence může být podpořen vznik onemocnění v pozdějším věku (Penders et al., 2007). Právě životní styl a dietní návyky – desinfekce, užívání antibiotik a příjem stravy bohaté na vysoký obsah tuku – mohou způsobit změny ve složení střevní mikrobioty, které by mohly vést k negativnímu dopadu na lidské zdraví. Bylo by tedy vhodné preventivně modulovat výživu a životní styl člověka s cílem udržení mutualistického fungování lidského mikrobiomu v průběhu celého jeho života (Rampelli et al., 2016).

Navzdory doporučení Světové zdravotnické organizace (WHO) množství prováděných císařských sekcí ve vyspělých zemích stále stoupá (WHO, 2001) a zároveň dochází k poklesu kojení mateřským mlékem během prvních měsíců života dítěte (Declercq et al., 2011; Kelly and Watt, 2005). Po systematickém přezkoumání a odborné konzultaci bylo v roce 2001 vydáno doporučení výlučného kojení do šesti měsíců života kojence a následné pokračování v kojení s nemléčnými příkrmy od ukončení šestého měsíce až do dvou let věku dítěte i déle. Toto doporučení WHO je platné až dodnes (Kramer and Kakuma, 2012; WHO, 2001).

V některých zemích je způsob porodu volitelný. Plánované císařské řezy jsou pak prováděny na vyžádání rodičkou, často z důvodů obav z bolesti během porodu a také kvůli pohodlí provedení pro pacientku a lékaře (Miesnik and Reale, 2007).

### 3.5.1 Vliv způsobu porodu na mikrobiotu kojence

Způsob porodu (vaginální porod, císařská sekce) má významný vliv na časnou kolonizaci gastrointestinálního traktu kojence (Biasucci et al., 2010). U dětí porozených vaginálně bylo zjištěno zvýšené množství bifidobakterií oproti dětem porozeným císařskou sekcí (Dominguez-Bello et al., 2010). Mikrobiota vaginálně porozeného kojence je úzce spjata s intestinální mikrobiotou své matky. Některé z bifidobakteriálních kmenů jsou přeneseny z matky na novorozence právě bezprostředně během porodu (Makino et al., 2013).

Velmi významným faktorem, který ovlivňuje střevní mikrobiotu novorozence po císařské sekci, je okolní prostředí, které je významnějším modifikátorem kolonizace jeho střevního traktu oproti způsobu jeho výživy (Fanaro et al., 2003). Ve vzorcích stolic kojenců porozených císařským řezem byly naopak zjištěny nižší počty bifidobakterií a *Bacteroides*, zatímco přítomnost *Clostridium difficile* v gastrointestinálním traktu takto porozených dětí byla detekována nejčastěji (Penders et al., 2006).

Během průběhu porodu císařským řezem je zabráněno expozici novorozence mikroorganismům své matky a je tedy narušena normální kolonizace jeho střeva (Fouhy et al., 2012). Sekcí porozené děti jsou vystaveny zvýšenému riziku propuknutí astmatu, obezity a diabetu 1. typu (Neu and Rushing, 2011). V mikrobiotě novorozenců po císařské sekci byly nejčastěji detekovány rody *Escherichia*, *Shigella* a *Bacteroides* (Azad et al., 2013).

### 3.5.2 Vliv výživy na mikrobiotu kojence

Mateřské mléko představuje komplexní sloučeninu, která je ovlivňována gestačním věkem plodu při porodu, laktačním obdobím a stravou ženy, čímž se liší od náhradních umělých výživ koncentrací a složením živin, přítomností růstových faktorů, cytokinů, imunoglobulinů a trávicích enzymů. Typ výživy kojence má navíc přímý vliv na složení mikrobioty, který je zprostředkován poskytnutím substrátů nezbytných pro bakteriální proliferaci a funkci (Le Huërou-Luron et al., 2010; Roncada et al., 2012), nepřímý vliv na modulaci morfologie a složení buněk intestinální mukózy a také na funkci pankreatickou (Le Huërou-Luron et al., 2010).

Přestože je kojení mateřským mlékem zlatým standardem ve výživě kojenců a je velmi doporučováno, nemusí být vždy plně možné, a proto jsou průmyslově vyráběny náhradní kojenecké výživy s cílem co nejvíce napodobit nutriční složení mateřského mléka (Martin et

al., 2016). Tyto kojenecké formule jsou účinnými náhražkami mateřského mléka, které jsou nezbytné pro správnou výživu kojence (Stevens et al., 2009). Výrobní proces kojeneckých výživ je přísně regulován a kontrolován. Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) vydal pravidlo pro správnou výrobní praxi (GMP) při výrobě kojeneckých formulí a zároveň kritérium pro splnění kvalitativních faktorů pro zajištění živin nezbytných pro normální fyzický růst a dostatečnou biologickou kvalitu proteinu vhodnou pro kojence (Lønnerdal, 2012; Martin et al., 2016). Jako nejběžnější základ kojeneckých formulí je používáno kravské mléko s nezbytným přídavkem dalších složek, například mastných kyselin (arachidonová kyselina, dokosahexaenová kyselina), probiotik a prebiotik (Martin et al., 2016).

Pokud není možné kojit vlastním mateřským mlékem, existuje alternativní možnost podávání pasterizovaného mateřského mléka od dárkyně z mléčné banky. Proces pasterizace však snižuje množství přítomných komenzálních mikroorganismů a většiny živých imunitních buněk, bioaktivních proteinů a enzymů, což je jistou nevýhodou ve srovnání s čerstvým mateřským mlékem od vlastní matky (Martin et al., 2016).

*Escherichia coli*, *Clostridium difficile*, *Bacteroides* a laktobacily byly nejčastěji přítomny u kojenců, kterým byla podávána umělá výživa ve srovnání s kojenci přijímajícími mateřské mléko (Penders et al., 2006). Nepoměrně vysoké zastoupení *Clostridium difficile* bylo také detekováno u kanadských kojenců na umělé výživě a zároveň bylo zjištěno, že jejich střevní mikrobiota vykazovala vyšší druhovou rozmanitost dalších mikroorganismů oproti dětem přijímajícím mateřské mléko (Azad et al., 2013).

Způsob kojenecké výživy neovlivňuje významně rozmanitost bifidobakteriálních druhů přítomných ve stolici kojence. *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* a *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* byly přítomny u kojenců kojených i kojenců, jímž byla podávána umělá výživa. Nicméně lze konstatovat, že mikrobiota kojenců na umělé výživě obsahovala nižší počty bifidobakterií oproti kojencům kojeným mateřským mlékem a zároveň také vykazovala větší druhovou rozmanitost (Klaassens et al., 2009).

Příjem mateřského mléka podporuje vegetaci prospěšné střevní mikrobioty kojence (Fouhy et al., 2012). Kojenci kojení mateřským mlékem vykazují nižší bakteriální bohatost a rozmanitost ve svém střevě oproti kojencům přijímajících umělou výživu, což lze přisuzovat právě k obsahu unikátních oligosacharidů mateřského mléka, které fungují jako selektivní metabolické substráty pro omezený počet prospěšných střevních mikroorganismů (Azad et al., 2013). *Bifidobacterium* a *Lactobacillus* jsou často detekovanými mikroorganismy

v mikrobiotě kojeného kojence, což potvrzuje velmi významnou funkci mateřského mléka podporující růst probiotických bakterií (Fernández et al., 2013).

Střevní mikrobiota kojenců kojených mateřským mlékem obsahuje až dvakrát vyšší počty bifidobakteriálních buněk oproti kojencům přijímajících umělou výživu (Bezirtzoglou et al., 2011). Obohacování umělých kojeneckých výživ galaktooligosacharidy a fruktooligosacharidy je prováděno s cílem co nejvíce napodobit unikátní složení mateřského mléka (de Vrese and Schrezenmeir, 2008). Přídavkem prebiotik do těchto výživ je navíc pokryta selektivní stimulace růstu bifidobakterií a laktobacilů (Bunesova et al., 2012), jež jsou často do kojeneckých výživ také přidávány jako probiotické složky, u kterých má být právě přídavkem prebiotik zajištěna jejich selektivní stimulace růstu. Probiotika a prebiotika začala být do kojeneckých výživ přidávána s cílem napodobit složení střevní mikrobioty dětí přijímajících umělou výživu mikrobiotě dětí kojených (Parracho et al., 2007).

Výbor pro výživu Evropské společnosti pro dětskou gastroenterologii, hepatologii a výživu (ESPGHAN) provedl systematické zhodnocení bezpečnosti a zdravotních přínosů příjmu obohacených dětských výživ o probiotika a prebiotika s výsledkem potvrzujícím bezpečnost příjmu těchto výživ v souvislosti s růstem a nežádoucími účinky v porovnání s neobohacenými výživami o probiotika a prebiotika. Nezbytné je ovšem další pečlivé provedení randomizovaných kontrolovaných studií (Braegger et al., 2011). Analýzou jednotlivých studií bylo shrnuto, že prebiotické oligosacharidy v kojeneckých výživách mají bifidogenní účinek, neovlivňují růst dítěte, jsou bez vedlejších účinků, ovlivňují konzistenci, frekvenci a pH stolice a zvyšují počet bifidobakterií (Sýkora, 2011). V klinickém výzkumu bylo dále zjištěno, že podávání probiotických kmenů těhotným ženám a kojencům je bezpečné a dobře tolerované, navíc výsledky studií poukazovaly na snížení rizika propuknutí nespecifických gastrointestinálních infekcí, kolik a propuknutí pláče právě při příjmu specifických probiotických laktobacilů (Bergmann et al., 2014).

Jako jeden z nejdůležitějších faktorů ovlivňující správný vývoj a zdraví novorozence a následně dospělého jedince je způsob výživy během jeho prvních měsíců života. V současné době jsou umělé výživy obohacovány o prebiotika, probiotika a laktoferin za účelem modifikace střevní mikrobioty kojence přijímajícího umělou výživu směrem ke složení mikrobioty kojenců kojených mateřským mlékem. Obecně lze říci, že mateřské mléko je unikátní komplexní sloučeninou, která má zdraví prospěšné účinky, a mělo by být tedy považováno za jasnou volbu ve výběru kojenecké výživy alespoň do šestého měsíce života dítěte (Guaraldi and Salvatori, 2012).



### 3.5.3 Probiotika, prebiotika, synbiotika

Probiotika a prebiotika jsou v současné době jedny z velmi významných představitelů na trhu potravinového a farmaceutického průmyslu, a proto je prováděno mnoho výzkumů s cílem porozumět jejich vlastnostem a aktivitě (Kumar et al., 2015). Z hlediska prosperity potravinového průmyslu je část tohoto trhu zaměřená na děti a je velmi perspektivní. Protože kojenci jsou velmi náchylní k nemocem, jsou právě pro tuto skupinu vyhledávány nechemoterapeutické způsoby léčby (Mugambi et al., 2014). Zdravotní stav novorozeneckého střeva je velmi důležitý pro správný rozvoj celého organismu v dalších stádiích jeho vývoje (Bischoff, 2011).

#### 3.5.3.1 Probiotika

Probiotikum bylo poprvé a dodnes platně definováno jako mikrobiální doplněk mající blahodárny účinek na gastrointestinální mikrobiotu jedince (Fuller, 1989). Již v roce 1907 byla publikována tzv. „optimistická studie o prodlužování věku“ od Ilji Mečnikova, ve které byl poprvé popsán prospěšný vliv živých mikroorganismů obsažených v kysaných mléčných výrobcích na zdraví a dlouhověkost lidí žijících na Balkánu. Dodnes je potlačení škodlivých bakterií příjmem prospěšných bakteriálních kultur bráno jako jeden z mechanismů probiotického účinku (Metchnikoff, 1907). V současné době jsou probiotika chápána jako živé mikroorganismy, které pokud jsou podávány hostiteli v adekvátním množství, pozitivně ovlivňují jeho zdravotní stav (FAO/WHO, 2001). V roce 2002 byly definovány minimální požadavky, které jsou potřebné pro označení probiotického statusu potraviny – identifikace na úroveň rodu, druhu a kmene; *in vitro* testy ověřující schopnost probiotika odolat žaludečním a žlučovým kyselinám, trávicím enzymům a rovněž jeho antimikrobiální aktivitu zajišťující odolnost vůči potenciálně patogenním bakteriím; bezpečnostní kritérium zajišťující bezpečnost probiotika bez kontaminace v podávané formě a *in vivo* testy pro zdůvodnění zdravotních účinků v hostiteli (FAO/WHO, 2002).

Hill et al. (2014) uvádí možné rozdělení probiotik podle jejich mechanismu účinku do tří skupin – účinky vzácné (pozorovány u mála kmenů daného druhu), časté (pozorovány u většiny kmenů bakteriálních druhů) a široce rozšířené (pozorovány u běžně studovaných rodů). Neurologické, imunologické a endokrinologické působení a produkce specifických bioaktivních látek bylo zařazeno mezi účinky vzácné; syntéza vitamínů, přímý antagonismus, ochranná mikrobiální bariéra střeva, metabolismus solí žlučových kyselin, enzymatická aktivita a neutralizace karcinogenů mezi účinky časté a rezistence kolonizace, tvorba

organických kyselin a krátkých řetězců mastných kyselin, normalizace rozrušené mikrobioty, zvýšení počtu enterocytů a konkurenční vyloučení patogenů mezi účinky široce rozšířené.

V současné době jsou probiotika k dostání na trhu ve formě potravinových doplňků a léčiv, s jejichž příjmem je spojován preventivní či terapeutický účinek. Probiotikum vhodné pro člověka by mělo obsahovat pouze takové kmeny, které jsou přirozenou součástí zdravého lidského organismu (Bronský, 2011). Při vyhodnocování bezpečnosti používání probiotik musí být zohledněna povaha daného mikroorganismu, způsob jeho podávání, úroveň expozice, zdravotní stav příjemce a fyziologické funkce, které mají být stimulovány (Sanders et al., 2010). Na trhu existuje mnoho výrobků nesoucích označení „probiotické“, ale velmi často nespĺňují minimální kritéria pro toto označení, například definovaný obsah a počet životaschopných mikroorganismů na konci trvanlivosti a validní důkaz přínosu pro zdraví konzumenta (Hill et al., 2014). Probiotika jsou jednou z klíčových oblastí ve výzkumu potravin a pro hodnocení jejich kvality je nutná komunikace a spolupráce akademických vědců, zdravotníků, potravinářského a bioterapeutického průmyslu, politiků a složek regulačních, které by tak měly konat v zájmu spotřebitele a pacienta. Zjednodušeně lze říci, že účinnost probiotického výrobku je součtem jeho mikrobiální kvality a funkčního potenciálu (Huys et al., 2013).

Příjmem probiotik lze podpořit správnou funkcí epiteliální střevní bariéry, pomocí níž je zabráněno proniknutí patogenů a škodlivých prvků přes lumen střeva do vnitřního prostředí organismu. Konkurenčním podáváním probiotických bakterií lze dále zajistit tolerogenní imunitní odpověď, která je zprostředkována uvolněním sekrečních imunoglobulinu A (IgA). IgA zajišťují stabilizaci těsných spojů epiteliálních buněk střevní sliznice, čímž je zabráněno průchodu patogenů do hlubších vrstev sliznice. Hostitel je tímto mechanismem chráněn před infekcí a chronickým zánětem. Podpořením funkce epitelové střevní bariéry (těsné spoje epiteliálních buněk, snížená paracelulární permeabilita, zvýšená fyzická překážka slizniční vrstvy), zajištěním konkurenčního vyloučení nežádoucích mikroorganismů a stabilizace přirozené mikrobioty a v neposlední řadě i imunomodulačních schopností (signální dráhy ovlivňující vhodnou imunitní, zánětlivou a alergickou odpověď) je zajištěn pozitivní účinek probiotik (Binek et al., 2016).

Probiotika jsou užitečným doplňkem léčby specifických infekčních, zánětlivých a funkčních poruch (Cruchet et al., 2015). Mezi mikrobiologicky nejstudovanější onemocnění člověka patří akutní průjemy, u kterých bylo zjištěno, že podáváním probiotik dochází ke zmírnění průběhu tohoto onemocnění a následné rychlejší rekonvalescenci. *Bifidobacterium longum* a *Bifidobacterium breve* jsou nejčastěji aplikovanými druhy probiotických kultur při

akutních kojeneckých průjmech (Di Gioia et al., 2014). Bifidobakterie jsou totiž velmi často využívány jako probiotika s preventivním a terapeutickým účinkem pro novorozence a kojence vzhledem k jejich hojnému a přirozenému výskytu v gastrointestinálním traktu člověka, jejich schopnosti kolonizovat střevo a zároveň jejich bezpečnosti při užití (Sanders et al., 2010). Například *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* je jedním z nejvíce zastoupených bifidobakteriálních druhů ve střevní mikrobiotě zdravého kojence přijímajícího mateřské mléko a zároveň jsou tímto druhem nejlépe využívány oligosacharidy mateřského mléka (Sela et al., 2008).

Do probiotik, neboli *bioterapeutických agens*, nepatří pouze organismy bakteriálního původu, ale lze mezi ně zařadit i kvasinky a subcelární složky, jako jsou části bakteriálních stěn a fragmenty DNA (Bronský, 2010). Například kvasinka *Saccharomyces boulardii* je používána jako probiotický doplněk při antibiotické léčbě průjmů způsobených bakteriemi druhu *Clostridium difficile* (Szajewska and Mrukowicz, 2005).

Podáváním mikroorganismů ve formě probiotik lze modifikovat střevní mikrobiotu ve prospěch hostitele, neboť ovlivňují jeho střevní bariéru. Zhruba 80 % imunitních buněk je totiž spojováno s gastrointestinálním traktem, ve kterém dochází k interakci mezi bakteriemi trvale kolonizujícími střevo a bakteriemi ve střevě dočasnými. Tyto bakteriální interakce zajišťují rozvinutí ochranných mechanismů stimulujících imunitní odpověď. Vzhledem k této schopnosti střevní mikrobioty nedochází k nákaze jedince, i když jeho střevem prochází velké množství patogenů (Saavedra, 2007).

Kojenecké koliky, nekrotizující enterokolitida a streptokokové infekce jsou patologické stavy typické pro novorozence, k jejichž prevenci a léčbě jsou používány bifidobakterie s probiotickým účinkem (Di Gioia et al., 2014). Probiotika nejsou využívána pouze za účelem léčby patologických stavů a homeostaze mikrobioty gastrointestinálního traktu, ale i k testování jejich preventivního účinku k propuknutí alergií (Tang et al., 2010).

Kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*) a bakterie – bakterie mléčného kvašení (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*), *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Bacillus* a *Escherichia coli* – jsou v současné době nejpoužívanějšími probiotickými mikroorganismy (Sanders et al., 2010). Mezi aktuálně nejlépe prostudované probiotické kmeny lze zařadit *Lactobacillus rhamnosus* GG a *Saccharomyces boulardii* (Vandenplas et al., 2015).

Při léčbě průjmů způsobených antibiotickou léčbou byly testovány různé směsi probiotik, jako *Saccharomyces boulardii* a *Lactobacillus rhamnosus* GG, které působily jako účinná terapie (McFarland, 2006). Na základě předchozího zjištění byl testován vliv směsi *Clostridium butyricum* a *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* na tlumení systémového

zánětu u myši s průjmy způsobenými příjmem antibiotik. Závěrem tohoto *in vivo* testování bylo zjištěno, že tato probiotická směs by mohla být jednoduchou a efektivní metodou při léčbě antibiotických průjmů (Ling et al., 2015). *Clostridium butyricum* totiž produkuje velké množství butyrátu, který zajišťuje snížení střevní permeability a podporuje tak složky střevní ochranné bariéry (Hamer et al., 2008). Zároveň střevní permeabilitu také snižuje i *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*, jehož příjmem bylo navíc prokázáno i tlumení dráždivého tračníku (Ewaschuk et al., 2008).

V roce 2013 byla poprvé popsána i nová třída probiotik – psychobiotika. Psychobiotika jsou definována jako živé mikroorganismy, které pokud jsou požitý v adekvátním množství, příznivě ovlivňují zdraví pacienta trpícího psychiatrickým onemocněním. Tento účinek je zprostředkován produkcí neuroaktivních látek (gama-aminomáselná kyselina a serotonin), které interagují mezi střevem a mozkem hostitele. Během preklinických testů na myších byl prokázán antidepresivní a anxiolytický účinek (účinek potlačující úzkost), který mohl být zprostředkován nervem vagem, míchou či neuroendokrinním systémem (Dinan et al., 2013).

### 3.5.3.2 Prebiotika

Prebiotika, do nichž lze zařadit fruktooligosacharidy, inulin, galaktooligosacharidy a další prebiotické uhlovodíky, byla poprvé definována jako nestravitelné složky potravy, které stimulací růstu či aktivity prospěšných bakterií ve střevě příznivě ovlivňují zdraví hostitele (Gibson and Roberfroid, 1995). Později byla prebiotika vnímána jako selektivně fermentované složky stravy, které umožňují specifické změny jak v kompozici, tak i v činnosti gastrointestinální mikrobioty, které jsou příznivé pro zdraví hostitele (Gibson et al., 2004).

Všechna prebiotika lze klasifikovat jako vlákninu, ale nelze zevšeobecňovat, že každá vláknina je prebiotikem (Gibson and Roberfroid, 1995). Aby byl zajištěn prebiotický efekt, musí být splněna tři kritéria ingredience – odolnost prebiotik žaludeční kyselosti, hydrolyze savčími enzymy a gastrointestinální absorpci, fermentovatelnost prebiotika intestinální mikrobiotou a selektivní stimulace růstu/aktivity prospěšných střevních bakterií, které jsou spojovány se zdravotním přínosem pro hostitele (Gibson et al., 2004).

Jako potenciální prebiotikum lze vnímat každou součást stravy, která je nestravitelná a vstupuje do tlustého střeva. Na základě těchto kritérií by polysacharidy, jako je rezistentní škrob a vláknina, proteiny a lipidy bylo možné zařadit mezi prebiotika. Nicméně podle současných požadavků na „*status prebiotika*“ lze s jistotou takto zařadit pouze nestravitelné oligosacharidy, které vykazují žádanou fermentační selektivitu (směrem k prospěšným

bifidobakteriím). Pórek, chřest, čekanka, topinambur, cibule, česnek, oves a sójové boby jsou přirozenými zdroji prebiotických oligosacharidů. Ovšem vzhledem k nízkému obsahu těchto složek v lidské dietě by bylo vhodné fortifikovat často konzumované potraviny prebiotickými složkami (Gibson et al., 2010), protože už i malou změnou stravy člověka lze modifikovat jeho gastrointestinální mikrobiotu s pozitivním vlivem na jeho zdraví (Macfarlane et al., 2008). Za tímto účelem a zároveň také poptávkou spotřebitelů začaly být potravinářským průmyslem produkovány funkční potraviny, které jsou obohacovány probiotiky a prebiotiky. Například do funkčních mléčných výrobků jsou ve formě prebiotik přidávány různé typy rozpustné vlákniny, jako oligofruktosa, inulin a laktulosa (Oliveira et al., 2013).

Při podávání prebiotika je vhodné zvážit reakci daného organismu na příjem této sloučeniny a podle toho také upravit dávkování. Některá prebiotika, například inulin, jsou spojena se zhoršenou gastrointestinální tolerancí při vyšším příjmu (Grabitske and Slavin, 2009). Naopak existují i prebiotika, například pšeničné dextriny či polydextrosa, která i při příjmu přesahujícím 30–45 g/den vykazují vysokou gastrointestinální toleranci (Pasman et al., 2006).

Řada studií poukázala na spojitost dysbiózy střevní mikrobioty s mnohými onemocněními, jako je zánětlivé onemocnění střev, obezita, kolorektální karcinom, diabetes a alergie (DiBaise et al., 2012; Rowland, 2009; Russell et al., 2012; Wen et al., 2008). Na základě těchto zjištění bylo zvýšeno povědomí a zájem o modulaci prospěšných střevních mikroorganismů pomocí různých stravovacích strategií, kdy jednou z těchto možností je podávání prebiotik (Monteagudo-Mera et al., 2016), které zapříčiní selektivní stimulaci růstu zdraví prospěšných bakterií – laktobacilů a bifidobakterií (Watson et al., 2013).

Bifidobakterie a laktobacily patří mezi trvale přítomné střevní bakterie, které jsou stimulovány prebiotikem a jsou často přidávány do fermentovaných mléčných výrobků ve formě probiotik. Fermentované mléčné výrobky jsou obohacovány probiotiky z důvodu jejich schopnosti metabolizovat prebiotické cukry *in vivo*, což zajistí selektivní obohacení gastrointestinálního traktu vytvořením laktátu, acetátu a krátkých řetězců organických kyselin, díky čemuž jsou vytvořeny nepříznivé podmínky daného prostředí pro rozvoj nežádoucích mikroorganismů (Wang and Gibson, 1993).

Prvními prebiotiky ve výživě kojence jsou nenahraditelné oligosacharidy mateřského mléka, které podporují růst bifidobakterií (Coppa et al., 2004; Rockova et al., 2012). Většina oligosacharidů mateřského mléka je odolná gastrointestinálnímu trávení kojence, a tak se dostává do tlustého střeva, kde slouží jako prebiotikum (Gnoth et al., 2000), které je selektivně metabolizováno vybranými bifidobakteriálními kmeny a představuje tak

potenciálně novou třídu biologicky aktivních molekul usnadňující střevní kolonizaci novorozenců (LoCascio et al., 2007). V tlustém střevě je poté stimulován růst prospěšných bakterií, které fungují jako receptorové analogy zajišťující inhibici vazby patogenu a toxinu na epitelové buňky, čímž je tedy kojeneček – příjem oligosacharidů mateřského mléka – přirozeně chráněn před patogeny a různými infekcemi (Kobata, 2010).

Kojenecké výživy vzhledem k nedostupnosti oligosacharidů mateřského mléka z přírodních zdrojů v dostatečném množství (nižší výskyt a mnohem menší strukturní komplexnost v mlékách jiných savců) neobsahují oligosacharidy mateřského mléka. Alternativou napodobení četných výhod oligosacharidů mateřského mléka jsou do umělých kojeneckých výživ nejčastěji přidávány prebiotické fruktooligosacharidy (FOS) a galaktooligosacharidy (GOS) s bifidogenním efektem (Bode, 2012; Boehm and Moro, 2008), čímž je tedy podporován růst probiotických bakterií (Nakamura et al., 2009). Nicméně, při testování komerčně vyráběných FOS a GOS bylo zjištěno, že tyto sloučeniny podporují nejen růst probiotických bakterií, ale i klostridií, gram-negativních bakterií a *Escherichia coli* (Bunesova et al., 2012). V *in vitro* testování růstu čistých kultur bifidobakterií a klostridií na prebiotických oligosacharidech (FOS, GOS, rafinosa, stachyosa, inulin) byla zjištěna jejich nedostatečná substrátová selektivita. Oligosacharidy byly totiž využívány oběma skupinami bakterií, z čehož vyplývá pravděpodobná nevhodnost podávání prebiotik kojencům, v jejichž mikrobiotě nejsou přítomny bifidobakterie. Alternativou vhodnou pro tyto kojence by bylo podávání synbiotik (Rada et al., 2008).

Prebiotické účinky oligosacharidů jsou nejčastěji spojovány s pozitivními vlivy na problematiku průjmů, obezity a diabetu druhého typu. Vzhledem k synergickému efektu prebiotik s probiotiky lze do budoucna předpokládat rozmach jejich užívání (Belorkar and Gupta, 2016).

### 3.5.3.3 Synbiotika

Synergismus je základní mechanismus fungování synbiotika, kdy prebiotická složka selektivně ovlivňuje složku probiotickou (Schrezenmeir and de Vrese, 2001). Spojením prebiotik spolu s prospěšnými probiotiky by měl být vyvolán příznivý účinek, kdy prebiotikum jako sacharid, který je součástí diety, selektivně metabolizuje probiotikum (Fooks and Gibson, 2002). Současný koncept synbiotik je kombinace probiotika s prebiotikem s cílem usnadnění přežití a aktivity probiotik *in vivo*, stejně tak jako stimulace původní prospěšné mikrobioty. Probiotikum a prebiotikum funguje synergicky, a tak přináší hostiteli kombinovanou výhodu (Patel and DuPont, 2015).

Existuje mnoho studií, u nichž byl prokázán pozitivní synbiotický efekt u řady onemocnění (Patel and DuPont, 2015). Podáváním synbiotika s probiotickou kulturou *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* a prebiotikem inulinem bylo dosaženo snížení projevů a propuknutí nekrotizující enterokolitidy u kojenců s velmi nízkou porodní váhou (Dilli et al., 2015), u diabetických pacientů pak vedlo podávání *Lactobacillus sporogenes* s inulinem k výraznému poklesu sérové hladiny insulinu (Asemi et al., 2014) a u pacientů s chronickým onemocněním jater (nealkoholická steatosa) mělo podávání směsi probiotik obsahující *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium breve* a *Bifidobacterium longum* spolu s prebiotickými fruktooligosacharidy také pozitivní vliv na průběh jejich léčby (Eslamparast et al., 2014).

V Japonsku v roce 2009 byla testována účinnost synbiotika obsahujícího probiotický kmen *Bifidobacterium longum* a prebiotikum psyllium s cílem zlepšení kvality života pacientů trpícími ulcerózní kolitidou. Je zajímavé, že skupina pacientů, jimž bylo podáváno synbiotikum, vykazovala nejvýraznější zvýšení kvality jejich života oproti skupinám, kterým bylo probiotikum či prebiotikum podáváno samostatně (Fujimori et al., 2009). O dva roky později byl v Japonsku znovu testován synbiotický efekt *Bifidobacterium breve* Yakult a galaktooligosacharidů při léčbě ulcerózní kolitidy s výsledkem potvrzení pozitivního účinku synbiotika, tedy zlepšení klinických stavů pacientů (Ishikawa et al., 2011).

Užívání synbiotik dále prokazatelně vedlo ke zlepšení klinických stavů pacientů s Crohnovou chorobou, kterým bylo podáváno synbiotikum obsahující probiotikum *Bifidobacterium longum* a prebiotika inulin a oligofruktosu (Steed et al., 2010). Příjem probiotických kmenů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* spolu s prebiotickými fruktooligosacharidy vedl ke snížení intenzity zácpy dospělých žen (Waitzberg et al., 2013).

Stimulace prospěšných bakterií, zvláště významných rodů *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*, v kojeneckém střevě prebiotickou vlákninou je nezbytná, neboť bylo prokázáno, že právě tyto mikroorganismy hrají velmi důležitou roli v prevenci onemocnění (Di Gioia et al., 2014). Proto je velmi důležité pokračovat ve vyvíjení kojeneckých výživ s obsahem synbiotik, tedy směsí probiotik a prebiotik, kde prebiotika zajišťují růst probiotických mikroorganismů (Slavin, 2013).

### **3.6 Testování *in vivo***

Testování *in vivo* je v současné době hlavním pilířem výzkumu v oblasti biologie a biomedicíny. Je prováděno s cílem zhodnotit význam interakcí mezi mikroorganismy

a mnohobuněčnými organismy, protože řada lidských onemocnění je tímto vztahem ovlivňována (Macpherson and McCoy, 2015). Například zánětlivé onemocnění střev, rakovina, metabolické a psychiatrické poruchy jsou spojovány se střevní dysbiózou mikrobioty (Louis et al., 2014; Sampson and Mazmanian, 2015; Wlodarska et al., 2015).

Vzhledem ke značné rozmanitosti mikrobioty jednotlivých testovaných organismů a také mikroprostředí jednotlivých klecí, v němž jsou experimenty prováděny, je *in vivo* testování na zvířatech značně problematické z hlediska reprodukovatelnosti výsledků (Macpherson and McCoy, 2015). Rozdíl mezi bezmikrobním a kolonizovaným zvířetem je zřetelný v každém systémovém orgánu zvířete (Smith et al., 2007).

Růst mikroorganismů je ovlivněn fyzikálně-chemickými podmínkami v daném prostředí – například pH, teplotou, oxidačně-redukčním potenciálem – a dostupností substrátu. Střevní trakt býložravců, šelem a všežravců vykazuje značné anatomické a fyziologické rozdíly. Střevní mikrobiota byla přizpůsobena místním podmínkám svého hostitelského organismu, se kterým byla souběžně modifikována. Nejvýraznější bakteriální rozmanitost byla detekována u býložravců (Clavel et al., 2016; Ley et al., 2006).

Savčí hostitelské subjekty jsou značně ovlivněny přítomností symbiotických organismů, což způsobuje řadu imunitních i neimunitních změn. Normální funkce mnoha systémů je závislá na kolonizaci organismu. Je nutno zmínit, že defektním mutualismem může být způsobeno i zánětlivé onemocnění střev. Tyto mechanismy jsou proto studovány pomocí kombinačních experimentů s jednotlivými kmeny mikroorganismů a gnotobiotických technologií, jež jsou základem při vyvíjení účinných terapií v oblasti zdraví (Smith et al., 2007).

### **3.7 Gnotobiologie, gnotobiont**

Koncept gnotobiotického zvířete byl představen s cílem studia interakcí mezi mikrobiotou a hostitelem. Vědní obor gnotobiologie se zabývá mikrobiologicky definovanými organismy, což je založeno na skutečnosti, že k vývoji embrya dochází ve sterilním prostředí. Slova „gnotobiont“ a „gnotobiotický“ byla odvozena z řeckého „*gnotos*“ a „*biota*“, což lze volně chápat jako souvislost a znalosti mezi živými organismy a hostitelem. Gnotobiotické zvíře je mikrobiologicky definovaný organismus, který je v praxi bezmikrobním nebo původně bezmikrobním organismem, jež je uměle osídlen známým kmenem mikroorganismů. Bezmikrobní organismus lze získat císařským řezem, hysterektomií mateřského organismu, nebo přenosem sterilních embrií do sterilních bezmikrobních náhradních matek. V závislosti



na druhu zvířete mohou být jednotlivá zvířata chována ve sterilních izolátorech bez matky nebo s bezmikrobní náhradní matkou (Gordon and Pesti, 1971; Kubelkova et al., 2016).

Molekulárně-biologické testování mikrobioty poskytuje řadu výsledků, které by měly být vhodně paralelně doplňovány funkčními studii se zaměřením na intenzivní analýzu mikrobioty ve spojení s jejím vlivem na makroorganismus. Studium bakteriální kolonizace a její vlivy na hostitele je prováděno na pokusných zvířatech gnotobiologickými metodami. Principem těchto metod je poměrně náročný chov gnotobiotických zvířat v izolátorech se sterilním prostředím bez živých bakterií, ve kterých jsou řízeně kolonizovány mikroorganismy. Účinek kolonizace gnotobiotického organismu je poté sledován na genetické a proteinové úrovni (Falk et al., 1998).

Využití gnotobiotických zvířecích modelů při výzkumu má velký potenciál při poskytnutí nových mikrobiologických a imunologických informací o vztazích mezi patogenem a hostitelem, o etiologii infekčních onemocnění, akutních a chronických zánětlivých stavech, při vývoji vakcíny a získání informací při přechodu stavu organismu zdraví–nemoc (Kubelkova et al., 2016). Identifikace mikrobioty, kterou byl kolonizován gnotobiotický organismus, by mohla vést k objasnění molekulárních mechanismů při indukci patologických změn, propuknutí onemocnění, obranných mechanismů či prospěšných účinků, což by mohlo zapříčinit objevení nových možností, jak složením mikrobioty prospěšně ovlivnit prevenci a léčbu řady onemocnění. Studii těchto mechanismů lze nalézt i nové bakteriální kmeny a komponenty, například probiotika a prebiotika, jejichž podáváním by byly prospěšné účinky zprostředkovány (Tlaskalová-Hogenová et al., 2011).

Experimentální zvířecí modely jsou nezbytné pro řešení funkční otázky týkající se interakce mikrobioty a hostitele s cílem objasnění klinického významu spojeného s iniciací a rozvojem onemocnění (Hörmannsperger et al., 2015).

Studie prováděné na gnotobiotických zvířatech prokázaly vhodnost pro analýzu ochranných funkcí organismu. Mnoho experimentů bylo prováděno v souvislosti s imunitním systémem (Cebra, 1999; Hooper et al., 2012), strukturálními a metabolickými funkcemi organismu (Bäckhed and Crawford, 2010; Karlsson et al., 2013; Tilg and Kaser, 2011), vývojovými aspekty funkčních systémů obratlovců (Butler et al., 2009; Grover and Kashyap, 2014; Umesaki, 2014) a karcinogenezí (Francescone et al., 2014; Schwabe and Jobin, 2013).

Lidský mikrobiom produkuje velké množství bioaktivních molekul schopných interagovat s hostitelem, jejichž účinky by měly být dále studovány. Existence bakterií v tlustém střevě a jejich základní funkce ve výživě a metabolismu, jako je fermentace nestravitelných oligosacharidů, metabolismus xenobiotik a aktivace, či zničení mutagenních

metabolitů dělá střevní mikrobiotu pomyslným velkým fermentativním orgánem (Martin et al., 2009). Zkoumání role mikrobioty ve spojitosti s lidskými onemocněními za použití zvířecích modelů chovaných v definovaných gnotobiotických podmínkách by mohlo vést k objevení souvislosti a složitosti mechanismů chronických onemocnění. Je zřejmé, že lidská mikrobiota ovlivňuje zdraví člověka mnohem více, než se předpokládalo (Tlaskalová-Hogenová et al., 2011).

Jako tradičně používané bezmikrobní organismy lze zmínit krysy a myši, dále morčata, králíky, křečky, psy bígl, prasata, jehňata, telata a kozy (Coates, 1975).

Experimentálně indukované a spontánně rozvíjené zvířecí modely lidských onemocnění jsou nezbytné ke zkoumání vlivu genetických a environmentálních faktorů v propuknutí onemocnění ještě před objevením prvních symptomů, k objasnění patogenních mechanismů a k vyvinutí preventivních a terapeutických strategií (Tlaskalová-Hogenová et al., 2011). Tyto gnotobiotické modely jsou umělé a „biologicky čisté“, neboť na ně nepůsobí žádné vnější vlivy, a proto je nutné konstatovat, že nejsou zcela vždy ideální ke srovnání funkcí v organismu přirozeném (Kubelkova et al., 2016; Tlaskalová-Hogenová et al., 2011). Například gnotobiotická myš a člověk jsou značně rozdílní, a to zejména ve střevní fyziologii a fungování imunitního systému, a proto by tomu měla být přizpůsobena interpretace výsledků testování (Mestas and Hughes, 2004). Zároveň lze také zmínit vlivy stravovacích návyků, chování a životního prostředí (Clavel et al., 2016).

Laboratorní myš je v současné době hlavním experimentálním modelovým organismem v preklinickém výzkumu lidských onemocnění (Eppig et al., 2015), hlavně kvůli poměrně snadnému zajištění bezmikrobního stavu, což je základ pro založení gnotobiotického modelu (myši kolonizované definovanými bakteriálními kmeny, či jejich směsí), který je nástrojem pro testování příčinných vztahů mezi mikroorganismy a jejich hostitelem (Clavel et al., 2016).

## 4 Materiál a metody

Tato diplomová práce – Testování oligosacharidů mateřského mléka v *in vivo* podmínkách – byla prováděna v návaznosti na práci bakalářskou – Testování synbiotických vlastností oligosacharidů mateřského mléka a probiotických bakterií (*in vitro* kompetice). Provedení této práce bylo zprostředkováno na Katedře mikrobiologie, výživy a dietetiky (ČZU, Praha) ve spolupráci s Laboratoří gnotobiologie (Mikrobiologický ústav AV ČR, v. v. i., Nový Hrádek).

### 4.1 *In vitro* kompetice

#### 4.1.1 Příprava rifampicin-rezistentního mutanta (RRBM)

V rámci bakalářské práce byla provedena příprava rifampicin-rezistentního mutanta (RRBM) provedením rozboru výrobku Infloran (číslo šarže 3230A, datum spotřeby 04/2015), ve kterém bylo výrobcem (Laboratorio Farmaceutico S. I. T. S. r. l., Itálie) deklarováno  $10^9$  *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* a  $10^9$  *Lactobacillus acidophilus*. Bakterie byly kultivovány na selektivním médiu pro bifidobakterie – Wilkins-Chalgren anaerobe agar (W+SP médium (OXOID, UK), 100 mg/l mupirocin (OXOID, UK), 1 ml/l octové kyseliny) s následnou izolací narostlých kolonií do W+SP bujónu. Identifikace bifidobakterií na úroveň rodu i druhu byla ověřena pomocí biochemických a molekulárně-genetických testů (viz 4.1.2 a 4.1.3).

Na Petriho misky byly připraveny dva typy agarů – W+SP médium s mupirocinem (100 mg/l), octovou kyselinou (1 ml/l) podle Rada and Petr (2000) a W+SP médium s mupirocinem (100 mg/l), rifampicinem (100 mg/l) a octovou kyselinou (1 ml/l) podle Vlková et al. (2010) – které byly šikmo zality a vytvářely tak koncentrační gradient. Na takto připravené médium byly inokulovány vyizolované a identifikované bifidobakterie z výrobku Infloran s následnou anaerobní kultivací při 37 °C po dobu 48 hodin. Narostlé kolonie na části agaru s nejvyšší koncentrací antibiotika rifampicinu byly následně izolovány a poté ještě několikrát pasážovány s předpokladem nejvyšší možné rezistence na rifampicin. RRBM byl následně uchováván v mrazáku při –30 °C ve W+SP bujónu s přídavkem rifampicinu (100 mg/l), mupirocinu (100 mg/l) a glycerinu.

Při každém přeočkování a následném použití RRBM byla zkontrolována čistota narostlé kultury pomocí fázově kontrastního mikroskopu (Nikon Eclipse E 200LED MV RS, Japan).

## 4.1.2 Identifikace pomocí biochemických testů

### 4.1.2.1 F6PPK

Rod *Bifidobacterium* lze od ostatních bakteriálních rodů odlišit na základě metabolismu sacharidů. Tato rodová identifikace je prováděna detekcí enzymu fruktoso-6-fosfát fosfoketolasy, pomocí něhož jsou bifidobakteriemi štěpeny hexosy – fruktoso-6-fosfát na erytroso-4-fosfát a acetyl-1-fosfát. Použitím detergentu CTAB je způsobeno rozbití bakteriálních buněk, které jsou následně spolu s intracelulárními enzymy převedeny do roztoku, do něhož jsou dále přidávány činidla způsobující barevné změny. Detekce enzymu fruktoso-6-fosfát fosfoketolasy je potvrzena fialovým zbarvením, naopak zbarvení žluté značí reakci negativní. Během této identifikace je vhodné zařazení negativní (*Lactobacillus*) a pozitivní kontroly (*Bifidobacterium*).

Narostlé kultury ve W+SP bujónu po 24 hodinách byly odstředěny v centrifuze (9000 otáček/8 minut). Supernatant byl slit a usazené pelety byly propláchnuty v roztoku 1 (0,36 g  $K_2HPO_4$ , 0,10 g  $KH_2PO_4$ , 0,15 g cysteinu, 300 ml  $H_2O$ ). K lýze buněk bylo použito 200  $\mu$ l CTAB (45 mg cetridium bromidu, 100 ml  $H_2O$ ) – kultivace 5 minut. Následně bylo přidáno 125  $\mu$ l roztoku 2 (120 mg NaF, 200 mg Na-iodoacetátu, 20 ml  $H_2O$ ) a 200  $\mu$ l roztoku 7 (290 mg fruktosa-6-fosfátu, 5,5 ml  $H_2O$ ) – kultivace 30 minut/37 °C ve vodní lázni. Poté bylo přidáno 750  $\mu$ l roztoku 3 (4,17 g hydroxylaminu, 30 ml  $H_2O$ ) – kultivace 10 minut a nakonec ještě 500  $\mu$ l roztoku 4 (3 g trichloroctové kyseliny, 20 ml  $H_2O$ ), roztoku 5 (2,48 ml HCl, 17,52 ml  $H_2O$ ) a roztoku 6 (1 g  $FeCl_3$ , 62  $\mu$ l HCl, 20 ml  $H_2O$ ).

### 4.1.2.2 API 50 CHL

Mikroorganismy lze identifikovat na základě metabolismu sacharidů. API 50 CHL (BioMérieux, France) je standardizovanou metodou skládající se z 50 dílčích biochemických testů fungujících na základě barevné změny způsobené fermentací substrátu obsaženého ve zkumavce za anaerobních podmínek. Změna barvy je způsobena tvorbou kyselin a snížením pH. První zkumavka je negativní kontrolou a neobsahuje žádný substrát, tudíž nedojde k barevné změně (roztok zůstává fialový). Pokud je reakce pozitivní, roztok ve zkumavce zežloutne.

Narostlé kultury byly stočeny na centrifuze (9000 otáček/3 minuty). Supernatant byl slit a usazené pelety byly propláchnuty a promíchány v pufru. Následně bylo připraveno 5 ml suspenzního média odpovídajícího svojí hustotou druhému zákalovému stupni McFarlandovy zákalové stupnice. Poté bylo připraveno 10 ml fialového suspenzního média API 50 CHL, do něhož bylo přidáno dvojnásobné množství vzorku než do média předchozího. Vzniklé

inokulum bylo aplikováno do 50 zkumavek, které byly následně anaerobně kultivovány při 37 °C po dobu 48 hodin. Vyhodnocení bylo prováděno zaznamenáním barevné změny do výsledkové tabulky po 24 a 48 hodinách a zadáním do identifikačního softwaru (<https://apiweb.biomerieux.com>).

#### **4.1.2.3 APIZYM**

APIZYM (BioMérieux, France) je semikvantitativní mikrometoda, která je používána ke zjištění enzymatických aktivit bakterií. Na základě barevných reakcí lze orientačně zjistit, o který rod bakterií se jedná. Ověření přítomnosti bifidobakterií bylo prováděno detekováním pozitivních barevných změn u jamek číslo 13 (alfa-galaktosidasa), 14 (beta-galaktosidasa) a 16 (alfa-glukosidasa).

Narostlé kultury nebo směsný vzorek byl stočen na centrifuze (9000 otáček/3 minuty). Supernatant byl slit a usazené pelety byly propláchnuty ve fosfátovém pufru. Následně byla připravena suspenze odpovídající 5–6 zákalovému stupni McFarlandovy zákalové stupnice, která byla po 65 µl aplikována do jamek. Inkubační box byl aerobně inkubován při 37 °C po dobu 4 hodin. Následně bylo do každé jamky přidáno činidlo ZYM A a ZYM B s inkubací 5 minut. Poté byly zhodnoceny barevné změny do výsledkové tabulky.

#### **4.1.2.4 RAPID ID 32 A**

RAPID ID 32 A (BioMérieux, France) je biochemický test s lyofilizovanými substráty v jednotlivých jamkách, který je používán k identifikaci anaerobních bakterií na základě barevných změn, které jsou způsobeny aktivitou přítomného substrátu spolu s inokulem bakterií.

Narostlé kultury byly stočeny na centrifuze (9000 otáček/3 minuty). Supernatant byl slit a usazené pelety byly propláchnuty ve fosfátovém pufru. Následně byla připravena suspenze odpovídající čtvrtému zákalovému stupni McFarlandovy zákalové stupnice, která byla aplikována do jamek. Jamka obsahující ureasu byla ještě zakápnuta parafinovým olejem. Test byl aerobně inkubován při 37 °C po dobu 4 hodin. Po inkubaci byly jamky obsahující nitrát zakápnuty činidly NIT1 a NIT2, jamka s indolem činidlem JAMES a zbytek jamek v dolním řádku činidlem FB.

### **4.1.3 Identifikace pomocí molekulárně-genetických testů**

#### **4.1.3.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)**

Identifikace bakterií na úroveň druhu byla prováděna polymerázovou řetězovou reakcí (PCR). Principem metody je zmnožení specifického úseku DNA, který je umožněn

ohraničením dvěma druhově či rodově specifickými oligonukleotidy – primery (Garibyan and Avashia, 2013).

Nejprve byla provedena izolace DNA z čistých kultur s následným vytvořením PCR směsi, která byla podrobena PCR reakci. Poté byl PCR produkt aplikován do gelové destičky v elektroforéze. Elektroforéza (OWL EasyCast™, ThermoScientific, USA) je přístroj umožňující odlišnou pohyblivost látek ve stejnosměrném elektrickém poli a je to jedna ze základních metod pro vizualizaci a analýzu PCR produktu, která je ovlivněna velikostí molekul, hustotou gelu a napětím (Garibyan and Avashia, 2013). Pohyb nukleových kyselin je uskutečňován od záporně nabitě katody ke kladně nabitě anodě. Po proběhnutí tohoto procesu byl gel prosvícen UV světlem a vizualizován (BIO-RAD, USA) v podobě elektroforeogramu.

Izolace DNA z čistých kultur byla provedena převedením 1 ml narostlé kultury do sterilní zkumavky a následným odstředěním (14500 otáček/2 minuty). Supernatant byl slit a usazené pelety byly resuspendovány ve 100 µl PrepMan™ Ultra (Applied Biosystems, USA) s následnou inkubací při 99 °C/10 minut v termobloku. Po vychladnutí byla suspenze znovu odstředěna (14500 otáček/2 minuty) a vzniklý supernatant odebrán do nové sterilní zkumavky.

Identifikace na úroveň druhu – *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* – byla umožněna použitím dvou druhově specifických primerů BiINF-1 a BiINF-2 se sekvencemi bází TTCCAGTTGATCGCATGGTC a GGAAACCCCATCTCTGGGAT (Matsuki et al., 1999). PCR reakce byla uskutečněna v termocykleru (Biometra, Germany), v němž byly opakovány tři cykly s rychle se střídajícími teplotami – denaturace (oddělení jednotlivých vláken DNA templátu při 95 °C), hybridizace (přisedání primeru k templátu DNA na základě komplementarity bází při 40–72 °C) a elongace (syntéza nového komplementárního vlákna DNA působením *Taq* DNA polymerasy při 72 °C).

Pro proběhnutí reakce v elektroforéze byl nejprve připraven 1% agarosový gel (1 g agarosy (SERVA, Germany)/100 ml TAE pufry) s přísadkou 5 µl gelu RED (Biotium, USA). Poté byl ztuhlý gel vložen do elektroforézy, ve které do něj byly napipetovány po 5 µl velikostní standard (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific, USA) a PCR produkt. Elektroforéza byla následně zapnuta na 80 V a 50 mA po dobu 90 minut.

#### **4.1.4 Růst RRBM na oligosacharidech mateřského mléka (OMM)**

V rámci bakalářské práce byla dále testována schopnost RRBM využít různé frakce oligosacharidů mateřského mléka (OMM) – včetně monomerů OMM – sialyllaktosy a fukosy

(Sigma-Aldrich, USA) – jako jediný zdroj uhlíku o koncentraci 2 g/l. Do mikrotitrační destičky obsahující jednotlivá média – frakce OMM, sialyllaktosu, fukosu – byl inokulován RRBM o koncentraci 4 log KTJ/ml s následnou anaerobní kultivací při 37 °C po dobu 24 hodin. Po kultivaci byl proveden rozbor deskovou metodou s použitím selektivních médií pro stanovení RRBM.

#### **4.1.5 Rozbor stolice kojenců a *in vitro* kompetice**

Od osmi plně kojených, císařským řezem porozených kojenců, bez příjmu antibiotik a probiotik, ve stáří  $33,25 \pm 7,89$  dní (4–5 týdnů) byly odebrány čerstvé vzorky stolice, které byly neprodleně po odběru převedeny do zkumavky s W+SP bujónem s anaerobním prostředím. Následně byl z těchto vzorků proveden rozbor deskovou metodou s použitím selektivních médií pro zjištění růstu celkových počtů anaerobních bakterií, bifidobakterií, gram-negativních bakterií, enterokoků, *Escherichia coli*, laktobacilů a RRBM. Kultivace byla provedena dle náročnosti jednotlivých skupin mikroorganismů (viz příloha 1).

Součástí *in vitro* testování v bakalářské práci bylo mimo jiné i ověření schopnosti růstu střevních bakterií těchto kojenců na třech médiích – oligosacharidy mateřského mléka (OMM), mateřské mléko a médium kontrolní (W+SP bujón). Do mikrotitrační destičky bylo napipetováno 88  $\mu$ l média, 10  $\mu$ l vzorku kojenecké stolice (6 log KTJ/g) a 2  $\mu$ l RRBM (5 log KTJ/g), nebo 2  $\mu$ l kontrolní ředící řady s následnou anaerobní kultivací při 37 °C po dobu 24 hodin. Po kultivaci byl proveden rozbor deskovou metodou pomocí selektivních médií pro zjištění růstu již zmíněných skupin mikroorganismů.

#### **4.1.6 Měření koncentrace těkavých mastných kyselin a laktátu**

Po *in vitro* kompetici byla u každé varianty z důlku mikrotitrační destičky provedena analýza primárních metabolitů iontově-výměnnou chromatografií s potlačenou konduktivitou (Katedra pedologie a ochrany půd, ČZU, Praha). Na tuto analýzu byl použit iontový chromatograf ICS 1600 (Dionex, USA) s detektorem a analytickou kolonou a předkolonou IonPac AS11-HS (Dionex, USA). Jako mobilní fáze byl použit KOH s gradientem 1–37,5 mM po dobu 1–50 minut a průtokem 1 ml/min. K potlačení konduktivity eluentu byl použit supresor ASRS 300 (Dionex, USA) a pro snížení vlivu uhličitánů rozpuštěných ve vzorku bylo použito Carbonate Removal Device 200 (Dionex, USA).

## 4.2 *In vivo* kompetice

### 4.2.1 Příprava vzorků kojenecké stolice

Od 4–6 týdnů starých kojenců porozených císařskou sekcí byly odebrány dva vzorky kojenecké stolice, v nichž nebyly přítomny bifidobakterie. Tyto vzorky byly následně analyzovány pomocí deskové metody a biochemických testů APIZYM, API 50 CHL a RAPID ID 32 A (BioMérieux, France) pro ověření nepřítomnosti bifidobakterií. Po provedení analýzy byly vzorky převedeny do vzorku směsného s koncentrací bakterií 9 log KTJ/g určeného k humanizaci bezmikrobních myší. Směsný vzorek byl následně převezen do místa *in vivo* pokusu do Laboratoře gnotobiologie v Novém Hrádku, kde byl vzorek opět otestován na nepřítomnost bifidobakterií.

### 4.2.2 Humanizace bezmikrobních myší

Bezmikrobní imunokompetentní BALB/c myši byly chovány v plastových izolátorech v Novém Hrádku a byly krmeny dietou 1414 (Altromin). Myši byly kolonizovány způsobem orální gaváže obsahující 9 log KTJ/g směsného vzorku kojenecké stolice. Po 14 dnech byla provedena analýza bakteriálního osídlení střev myší pomocí selektivní deskové metody a následně i pomocí metody fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Vzorky stolic myší byly asepticky odebrány do zkumavek s W+SP médiem a následně po přepočtu byly sériově naředěny v ředících řadách do konečného poměru 1:10<sup>9</sup> g/ml. Následně byly takto rozředěné vzorky převedeny do sterilních Petriho misek, které byly okamžitě zality selektivními médii a kultivovány dle náročnosti jednotlivých skupin mikroorganismů (viz příloha 1).

Vzorky stolic byly vyšetřeny na celkové počty anaerobních bakterií (Wilkins-Chalgren anaerobe agar, Oxoid, UK), na přítomnost RRBM (Wilkins-Chalgren anaerobe agar, Oxoid, UK; doplněno o 100 mg/l mupirocinu, 100 mg/l rifampicinu, 1 ml/l octové kyseliny), gram-negativních bakterií (Wilkins-Chalgren anaerobe agar, Oxoid, UK; doplněno o G-N Anaerobe Selective Supplement, Oxoid, UK), *Enterococcus* spp. (Slanetz-Bartley medium, Oxoid, UK) a *Escherichia coli* (TBX medium, Oxoid, UK). Pro kvantifikaci *Clostridium* spp. byla použita metoda fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) s kity specifickými pro *Clostridium butyricum* group (RiboTechnologies, The Netherlands). Misky zality médiem pro celkové počty anaerobních mikroorganismů, gram-negativní bakterie a RRBM byly anaerobně inkubovány v anaerostatech (Anaerobic Plus System, Oxoid, UK) při 37 °C po dobu 48 hodin. *Enterococcus* spp. byl kultivován aerobně při 37 °C po dobu 48 hodin a *Escherichia coli* také aerobně při 37 °C po dobu 24 hodin. Analýza vzorků stolic myší byla provedena za



účelem potvrzení osídlení bezmikrobních myší právě kojeneckou mikrobiotou ze směsného vzorku stolice.

#### 4.2.2.1 Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

Fluorescenční *in situ* hybridizaci (FISH) lze zařadit mezi základní metody molekulární cytogenetiky s principem zviditelnění sekvence nukleových kyselin na mikroskopickém preparátu pod fluorescenčním mikroskopem. FISH je široce využívanou metodou k detekci normální či aberantní DNA sekvence v intaktní buňce, ať už v interfázi, metafázi, či v izolovaném chromozomu pomocí označení sekvence nukleové kyseliny vysokoenergetickým fluoroforem (Bartlett, 2004). Molekulární hybridizací lze identifikovat polohu DNA sekvence *in situ*, neboli v její přirozené pozici v chromozomu. Právě k identifikaci a kvantifikaci přirozeně se vyskytujících sekvencí v biologickém vzorku je používána molekulární hybridizace pomocí značené sekvence DNA nebo RNA sondy (O'connor, 2008).

Kvantifikace *Clostridium* spp. byla prováděna metodou FISH. Čerstvé směsné vzorky stolice myší (se zaznamenanou navázkou) byly odstředěny (14500 otáček/5 minut), supernatant byl slit a usazené pelety byly resuspendovány v 500 µl MCPX1 pufru (RiboTechnologies, The Netherlands). Tento proces byl zopakován a poté bylo přidáno 50 µl roztoku Fixative (RiboTechnologies, The Netherlands) s promícháním a inkubací při 4 °C po dobu 30 minut. Po inkubaci byly zkumavky stočeny (14500 otáček/5 minut), supernatant byl slit a pelety opět resuspendovány v 500 µl MCPX1 pufru. Tento proces byl opět zopakován s rozdílem resuspendace pelet v 500 µl Solution A (RiboTechnologies, The Netherlands) a další inkubací při –30 °C po dobu 1 hodiny.

Po inkubaci bylo z každé zkumavky odebráno 50 µl roztoku do dvou čistých zkumavek – do jedné zkumavky bylo přidáno 50 µl roztoku specifické klostridiální sondy (RiboTechnologies, The Netherlands) a do druhé 50 µl bifidobakteriální sondy (RiboTechnologies, The Netherlands). Takto připravené zkumavky s roztoky byly podrobeny hybridizaci v termobloku při 50 °C za nepřístupu světla po dobu minimálně 10 hodin. Během této inkubaci probíhalo navázání specifické sondy na bakteriální RNA.

Po hybridizaci byly vzorky převedeny do MCW1 pufru (RiboTechnologies, The Netherlands) a poté byly přefiltrovány přes filtrační papír, který byl po uschnutí vložen na kapku Mounting Fluid (RiboTechnologies, The Netherlands) na podložním sklíčku. Kapka Mounting fluid byla aplikována i na filtrační papír svrchu a poté bylo přiloženo krycí sklíčko. Takto připravené preparáty byly prohlédnuty fluorescenčním mikroskopem (Nikon Eclipse E800 VFM, Japan), a zároveň z nich bylo pořízeno 10 snímků sloužících k následné

kvantifikaci programem LUCIA General 5.10 (příloha 2, 3). Poté byl proveden přepočet na počet bakterií v gramu vzorku dle vzorce:

**Počet bakterií/gram vzorku**

$$= \frac{X (\text{průměrný počet pozitivních buněk v zorném poli}) \times M (\text{celkový počet polí filtru}) \times Df (\text{diluční faktor})}{S (\text{navážka směsného vzorku stolice myši v gramech})}$$

### 4.2.3 Směs OMM a MM s RRBM v humanizovaných myších

Schopnost růstu RRBM, který byl použit v *in vivo* testování s cílem jeho sledování při kompetici s kojeneckým vzorkem stolice (od kojenců porozených císařskou sekcí bez bifidobakterií v jejich mikrobiotě) a vzniku možného synbiotického efektu s prebiotikem, byla testována na třech médiích – médium s oligosacharidy mateřského mléka (OMM), médium s mateřským mlékem a médium kontrolní. Přežití RRBM bylo ověřováno kultivací na W+SP médiu s přidávkem mupirocinu (100 mg/l), rifampicinu (100 mg/l) a octové kyseliny (1 ml/l). Následně byl RRBM re-identifikován použitím druhově-specifické PCR.

Humanizované myši byly dva týdny po kolonizaci rozděleny do tří skupin. Každá skupina byla složena ze dvou samců a dvou samic. První pokusné skupině byla podávána voda s OMM o koncentraci 7 g/l a byl jí orálně gavážován RRBM (Mielcarek et al., 2011). Druhé pokusné skupině bylo podáváno mateřské mléko bez vody a byl jí také orálně gavážován RRBM. Třetí skupina byla skupinou kontrolní, a proto jí nebyly podávány OMM, mateřské mléko a ani jí nebyl orálně gavážován RRBM.

Mateřské mléko bylo získáno z Ústavu pro péči o matku a dítě (Praha) a bylo ošetřeno Holderovou metodou – tepelné ošetření při 62,5 °C/30 minut – zajišťující minimální vliv na obsah laktoferinu, sIgA a lysozymu v mateřském mléce (Peila et al., 2016). Bifidobakteriální probiotický kmen – RRBM – byl kultivován ve W+SP médiu se sójovým peptonem (5 g/l), a poté byl centrifugován (14500 otáček/5 minut). Po odstředění narostlé kultury byl odstraněn supernatant a z usazených bakteriálních buněk na dně zkumavky byla resuspendací ve fyziologickém roztoku připravena bakteriální suspenze o koncentraci  $10^7$  KTJ/ml. 200 µl takto připravené probiotické suspenze bylo zaváděno orální gaváží první a druhé pokusné skupině myši každý třetí a čtvrtý den ( $2 \cdot 10^6$  KTJ/ml RRBM).

Každý třetí den byl z každé pokusné i kontrolní skupiny myši odebrán čerstvý směsný vzorek stolice do zkumavek s W+SP médiem s anaerobními podmínkami (bez přítomnosti kyslíku v CO<sub>2</sub> prostředí). Takto odebrané vzorky byly neprodleně převezeny na KMVD v Praze, kde byly prováděny rozборы pomocí deskové metody stanovující přítomnost jednotlivých skupin mikroorganismů pomocí selektivních médií a metody FISH

(*Clostridium*). Po 14 dnech bylo provedeno ukončení pokusu, a to anestezií myši (3–4 hodiny po odebrání pítek) a následným aseptickým odebráním jejich orgánů (zabránění křížové bakteriální kontaminaci) – periferní krve, mezenterických lymfatických uzlin, sleziny a střev.

#### **4.2.4 Měření koncentrace těkavých mastných kyselin a laktátu**

U každého směsného vzorku stolice, který byl odebrán myším, byla provedena analýza primárních metabolitů iontově-výměnnou chromatografií s potlačenou konduktivitou (Katedra pedologie a ochrany půd, ČZU, Praha).

#### **4.2.5 Analýza cytokinů**

Ze sleziny myši byly asepticky připraveny jednobuněčné suspenze. Buňky sleziny ( $6 \cdot 10^5$ /v jamce) byly následně kultivovány v médiu (RPMI 1640 medium s 10% tepelnou inaktivací FBS, 10 mM HEPES, 100 U/ml penicilinu a 100  $\mu$ l/ml streptomycinu; všechno Sigma-Aldrich, USA) při 37 °C v CO<sub>2</sub> po dobu 48 hodin. Koncentrace IL-4, IL-6, IL-10 a IFN- $\gamma$  v buněčném supernatantu byly detekovány pomocí MILLIPLEX MAP Mouse Cytokine/Chemokine Panel (Milipore Corporation, USA). Hladiny TNF- $\alpha$  byly zjištěny metodou ELISA Ready-Set-Go! Kits (eBioscience, USA) podle instrukcí výrobce. Tato analýza byla prováděna v Laboratoři gnotobiologie (Mikrobiologický ústav AV ČR, v. v. i., Nový Hrádek).

#### **4.2.6 Statistické vyhodnocení**

Statistická analýza byla provedena pomocí dvou-výběrového T-testu s rovností rozptylů v programu Microsoft Excel (Microsoft Office 2013 Professional Plus) a pomocí Multiple Range Tests (Duncan's Multiple Range Tests) při  $P \leq 0,05$  v programu Statgraphics Centurion XV.II (Manugistics, Rockville, MD, USA).

## 5 Výsledky

### 5.1 *In vitro*

#### 5.1.1 Růst RRBM na OMM

Schopnost růstu RRBM byla testována na směsích oligosacharidů mateřského mléka (Směs OMM 1–3) izolovaných ze směsných vzorků mateřských mlék, na fukose a sialyllaktose. Z následující tabulky (tab. 1) je patrné, že vzhledem k většímu zdroji uhlíku byly lépe využity testované směsi OMM, oproti fukose a sialyllaktose. Vzhledem k inokulační dávce  $10^4$  KTJ/ml je nutno konstatovat, že ke svému růstu byl RRBM schopen využít všechny testované substráty.

Tabulka 1: Růst RRBM (log KTJ/ml) na oligosacharidech

Médium	Směs OMM 1	Směs OMM 2	Směs OMM 3	Fukosa	Sialyllaktosa
log KTJ/ml	$8,17 \pm 0,04^b$	$8,27 \pm 0,04^b$	$8,65 \pm 0,02^c$	$6,58 \pm 0,02^a$	$6,43 \pm 0,16^a$

Hodnoty jsou průměry  $\pm$  směrodatné odchylky (SD) z minimálně tří hodnot. Statistická analýza byla provedena pomocí Multiple Range Testu ( $P < 0,01$ ) v programu Statgraphics Centurion XV.II (Manugistics, Rockville, MD, USA). Hodnoty s odlišným horním indexem se od sebe statisticky významně liší na hladině významnosti  $\alpha = 0,01$ .

#### 5.1.2 Kompetice a re-identifikace izolátů

Výsledkem kompetice jsou průměrné hodnoty narostlých skupin mikroorganismů na jednotlivých médiích – oligosacharidy mateřského mléka (OMM), kontrolní médium (W+SP), mateřské mléko (MM) a jejich směrodatné odchylky (tab. 2).

Tabulka 2: Růst jednotlivých skupin mikroorganismů (log KTJ/ml) na oligosacharidech mateřského mléka, na W+SP médiu a na mateřském mléce – Multiple Range Test

Skupiny bakterií	OMM		W+SP		MM	
	Kontrola	RRBM	Kontrola	RRBM	Kontrola	RRBM
CP	$9,00 \pm 0,23^a$	$9,04 \pm 0,34^a$	$9,48 \pm 0,28^b$	$9,36 \pm 0,29^b$	$8,97 \pm 0,25^a$	$9,16 \pm 0,37^{ab}$
G-	$7,27 \pm 0,90^{bc}$	$7,54 \pm 0,86^{bc}$	$8,11 \pm 0,57^c$	$7,91 \pm 0,74^c$	$6,52 \pm 1,26^b$	$5,18 \pm 0,77^a$
<i>Clostridium</i>	$7,43 \pm 1,02^a$	ND	$7,24 \pm 1,19^a$	ND	$7,73 \pm 1,76^a$	ND
RRBM	ND	$8,27 \pm 0,57^a$	ND	$8,16 \pm 0,36^a$	ND	$8,23 \pm 1,40^a$
EC	$9,28 \pm 1,05^b$	$9,01 \pm 0,89^b$	$9,41 \pm 0,72^b$	$9,13 \pm 0,48^b$	$8,72 \pm 0,36^b$	$7,13 \pm 1,71^a$
ENT	$8,71 \pm 0,42^{bc}$	$8,15 \pm 1,20^{bc}$	$8,99 \pm 0,28^c$	$8,69 \pm 0,63^{bc}$	$7,33 \pm 1,31^{ab}$	$6,69 \pm 1,66^a$

*Pozn.:* CP – Celkové počty bakterií, G- – Gram-negativní bakterie, RRBM – rifampicin-rezistentní mutant, EC – *Escherichia coli*, ENT – Enterokoky, OMM – oligosacharidy mateřského mléka, W+SP – kontrolní médium, MM – mateřské mléko.

Hodnoty jsou průměry  $\pm$  směrodatné odchylky (SD) z minimálně tří hodnot. Zkratka ND znamená nedetekovatelnou hodnotu log KTJ/ml. Detekční limit pro námi použitou metodu byl 3 log KTJ/ml. Statistická analýza byla provedena pomocí Multiple Range Testu ( $P < 0,05$ ) v programu Statgraphics Centurion XV.II (Manugistics, Rockville, MD, USA). Hodnoty v řádcích s odlišným horním indexem se od sebe statisticky významně liší na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

Po kompetici byla ověřena přítomnost RRBM biochemickými a molekulárně-genetickými testy na úroveň rodu a druhu (tab. 3). Všechny čisté kultury odebraných izolátů po *in vitro* kompetici byly identifikovány na úroveň rodu jako bifidobakterie a zároveň také byly potvrzeny a re-identifikovány jako RRBM – *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*.

Tabulka 3: Identifikace RRBM pomocí biochemických a molekulárně-genetických testů

Číslo vzorku	Počet izolátů	P. čistých kultur	F6PPK	PCR
1	12	12	12	12 RRBM
2	25	25	25	25 RRBM
3	21	18	18	18 RRBM
4	13	13	13	13 RRBM
5	13	13	13	13 RRBM
6	13	8	8	8 RRBM
7	15	14	14	14 RRBM
8	15	15	15	15 RRBM

*Pozn.:* F6PPK – fruktoso-6-fosfát fosfoketolasa (rodová identifikace), PCR – polymerázová řetězová reakce (druhá identifikace), RRBM – rifampicin-rezistentní mutant.

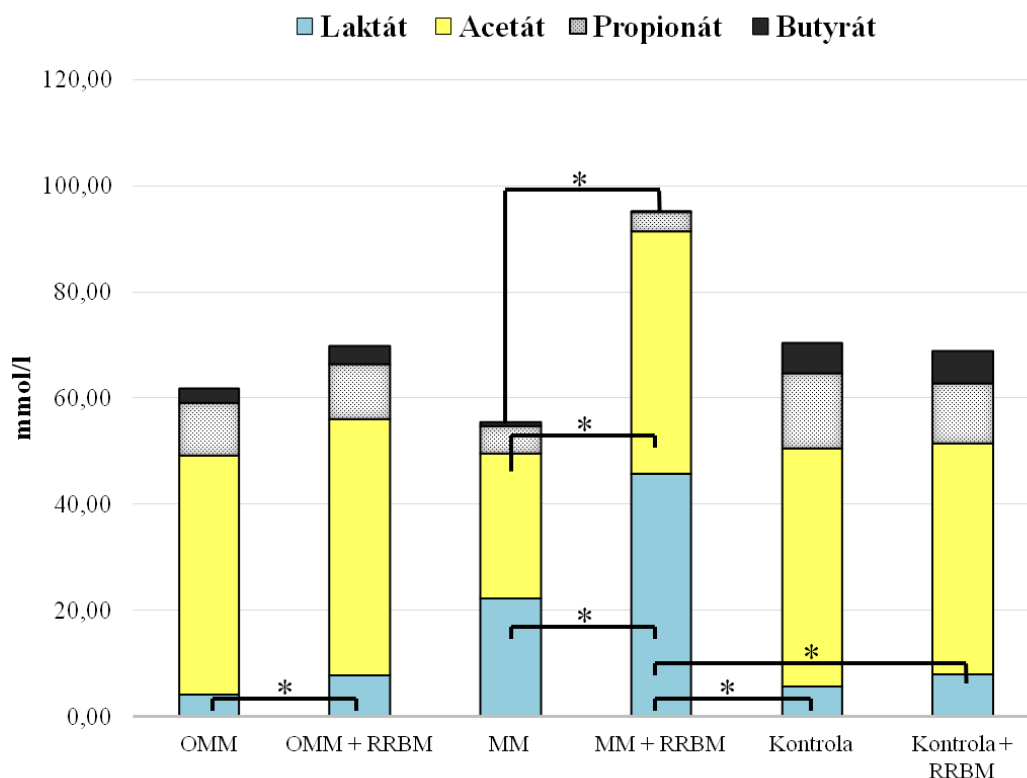
### 5.1.3 Měření koncentrace těkavých mastných kyselin a laktátu (*in vitro*)

Koncentrace těkavých mastných kyselin a laktátu (mmol/l) byly analyzovány 24 hodin po *in vitro* inkubaci v přítomnosti vzorku kojenecké stolice se synbiotickou směsí OMM s/bez RRBM, MM s/bez RRBM a kontroly s/bez RRBM (obrázek 4, příloha 4).

Statisticky významné rozdíly v koncentraci laktátu byly zjištěny mezi skupinami s OMM bez RRBM a OMM s RRBM; s MM bez RRBM a MM s RRBM. Rozdíl koncentrací

acetátu a butyrátu byl významný mezi skupinami s MM bez RRBM a MM s RRBM. Významný rozdíl byl dále zjištěn i u koncentrace laktátu mezi skupinami s MM s RRBM a kontrolou bez RRBM, a také mezi skupinami s MM s RRBM a kontrolou s RRBM.

Obrázek 4: Koncentrace těkavých mastných kyselin a laktátu (*in vitro*)



\* Statisticky významný rozdíl naměřených hodnot na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

## 5.2 *In vivo*

Po 14 dnech po provedené humanizaci BALB/c myši byly celkové počty anaerobních bakterií ve všech experimentálních skupinách stejné –  $9,99 \pm 0,78$  log KTJ/g – jako ve směsi kojenecké stolice použité ke kolonizaci –  $8,95 \pm 0,17$  log KTJ/g.

Počty *Escherichia coli* zůstaly stejné ve všech skupinách v průběhu celého *in vivo* pokusu ( $9,43 \pm 0,73$  log KTJ/g).

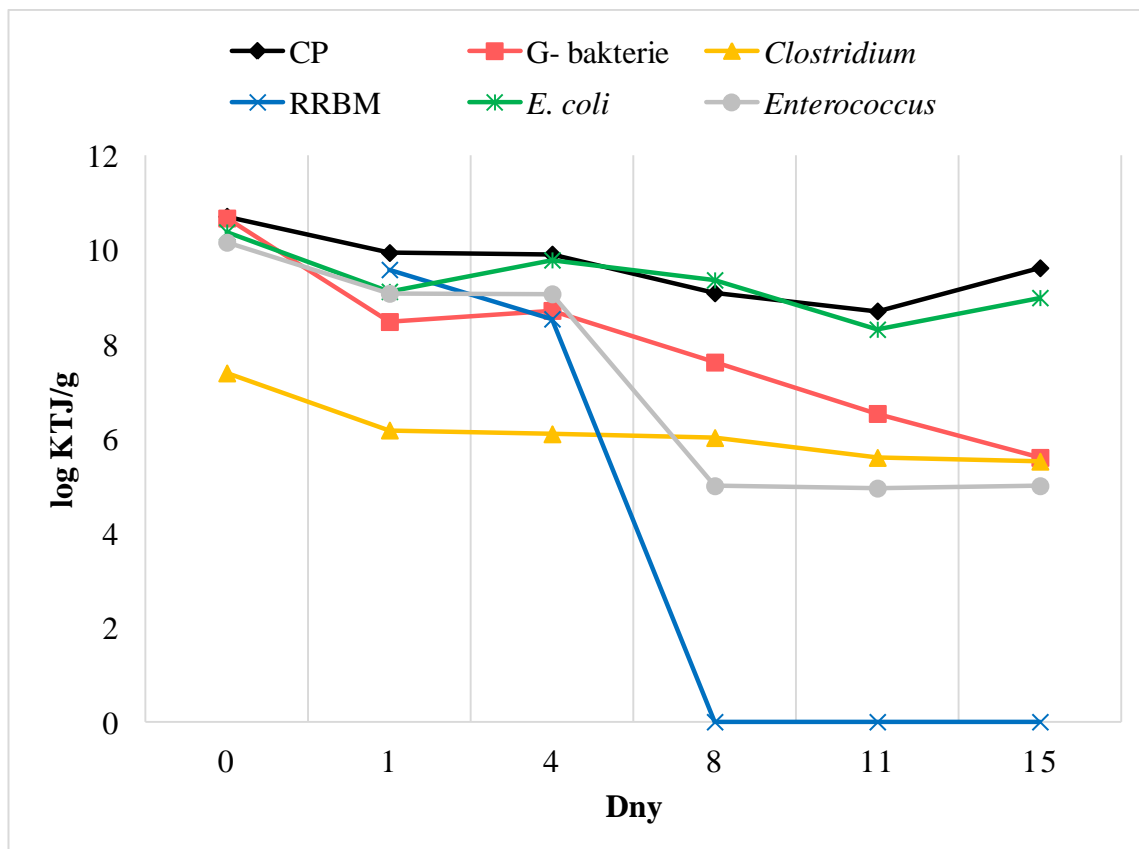
Počty gram-negativních bakterií u druhé pokusné skupiny (MM + RRBM) nebyly ovlivněny vzhledem ke skupině kontrolní ( $8,50 \pm 1,52$  log KTJ/g), zatímco u první pokusné skupiny (OMM + RRBM) byly počty sníženy z  $8,48$  log KTJ/g na  $5,60$  log KTJ/g.

Počty *Enterococcus* spp. byly sníženy z  $10,36$  log KTJ/g na  $5,58$  log KTJ/g u první i druhé pokusné skupiny ve srovnání se skupinou kontrolní ( $8,74 \pm 0,40$  log KTJ/g), ve které se počty během pokusu nezměnily.

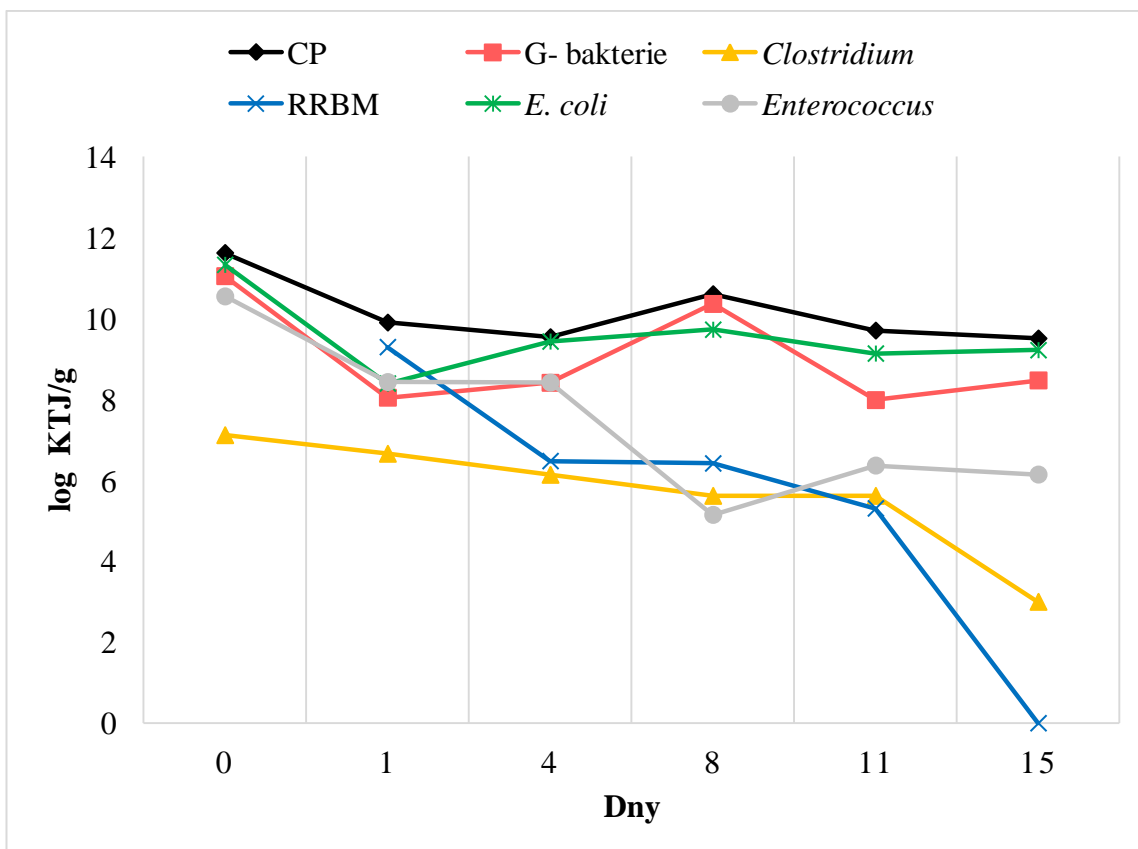
RRBM byl schopen kolonizovat střevní trakt myši první pokusné skupiny s OMM po dobu 4 dnů a u myši druhé pokusné skupiny s MM po dobu 8 dnů (obrázek 5, 6), po nichž vymizel. U první pokusné skupiny nebyl RRBM detekován již po druhém podání probiotika – 8 dní po první aplikaci – ani po opakovaném podání (detekční limit byl 3 log KTJ/g). U druhé pokusné skupiny s MM byly počty RRBM sníženy z 9,30 log KTJ/g na 5,31 log KTJ/g a po 11 dnech došlo k jeho úplnému vymizení.

Ve vzorcích myši stolice po humanizaci byly detekovány vysoké počty klostridií (9,15 log KTJ/g). Významné snížení počtu klostridií bylo zjištěno u první i druhé pokusné skupiny ve srovnání se skupinou kontrolní. Během 15 dnů bylo u první pokusné skupiny s OMM detekováno snížení počtů klostridií z 7,39 log KTJ/g na 5,52 log KTJ/g. U druhé pokusné skupiny s MM bylo také detekováno snížení počtu klostridií spolu se snížením počtu RRBM a po 15 dnech pokusu již nebyly klostridie detekovány vůbec. Jejich počty byly sníženy z 7,15 log KTJ/g z prvního dne až pod limit detekce (< 5 log KTJ/g) ve srovnání s kontrolní skupinou, u které byl zjištěn pouze mírný pokles jejich počtu z 7,84 log KTJ/g na 7,65 log KTJ/g (obrázek 7).

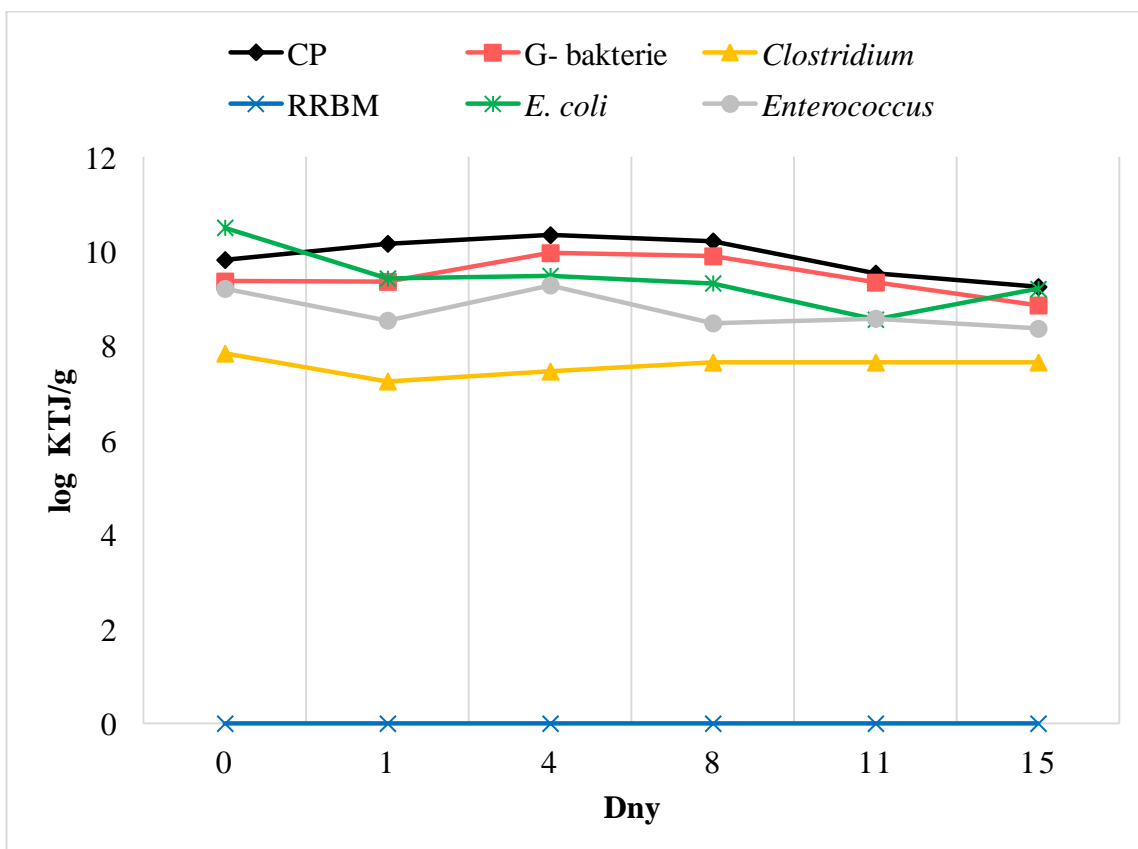
Obrázek 5: Počty bakterií (log KTJ/g) ve stolici humanizovaných BALB/c myši (OMM s RRBM)



Obrázek 6: Počty bakterií (log KTJ/g) ve stolici humanizovaných BALB/c myší (MM s RRBM)



Obrázek 7: Počty bakterií (log KTJ/g) ve stolici humanizovaných BALB/c myších (kontrola)

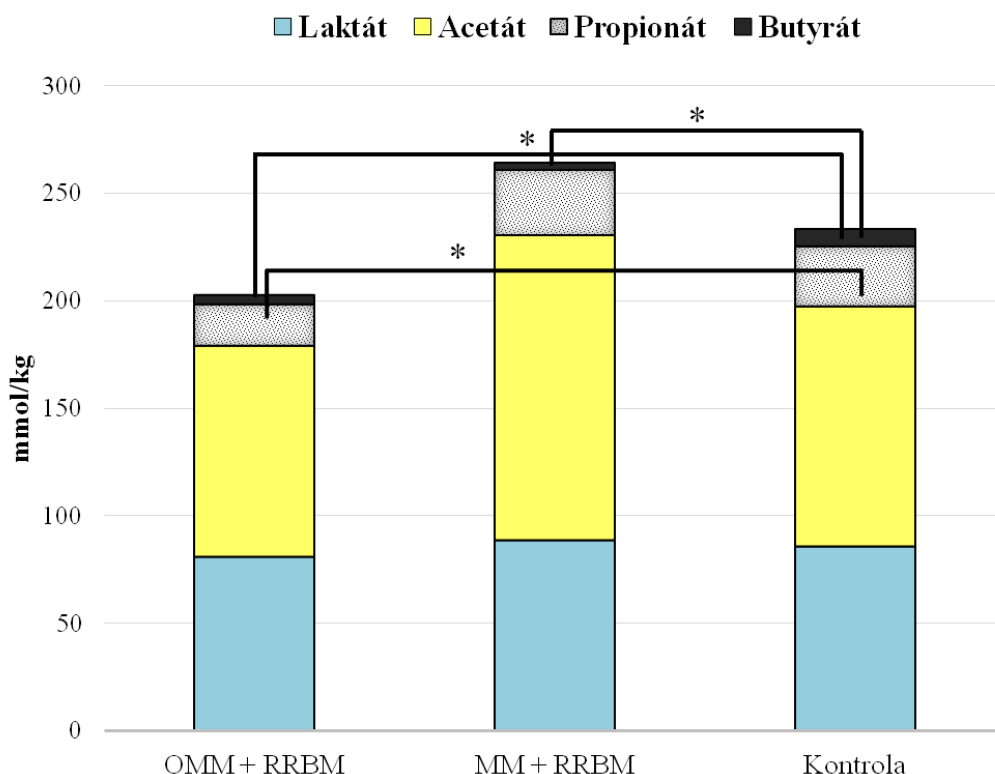




### 5.2.1 Měření koncentrace těkavých mastných kyselin a laktátu (*in vivo*)

Koncentrace těkavých mastných kyselin a laktátu (mmol/kg) byly měřeny ve vzorku stolic humanizovaných BALB/c myší po *in vivo* kompetici se synbiotickou směsí OMM s RRBM, MM s RRBM a u kontrolní skupiny (obrázek 8, příloha 5).

Obrázek 8: Koncentrace těkavých mastných kyselin a laktátu (*in vivo*)



\* Statisticky významný rozdíl naměřených hodnot na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

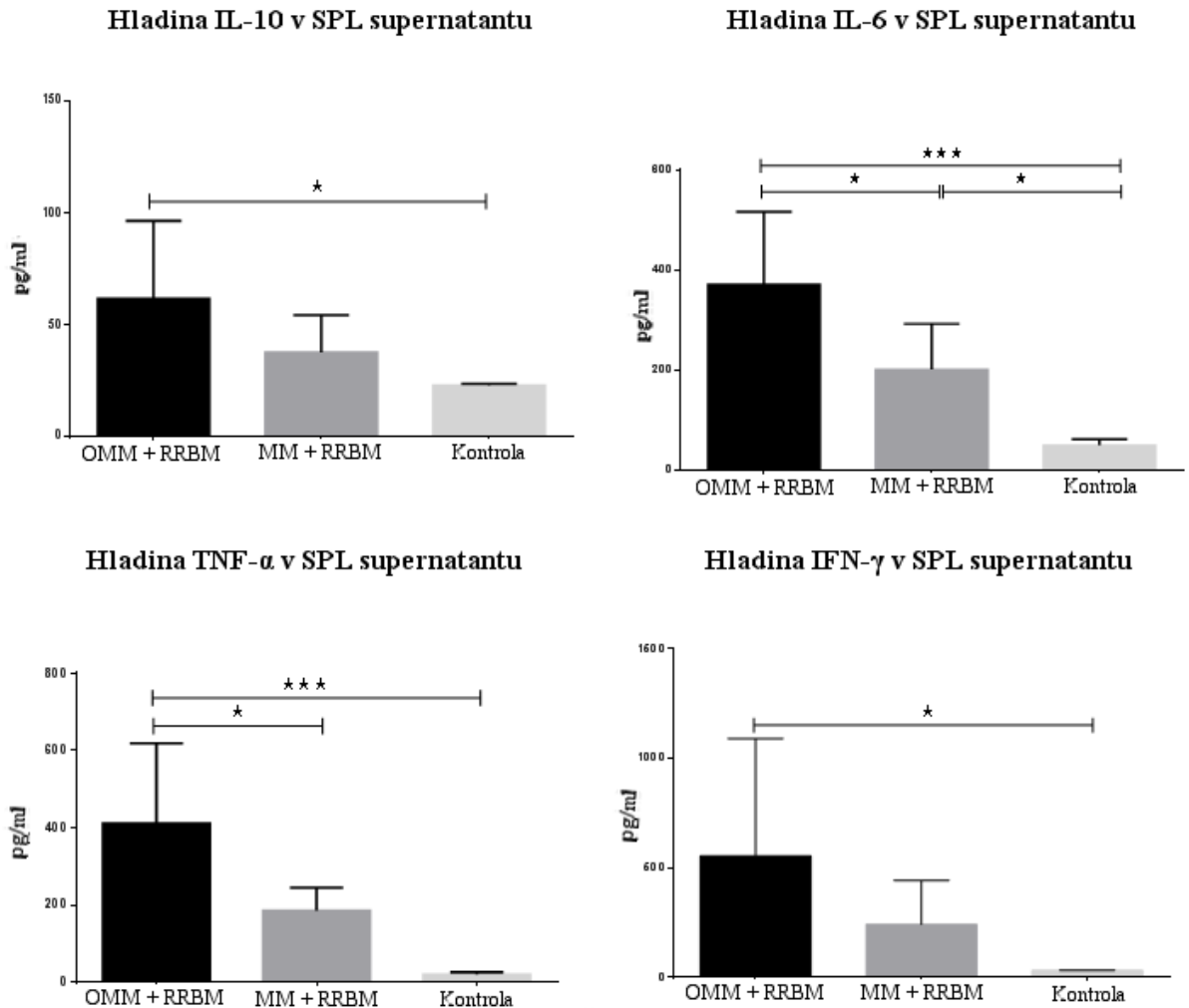
Významné rozdíly v koncentraci butyrátu byly zjištěny mezi první pokusnou (4,07 mmol/kg) a kontrolní skupinou (7,80 mmol/kg), a také mezi druhou pokusnou (3,68 mmol/kg) a kontrolní skupinou (7,80 mmol/kg), což koreluje se snížením počtu klostridií. Mezi první pokusnou a kontrolní skupinou byl také významný rozdíl v koncentraci propionátu.

### 5.2.2 Analýza cytokinů

U první pokusné skupiny s OMM bylo detekováno výrazné zvýšení hladiny protizánětlivého cytokinu IL-10 ve srovnání se skupinou kontrolní. U skupin, jimž byl podáván RRBM – první a druhá pokusná skupina – bylo zjištěno zvýšení hladin IL-10. U první pokusné skupiny bylo také detekováno výrazné zvýšení hladiny prozánětlivých cytokinů IL-6, TNF- $\alpha$  a IFN- $\gamma$  ve srovnání s ostatními skupinami. Zvýšené hladiny těchto

prozánětlivých cytokinů byly zjištěny také u druhé pokusné skupiny s MM ve srovnání se skupinou kontrolní (obrázek 9).

Obrázek 9: Analýza cytokinů



*Pozn.:* SPL supernatant – supernatant jednobuněčné suspenze ze sleziny myši, IL-10 – interleukin 10, IL-6 – interleukin 6, TNF- $\alpha$  – faktor nádorové nekrózy („*tumor necrosis factor*“), IFN- $\gamma$  – interferon  $\gamma$ , OMM – oligosacharidy mateřského mléka, MM – mateřské mléko, RRBM – rifampicin-rezistentní mutant.

## 6 Diskuze

Cílem této práce bylo zjistit vliv synbiotických vlastností oligosacharidů mateřského mléka (OMM) a bifidobakterií v porovnání s mateřským mlékem (MM) a bifidobakteriemi a zároveň jejich vliv na novorozenecký střevní mikrobiom po císařské sekci v podmínkách *in vitro* a *in vivo*. Během prvního dne *in vivo* testování nebyly zjištěny žádné významné rozdíly. Délka podávání probiotika byla určena na základě předchozích studií u lidí a myši, které byly provedeny v rozmezí od 7 (Nakayama and Oishi, 2013) do 14 dnů (Monteagudo-Mera et al., 2016). Kolonizací střevního traktu rifampicin-rezistentním mutantem (RRBM) bylo způsobeno snížení počtu *Clostridium* spp. od 8. dne po podávání synbiotik (skupina s MM a RRBM). Monteagudo-Mera et al. (2016) a Nakayama and Oishi (2013) uvádějí, že podávání synbiotika po dobu jednoho týdne bylo dostatečné k detekci změn v mikrobiotě myši u skupin bakterií *Clostridium* spp. a gram-negativních bakterií.

Doporučenou denní dávkou prebiotik pro člověka bylo v řadě studií uváděno množství 8–15 g/den (Macfarlane et al., 2008), nicméně bifidogenní efekt prebiotik byl pozorován již od dávky 5 g/den (Anthony et al., 2006). Koncentrace OMM – 7 g/l – použita v našem *in vivo* pokusu byla přibližně stejná jako koncentrace oligosacharidů v mateřském mléce – v průměru 5–20 g/l (Bode, 2012; Gabrielli et al., 2011). Při podávání 1 g galaktooligosacharidů na kilogram hmotnosti myši byl zaznamenán zvýšený výskyt bifidobakterií a laktobacilů. Rovněž byl zjištěn vliv prebiotických oligosacharidů na koncentrace těkavých mastných kyselin (Pan et al., 2009), což bylo v této práci také potvrzeno.

Těkavé mastné kyseliny – acetát, butyrát, propionát – jsou primárním produktem mikrobiální fermentace prebiotik, jsou zdrojem dobře a rychle využitelné energie a podílejí se na metabolismu hostitele (Yang et al., 2013). Je pravděpodobné, že těkavé mastné kyseliny vykazují určitou souvislost mezi dietou, střevní mikrobiotou a imunitní reakcí a je tedy zřejmé, že jejich tvorba pozitivně ovlivňuje lokální metabolické procesy tlustého střeva a rozvoj trávicího systému jako takového (Oozer et al., 2013). V této souvislosti bylo zjištěno, že acetát, který byl syntetizován bifidobakteriemi, zvyšoval střevní obranu hostitele proti infekci. Tato ochrana byla zprostředkována buňkami epitelu (Ventura et al., 2014).

V naší *in vitro* kompetici byly zjištěny významné rozdíly koncentrace laktátu v rámci skupiny s OMM a skupiny s MM. Tyto rozdíly byly způsobeny inokulací probiotického RRBM. Je totiž známo, že metabolickým produktem *Bifidobacterium* spp. je laktát a acetát v poměru 2:3 (De Vries and Stouthamer, 1967; Gupta et al., 2016). Dále byly zjištěny i významné rozdíly v koncentraci acetátu a butyrátu v rámci skupiny s MM. Při měření

koncentrace těkavých mastných kyselin po *in vivo* kompetici byly zjištěny významné rozdíly koncentrací butyrátu mezi první pokusnou a kontrolní skupinou a zároveň také mezi druhou pokusnou a kontrolní skupinou, což koreluje se snížením počtu klostridií. Zároveň byl také zjištěn významný rozdíl koncentrací propionátu mezi skupinou první a kontrolní.

U skupiny myši s OMM a u skupin, jimž byl podáván RRBM *in vivo*, byla zjištěna zvýšená hladina protizánětlivého cytokinu IL-10. Kole and Maloy (2014) uvádějí, že produkce cytokinu IL-10 byla spojována s jeho ochranným efektem při zánětlivých onemocněních střev. Nicméně, u skupin myši s OMM byly výrazně produkovány i prozánětlivé cytokiny IL-6, TNF- $\alpha$  a IFN- $\gamma$ , které pak byly v menším množství produkovány i u skupiny myši s MM. Produkce těchto cytokinů byla pravděpodobně ovlivněna příjmem synbiotik, respektive probiotik a prebiotik. Na základě této úvahy plynoucí z výsledků naší *in vivo* studie by tedy bylo pravděpodobné, že správná funkce a vývoj imunitního systému organismu by mohla být podporována příjmem prebiotických OMM, nebo synbiotik obsahujících OMM s RRBM. Zároveň by bylo možné, že tento vliv by mohl být mírně způsoben i příjmem MM nebo synbiotik obsahujících MM s RRBM.

Po ukončení pokusu pitvou myši bylo zjištěno, že podáváním OMM byla způsobena flatulence a břišní plynatost. Tento jev – flatulence – byl potvrzen již v dřívějších studiích při dávkách fruktooligosacharidů či inulinu vyšší než 15 g/den (Stone-Dorshow and Levitt, 1987) a také při dávkách oligofruktosy vyšší než 30 g/den (François et al., 2014).

Aloisio et al. (2012) a Mazzola et al. (2015) doporučují po *in vitro* testování probiotický kmen *Bifidobacterium breve* B632 spolu s prebiotickými galaktooligosacharidy (Vivinal®) a fruktooligosacharidy (Actilight®950P) jako vhodné součásti synbiotik pro kojence. Nicméně účinek synbiotik *in vivo* může být různý. Právě proto byl v řadě dalších *in vivo* studií dále zkoumán vliv synbiotik – kombinace probiotik a prebiotik – na složení gastrointestinální mikrobioty. Vlastní efekt synbiotika, které je podáváno s cílem prospěšně ovlivnit střevní mikrobiotu hostitele, ještě nebyl zcela prozkoumán a výsledky synbiotického vlivu jsou tedy poměrně omezené (Saulnier et al., 2008). V současné době jsou prováděny nové *in vivo* metody selekce probiotik pro použití do synbiotik. Principem této metody je izolace probiotických bakterií ze stolice jedince, kterému byly předem podávány prebiotika. Po izolaci v této studii byly následně vlastnosti probiotického kmene po *in vivo* selekci ověřeny na krysím *in vivo* modelu podáváním probiotika, prebiotika a synbiotika. Výsledkem bylo zjištění, že selekce probiotika *in vivo* by mohla být vhodnou metodou pro zajištění lepších vlastností a konkurenceschopnosti probiotika jako součásti synbiotika v gastrointestinálním traktu hostitele (Krumbeck et al., 2015). Bindels et al. (2015) testoval

účinek synbiotik *in vivo* u myši s indukovanou leukémií. Tento příjem byl spojován s modifikací mikrobioty myši ve prospěch znovuvytvoření mikrobiální homeostaze, prodloužení jejich přežití a snížení kachexie.

Součástí výstupu našeho *in vitro* testování bylo zjištění, že kombinací OMM s RRBM lze získat potenciální synbiotikum pro kojence, a proto byla tato směs dále testována *in vivo* ve zvířecím modelu. Nejvyšší synbiotický efekt *in vitro* testování byl detekován u varianty MM jako prebiotika s RRBM jako probiotikem, u které byly nejvýrazněji sníženy počty potenciálně patogenních gram-negativních bakterií. Nižší synbiotický efekt vykazovala také varianta OMM spolu s RRBM, u které byly opět počty gram-negativních bakterií výrazně sníženy oproti kontrole. RRBM byl detekován ve stejných počtech ve všech médiích, do nichž byl inokulován. Bifidogenní efekt OMM nebyl tak výrazný jako u MM pravděpodobně proto, že OMM poskytují pouze komplexní cukry – oligosacharidy – jako zdroj uhlíku, zatímco MM dále poskytuje i jednodušší a snadněji fementovatelné cukry – glukosu, galaktosu a laktosu. MM navíc dále obsahuje i antimikrobiální faktory – laktoferin, laktofericin, lysozym a antimikrobiální peptidy, které inhibují růst patogenů (Field, 2005). Je zajímavé, že antimikrobiální enzym lysozym, který rozkládá buněčnou stěnu gram-pozitivních bakterií hydrolýzou  $\beta(1\rightarrow4)$  vazby mezi *N*-acetylglukosaminem a *N*-acetylmuramovou kyselinou (Wiesner and Vilcinskas, 2010), nezpůsobil inhibici růstu RRBM (*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) patřícího do této skupiny bakterií. Již dříve bylo zjištěno, že některé gram-pozitivní bakterie – *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum* – jsou lysozym rezistentní a mají výbornou růstovou schopnost v mateřském mléce (Rockova et al., 2011), ve kterém může být lysozym obsažen v koncentracích až 400  $\mu\text{g/ml}$  (Clare et al., 2003).

Saulnier et al. (2008) potvrdil synbiotický účinek řady kombinací fruktooligosacharidů spolu s *Lactobacillus fermentum*, *Lb. plantarum*, *Lb. paracasei* a *Bifidobacterium longum*, při kterém byl růst probiotik stimulován prebiotiky. Byly zvýšeny počty prospěšných a sníženy počty potenciálně patogenních bakterií a ve srovnání pouze s probiotickým účinkem byl synbiotický účinek významnější. Uvádí dále nezbytnost dalšího *in vivo* testování. Přestože byl růst střevních bakterií na oligosacharidech mateřského mléka *in vivo* testován již dříve, také Wang et al. (2015) uvádí nezbytnost dalšího *in vivo* testování pro potvrzení prebiotických účinků oligosacharidů mateřského mléka na stimulaci prospěšné střevní mikrobioty kojence.

Jak již bylo zmíněno, synbiotický účinek OMM s RRBM byl prokázán pouze v *in vitro* testování. Je pravděpodobné, že *in vivo* modely myši nejsou vždy zcela vhodné a jsou často kritizovány z důvodu různých omezení. Přestože *in vivo* modely mohou poskytovat poměrně

přesné výsledky, nejsou vždy v dokonalém souladu s testy na lidech. Je zřejmé, že myš není sedmdesátakilový člověk (Leist and Hartung, 2013; Seok et al., 2013) ani tříkilový novorozenec. Přesto tyto modely stále poskytují řadu důležitých informací. Zvířecí modely byly použity i pro testování bezpečnosti některých OMM, konkrétně k objasnění jejich funkce ve střevě novorozence spolu s lakto-*N*-tetraosou z MM (Coulet et al., 2014; Coulet et al., 2013).

## 7 Závěr

- V *in vitro* kompetici bylo potvrzeno, že RRBM izolovaný z probiotika Inflanu je vhodným probiotickým kmenem pro kojence a v kombinaci spolu s prebiotickým MM nebo OMM by mohl být potenciálním kojeneckým synbiotikem se schopností inhibovat růst potenciálně patogenních bakterií.

- V *in vitro* vykazoval RRBM dobrou růstovou schopnost ve všech médiích, do kterých byl inokulován. Nejvýraznější snížení počtu potenciálně patogenních bakterií (gram-negativní bakterie a *E. coli*) bylo zjištěno u média s MM a RRBM. Laktobacily nedosáhly detekčního limitu (3 log KTJ/ml).

- V *in vivo* kompetici u myšího modelu nebyl potvrzen synbiotický účinek, ale přesto bylo detekováno výrazné snížení počtu *Clostridium* spp. u obou pokusných skupin (OMM + RRBM, MM + RRBM) a zároveň i snížení počtu gram-negativních bakterií u první pokusné skupiny (OMM + RRBM).

- Existuje málo *in vivo* studií a zároveň některé zvířecí modely nejsou zcela vhodné pro testování s OMM. Ve zvířecím modelu nelze zcela přesně nasimulovat vlastnosti a funkce lidského organismu. Přesto jsou tyto modely nenahraditelné pro testování bezpečnosti funkčních potravin – prebiotik, probiotik a synbiotik. Testování OMM a probiotických bakterií *in vivo* by mělo být předmětem dalšího zkoumání.

- Probiotický RRBM vykazoval imunostimulační účinky na imunitní systém hostitele, které byly ještě zesíleny podáním prebiotických OMM ve srovnání s MM. Byla vyvolána specifická imunitní odpověď – tvorba protilátek – o čemž svědčí zvýšená hladina IL-6 ve skupinách, jímž byl podáván RRBM.

## 8 Seznam literatury

- Aloisio, I., Santini, C., Biavati, B., Dinelli, G., Cencic, A., Chingwaru, W., Mogna, L. and Di Gioia, D.** (2012). Characterization of *Bifidobacterium* spp. strains for the treatment of enteric disorders in newborns. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 96 (6). 1561-1576.
- Anthony, J. C., Merriman, T. N. and Heimbach, J. T.** (2006). 90-Day oral (gavage) study in rats with galactooligosaccharides syrup. *Food and chemical toxicology*. 44 (6). 819-826.
- Arboleya, S., Ang, L., Margolles, A., Yiyuan, L., Dongya, Z., Liang, X., Solís, G., Fernández, N., Clara, G. and Gueimonde, M.** (2012a). Deep 16S rRNA metagenomics and quantitative PCR analyses of the premature infant fecal microbiota. *Anaerobe*. 18 (3). 378-380.
- Arboleya, S., Binetti, A., Salazar, N., Fernández, N., Solís, G., Hernández-Barranco, A., Margolles, A., Clara, G. and Gueimonde, M.** (2012b). Establishment and development of intestinal microbiota in preterm neonates. *FEMS Microbiology Ecology*. 79 (3). 763-772.
- Arboleya, S., Sánchez, B., Milani, C., Duranti, S., Solís, G., Fernández, N., Clara, G., Ventura, M., Margolles, A. and Gueimonde, M.** (2015). Intestinal microbiota development in preterm neonates and effect of perinatal antibiotics. *The Journal of Pediatrics*. 166 (3). 538-544.
- Arboleya, S., Watkins, C., Stanton, C. and Ross, R. P.** (2016). Gut Bifidobacteria Populations in Human Health and Aging. *Frontiers in Microbiology*. 7. 1204.
- Arrieta, M.-C., Stiemsma, L. T., Amenyogbe, N., Brown, E. M. and Finlay, B.** (2014). The intestinal microbiome in early life: health and disease. *Frontiers in Immunology*. 5. 427.
- Asemi, Z., Khorrami-Rad, A., Alizadeh, S.-A., Shakeri, H. and Esmailzadeh, A.** (2014). Effects of synbiotic food consumption on metabolic status of diabetic patients: a double-blind randomized cross-over controlled clinical trial. *Clinical Nutrition*. 33 (2). 198-203.
- Aureli, P., Fencia, L., Pasolini, B., Gianfranceschi, M., McCroskey, L. M. and Hatheway, C. L.** (1986). Two cases of type E infant botulism caused by neurotoxicogenic *Clostridium butyricum* in Italy. *Journal of Infectious Diseases*. 154 (2). 207-211.
- Azad, M. B., Konya, T., Maughan, H., Guttman, D. S., Field, C. J., Chari, R. S., Sears, M. R., Becker, A. B., Scott, J. A. and Kozyrskyj, A. L.** (2013). Gut microbiota of healthy Canadian infants: profiles by mode of delivery and infant diet at 4 months. *Canadian Medical Association Journal*. 185 (5). 385-394.
- Barile, D. and Rastall, R. A.** (2013). Human milk and related oligosaccharides as prebiotics. *Current Opinion in Biotechnology*. 24 (2). 214-219.
- Barrett, E., Kerr, C., Murphy, K., O'Sullivan, O., Ryan, C. A., Dempsey, E. M., Murphy, B. P., O'Toole, P. W., Cotter, P. D. and Fitzgerald, G. F.** (2013). The individual-specific and diverse nature of the preterm infant microbiota. *Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition*. 98 (4). 334-340.



- Bartlett, J. M. S.** (2004). Fluorescence *in situ* Hybridization. Molecular Diagnosis of Cancer: Methods and Protocols. Humana Press. Totowa. p. 77-87. ISBN: 978-1-59259-760-4.
- Belorkar, S. A. and Gupta, A.** (2016). Oligosaccharides: a boon from nature's desk. *AMB Express*. 6 (1). 82.
- Bergmann, H., Rodríguez, J. M., Salminen, S. and Szajewska, H.** (2014). Probiotics in human milk and probiotic supplementation in infant nutrition: a workshop report. *British Journal of Nutrition*. 112 (7). 1119-1128.
- Bezirtzoglou, E., Tsiotsias, A. and Welling, G. W.** (2011). Microbiota profile in feces of breast-and formula-fed newborns by using fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Anaerobe*. 17 (6). 478-482.
- Biasucci, G., Rubini, M., Riboni, S., Morelli, L., Bessi, E. and Retetangos, C.** (2010). Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut. *Early Human Development*. 86 Suppl 1. 13-15.
- Biavati, B. and Mattarelli, P.** (2006). The family *Bifidobacteriaceae*. The prokaryotes. Springer. New York. p. 322-382. ISBN: 978-0-387-30743-5.
- Bindels, L. B., Neyrinck, A. M., Claus, S. P., Le Roy, C. I., Grangette, C., Pot, B., Martinez, I., Walter, J., Cani, P. D. and Delzenne, N. M.** (2015). Synbiotic approach restores intestinal homeostasis and prolongs survival in leukaemic mice with cachexia. *The ISME Journal*. 10 (6). 1456-1470.
- Binek, M., Kizerwetter-Swida, M., Cisek, A. A., Rzewuska, M., Chrobak-Chmiel, D. and Gierynska, M.** (2016). Mechanisms of maintenance of intestinal homeostasis by autochthonic microbiota and probiotics. *Medycyna Weterynaryjna – Veterinary Medicine-Science and Practise*. 72 (10). 611-615.
- Bischoff, S. C.** (2011). 'Gut health': a new objective in medicine? *BMC medicine*. 9 (1). 24.
- Blaut, M. and Clavel, T.** (2007). Metabolic diversity of the intestinal microbiota: implications for health and disease. *The Journal of Nutrition*. 137 (3). 751-755.
- Bode, L.** (2009). Human milk oligosaccharides: prebiotics and beyond. *Nutrition Reviews*. 67 Suppl 2. 183-191.
- Bode, L.** (2012). Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama. *Glycobiology*. 22 (9). 1147-1162.
- Bode, L. and Jantscher-Krenn, E.** (2012). Structure-function relationships of human milk oligosaccharides. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*. 3 (3). 383-391.
- Boehm, G., Fanaro, S., Moro, G., Knol, J., Arslanoglu, S., Mosca, F. and Stahl, B.** (2004). Prebiotic oligosaccharides in infant nutrition: effects in intestinal flora. *Agro FOOD Industry Hi Tech*. 15. 14-17.
- Boehm, G. and Moro, G.** (2008). Structural and functional aspects of prebiotics used in infant nutrition. *Journal of Nutrition*. 138 (9). 1818-1828.
- Boehm, G., Stahl, B., Mattila-Sandholm, T. and Saarela, M.** (2003). Oligosaccharides. *Functional Dairy Products*. 203-243.
- Braegger, C., Chmielewska, A., Decsi, T., Kolacek, S., Mihatsch, W., Moreno, L., Piescik, M., Puntis, J., Shamir, R. and Szajewska, H.** (2011). Supplementation of infant formula with probiotics and/or prebiotics: a systematic review and comment by

- the ESPGHAN committee on nutrition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 52 (2). 238-250.
- Brazier, J., Duerden, B., Hall, V., Salmon, J., Hood, J., Brett, M., McLauchlin, J. and George, R.** (2002). Isolation and identification of *Clostridium* spp. from infections associated with the injection of drugs: experiences of a microbiological investigation team. *Journal of Medical Microbiology*. 51 (11). 985-989.
- Bronský, J.** (2010). Probiotika v pediatrické praxi. *Pediatric pro praxi*. 11 (3). 162-164.
- Bronský, J.** (2011). Mateřské mléko jako zdroj bakterií s potencionálně probiotickým účinky. *Pediatric pro praxi*. 12 (2). 94-96.
- Bunesova, V., Vlkova, E., Rada, V., Killer, J. and Musilova, S.** (2014). Bifidobacteria from the gastrointestinal tract of animals: differences and similarities. *Beneficial Microbes*. 5 (4). 377-388.
- Bunesova, V., Vlkova, E., Rada, V., Knazovicka, V., Rockova, S., Geigerova, M. and Bozik, M.** (2012). Growth of infant fecal bacteria on commercial prebiotics. *Folia Microbiologica*. 57 (4). 273-275.
- Butler, J., Lager, K., Splichal, I., Francis, D., Kacskovics, I., Sinkora, M., Wertz, N., Sun, J., Zhao, Y. and Brown, W.** (2009). The piglet as a model for B cell and immune system development. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 128 (1-3). 147-170.
- Bäckhed, F. and Crawford, P. A.** (2010). Coordinated regulation of the metabolome and lipidome at the host-microbial interface. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids*. 1801 (3). 240-245.
- Bäckhed, F., Ley, R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A. and Gordon, J. I.** (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*. 307 (5717). 1915-1920.
- Cato, E., George, W. L. and Finegold, S.** (1986). Genus *Clostridium*. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2. 1141-1200.
- Cebra, J. J.** (1999). Influences of microbiota on intestinal immune system development. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 69 (5). 1046-1051.
- Choi, Y. J., Lee, J., Jang, Y.-S. and Lee, S. Y.** (2014). Metabolic engineering of microorganisms for the production of higher alcohols. *MBio*. 5 (5). e01524-14.
- Clare, D., Catignani, G. and Swaisgood, H.** (2003). Biodefense properties of milk: the role of antimicrobial proteins and peptides. *Current Pharmaceutical Design*. 9 (16). 1239-1255.
- Clavel, T., Lagkouvardos, I., Blaut, M. and Stecher, B.** (2016). The mouse gut microbiome revisited: From complex diversity to model *ecosystems*. *International Journal of Medical Microbiology*. 306 (5). 316-327.
- Coates, M. E.** (1975). Gnotobiotic animals in research: their uses and limitations. *Laboratory Animals*. 9 (4). 275-282.
- Collado, M. C., Cernada, M., Bauerl, C., Vento, M. and Perez-Martinez, G.** (2012). Microbial ecology and host-microbiota interactions during early life stages. *Gut Microbes*. 3 (4). 352-365.
- Collado, M. C., Rautava, S., Aakko, J., Isolauri, E. and Salminen, S.** (2016). Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Scientific Reports*. 6.

- Coppa, G., Pierani, P., Zampini, L., Carloni, I., Carlucci, A. and Gabrielli, O.** (1999). Oligosaccharides in human milk during different phases of lactation. *Acta Paediatrica*. 88 (430). 89-94.
- Coppa, G. V., Bruni, S., Morelli, L., Soldi, S. and Gabrielli, O.** (2004). The First Prebiotics in Humans: Human Milk Oligosaccharides. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 38 (6). 80-83.
- Coppa, G. V., Gabrielli, O., Versalovic, J. and Wilson, M.** (2008). Human milk oligosaccharides as prebiotics. *Therapeutic Microbiology: Probiotics and Related Strategies*. 131-146.
- Coppa, G. V., Zampini, L., Galeazzi, T. and Gabrielli, O.** (2006). Prebiotics in human milk: a review. *Digestive and Liver Disease*. 38 Suppl 2. 291-294.
- Coulet, M., Phothirath, P., Allais, L. and Schilter, B.** (2014). Pre-clinical safety evaluation of the synthetic human milk, nature-identical, oligosaccharide 2'-O-Fucosyllactose (2' FL). *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 68 (1). 59-69.
- Coulet, M., Phothirath, P., Constable, A., Marsden, E. and Schilter, B.** (2013). Pre-clinical safety assessment of the synthetic human milk, nature-identical, oligosaccharide Lacto-*N*-neotetraose (LNnT). *Food and Chemical Toxicology*. 62. 528-537.
- Cruchet, S., Furnes, R., Maruy, A., Hebel, E., Palacios, J., Medina, F., Ramirez, N., Orsi, M., Rondon, L. and Sdepanian, V.** (2015). The use of probiotics in pediatric gastroenterology: A review of the literature and recommendations by latin-american experts. *Pediatric Drugs*. 17 (3). 199-216.
- de la Cochetière, M.-F., Piloquet, H., des Robert, C., Darmaun, D., Galmiche, J.-P. and Rozé, J.-C.** (2004). Early intestinal bacterial colonization and necrotizing enterocolitis in premature infants: the putative role of *Clostridium*. *Pediatric Research*. 56 (3). 366-370.
- de Vrese, M. and Schrezenmeir, J.** (2008). Probiotics, prebiotics, and synbiotics. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 111. 1-66.
- De Vries, W. and Stouthamer, A.** (1967). Pathway of glucose fermentation in relation to the taxonomy of bifidobacteria. *Journal of Bacteriology*. 93 (2). 574-576.
- Declercq, E., Young, R., Cabral, H. and Ecker, J.** (2011). Is a rising cesarean delivery rate inevitable? Trends in industrialized countries, 1987 to 2007. *Birth*. 38 (2). 99-104.
- Di Gioia, D., Aloisio, I., Mazzola, G. and Biavati, B.** (2014). Bifidobacteria: their impact on gut microbiota composition and their applications as probiotics in infants. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 98 (2). 563-577.
- DiBaise, J. K., Frank, D. N. and Mathur, R.** (2012). Impact of the gut microbiota on the development of obesity: current concepts. *The American Journal of Gastroenterology Supplements*. 1. 22-27.
- Dilli, D., Aydin, B., Fettah, N. D., Özyazıcı, E., Beken, S., Zenciroğlu, A., Okumuş, N., Özyurt, B. M., İpek, M. Ş. and Akdağ, A.** (2015). The pro-pre-save study: effects of probiotics and prebiotics alone or combined on necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *The Journal of Pediatrics*. 166 (3). 545-551.
- Dinan, T. G., Stanton, C. and Cryan, J. F.** (2013). Psychobiotics: a novel class of psychotropic. *Biological Psychiatry*. 74 (10). 720-726.

- Dominguez-Bello, M. G., Costello, E. K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N. and Knight, R.** (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107 (26). 11971-11975.
- Dürre, P.** (2005). *Handbook on Clostridia*. CRC Press. p. 920. ISBN: 9780849316180.
- Eppig, J. T., Blake, J. A., Bult, C. J., Kadin, J. A., Richardson, J. E. and Group, M. G. D.** (2015). The Mouse Genome Database (MGD): facilitating mouse as a model for human biology and disease. *Nucleic Acids Research*. 43. 726-736.
- Eslamparast, T., Poustchi, H., Zamani, F., Sharafkhah, M., Malekzadeh, R. and Hekmatdoost, A.** (2014). Synbiotic supplementation in nonalcoholic fatty liver disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *The American journal of clinical nutrition*. 99 (3). 535-542.
- Euler, A. R., Mitchell, D. K., Kline, R. and Pickering, L. K.** (2005). Prebiotic effect of fructo-oligosaccharide supplemented term infant formula at two concentrations compared with unsupplemented formula and human milk. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 40 (2). 157-164.
- Ewaschuk, J. B., Diaz, H., Meddings, L., Diederichs, B., Dmytrash, A., Backer, J., Looijer-van Langen, M. and Madsen, K. L.** (2008). Secreted bioactive factors from *Bifidobacterium infantis* enhance epithelial cell barrier function. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 295 (5). 1025-1034.
- Falk, P. G., Hooper, L. V., Midtvedt, T. and Gordon, J. I.** (1998). Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62 (4). 1157-1170.
- Fallani, M., Amarri, S., Uusijarvi, A., Adam, R., Khanna, S., Aguilera, M., Gil, A., Vieites, J. M., Norin, E. and Young, D.** (2011). Determinants of the human infant intestinal microbiota after the introduction of first complementary foods in infant samples from five European centres. *Microbiology*. 157 (5). 1385-1392.
- Fallani, M., Young, D., Scott, J., Norin, E., Amarri, S., Adam, R., Aguilera, M., Khanna, S., Gil, A. and Edwards, C. A.** (2010). Intestinal microbiota of 6-week-old infants across Europe: geographic influence beyond delivery mode, breast-feeding, and antibiotics. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 51 (1). 77-84.
- Fanaro, S., Chierici, R., Guerrini, P. and Vigi, V.** (2003). Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatrica*. 91 (441). 48-55.
- FAO/WHO** (2001). Report on Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. FAO/WHO Cordoba.
- FAO/WHO** (2002). Report of a Joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada. 30.
- Fernández, L., Langa, S., Martín, V., Maldonado, A., Jiménez, E., Martín, R. and Rodríguez, J. M.** (2013). The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacological Research*. 69 (1). 1-10.
- Ferrario, C., Milani, C., Mancabelli, L., Lugli, G. A., Turrone, F., Duranti, S., Mangifesta, M., Viappiani, A., van Sinderen, D. and Ventura, M.** (2015).

- A genome-based identification approach for members of the genus *Bifidobacterium*. *FEMS Microbiology Ecology*. 91 (3).
- Field, C. J.** (2005). The immunological components of human milk and their effect on immune development in infants. *The Journal of Nutrition*. 135 (1). 1-4.
- Fooks, L. and Gibson, G.** (2002). Probiotics as modulators of the gut flora. *British Journal of Nutrition*. 88. 39-49.
- Fouhy, F., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Stanton, C. and Cotter, P. D.** (2012). Composition of the early intestinal microbiota: knowledge, knowledge gaps and the use of high-throughput sequencing to address these gaps. *Gut Microbes*. 3 (3). 203-220.
- Francescone, R., Hou, V. and Grivennikov, S. I.** (2014). Microbiome, Inflammation and Cancer. *Cancer Journal (Sudbury, Mass)*. 20 (3). 181.
- François, I. E., Lescroart, O., Veraverbeke, W. S., Windey, K., Verbeke, K. and Broekaert, W. F.** (2014). Tolerance and the effect of high doses of wheat bran extract, containing arabinoxylan–oligosaccharides, and oligofructose on faecal output: a double-blind, randomised, placebo-controlled, cross-over trial. *Journal of Nutritional Science*. 3. e49.
- Fujimori, S., Gudis, K., Mitsui, K., Seo, T., Yonezawa, M., Tanaka, S., Tatsuguchi, A. and Sakamoto, C.** (2009). A randomized controlled trial on the efficacy of synbiotic versus probiotic or prebiotic treatment to improve the quality of life in patients with ulcerative colitis. *Nutrition*. 25 (5). 520-525.
- Fuller, R.** (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*. 66 (5). 365-378.
- Gabrielli, O., Zampini, L., Galeazzi, T., Padella, L., Santoro, L., Peila, C., Giuliani, F., Bertino, E., Fabris, C. and Coppa, G. V.** (2011). Preterm milk oligosaccharides during the first month of lactation. *Pediatrics*. 128 (6). 1520-1531.
- Gariyban, L. and Avashia, N.** (2013). Polymerase chain reaction. *Journal of Investigative Dermatology*. 133 (3). 1-4.
- Garrity, G. M., Bell, J. A. and Lilburn, T. G.** (2004). Taxonomic outline of the prokaryotes. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer, New York, Berlin, Heidelberg.
- Gibson, G. R., Probert, H. M., Van Loo, J., Rastall, R. A. and Roberfroid, M. B.** (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*. 17 (2). 259-275.
- Gibson, G. R. and Roberfroid, M. B.** (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*. 125 (6). 1401-1412.
- Gibson, G. R., Scott, K. P., Rastall, R. A., Tuohy, K. M., Hotchkiss, A., Dubert-Ferrandon, A., Gareau, M., Murphy, E. F., Saulnier, D. and Loh, G.** (2010). Dietary prebiotics: current status and new definition. *Food Science and Technology Bulletin – Functional Foods*. 7 (1). 1-19.
- Gnoth, M. J., Kunz, C., Kinne-Saffran, E. and Rudloff, S.** (2000). Human milk oligosaccharides are minimally digested *in vitro*. *The Journal of Nutrition*. 130 (12). 3014-3020.

- Gordon, H. A. and Pesti, L.** (1971). The gnotobiotic animal as a tool in the study of host microbial relationships. *Bacteriological Reviews*. 35 (4). 390-429.
- Grabitske, H. A. and Slavin, J. L.** (2009). Gastrointestinal effects of low-digestible carbohydrates. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 49 (4). 327-360.
- Grover, M. and Kashyap, P. C.** (2014). Germ-free mice as a model to study effect of gut microbiota on host physiology. *Neurogastroenterology & Motility*. 26 (6). 745-748.
- Guaraldi, F. and Salvatori, G.** (2012). Effect of Breast and Formula Feeding on Gut Microbiota Shaping in Newborns. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2. 94.
- Gupta, V. K., Sharma, G. D., Tuohy, M. G. and Gaur, R.** (2016). *The Handbook of Microbial Bioresources*. CABI. UK. p. 720. ISBN: 978-1780645216.
- Hamer, H. M., Jonkers, D., Venema, K., Vanhoutvin, S., Troost, F. and Brummer, R. J.** (2008). Review article: the role of butyrate on colonic function. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 27 (2). 104-119.
- Hansen, C. H. F., Nielsen, D. S., Kverka, M., Zakostelska, Z., Klimesova, K., Hudcovic, T., Tlaskalova-Hogenova, H. and Hansen, A. K.** (2012). Patterns of early gut colonization shape future immune responses of the host. *PLoS ONE*. 7 (3). e34043.
- Heap, J. T., Pennington, O. J., Cartman, S. T., Carter, G. P. and Minton, N. P.** (2007). The Clostron: a universal gene knock-out system for the genus *Clostridium*. *Journal of Microbiological Methods*. 70 (3). 452-464.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J. and Salminen, S.** (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 11 (8). 506-514.
- Hooper, L. V., Littman, D. R. and Macpherson, A. J.** (2012). Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*. 336 (6086). 1268-1273.
- Huys, G., Botteldoorn, N., Delvigne, F., De Vuyst, L., Heyndrickx, M., Pot, B., Dubois, J. J. and Daube, G.** (2013). Microbial characterization of probiotics—advisory report of the Working Group “8651 Probiotics” of the Belgian Superior Health Council (SHC). *Molecular Nutrition & Food Research*. 57 (8). 1479-1504.
- Hörmannsperger, G., Schaubeck, M. and Haller, D.** (2015). Intestinal microbiota in animal models of inflammatory diseases. *ILAR Journal*. 56 (2). 179-191.
- Ishikawa, H., Matsumoto, S., Ohashi, Y., Imaoka, A., Setoyama, H., Umesaki, Y., Tanaka, R. and Otani, T.** (2011). Beneficial effects of probiotic *Bifidobacterium* and galacto-oligosaccharide in patients with ulcerative colitis: a randomized controlled study. *Digestion*. 84 (2). 128-133.
- Jensen, R. G., Hagerty, M. M. and McMahon, K. E.** (1978). Lipids of human milk and infant formulas: a review. *The American journal of clinical nutrition*. 31 (6). 990-1016.
- Jensen, H. and Hancock, R. E.** (2009). Antimicrobial properties of lactoferrin. *Biochimie*. 91 (1). 19-29.
- Johnson, C. L. and Versalovic, J.** (2012). The human microbiome and its potential importance to pediatrics. *Pediatrics*. 129 (5). 950-960.

- Jost, T., Lacroix, C., Braegger, C. P., Rochat, F. and Chassard, C.** (2014). Vertical mother–neonate transfer of maternal gut bacteria via breastfeeding. *Environmental Microbiology*. 16 (9). 2891-2904.
- Karlsson, F., Tremaroli, V., Nielsen, J. and Bäckhed, F.** (2013). Assessing the human gut microbiota in metabolic diseases. *Diabetes*. 62 (10). 3341-3349.
- Kasper, H.** (2001). Development and Modification of the Intestinal Flora. *The Balance – Functional Aspects of Intestinal Flora*. 4-8.
- Kassinen, A., Krogius-Kurikka, L., Mäkivuokko, H., Rinttilä, T., Paulin, L., Corander, J., Malinen, E., Apajalahti, J. and Palva, A.** (2007). The fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients differs significantly from that of healthy subjects. *Gastroenterology*. 133 (1). 24-33.
- Kelly, Y. and Watt, R.** (2005). Breast-feeding initiation and exclusive duration at 6 months by social class—results from the Millennium Cohort Study. *Public Health Nutrition*. 8 (4). 417-421.
- Klaassens, E. S., Boesten, R. J., Haarman, M., Knol, J., Schuren, F. H., Vaughan, E. E. and de Vos, W. M.** (2009). Mixed-species genomic microarray analysis of fecal samples reveals differential transcriptional responses of bifidobacteria in breast- and formula-fed infants. *Applied and Environmental Microbiology*. 75 (9). 2668-2676.
- Kleessen, E. B., Jaana Mättö, Brigitta** (2000). Culture-based knowledge on biodiversity, development and stability of human gastrointestinal microflora. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 12 (2). 53-63.
- Kobata, A.** (2010). Structures and application of oligosaccharides in human milk. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*. 86 (7). 731-747.
- Koenig, J. E., Spor, A., Scalfone, N., Fricker, A. D., Stombaugh, J., Knight, R., Angenent, L. T. and Ley, R. E.** (2011). Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 108 Suppl 1. 4578-4585.
- Kole, A. and Maloy, K. J.** (2014). Control of intestinal inflammation by interleukin-10. *Interleukin-10 in Health and Disease*. 380. 19-38.
- Kramer, M. S. and Kakuma, R.** (2012). Optimal duration of exclusive breastfeeding. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Issue 8.
- Krumbeck, J. A., Maldonado-Gomez, M. X., Martínez, I., Frese, S. A., Burkey, T. E., Rasineni, K., Ramer-Tait, A. E., Harris, E. N., Hutkins, R. W. and Walter, J.** (2015). *In vivo* selection to identify bacterial strains with enhanced ecological performance in synbiotic applications. *Applied and Environmental Microbiology*. 81 (7). 2455-2465.
- Kubelkova, K., Benuchova, M., Kozakova, H., Sinkora, M., Krocova, Z., Pejchal, J. and Macela, A.** (2016). Gnotobiotic mouse model's contribution to understanding host–pathogen interactions. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 73 (20). 3961-3969.
- Kumar, H., Salminen, S., Verhagen, H., Rowland, I., Heimbach, J., Bañares, S., Young, T., Nomoto, K. and Lalonde, M.** (2015). Novel probiotics and prebiotics: road to the market. *Current Opinion in Biotechnology*. 32. 99-103.

- Kunz, C., Rudloff, S., Baier, W., Klein, N. and Strobel, S.** (2000). Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects. *Annual Review of Nutrition*. 20. 699-722.
- Lamendella, R., Santo Domingo, J. W., Kelty, C. and Oerther, D. B.** (2008). Bifidobacteria in feces and environmental waters. *Applied and Environmental Microbiology*. 74 (3). 575-584.
- Lawrence, R. M. and Pane, C. A.** (2007). Human breast milk: current concepts of immunology and infectious diseases. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*. 37 (1). 7-36.
- Le Huërou-Luron, I., Blat, S. and Boudry, G.** (2010). Breast-v. formula-feeding: impacts on the digestive tract and immediate and long-term health effects. *Nutrition Research Reviews*. 23 (1). 23-36.
- Lee, S. Y., Park, J. H., Jang, S. H., Nielsen, L. K., Kim, J. and Jung, K. S.** (2008). Fermentative butanol production by Clostridia. *Biotechnology and Bioengineering*. 101 (2). 209-228.
- Leist, M. and Hartung, T.** (2013). Inflammatory findings on species extrapolations: humans are definitely no 70-kg mice. *Archives of Toxicology*. 87 (4). 563-567.
- Ley, R. E., Peterson, D. A. and Gordon, J. I.** (2006). Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*. 124 (4). 837-848.
- Ling, Z., Liu, X., Cheng, Y., Luo, Y., Yuan, L., Li, L. and Xiang, C.** (2015). *Clostridium butyricum* combined with *Bifidobacterium infantis* probiotic mixture restores fecal microbiota and attenuates systemic inflammation in mice with antibiotic-associated diarrhea. *BioMed Research International*.
- LoCascio, R. G., Ninonuevo, M. R., Freeman, S. L., Sela, D. A., Grimm, R., Lebrilla, C. B., Mills, D. A. and German, J. B.** (2007). Glycoprofiling of bifidobacterial consumption of human milk oligosaccharides demonstrates strain specific, preferential consumption of small chain glycans secreted in early human lactation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55 (22). 8914-8919.
- Lonnerdal, B.** (2003). Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 77 (6). 1537-1543.
- Louis, P., Hold, G. L. and Flint, H. J.** (2014). The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nature Reviews Microbiology*. 12 (10). 661-672.
- Lozupone, C. A., Stombaugh, J., Gonzalez, A., Ackermann, G., Wendel, D., Vázquez-Baeza, Y., Jansson, J. K., Gordon, J. I. and Knight, R.** (2013). Meta-analyses of studies of the human microbiota. *Genome Research*. 23 (10). 1704-1714.
- Lönnerdal, B.** (2012). Preclinical assessment of infant formula. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 60 (3). 196-199.
- Macfarlane, G. T., Steed, H. and Macfarlane, S.** (2008). Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *Journal of Applied Microbiology*. 104 (2). 305-344.
- Macpherson, A. and McCoy, K.** (2015). Standardised animal models of host microbial mutualism. *Mucosal Immunology*. 8 (3). 476-486.
- Makino, H., Kushiro, A., Ishikawa, E., Kubota, H., Gawad, A., Sakai, T., Oishi, K., Martin, R., Ben-Amor, K. and Knol, J.** (2013). Mother-to-infant transmission of



- intestinal bifidobacterial strains has an impact on the early development of vaginally delivered infant's microbiota. *PloS ONE*. 8 (11). e78331.
- Martin, C. R., Ling, P.-R. and Blackburn, G. L.** (2016). Review of Infant Feeding: Key Features of Breast Milk and Infant Formula. *Nutrients*. 8 (5). 279.
- Martin, F.-P. J., Sprenger, N., Yap, I. K., Wang, Y., Bibiloni, R., Rochat, F., Rezzi, S., Cherbut, C., Kochhar, S. and Lindon, J. C.** (2009). Panorganismal gut microbiome–host metabolic crosstalk. *Journal of Proteome Research*. 8 (4). 2090-2105.
- Matamoros, S., Gras-Leguen, C., Le Vacon, F., Potel, G. and de La Cochetiere, M.-F.** (2013). Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health. *Trends in Microbiology*. 21 (4). 167-173.
- Matsuki, T., Watanabe, K., Tanaka, R., Fukuda, M. and Oyaizu, H.** (1999). Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers. *Applied and Environmental Microbiology*. 65 (10). 4506-4512.
- Mattarelli, P., Holzapfel, W., Franz, C. M., Endo, A., Felis, G. E., Hammes, W., Pot, B., Dicks, L. and Dellaglio, F.** (2014). Recommended minimal standards for description of new taxa of the genera *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* and related genera. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 64 (4). 1434-1451.
- Maynard, C. L., Elson, C. O., Hatton, R. D. and Weaver, C. T.** (2012). Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature*. 489 (7415). 231-241.
- Mazzola, G., Aloisio, I., Biavati, B. and Di Gioia, D.** (2015). Development of a synbiotic product for newborns and infants. *LWT-Food Science and Technology*. 64 (2). 727-734.
- McCoy, E., Fred, E., Peterson, W. and Hastings, E.** (1926). A cultural study of the acetone butyl alcohol organism. *The Journal of Infectious Diseases*. 39 (6). 457-483.
- McCoy, E., Fred, E., Peterson, W. and Hastings, E.** (1930). A cultural study of certain anaerobic butyric-acid-forming bacteria. *The Journal of Infectious Diseases*. 46 (2). 118-137.
- McFarland, L. V.** (2006). Meta-analysis of probiotics for the prevention of antibiotic associated diarrhea and the treatment of *Clostridium difficile* disease. *The American Journal of Gastroenterology*. 101 (4). 812-822.
- McVea, K. L., Turner, P. D. and Pepler, D. K.** (2000). The role of breastfeeding in sudden infant death syndrome. *Journal of Human Lactation*. 16 (1). 13-20.
- Mestas, J. and Hughes, C. C.** (2004). Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *The Journal of Immunology*. 172 (5). 2731-2738.
- Metchnikoff, I. I.** (1907). Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction. *The Prolongation of Life: Optimistic Studies*. 161-183.
- Mielcarek, C., Romond, P., Romond, M. and Bezirtzoglou, E.** (2011). Modulation of bacterial translocation in mice mediated through lactose and human milk oligosaccharides. *Anaerobe*. 17 (6). 361-366.

- Miesnik, S. R. and Reale, B. J.** (2007). A review of issues surrounding medically elective cesarean delivery. *Journal of Obstetric, Gynecologic, & Neonatal Nursing*. 36 (6). 605-615.
- Milani, C., Turrone, F., Duranti, S., Lugli, G. A., Mancabelli, L., Ferrario, C., van Sinderen, D. and Ventura, M.** (2016). Genomics of the genus *Bifidobacterium* reveals species-specific adaptation to the glycan-rich gut environment. *Applied and Environmental Microbiology*. 82 (4). 980-991.
- Mitsuoka, T.** (1982). Recent trends in research on intestinal flora. *Bifidobacteria and Microflora*. 1 (1). 3-24.
- Monteagudo-Mera, A., Arthur, J., Jobin, C., Keku, T., Bruno-Barcena, J. and Azcarate-Peril, M.** (2016). High purity galacto-oligosaccharides enhance specific *Bifidobacterium* species and their metabolic activity in the mouse gut microbiome. *Beneficial Microbes*. 7 (2). 247-264.
- Morrow, A. L. and Rangel, J. M.** (2004). Human milk protection against infectious diarrhea: implications for prevention and clinical care. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*. 15 (4). 221-228.
- Mugambi, M. N., Young, T. and Blaauw, R.** (2014). Application of evidence on probiotics, prebiotics and synbiotics by food industry: a descriptive study. *BMC Research Notes*. 7 (1). 754.
- Musilova, S., Rada, V., Vlkova, E., Bunesova, V. and Nevorál, J.** (2015). Colonisation of the gut by bifidobacteria is much more common in vaginal deliveries than Caesarean sections. *Acta Paediatrica*. 104 (4). 184-186.
- Nakamura, N., Gaskins, H. R., Collier, C. T., Nava, G. M., Rai, D., Petschow, B., Russell, W. M., Harris, C., Mackie, R. I. and Wampler, J. L.** (2009). Molecular ecological analysis of fecal bacterial populations from term infants fed formula supplemented with selected blends of prebiotics. *Applied and Environmental Microbiology*. 75 (4). 1121-1128.
- Nakayama, T. and Oishi, K.** (2013). Influence of coffee (*Coffea arabica*) and galacto-oligosaccharide consumption on intestinal microbiota and the host responses. *FEMS Microbiology Letters*. 343 (2). 161-168.
- Neu, J. and Rushing, J.** (2011). Cesarean versus vaginal delivery: long-term infant outcomes and the hygiene hypothesis. *Clinics in Perinatology*. 38 (2). 321-331.
- Newburg, D. S.** (2005). Innate immunity and human milk. *The Journal of Nutrition*. 135 (5). 1308-1312.
- Niers, L., Stasse-Wolthuis, M., Rombouts, F. M. and Rijkers, G. T.** (2007). Nutritional support for the infant's immune system. *Nutrition Reviews*. 65. 347-360.
- O'connor, C.** (2008). Fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Nature Education*. 1 (1). 171.
- Obladen, M.** (2009). Necrotizing enterocolitis—150 years of fruitless search for the cause. *Neonatology*. 96 (4). 203-210.
- Odamaki, T., Kato, K., Sugahara, H., Hashikura, N., Takahashi, S., Xiao, J.-z., Abe, F. and Osawa, R.** (2016). Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: a cross-sectional study. *BMC Microbiology*. 16 (1). 90.

- Oliveira, R. P., Casazza, A. A., Aliakbarian, B., Perego, P., Converti, A. and Oliveira, M. N.** (2013). Influence of fructooligosaccharides on the fermentation profile and viable counts in a symbiotic low fat milk. *Brazilian Journal of Microbiology*. 44 (2). 431-434.
- Oozeer, R., van Limpt, K., Ludwig, T., Amor, K. B., Martin, R., Wind, R. D., Boehm, G. and Knol, J.** (2013). Intestinal microbiology in early life: specific prebiotics can have similar functionalities as human-milk oligosaccharides. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 98 (2). 561-571.
- Pacheco, A. R., Barile, D., Underwood, M. A. and Mills, D. A.** (2015). The impact of the milk glycobiome on the neonate gut microbiota. *Annual Review of Animal Biosciences*. 3. 419-445.
- Palmer, C., Bik, E. M., DiGiulio, D. B., Relman, D. A. and Brown, P. O.** (2007). Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biology*. 5 (7). e177.
- Pan, X.-d., Chen, F.-q., Wu, T.-x., Tang, H.-g. and Zhao, Z.-y.** (2009). Prebiotic oligosaccharides change the concentrations of short-chain fatty acids and the microbial population of mouse bowel. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*. 10 (4). 258-263.
- Paramasivam, K., Michie, C., Opara, E. and Jewell, A. P.** (2006). Human breast milk immunology: a review. *International Journal of Fertility and Womens' Medicine*. 51 (5). 208-217.
- Parracho, H., McCartney, A. L. and Gibson, G. R.** (2007). Probiotics and prebiotics in infant nutrition. *Proceedings of the Nutrition Society*. 66 (3). 405-411.
- Parsonnet, J., Friedman, G. D., Vandersteen, D. P., Chang, Y., Vogelman, J. H., Orentreich, N. and Sibley, R. K.** (1991). *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *New England Journal of Medicine*. 325 (16). 1127-1131.
- Pasman, W., Wils, D., Saniez, M. and Kardinaal, A.** (2006). Long-term gastrointestinal tolerance of NUTRIOSE® FB in healthy men. *European Journal of Clinical Nutrition*. 60 (8). 1024-1034.
- Patel, R. and DuPont, H. L.** (2015). New approaches for bacteriotherapy: prebiotics, new-generation probiotics, and synbiotics. *Clinical Infectious Diseases*. 60 Suppl 2. 108-121.
- Patáková, P., Lipovský, J. and Fribert, P.** (2009). Fermentační produkce butanolu – současné reálné možnosti a výhled do budoucnosti. *Sborník referátů Odpadové fórum 2009*. 1377.
- Peila, C., Moro, G. E., Bertino, E., Cavallarín, L., Giribaldi, M., Giuliani, F., Cresi, F. and Coscia, A.** (2016). The effect of holder pasteurization on nutrients and biologically-active components in donor human milk: a review. *Nutrients*. 8 (8). 477.
- Penders, J., Stobberingh, E. E., van den Brandt, P. A. and Thijs, C.** (2007). The role of the intestinal microbiota in the development of atopic disorders. *Allergy*. 62 (11). 1223-1236.
- Penders, J., Thijs, C., Vink, C., Stelma, F. F., Snijders, B., Kummeling, I., van den Brandt, P. A. and Stobberingh, E. E.** (2006). Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics*. 118 (2). 511-521.

- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F. and Yamada, T.** (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 464 (7285). 59-65.
- Rada, V., Nevoral, J., Trojanova, I., Tomankova, E., Smehilova, M. and Killer, J.** (2008). Growth of infant faecal bifidobacteria and clostridia on prebiotic oligosaccharides in *in vitro* conditions. *Anaerobe*. 14 (4). 205-208.
- Rada, V. and Petr, J.** (2000). A new selective medium for the isolation of glucose non-fermenting bifidobacteria from hen caeca. *Journal of Microbiological Methods*. 43 (2). 127-132.
- Rampelli, S., Candela, M., Turrioni, S., Biagi, E., Pflueger, M., Wolters, M., Ahrens, W. and Brigidi, P.** (2016). Microbiota and lifestyle interactions through the lifespan. *Trends in Food Science & Technology*. 57. 265-272.
- Roberfroid, M.** (2007). Prebiotics: the concept revisited. *The Journal of Nutrition*. 137 (3 Suppl 2). 830-837.
- Rockova, S., Rada, V., Marsik, P., Vlkova, E., Bunesova, V., Sklenar, J. and Splichal, I.** (2011). Growth of bifidobacteria and clostridia on human and cow milk saccharides. *Anaerobe*. 17 (5). 223-225.
- Rockova, S., Rada, V., Nevoral, J., Marsik, P., Vlkova, E. and Bunesova, V.** (2012). Interspecies differences in the growth of bifidobacteria cultured on human milk oligosaccharides. *Folia Microbiologica*. 57 (4). 321-324.
- Roncada, P., Piras, C., Soggiu, A., Turk, R., Urbani, A. and Bonizzi, L.** (2012). Farm animal milk proteomics. *Journal of Proteomics*. 75 (14). 4259-4274.
- Rowland, I. R.** (2009). The role of the gastrointestinal microbiota in colorectal cancer. *Current Pharmaceutical Design*. 15 (13). 1524-1527.
- Russell, S. L., Gold, M. J., Hartmann, M., Willing, B. P., Thorson, L., Wlodarska, M., Gill, N., Blanchet, M. R., Mohn, W. W. and McNagny, K. M.** (2012). Early life antibiotic-driven changes in microbiota enhance susceptibility to allergic asthma. *EMBO Reports*. 13 (5). 440-447.
- Saavedra, J. M.** (2007). Use of probiotics in pediatrics: rationale, mechanisms of action, and practical aspects. *Nutrition in Clinical Practice*. 22 (3). 351-365.
- Sampson, T. R. and Mazmanian, S. K.** (2015). Control of brain development, function, and behavior by the microbiome. *Cell Host & Microbe*. 17 (5). 565-576.
- Sanders, M. E., Akkermans, L. M., Haller, D., Hammerman, C., Heimbach, J., Hormansperger, G., Huys, G., Levy, D. D., Lutgendorff, F., Mack, D., et al.** (2010). Safety assessment of probiotics for human use. *Gut Microbes*. 1 (3). 164-185.
- Saulnier, D. M., Gibson, G. R. and Kolida, S.** (2008). *In vitro* effects of selected synbiotics on the human faecal microbiota composition. *FEMS Microbiology Ecology*. 66 (3). 516-527.
- Schrezenmeir, J. and de Vrese, M.** (2001). Probiotics, prebiotics, and synbiotics – approaching a definition. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 73 (2 Suppl). 361-364.
- Schwabe, R. F. and Jobin, C.** (2013). The microbiome and cancer. *Nature Reviews Cancer*. 13 (11). 800-812.

- Sela, D., Chapman, J., Adeuya, A., Kim, J., Chen, F., Whitehead, T., Lapidus, A., Rokhsar, D., Lebrilla, C. B. and German, J. B.** (2008). The genome sequence of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* reveals adaptations for milk utilization within the infant microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105 (48). 18964-18969.
- Seok, J., Warren, H. S., Cuenca, A. G., Mindrinos, M. N., Baker, H. V., Xu, W., Richards, D. R., McDonald-Smith, G. P., Gao, H. and Hennessy, L.** (2013). Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 110 (9). 3507-3512.
- Slavin, J.** (2013). Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits. *Nutrients*. 5 (4). 1417-1435.
- Smith, K., McCoy, K. D. and Macpherson, A. J.** (2007). Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. *Seminars in Immunology*. 19 (2). 59-69.
- Smith, M. M., Durkin, M., Hinton, V. J., Bellinger, D. and Kuhn, L.** (2003). Influence of breastfeeding on cognitive outcomes at age 6–8 years: follow-up of very low birth weight infants. *American Journal of Epidemiology*. 158 (11). 1075-1082.
- Steed, H., Macfarlane, G. T., Blackett, K. L., Bahrami, B., Reynolds, N., Walsh, S. V., Cummings, J. H. and Macfarlane, S.** (2010). Clinical trial: the microbiological and immunological effects of synbiotic consumption – a randomized double-blind placebo-controlled study in active Crohn’s disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 32 (7). 872-883.
- Stevens, E. E., Patrick, T. E. and Pickler, R.** (2009). A history of infant feeding. *The Journal of Perinatal Education*. 18 (2). 32-39.
- Stiles, B. G., Wigelsworth, D. J., Popoff, M. R. and Barth, H.** (2011). Clostridial binary toxins: iota and C2 family portraits. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 1. 11.
- Stone-Dorshow, T. and Levitt, M.** (1987). Gaseous response to ingestion of a poorly absorbed fructo-oligosaccharide sweetener. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 46 (1). 61-65.
- Szajewska, H. and Mrukowicz, J.** (2005). Meta-analysis: non-pathogenic yeast *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 22 (5). 365-372.
- Sýkora, M. J.** (2011). Prebiotika a kojenecká výživa. *Pediatric pro praxi*. 12 (3). 180-185.
- Tamboli, C., Neut, C., Desreumaux, P. and Colombel, J.** (2004). Dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut*. 53 (1). 1-4.
- Tang, M. L., Lahtinen, S. J. and Boyle, R. J.** (2010). Probiotics and prebiotics: clinical effects in allergic disease. *Current Opinion in Pediatrics*. 22 (5). 626-634.
- Tilg, H. and Kaser, A.** (2011). Gut microbiome, obesity, and metabolic dysfunction. *The Journal of Clinical Investigation*. 121 (6). 2126-2132.
- Tlaskalová-Hogenová, H., Štěpánková, R., Kozáková, H., Hudcovic, T., Vannucci, L., Tučková, L., Rossmann, P., Hrnčíř, T., Kverka, M. and Zákostelská, Z.** (2011). The role of gut microbiota (commensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases and cancer: contribution of

- germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases. *Cellular & Molecular Immunology*. 8 (2). 110-120.
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R. and Gordon, J. I.** (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. 444 (7122). 1027-1131.
- Turroni, F., Peano, C., Pass, D. A., Foroni, E., Severgnini, M., Claesson, M. J., Kerr, C., Hourihane, J., Murray, D. and Fuligni, F.** (2012). Diversity of bifidobacteria within the infant gut microbiota. *PloS ONE*. 7 (5). e36957.
- Umesaki, Y.** (2014). Use of gnotobiotic mice to identify and characterize key microbes responsible for the development of the intestinal immune system. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*. 90 (9). 313-332.
- Vaishampayan, P. A., Kuehl, J. V., Froula, J. L., Morgan, J. L., Ochman, H. and Francino, M. P.** (2010). Comparative metagenomics and population dynamics of the gut microbiota in mother and infant. *Genome Biology and Evolution*. 2. 53-66.
- Van Mellaert, L., Barbé, S. and Anné, J.** (2006). *Clostridium* spores as anti-tumour agents. *TRENDS in Microbiology*. 14 (4). 190-196.
- Vandenplas, Y., Huys, G. and Daube, G.** (2015). Probiotics: an update. *Jornal de Pediatria (Versão em Português)*. 91 (1). 6-21.
- Venema, K.** (2012). Intestinal fermentation of lactose and prebiotic lactose derivatives, including human milk oligosaccharides. *International Dairy Journal*. 22 (2). 123-140.
- Ventura, M., Turroni, F., Lugli, G. A. and van Sinderen, D.** (2014). Bifidobacteria and humans: our special friends, from ecological to genomics perspectives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 94 (2). 163-168.
- Vlkova, E., Medkova, J. and Rada, V.** (2002). Comparison of four methods for identification of Bifidobacteria to the genus level. *Czech Journal of Food Sciences*. 20 (5). 171-174.
- Vlková, E., Grmanová, M., Killer, J., Mrázek, J., Kopečný, J., Bunešová, V. and Rada, V.** (2010). Survival of bifidobacteria administered to calves. *Folia Microbiologica*. 55 (4). 390-392.
- Waitzberg, D. L., Logullo, L. C., Bittencourt, A. F., Torrinhas, R. S., Shiroma, G. M., Paulino, N. P. and Teixeira-da-Silva, M. L.** (2013). Effect of synbiotic in constipated adult women – a randomized, double-blind, placebo-controlled study of clinical response. *Clinical Nutrition*. 32 (1). 27-33.
- Walker, A.** (2010). Breast milk as the gold standard for protective nutrients. *The Journal of Pediatrics*. 156 (2 Suppl). 3-7.
- Wang, M., Li, M., Wu, S., Lebrilla, C. B., Chapkin, R. S., Ivanov, I. and Donovan, S. M.** (2015). Fecal microbiota composition of breast-fed infants is correlated with human milk oligosaccharides consumed. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 60 (6). 825-833.
- Wang, X. and Gibson, G.** (1993). Effects of the *in vitro* fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. *Journal of Applied Bacteriology*. 75 (4). 373-380.

- Watson, D., O'Connell Motherway, M., Schoterman, M., Neerven, R., Nauta, A. and Sinderen, D.** (2013). Selective carbohydrate utilization by lactobacilli and bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 114 (4). 1132-1146.
- Wen, L., Ley, R. E., Volchkov, P. Y., Stranges, P. B., Avanesyan, L., Stonebraker, A. C., Hu, C., Wong, F. S., Szot, G. L. and Bluestone, J. A.** (2008). Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature*. 455 (7216). 1109-1113.
- WHO** (2001). Global strategy for infant and young child feeding: the optimal duration of exclusive breastfeeding. World Health Organization, Geneva (Switzerland).
- Wiesner, J. and Vilcinskis, A.** (2010). Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. *Virulence*. 1 (5). 440-464.
- Wlodarska, M., Kostic, A. D. and Xavier, R. J.** (2015). An integrative view of microbiome-host interactions in inflammatory bowel diseases. *Cell Host & Microbe*. 17 (5). 577-591.
- Yang, J., Martínez, I., Walter, J., Keshavarzian, A. and Rose, D. J.** (2013). *In vitro* characterization of the impact of selected dietary fibers on fecal microbiota composition and short chain fatty acid production. *Anaerobe*. 23. 74-81.
- Yatsunenkov, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R. N. and Anokhin, A. P.** (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*. 486 (7402). 222-227.
- Young, V. B.** (2012). The intestinal microbiota in health and disease. *Current Opinion in Gastroenterology*. 28 (1). 63-69.
- Zivkovic, A. M., German, J. B., Lebrilla, C. B. and Mills, D. A.** (2011). Human milk glycobiome and its impact on the infant gastrointestinal microbiota. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America*. 108 Suppl 1. 4653-4658.

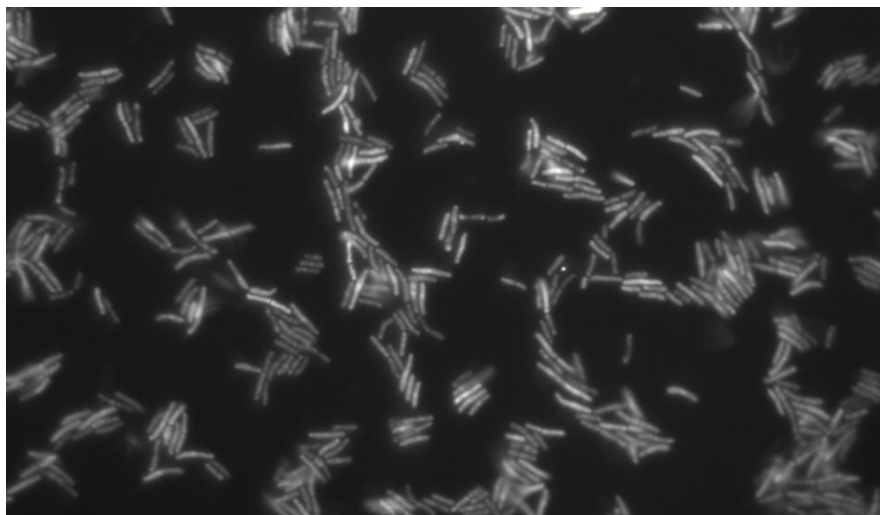
## 9 Přílohy

Příloha 1: Selektivní média pro růst mikroorganismů

Mikroorganismy	Složení média na 100 ml dH <sub>2</sub> O	Podmínky kultivace
<b>CP anaerobních mikroorganismů</b>	4,3 g W agar, 0,5 g SP, 0,05 g Cys, 0,1 ml Tween (Sigma, US)	AN, 37 °C/24 hodin
<b>Gram-negativní bakterie</b>	4,3 g W agar, 0,5 g SP, 0,05 g Cys, 5 ml koňská krev, 2 ml suplement pro gram-negativní bakterie	AN, 37 °C/24 hodin
<i>Bifidobacterium</i> - MUP	4,3 g W agar, 0,5 g SP, 0,05 g Cys, 0,1 ml Tween (Sigma, US), 100 µl octová k., MUP (100 mg/l)	AN, 37 °C/24 hodin
<i>Bifidobacterium</i> - NORF	4,3 g W agar, 0,5 g SP, 0,05 g Cys, 0,1 ml Tween (Sigma, US), 10 ml NORF, MUP (100 mg/l)	AN, 37 °C/24 hodin
<b>RRBM - RIF</b>	4,3 g W agar, 0,5 g SP, 0,05 g Cys, 0,1 ml Tween, 100 µl octová kyselina, MUP (100 mg/l), 1 ml RIF (100 mg/l)	AN, 37 °C/24 hodin
<i>Lactobacillus</i>	6 g Rogosa agar, 132 µl octová kyselina	MAE, 37 °C/24 hodin
<i>Enterococcus</i>	4,2 g Slanetz & Bartley medium	AE, 37 °C/48 hodin
<i>Escherichia coli</i>	3,66 g TBX agar	AE, 37 °C/24 hodin

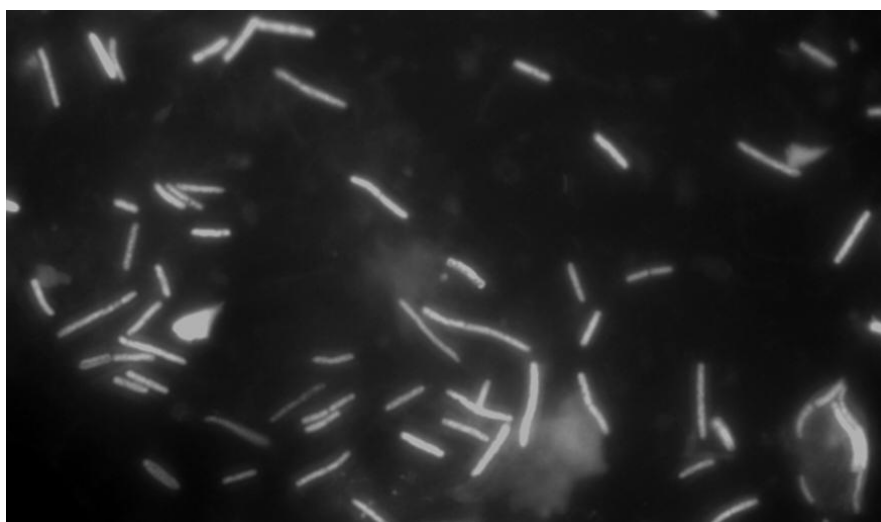
*Pozn.:* CP – celkové počty, RRBM – rifampicin-rezistentní mutant, W agar – Wilkins-Chalgren Anaerobe Agar, SP – Sójový pepton, Cys – cystein, MUP – mupirocin, NORF – norfloxacin, RIF – rifampicin, AE – aerobně, AN – anaerobně, MAE – mikroaerofilně. Výrobce jednotlivých složek médií je OXOID (UK), pokud není uvedeno jinak.

Příloha 2: Vizualizace FISH – *Bifidobacterium*





Příloha 3: Vizualizace FISH – *Clostridium*



Příloha 4: Koncentrace těkavých mastných kyselin a laktátu (mmol/l) po *in vitro* kompetici

Médium	Těkavé mastné kyseliny			
	Laktát	Acetát	Propionát	Butyrát
<b>OMM</b>	4,31	44,96	9,88	2,68
<b>OMM + RRBM</b>	7,96	48,17	10,40	3,29
<b>MM</b>	22,34	27,37	5,03	0,93
<b>MM+ RRBM</b>	45,78	45,66	3,60	0,26
<b>Kontrola</b>	5,85	44,76	14,17	5,75
<b>Kontrola + RRBM</b>	8,12	43,53	11,09	6,26

*Pozn.:* OMM – oligosacharidy mateřského mléka, RRBM – rifampicin-rezistentní mutant, MM – mateřské mléko.

Příloha 5: Koncentrace těkavých mastných kyselin a laktátu (mmol/kg) po *in vivo* kompetici

Skupiny myši	Těkavé mastné kyseliny			
	Laktát	Acetát	Propionát	Butyrát
<b>První pokusná skupina (OMM + RRBM)</b>	80,67	98,40	19,45	4,07
<b>Druhá pokusná skupina (MM + RRBM)</b>	88,72	141,92	30,25	3,68
<b>Kontrolní skupina</b>	85,84	111,69	28,05	7,80

*Pozn.:* OMM – oligosacharidy mateřského mléka, RRBM – rifampicin-rezistentní mutant, MM – mateřské mléko.

Příloha 6: Na základě výzkumu a této práce byl přijat článek do vědeckého časopisu *Beneficial Microbes* s názvem „*Assessment of the synbiotic properties of human milk oligosaccharides and B. longum subsp. infantis in vitro and in humanised mice*“ (zobrazen proof ke článku – 2017)

## Assessment of the synbiotic properties of human milk oligosaccharides and *B. longum* subsp. *infantis* *in vitro* and in humanised mice

S. Musilova<sup>1\*</sup>, N. Modrackova<sup>1</sup>, P. Hermanova<sup>2</sup>, T. Hudcovic<sup>2</sup>, R. Svejstil<sup>1</sup>, V. Rada<sup>1</sup>, V. Tejnecky<sup>3</sup> and V. Bunesova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Nutrition and Dietetics, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, Kamycka 129, 165 21 Prague 6, Czech Republic; <sup>2</sup>Laboratory of Gnotobiology, Institute of Microbiology of the Czech Academy of Sciences, v.v.i., 549 22 Novy Hradek, Czech Republic; <sup>3</sup>Department of Soil Science and Soil Protection, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, Kamycka 129, 165 21 Prague 6, Czech Republic; [musilovas@af.czu.cz](mailto:musilovas@af.czu.cz)

Received: 7 August 2016 / Accepted: 21 October 2016

© 2017 Wageningen Academic Publishers

### RESEARCH ARTICLE

#### Abstract

The mode of delivery plays a crucial role in infant gastrointestinal tract colonisation, which in the case of caesarean section is characterised by the presence of clostridia and low bifidobacterial counts. Gut colonisation can be modified by probiotics, prebiotics or synbiotics. Human milk oligosaccharides (HMOs) are infant prebiotics that show a bifidogenic effect. Moreover, genome sequencing of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* within the infant microbiome revealed adaptations for milk utilisation. This study aimed to evaluate the synbiotic effect of *B. longum* subsp. *infantis*, HMOs and human milk (HM) both *in vitro* and *in vivo* (in a humanised mouse model) in the