Mikrobiota majčinog mlijeka

Cavrić, Marija

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:672700

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Biotehnologija

Marija Cavrić

7194/BT

MIKROBIOTA MAJČINOG MLIJEKA

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biotehnologija 4

Mentor: prof. dr. sc. Jagoda Šušković

Zagreb, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Mikrobiota majčinog mlijeka

Marija Cavrić, 0058208135

Sažetak: Majčino mlijeko sadrži nekoliko tisuća bakterijskih vrsta u koncentracijama od približno 1000 CFU mL^{-1}. Procjenjuje se da dojenče koje konzumira oko 800 mL majčinog mlijeka dnevno unese oko 10^5-10^7 komensalnih bakterija, zbog čega postoji sličnost u sastavu mikrobiote majčinog mlijeka s mikrobiotom crijeva djeteta. U ovom radu provedeno je identificiranje mikrobiote majčinog mlijeka sa po 3 uzorka mlijeka svake majke uzetih u različito vrijeme nakon poroda i fecesa dojenčadi sa 3 uzorka uzetih isti dan kao i uzorci mlijeka. Nakon izolacije DNA iz uzoraka majčinog mlijeka i fecesa dojenčadi, uzorci DNA su sekvencionirani te analizirani pomoću QIIME programa za analizu mikrobioma. Nakon utvrđivanja taksonomskih jedinica u uzorcima, određena je i alfa raznolikost. Dobivenim rezultatima utvrđena je korelacija sastava mikrobioma majčinog mlijeka s neonatalnim mikrobiomom dojenčeta. Najprisutnije bakterije u uzorcima fecesa dojenčadi su iz koljena *Actinobacteria*, *Firmicutes* i *Proteobacteria*, dok u uzorcima majčinog mlijeka prevladavaju bakterije iz roda *Firmicutes*.

Ključne riječi: majčino mlijeko, mikrobiota, neonatalna crijevna mikrobiota

Rad sadrži: 32 stranice, 8 slika, 2 tablice, 40 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku (pdf format) pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Jagoda Šušković

Pomoć pri izradi: Martina Banić, mag. ing. biotechn.

Rad predan: srpanj 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Antibiotic, Enzyme, Probiotic and Starter culture Technology

Human milk microbiota

Marija Cavrić, 0058208135

Abstract: Breast milk contains several hundred bacterial species at concentrations of aproximately 1000 CFU mL^{-1}. It is estimated that infants who consume about 800 mL of mother's milk daily, ingest 10^5-10^7 commensal bacteria, which explains a similarity in the composition of human milk microbiota with infants intestinal microbiota. In this Bachelor thesis, the identification of human milk microbiota with 3 samples of milk from each mother sampled at different times after delivery and 3 samples of infants feces taken the same day as milk samples, was performed. After DNA isolation, DNA samples were sequenced and analyzed using QIIME program for microbiome analyses. After determing the taxonomy units in the samples, alpha diversity was also determined. With given results, correlation between breast milk microbiome and neonatal intestinal microbiome was concluded. Infants feces samples are dominated by the phyla *Actinobacteria*, *Firmicutes* and *Proteobacteria*, while breast milk samples are dominated by *Firmicutes*.

Key words: breast milk, microbiota, neonatal intestinal microbiota
Thesis contains: 32 pages, 8 figures, 2 tables, 40 references
Original in: Croatian
Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb
Mentor: PhD Jagoda Šušković, Full professor
Technical support and assistance: Martina Banić, mag. ing. biotechn.
Thesis delivered: July, 2018

SADRŽAJ

1. UVOD 1
2. TEORIJSKI DIO 2
2.1. Bakterijska raznolikost majčinog mlijeka 2
2.1.1. Porijeklo bakterija u majčinom mlijeku 3
2.1.2. Kako promjene u tijelu utječu na povećanu bakterijsku translokaciju 5
2.2. Mikrobota crijeva djeteta 6
2.3. Uloga bakterija iz majčinog mlijeka u crijevima novorođenčadi 7
2.3.1. Blagotvoran utjecaj probiotičkih bakterija 8
2.4. Dobrotvorni faktori u majčinom mlijeku 9
2.4.1. Oligosaharidi majčinog mlijeka (HMO) 9
2.5. Pozitivni ishodi dojenja i uporabe majčinog mlijeka 11
3. MATERIJALI I METODE 12
3.1. MATERIJALI 12
3.1.1. Uzorci majčinog mlijeka i fecesa dojenčadi 12
3.1.2. Kemikalije 13
3.1.3. Aparatura i pribor 13
3.2. METODE RADA 14
3.2.1. Izolacija DNA iz majčinog mlijeka 14
3.2.2. Izolacija DNA iz fecesa dojenčadi 14
3.2.3. Mjerenje koncentracije DNA 14
3.2.4. Sekvencioniranje DNA 14
3.2.5. Određivanje taksonomije i alfa raznolikosti 15
4. REZULTATI I RASPRAVA 16
4.1. Izolacija genomske DNA iz prikupljenih uzoraka majčinog mlijeka i fecesa dojenčadi 16
4.2. Taksonomska analiza rezultata dobivenih sekvncioniranjem 17
4.3. Alfa raznolikost 25
5. ZAKLJUČCI 27
6. LITERATURA 28

1. UVOD

Majčino mlijeko je biološka tekućina složenog kemijskog sastava specifična za pojedinu vrstu, prilagođena da savršeno zadovoljava nutritivne i imunološke potrebe novorođenčeta. Sama mikrobiota dojke je svojstvena jer je prolazne prirode. Njen razvitak započinje tijekom zadnjeg tromjesečja trudnoće, najkompleksnija je na kraju tog perioda, ostaje konstantna tijekom laktacije te naglo pada tijekom perioda odvikavanja, dok nestaje kada više nema mlijeka u mliječnim žlijezdama. Majčino mlijeko pruža zaštitu od različitih zaraznih bolesti s obzirom da je njihova učestalost manja kod dojene djece nego kod djece hranjene dojenačkim formulama. U kolostrumu i zrelom mlijeku nalazi se velik broj bioaktivnih tvari za koje se smatra da su zaslužne za antiinfektivniučinak, kao što su imunoglobulini, stanice imuno sustava, antimikrobne kiseline, poliamini, oligosaharidi, lizozimi, glikoproteini i bioaktivni peptidi.

Majčino mlijeko se tradicionalno smatralo sterilnim, međutim istraživanja su pokazala da ono predstavlja stalan dotok mutualističkih i probiotičkih bakterija za crijeva novorođenčadi. U najvećoj mjeri prevladavaju bakterije iz rodova *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* i *Staphylococcus*. Ove bakterije također mogu igrati važnu ulogu u smanjenju učestalosti i težine zaraznih bolesti kod dojene djece. Glavni izvor bakterija u intestinalnom traktu djeteta je upravo majčino mlijeko s obzirom da dijete konzumira otprilike 800 mL dnevno, što čini između 10^5 i 10^7 bakterija dnevno. To objašnjava sličnost mikrobiote majčinog mlijeka i crijeva djeteta te zašto se razvoj raznovrsnije mikrobiote podudara s periodom odvikavanja od dojenja.

Cilj ovog rada je bio provesti identifikaciju mikrobiote majčinog mlijeka i mikrobiote crijeva djeteta te utvrditi povezanost, ali i promjene u sastavu mikrobiote i zastupljenosti pojedinih taksonomskih jedinica odmičući se od vremena poroda. Za provedbu istraživanja korišteni su uzorci mlijeka majki i fecesa djeteta uzeti u različito vrijeme nakon poroda, unutar sedam dana nakon poroda, mjesec dana nakon poroda i mjesec dana nakon uvođenja krute hrane u prehranu.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Bakterijska raznolikost majčinog mlijeka

Majčino mlijeko sadrži nekoliko stotina bakterijskih vrsta u koncentracijama od približno 1000 CFU mL^{-1} (Le Doare i sur., 2018). Fitzstevens i sur. (2017) proveli su sistematičan pregled znanstvenih radova za definiranje mikrobiote majčinog mlijeka. Uzeto je u obzir dvanaest znanstvenih radova koji su zadovoljavali potrebne uvjete (radovi su pisani na engleskom jeziku, provedeni su na zdravim majkama, korištene su metode neovisne o kulturama, identificirane su bakterije u majčinom mlijeku te su primarni rezultati prikazani na genetičkoj razini). Od dvanaest radova, njih osam je koristilo metodu rRNA PCR, dok su ostala četiri rada koristila metodu NGS (Next Generation Sequencing).

Bakterije iz rodova *Streptococcus* i *Lactobacillus* identificirani su u 11 radova (91,6%), *Staphylococcus* u 10 radova (83,3%) , *Bifidobacterium* u 9 radova (75%), *Enterococcus* u 8 radova (66,7%) i *Propionbacterium* u 6 radova (50%). Od 8 radova koji su koristili metodu rRNA PCR, *Lactobacillus* je identificiran u svih 8 (100%), *Bifidobaterium* i *Streptococcus* u 7 radova (87,5%), *Staphylococcus* u 6 radova (75%) i *Enterococcus* u 4 rada (50%). NGS metoda detektirala je rodove *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* i *Propionibacterium* u četiri rada (100%), *Lactobacillus* u 3 rada (75%) i *Bifidobacterium* u 2 rada (50%). Kao najbrojniji, odnosno dominanti rod pokazali su se *Streptococcus* i *Staphylococcus* u 6 od 12 radova (50%), *Bifidobacterium* u 3 rada (25%), *Lactobacillus* u 2 rada (17%) i *Enterococcus* u nijednom radu (0%).

Rodovi *Streptococcus* i *Staphylococcus* dominantni su u majčinom mlijeku neovisno o geografskoj lokaciji i analitičkim metodama provedenim u istraživanjima. Također, pokazalo se da se određeni rodovi bolje identificiraju koristeći početnice koje se ciljano vežu na 16S varijabilne regije gena (Walker i sur., 2015; Starke i sur., 2014) zbog čega postoji mogućnost da je prisutnost/dominantnost upravo ovih rodova bakterija podcijenjena koristeći PCR metode.

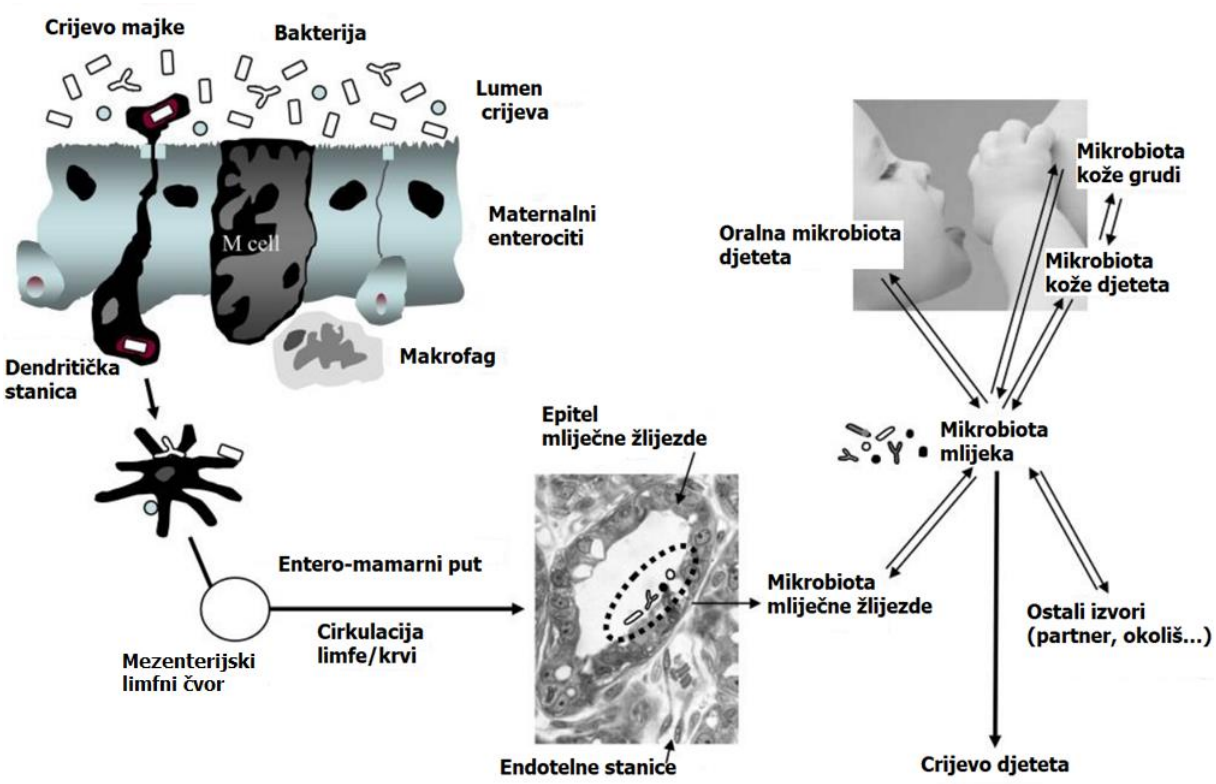
Dokazano je da postoje prenatalni i postnatalni faktori koji utječu na sastav mikrobiote majčinog mlijeka te da se ona mijenja tijekom perioda laktacije. Jedan od faktora je tip porođaja. Kod majki porođenih planiranim carskim rezom smanjena je koncentracija *Leuconostocaceae* te povećana koncentracija *Carnobacteriaceae*, u odnosu na sastav mlijeka majki porođenih vaginalno. Ta razlika bila je vidljiva u prekolostrumu te se zadržala u uzorcima mlijeka mjesec dana i šest mjeseci nakon poroda. Kod majki koje su rodile neplaniranim

carskim rezom vidljiv je sastav mikrobiote sličniji onom majki porođenih vaginalno, nego što je to majkama porođenim planiranim carskim rezom. To dokazuje da psihološke promjene tijekom poroda mogu utjecati na bakterijski sastav mlijeka (Cabrera-Rubio i sur., 2012).

Indeks tjelesne mase, BMI (Body Mass Indeks) majki kao i dobitak kilograma tijekom trudnoće utječe na raznolikost i sastav mikrobiote mlijeka. Mlijeko pretilih majki pokazuje manju raznolikost u odnosu na mlijeko majki adekvatne tjelesne mase. Takva razlika nestaje u uzorcima mlijeka uzetih šest mjeseci nakon poroda (Cabrera-Rubio i sur., 2012). Koncentracija *Bifidobacteriuma* je smanjena kod uranjenih poroda (Khodayar Pardo i sur., 2014). Uporaba antibiotika te tretman kemoterapijom smanjuju bakterijsku raznolikost (Soto i sur., 2014; Urbaniak i sur., 2014).

2.1.1. Porijeklo bakterija u majčinom mlijeku

Porijeklo bakterija u majčinom mlijeku nije u potpunosti razjašnjeno. Tradicionalno se smatralo kako je prisutnost bakterija rezultat kontaminacije mlijeka preko kože majke i/ili oralne šupljine dojenčadi prilikom dojenja. Međutim, detekcijom živih bakterijskih stanica i DNA anaerobnih vrsta povezanih s crijevnom mikroflorom pokrenuo se niz rasprava i istraživanja o porijeklu bakterija u majčinom mlijeku.



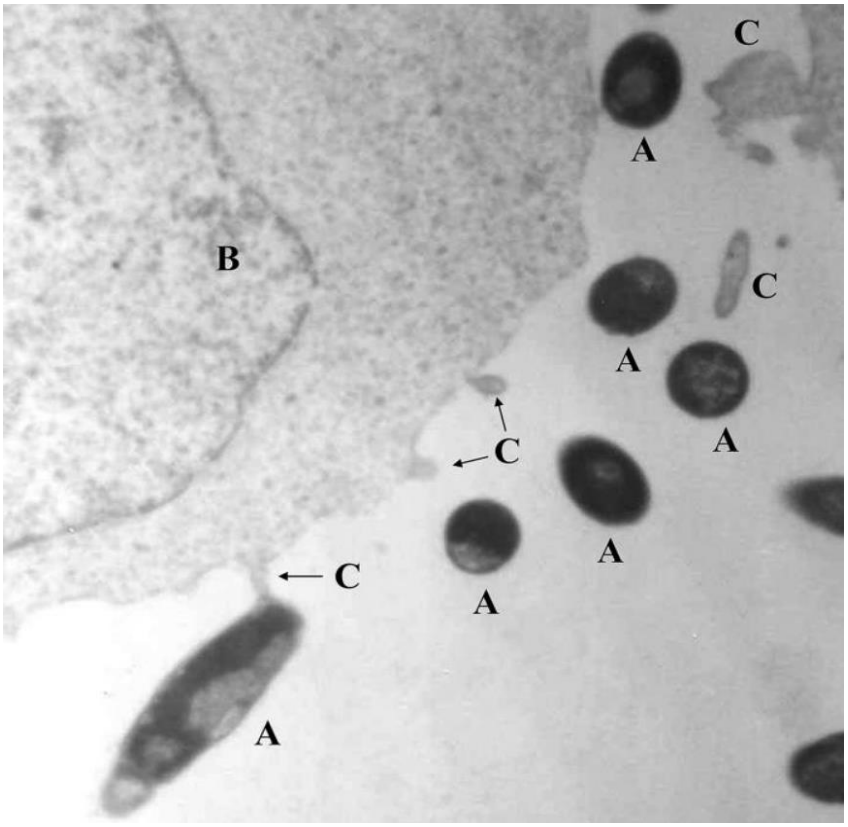
Slika 1. Izvori bakterija prisutnih u majčinom mlijeku, uz prikazani model mogućeg prijenosa bakterijskih vrsta do crijeva dojenčadi (Rodriguez, 2014)

Jedan od mehanizama prikazanih na slici 1 je mogućnost kontaminacije majčinog mlijeka bakterijama iz oralne šupljine dojenčadi prilikom dojenja, međutim on ne objašnjava činjenicu da predkolostrum kojeg neke žene izlučuju prije poroda (dakle i prije doticaja s ustima djeteta) sadrži mikrobiotu karakterističnu za majčino mlijeko (Martin i sur., 2004).

Također, mnoge bakterijske vrste pronađene na koži poput *Staphylococcusa*, *Corynebacterium* i *Propionibacterium*, nalaze se i u majčinom mlijeku. Ali, isto tako se nalaze na svim površinama sluznica te pokazuju najvišu koncentraciju u probavnom i urogenitalnom sustavu. Iste bakterijske vrste pronađene su u pupčanoj vrpci dojenčadi rođenih vaginalno i carskim rezom, amniotskoj i korinamniontskoj tekućini što pokazuje na mogućnost kolonizacije kože fetusa i probavnog trakta u maternici (Rodriguez, 2014).

Iako postoje neke iste fenotipske karakteristike, ipak postoji i bitna razlika između bakterijskih zajednica majčinog mlijeka i kože majke. Primjerice, bakterije mliječne kiseline izolirane iz majčinog mlijeka genetički se razlikuju od onih izoliranih s majčine kože. Isto tako, bakterije iz roda *Bifidobacterium* su striktno anaerobne i ne može ih se naći na koži zbog čega se postavlja pitanje koji još izvori bakterija za majčino mlijeko postoje te kako funkcioniraju (Martin i sur., 2003).

Novija istraživanja predlažu mogućnost prolaska bakterija iz crijevne mikrobiote majke do mliječnih kanala. Ovaj mehanizam uključuje dendritičke stanice koje mogu proći kroz epitel crijeva i vezati nepatogene bakterije direktno iz lumena crijeva nakon čega ih mogu prenositi na druge lokacije uključujući mliječne žlijezde. Ovaj mehanizam javlja se i u CD18+ stanicama, uključujući makrofage (Martin i sur., 2004).



Slika 2. Interakcije između stanica *Lactobacillus gasseri* izoliranih iz majčinog mlijeka (A) i dendritičkih stanica (B), procijenjeno transmisijskom elektronskom mikroskopijom; dendriti dendritičkih stanica (C) (Rodriguez, 2014)

Istraživanje koje je uključivalo *Lactobacillus salivarius* i *Lactobacillus gasseri* izolirane iz majčinog mlijeka, pokazalo je njihovu translokaciju kroz Caco-2 stanice preko mehanizma koji uključuje dendritičke stanice (slika 2) (Rodriguez, 2014).

2.1.2. Kako promjene u tijelu utječu na povećanu bakterijsku translokaciju

Mnoge anatomske i psihološke promjene koje se događaju tijekom trudnoće i laktacije imaju utjecaj na kardiovaskularni, urogenitalni, dišni i probavni sustav, ali isto tako mogu utjecati na povećanu bakterijsku translokaciju tijekom kasne trudnoće i rane laktacije. Maternica se povećava i stvara pritisak na okolne organe, krv i limfne žile, što dovodi do promjena u probavi i probavnom sustavu. U želucu dolazi do usporenog rada te produljenog vremena pražnjenja, povišen je želučani pH te je smanjena sekrecija. Žučni mjehur ima smanjenu mobilnost i dolazi do promjena u žuči. Mijenja se mikrobiota crijeva, usporeno rade i produženo je vrijeme pražnjenja posebno u zadnjem tromjesečju trudnoće, što zajedno s

pritiskom kojeg stvara povećanje maternice dovodi do zatvora i pojave hemeroida. U probavnom sustavu dolazi do određenih promjena koje su blisko povezane s bakterijskom translokacijom, to su oslabljene barijere protiv rasta bakterija, povećana propusnost i usporena peristaltika. Mijenja se oralni pH i mikrobiota, prisutni su edemi i hiperemije te su desni skloni krvarenju, često se javlja gingivitis. Promjene u jednjaku su želučani refluks, žgaravica i ezofagitis. Među kardiovaskularnim promjenama koje bi mogle imati pozitivan utjecaj na bakterijsku translokaciju su vazodilatacija, povećan protok krvi prema maternici, crijevima i dojkama, povećana angiogeneza, povećan pritisak na mezenterične arterije i limfne čvorove te povišena koncentracija leukocita. U dojkama dolazi do hiperplazije i hipertrofije mliječnih žlijezdi/alveola, povećanja broja imuno stanica, povećan je dotok krvi i dolazi do stvaranja prekolostruma. Među dramatičnijim promjena u tijelu tijekom kasne trudnoće i laktacije je povećanje veličine i kompleksnosti majčinih crijeva (Rodriguez, 2014).

2.2. Mikrobota crijeva djeteta

Mikrobiota crijeva sve se više smatra nevidljivim organom ljudskog tijela i važnim faktorom za zdravlje domaćina. Intenzivno se razvija do dobi od dvije do tri godine, nakon čega se stabilizira i sve je sličnija mikrobioti odraslog čovjeka (Maynard i sur, 2012; Yatsunenko i sur., 2012). Dojenje je važan faktor u uspostavi i razvoju mikrobiote, majčino mlijeko smatra se jednim od važnih faktora za uspostavu metaboličkih i imunosnih odgovora vezanih uz zdravlje djeteta (Cabrera-Rubio i sur., 2012). Uspostavljanje stabilne mikrobiote crijeva praćeno je dvjema važnim promjenama u djetinjstvu. Prva se događa ubrzo nakon rođenja, tijekom laktacije i rezultira dominantnošću mikrobite roda *Bifidobacterium*. Druga promjena događa se tijekom perioda odvikavanja i uvođenja krute hrane u prehranu. To rezultira uspostavljanjem kompleksne mikrobiote kao u odraslih osoba gdje dominiraju bakterije iz koljena *Bacteroidites* i *Firmicutes*. Intestinalna mikrobiota u razvoju razlikuje se od pojedinca do pojedinca na što utječu i unutarnji faktori domaćina i vanjski faktori, poput tipa poroda (vaginalni porod ili carski rez), majčino mlijeko ili hranjenje dojenačkim formulama, uporaba antibiotika i vrijeme uvođenja krute hrane u prehranu (Tanako i Nakayama, 2017).

Nakon rođenja, mikrobiota crijeva novorođenčeta dominira rodovima *Enterobacteriaceae* i *Staphylococcus*. Nakon toga dominiraju bakterije mliječne kiseline i *Bifidobacterium*. Bakterije iz roda *Bifidobacterium* prevladavaju sve do uvođenja krute hrane. Nakon perioda odvikavanja, dominiraju rodovi *Bacteroides*, *Prevotella*, *Ruminococcus*, *Clostridium* i *Veillonella*. Mikrobiota prije perioda odvikavanja bogata je bakterijama koje olakšavaju korištenje laktata, dok nakon perioda odvikavanja, kruta hrana potiče rast bakterija

koje sadrže gene koji kodiraju za razgradnju ugljikohidrata, sintezu vitamina i razgradnja ksenobiotika (Tanako i Nakayama, 2017).

Tip poroda jedan je od faktora koji utječe na razvoj mikrobiote u ranom djetinjstvu. Kod djece rođene vaginalnim putem, mikrobiota crijeva slična je vaginalnoj mikrobioti majke gdje prevladavaju rodovi *Lactobacillus*, *Prevotella* i *Sneathia*. Dok je mikrobiota crijeva djece rođene carskim rezom slična mikrobioti kože gdje prevladavaju rodovi *Staphylococcus*, *Corynebacterium* i *Propionibacterium* (Dominguez-Bello i sur., 2010). Neke studije pokazale su da kolonizacija rodovima *Bacterioides* i *Bifidobacterium* kreće mjesec dana nakon rođenja, dok je koncentracija *Clostridium difficile* bila jako visoka nakon mjesec dana (Biasucci i sur., 2008; Penders i sur., 2006). Došlo je i do pada zastupljenosti *Bacterioides* nakon tri do četiri mjeseca kod djece rođene carskim rezom, kao i da mikrobiota djece rođene carskim rezom ima manju raznolikost (Tanaka i Nakayama, 2017).

2.3. Uloga bakterija iz majčinog mlijeka u crijevima novorođenčadi

Bakterije iz majčinog mlijeka pridonose smanjenju učestalosti i težini infekcija kod dojene djece različitim mehanizmima poput kompetitivnog isključivanja, proizvodnje antimikrobnih metabolita ili poboljšanjem crijevne barijere povećanim lučenjem mucina i smanjenom permeabilnošću. Davanjem soja *Lactobacillusa* izoliranog iz ljudskog mlijeka novorođenčadi u periodu od 6 mjeseci dovelo je do 46%-tnog, 27%-tnog i 30%-tnog smanjena pojava infekcija u gastrointestinalnom traktu, gornjem dišnom sustavu i infekcija općenito. Koagulaza negativni stafilokoki i viridans streptokoki mogu biti posebno korisni za smanjenje prihvaćanja neželjenih patogena kojima je dojenčad izložena u bolničkom okruženju. Neki sojevi *Staphylococcus epidermidis* koji inhibiraju *in vivo* kolonizaciju *Staphylococcus aureus* predlažu se kao buduća strategija za iskorijenjenje tog patogena s mukoznih površina. Slično tome, pokazalo se da viridans streptokoki inhibiraju oralnu kolonizaciju meticilin rezistentnog *Staphylococcus aureus* (MRSA) kod novorođenčadi izloženih bolničkom okruženju. Bakterije majčinog mlijeka djeluju i na pravilno sazrijevanje imunološkog sustava budući da su neki sojevi sposobni modulirati prirodne i stečene imuno odgovore kod miševa i ljudi. Njihova funkcija ima određenu razinu fleksibilnosti ovisno o uvjetima koji se nalaze u intestinalnom okolišu. Kao primjer, *Lactobacillus salivarius* CECT 5713 i *Lactobacillus fermentum* CECT 5716 poboljšali su proizvodnju makrofaga Th1, citokina kao što su IL-2 i IL-12 i upalni posrednik TNF-alfa, u odsutstvu upalnog stimulansa. Međutim, oba soja vode smanjenju Th1 citokina kada su stanice inkubirane u prisutnosti lipopolisaharida (Fernandez i sur., 2013). Soj

Lactobacillus gasseri CECT 5714 smanjio je učestalost i ozbiljnost alergijskog odgovora u životinjskom modelu alergije na proteine kravljeg mlijeka. Također, prisutnist viri viridans streptokoki je značajka zdravih crijeva dojenčadi suprotno dojenčadi koja boluje od atopijskog dermatitisa (Kirjavainen i sur., 2001).

Bakterije majčinog mlijeka imaju veliki potencijal za metaboličku ulogu u dojenčadi. Glikobiom nekih laktobacila i bifidobakterija može pomoći u stvaranju zdrave intestinalne mikrobiote dojenčadi. Isti mikroorganizmi mogu doprinijeti dječjoj probavi razgradnjom šećera i proteina, te je tu potrebno naglasiti da je prolazak hrane kroz probavni sustav djeteta kraći nego kod odraslih osoba te da je pH želuca kod dojenčadi viši. U tom kontekstu, sojevi laktobacila iz majčinog mlijeka metabolički su aktivni u crijevima dojenčadi i povećavaju proizvodnju funkcionalnih metabolita poput butirata koji je glavni izvor energije za kolonocite i važan faktor u uspostavljanju funkcionalnosti probavnog sustava. Kao rezultat, oni poboljšavaju crijevne navike s povećanjem fekalne vlage, frekvencije i volumena stolice (Fernandez i sur., 2013).

2.3.1. Blagotvoran utjecaj probiotičkih bakterija

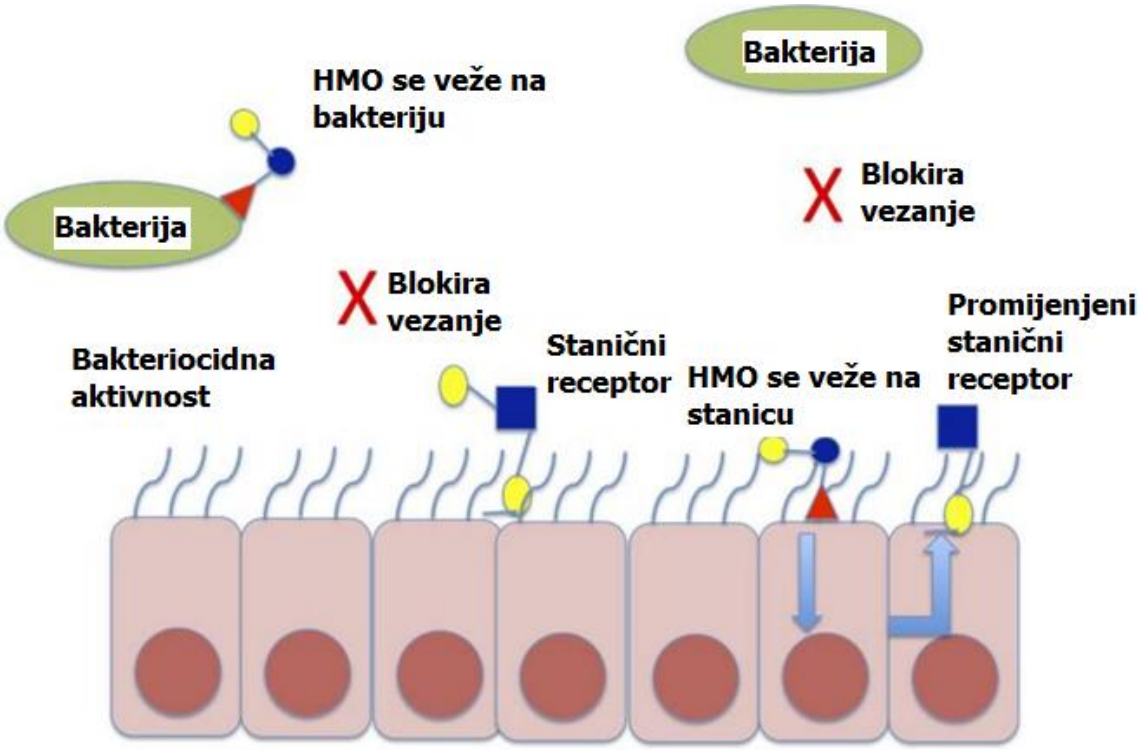
Probiotočke bakterije izolirane iz majčinog mlijeka su važni mikroorganizmi jer zadovoljavaju neke od glavnih kriterija koji se preporučuju za ljudske probiotike, poput humanog porijekla, povijesti sigurnog produljenog unosa od strane osjetljive populacije novorođenčadi i prilagodba sluznici i mliječnim supstratima. Među bakterijama izoliranim iz majčinog mlijeka, vrste poput *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus fermentum* i *Bifidobacterium fermentum* smatraju se onima potencijalno probiotičkim i imaju status Qualified Presumption of Safety, dodijeljen od strane Europske agencije za sigurnost hrane (EFSA). Određeni sojevi imaju protuupalnu, antiinfektivnu, imunomodulatornu i metaboličku ulogu što je već navedeno u poglavlju „Uloga bakterija iz majčinog mlijeka u crijevima novorođenčadi". Hranjenje isključivo dojenjem tijekom prvog mjeseca života povezano je s padom oboljenja od astme i atopijskog dermatitisa. Bakterije mliječne kiseline iz majčinog mlijeka mogu u tome imati zaštitnu ulogu s obzirom na to da probiotički laktobacili mogu biti djelotvorni u prevenciji atopičnih bolesti kroz različite mehanizme. Intestinalne bakterije smatraju se najranijim i najvažnijim stimulansom za razvoj limfatičnog tkiva probavnog sustava i antialergijskih procesa. Stoga se na majčino mlijeko može gledati kao izvor potencijalno probiotičkih ili bioterapeutskih bakterija s ulogom zaštite majke i/ili dojenčadi od različitih alergijskih, infektivnih i upalnih bolesti (Fernandez i sur., 2013).

2.4. Dobrotvorni faktori u majčinom mlijeku

Majčino mlijeko sadrži proteine, masti, ugljikohidrate kao i imunoglobuline i endokanabinoide. U majčinom mlijeku nalaze se brojni čimbenici koji moduliraju i potiču razvoj imunološkog sustava, uključujući imunoglobuline poput IgA i IgB, antimikrobne komponente kao što su lizozim i laktoferin, imuno regulatorne citokine kao što su TGF-β i interleukin 10 (IL-10), te limfociti. Navedene tvari selektiraju bakterije koje nastanjuju gastrointestinalni trakt. Primjerice, imuno regulatorni citokini poput IL-10 i TGF-β iz majčinom mlijeku olakšavaju toleranciju imunološkog sustava domaćina na intestinalne bakterije i potiču proizvodnju IL-10 u dojenčadi. Bakterije iz roda *Bifidobacterium*, čiji rast promoviraju HMO (Human milk oligosaccharides), posebice *Bifidobacterium infantis*, izravno je povezan s protuupalnim efektima i s količinom izlučenog IgA. Masne kiseline iz majčinog mlijeka također su povezane sa zdravljem domaćina i razvojem imunološkog sustava. Zabilježeno je da razina TGF-β u majčinom mlijeku pozitivno korelira s polinezasićenim masnim kiselinama i negativno korelira s zasićenim masnim kiselinama. Neka istraživanja pokazala su da je omjer polinezasićenih masnih kiselina povezan s atopijskim dermatitisom kod dojenčadi. Još se nedovoljno zna o mehanizmu kojim masne kiseline utječu na razvoj imunološkog sustava domaćina i kako je ono povezano s razvojem crijevne mikrobiote u djetinjstvu (Tanako i Nakayama, 2017).

2.4.1. Oligosaharidi majčinog mlijeka (HMO)

U razvoju imunološkog sustava novorođenčeta i zaštiti od patogenih bakterija sudjeluju brojne bioaktivne kompononte među kojima su i oligosaharidi, treća najveća komponenta mlijeka (Fernandez i sur., 2013). Potiču osnivanje zdravog mikrobioma tako da vežu potencijalno loše bakterije u lumenu crijeva i mijenjaju konformaciju veznog mjesta bakterija zbog čega se one ne mogu vezati na crijevne receptore, ili se HMO mogu direktno vezati na stanice crijevnog epitela uzrokujući promijenjenu ekspresiju staničnih receptora, što dovodi do nemogućnosti vezanja patogena (slika 3).



Slika 3. Mehanizam HMO za spriječavanje kolonizacije patogenim bakterijama (Le Doare i sur., 2018)

Novorođenče ne može probaviti HMO, oni funkcioniraju kao prebiotici potičući rast određenih dobrih bakterija poput *Bifidobacterium infantis* u gastrointestinalnom sustavu novorođenčeta i tako spriječavaju infekcije dopuštajući mikrobioti da nadraste potencijalne patogene mikroorganizme. HMO mijenjaju okolinu crijeva tako što reduciraju rast stanica i potiču diferencijaciju i apoptozu. Genetske različitosti odgovorne su za različite HMO profile, stoga majke s različitim genotipom posjeduju različite HMO profile što dovodi do smanjene ili povećane zaštite novorođenčadi od patogena ovisno o prisutnosti određenih HMO. To dovodi i do različitosti u mikrobioti koja kolonizira crijeva kao i vremenu njenoga osnivanja. Smatra se da HMO igraju važnu ulogu u spriječavanju neonatalne dijareje i infekcija respiratornog sustava (Le Doare i sur., 2018). Nekoliko HMO povezano je sa zaštitom novorođenčadi od bakterijskih i virusnih infekcija. Visoke koncentracije 2-fukozillaktaze povezane su sa smanjenim rizikom od infekcije dojenčadi s *Campylobacter jejuni* (Morrow i sur., 2005) i rotavirusom (Laucirica i sur., 2017).

2.5. Pozitivni ishodi dojenja i uporabe majčinog mlijeka

2012. godine je časopis American Academy of Pediatricians objavio rad o brojnim pozitivnim utjecajima dojenja, samim time majčinog mlijeka na razne bolesti i infekcije. Rizik hospitalizacije za upale donjeg dišnog trakta smanjen je za 72% u prvoj godini kod dojenčadi isključivo dojene više od 4 mjeseca. Također, djeca dojena 4 do 6 mjeseci imala su četverostruko povećan rizik dobivanja upale pluća uspoređujući ih s djecom koja su dojena više od 6 mjeseci. Težina oboljenja od bronhitisa smanjena je za 72% kod djece dojene 4 mjeseca u usporedbi s djecom koja su djelomično ili uopće nisu dojena. Dojenje više od 3 mjeseca dovodi do smanjenja rizika od upale srednjeg uha za 50%. Ozbiljne prehlade te infekcija uha i grla reducirane su za 63% kod djece dojene 6 mjeseci. Svako dojenje je povezano s redukcijom infekcija u gastrointestinalnom traktu za 64%, a taj efekt traje i do 2 mjeseca nakon prestanka dojenja. Meta analize 4 klinička ispitivanja provedena u periodu od 1993. do 2005. podržavaju zaključak da dojenjem prijevremeno rođene dojenčadi smanjuje pojavu nekrotizirajućeg enterokolitisa (58%). Dojenje je također povezano sa smanjenjem učestalosti sindroma iznenadne smrti u dojenčadi (36%). Rizik od dobivanja celijakije smanjen je za 52% kod dojenčadi dojene u vrijeme izlaganja glutenu. Dojenje je povezano s redukcijom rizika dobivanja upalnih bolesti crijeva za 31%. Što se tiče pretilosti u kasnijoj dobi, podaci govore od 15% do 30%-tnom smanjenju u adolescentnoj i odrasloj dobi ako se bilo kakvo dojenje prakticiralo u djetinjstvu u odnosu na potpuni izostanak dojenja. Dojenje do barem 3 mjeseca je smanjilo izlaganje proteinima kravljeg mlijeka čime je došlo do 30% smanjenja pojave dijabetesa tipa 1. Pretpostavlja se da je mehanizam za razvoj dijabetesa tip 1 izloženost dojenčadi beta-laktoglobulinu iz kravljeg mlijeka, koji stimulira imunološko posredovni odgovor u međureakciji s pankreatičkim β stanicama. Utvrđeno je smanjenje od 40% za dijabetes tip 2 što ukazuje na dugoročne pozitivne efekte dojenja i majčinog mlijeka.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorci majčinog mlijeka i fecesa dojenčadi

Prikupljeno je po 3 uzorka mlijeka svake majke i po 3 uzorka fecesa dojenčadi (Tablica 1) isti dan u zasebne sterilne posudice:

1. unutar 7 dana nakon poroda
2. mjesec dana nakon poroda
3. mjesec dana nakon uvođenja krute hrane u prehranu djeteta

Ukupno je prikupljeno 9 uzoraka mlijeka i 9 uzoraka fecesa dojenčadi. Za prikupljanje i rad s navedenim uzorcima, dobivena je dozvola etičkog povjerenstva (Br. 380-59-10106-17-100/99, Klasa 641-01/17-02/01) Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Uzorci su u smrznutom stanju prebačeni u Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i pohranjeni na -20°C do daljnih analiza.

Tablica 1. Uzorci mlijeka i fecesa korišteni u ovom radu

Oznaka dojilje	Vrijeme uzorkovanja	Oznaka uzorka mlijeka	Oznaka uzorka fecesa
KR	Unutar 7 dana nakon poroda	KRM1	KRF1
	Mjesec dana nakon poroda	KRM2	KRF2
	Mjesec dana nakon uvođenja krute hrane	KRM3	KRF3
MC	Unutar 7 dana nakon poroda	MCM1	MCF1
	Mjesec dana nakon poroda	MCM2	MCF2
	Mjesec dana nakon uvođenja krute hrane	MCM3	MCF3
AF	Unutar 7 dana nakon poroda	AFM1	AFF1
	Mjesec dana nakon poroda	AFM2	AFF2
	Mjesec dana nakon uvođenja krute hrane	AFM3	AFF3

3.1.2. Kemikalije

- etanol, „Kemika", Hrvatska
- lizozim, „EuroBio", Francuska
- Nuclease Free Water, „Takara", Japan
- Tris (hidroksimetil)-aminometan, „Carlo Erba", Italija
- EDTA, „Sigma-Aldrich, SAD
- Maxwell 16S Tissue DNA purification kit

3.1.3. Aparatura i pribor

- Petrijeve zdjelice
- epruvete
- automatske pipete, „Eppendorf", SAD
- ependorfice
- kivete za centrifugiranje; 15 ml, 50 ml
- stalci za ependorfice
- stalci za epruvete
- pinceta
- autoklav, „Sutjeska", Jugoslavija
- termostat, „Instrumentarija", Hrvatska
- vodena kupelj, „Sutjeska"
- vibro-mješač EV-100, „Kartell", Italija
- vaga, „Tehtnica", Slovenija
- magnetska mješalica, „Tehtnica", Slovenija
- hladnjak, „Gorenje", Slovenija
- centrifuga Centric, „Tehtnica", Slovenija
- centrifuga s hlađenjem 5804R, „Eppendorf", SAD
- tresilica, „New Brunswick Scientific", SAD
- zamrzivač (-80˚C), „New Brunswick Scientific", SAD
- BioSpec Nano, „Shimadzu", Japan
- Sonopuls mini20 sonifikator, „Bandelin", Njemačka
- Maxwell® 16 Research System instrument, „Promega", SAD

3.2. METODE RADA

3.2.1. Izolacija DNA iz majčinog mlijeka

Dvije paralele po 5 mL svakog uzorka mlijeka centrifugiraju se 10 min pri 3600 g i 10 °C. Nakon uklanjanja supernatanta i masnog sloja, stanice prisutne u talogu se liziraju dvosatnom inkubacijom u 200 µL otopine lizozima (5 mg/mL) u TE puferu. Nakon inkubacije, uzorci se uranjaju u kutiju s ledom kako bi se spriječilo njihovo zagrijavanje tijekom sonifikacije. Sonifikacija se provodi pomoću uređaja Sonopuls mini20, 3 puta po 30 sekundi, s 15 sekundi pauze između svakog ciklusa. Ultrazvučna sonda se između svakog uzorka ispire vodom i etanolom kako bi se spriječila kontaminacija. Patrone Maxwell 16S Tissue DNA kita se slažu u Maxwell uređaj za automatsku izolaciju DNA koji se prethodno prebriše etanolom. Cijeli volumen pripremljenih uzoraka se prebacuje u prvu jažicu patrone te se u tubice za eluaciju doda pufer za eluaciju. Nakon završetka procesa izolacije DNA, spajaju se eluati 2 paralele svakog uzorka DNA izolirane iz mlijeka iste dojilje. Na taj način, dobije se oko 400 µl DNA kojoj se zatim spektrofotometrijski određuje koncentracija.

3.2.2. Izolacija DNA iz fecesa dojenčadi

Dvije paralele po 200 mg svakog uzorka fecesa resuspendiraju se u 1 mL destilirane vode te vorteksiraju i centrifugiraju 10 min pri 3600 g i 10°C. Nakon uklanjanja supernatanta, stanice se liziraju tijekom 2 h u 200 µL otopine lizozima (5 mg/mL) u TE puferu. Zatim se provodi sonifikacija stanica i izolacija DNA na isti način opisan u Poglavlju 3.2.1.

3.2.3. Mjerenje koncentracije DNA

Mjerenje koncentracije DNA izolirane iz majčinog mlijeka i fecesa dojenčadi, provodi se iz 2 µL uzorka pomoću uređaja BioSpec-Nano pri valnoj duljini 0,7 nm, pri čemu se kao slijepa proba koristi pufer za eluaciju iz Maxwell 16S Tissue DNA kita.

3.2.4. Sekvencioniranje DNA

30 µL svakog uzorka DNA izolirane iz fecesa i iz majčinog mlijeka je poslano na Illumina MiSeq sekvenciranje u Molecular Research laboratorij (Shallowater, TX, SAD), a ostatak je pohranjen na -20°C do daljnjih analiza.

Amplifikacija V1-V3 hipervarijabilnih regija 16S rRNA gena provodi se pomoću ill27Fmod (5'-AGRGTTTGATCMTGGCTCAG-3') i ill519Rmod (5'-GTNTTACNGCGGCKGCTG-3') početnica specifičnih za te regije. Za pripremu uzoraka za PCR reakcije koristi se HotStarTaq Plus Master Mix Kit (Qiagen, SAD) te se DNA najprije denaturira pri 94°C tijekom 3 minute,

nakon čega slijedi 28 ciklusa na 94°C po 30 sekundi, 53°C kroz 40 sekundi i 72°C kroz 1 minutu, te posljednji korak elongacije na 72°C koji traje 5 minuta. Nakon amplifikacije, uspješnost amplifikacije se provjerava na 2%-om agaroznom gelu. Više se uzoraka, na temelju njihove molekularne mase i koncentracije DNA, spaja u jedan u jednakim omjerima, nakon čega se pročišćavaju sa Ampure XP kuglicama.

Pročišćeni PCR produkti se koriste za pripremu Illumina DNA knjižnice te se provodi sekvenciranje na MiSeq uređaju prema uputama proizvođača.

3.2.5. Određivanje taksonomije i alfa raznolikosti

Sirovi podaci u FASTQ formatu dobiveni sekvenciranjem su obrađeni korištenjem QIIME (eng. Quantitative Insights Into Microbial Ecology) programa za analizu mikrobioma u suradnji s Kabinetom za bioinformatiku Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Kako bi se omogućila analiza raznolikosti, pomoću QIIME programa se najprije odrede operativne taksonomske jedinice (eng. *OTU-operational taxonomic unit)* za razvrstavanje grupa blisko povezanih, tj. sličnih sekvenci, pomoću kojih se vidi prisutnost bakterija u svakom uzorku. Generiraju su tablice OTU zastupljenosti u svakom uzorku s taksonomskom identifikacijom za svaki OTU. Na grafovima se slovom „p" označava koljeno (phylum), slovom „c" razred (classis); slovom „o" red (ordo), slovom „f" porodica (familia), slovom „g" rod (genus), a slovom „s" vrsta (species).

Pomoću QIIME programa, određena je i alfa raznolikost za što su korištene „*observed otus*" te „*shannon*" metrika. Nizom naredbi u QIIME-u se kreira graf krivulja razrjeđenja koje služe za vizualizaciju rezultata, tj. za utvrđivanje bioraznolikosti bakterijskih vrsta prisutnih unutar svakog uzorka. Krivulje također omogućuju da se utvrdi je li dubina sekvenciranja bila dovoljna za pojedini uzorak. Svi uzorci koji sadrže manje sekvenci od traženog broja se izostavljaju iz analize. Točka u kojoj se broj OTU-a ne povećava s daljnjim uzorkovanjem je točka u kojoj je uzeto dovoljno uzoraka za preciznu karakterizaciju zajednice.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Izolacija genomske DNA iz prikupljenih uzoraka majčinog mlijeka i fecesa dojenčadi

Izolacija DNA je proces pročišćavanja DNA iz određenog uzorka, kojim se DNA kombinacijom kemijskih i fizikalnih metoda razdvaja od proteina, membrana i drugih sastojaka stanice iz koje se izolira. Budući da taj proces predstavlja neophodan korak prije analize genoma bilo kojeg organizma ili metagenoma kompleksnih uzoraka, provedena je izolacija metagenomske DNA iz svih prikupljenih uzoraka majčinog mlijeka i fecesa dojenčadi pomoću Maxwell 16 Research System uređaja i pripadajućeg Maxwell 16S Tissue DNA purification kita prema uputama proizvođača. Prednost korištenja navedene metode je jednostavnost i kratkoća postupka (~45 min) te dobivanje DNA iznimne čistoće koja je spremna za daljnje analize bez potrebe za dodatnom obradom, precipitacijom i rehidracijom peleta te pročišćavanjem.

Iako za uspješnu izolaciju DNA ovom metodom nije potrebna nikakva dodatna predobrada, uzorci su ipak zbog očekivano malog broja prisutnih bakterija tretirani prije izolacije tretirani lizozimom; enzimom koji cijepa β-1,4-glikozidnu vezu između N-acetilglukozamina i N-acetilmuraminske kiseline peptidoglikana prisutnog u staničnoj stijenci bakterija. Također, svaki uzorak je podvrgnut sonifikaciji, tj. tretmanu ultrazvukom visokog intenziteta, kako bi se pospješilo razaranje stanične stijenke bakterija.

Provjera uspješnosti izolacije DNA ispitana je BioSpec-Nano spektrofotometrom te su rezultati vidljivi u tablici 2. Najveći prinos je ostvaren izolacijom DNA iz uzorka fecesa KRF3, a najniži iz uzorka majčinog mlijeka KRM1. Iz rezultata je vidljivo da su prinosi DNA izolirane iz fecesa uglavnom bili viši od prinosa DNA izolirane iz majčinog mlijeka, što je i očekivano zbog povećane prisutnosti bakterija u fekalnim uzorcima.

Tablica 2. Prikaz rezultata mjerenja koncentracije dsDNA BioSpec-Nano uređajem

Uzorak	Koncentracija dsDNA (ng/µL)
KRM1	2,61
KRM2	8,58
KRM3	83,26
MCM1	14.67
MCM2	15,05
MCM3	6,68

AFM1	7,11
AFM2	8,12
AFM3	46,60
KRF1	204,70
KRF2	158,12
KRF3	420,82
MCF1	36,13
MCF2	102,56
MCF3	49,94
AFF1	20,12
AFF2	17,23
AFF3	132,15

4.2. Taksonomska analiza rezultata dobivenih sekvncioniranjem

Uzorci genomske DNA izolirani iz fecesa i iz majčinog mlijeka su poslani na Illumina MiSeq sekvenciranje u Molecular Research laboratorij, gdje je najprije provedena amplifikacija V1-V3 hipervarijabilnih regija 16S rRNA gena, a nakon toga i sekvenciranje korištenjem Illumina MiSeq platforme. Sirovi podaci u FASTQ formatu dobiveni sekvenciranjem su obrađeni korištenjem QIIME programa programa za analizu mikrobioma, koji omogućuje identifikaciju prisutnih mikroorganizama u uzorcima te taksonomsku analizu sastava mikrobiote prisutne u svakom uzorku.

Iako se prije smatralo da je mikrobiom gastrointestinalnog trakta (GIT-a) novorođenčadi sterilan i da do prve kolonizacije bakterija dolazi tijekom rođenja djeteta, novija istraživanja su pokazala da mekonij beba sadrži malu količinu bakterija i to uglavnom onih zastupljenih u amnionskoj tekućini (Ardissone i sur., 2014). Dokazano je i da se u posteljici, amnionskoj tekućini, fetalnim membranama i pupkovini mogu nalaziti mikroorganizmi koji nisu pokazatelj nikakvog patogenog stanja (Aagaard i sur., 2014) te da se kolonizacija neonatalnog GIT-a uglavnom događa i prije rođenja. Osim toga, potencijalni izvor mikroorganizama u fetalnom mekoniju može biti i maternica (Møller i sur., 1995), vaginalni trakt (Romero i sur., 2014), ali i probavni sustav majke koji uključuje i usnu šupljinu (Aagaard i sur., 2014). Smatra se da su bakterije iz roda *Fusobacterium*, *Bacteroides*, *Streptococcus*, *Veillonella* i *Prevotella*, ukoliko su prisutne u fecesu dojenčadi, porijeklom iz GIT-a i usne šupljine (Aagaard i sur., 2012; Cabrera-Rubio i sur., 2012). Novijim istraživanjima je potvrđena prisutnost bakterija

usne šupljine u placenti zdravih trudnica, što sugerira translokaciju bakterija iz usne šupljine te njihovu kolonizaciju u placenti koja tada služi kao izvor bakterija za kolonizaciju GIT-a fecesa (Zhang i sur., 2015; Aagaard i sur., 2014). Smatra se da oralne bakterije, među kojima i potencijalni patogeni, ulaze u krvotok majke putem manjih posjekotina u sluznici usta, zbog čega mnoge periodentalne bolesti mogu dovesti do prijevremenog poroda (Schwendicke i sur., 2015).

U usporedbi s mikrobiomom odraslog čovjeka, mikrobiom novorođenčeta posjeduje manju bakterijsku raznolikost, ali pokazuje puno veća odstupanja između pojedinaca (Yatsunenko i sur., 2012). Dokazano je da su u GIT-u novorođenčeta najzastupljeniji pripadnici koljena *Actinobacteria*, *Firmicutes* i i *Proteobacteria*, dok su u mikrobiomu GIT-a odraslog čovjeka najzastupljeniji pripadnici roda *Bacteroidetes*. Na slici 4B, vidljivo je da je u uzorcima fecesa analiziranima u ovom radu također prisutno najviše bakterija iz koljena *Actinobacteria*, *Firmicutes* i *Proteobacteria*, dok je pripadnika koljena *Bacteroidetes* vrlo malo te se njihov broj primjetno povećavao sa starošću djeteta. Naime, u uzorcima stolice koji su prikupljeni unutar tjedan dana od rođenja djeteta, prosječan udio bakterija iz koljena *Bacteroidetes* bio je 0,969%, dok je u uzorcima fecesa prikupljenima mjesec dana nakon rođenja već iznosio 9,087%. U mikrobiomu ovdje analiziranih uzoraka majčinog mlijeka, očekivano su najzastupljenije su bakterije iz koljena *Firmicutes*, čiji se udio smanjio nakon uvođenja krute hrane u prehranu djeteta (slika 4B). Osim toga, uočeno je i smanjenje udjela navedenih bakterija u zrelim uzorcima majčinog mlijeka, s obzirom da je njihov udio puno viši u uzorcima mlijeka prikupljenim tjedan, odnosno mjesec dana nakon rođenja, u odnosu na uzorke zrelog mlijeka koje je prikupljeno otprilike 6 mjeseci nakon rođenja djeteta (slika 4B). Nasuprot tome, u uzorcima zrelog mlijeka označenim s M3, došlo je do povećanja udjela bakterija iz koljena *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* i *Actinobacteria* u odnosu na ranije prikupljene uzorke.

Procjenjuje se da dojenče koje konzumira oko 800 mL majčinog mlijeka dnevno unese oko 10^5-10^7 komensalnih bakterija, zbog čega je sastav mikrobioma majčinog mlijeka vrlo često u korelaciji s neonatalnim mikrobiomom dojenčeta (Heikkilä i Saris, 2003), što je vidljivo i u ovdje analiziranim uzorcima (slika 4A). Npr., uzorci majčinog mlijeka označeni slovima MCM sadrže prosječno najviši udio bakterija iz koljena *Firmicutes* (79,488%), kao i uzorci fecesa dojenčeta hranjenog tim mlijekom koji su označeni slovima MCF (50,310%), dok uzorci mlijeka i fecesa označeni s AFM, odnosno AFF, sadrže prosječno najniži udio navedenih bakterija (48,75%, odnosno 30,346%). Nakon uvođenja krute hrane u prehranu dojenčadi, uočeno je povećanje udjela bakterija iz koljena *Verrucomicrobia* s 0,060% u uzorcima fecesa označenim

brojem 1, odnosno 0,090% u uzorcima fecesa označenim brojem 2, na čak 15,129% u uzorcima fecesa označenim brojem 3 (slika 4B).

Majčino mlijeko osim bakterija (Hunt i sur., 2011), sadrži i brojne komponente koje neposredno utječu na neonatalni mikrobiom i zdravlje dojenčeta. Najčešće su to antimikrobni spojevi (Saavedra i Tschernia, 2002), imunoglobulini (Rogier i sur., 2014), ali i prebiotički oligosaharidi, koji pospješuju rast bifidobakterija čija je dominacija u neonatalnom mikrobiomu potvrđena brojnim istraživanjima (Penders i sur., 2006). Zbog toga mikrobiom GIT-a novorođenčadi hranjene majčinim mlijekom, u usporedbi s mikrobiomom GIT-a novorođenčadi hranjene formulom, sadrži manje patogena i bakterija iz koljena *Firmicutes* i *Proteobacteria*, a više bakterija iz koljena *Actinobacteria* (Lee i sur., 2015). U majčinom mlijeku se nalaze i imunoglobulini od kojih su najzastupljeniji IgA imunoglobulini koji štite GIT djeteta od kolonizacije patogenih bakterija iz roda *Campylobacter*, *Salmonella*, *Shigella* te vrsta *Vibrio cholera* i *Escherichia coli*, koji su glavni uzročnici infektivne dijareje; drugog najčešćeg uzročnika smrti djece mlađe od 5 godina u svijetu (Moszynski, 2007).

U fecesu dojenih beba može biti prisutno čak 70-80% bifidobakterija od kojih su najzastupljenije *B. longum* i *B. breve*. Bifidobakterije razgrađuju oligosaharide prisutne u majčinom mlijeku koje probavni sustav novorođenčeta ne može razgraditi i direktno utječu na metabolizam domaćina. U fekalnim uzorcima analiziranim u ovom istraživanju je također primjetna dominantna zastupljenost bakterija iz koljena *Actinobacteria* koja je u uzorku stolice AFF1, prikupljenom unutar tjedan dana od rođenja djeteta, iznosila čak 85.257% (slika 4A). Na slici 6 je vidljivo da su bifidobakterije najzastupljeniji rod bakterija u analiziranim uzorcima fecesa, pri čemu je najviši udio bakterija iz tog roda detektiran u uzorku fecesa AFF1 (85,181 %). Također, taksonomskom analizom na razini vrste, potvrđeno je prisustvo *B. breve* u nekim uzorcima mlijeka (KRM3, MCM1 i MCM2) te fecesa dojenčadi (MCF3), dok je *B. longum* detektiran samo u uzorcima fecesa AFF2 i AFF3 (slika 7).

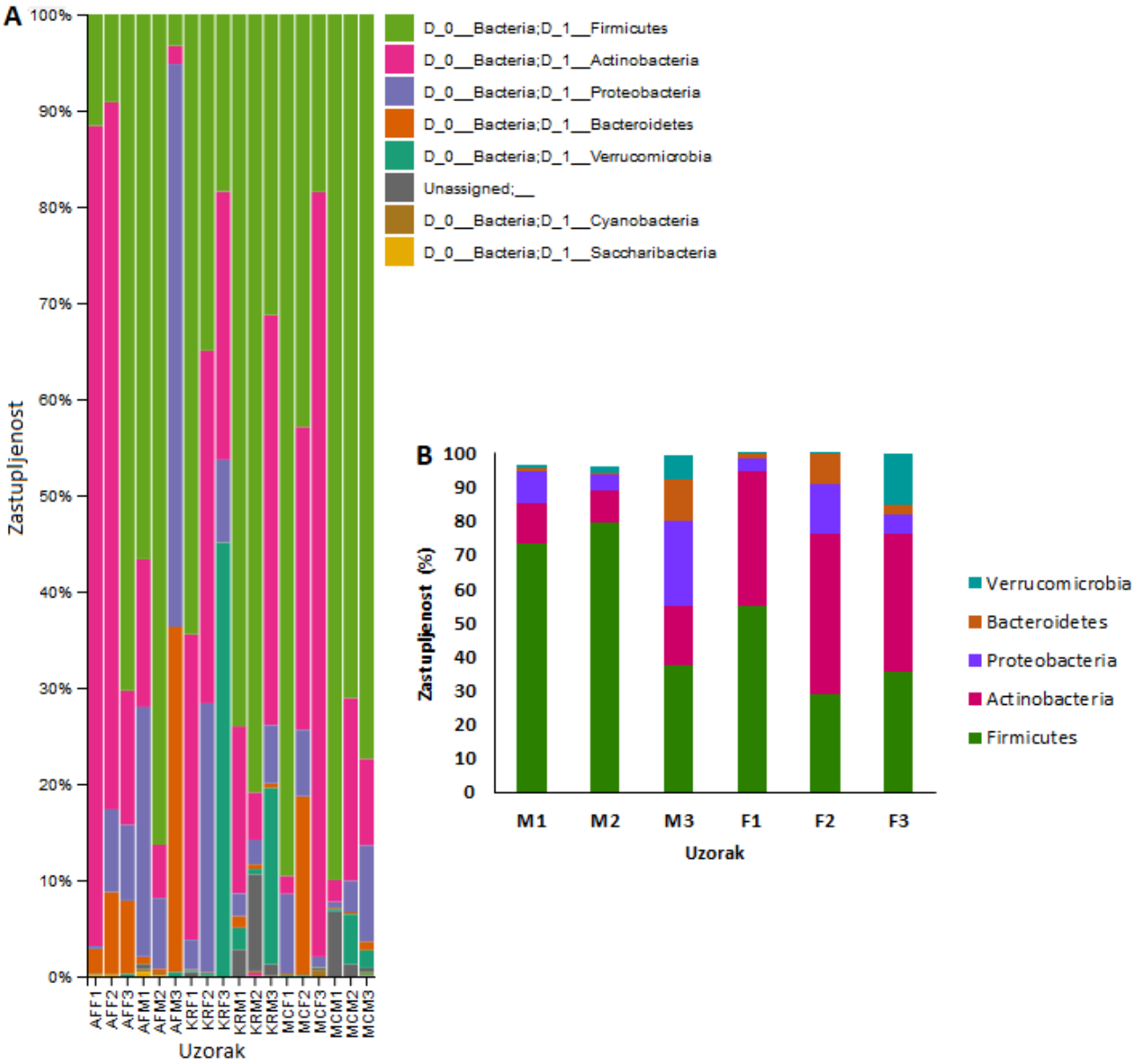
Jost i sur. (2015) su dokazali da su u mikrobiomu majčinog mlijeka najzastupljenije vrste iz roda *Staphylococcus* i *Streptococcus*, među kojima se izdvajaju *Staphylococcus epidermidis* i *Streptococcus salivarius*. U ovdje analiziranim uzorcima majčinog mlijeka, bakterije iz roda *Staphylococcus* i *Streptococcus* su također bile najzastupljenije ali je njihov udio opadao sa zrelošću mlijeka, što se odrazilo i na smanjenje njihove zastupljenosti u kasnije prikupljenim uzorcima fecesa dojenčadi (slika 6). Uehara i sur. (2001) su pokazali da streptokoki iz grupe viridans, u koje se ubrajaju i *S. pneumoniae* i *S.lactarius* detektirani u mikrobiomu ovdje analiziranih uzoraka majčinog mlijeka (slika 7), sprječavaju oralnu kolonizaciju bolničkih patogena poput meticilin rezistentnog *Staphylococcus aureusa* (MRSA)

kod dojenčadi. *S. lactarius* u majčinom mlijeku je prvi puta otkriven tek 2010 godine (Martín i sur., 2011). Također je dokazano da su viridans streptokoki prisutni u mikrobiomu GIT-a zdrave novorođenčadi, dok ih nema kod djece oboljele od atopijskog dermatitis (Kirjavainen i sur., 2001). Na slici 7 je vidljivo i prisustvo *S. epidermidis* u svim uzorcima osim kod uzoraka fecesa i mlijeka označenih slovima AF. Smatra se da *S. epidermidis* potječe s majčine kože i da ga dojenčad na taj način unosi za vrijeme hranjenja (West i sur., 1979), dok se viridans streptokoki rijetko nalaze na koži.

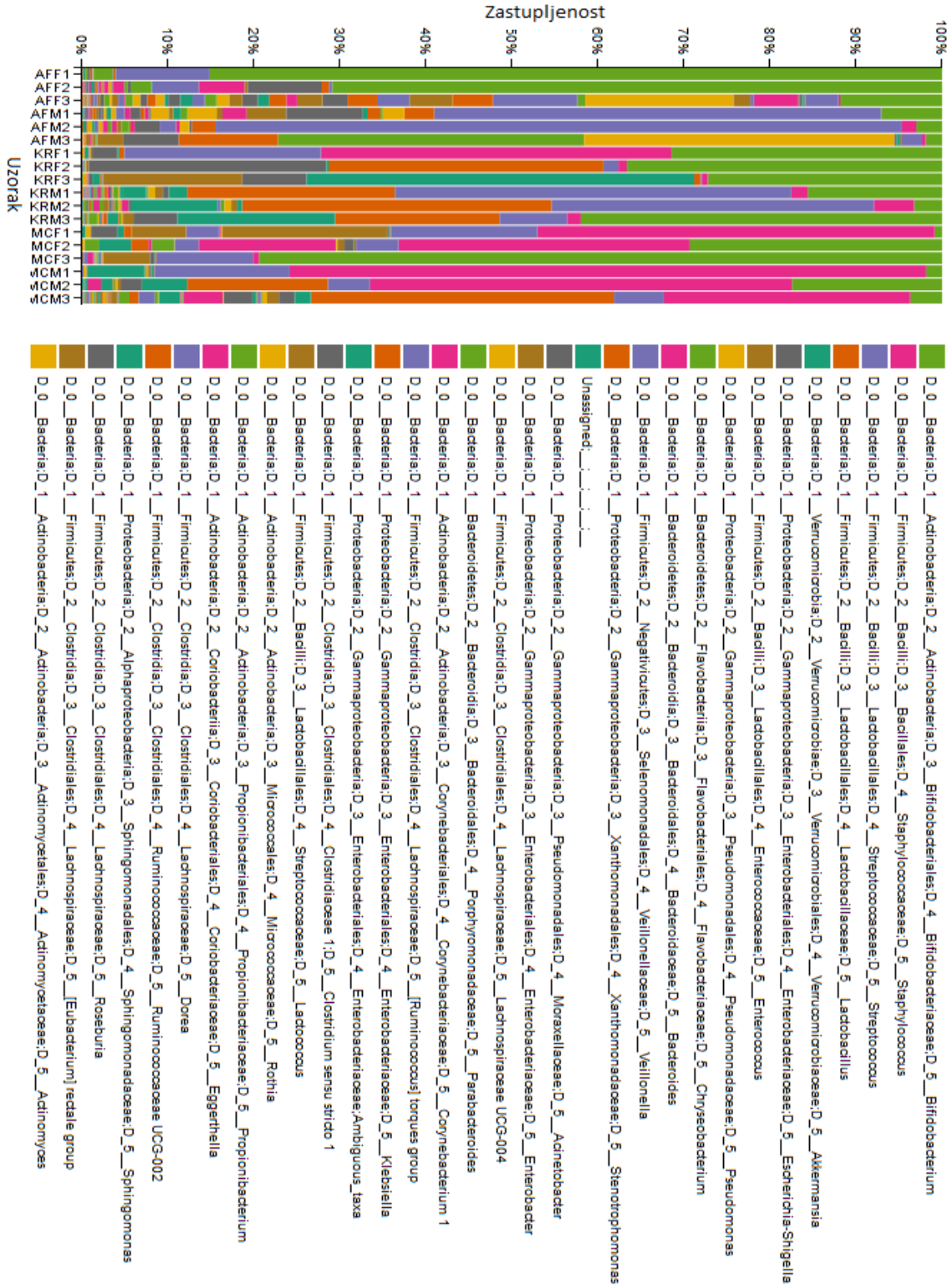
U uzorcima mlijeka prikupljenim 6 mjeseci nakon rođenja djeteta, vidljivo je i povećanje udjela bakterija iz roda *Akkermansia, Enterococcus, Chryseobacterium* i *Pseudomonas* (slika 6). Sa zrelošću mlijeka, došlo je i do povećanja udjela bakterija iz roda *Stenotrophomonas*, čije prisustvo nije detektirano niti u jednom uzroku fecesa dojenčadi (slika 5). Bakterije iz roda *Acinetobacter*, detektirane u većini uzoraka mlijeka, također nisu pronađene u uzorcima fecesa dojenčadi (slika 5). Također je uočen očekivano niži udio bakterija iz roda *Bifidobacterium* u uzorcima mlijeka u usporedbi s uzorcima fecesa dojenčadi (slika 5). Na slici 5 je u uzorcima vidiljiva i prisutnost bakterija iz roda *Veillonella* i *Propionibacterium*, koje metaboliziraju laktat dobiven fermentacijom laktoze u propionat i acetat te na taj način sprječavaju pojavu ulceroznog kolitisa koji se može javiti uslijed povećanog nakupljanja laktata u crijevima (Chassard i sur., 2014).

Osim majčinog mlijeka, značajnu ulogu u formiranju kompleksne mikrobiote djeteta ima i način poroda. Dominguez-Bello i sur., 2010 su pokazali da neonatalni mikrobiom GIT-a djece rođene vaginalnim putem najčešće sadrži bakterije prisutne u vaginalnom traktu poput onih iz roda *Lactobacillus*, dok su kod djece rođene carskim rezom najzastupljenije bakterije prisutne na koži, poput onih iz roda *Staphylococcus, Corynebacterium* i *Propionibacterium*. U jednoj studiji je pokazano i da GIT djece rođene carskim rezom ne sadrži bifidobakterije, dok kod djece rođene vaginalnim putem one prevladavaju u mikrobiomu (Biasucci i sur., 2008).

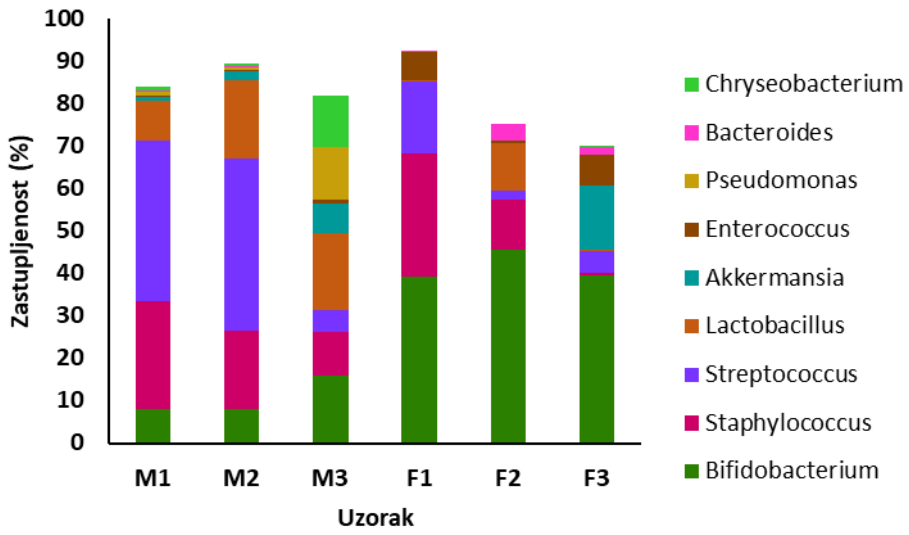
Kao što je vidljivo na slici 7, analizom metagonoma je vrlo teško postići točnu identifikaciju na razini vrste. Među detektiranim vrstama, nalazi se *Enterococcus faecalis*, koji je poznati producent bakteriocina, ali i niz drugih bakterija popus *Lactobacillus gasseri*, koje se ubrajaju u potencijalne probiotičke bakterije i nalaze se u većini komercijalno dostupnih probiotičkih proizvoda.



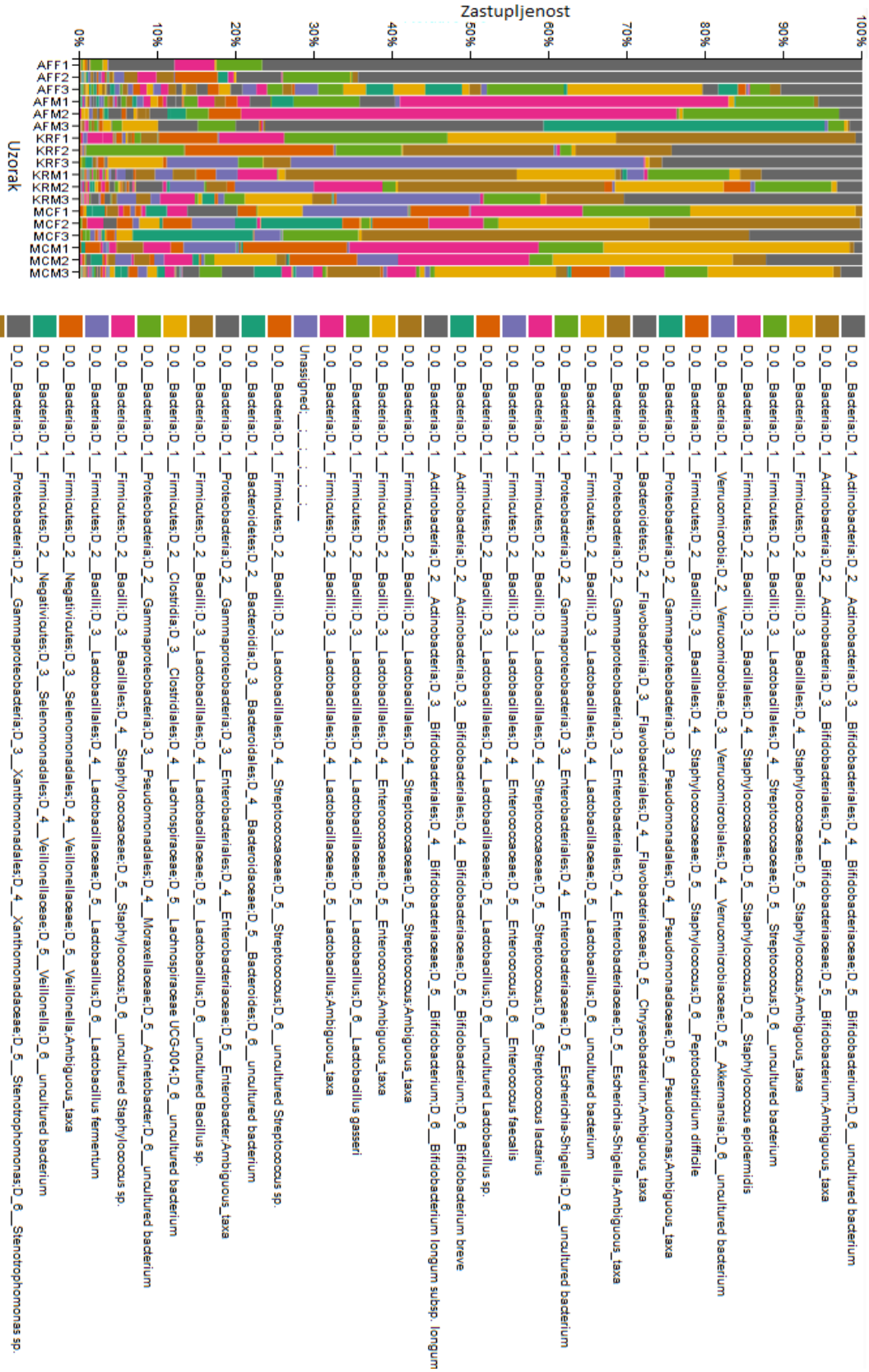
Slika 4. Grafički prikaz taksonomskih jedinica u uzorcima mlijeka i fecesa dojenčadi na razini koljena. **A** Prikaz zastupljenosti pojedinih koljena bakterija u svim uzorcima majčinog mlijeka i fecesa. **B** Prikaz najzastupljenijih koljena bakterija u uzorcima mlijeka (M) i fecesa (F) dojenčadi prikupljenih u određenom vremenskom periodu: 1 (unutar 7 dana od poroda), 2 (mjesec dana nakon poroda), 3 (mjesec dana nakon uvođenja krute prehrane)



Slika 5. Grafički prikaz taksonomskih jedinica u uzorcima mlijeka i fecesa na razini roda



Slika 6. Prikaz najzastupljenijih rodova bakterija u uzorcima mlijeka (M) i fecesa (F) dojenčadi prikupljenih u određenom vremenskom periodu: 1 (unutar 7 dana od poroda), 2 (mjesec dana nakon poroda), 3 (mjesec dana nakon uvođenja krute prehrane)



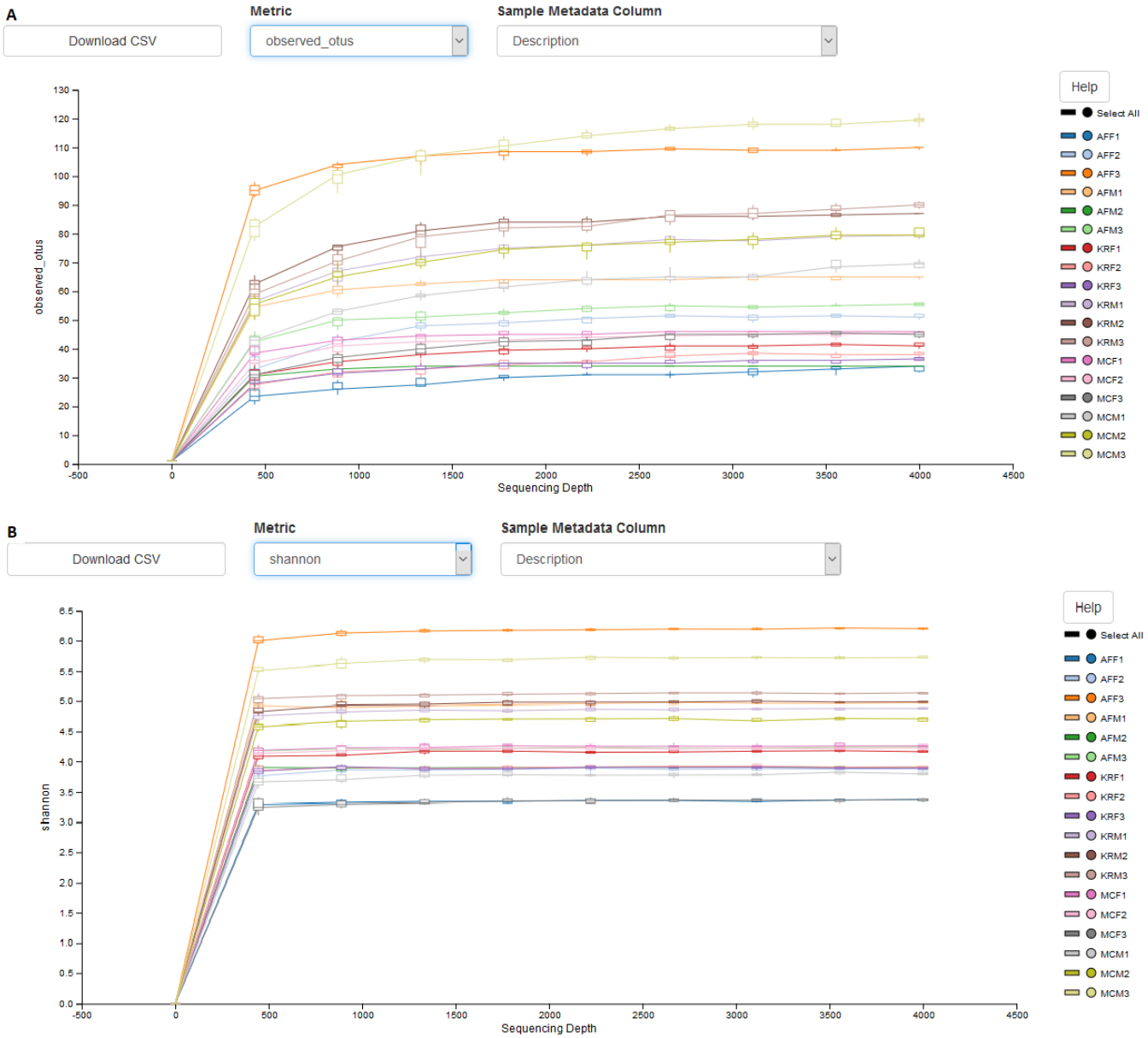
Slika 7. Grafički prikaz taksonomskih jedinica u uzorcima mlijeka i fecesa na razini vrste

4.3. Alfa raznolikost

Pomoću QIIME programa, određena je i alfa raznolikost, odnosno bioraznolikost uzoraka, kojom se iz generiranih krivulja može iščitati bogatstvo vrsta u pojedinom uzorku (slika 8A).

Korištenjem „*observed otus*" metrike, primjetno je da je najveća α-raznolikost prisutna u uzorcima AFF3 i MCM3 prikupljenima mjesec dana nakon uvođenja krute hrane u prehranu dojenčadi (otprilike šest mjeseci nakon poroda), dok je najniža α-raznolikost primjećena u uzorku AFF1 koji predstavlja uzorak fecesa prikupljen unutar tjedan dana od poroda. Iz grafa na Slici 8A se vidi i da krivulje završavaju na 4000 sekvenci po uzorku što znači da je to maksimalan broj sekvenci u jednom od 18 analiziranih uzoraka te su svi ostali uzorci poduzorkovani na taj broj sekvenci kako bi bili jednako zastupljeni. Iz grafa se također može vidjeti da su krivulje postigle plato, odnosno ustalile su se i dosegle asimptotu, što govori da je dubina sekvenciranja dovoljna te da broj sekvenci po uzorku veći of 4000 ne bi dao pouzdanije podatke i rezultirao većim brojem vrsta u svakom uzorku.

Iz grafa metrike „*shannon*", koji je prikazan na slici 8B, vidi se da najveću bioraznolikost, kao i u prethodno spomenutoj analizi, imaju uzorci AFF3 i MCM3, dok je ona najniža u uzorcima AFF1 i MCF3.



Slika 8. A α-raznolikost u „*observed otus*" metrici. **B** α-raznolikost u „*shannon*" metrici. Na x-osi prikazan je broj sekvenci po uzorku, a na y-osi broj određenih OTU-a

5. ZAKLJUČCI

1. Izolacija metagenomske DNA pomoću Maxwell 16 Research System uređaja i pripadajućeg Maxwell 16S Tissue DNA purification kita omogućuje dobivanje DNA iznimne čistoće koja je spremna za daljnje analize bez potrebe za dodatnom obradom te pročišćavanjem.

2. Sastav mikrobioma majčinog mlijeka najčešće je u korelaciji s neonatalnim mikrobiomom dojenčeta.

3. U uzorcima fecesa dojenčadi prisutno je najviše bakterija iz koljena *Actinobacteria*, *Firmicutes* i *Proteobacteria*, dok u uzorcima majčinog mlijeka prevladavaju bakterije iz koljena *Firmicutes*.

4. Korištenjem „*observed otus*" metrike, primjetno je da je najveća α-raznolikost prisutna u uzorcima AFF3 i MCM3 prikupljenima mjesec dana nakon uvođenja krute hrane u prehranu dojenčadi, dok je najniža α-raznolikost primjećena u uzorku AFF1 koji je prikupljen unutar tjedan dana od poroda. Prema grafa metrike „*shannon*", najveću bioraznolikost imaju uzorci AFF3 i MCM3, dok je ona najniža u uzorcima AFF1 i MCF3.

6. LITERATURA

Aagaard K., Ma J., Antony K. M., Ganu R., Petrosino J., Versalovic J. (2014) The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med* **6(237)**. doi: 10.1126/scitranslmed.3008599

Aagaard K., Riehle K., Ma J., Segata N., Mistretta T. A., Coarfa C., Raza S., Rosenbaum, S., Van den Veyver I., Milosavljevic A., Gevers D., Huttenhower C., Petrosino J., Versalovic J. (2012) A metagenomic approach to characterization of the vaginal microbiome signature in pregnancy. *PLoS One* **7(6)**. doi: 10.1371/journal.pone.0036466

American Academy of Pediatrics (2012) Breastfeeding and the Use of Human Milk. *Pediatrics* 0031-4005.

Ardissone A. N., de la Cruz D. M., Davis-Richardson A. G., Rechcigl K. T., Li N., Drew J. C., Murgas-Torrazza R., Sharma R., Hudak M. L., Triplett E. W., Neu J. (2014) Meconium microbiome analysis identifies bacteria correlated with premature birth. *PLoS One* **9(3)**. doi: 10.1371/journal.pone.0090784e90784.

Biasucci G., Benenati B., Morelli L., Bessi E., Boehm G. (2008) Cesarean delivery may affect the early biodiversity of intestinal bacteria. *J Nutr* **138(9)**:1796–1800.

Cabrera-Rubio R., Collado M. C., Laitinen K., Salminen S., Isolauri E., Mira A. (2012) The human milk microbiome changes over lactation and is shaped bymaternal weight and mode of delivery. *Am J Clin Nutr* **96(3)**:544–551.

Chassard C., de Wouters T., Lacroix C. (2014) Probiotics tailored to the infant: a window of opportunity. *Curr Opin Biotechnol* **26**:141-147.

Dominguez-Bello M. G., Costello E. K., Contreras M., Magris M., Hidalgo G., Fierer N., Knight R. (2010) Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci USA* **107(26**):11971-11975.

Fernandez L., Langa S., Martin V., Maldonado A., Jiménez E., Martin R., Rodriguez J. M. (2013) The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacol Res* **69(1)**:1-10.

Fitzstevens J. L., Smith K. C., Hagadorn J. I., Caimano M. J., Matson A. P., Brownell E.A. (2017) Systematic Review of the Human Milk Microbiota. *Nutr Clin Pract* **32(3)**:354-364.

Heikkilä M. P., Saris P. E. J. (2003). Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *J Appl Microbiol* **95**:471-478.

Hunt K. M., Foster J. A., Forney L. J., Schütte U.M.E., Beck D.L., Abdo Z., Fox L. K., Williams J. E., McGuire M. K., McGuire M. A. (2011) Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. *PLoS One* **6**:1-8.

Jost T., Lacroix C., Braegger C., Chassard C. (2015) Impact of human milk bacteria and oligosaccharides on neonatal gut microbiota establishment and gut health. *Nutr Rev* **73(7)**:426-437.

Khodayar-Pardo P., Mira-Pascual L., Collado MC., Martinez-Costa C. (2014) Impact of lactation stage, gestational age and mode of delivery on breast milk microbiota. *J Perinatol* **34(8)**:599-605.

Kirjavainen P. V., Apostolou E., Arvola T., Salminen S. J., Gibson G. R., Isolauri E. (2001). Characterizing the composition of intestinal microflora as a prospective treatment target in infant allergic disease. *FEMS Immunol Med Microbiol* **32**:1-7.

Laucirica D.R., Triantis V., Schoemaker R., Estes M. K., Ramani S. (2017) Milk oligosaccharides inhibit human rotavirus infectivity in MA104 cells. *J Nutr* **147**:1709-1714.

Le Doare, K., Holder, B., Bassett, A., Pannaraj P. S. (2018) Mother's milk: A Purposeful Contribution to the Development of the Infant Microbiota and Immunity. *Front Immunol* **9**:361.

Lee S. A., Lim J. Y., Kim B. S., Cho S. J., Kim N. Y., Kim O. B., Kim Y. (2015) Comparison of the gut microbiota profile in breast-fed and formula-fed Korean infants using pyrosequencing. *Nutr Res Pract* **9(3)**:242-248.

Martin R., Lang S., Reviriego C., Jiménez E., Marín ML., Xaus J., Fernández L., Rodríguez JM. (2003) Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J Pediatr* **143(6)**:754-758.

Martin R., Langa S., Reviriego C., Jiménez E., Marín ML., Olivares M., Boza J., Jiménez J., Fernández L., Xaus J. et al. (2004) The commensal microflora of human milk: new perspective for food bacteriotherapy and probiotics. *Trends Food Sci Technol* **15**:121-127.

Martín V., Mãnés-Lázaro R., Rodríguez J. M., Maldonado A. (2011) *Streptococcus lactarius* sp. nov., isolated from breast milk of healthy women. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**:1048-1052.

Maynard C. L., Elson C. O., Hatton R. D., Weaver C. T. (2012) Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature* **489**:231-241.

Møller B. R., Kristiansen F. V, Thorsen P., Frost L., Mogensen S. C. (1995) Sterility of the uterine cavity. *Acta Obstet Gynecol Scand* **74**:216-219.

Morrow A. L., Ruiz-Palacios G. M., Jiang X., Newburg D. S. (2005) Human-milk glycans that inhibit pathogen binding protect breast-feeding infants against infectious diarrhea. *J Nutr* **135(5)**:1304-1307.

Moszynski P. (2007) Diarrhoeal diseases still kill more than 1.5m children under 5 each year. *BMJ* **335(7632)**:1227.

Penders J., Thijs C., Vink C., Stelma F. F., Snijders B., Kummeling I., van den Brandt P. A., Stobberingh E. E. (2006) Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* **118(2)**:511–521.

Rodriguez J. M. (2014) The origin of human milk bacteria: is there a bacterial entero-mammary pathway during late pregnancy and lactation? *Adv Nutr* **5(6)**:779-784.

Rogier E. W., Frantz A. L., Bruno M. E., Wedlund L., Cohen D. A., Stromberg A. J., Kaetzel C. S. (2014) Secretory antibodies in breast milk promote long-term intestinal homeostasis by regulating the gut microbiota and host gene expression. *Proc Natl Acad Sci* USA **111(8)**:3074-3079.

Romero R., Hassan S. S., Gajer P., Tarca A. L., Fadrosh D. W., Bieda J., Chaemsaithong P., Miranda J., Chaiworapongsa T., Ravel J. (2014) The vaginal microbiota of pregnant women who subsequently have spontaneous preterm labor and delivery and those with a normal delivery at term. *Microbiome* **2**:1-15.

Saavedra J. M., Tschernia A. (2002) Human studies with probiotics and prebiotics: clinical implications. *Br J Nutr* **2**:S241-246.

Schwendicke F., Karimbux N., Allareddy V., Gluud C. (2015) Periodontal treatment for preventing adverse pregnancy outcomes: a meta-and trial sequential analysis. *PLoS One* **10(6)**. doi: 10.1371/journal.pone.0129060

Soto A., Martin V., Jiménez E., Mader I., Rodríguez J. M., Fernández L. (2014) Lactobacilli and bifidobactera in human breast milk: influence of antibiotherapy and other host and clinical factors. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **59(1)**:78-88.

Starke IC., Vahjen W., Pieper R., Zentek J. (2014) The influence of DNA Extraction Procedure and Primer Set on the Bacterial Community Analysis by Pyrosequencing of Barcoded 16S rRNA Gene Amplicons. *Mol Bio Int* 548683.

Tanaka M., Nakayama J. (2017) Development of the gut microbiota in infancy and its impact on health in later life. *Allergol Int* **66(4)**:515-522.

Uehara Y., Kikuchi K., Nakamura T., Nakama H., Agematsu K., Kawakami Y., Maruchi N., Totsuka K. (2001). H_2O_2 produced by viridans group streptococci may contribute to inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization of oral cavities in newborns. *Clin Infect Dis* **32**:1408-1413.

Urbaniak C., McMillan A., Angelini M., Gloor G. B., Sumarah M., Burton J. P., Reid G. (2014) Effect of chemotheraphy on the microbiota and metabolome of human milk, a case report. *Microbiome* **2**:24.

Walker A. W., Martin J. C., Scott P., Parkhill J., Flint H. J., Scott KP. (2015) 16S rRNA gene-based profiling on the human infant gut microbiota is strongly influenced by sample processing and PCR primer choice. *Microbiom*e **3**:26.

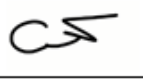
West P. A., Hewitt J. H., Murphy O. M. (1979). The influence of methods of collection and storage on the bacteriology of human milk. *J Appl Bacteriol* **46**:269-277.

Yatsunenko T., Rey F. E., Manary M. J., Trehan I., Dominguez-Bello M. G., Contreras M., Magris M., Hidalgo G., Baldassano R. N., Anokhin A. P., Heath A. C., Warner B., Reeder J., Kuczynski J., Caporaso J. G., Lozupone C. A., Lauber C., Clemente J. C., Knights D., Knight R., Gordon J. I. (2012) Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* **486**:222-227.

Zhang Y., Li S., Gan R., Zhou T., Xu D., Li H. (2015) Impacts of Gut Bacteria on Human Health and Diseases. *In J Mol Sci* **16**:7493-7519.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



Ime i prezime studenta