

Uniwersytet Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy

Szkoła Doktorska



Uniwersytet
Kazimierza
Wielkiego
w Bydgoszczy

Rozprawa doktorska

Iwona Adamczyk

**Mikrobiota matki a niemowlęcia - identyfikacja, korelacja.
Laktoferyna i oligosacharydy w mleku kobiecym
na różnych etapach laktacji**

Promotor: dr hab. Magdalena Twarużek, prof. uczelni

Promotor pomocniczy: dr n. med. Elena Sinkiewicz-Darol

Pracę wykonano w Katedrze Fizjologii i Toksykologii

Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy

Kierownik jednostki dr hab. Magdalena Twarużek

Bydgoszcz 2026

Pragnę serdecznie podziękować mojej Pani Promotor dr hab. Magdalenie Twarużek za zaufanie, opiekę naukową, cenne wskazówki, życzliwość oraz wsparcie na wszystkich etapach realizacji pracy doktorskiej. Podziękowania kieruję również do mojej Promotor Pomocniczej, dr Elenie Sinkiewicz-Darol, za cierpliwość, merytoryczne wsparcie, dostępność, zaangażowanie oraz wszystkie uwagi i sugestie, które pomogły mi w doprowadzeniu tej pracy do końca.

Wszystkim Pracownikom Katedry Fizjologii i Toksykologii, szczególnie Profesorowi Janowi Grajewskiemu dziękuję za serdeczne przyjęcie.

Dziękuję za pomoc w realizacji badań Kierownikowi Zakładu Diagnostyki Mikrobiologicznej Wojewódzkiego Szpitala Zespolonego im. L. Rydygiera w Toruniu, dr hab. Dorocie Martysiak-Żurowskiej z Politechniki Gdańskiej oraz Zespołowi Interdyscyplinarnego Centrum Nowoczesnych Technologii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu.

Szczególne podziękowania składam Uczestniczkom badania za zaufanie, zaangażowanie i poświęcony czas, bez których realizacja niniejszej pracy nie byłaby możliwa.

Z całego serca dziękuję mojemu Mężowi za cierpliwość, wyrozumiałość, codzienne wsparcie i wiarę we mnie, szczególnie w chwilach zwątpienia i zmęczenia. Dziękuję za to, że byłeś obok i pomagałeś mi znaleźć czas oraz przestrzeń potrzebne do pracy naukowej.

Moim Dzieciom dziękuję za radość, energię i przypominanie mi każdego dnia o tym, co w życiu najważniejsze. To Wy byliście dla mnie największą motywacją, aby wytrwać i doprowadzić tę drogę do końca.

Dziękuję także całej mojej Rodzinie oraz Przyjaciołom za obecność, pomoc i dobre słowo – zarówno w momentach sukcesów, jak i wtedy, gdy droga do celu wydawała się szczególnie wymagająca.

Spis treści

Wykaz skrótów.....	8
1 WSTĘP	10
1.1 Karmienie piersią: fizjologia, skład mleka kobiecego, znaczenie zdrowotne oraz sytuacja epidemiologiczna w Polsce i na świecie	10
1.1.1 Fizjologia laktacji	10
1.1.2 Skład mleka kobiecego: makroskładniki i mikroskładniki oraz komponenty aktywne biologicznie.....	12
1.1.3 Zmienność składu mleka kobiecego	15
1.1.4 Znaczenie i korzyści karmienia piersią dla matki i dziecka	15
1.1.5 Karmienie piersią w Polsce i na świecie	18
1.2 Mikrobiota matki, dziecka i mleka kobiecego	18
1.2.1 Pochodzenie, skład i zmiany mikrobioty mleka kobiecego	19
1.2.2 Skład, pochodzenie i rozwój mikrobioty dziecka.....	21
1.2.3 Znaczenie mikrobioty dziecka	24
1.2.4 Wpływ sposobu żywienia i podawania pokarmu na mikrobiotę błon śluzowych niemowlęcia	25
1.3 Oligosacharydy w mleku kobiecym	27
1.3.1 Budowa i znaczenie oligosacharydów mleka kobiecego.....	28
1.3.2 Zmienność składu oligosacharydów w mleku kobiecym.....	30
1.4 Laktoferyna w mleku kobiecym	31
1.4.1 Budowa chemiczna i znaczenie laktoferyny	31
2 CEL PRACY	34
2.1 Hipotezy badawcze	34
2.2 Ogólne cele badawcze	35
2.3 Cele szczegółowe	35

3	MATERIAŁY.....	37
3.1	Projekt badania, uczestnicy oraz materiał badawczy.....	37
4	METODY.....	43
4.1	Odczynniki.....	43
4.1.1	Odczynniki mikrobiologiczne.....	43
4.1.2	Aparatura i wyposażenie.....	44
4.1.3	Badanie mikrobioty mleka kobiecego oraz wymazów z jam ustnych dzieci metodą powierzchniową.....	45
4.1.4	Identyfikacja mikrobiomu metodą MALDI TOF MS Microflex.....	48
4.1.5	Oznaczanie oligosacharydów metodą wysokosprawną chromatografię cieczową (UHPLC).....	52
4.1.6	Oznaczanie laktoferyny w mleku kobiecym metodą immunoenzymatyczną ELISA.....	55
4.2	Analiza statystyczna.....	57
4.2.1	Oprogramowanie i odtwarzalność.....	58
5	WYNIKI.....	59
5.1	Charakterystyka grupy badanej.....	59
5.2	Porównanie miana mikrobioty mleka między I a II zbiórką materiałów badanych.....	60
5.3	Ocena składu gatunkowego mleka oraz wymazów oraz stopnia nakładania się mikrobioty mleka matki z mikrobiotą jamy ustnej dziecka (oś matka-dziecko).....	62
5.4	Alfa- i beta- różnorodność mikrobioty mleka kobiecego oraz wymazów z jamy ustnej dzieci.....	74
5.5	Ocena zawartości oligosacharydów i laktoferyny.....	77
5.6	Korelacja miana bakterii mleka kobiecego z oligosacharydami i laktoferyną.....	82
5.7	Związek gatunków bakterii z oligosacharydami i laktoferyną.....	84
5.8	Profil mikrobiologiczny i biochemiczny mleka kobiecego a etap laktacji. Korelacje oligosacharydów i laktoferyny z wiekiem badanych i BMI.....	86
5.9	Wpływ etapu laktacji na skład mikrobiologiczny oraz biochemiczny.....	89
5.10	Porównania międzygrupowe: metoda porodu i suplementacja.....	95

6	DYSKUSJA	97
6.1	Mleko kobiece jako środowisko mikrobiologiczne i jego wpływ na karmione piersią dziecko	98
6.2	Różnorodność gatunkowa mleka kobiecego i wymazów z jamy ustnej dzieci oraz zmiany mikrobioty mleka w czasie.....	102
6.3	Oligosacharydy i laktoferyna w mleku kobiecym	104
6.4	Związek pomiędzy składem mikrobiologicznym a oligosacharydami i laktoferyną	108
6.5	Wpływ czynników środowiskowych na skład mikrobiologiczny mleka kobiecego oraz składników biochemicznych	110
6.5.1	Metoda porodu	110
6.5.2	Wiek matki.....	111
6.5.3	BMI	112
7	WNIOSKI.....	114
8	STRESZCZENIE	116
9	ABSTRACT.....	118
10	SPIS RYSUNKÓW	120
11	SPIS WYKRESÓW	122
12	SPIS TABEL.....	124
13	SPIS ZDJĘĆ	126
14	BIBLIOGRAFIA.....	127
15	ZAŁĄCZNIKI.....	145
15.1	Wniosek i zgoda Komisji Bioetycznej.....	145
15.2	Formularz świadomej zgody uczestniczki badania	154
15.3	Kwestionariusz osobowy i ankieta.....	156

Wykaz skrótów

- ARA – *Arachidonic Acid*, kwas arachidonowy
- CZDA – czysty do analizy
- PZMK – preparat zastępujący mleko kobiece
- DHA – *Docosahexaenoic Acid*, kwas dokozaheksaenowy
- EGF – *Epidermal Growth Factor*, naskórkowy czynnik wzrostu
- HMO – *Human Milk Oligosaccharides*, oligosacharydy mleka kobiecego
- Ig – *Immunoglobulin*, immunoglobulina
- IgA – *Immunoglobulin A*, immunoglobulina A
- IGF-I – *Insulin-like Growth Factor I*, insulinopodobny czynnik wzrostu I
- IGF-II – *Insulin-like Growth Factor II*, insulinopodobny czynnik wzrostu II
- IgG – *Immunoglobulin G*, immunoglobulina G
- IgM – *Immunoglobulin M*, immunoglobulina M
- IL-6 – *Interleukin 6*, interleukina 6
- IL-8 – *Interleukin 8*, interleukina 8
- IL-10 – *Interleukin 10*, interleukina 10
- IL-13 – *Interleukin 13*, interleukina 13
- jtk/mL – jednostek tworzących kolonie na mililitr
- KP – karmienie piersią
- LAB – *lactic acid bacteria*, bakterie kwasu mlekowego
- LC-PUFA – *Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids*, długołańcuchowe wielonienasycone kwasy tłuszczowe
- LF – *Lactoferrin*, laktoferryina
- MALDI-ToF MS – *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*, spektrometria mas z desorpcją/ionizacją laserową wspomaganą matrycą z analizatorem czasu przelotu
- MK – mleko kobiece
- MS – *Mass Spectrometry*, spektrometria mas
- PUFA – *Polyunsaturated Fatty Acids*, wielonienasycone kwasy tłuszczowe
- PZMK – preparaty zastępujące mleko kobiece
- slgA – *Secretory Immunoglobulin A*, wydzielnicza immunoglobulina A

slgG – *Secretory Immunoglobulin G*, wydzielnicza immunoglobulina G

qPCR – Quantitative real-time polymerase chain reaction, ilościowa reakcja polimerazy łańcuchowej

UHPLC – *Ultra-High-Performance Liquid Chromatography*, ultrasprawną chromatografię cieczową

VEGF – *Vascular Endothelial Growth Factor*, czynnik wzrostu śródbłonnka naczyniowego

WHO – *World Health Organization*, Światowa Organizacja Zdrowia

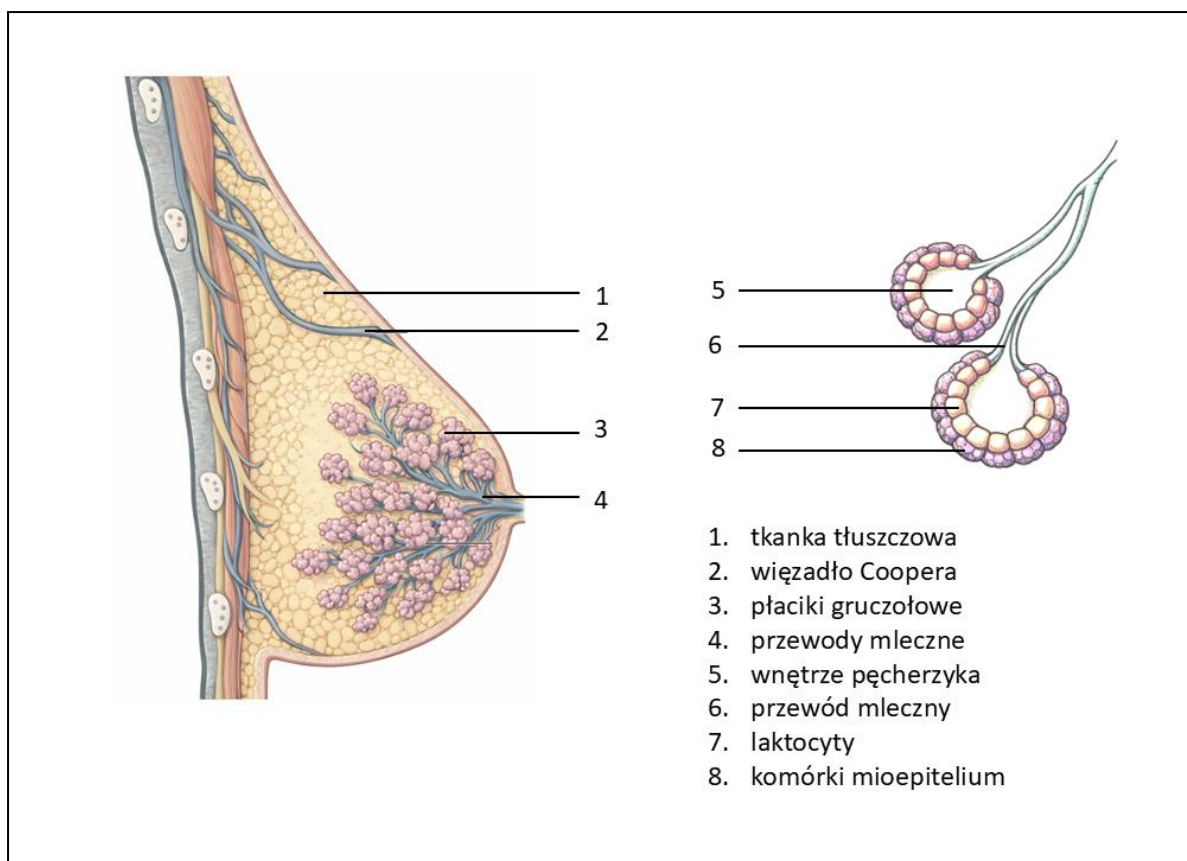
1 WSTĘP

1.1 Karmienie piersią: fizjologia, skład mleka kobiecego, znaczenie zdrowotne oraz sytuacja epidemiologiczna w Polsce i na świecie

1.1.1 Fizjologia laktacji

Karmienie piersią (KP) stanowi normę fizjologicznego i ewolucyjnie uwarunkowanego sposobu żywienia niemowląt, zapewniający optymalne warunki wzrastania, rozwoju immunologicznego oraz metabolicznego w okresie wczesnodziecięcym [1, 2]. Mleko kobiece (MK) jest dynamicznym płynem biologicznym, którego skład ulega zmianom w zależności od etapu laktacji, pory dnia, potrzeb dziecka oraz czynników środowiskowych. Zawiera ono nie tylko makro- i mikroskładniki odżywcze, lecz również liczne komponenty bioaktywne. Głównymi aktywnymi składnikami mleka kobiecego są immunoglobuliny głównie IgA (immunoglobulina A), laktoferyna, lizozym, cytokiny, hormony, komórki odpornościowe, oligosacharydy mleka kobiecego (HMO, ang. *Human Milk Oligosaccharide*) oraz żywe mikroorganizmy, które wspólnie determinują właściwości ochronne i immunomodulacyjne [3, 4].

Gruzoł piersiowy składa się z rozgałęzionego systemu przewodów wyprowadzających zbudowanych z komórek nabłonkowych zakończonych jednostkami zrazikowo-pęcherzykowymi. Każdy pęcherzyk od strony światła wyścielony jest jednowarstwowym nabłonkiem wydzielniczym, który tworzą komórki – laktocyty, ułożone na unaczynionym podścielisku tkanki łącznej. Jest to główne miejsce syntezy i sekrecji mleka. Od zewnętrznej strony pęcherzyk otoczony jest komórkami mioepitelialnymi, które mają zdolność kurczenia się pod wpływem działania oksytocyny (Rysunek 1) [5–8].



Rysunek 1. Budowa gruczołu piersiowego (opracowanie własne na podstawie [9])

Laktocyty w okresie laktacji są wysoko wyspecjalizowanymi komórkami wydzielniczymi. Ich cytoplazma jest wypełniona licznymi mitochondriami, rozległą siateczką śródplazmatyczną i aktywnym aparatem Golgiego z pęcherzykami wydzielniczymi zawierającymi micle kazeinowe. Istnieją dwa główne źródła substancji wchodzących w skład wydzielanego mleka. Syntetyzowane w laktocytach – składniki endogenne oraz składniki egzogenne, głównie pochodzące z krwi. Do substancji endogennych, syntetyzowanych w gruczole mlekowym, należą białka mleka (głównie kazeiny i białka serwatkowe), oligosacharydy i składniki odżywcze, takie jak laktoza, a także lipidy, w tym trójglicerydy oraz białka związane z lipidami. Do składników egzogennych transportowanych z surowicy lub komórek podścieliska należą białka surowicy (np.: albuminy, transferyna), hormony (np.: insulina, prolaktyna, estrogen), immunoglobuliny (immunoglobulina M – IgM, immunoglobulina E – IgE, wydzielnicza immunoglobulina A – sIgA [ang. *Secretory Immunoglobulin A*], wydzielnicza immunoglobulina G – sIgG [ang. *Secretory Immunoglobulin G*]), cytokiny, lipaza lipoproteinowa, glukoza, aminokwasy i woda [5, 8, 10, 11].

Prawidłowa laktacja rozpoczyna się jeszcze w ciąży, od około 16 tygodnia ciąży i jest to laktogeneza I. Pod wpływem estrogenu i progesteronu następuje dojrzewanie gruczołu mlekowego, co prowadzi do gromadzenia małych ilości siary. Po narodzinach dziecka, rozpoczyna się laktogeneza II. W wyniku spadku stężenia progesteronu następuje aktywacja procesu wydzielniczego gruczołu mlekowego, a wydzielana prolaktyna i oksytocyna podczas aktu karmienia piersią podtrzymuje syntezę i wydzielanie mleka. Prolaktyna stymuluje syntezę mleka, natomiast oksytocyna odpowiada za jego wypływ podczas karmienia piersią [12, 13]. W pierwszym tygodniu po porodzie gruczoł piersiowy wydziela siarę (łac. *colostrum*) – bogaty w składniki odżywcze pokarm, zawierający wysokie stężenia przeciwciał i komórek odpornościowych. Laktogenezą III rozpoczyna się stabilizacja laktacji, która ma miejsce między 7. a 14. dniem życia noworodka. W tym czasie pojawia się w mleko przejściowe, będące mieszanką siary i mleka dojrzalego. Po około 2 tygodniach rozpoczyna się wydzielanie mleka dojrzalego, którego skład jest stabilny, choć badania potwierdzają, że ewoluuje w kolejnych miesiącach po porodzie, wraz ze zmianami potrzeb dziecka, co podkreśla dynamiczną i adaptacyjną naturę karmienia piersią [14, 15].

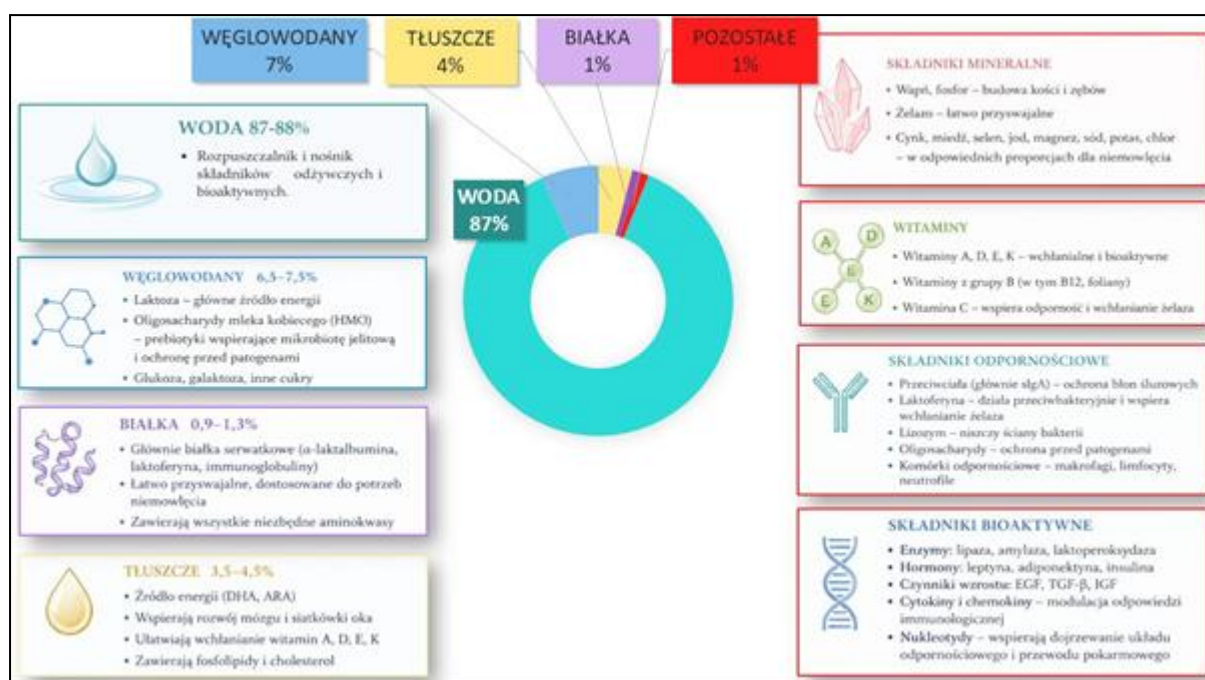
1.1.2 Skład mleka kobiecego: makroskładniki i mikroskładniki oraz komponenty aktywne biologicznie

Podstawowymi składnikami odżywczymi mleka kobiecego są węglowodany, tłuszcze oraz białka, których proporcje są dopasowane do potrzeb żywieniowych karmionego dziecka (Rysunek 2). Zawartość węglowodanów w mleku wynosi około 65–70 g/L, a ich głównym źródłem jest laktoza. Stanowią podstawowe źródło energii, a osmolalność oraz stężenie węglowodanów idealnie zaspokajają zapotrzebowanie energetyczne szybko rozwijającego się mózgu dziecka. Ponadto laktoza wspiera wchłanianie wapnia, żelaza i cynku. Wśród węglowodanów drugą grupą pod względem ilości są oligosacharydy, występujące w stężeniu 5–25 g/L, które pełnią głównie funkcje prebiotyczne i immunomodulacyjne [16, 17].

Tłuszcze stanowią główne źródło energii (około 45–55% wartości energetycznej mleka) i występują w stężeniu średnio 30–50 g/L. Lipidy mleka kobiecego zawierają trójglicerydy, fosfolipidy, cholesterol oraz długołańcuchowe wielonienasycone kwasy tłuszczowe, w tym kwas dokozaheksaenowy i arachidonowy, które odgrywają ważną rolę w rozwoju mózgu, siatkówki oka i układu immunologicznego. Tłuszcz jest najbardziej zmiennym makroskładnikiem mleka kobiecego, którego średnia wartość waha się od 21,6 g/L

do 53,5 g/L i jest zależna od: stopnia wypełnienia piersi, pory karmienia, okresu laktacji. Jednym z czynników wpływających na wahania zawartości tłuszczów jest ze stopień wypełnienia piersi. Stężenie tłuszczów wzrasta wraz z postępowaniem karmienia od 3,5 g/L przed rozpoczęciem karmienia do 106 g/L po jego zakończeniu [14, 18].

Białko występuje w stężeniu około 14–25 g/L w sianie i wczesnym mleku, po czym spada do 7–10 g/L w mleku dojrzałym. Niższa zawartość białka w mleku kobiecym, w porównaniu z mlekiem innych ssaków, odzwierciedla wolniejsze tempo wzrostu właściwe dla gatunku ludzkiego. W MK dominują białka serwatkowe (np. α -laktoalbumina, laktoferyna, lizozym, immunoglobuliny) i kazeiny. Białka mleka kobiecego cechują się wysoką biodostępnością i zawierają wszystkie niezbędne aminokwasy egzogenne, wpływając na prawidłowy wzrost i rozwój niemowląt. Ponadto aktywne białka MK o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, takie jak laktoferyna i lizozym, zapewniają ochronę przed infekcjami i stanami zapalnymi oraz promują homeostazę jelit [19, 20].



Rysunek 2. Odżywczy i poza odżywczy skład mleka kobiecego (opracowanie własne na podstawie przeglądu literatury)

Mleko kobiece zawiera szeroki zakres mikroskładników, tj. wapń, fosfor, magnez, sód, potas, żelazo, cynk, miedź i selen. Choć stężenie niektórych pierwiastków (np. żelaza) jest stosunkowo niskie, ich biodostępność pozostaje wysoka dzięki obecności czynników transportowych, takich jak np. laktoferyna, która wiąże żelazo i ułatwia jego wchłanianie. Profil witamin obejmuje zarówno witaminy rozpuszczalne w tłuszczach (A, D, E, K),

jak i w wodzie (witamina C oraz witaminy z grupy B). Zawartość niektórych witamin i minerałów, zwłaszcza witamin D i B12 oraz żelaza, może zależeć od stanu odżywienia matki i jej diety [21].

Poza funkcją odżywczą mleko kobiece zawiera liczne składniki aktywne biologiczne. Bioaktywne składniki żywności to takie, które wpływają na procesy biologiczne, a zatem mają wpływ na funkcjonowanie organizmu. Wśród składników bioaktywnych MK można wymienić m.in.

- a. przeciwciała: głównie wydzielnicza immunoglobulina A (sIgA, ang. *secretory Immunoglobulin A*) oraz wydzielnicza immunoglobulina G (sIgG, ang. *secretory Immunoglobulin G*),
- b. czynniki wzrostu: naskórkowy czynnik wzrostu (EGF, ang. *Epidermal Growth Factor*), insulinopodobny czynnik wzrostu I (IGF-I, ang. *insulin-like growth factor I*), insulinopodobny czynnik wzrostu II (IGF-II, ang. *insulin-like growth factor*), naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF, ang. *vascular endothelial growth factor*),
- c. cytokiny (interleukiny: IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, intyferon typu I i II, chemokiny) [22],
- d. hormony (insulina, prolaktyna, estrogen, leptyna, grelina),
- e. enzymy (laktaza, lipaza, proteaza),
- f. mikrobiota (omówiono w rozdziale 1.2),
- g. oligosacharydy (omówiono w rozdziale 1.3)
- h. laktoferyna (omówiona w rozdziale 1.4),
- i. komórki krwi: leukocyty, komórki macierzyste, komórki T, makrofagi [23].

Większość składników bioaktywnych (czynniki wzrostu, przeciwciała, cytokiny, hormony, enzymy czy komórki jądrazte) przenikają bezpośrednio z krwi matki, natomiast oligosacharydy produkowane są przez aparacie Golgiego w laktocytach. Bogactwo składników mleka kobiecego sprawia, że MK uznawane jest w środowisku naukowym za żywą, dynamiczną tkankę, zmieniającą skład podczas jednego karmienia, ale także w czasie całej laktacji [24, 25].

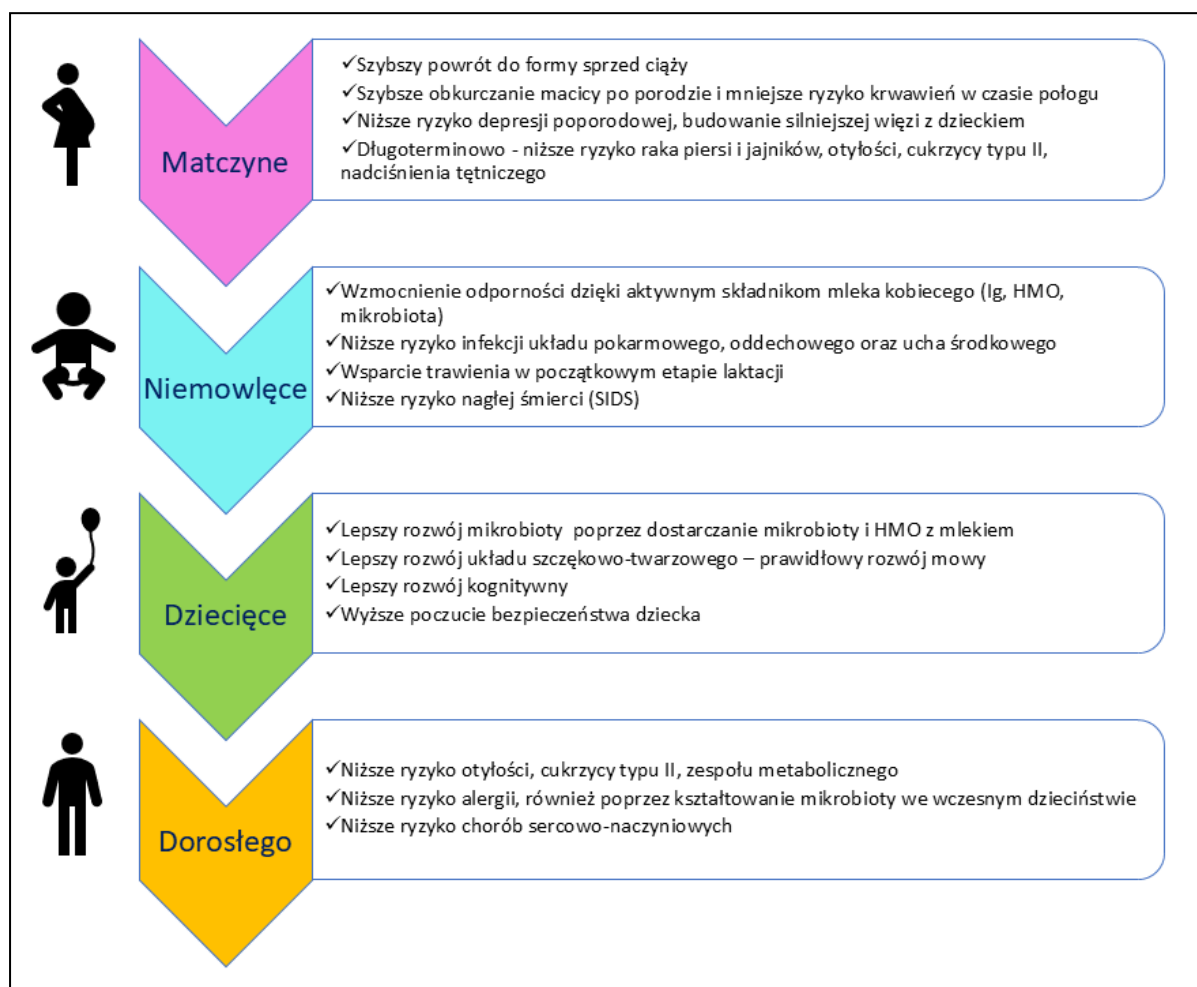
1.1.3 Zmienność składu mleka kobiecego

Skład mleka kobiecego kształtowany jest przez współdziałanie czynników genetycznych, fizjologicznych oraz środowiskowych, a jego profil zmienia się wraz z czasem trwania laktacji. Czynniki matczyne wpływające na skład mleka obejmują dietę, stan odżywienia, masę ciała, wiek, uwarunkowania genetyczne (np. status sekrecyjny determinujący profil oligosacharydów), stan zdrowia oraz mikrobiotę matki. Czynniki środowiskowe i fizjologiczne obejmują wiek ciążowy dziecka (np. mleko matek wcześniaków ma wyższe stężenie białka), rytm dobowy, a także stadium laktacji, częstotliwość karmień oraz różnice składu podczas pojedynczego aktu karmienia. Skład siary ulega znacznym zmianom podczas przejścia w mleko dojrzałe. Siara ma niską zawartość laktozy, a bogata jest w białko, immunoglobuliny i czynniki immunomodulujące [21]. Mleko dojrzałe cechuje się względnie stabilnym, uśrednionym profilem odżywczym, obejmującym około 7% laktozy, 3,5% tłuszczu oraz 1% białka. Taki skład utrzymuje się od około drugiego tygodnia po porodzie donoszonego noworodka do około 12. miesiąca życia dziecka i obserwowany jest w populacjach na całym świecie. Zmiany w składzie odżywczym zachodzące w obrębie jednego karmienia obejmują różnice pomiędzy mlekiem początkowym, a końcowym. Frakcja początkowa zawiera relatywnie więcej laktozy i mniej tłuszczu, natomiast frakcja końcowa jest istotnie bogatsza w lipidy oraz wykazuje wyższe stężenie białka [14, 18]. U matek w okresie przedłużonej laktacji, czyli po około roku od porodu, obserwuje się kolejne istotne zmiany w składzie mleka. W tym czasie mleko cechuje się wzrostem zawartości tłuszczu (średnio do około 5%) i białka (średnio do 1,4%), co odzwierciedla mechanizm adaptacyjny odpowiadający zwiększonemu zapotrzebowaniu energetycznemu i budulcowemu rozwijającego się dziecka [26, 27].

1.1.4 Znaczenie i korzyści karmienia piersią dla matki i dziecka

Karmienie piersią przynosi liczne korzyści zdrowotne zarówno matce jak i dziecku. W okresie bezpośrednio poporodowym karmienie piersią u kobiety karmiącej stymuluje wydzielanie oksytocyny, co sprzyja obkurczaniu macicy i zmniejsza ryzyko krwotoku poporodowego. W dłuższej perspektywie obserwuje się obniżenie ryzyka raka piersi, raka jajnika, cukrzycy typu 2, zespołu metabolicznego oraz chorób sercowo-naczyniowych. Karmienie piersią może również wspomagać powrót do masy ciała sprzed ciąży poprzez zwiększony wydatek energetyczny związany z produkcją mleka [28, 29]. Z perspektywy psychologicznej laktacja i bliski kontakt „skóra do skóry” sprzyja budowaniu więzi

emocjonalnej między matką a dzieckiem, a także mogą zmniejszać ryzyko depresji poporodowej poprzez neurohormonalne działanie oksytocyny i prolaktyny. Oksytocyna, określana jako „hormon więzi”, odgrywa istotną rolę w kształtowaniu relacji matka-dziecko oraz w poprawie dobrostanu emocjonalnego zarówno matki, jak i dziecka (Rysunek 3) [1, 30, 31].



Rysunek 3. Korzyści płynące z karmienia piersią dla matki i dziecka od narodzin do dorosłości [32] (opracowanie własne)

Mleko kobiece dostarcza wszystkich niezbędnych składników odżywczych w odpowiednich proporcjach oraz zawiera liczne substancje biologicznie aktywne wspierające rozwój układu odpornościowego, pokarmowego i nerwowego dziecka. Karmienie piersią odgrywa kluczową rolę w budowaniu odporności wrodzonej i nabytej niemowlęcia.

Dziecko rodzi się z niedojrzałym układem immunologicznym, który wymaga dalszego rozwoju oraz odpowiedniego wsparcia w procesie kształtowania prawidłowej odpowiedzi odpornościowej. Najliczniej występującymi przeciwciałami są sekrecyjne immunoglobuliny A i G (sIgA i sIgG), które osiągają najwyższe stężenia w mleku początkowym – siarze.

Przeciwciała te tworzą barierę ochronną na powierzchni błon śluzowych przewodu pokarmowego i oddechowego, ograniczając adhezję patogenów oraz ich translokację. Immunoglobuliny wykazują bezpośrednie działanie przeciwdrobnoustrojowe w jelitach, wiążąc się z toksynami bakteryjnymi, bakteriami i wirusami [33]. Ponadto, przeciwciała produkowane przez matkę w odpowiedzi kontakt z otaczającymi patogenami są przekazywane dziecku poprzez mleko wspierając jego odporność [34, 35].

Cytokiny, czynniki wzrostu oraz hormony są białkami regulującymi procesy biologiczne takie jak stan zapalny, wzrost i rozwój organizmu. Komórki jądrowe w mleku kobiecym mają różnorodne, swoiste funkcje. Makrofagi mleka kobiecego mają zdolność do różnicowania się w komórki dendrytyczne, które pobudzają aktywność limfocytów niemowlęcia. Dodatkowo, limfocyty wydzielają przeciwciała oraz cytokiny umożliwiające komunikację między limfocytami. Ta zdolność zapewnia ochronę przed patogenami, jednocześnie stymulując rozwój układu odpornościowego niemowlęcia. Skład i właściwości bioaktywnych składników nie są w pełni poznane. Wciąż trwają liczne badania w wielu ośrodkach akademickich, by lepiej poznać i zrozumieć skład mleka kobiecego i jego wpływ na karmione dziecko [21–23, 36–39].

Laktoferyna jest białkiem pełniącym liczne funkcje, m.in. wykazując działanie przeciwbakteryjne stanowiąc pierwszą linię obrony przed patogenami [33, 40]. Oligosacharydy mleka kobiecego działają jak prebiotyki, selektywnie stymulujące wzrost bakterii komensalnych i probiotycznych, głównie z rodzaju *Bifidobacterium*. HMO pełnią funkcję receptorów wabikowych (ang. *decoy receptors*), blokując wiązanie patogenów z nabłonkiem błon śluzowych układu pokarmowego dziecka [3]. Mikrobiota stanowi żywy komponent MK, aktywnie kolonizując dostępną niszę błon śluzowych karmionego dziecka. Transfer bakterii z mleka matki, wraz z prebiotycznym działaniem HMO, sprzyja powstawaniu mikrobioty o niskiej różnorodności, lecz wysokiej stabilności funkcjonalnej, co uznaje się za korzystny immunologicznie profil we wczesnym okresie życia [41–44].

W licznych badaniach wykazano, że dzieci karmione piersią rzadziej chorują na infekcje przewodu pokarmowego, zakażenia dróg oddechowych, zapalenie ucha środkowego oraz choroby alergiczne. Długoterminowe korzyści dla dziecka obejmują również zmniejszone ryzyko otyłości, cukrzycy typu 1 i 2, nadciśnienia tętniczego oraz niektórych chorób autoimmunologicznych [18, 45, 46]. Karmienie piersią wiąże się z korzystnym wpływem na rozwój neurokognitywny, co częściowo przypisuje się obecności długołańcuchowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (LC-PUFA, ang. *long-chain polyunsaturated fatty*

acids), takich jak kwas dokozaheksaenowy (DHA, ang. *docosahexaenoic acid*) czy kwas arachidonowy (ARA, ang. *arachidonic acid*) [45–47].

1.1.5 Karmienie piersią w Polsce i na świecie

Światowa Organizacja Zdrowia (WHO, ang. *World Health Organization*) rekomenduje wyłącznie karmienie piersią przez pierwsze 6 miesięcy życia dziecka, po czym kontynuację karmienia wraz z rozszerzaniem diety co najmniej do 2. roku życia lub dłużej, zgodnie z potrzebami matki i dziecka [32, 48]. Globalnie odsetek dzieci karmionych wyłącznie piersią do 6. miesiąca życia wynosi około 40–50%, przy czym obserwuje się znaczne zróżnicowanie regionalne. Najwyższe wskaźniki KP notuje się w krajach Afryki Subsaharyjskiej i Azji Południowej, natomiast najniższe w krajach wysoko uprzemysłowionych. W ujęciu globalnym, karmienie piersią stanowi ratunek przed niedoborami żywieniowymi dzieci, a z drugiej strony jest prewencją przed otyłością, co ma realne przełożenie na dobrostan dzieci, a w konsekwencji społeczeństwa. Upowszechnienie karmienia piersią zgodnie z rekomendacjami WHO wspiera rozwój dziecka oraz wiąże się z korzyściami ekonomicznymi dla rodzin i społeczeństwa, w tym z obniżeniem kosztów opieki zdrowotnej [32, 49–51].

W Polsce odsetek kobiet karmiących piersią po porodzie jest stosunkowo wysoki – około 97% kobiet deklaruje chęć karmienia piersią, a większość z nich rozpoczyna karmienie naturalne w pierwszych dobach życia dziecka. Procent kobiet karmiących wyłącznie piersią wyraźnie maleje w kolejnych miesiącach życia niemowlęcia. Szacuje się, że około 58% matek kontynuuje karmienie piersią, jednak często ma ono charakter mieszany, z jednoczesnym dokarmianiem mieszkanką mlekozastępczą [52]. Nie ma dokładnych danych na temat długości karmienia piersią przez Polki, ale szacuje się, że około 30–40% niemowląt jest karmionych wyłącznie piersią w wieku 3 miesięcy, natomiast w 6. miesiącu życia odsetek ten spada do kilku-kilkunastu procent. Głównymi przyczynami przedwczesnego zakończenia karmienia piersią są trudności laktacyjne – ból podczas karmienia, niewystarczająca ilość pokarmu oraz niewystarczające profesjonalne wsparcie, czynniki społeczne i zawodowe [53, 54].

1.2 Mikrobiota matki, dziecka i mleka kobiecego

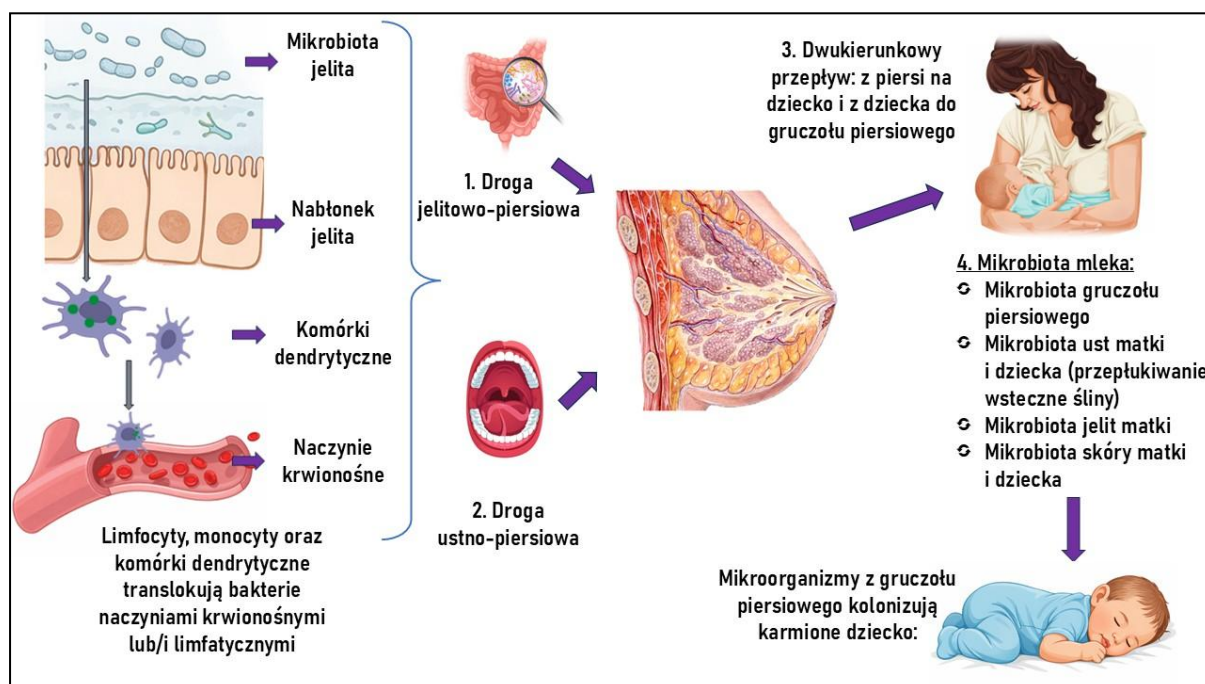
Mikrobiota matki stanowi kluczowe źródło drobnoustrojów uczestniczących w kolonizacji organizmu noworodka, a proces ten rozpoczyna się już w okresie okołoporodowym i jest kontynuowany przez cały okres karmienia piersią. W ostatnich latach

wykazano, że mleko kobiece nie jest płynem jałowym, lecz zawiera zróżnicowaną społeczność mikroorganizmów, obejmującą między innymi bakterie z rodzajów *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bifidobacterium* oraz bakterie kwasu mlekowego z rodziny *Lactobacillaceae*, które mogą uczestniczyć w kształtowaniu mikrobioty przewodu pokarmowego i jamy ustnej dziecka. Obecnie mikrobiota mleka kobiecego jest intensywnie badanym komponentem. Niewątpliwie w pierwszych 6 miesiącach po narodzinach dziecka zachodzą największe zmiany w składzie mleka kobiecego, nie tylko w składzie odżywczym, ale także w warstwie składników czynnych biologicznie jak i mikrobiomie [55, 56]. Ostatnie badania, bazujące na sekwencjonowaniu nowej generacji, wskazują na „rdzeń” mikrobioty mleka kobiecego, w skład którego wchodzi rodzaje: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Elizabethkingia*, *Variovorax*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Brevundimonas*, *Chryseobacterium*, *Enterobacter* oraz rodzina *Lactobacillaceae* [57].

1.2.1 Pochodzenie, skład i zmiany mikrobioty mleka kobiecego

Pierwotne pochodzenie mikrobioty mleka kobiecego nie zostało jednoznacznie wyjaśnione, a dostępne dane wskazują na jego wieloczynnikowy charakter. Zaproponowano kilka hipotez dotyczących potencjalnych źródeł mikroorganizmów w mleku kobiecym (Rysunek 4). W skład mikrobioty MK wchodzi bakterie pochodzące ze skóry matki oraz jamy ustnej dziecka, które mogą przedostawać się do gruczołu mlekowego drogą wstępującą i uczestniczyć w jego kolonizacji. Jednym z mechanizmów tego procesu jest tzw. przepływ wsteczny śliny (ang. *salivary backwash*). Zjawisko to zachodzi podczas karmienia dziecka, niewielka ilość śliny niemowlęcia wraz z mlekiem cofa się przez brodawkę sutkową do przewodów mlecznych. W ten sposób do gruczołu piersiowego mogą przedostawać się mikroorganizmy zarówno ze skóry i brodawki matki, jak i z jamy ustnej oraz skóry dziecka [58, 59]. Inną proponowaną hipotezą jest kolonizacja gruczołu piersiowego „drogą jelitowo-piersiową” (ang. *“entero-mammary pathway”*), zakładającą translokację bakterii z jelit do gruczołu piersiowego. W jelicie bakterie komensalne, szczególnie *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillaceae* spp. oraz niektóre *Streptococcus* spp., są wychwycone przez komórki układu immunologicznego związane z błoną śluzową (GALT – ang. *gut-associated lymphoid tissue*) tj. monocyty, limfocyty i komórki dendrytyczne. Komórki dendrytyczne wykazują zdolność transportu bakterii przez nabłonek jelitowy za pomocą wypustek między komórkowych, bez konieczności klasycznej fagocytozy. Następnie komórki immunologiczne migrują drogą

naczyń krwionośnych i limfatycznych, kierując bakterie do tkanki limfatycznej związanej z gruczołem piersiowym (MALT – ang. *mammary-associated lymphoid tissue*) oraz zrębu i nabłonka przewodów mlecznych. W gruczole piersiowym bakterie są uwalniane z komórek immunologicznych i przeniesione do światła przewodów mlecznych lub pozostają związane z komórkami np. leukocytami mleka. Proces ten ma miejsce w trakcie ciąży jak i laktacji, umożliwiając kolonizację dostępnych nisz w gruczole piersiowym. W ten sposób, mikrobiota jelita matki może bezpośrednio wpływać na kolonizację błon śluzowych dziecka karmionego piersią [60–63]. Kolejna hipoteza zakłada kolonizację „drogą ustno-piersiową” (ang. *“oro-mammary pathway”*), co wiąże się z obserwowanym podobieństwem mikrobiologicznym siary do mikrobioty jamy ustnej dziecka. Mechanizm ten może być zbliżony do „drogi jelitowo-piersiowej”. Jednakże ze względu na większe zainteresowanie badawcze koncepcją „drogi jelitowo-piersiowej”, hipoteza „drogi ustno-piersiowej” jest rzadziej uwzględniana w badaniach [61, 62, 64]. Kształtowanie mikrobioty mleka kobiecego to złożony proces, który rozpoczyna się już w trakcie trwania ciąży, a na ostateczny skład wpływa wiele czynników matczyno-środowiskowych (Rysunek 4).



Rysunek 4. Hipotetyczne ścieżki transferu mikroorganizmów do gruczołu mlekowego kobiety. Droga 1. jelitowo-piersiowa, 2. ustno-piersiowa, 3. przepłukiwanie wsteczne, 4. wymiana mikroorganizmów drogą kontaktu (opracowanie własne)

Mikrobiota siary charakteryzuje się stosunkowo niską różnorodnością, ale wysokim udziałem bakterii o właściwościach potencjalnie immunomodulujących, takich jak *Weissella* spp., *Leuconostoc* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Lactococcus* spp.

oraz *Lactobacillaceae* spp. [65]. Co więcej, badania Cabrera-Rubio i współpracowników sugerują, że droga porodu wpływa na skład mikrobiologiczny siary. U kobiet po porodzie drogami natury obserwuje się wyższą zawartością bakterii *Bifidobacterium* spp. i *Lactobacillaceae* spp., natomiast u kobiety po cięciu cesarskim stwierdza się odmienny profil mikrobiologiczny, z większym udziałem bakterii skórnych z rodzaju *Staphylococcus* [66].

Pierwsze dni karmienia piersią odgrywają kluczową rolę w inicjacji kolonizacji przewodu pokarmowego noworodka oraz w kształtowaniu wczesnej odpowiedzi immunologicznej [67, 68]. W fazie mleka przejściowego (2–4 tydzień laktacji) obserwuje się wzrost różnorodności mikrobiologicznej w mleku oraz stopniowe zmiany w strukturze społeczności bakteryjnych. Badania wskazują na zwiększony udział bakterii z rodzajów *Bifidobacterium* i *Veillonella*, a także tych związanych z jamą ustną oraz skórą – *Staphylococcus* spp i *Streptococcus* spp [69, 70]. Mleko dojrzałe cechuje się względnie stabilną, choć nadal dynamiczną mikrobiotą. W tym okresie obserwuje się dalsze przesunięcie w kierunku mikrobioty związanej z jamą ustną i skórą. Dominującymi rodzajami są *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Lactobacillus* i *Leptotrichia* [71]. Mleko dojrzałe zawiera około 10^6 jtk/mL (jtk – jednostek tworzących kolonię) bakterii, reprezentujących około 121 gatunków, m.in. *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium dentium*, *Lactobacillus rhamnosus* i *Staphylococcus epidermidis* oraz w mniejszym stopniu *Escherichia coli*, *Tyzzera nexilis*, *Eggerthella lenta*, *Ruminococcus torques* i *Roseburia intestinalis* [72, 73]. Należy jednak podkreślić, że pod pojęciem mleko dojrzałe może kryć się długi okres laktacji, w czasie którego na skład mikrobioty wpływają czynniki środowiskowe, zdrowie matki i dziecka, rozszerzenie diety niemowlęcia i.in. Zmiany mikrobioty mleka w trakcie laktacji mają istotne znaczenie dla zdrowia dziecka, wpływając na dojrzewanie organizmu oraz zmniejszając ryzyko rozwoju chorób alergicznych i metabolicznych. Zrozumienie tych dynamicznych procesów może w przyszłości przyczynić się do lepszego wsparcia żywienia niemowląt, zwłaszcza w sytuacjach klinicznych.

1.2.2 Skład, pochodzenie i rozwój mikrobioty dziecka

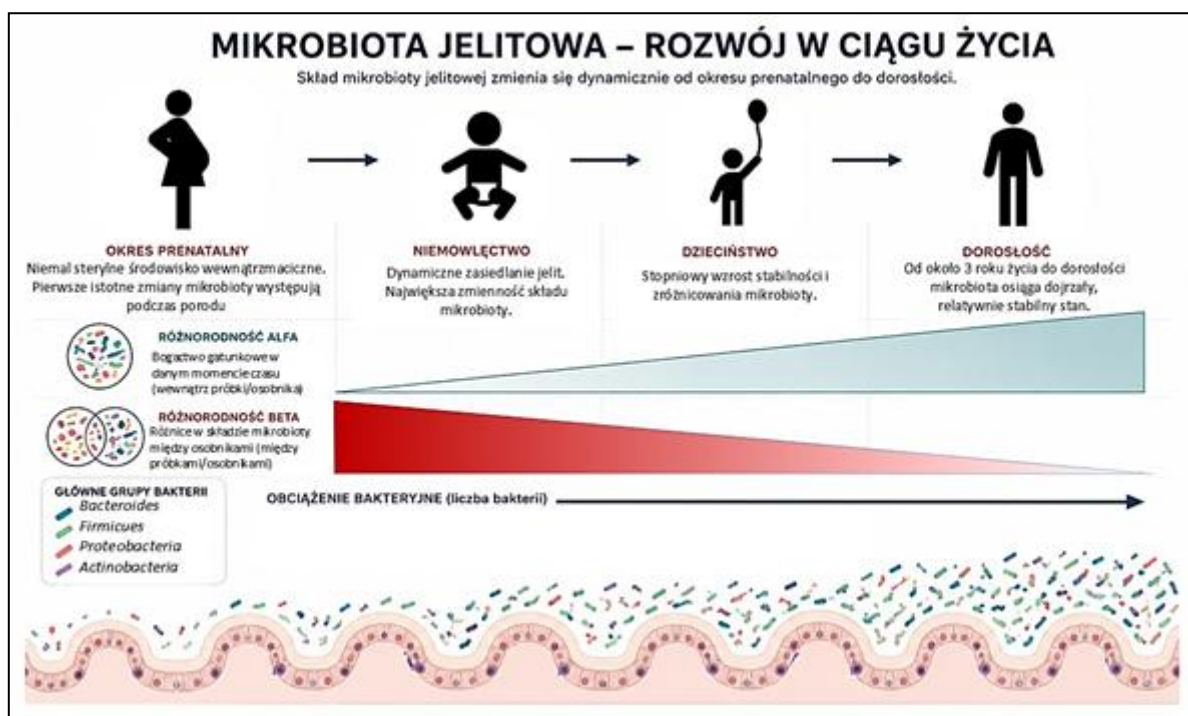
Kształtowanie i skład mikrobioty u nowonarodzonego dziecka jest ściśle związane z matczyną mikrobiotą, a ta zależna jest od szeregu czynników, takich jak: wiek matki, stan zdrowia, styl życia, dieta, stosowanie antybiotyków czy środków dezynfekujących w otoczeniu. Już w środowisku *in utero* kształtujący się płód ma kontakt z mikroorganizmami

(m.in. z typu *Firmicutes*, *Tenericutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* czy *Fusobacteria*), które w przyszłości będą wchodzić w skład jego własnej mikrobioty [74–76]. Po urodzeniu, w mikrobiocie jamy ustnej noworodka dominują bakterie z rodziny *Streptococcaceae*, *Staphylococcaceae*, *Gemellaceae*, *Pasteurellaceae* i *Lactobacillaceae* [77, 78]. KP sprzyja namnażaniu korzystnych bakterii, takich jak: *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitis*, *Bifidobacteria* spp. czy *Lactobacillaceae* spp., które wspierają utrzymanie równowagi mikrobiologicznej oraz pełnią funkcję ochronną przed patogenami. Początkowy skład mikrobioty błon śluzowych dziecka zależy od sposobu narodzin. Dzieci urodzone drogami natury wykazują bardziej złożoną mikrobiotę, z liczniejszym udziałem rodzaju *Lactobacillus* w porównaniu z dziećmi urodzonymi drogą cięcia cesarskiego [79, 80]. Poród drogami natury będzie związany z kolonizacją dziecka bakteriami dróg rodnych i okolic, m.in. z rodzajów *Lactobacillus* oraz *Prevotella*. Poród drogą cięcia cesarskiego ogranicza kontakt fizyczny dziecka z matką, nie ma miejsca przechodzenie przez kanał rodny matki, co naraża dziecko na kolonizację szpitalnymi mikroorganizmami środowiskowymi oraz mikrobiotą skórą matki i personelu medycznego. Badania naukowe wskazują na mniejszą różnorodność mikrobioty jelitowej u dzieci urodzonych cięciem cesarskim w pierwszych dniach życia. Co więcej, u dzieci po cięciu cesarskim rzadziej występują bakterie z rodzajów *Bifidobacterium* i *Bacterioides*, przy jednoczesnym częstszym występowaniem bakterii z rodzaju *Clostridioides* w mikrobiocie jelitowej. Natomiast praca przeglądowa Steward i wsp. wynika, że KP wpływa na obecność *Bifidobacterium* spp. w przewodzie pokarmowym karmionego piersią dziecka na każdym etapie karmienia piersią [73]. Takie bogactwo pre- i probiotyczne sprawia, że wyłączenie karmienia mlekiem kobiecym może zniwelować zubożenie mikrobiologiczne po porodzie drogą cięcia cesarskiego, jak również po okresie karmienia dziecka preparatami zastępującymi mleko kobiece, lub w sposób mieszany [81, 82].

Różnice w składzie mikrobioty z czasem zmniejszają się, jednakże heterogeniczność mikrobioty ze względu na rodzaj porodu może utrzymywać się nawet do 12 miesięcy życia dziecka [83–87]. Po narodzinach początkowy skład mikrobiologiczny błon śluzowych jamy ustnej dziecka zdominowany jest bakterie z rodzaju *Streptococcus* i *Staphylococcus*. W kolejnych miesiącach kolonizacja błon śluzowych niemowlęcia coraz silniej związana jest z czynnikami środowiskowymi. Stanowią one przede wszystkim sposób karmienia, szeroko pojęty stan zdrowia matki i dziecka, stosowanie antybiotyków, obecność zwierząt

i rodzeństwa w otoczeniu dziecka, jak również sposób sprawowania opieki – domowa (indywidualna) czy w placówce opiekuńczej (np. żłobki) [76, 88–91].

W okresie niemowlęcym skład mikrobiologiczny błon śluzowych jamy ustnej wzbogaca się o kolejne gatunki mikroorganizmów, a badania naukowe wskazują na wzrost różnorodności od narodzin do szóstego miesiąca życia, co może stanowić krytyczny okres dla rozwoju mikrobioty niemowlęcia. Od rozpoczęcia drugiego półrocza, wraz z rozszerzaniem diety oraz większej mobilności dziecka, mikrobiota jest coraz intensywniej wzbogacana o mikroorganizmy pochodzące ze środowiska. Proces jej kształtowania trwa kolejne lata, a po upływie około 3. roku życia stabilizuje się i przypomina mikrobiotę osoby dorosłej [92–94].



Rysunek 5. Schematyczne przedstawienie rozwoju mikrobioty u dzieci w pierwszych latach życia, z uwzględnieniem zmian dominujących rodzajów bakterii oraz wzrostu różnorodności alfa i beta (rysunek na podstawie [95], z własnymi modyfikacjami)

Różnorodność mikrobiologiczną ocenia się za pomocą współczynników alfa i beta (Rysunek 5). Współczynnik różnorodności alfa mówi o zróżnicowaniu mikrobioty u jednego osobnika (dziecka) w konkretnym momencie. W okresie noworodkowym do około szóstego miesiąca życia dziecka fizjologicznie występuje niski współczynnik alfa, po czym następuje gwałtowny wzrost, który stabilizuje się około 2–3 roku życia. Współczynnik różnorodności beta opisuje różnice mikrobioty między osobnikami (dziećmi) w tym samym wieku lub u tej samej osoby, ale w różnym czasie. We wczesnym okresie życia występuje bardzo duża

różnorodność pomiędzy poszczególnymi dziećmi, ponieważ mikrobiota osobnicza zależna jest od indywidualnych czynników środowiskowych. Z czasem współczynnik beta maleje między dziećmi, aż w trzecim roku życia skład mikrobioty dzieci jest podobny do składu dorosłych i charakteryzuje się głównie dwoma głównymi typami: *Bacteroidetes* i *Firmicutes*. Różnorodność alfa i beta razem stanowią ogólną różnorodność lub heterogeniczność mikrobiologiczną badanych zbiorowisk [61, 75, 96]. Rysunek 4 przedstawia ogólne zmiany w składzie mikrobioty rosnącego dziecka z uwzględnieniem zmian różnorodności alfa i beta.

1.2.3 Znaczenie mikrobioty dziecka

Mikrobiota jamy ustnej i błon śluzowych jelit nowonarodzonego dziecka ma istotne znaczenie dla zdrowia rozwijającego się organizmu. Oprócz wyżej opisanej funkcji ochronnej przed czynnikami patogennymi, bakterie jelitowe mają umiejętność syntezy ważnych dla zdrowia molekuł. Szczególne znaczenie w tym procesie przypisuje się bakteriom probiotycznym, zwłaszcza z rodzaju *Bifidobacterium* oraz *Lactobacillus* [75, 97, 98]. Probiotyczne bakterie jelitowe są zdolne do fermentacji HMO, wytwarzając przy tym krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (SCFA, ang. *Short-chain fatty acids*). W skład SCFA wchodzi m.in. kwas octowy (C2), kwas propionowy (C3), kwas masłowy (C4), kwas izomasłowy (iC4), kwas 2-metylomasłowy (mC4), kwas walerianowy (C5) i kwas izowalerianowy (iC5). SCFA odgrywają istotną rolę w dojrzewaniu bariery jelitowej i ochronie przed patogenami. Stanowią również mediatory komunikacji między mikrobiotą jelitową, układem odpornościowym a ośrodkowym układem nerwowym. Poprzez modulację odpowiedzi immunologicznej wpływają na utrzymanie równowagi między odpowiedzią pro- i przeciwzapalną, a także indukują różnicowanie limfocytów T regulatorowych. W konsekwencji działania te wspierają kształtowanie adekwatnej odpowiedzi immunologicznej, co ma istotne znaczenie w kontakcie rozwoju młodego organizmu i jego układów fizjologicznych [99–103].



Rysunek 6. Wpływ karmienia piersią na kształtowanie mikrobioty jamy ustnej i przewodu pokarmowego niemowlęcia (opracowanie własne na podstawie przeglądu literatury)

Wczesny rozwój mikrobioty jelitowej ma szczególne znaczenie dla zdrowia w późniejszych etapach życia. Karmienie piersią wspiera prawidłową kolonizację jamy ustnej i przewodu pokarmowego niemowlęcia, co wiąże się ze zmniejszonym ryzykiem infekcji oraz niższą predyspozycją do próchnicy, otyłości, schorzeń sercowo-naczyniowych, chorób o podłożu zapalnym, alergicznym i autoimmunologicznym [92–94, 104]. Dodatkowo, mikrobiota jelitowa uczestniczy w regulacji osi jelito-mózg, co sugeruje istnienie potencjalnego związku pomiędzy wczesnym sposobem żywienia a rozwojem funkcji neuropsychicznych (Rysunek 6) [105–107].

Jakościowe badania opisujące długoterminowe zmiany mikrobioty oraz wpływ czynników zewnętrznych są nieliczne lub obarczone istotnymi ograniczeniami metodologicznymi [73, 94, 108]. W związku z tym istnieje potrzeba pogłębienia wiedzy na temat długoterminowych czynników kształtujących mikrobiotę oraz jej wpływ na zdrowie rozwijającego się organizmu.

1.2.4 Wpływ sposobu żywienia i podawania pokarmu na mikrobiotę błon śluzowych niemowlęcia

Jama ustna, obok jelit stanowi jedno z najbogatszych w mikroorganizmy siedlisk ludzkiego organizmu. Kształtowanie mikrobioty jest procesem dynamicznym, rozpoczynającym się we wczesnym okresie życia i zależnym od wielu czynników. Wśród nich

szczególne znaczenie przypisuje się wczesnym praktykom żywieniowym. Wczesne praktyki żywieniowe to sposób podawania pokarmu – karmienie piersią, karmienie mlekiem kobiecym butelką, karmienie mieszane lub karmienie preparatami zastępujące mleko kobiece (PZMK), a w dalszej perspektywie, rozszerzenie diety niemowlęciu [77]. Dostępne badania wskazują, że dzieci karmione piersią wykazują wyższe wskaźniki różnorodności mikrobiologicznej jamy ustnej w porównaniu do dzieci karmionych PZMK [108, 109].

W jamie ustnej u dwumiesięcznych dzieci karmionych piersią w porównaniu z dziećmi karmionymi PZMK obserwuje się większą obecność bakterii z rodzaju *Streptococcus* i mniejszą liczebność bakterii z rodzaju *Veillonella* [77, 109, 110]. W wieku trzech miesięcy, bakterie z rodzaju *Lactobacillus* obserwuje się wyłącznie u dzieci karmionych wyłącznie lub częściowo piersią [109, 111]. Badanie Butler i. in. wskazuje istotnie wyższą różnorodność bakteryjną u dwumiesięcznych niemowląt karmionych PZMK, związaną ze zwiększoną liczebnością bakterii z rodzaju *Veillonella* i gatunków z typu *Bacteroidetes* w porównaniu z niemowlętami karmionymi piersią. Różnice te, prawdopodobnie odzwierciedlają rolę pro- i prebiotyczną mleka matki w selekcji mikroorganizmów zasiedlających jamę ustną we wczesnym okresie życia [97, 111]. Bakterie z rodzaju *Streptococcus* (w szczególności *Streptococcus salivarius* i *Streptococcus mitis*), dominujące u dzieci karmionych mlekiem kobiecym, są uważane za korzystne dla zdrowia gospodarza. Wynika to z ich właściwości immunomodulujących oraz zdolności do ograniczania kolonizacji drobnoustrojów patogennych. Ponadto obecność *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactobacillus gasseri* i *Limosilactobacillus vaginalis* w mikrobiocie jamy ustnej działa hamująco na selekcję i wzrost bakterii próchnicznych *Streptococcus mutans* (Rysunek 7) [111, 112].



Rysunek 7. Wpływ sposobu karmienia na kolonizację karmionego dziecka na wczesnym etapie życia (opracowanie własne stworzone na bazie przeglądu literatury)

Mikrobiota jamy ustnej dzieci karmionych wyłącznie PZMK charakteryzuje się zmniejszoną różnorodnością mikrobiologiczną oraz zwiększoną kolonizacją bakterii potencjalnie patogennych, tj. *Staphylococcus aureus* czy z rodzaju *Enterobacteriaceae*. Różnice te prawdopodobnie odzwierciedlają rolę pro- i prebiotyczną mleka matki w selekcji mikroorganizmów zasiedlających jamę ustną we wczesnym okresie życia. Zjawisko to może wiązać się także z różnicami w zawartości oraz pochodzenia składników bioaktywnych względem mleka kobiecego. W przypadku karmienia mieszanego, mikrobiota jamy ustnej wykazuje cechy pośrednie – występują zarówno bakterie charakterystyczne dla dzieci karmionych piersią jak i typowych dla dzieci karmionych PZMK [113, 114].

1.3 Oligosacharydy w mleku kobiecym

Oligosacharydy (od greckiego ὀλίγος olígos, „kilka” i σάκχαρ sácchar, „cukier”) to krótkołańcuchowe polimery sacharydów, zbudowane zazwyczaj 3–22 podjednostek monosacharydów. Aktualne badania wskazują, że HMO stanowią trzeci pod względem ilości składnik mleka kobiecego (po laktozie i tłuszczach), osiągając stężenie 5–25 g/L. Stężenie HMO zmienia się w zależności od etapu laktacji. W siarze osiąga najwyższe wartości i wynosi około

20–25 g/L (średnio 9–22 g/L). W mleku dojrzalym obniża się do 8–19 g/L (średnio 10–15 g/L), natomiast po 6 miesiącach laktacji spada do około 4–6 g/L. Mleko kobiet, które urodziły dzieci przedwcześnie wykazuje wyższą koncentrację HMO niż mleko matek, które urodziły o czasie [115]. Szacuje się, że donoszone niemowlę spożywające około 800 mL mleka kobiecego dziennie przyjmuje przeciętnie około 10 g HMO na dobę [43]. Wykazano ponadto, że mleko kobiece zawiera od 100 do 1000 razy większe stężenie oligosacharydów w porównaniu z mlekiem pochodzącym od innych ssaków [44].

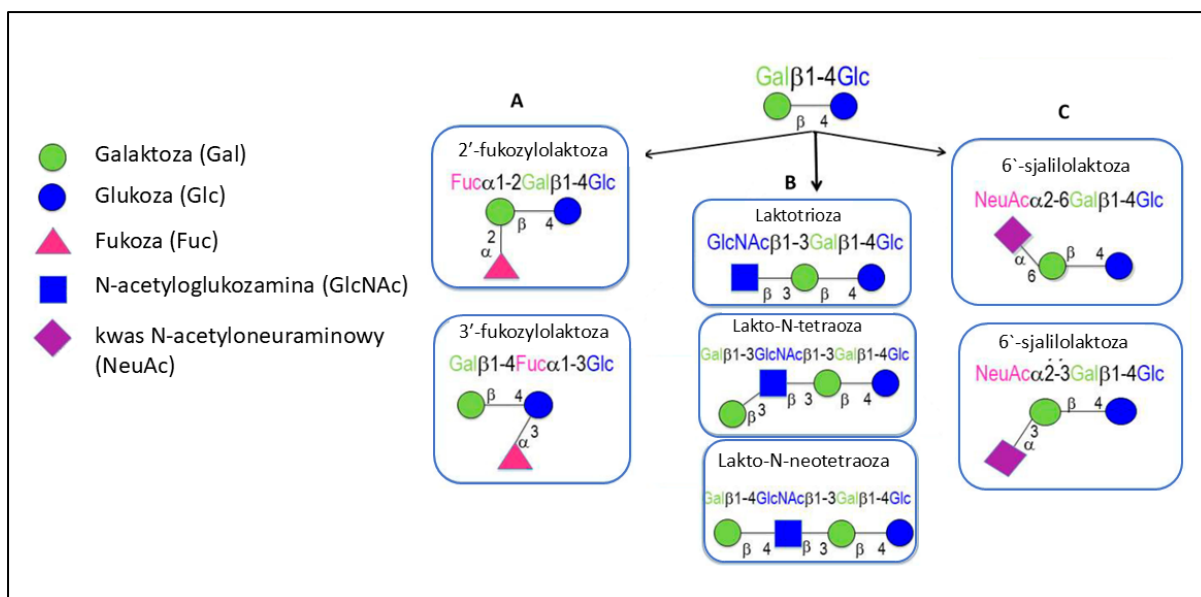
1.3.1 Budowa i znaczenie oligosacharydów mleka kobiecego

W wyniku intensywnego rozwoju badań z zakresu glikomiki dotychczas scharakteryzowano ponad 200 odrębnych struktur HMO. Oligosacharydy mleka kobiecego składają się z 5 podstawowych cukrowych komponentów budulcowych występujących w heterogenicznych sekwencjach i orientacjach. Są to: galaktoza (Gal), glukoza (Glc), N-acetyloglukozamina (GlcNAc), fukoza (Fuc) i pochodna kwasu sjałowego (Sia) – kwasu N-acetyloneuraminowego (NeuAc) [116, 117].

Oligosacharydy mleka kobiecego są zbudowane na szkielecie laktozy, który ulega dalszym modyfikacjom poprzez przyłączanie reszt fukozy, N-acetylolaktozaminy lub/i kwasu sjałowego. Po przyłączeniu do laktozy fukozy na końcu Gal w wiązaniu α 1-2 powstaje 2'-fukozylolaktoza (2'-FL), natomiast dołączenie Fuc na końcu redukującym Glc w wiązaniu α 1-3 tworzy 3-fukozylolaktozę (3'-FL) (Rysunek 8 A). Inną opcją modyfikacji laktozy jest wydłużenie końca redukującego Gal poprzez dodanie N-acetylolaktozaminy (Gal β 1-3GlcNAc lub Gal β 1-4GlcNAc) połączonej wiązaniem β 1-3 lub β 1-4. Powstaje wówczas odpowiednio lakto-N-tetraoza (LNT) lub lakto-N-neotetraoza (LNnT) (Rysunek 8 B). Alternatywnie laktozę można zmodyfikować poprzez włączenie kwasu sjałowego na terminalnym końcu Gal w wiązaniu α 2-3 lub α 2-6, tworząc odpowiednio 3'-sjałilolaktozę (3'-SL) i 6'-sjałilolaktozę (6'-SL) (Rysunek 8 C). Efektem tych modyfikacji jest podział HMO na trzy kategorie:

1. neutralne fukozylowane,
2. neutralne,
3. sjałizowane.

Głównymi oligosacharydami w mleku kobiecym są neutralne fukozylowane HMO stanowiące 50–70% ogólnej frakcji. Neutralne stanowią 20–35%, a sjałowane 10–15% wszystkich oligosacharydów mleka kobiecego [118].



Rysunek 8. Podstawowe struktury oligosacharydów (na podstawie [118] z własnymi modyfikacjami)

HMO Wykazują różnorodne właściwości zależne od struktury i budowy [119]. Są to wiązki w dużej mierze odporne na trawienie w przewodzie pokarmowym niemowlęcia. Jedynie ok. 1% HMO jest wchłaniana do krwiobiegu, podczas gdy reszta jest metabolizowana przez bakterie jelitowe lub wydalana z kałem [120]. HMO służą głównie jako funkcjonalny prebiotyk, stymulując wzrost niektórych korzystnych szczepów bakterii, takich jak *Bifidobacterium infantis* [42], co sprzyja utrzymaniu równowagi mikrobioty jelitowej. Obecność w mleku oligosacharydów wspiera dojrzewanie bariery jelitowej dziecka, zmniejszając ryzyko chorób zapalnych jelita ograniczając kolonizację patogenów [116, 117]. HMO wykazują podobieństwo strukturalne do glikokaliksu nabłonka jelitowego, który stanowi miejsce przyczepiania się wielu patogenów do ściany jelita. Dzięki temu mikroorganizmy chorobotwórcze wiążą się z HMO zamiast z komórkami nabłonka. Następnie są usuwane z organizmu wraz z treścią pokarmową, nie powodując zakażenia. Badania naukowe wykazują zmniejszenie ryzyka częstości występowania biegunki związanej z infekcją *Caplylobacter* spp. u dzieci karmionych piersią [121–124]. Norowirusy i rotawirusy są przykładami patogenów, które wykorzystują glikany glikokaliksu nabłonka jelitowego do adhezji i zakażenia, w analogicznym mechanizmie co patogeny bakteryjne. Oligosacharydy mleka kobiecego mogą działać jako receptory-wabiki, ograniczając wiązanie wirusów do komórek gospodarza i zmniejszając ryzyko infekcji u niemowląt karmionych piersią [124].

Oligosacharydy mleka kobiecego mają również zdolność modulowania układu immunologicznego dziecka. Obecny w świetle jelita lipopolisacharyd bakteryjny (LPS) może aktywować komórki układu immunologicznego, tj. limfocyty o makrofagi indukując produkcję cytokin i nasilając reakcje zapalną, co w konsekwencji może prowadzić do uszkodzenia błony śluzowej jelita. Wykazano, że sjalilowane HMO ograniczają tę odpowiedź poprzez zmniejszenie ekspresji cytokin prozapalnych – IL-1 β i IL-6 [117, 125].

1.3.2 Zmienność składu oligosacharydów w mleku kobiecym

Dotychczasowe badania wykazały indywidualne różnice w stężeniu oraz profilu oligosacharydów mleka kobiecego, które nie wynikają wyłącznie z etapu laktacji. Na ich zróżnicowanie wpływa wiele czynników matczynych i okołoporodowych, ale także czynniki demograficzne i środowiskowe. Wśród najistotniejszych wymienia się: rasę, pochodzenie etniczne, region geograficzny zamieszkania czy pory roku. Ponadto profil HMO może być modulowany przez dietę matki, jej stan fizjologiczny, liczbę przebytych porodów, wiek ciążowy noworodka oraz sposób zakończenia ciąży (poród drogami natury lub cięcie cesarskie) [119, 126]. Ponadto istotnym czynnikiem determinującym skład oligosacharydów mleka kobiecego, jest profil genetyczny matki związany ze statusem sekrecyjnym oraz fenotyp grupy krwi. System antygenów Lewisa stanowi ludzki układ grup krwi uwarunkowany przez geny zlokalizowane na chromosomie 19: w regionie 19p13.3 (gen *FUT3*, ang. *fucosyltransferase 3*, określany jako gen Lewisa – *Le*) oraz 19q13.3 (gen *FUT2*, ang. *fucosyltransferase 2*, tzw. gen sekrecyjny – *Se*). W zależności od aktywności genów *FUT2* i *FUT3* wyróżnia się cztery główne fenotypowe wzorce HMO: Se^+Le^+ , Se^-Le^+ , Se^+Le^- oraz Se^-Le^- . Oba geny ulegają ekspresji w komórkach nabłonka gruczołu mlekowego. Allele dominujące genów kodujących fukozylotransferazy (FUT) determinują syntezę funkcjonalnych enzymów o zachowanej aktywności biologicznej. Allele recesywne są niefunkcjonalne, co prowadzi do braku lub istotnego obniżenia aktywności enzymatycznej. Szacuje się, że około 20% kobiet wykazuje brak funkcjonalnej aktywności enzymu *FUT2* (fenotyp niesekrecyjny). Skutkuje to wytwarzaniem mleka o obniżonej zawartości niektórych oligosacharydów, w szczególności pozbawionego struktur α 1,2-fukozylowanych, takich jak 2'-fukozylolaktoza (2'FL) oraz lakto-N-fukopentaoza I (LNFP I) [127–129].

Ilościowe i jakościowe oznaczanie oligosacharydów mleka kobiecego stanowi istotne wyzwanie analityczne ze względu na ich znaczną zmienność biologiczną, zarówno

międzyosobniczą, jak i wewnątrzosobniczą. Dodatkowym utrudnieniem analiz jest wysoka złożoność składu mleka kobiecego oraz skomplikowana struktura tych związków oraz szeroki zakres stężeń poszczególnych komponentów. Niemniej jednak obiecujące perspektywy dla pogłębienia wiedzy na temat HMO stwarzają badania z zakresu glikomiki. Są to analizy oparte na zaawansowanych technikach spektrometrii mas, w szczególności sprzężonych z wysokosprawną chromatografią cieczową (LC-MS, ang. *liquid chromatography-mass spectrometry*), które umożliwiają coraz bardziej precyzyjną charakterystykę jakościową i ilościową profilu HMO [130].

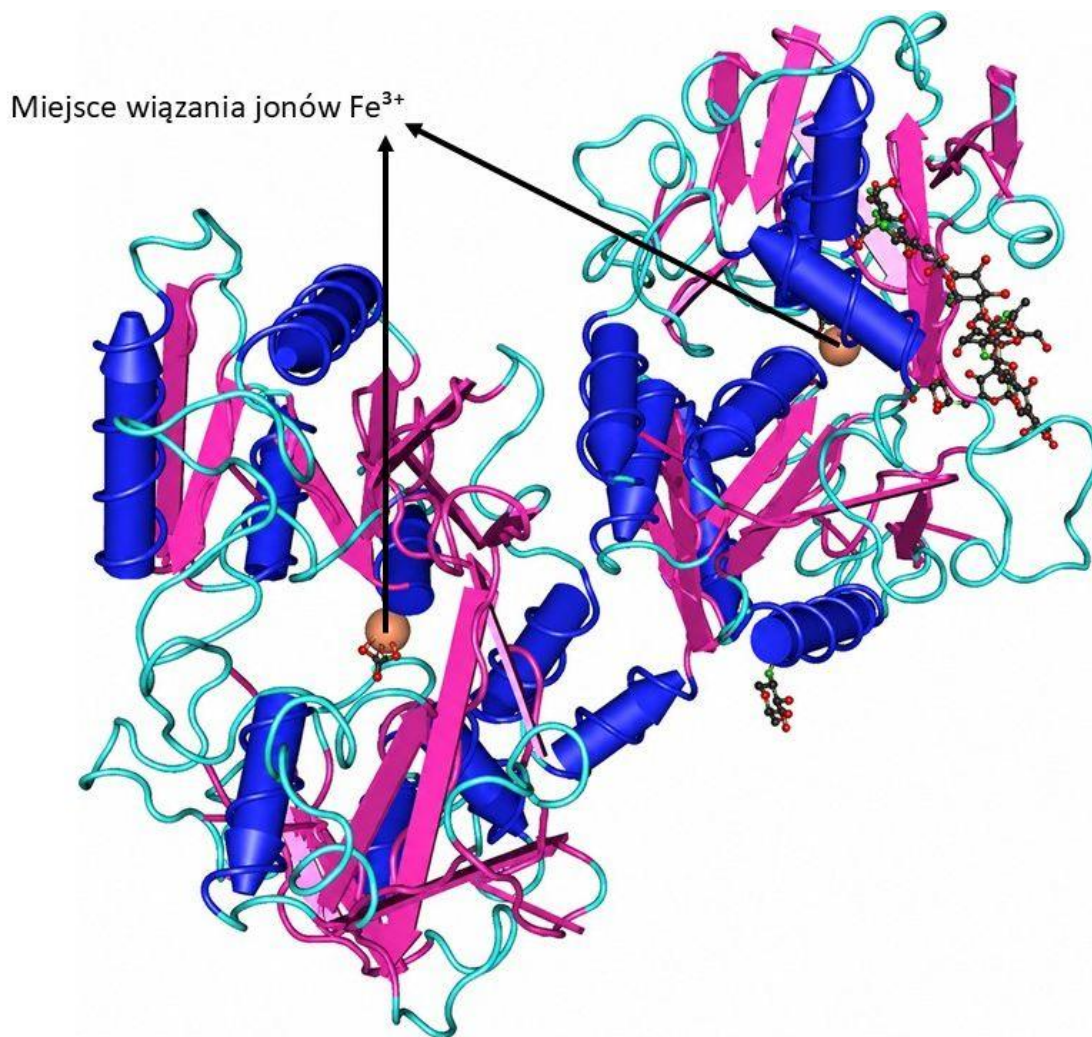
1.4 Laktoferyna w mleku kobiecym

Laktoferyna (lub laktotransferyna, LF, ang. *lactoferrin*) to glikoproteina o barwie od czerwonej do łososiowo-różowej z rodziny białek transferyn będąca nośnikiem i magazynem jonów żelaza. Najwyższe stężenie osiąga w sianie i wynosi 5–7 g/L, w mleku dojrzalym spada do 1–3 g/L. Niemniej jednak wysokie stężenie laktoferyny w mleku sprawia, że jest drugim po kazeinie najczęściej występującym białkiem mleka kobiecego, stanowiąc około 20% wszystkich białek [131, 132]. Glikoproteina ta jest wydzielana przez komórki nabłonkowe błon śluzowych, co sprawia, że jest powszechnie występującym białkiem, nie tylko w mleku kobiecym. Obecność LF wykazano w licznych wydzielinach błon śluzowych, tj. łzach, ślinie, wydzielinie pochwowej, nasieniu, wydzielinie nosowej i oskrzelowej oraz płynach żołądkowo-jelitowych [133, 134].

1.4.1 Budowa chemiczna i znaczenie laktoferyny

Laktoferyna została po raz pierwszy zidentyfikowana w 1939 roku w mleku krowim, natomiast jej izolacji dokonano w 1960 roku. Od tego czasu obserwuje się dynamiczny rozwój badań nad tym białkiem, czego efektem jest poznanie szerokiego spektrum funkcji biologicznych. Laktoferyna jest glikoproteina o masie cząsteczkowej wynoszącej około 80 kDa, zbudowaną z ponad 700 reszt aminokwasowych [135]. Punkt izoelektryczny LF wynosi 8,0–8,5, co oznacza, że przy fizjologicznym pH 7,4 jest naładowana dodatnio [136]. W 1984 roku szczegółowo scharakteryzowano strukturę molekularną oraz sekwencję aminokwasową ludzkiej laktoferyny. Cząsteczka laktoferyny zbudowana jest z dwóch płatów o zbliżonej konformacji przestrzennej. Każdy z płatów zawiera specyficzne miejsce wiązania jonów żelaza

(Fe^{3+}), zlokalizowane w szczelinie pomiędzy dwoma poddomenami (Rysunek 9). Stabilizację kompleksu zapewnia anion towarzyszący, najczęściej węglanowy (CO_3^{2-}). Laktoferyna ma odwracalną zdolność wiązania jonów żelaza, a trójwymiarowa konformacja LF zmienia się zależnie od występowania związanego żelaza w cząsteczce. Przyłączenie do LF jonów żelaza powoduje zmianę budowy przestrzennej cząsteczki z formy otwartej (apo-laktoferyna) do formy zamkniętej (holo-laktoferyna). Forma holo-laktoferyny zwiększa stabilność cząsteczki oraz jej odporność na proteolizę [134, 136, 136, 137].



Rysunek 9. Trójwymiarowa struktura laktoferyny związana z jonem żelaza – pomarańczowa kulka w centrum obu płatów laktoferyny (modyfikacja na podstawie [137])

Specyficzna budowa cząsteczki laktoferyny wykazująca wielokierunkową aktywność biologiczną oraz wysokie stężenia mleku kobiecym sprawia, że LF stanowi jeden z kluczowych składników białkowych MK. LF wykazuje znaczną odporność na degradację proteolityczną w przewodzie pokarmowym dziecka karmionego mlekiem kobiecym. Potwierdza to obecność biologicznie aktywnej, niezmienionej formy LF w stolcu noworodków i niemowląt. Jako jeden

z kluczowych czynników immunologicznych mleka kobiecego, LF odgrywa istotną rolę w ochronie dziecka przed zakażeniami wykazując liczne mechanizmy przeciwdrobnoustrojowe, immunomodulujące i przeciwzapalne [135, 138, 139]. Jednym z takich mechanizmów jest wiązanie jonów żelaza w ognisku zakażenia przez LF, co ogranicza dostępność tego pierwiastka dla bakterii patogennych. Prowadzi to do zahamowania namnażania się mikroorganizmów poprzez efekt bakteriostatyczny. Innym mechanizmem jest bezpośrednie oddziaływanie cząsteczki LF z patogenem. Dodatkowo naładowane reszty aminokwasowe obecne w strukturze laktoferyny mogą oddziaływać elektrostatycznie z ujemnie naładowanymi składnikami powierzchniowymi drobnoustrojów. Przykładami takich struktur są kwas lipotejchojowy, lipopolisacharydy czy inne anionowe komponenty ściany komórkowej bakterii, a także struktury powierzchniowe wirusów, grzybów i pasożytów. Interakcje te prowadzą do destabilizacji integralności błon i ścian komórkowych patogenów, zwiększając ich podatność na uszkodzenia oraz powodując lizę komórkową, m.in. poprzez nasilenie działania enzymów hydrolitycznych, takich jak lizozym [137, 140, 141]. Z drugiej strony badania *in vitro* sugerują korzystny wpływ LF na wzrost *Bifidobacterium*, stymulując wzrost tych probiotycznych bakterii, natomiast w badaniach *in vivo*, nie wykazano jednoznacznie takiego efektu [138].

2 CEL PRACY

Badania nad mlekiem kobiecym mają istotne znaczenie naukowe, kliniczne i społeczne, odgrywając kluczową rolę w rozwoju wiedzy z zakresu żywienia i zdrowia niemowląt. Badania poszczególnych składników oraz ich funkcji pozwalają lepiej zrozumieć mechanizmy odpowiedzialne za ochronne działanie karmienia piersią, a także stanowi podstawę do opracowywania strategii żywieniowych stosowanych we wczesnym okresie życia. Na etapie projektowania niniejszego badania stwierdzono lukę badawczą dotyczącą wzajemnych zależności pomiędzy składem mikrobiologicznym a zawartością oligosacharydów oraz laktoferyny, a także wpływu tych składników na kolonizację jamy ustnej dziecka karmionego piersią. Stąd wydaje się, że przedstawione badanie stanowi cenne uzupełnienie dostępnej literatury, ponieważ łączy ocenę mikrobiologiczną zarówno mleka, jak i jamy ustnej karmionego dziecka, a także analizę zawartości oligosacharydów oraz laktoferyny w mleku kobiecym.

2.1 Hipotezy badawcze

Analiza dostępnej literatury naukowej wskazuje, że skład mleka kobiecego, zarówno mikrobiologiczny, jak i biochemiczny, ma wpływ na kolonizację mikrobiologiczną organizmu dziecka, w tym jamy ustnej i przewodu pokarmowego [41]. Na podstawie aktualnych danych naukowych dotyczących mikrobiomu mleka kobiecego, mikrobiomu jamy ustnej niemowląt karmionych piersią, laktoferyny oraz oligosacharydów mleka kobiecego, można zaproponować następujące hipotezy:

1. Mleko kobiece zawiera mikroorganizmy stanowiące źródło bakterii komensalnych dla kształtującej się mikrobioty karmionego piersią dziecka.
2. Skład jakościowy mikrobioty mleka kobiecego koreluje ze składem mikrobioty jamy ustnej niemowląt karmionych piersią.
3. Różnorodność mikrobiologiczna mleka kobiecego wpływa na różnorodność mikrobiologiczną jamy ustnej niemowlęcia.
4. Stężenie laktoferyny w mleku kobiecym zmienia się w trakcie laktacji i wpływa na zmiany składu mikrobioty jamy ustnej dziecka.
5. Całkowite stężenie HMO w mleku kobiecym zmienia się w trakcie laktacji i wpływa na zmiany składu mikrobioty jamy ustnej dziecka.

6. Na skład microbiologiczny badanych materiałów oraz stężenia laktoferyny i HMO wpływają czynniki kliniczne i środowiskowe.

2.2 Ogólne cele badawcze

Celem niniejszego badania była wielowymiarowa charakterystyka mikrobiomu mleka kobiecego oraz mikrobiomu jamy ustnej niemowlęcia z uwzględnieniem ich wzajemnych zależności. Analizy przedstawiono w kontekście składu microbiologicznego mleka, w tym zawartości – oligosacharydów mleka kobiecego oraz laktoferyny w odniesieniu do wybranych zmiennych klinicznych i demograficznych matki oraz dziecka. Zmienne kliniczne i demograficzne uwzględnione w analizie wybrano na podstawie przeglądu dostępnej literatury jako czynniki potencjalnie wpływające na kształtowanie się badanej mikrobioty matki i dziecka. Badanie miało charakter prospektywny i obserwacyjny oraz obejmowało dwa punkty pomiarowe (I pobór materiału badanego oraz II pobór, po około miesiącu od pierwszego spotkania), co umożliwiło analizę zmian w czasie w obrębie tej samej kohorty.

2.3 Cele szczegółowe

Sformułowano następujące cele szczegółowe niniejszej pracy:

1. Charakterystykę socio-demograficzną grupy badanej.
2. Analizę zmian ilościowych bakterii mikrobioty mleka kobiecego pomiędzy pierwszym a drugim poborem materiału biologicznego.
3. Identyfikację składu gatunkowego mikrobioty mleka oraz jamy ustnej karmionego dziecka, a także ocenę stopnia podobieństwa i nakładania się mikrobiot w obrębie pary matka-dziecko.
4. Ocenę alfa- i beta- różnorodności gatunkowej badanych materiałów.
5. Oznaczenie i ocenę stężeń oligosacharydów mleka kobiecego i laktoferyny w badanych próbkach.
6. Analizę korelacji pomiędzy składem ilościowym mikrobioty mleka kobiecego a stężeniami poszczególnych frakcji oligosacharydów mleka kobiecego oraz laktoferyny.
7. Identyfikację zależności między występowaniem poszczególnych gatunków bakterii a profilem biochemicznym mleka kobiecego.

8. Ocenę wpływu etapu laktacji (zdefiniowanego na podstawie wieku dziecka) na skład gatunkowy mikrobioty, stężenia laktoferyny i profilu HMO w mleku kobiecym.
9. Porównanie profili biochemicznych i mikrobiologicznych mleka kobiecego pomiędzy podgrupami wyodrębnionymi ze względu na wybrane zmienne kliniczne, tj. na BMI przed ciążą, metodę porodu, suplementację i inne zmienne kliniczne.
10. Analizę dynamiki zmian w czasie składu mikrobioty mleka kobiecego oraz stężeń HMO i laktoferyny pomiędzy I i II punktem pomiarowym.

3 MATERIAŁY

3.1 Projekt badania, uczestnicy oraz materiał badawczy

Badanie zaprojektowano jako prospektywne badanie obserwacyjne o charakterze przekrojowo-podłużnym (ang. *prospective observational study with repeated measures*), obejmujące kohortę kobiet karmiących piersią oraz ich niemowląt. Każdą uczestniczkę oceniano w dwóch punktach czasowych: podczas pierwszego spotkania (I pobór: materiał biologiczny: mleko, wymaz z jamy ustnej dziecka oraz ankieta) oraz podczas drugiego spotkania, przeprowadzonego po około miesiącu (II pobór: ten sam materiał biologiczny i ankieta) (Rysunek 11).

Ze względu na charakter badań sformułowano istotne czynniki włączenia i wykluczenia dla zgłaszających się uczestniczek i ich dzieci.

Kryteria włączenia dla uczestniczek badania były:

- ✓ Pełnoletność i wiek rozrodczy (18–45 lat);
- ✓ Prawidłowy stan zdrowia i odżywiania;
- ✓ Karmienie mlekiem kobiecym (bezpośrednio z piersi lub odciągniętym mlekiem podawanym butelki); dopuszczano karmienie mieszane oraz żywienie dziecka w okresie rozszerzania diety;
- ✓ Możliwość pozyskania minimum 10–30 mL mleka do badania;
- ✓ Wyrażenie pisemnej zgody na udział w badaniu oraz zgody na ponowny kontakt w celu ustalenia drugiego poboru materiału biologicznego.

Kryteriami włączenia wobec dziecka były:

- ✓ Dobry stan zdrowia rozumiany jako brak rozpoznanych wad wrodzonych i chorób przewlekłych;
- ✓ Masa urodzeniowa odpowiednia do wieku ciążowego;
- ✓ Prawidłowy rozwój odpowiedni do wieku dziecka.

Kryteriami wykluczenia wobec matki były:

- ✓ Aktywna choroba zakaźna, w tym zapalenie piersi w okresie kwalifikacji do badania;
- ✓ Antybiotykoterapia w dniu poboru materiału do badania lub w okresie co najmniej jednego miesiąca przed borem materiału badania;

- ✓ Stosowanie używek, w tym palenie tytoniu, spożywanie alkoholu oraz innych substancji psychoaktywnych;
- ✓ Poród powikłany infekcjami okołoporodowymi.

Kryteriami wykluczenia wobec dziecka były:

- ✓ Aktywna choroba zakaźna, infekcje w obrębie jamy ustnej oraz przewodu pokarmowego;
- ✓ Antybiotykoterapia w dniu poboru materiału do badania lub w okresie co najmniej jednego miesiąca przed borem materiału badania;
- ✓ Hospitalizacja oraz istotne interwencje medyczne w okresie co najmniej jednego miesiąca przed borem materiału badania.

Na realizację badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu przy Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy (decyzja z dnia 23.03.2021, nr KB 196/2021).

Przed kwalifikacją wszystkie uczestniczki zostały poinformowane o celu oraz przebiegu projektu, a następnie wyraziły świadomą, pisemną zgodę na udział w badaniu. Badane były rekrutowane do projektu w odpowiedzi na ogłoszenia informacyjne publikowane na tematycznych forach w mediach społecznościowych. Po uzyskaniu pisemnej zgody kierowników Oddziału Klinicznego Położnictwa, Chorób Kobięcych i Ginekologii Onkologicznej oraz Banku Mleka Kobięcego Wojewódzkiego Szpitala Zespólnego im. L. Rydygiera w Toruniu, na bezpośredni kontakt z pacjentkami z ww. jednostkami szpitalnymi, uczestniczki badania pozyskiwano również w/w jednostkach.

Dane wrażliwe zebrane w trakcie realizacji badania objęto zasadami poufności i przetwarzano zgodnie z obowiązującymi przepisami dotyczącymi ochrony danych osobowych, w tym z Rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2016/679 (RODO), zapewniając odpowiedni poziom bezpieczeństwa oraz ochrony informacji.

Ze względu na zmienność składu mleka kobiecego oraz dynamiczny rozwój mikrobioty jamy ustnej niemowląt, pary matka-dziecko zostały podzielone na 3 grupy wiekowe:

- ✓ noworodki – dzieci do ukończenia 6. tygodnia życia (siara, mleko wczesne)
- ✓ niemowlęta do ukończenia 5. miesiąca życia (mleko dojrzałe)
- ✓ niemowlęta oraz małe dzieci od 6. miesiąca życia (mleko przedłużonej laktacji)

Materiał badawczy stanowiły próbki mleka kobiecego pobrane w godzinach porannych na różnych etapach laktacji – od pierwszych dni po porodzie (siara), poprzez mleko

przejściowe, aż do mleka dojrzałego. Analizą objęto również próbki pochodzące od kobiet w przedłużonej laktacji, tj. karmiących piersią powyżej sześciu miesięcy od urodzenia dziecka. Przed przystąpieniem do poboru materiału biologicznego, uczestniczka została szczegółowo poinstruowana w zakresie procedury higienicznego odciągania mleka oraz o sposobie pobrania wymazu z jamy ustnej dziecka. Objętość pobieranej próbki mleka kobiecego (10-50 ml) nie wpływała na realizację bieżących potrzeb żywieniowych dziecka. Mleko do badania pozyskiwane było do jałowych, jednorazowych pojemników do mleka (Medela, Szwajcaria), laktatorem klasy szpitalnej Symphony (Medela, Szwajcaria, Rysunek 10) z zastosowaniem jałowych, jednorazowych końcówek kompatybilnych do laktatora (Ready-to-use One-day-set, Medela, Szwajcaria). W tym samym czasie pobierano wymaz z błony śluzowej jamy ustnej dziecka, z okolicy między policzkiem a dziąsłami, przy użyciu jałowej wymazówki mikrobiologicznej, którą następnie umieszczano w próbówce zawierającej podłoże transportowe AMIES (Deltalab, Hiszpania). Zastosowany zestaw przeznaczony jest do bezpiecznego pobierania i transportu bakterii tlenowych, beztlenowych oraz grzybów. Podłoże umożliwia zachowanie żywotności mikroorganizmów w pobranym materiale przez okres do 72 godzin. Próbki mleka kobiecego oraz wymazy transportowano w warunkach chłodniczych (temperatura 2–8°C) do laboratorium celem wykonania posiewu mikrobiologicznego i zdeponowania pozostałej ilości pozyskanego mleka.

Do wykonania pełnego posiewu mikrobiologicznego mleka kobiecego na zestaw podłoży agarowych wykorzystywano 3 mL mleka. Po wykonaniu posiewu mikrobiologicznego pozostałą część mleka podzielono na dwie jałowe próbówki, a następnie przechowywano w temperaturze –80°C do czasu przeprowadzenia dalszych analiz. Minimum 0,5 mL próbki MK wykorzystywano do oznaczenia stężenia laktoferyny, natomiast minimum 4 mL do oznaczenia profilu i stężeń oligosacharydów mleka kobiecego.

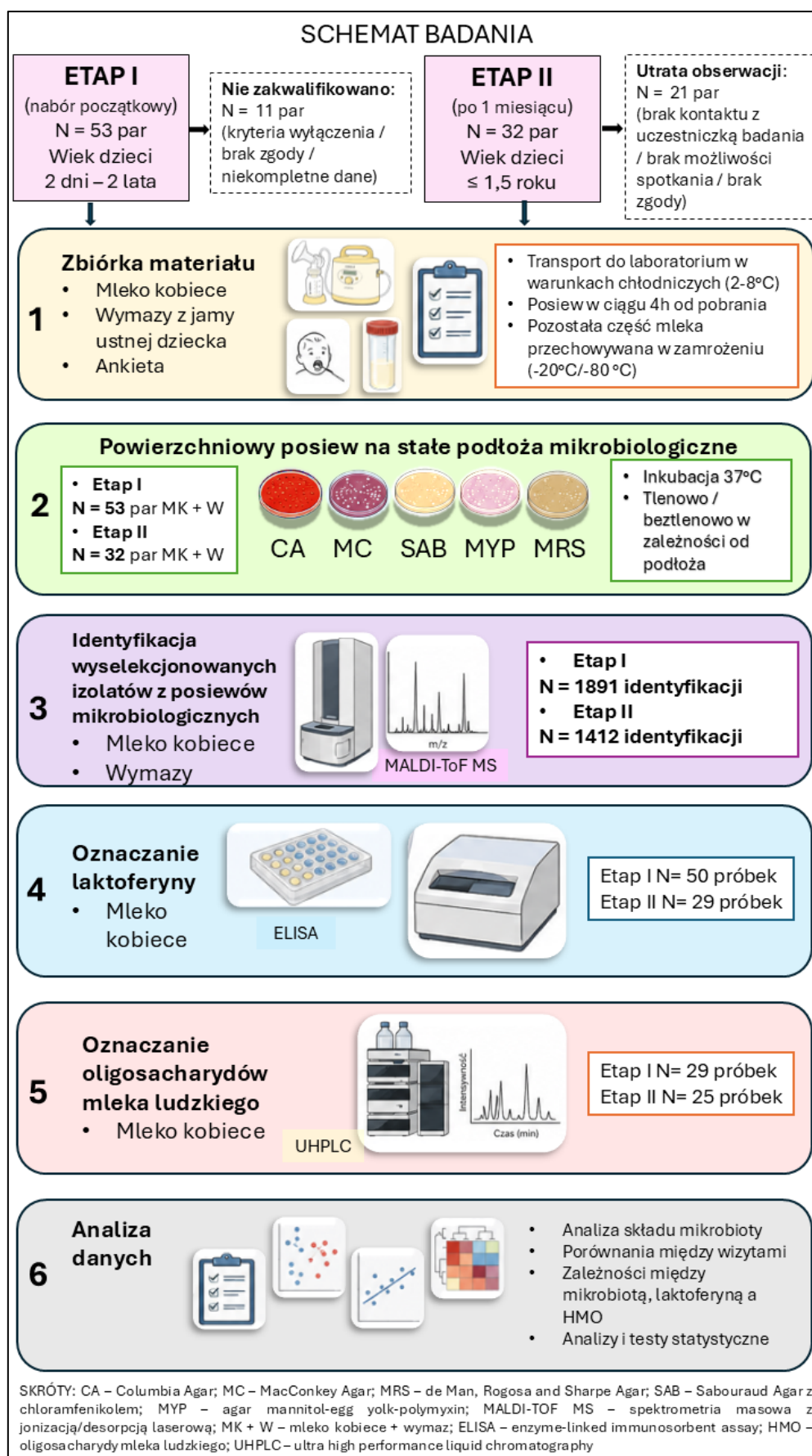


Rysunek 10. Laktator klasy szpitalnej Medela Symphony i indywidualny, jednorazowy zestaw do odciągania mleka (źródło medela.com)

Podczas obu spotkań, oprócz pobrania materiału biologicznego, uczestniczki badania wypełniały kwestionariusz składający się z 22 pytań oraz tabelę zawierającą dane socjodemograficzne. Kwestionariusz ankietowy opracowano na podstawie przeglądu literatury naukowej dotyczącej czynników wpływających na mikrobiotę matki i dziecka. Uwzględniono w nim m.in. informacje dotyczące ogólnego stanu zdrowia matki i dziecka, przebiegu ciąży, porodu, pierwszych dni po porodzie, diety, przyjmowanych leków i suplementów, ze szczególnym uwzględnieniem antybiotykoterapii (także w przebiegu ciąży) oraz produktów fermentowanych. Przed wdrożeniem do badania kwestionariusz został poddany konsultacjom eksperckim przez mikrobiologa, doradcę laktacyjnego oraz technologa żywienia oraz walidacji poprzez badanie pilotażowe w grupie kobiet w okresie laktacji (N=9).

Wszystkie kobiety wyraziły zgodę na ponowny kontakt celem umówienia się na kolejne spotkanie. Nie wszystkie uczestniczki ukończyły drugi etap badania. Powody utraty uczestników obejmowały między innymi czynniki zdrowotne, zakończenie karmienia mlekiem kobiecym, wprowadzenie PZMK, co uniemożliwiało pozyskanie odpowiedniej ilości mleka do badania. Na podstawie danych literaturowych wskazujących mniejszą dynamikę zmian w składzie mikrobiologicznym mleka kobiecego oraz mikrobioty jamy ustnej dziecka, zrezygnowano z kwalifikacji do drugiego etapu badań uczestniczek, których dziecko podczas pierwszego spotkania miało ukończone 18 miesięcy.

Materiał biologiczny oraz dane ankietowe do badania pozyskiwano od czerwca do października 2021 r. oraz od listopada 2022 r. do grudnia 2023 r. W ramach badania pozyskano 53 zestawy próbek (mleka kobiecego i wymazów z jamy ustnej dziecka) podczas pierwszego poboru oraz 32 zestawy (mleko + wymaz z jamy ustnej) z drugiego spotkania, co sumarycznie daje 170 przebadanych próbek biologicznych (Rysunek 11).



Rysunek 11. Schemat badania (opracowanie własne)

4 METODY

4.1 Odczynniki

4.1.1 Odczynniki mikrobiologiczne

Hodowla mikrobiologiczna:

- agar Columbia z dodatkiem 5% odwłóknionej krwi baraniej (CA, gotowe podłoże agarowe, GRASO Biotech, Polska)
- agar MacConkey'a (MC, granulaty do przygotowania podłoża, GRASO Biotech, Polska)
- agar Sabourauda (S, granulaty do przygotowania podłoża, GRASO Biotech, Polska)
- agar de Man, Rogosa i Shreibe (MRS, granulaty do przygotowania podłoża, bioMérieux, Francja)
- agar MYP z ang. *Mannitol, egg Yolk, Polymyxin* (MYP, podłoże agarowe stałe, GRASO Biotech, Polska)
- buforowany roztwór peptonowo-sodowy – Saline 0,85% Solution Tubes (Thermo Fisher Scientific, Niemcy)
- GENbag, GENbox anaer – system do inkubacji w warunkach beztlenowych (bioMérieux, Francja)

Identyfikacja MALDI-ToF MS:

- matryca HCCA – wystandaryzowany roztwór zawierający kwas α -cyjano-4-hydroksycynamonowy (ang. *α -cyano-4-hydroxycinnamic acid*) w rozpuszczalniku organicznym zawierający 50% acetonitrylu i 2,5% kwasu trifluorooctowego
- BTS (ang. *Bacterial Test Standard*) – mikrobiologiczny wzorzec, stanowiący wewnątrzlaboratoryjną kontrolę jakości odczytu
- 70% kwas mrówkowy – odczynnik stosowany do lizy ścian komórkowych mikroorganizmów

Oznaczanie laktoferyny:

- Human Lactoferrin ELISA kit – zestaw do oznaczania LF metoda ELISA (ABCAM, Wielka Brytania)
- woda destylowana

Oznaczanie oligosacharydów mleka kobiecego:

- woda ultraczysta (Milli-Q, USA)

- etanol czysty do analizy (CZDA), (Merck, Niemcy)
- acetonitryl CZDA (Merck, Niemcy)
- metanol CZDA (Merck, Niemcy)
- kwas mrówkowy 85% CZDA (Merck, Niemcy)
- kwas octowy CZDA (Merck, Niemcy)
- bufor amonowy
- standardy analityczne oligosacharydów mleka kobiecego:
 - 2'-Fucosyllactose (2'-FL)
 - 3'-Sialyllactose (3'SL)
 - 6'-Sialyllactose (6'-SL)
 - lacto-N-tetraose (LNT)
 - difucosyllactose (DFL)

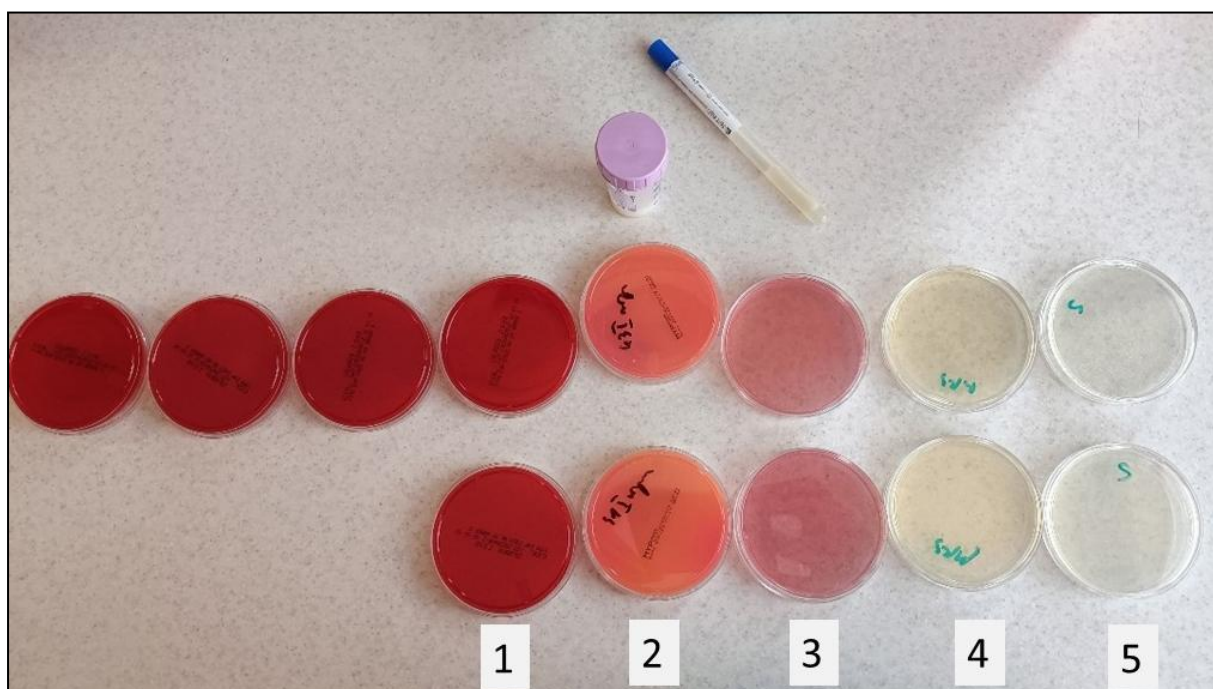
4.1.2 Aparatura i wyposażenie

- lodówki (4°C), zamrażarki (–20°C), (Liebherr, Szwajcaria)
- zamrażarki głębokiego mrożenia (–80°C), (New Brunswick Eppendorf, Niemcy)
- laktator klasy szpitalnej Medela Symphony (Medela, Szwajcaria)
- wymazówki mikrobiologiczne z podłożem transportowym AMIES (deltalab, Hiszpania)
- mikroprobówki Eppendorf o pojemności 2 mL, 5 mL, (Eppendorf, Niemcy)
- miniwirówki laboratoryjne (Eppendorf, Niemcy)
- waga analityczna o dokładności odczytu 0,0001 g oraz 0,01 g
- wirówka laboratoryjna z chłodzeniem (Eppendorf, Niemcy)
- komory laminarne, (Thermo Fisher Scientific, Niemcy)
- autoklaw laboratoryjny (Enbio Technology, Polska)
- czytnik mikropłytek ELISA (Biogenet, Polska)
- inkubatory laboratoryjne (Binder, Niemcy)
- spektrometr mas MALDI-ToF MS Microflex LT Biotyper (Bruker, Niemcy).
- 96-dołkowa płytka systemu MALDI Biotyper
- jednorazowe aplikatory do nakładania kolonii bakteryjnych na 96-dołkową płytkę
- pipety automatyczne (Eppendorf, Niemcy)

- wysokorozdzielczy spektrometr mas Q Exactive TM Focus quadrupole-Orbitrap (LC-Q-Orbitrap-MS/MS), (Thermo Fisher Scientific, Niemcy)
- system odparowywania próżniowego RapidVap, (Labconco, Polska)
- system chromatografii cieczowej Ultimate 3000 UHPLC, (Thermo ScientificTM, Dionex, San Jose, CA, Stany Zjednoczone)
- kolumna chromatograficzna ACQUITY Glycoprotein BEH Amid (Waters Corporation, Stany Zjednoczone)
- wstrząsarka laboratoryjna (Heidolph, Niemcy).

4.1.3 Badanie mikrobioty mleka kobiecego oraz wymazów z jam ustnych dzieci metodą powierzchniową

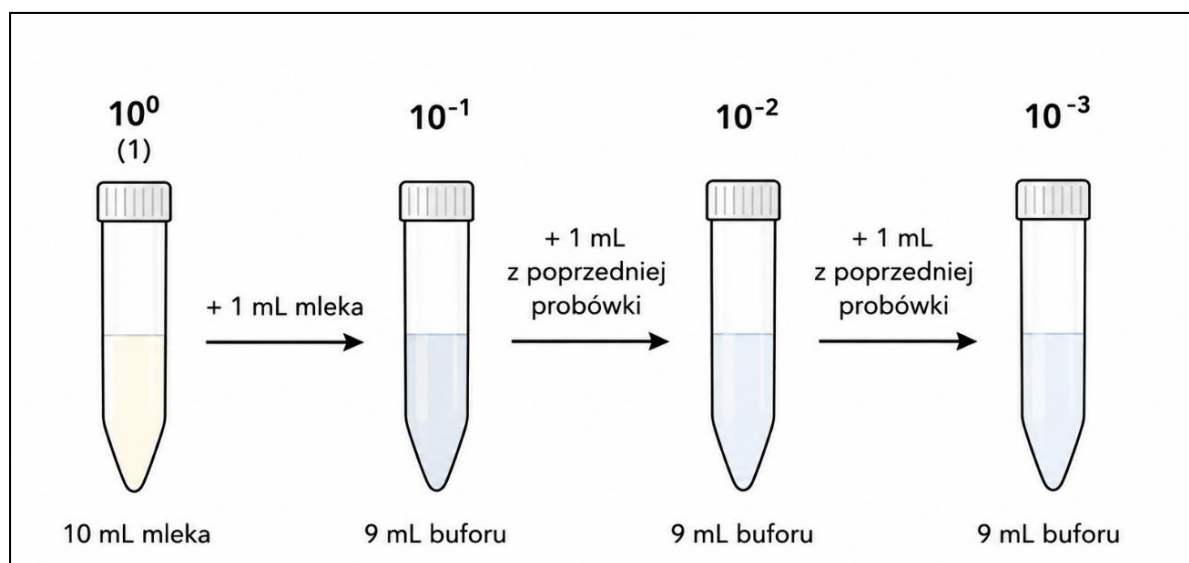
Badanie mikrobioty mleka kobiecego oraz wymazów z jamy ustnej dzieci przeprowadzono metodą posiewu powierzchniowego na zestaw podłoży stałych: agar Columbia (1), agar MYP (2), agar MC (3), agar MRS (4), agar Sabourauda (5), (Zdjęcie 1).



Zdjęcie 1. Zestaw podłoży stosowanych do posiewu zebranego materiału biologicznego – pojedynczej próbki mleka – szereg górny i wymazy – szereg dolny (opracowanie własne)

Przed przystąpieniem do posiewu, z próbek mleka przygotowywano szereg rozcieńczeń 10^{-1} , 10^{-2} oraz 10^{-3} (Rysunek 13). Rozcieńczenia wykonane były z zastosowaniem gotowego, buforowanego roztworu peptonu chlorku sodu (Saline 0,85% Solution Tubes, Thermo Fisher Scientific, Niemcy) w proporcji 1:9, tj. 1 mL mleka do 9 mL buforu. Po przygotowaniu mleka oraz rozcieńczeń pomocą pipety automatycznej nanoszono na podłoża 100 μ L mleka i jego

roztworów, a następnie rozprowadzano jałową, jednorazową eżę w trzech płaszczynach. Przygotowane serie rozcieńczeń próbek mleka służyły do oznaczenia liczby żywych i wyrosłych bakterii w 1 mL mleka kobiecego (jtk/mL), zamiennie stosowano określenia miano.



Rysunek 12. Schemat szeregu rozcieńczeń próbek mleka (opracowanie własne)

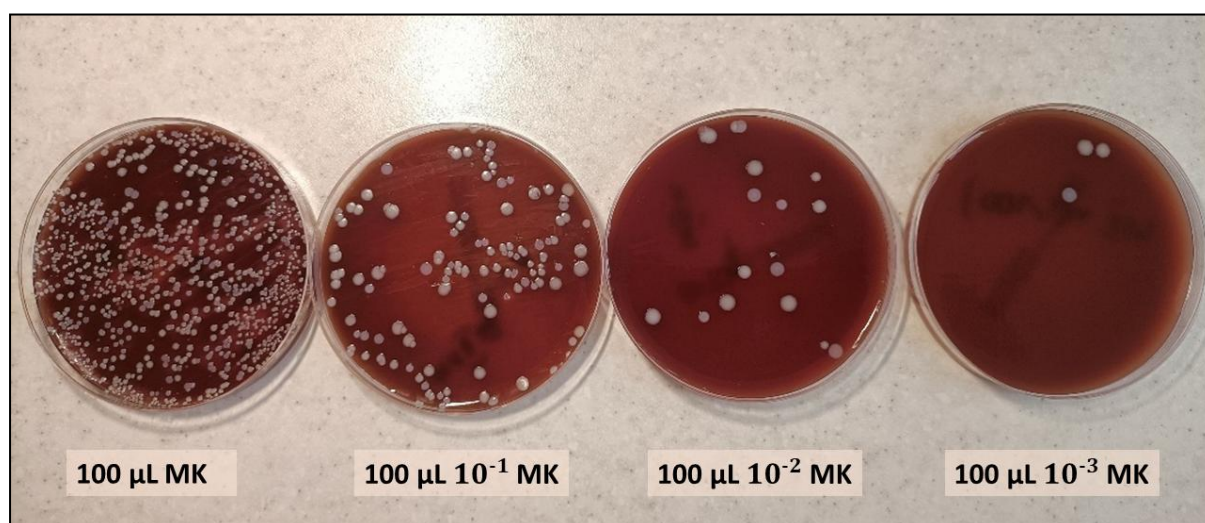
Wymaz z jamy ustnej dziecka posiano metodą posiewu powierzchniowego, redukcyjnego bezpośrednio z wymazówki na ten sam zestaw podłoży mikrobiologicznych jak w przypadku próbek mleka. Redukcję materiału wykonywano przy użyciu jałowej, jednorazowej eży.

Po wykonaniu posiewu materiału biologicznego podłoża umieszczano w cieplarni i inkubowano w temperaturze 36°C przez 48–72 godziny. Standardowy czas hodowli mikrobiologicznej w warunkach tlenowych wynosi 24 godziny [142, 143]. W przypadku bakterii, m.in. z rodzaju *Streptococcus* oraz *Lactobacillus*, czas inkubacji podłoży Columbia, MC i MYP wydłużono do 48 godzin. W przypadku podłoży MRS oraz Sabouraud inkubacja prowadzono przez 72 godziny. Hodowlę na podłożach agar Columbia, MacConkey oraz Sabouraud prowadzono w warunkach tlenowych. Podłoża MRS i MYP inkubowano w warunkach beztlenowych, uzyskiwanych z wykorzystaniem zestawów GENbag i GENbox (bioMérieux, Francja) (Zdjęcie 2).



Zdjęcie 2. System do hodowli w warunkach beztlenowych (opracowanie własne)

Przykładowy wzrost wyhodowanych mikroorganizmów wyizolowanych z mleka kobiecego na podłożu Columbia po 48 godzinach inkubacji przedstawiono na Zdjęciu 3. Próbkę posiano metodą powierzchniową w szeregu rozcieńczeń.



Zdjęcie 3. Posiew powierzchniowy szeregu rozcieńczeń mleka kobiecego (opracowanie własne)

Przykładowy zestaw podłoży po inkubacji próbek mleka kobiecego (górny szereg) oraz wymazu z jam ustnych dzieci (dolny szereg) przedstawia Zdjęcie 4.



Zdjęcie 4. Zestaw podłoży agarowych z widocznymi koloniami bakteryjnymi. Górny szereg przedstawia posiew mleka kobiecego. Dolny szereg przedstawia posiew redukcyjny wymazu jamy ustnej dziecka (opracowanie własne)

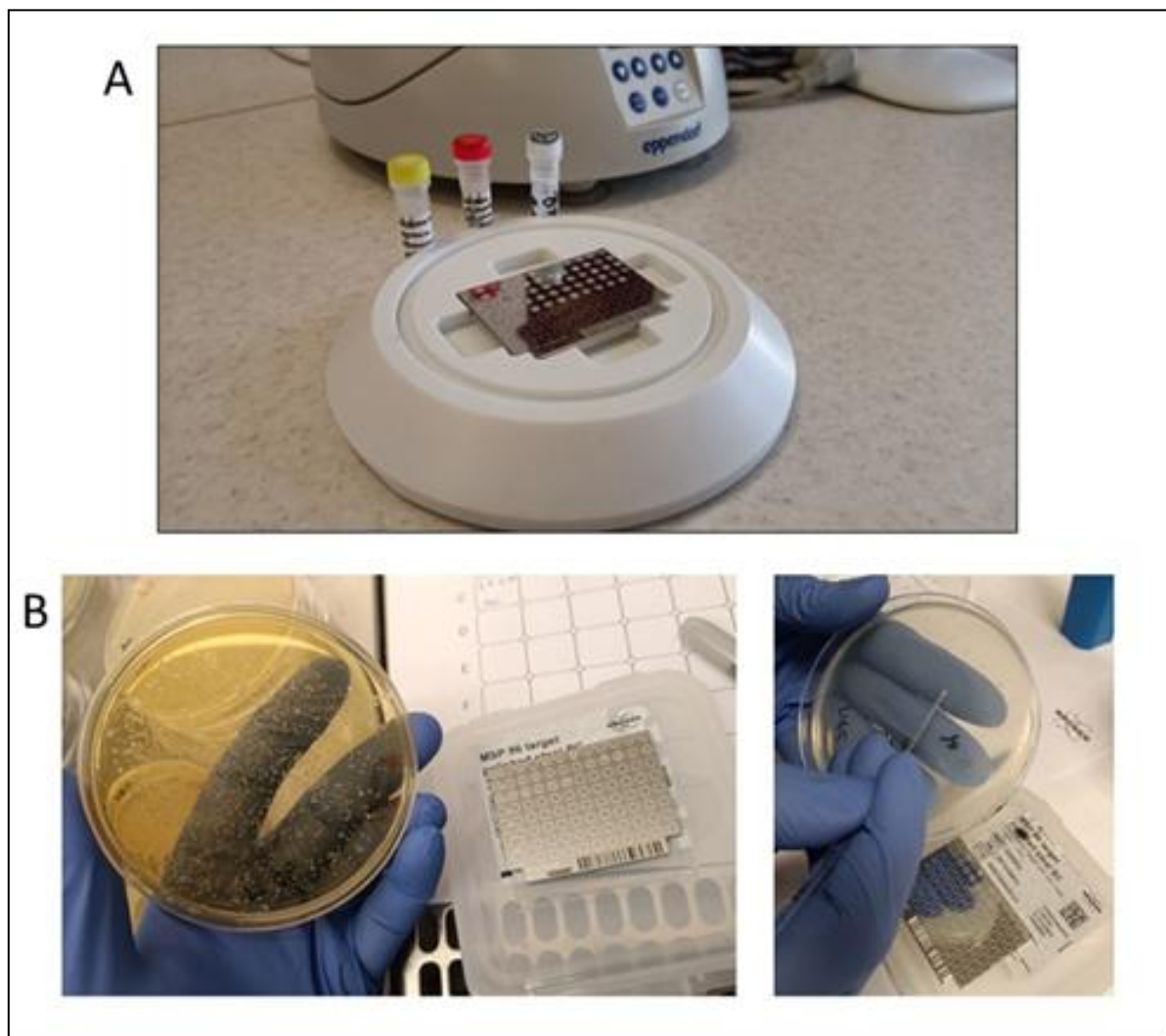
4.1.4 Identyfikacja mikrobiomu metodą MALDI TOF MS Microflex

Wyroste kolonie, głównie bakteryjne, były poddane identyfikacji na spektrometrze masowym typu MALDI-TOF MS Microflex LT Biotyper (Bruker Daltonics GmbH, Niemcy). Identyfikacje zostały przeprowadzone w Zakładzie Diagnostyki Mikrobiologicznej Wojewódzkiego Szpitala Zespołowego w Toruniu (Zdjęcie 5).



Zdjęcie 5. Zestaw MALDI TOF MS Microflex LT Biotyper w Zakładzie Diagnostyki Mikrobiologicznej Wojewódzkiego Szpitala Zespołowego im. L. Rydygiera w Toruniu (zdjęcie własne)

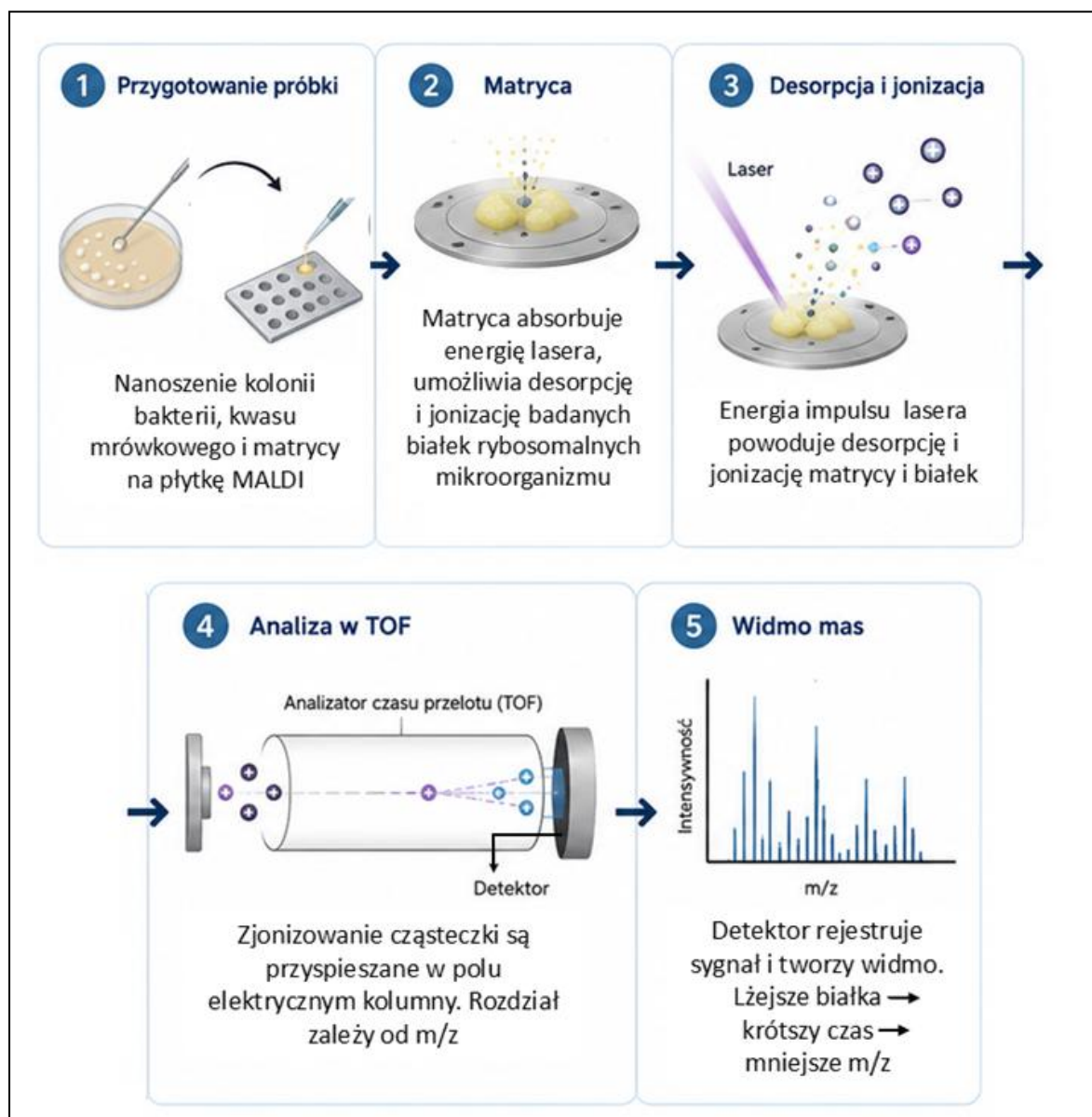
W celu identyfikacji pojedynczą kolonię mikroorganizmu nanoszono na odpowiedni dołek płytki do analizy metodą MALDI-TOF MS (Zdjęcie 6). Następnie na każdy dołek płytki z materiałem bakteryjnym nanoszono 1 μ L 70% kwasu mrówkowego, a po wyschnięciu kwasu dodawano 1 μ L matrycy HCCA.



Zdjęcie 6. A – 96-dołkowa wielorazowa płytka do analizy spektrometrem MALDI-TOF MS; B – nanoszenie masy bakteryjnej na płytkę (zdjęcia własne)

Po nałożeniu na płytkę wszystkich analitów i ich wyschnięciu, płytkę wprowadzano do komory analizatora MALDI-TOF MS Microflex, która po zamknięciu wytwarza próżnię. We wnętrzu komory, pod wpływem impulsów laserowych następuje desorpcja (uwalnianie do stanu gazowego) i jonizacja białek rybosomalnych badanego mikroorganizmu. W tym procesie kluczowa jest matryca, która pochłania energię lasera, umożliwiając przejście cząsteczek białkowych w stan gazowy. Jednocześnie poprzez przekazanie lub odebranie protonu HCCA prowadzi do jonizacji analitu. Powstałe jony białkowe są przyspieszane w polu

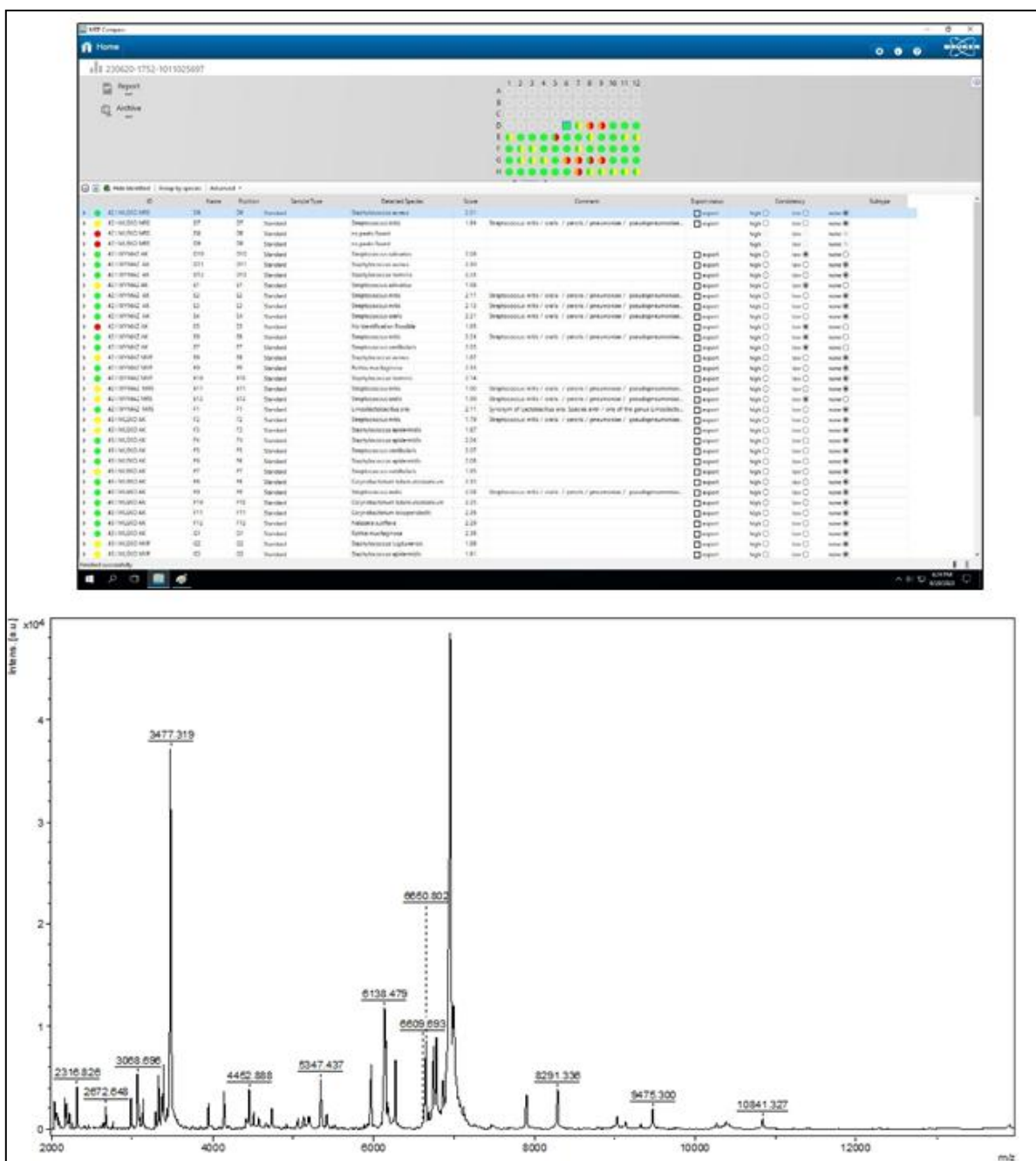
elektrycznym kolumny i rozdzielane na podstawie stosunku masy do ładunku cząsteczek (m/z). Detektor rejestruje czas przelotu (TOF, ang. „*time-of-flight*”) tworząc unikalne widma charakterystyczne dla danego gatunku na podstawie budowy białek rybosomalnych mikroorganizmu, odczytując “białkowy odcisk palca” drobnoustroju (Rysunek 14).



Rysunek 13. Zasada działania spektrometru MALDI-TOF MS (na podstawie [144] z własnymi modyfikacjami)

Dedykowana aplikacja do spektrometru „BRUKER MALDI Biotyper Compass IVD” odczytuje uzyskane widma, a następnie automatycznie porównuje je z biblioteką widm referencyjnych, dokonując ich interpretacji i identyfikacji badanego mikroorganizmu (Rysunek 15). Prawdopodobieństwo poprawnej identyfikacji drobnoustroju w systemie MALDI Biotyper wyrażane jest w postaci tzw. wskaźnika punktowego Score mieszczącego się

w zakresie od 0,00 do 3,00, określającego stopień podobieństwa do widm referencyjnych. Wyniki identyfikacji oznaczane kolorem zielonym, mieszczące się w zakresie od 2,00 do 3,00, określane są jako wysoko prawdopodobna identyfikacja do gatunku. Identyfikacje oznaczone na żółto, w zakresie 1,70 – 1,99, oznaczają pewną identyfikację do rodzaju i prawdopodobną do gatunku. Kolorem czerwonym oznaczane są wyniki identyfikacji z punktacją poniżej 1,70 i oznaczają brak wiarygodnej identyfikacji mikroorganizmu i wymagają powtórzenia analizy [144–147]. Do opracowania wyników identyfikacyjnych mikroorganizmów uwzględniono wyniki ze Score $\geq 1,70$ oraz Score $\geq 2,00$, gdzie przyjęto próg Score $\geq 1,70$ dla klasyfikacji rodzajowej oraz $\geq 2,00$ dla klasyfikacji gatunkowej.



Rysunek 14. Widok aplikacji do obsługi MALDI-TOF MS wraz z wykonanymi identyfikacjami oraz przykładowe widmo MS (rycina własna – screen aplikacji BRUKER MBT Compass IVD)

4.1.5 Oznaczanie oligosacharydów metodą wysokosprawną chromatografię cieczową (UHPLC)

Badanie ilościowe i jakościowe oligosacharydów (HMO) zostało przeprowadzone w Katedrze Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności Politechniki Gdańskiej. Identyfikacja i oznaczanie oligosacharydów w mleku kobiecym zostało przeprowadzone wysokosprawną chromatografię cieczową (UHPLC, ang. *ultrahigh-performance liquid chromatography*)

sprzężoną z wysokorozdzielczą spektrometrią mas (HRMS, ang. *high-resolution mass spectrometry*). Badaniom poddano 29 próbek mleka kobiecego z pierwszego poboru oraz 25 z drugiego. Przed oznaczeniem oligosacharydów próbki mleka poddano procesowi odtłuszczenia, strącania białek oraz odparowania zawartej w mleku wody.

Odtłuszczanie próbek przeprowadzono poprzez ich odwirowanie (12000 obrotów/min, 4°C, 15 min) 1,8 mL mleka. Po wirowaniu usunięto górne frakcje, zawierające głównie tłuszcz, natomiast 1,2 mL supernatantu (fazy wodnej) przeniesiono do nowej probówki typu eppendorf. Do pozostałego w probówce osadu dodano 1 mL 99% etanolu, po czym próbki dokładnie wymieszano i odwirowano w (12000 obrotów/min, 15 min, 20°C). Po zakończeniu wirowania uzyskany supernatant zebrano i połączono z wcześniej pobraną frakcją supernatantu. Połączone frakcje uzupełniono etanolem do objętości 3 mL, a następnie pozostawiono w temperaturze 4°C przez 24 godziny, co umożliwiło wytrącenie pozostałych w roztworze białek. Wytrącone białka oddzielono przez wirowanie (12000 obrotów/min, 15 min, 20°C). Powstały supernatant zawierający węglowodany zebrano do probówek typu eppendorf i odparowano do sucha przy użyciu systemu odparowywania próżniowego RapidVap (Labconco, Włochy). Otrzymane sacharydy w postaci proszku zważono, a następnie przechowywano w temperaturze –80°C do dalszych analiz.

Przed analizą przygotowywano roztwór sacharydów w roztworze acetonitryl: woda (50:50, v:v). Po przygotowaniu próbki oligosacharydy zostały poddane analizie UHPLC z wykorzystaniem System Ultimate 3000 UHPLC (Thermo Scientific TM, USA) sprzężonym ze spektrometrem masowym Q Exactive TM Focus kwadrupol-Orbitrap (LC-Q-OrbitrapMS/MS, Thermo Fisher Scientific, Niemcy) z podgrzewanym elektrorozpylaniem (Zdjęcie 7). Rozdział chromatograficzny przeprowadzono na kolumnie ACQUITY Glycoprotein BEH Amid (300 Å, 1,7 µm, 2,1 mm × 150 mm, Waters Corporation, USA) w temperaturze 25°C.

Na fazę ruchomą składało się:

A: 5 mmol/L mrówczanu amonu z 0,1% (v/v) kwasem mrówkowym w wodzie

B: 5 mmol/L mrówczanu amonu z 0,1% (v/v) kwasem mrówkowym w 90% acetonitrylu.

Proces elucji zaprogramowano w następujący sposób:

- 2 min izokratyczny 95% B
- min gradient liniowy do 80% B
- 30 min gradient liniowy od 80% do 50% B
- 3 min płukania kolumny gradientem liniowym od 50% do 2% B i równoważenia kolumny od 2% do 95% B w ciągu 5 min.

Objętość wstrzyknięcia wynosiła 10 μ L. Czas akwizycji wyniósł 45 minut, a faza ruchoma przepływała z prędkością ok. 200 μ L/min. Jako wzorców w badaniu użyto komercyjnie dostępnych standardów oligosacharydów mleka, w tym izomery niefukozylowane, fukozylowane i sjałowane.

Detekcja elektrorozpylania MS została przeprowadzona w trybie detekcji dodatniej i ujemnej przy:

- napięciu źródła jonów ustawionym na $\pm 3,5$ kV;
- temperaturze gazu suszącego 350° C;
- skanowaniu od 200 do 2000 m/z;
- rozdzielczości 280 000;
- temperaturze kapilarnej 250°C.



Zdjęcie 7. UltiMate 3000 HPLC and UHPLC Systems, Politechnika Gdańska, Katedra Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności (zdjęcie własne)

Piki zidentyfikowano poprzez porównanie widm MS zarejestrowanych dla badanych próbek z widmami standardów referencyjnych (2'FL, 3'SL, 6'SL, DFL i LNT) oraz z danymi opisanymi w literaturze naukowej [148, 149]. Ilościowe oznaczenie HMO przeprowadzono z wykorzystaniem zewnętrznych krzywych kalibracyjnych, które sporządzono na podstawie integracji powierzchni pików MS uzyskanych dla wzorców referencyjnych. Każdą próbkę poddano dwóm niezależnym, równoległym ekstrakcjom oraz analizom, aby zwiększyć wiarygodność wyników.

4.1.6 Oznaczanie laktoferyny w mleku kobiecym metodą immunoenzymatyczną ELISA

Oznaczenie laktoferyny metodą immunoenzymatyczną przeprowadzono z zastosowaniem testu Human Lactoferrin ELISA kit (ab200015, ABCAM, Wielka Brytania) zgodnie z protokołem producenta. Test umożliwia ilościowe oznaczanie ludzkiej laktoferyny w próbkach mleka kobiecego. Analizę wykonano na odtłuszczonej mleku kobiecym, uzyskanym dwuetapowo. Pierwsze wirowanie wykonano przez 15 min w 4°C, 1500 obrotów/min, po czym usunięto warstwę tłuszczu pozostającej na powierzchni mleka po wirowaniu. A następnie wykonano ponowne wirowanie przez 15 min w 4 °C, 10000

obrotów/min. Po przygotowaniu buforu płuczącego, roztworu przeciwciał, standardów oraz próbek mleka przystąpiono do analizy.

Do ramki z mikrodołkami nalano po 50 μL wzorców, odczynników do krzywej kalibracyjnej i próbek mleka. Następnie dodano 50 μL roztworu przeciwciał, zamknięto szczelnie płytkę i pozostawiona na 1 godzinę inkubacji w temperaturze pokojowej na wytrząsarce. Następnie trzykrotnie przepłukano każdą studzienkę roztworem płuczącym. Do przepłukanych i osuszonych studzienek dodano 100 μL chromogen TMB Development Solution, wizualizujący wyniki reakcji, który inkubowano 15 min w ciemności. W ostatnim kroku dodano 100 μL roztworu „stop” (Stop Solution), który zmienił uzyskany niebieski kolor na żółty i jednocześnie wzmocnił sygnał odczytu. Tak przeprowadzoną reakcję odczytano na spektrofotometrze SPECTROstar Nano (BMG LABOTECH, Germany; zdjęcie 8) przy długości fali 450 nm. Korzystając z krzywej wzorcowej przeliczono uzyskane wyniki absorpcji laktoferyny w próbkach na stężenie laktoferyny zawartej w mleku.



Zdjęcie 8. Spektrofotometr SPECTROstar Nano (BMG LABOTECH, Germany), Katedra Fizjologii i Toksykologii (zdjęcie własne)

4.2 Analiza statystyczna

Do wykonania analizy statystycznej wykorzystano następujące testy:

1. Poziom istotności i strategia kontroli błędu I rodzaju

Dla wszystkich hipotez głównych przyjęto poziom istotności $\alpha = 0,05$. W przypadku wielokrotnych testów w ramach jednej analizy (np. 15 korelacji HMO $\times$ miano) zastosowano procedurę Benjaminiego-Hochberga [150] kontrolującą odsetek fałszywych odkryć (ang. *False Discovery Rate*, FDR) na poziomie $q = 0,05$. Dla testów *post hoc* stosowano korektę Holma [151].

2. Statystyki opisowe

Zmienne ciągłe opisano za pomocą: mediany (Me), rozstępu międzykwartylowego (IQR: Q_1 – Q_3), wartości minimalnej i maksymalnej, a w przypadku rozkładu normalnego – średniej arytmetycznej (M) i odchylenia standardowego (SD). Normalność weryfikowano testem Shapiro-Wilka [152]. Zmienne katégoryczne przedstawiono jako liczebności bezwzględne (N) i odsetki (%).

3. Porównanie miana bakterii między poborem I a II

Porównanie $\log_{10}$ (miano bakterii) między I a II poborem oparto na teście rang ze znakami Wilcoxona (*Wilcoxon signed-rank test*) dla prób zależnych z przedziałem ufności 95% CI.

4. Analiza składu gatunkowego mikrobiomu

Dla każdej uczestniczki i każdej wizyty obliczono wskaźniki nakładania się zbiorów gatunków:

- Indeks Jaccarda
- Indeks Sorensena-Dice’a

Gatunki wspólne i unikalne wizualizowano diagramami Venna.

5. Alfa-różnorodność mikrobiomu

Wskaźniki alfa-różnorodności obliczono per uczestniczka, per źródło materiału (mleko / wymaz), per wizyta, na podstawie macierzy obecności:

- Bogactwo gatunkowe S – liczba unikalnych gatunków.
- Indeks Shannona
- Indeks Simpsona

6. Beta-różnorodność i mapowanie PCoA

Różnorodność struktury mikrobiomu między próbkami obliczono za pomocą odległości Braya-Curtisa [153]. Rozmieszczenie próbek wykonano w analizie PCoA (PCoA, ang. *Principal Coordinates Analysis*) [154]. Wpływ czynników klinicznych (metoda porodu, etap laktacji, dieta w ciąży) na strukturę beta-różnorodności oceniono za pomocą wielowymiarowej analizy wariancji PERMANOVA [155].

7. Korelacje miana bakterii z HMO i laktoferyną: analizy przekrojowe

Korelacje między $\log_{10}$ (miano) a stężeniem każdej frakcji HMO oraz laktoferyny obliczono oddzielnie dla I i II poboru za pomocą współczynnika korelacji rang Spearmana ρ [156], z korektą FDR.

8. Screening zależności gatunek $\times$ HMO

Dla każdego gatunku występującego u $\geq 10\%$ uczestniczek przeprowadzono test Manna-Whitneya-Wilcoxa porównujący stężenie każdej frakcji HMO między grupą uczestniczek z danym gatunkiem (obecność = 1) a grupą bez (obecność = 0), z korektą FDR.

9. Korelacje z wiekiem dziecka, matki i BMI

Korelacje Spearmana obliczono dla par: $[HMO_k \times \text{wiek dziecka}]$, $[HMO_k \times \text{wiek matki}]$, $[HMO_k \times \text{BMI}]$, $[\text{laktoferyna} \times \text{wiek dziecka/matki/BMI}]$, $[\log_{10}(\text{miano}) \times \text{wiek dziecka}]$, $[\text{Shannon } H' \times \text{wiek dziecka}]$, z korektą FDR. Porównania między trzema etapami laktacji przeprowadzono testem Kruskala-Wallisa z *post hoc* Dunna (korekta Holma).

10. Zmiany longitudinalne HMO i laktoferyny

Do porównania stężenia każdej frakcji HMO i laktoferyny między I a II poborem (N par = 25–29 zależnie od frakcji) zastosowano Test Wilcoxa dla prób zależnych, z korektą FDR. Wizualizacja: wykresy parowane (*spaghetti plot*) z liniami per uczestniczką.

4.2.1 Oprogramowanie i odtwarzalność

Wszystkie analizy przeprowadzono w środowisku R 4.5.2 (Windows 11 Pro 64-bit). Do analiz statystycznych wykorzystano głównie pakiety: rstatix, coin, lme4, lmerTest, MuMIn, vegan, phyloseq, microbiome oraz cluster. Wizualizacje wykonano z użyciem ggplot2 i rozszerzeń (ggpubr, patchwork, corrplot, pheatmap). Analizę braków danych przeprowadzono pakietami naniar i mice, a tabele, wykresy, ryciny i eksport wyników przygotowano z użyciem gtsummary, flextable, officer i openxlsx, MS office (2019).

5 WYNIKI

5.1 Charakterystyka grupy badanej

W badaniu, podczas pierwszego spotkania, wzięły udział 53 pary matka-dziecko. Drugie spotkanie było wizytą follow-up przeprowadzoną po miesiącu, wzięły w nim udział 32 pary. Średni wiek matek wynosił $M = 32,49$ lat ($SD = 3,59$), przy średnim BMI sprzed ciąży $23,40 \pm 4,05$ kg/m². Większość uczestniczek (77,4%) mieszkała w miastach powyżej 100 tysięcy mieszkańców (Tabela 1A).

Wiek dzieci w pierwszym etapie obejmował szeroką rozpiętość: od 2 dni do 20 miesięcy po porodzie ($M = 5,74$ m). Zakres wieku dzieci podczas drugiego spotkania wynosił 1,5–15 miesięcy ($M = 5,09$). Na podstawie wieku dzieci i etapu laktacji wyodrębniono trzy grupy badane obejmujące: siarę i mleko wczesne ($\leq 1,5$ m), mleko dojrzałe (2–5 m) oraz mleko matek długokarmiących (≥ 6 m) (Tabela 1B).

Niemal połowa noworodków urodziła się drogą porodu naturalnego (49,1%). Większość porodów odbyła się o czasie, tj. między 37. a 42. tygodniem ciąży. Poród przedwczesny, tj. między 28. a 36. tygodniem ciąży, dotyczył 15,38% badanych dzieci. W przypadku 69,8% noworodków bezpośrednio po porodzie zapewniono kontakt skóra do skóry (Tabela 1C)

Tabela 1. Charakterystyka demograficzna i kliniczna uczestniczek badania

Panel A. Zmienne ciągłe

Zmienna	N	$M \pm SD$	Me (IQR)	Zakres	95% CI
Wiek matki (lata)	53	$32,49 \pm 3,59$	33,00 (30,00-35,00)	24-40	32-33
Wiek dziecka – I pobór (miesiące)	53	$5,74 \pm 5,50$	4,00 (0,30-10,50)	0,1-20,0	4,2-7,3
Wiek dziecka – II pobór (miesiące)	32	$5,09 \pm 3,87$	4,00 (1,75-8,25)	0,5-15,0	3,7-6,5
Tydzień ciąży podczas porodu	53	$38,30 \pm 2,82$	39,00 (38,00-40,00)	27-42	38-39
Masa urodzeniowa dziecka (g)	53	$3\,224 \pm 790$	3 360 (2 990-3 710)	850-4 740	3 006 - 3441
BMI kobiet przed ciążą (kg/m ²)	53	$23,40 \pm 4,05$	22,68 (20,32-25,78)	17,0-37,5	22-25

Panel B. Etap laktacji

Etap laktacji	I pobór (N = 53)		II pobór (N= 32)	
	N (%)	95% CI	N (%)	95% CI
Siara / mleko wczesne ($\geq 1,5$ miesiąca)	19 (35,8%)	23%-50%	8 (25,0%)	12%-44%
Mleko dojrzałe (2–5 miesiąc)	10 (18,9%)	9,9%-32%	11 (34,4%)	19%-53%
Mleko długiego karmienia (≥ 6 miesięcy)	24 (45,3%)	32%-59%	13 (40,6%)	24%-59%

Panel C. Sposób karmienia dziecka i suplementacja kobiet oraz zmienne kliniczne

Zmienna	Kategoria	I pobór: N (%)	II pobór: N (%)
Sposób karmienia dziecka	Karmienie wyłącznie piersią	26 (49,1%)	17 (53,1%)
	Karmienie piersią + rozszerzenie diety	22 (41,5%)	11 (34,4%)
	Karmienie piersią + mieszanka modyfikowana	5 (9,4%)	4 (12,5%)
Suplementy diety (jakikolwiek)	Tak	38 (71,7%)	24 (46,2%)
Probiotyki	Tak	2 (3,8%)	1 (1,9%)
Antybiotyki (ostatnie 2 miesiące)	Tak	5 (9,4%)	0 (0,0%)
Zmienna	Kategoria	N (%)	95% CI
Metoda porodu	Cięcie cesarskie	27 (50,9%)	37%-65%
	Poród naturalny	26 (49,1%)	35%-63%
Dieta w ciąży	Dieta ogólna	40 (75,5%)	61%-86%
	Dieta cukrzycowa	10 (18,9%)	9,9%-32%
	Dieta wegetariańska	2 (3,8%)	0,7%-14%
	Dieta bezglutenowa	1 (1,9%)	0,1%-11%
Kontakt skóra-do-skóry	Tak	37 (69,8%)	55%-81%
	Nie	16 (30,2%)	19%-45%
Hospitalizacja w ciąży (> 6 dni)	Nie	37 (69,8%)	55%-81%
	Tak	16 (30,2%)	19%-45%

N = 53 pary matka-dziecko; dane z II poboru dostępne dla N = 32 uczestniczek (kompletność follow-up dla danych biochemicznych: 60,4%). *M* = średnia arytmetyczna; *SD* = odchylenie standardowe; *Me* = mediana; *IQR* = rozstęp międzykwartylowy (Q1-Q3). 95% CI = przedział ufności

5.2 Porównanie miana mikrobioty mleka między I a II zbiórką materiałów badanych

Badanie szacunkowej liczby żywych mikroorganizmów (miano) w mleku kobiecym były określone dla wszystkich uczestniczek w obu pobraniach. Wyniki wykazały w pierwszym poborze niższe wartości średniej i mediany oraz rozpiętości liczby bakterii w porównaniu z

drugim poborem (Tabela 2). Mediana miana pierwszego poboru wynosiła 7100 Jtk/mL oraz 9200 Jtk/mL w drugim poborze. Analiza porównawcza logarytmicznego miana bakterii [$\log_{10}(\text{miano})$] w próbkach mleka wykazała podobne wartości pomiędzy pierwszym a drugim poborem ($\text{Me} = 3,851$ vs $\text{Me} = 3,964$) oraz szeroki zakres wartości w obu poborach (około 2-6 $\log_{10}$ Jtk/mL), Tabela 3).

Tabela 2. Porównanie parowane miana bakterii w mleku między I a II poborem

Zmienna	Pobór	N	% braków	Me (IQR)	$M \pm SD$	Zakres	95% CI
Miano bakterii (Jtk/mL)	I	53	0,0%	7 100 (1 600-42 000)	54 271 $\pm$ 147 779	120- 1 000 000	6 950- 33 000
	II	32	39,6%	9 200 (2 000-21 150)	34 456 $\pm$ 91 989	60- 500 000	6 200- 22 000
$\log_{10}(\text{miano})$	I	53	0,0%	3,851 (3,204-4,623)	3,895 $\pm$ 0,914	2,079-6,000	3,6-4,2
	II	32	39,6%	3,964 (3,300-4,325)	3,769 $\pm$ 0,917	1,778-5,699	3,4-4,1

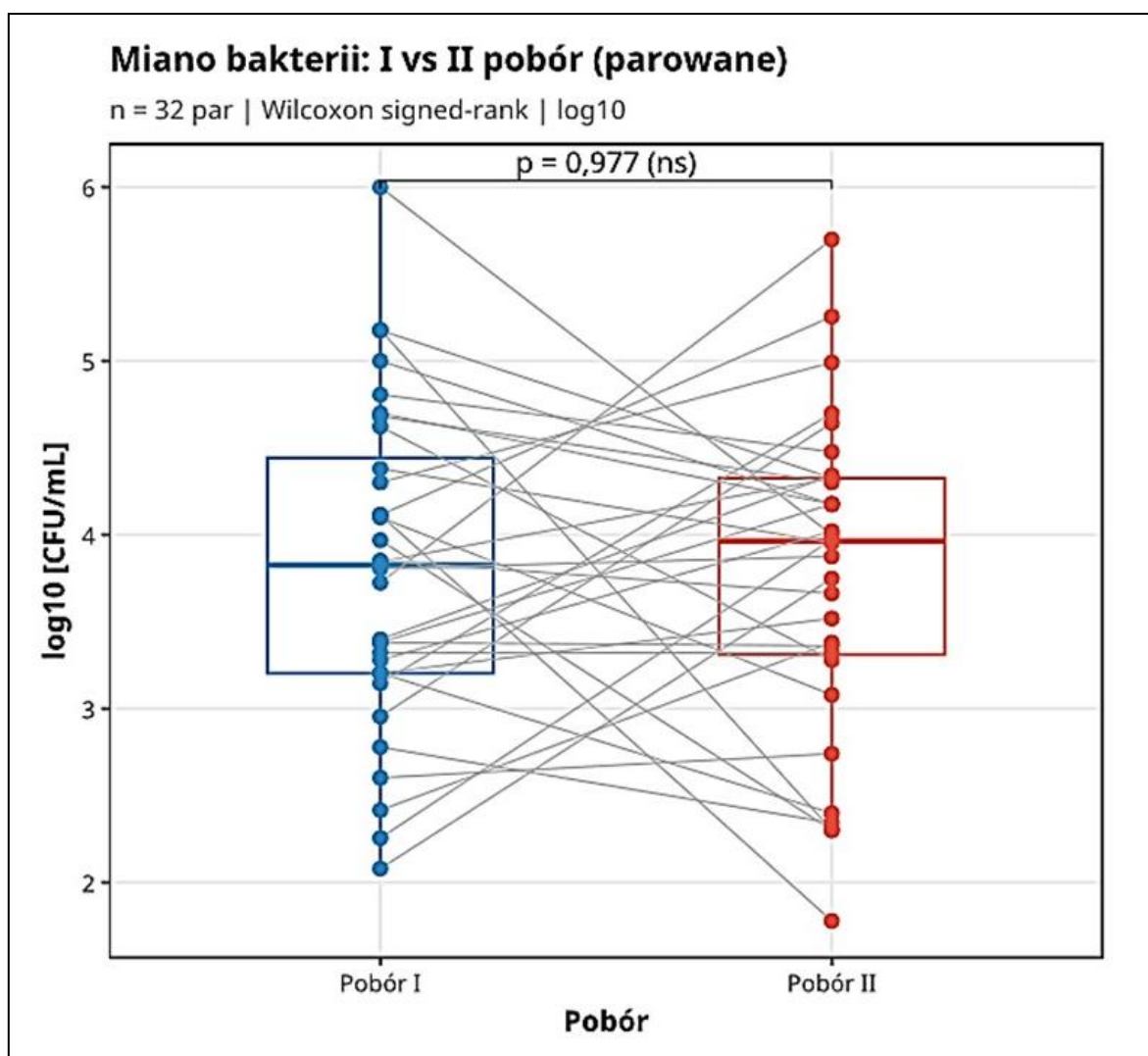
$N = 53$ pary matka-dziecko. Me = mediana; IQR = rozstęp międzykwartyłowy (Q1-Q3); M = średnia arytmetyczna; SD = odchylenie standardowe. 95% CI = przedział ufności (test Wilcoxon). % braków = odsetek próbek bez dostępnych danych w odniesieniu do całej grupy badanej z I poboru ($N = 53$)

Analiza porównawcza miana bakterii oraz $\log_{10}(\text{miano})$ pomiędzy pierwszym a drugim poborem, przeprowadzona wśród uczestniczek biorących udział w obu spotkaniach, nie wykazała istotnych różnic statystycznych ($p = 0,977$). Ocena danych sparowanych wskazała na dużą zmienność indywidualną uczestniczek. Wykres skrzynkowy obrazuje zarówno wzrosty, jak i spadki miana bakterii między pobraniami, bez wyraźnego trendu na poziomie grupy (Wykres 1).

Tabela 3. Porównanie miana bakterii w mleku między I a II poborem uczestniczek z danymi o mianie bakterii w obu pobraniach

Parametr	I pobór	II pobór
Miano bakterii, Me (IQR),	6 700 (1 600-28 500)	9 200 (2 050-21 125)
$\log_{10}(\text{miano})$, Me (IQR)	3,826 (3,204-4,455)	3,964 (3,312-4,325)

$N = 32$; Me = mediana; IQR = rozstęp międzykwartyłowy (Q1-Q3)



Wykres 1. Porównanie logarytmicznej liczby bakterii w I i II poborze. Analiza danych sparowanych z liniami łączącymi pomiary tej samej uczestniczki

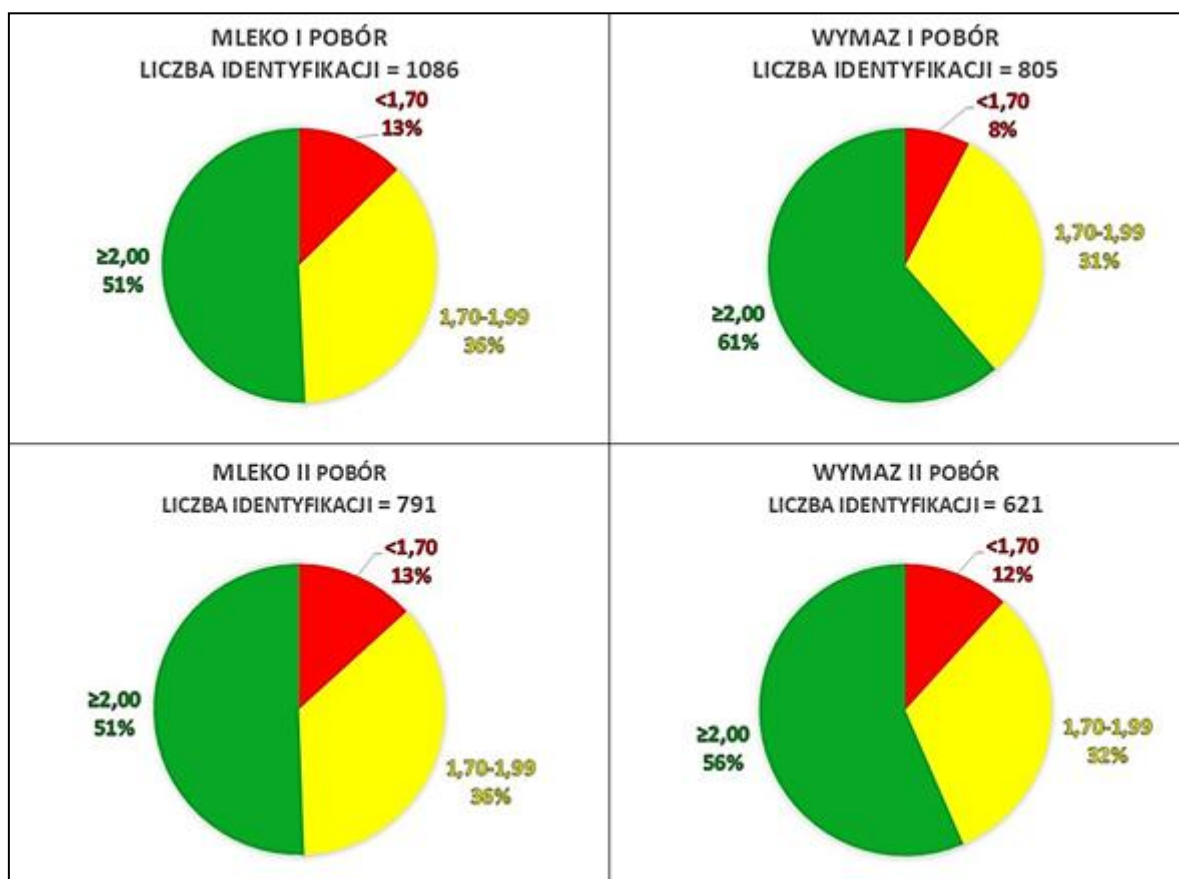
5.3 Ocena składu gatunkowego mleka oraz wymazów oraz stopnia nakładania się mikrobioty mleka matki z mikrobiotą jamy ustnej dziecka (oś matka-dziecko)

W trakcie badań nad składem mikrobiologicznym, łącznie wykonano 3303 oznaczenia identyfikacyjne mikroorganizmów, z czego 1891 dotyczyło próbek z pierwszego spotkania, a 1412 z drugiego. Wyniki identyfikacji mikroorganizmów z wykorzystaniem techniki MALDI-TOF MS dla próbek mleka i wymazów z dwóch pomiarów – przedstawiono w Tabeli 3. Mleko kobiece charakteryzowało się wyższym odsetkiem niepowodzeń identyfikacyjnych. Największą skuteczność identyfikacji do poziomu gatunku uzyskano w przypadku wymazów z pierwszego poboru (Tabela 4, Wykres 2).

Tabela 4. Liczba oznaczeń oraz jakości identyfikacji na MALDI TOF MS

Score	Mleko I pobór N ID = 1086	Wymaz I pobór N ID = 805	Mleko II pobór N ID = 791	Wymaz II pobór N ID = 621
<1,70	138	62	105	73
1,70-1,99	397	249	286	197
≥2,00	551	494	400	351

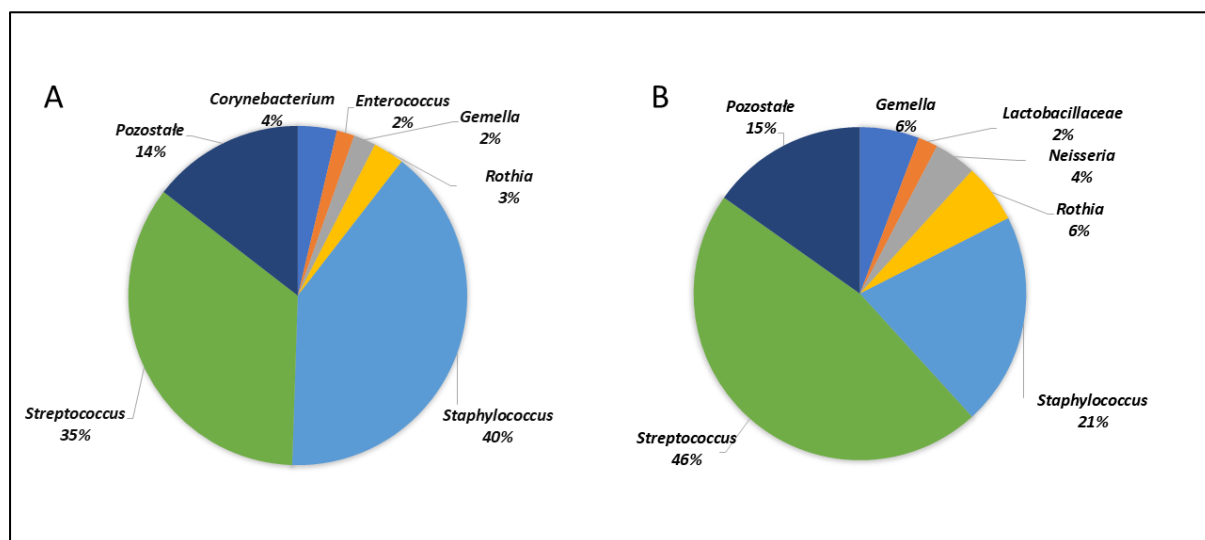
N ID – liczba identyfikacji; <1,70 wynik niewiarygodny; 1,70 – 1,99 wiarygodna identyfikacja na poziomie rodzaju; ≥2,00 pewna identyfikacja na poziomie gatunku



Wykres 2. Rozkład procentowy wartości Score identyfikacji bakteryjnych w próbkach mleka oraz wymazów z jamy ustnej podczas I i II poboru

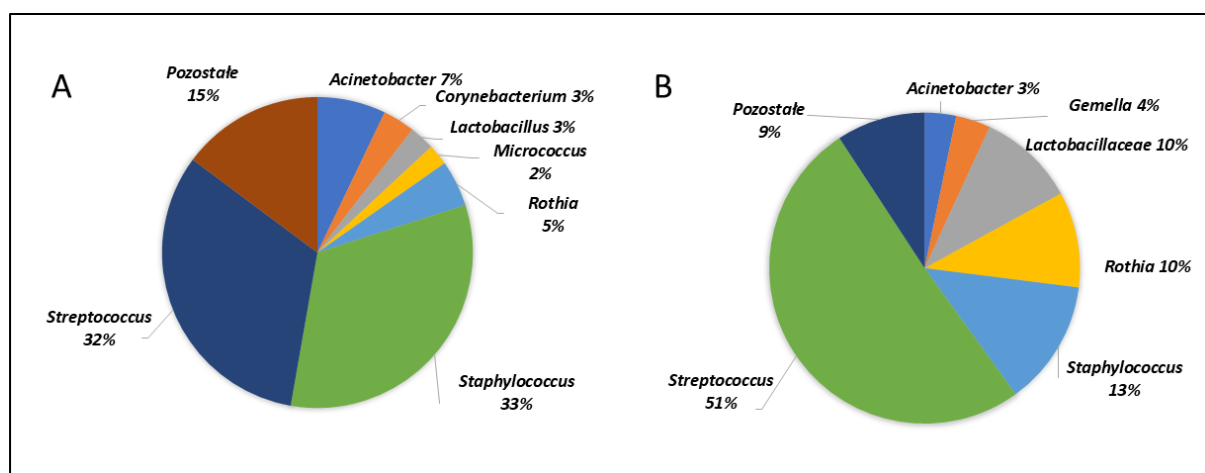
Najczęściej w próbkach mleka kobiecego i wymazów jam ustnych dzieci identyfikowano gatunki z rodzaju *Staphylococcus* oraz *Streptococcus*. W próbkach mleka dominował *Staphylococcus* spp., natomiast w próbkach wymazów *Streptococcus* spp. Kolejnymi, często występującymi rodzajami mleka były *Acinetobacter*, *Corynebacterium*, *Rothia*, *Enterococcus* oraz gatunki z rodziny *Lactobacillaceae*. Z kolei w próbkach z wymazów często obserwowano

rodzaje *Gemella*, *Neisseria*, *Rothia*, *Acinetobacter* oraz gatunki z rodziny *Lactobacillaceae* (Wykres 3 i 4).



Wykres 3. Porównanie najczęściej występujących rodzajów w próbkach mleka kobiecego (A) i wymazów z jamy ustnej dzieci (B) z poboru I

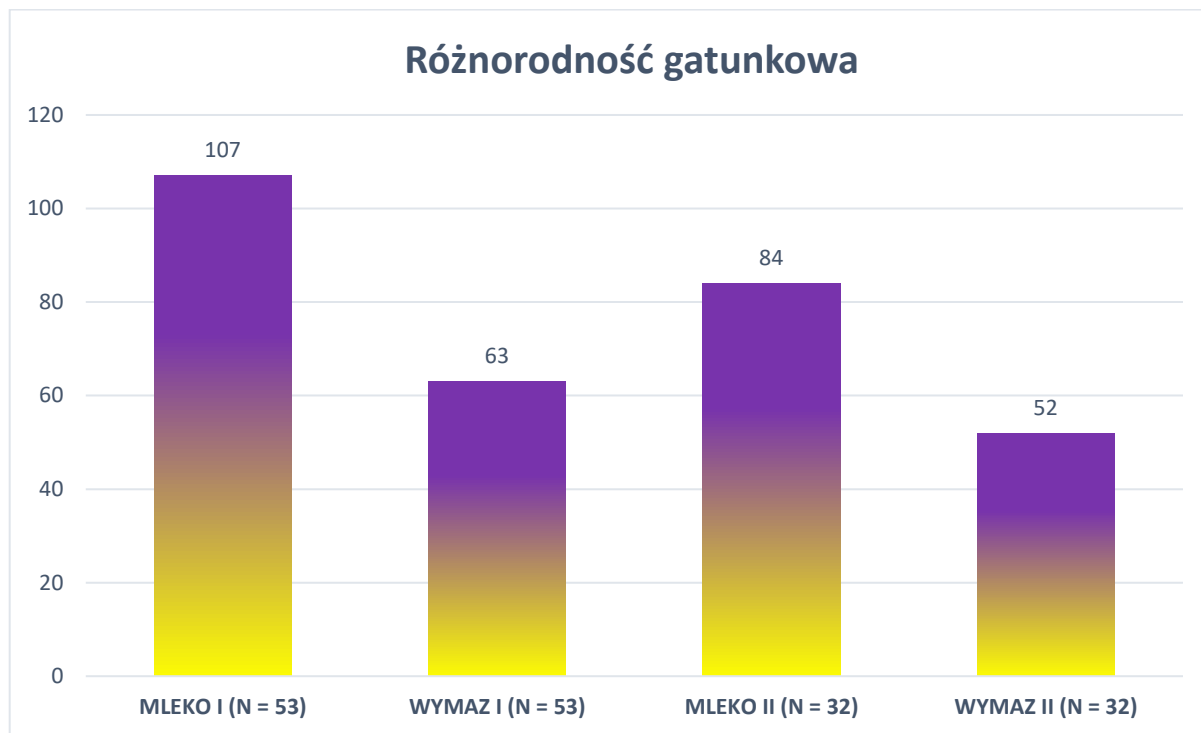
W próbkach z pierwszego punktu czasowego zidentyfikowano łącznie 30 i 28 rodzajów mikroorganizmów, odpowiednio w próbkach mleka kobiecego i wymazów. Natomiast w drugim punkcie czasowym odpowiednio 31 i 26 rodzajów.



Wykres 4. Porównanie najczęściej występujących rodzajów w próbkach mleka kobiecego i wymazów z jamy ustnej dzieci z poboru II

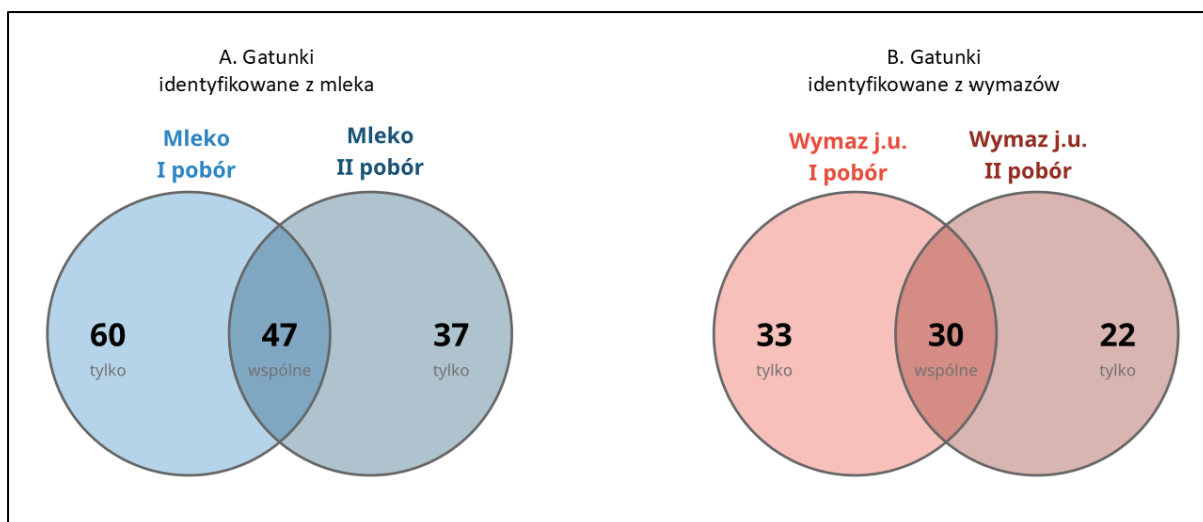
W I poborze skład gatunkowy mikrobioty mleka obejmował 107 unikalnych gatunków zidentyfikowanych w 53 próbkach mleka oraz 63 gatunki obecne w wymazach z jamy ustnej. W pojedynczej próbce mleka wykrywano średnio 8,94 gatunku mikroorganizmów (zakres: 4-28), w wymazach z jamy ustnej średnio 6,69 gatunku (zakres: 2-12).

W II poborze stwierdzono obecność 84 gatunków w 32 próbkach mleka oraz 52 gatunków w wymazach z jamy ustnej. Średnia liczba gatunków przypadających na pojedynczą próbkę mleka wynosiła 10,42 (zakres: 2–15), w wymazach średnio 8,73 gatunku (zakres: 3-15) (Wykres 5).



Wykres 5. Porównanie liczby zidentyfikowanych gatunków bakterii w próbkach mleka i wymazów z jamy ustnej podczas I i II poboru

W mleku kobiecym zidentyfikowano z obu pobrań 47 gatunków wspólnych, przy jednoczesnej obecności 60 gatunków wyłącznych dla I poboru oraz 37 dla II poboru. W wymazach z jamy ustnej liczba gatunków wspólnych wynosiła 30, natomiast unikatowych zidentyfikowano 33 i 22 dla I i II poboru (Wykres 6).



Wykres 6. Diagramy Venna obrazujące nakładanie się wspólnych rodzajów bakterii w próbkach mleka oraz wymazów z jamy ustnej pomiędzy pierwszym i drugim poborem (j.u. = jama ustna)

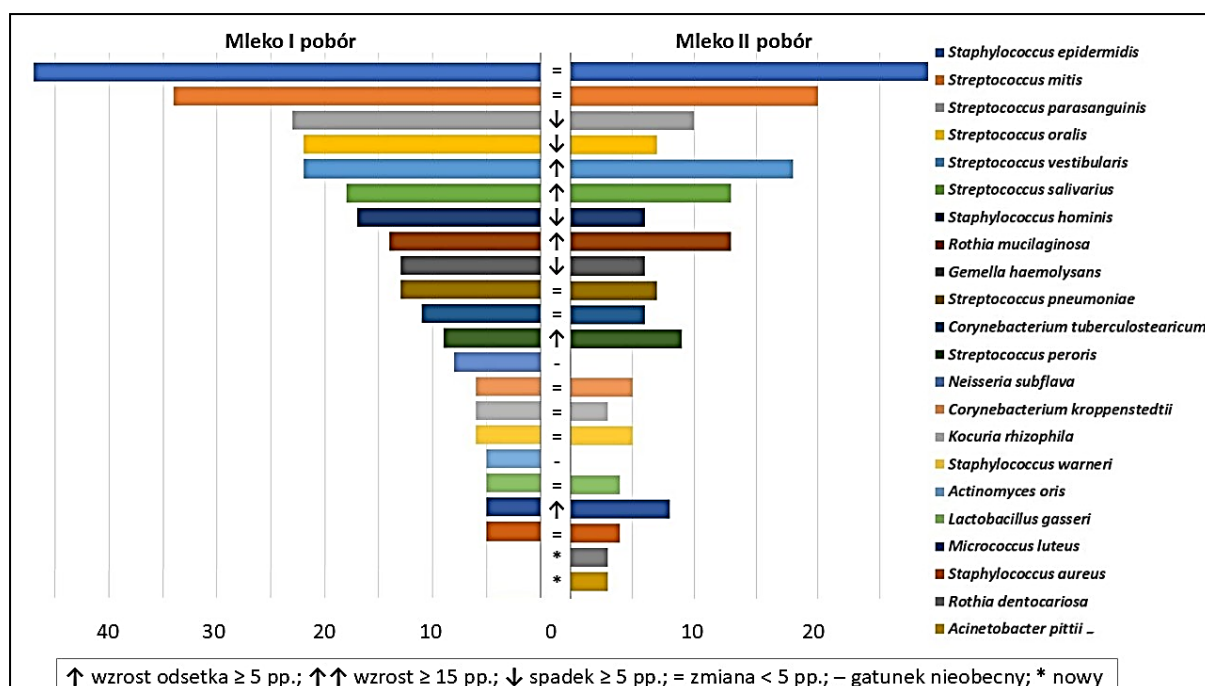
Najczęstszym gatunkiem wchodzącym w skład mikrobioty mleka był *Staphylococcus epidermidis*, identyfikowany u 88,7% uczestniczek w pierwszym punkcie czasowym oraz u 90,6% w drugim. Kolejne pod względem częstości występowania były: *Streptococcus mitis* (I – 64,2%; II – 62,5%), *Streptococcus parasanguinis* (I – 43,4%; II – 31,2%), *Streptococcus oralis* (I – 41,5%; II – 21,9%) oraz *Streptococcus vestibularis* (I – 41,5%; II – 56,2%) (Tabela 5, Wykres 7).

W przypadku *Rothia mucilaginosa*, odnotowano wzrost częstości występowania w II poborze zarówno w mleku (26,4% → 40,6%, +14,2 pp.) jak i wymazach (35,8% → 65,6%, +29,8 pp.) (Tabela 5 i 6).

Tabela 5. Dwadzieścia najczęściej identyfikowanych gatunków w mleku – I i II pobór

Poz.	Mleko Gatunek	I pobór (N = 53)		II pobór (N = 32)		Zmiana
		N	%	N	%	
1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	47	88,7	29	90,6	=
2	<i>Streptococcus mitis</i>	34	64,2	20	62,5	=
3	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	23	43,4	10	31,2	↓
4	<i>Streptococcus oralis</i>	22	41,5	7	21,9	↓
5	<i>Streptococcus vestibularis</i>	22	41,5	18	56,2	↑
6	<i>Streptococcus salivarius</i>	18	34,0	13	40,6	↑
7	<i>Staphylococcus hominis</i>	17	32,1	6	18,8	↓
8	<i>Rothia mucilaginosa</i>	14	26,4	13	40,6	↑
9	<i>Gemella haemolysans</i>	13	24,5	6	18,8	↓
10	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	13	24,5	7	21,9	=
11	<i>Corynebacterium tuberculostrictum</i>	11	20,8	6	18,8	=
12	<i>Streptococcus peroris</i>	9	17,0	9	28,1	↑
13	<i>Neisseria subflava</i>	8	15,1	–	–	–
14	<i>Corynebacterium kroppenstedtii</i>	6	11,3	5	15,6	=
15	<i>Kocuria rhizophila</i>	6	11,3	3	9,4	=
16	<i>Staphylococcus warneri</i>	6	11,3	5	15,6	=
17	<i>Actinomyces oris</i>	5	9,4	–	–	–
18	<i>Lactobacillus gasseri</i>	5	9,4	4	12,5	=
19	<i>Micrococcus luteus</i>	5	9,4	8	25,0	↑
20	<i>Staphylococcus aureus</i>	5	9,4	4	12,5	=
–	<i>Rothia dentocariosa</i> ^b	–	–	3	9,4	nowy
–	<i>Acinetobacter pittii</i> ^b	–	–	3	9,4	nowy

Poz. = pozycja w rankingu częstości (I pobór). N = liczba uczestniczek, u których zidentyfikowano dany gatunek; % = odsetek uczestniczek z danym gatunkiem. Zmiana: ↑ wzrost odsetka ≥ 5 pp.; ↑↑ wzrost ≥ 15 pp.; ↓ spadek ≥ 5 pp.; = stabilny (zmiana < 5 pp.); – gatunek nieobecny



Wykres 7. Podsumowanie dwudziestu najczęściej identyfikowanych gatunków w mleku – I i II pobór

W materiale z wymazów jamy ustnej dzieci, pobranym w obu punktach czasowych, dominowały paciorkowce z gatunków *Streptococcus mitis* (81,1% vs. 81,2%), *Streptococcus oralis* (67,9% vs. 53,1%) oraz *Streptococcus vestibularis* (49,1% vs. 56,2%). Do często identyfikowanych gatunków należały także *Staphylococcus epidermidis* (47,2% vs. 56,2%) oraz *Gemella haemolysans* (45,3% vs. 28,1%) (Tabela 6, Wykres 8).

Tabela 6. Dwadzieścia najczęściej identyfikowanych gatunków w wymazach z jamy ustnej dzieci – I i II pobór

Poz.	Wymazy Gatunek	I pobór (N = 53)		II pobór (N = 32)		Zmiana
		N	%	N	%	
1	<i>Streptococcus mitis</i>	43	81,1	26	81,2	=
2	<i>Streptococcus oralis</i>	36	67,9	17	53,1	↓
3	<i>Streptococcus vestibularis</i>	26	49,1	18	56,2	↑
4	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	25	47,2	18	56,2	↑
5	<i>Gemella haemolysans</i>	24	45,3	9	28,1	↓
6	<i>Rothia mucilaginosa</i>	19	35,8	21	65,6	↑↑
7	<i>Staphylococcus hominis</i>	19	35,8	13	40,6	=
8	<i>Streptococcus salivarius</i>	18	34,0	12	37,5	=
9	<i>Neisseria subflava</i>	13	24,5	–	–	–
10	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	11	20,8	8	25,0	=
11	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	9	17,0	11	34,4	↑↑
12	<i>Staphylococcus aureus</i>	8	15,1	3	9,4	↓
13	<i>Neisseria cinerea</i>	7	13,2	–	–	–
14	<i>Lactobacillus gasseri</i>	6	11,3	8	25,0	↑
15	<i>Rothia dentocariosa</i>	6	11,3	–	–	–
16	<i>Actinomyces oris</i>	5	9,4	–	–	–
17	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	5	9,4	–	–	–
18	<i>Streptococcus peroris</i>	5	9,4	4	12,5	=
19	<i>Streptococcus sanguinis</i>	5	9,4	–	–	–
20	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	4	7,5	–	–	–
–	<i>Escherichia coli</i> ^b	–	–	3	9,4	nowy
–	<i>Lactobacillus fermentum</i> ^b	–	–	3	9,4	nowy

Poz. = pozycja w rankingu częstości (I pobór). N = liczba uczestniczek, u których zidentyfikowano dany gatunek; % – odsetek uczestniczek z danym gatunkiem. Zmiana: dwadzieścia najczęściej identyfikowanych gatunków w mleku – I i II pobór. ↑ wzrost odsetka ≥ 5 pp.; ↑↑ wzrost ≥ 15 pp.; ↓ spadek ≥ 5 pp.; = stabilny (zmiana < 5 pp.); – gatunek nieobecny

Tabela 7. Gatunki dominujące wspólne dla mleka i wymazu z poboru I (rdzeń mikrobiomu osi matka-dziecko)

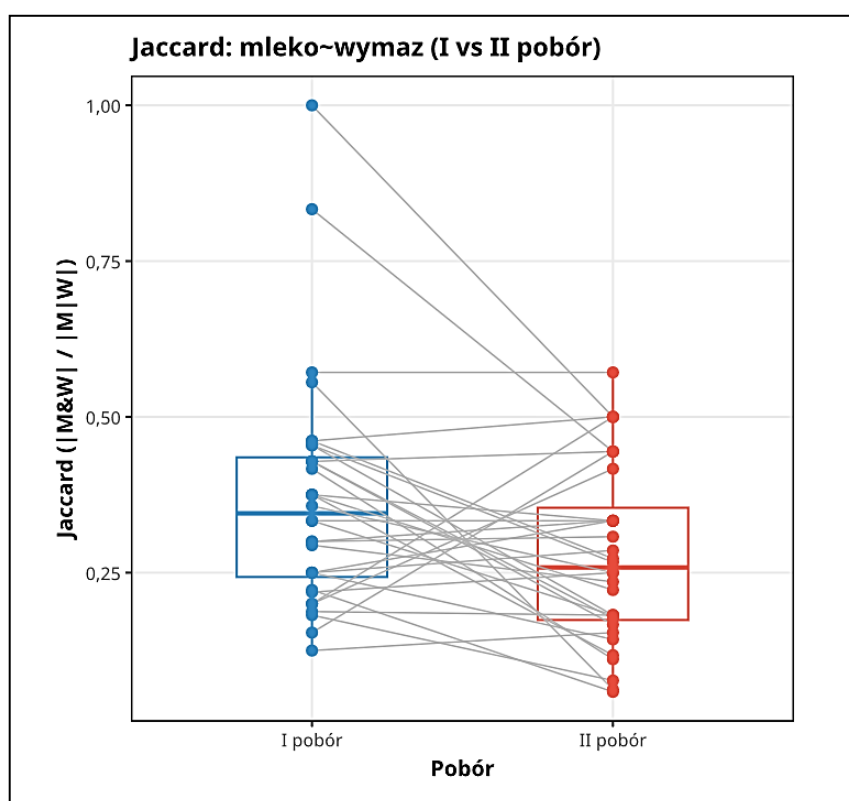
Gatunek	Mleko I (%)	Wymaz I (%)	Obecny w obu typach materiału biologicznego
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	88,7	47,2	tak
<i>Streptococcus mitis</i>	64,2	81,1	tak
<i>Streptococcus oralis</i>	41,5	67,9	tak
<i>Streptococcus vestibularis</i>	41,5	49,1	tak
<i>Streptococcus salivarius</i>	34,0	34,0	tak
<i>Staphylococcus hominis</i>	32,1	35,8	tak
<i>Rothia mucilaginosa</i>	26,4	35,8	tak
<i>Gemella haemolysans</i>	24,5	45,3	tak
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	24,5	17,0	tak
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	43,4	20,8	tak

W II poborze zaobserwowano podobny ogólny rozkład identyfikacji bakteryjnych jak w I poborze (Tabela 7). *S. epidermidis* obecny był w obu badanych materiałach, ale częściej identyfikowano go w mleku (90,6% vs. 56,2%). Natomiast w wymazach, podobnie jak w przypadku identyfikacji z pierwszego poboru, dominowały paciorkowce – *S. mitis* (62,5% vs. 81,2%), *S. oralis* (21,9% vs. 53,2%) *S. vestibularis* (odpowiednio 56,2% vs. 56,2%), (Tabela 8).

Tabela 8. Gatunki dominujące wspólne dla mleka i wymazu z poboru II (rdzeń mikrobiomu osi matka-dziecko)

Gatunek	Mleko II (%)	Wymaz II (%)	Obecny w obu typach materiału biologicznego
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	90,6	56,2	tak
<i>Streptococcus mitis</i>	62,5	81,2	tak
<i>Streptococcus oralis</i>	21,9	53,1	tak
<i>Streptococcus vestibularis</i>	56,2	56,2	tak
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	31,2	25,5	tak
<i>Streptococcus salivarius</i>	40,6	37,5	tak
<i>Staphylococcus hominis</i>	18,8	40,6	tak
<i>Rothia mucilaginosa</i>	40,6	65,6	tak
<i>Gemella haemolysans</i>	18,8	28,1	tak
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	21,9	34,1	tak

Analiza podobieństwa składu mikrobioty mleka matki i wymazów z jamy ustnej dziecka, oceniano za pomocą indeksu Jaccarda, która wykazała zmniejszenie stopnia nakładania się składu gatunkowego pomiędzy poborami. W I poborze mediana indeksu wynosiła 0,39 (IQR: 0,29–0,53), co odpowiadało średnio 39% gatunków wspólnych dla obu typów próbek. W II poborze wartość mediany obniżyła się do 0,26, a większość analizowanych par próbek wykazywała trend spadkowy (Wykres 9).



Wykres 9. Parowany wykres indeksu Jaccarda nakładania się mikrobiomu mleka i wymazu jamy ustnej: I vs II pobór

W celu oceny stabilności składu gatunkowego mikrobioty pomiędzy I i II poborem mleka przeprowadzono analizę zmian częstości występowania 17 najczęściej identyfikowanych gatunków bakterii mleka kobiecego z wykorzystaniem testu McNemara. Badanie obejmowało 32 pary próbek mleka pobranych od tych samych uczestniczek.

Analiza nie wykazała istotnych zmian częstości występowania dla żadnego z badanych gatunków bakterii po korekcji FDR (wszystkie $p_{FDR} \geq 0,167$). Dla części gatunków obserwowano zmiany częstości występowania, ale miały one charakter umiarkowany i nie tworzyły spójnego wzorca zmian na poziomie całej badanej grupy. Stąd uzyskane wyniki wykazują wysoką stabilność składu gatunkowego mikrobioty mleka pomiędzy poborami.

Największą bezwzględną zmianę odnotowano dla *S. oralis*, którego odsetek zmniejszył się z 34,0% w I poborze do 13,2% w II poborze ($p_{\text{raw}} = 0,010$). Mimo, że wynik ten nie osiągnął istotności po korekcji, stanowił najsilniejszy obserwowany sygnał zmian w czasie. Drugą co do wielkości redukcję zaobserwowano dla *S. hominis* (24,5% vs 11,3%; $p_{\text{raw}} = 0,070$).

Wśród gatunków wykazujących tendencję wzrostową wyróżniały się: *M. luteus* (5,7% vs 15,1%; $p_{\text{raw}} = 0,182$), *R. mucilaginosa* (17,0% vs 24,5%; $p_{\text{raw}} = 0,423$) oraz *S. vestibularis* (26,4% vs 34,0%; $p_{\text{raw}} = 0,423$).

Największą stabilność wykazywały *S. epidermidis* (54,7% w obu pobraniach) oraz *S. salivarius* (24,5% w obu pobraniach) (Tabela 9).

Tabela 9. Zmiany częstości występowania najczęściej identyfikowanych gatunków bakterii pomiędzy I i II poborem mleka ocenione testem McNemara uporządkowane rosnąco wg p_{raw} (N = 32 pary)

Gatunek	N_I (%)	N_{II} (%)	Zmiana (pp.)	χ^2	p_{raw}	p_{FDR}	Kierunek
<i>Streptococcus oralis</i>	18 (34,0%)	7 (13,2%)	-20,8	6,67	0,010	0,167	spadek
<i>Staphylococcus hominis</i>	13 (24,5%)	6 (11,3%)	-13,2	3,27	0,070	0,599	spadek
<i>Gemella haemolysans</i>	10 (18,9%)	6 (11,3%)	-7,5	1,13	0,289	1,000	spadek
<i>Micrococcus luteus</i>	3 (5,7%)	8 (15,1%)	+9,4	1,78	0,182	1,000	wzrost
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	15 (28,3%)	10 (18,9%)	-9,4	1,07	0,302	1,000	spadek
<i>Rothia mucilaginosa</i>	9 (17,0%)	13 (24,5%)	+7,5	0,64	0,423	1,000	wzrost
<i>Streptococcus vestibularis</i>	14 (26,4%)	18 (34,0%)	+7,5	0,64	0,423	1,000	wzrost
<i>Corynebacterium kroppenstedtii</i>	3 (5,7%)	5 (9,4%)	+3,8	0,50	0,480	1,000	wzrost
<i>Streptococcus mitis</i>	22 (41,5%)	20 (37,7%)	-3,8	0,08	0,773	1,000	stabilny
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	29 (54,7%)	29 (54,7%)	0,0	< 0,01	1,000	1,000	stabilny
<i>Streptococcus salivarius</i>	13 (24,5%)	13 (24,5%)	0,0	< 0,01	1,000	1,000	stabilny
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	8 (15,1%)	7 (13,2%)	-1,9	< 0,01	1,000	1,000	stabilny
<i>Streptococcus peroris</i>	8 (15,1%)	9 (17,0%)	+1,9	< 0,01	1,000	1,000	stabilny
<i>Staphylococcus warneri</i>	4 (7,5%)	5 (9,4%)	+1,9	< 0,01	1,000	1,000	stabilny
<i>C. tuberculostearicum</i>	5 (9,4%)	6 (11,3%)	+1,9	< 0,01	1,000	1,000	stabilny
<i>Kocuria rhizophila</i>	2 (3,8%)	3 (5,7%)	+1,9	< 0,01	1,000	1,000	stabilny
<i>Neisseria subflava</i>	3 (5,7%)	2 (3,8%)	-1,9	< 0,01	1,000	1,000	stabilny

Test McNemara; N_I , N_{II} = liczba uczestniczek z danym gatunkiem w I i II poborze. Zmiana (pp.) = różnica w punktach procentowych ($\%_{II} - \%_I$). χ^2 = statystyka McNemara; p_{FDR} = korekta Benjaminiego-Hochberga; Kierunek: wzrost $\geq +5$ pp.; spadek ≤ -5 pp.; stabilny < 5 pp.

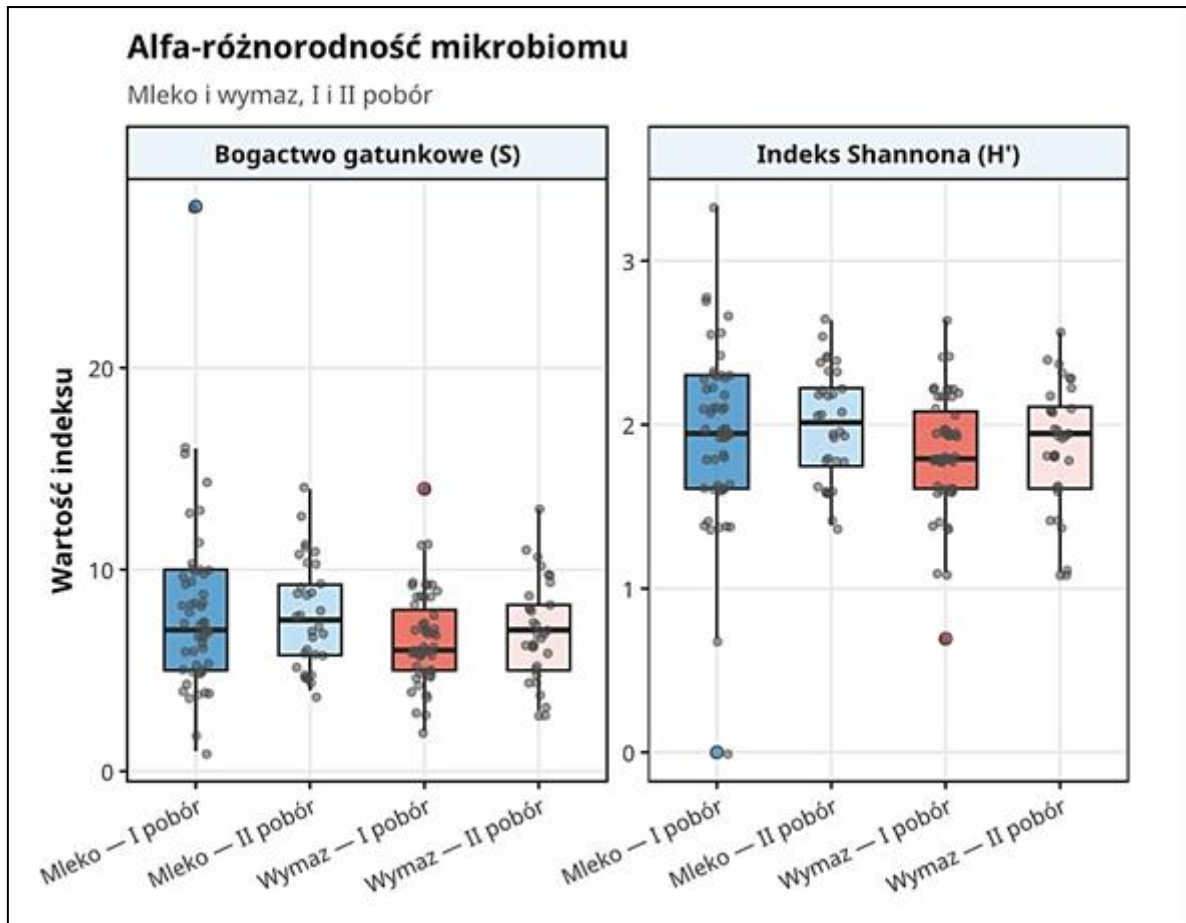
5.4 Alfa- i beta- różnorodność mikrobioty mleka kobiecego oraz wymazów z jamy ustnej dzieci

Wskaźniki alfa-różnorodności mikrobiomu mleka oraz wymazów z jamy ustnej były zbliżone zarówno pomiędzy badanymi materiałami, jak i pomiędzy pobraniami (Tabela 10; Wykres 10). Mediana indeksu Shannona dla mleka w I poborze wynosiła 1,95 (IQR: 1,61–2,30) oraz 2,01 (IQR: 1,75–2,22) w II poborze; bez istotnych statystycznie różnic (test Wilcoxona: $p = 0,809$). Bogactwo gatunkowe było nieznacznie wyższe w mleku ($Me = 7,0$; IQR: 5,0–10,0) niż w wymazach ($Me = 6,0$; IQR: 5,0–8,0). Wartości indeksu Shannona mieściły się w zakresie 1,6–2,3.

Tabela 10. Wskaźniki alfa-różnorodności mikrobiomu mleka i wymazu jamy ustnej w I i II poborze

Źródło materiału	Pobór	N	Bogactwo S , Me (IQR)	Shannon H' , Me (IQR)
Mleko	I	53	7,0 (5,0-10,0)	1,95 (1,61-2,30)
Mleko	II	32	7,5 (5,8-9,2)	2,01 (1,75-2,22)
Wymaz j.u.	I	53	6,0 (5,0-8,0)	1,79 (1,61-2,08)
Wymaz j.u.	II	32	7,0 (5,0-8,2)	1,95 (1,61-2,11)
Wilcoxon (mleko I vs II)				$p = 0,809$

Me = mediana; IQR = rozstęp międzykwartylowy. S = bogactwo gatunkowe H' = indeks Shannona. Porównanie parowane (I vs II pobór): test Wilcoxona. j.u. = jama ustna.



Wykres 10. Porównanie wskaźników alfa-różnorodności mikrobiomu między czterema kombinacjami materiału i czasu poboru (bogactwo gatunkowe oraz indeks Shannona)

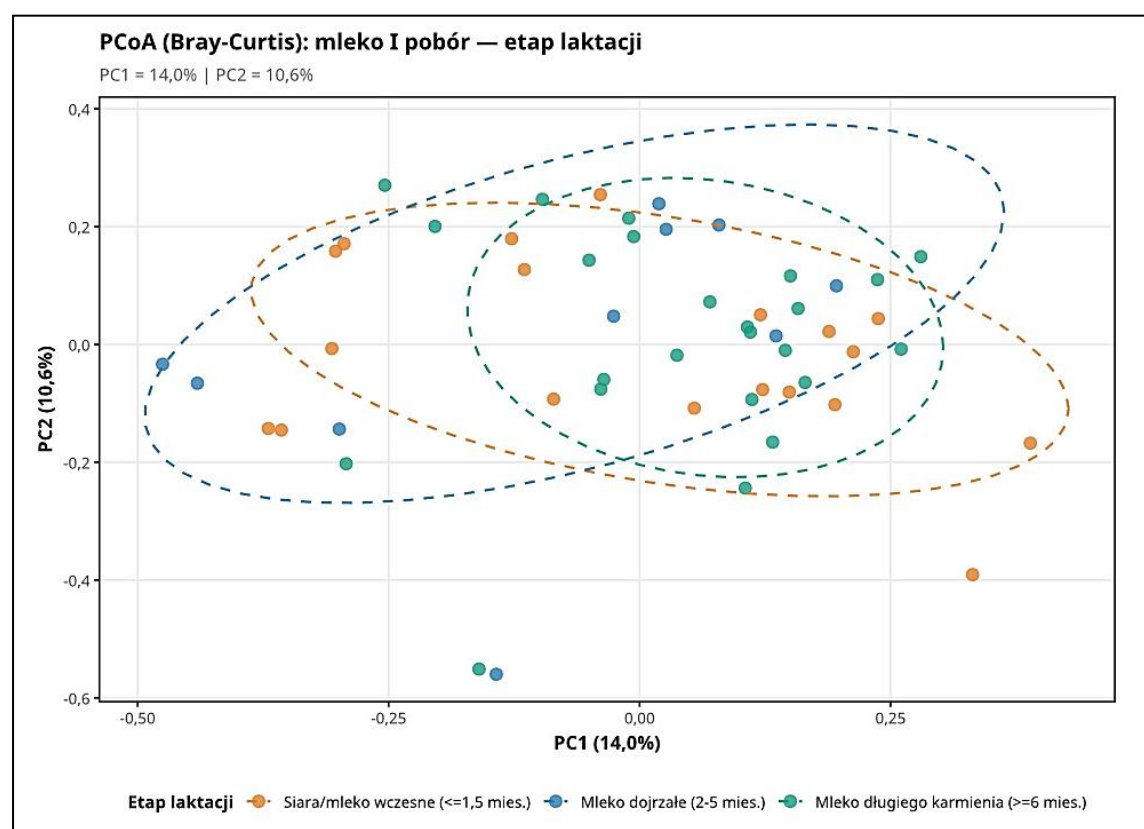
Badanie różnic w składzie mikrobioty pomiędzy próbkami (analizą PERMANOVA na macierzy Braya-Curtisa) wykazała, że etap laktacji jest czynnikiem istotnie wpływającym na strukturę beta-różnorodności mikrobiomu mleka ($R^2 = 0,067$, pseudo-F = 1,83, $p = 0,009$), (Tabela 11). Metoda porodu oraz dieta stosowana w ciąży nie były istotnie związane ze zmianami w składzie mikrobioty mleka ($R^2 = 0,024$, $p = 0,195$ vs. $R^2 = 0,059$, $p = 0,331$).

Tabela 11. Wielowymiarowa analiza różnic między grupami klinicznymi: wpływ czynników klinicznych w strukturę beta-różnorodności mikrobioty mleka (I pobór, N = 53)

Czynnik	Suma kwadratów	R^2	p
Etap laktacji (3 kategorie)	0,93	0,067	0,009
Metoda porodu (2 kategorie)	0,33	0,024	0,195
Dieta w ciąży (4 kategorie)	0,82	0,059	0,331

R^2 = frakcja całkowitej wariancji odległości Bray-Curtisa wyjaśniona przez dany czynnik; p = wartość p permutacyjna. Etapy laktacji kategorie: siara / mleko wczesne ($\leq 1,5$ mies., N = 19), mleko dojrzałe (2–5 mies., N = 10), mleko długiego karmienia (≥ 6 mies., N=24); metoda porodu kategorie: drogami natury (N = 26), cięcie cesarskie (N = 27); Dieta w ciąży kategorie: ogólna (N = 40), cukrzycowa (N = 10), wegetariańska (N = 2), bezglutenowa (N = 1)

Rozmieszczenie próbek w analizie PCoA mapowana wg etapu laktacji (Wykres 11), ujawniła tendencję do separacji grupy próbek siary/mleka wczesnego od grupy próbek mleka przedłużonej laktacji wzdłuż osi PC1. Nakładanie się elips w 80% CI wskazuje na znaczne podobieństwo między grupami próbek, jednocześnie wykazując heterogeniczność pomiędzy próbkami (brak wyraźnie odrębnych klastrow).



Wykres 11. Wykres analizy PCoA (na macierzy Bray-Curtis) mikrobioty mleka mapowana wg etapu laktacji (I pobór)

5.5 Ocena zawartości oligosacharydów i laktoferyny

Ocenie składu oligosacharydów mleka kobiecego wykonano w 29 próbek pochodzących z pierwszego oraz 25 próbek z drugiego poboru, co stanowiło odpowiednio 54,7% i 78,1% dostępnych próbek. Z przeprowadzonych analiz mleka kobiecego zidentyfikowano 13 typów (HMO) przedstawionych w Tabeli 11. Mediana całkowitego stężenia oligosacharydów w pierwszym i drugim poborze wynosiła odpowiednio 2,49 mg/mL (zakres 0,85 – 100,48) 2,43 mg/mL (0,77 – 72,78) (Tabela 12).

Tabela 12. Zidentyfikowane HMO w badanych próbkach mleka

Lp.	Pełna nazwa	Skrót	Wzór	Masa cząsteczkowa [u]
1	2'-Fucosyllactose	2FL	$C_{18}H_{32}O_{15}$	488,17
2	3-Fucosyllactose	3FL	$C_{18}H_{32}O_{15}$	488,17
3	3'-Sialyllactose	3SL	$C_{23}H_{39}NO_{19}$	633,21
4	6'-Sialyllactose	6SL	$C_{23}H_{39}NO_{19}$	633,21
5	Difucosyllactose	DFL	$C_{24}H_{42}O_{19}$	634,58
6	Lacto-N-difucohexaose	LNDFH	$C_{38}H_{65}NO_{29}$	999,36
7	Lacto-N-tetraose	LNT	$C_{26}H_{45}NO_{21}$	707,25
8	Disialyllacto-N-tetraose	DSLNT	$C_{48}H_{79}N_3O_{37}$	1289,44
9	Sialyllacto-N-hexaose	SLNH	$C_{51}H_{85}N_3O_{39}$	1363,48
10	Lacto-sialyl-tetrasaccharide	LST	$C_{37}H_{62}N_2O_{29}$	998,34
11	Difucosyl-lacto-N-hexaose	DFLNH	$C_{52}H_{88}N_2O_{39}$	1364,50
12	Fucosyl-lacto-N-hexaose	FLNH	$C_{46}H_{78}N_2O_{35}$	1219,12
13	Lacto-N-fucopentaose	LNFP	$C_{32}H_{55}NO_{25}$	853,31

Oznaczenie stężenia laktoferyny wykonano w 50 próbkach mleka z I poboru oraz 29 próbek z II poboru, co odpowiadało 94,3% i 90,6% zebranego materiału biologicznego obu zbiorów. Mediana LF I i II zbiórki wyniosła 2,535 mg/mL (zakres 1,240 – 14,268) oraz 2,805 mg/mL (1,376 – 14,454) (Tabela 13).

Różnice w liczbie analizowanych danych były zależne od dostępności materiału biologicznego.

Nie stwierdzono istotnych różnic statystycznych pomiędzy pierwszym a drugim poborem dla badanych parametrów biochemicznych.

Tabela 13. Charakterystyka statystyczna stężeń HMO i laktoferyny (I i II pobór)

Zmienna	Pobór	N	% braków	Me (IQR)	$M \pm SD$	Zakres	95% CI
Total HMO mg/mL	I	29	45,3%	2,49 (1,45-3,49)	9,74 $\pm$ 21,65	0,85-100,48	1,9-6,0
(suma 13 frakcji)	II	25	21,9%	2,43 (1,87-4,10)	7,78 $\pm$ 16,48	0,77-72,78	2,1-5,3
Laktoferyna (mg/mL)	I	50	5,7%	2,535 (1,910-5,161)	4,022 $\pm$ 3,264	1,240- 14,268	2,4-4,6
	II	29	9,4%	2,805 (2,236-4,390)	3,959 $\pm$ 3,019	1,376- 14,454	2,6-4,3

N = liczba prób; Me = mediana; IQR = rozstęp międzykwartylowy ($Q1-Q3$); M = średnia arytmetyczna; SD = odchylenie standardowe; 95% CI = przedział ufności (test Wilcozona); % braków = odsetek próbek bez dostępnych danych w odniesieniu do sumy zebranego materiału biologicznego

Najwyższe mediany stężeń odnotowano dla 2'-FL zarówno w I poborze (1,17 mg/mL), jak i w II poborze (1,21 mg/mL). Wysokie wartości obserwowano również dla 3-FL, którego mediana wynosiła odpowiednio 0,83 mg/mL i 0,89 mg/mL.

Większość analizowanych frakcji HMO charakteryzowała się zbliżonymi medianami stężeń pomiędzy próbkami mleka z I i II poboru. Niewielki wzrost mediany w II poborze obserwowano dla LNT, SLNH oraz FLNH, natomiast niższe wartości odnotowano dla DFL.

Analizowane frakcje HMO wykazały znaczną zmienność indywidualną, co potwierdzają szerokie zakresy wartości oraz wysokie odchylenia standardowe dla części oznaczanych oligosacharydów. Największą rozpiętość wyników stwierdzono m.in. dla 6'-SL, LNT oraz LNFP (Tabela 14).

Tabela 14. Charakterystyka statystyczna stężeń HMO - frakcje indywidualne HMO (I i II pobór)

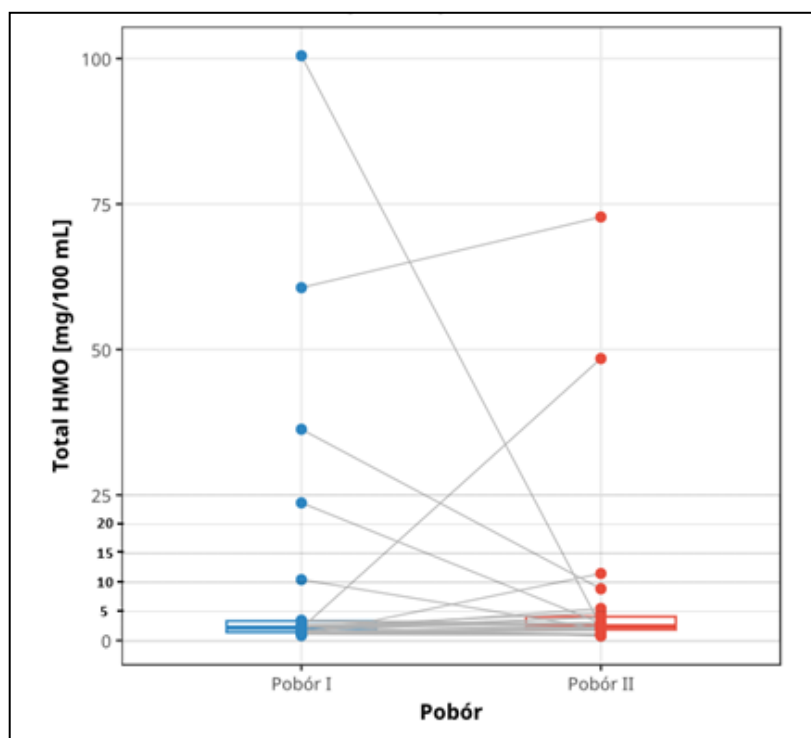
Frakcja HMO mg/mL	Pobór	N	Me (IQR),	$M \pm SD$	Zakres	95% CI
2'-FL (2'- fukozylolaktoza)	I	29	1,17 (0,55-2,21)	$1,51 \pm 1,25$	0,11-5,3	0,93-1,8
	II	25	1,21 (0,59-2,23)	$1,61 \pm 1,51$	0,15-7,25	0,90-1,9
3'-SL (3'- sialilolaktoza)	I	29	0,10 (0,08-0,13)	$0,70 \pm 2,05$	0,05-10,65	0,09-0,26
	II	25	0,12 (0,08-0,16)	$0,49 \pm 1,11$	0,06-4,93	0,10-0,28
6'-SL (6'- sialilolaktoza)	I	29	0,08 (0,07-0,14)	$1,31 \pm 3,99$	0,05-18,96	0,08-0,62
	II	25	0,08 (0,07-0,18)	$0,80 \pm 2,32$	0,06-10,92	0,08-0,25
DFL (difukozylolaktoza)	I	28	0,15 (0,09-0,18)	$0,64 \pm 1,85$	0,05-9,64	0,12-0,19
	II	25	0,14 (0,10-0,21)	$0,80 \pm 2,16$	0,06-8,89	0,12-0,40
LNDFH (lakto-N- difukohekszoza)	I	29	0,08 (0,07-0,09)	$0,65 \pm 1,88$	0,05-8,55	0,07-0,14
	II	24	0,08 (0,07-0,14)	$0,63 \pm 1,83$	0,05-7,831	0,07-0,15
LNT (lakto-N- tetraoza)	I	29	0,12 (0,08-0,17)	$1,10 \pm 3,13$	0,06-13,09	0,10-0,63
	II	25	0,14 (0,08-0,34)	$1,09 \pm 2,92$	0,06-13,13	0,11-0,65
DSLNT (disialilolakto-N- tetraoza)	I	29	0,08 (0,07-0,09)	$1,06 \pm 2,65$	0,05-10,59	0,07-0,13
	II	25	0,08 (0,07-0,13)	$0,56 \pm 1,49$	0,05-6,47	0,07-0,13
SLNH (sialilolakto-N- hekszoza)	I	12	0,08 (0,07-0,81)	$0,47 \pm 0,65$	0,05-1,82	0,07-0,94
	II	9	0,13 (0,09-0,24)	$0,23 \pm 0,22$	0,06-0,67	0,09-0,40
LST (lakto-sialil- tetrasacharyd)	I	24	0,08 (0,07-0,12)	$1,05 \pm 2,40$	0,06-8,90	0,07-1,5
	II	21	0,09 (0,07-0,14)	$0,36 \pm 0,90$	0,05-4,09	0,08-0,25
DFLNH (difukozył- lakto-N-hekszoza)	I	11	0,08 (0,07-1,35)	$0,60 \pm 0,78$	0,05-2,13	0,07-1,1
	II	10	0,09 (0,07-0,23)	$0,29 \pm 0,40$	0,07-1,14	0,07-0,60
FLNH (fukozył-lakto- N-hekszoza)	I	9	0,24 (0,21-0,27)	$0,72 \pm 1,0$	0,16-2,93	0,21-1,6
	II	9	0,39 (0,24-0,41)	$0,69 \pm 0,78$	0,20-2,34	0,24-1,4
LNFP (lakto-N- fukopentaoza)	I	28	0,16 (0,14-0,20)	$1,21 \pm 3,15$	0,10-13,35	0,15-0,66
	II	23	0,16 (0,13-0,26)	$1,01 \pm 2,80$	0,11-12,20	0,15-0,27
3-FL (3- fukozylolaktoza)	I	4	0,83 (0,29-1,28)	$0,79 \pm 0,59$	0,12-1,37	0,12-1,4
	II	3	0,89 (0,49-1,22)	$0,87 \pm 0,37$	0,49-1,22	0,49-1,2

N = liczba prób; Me = mediana; IQR = rozstęp międzykwartyłowy (Q1-Q3); M = średnia arytmetyczna; SD = odchylenie standardowe; 95% CI = przedział ufności (test Wilcozona)

Największą bezwzględną zmianę mediany odnotowano dla całkowitego stężenia HMO, którego mediana wzrosła z 2,21 do 2,43 mg/mL ($\Delta Me = 0,329$), ale różnica nie była istotna statystycznie ($p = 0,647$). Mediana laktoferyny wzrosła nieznacznie z 2,535 do 2,748 mg/mL ($\Delta Me = 0,165$), jednak również ta zmiana nie osiągnęła istotności statystycznej ($p = 0,882$).

Mediana stężenia 2'-FL wzrosła z 0,97 do 1,21 mg/mL ($\Delta Me = 0,024$), uzyskując najniższą niekorygowaną wartość $p = 0,501$. Podobny kierunek zmian obserwowano dla większości analizowanych składników, bez istotności statystycznej (Tabela 14).

Wykres 12 przedstawia parowane porównanie całkowitego stężenia HMO (*Total HMO*) pomiędzy pierwszym i drugim poborem mleka. Każda linia łączy dwa pomiary pochodzące od tej samej uczestniczki, umożliwiając ocenę indywidualnych zmian w czasie. Analiza wizualna wskazuje na występowanie wyraźnych różnic u pojedynczych uczestniczek, nie miały one wyraźnego trendu wzrostowego lub spadkowego i nie przełożyły się na istotne różnice dla całej grupy. Indywidualne zmiany stężeń koncentrowały się wokół mediany wynoszącej około 2–4 mg/mL. Wykres potwierdza wyniki analizy statystycznej przedstawione w Tabeli 14. Wykazują one stabilne stężenie HMO w mleku kobiecym pomiędzy poborami, potwierdzając niewielką tendencję wzrostową stężeń całkowitej ilości HMO w II poborze.



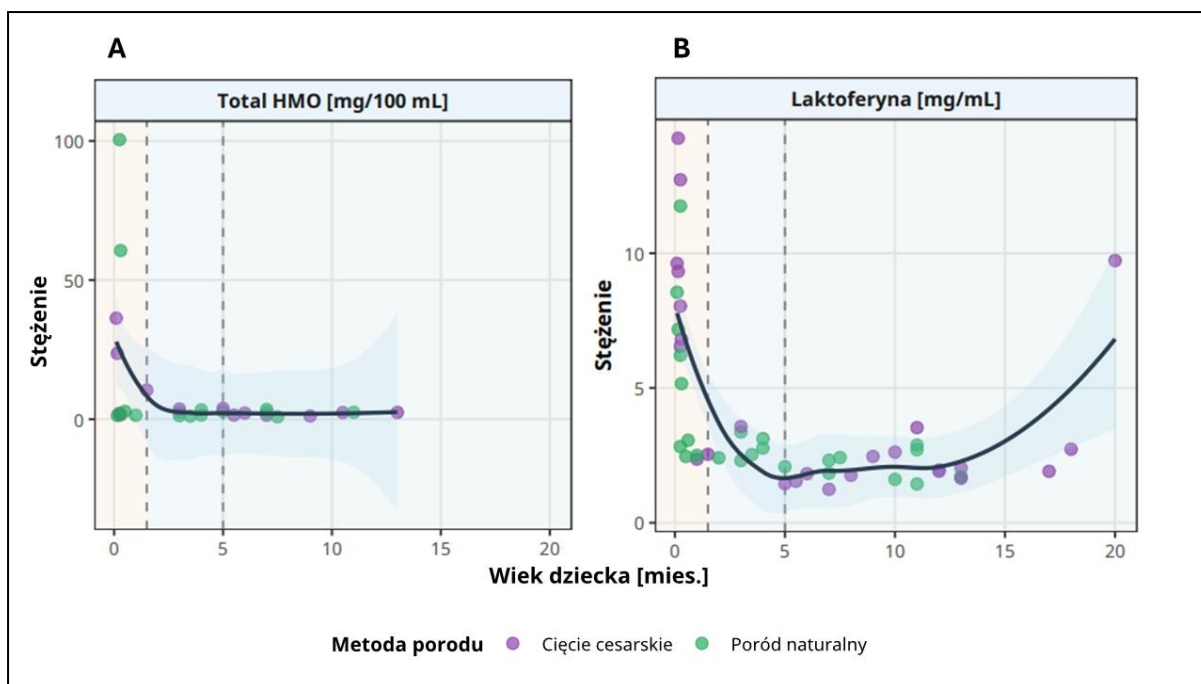
Wykres 12. Indywidualne zmiany całkowitego stężenia HMO pomiędzy I i II poborem mleka (analiza parowana)

Wykres 13 przedstawia zależność pomiędzy wiekiem dziecka a całkowitym stężeniem HMO (panel A) oraz stężeniem laktoferyny (panel B) w mleku kobiecym, w formie wykresów rozrzutu z oznaczeniem metody porodu (zielony – poród naturalny, fioletowy – cięcie cesarskie). Linia ciągła przedstawia wygładzony trend zmian, natomiast zacieniowany obszar odpowiada 95% przedziałowi ufności. Pionowe linie przerywane wyznaczają granice pomiędzy kolejnymi etapami laktacji.

Panel lewy wykazuje najwyższe stężenie oligosacharydów w pierwszym miesiącu życia, podczas którego następuje łagodny spadek z szerokim rozproszeniem obserwacji. Po początkowym okresie wysokich wartości, następowała szybka redukcja stężenia i jego stabilizacja na relatywnie niskim poziomie. Wykres uwidacznia znaczną zmienność międzynosobniczą, zwłaszcza w najwcześniejszym okresie laktacji, gdzie odnotowano pojedyncze próbki o bardzo wysokich stężeniach HMO (Wykres 13A).

Stężenie laktoferyny w mleku wykazuje najwyższe stężenie w pierwszych tygodniach życia dziecka, po czym następuje wyraźny spadek. Po czym krzywa opada gwałtownie około 4–5 miesiąca, następnie uwidacznia się stabilizacja na niższym poziomie, a po około 12 miesiącu laktacji uwidacznia się trend wzrostowy (Wykres 13B).

Metoda porodu nie wskazuje na różnice pomiędzy kobietami po cięciu cesarskim a rodzącymi drogą naturalną. Punkty reprezentujące obie grupy są rozmieszczone podobnie w całym zakresie wieku dziecka (Wykres 13).

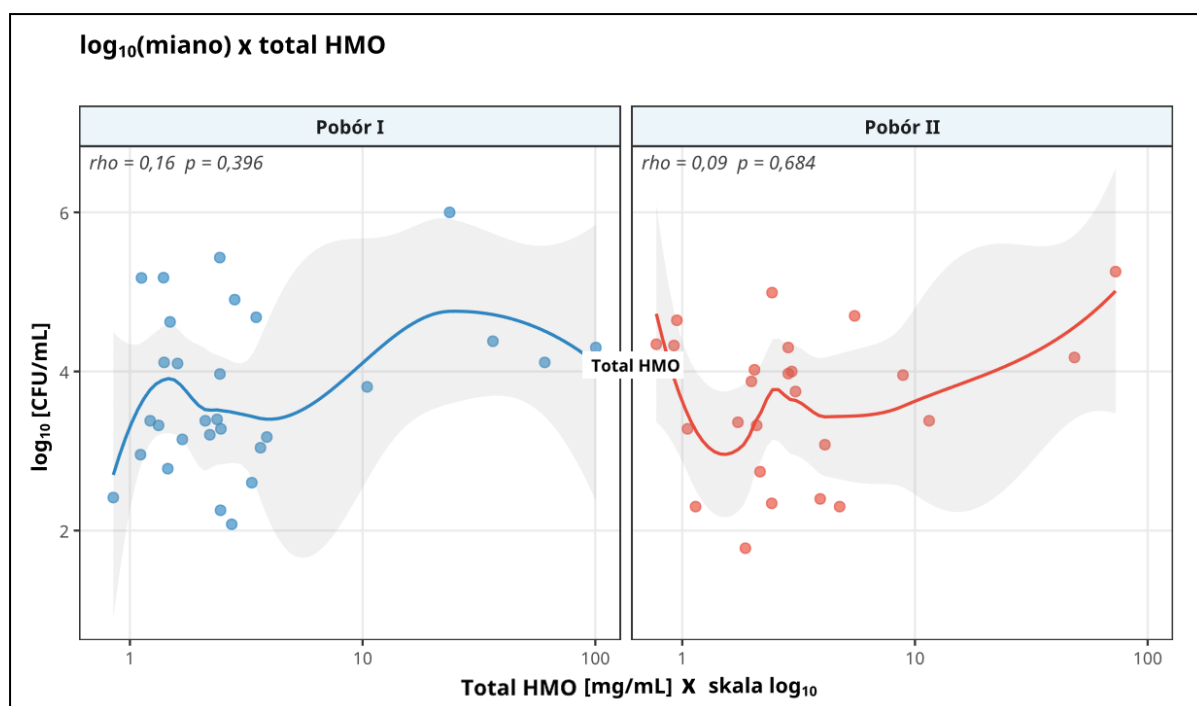


Wykres 13. Zależność całkowitego stężenia HMO (A) oraz stężenia laktoferyny (B) od wieku dziecka z uwzględnieniem metody porodu (I pobór)

5.6 Korelacja miana bakterii mleka kobiecego z oligosacharydami i laktoferyną

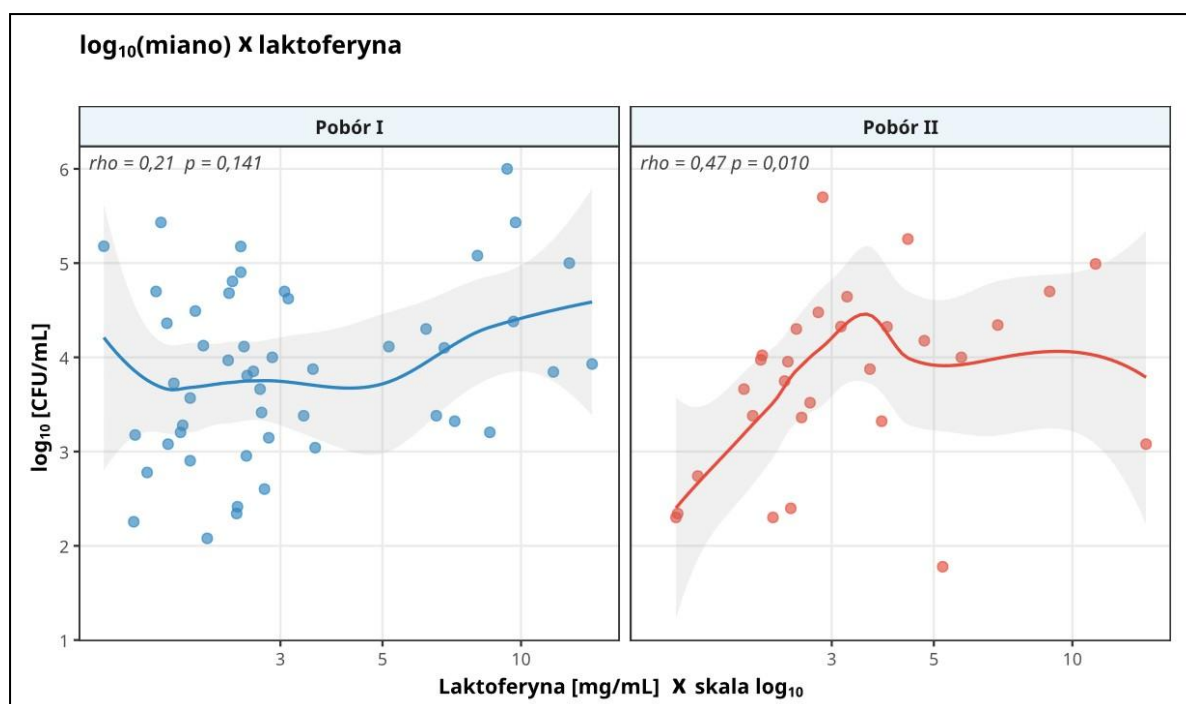
Analiza korelacji Spearmana wykazała wyłącznie umiarkowanie dodatnie zależności pomiędzy logarytmem liczby bakterii (mianem) mleka, a wybranymi składnikami mleka.

Wykresy rozrzutu potwierdziły brak wyraźnego trendu pomiędzy logarytmem miana bakterii stężeniem oligosacharydów mleka kobiecego (Total HMO). Znaczne rozproszenie naniesionych danych oraz szerokie przedziały ufności wokół linii wskazują na dużą zmienność badanych parametrów (Wykres 14). Wartość współczynnika korelacji Spearmana wskazuje na bardzo słabą dodatnią zależność pomiędzy log miana bakterii a stężeniem oligosacharydów mleka kobiecego (Total HMO) w I i II poborze ($\rho = 0,164$; $\rho = 0,09$). Nie stwierdzono istotnej korelacji pomiędzy mianem bakterii a całkowitym stężeniem HMO ani w pierwszym, ani w drugim poborze mleka ($p = 0,396$; $p = 0,684$).



Wykres 14. Wykresy rozrzutu: $\log_{10}$ (miano bakterii) a stężenie Total HMO (I i II pobór, skala logarytmiczna)

Graficzna prezentacja zależności pomiędzy stężeniem laktoferyny a logarytmem miana bakterii wykazywała dodatni trend korelacji badanych parametrów. W pierwszym poborze zależność między stężeniem laktoferyny a logarytmem liczebności bakterii stwierdzono słabą dodatnią korelację ($\rho = 0,211$), która nie uzyskała istotności statystycznej ($p = 0,141$). W drugim poborze zaobserwowano umiarkowaną dodatnią korelację ($\rho = 0,47$; $p = 0,010$), wskazującą na tendencję wzrostu liczebności bakterii wraz ze wzrostem stężenia laktoferyny, która potwierdziła istotność statystyczną (Wykres 15).



Wykres 15. Wykresy rozrzutu: log₁₀(miano bakterii) a stężenie laktoferyny (I i II pobór, skala logarytmiczna)

5.7 Związek gatunków bakterii z oligosacharydami i laktoferyną

Wykonano jednoczynnikową analizę przesiewową mającą na celu ocenę związku obecności poszczególnych gatunków bakterii mleka kobiecego a stężeniem oligosacharydów mleka kobiecego i laktoferyny w próbkach mleka z I poboru. Tabela 15 przedstawia dwanaście par gatunek – HMO/laktoferyna wykazujących najsilniejsze zależności. Analiza wykazała, że w próbkach mleka, w których zidentyfikowano obecność *Rothia mucilaginosa*, stężenia wybranych oligosacharydów były istotnie niższe w porównaniu z próbkami, w których tego gatunku nie wykryto. Dotyczyło to 2'-FL (Me: 0,44 vs 1,43 mg/mL; $p_{\text{raw}} = 0,006$), DFLNH (Me: 0,067 vs. 0,969 mg/mL; $p_{\text{raw}} = 0,012$) i SLNH (Me: 0,068 vs. 0,106 mg/mL; $p_{\text{raw}} = 0,018$).

Obecność w mleku *Staphylococcus hominis* wiązała się z istotnie statystycznym wyższym stężeniem laktoferyny w porównaniu z próbkami mleka, w których nie wykryto obecności tego gatunku bakterii (Me = 2,830 vs 2,410 mg/ml; $p_{\text{raw}} = 0,029$). Była to jedyna dodatnia zależność wykazana w przeprowadzonej analizie (Tabela 15).

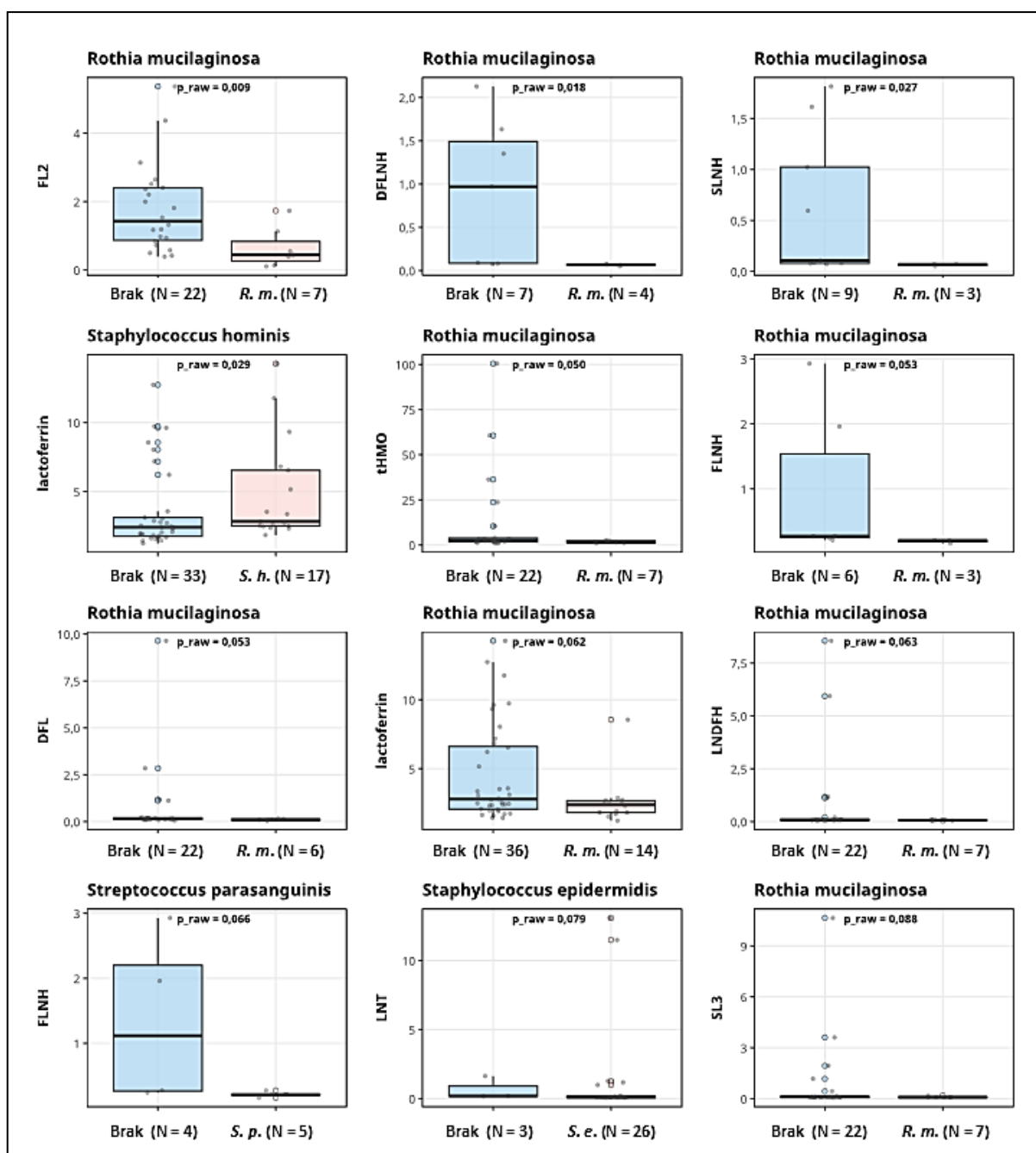
Tabela 15. Jednoczynnikowa analiza zależności pomiędzy obecnością wybranych gatunków bakterii a stężeniem HMO i laktoferyny w mleku kobiecym (12 najbardziej istotnych statystycznie wyników z I poboru)

Gatunek	HMO/laktoferyna	N ₊	N ₋	Me ₊	Me ₋	Kierunek	<i>p_{raw}</i>
<i>Rothia mucilaginosa</i>	2'-FL	7	22	0,442	1,427	-	0,006
<i>Rothia mucilaginosa</i>	DFLNH	4	7	0,067	0,969	-	0,012
<i>Rothia mucilaginosa</i>	SLNH	3	9	0,068	0,106	-	0,018
<i>Staphylococcus hominis</i>	Laktoferyna	17	33	2,830	2,410	+	0,029
<i>Rothia mucilaginosa</i>	FLNH	3	6	0,206	0,272	-	0,048
<i>Rothia mucilaginosa</i>	Total HMO	7	22	1,454	2,594	-	0,048
<i>Rothia mucilaginosa</i>	DFL	6	22	0,093	0,157	-	0,052
<i>Rothia mucilaginosa</i>	Laktoferyna	14	36	2,385	2,800	-	0,062
<i>Rothia mucilaginosa</i>	LNDFH	7	22	0,069	0,080	-	0,062
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	FLNH	5	4	0,209	1,116	-	0,064
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	LNT	26	3	0,108	0,191	-	0,081
<i>Rothia mucilaginosa</i>	3'-SL	7	22	0,088	0,113	-	0,088

Test Manna-Whitneya-Wilcozona; N_{+/.} = liczba obecnego/nieobecnego gatunku; Me = mediana stężenia [mg/mL dla HMO; mg/mL dla laktoferyny]; pogrubione: *p_{raw}* < 0,05; Kierunek („+”/„-”) wskazuje wyższe/nizsze stężenie u uczestniczek z obecnością danego gatunku

Wykres 16 przedstawia serię wykresów skrzynkowych ilustrujących różnice w stężeniach wybranych oligosacharydów mleka kobiecego oraz laktoferyny w zależności od obecności wybranych gatunków bakterii w próbkach mleka. Wykresy stanowią graficzną prezentację danych z Tabeli 15. Najczęściej występującym gatunkiem była *R. mucilaginosa*, uwzględniona na dziewięciu wykresach i wykazująca najsilniejsze zależności badanych parametrów. Obecność tego gatunku była związana z niższymi stężeniami większości analizowanych HMO w porównaniu z próbkami, w których gatunek ten nie występował. Najbardziej wyraźną różnicę odnotowano dla 2'-FL (*p_{raw}* = 0,006), DFLNH (*p_{raw}* = 0,018) oraz SLNH (*p_{raw}* = 0,027).

Obecność *S. hominis* wiązała się z istotnie statystycznie wyższym stężeniem laktoferyny w porównaniu z próbkami mleka bez niniejszego gatunku bakterii (*p_{raw}* = 0,029). Występowanie *S. parasanguinis* była związana z niższymi stężeniami FLNH (*p_{raw}* = 0,066), natomiast dla *S. epidermidis* obserwowano tendencję do niższych stężeń LNT (*p_{raw}* = 0,079). W obu przypadkach wartości *p* nie osiągnęły jednak progu istotności statystycznej (Wykres 16).



Wykres 16. Wykresy skrzynkowe: stężenia HMO wg obecności najsilniej zasocjowanych gatunków bakterii

5.8 Profil mikrobiologiczny i biochemiczny mleka kobiecego a etap laktacji. Korelacje oligosacharydów i laktoferyny z wiekiem badanych i BMI

Wykonano analizę korelacji rang Spearmana między 17 biomarkerami mleka (HMO i LF) a trzema zmiennymi ciągłymi (wiekiem dziecka, wiekiem matki oraz BMI przed ciążą). Wyniki wskazały, że zarówno wyższy wiek matki i dziecka (odzwierciedlający etap laktacji) wiążą się z tendencją do obniżania stężeń HMO oraz laktoferyny w mleku kobiecym. Jednocześnie nie

stwierdzono istotnych statystycznie korelacji pomiędzy stężeniami HMO i LF a wartością BMI matki przed ciążą oraz sposobem porodu (Tabela 16, 17, 18).

Tabela 16 przedstawia wyniki analizy korelacji rang Spearmana pomiędzy stężeniami HMO, laktoferyny, mianem bakterii oraz wskaźnikami różnorodności mikrobiomu a wiekiem dziecka wyrażonym w miesiącach. Analiza wykazała przewagę ujemnych zależności (ρ), wskazujących na zmniejszenie się części składników biochemicznych mleka wraz z wiekiem dziecka.

Najsilniejsze korelacje odnotowano dla laktoferyny, która wykazała silną ujemną korelację, istotną statystycznie ($\rho = -0,629$; $p_{\text{FDR}} < 0,001$). Wskazuje to na spadek stężenia LF wraz z wiekiem dziecka, tym samym postępowaniem laktacji.

Nie stwierdzono istotnych zależności pomiędzy wiekiem dziecka a całkowitym stężeniem HMO, logarytmem miana bakterii ani wskaźnikami różnorodności mikrobiomu.

Tabela 16. Korelacje rang Spearmana pomiędzy stężeniami HMO, laktoferyny, mianem bakterii oraz wskaźnikami różnorodności mikrobiomu mleka a wiekiem dziecka wyrażonym w miesiącach (I pobór)

Biomarker	N	ρ	p_{raw}	p_{FDR}	Siła ^a
DFLNH	11	-0,773	0,005	0,035	Silna
FLNH	9	-0,678	0,045	0,135	Silna
SLNH	12	-0,631	0,028	0,102	Silna
Laktoferyna	50	-0,629	< 0,001	< 0,001	Silna
6'-SL	29	-0,592	0,001	0,009	Silna
DSLNT	29	-0,503	0,005	0,035	Silna
LNDFH	29	-0,452	0,014	0,059	Umiarkowana
LNFP	28	-0,436	0,020	0,080	Umiarkowana
LST	24	-0,426	0,038	0,129	Umiarkowana
LNT	29	-0,375	0,045	0,135	Umiarkowana
3'-SL	29	-0,343	0,069	0,195	Umiarkowana
Total HMO	29	-0,290	0,127	0,308	Słaba
DFL	28	-0,202	0,302	0,548	Słaba
Shannon H' mleka	53	+0,193	0,167	0,369	Słaba
Bogactwo S	53	+0,193	0,167	0,369	Słaba
$\log_{10}(\text{miano})$	53	-0,075	0,592	0,839	Pomijalna
2'-FL	29	-0,071	0,713	0,887	Pomijalna

ρ = współczynnik korelacji rang Spearmana. p_{raw} = dwustronna wartość p nieskorygowana. p_{FDR} = korekta Benjaminiego-Hochberga; Siła^a Interpretacja siły korelacji; Wyniki uporządkowane wg. ρ . Pogrubione: $p_{\text{FDR}} < 0,05$

Tabela 17 przedstawia wyniki analizy korelacji rang Spearmana pomiędzy stężeniami HMO, laktoferyny, mianem bakterii oraz wskaźnikami różnorodności mikrobiomu a wiekiem matki. Wyniki wskazują na dominację ujemnych korelacji, wskazujące na tendencję do obniżania się stężeń badanych parametrów wraz ze wzrostem wieku matki.

Najsilniejszą zależność odnotowano dla LST ($\rho = -0,651$; $p_{\text{FDR}} = 0,009$), co wskazuje na silną ujemną korelację pomiędzy wiekiem matki a stężeniem tej frakcji HMO. Silne i istotne po korekcji FDR korelacje stwierdzono również dla DSLNT ($\rho = -0,613$; $p_{\text{FDR}} = 0,009$), LNFP ($\rho = -0,529$; $p_{\text{FDR}} = 0,035$), 3'-SL ($\rho = -0,512$; $p_{\text{FDR}} = 0,035$) oraz 6'-SL ($\rho = -0,483$; $p_{\text{FDR}} = 0,045$). Wyniki te sugerują, że wyższy wiek matki wiąże się ze stopniowym obniżaniem stężeń kilku frakcji oligosacharydów mleka kobiecego.

Nie stwierdzono istotnych korelacji pomiędzy wiekiem matki a laktoferyną ($\rho = -0,163$; $p_{\text{FDR}} = 0,529$). Całkowite stężenie HMO także nie wykazywało związku z wiekiem matki ($\rho = -0,184$; $p_{\text{FDR}} = 0,550$), podobnie jak miano bakterii i wskaźniki różnorodności mikrobiologicznej (Tabela 17).

Tabela 17. Korelacje rang Spearmana pomiędzy stężeniami HMO, laktoferyny, mianem bakterii oraz wskaźnikami różnorodności mikrobiomu mleka a wiekiem matki (I pobór)

Biomarker	N	ρ	p_{raw}	p_{FDR}	Siła ^a
LST	24	-0,651	0,001	0,009	Silna
DSLNT	29	-0,613	< 0,001	0,009	Silna
LNFP	28	-0,529	0,004	0,035	Silna
3'-SL	29	-0,512	0,005	0,035	Silna
6'-SL	29	-0,483	0,008	0,045	Umiarkowana
LNDFH	29	-0,461	0,012	0,059	Umiarkowana
LNT	29	-0,454	0,013	0,059	Umiarkowana
DFLNH	11	-0,426	0,191	0,407	Umiarkowana
FLNH	9	-0,333	0,381	0,588	Umiarkowana
SLNH	12	-0,237	0,459	0,675	Słaba
DFL	28	-0,198	0,312	0,548	Słaba
Total HMO	29	-0,184	0,341	0,550	Słaba
Laktoferyna	50	-0,163	0,260	0,529	Słaba
$\log_{10}(\text{miano})$	53	-0,062	0,661	0,878	Pomijalna
2'-FL	29	+0,027	0,888	0,957	Pomijalna
Shannon H' mleka	53	+0,132	0,345	0,550	Słaba
Bogactwo S	53	+0,132	0,345	0,550	Słaba

ρ = współczynnik korelacji rang Spearmana. p_{raw} = dwustronna wartość p nieskorygowana. p_{FDR} = korekta Benjamini-Hochberga. Siła^a - Interpretacja siły korelacji. Wyniki uporządkowano wg. ρ . Pogrubione: $p_{\text{FDR}} < 0,05$

BMI przed ciążą nie wykazało istotnych korelacji z żadnym z 17 biomarkerów po korekcji FDR (Tabela 18). Najsilniejsza korelacja – LST ($\rho = -0,358$; $p_{\text{FDR}} = 0,230$) – nie osiągnęła progu istotności. W badanej kohorcie stan odżywienia sprzed ciąży nie wpływał istotnie statystycznie na profil biochemiczny i mikrobiologiczny mleka kobiecego.

Tabela 18. Korelacje rang Spearmana: frakcje HMO, laktoferyna, miano bakterii i wskaźniki różnorodności mikrobiomu a BMI kobiet (I pobór)

Biomarker	<i>n</i>	ρ	p_{raw}	p_{FDR}
LST	24	-0,358	0,086	0,230
$\log_{10}(\text{miano})$	53	+0,217	0,119	0,304
Shannon H' mleka	53	+0,143	0,308	0,548

ρ = współczynnik korelacji rang Spearmana. p_{raw} = dwustronna wartość p nieskorygowana. p_{FDR} = korekta Benjaminiego-Hochberga; przedstawiono wyłącznie korelacje z $p_{\text{FDR}} < 0,55$ (3 z 17). Wyniki uporządkowano wg. ρ .

5.9 Wpływ etapu laktacji na skład mikrobiologiczny oraz biochemiczny

Oceniono wpływ czasu trwania laktacji na skład mleka kobiecego. Próbkę mleka z pierwszego poboru podzielono według wieku dziecka na trzy biologicznie uzasadnione etapy laktacji: siarę i mleko wczesne ($\leq 1,5$ miesiąca; $N_I = 19$), mleko dojrzałe (2–5 miesięcy; $N_{II} = 10$) oraz mleko z przedłużonej laktacji (≥ 6 miesięcy; $N_{III} = 24$). Analizę przeprowadzono dla 18 markerów z wykorzystaniem testu Kruskala-Wallisa, gdzie porównano stężenia HMO, laktoferyny, miano bakterii oraz wskaźniki różnorodności mikrobiomu pomiędzy etapami, co pozwoliło na ocenę dynamiki zmian tych parametrów wraz postępowaniem czasu laktacji (Tabela 19).

Laktoferyna wykazała największe różnice stężeń w poszczególnych etapach laktacji badanego mleka, uzyskując dużą wielkość efektu ($H = 21,85$; $\epsilon^2 = 0,42$) i była jedyną zmienną, dla której stwierdzono istotny statystycznie różnice ($p_{\text{FDR}} < 0,001$).

Wśród analizowanych oligosacharydów, 6'-sialilolaktoza wykazała najsilniejszy efekt statystyczny spośród wszystkich 18 biomarkerów ($H = 9,53$; $\epsilon^2 = 0,29$; $p_{\text{FDR}} = 0,077$). Pozostałe frakcje HMO oraz całkowita zawartość HMO wykazała umiarkowany lub duży efekt, lecz nieistotne statystycznie. Nie stwierdzono również istotnych statystycznie różnic pomiędzy etapami laktacji dla miana bakterii ($p_{\text{FDR}} = 0,154$), całkowitej różnorodności

mikrobiomu mierzonej indeksem Shannona ($p_{FDR} = 0,163$) ani bogactwa gatunkowego S ($p_{FDR} = 0,163$) (Tabela 19).

Tabela 19. Porównanie stężeń HMO, laktoferyny, miana bakterii i wskaźników różnorodności między etapami laktacji, analiza testem Kruskala-Wallisa (I pobór)

Biomarker	N	N _I	N _{II}	N _{III}	H	epsilon ²	p _{KW}	p _{FDR}
Laktoferyna (mg/mL)	50	18	9	23	21,848	0,422	< 0,001	< 0,001
6'-SL (mg/mL)	29	11	8	10	9,530	0,290	0,009	0,077
LNDFH (mg/mL)	29	11	8	10	7,784	0,222	0,020	0,122
DSLNT (mg/mL)	29	11	8	10	6,834	0,186	0,033	0,126
LNFP (mg/mL)	28	10	8	10	6,707	0,188	0,035	0,126
log ₁₀ (miano)	53	19	10	24	5,935	0,079	0,051	0,154
DFLNH (mg/mL)	11	6	2	3	5,636	0,455	0,060	0,154
LNT (mg/mL)	29	11	8	10	5,074	0,118	0,079	0,163
Shannon H' mleka	53	19	10	24	4,700	0,054	0,095	0,163
Bogactwo S	53	19	10	24	4,700	0,054	0,095	0,163
3'-SL (mg/mL)	29	11	8	10	4,489	0,096	0,106	0,163

H = statystyka testowa Kruskala-Wallisa, epsilon² = rozmiar efektu: < 0,01 pomijalny, 0,01 – 0,06 mały, 0,06 – 0,14 umiarkowany, > 0,14 duży. p_{FDR} = korekta Benjaminiego-Hochberga. Wyniki przedstawiono po korekcji dla p_{FDR} < 0,20; pogrubione: p_{FDR} < 0,10

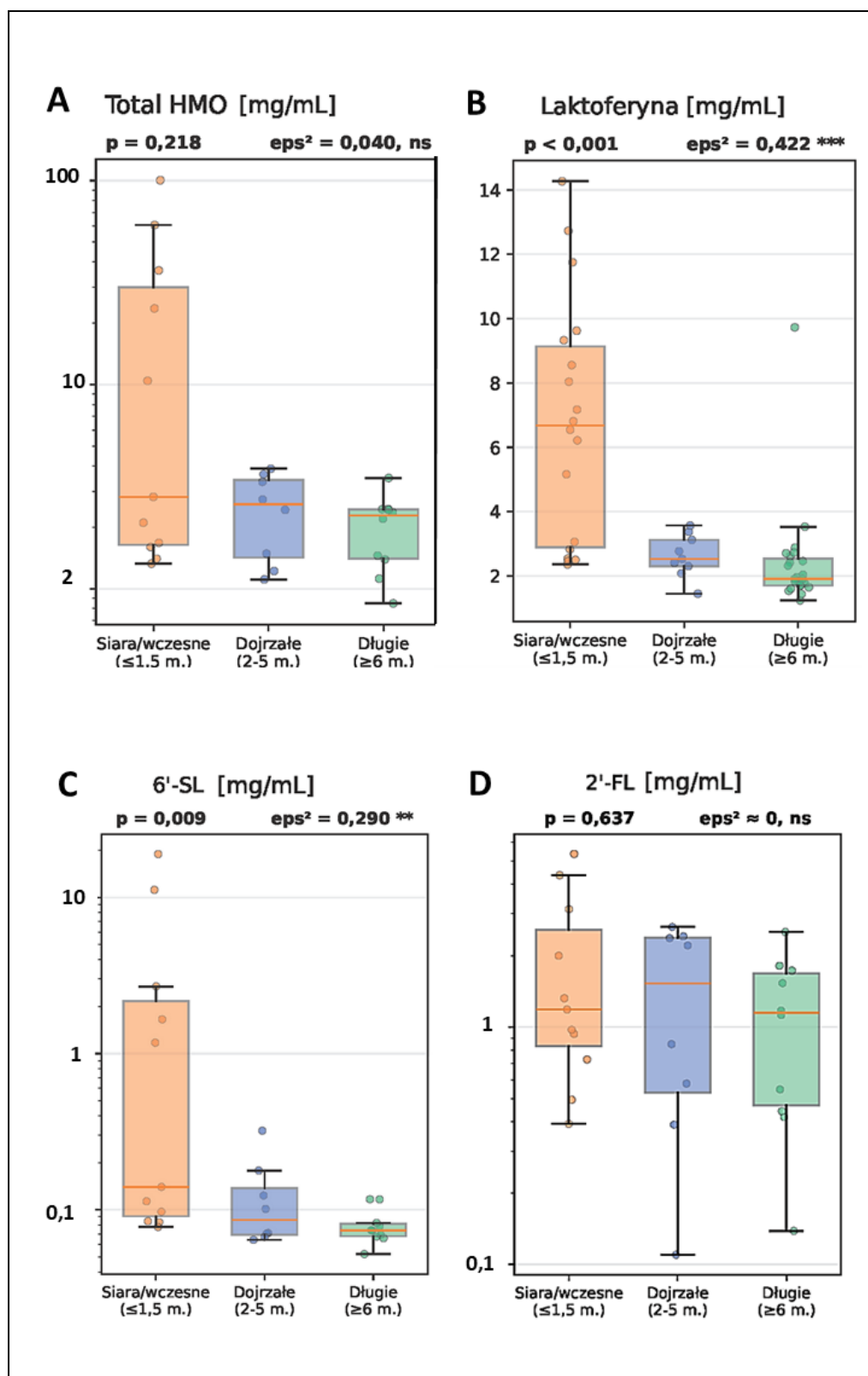
Przeprowadzono analizę porównawczą z wykorzystaniem wykresów skrzynkowych z naniesionymi pojedynczymi obserwacjami dla trzech etapów laktacji. Analizowano całkowite stężenie HMO, laktoferyny, 6'-SL oraz 2'-FL, będącego oligosacharydem występującym w najwyższym stężeniu w mleku kobiecym (Wykres 17).

Stężenie całkowitych HMO było najwyższe w siarze i mleku wczesnym, jednak różnice pomiędzy badanymi grupami nie osiągnęły istotności statystycznej ($p = 0,218$) (Wykres 17A).

Stężenie laktoferyny było istotnie wyższe w siarze i mleku wczesnym w porównaniu z pozostałymi dwoma etapami laktacji uzyskując istotność statystyczną ($p = <0,001$). Wysokie stężenia LF w siarze wraz z postępem laktacji ulega wyraźnemu obniżeniu i stabilizacji w próbkach mleka z późniejszych okresów karmienia piersią (Wykres 17B).

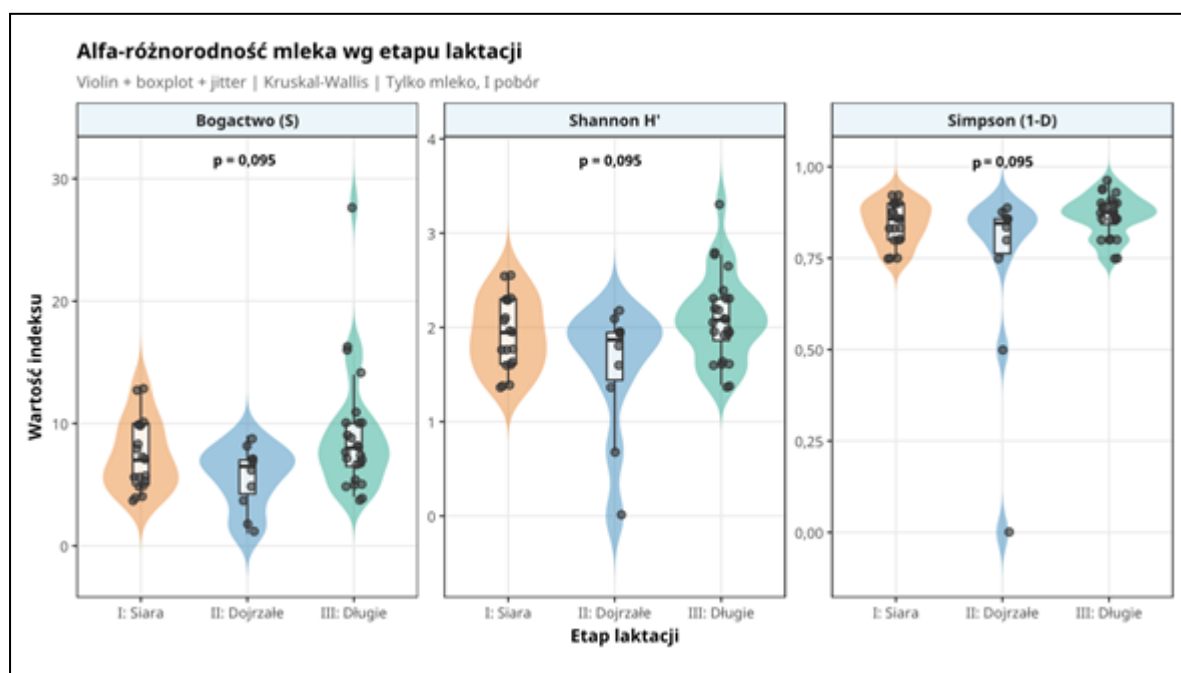
Stężenie 6'-SL różniło się istotnie pomiędzy grupami ($p = 0,009$). Najwyższe wartości obserwowano w siarze i mleku wczesnym, natomiast w mleku dojrzałym i podczas długiej laktacji stężenia wykazują tendencję spadkową (Wykres 17C).

W przypadku najobficiej występującej w mleku 2'-fukozylolaktoza nie wykazano istotnych różnic statystycznych ($p = 0,64$), jednak uwidoczniono trend spadkowy wskazujący na różnice między skrajnymi etapami laktacji (Wykres 17D).



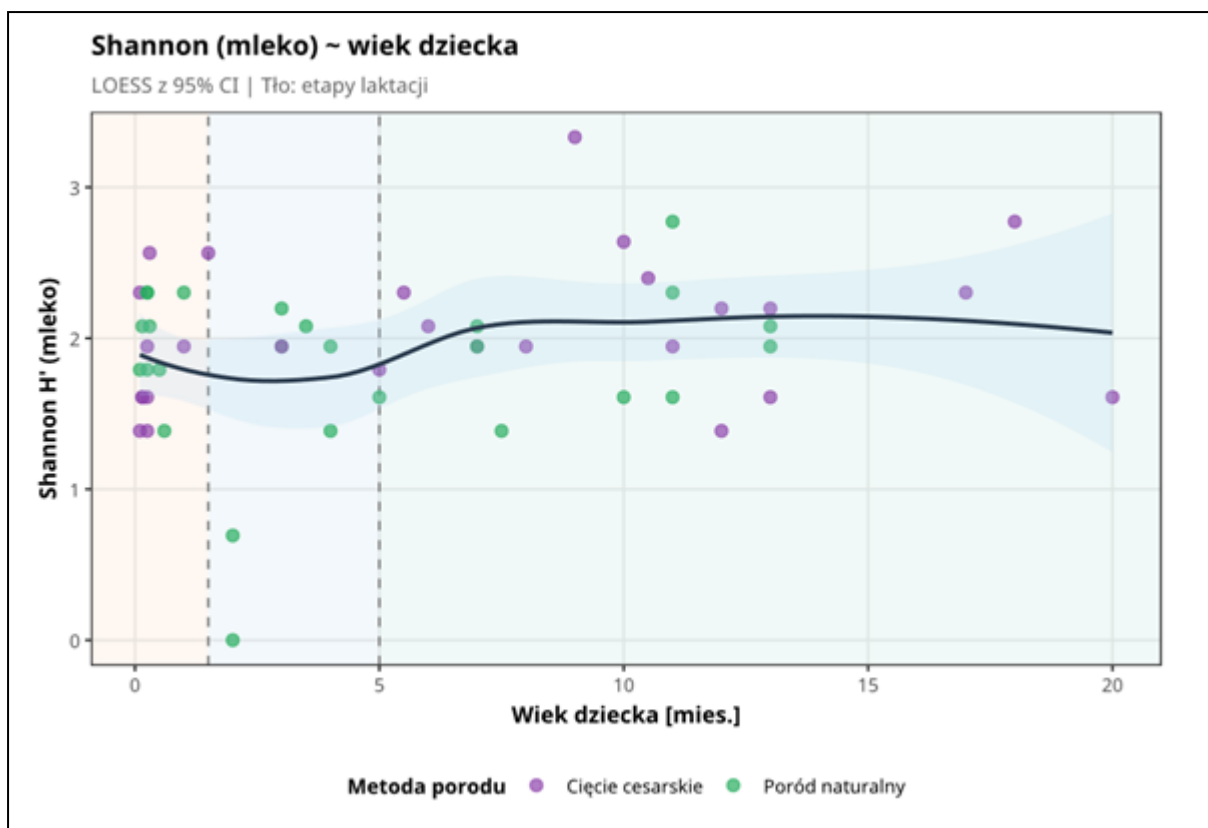
Wykres 17. Wpływ etapu laktacji na stężenie HMO, laktoferyny, 6'SL oraz 2'FL

Na wykresach skrzypcowych (violin plots) z nałożonymi wykresami pudełkowymi oraz pojedynczymi punktami obserwacji przedstawiono porównanie wskaźników alfa-różnorodności mikrobiomu mleka (Bogactwo gatunkowe S , indeks Shannona H' oraz indeks Simpsona) pomiędzy trzema etapami laktacji. Analiza testem Kruskala-Wallisa nie wykazała istotnych statystycznie różnic dla żadnego z analizowanych wskaźników ($p = 0,095$). Pomimo braku istotności statystycznej, wykresy wskazują na tendencję sugerującą, że różnorodność mikrobiomu mleka pozostaje na zbliżonym poziomie w sianie i mleku dojrzłym, natomiast wzrasta w okresie długiej laktacji (Wykres 18).



Wykres 18. Alfa-różnorodność mikrobiomu mleka kobiecego w zależności od etapu laktacji (wykres skrzypcowy, 1 pobór)

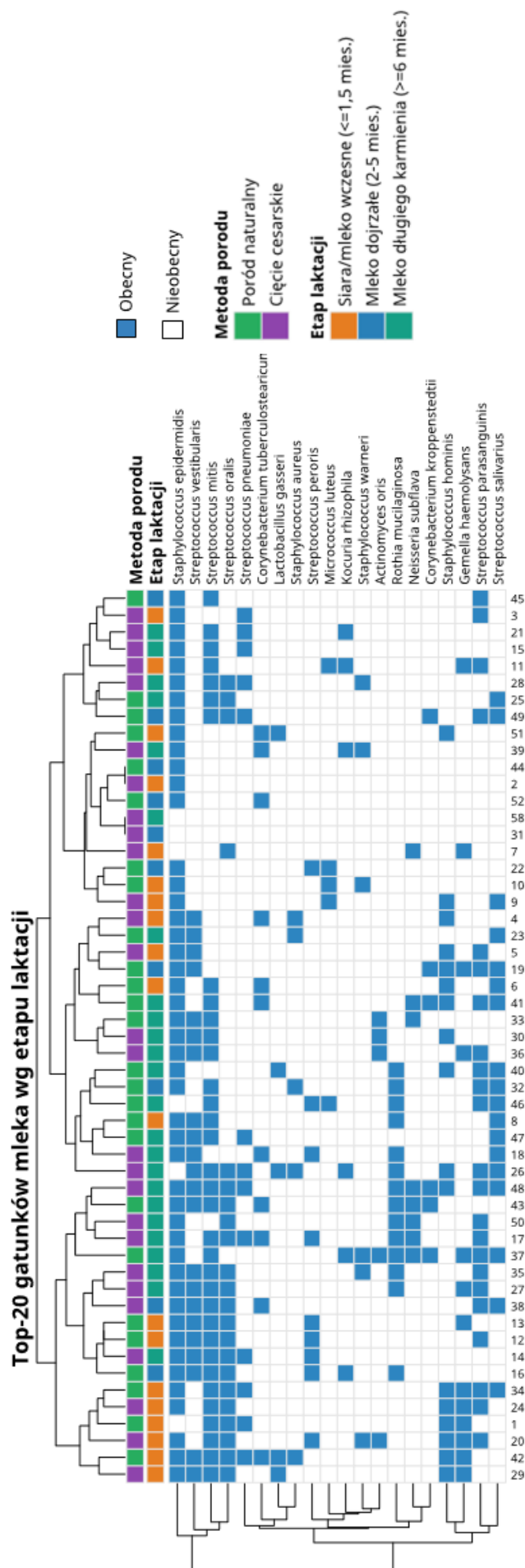
Na Wykresie 19 przedstawiono zależność pomiędzy wiekiem dziecka a wartością indeksu Shannona mikrobiomu mleka. Krzywa wygładzająca LOESS wskazuje na niewielki spadek różnorodności mikrobiologicznej w pierwszych miesiącach laktacji, po którym następuje stopniowy wzrost i stabilizacja wartości indeksu na poziomie około 2,0 – 2,1 w późniejszym okresie karmienia. Mimo znacznego rozproszenia pojedynczych obserwacji nie obserwuje się wyraźnej liniowej zależności pomiędzy wiekiem dziecka a alfa-różnorodnością mikrobiomu mleka. Metoda rozwiązywania ciężkości również nie wykazuje zależności pomiędzy wiekiem dziecka a różnorodnością mikrobiologiczną.



Wykres 19. Zależność pomiędzy wiekiem dziecka a indeksem Shannona mikrobiomu mleka. Punkty przedstawiają pojedyncze próbki, kolory oznaczają metodę porodu, linia LOESS obrazuje trend zmian alfa-różnorodności w czasie laktacji, pionowe linie odzwierciedlają etapy laktacji

Rycina 16 przedstawia heatmapę obrazującą wzorce współwystępowania 20 najczęściej identyfikowanych gatunków bakterii w próbkach mleka kobiecego pobranych podczas pierwszego poboru. Najczęściej wykrywanymi gatunkami były *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus vestibularis*, *Streptococcus mitis* oraz *Streptococcus oralis*, które tworzyły względnie równomierne rozmieszczenie w zbiorze próbek stanowiąc rdzeń mikrobioty mleka, niezależny od etapu laktacji. Rzadziej występujące gatunki takie jak *R. mucilaginosa*, *N. subflava*, *C. kroppenstedtii*, *S. hominis* czy *G. hamolysans* wykazują na heatmapie bardziej mozaikowy charakter, sugerujący osobniczą zmienność lub wpływ czynników zewnętrznych.

Klastrowanie hierarchiczne próbek wyłoniło istnienie kilku grup o podobnym profilu mikrobiologicznym, jednak bez wyraźnych powiązań z etapem laktacji czy metodą porodu.



Rysunek 15. Heatmapa obecności 20 najczęstszych gatunków bakterii mleka z I poboru z kastroowaniem hierarchicznym i uwzględnieniem etapu laktacji i metody porodu

5.10 Porównania międzygrupowe: metoda porodu i suplementacja

Analizy porównawcze profilu biochemicznego i mikrobiologicznego mleka między podgrupami klinicznymi nie wykazały istotnych statystycznie różnic po korekcji FDR dla żadnej z badanych zmiennych grupujących. Metoda porodu, cięcie cesarskie ($n = 27$) vs. poród naturalny ($n = 26$), nie różnicowała istotnie stężeń żadnej z frakcji HMO, laktoferyny, miana bakterii ani wskaźników różnorodności mikrobiomu. Najsilniejsze różnice obserwowano dla LNDFH ($p_{\text{raw}} = 0,056$), LNFP ($p_{\text{raw}} = 0,072$) i DSLNT ($p_{\text{raw}} = 0,083$) (Tabela 23).

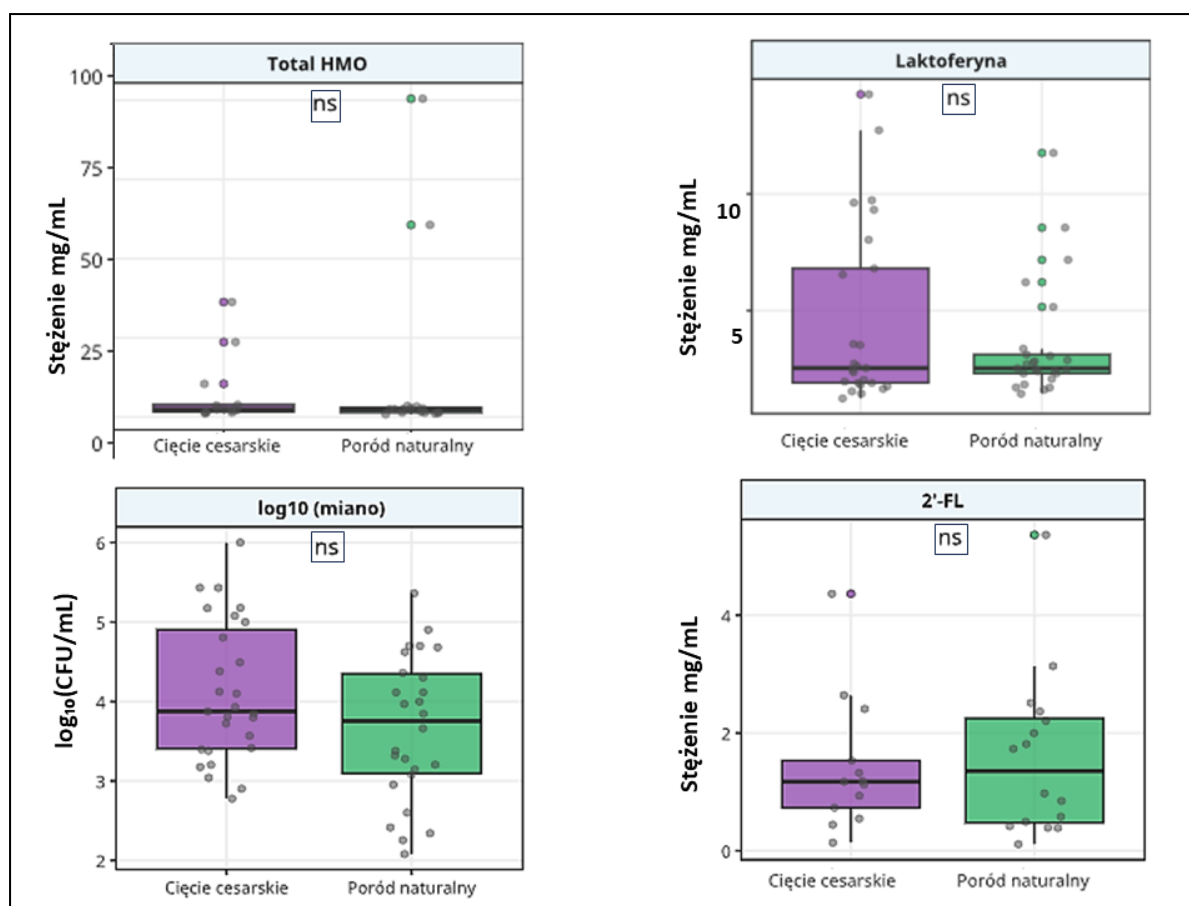
Tabela 20. Porównania stężeń biomarkerów mleka między podgrupami klinicznymi: metoda porodu – cięcie cesarskie $n = 27$ vs poród naturalny $n = 26$ (I pobór)

Biomarker	W	p_{raw}	r	p_{FDR}
LNDFH	148	0,056	0,35	0,499
LNFP	137	0,072	0,34	0,499
DSLNT	144	0,083	0,32	0,499
$\log_{10}(\text{miano})$	437	0,128	0,21	0,511
6'-SL	138	0,142	0,27	0,511
LNT	135	0,181	0,25	0,543
Shannon H'	410	0,298	0,14	0,557
DFL	112	0,472	0,14	0,607
Total HMO	115	0,645	0,09	0,774
Laktoferyna	320	0,900	0,02	0,979
2'-FL	105	0,983	< 0,01	0,983

test Manna-Whitneya-Wilcoxona; W = statystyka testowa; r = rozmiar efektu: < 0,10 pomijalny, 0,10 – 0,30 mały, 0,30 – 0,50 umiarkowany, > 0,50 duży. Przedstawiono wyłącznie biomarkery z $p_{\text{raw}} < 0,70$

Wykonano porównanie wybranych biomarkerów mleka kobiecego pomiędzy kobietami, które urodziły drogą naturalną, a kobietami po cięciu cesarskim. Analizie poddano stężenie 2'-FL, laktoferyny, całkowitego HMO oraz całkowite miano bakterii.

Nie stwierdzono istotnych różnic w stężeniach 2'-FL, laktoferyny, całkowitego HMO ani w całkowitym mianie bakterii pomiędzy kobietami po porodzie naturalnym i po cięciu cesarskim. Wyniki wskazują, że metoda porodu nie wpływała istotnie na analizowane biomarkery mleka kobiecego w pierwszym poborze (Wykres 20).



Wykres 20. Wykresy skrzynkowe prezentują porównanie biomarkerów mleka między kobietami po porodzie naturalnym a cięciem cesarskim (I pobór). Skrót ns (ang. not significant) oznacza brak istotnych statystycznie różnic

6 Dyskusja

Wyniki niniejszej pracy potwierdzają, że mleko kobiece jest złożonym i dynamicznie zmieniającym się pokarmem, zawierającym żywe mikroorganizmy oraz składniki bioaktywne. Istotność niniejszych badań wynika przede wszystkim z wielowymiarowej oceny składu mikrobiologicznego mleka kobiecego oraz mikrobioty jamy ustnej dzieci karmionych piersią w odniesieniu do konkretnej populacji regionalnej. Taka analiza ma szczególne znaczenie, ponieważ pozwala spojrzeć na karmienie piersią nie tylko jako proces żywienia, ale także element kształtowania mikrobioty karmionego piersią dziecka. Obecność wspólnych gatunków bakterii w mleku oraz wymazach może wskazywać na powiązanie ekosystemu mikrobiologicznego pomiędzy matką a karmionym piersią dzieckiem. Dostępne dane literaturowe wskazują, że skład mikrobioty mleka kobiecego oraz stężenia jego składników bioaktywnych mogą być modulowane przez czynniki osobnicze, środowiskowe, żywieniowe i okołoporodowe. Analiza przeprowadzona w lokalnej grupie matek i dzieci stanowi istotne uzupełnienie wiedzy dotyczącej profilu mikrobiologicznego i biochemicznego mleka kobiecego oraz pozwalają na porównanie z wynikami badań publikowanych w literaturze światowej. Ocena ilościowa laktoferyny oraz jakościowa i ilościowa oligosacharydów dostarczają dodatkowych informacji związanych z czynnikami mogącymi wpływać na kształtowanie się składu mikrobiologicznego mleka. Zestawienie badanych parametrów z danymi pozyskanymi z wywiadu ankietowego pozwalają na szerszą interpretację składu mleka kobiecego oraz jego wpływu w kształtowaniu wczesnej mikrobioty dziecka.

Elementem zwiększającym wartość niniejszej pracy jest zastosowanie nowoczesnych technik analitycznych. Zastosowanie zestawu podłoży hodowlanych o komplementarnych właściwościach, w połączeniu z identyfikacją drobnoustrojów metodą MALDI-TOF MS, umożliwiło szybką i wiarygodną analizę składu mikrobiologicznego na poziomie gatunkowym. Podejście to stanowi jeden z wyznaczników nowoczesnej mikrobiologii i upowszechniło się w drugiej dekadzie XXI wieku, wraz z rozwojem kulturomiki. Metoda ta łączy klasyczne techniki hodowlane z wysokoprzepustową identyfikacją mikroorganizmów opartą na analizie ich profili białkowych (proteomiką), spektrometrią mas MALDI-TOF [157]. Zastosowanie metody ELISA z użyciem testu dedykowanego do ilościowego oznaczania laktoferyny w mleku kobiecym umożliwiło precyzyjną ilościową ocenę stężenia LF. Analiza oligosacharydów mleka kobiecego z wykorzystaniem UHPLC-MS umożliwiło precyzyjną charakterystykę frakcji HMO

w badanych próbkach. Wykorzystanie zaawansowanych metod badawczych, szczegółowa analiza statystyczna uzyskanych wyników umożliwiło ocenę mleka kobiecego jako dynamicznego układu biologicznego mającego wpływ na karmione dziecko.

6.1 Mleko kobiece jako środowisko mikrobiologiczne i jego wpływ na karmione piersią dziecko

Dotychczasowe badania mikrobioty mleka kobiecego ewoluowały, historycznie mleko kobiece uważano za pokarm wolny od bakterii. Obecność drobnoustrojów w mleku kojarzono ze stanem zapalnym gruczołu piersiowego (*mastitis*), skażeniem wynikającym z nieprawidłowego pozyskiwania mleka lub przechowywania [11, 158]. Badania z początku XX wieku sporadycznie donosiły o obecności bakterii w mleku, ale prace te często odrzucano, traktując obecność bakterii w mleku jako błąd wynikający z niewłaściwej techniki aseptycznej posiewu lub zewnętrznego skażenia. Intensywne badania nad składem mikrobiologicznym mleka kobiecego ewoluowały i współcześnie wskazują na występowanie ogromnej bioróżnorodności mikroorganizmów komensalnych oraz probiotycznych [159]. Zawartość bakterii w przeliczeniu na mililitr mleka kobiecego jest zróżnicowana i według różnych źródeł waha się od około 10^1 do 10^7 jtk/mL. Różnice w szacunkach ilości mikroorganizmów w mleku w dużej mierze wynikają z metody badawczej oraz etapu laktacji. Metody szacujące liczbę bakterii w mleku bazujące na hodowli mikrobiologicznej wskazują zwykle niższe wartości niż te uzyskane metodą biologii molekularnej. Badanie Jost i wsp. bazujące na metodzie hodowlanej wskazuje liczbę bakterii na $10^1 - 10^4$ jtk/mL [160]. Damaceno i wsp. w badaniu opartym na kulturomice, na próbkach mleka pochodzących od 47 kobiet uzyskali miano w zakresie $10^1 - 10^5$ jtk/mL, średnio 10^4 jtk/mL [161]. Natomiast Boix-Amoros i wsp. badała mleko kobiece metodą biologii molekularnej, qPCR (*quantitative real-time polymerase chain reaction*, ilościowa reakcja polimerazy łańcuchowej), która wykazała obecność bakterii na poziomie około 10^6 jtk/mL, z zakresem od 10^5 do 10^8 jtk/mL [162]. W niniejszym badaniu liczebność bakterii w mleku kobiecym wynosiła średnio 10^4 jtk/mL i mieściła się w zakresie od 10^2 do 10^6 jtk/mL, co niemalże pokrywają się z badaniem Jost i wsp oraz Damaceno i wsp. Jest to naturalna konsekwencja zastosowania analogicznych metod badawczych oraz uniwersalności mikrobiologicznej mleka kobiecego, która przekłada się podobieństwo w uzyskanych wynikach, niezależnie od regionu świata. Ponadto należy podkreślić, że w metodzie opartej na klasycznej hodowli szacowana jest liczba bakterii, które wyrosły

w określonych warunkach hodowlanych. Trzeba wziąć pod uwagę, że część bakterii i grzybów może być niehodowalna w standardowych warunkach inkubacji, a część mikroorganizmów może nie wzrastać na zastosowanych podłożach mikrobiologicznych. Dodatkowo liczba wyrosłych kolonii zależy od szeregu czynników, m.in. od metody pobrania materiału, czasu transportu, ewentualnego przechowywania próbki, jakości podłoża oraz warunków inkubacji. Z tego względu w klasycznej metodzie mikrobiologicznej może dochodzić do pewnego niedoszacowania faktycznej liczby mikroorganizmów. Natomiast metody biologii molekularnej stanowią czułą metodę, umożliwiającą oznaczenie obecności materiału genetycznego mikroorganizmów (np. rybosomalnego 16S RNA). Rozpowszechnienie wysokoprzepustowych metod sekwencjonowania, z możliwością sekwencjonowania całego genomu w badanym materiale umożliwiło na szersze ujęcie taksonomiczne i funkcjonalne [163, 164]. Należy jednak dodać, że identyfikacja bakteryjnego materiału genetycznego nie zawsze świadczy o obecności żywych komórek zdolnych do zasiedlenia danego środowiska. Ponadto sporym problemem w tak czułych metodach są zanieczyszczenia ze środowiska zewnętrznego [159, 165].

Zastosowanie kulturomiki wydaje się szczególnie cenne w kontekście badania żywej mikrobioty mleka kobiecego, która może skolonizować karmione piersią dziecko. Niniejsze badanie dostarczyło szczegółowych informacji dotyczących składu mikrobiologicznego badanych materiałów. Bazując na kulturomice, w mleku kobiecym zidentyfikowano 107 różnych gatunków, reprezentujące 30 rodzajów. Najczęściej występującym mikroorganizmami mleka kobiecego były kolejno *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp., rodzina *Lactobacillaceae* spp., *Rothia* spp., *Gemella* spp., *Acinetobacter* spp., oraz *Enterococcus* spp. Przeglądy systematyczne raportują ponad 1300 gatunków dotychczas zidentyfikowanych w mleku kobiecym [166]. Świadczy to o bogactwie gatunkowym mleka kobiecego. Liczne publikacje wskazują, że najczęściej identyfikowane gatunki reprezentują rodzaje: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Bifidobacterium*, *Corynebacterium*, *Acinetobacter*, *Enterococcus*, *Acinetobacter*, *Rothia*, *Cutibacterium*, z przeważającą dominacją rodzaju *Staphylococcus*, *Streptococcus* [165–171]. Przegląd systematyczny Fitzstevens i wsp. podkreśla, że rodzaje *Staphylococcus* i *Streptococcus* stanowią uniwersalny i dominujący rdzeń mleka kobiecego występujący w 80–92% badanych próbek MK niezależnie od metody identyfikacyjnej, etapu laktacji czy szerokości geograficznej przeprowadzonego badania [172]. Zbliżoną częstość występowania

wykazano dla bakterii z rodzajów *Staphylococcus* spp. i *Streptococcus* spp. w niniejszym badaniu. Siedem najczęściej izolowanych gatunków należało do tych dwóch rodzajów, co wskazuje, że w każdej analizowanej próbce mleka kobiecego stwierdzono obecność co najmniej jednego gatunku reprezentującego *Staphylococcus* i/lub *Streptococcus* (*Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus vestibularis*, *Streptococcus salivarius*, *Staphylococcus hominis*).

W wymazach z jamy ustnej identyfikowano 63 różne gatunki reprezentujące 28 rodzajów. Głównymi składnikami mikrobioty jamy ustnej dzieci karmionych piersią były kolejno: *S. mitis*, *S. oralis*, *S. vestibularis* oraz *S. epidermidis*. Wysokie podobieństwo gatunkowe obu badanych materiałów biologicznych sugeruje transfer mikrobiologiczny pomiędzy matką a karmionym piersią dzieckiem, na co wskazuje opisywany w literaturze przepływ wsteczny mleka podczas aktu karmienia piersią [165, 173, 174]. Wczesna kolonizacja jamy ustnej dziecka jest zdominowana przez bakterie z rodzajów *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Gemella*, *Neisseria*, *Rothia* i *Acinetobacter*, co w dużym stopniu pokrywa się z dominującymi taksonami identyfikowanymi w mleku kobiecym. Zależność tę odzwierciedla liczba wspólnych gatunków zidentyfikowanych w mleku kobiecym oraz wymazach z jamy ustnej dzieci, która wynosiła odpowiednio 47 podczas I poboru oraz 30 podczas II poboru materiału biologicznego. W odniesieniu do najczęściej identyfikowanych gatunków w próbkach mleka kobiecego i wymazach z jamy ustnej dzieci wykazano, że podczas I poboru *S. epidermidis* występował odpowiednio w 89% i 48% wszystkich próbek, *S. mitis* w 64% i 81%, natomiast *S. oralis* w 42% i 68%. Analogicznie, podczas II poboru materiału biologicznego częstość występowania w mleku kobiecym i wymazach wynosiła odpowiednio 91% i 56% dla *S. epidermidis*, 63% i 81% dla *S. mitis* oraz po 56% dla *S. vestibularis*. Badanie Biagi i wsp., obejmujące m.in. ocenę transferu mikroorganizmów oraz podobieństwa gatunkowego między mlekiem kobiecym, jamą ustną dzieci i ich kałem, wykazało współdzielenie gatunków na poziomie od 80% do 97% pomiędzy analizowanymi materiałami [175]. Porównanie wyników obu badań, prowadzonych przy zbliżonych założeniach eksperymentalnych w odniesieniu do niniejszej pracy, wskazuje na znaczny stopień współdzielenia mikrobioty pomiędzy mlekiem kobiecym a jamą ustną dziecka karmionego piersią. Uzyskane rezultaty mogą świadczyć o istotnej roli karmienia piersią w kształtowaniu wczesnej kolonizacji mikrobiologicznej dziecka. Przytoczone badanie wnioskuje, że jama ustna dziecka, jako miejsce pośredniczące między piersią matki a początkiem układu pokarmowego,

może odgrywać ważną rolę w kształtowaniu mikrobioty mleka matki jak i tworzeniu własnej mikrobioty jelitowej [175]. Należy jednak dodać, że wysoka zgodność gatunkowa nie daje jednoznacznej informacji o stopniu i kierunku transferu mikrobioty.

Kształtowanie się mikrobioty jelitowej noworodków niemowląt jest tematem budzącym ogromne zainteresowanie zarówno ze strony środowiska naukowego, jak i klinicznego. Wśród czynników o potwierdzonym wpływie na kształtowanie się i skład mikrobiomu niemowląt jako te o największym wpływie wskazywano: wiek ciążowy dziecka w momencie porodu, sposób porodu oraz rodzaj żywienia (mleko matki vs. mleko dawczyni vs. mleko modyfikowane) [176, 177]. Badanie Pannaraj i wsp. wykazało, że pośród wyżej wskazanych czynników, bakterie mleka kobiecego skutecznie zasiedlają błony śluzowe układu pokarmowego karmionego dziecka, co podkreśla znaczenie MK w żywieniu noworodków i niemowląt. Co więcej, Pannaraj i wsp. wskazują, że społeczności mikroorganizmów jelitowych niemowląt były bardziej podobne do mikrobioty mleka własnej matki oraz skóry otoczki brodawki piersiowej niż do mikrobioty mleka i skóry losowo wybranej, niespokrewnionej matki. Podobieństwo mikrobiologiczne pomiędzy matką a dzieckiem było powiązane z porcją dziennego spożycia mleka matki – im więcej mleka matki w diecie dziecka, tym powiązanie mikrobiologiczne było większe, nawet po wprowadzeniu pokarmów uzupełniających [178]. Wysoki stopień podobieństwa gatunkowego pomiędzy mlekiem kobiecym i wymazami z jam ustnych dzieci wykazany w niniejszej pracy potwierdza wyniki badań Pannaraj i wsp. i podkreśla ogromne znaczenie MK w kształtowaniu się fizjologicznej mikrobioty karmionego piersią dziecka.

Podczas analiz składu mikrobiologicznego mleka kobiecego na szczególną uwagę zasługują bakterie kwasu mlekowego (LAB, ang. *lactic acid bacteria*), uważane za bakterie probiotyczne, mające pozytywny wpływ na zdrowie człowieka. Pomimo zastosowania w niniejszym badaniu podłoża mikrobiologicznego sprzyjającego wzrostowi LAB (MRS agar), uzyskano identyfikację bakterii kwasu mlekowego w MK tylko w co dziesiątej badanej próbce. Badanie Sinkiewicz i wsp. na 220 próbkach MK metodą hodowlaną na podłożu MRS wskazuje obecność *Lactobacillus reuteri* w 15% badanych próbkach mleka kobiecego [179]. Natomiast badanie Soto i wsp. wykazało obecność *Lactobacillus* sp. w 41% oraz *Bifidobacteria* sp. w 11% z 66 przebadanych próbek mleka [180]. W badaniu Łubiech i wsp. zidentyfikowano LAB w 22% badanych próbek MK pochodzących od 63 kobiet na różnych etapach laktacji [181]. Taka rozbieżność uzyskanych wyników może wynikać z wysublimowanych zmian osobniczych, geograficznych bądź metodologicznych. Choć wszystkie wymienione prace bazowały

na klasycznej hodowli z zastosowaniem agaru mikrobiologicznego MRS, który jest dedykowany LAB, to niewielkie różnice w składzie pożywki w obrębie producentów podłoży może wpływać na zdolność wzrostu bardziej wymagających gatunków LAB.

Analiza podobieństwa składu mikrobioty dla obu materiałów biologicznych wykazało zmniejszenie stopnia nakładania się składu gatunkowego pomiędzy poborami. Może to wynikać ze zmniejszenia liczby próbek podczas II poboru, co przekłada się na mniejszą liczbę uzyskanych identyfikacji. Natomiast dla oceny stabilności składu gatunkowego mikrobioty badanych materiałów przeprowadzono test McNemara tylko par próbek mleka kobiet uczestniczących w obu poborach. Wyniki nie wykazały istotnych zmian ogólnych, jedynie w obrębie pojedynczych gatunków nastąpiły zmiany pomiędzy poborami. Świadczy to o stosunkowo dużej stabilności składu mikrobiologicznego mleka kobiecego.

6.2 Różnorodność gatunkowa mleka kobiecego i wymazów z jamy ustnej dzieci oraz zmiany mikrobioty mleka w czasie

Uzyskane w niniejszej pracy wskaźniki alfa-różnorodności nie wykazały istotnych statystycznie różnic ani pomiędzy badanymi materiałami, ani pomiędzy kolejnymi pobraniami. Zarówno bogactwo gatunkowe, jak i wartości indeksu Shannona były jednak nieznacznie wyższe w próbkach mleka kobiecego niż w wymazach z jamy ustnej dzieci w obu poborach ($Me = 1,95/2,01$ vs. $1,79/1,95$). Podobny kierunek zależności zaobserwowali Biagi i wsp., którzy porównali mikrobiotę mleka kobiecego, jamy ustnej oraz kału niemowląt za pomocą sekwencjonowania regionu genu 16S rRNA. W badaniu tym mikrobiota mleka charakteryzowała się istotnie większą alfa-różnorodnością, wyrażoną średnią wartością indeksu Shannona wynoszącą $4,9 \pm 1,1$, niż mikrobiota jamy ustnej, dla której wartość ta wynosiła $2,3 \pm 0,6$ [177]. Mniejsze zróżnicowanie mikrobioty jamy ustnej mogło być związane z wyraźną dominacją przez rodzaj *Streptococcus*, który stanowił najliczniejszy rodzaj w 94% badanych próbek. W mleku kobiecym struktura społeczności była bardziej równomierna: średni udział *Streptococcaceae* wynosił 24,5%, natomiast *Staphylococcaceae* stanowiły 11,1% analizowanej mikrobioty. Obecność gronkowców jako istotnego składnika mikrobioty mleka pozostaje zgodna z wynikami niniejszej pracy, w której *Staphylococcus epidermidis* należał do najczęściej identyfikowanych gatunków. Większa różnorodność mleka może zatem wynikać nie tylko z obecności większej liczby taksonów, lecz również z bardziej równomiernego udziału poszczególnych grup bakterii, podczas gdy mikrobiota jamy ustnej

jest w większym stopniu zdominowana przez paciorkowce. Porównując wyniki badań własnych oraz Biagi i wsp., należy jednak uwzględnić różnice metodologiczne. Sekwencjonowanie zastosowane przez Biagi i wsp. umożliwia wykrycie znacznie szerszego spektrum taksonów, w tym bakterii niehodowlanych oraz występujących w niewielkiej liczebności. Metoda hodowlana połączona z identyfikacją MALDI-TOF MS, zastosowana w niniejszej pracy, obejmuje natomiast przede wszystkim żywe mikroorganizmy zdolne do wzrostu w określonych warunkach hodowlanych. Z tego względu bezpośrednie porównywanie wartości indeksu Shannona pomiędzy badaniami jest ograniczone, jednak zgodny kierunek obserwowanych zależności potwierdza, że mleko kobiece może stanowić bardziej złożone i zróżnicowane środowisko mikrobiologiczne niż jama ustna karmionego piersią dziecka.

Spośród analizowanych czynników etap laktacji wykazywał najsilniejszy i istotny statystycznie związek z beta-różnorodnością mikrobioty mleka kobiecego. Nie stwierdzono natomiast istotnych zależności między ogólną strukturą społeczności mikroorganizmów a sposobem porodu lub dietą matki w okresie ciąży. Wyniki analizy PERMANOVA wskazują zatem, że wraz z przebiegiem laktacji skład mikrobioty mleka ulega zmianom, jednak stosunkowo niewielka wartość współczynnika R^2 świadczy o ograniczonym udziale tego czynnika w wyjaśnianiu całkowitej zmienności między próbkami. Znaczne, 80-procentowe, nakładanie się elips na wykresie PCoA potwierdza, że różnice między etapami laktacji nie prowadziły do wyraźnego rozdzielenia próbek i występowały na tle dużej zmienności osobniczej. Wyniki te mogą wskazywać, że mikrobiota mleka kobiecego zachowuje część względnie stałych taksonów, tworzących jej potencjalny rdzeń, a jednocześnie wykazuje dynamiczne zmiany w ogólnej strukturze społeczności mikroorganizmów wraz z przebiegiem laktacji. Obserwowane w niniejszej pracy zmiany beta-różnorodności przy jednoczesnym braku istotnych różnic w zakresie alfa-różnorodności znajdują częściowe potwierdzenie w badaniu Pannaraj i wsp. Autorzy, analizując metodą sekwencjonowania genu 16S rRNA próbki mleka kobiecego pobierane w pierwszym roku życia dziecka, nie stwierdzili istotnych zmian alfa-różnorodności mikrobioty mleka wraz z wiekiem niemowlęcia. Wykazali natomiast, że zróżnicowanie składu mikrobioty mleka pomiędzy kobietami zwiększało się w ciągu pierwszych sześciu miesięcy laktacji, po czym ulegało zmniejszeniu [178]. Wyniki te wskazują, że względna stabilność różnorodności, tworząca rdzeń mikrobiologiczny, wewnątrz poszczególnych próbek nie wyklucza zachodzenia zmian w ogólnej strukturze społeczności

mikroorganizmów oraz nasilania się różnic międzyosobniczych. Obserwacje Pannaraj i wsp. pozostają zgodne z wynikami niniejszej pracy, w której etap laktacji wykazywał istotny związek z beta-różnorodnością mikrobioty mleka, mimo znacznego nakładania się elips na wykresie PCoA. Może to świadczyć o występowaniu stopniowych i stosunkowo subtelnych zmian w składzie społeczności mikroorganizmów, zachodzących na tle dużej zmienności osobniczej, a nie o powstawaniu wyraźnie odrębnych profili mikrobiologicznych właściwych dla poszczególnych etapów laktacji. Jednocześnie brak istotnej zależności pomiędzy sposobem porodu a mikrobiotą mleka w badaniu Pannaraj i wsp. jest zbieżny z wynikami uzyskanymi w niniejszej pracy. Co więcej, przegląd literatury Koynova-Tenchov wskazuje, że siara może charakteryzować się największą liczebnością mikroorganizmów, która następnie zmniejsza się wraz z dojrzewaniem mleka. Jednocześnie autorzy cytowanych badań opisywali zmiany zróżnicowania składu społeczności mikroorganizmów pomiędzy kolejnymi etapami laktacji [159]. Obserwacje te nie są w pełni zgodne z wynikami niniejszej pracy, co może częściowo wynikać z odmiennego sposobu klasyfikacji próbek. W badaniu własnym, próbki siary połączone z mlekiem wczesnym, pobranym do ukończenia przez dziecko 1,5 miesiąca życia. Takie grupowanie mogło ograniczyć możliwość wyodrębnienia cech mikrobiologicznych charakterystycznych wyłącznie dla siary, zwłaszcza że przejście od siary do mleka przejściowego wiąże się ze stosunkowo szybkimi zmianami jego składu. Odmienny kierunek zmian różnorodności mikrobioty w czasie laktacji opisali LaTuga i wsp., którzy w przeglądzie dostępnych badań wskazali, że siara może wykazywać większe zróżnicowanie bakterii związanych ze skórą i przewodem pokarmowym matki. Wraz z postępem laktacji różnorodność mikrobioty mleka miała się zmniejszać, przy jednoczesnym zwiększaniu udziału bakterii związanych z jamą ustną i skórą niemowlęcia. Zjawisko to może odzwierciedlać rosnące znaczenie kontaktu matka-dziecko oraz potencjalnego wstecznego przepływu treści z jamy ustnej niemowlęcia do przewodów mlecznych podczas karmienia [169]. Rozbieżności pomiędzy poszczególnymi badaniami mogą także wynikać z zastosowanych metod identyfikacji mikroorganizmów, odmiennych granic etapów laktacji, liczebności grup oraz dużej zmienności osobniczej mikrobioty mleka kobiecego.

6.3 Oligosacharydy i laktoferyna w mleku kobiecym

Z danych literaturowych wynika, że zawartość oligosacharydów mleka kobiecego jest najwyższa na początku laktacji, w siarze, a całkowita zawartość tych węglowodanów w mleku

jest wyższa niż białek [182]. HMO stanowią różnorodną grupę cząsteczek, zainteresowanie nimi wśród naukowców wynika z właściwości i wpływu na zdrowie karmionych piersią dzieci. W badaniu własnym pośród wszystkich przeanalizowanych próbek (N = 54) pod kątem zawartości HMO udało się wyizolować trzynaście różnych typów HMO. Całkowita, średnia zawartość HMO wyniosła 9,74 mg/mL w I poborze i 7,78 mg/mL w II poborze próbek, co wskazuje na tendencję spadkową stężenia pomiędzy poborami. Jednak co istotniejsze, najwyższe stężenia oligosacharydów w MK, wynoszące około 16 mg/mL, osiągnięte zostały w próbkach z początkowej laktacji do końca 1. miesiąca życia dziecka, następnie ulegało obniżeniu i utrzymywało się na stosunkowo stałym, średnim poziomie około 2 mg/mL. W pracy Samuel i wsp. wykazano, że całkowita ilość HMO istotnie zmniejszała się w pierwszych czterech miesiącach laktacji, od średniej zawartości 13,138 mg/mL w drugiej dobie do 6,650 mg/mL w studwudziestej dobie [183]. Przegląd systematyczny Dinleyici i wsp. wykazuje, że stężenie HMO w sianie waha się od 20 do 25 mg/mL (średnio 9–22 mg/mL), w mleku dojrzalym do 10–15 mg/mL (średnio 8–19 mg/mL) oraz w MK w przedłużonej laktacji po sześciu miesiącach wynosi 4–6 mg/mL [184]. Przedstawione dane obu autorów korespondują z uzyskanymi wynikami badania własnego.

W badaniu własnym, większość poszczególnych frakcji HMO była najwyższa na wczesnych etapach laktacji i następnie malała. Wyjątek stanowiła 3-FL, której stężenie wzrastało w czasie. Najwyższe średnie stężenie podczas obu poborów w oznaczanych próbkach osiągnęła 2'-fukozyloolaktoza (1,51 vs. 1,61 mg/mL), 6'-sjalilolaktoza (1,31 vs. 0,80 mg/mL) oraz lakto-N-fukopentaoza (1,21 vs. 1,01 mg/mL), natomiast pozostałe analizowane oligosacharydy, w tym 3'-SL, 6'-SL, DFL, LNT, DSLNT, LST czy LNFP, występowały zwykle w niższych stężeniach. Jednocześnie dla wielu frakcji widoczny był szeroki zakres wartości oraz wysokie odchylenia standardowe, co wskazuje na obecność próbek o wyraźnie podwyższonych stężeniach wybranych HMO.

Taki obraz jest podobny z obserwacjami Samuel i wsp., oraz Spevacek i wsp., którzy podkreślają, że skład HMO jest silnie zróżnicowany między kobietami i zależy między innymi od aktywności enzymów FUT2 i FUT3, determinujących tzw. grupy mleka zależne od statusu Secreter i Lewis [183, 185]. Ewentualne różnice między wynikami własnymi a obserwacjami Samuel i wsp. mogą wynikać przede wszystkim z projektu badania, a konkretnie liczby przeanalizowanych próbek. W cytowanej pracy Samuela analizowano dużą, wieloośrodkową kohortę europejską, obejmującą 290 kobiet z siedmiu krajów, z próbkami pobieranymi

w ściśle określonych punktach czasowych od 2. do 120. dnia laktacji. W badaniu Spevacek i wsp. badano małą grupę kobiet – 15 matek, które urodziły o czasie oraz 13 matek dzieci urodzonych przedwcześnie. Próbkę zbierane były w trzech punktach czasowych, w pierwszym tygodniu po porodzie, drugim tygodniu oraz po miesiącu w jednym ze szpitali uniwersyteckich w Kalifornii. W badaniu własnym liczba analizowanych próbek była większa niż w jednym z cytowanych badań, lecz mniejsza niż w drugim. Jednocześnie badana grupa charakteryzowała się większym zróżnicowaniem pod względem wieku dzieci i etapu laktacji, co mogło ograniczać możliwość uchwycenia wyraźnych trendów czasowych w stężeniach poszczególnych HMO. Ponadto II pobór nastąpił po krótszym odstępie czasu, dlatego zmiany między pobraniami mogą być subtelniejsze niż w badaniach obejmujących pierwsze cztery miesiące laktacji.

Laktoferyna mleka kobiecego jest jednym z głównych białek mleka kobiecego. Zmiany jej stężenia są dość dobrze opisane literaturze, gdzie najwyższe stężenia osiąga w sianie, po czym istotnie spada utrzymując na stałym poziomie w mleku dojrzalym [186]. LF oznaczona w niniejszym badaniu wykazała średnie stężenie na poziomie 4,00 mg/mL. Analiza stężeń tego białka z uwzględnieniem etapów laktacji wykazała wyraźnie zróżnicowanie w zależności od czasu trwania laktacji. Najwyższe stężenie laktoferyny obserwowano w mleku początkowym, gdzie średnia wyniosła 6,30 mg/mL, a maksymalne stężenie osiągnęło ponad 14,00 mg/mL. Po pierwszym miesiącu laktacji zawartość LF wyraźnie obniżyła się, stabilizując na poziomie około 2,5 mg/mL. Po ukończeniu 1. roku laktacji zaobserwowano ponowny wzrost stężenia LF, osiągający wartości powyżej 5,00 mg/mL. Takie zmiany stężeń wydają się być charakterystyczne i pozostają zgodne z danymi literaturowymi. W przeglądzie systematycznym Rai i wsp., obejmującym 52 badania i 2724 kobiety wykazano, że najwyższe stężenie LF występuje we wczesnej laktacji, po czym spada i pozostaje względnie stabilny, niezależnie od regionu świata. Autorzy podali, że średnie stężenie LF w mleku wczesnym wynosiło 4,91 mg/mL, natomiast w mleku dojrzalym 2,10 mg/mL [187]. Podobny kierunek zmian opisali Czosnykowska-Łukacka i wsp., którzy analizowali mleko kobiet karmiących od 1. do 48. miesiąca po porodzie. Autorzy wykazali, że najniższe średnie stężenie LF występowało w okresie 1–12 miesięcy laktacji i wynosiło $3,39 \pm 1,43$ mg/mL, natomiast w okresie 13–18 miesięcy istotnie wzrastało do $5,55 \pm 4,00$ mg/mL. W kolejnych etapach przedłużonej laktacji stężenie utrzymywało się na porównywalnym poziomie: $5,02 \pm 2,97$ mg/mL między 19. a 24. miesiącem oraz $4,90 \pm 3,18$ mg/mL po 24. miesiącu [188]. Dane te korespondują z wynikami

własnymi, w których po ukończeniu pierwszego roku laktacji stężenie laktoferyny ponownie przekraczało 5,00 mg/mL. Podobne do powyższych wyników przedstawia badanie Sinkiewicz-Darol i wsp., które również wykazało, że zawartość LF po 12. miesiącu karmienia jest wyższa, w porównaniu z dojrzałym mlekiem matek między 3. a 6. tygodniem laktacji [189]. Zakres stężeń LF wyniósł około $1,5 \pm 0,43$ mg/mL, natomiast różnica w wartości oznaczanej laktoferyny mogła wynikać z zastosowania różnych metod analitycznych badania własnego i przytoczonego (ELISA vs. RP-HPLC z detekcją UV-VIS). Czosnykowska-Łukacka i wsp. oraz Sinkiewicz-Darol i wsp., interpretują wysokie stężenia laktoferyny w mleku po 12 miesiącu jako oznakę wysokiego potencjału immunologicznego mleka w okresie przedłużonego karmienia, a uzyskane wartości porównują do stężeń obserwowanych w siarze. Co więcej, autorzy obu prac podkreślają, że przedłużona laktacja nie wiąże się z obniżeniem wartości biologicznej mleka kobiecego. Przeciwnie, także po 12. miesiącu karmienia piersią mleko zachowuje istotną wartość odżywczą i bioaktywną.

Uzyskane wyniki potwierdzają etapową zmienność stężeń oligosacharydów i laktoferyny w mleku kobiecym. Najwyższe wartości obserwowano w początkowym okresie laktacji. Jest to zgodne z ochronną funkcją tych składników w pierwszych dniach życia dziecka. W tym okresie układ immunologiczny i bariery śluzówkowe są jeszcze niedojrzałe, a dziecko jest intensywnie ekspozowane na mikroorganizmy środowiskowe. Składniki bioaktywne mleka wspierają więc ochronę immunologiczną oraz kształtowanie wczesnej mikrobioty dziecka. Spadek i stabilizacja w mleku dojrzałym może być pozorny, ponieważ ilość spożywanego mleka w przeliczeniu na dobę jest duży i osiąga około 700 mL – 800 mL na dobę [190], co sprawia, że sumaryczna zawartość spożywanych składników odżywczych i biologicznie aktywnych pozostaje na wysokim poziomie. Ponowny wzrost zawartości HMO i LF po pierwszym roku laktacji może natomiast wskazywać na utrzymywanie się istotnej roli immunomodulacyjnej mleka kobiecego w okresie przedłużonego karmienia. Dziecko rozwija się, staje się aktywne, ponadto przyjmuje stałe pokarmy, stąd zapotrzebowanie na MK spada i stanowi uzupełnienie diety. Stąd odpowiedzią, na zmieniające się zapotrzebowanie dziecka wydaje się być wyraźna zmiana składu mleka kobiecego i wzrost zawartości poszczególnych składników. Wyniki te są zgodne z koncepcją mleka kobiecego jako dynamicznego płynu biologicznego, którego kompozycja zmienia się wraz z czasem laktacji i prawdopodobnie dostosowuje się do zmieniających się potrzeb dziecka.

6.4 Związek pomiędzy składem mikrobiologicznym a oligosacharydami i laktoferyną

Badania dotyczące wpływu składników mleka kobiecego na kształtowanie kompozycji mikrobiologicznej mleka oraz mikrobioty dziecka wskazują na istotną rolę oligosacharydów mleka kobiecego i laktoferyny. Potwierdzają to dostępne badania oryginalne oraz przeglądowe publikacje. Badania Cabrera-Rubio i wsp., Aakko i wsp., LeMay-Nedjelski i wsp. oraz Ge i wsp. wykazały korelacje między stężeniami wybranych oligosacharydów lub grup HMO a obecnością określonych taksonów bakteryjnych w mleku. Autorzy opisywali m.in. dodatnią korelację między całkowitym stężeniem HMO a obecnością *Bifidobacterium* spp. i *Lactobacillaceae* spp., co wskazuje na prebiotyczne właściwości oligosacharydów względem mikrobioty mleka kobiecego oraz docelowo układu pokarmowego karmionego piersią dziecka. Z kolei praca Seferovic i wsp. sugeruje, że niektóre bakterie mleka, w tym przedstawiciele rodzajów *Streptococcus* i *Staphylococcus*, mogą wykorzystywać wybrane HMO lub być przez nie selektywnie modulowane [191–194].

W związku z powyższymi przesłankami, niniejsze badanie zaprojektowano tak, aby możliwe było nie tylko oznaczenie stężeń HMO i laktoferyny, lecz także ocena zależności pomiędzy tymi składnikami a profilem mikrobiologicznym mleka kobiecego. W badaniu własnym nie wykazano związku pomiędzy stężeniami HMO a obecnością bakterii z rodzajów LAB i *Bifidobacterium*. Wynik ten może częściowo wynikać z ograniczeń zastosowanej metody hodowlanej, ponieważ bakterie LAB oraz *Bifidobacterium* spp., charakteryzują się wysokimi wymaganiami wzrostowymi i mogą być trudne do izolacji z mleka kobiecego. Wykazano natomiast, że obecność *R. mucilaginosa* była istotnie związana z zawartością wybranych oligosacharydów w badanych próbkach. W mleku, z którego wyizolowano *Rothia mucilaginosa*, stwierdzono istotnie niższe stężenia 2'-FL, DFLNH i SLNH niż w próbkach, w których gatunku tego nie wykryto. Z kolei obecność *Staphylococcus hominis* wiązała się z istotnie wyższym stężeniem laktoferyny. Ze względu na obserwacyjny charakter badania zależności te nie pozwalają jednak na wnioskowanie o bezpośrednim wpływie wymienionych bakterii na stężenia HMO lub laktoferyny.

R. mucilaginosa stanowi naturalną mikrobiotę górnych dróg oddechowych, skąd poprzez bezpośredni kontakt podczas aktu karmienia przedostawać się do gruczołu piersiowego. Jest to gatunek rzadko izolowany z zakażeń, w literaturze podkreśla się jego udział w zakażeniach u osób z immunosupresją. Natomiast obecność tego gatunku może

wpływać na skład MK poprzez wykorzystywanie wybranych składników na własne potrzeby. Szczególnie HMO, które stanowią „pożywkę cukrową” dla mikrobioty. Badacze z Chin, którzy badali korelację pomiędzy mikrobiotą, wskazują na zmianę składu oligosacharydów pod wpływem obecności niektórych gatunków bakterii [195]. Obecność gatunków z rodzaju *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Anaerococcus*, *Rothia*, *Gemella*, *Neisseria*, *Acinetobacter* i *Haemophilus* była ujemnie skorelowana z zawartością niektórych frakcji HMO. Potwierdzają to częściowo własne obserwacje związane z obniżeniem stężenia HMO w próbkach mleka z obecnością *R. mucilaginosa*. Ponadto obecność *R. mucilaginosa* nie pozostaje obojętna na stan błony śluzowej górnych dróg oddechowych. Badanie Rigauts i wsp. na modelu mysim wykazało, że obecność *R. mucilaginosa* wpływa na stan zapalny śluzówki w drogach oddechowych, co może sprzyjać przewlekłym chorobom układu oddechowego [196]. Takie właściwości immunomodulujące nie muszą mieć negatywnego wpływu na stan zdrowotny osoby skolonizowanej, natomiast wykazują niezwykle skomplikowany charakter interakcji między mikrobiotą, składnikami bioaktywnymi MK, a potencjalną odpowiedzią immunologiczną gospodarza.

S. hominis również stanowi naturalny składnik błon śluzowych oraz skóry człowieka, nie stanowiąc zwiększonego ryzyka zakażeń, z wyjątkiem osób z obniżoną odpornością. Wyższe stężenie laktoferyny w mleku może być wynikiem lokalnego stanu zapalnego, co sugeruje badanie Ito i wsp. [197]. Wyższe stężenie LF w mleku z obecnym *S. hominis*, może być związane z wyższą aktywnością prozapalną gronkowców w gruczole piersiowym i wpływać na zwiększoną przepuszczalność naczyń gruczołu, a w efekcie zwiększone stężenie LF w mleku. Drugi aspekt może być związany z powinowactwem LF do jonów żelaza, niezbędnych do wzrostu bakterii. Poprzez zwiększoną zawartość laktoferyny w gruczole eliminuje się pulę wolnego żelaza, zmniejszając ryzyko nadmiernego wzrostu bakterii i rozwoju *mastitis* [197]. Innym potencjalnym wyjaśnieniem obserwowanej korelacji między wyższym stężeniem LF a obecnością *S. hominis* jest zdolność laktoferyny do modulowania składu mikrobioty. Zwiększone stężenie LF może sprzyjać selekcji drobnoustrojów lepiej przystosowanych do środowiska bogatego w laktoferynę, takich jak *S. hominis*. Obserwowany wynik może wskazywać na wzajemne powiązanie mikrobioty mleka z lokalnymi mechanizmami odpornościowymi gruczołu piersiowego. Potwierdzeniem takiego założenia jest praca Mastromarino i wsp., którzy badali interakcje pomiędzy stężeniem laktoferyny, a liczebnością bakterii probiotycznych z rodzajów *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* [198]. Na podstawie

uzyskanych wyników autorzy postawili hipotezę zakładającą, że dzięki swoim właściwościom przeciwdrobnoustrojowym i immunomodulującym LF może stanowić ważny element wsparcia rozwoju jelit i odporności niemowlęcia. Jednak takie wnioski należy odnosić do własnych wyników z dużą ostrożnością. W dostępnej literaturze nie znaleziono dotychczas badań potwierdzających bezpośrednią zależność pomiędzy obecnością *S. hominis* a stężeniem laktoferyny w mleku kobiecym. Stąd omawiany wynik własny ma charakter obserwacyjny i może stanowić nową zależność wymagającą potwierdzenia z uwzględnieniem miana bakterii, etapu laktacji, markerów zapalnych oraz powtarzanych pomiarów u tych samych kobiet.

6.5 Wpływ czynników środowiskowych na skład mikrobiologiczny mleka kobiecego oraz składników biochemicznych

6.5.1 Metoda porodu

W niniejszym badaniu nie wykazano istotnego związku pomiędzy sposobem porodu a składem mikrobiologicznym ani profilem biochemicznym mleka kobiecego. Analiza krzywych LOESS nie wskazała na występowanie odmiennego przebiegu zmian różnorodności mikrobiologicznej wraz z etapem laktacji u kobiet po porodzie drogami natury i po cięciu cesarskim. Również klastrowanie hierarchiczne przedstawione na mapie cieplnej, obejmującej 20 najczęściej identyfikowanych gatunków bakterii, nie ujawniło wyraźnego grupowania próbek w zależności od sposobu zakończenia ciąży. Wyniki te potwierdziły analizy porównawcze profilu mikrobiologicznego i biochemicznego mleka. Po zastosowaniu korekcji FDR nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy kobietami po cięciu cesarskim a kobietami po porodzie drogami natury w zakresie stężeń poszczególnych frakcji HMO, laktoferyny, miana bakterii ani wskaźników alfa-różnorodności. Oznacza to, że w badanej grupie sposób rozwiązania ciąży nie stanowił czynnika istotnie różnicującego analizowane właściwości mleka kobiecego. Brak wykazanej zależności nie wyklucza jednak możliwości występowania subtelnych różnic dotyczących pojedynczych taksonów lub krótkotrwałych zmian obserwowanych np. we wczesnym okresie poporodowym, co w niniejszym badaniu było trudne do uchwycenia ze względu na dużą rozpiętość okresu poporodowego grupy badanej. Potencjalny wpływ sposobu porodu może być także modyfikowany przez inne czynniki, takie jak antybiotykoterapia okołoporodowa, kontakt skóra do skóry, czas rozpoczęcia karmienia piersią, etap laktacji oraz indywidualne cechy matki i dziecka.

Brak zależności składu mikrobiologicznego i biochemicznego MK od sposobu porodu w niniejszym badaniu, nie oznacza jednoznacznie, że sposób rozwiązania ciąży nie ma wpływu na kompozycję mleka. Badania Khodayar-Pardo i wsp., Cabrera-Rubio i wsp., Toscano i wsp. wskazują na związek sposobu porodu z ogólną strukturą społeczności mikroorganizmów, ich różnorodnością lub liczebnością wybranych rodzajów bakterii [199–202]. Zależności te były jednak obserwowane przede wszystkim w siarze lub w pierwszym miesiącu laktacji. Natomiast wyniki Urbaniak i wsp. i Lyonsi wsp. wykazują brak wpływu sposobu porodu na skład mleka, jednocześnie podkreślając etap laktacji jako główny czynnik wpływający na kompozycję MK [203, 204]. Dane literaturowe dotyczące wpływu sposobu porodu na skład mleka kobiecego pozostają niejednoznaczne, co może znaczyć, że metoda rozwiązania ciąży jest czynnikiem wpływającym w niewielkim stopniu lub/i krótkotrwale na kompozycję mleka kobiecego.

6.5.2 Wiek matki

Analiza korelacji rang Spearmana pomiędzy stężeniami HMO, laktoferyny, mianem bakterii oraz wskaźnikami różnorodności mikrobiomu a wiekiem matki wykazała tendencję ujemnych korelacji wskazujących obniżenie kilku frakcji HMO wraz z wiekiem, bez większego wpływu na pozostałe parametry MK. Najsilniejszą ujemną korelację odnotowano dla frakcji HMO, tj. LST, DSLNT, LNFP i 6'-SL, natomiast dla LNDHF i LNT uzyskano umiarkowaną ujemną korelację wraz z wiekiem badanych kobiet. Stężenie całkowite HMO i LF, miano oraz różnorodność mikrobiologiczna nie wykazała związku z wiekiem matek.

W badaniu Xu i wsp. wykazało brak związku między wiekiem matki a składem mikrobiologicznym mleka [205]. Natomiast badanie Padilha i wsp. analizujące wpływ suplementacji fruktooligosacharydów na skład mikrobioty MK wykazało korzystne zmiany w składzie mikrobiologicznym bakterii uznawanych za probiotyczne u kobiet poddanych suplementacji w porównaniu z grupą placebo. Dodatkowo zbadano tę zależność w kontekście wieku kobiet biorących udział w badaniu i wykazało, że lepszy efekt niniejszej suplementacji uzyskano u młodszych kobiet (poniżej 30. r.ż). Możliwe jest zatem wpływanie na mikrobiotę mleka kobiecego za pomocą prebiotyków, a wiek matki może wpływać na tę odpowiedź [206].

Wang i wsp. poddali analizie wpływu czynników matczynych na skład oligosacharydów mleka od początkowej laktacji do ukończenia 6. miesiąca życia dziecka. W badaniu wykazano, że wiek matki był negatywnie powiązany z m.in. LNT, LNT, LNFP, LNDHF i DFLNH. Natomiast badanie Azad i wsp. nie odnotowało żadnych zmian w składzie HMO w korelacji z wiekiem

badanych uczestniczek [207]. Eksperyment Wang i wsp. potwierdza wyniki badania własnego i sugeruje tendencję do obniżenia stężeń niektórych frakcji HMO w mleku kobiecym wraz z wiekiem matek. Jednakże wyniki te wymagają dalszych analiz i potwierdzenia ze względu na brak jednoznacznych wyników.

Stężenie laktoferyny w mleku kobiecym jest przede wszystkim związane z etapem laktacji. Zależność tę wykazali Cai i wsp., którzy dodatkowo zaobserwowali, że u kobiet powyżej 30. roku życia średnie stężenie laktoferyny było niższe w porównaniu z młodszymi uczestniczkami [208]. Natomiast badanie Kulesza-Brończyk nie odnotowało korelacji pomiędzy zawartością LF a wiekiem matki [209].

6.5.3 BMI

W badaniu własnym wartość BMI uczestniczek przed ciążą nie wpłynęło na zawartość analizowanych parametrów (bioróżnorodność i miano mikrobioty, HMO, LF). Przegląd piśmiennictwa wskazuje, że BMI matki może wpływać na skład mleka kobiecego, jednak zależność ta nie jest jednoznaczna, a sam wskaźnik BMI nie stanowi wystarczającego predyktora określającego właściwości odżywcze i biochemiczne MK. Wyniki badania opisujących wpływ matczynej BMI na skład mleka nie są spójne i wymagają dalszych analiz. Cabrera-Rubio wsp. badali w kolejnych etapach laktacji 18 kobiet i wykazali, że mleko kobiet z BMI powyżej 30 charakteryzowało się odmiennym i mniej zróżnicowanym profilem mikrobiologicznym niż mleko kobiet z prawidłową masą ciała [210]. Collado i wsp. badali kompozycję mikrobioty MK i kobiet z prawidłową masą ciała i otyłością. U kobiet z otyłością odnotowano wyższe miano rodzaju *Staphylococcus*, przy jednoczesnej mniejszej zawartości *Bifidobacterium* spp.

Analiza Azad i wsp. nie wykazała korelacji pomiędzy BMI sprzed ciąży a zawartością HMO [207], natomiast Wang i wsp. uzyskali dodatnią korelację BMI z niektórymi frakcjami HMO (LNH, LNnH, IFLNH-I i DFLNH)[211]. Kulesza-Brończyk i wsp. wskazuje, że wzrost BMI koreluje z niższą zawartością laktoferyny [209]. Należy jednak podkreślić, że wyżej przytoczone wyniki nie oznaczają jednoznacznego wpływu wyższego BMI na zmniejszenie bioróżnorodności mikrobioty lub spadek stężenia LF. Związek ten może wskazywać jedynie na współwystępowanie obu zjawisk w badanej grupie. Rozbieżności pomiędzy zacytowanymi publikacjami mogą wynikać z różnego momentu oceny BMI, etapu laktacji, sposobu karmienia

i pobierania mleka, antybiotykoterapii, przyrostu masy ciała w ciąży, gospodarki glukozowej oraz zastosowanych metod analitycznych.

7 WNIOSKI

1. Duża zmienność wewnątrzsobnicza miana bakterii wskazuje, że pojedyncza próbka mleka nie jest wystarczająca do wiarygodnej oceny indywidualnego poziomu kolonizacji. W przyszłych badaniach należy uwzględnić wielokrotne pobrania próbek oraz zastosowanie wieloczynnikowych modeli statystycznych.
2. W mleku kobiecym i jamie ustnej niemowląt wykazano wspólny rdzeń obejmujący 10 gatunków bakterii. Wynik ten wspiera hipotezę o transferze mikroorganizmów podczas karmienia piersią, ale nie pozwala jednoznacznie określić jego kierunku.
3. Etap laktacji był jedynym spośród analizowanych czynników klinicznych istotnie związanym ze strukturą mikrobioty mleka kobiecego oraz jednym z głównych czynników różnicujących stężenia laktoferyny i wybranych HMO. Nie wykazano natomiast istotnego wpływu sposobu porodu, diety i suplementacji w okresie ciąży ani miejsca zamieszkania.
4. Obecność *Rothia mucilaginosa* była związana z niższymi stężeniami wybranych fukozylowanych HMO, co wskazuje na możliwe powiązanie tego gatunku środowiskiem biochemicznym mleka, lecz wymaga potwierdzenia w badaniach eksperymentalnych.
5. Poszczególne frakcje HMO wykazywały odmienne zależności z mianem bakterii. Dodatnie korelacje dotyczyły przede wszystkim 3'-SL i DSLNT, natomiast FLNH wykazywał ujemny związek z liczebnością mikroorganizmów. Wskazuje to na frakcjozależny charakter interakcji pomiędzy HMO a mikrobiotą mleka.
6. Dodatnia zależność pomiędzy laktoferyną a mianem bakterii sugeruje związek z miejscową odpowiedzią immunologiczną gruczołu piersiowego, jednak obserwacyjny charakter badania nie pozwala na określenie kierunku tej zależności.

Pomimo ograniczeń wynikających z niekompletności danych, liczebności próby i zastosowania metod hodowlanych uzyskane wyniki wskazują, że mleko kobiece jest dynamicznym ekosystemem, w którym składniki bioaktywne i mikroorganizmy tworzą złożoną sieć wzajemnych zależności. Podsumowując, niniejsze badanie dostarcza dowodów na to, etap laktacji odgrywa kluczową rolę w kształtowaniu zarówno profilu biochemicznego, jak i mikrobiologicznego mleka, natomiast oligosacharydy mleka kobiecego uczestniczą w zróżnicowanych, frakcjozależnych interakcjach z mikrobiotą. Obecność stabilnego rdzenia

gatunków wspólnych dla mleka i jamy ustnej niemowlęcia wspiera hipotezę o biologicznym znaczeniu transmisji mikroorganizmów między matką a dzieckiem w kształtowaniu wczesnego mikrobiomu jamy ustnej.

8 STRESZCZENIE

Mleko kobiece stanowi optymalny sposób żywienia noworodków i niemowląt zapewniając wszystkie niezbędne składniki do wzrostu i rozwoju karmionego piersią dziecka. Oprócz składników odżywczych zawiera liczne składniki aktywne mające znaczenie zdrowotne dla dziecka, takie jak immunoglobuliny, cytokiny, laktoferynę, witaminy, hormony, oligosacharydy czy żywe mikroorganizmy.

Celem badania była charakterystyka mikrobiomu mleka kobiecego oraz jamy ustnej karmionego piersią dziecka z uwzględnieniem danych socjo-demograficznych uczestników badania. Ponadto oznaczono ilościową zawartość laktoferyny (LF) oraz jakościową i ilościową zawartość oligosacharydów mleka kobiecego (HMO). Na badanie uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu Collegium Medicum w Bydgoszczy nr KB196/2021. Badanie obejmowało dwa etapy, podczas których od tych samych par matka-dziecko pobrano próbki mleka kobiecego, wymazy z jamy ustnej dzieci oraz uzyskano dane ankietowe (N1 = 53, N2 = 32). Zebrane materiały biologiczne posiano metodą powierzchniową na zestaw podłoży mikrobiologicznych – agar z 5% krwią baranią, agar MacConkey’a, agar Sabourauda, agar de Man, Rogosa i Shreve, agar MYP. Podłoża mikrobiologiczne inkubowano w 36°C przez 48 – 72h. Wyrosłe kolonie poddano identyfikacji na spektrometrze masowym typu MALDI-TOF MS. Oznaczanie ilościowe laktoferyny wykonano metodą immunoenzymatyczną (ELISA), a badanie oligosacharydów zostało przeprowadzone wysokosprawną chromatografią cieczową (UHPLC).

Mediana szacunkowej zawartości żywych mikroorganizmów w mleku wyniosła 7100 jtk/mL podczas pierwszego oraz 9200 jtk/mL podczas drugiego poboru próbek mleka. Dominującymi rodzajami mleka kobiecego były *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Rothia*, *Enterococcus*, *Acinetobacter* oraz gatunki z rodziny *Lactobacillaceae*. Z wymazów najczęściej identyfikowano rodzaje *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Gemella*, *Neisseria*, *Rothia*, *Acinetobacter* oraz gatunki z rodziny *Lactobacillaceae*. Najczęstszym gatunkiem wchodzącym w skład mikrobioty mleka był *Staphylococcus epidermidis*, identyfikowany u 88,7% uczestniczek w pierwszym punkcie czasowym oraz u 90,6% w drugim. Kolejne pod względem częstości występowania były: *Streptococcus mitis* (64,2% vs. 62,5%), *Streptococcus parasanguinis* (43,4% vs. 31,2%), *Streptococcus oralis* (41,5% vs. 21,9%) oraz *Streptococcus vestibularis* (41,5% vs. 56,2%).

W materiale z wymazów jamy ustnej dzieci, pobranym w obu punktach czasowych, dominowały gatunki: *Streptococcus mitis* (81,1% vs. 81,2%), *Streptococcus oralis* (67,9% vs. 53,1%), *Streptococcus vestibularis* (49,1% vs. 56,2%), *Staphylococcus epidermidis* (47,2% vs. 56,2%) oraz *Gemella haemolysans* (45,3% vs. 28,1%). Mediana laktoferyny z I i II zbiórki wyniosła 2,535 mg/mL (zakres 1,240–14,268) oraz 2,805 mg/mL (1,376–14,454). Mediana całkowitego stężenia oligosacharydów w pierwszym i drugim poborze wynosiła odpowiednio 2,49 mg/mL (zakres 0,85–100,48) vs 2,43 mg/mL (0,77–72,78). Najwyższe stężenie LF oraz HMO uzyskano z próbek mleka z początkowych etapów laktacji, do ukończenia pierwszego miesiąca życia dziecka.

Niniejsze badanie wskazuje, że mleko kobiece stanowi dynamiczny mikrobiologicznie i biochemicznie układ, gdzie etap laktacji stanowi jeden z głównych czynników regulujących zawartość badanych składników. Transmisja mikrobioty między matką a dzieckiem opiera się na wspólnym rdzeniu gatunkowym bakterii, które mogą uczestniczyć w kształtowaniu wczesnego mikrobiomu jamy ustnej niemowlęcia.

9 ABSTRACT

Human milk is considered the optimal form of nutrition for newborns and infants, providing all essential nutrients required for the growth and development of breastfed children. In addition to nutrients, it contains numerous biologically active components with health-promoting effects, including immunoglobulins, cytokines, lactoferrin, vitamins, hormones, oligosaccharides, and viable microorganisms.

The aim of the study was to characterize the microbiota of human milk and the oral cavity of breastfed children, taking into account the sociodemographic characteristics of the study participants. In addition, lactoferrin (LF) concentration and the qualitative and quantitative composition of human milk oligosaccharides (HMOs) were determined. The study was approved by the Bioethics Committee of Nicolaus Copernicus University in Toruń, Collegium Medicum in Bydgoszcz (approval no. KB 196/2021). The study comprised two stages, during which human milk samples and oral swabs from children were collected from the same mother–child pairs, together with questionnaire data (N1 = 53, N2 = 32). The collected biological materials were inoculated using the surface plating method onto a set of microbiological media: agar supplemented with 5% sheep blood, MacConkey agar, Sabouraud agar, de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar, and MYP agar. The microbiological media were incubated at 36°C for 48–72 h. The resulting colonies were identified using MALDI-TOF mass spectrometry. Lactoferrin concentration was determined using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), whereas oligosaccharides were analyzed using ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC).

The median estimated concentration of viable microorganisms in human milk was 7,100 CFU/mL at the first sampling and 9,200 CFU/mL at the second sampling. The predominant genera identified in human milk were *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Rothia*, *Enterococcus*, and *Acinetobacter*, together with members of the family *Lactobacillaceae*. In oral swab samples, the most frequently identified genera were *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Gemella*, *Neisseria*, *Rothia*, and *Acinetobacter*, as well as members of the family *Lactobacillaceae*. The most prevalent species in the human milk microbiota was *Staphylococcus epidermidis*, identified in 88.7% of participants at the first sampling point and 90.6% at the second. The next most frequently detected species were *Streptococcus mitis* (64.2% vs. 62.5%), *Streptococcus parasanguinis* (43.4% vs. 31.2%),

Streptococcus oralis (41,5% vs. 21,9%), and *Streptococcus vestibularis* (41,5% vs. 56,2%). In oral swab samples collected from children at both sampling points, the predominant species were *Streptococcus mitis* (81,1% vs. 81,2%), *Streptococcus oralis* (67,9% vs. 53,1%), *Streptococcus vestibularis* (49,1% vs. 56,2%), *Staphylococcus epidermidis* (47,2% vs. 56,2%), and *Gemella haemolysans* (45,3% vs. 28,1%). The median lactoferrin concentration at the first and second sampling points was 2,535 mg/mL (range 1,240–14,268) and 2,805 mg/mL (range 1,376–14,454), respectively. The median total HMO concentration at the first and second sampling points was 2,49 mg/mL (range 0,85–100,48) and 2,43 mg/mL (range 0,77–72,78), respectively. The highest LF and HMO concentrations were observed in milk samples collected during the early stages of lactation, within the first month of the child's life.

The present study indicates that human milk is a microbiologically and biochemically dynamic system in which the stage of lactation is one of the major factors determining the levels of the analyzed components. Microbiota transmission between mother and child is associated with a shared core of bacterial species that may contribute to shaping the early oral microbiota of the infant.

10 SPIS RYSUNKÓW

Rysunek 1. Budowa gruczołu piersiowego (opracowanie własne na podstawie [9])	.11
Rysunek 2. Odżywczy i poza odżywczy skład mleka kobiecego (opracowanie własne na podstawie przeglądu literatury)	13
Rysunek 3. Korzyści płynące z karmienia piersią dla matki i dziecka od narodzin do dorosłości [32] (opracowanie własne)	16
Rysunek 4. Hipotetyczne ścieżki transferu mikroorganizmów do gruczołu mlekowego kobiety. Droga 1. jelitowo-piersiowa, 2. ustno-piersiowa, 3. przepłukiwanie wsteczne, 4. wymiana mikroorganizmów drogą kontaktu (opracowanie własne)	20
Rysunek 5. Schematyczne przedstawienie rozwoju mikrobioty u dzieci w pierwszych latach życia, z uwzględnieniem zmian dominujących rodzajów bakterii oraz wzrostu różnorodności alfa i beta (rysunek na podstawie [95], z własnymi modyfikacjami)	...23
Rysunek 6. Wpływ karmienia piersią na kształtowanie mikrobioty jamy ustnej i przewodu pokarmowego niemowlęcia (opracowanie własne na podstawie przeglądu literatury)	25
Rysunek 7. Wpływ sposobu karmienia na kolonizację karmionego dziecka na wczesnym etapie życia (opracowanie własne stworzone na bazie przeglądu literatury)	27
Rysunek 8. Podstawowe struktury oligosacharydów (na podstawie [118] z własnymi modyfikacjami)	29
Rysunek 9. Trójwymiarowa struktura laktoferyny związana z jonem żelaza – pomarańczowa kulka w centrum obu płatów laktoferyny (modyfikacja na podstawie [137])	32
Rysunek 10. Laktator klasy szpitalnej Medela Symphony i indywidualny, jednorazowy zestaw do odciągania mleka (źródło medela.com)	40
Rysunek 11. Schemat badania (opracowanie własne)	42

Rysunek 12. Schemat szeregu rozcieńczeń próbek mleka (opracowanie własne).....	46
Rysunek 13. Zasada działania spektrometru MALDI-TOF MS (na podstawie [144] z własnymi modyfikacjami)	50
Rysunek 14. Widok aplikacji do obsługi MALDI-TOF MS wraz z wykonanymi identyfikacjami oraz przykładowe widmo MS (rycina własna – screen aplikacji BRUKER MBT Compass IVD).....	52
Rysunek 15. Heatmapa obecności 20 najczęstszych gatunków bakterii mleka z I poboru z kastroowaniem hierarchicznym i uwzględnieniem etapu laktacji i metody porodu ..	94

11 SPIS WYKRESÓW

Wykres 1. Porównanie logarytmicznej liczby bakterii w I i II poborze. Analiza danych sparowanych z liniami łączącymi pomiary tej samej uczestniczki	62
Wykres 2. Rozkład procentowy wartości Score identyfikacji bakteryjnych w próbkach mleka oraz wymazów z jamy ustnej podczas I i II poboru	63
Wykres 3. Porównanie najczęściej występujących rodzajów w próbkach mleka kobiecego (A) i wymazów z jamy ustnej dzieci (B) z poboru I	64
Wykres 4. Porównanie najczęściej występujących rodzajów w próbkach mleka kobiecego i wymazów z jamy ustnej dzieci z poboru II	64
Wykres 5. Porównanie liczby zidentyfikowanych gatunków bakterii w próbkach mleka i wymazów z jamy ustnej podczas I i II poboru	65
Wykres 6. Diagramy Venna obrazujące nakładanie się wspólnych rodzajów bakterii w próbkach mleka oraz wymazów z jamy ustnej pomiędzy pierwszym i drugim poborem (j.u. = jama ustna)	66
Wykres 7. Podsumowanie dwudziestu najczęściej identyfikowanych gatunków w mleku – I i II pobór	68
Wykres 8. Podsumowanie dwudziestu najczęściej identyfikowanych gatunków w wymazach – I i II pobór	70
Wykres 9. Parowany wykres indeksu Jaccarda nakładania się mikrobiomu mleka i wymazu jamy ustnej: I vs II pobór	72
Wykres 10. Porównanie wskaźników alfa-różnorodności mikrobiomu między czterema kombinacjami materiału i czasu poboru (bogactwo gatunkowe oraz indeks Shannona)	75
Wykres 11. Wykres analizy PCoA (na macierzy Bray-Curtis) mikrobioty mleka mapowana wg etapu laktacji (I pobór)	76
Wykres 12. Indywidualne zmiany całkowitego stężenia HMO pomiędzy I i II poborem mleka (analiza parowana)	80

Wykres 13. Zależność całkowitego stężenia HMO (A) oraz stężenia laktoferyny (B) od wieku dziecka z uwzględnieniem metody porodu (I pobór).....	82
Wykres 14. Wykresy rozrzutu: $\log_{10}$ (miano bakterii) a stężenie Total HMO (I i II pobór, skala logarytmiczna)	83
Wykres 15. Wykresy rozrzutu: $\log_{10}$ (miano bakterii) a stężenie laktoferyny (I i II pobór, skala logarytmiczna)	84
Wykres 16. Wykresy skrzynkowe: stężenia HMO wg obecności najsilniej zasocjowanych gatunków bakterii.....	86
Wykres 17. Wpływ etapu laktacji na stężenie HMO, laktoferyny, 6'SL oraz 2'FL.....	91
Wykres 18. Alfa-różnorodność mikrobiomu mleka kobiecego w zależności od etapu laktacji (wykres skrzypcowy, I pobór)	92
Wykres 19. Zależność pomiędzy wiekiem dziecka a indeksem Shannona mikrobiomu mleka. Punkty przedstawiają pojedyncze próbki, kolory oznaczają metodę porodu, linia LOESS obrazuje trend zmian alfa-różnorodności w czasie laktacji, pionowe linie odzwierciedlają etapy laktacji.....	93
Wykres 20. Wykresy skrzynkowe prezentują porównanie biomarkerów mleka między kobietami po porodzie naturalnym a cięciem cesarskim (I pobór). Skrót ns (ang. not significant) oznacza brak istotnych statystycznie różnic	96

12 SPIS TABEL

Tabela 1. Charakterystyka demograficzna i kliniczna uczestniczek badania	59
Tabela 2. Porównanie parowane miana bakterii w mleku między I a II poborem	61
Tabela 3. Porównanie miana bakterii w mleku między I a II poborem uczestniczek z danymi o mianie bakterii w obu pobraniach	61
Tabela 4. Liczba oznaczeń oraz jakości identyfikacji na MALDI TOF MS	63
Tabela 5. Dwadzieścia najczęściej identyfikowanych gatunków w mleku – I i II pobór	67
Tabela 6. Dwadzieścia najczęściej identyfikowanych gatunków w wymazach z jamy ustnej dzieci – I i II pobór	69
Tabela 7. Gatunki dominujące wspólne dla mleka i wymazu z poboru I (rdzeń mikrobiomu osi matka-dziecko)	71
Tabela 8. Gatunki dominujące wspólne dla mleka i wymazu z poboru II (rdzeń mikrobiomu osi matka-dziecko)	71
Tabela 9. Zmiany częstości występowania najczęściej identyfikowanych gatunków bakterii pomiędzy I i II poborem mleka ocenione testem McNemara uporządkowane rosnąco wg p_{raw} (N = 32 pary)	73
Tabela 10. Wskaźniki alfa-różnorodności mikrobiomu mleka i wymazu jamy ustnej w I i II poborze	74
Tabela 11. Wielowymiarowa analiza różnic między grupami klinicznymi: wpływ czynników klinicznych w strukturę beta-różnorodności mikrobioty mleka (I pobór, N = 53)	76
Tabela 12. Zidentyfikowane HMO w badanych próbkach mleka	77
Tabela 13. Charakterystyka statystyczna stężeń HMO i laktoferyny (I i II pobór)	78

Tabela 14. Charakterystyka statystyczna stężeń HMO - frakcje indywidualne HMO (I i II pobór).....	79
Tabela 15. Jednoczynnikowa analiza zależności pomiędzy obecnością wybranych gatunków bakterii a stężeniem HMO i laktoferyny w mleku kobiecym (12 najbardziej istotnych statystycznie wyników z I poboru)	85
Tabela 16. Korelacje rang Spearmana pomiędzy stężeniami HMO, laktoferyny, mianem bakterii oraz wskaźnikami różnorodności mikrobiomu mleka a wiekiem dziecka wyrażonym w miesiącach (I pobór)	87
Tabela 17. Korelacje rang Spearmana pomiędzy stężeniami HMO, laktoferyny, mianem bakterii oraz wskaźnikami różnorodności mikrobiomu mleka a wiekiem matki (I pobór)	88
Tabela 18. Korelacje rang Spearmana: frakcje HMO, laktoferyna, miano bakterii i wskaźniki różnorodności mikrobiomu a BMI kobiet (I pobór)	89
Tabela 19. Porównanie stężeń HMO, laktoferyny, miana bakterii i wskaźników różnorodności między etapami laktacji, analiza testem Kruskala-Wallisa (I pobór) ...	90
Tabela 23. Porównania stężeń biomarkerów mleka między podgrupami klinicznymi: metoda porodu – cięcie cesarskie n = 27 vs poród naturalny n = 26 (I pobór)	95

13 SPIS ZDJEĆ

Zdjęcie 1. Zestaw podłoży stosowanych do posiewu zebranego materiału biologicznego – pojedynczej próbki mleka – szereg górny i wymazy – szereg dolny (opracowanie własne).....	45
Zdjęcie 2. System do hodowli w warunkach beztlenowych (opracowanie własne) ...	47
Zdjęcie 3. Posiew powierzchniowy szeregu rozcieńczeń mleka kobiecego (opracowanie własne).....	47
Zdjęcie 4. Zestaw podłoży agarowych z widocznymi koloniami bakteryjnymi. Górny szereg przedstawia posiew mleka kobiecego. Dolny szereg przedstawia posiew redukcyjny wymazu jamy ustnej dziecka (opracowanie własne)	48
Zdjęcie 5. Zestaw MALDI TOF MS Microflex LT Biotyper w Zakładzie Diagnostyki Mikrobiologicznej Wojewódzkiego Szpitala Zespolonego im. L. Rydygiera w Toruniu (zdjęcie własne).....	48
Zdjęcie 6. A – 96-dołkowa wielorazowa płytka do analizy spektrometrem MALDI-TOF MS; B – nanoszenie masy bakteryjnej na płytkę (zdjęcia własne).....	49
Zdjęcie 7. UltiMate 3000 HPLC and UHPLC Systems, Politechnika Gdańska, Katedra Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności (zdjęcie własne)	55
Zdjęcie 8. Spektrofotometr SPECTROstar Nano (BMG LABOTECH, Germany), Katedra Fizjologii i Toksykologii (zdjęcie własne)	56

14 BIBLIOGRAFIA

1. Tomori C (2022) Overcoming barriers to breastfeeding. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* 83:60–71. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2022.01.010>
2. Rollins NC, Bhandari N, Hajeebhoy N, et al (2016) Why invest, and what it will take to improve breastfeeding practices? *Lancet* 387:491–504. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01044-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01044-2)
3. Caba-Flores MD, Ramos-Ligonio A, Camacho-Morales A, et al (2022) Breast Milk and the Importance of Chrononutrition. *Front Nutr* 9:. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.867507>
4. Zimmermann P, Curtis N (2020) Breast milk microbiota: A review of the factors that influence composition. *Journal of Infection* 81:17–47. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.01.023>
5. McManaman JL, Neville MC (2003) Mammary physiology and milk secretion. *Advanced Drug Delivery Reviews* 55:629–641. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(03\)00033-4](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(03)00033-4)
6. Macias H, Hinck L (2012) Mammary gland development. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 1:533–557. <https://doi.org/10.1002/wdev.35>
7. Hurley WL (2019) Review: Mammary gland development in swine: embryo to early lactation. *Animal* 13:s11–s19. <https://doi.org/10.1017/S1751731119000521>
8. Hassiotou F, Geddes D (2013) Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. *Clinical Anatomy* 26:29–48. <https://doi.org/10.1002/ca.22165>
9. Nehring-Gugulska M (2025) Karmienie piersią w teorii i praktyce - Podręcznik dla doradców i konsultantów laktacyjnych oraz położnych, pielęgniarek i lekarzy, 3rd ed. *Medycyna Praktyczna*
10. Truchet S, Honvo-Houéto E (2017) Physiology of milk secretion. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 31:367–384. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2017.10.008>
11. Lyons KE, Ryan CA, Dempsey EM, et al (2020) Breast Milk, a Source of Beneficial Microbes and Associated Benefits for Infant Health. *Nutrients* 12:1039. <https://doi.org/10.3390/nu12041039>
12. Nagel EM, Howland MA, Pando C, et al (2022) Maternal Psychological Distress and Lactation and Breastfeeding Outcomes: a Narrative Review. *Clinical Therapeutics* 44:215–227. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2021.11.007>
13. Kent JC, Gardner H, Geddes DT (2016) Breastmilk Production in the First 4 Weeks after Birth of Term Infants. *Nutrients* 8:756. <https://doi.org/10.3390/nu8120756>

14. Ballard O, Morrow AL (2013) Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors. *Pediatr Clin North Am* 60:49–74. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2012.10.002>
15. Sabir S, Alhawaj AF (2025) Physiology, Breast Milk. In: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL)
16. Norrish I, Sindi A, Sakalidis VS, et al (2023) Relationships between the Intakes of Human Milk Components and Body Composition of Breastfed Infants: A Systematic Review. *Nutrients* 15:2370. <https://doi.org/10.3390/nu15102370>
17. Picciano MF (2001) Nutrient Composition of Human Milk. *Pediatric Clinics of North America* 48:53–67. [https://doi.org/10.1016/S0031-3955\(05\)70285-6](https://doi.org/10.1016/S0031-3955(05)70285-6)
18. George AD, Gay MCL, Wlodek ME, Geddes DT (2021) The importance of infants' lipid intake in human milk research. *Nutr Rev* 79:1353–1361. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuaa141>
19. Gridneva Z, Lai CT, Rea A, et al (2021) Human milk immunomodulatory proteins are related to development of infant body composition during the first year of lactation. *Pediatr Res* 89:911–921. <https://doi.org/10.1038/s41390-020-0961-z>
20. Zhu J, Dingess KA (2019) The Functional Power of the Human Milk Proteome. *Nutrients* 11:1834. <https://doi.org/10.3390/nu11081834>
21. Perrella S, Gridneva Z, Lai CT, et al (2021) Human milk composition promotes optimal infant growth, development and health. *Seminars in Perinatology* 45:151380. <https://doi.org/10.1016/j.semperi.2020.151380>
22. Garofalo R (2010) Cytokines in Human Milk. *The Journal of Pediatrics* 156:S36–S40. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2009.11.019>
23. Ballard O, Morrow AL (2013) Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors. *Pediatr Clin North Am* 60:49–74. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2012.10.002>
24. Witkowska-Zimny M, Kaminska-El-Hassan E (2017) Cells of human breast milk. *Cell Mol Biol Lett* 22:11. <https://doi.org/10.1186/s11658-017-0042-4>
25. Patki S, Kadam S, Chandra V, Bhonde R (2010) Human breast milk is a rich source of multipotent mesenchymal stem cells. *Hum Cell* 23:35–40. <https://doi.org/10.1111/j.1749-0774.2010.00083.x>
26. Sinkiewicz-Darol E, Bernatowicz-Łojko U, Łubiech K, et al (2021) Tandem Breastfeeding: A Descriptive Analysis of the Nutritional Value of Milk When Feeding a Younger and Older Child. *Nutrients* 13:277. <https://doi.org/10.3390/nu13010277>
27. Sinkiewicz-Darol E, Martysiak-Żurowska D, Puta M, et al (2022) Nutrients and Bioactive Components of Human Milk After One Year of Lactation. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 74:284–291. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000003298>

28. Victora CG, Bahl R, Barros AJD, et al (2016) Breastfeeding in the 21st century: epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. *The Lancet* 387:475–490. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01024-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01024-7)
29. da Silva M da CM, Oliveira Assis AM, Pinheiro SMC, et al (2015) Breastfeeding and maternal weight changes during 24 months post-partum: a cohort study. *Maternal & Child Nutrition* 11:780–791. <https://doi.org/10.1111/mcn.12071>
30. Modak A, Ronghe V, Gomase KP The Psychological Benefits of Breastfeeding: Fostering Maternal Well-Being and Child Development. *Cureus* 15:e46730. <https://doi.org/10.7759/cureus.46730>
31. Linde K, Lehnig F, Nagl M, Kersting A (2020) The association between breastfeeding and attachment: A systematic review. *Midwifery* 81:102592. <https://doi.org/10.1016/j.midw.2019.102592>
32. North K, Gao M, Allen G, Lee AC (2022) Breastfeeding in a Global Context: Epidemiology, Impact, and Future Directions. *Clinical Therapeutics* 44:228–244. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2021.11.017>
33. Reniker LN, Frazer LC, Good M (2023) Key biologically active components of breast milk and their beneficial effects. *Seminars in Pediatric Surgery* 32:151306. <https://doi.org/10.1016/j.sempedsurg.2023.151306>
34. Lyons KE, Ryan CA, Dempsey EM, et al (2020) Breast Milk, a Source of Beneficial Microbes and Associated Benefits for Infant Health. *Nutrients* 12:1039. <https://doi.org/10.3390/nu12041039>
35. Modak A, Ronghe V, Gomase KP (2023) The Psychological Benefits of Breastfeeding: Fostering Maternal Well-Being and Child Development. *Cureus* 15:e46730. <https://doi.org/10.7759/cureus.46730>
36. Andreas NJ, Kampmann B, Mehring Le-Doare K (2015) Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early Human Development* 91:629–635. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2015.08.013>
37. Castellote C, Casillas R, Ramírez-Santana C, et al (2011) Premature Delivery Influences the Immunological Composition of Colostrum and Transitional and Mature Human Milk123. *The Journal of Nutrition* 141:1181–1187. <https://doi.org/10.3945/jn.110.133652>
38. C H, H I, M S, et al (2002) Trophic effect of multiple growth factors in amniotic fluid or human milk on cultured human fetal small intestinal cells. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 34:. <https://doi.org/10.1097/00005176-200205000-00010>
39. Reniker LN, Frazer LC, Good M (2023) Key biologically active components of breast milk and their beneficial effects. *Seminars in Pediatric Surgery* 32:151306. <https://doi.org/10.1016/j.sempedsurg.2023.151306>

40. Bardanzellu F, Peroni DG, Fanos V (2020) Human Breast Milk: Bioactive Components, from Stem Cells to Health Outcomes. *Curr Nutr Rep* 9:1–13. <https://doi.org/10.1007/s13668-020-00303-7>
41. Lordan C, Roche AK, Delsing D, et al (2024) Linking human milk oligosaccharide metabolism and early life gut microbiota: bifidobacteria and beyond. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 88:e00094-23. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00094-23>
42. Ward RE, Niñonuevo M, Mills DA, et al (2006) In vitro fermentation of breast milk oligosaccharides by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus gasseri*. *Appl Environ Microbiol* 72:4497–4499. <https://doi.org/10.1128/AEM.02515-05>
43. Dinleyici M, Barbieur J, Dinleyici EC, Vandenplas Y (2023) Functional effects of human milk oligosaccharides (HMOs). *Gut Microbes* 15:2186115. <https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2186115>
44. Duman H, Bechelany M, Karav S (2024) Human Milk Oligosaccharides: Decoding Their Structural Variability, Health Benefits, and the Evolution of Infant Nutrition. *Nutrients* 17:118. <https://doi.org/10.3390/nu17010118>
45. Horta BL, Loret de Mola C, Victora CG (2015) Breastfeeding and intelligence: a systematic review and meta-analysis. *Acta Paediatrica* 104:14–19. <https://doi.org/10.1111/apa.13139>
46. Couto GR, Dias V, Oliveira I de J (2020) Benefits of exclusive breastfeeding: An integrative review. *Nursing Practice Today* 7:245–254. <https://doi.org/10.18502/npt.v7i4.4034>
47. Masi AC, Stewart CJ (2024) Role of breastfeeding in disease prevention. *Microbial Biotechnology* 17:e14520. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14520>
48. Breastfeeding. <https://www.who.int/health-topics/breastfeeding>. Accessed 26 Feb 2026
49. Infant and young child feeding. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/infant-and-young-child-feeding>. Accessed 26 Feb 2026
50. North K, Gao M, Allen G, Lee AC (2022) Breastfeeding in a Global Context: Epidemiology, Impact, and Future Directions. *Clinical Therapeutics* 44:228–244. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2021.11.017>
51. Prentice AM (2022) Breastfeeding in the Modern World. *Ann Nutr Metab* 78:29–38. <https://doi.org/10.1159/000524354>
52. Rozensztrauch A, Klaniewska M, Berghausen-Mazur M (2022) Factors affecting the mother's choice of infant feeding method in Poland: a cross-sectional preliminary study in Poland. *Ir J Med Sci* 191:1735–1743. <https://doi.org/10.1007/s11845-021-02751-8>

53. Królak-Olejek B, Błasiak I, Szczygiał A (2017) Promotion of breastfeeding in Poland: the current situation. *J Int Med Res* 45:1976–1984. <https://doi.org/10.1177/0300060517720318>
54. Udział pokarmu kobiecego w żywieniu dzieci do 2. r.ż. w Polsce na przykładzie województwa kujawsko-pomorskiego. - Standardy Medyczne. In: Udział pokarmu kobiecego w żywieniu dzieci do 2. r.ż. w Polsce na przykładzie województwa kujawsko-pomorskiego. - Standardy medyczne. <https://www.standardy.pl/artykuly/id/324>. Accessed 26 Feb 2026
55. Lyons KE, Shea C-AO', Grimaud G, et al (2022) The human milk microbiome aligns with lactation stage and not birth mode. *Sci Rep* 12:5598. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09009-y>
56. Sinkiewicz-Darol E, Bernatowicz-Łojko U, Łubiech K, et al (2021) Tandem Breastfeeding: A Descriptive Analysis of the Nutritional Value of Milk When Feeding a Younger and Older Child. *Nutrients* 13:277. <https://doi.org/10.3390/nu13010277>
57. Murphy K, Curley D, O'Callaghan TF, et al (2017) The Composition of Human Milk and Infant Faecal Microbiota Over the First Three Months of Life: A Pilot Study. *Sci Rep* 7:40597. <https://doi.org/10.1038/srep40597>
58. Granger CL, Embleton ND, Palmer JM, et al (2021) Maternal breastmilk, infant gut microbiome and the impact on preterm infant health. *Acta Paediatrica* 110:450–457. <https://doi.org/10.1111/apa.15534>
59. Beghetti I, Biagi E, Martini S, et al (2019) Human Milk's Hidden Gift: Implications of the Milk Microbiome for Preterm Infants' Health. *Nutrients* 11:2944. <https://doi.org/10.3390/nu11122944>
60. Fernández L, Langa S, Martín V, et al (2013) The human milk microbiota: Origin and potential roles in health and disease. *Pharmacological Research* 69:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.09.001>
61. Power ML, Muletz-Wolz CR, Bornbusch SL (2024) Microbiome: Mammalian milk microbiomes: sources of diversity, potential functions, and future research directions. *Reproduction and Fertility* 5:. <https://doi.org/10.1530/RAF-23-0056>
62. Vizzari G, Morniroli D, Ceroni F, et al (2021) Human Milk, More Than Simple Nourishment. *Children* 8:863. <https://doi.org/10.3390/children8100863>
63. Rodríguez JM (2014) The Origin of Human Milk Bacteria: Is There a Bacterial Entero-Mammary Pathway during Late Pregnancy and Lactation?1234. *Adv Nutr* 5:779–784. <https://doi.org/10.3945/an.114.007229>
64. Moossavi S, Azad MB (2020) Origins of human milk microbiota: new evidence and arising questions. *Gut Microbes* 12:1667722. <https://doi.org/10.1080/19490976.2019.1667722>

65. Cabrera-Rubio R, Collado MC, Laitinen K, et al (2012) The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery¹²³⁴. *The American Journal of Clinical Nutrition* 96:544–551. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.037382>
66. Cabrera-Rubio R, Mira-Pascual L, Mira A, Collado MC (2016) Impact of mode of delivery on the milk microbiota composition of healthy women. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease* 7:54–60. <https://doi.org/10.1017/S2040174415001397>
67. Notarbartolo V, Giuffrè M, Montante C, et al (2022) Composition of Human Breast Milk Microbiota and Its Role in Children’s Health. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr* 25:194–210. <https://doi.org/10.5223/pghn.2022.25.3.194>
68. Duale A, Singh P, Al Khodor S (2022) Breast Milk: A Meal Worth Having. *Front Nutr* 8:. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.800927>
69. Gonzalez E, Brereton NJB, Li C, et al (2021) Distinct Changes Occur in the Human Breast Milk Microbiome Between Early and Established Lactation in Breastfeeding Guatemalan Mothers. *Front Microbiol* 12:. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.557180>
70. Dinleyici M, Pérez-Brocal V, Arslanoglu S, et al (2024) Composition of Microbiota in Transient and Mature Human Milk: Significant Changes in Large for Gestational Age Group. *Nutrients* 16:208. <https://doi.org/10.3390/nu16020208>
71. Ingram K, Gregg C, Tegge A, et al (2024) Metagenomic assessment of the bacterial breastfeeding microbiome in mature milk across lactation. *Front Pediatr* 11:. <https://doi.org/10.3389/fped.2023.1275436>
72. Boix-Amorós A, Collado MC, Mira A (2016) Relationship between Milk Microbiota, Bacterial Load, Macronutrients, and Human Cells during Lactation. *Front Microbiol* 7:. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00492>
73. Stewart CJ, Ajami NJ, O’Brien JL, et al (2018) Temporal development of the gut microbiome in early childhood from the TEDDY study. *Nature* 562:583–588. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0617-x>
74. Aagaard K, Ma J, Antony KM, et al (2014) The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med* 6:237ra65. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008599>
75. Burcham ZM, Garneau NL, Comstock SS, et al (2020) Patterns of Oral Microbiota Diversity in Adults and Children: A Crowdsourced Population Study. *Sci Rep* 10:2133. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59016-0>
76. Milani C, Duranti S, Bottacini F, et al (2017) The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiol Mol Biol Rev* 81:e00036-17. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00036-17>

77. Arishi RA, Lai CT, Geddes DT, Stinson LF (2023) Impact of breastfeeding and other early-life factors on the development of the oral microbiome. *Front Microbiol* 14:. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1236601>
78. Gomez-Arango LF, Barrett HL, McIntyre HD, et al (2017) Antibiotic treatment at delivery shapes the initial oral microbiome in neonates. *Sci Rep* 7:43481. <https://doi.org/10.1038/srep43481>
79. Tamburini S, Shen N, Wu HC, Clemente JC (2016) The microbiome in early life: implications for health outcomes. *Nat Med* 22:713–722. <https://doi.org/10.1038/nm.4142>
80. Ximenez C, Torres J (2017) Development of Microbiota in Infants and its Role in Maturation of Gut Mucosa and Immune System. *Archives of Medical Research* 48:666–680. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2017.11.007>
81. Azad MB, Konya T, Guttman DS, et al (2014) Impact of cesarean section delivery and breastfeeding on infant gut microbiota at one year of age. *All Asth Clin Immun* 10:A24. <https://doi.org/10.1186/1710-1492-10-S1-A24>
82. Yasmin F, Tun HM, Konya TB, et al (2017) Cesarean Section, Formula Feeding, and Infant Antibiotic Exposure: Separate and Combined Impacts on Gut Microbial Changes in Later Infancy. *Front Pediatr* 5:. <https://doi.org/10.3389/fped.2017.00200>
83. Reyman M, van Houten MA, van Baarle D, et al (2019) Impact of delivery mode-associated gut microbiota dynamics on health in the first year of life. *Nat Commun* 10:4997. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13014-7>
84. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, et al (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* 107:11971–11975. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002601107>
85. Korpela K (2021) Impact of Delivery Mode on Infant Gut Microbiota. *Ann Nutr Metab* 77:11–19. <https://doi.org/10.1159/000518498>
86. Biasucci G, Rubini M, Riboni S, et al (2010) Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut. *Early Human Development* 86:13–15. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2010.01.004>
87. Martin R, Makino H, Yavuz AC, et al (2016) Early-Life Events, Including Mode of Delivery and Type of Feeding, Siblings and Gender, Shape the Developing Gut Microbiota. *PLOS ONE* 11:e0158498. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158498>
88. Gomez de Agüero M, Ganai-Vonarburg SC, Fuhrer T, et al (2016) The maternal microbiota drives early postnatal innate immune development. *Science* 351:1296–1302. <https://doi.org/10.1126/science.aad2571>

89. Hill CJ, Lynch DB, Murphy K, et al (2017) Evolution of gut microbiota composition from birth to 24 weeks in the INFANTMET Cohort. *Microbiome* 5:4. <https://doi.org/10.1186/s40168-016-0213-y>
90. Amir A, Erez-Granat O, Braun T, et al (2022) Gut microbiome development in early childhood is affected by day care attendance. *npj Biofilms Microbiomes* 8:2. <https://doi.org/10.1038/s41522-021-00265-w>
91. Michel C, Blottière HM (2022) Neonatal Programming of Microbiota Composition: A Plausible Idea That Is Not Supported by the Evidence. *Front Microbiol* 13:. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.825942>
92. Pantazi AC, Balasa AL, Mihai CM, et al (2023) Development of Gut Microbiota in the First 1000 Days after Birth and Potential Interventions. *Nutrients* 15:3647. <https://doi.org/10.3390/nu15163647>
93. Kazarina A, Kuzmicka J, Bortkevica S, et al (2023) Oral microbiome variations related to ageing: possible implications beyond oral health. *Arch Microbiol* 205:116. <https://doi.org/10.1007/s00203-023-03464-5>
94. Wernroth M-L, Peura S, Hedman AM, et al (2022) Development of gut microbiota during the first 2 years of life. *Sci Rep* 12:9080. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13009-3>
95. Hill L, Sharma R, Hart L, et al (2021) The neonatal microbiome in utero and beyond. *Journal of Laboratory Medicine*. <https://doi.org/10.1515/labmed-2021-0131>
96. Xiong J, Hu H, Xu C, et al (2022) Development of gut microbiota along with its metabolites of preschool children. *BMC Pediatr* 22:25. <https://doi.org/10.1186/s12887-021-03099-9>
97. Butler CA, Adams GG, Blum J, et al Breastmilk influences development and composition of the oral microbiome. *J Oral Microbiol* 14:2096287. <https://doi.org/10.1080/20002297.2022.2096287>
98. Lara-Villoslada F, Olivares M, Sierra S, et al (2007) Beneficial effects of probiotic bacteria isolated from breast milk. *British Journal of Nutrition* 98:S96–S100. <https://doi.org/10.1017/S0007114507832910>
99. Fusco W, Lorenzo MB, Cintoni M, et al (2023) Short-Chain Fatty-Acid-Producing Bacteria: Key Components of the Human Gut Microbiota. *Nutrients* 15:2211. <https://doi.org/10.3390/nu15092211>
100. Zhang Z, Zhang H, Chen T, et al (2022) Regulatory role of short-chain fatty acids in inflammatory bowel disease. *Cell Commun Signal* 20:64. <https://doi.org/10.1186/s12964-022-00869-5>
101. Pan L-L, Ren Z-N, Yang J, et al (2023) Gut microbiota controls the development of chronic pancreatitis: A critical role of short-chain fatty acids-producing Gram-positive

bacteria. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 13:4202–4216.
<https://doi.org/10.1016/j.apsb.2023.08.002>

102. Xi M, Yan Y, Duan S, et al (2024) Short-chain fatty acids in breast milk and their relationship with the infant gut microbiota. *Front Microbiol* 15:..
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1356462>
103. Liu X-C, Du T-T, Gao X, et al (2022) Gut microbiota and short-chain fatty acids may be new biomarkers for predicting neonatal necrotizing enterocolitis: A pilot study. *Front Microbiol* 13:.. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.969656>
104. Pannaraj PS, Li F, Cerini C, et al (2017) Association Between Breast Milk Bacterial Communities and Establishment and Development of the Infant Gut Microbiome. *JAMA Pediatr* 171:647–654. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2017.0378>
105. Ames SR, Lotoski LC, Azad MB Comparing early life nutritional sources and human milk feeding practices: personalized and dynamic nutrition supports infant gut microbiome development and immune system maturation. *Gut Microbes* 15:2190305. <https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2190305>
106. Tomaszewska A, Jeleniewska A, Porębska K, et al (2023) Immunomodulatory Effect of Infectious Disease of a Breastfed Child on the Cellular Composition of Breast Milk. *Nutrients* 15:3844. <https://doi.org/10.3390/nu15173844>
107. Granger CL, Embleton ND, Palmer JM, et al (2021) Maternal breastmilk, infant gut microbiome and the impact on preterm infant health. *Acta Paediatrica* 110:450–457. <https://doi.org/10.1111/apa.15534>
108. Notarbartolo V, Giuffrè M, Montante C, et al (2022) Composition of Human Breast Milk Microbiota and Its Role in Children’s Health. *Pediatric Gastroenterology, Hepatology & Nutrition* 25:194. <https://doi.org/10.5223/pghn.2022.25.3.194>
109. Oba PM, Holscher HD, Mathai RA, et al (2020) Diet Influences the Oral Microbiota of Infants during the First Six Months of Life. *Nutrients* 12:3400. <https://doi.org/10.3390/nu12113400>
110. Butler CA, Adams GG, Blum J, et al (2022) Breastmilk influences development and composition of the oral microbiome. *Journal of Oral Microbiology* 14:2096287. <https://doi.org/10.1080/20002297.2022.2096287>
111. Holgerson PL, Vestman NR, Claesson R, et al (2013) Oral Microbial Profile Discriminates Breast-fed From Formula-fed Infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 56:127–136. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e31826f2bc6>
112. Li X, Liu Y, Yang X, et al (2022) The Oral Microbiota: Community Composition, Influencing Factors, Pathogenesis, and Interventions. *Front Microbiol* 13:.. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.895537>

113. Embleton ND, Sproat T, Uthaya S, et al (2023) Effect of an Exclusive Human Milk Diet on the Gut Microbiome in Preterm Infants: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Netw Open* 6:e231165. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2023.1165>
114. Inchingolo F, Inchingolo AM, Latini G, et al (2024) Difference in the Intestinal Microbiota between Breastfed Infants and Infants Fed with Artificial Milk: A Systematic Review. *Pathogens* 13:533. <https://doi.org/10.3390/pathogens13070533>
115. Gabrielli O, Zampini L, Galeazzi T, et al (2011) Preterm Milk Oligosaccharides During the First Month of Lactation. *Pediatrics* 128:e1520–e1531. <https://doi.org/10.1542/peds.2011-1206>
116. Bode L (2015) The functional biology of human milk oligosaccharides. *Early Human Development* 91:619–622. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2015.09.001>
117. Bode L (2020) Human Milk Oligosaccharides: Structure and Functions. In: Ogra PL, Walker WA, Lönnerdal B (eds) *Nestlé Nutrition Institute Workshop Series*. S. Karger AG, pp 115–123
118. Plaza-Díaz J, Fontana L, Gil A (2018) Human Milk Oligosaccharides and Immune System Development. *Nutrients* 10:1038. <https://doi.org/10.3390/nu10081038>
119. Andreas NJ, Kampmann B, Mehring Le-Doare K (2015) Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early Human Development* 91:629–635. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2015.08.013>
120. Wiciński M, Sawicka E, Gębalski J, et al (2020) Human Milk Oligosaccharides: Health Benefits, Potential Applications in Infant Formulas, and Pharmacology. *Nutrients* 12:266. <https://doi.org/10.3390/nu12010266>
121. Andreas NJ, Kampmann B, Mehring Le-Doare K (2015) Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early Human Development* 91:629–635. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2015.08.013>
122. Morrow AL, Ruiz-Palacios GM, Altaye M, et al (2004) Human milk oligosaccharides are associated with protection against diarrhea in breast-fed infants. *J Pediatr* 145:297–303. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2004.04.054>
123. Vassilopoulou E, Agostoni C, Feketea G, et al (2024) The Role of Breastfeeding in Acute Respiratory Infections in Infancy. *Pediatr Infect Dis J* 43:1090–1099. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000004454>
124. Bode L (2015) The functional biology of human milk oligosaccharides. *Early Human Development* 91:619–622. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2015.09.001>
125. Eiwegger T, Stahl B, Haidl P, et al (2010) Prebiotic oligosaccharides: In vitro evidence for gastrointestinal epithelial transfer and immunomodulatory properties. *Pediatr Allergy Immunol* 21:1179–1188. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3038.2010.01062.x>

126. Erney RM, Malone WT, Skelding MB, et al (2000) Variability of human milk neutral oligosaccharides in a diverse population. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 30:181–192. <https://doi.org/10.1097/00005176-200002000-00016>
127. Hegar B, Wibowo Y, Basrowi RW, et al (2019) The Role of Two Human Milk Oligosaccharides, 2'-Fucosyllactose and Lacto-N-Neotetraose, in Infant Nutrition. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr* 22:330–340. <https://doi.org/10.5223/pghn.2019.22.4.330>
128. Wang M, Zhao Z, Zhao A, et al (2020) Neutral Human Milk Oligosaccharides Are Associated with Multiple Fixed and Modifiable Maternal and Infant Characteristics. *Nutrients* 12:826. <https://doi.org/10.3390/nu12030826>
129. Smilowitz JT, Lebrilla CB, Mills DA, et al (2014) Breast Milk Oligosaccharides: Structure-Function Relationships in the Neonate. *Annual Review of Nutrition* 34:143–169. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071813-105721>
130. Hirabayashi J (2003) Oligosaccharide microarrays for glycomics. *Trends in Biotechnology* 21:141–143. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(03\)00002-7](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(03)00002-7)
131. Yang Z, Jiang R, Chen Q, et al (2018) Concentration of Lactoferrin in Human Milk and Its Variation during Lactation in Different Chinese Populations. *Nutrients* 10:1235. <https://doi.org/10.3390/nu10091235>
132. Rai D, Adelman AS, Zhuang W, et al (2014) Longitudinal Changes in Lactoferrin Concentrations in Human Milk: A Global Systematic Review,. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 54:1539–1547. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.642422>
133. González-Chávez SA, Arévalo-Gallegos S, Rascón-Cruz Q (2009) Lactoferrin: structure, function and applications. *International Journal of Antimicrobial Agents* 33:301.e1-301.e8. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.07.020>
134. Oberčkal J, Liaqat H, Matijašić BB, et al (2023) Quantification of lactoferrin in human milk using monolithic cation exchange HPLC. *Journal of Chromatography B* 1214:123548. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2022.123548>
135. Elzoghby AO, Abdelmoneem MA, Hassanin IA, et al (2020) Lactoferrin, a multi-functional glycoprotein: Active therapeutic, drug nanocarrier & targeting ligand. *Biomaterials* 263:120355. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120355>
136. Elzoghby AO, Abdelmoneem MA, Hassanin IA, et al (2020) Lactoferrin, a multi-functional glycoprotein: Active therapeutic, drug nanocarrier & targeting ligand. *Biomaterials* 263:120355. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120355>
137. González-Chávez SA, Arévalo-Gallegos S, Rascón-Cruz Q (2009) Lactoferrin: structure, function and applications. *International Journal of Antimicrobial Agents* 33:301.e1-301.e8. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.07.020>

138. Mastromarino P, Capobianco D, Campagna G, et al (2014) Correlation between lactoferrin and beneficial microbiota in breast milk and infant's feces. *Biometals* 27:1077–1086. <https://doi.org/10.1007/s10534-014-9762-3>
139. Pammi M, Suresh G (2017) Enteral lactoferrin supplementation for prevention of sepsis and necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* 6:CD007137. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007137.pub5>
140. Kulesza-Brończyk B, Bień A, Sobieraj P, et al (2023) Factors affecting total protein and lactoferrin in human milk. *Sci Rep* 13:22434. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-50124-1>
141. Czosnykowska-Łukacka M, Orczyk-Pawitowicz M, Broers B, Królak-Olejek B (2019) Lactoferrin in human milk of prolonged lactation. *Nutrients* 11:. <https://doi.org/10.3390/nu11102350>
142. Lagier J-C, Edouard S, Pagnier I, et al (2015) Current and Past Strategies for Bacterial Culture in Clinical Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews* 28:208–236. <https://doi.org/10.1128/cmr.00110-14>
143. Whitfield NN, Martinez RM, Wolk DM (2016) Clinical Microbiology. In: *Manual of Commercial Methods in Clinical Microbiology*. pp 438–472
144. Elbehiry A, Aldubaib M, Abalkhail A, et al (2022) How MALDI-TOF Mass Spectrometry Technology Contributes to Microbial Infection Control in Healthcare Settings. *Vaccines* 10:1881. <https://doi.org/10.3390/vaccines10111881>
145. Li D, Yi J, Han G, Qiao L (2022) MALDI-TOF Mass Spectrometry in Clinical Analysis and Research. *ACS Meas Sci Au* 2:385–404. <https://doi.org/10.1021/acsmeasuresciau.2c00019>
146. Lasch P, Beyer W, Bosch A, et al (2025) A MALDI-ToF mass spectrometry database for identification and classification of highly pathogenic bacteria. *Sci Data* 12:187. <https://doi.org/10.1038/s41597-025-04504-z>
147. Arbefeveille SS, Timbrook TT, Garner CD (2024) Evolving strategies in microbe identification—a comprehensive review of biochemical, MALDI-TOF MS and molecular testing methods. *J Antimicrob Chemother* 79:i2–i8. <https://doi.org/10.1093/jac/dkae275>
148. Jarzynka S, Spott R, Tchatchiashvili T, et al (2022) Human Milk Oligosaccharides Exhibit Biofilm Eradication Activity Against Matured Biofilms Formed by Different Pathogen Species. *Front Microbiol* 12:. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.794441>
149. Remoroza CA, Mak TD, De Leoz MLA, et al (2018) Creating a Mass Spectral Reference Library for Oligosaccharides in Human Milk. *Anal Chem* 90:8977–8988. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b01176>

150. Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Royal Statistical Society Journal Series B: Methodological* 57:289–300. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x>
151. Holm S (1979) A Simple Sequentially Rejective Multiple Test Procedure. *Scandinavian Journal of Statistics* 6:65–70
152. SHAPIRO SS, WILK MB (1965) An analysis of variance test for normality (complete samples)[†]. *Biometrika* 52:591–611. <https://doi.org/10.1093/biomet/52.3-4.591>
153. Bray JR, Curtis JT (1957) An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. *Ecological Monographs* 27:325–349. <https://doi.org/10.2307/1942268>
154. GOWER JC (1966) Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. *Biometrika* 53:325–338. <https://doi.org/10.1093/biomet/53.3-4.325>
155. Anderson MJ (2001) A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology* 26:32–46. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.2001.01070.pp.x>
156. Spearman C (1904) The proof and measurement of association between two things. *The American Journal of Psychology* 15:72–101. <https://doi.org/10.2307/1412159>
157. Cheema SK, Li R, Cameron SJS (2023) Culturomics as a tool to better understand the human milk microbiota and host–microbiota interactions. *Microb Host* 1:e230001. <https://doi.org/10.1530/MAH-23-0001>
158. Kim SY, Yi DY (2020) Components of human breast milk: from macronutrient to microbiome and microRNA. *Clin Exp Pediatr* 63:301–309. <https://doi.org/10.3345/cep.2020.00059>
159. Koynova-Tenchov R (2026) The human breast milk microbiome: a landscape review of its composition, origins, and impact on infant health. *Arch Microbiol* 208:452. <https://doi.org/10.1007/s00203-026-05010-5>
160. Jost T, Lacroix C, Braegger C, Chassard C (2013) Assessment of bacterial diversity in breast milk using culture-dependent and culture-independent approaches. *British Journal of Nutrition* 110:1253–1262. <https://doi.org/10.1017/S0007114513000597>
161. Damaceno QS, Souza JP, Nicoli JR, et al (2017) Evaluation of Potential Probiotics Isolated from Human Milk and Colostrum. *Probiotics & Antimicro Prot* 9:371–379. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9270-1>
162. Boix-Amorós A, Collado MC, Mira A (2016) Relationship between Milk Microbiota, Bacterial Load, Macronutrients, and Human Cells during Lactation. *Front Microbiol* 7:. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00492>

163. Selma-Royo M, Calvo-Lerma J, Bäuerl C, et al (2022) Human milk microbiota: what did we learn in the last 20 years? *Microbiome Res Rep* 1:19. <https://doi.org/10.20517/mrr.2022.05>
164. Selma-Royo M, Calvo Lerma J, Cortés-Macías E, Collado MC (2021) Human milk microbiome: From actual knowledge to future perspective. *Semin Perinatol* 45:151450. <https://doi.org/10.1016/j.semperi.2021.151450>
165. Lopez Leyva L, Brereton NJB, Koski KG (2020) Emerging frontiers in human milk microbiome research and suggested primers for 16S rRNA gene analysis. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 19:121–133. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.11.057>
166. Zimmermann P, Curtis N (2020) Breast milk microbiota: A review of the factors that influence composition. *J Infect* 81:17–47. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.01.023>
167. Singh P, Al Mohannadi N, Murugesan S, et al (2023) Unveiling the dynamics of the breast milk microbiome: impact of lactation stage and gestational age. *J Transl Med* 21:784. <https://doi.org/10.1186/s12967-023-04656-9>
168. Mollova D, Baev V, Borisova T, et al (2026) A Metagenomic Comparison of the Colostrum Microbiome in Bulgarian Mothers by Delivery Mode: A Pilot Study. *Microorganisms* 14:184. <https://doi.org/10.3390/microorganisms14010184>
169. LaTuga MS, Stuebe A, Seed PC (2014) A Review of the Source and Function of Microbiota in Breast Milk. *Semin Reprod Med* 32:68–73. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1361824>
170. Sakwinska O, Moine D, Delley M, et al (2016) Microbiota in Breast Milk of Chinese Lactating Mothers. *PLOS ONE* 11:e0160856. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160856>
171. Jost T, Lacroix C, Braegger C, Chassard C (2013) Assessment of bacterial diversity in breast milk using culture-dependent and culture-independent approaches. *British Journal of Nutrition* 110:1253–1262. <https://doi.org/10.1017/S0007114513000597>
172. Fitzstevens JL, Smith KC, Hagadorn JI, et al (2017) Systematic Review of the Human Milk Microbiota. *Nutrition in Clinical Practice* 32:354–364. <https://doi.org/10.1177/0884533616670150>
173. Moossavi S, Azad MB Origins of human milk microbiota: new evidence and arising questions. *Gut Microbes* 12:1667722. <https://doi.org/10.1080/19490976.2019.1667722>
174. Moossavi S, Sepehri S, Robertson B, et al (2019) Composition and Variation of the Human Milk Microbiota Are Influenced by Maternal and Early-Life Factors. *Cell Host Microbe* 25:324–335.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.01.011>

175. Biagi E, Quercia S, Aceti A, et al (2017) The Bacterial Ecosystem of Mother's Milk and Infant's Mouth and Gut. *Front Microbiol* 8:. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01214>
176. Dahl C, Stigum H, Valeur J, et al (2018) Preterm infants have distinct microbiomes not explained by mode of delivery, breastfeeding duration or antibiotic exposure. *Int J Epidemiol* 47:1658–1669. <https://doi.org/10.1093/ije/dyy064>
177. Biagi E, Aceti A, Quercia S, et al (2018) Microbial Community Dynamics in Mother's Milk and Infant's Mouth and Gut in Moderately Preterm Infants. *Front Microbiol* 9:. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02512>
178. Pannaraj PS, Li F, Cerini C, et al (2017) Association Between Breast Milk Bacterial Communities and Establishment and Development of the Infant Gut Microbiome. *JAMA Pediatr* 171:647–654. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2017.0378>
179. Sinkiewicz G, Ljunggren L (2008) Occurrence of *Lactobacillus reuteri* in human breast milk. *Microbial Ecology in Health and Disease* 20:122–126. <https://doi.org/10.1080/08910600802341007>
180. Soto A, Martín V, Jiménez E, et al (2014) Lactobacilli and Bifidobacteria in Human Breast Milk. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 59:78–88. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000000347>
181. Łubiech K, Twarużek M (2021) *Lactobacillus* Bacteria in Breast Milk. *The FASEB Journal* 35:. <https://doi.org/10.1096/fasebj.2021.35.S1.05200>
182. Thum C, Wall CR, Weiss GA, et al (2021) Changes in HMO Concentrations throughout Lactation: Influencing Factors, Health Effects and Opportunities. *Nutrients* 13:2272. <https://doi.org/10.3390/nu13072272>
183. Samuel TM, Binia A, de Castro CA, et al (2019) Impact of maternal characteristics on human milk oligosaccharide composition over the first 4 months of lactation in a cohort of healthy European mothers. *Sci Rep* 9:11767. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48337-4>
184. Dinleyici M, Barbieur J, Dinleyici EC, Vandenplas Y Functional effects of human milk oligosaccharides (HMOs). *Gut Microbes* 15:2186115. <https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2186115>
185. Spevacek AR, Smilowitz JT, Chin EL, et al (2015) Infant Maturity at Birth Reveals Minor Differences in the Maternal Milk Metabolome in the First Month of Lactation1, 2, 3. *The Journal of Nutrition* 145:1698–1708. <https://doi.org/10.3945/jn.115.210252>
186. Kulesza-Brończyk B, Bień A, Sobieraj P, et al (2023) Factors affecting total protein and lactoferrin in human milk. *Sci Rep* 13:22434. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-50124-1>

187. Rai D, Adelman AS, Zhuang W, et al (2014) Longitudinal Changes in Lactoferrin Concentrations in Human Milk: A Global Systematic Review,. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 54:1539–1547. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.642422>
188. Czosnykowska-Łukacka M, Orczyk-Pawłowicz M, Broers B, Królak-Olejniak B (2019) Lactoferrin in Human Milk of Prolonged Lactation. *Nutrients* 11:2350. <https://doi.org/10.3390/nu11102350>
189. Sinkiewicz-Darol E, Martysiak-Żurowska D, Puta M, et al (2022) Nutrients and Bioactive Components of Human Milk After One Year of Lactation. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 74:284–291. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000003298>
190. Rios-Leyvraz M, Yao Q (2023) The Volume of Breast Milk Intake in Infants and Young Children: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Breastfeeding Medicine* 18:188–197. <https://doi.org/10.1089/bfm.2022.0281>
191. Tzani A, Xixi NA, Sokou R, et al (2025) Factors Influencing the Colostrum’s Microbiota: A Systematic Review of the Literature. *Children* 12:1336. <https://doi.org/10.3390/children12101336>
192. Aakko J, Kumar H, Rautava S, et al (2017) Human milk oligosaccharide categories define the microbiota composition in human colostrum. *Beneficial Microbes* 8:563–568. <https://doi.org/10.3920/BM2016.0185>
193. Seferovic MD, Mohammad M, Pace RM, et al (2020) Maternal diet alters human milk oligosaccharide composition with implications for the milk metagenome. *Sci Rep* 10:22092. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79022-6>
194. Ge H, Zhu W, Zhang J, et al (2024) Human milk microbiota and oligosaccharides in colostrum and mature milk: comparison and correlation. *Front Nutr* 11:. <https://doi.org/10.3389/fnut.2024.1512700>
195. Ge H, Zhu W, Zhang J, et al (2024) Human milk microbiota and oligosaccharides in colostrum and mature milk: comparison and correlation. *Front Nutr* 11:. <https://doi.org/10.3389/fnut.2024.1512700>
196. Rigauts C, Aizawa J, Taylor SL, et al (2022) *Rothia mucilaginosa* is an anti-inflammatory bacterium in the respiratory tract of patients with chronic lung disease. *Eur Respir J* 59:2101293. <https://doi.org/10.1183/13993003.01293-2021>
197. Ito M, Tanaka M, Date M, et al (2025) Immunological Factors and Macronutrient Content in Human Milk From Women With Subclinical Mastitis. *J Hum Lact* 41:26–33. <https://doi.org/10.1177/08903344241297585>
198. Mastromarino P, Capobianco D, Campagna G, et al (2014) Correlation between lactoferrin and beneficial microbiota in breast milk and infant’s feces. *Biometals* 27:1077–1086. <https://doi.org/10.1007/s10534-014-9762-3>

199. Cabrera-Rubio R, Collado MC, Laitinen K, et al (2012) The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *Am J Clin Nutr* 96:544–551. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.037382>
200. Khodayar-Pardo P, Mira-Pascual L, Collado MC, Martínez-Costa C (2014) Impact of lactation stage, gestational age and mode of delivery on breast milk microbiota. *J Perinatol* 34:599–605. <https://doi.org/10.1038/jp.2014.47>
201. Cabrera-Rubio R, Mira-Pascual L, Mira A, Collado MC (2016) Impact of mode of delivery on the milk microbiota composition of healthy women. *J Dev Orig Health Dis* 7:54–60. <https://doi.org/10.1017/S2040174415001397>
202. Toscano M, De Grandi R, Peroni DG, et al (2017) Impact of delivery mode on the colostrum microbiota composition. *BMC Microbiol* 17:205. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1109-0>
203. Urbaniak C, Angelini M, Gloor GB, Reid G (2016) Human milk microbiota profiles in relation to birthing method, gestation and infant gender. *Microbiome* 4:1. <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0145-y>
204. Lyons KE, Shea C-AO', Grimaud G, et al (2022) The human milk microbiome aligns with lactation stage and not birth mode. *Sci Rep* 12:5598. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09009-y>
205. Xu R, Gridneva Z, Payne MS, et al (2025) Longitudinal Profiling of the Human Milk Microbiome from Birth to 12 Months Reveals Overall Stability and Selective Taxa-Level Variation. *Microorganisms* 13:1830. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13081830>
206. Padilha M, Brejnrod A, Danneskiold-Samsøe NB, et al (2020) Response of the Human Milk Microbiota to a Maternal Prebiotic Intervention Is Individual and Influenced by Maternal Age. *Nutrients* 12:1081. <https://doi.org/10.3390/nu12041081>
207. Azad MB, Robertson B, Atakora F, et al (2018) 'Human Milk Oligosaccharide Concentrations Are Associated with Multiple Fixed and Modifiable Maternal Characteristics, Environmental Factors, and Feeding Practices. *The Journal of Nutrition* 148:1733–1742. <https://doi.org/10.1093/jn/nxy175>
208. Cai X, Duan Y, Li Y, et al (2018) Lactoferrin level in breast milk: a study of 248 samples from eight regions in China. *Food Funct* 9:4216–4222. <https://doi.org/10.1039/c7fo01559c>
209. Kulesza-Brończyk B, Bień A, Sobieraj P, et al (2023) Factors affecting total protein and lactoferrin in human milk. *Sci Rep* 13:22434. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-50124-1>
210. Cabrera-Rubio R, Collado MC, Laitinen K, et al (2012) The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *Am J Clin Nutr* 96:544–551. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.037382>

211. Wang M, Zhao Z, Zhao A, et al (2020) Neutral Human Milk Oligosaccharides Are Associated with Multiple Fixed and Modifiable Maternal and Infant Characteristics. *Nutrients* 12:826. <https://doi.org/10.3390/nu12030826>

15 ZAŁĄCZNIKI

15.1 Wniosek i zgoda Komisji Bioetycznej

Załącznik do zarządzenia nr 4 Rektora UMK
z dnia 14 stycznia 2014 r.

Nr wniosku UNIWERSYTEU MIKOŁAJA KOPERNIKA W TORUNIU
(wypełnia Komisja Bioetyczna Uniwersytetu) w Bydgoszczy
SEKRETARIAT KOMISJI BIOETYCZNEJ UMK
przy Collegium Medicum

2021-03-03

Data złożenia wniosku

Data wpływu

L.dz./KB

WNIOSEK
do Komisji Bioetycznej
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu
przy Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy
o zgodę na prowadzenie eksperymentu medycznego / badania naukowego

Wniosek należy złożyć do Sekretariatu Komisji co najmniej 2 tygodnie przed planowanym posiedzeniem Komisji.

1. Charakter badań: eksperyment leczniczy ☐, eksperyment badawczy ☐, inne ☒

2. Jednostka organizacyjna (w badaniach wieloosrodkowych wymienić wszystkie ośrodki):

¹Katedra Fizjologii i Toksykologii, Wydział Nauk Biologicznych

²Oddział Kliniczny Położnictwa, Chorób Kobięcych i Ginekologii Onkologicznej
Wojewódzkiego Szpitala Zespolonego im. L. Rydygiera w Toruniu

3. Kierownik samodzielnej jednostki organizacyjnej:

¹prof. dr hab. inż. Jan Grajewski

²lek. med. Waldemar Didkowski

4. Kierownik tematu badawczego (imię, nazwisko, tytuł i stopień naukowy, specjalizacja, telefon i/lub e-mail kontaktowy):

dr hab. Magdalena Twarużek, prof. Uczelni

tel. 52 34 19 193 twarmag@ukw.edu.pl

5. Członkowie zespołu badawczego (imiona, nazwiska, tytuły i stopnie naukowe, specjalizacje, stanowiska służbowe) ze wskazaniem osoby odpowiedzialnej za gromadzenie i przechowywanie dokumentacji badania:

dr hab. Magdalena Twarużek, prof. nadzw. UKW

prof. dr hab. inż. Jan Grajewski – kierownik Katedry Fizjologii i Toksykologii UKW

mgr Iwona Adamczyk - doktorantka w Katedrze Fizjologii i Toksykologii UKW osoba odpowiedzialna za gromadzenie i przechowywanie dokumentacji badania

dr n. med. Elena Sinkiewicz-Darol - biotechnolog, Kierownik Banku Mleka Kobięcego
Wojewódzkiego Szpitala Zespolonego im. L. Rydygiera w Toruniu

lek. wet. Katarzyna Łubiech – asystent badawczo-dydaktyczny, doktorantka w Katedrze
Fizjologii i Toksykologii UKW

lek. med. Waldemar Didkowski - koordynator Oddziału Klinicznego Położnictwa, Chorób
Kobięcych i Ginekologii Onkologicznej Wojewódzkiego Szpitala Zespolonego
im. L. Rydygiera w Toruniu

lek. med. Ewa Chodakowska - lekarz neonatolog, koordynator Oddziału Noworodków
i Intensywnej Terapii Neonatologicznej Wojewódzkiego Szpitala Zespolonego
im. L. Rydygiera w Toruniu

lek. med. Urszula Bernatowicz-Łojko - lekarz neonatolog, Konsultant Kliniczny Banku Mleka Kobięcego Wojewódzkiego Szpitala Zespolonego im. L. Rydygiera w Toruniu
mgr Katarzyna Kaczmarek - położna, doradca laktacyjny w Banku Mleka Kobięcego Wojewódzkiego Szpitala Zespolonego im. L. Rydygiera w Toruniu

6. Temat badań:

Mikrobiota matki a niemowlęcia - identyfikacja, korelacja, cytotoxycznosc.

7. Miejsce prowadzenia badań:

¹ Katedra Fizjologii i Toksykologii, Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy

² Oddział Kliniczny Położnictwa, Chorób Kobięcych i Ginekologii Onkologicznej Wojewódzkiego Szpitala Zespolonego im. L. Rydygiera w Toruniu

³ Oddział Noworodków i Intensywnej Terapii Neonatologicznej Wojewódzkiego Szpitala Zespolonego im. L. Rydygiera w Toruniu

8. Okres badań:

marzec 2021- grudzień 2023r.

9. Informacje o badaniach:

Mikrobiota jest caloscią mikroorganizmów występujących na danym organizmie. Są fizjologicznym i koniecznym elementem prawidłowo funkcjonującego organizmu. Na mikrobiom składają się bakterie, grzyby, pierwotniaki i wirusy. Wpływ mikrobiomu na organizm człowieka ma istotne znaczenie dla budowy odpowiedzi immunologicznej, produkcji witamin, hormonów czy neuroprzekazników, co niewątpliwie oddziałuje na funkcjonowanie i zdrowie. Drobnoustroje zasiedlające ciało człowieka w sprzyjających warunkach mogą stać się źródłem zakażeń, dlatego niezwykle ważna jest równowaga mikrobiomu nie tylko w jelitach, ale w całym ciele, co wpływa korzystnie i chroni przed chorobami. Pierwsze zasiedlenie człowieka drobnoustrojami ma miejsce już w czasie życia płodowego, lecz szczególnym, wręcz kluczowym momentem budującym prawidłową mikrobiotę jest poród i okres okołoporodowy (w tym karmienie piersią), choć na ostateczny całokształt mikrobiomu dziecka ma wpływ więcej czynników, m.in. dieta matki, stosowanie antybiotyków przez matkę, czynniki środowiskowe czy nawet szerokość geograficzna. W zależności od przebiegu porodu, sposobu karmienia w pierwszych dniach życia noworodka skolonizują drobnoustroje, z którymi dziecko będzie miało kontakt, co może być istotnym elementem kształtowania mikrobioty w dalszym życiu dziecka. Jak do tej pory nie ma polskich badań dotyczących składu mikrobioty w mleku kobiecym oraz jamy ustnej i kału dziecka tejże matki, a także wpływu porodu, sposobu karmienia czy kontaktu skóra do skóry na mikrobiom dziecka. Celem badania będzie zbadanie mikrobioty mleka kobiecego w pierwszych dniach po porodzie oraz skorelowanie z mikrobiotą jamy ustnej i kału dziecka.

Sugeruje się, by informacje o badaniach podać wg następujących punktów:

1) założenia badań:

- a) określić czy badania wnoszą bezpośrednią korzyść dla zdrowia leczonego, a jeżeli tak to jaką,

Badanie nie wnosi bezpośredniej korzyści dla uczestników badania.

- b) uzasadnić nieskuteczność lub małą skuteczność dotychczas stosowanych metod bądź procedur medycznych oraz podać informacje na temat wyników wcześniej prowadzonych w tym zakresie badań,

W zaplanowanym badaniu będą pobrane próbki mleka od matek oraz wymaz z jamy ustnej dziecka tejże matki oraz próbki kału dziecka, po czym materiał biologiczny będzie poddany hodowli mikrobiologicznej na odpowiednich podłożach mikrobiologicznych, po czym inkubowany. Identyfikacja mikrobiomu mleka kobiecego oraz jamy jamy ustnej i kału dziecka ustnej noworodka prowadzona będzie za pomocą nowatorskiej metody spektrometrii mas – MALDI – TOF MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry*). Aktualnie jest to najdokładniejsza oraz najszybsza automatyczna metoda analizy drobnoustrojów umożliwiającą precyzyjną identyfikację do gatunku pojedynczej kolonii bez konieczności namnażania bakterii. Dotychczas pojawiło się niewiele publikacji z zastosowaniem identyfikacji za pomocą technologii spektrometrii mas, jak również nie zostały opublikowane żadne tego typu badania prowadzone na terenie Polski w populacji polskich kobiet i ich dzieci.

c) podać w jakim zakresie wykonane badanie wpłynie na rozszerzenie wiedzy medycznej w przedmiotowym temacie,

Mikrobiom organizmu ludzkiego, jego kształtowanie, funkcjonowanie, wpływ zmian jest jeszcze słabo poznany, ale szeroko badanym zagadnieniem w świecie naukowym. Zbadanie struktury mikrobiomu mleka kobiecego oraz noworodków i małych dzieci w populacji polskich kobiet może przynieść nowe informacje. Zaplanowane badania dotyczące identyfikacji składu mikrobiomu na różnych etapach po porodzie w mleku matki oraz u ich dzieci pozwolą przeanalizować zmiany w składzie mikrobiomu zachodzące w czasie oraz korelacje pomiędzy mikrobiomem matki i dziecka. W momencie pobierania materiału zostanie przeprowadzony wywiad ankietowy z matką, gdzie zostaną uwzględnione czynniki środowiskowe, leki, przebieg ciąży czy stan zdrowia matki i dziecka. Zebrane dane przyczynią się do rozszerzenia wiedzy na temat składu mikrobioty oraz czynników wpływających na jej skład. Skład mikrobioty ściśle związany jest z ogólnym stanem zdrowia człowieka. Pojawia się coraz więcej doniesień wskazujących na mikrobiom jako czynnik ryzyka chorób oraz predyktor stanu zdrowia organizmu. Dlatego ważne jest poznanie i określenie składu mikrobioty, zwłaszcza u tak szczególnej grupy badanej jak noworodki i niemowlęta oraz mleko ich matek. Dotychczas nie opublikowano badań z Polski z tego zakresu.

d) ocenić stopień ryzyka osób biorących udział w eksperymencie medycznym,

Nie ma ryzyka dla osób biorących udział w badaniu.

e) podać korzyści płynące z proponowanego eksperymentu medycznego i określić czy możliwe do osiągnięcia korzyści z przeprowadzonego eksperymentu nie pozostają w dysproporcji do ponoszonego przez badanego ryzyka,

Materiałem do badania będzie próbka mleka kobiecego w objętości około 1ml oraz wymaz z jamy ustnej oraz próbka kału dziecka. Materiał ten zostanie pobrany w sposób nieinwazyjny, przez wykwalifikowany personel medyczny, od osób których stan zdrowia pozwoli na przeprowadzenie rozmowy i ankiety. Pobranie próbki mleka od kobiet nie wpłynie w żaden sposób na przebieg laktacji oraz stan odżywienia dziecka. Zatem uczestnicy badania nie ryzykują biorąc udział w badaniu, a zebrane dane mogą się istotnie przyczynić do rozwoju wiedzy z obszaru mikrobioty.

f) w odniesieniu do osób małoletnich podać przyczyny odstąpienia od prowadzenia eksperymentu badawczego z udziałem osoby posiadającej pełną zdolność do czynności prawnych,

Badanie zakłada ocenę zmian i kształtowanie się mikrobioty, wpływu czynników środowiskowych mleka kobiecego i dziecka karmionego pokarmem kobiecym. W związku

z tym badanie będzie dotyczyło osób pełnoletnich – kobiet, które wyrażą świadomą zgodę na udział w badaniu oraz ich dzieci, noworodków i niemowląt, bez których założone cele badania nie mogłyby być zrealizowane. Materiał będzie pobrany w sposób nie inwazyjny, za zgodą i w obecności matki.

- g) złożyć oświadczenie, że osoby uczestniczące w eksperymencie badawczym nie są ubezwłasnowolnione, nie są żołnierzami służby zasadniczej, nie są osobami pozbawionymi wolności, nie pozostają w zależności służbowej lub innej z prowadzącym badanie;

Oświadczam, że osoby uczestniczące w eksperymencie badawczym nie są ubezwłasnowolnione, nie są żołnierzami służby zasadniczej, nie są osobami pozbawionymi wolności, nie pozostają w zależności służbowej lub innej z prowadzącym badanie.

- 2) podać szczegółowo metodykę badań (w przypadku badań ankietowych należy podać czy jest to badanie anonimowe czy za zgodą badanego itp.)

UWAGA: W badaniach anonimowych należy wykazać, w jaki sposób zapewnione będzie w pełni anonimowe rozprowadzanie i gromadzenie ankiet.

Całe badanie złożone jest z 3 etapów. Pierwszym etapem będzie rekrutacja pary matka-dziecko i pobranie materiału do badania, czyli próbka mleka od matki z możliwością odciągnięcia 1-2ml mleka, wymaz z jamy ustnej dziecka oraz próbka kału dziecka, a także wywiad ankietowy z matką. Wywiad będzie obejmował informacje dotyczące przebiegu ciąży, przyrostu masy ciała kobiety w czasie ciąży, diagnostyki cukrzycy ciążowej zaburzeń hormonalnych, a także czynników środowiskowych mających wpływ na mikrobiotę (np. BMI, dieta, przyjmowane leki), czasu hospitalizacji przed porodem, przebiegu porodu, antybiotykoterapii w trakcie ciąży oraz porodu, stanu zdrowia matki i dziecka po porodzie. Każdy ze wskazanych materiałów biologicznych można pozyskać nieinwazyjnie, bez przerywania ciągłości skóry czy błon śluzowych. Odciągnięcie wskazanej objętości mleka na żadnym z etapów laktacji nie wpłynie na przebieg laktacji ani nie spowoduje braków żywieniowych u dziecka. Materiał zostanie pobrany przez wykwalifikowany personel medyczny, po poinformowaniu matki na czym badanie będzie polegać oraz po uzyskaniu świadomej zgody przez matkę na pobranie materiału od niej oraz od jej dziecka. Aby zminimalizować wpływ czynników środowiskowych pierwsze pobranie materiału zostanie zrealizowany podczas pobytu położnicy w szpitalu - Oddział Kliniczny Położnictwa, Chorób Kobiety i Ginekologii Onkologicznej Wojewódzkiego Szpitala Zespołowego im. L. Rydygiera w Toruniu. Po miesiącu od hospitalizacji zostanie podjęta próba ponownego kontaktu z matką, w celu zebrania wywiadu ankietowego oceniającego stan zdrowie matki i dziecka, a jeśli sytuacja epidemiczna na to pozwoli także spotkanie z matką i dzieckiem w celu pobrania dodatkowej próbek materiału badanego. Jeśli będzie taka możliwość i zgoda matki, takie spotkanie w warunkach domowych miałyby miejsce dwa razy, po miesiącu oraz dwóch miesiącach od wyjścia matki ze szpitala.

Drugim etapem będzie wykonanie posiewu mikrobiologicznego zebranego materiału na podłoża mikrobiologiczne – agar z krwią baranią, MacConkey'a, Sabourauda, MRS, MYP. Podłoża te umożliwiają wzrost większość drobnoustrojów powszechnych w środowisku człowieka, jak również tych bardziej wymagających, jak *Lactobacillus spp.* czy *Bacillus cereus*. Po posiewie materiału biologicznego, podłoża będą inkubowane przez 24-72h w warunkach tlenowych i beztlenowych w zależności od podłoża i wymagań badanych drobnoustrojów. W ten sposób wyhodowane drobnoustroje będą identyfikowane bezpośrednio z podłoża metodą automatyczną z zastosowaniem analizatora MALDI – TOF MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry*). Trzecim etapem projektu będzie zbadanie wpływu, właściwości niektórych szczepów drobnoustrojów na określone linie komórkowe adekwatne do profilu badań. Linie komórkowe będą poddane standardowej hodowli w warunkach laboratoryjnych- podwyższona wilgotność

atmosfery oraz stężenia CO₂ do 5%, oraz temperatura 34-37°C w zależności od linii komórkowej.

Zebrane dane poddane zostaną analizie statystycznej i skorelowane z danymi zebranymi w kwestionariuszu.

- 3) podać czy badania prowadzone są na: zdrowych, chorych, dzieciach, kobietach ciężarnych;

Badanie przeprowadzone będzie na zdrowych kobietach po porodzie oraz ich dzieciach, których stan zdrowia pozwoli na przeprowadzeniu wywiadu ankietowego oraz pobranie próbek materiału do badania.

- 4) określić liczebność grupy badanej;

Do badania zostanie zebrany materiał od około 150 par matka-dziecko.

- 5) podać dane odnośnie grupy kontrolnej;

Nie dotyczy.

- 6) podać sposób rekrutacji uczestników badania.

Ochotnicy do badania będą rekrutowane w czasie hospitalizacji na Oddziale Klinicznym Położnictwa, Chorób Kobietych i Ginekologii Onkologiczne Wojewódzkiego Szpitala Zespolonego w Toruniu.

10. Wzór informacji dla uczestnika badania powinien zawierać:

informacje o celu, sposobach i warunkach przeprowadzenia eksperymentu, spodziewanych korzyściach leczniczych i poznawczych, ryzyku i możliwości wystąpienia ewentualnych powikłań, jak i o warunkach ubezpieczenia. Uczestnik badania powinien być poinformowany o możliwości rezygnacji z uczestnictwa na każdym etapie badania. Jednak w przypadku, gdyby natychmiastowe przerwanie eksperymentu mogło spowodować niebezpieczeństwo dla życia lub zdrowia uczestnika badania badacz prowadzący badanie ma obowiązek poinformować go o tym fakcie. O ile badanie nie jest anonimowe, informacja dla uczestnika badania powinna zawierać datę oraz podpis badanego.

11. Wzór zgody na udział w badaniu powinien zawierać:

- 1) miejsce na czytelne wpisanie imienia i nazwiska osoby badanej;
- 2) świadomą dobrowolną zgodę uczestnika badania na udział w eksperymentcie;
- 3) potwierdzenie możliwości zadawania pytań prowadzącemu eksperyment lub badanie i otrzymania odpowiedzi na te pytania;
- 4) informację o możliwości odstąpienia od udziału w eksperymentcie lub badaniu w każdym jego stadium;
- 5) akceptację warunków ubezpieczenia oraz zgodę, w formie oświadczenia, na przetwarzanie przez osobę lub podmiot przeprowadzający eksperyment medyczny danych związanych z udziałem w badaniu;
- 6) numer historii choroby, w przypadku gdy eksperyment prowadzony jest w zakładzie opieki zdrowotnej;
- 7) miejscowość i datę;
- 8) podpis badanego i jego adres.

W przypadku, gdyby zachodziła możliwość identyfikacji osoby biorącej udział w eksperymentcie, uczestnik badania winien wyrazić również zgodę na ujawnienie tego faktu.

UWAGA: Zgody na udział w badaniu nie stosuje się w badaniach anonimowych.

12. Jednostki organizacyjne Uniwersytetu uprawnione do wykonywania badań sponsorowanych przez firmy farmaceutyczne mogą prowadzić badania wyłącznie po zawarciu umowy pomiędzy zlecającym badanie a odpowiednim zakładem opieki zdrowotnej i dodatkowo winny podać informacje wymagane w pkt 13 niniejszego wniosku oraz dołączyć do wniosku kserokopię polisy ubezpieczeniowej z aktualną datą ubezpieczenia, sumą ubezpieczenia i ogólnymi warunkami ubezpieczenia.

13. ****Informacje o instytucji lub innym podmiocie finansującym badania** (dokładny adres wraz z numerem NIP i REGON płatnika):
Nie dotyczy.

14. Do wniosku, wypełnionego komputerowo lub maszynowo, dołączono dokumenty:

- 1) ****protokół badania** oznaczony.....;
- 2) ****streszczenie protokołu** w języku polskim;
- 3) ****aneks do protokołu**.....;
- 4) ****broszurę badacza** oznaczoną
- 5) wzór informacji dla uczestnika badania w języku polskim;
- 6) wzór formularza świadomej zgody na udział w badaniu w języku polskim;
- 7) kartę obserwacji klinicznej;
- 8) informację o ubezpieczeniu badanych (kserokopia aktualnej polisy ubezpieczeniowej w języku polskim) z aktualną datą ubezpieczenia, sumą ubezpieczenia oraz ogólnymi warunkami ubezpieczenia;
- 9) inne.....

15. Oświadczam, że podczas eksperymentu / badania umożliwię przeprowadzenie kontroli badań i dokumentacji oraz udostępnię:

- 1) wszelkie informacje dotyczące zmian w protokole (aneksy), mogące mieć wpływ na przebieg oraz ocenę eksperymentu;
 - 2) wszystkie informacje o przypadkach zdarzeń niepożądanych;
 - 3) zawiadomienie o przyczynie przedwczesnego zakończenia badania;
- a po zakończeniu badania dostarczę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu raport końcowy.

KIEROWNIK
Oddziału Klinicznego Położnictwa,
Chorób Kobiecth i Ginekologii Onkologicznej

lek. Waldemar Odkowski

Naczelnik Lekarski

Kierownik Samodzielnej Pododdziału Organizacyjnej
w Toruniu

prof. zw. dr hab. n. med. Marek Jackowski

Kierownik placówki, na terenie której
planowane jest prowadzenie badań

Magdalena Twarużek

dr hab. Magdalena Twarużek, prof. Uczelni

Kierownik badania

KIEROWNIK

Katedry Fizjologii i Toksykologii

prof. dr hab. inż. Jan Orszewski

**** Dotyczy dodatkowo badań sponsorowanych przez firmy farmaceutyczne.**

UWAGA!

Wniosek należy wypełnić **komputerowo** zgodnie z instrukcjami w nim zawartymi.

W przypadku wątpliwości prosimy o kontakt w godzinach dyżurnych od poniedziałku do środy w godzinach 9:00-12:00 lub w czwartki w godzinach 12:00-15:00, pod nr tel. 52-585-3563 lub na adres mailowy:

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Collegium Medicum im L. Rydygiera w Bydgoszczy
KOMISJA BIOETYCZNA

Ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, tel.(052) 585-35-63, fax.(052) 585-38-11

KB 196/2021

Bydgoszcz, 23.03.2021 r.

Działając na podstawie art.29 ustawy z dnia 5 grudnia 1996 roku o zawodzie lekarza (Dz.U. z 1997 r. Nr 28 poz. 152 (wraz z późniejszymi zmianami), rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz.U. Nr 47 poz.480) oraz Zarządzenia Nr 21 Rektora UMK z dnia 4 marca 2009 r. z późn. zm. w sprawie powołania oraz zasad działania Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu przy Collegium Medicum im Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy oraz zgodnie z zasadami zawartymi w ICH – GCP

Komisja Bioetyczna przy UMK w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy

(skład podano w załączeniu), na posiedzeniu w dniu **23.03.2021 r.** przeanalizowała wniosek, który złożyła kierownik badania:

dr hab. Magdalena Twarużek
Katedra Fizjologii i Toksykologii
Uniwersytet Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy

z zespołem w składzie

dr hab. Magdalena Twarużek, prof. dr. hab. inż. Jan Grajewski, mgr Iwona Adamczyk, dr n. med. Elena Sinkiewicz-Darol, lek. wet. Katarzyna Łubiech, lek. med. Waldemar Didkowski, lek. med. Ewa Chodakowska, lek. med. Urszula Bernatowicz-Łojko, mgr Katarzyna Kaczmarek

w sprawie badania:

„Mikrobiota matki a niemowlęcia - identyfikacja, korelacja, cytotoksyczność.”

Po zapoznaniu się ze złożonym wnioskiem i w wyniku przeprowadzonej dyskusji oraz głosowania tajnego Komisja podjęła

Uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu wniosku

w sprawie przeprowadzenia badań, w zakresie określonym we wniosku pod warunkiem:

- poinformowania na piśmie uczestników badania o celu oraz zakresie badań i uzyskania od każdego z nich osobnej, pisemnej, świadomej zgody na udział w badaniu, zgodnie z obowiązującymi przepisami, datowanej najpóźniej na moment rozpoczęcia badania a nie wcześniej niż data uzyskania z Komisji Bioetycznej pozytywnej opinii o badaniu ;
- zachowania tajemnicy wszystkich danych, w tym danych osobowych uczestników badania, umożliwiających ich identyfikację w ewentualnych publikacjach
- zapewnienia, że osoby uczestniczące w eksperymencie badawczym nie są ubezwłasnowolnione, nie są żołnierzami służby zasadniczej, nie są osobami pozbawionymi wolności, nie pozostają w zależności służbowej, dydaktycznej lub innej z prowadzącym badanie;
- sugerujemy uzyskanie podpisu uczestnika badania pod informacją o badaniu, lub sporządzenie formularza informacji i świadomej zgody na udział w badaniu w ramach jednego dokumentu.

Jednocześnie informujemy, iż „Zgoda na udział w badaniu” winna zawierać m.in.: imię i nazwisko badanej osoby; adres zamieszkania lub PESEL lub nr historii choroby pacjenta (L.ks.gł. Oddziału/Poradni) oraz datę i

podpis badanej osoby, a także klauzule, że uczestnik badania wyraża zgodę na przetwarzanie danych osobowych dotyczących realizacji tematu badawczego, zgodnie z obowiązującym prawem (RODO).

Kierownik badania zobowiązany jest do przechowywania wszystkich dokumentów dotyczących badania przez okres dwudziestu lat.

Zgoda obowiązuje od daty podjęcia uchwały (23.03.2021 r.) do końca 2023 r.

Wydana opinia dotyczy tylko rozpatrywanego wniosku z uwzględnieniem przedstawionego projektu; każda zmiana i modyfikacja wymaga uzyskania odrębnej opinii. Wnioskodawca zobowiązany jest do informowania o wszelkich poprawkach, które mogłyby mieć wpływ na opinię Komisji oraz poinformowania o zakończeniu badania.

Od niniejszej uchwały podmiot zamierzający przeprowadzić eksperyment medyczny, kierownik zakładu opieki zdrowotnej, w której eksperyment medyczny ma być przeprowadzony, mogą wnieść odwołanie do Odwoławczej Komisji Bioetycznej przy Ministrze Zdrowia, za pośrednictwem Komisji Bioetycznej przy Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, w terminie 14 dni od daty otrzymania niniejszej Uchwały.

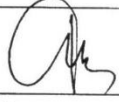
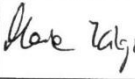
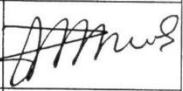
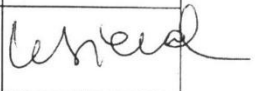
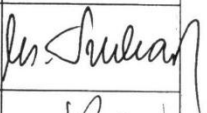
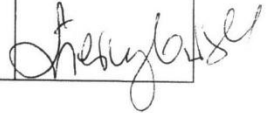
Prof. dr hab. med. Karol Śliwka

Przewodniczący Komisji Bioetycznej

Otrzymuje:

dr hab. Magdalena Twarużek
Katedra Fizjologii i Toksykologii
Uniwersytet Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy

Lista obecności
na posiedzeniu Komisji Bioetycznej
w dniu 23.03.2021 r.

Lp.	Imię i nazwisko	Funkcja/ Specjalizacja	Podpis
1.	Prof. dr hab. med. Karol Śliwka	medycyna sądowa przewodniczący	
2.	Mgr prawa Joanna Połetek-Żygas	prawniczka zastępcza przewodniczącego	
3.	Prof. dr hab. med. Mieczysława Czerwionka-Szaflarska	pediatra, alergologia i gastroenterologia dziecięca	
4.	Prof. dr hab. med. Marek Grabiec	położnictwo, ginekologia onkologiczna	
5.	Prof. dr hab. n med. Maria Kłopotka	choroby wewnętrzne, gastroenterologia	
6.	Prof. dr hab. med. Zbigniew Włodarczyk	chirurgia ogólna, transplantologia kliniczna	
7.	Dr hab. n. med. Maciej Ślupski, prof. UMK	chirurgia ogólna, transplantologia kliniczna	
8.	Dr hab. n. med. Katarzyna Sierakowska, prof. UMK	anestezjologia i intensywna terapia	
9.	Ks. dr hab. Wojciech Szukalski, prof. UAM	duchowny	
10.	Dr n. med. Radosława Staszak-Kowalska	pediatria, choroby płuc	
11.	Mgr prawa Patrycja Brzezicka	prawniczka	
12.	Mgr farm. Aleksandra Adamczyk	farmaceutka	
13.	Mgr Lidia Iwińska-Tarczykowska	pielęgniarka	

INFORMACJE DLA UCZESTNIKA BADANIA NAUKOWEGO

pt.: Mikrobiota matki a niemowlęcia - identyfikacja, korelacja, cytotoksyczność

Mikrobiota to zespół mikroorganizmów zasiedlających dany organizm. Na mikrobiom składają się bakterie, grzyby, pierwotniaki i wirusy. Wpływ mikrobiomu na organizm człowieka ma istotne znaczenie dla budowy odpowiedzi immunologicznej, produkcji witamin, hormonów czy neuroprzekaźników, co niewątpliwie oddziałuje na funkcjonowanie i zdrowie.

Najbardziej obfitującym w różnorodne mikroorganizmy siedliskiem organizmu człowieka jest przewód pokarmowy człowieka. Jednakże równowaga mikrobiomu nie tylko w jelitach, ale w całym ciele wpływa korzystnie i chroni przed chorobami. Na skład mikrobioty dziecka, a potem dorosłego człowieka, ma wpływ szereg czynników, a coraz częściej badania podkreślają kluczową rolę w przebiegu ciąży, sposobu porodu i karmienia w pierwszych miesiącach i latach na mikrobiom dorosłego człowieka i jego zdrowie.

Jak do tej pory nie ma polskich badań dotyczących składu mikrobioty w mleku kobiecym i wpływu porodu, sposobu karmienia czy kontaktu skóra do skóry na mikrobiom dziecka. Celem badania będzie zbadanie i przeanalizowanie mikrobioty mleka kobiecego w pierwszych dniach po porodzie, a także mikrobioty jamy ustnej i kału dziecka oraz powtórzenie pobrania materiału do badania w kolejnych miesiącach po porodzie.

Udział Pani w badaniu będzie polegał na oddaniu próbki mleka ok. 0,5-1ml, wyrażeniu zgody na pobranie wymazu z jamy ustnej oraz kału Pani dziecka, w których zostaną drogą hodowli mikrobiologicznej zidentyfikowane mikroorganizmy oraz na wypełnieniu ankiety.

Badanie nie wiąże się z dodatkowym ryzykiem dla osoby badanej. Udział w badaniu jest **dobrowolny i nieodpłatny**. W każdej chwili istnieje możliwość odmowy i rezygnacji z uczestnictwa w tym badaniu bez konieczności podania przyczyny i bez jakichkolwiek konsekwencji.

Dane osobowe osób biorących udział w programie podane będą jedynie do wiadomości osoby przeprowadzającej badania, zaś uzyskane wyniki opublikowane zostaną w sposób uniemożliwiający identyfikację osób w nim uczestniczących (dane zostaną zanonimizowane).

DODATKOWE INFORMACJE MOŻNA UZYSKAĆ POD NUMEREM TELEFONU: **785828477**

ZGODA NA UDZIAŁ W BADANIU NAUKOWYM
„Mikrobiota matki a niemowlęcia – identyfikacja, korelacja, cytotoksyczność”

Nazwisko i imię

Rok urodzenia

Adres
.....

Numer telefonu

Niniejszym oświadczam, że zostałam poinformowana o celu zamierzonych badań i sposobie ich przeprowadzenia. Rozumiem, na czym mają one polegać i do czego potrzebna jest moja zgoda. Zostałam poinformowana, że mogę odmówić zgody na udział w badaniach lub cofnąć ją w każdej chwili bez jakichkolwiek konsekwencji.

Oświadczam ponadto, że nie jestem ubezwłasnowolniona, nie jestem osobą pozbawioną wolności, nie pozostaję w zależności służbowej lub innej z prowadzącym badanie.

Wyrażam pełną i świadomą zgodę na udział w badaniu moją oraz mojego dziecka, którego jestem prawnym opiekunem oraz wykorzystanie materiału badanego do badań naukowych.

.....
czytelny podpis uczestnika badania

.....,

.....
miejsowość / data

KLAUZULA INFORMACYJNA

Badanie naukowe „Mikrobiota matki a niemowlęcia - identyfikacja, korelacja, cytotoksyczność”

Zgodnie z art. 13 Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2016/679 z dnia 27 kwietnia 2016 r. w sprawie ochrony osób fizycznych w związku z przetwarzaniem danych osobowych i w sprawie swobodnego przepływu takich danych oraz uchylenia dyrektywy 95/46/WE, informujemy, że:

- 1) administratorem Pani danych osobowych jest Uniwersytet Kazimierza Wielkiego (Katedra Fizjologii i Toksykologii Wydziału Nauk Biologicznych) z siedzibą przy ul. Chodkiewicza 30, 85-064 Bydgoszcz,
- 2) administrator danych osobowych powołał Inspektora Ochrony Danych nadzorującego prawidłowość przetwarzania danych osobowych, z którym można skontaktować się za pośrednictwem adresu e-mail: iod@ukw.edu.pl,
- 3) Pani dane będą przetwarzane w celu uczestnictwa w badaniu naukowym „Mikrobiota matki a niemowlęcia - identyfikacja, korelacja, cytotoksyczność”,
- 4) podstawą prawną przetwarzania jest Pani zgoda,
- 5) nie zamierzamy przekazywać Pani danych osobowych innym podmiotom, jak również nie zamierzamy przekazywać Pani danych do państw trzecich (tj. niebędących członkami UE) lub organizacji międzynarodowych,
- 6) Pani dane będą przechowywane przez rok od czasu przeprowadzenia badania, ale nie dłużej, niż do 31.12.2023 r. lub do czasu odwołania przez Panią zgody na dalsze przetwarzanie,
- 7) przysługuje Pani prawo do cofnięcia zgody w dowolnym momencie bez wpływu na zgodność z prawem przetwarzania, którego dokonano na podstawie zgody przed jej cofnięciem,
- 8) ma Pani prawo żądania od administratora danych dostępu do swoich danych osobowych, ich sprostowania, usunięcia, ograniczenia przetwarzania, przenoszenia danych oraz prawo żądania zaprzestania przetwarzania danych,
- 9) ma Pani prawo wniesienia skargi do organu nadzorczego; organem nadzorczym jest Prezes Urzędu Ochrony Danych Osobowych,
- 10) podanie przez Panią danych jest dobrowolne, jednak ich niepodanie uniemożliwi udział w badaniu,
- 11) nie zamierzamy na podstawie Pani danych realizować zautomatyzowanego podejmowania decyzji ani profilowania.

ZGODA NA PRZETWARZANIE DANYCH OSOBOWYCH

.....
imię i nazwisko

Oświadczam, że podaję dobrowolnie moje dane osobowe i wyrażam zgodę na ich przetwarzanie przez Uniwersytet Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy w celu uczestnictwa w badaniu naukowym „Mikrobiota matki a niemowlęcia - identyfikacja, korelacja, cytotoksyczność”.

.....
data i podpis

15.3 Kwestionariusz osobowy i ankieta

Ankieta

na potrzeby badań pracy doktorskiej

Mikrobiota matki a niemowlęcia - identyfikacja, korelacja, cytotoksyczność.

NR:

DATA				
IMIĘ NAZWISKO				
ADRES/MIEJSCE ZAMIESZKANIA				
NR TELEFONU				
E-MAIL				
DATA URODZENIA				
WYKSZTAŁCENIE				
WZROST				
MASA CIAŁA				
PANI DZIECI	Płeć	Data urodzenia	Tydzień ciąży w momencie rozwiązania	Masa i długość dziecka

I. PRZEBIEG CIĄŻY:

1. Czy w trakcie ciąży występowały jakieś dolegliwości/choroby (np. cukrzyca ciążowa, infekcje):
2. Czy w trakcie ciąży brała pani jakieś leki (ze szczególnym uwzględnieniem antybiotyków):
3. Czy w czasie ciąży miała miejsce hospitalizacja? Tak / nie*
Jeśli tak to jak długo i czy miała miejsce w tym czasie antybiotykoterapia?
4. Czy w trakcie ciąży brała pani jakieś suplementy diety, probiotyki:
5. Dieta stosowana w czasie ciąży:
Ogólna wegetariańska wegańska
eliminacyjna (jaka?) inna (jaka?)*
6. Jak często w czasie ciąży spożywała pani produkty kiszone/fermentowane (np. Jogurty / kefiry / kiszone ogórki / zakwas buraczany etc).....
7. Masa ciała (kg) i wzrost (cm) w 1 trymestrze ciąży.....
8. Masa ciała (kg) i wzrost (cm) w podczas ostatniej wizyty przed rozwiązaniem ciąży.....

II. PORÓD oraz hospitalizacja po porodzie:

1. Poród zakończony: drogami natury cięciem cesarskim
2. Czy przed rozwiązaniem ciąży miała miejsce czynność skurczowa?
TAK / NIE*
3. Czy w trakcie porodu pękł pęcherz płodowy/został przebity?
Tak / nie*
4. Czy w trakcie porodu była stosowana profilaktyka antybiotykowa (np. W przypadku badania dodatniego wyniku GBS)
5. Czy po porodzie miało miejsce kangurowanie / kontakt skóra do skóry? Tak / nie*
Jeśli tak to w jakim czasie po porodzie?
Jak długo trwał?
Czy przed kontaktem skóra do skóry miały miejsce jakieś procedury medyczne?.....
6. Po jakim czasie od narodzin dziecka nastąpiło pierwsze karmienie piersią?.....
7. Czy w ciągu pierwszych dni po porodzie miało miejsce dokarmienie mieszanką mlekozastępczą? Tak / nie*
Jeśli tak to w jakim czasie od porodu?
8. Czy w ciągu pierwszych dni po porodzie miało miejsce dokarmienie mlekiem z Banku Mleka Kobięcego? Tak / nie*
9. Czy po porodzie dziecko było zdrowe? (Jeśli nie, proszę podać chorobę/podejrzenie

1. schorzenia).....

2. Czy aktualnie czuje się Pani dobrze?

.....
3. Czy w ostatnich 2 tygodniach brała Pani jakieś leki/antybiotyki? tak/nie
Jeśli tak, to jakie?

.....
4. Czy w ostatnich 2 tygodniach brała Pani jakieś suplementy diety/probiotyki? Tak/Nie
Jeśli tak, to jakie?

.....
5. Jaką aktualnie stosuje Pani dietę?

.....
6. Jak często spożywa Pani produkty kiszone/sfermentowane (kiszonki, jogurty)?

.....
AKTUALNY STAN ZDROWIA (podczas kolejnego spotkania w warunkach domowych):

7. Czy aktualnie czuje się dobrze?

.....
8. Czy w ostatnich 2 miesiącach brała Pani jakieś leki/antybiotyki? tak/nie
Jeśli tak, to jakie?

.....
9. Czy w ostatnich 2 miesiącach brała 2 tygodniach Pani jakieś suplementy diety/probiotyki?
tak/nie
Jeśli tak, to jakie?

.....
10. Jaką aktualnie stosuje Pani dietę?

.....
11. Jak często spożywa Pani produkty kiszone/sfermentowane (kiszonki, jogurty)?

.....
12. Czy aktualnie Pani dziecko jest zdrowe?

.....
13. Czy dziecko jest karmione wyłącznie piersią/mlekiem mamy z butelki?

.....
14. Czy była konieczność podawanie mieszanki mlekozastępczej? Tak/nie
Jeśli tak, to od kiedy i jak często podawane jest mieszanka mlekozastępcza?