

Co je normální?

Pochopení mikrobioty mateřského mléka a faktorů,
které jsou spojeny s variabilitou mateřského mléka
na globální úrovni.

Michelle (Shelley) McGuire, PhD
Washington State University

1

Jsem z Washingtonské státní univerzity a naší oblastí zájmu je mikrobiom mateřského mléka.

Mléko – proč chceme vědět, co obsahuje?

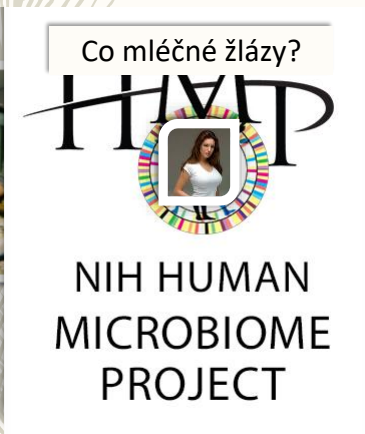


- Jediná specificky navržená „potravina“.
- Mateřské mléko - složení – je zlatý standard:
 - Odhad požadavků pro energii a živin u kojenců
 - Pro výrobu kojeneckých formulí
- Shrnutí: porozumění, co obsahuje mateřské mléko a co všechno ovlivňuje, může zlepšit lidské zdraví než pochopení složení jakékoliv jiné potraviny!

Na začátek se zkuste zamyslet nad tím, co mají všechna tato zvířata společné? Samozřejmě, všechna produkují mléko, že? Mezi mlékem jsou ale velké rozdíly, jak zmínil Lars (*pozn.: prof. Lars Bode, PhD, USA, University of California; <http://www.bodelab.com/team/lars-bode/>*): různí savci mají různé složení mléka. Co nás opravdu zajímá, je samozřejmě složení lidského mléka. Možná jste o tom vůbec nepřemýšleli, ale lidské mléko je ve skutečnosti jediná strava, která byla stvořena pro lidskou konzumaci. Rostliny, ani nic jiného ke konzumaci stvořeny nebyly, ale lidské mléko ano.

Proto je velmi důležité, abychom lépe porozuměli tomu, co se v lidském mléce nachází, a to nejen pro období raného života, ale po celý život. Mateřské mléko je používáno jako zlatý standard z řady důležitých důvodů – nastavuje výživové požadavky a představuje výživu pro kojence. Byla bych ráda, abyste se zamysleli nad skutečností, že znalost toho, co lidské mléko obsahuje a co jsme vlastně předurčeni konzumovat jako děti, nám pomůže pochopit, co jsme předurčeni konzumovat po zbytek našeho života.

Obsahuje mateřské mléko bakterie?



- Mateřské mléko bylo dlouhou dobu považováno za sterilní – tedy pokud nebylo kontaminováno nebo odebráno z „infikované“ prsní žlázy
- Banky mateřského mléka mají pasterizované mléko.
 - *Nikoho ani nenapadlo že by se bakterie měly přidávat zpátky do mléka.*
- Ještě donedávna, výrobci kojeneckých formulí ani ve snu nenapadlo obohacovat kojenecké formule bakteriemi.
- Co se změnilo?
 - Evoluce diagnostických metod.
 - V podstatě nic není sterilní!

Zaměříme se konkrétně na mikrobiom mateřského mléka a možná bude pro mnoho z vás překvapením, že mikrobiom mateřského mléka existuje, neboť v posledních desetiletích jsme se domnívali, že je mateřské mléko sterilní. Až doposud se v literatuře uvádělo, že pokud se v mateřském mléce objeví bakterie, žena trpí mastitidou, nebo mléko bylo kontaminováno. Samozřejmě, banky mateřského mléka mléko pasterizují, a já netvrdím, že toto není důležité. Ale až do nedávna by nás ani nenapadlo přidávat do mléka bakterie.

Takže po dlouhou dobu panovalo přesvědčení, že mléko by mělo být sterilní a děti by měly konzumovat sterilní potraviny. Tak proč toto paradigma měnit? Každý odborník v tomto oboru se ztotožní s tím, že jsme upustili od kultivace bakterií a zjištění jejich obsahu v potravinách, mléce apod. a začali jsme využívat molekulárních metod, pomocí kterých identifikujeme DNA v potravinách či bakteriích. Dnes k zjištění vhodného obsahu bakterií v mléce a ostatních potravinách používáme molekulární techniky a již k zjištění obsahu bakterií nemusíme již bakterie kultivovat. Toto skutečně pozměnilo naši znalost o lidském mikrobiomu, o řadě jiných mikrobiomů, půdě, atd.

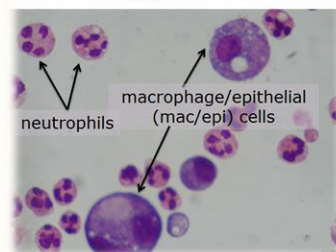
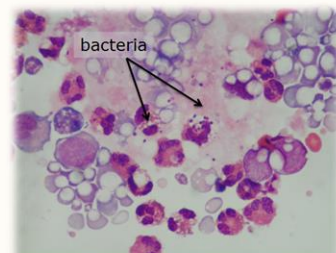
Změna technologie byla podnětem pro projekt Lidský mikrobiom, který pravděpodobně většina z vás zná. Ačkoliv, když byl projekt Lidský mikrobiom připraven a zahájen, nikoho nenapadlo zabývat se mlékem. Mlékem jsme se začali zabývat, jakmile byl projekt Lidský mikrobiom dokončen a nyní tyto informace doplňujeme do databáze.

Chci připomenout, že sterilní není pravděpodobně nic. Pokud se podíváte odlišným

způsobem, pravděpodobně najdete důkazy o přítomnosti bakterií.

Tuky ve výživě a zánět prsní žlázy?

- Intervenční studie s konjugovanou kys. linolovou (přídavek CLA vs. placebo)
 - Mléko sesbírané od 16 zdravých kojících žen 5x během laktace
 - Detailní pohled na mléčný „stěr“ pro kvantifikaci imunitních buněk
 - Analýza v laboratoři pro kultury zaslaných mléčných vzorků
- CLA bez efektu, ale ...
 - Ve většině vzorcích pozorovány bakterie – analýza kultur předpokládala, že ve vzorcích nejsou bakterie → „Great Plate Count Anomaly“*



Mléčný „stěr“

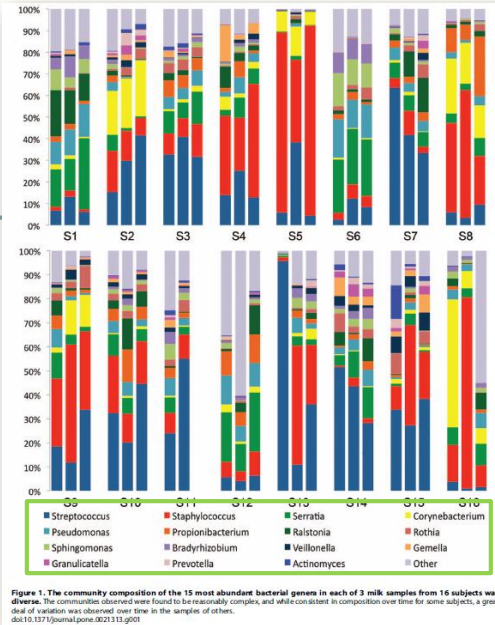
V 80. letech minulého století byl objeven velký rozpor ve výsledcích počtu bakterií zjištěných při přímém počítání buněk pozorovatelných pod mikroskopem a počtu kolonií vyrostlých na médiu (Staley J. T., Konopka A.: Annu. Rev. Microbiol. 39, 321 (1985)). „Great plate count anomaly“, byl první indicií toho, že kultivovat za rutinních podmínek lze jen některé bakterie. Tato zjištění přispěla k rozvoji molekulárně biologických metod pro studium bakteriálních populací bez potřeby kultivace a s tím spojených nových poznatků o bakteriální diversitě.

Předchozí tvrzení bych ráda podložila, a popsala vám, jak jsme němu dospěli. Naše laboratoř není mikrobiologická, ale řadu let jsme se tímto tématem intenzívně zabývali. Už několik let studujeme lipidy a nedávno se začalo mluvit o DHA a Omega-3 mastných kyselinách. Zajímalo nás, jaký dopad bude mít příjem lipidů nebo tuku u matky na složení mléka a před několika lety jsme se začali zabývat především mastnou kyselinou nazývanou konjugovaná kyselina linolová, neboli CLA (pozn.: CLA =Conjugated Linoleic Acid). CLA je významně protizánětlivá mastná kyselina; vytváří se v mléčné žláze, je také obsažena v kravském mléce. Zajímalo nás, pokud bychom ženám podávali CLA v podobě potravního doplňku, zda lze změnit schéma zánětů v mléce a snad i riziko mastitidy. Nebudeme zacházet do podrobností této studie, ale udělali jsme tzv. návrh křížení, kdy ženy konzumovaly doplňky CLA nebo placebo. Opakovaně jsme odebírali ženám vzorky mléka a poté je zkoumali pod mikroskopem. Na slidu jsou snímky z některých mléčných stěrů. Na snímku v dolní části vidíte, že se v něm nachází imunitní buňky, neutrofilů, makrofágy a tak vypadá zdravé lidské mléko. Zabývali jsme se tím, zda jsme schopni buňky v mléce zobrazit a zjistit, zda vypadají zánětlivě – více či méně zánětlivě. Mléko jsme odebrali a poslali jej do klinické laboratoře na naší univerzitě, kde byly použity metody pro určení mléčných kultur a zjištění přítomných bakterií. Zajímavé bylo, že jsme nenašli žádný vliv CLA, výstup, který jsme hledali. Navíc, laboranti se vrátili s následujícím závěrem: „Všechny vaše vzorky jsou sterilní: nic neroste“. Ale když se podíváte na snímek nahoře, jsou na něm bakterie a my jsme viděli bakterie na řadě snímků a prostě nám to nedávalo smysl. Viděli jsme bakterie, a přitom laboratoř přišla se závěrem, že vzorky jsou sterilní. Mysleli jsme si, že musíme proces zopakovat a použít jiné techniky. Jedná se však o

mikrobiologickou anomálií tzv. *Great Plate Count Anomaly*, která urychlila další vývoj molekulárních metod zkoumání bakterií. Mohli jsme pokračovat: „Možná naše vzorky sterilní nejsou; možná ke zkoumání bakterií potřebujeme použít tyto moderní techniky“.

Stanovení mikrobioty v mateřském mléce

- Stanovení mikrobioty mateřského mléka laboratorními testy metodami bez závislosti na kultuře
- Diverzní bakteriální genera – identifikovaná v každém vzorku
- Vysoká variabilita mezi ženami
- Individuální bakteriální „otisk prstu“ u každé ženy (“Bacterial fingerprints”)



Hunt KM et al.

PLoS One. 2011;6(6):e21313

Odebrali jsme tedy následně 16 vzorků, abychom se podívali na bakteriální identifikaci DNA. Stručně vám popíšu tento snímek – zde je 16 žen - S1 až S16, a studie byla publikována před několika lety, a vidíte sloupcové grafy. Zaujmout by vás měly barvy vzorků v každém ze sloupcových grafů.

Vidíte tři vzorky od Subjektu 1, tři vzorky Subjektu 16 a každá z barev představuje určitý bakteriální rod. Znovu se podívejte na jednotlivé barvy. V každém ze vzorků se vyskytovala široká škála bakterií a barvy u jedné ženy měly podobnou strukturu. Toto nazýváme bakteriální identifikací (pozn.: „otisk prstu = bacterial fingerprint“). Lars právě zmínil identifikaci HMOs (pozn.: HMOs=Human Milk Oligosaccharides = oligosacharidy mateřského mléka) a u složení mléka se tato identifikace objevuje často. Ženy mají tendenci produkovat mléko, které má v průběhu času stejné složení. Pozorovali jsme bakteriální „otisk prstu“ v průběhu času a ráda bych poukázala na významné bakterie, které jsme v mléce dokázali identifikovat. Nacházejí se v dolní části - hlavní bakterie, které lze v mateřském mléce pozorovat, jsou streptokoky, stafylokoky – bakterie, o kterých si můžete myslet, že by mohly být patogenní, ale v mléce se nachází. Dále serratia, corynebacterium atd. Jsou to běžné bakterie v mléce, které lze identifikovat u

matek po celém světě.

Změna Paradigma:

Mateřské mléko, i v případě zdravých žen, obsahuje bakterie; kdy mnoho těchto bakterií by mohlo být potenciálně patogenních!



What do you see?

Toto zjištění nás přivádí k paradigma, respektive k myšlence paradigma změnit. Nevím, jestli je tento obrázek v Evropě známý, ale pokud se na něj podíváte z jednoho úhlu, uvidíte starou ženu, a pokud se na něj podíváte z jiného úhlu, uvidíte krásnou mladou dívku: záleží na tom, jakým způsobem a jakou optikou se na obrázek díváte, a zároveň jste neustále schopni úhel pohledu měnit. Tohle je způsob, jakým nahlížím na změnu v myšlení, že mléko je sterilní, pomocí výzkumných metod pro jednotlivé bakteriální kultury, až k tomu, že mateřské mléko není sterilní, pomocí molekulárních metod: skutečně záleží na tom, na co se díváte a jakým způsobem se na to díváte. Přístup k paradigma, respektive jeho změna nám opravdu naznačuje, že mléko, dokonce produkované zdravými ženami bez zánětu atd., obsahuje bakterie. A dokonce i některé bakterie, o kterých byste si mysleli, že v mléce nejsou, se v mateřském mléku skutečně nachází.

Které faktory jsou asociovány s variabilitou mikrobioty mateřského mléka?

- Čas porodu?
- Způsob porodu?
- Strava matky?
- Další mléčné složky?
 - HMOs?
 - Imunitní buňky?
- Péče o dítě?
- Genetická informace matky?
- Expozice mikrobům okolního prostředí?


Slepice nebo vejce ?



Ilustrace: Charis Tsevis

Ve zbývající části bych chtěla krátce popsat co víme – ve skutečnosti je víc toho, co nevíme. Variabilitu mikrobiomu v lidském mléce, a tak rychle popíši některé z těchto faktorů, které Lars právě zmínil. Faktory, které v lidském mléce a u laktace sledujeme, když se snažíme pochopit, co variabilitu způsobuje. Takže něco málo o období po porodu, způsobu porodu, budeme trochu hovořit i o stravě matky – jsem výživářka, takže toto je moje oblíbená část. Poté o dalších složkách v mléce a zda-li se složky v mléce můžou vzájemně ovlivňovat. Také se velmi stručně zaměříme na péči o dítě – může to působit trochu zvláště, ale jde o zajímavý příběh. Ráda bych pohovořila o mateřské genetice a životním prostředí, ale zatím nevíme, jak by tyto skutečnosti mohly mléčný mikrobiom ovlivnit. A chci upozornit, že se díváme na vzájemný vztah; nebyly realizovány téměř žádné intervenční studie, které by se pokusily zjistit příčinnou souvislost, což bych vám chtěla připomenout. V mnoha situacích, zejména u stravy matky, mohou věci fungovat oběma způsoby: pamatujte na to, že bakterie produkují látky, a zároveň látky mohou mít vliv na růst bakterií. Takže mohou nastat obě situace, kdy

vzájemnou příčinnost neznáme.



Struktura mikrobioty mateřského mléka je relativně stabilní v čase

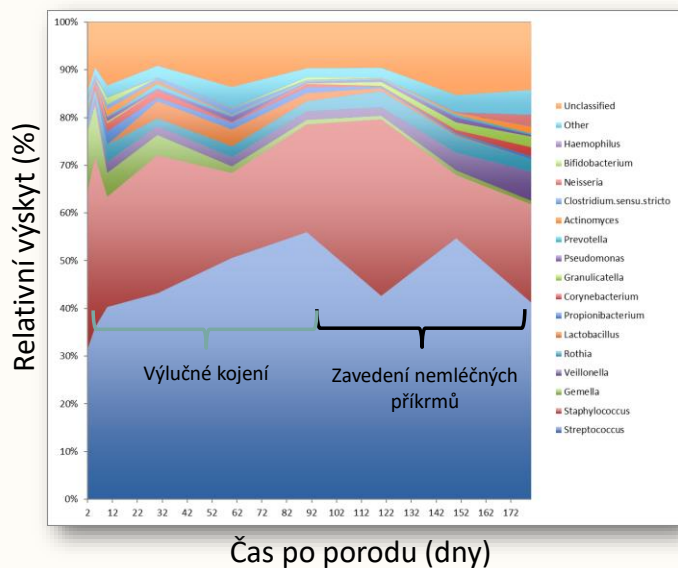
- Prospektivní, longitudoální humánní studie
- 21 matek a kojenců
- Mateřské mléko sbíráno od 0-6 měsíců po porodu (9 sběrů)

BILL & MELINDA
GATES foundation

Období po porodu má vliv na mléčný mikrobiom. Studie, kterou jsme nedávno realizovali, byla financována nadací Gates a sledovali jsme 21 žen a kojenců od narození do šesti měsíců po porodu. Během tohoto období jsme shromáždili devět vzorků mléka a celou řadu dalších vzorků, takže jsme se mohli podívat na změny v průběhu času.

- Hlavní zjištění: pouze malé změny v mikrobiotě mateřského mléka (tedy z pohledu statistiky)
- Při ranní fázi laktace
- Nejvíce ovlivněna *Gemella*
- Potřeba většího vzorku a vzorků kolostra!
- Potřeba výzkumu ve vztahu ke krmení kojence

BILL & MELINDA
GATES foundation



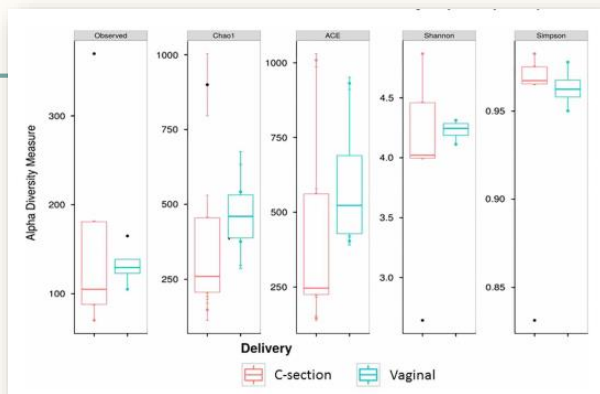
Williams et al., 2017

Tento sloupcový graf zaznamenává stav v časovém období, a opět věnujte pozornost barvám grafu. Pokud se na graf pozorně podíváte, relativní výskyt (abundance) je až 100 %. Modrá barva je streptokok a světle červená je stafylokok, tytéž bakteriální rody, které jsme již identifikovali. Pokud se podíváte na barevné vzory, uvidíte některé změny, ale pokud jde o statistiku, vypadá to, že některé z těchto změn nejsou tak významné, což může být způsobeno tím, že jsme měli poměrně málo vzorků. Jediný statistický posun je v této zelené části pro *gemellu*, která má tendenci mít zprvu hodnoty vyšší, a poté zmizí. Chtěla bych zdůraznit, že jsme zkoumali pouze 21 žen, takže skutečně potřebujeme zvýšit počet vzorků. Co je zajímavé: na počátku laktace se něco děje a pak se zdá, že v průběhu času dochází ke stabilitě. Všechny tyto ženy kojily výlučně alespoň tři měsíce, mnohé čtyři měsíce, a neznáme tak skutečný dopad zavedení příkrmů – později chci mluvit o tom, jak se mohou bakterie dostat do mléčné žlázy – a je možné, že krmení dítěte různorodou stravou může mít i vliv na mikrobiom mateřského mléka. Ráda bych tak povzbudila všechny, kteří se tímto zabývají, aby se začali dívat na

důležitou kombinaci, co máma dělá, co dělá dítě atd., a snažili se jedno s druhým spojit.

Vliv porodu?

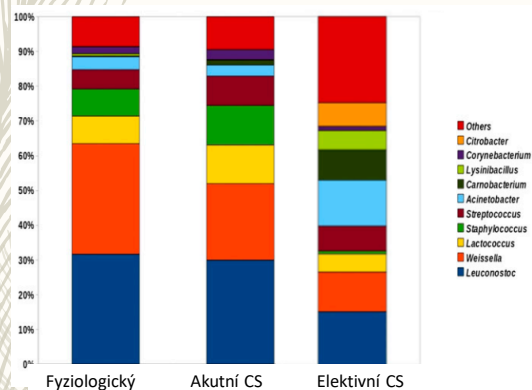
- Různorodé a limitované výstupy.
- CS asociovaný s
 - ↓diverzita v mléce (Cabrera-Rubio et al., 2016)?
 - ↑množství bakterií (Khodayar-Pardo et al., 2014)?
 - trend pro vyšší relativní výskyt *Propionibacterium* (Williams, před publikací)
 - Bez rozdílu (Urbaniak et al., 2016)
 - Bez konečného verdiktu.



Cabrera-Rubio R et al.
J Dev Orig Health Dis. 2016 Feb;7(1):54-60

Jak ovlivňuje způsobu porodu mléčný mikrobiom. K dispozici jsou pouze limitované a různorodé výstupy. Podívejte se na graf z jedné z nejnovějších prací o alfa-diverzitě. Jestliže je mikrobiom rozmanitější, znamená to, že buď existuje více různých druhů rodu, nebo je rovnost jednotlivých konkrétních rodů větší. Na grafu je zobrazena škála rozmanitosti, kdy vyšší rozmanitost je považována za dobrou. V této studii bylo zjištěno, že mléko žen, které rodily císařským řezem, vykazovalo nižší rozmanitost než mléko žen, které rodily vaginálně. Existuje teorie, že se pravděpodobně jedná o použití antibiotik atd., ale toto s jistotou nevíme. Zjištění jsou ale neurčitá; tato studie, ve které byla zjištěna nižší diverzita mléka produkovaného ženami, které rodily císařským řezem. V jiné studii byly zjištěny vyšší hladiny bakterií u mléka produkovaného ženami, které porodily císařským řezem. Pokud se podíváme pozorně, najdeme několik rozdílů, avšak nepříliš velkých; jiné skupiny nenalezly absolutně žádný rozdíl. Znamená to, že rozdíly existují, ale jsou závislé na lokalitě, porodní praxi, úrovni poporodní péče? Nevíme. Jak jsem již zmínila, povím vám více o tom, co nevíme, než o tom, co víme.

Efekt typu porodu?



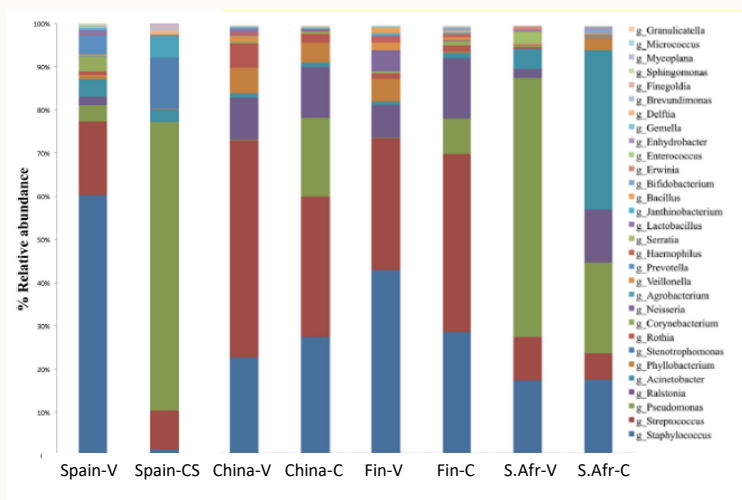
– Elektivní nebo akutní císařský řez?

Cabrera-Rubio R et al.
Am J Clin Nutr. 2012 Sep;96(3):544-51

Jedná se o velmi zajímavou studii, která byla publikována a – s použitím sekvence dalšího genu, tak aby se pomocí něj zkoumal mléčný mikrobiom. Na slidu vidíte mléčný mikrobiom žen, které rodily vaginálně, a mléčný mikrobiom žen, které musely porodit císařským řezem. Tedy ženy, které procházely porodem a pak musely podstoupit císařský řez, protože měly těžký průběh porodu. Oba mléčné mikrobiomy jsou relativně podobné. Zatímco ženy, které si zvolily císařský řez – které nepodstoupily přirozený porod atd., jedná se o velmi odlišné procesy porodu -, měly mléčný mikrobiom zcela jiný. Tato skutečnost nastala o tři měsíce později. Autoři se domnívají, že rozdíl mezi těmito dvěma způsoby porodu může souviset se stresovými hladinami, ale nejsou si tím jistí; mohla by to být také souvislost s užíváním různých antibiotik v nemocnici. Zdá se, že existuje dlouhodobý vztah; opět, nebudu říkat, že jde o účinek, protože o kauzalitě nic nevíme.

Typ porodu

- Mezinárodní kohorty
- 20 žen/lokalita
- 1 měsíc po porodu



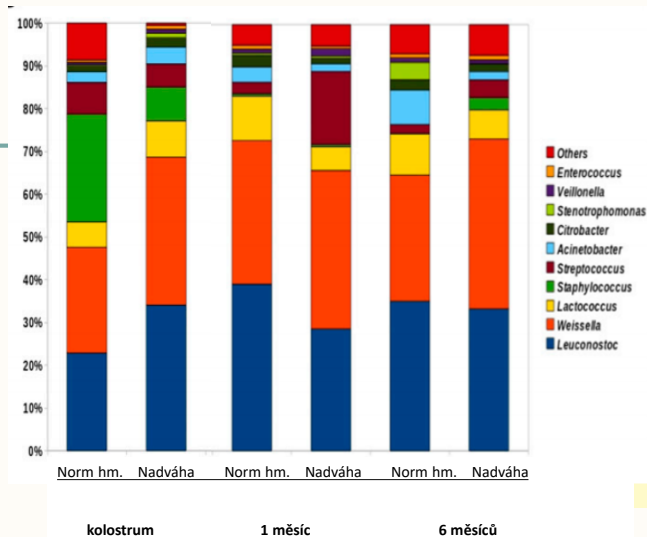
Kumar H et al.

Front Microbiol. 2016 Oct 13;7:1619

Další, nedávno publikovaná studie, kterou bych chtěla zmínit, když jsem zkoumala způsob porodu: tato studie se dívala na šest různých skupin po celém světě – velmi silná studie, a všechny vzorky mléka byly analyzovány ve stejné laboratoři, takže bychom mohli těmto údajům opravdu důvěřovat. Navíc v jednom místě bylo zkoumáno 20 žen. Vzorky mléka byly sesbírány jeden měsíc po porodu, a pro příklad: na snímku lze vidět ženy ze Španělska, které rodily vaginálně, a ženy ze Španělska, které rodily císařským řezem. Můžete vidět velmi odlišné vzory v těchto dvou typech mléka. Byl proveden ale také výzkum v Číně, Finsku a Jihoafrické republice. Chtěla bych zdůraznit, že pokud se podíváte pouze na tyto skupiny, existují i v nich velké rozdíly. A pokud se podíváte v rámci jedné skupiny, někdy lze pozorovat rozdíl mezi vaginálním a císařským porodem, a v některých případech nikoliv. Takže se vracím zpět k teorii, že mléčný mikrobiom je ovlivněn mnoha faktory, které pravděpodobně souvisí s lokalitou, ať už jde o vliv genetiky či prostředí. To nevíme. A zároveň způsob porodu může mít vliv na složení mléčného mikrobiomu, kdy ale závisí také na jednotlivých lokalitách.

Souvislost s nadváhou u matky?

- Ano
- Cabrera-Rubio, 2012
- Ne/Ne tolik
- Williams (před publikací)
 - *Bez souvislosti s BMI*
 - *↑ Granulicatella u žen s nadváhou/obezitou*

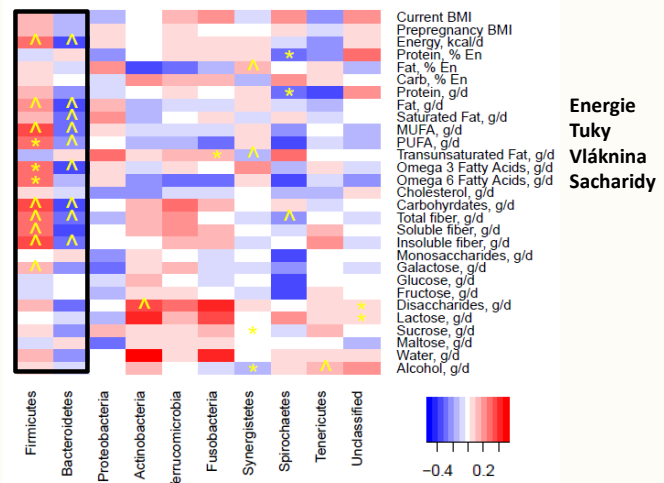


Cabrera-Rubio R et al.
Am J Clin Nutr. 2012 Sep;96(3):544-51

Zajímavé je i, zda existuje vztah mezi mléčným mikrobiomem a mateřskou adipozitou. Pokud jste studovali literaturu o mikrobiomu, víte, že lze najít opravdu zajímavé údaje, které zkoumají jak dospělé, tak děti. Lze dohledat rozdíly mezi mikrobiomem stolice u štíhlých a obézních lidí, následně tedy i mléčný mikrobiom může být rozdílný. Data jsou opět neurčitá, což může být způsobeno tím, že skutečně existují rozdíly na celém světě. Nebo také proto, že této problematice ještě dostatečně nerozumíme. Tato studie byla zveřejněna před několika lety – vědci zkoumali mateřské mléko u žen s normální hmotností a u žen s nadváhou. Patrně vidíte rozdíly ve vzorcích mikrobiomu kolostra. V šesti měsících po porodu byl mléčný mikrobiom velmi podobný. Nevíme, zda-li se jedná o podstatný rozdíl, ale zdá se, že rozdíly existují. Příkladně v této studii z Finska. Při zkoumání naší populace nenalzáme velké rozdíly; ani ve vztahu k BMI. Pro bakteriální rody jsme zjistili nárůst granulicatelly u žen s nadváhou a obézních žen, ale ve skutečnosti nejsme schopni dohledat konzistenci. Proto si myslím, že ani v tomto případě konečný verdikt nepřichází v úvahu.

Souvislost se stravou matky?

- 21 žen po dobu 6 měsíců po porodu (9 krát)
- * = Spearman rho ≤ -0.3 or ≥ 0.3 ; $P \leq 0.01$
- ^ = Spearman rho ≤ -0.3 or ≥ 0.3 ; $P \leq 0.05$
- ↑Firmicutes souvisí ↑ celková energie, tuky, sacharidy, vláknina
- A mnoho dalších souvislostí...



Williams et al., J Nutr 1017

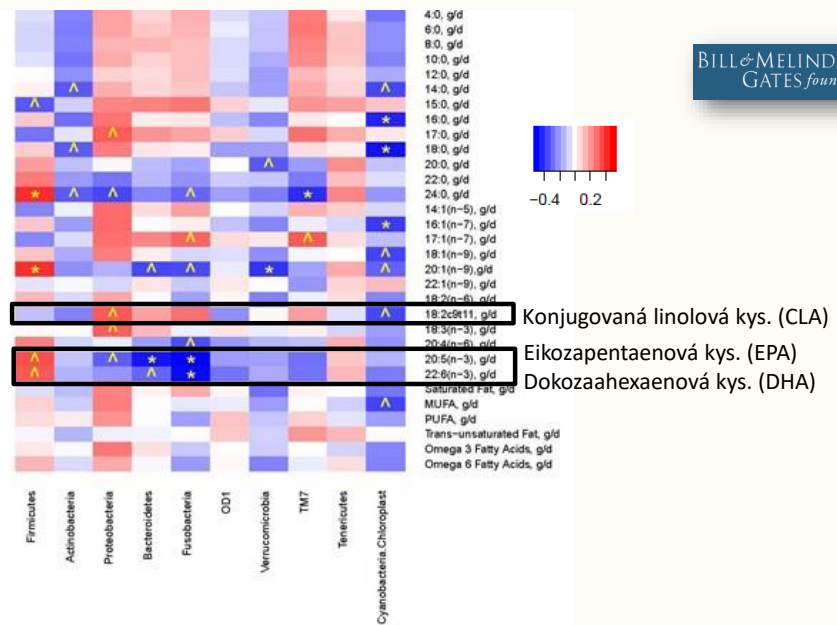
Jeden muž se mě zeptal: „...zajímám se o výživu matek. Jaký vliv může mít strava matky na mléčný mikrobiom?“ Na slidu je stejná studie nadace Gates, kterou jsem již prezentovala, 21 žen, kterým jsme odebrali vzorky mléka a u kterých jsme sledovali stravovací návyky, v průběhu devíti různých časových období během laktace. Máme tedy velmi dobré informace o stravování matky. Na tomto snímku jsou červenou barvou pozitivní asociace, modrou barvou jsou inverzní či negativní asociace. Malé karáty nebo malé hvězdičky znamenají významnou hodnotu $p < 0,01$ nebo $p < 0,05$.

Pokud se podíváte na Firmicutes* nebo Bakteroides*, jedná o dva nejdůležitější kmeny v mléce. A pokud se podíváte na faktory ve stravě, související s příjmem makronutrientů - energie, tuk, bílkoviny apod., lze vidět pravidelnost. Ženy, které konzumovaly nejvyšší množství makronutrientů, měly tendenci mít vyšší procento výskytu Firmicutes a nižší procento Bakteroides. Vidíte, že sloupec v černém rámečku je převážně červený, druhý sloupec je převážně modrý. Velmi zajímavé. Takto vypadá souvislost mezi stravováním matky a mléčným mikrobiomem. Vyšší procento Firmicutes v mléce může souviset s vyšším příjmem celkové energie z lipidů, sacharidů a vlákniny ve stravě. Během několika minut se ještě k této

problematice vrátíme.

*[Pozn.: *Až 90 % bakterií ve střevě je zastoupeno 2 hlavními kmeny: Bacteroidetes a Firmicutes, kdy Firmicutes (gram+) se vyskytují ve vyšší míře u lidí s nadváhou/obezitou. Firmicutes produkují ve střevě více vstřebatelných substrátů energie než Bacteroides, alterují metabolismus cukrů, produkci mastných kyselin s krátkým řetězcem, a způsobují tak inzulínovou rezistenci nebo zvyšují produkci ghrelinu (hormon zvyšující chuť k jídlu). Způsobují také subklinický střevní zánět, a povolení vazeb enterocytů, které usnadňuje průnik endotoxinů do krve. Výsledná endotoxemie zaktivuje imunitní systém, což vede k inzulínové rezistenci a nárůstu hmotnosti. Složení střevního mikrobiomu tak ovlivňuje obezitu: ale i naopak, obezita ovlivňuje složení střevní mikrobioty; např. zahájí-li obézní člověk redukční dietu, proporce Bacteroides relativně vzroste, množství Firmicutes klesne. Pokud dojde k opětovnému nárůstu hmotnosti, proporce Firmicutes se opět zvýší na úkor Bacteriades. Zdroj: <http://wp.interna.cz.eu/slozeni-strevni-mikroflora-ve-vztahu-obezite-diabetu/> (MUDr. Luboš Kotík)*

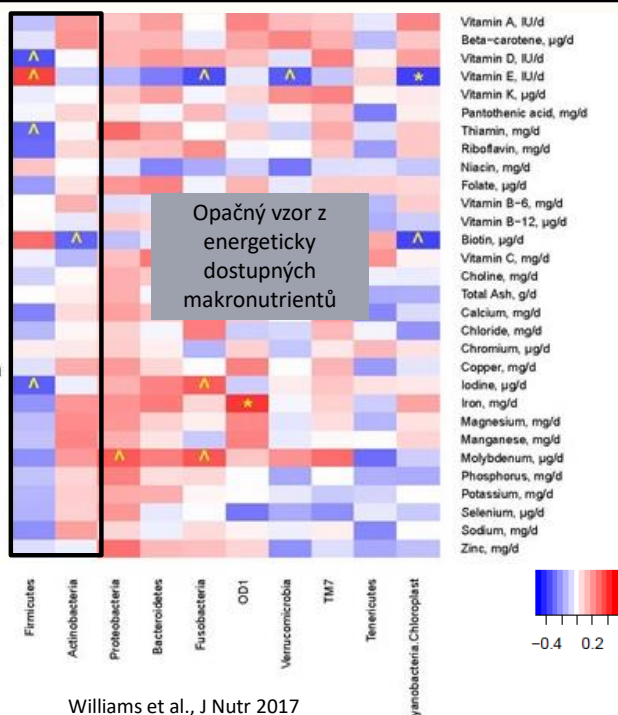
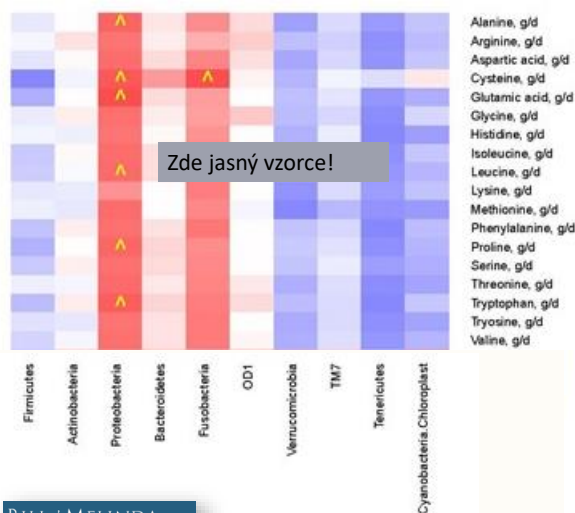
Mastné kyseliny



Williams et al., J Nutr 2017

Tento graf shrnuje mastné kyseliny, od nasycených mastných kyselin s velmi krátkým řetězcem až po polynenasycené mastné kyseliny s delšími řetězci, vyjadřuje souvislost mezi příjem stravy a bakteriálními kmeny v mléce. Zjistili jsme, pokud se podíváte na EPA a DHA, kdy červená barva znamená pozitivní asociaci, že ženy, které konzumovaly více EPA a DHA, měly tendenci mít vyšší hladiny bakterií Firmicutes v mléce a nižší hladiny fusobakterií. Vidíte i konjugovanou kyselinu linolovou, mastnou kyselinu, kterou jsme studovali na začátku, což je protizánětlivá mastná kyselina.

Aminokyseliny a vitamíny



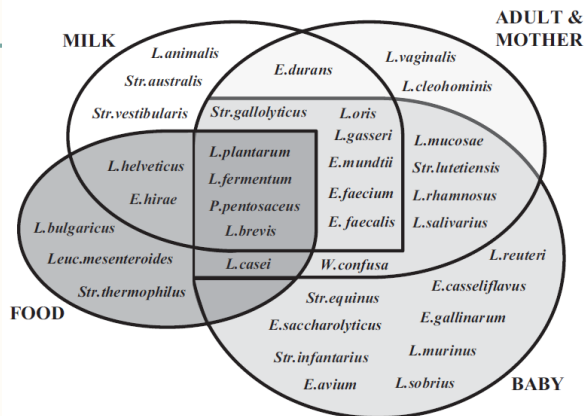
BILL & MELINDA
GATES foundation

Williams et al., J Nutr 2017

A pro aminokyseliny, které vidíte na levé straně, a které jsou pro lidi klíčové, jsou vidět jasné vzory; celý sloupec modrý, celý sloupec červený. Náš výklad je, že lidé, kteří konzumovali například nejdůležitější aminokyseliny, měli v mléce vyšší hladinu proteobakterií. Opět, nejsme si jisti, co způsobuje co, ale jde o velmi jasné vzorce. Pokud se podíváte vpravo, jedná se o mikronutrienty, tedy o základní vitamíny a minerály: není zde mnoho rozdílů, ale existuje jich několik, které je potřeba zdůraznit. Například vztah mezi vitamínem D a Firmicutes; nebo souvislost mezi vitamínem E a Firmicutes. Některé z těchto složek stravy mají souvislost se složením mléka. Složení mléka jsme neměřili a myslím si, že pro budoucí studie je důležité. Chci jen upozornit, že vztahy jsou v tomto případě opačné než pro výsledky s makronutrienty: vyšší hladiny základních mikronutrientů se pojí s nižšími proporcemi Firmicutes v mléku.

Příjem probiotik matkou a mikrobiota mateřského mléka

- Pokud ženy konzumují probiotika, probiotika si „najdou“ cestu do mléka.
- Lokálně fermentované syrské potraviny (Albesharat et al., 2011)
 - Mohou „skoro vyléčit“ mastitis (Arroyo et al., 2011)
 - Více efektivní než ATB léčba

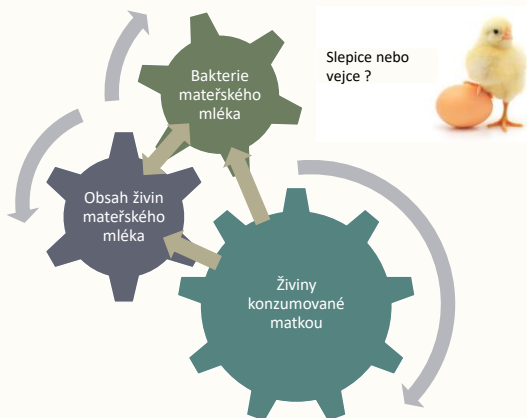


Albesharat R et al.
Syst Appl Microbiol. 2011 Apr;34(2):148-55

Víme také něco o příjmu probiotik u matky a výskytu probiotik v mléce. Zde prezentuji studii ze Sýrie, kdy byly zkoumány různé bakterie v lidském mléce, a v potravinách. Na obrázku vidíte různé probiotika, bakterie v potravinách, v mateřském mléku, mikrobiom stolice matky a dítěte. Některé probiotické bakterie se nachází v potravinách, v mléce a stejně tak i v mateřské a dětské stolici. Zajímavá je studie ze Španělska, a doporučuji vám, abyste si tuto výzkumnou skupinu vyhledali, kdy byla podávána probiotika kultivovaná z mateřského mléka ženám s mastitidou. Do značné míry byla tato probiotika schopna mastitidu léčit. Věřím, že existuje cesta mezi perorální konzumací určitých probiotických bakterií a lidským mlékem.

Potřebujeme!

- Souvislost mezi příjmem živin u matky (a probiotik), obsahem živin v mléce, a strukturou mikrobioty mateřského mléka.



Navrhují, aby budoucí studie, které se zabývají touto oblastí, zkoumaly skutečnou souvislost mezi konzumací živin a probiotik matkou, obsah živin v mateřském mléce, obsah mikrobů. Můžeme dovést, že existují určité přímé vlivy, ale lze také říci, že bakterie v lidském mléce mohou produkovat sloučeniny. Některé z těchto bakterií se podílí na tvorbě aminokyselin, mastných kyselin, vitamínů. Potřebujeme proto vědět, co se děje ve střevě ve srovnání s tím, co se děje v mléčné žláze, a uvidíme, jestli zde objevíme příčinné souvislosti.

Které faktory jsou asociovány s variabilitou mikrobioty mateřského mléka?

- Čas porodu?
- Způsob porodu?
- Strava matky?
- Další mléčné složky?
 - HMOs?
 - Imunitní buňky?
- Péče o dítě?
- Genetická informace matky?
- Expozice mikrobům okolního prostředí?

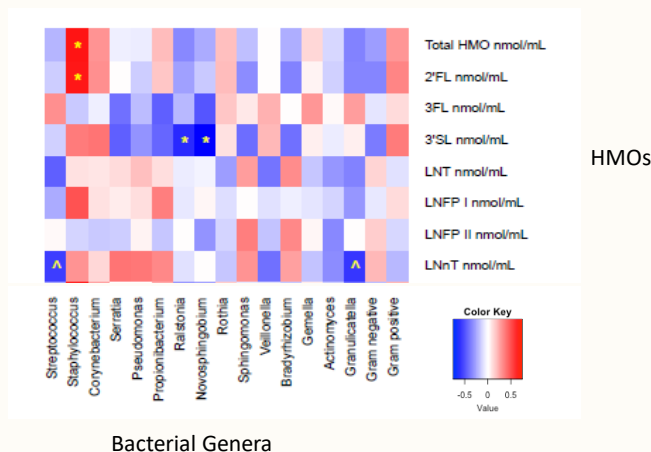
Slepice nebo vejce ?



Ilustrace: Charis Tsevis

Ještě bych chtěla zmínit několik věcí , vztah mezi HMOs (pozn. HMOs = *Human Milk Oligosaccharides*, oligosacharidy mateřského mléka) a mikrobiy v mléce a také imunitních buňkách.

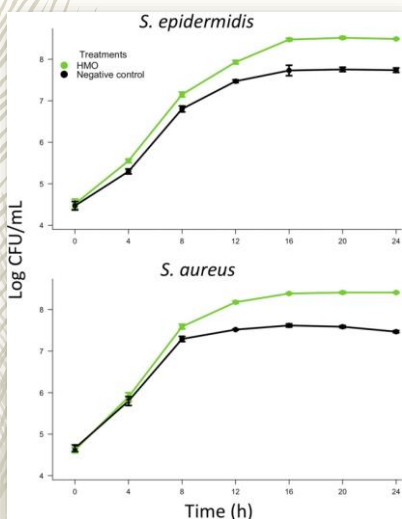
HMOs a mikrobiota
mateřského mléka
(prebiotický účinnek?)



Williams et al., JHL 2017

Zde je studie, která je v tisku a kterou jsme provedli s Larsem Bodem; zabývali jsme se souvislostmi mezi celkovým HMOs a ostatními částmi či izoformami HMOs a pak různými bakteriálními rody. Pokud se podíváme na souvislosti v mléce, vidíme u mléka pozitivní vztah mezi celkovým HMOs, a 2FL, a stafylokokem.

HMOs stimulují růst *Staphylococcus*, který pochází z mateřského mléka



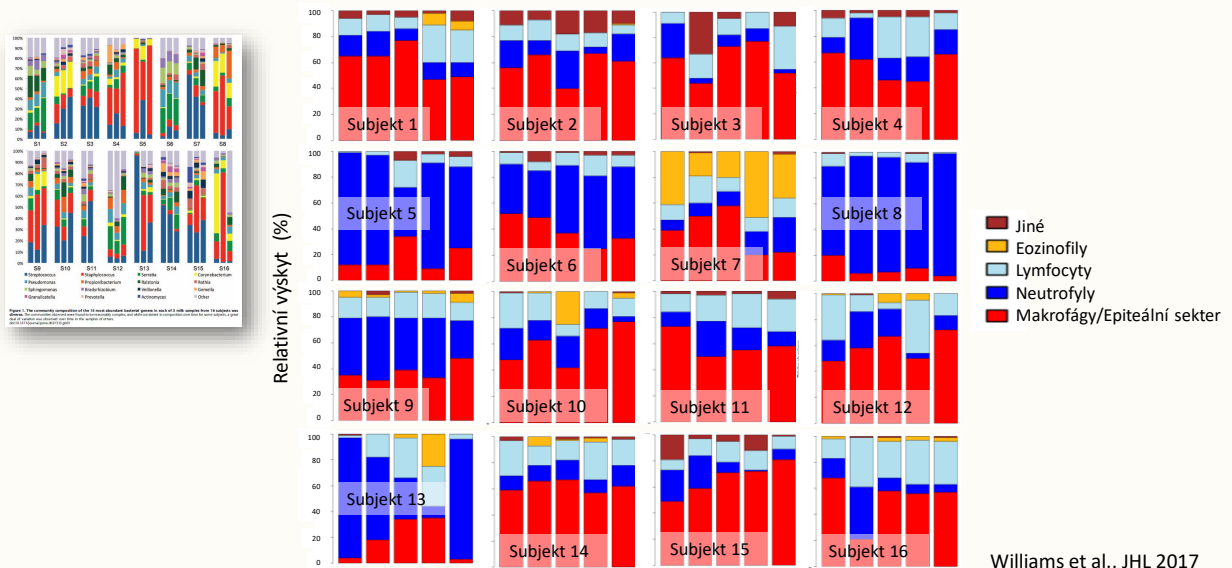
- 2 *Staph* izolovány z mateřského mléka
- Potvrzená kauzální souvislost mezi množstvím oligosacharidů mateřského mléka (HMOs) a růstem bakterií
- Předpoklad, že bakterie metabolizují HMOs
 - HMOs se neztratily z media
 - Ale některé aminokyseliny ano
 - HMOs nějak signalizují bakteriím, aby pro svůj růst metabolizovaly aminokyseliny

Hunt KM et al.

Appl Environ Microbiol. 2012 Jul;78(14):4763-70

Tuto studii jsme před několika lety publikovali s Larsem, kdy se nám podařilo kultivovat několik druhů stafylokoků z mléka – staph epidermidis a staph aureus společně s HMOs, což znázorňují na grafu zelené linky. Pokud dodáváte živiny nebo pokud vložíte HMOs do kulturních médií, bakterie staph rostou více, což potvrzuje kauzální vztah, ne pouze souvislost. V této studii jsme předpokládali, že HMOs jsou využity jako prebiotika, tedy bakterie konzumují prebiotika HMOs. Při zkoumání samotných kultivačních médií se ale ukázalo, že HMOs z médií nezmizely. Na druhou stranu se z médií ztratily aminokyseliny, což je velmi zajímavé, protože vidíme tento vztah mezi příjmem aminokyselin matkou a bakteriemi. Musíme se vrátit k výsledkům – protože HMOs v kultivačním médiu stimulovaly bakterie, aby používali aminokyseliny pro energii a růst. Velmi zajímavé zjištění.

Zpět k PRVNÍM vzorkům mateřského mléka analyzovaných pro mikrobiom ... také personalizované pro distribuci imunitních buněk.

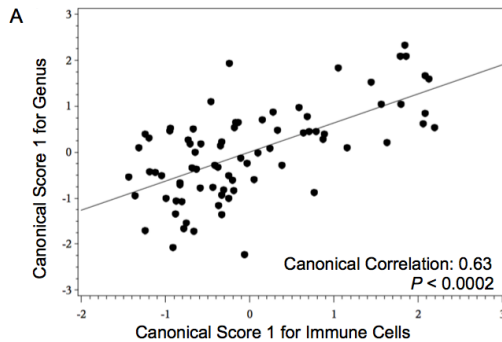


Williams et al., JHL 2017

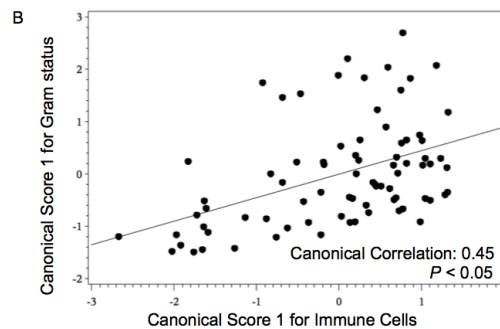
Podívali jsme se také na naše původní vzorky mléka (16 subjektů). Zkoumali jsme buňky pod mikroskopem a podařilo se nám identifikovat, že jde o hlavní buňky v mléce, makrofágy, neutrofilny, lymfocyty a eozinofily, a toto jsou sloupcové grafy těchto mléčných buněk. A opět vidíte, že u každé ženy lze identifikovat mléčné buňky, jedná se o pět vzorků v různém časovém období u každé ženy. Zajímalo nás, zda identifikace v mléčných imunitních buňkách souvisí s identifikací v mléčném mikrobiomu. A tato studie je momentálně v tisku, takže snad si ji budete moci brzy najít.

Souvislost mezi imunitními buňkami a mikrobiotou mateřského mléka

Slepice nebo vejce ?



Maternal cells: MSE, neutrophils, lymphocytes, eosinophils
Genera: *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*,
Serratia, *Pseudomonas*, *Propionibacterium*



Maternal cells: MSE, neutrophils, lymphocytes,
eosinophils

Williams et al., JHL 2017

Zde jsou vidět dva grafy – metodologie se nazývá kanonická korelace – kdy komplexní společenství, v tomto případě komplexní buňky – komplexní společenství bakterií – my jsme schopni se podívat, dobře, pokud se jedno komplexní společenství posune, můžeme předvídat posun v rámci jiného komplexního společenství? Na levé straně se podíváme na vztah mezi imunitními buňkami a rody mléčných bakterií a zde vidíte hezký vztah, vidíte stejný vztah s Gramovým barvením. Co bylo ale první, slepice nebo vejce?

Které faktory jsou asociovány s variabilitou mikrobioty mateřského mléka?

- Čas porodu?
- Způsob porodu?
- Strava matky?
- Další mléčné složky?
 - HMOs?
 - Imunitní buňky?
- Péče o dítě?
- Genetická informace matky?
- Expozice mikrobům okolního prostředí?

Slepice nebo vejce ?



Ilustrace: Charis Tsevis

Malá poznámka k péči o dítě.

Souvislost s přístupy v péči o dítě?

- Sběr mateřského mléka mezi ženami žijícími v Středoafričké republice
- ↑ diverzita mikrobioty mateřského mléka se pojí
↑ sociální „networking“
- Nyní se detailněji zabýváme tímto výstupem mezi rodinami v Americe



Spolupracovali jsme s výzkumnou pracovnící, která vede několik výzkumů ve Středoafričké republice. Antropoložku, která studuje sociální networking, a péči o dítě, kolik mají děti sociálních interakcí a podobně nám přivezla vzorky mléka. Nebudeme zacházet do podrobností této studie, ale podařilo se nám propojit sociální síť dítěte se složením mléčného mikrobiomu jeho matky. Pokud se podíváte na výstupy, ukazuje se, že děti, které měly v průběhu času více interakcí s více lidmi, prokazovaly větší rozmanitost mikrobiomu. Takže pokud jsou děti ve vzájemné interakci s více lidmi, jejich matky produkují mateřské mléko s vyšší bakteriální rozmanitostí. Velmi zajímavé zjištění.

Některé evidentní (velké) otázky...

- Jsou ty bakterie živé?
- Jsou přítomny v mléčné žláze u nekojících žen?

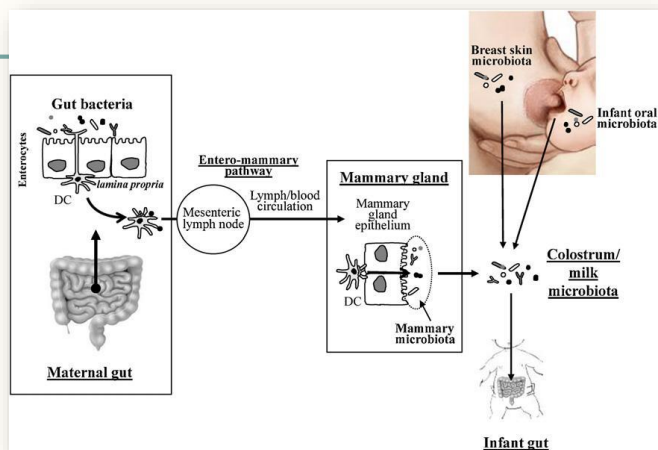


Urbaniak et al.
Microbiome. 2014 Jul 11;2:24.

Několik dalších závažných otázek, které jsem chtěla pouze zmínit. Otázky jako např. jsou mléčné bakterie živé? Odpověď je – ano. Když byly tyto bakterie kultivovány, vytvářely další kultury. Možná nejsou všechny bakterie živé, ale mnohé z nich ano. Jsou mléčné bakterie i v mléčné žláze nekojící matky? Odpověď je ano. Bakterie jsou i v mléčných žlázách žen, které nikdy nekojily.

Původ mikrobioty mateřského mléka?

- Kůže
- Dutina ústní kojence
- Prostředí
- GIT matky (via lymfatické cesty)



Rodriguez JM
Adv Nutr. 2014 Nov 14;5(6):779-84

Odkud bakterie v mléce pocházejí?

Domnívám se, že víte, že toto je jedna z nejdůležitějších otázek.

Odkud pocházejí? Jak je možné, že mléčná žláza není sterilní?

Na slidu lze vidět graf výzkumné skupiny Juan-Miguel Rodrigues. Myslíme si, že existuje několik cest, kterými se bakterie dostávají do mléka. První jsou ústa dítěte: u mléčné žlázy dochází ke zpětnému přenosu, což je názorné na ultrazvuku, takže se bakterie z úst kojence dostanou do prsou. Také si myslíme, že existuje cesta ze zažívacího traktu matky, kdy se bakterie ve střevě dostanou do krve a dojde k přenosu do mléčné žlázy. Problematika, kterou se řada z nás snaží pochopit. Zkoumali jsme také vztahy mezi komunitami bakterií na těchto místech. Vycházíme z toho, že složení mléčných bakterií bude velmi podobné slinám dítěte, což ze své podstaty vyplývá.

Další kroky



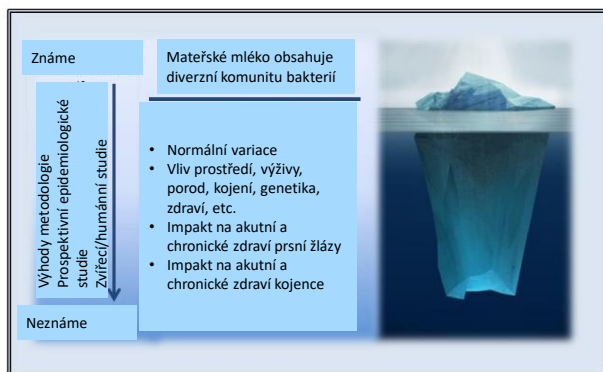
photo: Kimberly Lackey

- Pochopení variability
 - Typ porodu, užití ATB, strava matky (s probiotiky), živiny mateřského mléka, genetika
- Jaká je souvislost mezi mikrobiotou mateřského mléka a mikrobiotou stolice kojence?
- Další mikrobiální taxa (protozoa, virus, fungi)?
- Objasnění původu
- Souvislost mezi zdravím matky a kojence?
 - Potřeba pečlivých longitudinálních studií
- Přístup „jedna velikost“ zde „nesedí“



Co dále? Měli bychom pochopit variabilitu mléčného mikrobiomu. Potřebujeme porozumět, jaký je vztah mezi mléčným mikrobiomem a mikrobiomem kojenecké stolice. Nezkoumali jsme zatím jiné druhy bakterií či mikrobů v mléce, potřebujeme nejprve pochopit jejich původ. Samozřejmě musíme porozumět vztahům mezi mateřským mlékem a zdravím dítěte: to je to podstatné.

Vrchol ledovce...Děkuji!



McGuire and McGuire, Adv Nutr. 2015
Jan 15;6(1):112-23

- Mark McGuire, PhD
- Janet Williams, PhD
- Bill Price, PhD
- Bahman Shafii, PhD
- Katherine Yahveh, PhD
- Courtney Meehan, PhD
- Lars Bode, PhD

To nejpodstatnější pro mléčný mikrobiom - ještě toho spoustu nevíme.

Ráda bych poděkovala mým kolegům.

Děkuji vám.