

Známe úlohu oligosacharidů mateřského mléka?

doc. Ing. Šárka Musilová, Ph.D., prof. Ing. Eva Vlková, Ph.D., Ing. Iva Mrvíková, Ing. Štěpánka Kozáková

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

Oligosacharidy, obsažené v mateřském mléce, mají pro správný vývoj novorozence nezastupitelnou úlohu a plní celou řadu biologických funkcí, i přesto jsou často opomíjeny. Z hlediska výživy nemají pro kojence velký význam, avšak jejich hlavní benefity spočívají ve schopnosti ovlivnit vývoj nervové soustavy a imunity kojence díky svým prebiotickým, antimikrobiálním, antiadhezivním a antibiofilmovým vlastnostem. Bohužel nedostatek informací o těchto oligosacharidech nás brzdí v jejich terapeutickém využití.

Klíčová slova: oligosacharidy mateřského mléka, antimikrobiální vlastnosti, antibiofilmové vlastnosti, prebiotika.

Do we know the role of human milk oligosaccharides?

The oligosaccharides contained in breast milk play an irreplaceable role in the proper development of the newborn and perform a number of biological functions, although they are often neglected. From a nutritional point of view, they are not very important for infants, but their main benefits are their ability to influence the development of the infant's nervous system and immunity due to their prebiotic, antimicrobial, antiadhesive and antibiofilm properties. Unfortunately, the lack of information about them hinders us in their therapeutic use.

Key words: human milk oligosaccharides, antimicrobial properties, antibiofilm properties, prebiotics.

Bioaktivní molekuly mateřského mléka

Mateřské mléko plní nezastupitelnou roli pro kojence a z hlediska výživy je v jeho prvních šesti měsících jedinou potravinou (1). Jedná se o komplexní biologickou tekutinu obsahující lipidy, proteiny, sacharidy, vitaminy a minerály. Navíc komponenty mateřského mléka nabízejí kromě výživové úlohy ještě další důležité výhody, jako je stimulace tvorby a růstu ochranné mikrobioty, zvýšené vstřebávání vápníku, železa a dalších minerálních látek a podpora rozvoje centrální nervové soustavy (2). Tyto tzv. bioaktivní molekuly mateřského mléka představují velkou skupinu zahrnující růstové faktory (3), buňky (4), cytokiny (5), imunoglobuliny (6) a v neposlední řadě sacharidy včetně oligosacharidů (7, 8). Sacharidová frakce tvoří první a třetí nejvíce zastoupenou složku v mateřském mléce, a to v podobě mléčného disacharidu laktózy v koncentraci 70 g/l a oligosacharidů mateř-

ského mléka (OMM) v koncentraci 12–15 g/l ve zralém mléce a 20–23 g/l v kolostru (9).

Složení oligosacharidů mateřského mléka

Mateřské mléko je z hlediska struktury a rozmanitosti naprosto jedinečným zdrojem OMM složených ze 2 a více monosacharidových jednotek tvořených pouze z pěti základních stavebních kamenů L-fukózy, D-glukózy, D-galaktózy, N-acetylneuraminové kyseliny (kyseliny sialové) a N-acetylglukosaminu (10). Doposud bylo identifikováno přes 200 různých OMM od jednoduchých derivátů laktózy obsahující 3 monosacharidy až po komplexní polymery, které obsahují více než 20 monosacharidů (11). Jejich složení a variabilita se v průběhu laktace mění v závislosti na potřebách kojence a je podmíněno geneticky a environmentálně (12). Po genetické stránce je jejich složení závislé na sekretorickém a Lewis krevním systémem matky, které ovlivňují ex-

presi enzymů fukosyltransferáz (13, 14). Každé mateřské mléko je tedy z hlediska složení a koncentrace jednotlivých struktur oligosacharidů naprosto jedinečné (15).

Přibližně 1–3 % požitých OMM je absorbováno do krevního oběhu a vylučováno močí bez metabolické modifikace v hladinách, které korelují s jejich dietárním příjmem z mateřského mléka (16, 17, 18). Tyto oligosacharidy přítomné v plazmě kojenců se přes hematoencefalickou bariéru mohou dostávat do nezralého mozku, proto mají OMM účinek jak na lokální úrovni přímo na buňky lymfoidní tkáně spojené se sliznicí, tak na systémové úrovni, čímž přispívají k vývoji vrozeného i adaptivního imunitního systému (17, 18, 19). Zbýlých 97–99 % OMM odolá trávicím enzymům kojence a dosáhne distální části trávicího traktu, kde plní funkci prvních prebiotik, inhibuje adhezi patogenů, podporuje rozvoj mozku, pomáhá chránit epitelální bariéru a stimuluje imunitní systém (16, 20, 21, 22, 23). Z hlediska výživy

proto nemají oligosacharidy pro kojence velký význam.

Prebiotická funkce oligosacharidů mateřského mléka

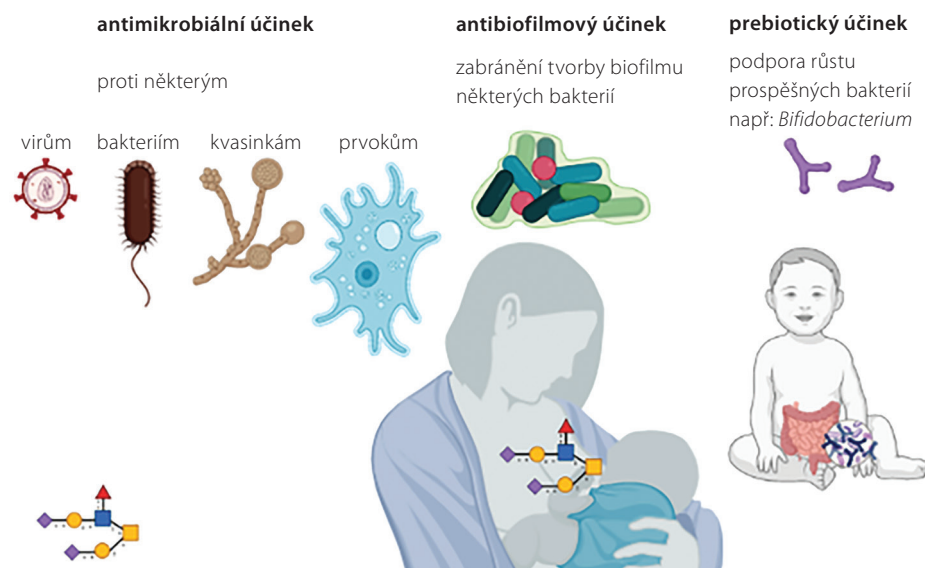
OMM jsou řazeny mezi prebiotika, podporují kolonizaci kojeneckého střeva potenciálně prospěšnými bakteriemi, zejména rodem *Bifidobacterium*, který disponuje potřebnými enzymy pro jejich degradaci (24, 25, 26). Z hlediska obsahu prebiotik je snaha mléčné výživy přiblížit se více mateřskému mléku a imitovat tak OMM přidáváním fruktooligosacharidů (FOS) a galaktooligosacharidů (GOS), které bohužel nejsou plně selektivní a mohou podporovat růst některých potenciálně patogeních bakterií (27, 28). OMM působí mnohem specifičtěji než FOS a GOS, jak bylo již výše zmíněno. Funkce OMM závisí na jejich struktuře, jak vyplývá se studií (22, 29, 30, 31, 32).

Antimikrobiální a antibiofilmové vlastnosti jednotlivých struktur oligosacharidů

V současnosti jsou některé kratší OMM průmyslově syntetizovány pomocí geneticky modifikovaných mikroorganismů a doplňovány do mléčných výživ, zatím se jedná o 2'-fukosyllaktózu (2'FL) nebo v kombinaci s 2'FL/lakto-N-neotetraózou (LNnT), tyto OMM dle předběžných studií jsou bezpečné a vytváří podobný růstový model jako mateřské mléko u kojených dětí (33, 34). Zda lze těchto účinků dosáhnout přidáním jediného OMM místo bohaté různorodé směsi OMM je v současné době předmětem řady studií (35, 36, 37).

Chemická struktura OMM je podobná struktuře buněčných povrchových glykanů (mucinu a glykolipidů), které slouží jako receptory pro vazbu patogenních bakterií a virů (38). Jejich antimikrobiální účinek byl popsán právě na bázi rozpustných receptorů, kdy napodobují receptory epiteliálních buněk, vytvoří vazbu s patogenem a spolu s ním jsou vyloučeny ven z těla nebo přímo receptor zablokuje, čímž znemožní mikroorganismu se na něj navázat (10). Tím mohou působit jak proti virům, bakteriím, kvasinkám, plísním i prvokům (23, 39). Antibakteriální účinek těchto tzv. rozpustných receptorů byl zatím pozorován u některých druhů oligosacharidů, jako je 2'FL, 3'sialyllaktóza (3'SL) a disialyllaktoza-N-tetraóza, které se váží na povrchové struktury enteropatogenních *Escherichia coli*, nebo dalších patogenů, jako jsou *Vibrio cholerae*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella sp.*, *Helicobacter pylori*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Entamoeba histolytica*, *Candida albicans*, HIV virus, noroviry (23, 39, 40). Jako návnadové receptory byly popsány v souvislosti se snížením rotavirové a chřipkové infekce také 3'SL, 6'sialyllaktóza (6'SL), LNnT (pouze u chřipky) a 2'FL, tak 3fukosyllaktóza (3FL) v souvislosti s redukcí virové zátěže respiračního syncytiálního viru (RSV) v epiteliálních buňkách dýchacích cest (41, 42, 43). Bylo zjištěno, že různé kmeny norovirů se váží na různé druhy OMM (vazba s lakto-N-fukopentaózou III (LNFP III)) a 2'FL se váží na jeden kmen noroviru VA387 a lakto-N-fukopentaózu I (LNFP I) a lakto-N-difukohexaóza (LNDHF I) (44). Každá struktura OMM tedy pravděpodobně z hlediska antimikrobiálních vlastností účinkuje proti jinému patogenu.

Obr. 1. Působení oligosacharidů mateřského mléka na mikroorganismy



Obrázek byl vytvořen v programu BioRender.

lyllaktoza-N-tetraóza, které se váží na povrchové struktury enteropatogenních *Escherichia coli*, nebo dalších patogenů, jako jsou *Vibrio cholerae*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella sp.*, *Helicobacter pylori*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Entamoeba histolytica*, *Candida albicans*, HIV virus, noroviry (23, 39, 40). Jako návnadové receptory byly popsány v souvislosti se snížením rotavirové a chřipkové infekce také 3'SL, 6'sialyllaktóza (6'SL), LNnT (pouze u chřipky) a 2'FL, tak 3fukosyllaktóza (3FL) v souvislosti s redukcí virové zátěže respiračního syncytiálního viru (RSV) v epiteliálních buňkách dýchacích cest (41, 42, 43). Bylo zjištěno, že různé kmeny norovirů se váží na různé druhy OMM (vazba s lakto-N-fukopentaózou III (LNFP III)) a 2'FL se váží na jeden kmen noroviru VA387 a lakto-N-fukopentaózu I (LNFP I) a lakto-N-difukohexaóza (LNDHF I) (44). Každá struktura OMM tedy pravděpodobně z hlediska antimikrobiálních vlastností účinkuje proti jinému patogenu.

Disialyllaktoza-N-tetraóza je účinný oligosacharid v prevenci nekrotizující enterokolitidy (střevní onemocnění zejména u předčasně narozených dětí s nízkou porodní hmotností), kdy bylo prokázáno, že s její rostoucí koncentrací v MM klesá riziko tohoto onemocnění, přesný mechanismus, ale nebyl zatím objasněn (45, 46).

Dále bylo zjištěno, že směs OMM vyzolovaných z MM má antibiofilmové a antimikrobiální vlastnosti proti *Streptococcus agalactiae* (GBS), antimikrobiální vlastnosti proti gramnegativnímu aerobnímu *Acinetobacter baumannii* a antibiofilmové vlastnosti proti methicilin-re-

zistentnímu *Staphylococcus aureus* (MRSA) (47, 48, 49). OMM neovlivňují již vytvořený biofilm *A. baumannii*, ale brání bakteriím ve vytvoření nového biofilmu, inhibují jejich přichycení k abiotickým povrchům a následnou adhezenci mezi buňkami a zráním biofilmu (49).

Závěr

Z uvedených důvodů má množství a variabilita struktur OMM význam v obraně kojence před infekcí a k tomu, abychom mohli tento terapeutický potenciál využít, je potřeba znát přesnou strukturu jednotlivých OMM a jejich vlastností. Zatím bylo pro svou antimikrobiální aktivitu testováno méně než 10 % OMM (23). Pokrok v chemické a chemoenzymatické syntéze OMM je tedy nezbytný k dosažení znalostí dalších oligosacharidových struktur a jejich bioaktivních vlastností. Zároveň je nutné pokračovat v dalším testování antimikrobiálních vlastností nově uměle syntetizovaných OMM proti dalším patogenním mikroorganismům. V budoucnu bychom možná místo předepisování antibiotik a antivirotek mohli užívat OMM, které nemají vedlejší účinky na zdraví, a proti kterým si mikroorganismy nejsou schopny vytvořit rezistenci.

Tato práce byla podpořena projektem výzkumné infrastruktury METROFOOD-CZ (č. grantu MŠMT: LM2018100) a METROFOOD-PP grantovým programem Evropské unie pro výzkum a inovace Horizont 2020 (smlouva č. 871083).

LITERATURA

1. Organization WH. Report of the expert consultation of the optimal duration of exclusive breastfeeding. Geneva, Switzerland: World health organisation; 28-30 March 2001.
2. Lönnnerdal B. Infant formula and infant nutrition: bioactive proteins of human milk and implications for composition of infant formulas. *The American journal of clinical nutrition*. 2014;99(3):712S-717S.
3. Vass RA, et al. Distribution of bioactive factors in human milk samples. *International breastfeeding journal*. 2019;14(1):1-10.
4. Cregan MD, et al. Identification of nestin-positive putative mammary stem cells in human breastmilk. *Cell and tissue research*. 2007;329(1):129-136.
5. Meki A-RM, et al. Interleukins-6, -8 and -10 and tumor necrosis factor- α and its soluble receptor I in human milk at different periods of lactation. *Nutrition research*. 2003;23(7): 845-855.
6. Savel'ev AN, et al. Amylolytic activity of IgG and sIgA immunoglobulins from human milk. *Clinica chimica acta*. 2001;314(1-2):141-152.
7. Coppa GV, et al. Changes in carbohydrate composition in human milk over 4 months of lactation. *Pediatrics*. 1993;91(3): 637-641.
8. Nijman RM, et al. Characterization and quantification of oligosaccharides in human milk and infant formula. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2018;66(26):6851-6859.
9. Gabrielli O, et al. Preterm milk oligosaccharides during the first month of lactation. *Pediatrics*. 2011;128(6):e1520-e1531.
10. Bode LE, Jantscher-Krenn. Structure-function relationships of human milk oligosaccharides. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*. 2012;3(3):383S-391S.
11. Thurl S, et al. Systematic review of the concentrations of oligosaccharides in human milk. *Nutrition Reviews*. 2017;75(11):920-933.
12. Erney R, et al. Human Milk Oligosaccharides, in *Bioactive Components of Human Milk*. Berlin: Springer; 2001:285-297.
13. Thurl S, et al. Detection of four human milk groups with respect to Lewis blood group dependent oligosaccharides. *Glycoconjugate journal*. 1997;14(7):795-799.
14. Stahl B, et al. Detection of four human milk groups with respect to Lewis-bloodgroup-dependent oligosaccharides by serologic and chromatographic analysis. In *Bioactive Components of Human Milk*. Berlin: Springer; 2001:299-306.
15. Thurl S, et al. Variation of human milk oligosaccharides in relation to milk groups and lactational periods. *British Journal of Nutrition*. 2010;104(9):1261.
16. Rudloff S, et al. Urinary excretion of in vivo ¹³C-labelled milk oligosaccharides in breastfed infants. *British Journal of Nutrition*. 2012;107(07):957-963.
17. Ruhaak LR, et al. Detection of milk oligosaccharides in plasma of infants. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2014; 406(24):5775-5784.
18. Goehring KC, et al. Direct evidence for the presence of human milk oligosaccharides in the circulation of breastfed infants. *PLoS one*. 2014;9(7):e101692.
19. Dotz V, Kunz C. Letter to the editor regarding „A quantitative and comprehensive method to analyze human milk oligosaccharide structures in the urine and feces of infants“. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2013;405(24): 7897-7897.
20. Bode L. Human milk oligosaccharides: prebiotics and beyond. *Nutrition reviews*. 2009;67(s2):S183-S191.
21. Gnath MJ, et al. Human milk oligosaccharides are minimally digested in vitro. *The Journal of nutrition*. 2000;130(12): 3014-3020.
22. Jantscher-Krenn E, et al. The human milk oligosaccharide disialyllacto-N-tetraose prevents necrotising enterocolitis in neonatal rats. *Gut*. 2012;61(10):1417-1425.
23. Moore RE, Xu LL, Townsend SD. Prospecting human milk oligosaccharides as a defense against viral infections. *ACS infectious diseases*. 2021;7(2):254-263.
24. Sela DA, et al. An infant-associated bacterial commensal utilizes breast milk sialyloligosaccharides. *Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(14):11909-11918.
25. Sela DA, et al. Bifidobacterium longum subsp infantis ATCC 15697 α -Fucosidases Are Active on Fucosylated Human Milk Oligosaccharides. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012;78(3):795-803.
26. Musilova S, et al. Assessment of the synbiotic properties of human milk oligosaccharides and Bifidobacterium longum subsp. infantis in vitro and in humanised mice. *Beneficial Microbes*. 2017:1-9.
27. Bunešová V, et al. Growth of infant fecal bacteria on commercial prebiotics. *Folia Microbiologica*. 2012;57(4): 273-275.
28. Vivatkin B, et al. Effect of a whey-predominant starter formula containing LCPUFAs and oligosaccharides (FOS/GOS) on gastrointestinal comfort in infants. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*. 2010;19(4):473-480.
29. Bode L, et al. Human milk oligosaccharides reduce platelet-neutrophil complex formation leading to a decrease in neutrophil β 2 integrin expression. *Journal of Leukocyte Biology*. 2004;76(4):820-826.
30. Bode L, et al. Inhibition of monocyte, lymphocyte, and neutrophil adhesion to endothelial cells by human milk oligosaccharides. *Thrombosis and haemostasis* stutt gart. 2004;92:1402-1410.
31. Morrow AL, et al. Human-milk glycans that inhibit pathogen binding protect breast-feeding infants against infectious diarrhea. *The Journal of nutrition*. 2005;135(5):1304-1307.
32. Ruiz-Palacios GM, et al. Campylobacter jejuni binds intestinal H (O) antigen (Fuc α 1, 2Gal β 1, 4GlcNAc), and fucosyloligosaccharides of human milk inhibit its binding and infection. *Journal of biological chemistry*. 2003;278(16): 14112-14120.
33. Vandenplas Y, et al. Human milk oligosaccharides: 2'-fucosyllactose (2'-FL) and lacto-N-neotetraose (LNnT) in infant formula. *Nutrients*. 2018;10(9):1161.
34. Puccio G, et al. Effects of infant formula with human milk oligosaccharides on growth and morbidity: a randomized multicenter trial. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2017;64(4):624.
35. Cheng L, et al. Human milk oligosaccharides and its acid hydrolysate LNT2 show immunomodulatory effects via TLRs in a dose and structure-dependent way. *Journal of Functional Foods*. 2019;59:174-184.
36. Kong C, et al. Modulation of intestinal epithelial glycocalyx development by human milk oligosaccharides and non-digestible carbohydrates. *Molecular nutrition & food research*. 2019;63(17):1900303.
37. Salli K, et al. The effect of 2'-fucosyllactose on simulated infant gut microbiome and metabolites; a pilot study in comparison to GOS and lactose. *Scientific reports*. 2019;9(1):1-15.
38. Kunz C, et al. Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects. *Annual review of nutrition*. 2000;20(1):699-722.
39. Bode L. Human milk oligosaccharides: structure and functions. *Milk, Mucosal Immunity and the Microbiome: Impact on the Neonate*. 2020;94:115-123.
40. Bode L. Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama. *Glycobiology*. 2012;22(9):1147-1162.
41. Duska-McEwen G, et al. Human milk oligosaccharides enhance innate immunity to respiratory syncytial virus and influenza in vitro. *Food and Nutrition Sciences*. 2014.
42. Zevgiti S, et al. Sialic acid and sialyl-lactose glyco-conjugates: design, synthesis and binding assays to lectins and swine influenza H1N1 virus. *Journal of Peptide Science*. 2012;18(1):52-58.
43. Triantis V, Bode L, Neerven van RJ. Immunological effects of human milk oligosaccharides. *Frontiers in pediatrics*. 2018: 190.
44. Shang J, et al. Identifying human milk glycans that inhibit norovirus binding using surface plasmon resonance. *Glycobiology*. 2013;23(12):1491-1498.
45. Bode L. Human milk oligosaccharides at the interface of maternal-infant health. *Breastfeeding Medicine*. 2018; 13(S1):S-7-S-8.
46. Autran CA, et al. Human milk oligosaccharide composition predicts risk of necrotising enterocolitis in preterm infants. *Gut*. 2018;67(6): p. 1064-1070.
47. Ackerman DL. Human Milk Oligosaccharides as a Defense Against Group B Streptococcus. USA: Vanderbilt University; 2018.
48. Craft KM, Gaddy JA, Townsend SD. Human milk oligosaccharides (HMOs) sensitize group B Streptococcus to clindamycin, erythromycin, gentamicin, and minocycline on a strain specific basis. *ACS Chemical Biology*. 2018;13(8): 2020-2026.
49. Ackerman DL, et al. Antimicrobial and antibiofilm activity of human milk oligosaccharides against Streptococcus agalactiae, Staphylococcus aureus, and Acinetobacter baumannii. *ACS infectious diseases*. 2017;4(3):315-324.