

Received: 2015.02.03
Accepted: 2015.06.09
Published: 2015.07.22

Znaczenie fukozylowanych glikokoniugatów mleka ludzkiego w żywieniu noworodków i niemowląt

The significance of fucosylated glycoconjugates of human milk in nutrition of newborns and infants

Jolanta Lis-Kuberka, Magdalena Orczyk-Pawiłowicz

Katedra i Zakład Chemii i Immunochemii, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Streszczenie

Mleko ludzkie jest niezwykle złożoną wydzieliną bogatą w biologicznie aktywne glikokoniugaty, do których zalicza się wolne oligosacharydy, glikoproteiny, glikolipidy oraz glikozaminoglikany. Obecne w mleku ludzkim α 1-2-fukozylowane glikokoniugaty są składową wrodzonego układu odpornościowego i stanowią dodatkową linię obrony dla niemowląt. Udział fukozylowanych glikotopów w hamowaniu infekcji wywołanych przez niektóre bakterie i/lub wirusy polega na blokowaniu receptorów lektynowych patogenu. Obecne w mleku wolne fukozylowane glikokoniugaty są rozpoznawane i wiązane przez receptory lektynowe bakterii i/lub wirusów, co uniemożliwia adhezję patogenu do komórek nabłonkowych gospodarza i rozwój infekcji. Skuteczność fukozylowanych glikokoniugatów mleka ludzkiego w hamowaniu adhezji patogenów została potwierdzona m.in. dla *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica*, rotawirusów, HIV, norowirusów. W hamowaniu adhezji patogenów do komórek nabłonkowych ważną rolę odgrywa status wydzielacza/niewydzielacza. Jest to szczególnie istotne u kobiet karmiących o statusie niewydzielacza, których mleko nie zawiera α 1-2-fukozylowanych glikokoniugatów i ma potencjalnie mniejsze właściwości przeciwmikrobiologiczne. Fukozylowane glikokoniugaty mleka ludzkiego są także jednym ze źródeł energii dla bakterii tworzących fizjologiczną florę bakteryjną (*Bifidobacterium*), a także korzystnie wpływają na perystaltykę jelit oraz pośrednio stymulują centralny system nerwowy niemowląt. Ponadto w porównaniu z mlekiem ludzkim, w mleku krowim, zawartość fukozylowanych glikokoniugatów jest bardzo mała i nie zapewnia właściwej ochrony. Jest to szczególnie istotne w żywieniu i powinno być uwzględnione podczas wprowadzania do żywienia niemowląt mieszanek produkowanych na bazie mleka krowiego. W pracy omówiono stan wiedzy na temat glikokoniugatów mleka ludzkiego, ze szczególnym uwzględnieniem α 1-2-fukozylowanych wolnych oligosacharydów i glikoprotein oraz omówiono znaczenie fukozylowanych glikokoniugatów mleka ludzkiego w żywieniu noworodków i niemowląt.

Słowa kluczowe:

fukozylowane glikokoniugaty mleka ludzkiego • α 1-2-fukozylowany glikotop • oligosacharydy mleka ludzkiego • oddziaływanie typu patogen-gospodarz • status wydzielacza/niewydzielacza • żywienie niemowląt

Summary

Human milk is extremely complex secretion rich in biologically active glycoconjugates including free oligosaccharides, glycoproteins, glycolipids, and glycosaminoglycans. Alpha1-2-fucosylated glycoconjugates of human milk are component of the innate immune system and provide an additional defense for infants. Participation of fucosylated glycotopes in the inhibition of infections caused by some bacteria and/or viruses rely on blocking of lectin-receptors of pathogen. Free fucosylated glycoconjugates present in milk are recognized and bound by the lectin-receptors of bacteria and/or viruses, and prevent pathogens adhesion to host epithelial

cells and development of infection. So far, the efficacy of fucosylated glycoconjugates of human milk in the inhibition of adhesion has been confirmed for *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica*, Rotaviruses, HIV, and Noroviruses. In this process the secretor/nonsecretor status of mother plays an important role. This is particularly important for the women who are nonsecretors and whose milk does not contain α 1-2-fucosylated glycoconjugates and has reduced anti-microbial properties. Fucosylated glycoconjugates of milk are also one of the energy sources for physiological bacterial flora (*Bifidobacterium*), and have a positive impact on the intestinal peristalsis, and indirectly stimulate the central nervous system of infants. Furthermore, compared to human milk, the content of fucosylated glycoconjugates of cow's milk is very low and does not provide adequate protection. This fact is particularly important in terms of nutrition and should be taken into consideration when artificial mixtures based on cows' milk are used. The paper presents the current state of knowledge on human milk glycoconjugates, particularly on α 1-2-fucosylated free oligosaccharides and glycoproteins, and discusses the significance of fucosylated glycoconjugates of human milk in the nutrition of newborns and infants.

Keywords: fucosylated glycoconjugates of human milk • α 1-2-fucosylated glycotop • human milk oligosaccharides • interaction between host and pathogen • secretor/nonsecretor status • infants nutrition

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1162561>

Word count: 2621
Tables: 5
Figures: 5
References: 125

Adres autorki: dr Magdalena Orczyk-Pawiłowicz, Katedra i Zakład Chemii i Immunochemii, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, ul. Bujwida 44a, 50-345 Wrocław; e-mail: magdalena.orczyk-pawilowicz@umed.wroc.pl

Wykaz skrótów:

2'-FL – 2'-fukozylo laktoza (2'-fucosyllactose); **3-FL** – 3-fukozylo laktoza (3-fucosyllactose); **6'-SL** – 6'-sjalolaktoza (6'-sialyllactose); **AGP** – α 1-kwaśna glikoproteina (α 1-acid glycoprotein); **Asn** – asparagina (asparagine); **BSSL** – lipaza stymulowana solami żółciowymi (bile-salt-stimulated lipase); **DC-SIGN** – receptor komórek dendrytycznych, nieintegryna swoista dla komórek dendrytycznych chwytająca ICAM-3 (dendritic cell receptor, dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin); **ESPGHAN** – Komitet ds. Żywnienia Europejskiego Towarzystwa Gastroenterologii, Hepatologii i Żywnienia Dzieci (European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition); **FOSS** – fruktooligosacharydy (fructooligosaccharides); **Fuc** – fukoza (fucose); **FucTs** – fukozylotransferazy (fucosyltransferases); **FUT1-13** – geny kodujące fukozylotransferazy (fucosyltransferase genes); **GAGs** – glikozaminoglikany (glycosaminoglycans); **Gal** – galaktoza (galactose); **GALT** – tkanka limfatyczna związana z przewodem pokarmowym (gut associated lymphoid tissue); **Glc** – glukoza (glucose); **GlcNAc** – N-acetyloglukozamina (N-acetylglucosamine); **GOSS** – galaktooligosacharydy (galactooligosaccharides); **PNG-aza F** – glikopeptydaza F (glycopeptidase F); **Hex** – heksoza (hexose), **HexNAc** – N-acetylo-heksozoamina (N-acetylhexosamine), **HIV** – ludzki wirus niedoboru odporności (human immunodeficiency virus); **HMOs** – wolne oligosacharydy mleka ludzkiego (human milk oligosaccharides); **LNDFH I** – lakto-N-dwufukoheksasacharyd I (lacto-N-difucohexaose I); **Le** – antygeny grupowe krwi Lewis (Lewis blood group antigens); **LF** – laktoferyna (lactoferrin); **LNFP** – lakto-N-fukopentasacharyd (lacto-N-fucopentaose); **LNT** – lakto-N-tetrasacharyd (lacto-N-tetraose); **MALT** – tkanka limfatyczna związana z błonami śluzowymi (mucosa associated lymphoid tissue); **Man** – mannoza (mannose); **MFGM** – białka związane z frakcją tłuszczową mleka (milk fat globule membrane); **MUC** – mucyny (mucin); **NEC** – martwicze zapalenie jelit i okrężnicy (necrotizing enterocolitis); **Neu5Ac** – kwas sjalowy (N-acetylneuraminic acid); **OSTs** – geny kodujące oligosacharydotransferazy (oligosaccharyltransferase genes); **pIgR** – prekursor receptora polimerycznych Ig (polymeric immunoglobulin receptor precursor); **Se⁺/Se⁻** – status wydzielacz/niewydzielacz (secretor/non-secretor); **Ser** – seryna (serine); **S-IgA** – wydzielnicza IgA (secretory IgA); **THBS** – trombospodyna (thrombospondin); **Thr** – treonina (threonine).

WPROWADZENIE

Według wytycznych Komitetu ds. Żywienia Europejskiego Towarzystwa Gastroenterologii Hepatologii i Żywienia Dzieci (ESPGHAN) mleko matki jest dla dziecka najlepszym pokarmem, którego nie można zastąpić sztucznymi mieszkankami mlecznymi na bazie mleka krowiego [38]. Rekomendacja mleka ludzkiego jako najlepszego sposobu żywienia noworodków i niemowląt jest związana z unikalnym składem, które oprócz składników odżywczych (białek, tłuszczów, cukrów i elementów nieorganicznych) zawiera także wiele związków bioaktywnych: hormony, enzymy, cytokiny, witaminy i czynniki wzrostu. Mleko ludzkie zawiera białka (m.in. immunoglobuliny, lizozym, laktoferynę) oraz komórki (m.in. makrofagi, limfocyty, neutrofile), które wspierają niedojrzały system immunologiczny noworodka i chronią go przed infekcjami spowodowanymi przez niektóre wirusy i bakterie. Wyjątkowe właściwości mleka ludzkiego wiążą się także z obecnością znacznej ilości biologicznie aktywnych glikokoniugatów, do których zalicza się: wolne oligosacharydy, glikoproteiny (m.in. wydzielniczą IgA i laktoferynę), glikolipidy oraz glikozaminoglikany [1,10,33,53,62]. Bioaktywne składniki mleka ludzkiego są szczególnie cenne dla dzieci urodzonych przedwcześnie oraz dla dzieci z małą masą urodzeniową, dla których mleko matki jest nie tylko pokarmem, ale również lekiem, który wpływa na działanie układu pokarmowego i nerwowego, a także ogranicza ryzyko wystąpienia martwiczego zapalenia jelit (NEC) oraz retinopatii wcześniaków [33,94]. Z tego powodu mleko kobiece w oddziałach intensywnej terapii i patologii noworodka jest traktowane jako „złoty pokarm”, który jest nieodłącznym elementem opieki postnatalnej [35,119].

GLIKOKONIUGATY MLEKA LUDZKIEGO

Glikozylacja jest jednym z najpowszechniejszych i najbardziej zróżnicowanych sposobów potranslacyjnej modyfikacji białek, warunkującym ich aktywność i określone funkcje biologiczne. W mleku ludzkim glikoproteiny stanowią ponad 70% wszystkich białek i są odpowiedzialne za właściwości biomodulacyjne oraz jakość odżywczą mleka. Oprócz glikoprotein, w mleku ludzkim są obecne jeszcze inne glikokoniugaty: wolne oligosacharydy (HMOs – human milk oligosaccharides), glikolipidy oraz glikozaminoglikany (GAGs) [22,43,44,63,79,91]. HMOs zawierają w swojej strukturze: Glc, Gal, GlcNAc, natomiast w skład glikanów glikoprotein wchodzi: Gal, GalNAc, GlcNAc i Man. Ponadto do wolnych łańcuchów cukrowych HMOs oraz do N- i O-glikanów glikoprotein mogą być dołączone w pozycji końcowej fukoza (Fuc) i/lub kwas sjałowy (Neu5Ac). Przyłączenie fukozy i kwasu sjałowego, podobnie jak innych monosacharydów tworzących łańcuch cukrowy jest kontrolowane enzymatycznie przez odpowiednie glikozylotransferazy [82,109]. Współdziałanie glikozylotransferaz warunkuje powstawanie niezwykle zróżnicowanej grupy glikokoniugatów.

SYNTEZA FUKOZYLOWANYCH GLIKANÓW A STATUS WYDZIELACZA

Glikokoniugaty zawierające L-fukozę są szczególnie istotne dla procesów fizjologicznych (reakcje biologicznego rozpoznania i interakcje typu komórka-komórka) i patologicznych (bakteryjne i wirusowe zakażenia, przerzutowanie nowotworów, niektóre choroby o podłożu genetycznym, np. niedobory odporności związane z wadliwą glikozylacją czy mukowiscydoza) [9,56,106,109].

W ludzkim genomie zidentyfikowano geny *FUT1-13* kodujące 13 fukozylotransferaz (FucTs). Enzymy te katalizują przeniesienie L-fukozy z guanozynodwufosforanu L-fukozy (GDP-Fuc) na akceptor, którym może być syntetyzowany HMO lub łańcuch cukrowy glikoprotein [82,109]. Ekspresja fukozylotransferaz zależy od rodzaju tkanki, etapu rozwoju oraz statusu fizjologicznego komórek (w przypadku gruczołu sutkowego – od okresu laktacji) [8,82,106]. Z tego powodu glikany białek wytwarzanych przez komórki nabłonkowe gruczołu sutkowego mogą się strukturalnie różnić od analogicznych cząsteczek syntetyzowanych w wątrobie lub wytwarzanych przez neutrofile (np. laktoferyna) i obecnych w osoczu.

Geny *FUT1* i *FUT2* kodują odpowiednio FucT I i FucT II, a oba są α 1-2-fukozylotransferazą, która odpowiada za przyłączenie L-fukozy wiązaniem α 1-2 glikozydowym do galaktozy glikanów: FucT I do Gal β 1-3GlcNAc i FucT II do Gal β 1-4GlcNAc. Fukozylotransferazy I i II są odpowiedzialne za syntezę antygeny grupowego krwi H. Do antygeny H, z udziałem transferazy A lub B, mogą być przyłączone wiązaniem α 1-3 glikozydowym GalNAc lub Gal, co prowadzi do powstania odpowiednio antygeny A lub B. Obecność α 1-2-fukozylowanego glikotopu na glikokoniugatach tkanek oraz wydzielin ustrojowych (ślina, mleko, nasienie itp.) stała się podstawą do podziału populacji ludzi na 2 grupy: wydzielaczy – Se⁺ (secretor) oraz niewydzielaczy – Se⁻ (nonsecretor) [17,108,109].

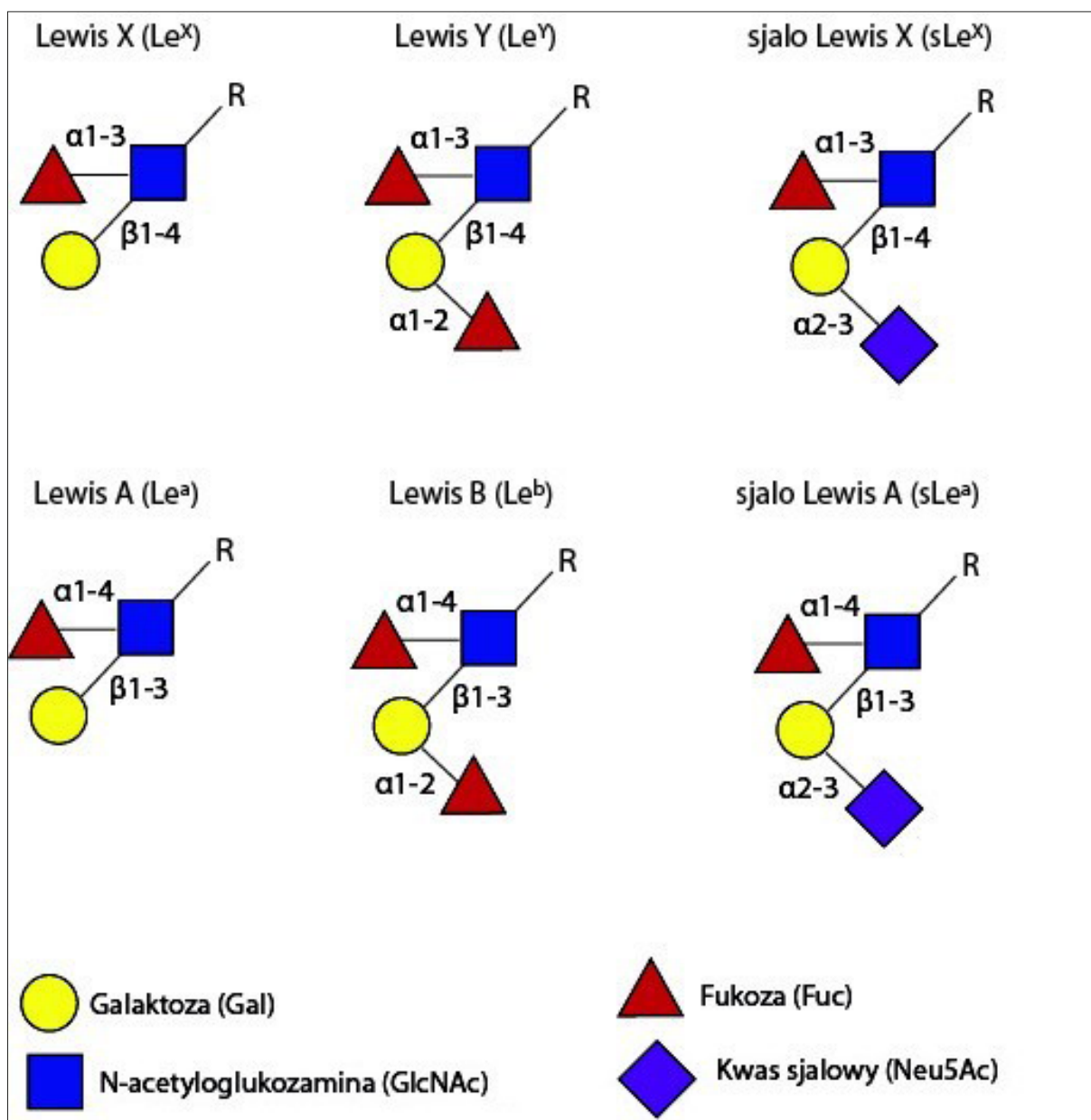
Geny *FUT3-7* oraz *FUT9*, a także prawdopodobnie *FUT10* i *FUT11* kodują α 1-3-fukozylotransferazę, a geny *FUT3* i *FUT5* kodują dodatkowo α 1-4-fukozylotransferazę. Fukozylotransferazy: III, IV, V, VI, VII oraz IX są odpowiedzialne za ostatni etap syntezy tzw. antygenów grupowych krwi układu Lewis (Le^x, Le^y, Le^a, Le^b, sLe^x, sLe^a) (ryc. 1) [108,109]. W wyniku działania α 1-2- oraz α 1-3/4-fukozylotransferaz, powstaje glikotop Le^b (Se⁺/Le⁺), który występuje u ~70% populacji europejskiej. Mutacje genów *FUT2* i *FUT3* są odpowiedzialne za brak syntezy glikotopów zawierających fukozy przyłączone wiązaniem glikozydowym α 1-2 oraz α 1-3/4, a osoby o takim fenotypie (Se⁻/Le⁻) stanowią jedynie ~1% populacji europejskiej [113]. Możliwe jest również występowanie glikanów zawierających tylko glikotop α 1-2-Fuc (Se⁺/Le⁻) lub α 1-3/4-Fuc (Se⁻/Le⁺) (ryc. 2). Osoby o takich fenotypach stanowią odpowiednio ~9% i ~20% populacji europejskiej [32,108].

Gen *FUT8* koduje α 1-6-fukozylotransferazę, enzym odpowiedzialny za przyłączenie tzw. fukozy rdzeniowej do

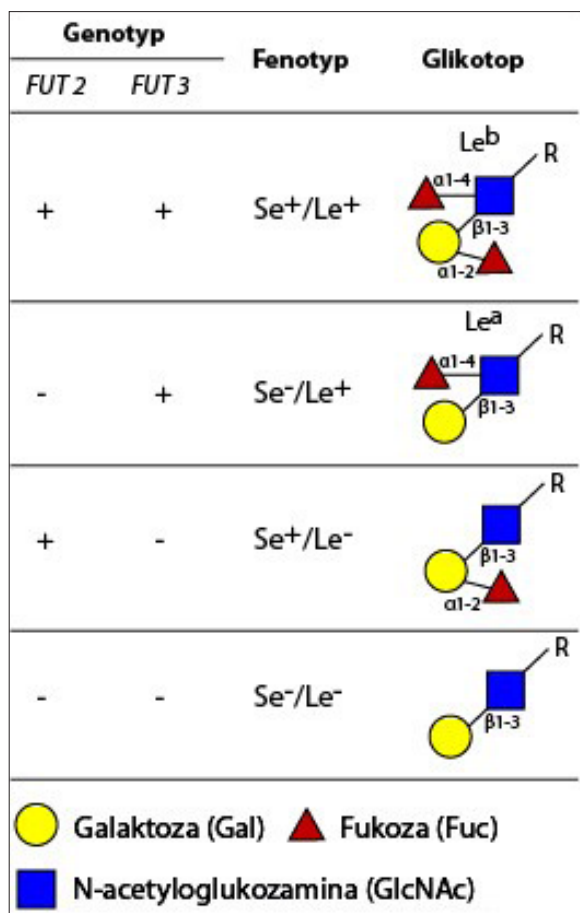
GlcNAc N-glikanów glikoprotein. Rdzeniowa fukozylacja N-glikanów jest charakterystyczna dla glikoprotein wytwarzanych przez komórki wątroby i jest szczególnie ważna dla prawidłowej struktury przestrzennej białka, a także jego funkcji biologicznych [109].

Geny *FUT12* oraz *FUT13* kodują O-fukozylotransferazy (PO-FucT-I oraz PO-FucT-II) kontrolujące przyłączenie Fuc bezpośrednio do Ser/Thr łańcucha polipeptydowego czynnika wzrostu naskórka (EGF) oraz trombospodyny (THBS) [9,82,109].

W mleku ludzkim zidentyfikowano do tej pory obecność wielu fukozylowanych oligosacharydów oraz glikoprotein i choć znane są przykłady fukozylowanych glikolipidów, to brak danych dotyczących ich obecności w mleku [43]. Przykłady struktur HMOs oraz glikanów glikoprotein z fukozylowanymi glikotopami przedstawiono w tabeli 1. W HMOs jest możliwe przyłączenie fukozy wiązaniem α 1-2 do galaktozy i/lub α 1-3/4 do N-acetyloglucozaminy. Natomiast w łańcuchu cukrowym glikoprotein fukoza może być przyłączona wiązaniem α 1-2-, α 1-3/4- oraz α 1-6 [95,109].



Ryc. 1. Struktura antygenów grupowych krwi układu Lewis; R – struktury oligosacharydowe glikokoniuugatów, które mogą występować w antenach N- i O-glikanów glikoprotein i/lub glikolipidów i/lub wolnych oligosacharydów (wg [9,82])



Ryc. 2. Genotypy i fenotypy determinujące status wydzielacza i niewydzielacza. Struktura glikotopów HMOs oraz glikanów glikoprotein jest zależna od ekspresji genu *FUT2*, kodującego α 1-2-fukozylotransferazę oraz genu *FUT3*, kodującego α 1-3/4-fukozylotransferazę. Na podstawie obecności i/lub braku produktów ekspresji genów, wyróżnia się 4 fenotypy: Se⁺/Le⁺, Se⁺/Le⁻, Se⁻/Le⁺, Se⁻/Le⁻. Obecność produktu/ów ekspresji genów: *FUT2* i *FUT3* warunkuje syntezę glikotopu zawierającego α 1-2- oraz α 1-3/4-Fuc, *FUT2* warunkuje syntezę glikotopu zawierającego α 1-2-Fuc, *FUT3* warunkuje syntezę glikotopu zawierającego α 1-3/4-Fuc; *FUT2* – gen kodujący fukozylotransferazę FucT α 1-2; *FUT3* – gen kodujący fukozylotransferazę FucT α 1-3/4; Le – antygeny grupowe krwi Lewis; Le^a – antygen grupowy krwi Lewis^a; Le^b – antygen grupowy krwi Lewis^b; R – rdzeń cukrowy wolnych oligosacharydów i/lub anteny N- i O-glikanów glikoprotein; Se⁺/Se⁻ – status wydzielacz/ niewydzielacz (wg [15,17,108])

FUKOZYLOWANE WOLNE OLIGOSACHARYDY MLEKA LUDZKIEGO

Wolne oligosacharydy mleka, oprócz laktozy i kwasów tłuszczowych, są najliczniejszą grupą związków w mleku ludzkim [16,17]. Częścieczki te nie są lub są w niewielkim stopniu hydrolizowane przez enzymy śliny, rąbka szczołeczkowego jelita cienkiego, a także soku trzustkowego wydzielanego do dwunastnicy [37,45]. Z nielicznych doniesień wynika jednak, że glikokoniugaty mleka ludzkiego, w tym HMOs, mogą być w niewielkim stopniu hydrolizowane przez glikozydazy

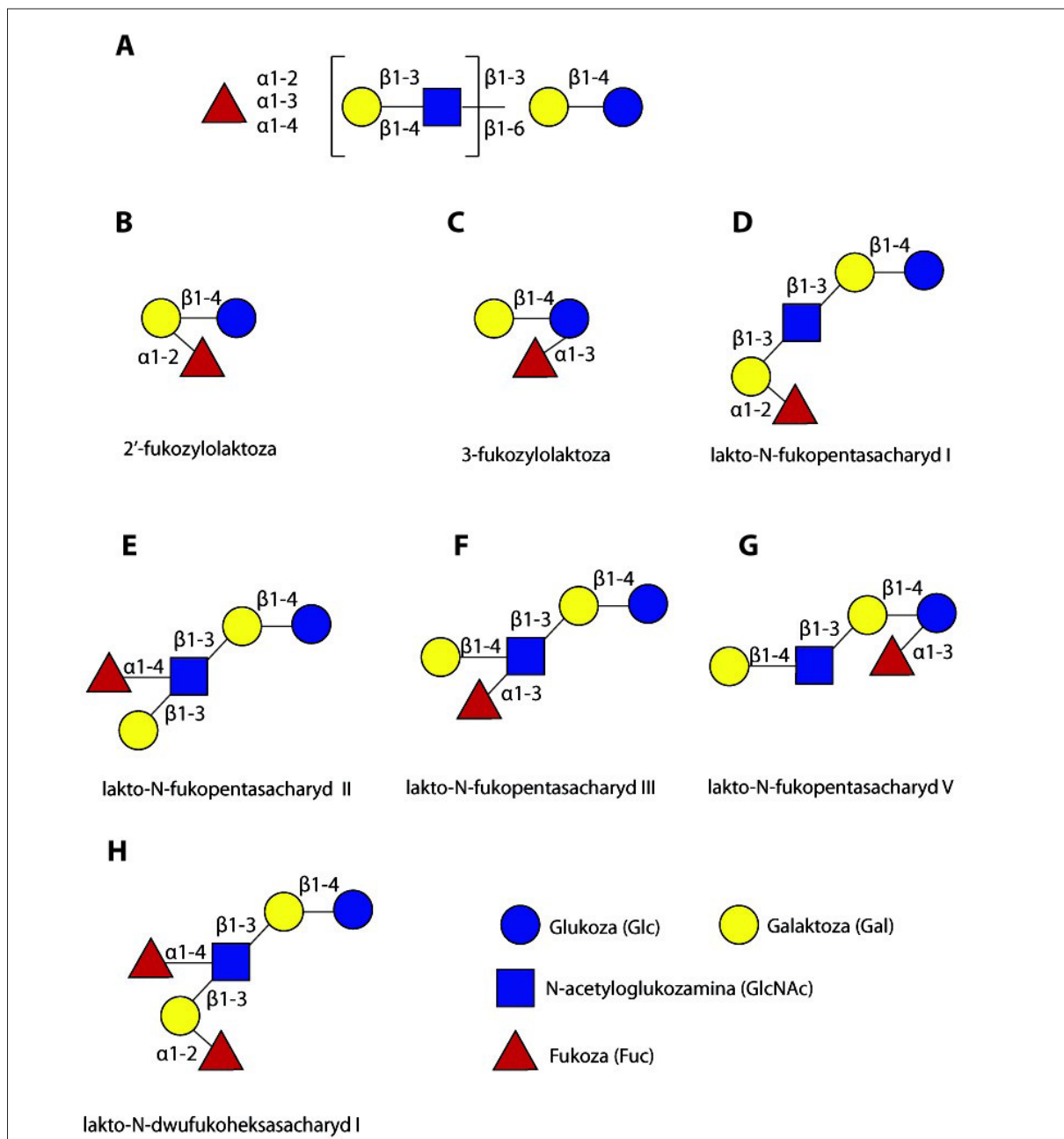
Tabela 1. Występowanie fukozylowanych glikotopów na glikokoniugatach mleka ludzkiego

Oligosacharyd mleka	Glikotop	Glikokoniugat	Piśmiennictwo
Wolne oligosacharydy mleka ludzkiego (HMOs)	α 1-2-Fuc	2'-FL, LNFP I,	[17,32,79]
	α 1-3-Fuc	3-FL, LNFP III, LNFP V	[17,32,79]
	α 1-4-Fuc	LNFP II	[17,32,79]
	α 1-2-Fuc	BSSL, S-IgA, laktoferyna, fibronektyna, AGP, MFGM	[8,83,84,95,98,118]
0- i/lub N-glikany glikoprotein	α 1-3-Fuc	BSSL, MUC1, S-IgA, AGP, laktoferyna, fibronektyna	[78,83,84,86,95,122]
	α 1-4-Fuc	S-IgA, MFGM	[95,118,122]
	α 1-6-Fuc*	MUC1, AGP, laktoferyna, fibronektyna	[83,84,86]

*dotyczy tylko N-glikanów glikoprotein; AGP – α -kwasna glikoproteina, BSSL – lipaza stymulowana kwasami żołącowymi, FL – fukozyllaktoza, LNFP – lakto-N-fukopentaszacharyd, S-IgA – wydzielniczka immunoglobulina A, MFGM – białka związane z frakcją tłuszczową mleka, MUC – mucyna

(α -L-fukozydazy i neuraminidazy) wydzielane do mleka przez komórki nabłonkowe gruczołu sutkowego [117]. Docierające do jelit dziecka, niezhydrolizowane i/lub częściowo zhydrolizowane HMOs mogą być absorbowane, dzięki czemu jest możliwe ich przedostawanie się do krwiobiegu, gdzie mogą działać jako cząsteczki immunomodulujące, wpływając m.in. na przyłączanie neutrofilów do komórek śródbłonna [46,110]. Większość HMOs dociera jednak w nienaruszonej postaci do jelita grubego, gdzie działa jako prebiotyk, stymulując wzrost korzystnych dla noworodków i niemowląt mikroorganizmów, takich jak *Bifidobacterium*. Inną, niezwykle ważną właściwością HMOs jest możliwość hamowania infekcji wywołanych przez niektóre patogeny. Wiąże się to z występowaniem homologii między glikanami na powierzchni komórek nabłonkowych gospodarza, a strukturami cukrowymi oligosacharydów. HMOs hamowały adhezję patogenów do komórek nabłonkowych gospodarza m.in. w żołądku, jelicie cienkim, okrężnicy, a także gardzieli i układzie moczowym [16,17,37,110].

Dotąd scharakteryzowano ponad 200 różnych struktur oligosacharydów mleka ludzkiego (zbudowanych z 3-22



Ryc. 3. Struktury wybranych fukozylowanych wolnych oligosacharydów mleka ludzkiego (HMOs); A - rdzeń oligosacharydów – laktoza może przyłączać monomery fukozy tworząc trójsacharydy, tj. B - 2'-fukozyloaktoza, C - 3-fukozyloaktoza. W mleku ludzkim są obecne również większe struktury cukrowe m.in. D, E, F, G - lakto-N-fukopentasacharyd, H – lakto-N-dwufukoheksasacharyd oraz inne (wg [15,16,17])

cukrów prostych) [43,120,121], których stężenie w mleku matki zmienia się w zależności od tygodnia zakończenia ciąży oraz okresu laktacji [6,23,32]. Synteza HMOs zachodzi w aparacie Golgiego komórek pęcherzykowatych gruczołu sutkowego matki i rozpoczyna się od enzymatycznego przyłączenia do końca redukującego laktozy (Gal β 1-4Glc) kolejnych monosacharydów (GlcNAc, Gal, Fuc, Neu5Ac) [15,16,17]. W zależności od obecności kwasu sjałowego, HMOs dzieli się na oligosacharydy

kwaśne (z ładunkiem pochodzącym od kwasu sjałowego) i oligosacharydy obojętne. Najprostszymi fukozylowanymi trójsacharydami powstałymi w wyniku przyłączenia do końca redukującego laktozy są 2'-fukozyloaktoza (2'-FL) oraz 3-fukozyloaktoza (3-FL). W wyniku dołączenia fukozy do lakto-N-tetrasacharydu (LNT) mogą powstawać m.in.: lakto-N-fukopentasacharyd I, II, III, V (LNFP I, II, III, V) oraz lakto-N-dwufukoheksasacharyd I (LNDFH I) (ryc. 3) [15,16,17].

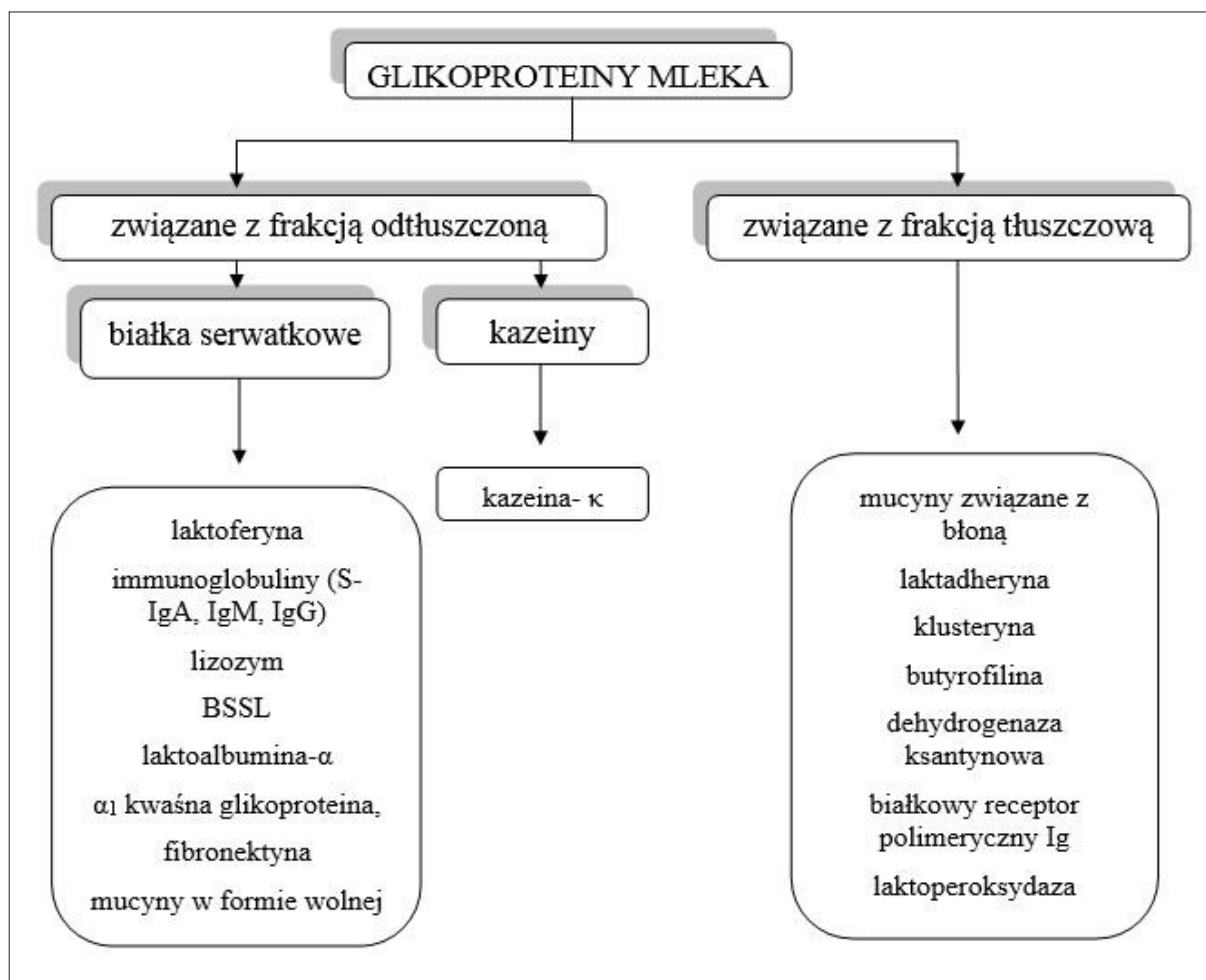
Według Coppa i wsp. najwyższe stężenie HMOs występuje w sianie i wynosi 20-23 g/L, a następnie spada i w mleku dojrzalym wynosi 12-14 g/L [23]. Istotny wpływ na ilość HMOs w mleku ludzkim ma status wydzielacza, determinowany obecnością genu *FUT2* kodującego enzym α 1-2-fukozylotransferazę, odpowiedzialny za przyłączenie fukozy wiazaniem α 1-2-glikozydowym do galaktozy. Zawartość HMOs w mleku matek-wydzielaczy (Se^+) jest większa w porównaniu z mlekiem matek-niewydzielaczy (Se^-), co jest spowodowane obecnością α 1-2-fukozylowanych oligosacharydów u tych pierwszych [108]. W badaniach Totten i wsp. obserwowano istotne statystycznie różnice między procentową zawartością fukozylowanych HMOs w mleku matek-wydzielaczy oraz niewydzielaczy (odpowiednio 50,5±6,85% i 34,7±8,99%) [108]. Natomiast zawartość sjalowanych oraz obojętnych niefukozylowanych oligosacharydów była podobna w obu analizowanych grupach [108]. Oprócz ilościowych zmian w stężeniu HMOs wykazano, że stosunek stężenia α 1-2 fukozylowanych HMOs do α 1-3/4 fukozylowanych HMOs w mleku matki zmienia się z 5:1 do 1:1 w ciągu pierwszego roku laktacji [20].

Na stężenie HMOs w mleku ludzkim wpływa także tydzień zakończenia ciąży. Według De Leoz i wsp. [32]

w mleku kobiet, które urodziły przedwcześnie występują ilościowe i jakościowe zmiany wolnych oligosacharydów mleka. Największe różnice między mlekiem matek, które urodziły przedwcześnie w porównaniu z mlekiem matek, które urodziły w terminie, obserwuje się w pierwszym tygodniu laktacji, tj. w sianie. Całkowite stężenie HMOs w mleku kobiet, które urodziły przedwcześnie jest większe, aczkolwiek procentowa zawartość fukozylowanych HMOs jest niższa (52,8%) w porównaniu z HMOs mleka matek, które urodziły w terminie (63,5%) [32]. Różnice te wynikają z niedojrzałości gruczołu sutkowego [32].

FUKOZYLOWANE GLIKOPROTEINY MLEKA LUDZKIEGO

Glikoproteiny mleka to niezwykle duża i różnorodna grupa, która jest zaangażowana w liczne procesy biologiczne, co wiąże się m.in. z obecnością N- i O-glikanów, dołączonych do rdzenia białkowego. Łańcuch cukrowy przyłączony wiazaniem kowalencyjnym do białek wpływa na właściwości fizykochemiczne tych cząsteczek m.in. rozpuszczalność, lepkość, ładunek wypadkowy, strukturę przestrzenną, większą odporność na proteolizę w przewodzie pokarmowym, a przede wszystkim na ich biologiczną aktywność [29,44,117]. Mimo że osoby dorosłe oraz



Ryc. 4. Glikoproteiny mleka ludzkiego (wg [19,58,63,73,77,78,79,83,84,86])

niemowlęta syntetyzują wiele enzymów degradujących dwusacharydy oraz skrobię, to hydroliza części cukrowej glikoprotein, podobnie jak HMOs, jest nieznaczna lub w ogóle nie występuje. Jest to związane z brakiem w sokach trawiennych (ślina, sok żołądkowy, sok trzustkowy) enzymów hydrolizujących wiązania glikozydowe w łańcuchach cukrowych glikoprotein [29]. Brak tych enzymów trawiących złożone struktury cukrowe umożliwia aktywność biologiczną łańcuchów oligosacharydowych, m.in. kompetycyjne hamowanie wiązania patogenów do komórek nabłonkowych czy stymulację rozwoju właściwej flory bakteryjnej [8,17,29,42,44,63,91].

Glikoproteiny obecne w mleku ludzkim można podzielić, podobnie jak białka mleka, na związane z frakcją tłuszczową (MFGM – milk fat globule membrane) oraz obecne

w mleku odtłuszczonej [19,44,60,62,91]. Do glikoprotein obecnych we frakcji tłuszczowej zalicza się m.in. laktadherynę, butyrofilinę, laktoperoksydazę oraz mucyny. Glikoproteiny frakcji odtłuszczonej dzieli się na glikoproteiny kazeinowe, do których należy jedynie kazeina κ oraz glikoproteiny z grupy białek serwatkowych, do których należą m.in.: laktoferyna (LF), wydzielnicza IgA (S-IgA) i lipaza stymulowana solami żółciowymi (BSSL) (ryc. 4) [3,4,5,19,40,44,58,73,77,91].

Białka mleka ludzkiego zostały dość dobrze scharakteryzowane (tab. 2), natomiast danych dotyczących ich glikozylacji, w tym korelacji z kolejnymi etapami laktacji, jest nadal niewiele. Opisano dopiero glikozylację kilku białek frakcji tłuszczowej mleka: klusteryny, prekursora receptora polimerycznych Ig (pIgR – polymeric

Tabela 2. Charakterystyka wybranych glikoprotein mleka ludzkiego

Glikoproteiny	Właściwości, funkcje	Masa cząsteczkowa [kDa]	Stężenie [mg/L]
Mucyny	udział w hamowaniu adhezji patogenów do komórek gospodarza	200-2000	729±75
Wydzielnicza immunoglobulina A	rozpoznanie i wiązanie antygenów, neutralizacja wirusów, hamowanie adhezji patogenów do błon śluzowych gospodarza, aglutynacja bakterii i wirusów, glikany obecne na S-IgA stanowią łącznik pomiędzy odpornością wrodzoną a nabytą	160	200-6200
Lipaza stymulowana solami żółciowymi	wspomaga proces trawienia trójglicerydów przez noworodki i niemowlęta, hamowanie adhezji Norowirusa przez fukozylowane glikany	120-140	100-200
Laktoferyna	działanie przeciwbakteryjne, przeciwwgrzybiczne, przeciwwirusowe, ograniczanie wzrostu bakterii przez chelatowanie jonów żelaza, a także blokowanie adhezji bakterii do komórek nabłonkowych dzięki obecności glikanów	80	1000-7000
Laktoperoksydaza	działanie bakteriostatyczne	77,5	0,77±0,38
Osteopontyna	właściwości immunomodulujące m.in. stymulowanie subpopulacji limfocytów Th1, możliwy udział w transporcie białek o właściwościach przeciwbakteryjnych	40-60	140
Fibronektyna	właściwości immunomodulujące	220	0,6-6,1
Butyrofilina	udział w modulowaniu encefalitogennych limfocytów T wpływających na mielinowe glikoproteiny oligodendrocytów	66	41±3
Laktadheryna	ochrona dzieci przed zakażeniami rotawirusowymi	46	93±10
α 1-kwaśna glikoproteina	białko ostrej fazy o właściwościach przeciwwzapalnych i immunomodulujących, glikany AGP mogą pełnić rolę rozpuszczalnych inhibitorów dla bakteryjnych receptorów lektynowych	44	18±5,2
Adiponektyna	udział w regulacji metabolizmu węglowodanów i lipidów oraz wrażliwości na insulinę	30	4-88
Kazeina κ	właściwości odżywcze, kazeina κ hamuje adhezję <i>Helicobacter pylori</i> do błony śluzowej żołądka, nośnik wapnia i innych mikroelementów	19	100-4600
Leptyna	zaangażowana w regulację równowagi energetycznej organizmu	16	0,003
Lizozym	właściwości przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, przeciwwzapalne, obniża poziom wolnych rodników	14,4	500
Laktoalbumina α	właściwości odżywcze, przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, przeciwnowotworowe, źródło peptydów o właściwościach przeciwbakteryjnych	14,2	2440±640

Tabela własna na podstawie [19,29,62,63,83,84,112]

immunoglobulin receptor precursor), laktadheryny [19], mucyn [86], a także glikoprotein frakcji odtłuszczonej: laktoferyny [8,40], S-IgA [95], BSSL [40,58], α 1-kwaśnej glikoproteiny (AGP) [83], fibronektyny [84] oraz kazeiny κ [40].

Laktoferyna

Laktoferyna jest glikoproteiną o masie cząsteczkowej 80 kDa, a jej najczęściej występujący glikowariant (~85%) zawiera dwa N-glikany typu złożonego przyłączone do Asn-138 i Asn-479, stanowiące około 6,5% masy cząsteczki [40,85,111,125]. Ponadto laktoferyna może występować w dwóch innych glikowariantach, z obsadzonym jednym miejscem: Asn-479 (~5%) lub trzema miejscami N-glikozylacji: Asn-138, Asn-479 i Asn-624 (~9%) [111]. Glikozylacja LF mleka ludzkiego zmienia się w dwóch pierwszych tygodniach laktacji, co wynika ze zmian w ekspresji genów dwóch grup enzymów uczestniczących w procesie N-glikozylacji: kompleksu enzymów oligosacharydotransferaz (OSTs) katalizujących transfer łańcucha cukrowego na białko i fukozylotransferaz (*FUT11*). Szczegółowa analiza N-glikanów LF wykazała, że procentowa zawartość glikanów fukozylowanych (zwłaszcza dwufukozylowanych) była większa w następnych etapach laktacji i korelowała ze wzrostem ekspresji genów *FUT2*, *FUT3*, *FUT6* oraz *FUT11* [8]. Wykazano też występowanie dużych różnic osobniczych między badanymi próbkami [8,40]. Analiza stopnia fukozytacji LF obecnej w mleku matek z cukrzycą ciążową wykazała istotny wzrost zawartości fukozylowanych N-glikanów LF w porównaniu z LF w mleku matek zdrowych [105].

Wydzielnicza immunoglobulina A

Wydzielnicza immunoglobulina A, ze względu na dominację w układzie odpornościowym błon śluzowych, jest uważana za pierwszą linię obrony organizmu przed szkodliwymi czynnikami środowiska zewnętrznego [95]. Wśród wydzielniczych IgA wyróżnia się 2 podklasy: S-IgA1 i S-IgA2, które stanowią odpowiednio 39 i 61% S-IgA w ludzkiej sianie [95]. Obie podklasy zawierają bogato N-glikozylowany fragment sekrecyjny (7 miejsc glikozylacji), ale jedynie S-IgA1 ma 3-5 O-glikanów przyłączonych do łańcucha ciężkiego H immunoglobuliny. Analiza N-glikanów S-IgA wykazała, że ponad 70% z nich zawiera kwas sjałowy, a 65% - rdzeniową fukozę [95]. Stopień glikozylacji łańcucha ciężkiego S-IgA1 fizjologicznego mleka ludzkiego jest względnie stały w dwóch pierwszych tygodniach laktacji, ale obniża się w mleku dojrzalym [40]. Analiza stopnia fukozytacji S-IgA obecnej w mleku matek z cukrzycą ciążową wykazała istotny spadek zawartości fukozylowanych N-glikanów S-IgA w porównaniu z mlekiem matek zdrowych [105].

Zarówno O-glikany łańcucha ciężkiego (H) oraz N-glikany fragmentu wydzielniczego (SC) S-IgA zawierają fukozylowane (Fuc(α 1-3/4)GlcNAc, Fuc(α 1-2)Gal) i/lub sjałowane (Neu5Ac(α 2-3/6)GlcNAc) glikotopy, które tworzą dodatkowe miejsca wiązania bakterii i są jed-

nym z elementów odporności wrodzonej. Według Royle obecność na cząsteczce S-IgA N- i O-glikanów, oprócz czterech miejsc wiążących antygeny (Fab), jest łącznikiem między odpornością wrodzoną a nabytą [95]. Ponadto duża zawartość glikanów przyłączonych do S-IgA sprawia, że cząsteczki te nie są w całości trawione w przewodzie pokarmowym dziecka, a docierając do jelit zapobiegają powstawaniu reakcji prozapalnych, a także przyczyniają się do zachowania ciągłości bariery nabłonka jelitowego m.in. przez aglutynację bakterii oraz tworzenie z probiotycznymi mikroorganizmami ochronnego biofilmu [95].

Lipaza stymulowana solami żółciowymi

Lipaza stymulowana solami żółciowymi (BSSL) jest glikoproteiną o masie 120-140 kDa, w której glikany stanowią około 20% masy cząsteczki, a ich zawartość oraz struktura zależy od okresu laktacji i fenotypu grupy krwi matki [58,63]. BSSL ma kilka miejsc O- i jedno miejsce N-glikozylacji [91,115]. Według Wang i wsp. O-glikany BSSL zawierają fukozę, galaktozę, glukozaminę, galaktozaminę i kwas sjałowy, w proporcjach odpowiednio: 1:3:2:1:0,3 [115]. Landberg i wsp. wykazali wzrost ekspresji glikotopów Lewis^x i zawartości fukozylowanych glikotopów oraz spadek sjałizacji BSSL w następnych okresach laktacji [58].

Mucyny

Najobficiej występującymi glikoproteinami związanymi z frakcją tłuszczową mleka są mucyny (MUC). Są bogato N- i O-glikozylowane i w zależności od liczby przyłączonych łańcuchów cukrowych osiągają masę cząsteczkową 200-2000 kDa [86,118]. Duża zawartość cukrów sprawia, że mucyny nie są trawione w przewodzie pokarmowym noworodków i nie pełnią prawdopodobnie funkcji odżywczych, tylko ochronne [64,87,88,91].

Deglikozylacja z użyciem PNG-azy F (glycopeptidase F) MUC1 mleka ludzkiego, a następnie analiza spektralna (MALDI-MS) uwolnionych glikanów wykazała, że najliczniej występującymi N-glikanami MUC1 związanej z błoną były złożone dwu- i trójantenne N-glikany z 0 do 3 resztami fukozy (Neu5Ac₀₋₁Fuc₀₋₃Hex₄₋₇HexNAc₃₋₆) [86]. W N-glikanach MUC1 obecnej w mleku w postaci wolnej, dominowały struktury wysokomannozone, natomiast sjałowane i fukozylowane dwuantenne glikany typu złożonego (Neu5Ac₁₋₂Fuc₀₋₂Hex₅HexNAc₄) stanowiły niewielki procent [86].

Przeprowadzona przez Wilson i wsp. analiza LC-ESI-MS/MS O-glikanów frakcji tłuszczowej mleka ludzkiego i krowiego potwierdziła obecność w mleku ludzkim glikanów zbudowanych na bazie rdzenia typu 2 (Gal β 1-3(GalNAc β 1-6)GalNAc), podczas gdy w mleku krowim dominowały glikany z rdzeniem typu 1 (Gal β 1-3GalNAc) [118]. Wspomniani autorzy wykazali ponadto znaczne różnice strukturalne między N-glikanami frakcji tłuszczowej mleka ludzkiego (hMFGM) i krowiego (bMFGM).

Różnice wynikają z odmiennych enzymów zaangażowanych w ich syntezę, spośród których istotną rolę odgrywają m.in. enzymy kodowane przez geny *FUT2* i *FUT3*, warunkujące obecność antygenów Lewis^a i Lewis^b, które mogą być ligandem dla niektórych patogenów [50,64,98,118]. Obecność glikotopów typu Lewis, m.in. na MUC1, sprawia, że cząsteczki te są zaangażowane we wrodzoną ochronę noworodków i niemowląt przed infekcjami wywołanymi przez niektóre mikroorganizmy: *E. coli*, *Salmonella*, HIV oraz rotawirusy [64,98].

ZNACZENIE FUKOZYLOWANYCH GLIKOKONIUGATÓW MLEKA LUDZKIEGO

Fukozylowane glikokoniugaty mleka jako prebiotyki

Kolonizacja organizmu dziecka przez drobnoustroje występuje w warunkach fizjologicznych już podczas życia płodowego. Obecność bakterii z matczynej przewodu pokarmowego i układu moczowo-płciowego (*Enterococcus* sp. i *Lactobacillus* sp.) stwierdzono w płynie owodniowym, łożysku, błonach płodowych i smółce [107]. Dalsza kolonizacja przewodu pokarmowego noworodka przez mikroorganizmy odbywa się podczas porodu i trwa intensywnie w pierwszych dniach życia dziecka osiągając w pierwszym tygodniu 10⁹ komórek/ml treści jelitowej [18,49]. W następnych miesiącach życia dochodzi do wielu zmian w składzie flory bakteryjnej i dopiero dzieci w wieku 1-4 lat mają względnie ustaloną florę bakteryjną wykazującą podobieństwo do mikrobiomu osób dorosłych, który zawiera około 10¹⁴ różnego rodzaju komórek bakteryjnych [49]. Na skład pierwotnej flory bakteryjnej wpływa wiele czynników, spośród których istotną rolę odgrywają: wiek płodowy dziecka, rodzaj porodu i dieta noworodka (tab. 3) [12,13,14,21,41,43,49,89].

We wczesnym okresie życia postnatalnego, obecność mikroorganizmów tworzących fizjologiczną florę bakteryjną jest istotna dla prawidłowego rozwoju i funkcjonowania nie tylko tkanki limfatycznej związanej z błonami śluzowymi (MALT oraz GALT), ale także całego układu odpornościowego człowieka (zwłaszcza odpowiedzi swoistej) [18,49,67]. Ponadto fizjologiczna flora jelitowa jest

odpowiedzialna za syntezę niektórych witamin (B₁, B₂, B₁₂, K), kwasu foliowego oraz krótko łańcuchowych kwasów tłuszczowych, tj. kwasu octowego, propionowego i masłowego, będących głównym źródłem energii enterocytów [18,27].

Pierwszymi mikroorganizmami, z jakim ma kontakt noworodek są bytujące w drogach rodnych matki beztlenowe pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae* (przede wszystkim *E. coli*), a także ziarniaki z rodzajów *Enterococcus* i *Streptococcus*, które przedostają się do układu pokarmowego noworodka w czasie porodu siłami natury. W następnych dniach po porodzie, flora bakteryjna niemowląt wzbogaca się o kolejne drobnoustroje m.in. bakterie z rodzajów *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. W zależności jednak od rodzaju stosowanej u noworodków i niemowląt diety, skład flory bakteryjnej dzieci może się zmieniać. Według Bezirtzoglou u dzieci karmionych mlekiem matki stosunek bakterii beztlenowych do tlenowych wynosi 10:1, podczas gdy u dzieci karmionych sztucznymi mieszankami mlecznymi wartość ta sięga aż 1000:1 [12]. Przeprowadzona przez Harmsen i wsp. analiza flory bakteryjnej noworodków żywionych mlekiem matki wykazała obecność w przewodzie pokarmowym przede wszystkim *Bifidobacterium* (około 75% wszystkich bakterii) z niewielką liczbą bakterii *Lactobacillus* i *Streptococcus* [51]. Mikroflora dzieci karmionych sztuczną mieszanką mleczną zdominowana była przez bakterie z rodzajów *Bacteroides* i *Bifidobacterium* oraz niewielkie populacje *Clostridium*, *Staphylococcus* i *E. coli* [51]. Występowanie mikroflory z przewagą *Bifidobacterium* u dzieci karmionych naturalnie wiąże się ze składem mleka kobiecego, które w porównaniu z mlekiem krowim charakteryzuje się słabszymi właściwościami buforującymi (mniejsze stężenie białka całkowitego) oraz dużą zawartością (50-80%) fukozylowanych oligosacharydów [12,14,17].

W pierwszym roku życia dziecka licznie występujące w przewodzie pokarmowym bifidobakterie, dzięki zaangażowaniu odpowiednich mechanizmów molekularnych (przede wszystkim ekspresji odpowiednich glikozydaz) mogą metabolizować zawarte w mleku ludzkim glikoko-

Tabela 3. Występowanie niektórych gatunków mikroorganizmów tworzących florę bakteryjną przewodu pokarmowego w zależności od rodzaju diety noworodka

Dzieci karmione	Udział dzieci, u których stwierdzono występowanie niektórych gatunków mikroorganizmów tworzących mikroflorę przewodu pokarmowego [%]				
	<i>Bifidobacterium</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. difficile</i>	<i>B. fragilis</i>	<i>Lactobacillus</i>
Wyłącznie mlekiem matki	99	85	21	79	29
Wyłącznie mieszanką	97	94	33	88	41
Mlekiem matki i mieszanką	99	93	35	83	34

Na podstawie [89]

Badania kału 1032 dzieci w 1 miesiącu życia.

niugaty (tab. 4) [43,124]. Głównymi szczepami bakteryjnymi rozkładającymi dominujące w mleku fukozylowane oligosacharydy, tj. 2'-FL oraz 3-FL są: *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*, *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*, *Bacteroides vulgatus*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides thetaio-taomicron* [124]. Hydroliza (konsumpcja) fukozylowanych oligosacharydów mleka ludzkiego przez wymienione bakterie przekracza 40%. Nieco słabiej degradowały 2'-FL i 3-FL bakterie *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*. Pałeczki z rodzaju *Lactobacillus* fermentują kwas mlekowy i choć są mniej liczne w przewodzie pokarmowym dzieci karmionych mlekiem matki, to wg Savino i wsp. [100,101] odgrywają istotną rolę w zapobieganiu kolkom. Ponadto wykazano, że niektóre szczepy bakterii *Lactobacillus* mają wpływ na jelitowy układ nerwowy i perystaltykę jelit [114,115]. Według Bienenstock i wsp. fukozylowane oligosacharydy, w tym przede wszystkim 2'-FL i 3-FL, a także L-fukoza mogą być użyteczne w profilaktyce i terapii zaburzeń perystaltyki jelit oraz korzystnie wpływającymi na centralny układ nerwowy dzieci [14].

Fukozylowane glikany a adhezja patogenów do komórek nabłonkowych gospodarza

W większości chorób o podłożu bakteryjnym i/lub wirusowym głównym etapem są reakcje biologicznego rozpoznania, a następnie adhezja patogenów do komórek gospodarza [103]. W procesie tym ważną rolę odgrywają struktury powierzchniowe drobnoustrojów, takie jak adhezyny i/lub lektyny, które oddziałując z określonymi strukturami cukrowymi (glikotopami) na powierzchni tkanek gospodarza, umożliwiają ich kolonizację [17,24,103]. Proces przylegania patogenów do komórek gospodarza może być jednak ograniczony dzięki obecności w mleku biologicznie aktywnych cząsteczek, w tym także glikokoniugatów. Wykazano, że ryzyko wystąpienia u niemowląt karmionych mlekiem matki infekcji, biegunek, ostrego zapalenia żołądka i jelit oraz innych chorób o podłożu bakteryjnym i/lub wirusowym jest mniejsze w porównaniu z niemowlętami karmionymi sztucznymi mieszkami mlecznymi [17,43,79]. Udział glikokoniugatów mleka w hamowaniu infekcji wiąże się z występowaniem w tych cząsteczkach analogicznych glikotopów jak w glikoproteinach i glikolipidach na błonach komórkowych. Dzięki temu glikokoniugaty mleka ludzkiego mogą działać jak „wabiki” dla patogenów, blokując ich adhezję i wiązanie się do powierzchni komórek nabłonkowych (ryc. 5) [8,9,17,24,79,80,91,98].

Wykazano, że rozpuszczalne glikokoniugaty zawarte w mleku „opłukującym” komórki nabłonkowe gardzieli, przełyku, żołądka oraz jelit noworodka mogą być rozpoznawane i wiązane przez lektynowe receptory bakteryjne, a także przez receptory lektynowe na powierzchni komórek gospodarza. W obu przypadkach dochodzi do zablokowania lektynowych receptorów przez glikokoniugaty mleka, uniemożliwiając kolonizację komórek gospodarza przez patogeny (ryc. 5) [35,77,78,79,80,98]. Ten „dwukierunkowy” udział glikokoniugatów mleka ludzkiego

w hamowaniu adhezji patogenów został potwierdzony m.in. dla mucyny 1 oraz 4, kazeiny κ , laktoalbuminy α oraz laktoferyny [57]. Analogicznie do interakcji glikokoniugatów mleka ludzkiego z komórkami bakteryjnymi, jest możliwe blokowanie adhezji do komórki gospodarza równie groźnych (lub nawet groźniejszych) niż same drobnoustroje, toksyn bakteryjnych. Dotąd potwierdzono udział fukozylowanych glikokoniugatów mleka ludzkiego w hamowaniu wiązania ciepłostabilnej toksyny *E. coli* do receptorów cyklazy guanylowej C (tab. 5) [34,69,79,80,97].

Wykazano, że 4-14% HMOs może być absorbowane w jelicie cienkim noworodka (transport w poprzek nabłonka jelitowego w wyniku transcytozy z udziałem receptorów, jak również międzykomórkowo) i pozostawać w krwiobiegu przez kilka godzin [36]. Na podstawie badań *in vitro* sugeruje się, że obecne we krwi noworodka HMOs mogą bezpośrednio modulować działanie systemu immunologicznego na poziomie wewnątrzkomórkowym, a ostatecznie eliminowane z organizmu z moczem mogą zapobiegać adhezji patogenów do komórek układu moczowego [36,46,69]. Fukozylowane glikokoniugaty, w tym HMOs oraz glikoproteiny mleka ludzkiego, pełnią więc istotną rolę w ochronie niemowląt przed infekcjami m.in. układu moczowego, oddechowego i pokarmowego [8,9,17,24,36,46,63,69,77,78,79,80,91,98].

Ze względu na większe całkowite stężenie HMOs w mleku matek o statusie wydzielacza w porównaniu z mlekiem matek-niewydzielaczy, a także możliwość rozpoznawania przez niektóre patogeny fukozylowanych struktur cukrowych, uważa się, że fukozylowane glikokoniugaty, a zwłaszcza zawierające α 1-2-fukozylowany glikotop, są istotnym czynnikiem ograniczającym adhezję patogenów do komórek nabłonkowych [9,17,56,72]. Udział fukozylowanych glikokoniugatów (w tym α 1-2-fukozylowanych) mleka w hamowaniu adhezji bakterii i wirusów do komórek nabłonkowych gospodarza potwierdzono m.in. w badaniach: Ruvoën-Clouet i wsp. [98], Naardinga i wsp. [77,78], Newburga [79,80], Barboza i wsp. [8] oraz Weichert i wsp. [116].

Pierwsze informacje o udziale fukozylowanych glikanów w hamowaniu adhezji enteropatogennych bakterii *E. coli* (EPEC) oraz *Helicobacter pylori* do komórek nabłonkowych gospodarza przedstawili m.in. Cravioto i wsp. [26] oraz Falk i wsp. [39] (tab. 5). Lesman-Movshovich i wsp. wykazali, że lektyny PA-IL i PA-III wyizolowane z *Pseudomonas aeruginosa* (z powinowactwem do L-fukozy > D-arabinozy > D-mannozy) mogą oddziaływać w warunkach *in vitro* z glikoproteinami mleka ludzkiego, co może tłumaczyć rzadsze występowanie u niemowląt infekcji dróg oddechowych spowodowanych przez te patogeny [59]. W późniejszej pracy Perret i wsp. wykazali, że antygenami bezpośrednio zaangażowanymi w interakcje z PA-III są fukozylowane glikotopy Lewis^a oraz 3-FL [90].

Ruiz-Palacios i wsp. wykazali *in vivo* hamujący wpływ fukozylowanych HMOs na adhezję bakterii *Campylobacter jejuni* do komórek jelita myszy BALB oraz *ex vivo*

Tabela 4. Hydroliza fukozylowanych glikokoniuatów mleka ludzkiego przez mikroorganizmy zasiedlające przewód pokarmowy niemowląt

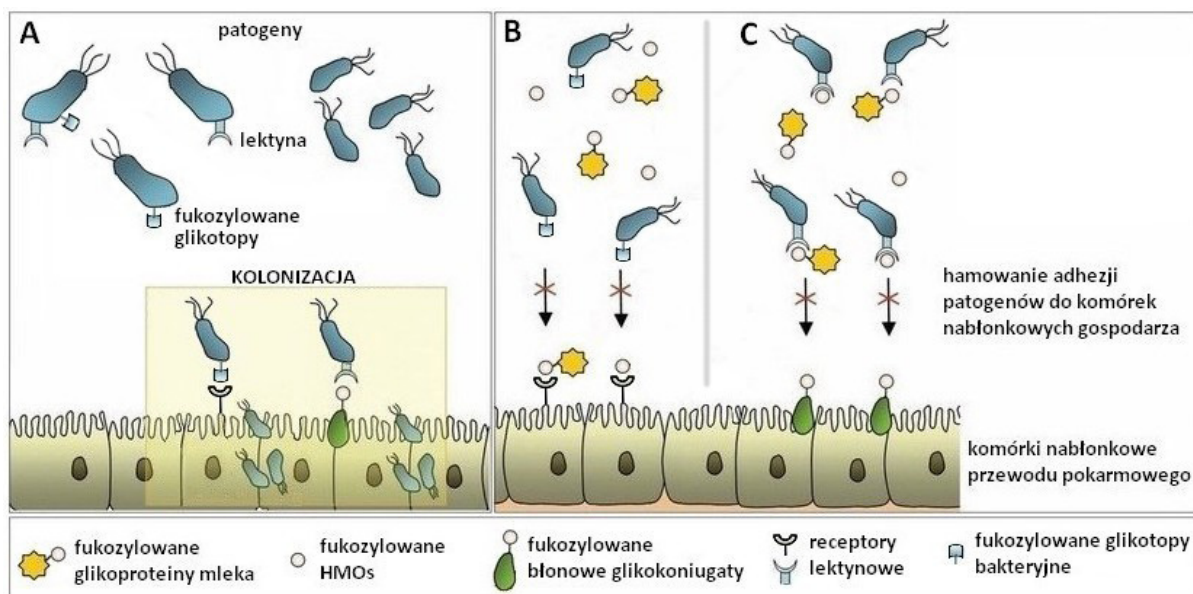
Mikroorganizm	Wytwarzane enzymy	Preferencje substratowe	Piśmiennictwo
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	α -L-fukozydaza α 1-2-L-fukozydaza α 1-3/4-L-fukozydaza	2'-FL > LNFP I znikoma hydroliza 3-FL i LNFP V brak hydrolizy LNFP II	[55]
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>	α 1-2-L-fukozydaza α 1-3/4-L-fukozydaza	LNT > LNH > F-LNH > DF-LNH >> F-LNO, DF-LNO wzrost na HMOs 2'-FL, 3-FL	[65,102]
<i>Bifidobacterium fragilis</i>	α 1-2-L-fukozydaza	niefukozylowane HMOs > fukozylowane HMOs	[68]
<i>Bifidobacterium breve</i>	α 1-2-L-fukozydaza α 1-3/4-L-fukozydaza	LNT, LNnT >> 2'-FL >> 3-FL	[96]
<i>Bifidobacterium vulgatus</i>	α 1-2-L-fukozydaza	wzrost na HMOs	[68]
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	α 1-2-L-fukozydaza	znikoma hydroliza 2'-FL < 10%	[124]
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	α 1-2-L-fukozydaza	słaba zdolność hydrolizy 2'-FL	[124]
<i>Ruminococcus gnavus</i>	α -1-3/4-L-fukozydaza α 1-2-L-fukozydaza	wzrost na 2'-FL, 3-FL	[27]
<i>Clostridium</i> spp.	brak danych dot. obecności w genomie genów kodujących α 1-2- oraz α 1-3/4-L-fukozydazę	brak lub też zanikoma hydroliza 2'-FL oraz 3-FL < 10%	[123,124]
<i>Staphylococcus</i> spp.	brak danych dot. obecności w genomie genów kodujących α 1-2- oraz α 1-3/4-L-fukozydazę	znikoma hydroliza 2'-FL oraz 3-FL < 10%	[124]

Oznaczenia: 2'-FL – 2'-fukozyloolaktoza, 3-FL – 3-fukozyloolaktoza, DF-LNH – dwufukozylowany lakto-N-heksasacharyd, DF-LNO – dwufukozylowany lakto-N-oktasacharyd, F-LNH – fukozylowany lakto-N-heksasacharyd, F-LNO – fukozylowany lakto-N-oktasacharyd, HMOs – wolne oligosacharydy mleka ludzkiego, LNDFH – lakto-N-dwufukoheksasacharyd, LNFP – lakto-N-fukopentasacharyd, LNH – lakto-N-heksasacharyd, LNnT – lakto-N-neotetrasacharyd, LNT – lakto-N-tetrasacharyd.

– do ludzkich komórek błony śluzowej jelita [97]. Bezpośrednią strukturą cukrową zaangażowaną w interakcje z adhezynami/lektynami *C. jejuni* jest antygen grupowy krwi H(O) zawierający glikotopy Fuc(α 1-2)Gal(β 1-4)GlcNAc [97]. Według Pytrus i Iwańczak [93] oraz Ruiz-Palacios [97] *C. jejuni* są jedną z głównych przyczyn ostrych biegunek, powodujących dużą śmiertelność dzieci poniżej 5 lat. Hamowanie przylegania bakterii do błony śluzowej jelit (pierwszy etap adhezji) przez fukozylowane glikokoniuaty w mleku matki ma ogromne znaczenie dla zdrowia noworodków i niemowląt. Jak sugerują autorzy [97] fukozylowane HMOs mogą stanowić nową klasę czynników o właściwościach przeciwbakteryjnych.

W 2006 r. zespół pod kierunkiem Ruvoën-Clouet [98] wykazał, że mleko matek-wydzielaczy, w przeciwień-

stwie do mleka matek-niewydzielaczy, silnie hamuje adhezję do ludzkich tkanek bezotoczkowego wirusa Norwalk (norowirus) z rodziny Kaliciwirusów, odpowiedzialnego m.in. za wirusowe zapalenia żołądka i jelit u niemowląt. Jako cząsteczki bezpośrednio zaangażowane w blokowanie adhezji wirusa do komórek autorzy [98] w pierwszej kolejności wymieniają α 1-2-fukozylowane glikany lipazy stymulowanej solami żółciowymi, a następnie O-glikany MUC1 oraz MUC4. Na istotną rolę fukozylowanych glikanów MUC1 w hamowaniu adhezji patogenów zwrócili uwagę również Saeland i wsp. [99] oraz Koning i wsp. [57]. Pierwsza grupa badaczy wykazała, że O-glikany MUC1 zawierające glikotopy Lewis^x mogą oddziaływać z receptorami komórek dendrytycznych (DC-SIGN), dzięki czemu niemożliwe są ich interakcje z wirusem HIV. Z badań dru-



Ryc. 5. Ograniczanie adhezji patogenów do komórek nabłonkowych przewodu pokarmowego gospodarza przez fukozylowane glikokoniugaty mleka ludzkiego. Możliwość kolonizacji komórek nabłonkowych gospodarza przez patogeny nazywa się inwazyjnym mechanizmem wirulencji, a w procesie tym ważną rolę odgrywają struktury powierzchniowe drobnoustrojów, takie jak receptory lektynowe i/lub glikotopy (A). Proces przylegania (adhezji) drobnoustrojów do błonowych glikokoniugatów gospodarza może być utrudniony dzięki występowaniu w mleku ludzkim rozpuszczalnych fukozylowanych glikokoniugatów, tj. HMOs i glikoprotein, które są rozpoznawane przez receptory lektynowe na powierzchni komórek nabłonkowych (B), a także są rozpoznawane i wiązane przez bakteryjne receptory lektynowe (C). W obu przypadkach występowanie tego rodzaju interakcji między fukozylowanymi glikokoniugatami mleka ludzkiego a receptorami lektynowymi bakteryjnymi i/lub komórek gospodarza prowadzi do hamowania adhezji patogenów uniemożliwiając zasiedlanie tkanek; HMOs – wolne oligosacharydy mleka ludzkiego (wg [15,16,17,35,77,78,79,80,98])

giej grupy wynika, że zawarte w mleku ludzkim MUC1 hamują interakcję bakterii *Neisseria gonorrhoeae* i *H. pylori* z DC-SIGN. Ponadto glikotop Lewis^x w łańcuchach cukrowych lipazy stymulowanej solami żółciowymi również blokuje oddziaływanie komórek dendrytycznych z wirusem HIV i zmniejsza ryzyko przeniesienia wirusa z matki na dziecko [77,78,99].

Barboza i wsp. w badaniach polegających na inkubacji 3 serowarów bakterii *Salmonella enterica* z N-glikanami laktoferyny mleka ludzkiego wykazali, że fukozylowane glikany są zaangażowane w proces hamowania przylegania bakterii *Salmonella* serowar Typhimurium oraz Heidelberg do komórek nabłonkowych linii komórkowej Caco-2 [8]. Możliwość hamowania bakterii *Salmonella* przez glikany LF ma szczególne znaczenie, ponieważ zakażenia spowodowane przez te drobnoustroje są szczególnie niebezpieczne dla noworodków [8]. Choroby wywołane przez *S. enterica* są inicjowane przez oddziaływanie komórek bakteryjnych z komórkami przewodu pokarmowego, szczególnie z tzw. komórkami M nabłonka pęcherzykowatego i kępek Peyera [30,49]. Ostatecznie, do inwazji komórek M dochodzi przez tzw. system wydzielniczy III bakterii, dzięki któremu do wnętrza komórek gospodarza przedostają się bakteryjne białka efektorowe, które rozpoczynają reorganizację cytoszkieletu aktynowego komórki. Zmiany umożliwiają następnie przedostawanie się pałeczek *Salmonella* do wnętrza komórek

gospodarza, ich namnażanie i rozwój procesu zapalnego [30].

Liczne doniesienia o udziale fukozylowanych HMOs oraz glikoprotein mleka ludzkiego w hamowaniu adhezji patogenów do komórek nabłonkowych, a także obniżeniu stosunkowo wysokiego kosztu produkcji oligosacharydów przyczyniły się do poszukiwania optymalnych metod syntezy niektórych HMOs [103]. Weichert i wsp. wykorzystując zmodyfikowane metodami bioinżynierijnymi bakterie *E. coli* uzyskali dwie fukozylowane pochodne laktozy, tj. 2'-FL oraz 3-FL [116]. Zastosowanie 2'-FL w badaniach adhezji patogenów do ludzkich komórek linii Caco-2 i/lub A549 wykazało obniżenie wiązania bakterii *C. jejuni*, enteropatogennych *E. coli*, *S. enterica* serowar Fyris oraz *P. aeruginosa* odpowiednio o 26, 18, 12 oraz 17%. Użycie 3-FL hamowało adhezję enteropatogennych *E. coli* o 29%, a *P. aeruginosa* o 26%. Uzyskane przez Weichert i wsp. wyniki [116] są krokiem milowym, który dekadę temu pozostawał jedynie w sferze marzeń [103]. Wówczas, na podstawie przeprowadzonych badań klinicznych, Sharon i Ofek [103] prognozowali, że syntetyczne oligosacharydy dołączą w niedalekiej przyszłości do arsenału antyadhezyjnych leków wykorzystywanych do zapobiegania/leczenia chorób o podłożu bakteryjnym. W świetle najnowszych badań [116] można przypuszczać, że dodatek syntetycznych trójsacharydów do sztucznych mieszanek mlecznych zrewolucjonizuje produkcję pre-

Tabela 5. Przykłady fukozylowanych glikokoniugatów mleka ludzkiego uczestniczących w hamowaniu oddziaływań patogenów z komórkami gospodarza

Glikokoniugat/ glikotop, jeśli znany	Mikroorganizm	Piśmiennictwo
WOLNE OLIGOSACHARYDY		
2'-Fukozylolaktoza	<i>Salmonella enterica</i> serowar Fyris, <i>Campylobacter jejuni</i> enteropatogenne <i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	[116]
3-Fukozylolaktoza	enteropatogenne <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i>	[116]
Lakto-N-dwufukoheksasacharyd I zawierająca antygen Lewis ^b (α1-2- oraz α1-4-Fuc)	Norowirus	[79]
α1-2-fukozylowane HMOs	<i>C. jejuni</i> , Kaliciwirus ciepłostabilna toksyna <i>E. coli</i>	[25,34,79]
Fukozylowane HMOs	<i>Vibrio cholerae</i>	[80,97]
GLIKOPROTEINY		
S-IgA fukozylowane glikany	enteropatogenne <i>E. coli</i>	[26]
S-IgA α1-2 fukozylowane glikany	<i>Helicobacter pylori</i>	[39,95]
Laktoferyna fukozylowane glikany	<i>Salmonella enterica</i> serowar Typhimurium, Heidelberg	[8]
Mucyna fukozylowane glikany	Norowirus	[54]
Mucyna antygen Lewis ^x (α1-3-Fuc)	hamowanie interakcji pomiędzy komórkami dendrytycznymi a wirusem HIV-1	[99]
Glikoproteiny zawierające antygen Lewis ^b oraz 2'-fukozylolaktoza	<i>C. jejuni</i>	[31,75]
BSSL α1-2-fukoza	Norowirus	[98]
BSSL antygen Lewis ^x (α1-3-Fuc)	HIV-1	[77,78]

Oznaczenia: BSSL – lipaza stymulowana kwasami żółciowymi, HMOs – wolne oligosacharydy mleka ludzkiego, S-IgA – wydzielnicza immunoglobulina A

paratów mlekozastępczych przeznaczonych do karmienia noworodków i niemowląt.

Udział fukozylowanych glikanów w komunikacji między neuronami

Fukozylowane glikany glikokoniugatów mleka matki mogą być także źródłem wolnej fukozy, która razem ze szlakiem *de novo* powstawania fukozy zapewnia dostatecznie dużą pulę tego monosacharydu, wykorzystywanego następnie do wytwarzania nowych glikokoniugatów [9,82]. Mimo to, że zawartość fukozy

pochodzącej z „odzysku” w nowo powstających glikokoniugatach nie jest duża (szacuje się, że 90% fukozy transportowanej do aparatu Golgiego z cytosolu komórek pochodzi z wytwarzania *de novo*), przypuszcza się, że egzogenne źródła fukozy mogą odgrywać ważną rolę w rozwoju i funkcjonowaniu centralnego i jelitowego układu nerwowego (w tym m.in. przekazywaniu impulsów między neuronami) [9,11,14,52].

Jak wynika z badań Murrey i wsp. przeprowadzonych na glikokoniugatach w hipokampie szczurów, dzięki obecności w błonach synaptycznych glikokoniugatów

z fukozą jest ułatwiona komunikacja między neuronami, co wspomaga efektywność procesu nauki i zapamiętywania [70,76,92]. Lorenzini i wsp. wykazali, że podawanie szczerom 2-deoksygalaktozy uniemożliwia przyłączenie fukozy do galaktozy wiązaniem α 1-2-glikozydowym i prowadzi do zablokowania syntezy α 1-2-fukozylowanego glikotopu [66]. Brak tego glikotopu był skorelowany z rozwojem amnezji.

PORÓWNANIE FUKOZYLOWANYCH GLIKOKONIUGATÓW MLEKA LUDZKIEGO I KROWIEGO

Przeprowadzone analizy biochemiczne mleka ludzkiego i krowiego jednoznacznie wskazują na znaczące różnice w ich składzie. Dojrzałe mleko ludzkie zawiera m.in. więcej cukrów (wolnych oligosacharydów i laktozy) oraz białek serwatkowych w porównaniu z dojrzałym mlekiem krowim [15,16,17,112]. Zaobserwowane różnice dotyczą jednak nie tylko ilości poszczególnych składników przypadających na 100 g mleka ludzkiego/krowiego, ale także obejmują różnice w składzie i strukturze wolnych oligosacharydów oraz glikoprotein [17,105,112]. Zawartość wolnych oligosacharydów w 100 ml dojrzałego mleka ludzkiego wynosi 500-1500 mg, a jedynie 5-10 mg w tej samej ilości mleka krowiego [2,6,17,112]. Według Bode 50-80% wolnych oligosacharydów mleka ludzkiego jest fukozylowanych (oligosacharydy obojętne), a sjałowane (oligosacharydy kwaśne) stanowią 10-20% [15]. W mleku krowim większość oligosacharydów jest sjałowana, a fukozylowane oligosacharydy stanowią jedynie ~1% [2,17]. Podobne różnice jak w HMOs, widoczne są również w N-glikanach glikoprotein mleka ludzkiego [28,81]. Analiza N-glikomu dojrzałego mleka ludzkiego wykazała obecność 52 struktur cukrowych, których 65% zawierało fukozę, 38% kwas sjałowy, a 25% kwas sjałowy jak i fukozę [28]. Podobne wyniki uzyskali Nwosu i wsp. [81]. Autorzy, z użyciem nano-LC MS, zidentyfikowali 38 oraz 51 struktur N-glikanów odpowiednio w mleku ludzkim i krowim, spośród których odpowiednio 75 i 31% było fukozylowanych.

PODSUMOWANIE

Mleko ludzkie jest wyjątkową wydzieliną zawierającą wiele związków odżywczych, a także immunomodulujących potrzebnych do prawidłowego wzrostu i rozwoju noworodków i niemowląt. Bogactwo składników odżywczych mleka, a także temperatura wewnątrz gruczołu sutkowego, stwarzają jednak optymalne warunki do wzrostu niektórych mikroorganizmów. Z tego też względu wydaje się, że jednym z ewolucyjnych przystosowań jest wydzielanie do mleka peptydów i białek o właściwościach przeciwbakteryjnych i/lub przeciwwirusowych [5,47,48]. Glikokoniugaty w mleku ludzkim pełnią również ważną rolę w ochronie noworodków. Fukozylowane glikotopy glikoprotein mleka oraz HMOs są podobne do glikotopów na glikokoniugatach komórek nabłonkowych gospodarza i mogą pełnić funkcję „wabików” dla bakterii i wirusów blokując w ten sposób ich adhezję do nabłonka.

W procesach hamowania adhezji patogenów do komórek nabłonkowych ważną rolę odgrywa status wydzielacza/niewydzielacza. Status ten jest szczególnie istotny u kobiet karmiących, ponieważ mleko matek, które zawiera α 1-2-fukozylowane glikokoniugaty, uniemożliwia adhezję bakterii i wirusów do komórek nabłonkowych, chroniąc tym samym noworodki przed biegunkami powodowanymi m.in. przez *C. jejuni*, *E. coli*, norowirusy, kaliciwirusy, a także przed infekcjami dróg moczowych oraz górnych dróg oddechowych spowodowanych m.in. przez *P. aeruginosa* [32,44,61,64,91,104]. Z tego też względu, mleko matek o statusie wydzielacza oddawane do banków mleka ma potencjalnie lepsze właściwości ochronne dla noworodka w porównaniu z mlekiem matek będących niewydzielaczami. Innym, ważnym zadaniem fukozylowanych glikokoniugatów w mleku ludzkim jest promowanie tworzenia prawidłowej mikroflory przewodu pokarmowego noworodków i niemowląt.

Występowanie w mleku ludzkim fukozylowanych glikokoniugatów jest bardzo ważnym aspektem żywieniowym, na który należy zwrócić uwagę podczas wprowadzenia do żywienia noworodków i niemowląt sztucznych mieszanek mlecznych produkowanych na bazie mleka krowiego. Znaczenie mniejsza zawartość fukozylowanych HMOs oraz glikoprotein jest najprawdopodobniej przyczyną rozwoju innego składu gatunkowego mikroflory przewodu pokarmowego. Szczególne znaczenie może to mieć u dzieci urodzonych przedwcześnie, a także noworodków i niemowląt, u których z różnych powodów istnieje potrzeba zastosowania antybiotykoterapii, która często wiąże się z wyjałowieniem przewodu pokarmowego [41]. Możliwość tworzenia pożytecznej mikroflory jelit oraz hamowanie adhezji niektórych patogenów przez fukozylowane glikokoniugaty mleka ludzkiego jest jednym z czynników mogących ograniczać występowanie posocznicy i NEC u dzieci urodzonych przedwcześnie [41,71,74]. Według Ganguli i Walker przez odmienny skład mikroflory przewodu pokarmowego dzieci karmionych mlekiem matki w porównaniu z dziećmi karmionych mieszankami mlecznymi ma istotne znaczenie dla ich zdrowia. Obecne w przewodzie pokarmowym „pożyteczne” mikroorganizmy umożliwiają trawienie i absorpcję niektórych składników pokarmowych, ograniczają ryzyko chorób/infekcji powodowanych przez patogeny oraz ograniczają powstawanie gazów jelitowych [41].

Jednym ze sposobów wzbogacenia sztucznych mieszanek mlecznych jest dodatek fruktooligosacharydów (FOS), galaktooligosacharydów (GOS) oraz inuliny, które wspierają rozwój korzystnej mikroflory jelitowej [7,43]. Obecnie coraz częściej pojawiają się pomysły suplementacji sztucznych mieszanek mlecznych, komercyjnie uzyskanymi wolnymi oligosacharydami (w tym LNnT, 2'-FL, 3-FL, 6'-SL), które skutecznie hamują adhezję niektórych patogenów obniżając w ten sposób ryzyko infekcji [43,72,116]. Wolne oligosacharydy, w tym fukozylowane HMOs w mleku ludzkim stanowią część wrodzonego układu odpornościowego i z tego powodu wzbogacenie składu dostępnych na rynku sztucznych mieszanek na bazie mleka krowiego o 2'-FL i 3-FL jest celowe.

PODZIĘKOWANIA

Składamy serdeczne podziękowania Pani prof. dr hab. Marii Iwonie Kątnik-Prastowskiej za cenne uwagi podczas przygotowywania niniejszej pracy.

PIŚMIENICTWO

- [1] Adamkin D.H.: Mother's milk, feeding strategies, and lactoferrin to prevent necrotizing enterocolitis. *JPEN J. Parenter. Enteral Nutr.*, 2012; 36: 255-295
- [2] Aldredge D.L., Geronimo M.R., Hua S., Nwosu C.C., Lebrilla C.B., Barile D.: Annotation and structural elucidation of bovine milk oligosaccharides and determination of novel fucosylated structures. *Glycobiology*, 2013; 23: 664-676
- [3] Artym J.: Udział laktoferyny w gospodarce żelazem w organizmie. Część II. Działanie przeciwmikrobiologiczne i przeciwzapalne poprzez sekwestrację żelaza. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2010; 64: 604-616
- [4] Artym J., Zimecki M.: Milk-derived proteins and peptides in clinical trials. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2013; 67: 800-816
- [5] Artym J., Zimecki M.: Rola laktoferyny w prawidłowym rozwoju noworodka. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2005; 59: 421-432
- [6] Asakuma S., Urashima T., Akahori M., Obayashi H., Nakamura T., Kimura K., Watanabe Y., Arai I., Sanai Y.: Variation of major neutral oligosaccharides levels in human colostrum. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 2008; 62: 488-494
- [7] Bakker-Zierikzee A.M., Alles M.S., Knol J., Kok F.J., Tolboom J.J., Bindels J.G.: Effects of infant formula containing a mixture of galacto- and fructo-oligosaccharides or viable *Bifidobacterium animalis* on the intestinal microflora during the first 4 months of life. *Br. J. Nutr.*, 2005; 94: 783-790
- [8] Barboza M., Pinzon J., Wickramasinghe S., Froehlich J.W., Moeller I., Smilowitz J.T., Ruhaak L.R., Huang J., Lönnerdal B., German J.B., Medrano J.F., Weimer B.C., Lebrilla C.B.: Glycosylation of human milk lactoferrin exhibits dynamic changes during early lactation enhancing its role in pathogenic bacteria-host interactions. *Mol. Cell. Proteomics*, 2012; 11: M111
- [9] Becker D.J., Lowe J.B.: Fucose: biosynthesis and biologic function in mammals. *Glycobiology*, 2003; 13: 41R-53R
- [10] Bertino E., Giuliani F., Occhi L., Coscia A., Tonetto P., Marchino F., Fabris C.: Benefits of donor human milk for preterm infants: current evidence. *Early Hum. Dev.*, 2009; 85: S9-S10
- [11] Best T., Kamps E., Bryan J.: Effects of saccharides on brain function and cognitive performance. *Nutr. Rev.*, 2005; 63: 409-418
- [12] Bezirtzoglou E.: The intestinal microflora during the first weeks of life. *Anaerobe*, 1997; 3: 173-177
- [13] Bezirtzoglou E., Tsiotsias A., Welling G.W.: Microbiota profile in feces of breast- and formula-fed newborns by using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Anaerobe*, 2011; 17: 478-482
- [14] Bienenstock J., Buck R.H., Linke H., Forsythe P., Stanisz A.M., Kunze W.A.: Fucosylated but not sialylated milk oligosaccharides diminish colon motor contractions. *PLoS One*, 2013; 8: e76236
- [15] Bode L.: Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama. *Glycobiology*, 2012; 22: 1147-1162
- [16] Bode L.: Recent advances on structure, metabolism, and function of human milk oligosaccharides. *J. Nutr.*, 2006; 136: 2127-2130
- [17] Bode L., Jantscher-Krenn E.: Structure-function relationships of human milk oligosaccharides. *Adv. Nutr.*, 2012; 3: 383S-391S
- [18] Canny G.O., McCormick B.A.: Bacteria in the intestine, helpful residents or enemies from within? *Infect. Immun.*, 2008; 76: 3360-3373
- [19] Charlwood J., Hanrahan S., Tyldesley R., Langridge J., Dwek M., Camilleri P.: Use of proteomic methodology for the characterization of human milk fat globular membrane proteins. *Anal. Biochem.*, 2002; 301: 314-324
- [20] Chaturvedi P., Warren C.D., Buescher C.R., Pickering L.K., Newburg D.S.: Survival of human milk oligosaccharides in the intestine of infants. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2001; 501: 315-323
- [21] Coppa G.V., Bruni S., Morelli L., Soldi S., Gabrielli O.: The first prebiotics in humans: human milk oligosaccharides. *J. Clin. Gastroenterol.*, 2004; 38: S80-S83
- [22] Coppa G.V., Gabrielli O., Bertino E., Zampini L., Galeazzi T., Padella L., Santoro L., Marchesiello R.L., Galeotti F., Maccari F., Volpi N.: Human milk glycosaminoglycans: the state of the art and future perspectives. *Ital. J. Pediatr.*, 2013; 39: 2
- [23] Coppa G.V., Pierani P., Zampini L., Carloni I., Carlucci A., Gabrielli O.: Oligosaccharides in human milk during different phases of lactation. *Acta Paediatr. Suppl.* 430, 1999; 88: 89-94
- [24] Coppa G.V., Zampini L., Galeazzi T., Facinelli B., Ferrante L., Capretti R., Orazio G.: Human milk oligosaccharides inhibit the adhesion to Caco-2 cells of diarrheal pathogens: *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, and *Salmonella typhi*. *Pediatr. Res.*, 2006; 59: 377-382
- [25] Crane J.K., Azar S.S., Stam A., Newburg D.S.: Oligosaccharides from human milk block binding and activity of the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin (StA) in T84 intestinal cells. *J. Nutr.* 1994; 124: 2358-2364
- [26] Cravioto A., Tello A., Villafán H., Ruiz J., del Vedovo S., Neeser J.R.: Inhibition of localized adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells by immunoglobulin and oligosaccharide fractions of human colostrum and breast milk. *J. Infect. Dis.*, 1991; 163: 1247-1255
- [27] Crost E.H., Tailford L.E., Le Gall G., Fons M., Henrissat B., Juge N.: Utilisation of mucin glycans by the human gut symbiont *Ruminococcus gnavus* is strain-dependent. *PLoS One*, 2013; 8: e76341
- [28] Dallas D.C., Martin W.F., Strum J.S., Zivkovic A.M., Smilowitz J.T., Underwood M.A., Affolter M., Lebrilla C.B., German J.B.: N-linked glycan profiling of mature human milk by high-performance microfluidic chip liquid chromatography time-of-flight tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 2011; 59: 4255-4263
- [29] Dallas D.C., Sela D., Underwood M.A., German J.B., Lebrilla C.: Protein-linked glycan degradation in infants fed human milk. *J. Glycomics Lipidomics*, 2012; Suppl. 1: 002
- [30] Darwin K.H., Miller V.L.: Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1999; 12: 405-428
- [31] Day C.J., Semchenko E.A., Korolik V.: Glycoconjugates play a key role in *Campylobacter jejuni* infection: interactions between host and pathogen. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2012; 2: 9
- [32] De Leoz M.L., Gaerlan S.C., Strum J.S., Dimapasoc L.M., Mirmiran M., Tancredi D.J., Smilowitz J.T., Kalanetra K.M., Mills D.A., German J.B., Lebrilla C.B., Underwood M.A.: Lacto-N-tetraose, fucosylation,

- and secretor status are highly variable in human milk oligosaccharides from women delivering preterm. *J. Proteome Res.*, 2012; 11: 4662-4672
- [33] DiBiasie A.: Evidence-based review of retinopathy of prematurity prevention in VLBW and ELBW infants. *Neonatal Netw.*, 2006; 25: 393-403
- [34] Duska-McEwen G., Senft A.P., Ruetschilling T.L., Barrett E.G., Buck R.H.: Human milk oligosaccharides enhance innate immunity to respiratory syncytial virus and influenza *in vitro*. *Food Nutr. Sci.*, 2014; 5: 1387-1398
- [35] Eidelman A.I.: Breastfeeding and the use of human milk: an analysis of the American Academy of Pediatrics 2012 Breastfeeding Policy Statement. *Breastfeed. Med.*, 2012; 7: 323-324
- [36] Eiwegger T., Stahl B., Haidl P., Schmitt J., Boehm G., Dehlink E., Urbanek R., Szépfalusi Z.: Prebiotic oligosaccharides: in vitro evidence for gastrointestinal epithelial transfer and immunomodulatory properties. *Pediatr. Allergy Immunol.*, 2010; 21: 1179-1188
- [37] Engfer M.B., Stahl B., Finke B., Sawatzki G., Daniel H.: Human milk oligosaccharides are resistant to enzymatic hydrolysis in the upper gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2000; 71: 1589-1596
- [38] ESPGHAN Committee on Nutrition, Agostoni C., Braegger C., Decsi T., Kolacek S., Koletzko B., Michaelsen K.F., Mihatsch W., Moreno L.A., Puntis J., Shamir R., Szajewska H., Turck D., van Goudoever J.: Breast-feeding: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 2009; 49: 112-125
- [39] Falk P., Roth K.A., Boren T., Westblom T.U., Gordon J.I., Normark S.: An *in vitro* adherence assay reveals that *Helicobacter pylori* exhibits cell lineage-specific tropism in the human gastric epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993; 90: 2035-2039
- [40] Froehlich J.W., Dodds E.D., Barboza M., McJimpsey E.L., Seipert R.R., Francis J., An H.J., Freeman S., German J.B., Lebrilla C.B.: Glycoprotein expression in human milk during lactation. *J. Agric. Food Chem.*, 2010; 58: 6440-6448
- [41] Ganguli K., Walker W.A.: Probiotics in the prevention of necrotizing enterocolitis. *J. Clin. Gastroenterol.*, 2011; 45: S133-S138
- [42] García-Montoya I.A., Cendón T.S., Arévalo-Gallegos S., Rascón-Cruz Q.: Lactoferrin a multiple bioactive protein: an overview. *Biochim. Biophys. Acta*, 2012; 1820: 226-236
- [43] Garrido D., Dallas D.C., Mills D.A.: Consumption of human milk glycoconjugates by infant-associated bifidobacteria: mechanisms and implications. *Microbiology*, 2013; 159: 649-664
- [44] Georgi G., Bartke N., Wiens F., Stahl B.: Functional glycans and glycoconjugates in human milk. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2013; 98: S785-S785
- [45] Gnoth M.J., Kunz C., Kinne-Saffran E., Rudloff S.: Human milk oligosaccharides are minimally digested *in vitro*. *J. Nutr.*, 2000; 130: 3014-3020
- [46] Goehring K.C., Kennedy A.D., Prieto P.A., Buck R.H.: Direct evidence for the presence of human milk oligosaccharides in the circulation of breastfed infants. *PLoS One*, 2014; 9: e101692
- [47] Goldman A.S.: The immune system in human milk and the developing infant. *Breastfeed. Med.*, 2007; 2: 195-204
- [48] Goldman A.S., Chheda S., Garofalo R.: Evolution of immunologic functions of the mammary gland and the postnatal development of immunity. *Pediatr. Res.*, 1998; 43: 155-162
- [49] Górska S., Jarzab A., Gamian A.: Bakterie probiotyczne w żywieniu pokarmowym człowieka jako czynnik stymulujący układ odpornościowy. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2009; 63: 653-667
- [50] Hanisch F.G., Müller S.: MUC1: the polymorphic appearance of a human mucin. *Glycobiology*, 2000; 10: 439-449
- [51] Harmsen H.J., Wildeboer-Veloo A.C., Raangs G.C., Wagendorp A.A., Klijn N., Bindels J.G., Welling G.W.: Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 2000; 30: 61-67
- [52] Hart G.W.: Sweet insights into learning and memory. *Nat. Chem. Biol.*, 2006; 2: 67-68
- [53] Hylander M.A., Strobino D.M., Dhanireddy R.: Human milk feedings and infection among very low birth weight infants. *Pediatrics*, 1998; 102: E38
- [54] Jiang X., Huang P., Zhong W., Tan M., Farkas T., Morrow A.L., Newburg D.S., Ruiz-Palacios G.M., Pickering L.K.: Human milk contains elements that block binding of noroviruses to human histoblood group antigens in saliva. *J. Infect. Dis.*, 2004; 190: 1850-1859
- [55] Katayama T., Sakuma A., Kimura T., Makimura Y., Hiratake J., Sakata K., Yamanoi T., Kumagai H., Yamamoto K.: Molecular cloning and characterization of *Bifidobacterium bifidum* 1,2- α -L-fucosidase (AfcA), a novel inverting glycosidase (glycoside hydrolase family 95). *J. Bacteriol.*, 2004; 186: 4885-4893
- [56] Kątnik-Prastowska I., Orczyk-Pawłowicz M.: Expression and potential biological role of α (1,2)fucosylated glycotopes on amniotic and seminal fibronectins. *Biochem. Soc. Trans.*, 2011; 39: 355-359
- [57] Koning N., Kessen S.F., Van Der Voorn J.P., Appelmelk B.J., Jeurink P.V., Knippels L.M., Garssen J., Van Kooyk Y.: Human milk blocks DC-SIGN-pathogen interaction via MUC1. *Front. Immunol.*, 2015; 6: 112
- [58] Landberg E., Huang Y., Strömqvist M., Mechref Y., Hansson L., Lundblad A., Novotny M.V., Pålsson P.: Changes in glycosylation of human bile-salt-stimulated lipase during lactation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2000; 377: 246-254
- [59] Lesman-Movshovich E., Lerrer B., Gilboa-Garber N.: Blocking of *Pseudomonas aeruginosa* lectins by human milk glycans. *Can. J. Microbiol.*, 2003; 49: 230-235
- [60] Liao Y., Alvarado R., Phinney B., Lönnerdal B.: Proteomic characterization of human milk fat globule membrane proteins during a 12 month lactation period. *J. Proteome Res.*, 2011; 10: 3530-3541
- [61] Lin A.E., Autran C.A., Espanola S.D., Bode L., Nizet V.: Human milk oligosaccharides protect bladder epithelial cells against uropathogenic *Escherichia coli* invasion and cytotoxicity. *J. Infect. Dis.*, 2014; 209: 389-398
- [62] Lis J., Orczyk-Pawłowicz M., Kątnik-Prastowska I.: Białka mleka ludzkiego zaangażowane w procesy immunologiczne. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2013; 67: 529-547
- [63] Liu B., Newburg D.S.: Human milk glycoproteins protect infants against human pathogens. *Breastfeed. Med.*, 2013; 8: 354-362
- [64] Liu B., Yu Z., Chen C., Kling D.E., Newburg D.S.: Human milk mucin 1 and mucin 4 inhibit *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion of human intestinal epithelial cells *in vitro*. *J. Nutr.*, 2012; 142: 1504-1509
- [65] LoCascio R.G., Ninonuevo M.R., Freeman S.L., Sela D.A., Grimm R., Lebrilla C.B., Mills D.A., German J.B.: Glycoprofiling of bifidobacterial consumption of human milk oligosaccharides demonstrates strain specific, preferential consumption of small chain glycans secreted in early human lactation. *J. Agric. Food Chem.*, 2007; 55: 8914-8919
- [66] Lorenzini C.G., Baldi E., Bucherelli C., Sacchetti B., Tassoni G.: 2-Deoxy-D-galactose effects on passive avoidance memorization in the rat. *Neurobiol. Learn. Mem.*, 1997; 68: 317-324
- [67] Macpherson A.J., Harris N.L.: Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat. Rev. Immunol.*, 2004; 4: 478-485
- [68] Marcobal A., Barboza M., Froehlich J.W., Block D.E., German J.B., Lebrilla C.B., Mills D.A.: Consumption of human milk oligosaccharides by gut-related microbes. *J. Agric. Food Chem.*, 2010; 58: 5334-5340
- [69] Martin-Sosa S., Martin M.J., Hueso P.: The sialylated fraction of milk oligosaccharides is partially responsible for binding to entero-

- toxigenic and uropathogenic *Escherichia coli* human strains. *J. Nutr.*, 2002; 132: 3067-3072
- [70] Matthies H., Staak S., Krug M.: Fucose and fucosyllactose enhance *in-vitro* hippocampal long-term potentiation. *Brain Res.*, 1996; 725: 276-280
- [71] McGuire W., Anthony M.Y.: Donor human milk versus formula for preventing necrotising enterocolitis in preterm infants: systematic review. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.*, 2003; 88: F11-F14
- [72] Mehra R., Barile D., Marotta M., Lebrilla C.B., Chu C., German J.B.: Novel high-molecular weight fucosylated milk oligosaccharides identified in dairy streams. *PLoS One*, 2014; 9: e96040
- [73] Molinari C.E., Casadio Y.S., Hartmann B.T., Livk A., Bringans S., Arthur P.G., Hartmann P.E.: Proteome mapping of human skim milk proteins in term and preterm milk. *J. Proteome Res.*, 2012; 11: 1696-1714
- [74] Morowitz M.J., Poroyko V., Caplan M., Alverdy J., Liu D.C.: Redefining the role of intestinal microbes in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Pediatrics*, 2010; 125: 777-785
- [75] Morrow A.L., Ruiz-Palacios G.M., Jiang X., Newburg D.S.: Human-milk glycans that inhibit pathogen binding protect breast-feeding infants against infectious diarrhea. *J. Nutr.*, 2005; 135: 1304-1307
- [76] Murrey H.E., Gama C.I., Kalovidouris S.A., Luo W.L., Driggers E.M., Porton B., Hsieh-Wilson L.C.: Protein fucosylation regulates synapsin Ia/Ib expression and neuronal morphology in primary hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006; 103: 21-26
- [77] Naarding M.A., Dirac A.M., Ludwig I.S., Speijer D., Lindquist S., Vestman E.L., Stax M.J., Geijtenbeek T.B., Pollakis G., Hernell O., Paxton W.A.: Bile salt-stimulated lipase from human milk binds DC-SIGN and inhibits human immunodeficiency virus type 1 transfer to CD4+ T cells. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2006; 50: 3367-3374
- [78] Naarding M.A., Ludwig I.S., Groot F., Berkhout B., Geijtenbeek T.B., Pollakis G., Paxton W.A.: Lewis X component in human milk binds DC-SIGN and inhibits HIV-1 transfer to CD4+ T lymphocytes. *J. Clin. Invest.*, 2005; 115: 3256-3264
- [79] Newburg D.S.: Neonatal protection by an innate immune system of human milk consisting of oligosaccharides and glycans. *J. Anim. Sci.*, 2009; 87, Suppl. 1: 26-34
- [80] Newburg D.S., Pickering L.K., McCluer R.H., Cleary T.G.: Fucosylated oligosaccharides of human milk protect suckling mice from heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.*, 1990; 162: 1075-1080
- [81] Nwosu C.C., Aldredge D.L., Lee H., Lerno L.A., Zivkovic A.M., German J.B., Lebrilla C.B.: Comparison of the human and bovine milk N-glycome via high-performance microfluidic chip liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *J. Proteome Res.*, 2012; 11: 2912-2924
- [82] Orczyk-Pawliowicz M.: Znaczenie fukozytacji glikokoniuatow w zdrowiu i chorobie. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2007; 61: 240-252
- [83] Orczyk-Pawliowicz M., Hirnle L., Berghausen-Mazur M., Kątnik-Prastowska I.: Lactation stage-related expression of sialylated and fucosylated glycotopes of human milk α -1-acid glycoprotein. *Breastfeed. Med.*, 2014; 9: 313-319
- [84] Orczyk-Pawliowicz M., Hirnle L., Berghausen-Mazur M., Kątnik-Prastowska I.: Terminal glycotope expression on milk fibronectin differs from plasma fibronectin and changes over lactation. *Clin. Biochem.*, 2015; 48: 167-173
- [85] Pan F., Zhao X., Waigh T.A., Lu J.R., Miano F.: Interfacial adsorption and denaturation of human milk and recombinant rice lactoferrin. *Biointerphases*, 2008; 3: FB36
- [86] Parry S., Hanisch F.G., Leir S.H., Sutton-Smith M., Morris H.R., Dell A., Harris A.: N-Glycosylation of the MUC1 mucin in epithelial cells and secretions. *Glycobiology*, 2006; 16: 623-634
- [87] Patton S.: Detection of large fragments of the human milk mucin MUC-1 in feces of breast-fed infants. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 1994; 18: 225-230
- [88] Patton S., Gendler S.J., Spicer A.P.: The epithelial mucin, MUC1, of milk, mammary gland and other tissues. *Biochim. Biophys. Acta*, 1995; 1241: 407-423
- [89] Penders J., Thijs C., Vink C., Stelma F.F., Snijders B., Kummeling I., van den Brandt P.A., Stobberingh E.E.: Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics*, 2006; 118: 511-521
- [90] Perret S., Sabin C., Dumon C., Pokorná M., Gautier C., Galanina O., Ilia S., Bovin N., Nicaise M., Desmadril M., Gilboa-Garber N., Wimmerová M., Mitchell E.P., Imberty A.: Structural basis for the interaction between human milk oligosaccharides and the bacterial lectin PA-IIL of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. J.*, 2005; 389: 325-332
- [91] Peterson R., Cheah W.Y., Grinyer J., Packer N.: Glycoconjugates in human milk: protecting infants from disease. *Glycobiology*, 2013; 23: 1425-1438
- [92] Pohle W., Acosta L., Rührich H., Krug M., Matthies H.: Incorporation of [3H]fucose in rat hippocampal structures after conditioning by perforant path stimulation and after LTP-producing tetanization. *Brain Res.*, 1987; 410: 245-256
- [93] Pytrus T., Iwańczak F.: Leczenie ostrych biegunek u dzieci. *Nowa Pediatria*, 2002; 3: 149-158
- [94] Reynolds J.D.: The management of retinopathy of prematurity. *Paediatr. Drugs*, 2001; 3: 263-272
- [95] Royle L., Roos A., Harvey D.J., Wormald M.R., van Gijlswijk-Janssen D., Redwan el-R.M., Wilson I.A., Daha M.R., Dwek R.A., Rudd P.M.: Secretory IgA N- and O-glycans provide a link between the innate and adaptive immune systems. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 20140-20153
- [96] Ruiz-Moyano S., Totten S.M., Garrido D.A., Smilowitz J.T., German J.B., Lebrilla C.B., Mills D.A.: Variation in consumption of human milk oligosaccharides by infant gut-associated strains of *Bifidobacterium breve*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2013; 79: 6040-6049
- [97] Ruiz-Palacios G.M., Cervantes L.E., Ramos P., Chavez-Munguia B., Newburg D.S.: *Campylobacter jejuni* binds intestinal H(O) antigen (Fuc α 1,2Gal β 1,4GlcNAc), and fucosyloligosaccharides of human milk inhibit its binding and infection. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 14112-14120
- [98] Ruvoën-Clouet N., Mas E., Marionneau S., Guillon P., Lombardo D., Le Pendu J.: Bile-salt-stimulated lipase and mucins from milk of 'secretor' mothers inhibit the binding of Norwalk virus capsids to their carbohydrate ligands. *Biochem. J.*, 2006; 393: 627-634
- [99] Saeland E., de Jong M.A., Nabatov A.A., Kalay H., Geijtenbeek T.B., van Kooyk Y.: MUC1 in human milk blocks transmission of human immunodeficiency virus from dendritic cells to T cells. *Mol. Immunol.*, 2009; 46: 2309-2316
- [100] Savino F., Cordisco L., Tarasco V., Locatelli E., Di Gioia D., Oggero R., Matteuzzi D.: Antagonistic effect of *Lactobacillus* strains against gas-producing coliforms isolated from colicky infants. *BMC Microbiol.*, 2011; 11: 157
- [101] Savino F., Cresi F., Pautasso S., Palumeri E., Tullio V., Roana J., Silvestro L., Oggero R.: Intestinal microflora in breastfed colicky and non-colicky infants. *Acta Paediatr.*, 2004; 93: 825-829
- [102] Sela D.A., Garrido D., Lerno L., Wu S., Tan K., Eom H.J., Joachimiak A., Lebrilla C.B., Mills D.A.: *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 α -fucosidases are active on fucosylated human milk oligosaccharides. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2012; 78: 795-803
- [103] Sharon N., Ofek I.: Safe as mother's milk: carbohydrates as future anti-adhesion drugs for bacterial diseases. *Glycoconj. J.*, 2000; 17: 659-664
- [104] Sheinfeld J., Schaeffer A.J., Cordon-Cardo C., Rogatko A., Fair W.R.: Association of the Lewis blood-group phenotype with recurrent

- urinary tract infections in women. *N. Engl. J. Med.*, 1989; 320: 773-777
- [105] Smilowitz J.T., Totten S.M., Huang J., Grapov D., Durham H.A., Lammi-Keefe C.J., Lebrilla C., German J.B.: Human milk secretory immunoglobulin A and lactoferrin N-glycans are altered in women with gestational diabetes mellitus. *J. Nutr.*, 2013; 143: 1906-1912
- [106] Staudacher E., Altmann F., Wilson I.B., März L.: Fucose in N-glycans: from plant to man. *Biochim. Biophys. Acta*, 1999; 1473: 216-236
- [107] Thum C., Cookson A.L., Otter D.E., McNabb W.C., Hodgkinson A.J., Dyer J., Roy N.C.: Can nutritional modulation of maternal intestinal microbiota influence the development of the infant gastrointestinal tract? *J. Nutr.*, 2012; 142: 1921-1928
- [108] Totten S.M., Zivkovic A.M., Wu S., Ngyuen U., Freeman S.L., Ruhaak L.R., Darboe M.K., German J.B., Prentice A.M., Lebrilla C.B.: Comprehensive profiles of human milk oligosaccharides yield highly sensitive and specific markers for determining secretor status in lactating mothers. *J. Proteome Res.*, 2012; 11: 6124-6133
- [109] Tu Z., Lin Y.N., Lin C.H.: Development of fucosyltransferase and fucosidase inhibitors. *Chem. Soc. Rev.*, 2013; 42: 4459-4475
- [110] Urashima T., Asakuma S., Leo F., Fukuda K., Messer M., Oftedal O.T.: The predominance of type I oligosaccharides is a feature specific to human breast milk. *Adv. Nutr.*, 2012; 3: 473S-482S
- [111] van Berkel P.H., van Veen H.A., Geerts M.E., de Boer H.A., Nuijens J.H.: Heterogeneity in utilization of N-glycosylation sites Asn624 and Asn138 in human lactoferrin: a study with glycosylation-site mutants. *Biochem. J.*, 1996; 319: 117-122
- [112] van Neerven R.J., Knol E.F., Heck J.M., Savelkoul H.F.: Which factors in raw cow's milk contribute to protection against allergies? *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2012; 130: 853-858
- [113] Wacklin P., Mäkiyuokko H., Alakulppi N., Nikkilä J., Tenkanen H., Råbinä J., Partanen J., Aranko K., Mättö J.: Secretor genotype (*FUT2* gene) is strongly associated with the composition of *Bifidobacteria* in the human intestine. *PLoS One*, 2011; 6: e20113
- [114] Wang B., Mao Y.K., Diorio C., Pasyk M., Wu R.Y., Bienenstock J., Kunze W.A.: Luminal administration *ex vivo* of a live *Lactobacillus* species moderates mouse jejunal motility within minutes. *FASEB J.*, 2010; 24: 4078-4088
- [115] Wang C.S., Dashti A., Jackson K.W., Yeh J.C., Cummings R.D., Tang J.: Isolation and characterization of human milk bile salt-activated lipase C-tail fragment. *Biochemistry*, 1995; 34: 10639-10644
- [116] Weichert S., Jennewein S., Hüfner E., Weiss C., Borkowski J., Putze J., Schrotten H.: Bioengineered 2'-fucosyllactose and 3-fucosyllactose inhibit the adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* and enteric pathogens to human intestinal and respiratory cell lines. *Nutr. Res.*, 2013; 33: 831-838
- [117] Wiederschain G.Y., Newburg D.S.: Glycoconjugate stability in human milk: glycosidase activities and sugar release. *J. Nutr. Biochem.*, 2001; 12: 559-564
- [118] Wilson N.L., Robinson L.J., Donnet A., Bovetto L., Packer N.H., Karlsson N.G.: Glycoproteomics of milk: differences in sugar epitopes on human and bovine milk fat globule membranes. *J. Proteome Res.*, 2008; 7: 3687-3696
- [119] World Health Organization
http://www.who.int/nutrition/publications/infantfeeding/nut_adequacy_of_exc_bfeeding_eng (07.10.2014)
- [120] Wu S., Grimm R., German J.B., Lebrilla C.B.: Annotation and structural analysis of sialylated human milk oligosaccharides. *J. Proteome Res.*, 2011; 10: 856-868
- [121] Wu S., Tao N., German J.B., Grimm R., Lebrilla C.B.: Development of an annotated library of neutral human milk oligosaccharides. *J. Proteome Res.*, 2010; 9: 4138-4151
- [122] Yen M.H., Wu A.M., Yang Z., Gong Y.P., Chang E.T.: Recognition roles of the carbohydrate glycotopes of human and bovine lactoferrins in lectin-N-glycan interactions. *Biochim. Biophys. Acta*, 2011; 1810: 139-149
- [123] Yu Z.T., Chen C., Kling D.E., Liu B., McCoy J.M., Merighi M., Heidtman M., Newburg D.S.: The principal fucosylated oligosaccharides of human milk exhibit prebiotic properties on cultured infant microbiota. *Glycobiology*, 2013; 23: 169-177
- [124] Yu Z.T., Chen C., Newburg D.S.: Utilization of major fucosylated and sialylated human milk oligosaccharides by isolated human gut microbes. *Glycobiology*, 2013; 23: 1281-1292
- [125] Zimecki M., Artym J.: Therapeutic properties of proteins and peptides from colostrum and milk. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2005; 59: 309-323

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.