

Programowanie mikrobiotyczne – znaczenie prebiotyków i probiotyków w tworzeniu mikrobiomu jelitowego i żywieniu niemowląt

Prof. dr hab. n. med. Bożena Cukrowska

kierownik Pracowni Immunologii, Zakład Patologii, Instytut „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka”

Mikrobiota/mikrobiom przewodu pokarmowego

Mikrobiota przewodu pokarmowego to zespół mikroorganizmów zasiedlających błony śluzowe głównie jelit, stanowiący integralną część organizmu człowieka. Liczba bakterii kolonizujących przewód pokarmowy osoby dorosłej (10^{14} komórek) jest porównywalna z liczbą wszystkich komórek ciała, przy czym 10-krotnie przewyższa liczbę jądrzastych komórek człowieka¹. Natomiast mikrobiom (zespół wszystkich genów mikrobioty, czyli genom mikrobioty) jest ponad stukrotnie większy w porównaniu do genomu człowieka.

Kompleksowe badania molekularne mikrobiomu człowieka pozwoliły sklasyfikować mikroorganizmy jelitowe do 5 typów (ang. phyla): *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* oraz *Fusobacteria*. U dorosłych zdecydowana większość (ponad 90%) bakterii jelitowych należy do dwóch typów *Bacteroidetes* i *Firmicutes*, wśród których można zidentyfikować ponad 1000 gatunków. Tak bioróżnorodny kompleks mikroorganizmów to również źródło wielu metabolitów, wśród których wyróżniamy witaminy, enzymy, nukleotydy, aminokwasy, sterole, cukry, alkohole, kwasy organiczne i krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (SCFA, ang. short chain fatty acids)².

Skład mikrobioty jelitowej zmienia się w trakcie rozwoju człowieka. Mikrobiota kształtuje się już w życiu prenatalnym i zależy głównie od składu mikrobioty matki. Wykazano, że w łożysku i płynie owodniowym obecny jest materiał genetyczny bakterii pochodzących z przewodu pokarmowego matki, przy czym dane wskazują na wysokie podobieństwo mikrobiomu łożyskowego z mikrobiomem jamy ustnej matki³. W okresie płodowym wpływ na ekosystem jelitowy dziecka, mają również drobnocząsteczkowe metabolity mikrobioty matczynej, w tym SCFA. Główny proces zasiedlania jelit mikroorganizmami następuje dopiero po porodzie. U noworodka, niezależnie od wieku płodowego 98% bakterii jelitowych należy do 4 typów: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*. Wraz z

rozwojem dziecka skład mikrobioty zmienia się. Około 2-3 roku życia mikrobiom jelitowy stabilizuje się, a udział procentowy poszczególnych typów bakterii jest podobny do obserwowanego u osoby dorosłej, z dominacją *Bacteroidetes*⁴.

Rola mikrobioty jelitowej

Obecnie uważa się, że mikrobiota tworzy „super organ” niezbędny do życia, który wpływa na funkcjonowanie większości narządów i układów. Mikrobiota ma wpływ na perystaltykę jelit, produkcję witamin, trawienie, przyswajanie składników odżywczych oraz na metabolizm kwasów żółciowych i procesy fermentacyjne zachodzące w jelicie grubym. Poza efektami na pracę jelit mikrobiota wpływa na funkcjonowanie układu immunologicznego i nerwowego. Ponad 70% limfocytów człowieka to komórki tkanki limfatycznej związanej z przewodem pokarmowym, tzw. układem GALT (ang. gut associated lymphoid tissue), który komunikuje się z mikrobiotą poprzez komórki nabłonkowe oraz wypustki komórek dendrytycznych skierowane do światła jelita. Jednocześnie nabłonki jelit otoczone są licznymi neuronami (około 100 milionów) tworzącymi układ neuro-endokrynną przewodu pokarmowego. Jelita to również główne źródło serotoniny (aż 95% serotoniny pochodzi z jelit)⁵.

Wpływ mikrobioty na odporność

Układ immunologiczny noworodka pomimo wykształcenia organów limfatycznych jest niedojrzały, a mikrobiota jelitowa to główne źródło antygenów zewnętrznych stymulujących odporność⁶. Bakterie zasiedlające jelita tworzą pierwszą linię obrony przed patogenami, aktywują produkcję sekrecyjnych immunoglobulin (Ig) klasy A oraz ekspresję białek (np. zonuliny, okludyny) biorących udział w tworzeniu połączeń międzynabłonkowych. Opisane mechanizmy uszczelniają nabłonki jelitowe i odpowiadają za prawidłowe działanie bariery jelitowej chroniącej organizm przed wnikaniem mikroorganizmów patogennych, alergenów oraz toksycznych związków. Powstały w wyniku fermentacji kwas mlekowy obniża pH stolca, co zapobiega namnażaniu się bakterii patogennych, natomiast SCFA, szczególnie kwas masłowy, indukuje odbudowę i namnażanie komórek nabłonkowych⁷. Tworzenie nabłonkowej bariery jelitowej ma ogromne znaczenie w patogenezie wielu chorób. „Nieszczelne” jelito (ang. „leaky” gut) może indukować rozwój alergii, chorób autoimmunizacyjnych (celiakii, cukrzycy typu 1), nieswoistych zapaleń jelit, autyzmu, niealkoholowych stłuszczeń wątroby⁸. Nabłonki błony śluzowej jelit ogrywiają również

ogromną rolę w aktywacji układu immunologicznego poprzez ekspresję receptorów rozpoznających wzorce molekularne bakterii, wśród których rozróżniamy receptory Toll-podobne (TLR, ang. Toll-like receptors)⁹.

Bakterie przewodu pokarmowego reagując z TLR zlokalizowanymi na nabłonku jelitowym oraz wypustkach komórek dendrytycznych pobudzają drogi sygnalizacyjne indukujące liczne komórki efektorowe (makrofagi, limfocyty B, komórki NK, pomocnicze i cytotoksyczne limfocyty T) oraz limfocyty Treg. Limfocyty Treg, to komórki regulujące odpowiedź immunologiczną, które odpowiedzialne są za utrzymanie równowagi cytokinowej Th1/Th2/Th17 i rozwój tolerancji immunologicznej. Ma to szczególne znaczenie w okresie noworodkowo-niemowlęcym, gdyż profil cytokinowy limfocytów T we wczesnej ontogenezie skierowany jest w kierunku pro-alergicznym Th2, a zdolność do produkcji cytokin Th1 (IL-12, IFN-gamma) jest upośledzona. Zaburzenia mikrobioty w tym okresie mogą skutkować zaprogramowaniem układu immunologicznego z jednej strony w kierunku chorób atopowych, z drugiej w kierunku chorób autoimmunizacyjnych i metabolicznych.

Ostatnio podkreśla się również znaczenie mikrobioty w procesach epigenetycznych¹⁰. Mikrobiota i jej metabolity (szczególnie SCFA) mogą regulować ekspresję genów, różnicowanie i rozwój komórek, modyfikując m. in. ryzyko rozwoju alergii, otyłości, nieswoistych zapaleń jelit. Wykazano, że regulacje epigenetyczne mają miejsce już w życiu płodowym i zależą od mikrobiomu matki. Różnice w metylacji ponad 500 genów obserwowano u kobiet z dominacją *Firmicutes*.

Mikrobiotyczna teoria rozwoju przewlekłych chorób nieinfekcyjnych

Mikrobiotyczna hipoteza zakłada, że mikrobiota i jej metabolom w pierwszych 1000. dniach życia, włączając okres prenatalny, programują organizm dziecka, wpływając na jego stan zdrowia w późniejszych latach¹¹. Dysbioza, czyli zaburzenie składu i funkcji mikrobioty/metabolomu aktywuje niepożądane procesy immunologiczne oraz metaboliczne, co skutkuje rozwojem przewlekłych chorób nieinfekcyjnych. Zaburzenia składu mikrobioty jelitowej obserwuje się w chorobach alergicznych, cukrzycy typu 1, celiakii, otyłości. Badania prospektywne pokazują, że dysbioza w okresie niemowlęcym wyprzedza rozwój choroby, co

potwierdza tezę, że przyszły stan zdrowia dziecka programowany jest w okresie kształtowania się biocenozy jelitowej.

Czynniki warunkujące optymalny rozwój mikrobiomu jelitowego

Mikrobiom kształtuje się w pierwszych 1000 dni życia dziecka i w tym okresie jest szczególnie wrażliwy na różne czynniki: skład mikrobioty matki, długość ciąży, typ porodu, dietę dziecka, liczbę rodzeństwa, kontakt z rówieśnikami, zwierzętami, antybiotykoterapię¹². Okres tworzenia mikrobiomu, nazywamy często „oknem możliwości” (ang. „window of opportunity”), co podkreśla, że jest to czas kiedy możemy wpływać na skład i funkcje mikrobioty.

Optymalny skład mikrobioty, zmniejszający ryzyko zachorowania na choroby przewlekłe, w tym alergię, mają niemowlęta matek zdrowych, nie przyjmujących antybiotyków oraz używek w czasie ciąży i laktacji, urodzone naturalnie, karmione piersią, żyjące w kontakcie z naturą, zwierzętami, rówieśnikami i rodzeństwem, bez stosowania antybiotyków i zbytnej sterylizacji życia¹³.

W trakcie porodu naturalnego głównym źródłem mikroorganizmów kolonizujących noworodka jest mikrobiota zasiedlająca drogi rodne i przewód pokarmowy matki¹⁴. W pierwszej dobie życia w jelitach dominują względnie beztlenowe bakterie *Escherichia coli* i enterokoki, które namnażają się w bogatym w tlen przewodzie pokarmowym noworodka i stwarzają warunki do dalszej kolonizacji bakteriami beztlenowymi z rodzaju *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Bacteroides* i *Clostridium*. Korzystnym efektem obserwowanym u noworodków z porodów drogami natury jest zmniejszenie się już w 3 dobie życia liczebności bakterii z rodzaju *Clostridium* na korzyść *Bifidobacterium*¹⁴. Noworodek urodzony cięciem cesarskim pozbawiony jest kontaktu z mikrobiotą matki, co skutkuje dysbiozą obserwowaną już w pierwszych godzinach, a następnie dniach życia dziecka. U 1-dniowych noworodków z cięć cesarskich wykazano dominację mikroorganizmów kolonizujących skórę matki, zmniejszenie liczby *Escherichia coli* oraz *Bacteroides fragilis*, oraz częstsze występowanie *Clostridium difficile* i bakterii pochodzących ze środowiska szpitalnego. Badania potwierdzają, że dysbioza dzieci urodzonych cięciem cesarskim utrzymuje się co najmniej przez 7 pierwszych lat, a być może nawet przez całe życie¹⁵. U tych dzieci obserwuje się obniżenie

bioróżnorodności mikrobiomu jelitowego oraz obniżenie liczebności *Bacteroidetes*, *Bifidobacterium* sp. i *Lactobacillus* sp.

Poród cięciem cesarskim, antybiotykoterapia oraz karmienie mieszankami – to trzy główne czynniki negatywnie wpływające na rozwój mikrobioty jelitowej. Dzieci z cięć cesarskich narażone są na wyższe ryzyko zachorowania na alergię pokarmową, atopowe zapalenie skóry, astmę, celiakię¹¹. Również antybiotykoterapia zastosowana w okresie kształtowania mikrobiomu może indukować długotrwałą dysbiozę korelującą z wyższym ryzykiem zachorowania na astmę, otyłość czy celiakię. Im więcej czynników negatywnie wpływających na mikrobiom tym ryzyko zachorowania jest wyższe. Wykazano, że ryzyko zachorowania na astmę u dzieci w wieku 4,5-6 lat wzrastało ponad siedmiokrotnie (OR=7.77, 95%CI: 6.25- 9.65), gdy matki były leczone antybiotykami w trakcie ciąży, poród odbył się cięciem cesarskim, dzieci nie miały rodzeństwa i były leczone antybiotykami jako niemowlęta¹⁶.

Pokarm kobiecy – naturalny synbiotyki stymulujący prawidłowy rozwój mikrobioty jelitowej

Dieta niemowlęcia to główny czynnik modulujący skład mikrobioty jelitowej po porodzie. Najlepszym pokarmem dla niemowląt wspomagającym niedojrzałe funkcje układu pokarmowego, immunologicznego i optymalnie kształtującym rozwój mikrobioty jelitowej jest mleko matki. W kale zdrowych noworodków urodzonych o czasie drogami i siłami natury, karmionych mlekiem matki po 2 tygodniach stwierdzano dominację bifidobakterii¹⁴. Mikrobiota dzieci karmionych mieszankami mlecznymi jest bardziej zróżnicowana. Identyfikuje się u nich bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* sp. i *Bacteroides* sp.

Optymalny rozwój mikrobioty u niemowląt karmionych piersią wynika z unikalnego składu mleka kobiety. W mleku matki obecne są sekrecyjne IgA – stanowiące pierwszą linię obrony oraz liczne białka i peptydy o aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwwirusowej (np. laktoferyna, lizozym). Oba składniki chronią jelita przed zasiedlaniem patogenami¹⁷. Mleko kobiece zawiera również cukry: laktozę oraz unikalne oligosacharydy (ang. human milk oligosaccharides, HMO) o właściwościach prebiotycznych¹⁸. Prebiotyki definiuje się jako substancje pokarmowe, odporne są na działanie enzymów trawiennych, które w

niezmienionej postaci docierają się do jelita grubego, gdzie stanowią pożywkę dla bakterii zasiedlających jelito grube.

HMO to rodzina około 200 zróżnicowanych pod względem budowy oligosacharydów tworzonych na bazie galaktozy i glukozy, zazwyczaj złożonych z 3 do 8 jednostek monosacharydowych, które stanowią trzeci co do wielkości, po laktozie i tłuszczu, składnik mleka kobiecego. HMO selektywnie indukują namnażanie bifidobakterii, powodują wzrost stężenia SCFA oraz obniżenie pH kału. Ponadto HMO mają zdolność wiązania się ze specyficznymi receptorami na powierzchni nabłonka jelitowego, co zapobiega adhezji bakterii patogennych.

W mleku kobiecym oprócz naturalnych prebiotyków obecne są liczne bakterie z gatunku *Lactobacillus*: *L. gasseri*, *L. fermentum*, *L. salivarius*, *L. reuteri*, czy *Bifidobacterium breve*, wśród których wyizolowano szczepy o korzystnym działaniu probiotycznym (*L. fermentum* CECT5716 i *L. salivarius* CECT5713)¹⁹. Bakterie mleka kobiecego najprawdopodobniej pochodzą z mikrobioty jelitowej matki, skąd są transferowane do gruczołów mlecznych za pomocą komórek dendrytycznych zlokalizowanych w przewodzie pokarmowym²⁰.

Mleko kobiece można więc zaliczyć do naturalnych synbiotyków (naturalny produkt, w skład którego wchodzi prebiotyki HMO oraz bakterie probiotyczne). Skład obu aktywnych komponent mleka kobiecego zależy od czynników genetycznych (polimorfizmu genów FUT2 i FUT3), składu mikrobioty jelitowej i skórnej kobiety, jej stanu zdrowia oraz przyjmowanych leków, np. antybiotyków. Wykazano, że antybiotykoterapia w okresie ciąży i laktacji drastycznie obniża w mleku liczebność bakterii z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*²¹. Natomiast mleko kobiet po cięciu cesarskim oraz matek otyłych zawiera mniejszą liczbę bifidobakterii w porównaniu z mlekiem kobiet po porodach naturalnych i o prawidłowej masie ciała²².

Karmienie piersią a prewencja chorób przewlekłych

Mikrobiom jelitowy niemowląt karmionych piersią korzystnie wpływa na rozwój odporności i indukuje tolerancję immunologiczną¹³. Potwierdzono, że wyłącznie karmienie piersią przez co najmniej 3 miesiące obniża ryzyko zachorowania na atopowe zapalenie skóry, nawet u dzieci

obciążonych genetycznie²³, natomiast 6 miesięczny okres karmienia obniża zwiększone ryzyko zachorowania na astmę nawet u dzieci urodzonych cięciem cesarskim²⁴.

Prebiotyki i probiotyki w mieszankach – wpływ na mikrobiom i stan zdrowia dzieci

Mieszanki przeznaczone do karmienia niemowląt powstają na bazie mleka krowiego, które różni się składem w porównaniu do mleka kobiecego. Dlatego producenci wzbogacają mieszanki w bioaktywne komponenty obecne w mleku kobiecym, w tym substancje bezpośrednio wpływające na mikrobiom dziecka, takie jak oligosacharydy o właściwościach prebiotycznych lub bakterie probiotyczne. Dostępne są również mieszanki synbiotyczne zawierające oligosacharydy oraz bakterie probiotyczne.

Prebiotyczne oligosacharydy

Obecnie w mieszankach stosowane są przede wszystkim galaktooligosacharydy (GOS) powstałe na bazie laktozy (dwucukru występującego naturalnie w mleku kobiecym), fruktooligosacharydy (FOS) i inulina, obie substancje pochodzenia roślinnego powstałe na bazie fruktozy oraz polidekstroza (polimer glukozy). Najwięcej publikacji dotyczy suplementacji mieszanek GOS/FOS i GOS. Wykazano, że wzbogacanie mieszanek w prebiotyczne oligosacharydy GOS i GOS/FOS jest bezpieczne i korzystnie wpływa na zmianę profilu mikrobiotycznego stolca niemowląt w kierunku obecnego u dzieci karmionych piersią^{25,26}. **U niemowląt spożywających mieszanki początkowe wzbogacone w GOS obserwowano wzrost liczebności bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* oraz obniżenie pH stolca do wartości stwierdzanych u dzieci karmionych piersią^{26,27}. Dodatkowo dodatek prebiotycznych oligosachardów indukował profil SCFA podobny do obecnego u niemowląt karmionych mlekiem matki²⁶.** Wykazano również, że efekt bifidogeny mieszanki następczej z GOS podawanej przez 18 tygodni utrzymywał się przez następnych 12 tygodni pomimo zaprzestania podawania tej mieszanki²⁷. W wieloośrodkowym randomizowanym kontrolowanym placebo badaniu klinicznym wykazano natomiast, że korzystna modulacja składu mikrobioty jelitowej (wzrost liczebności *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* z jednoczesnym obniżeniem liczby bakterii z rodzaju *Clostridium*) u niemowląt spożywających mieszanki początkowe z dodatkiem GOS wpływa na stan zdrowia, powodując zmniejszenie ryzyka wystąpienia kolki niemowlęcej²⁸.

Szczepy probiotyczne – unikalny szczep *Lactobacillus fermentum* CECT 5716 z mleka kobiecego

Probiotyki zgodnie z definicją Światowej Organizacji Zdrowia to żywe mikroorganizmy, które podane w odpowiedniej dawce mają korzystny wpływ na zdrowie²⁹. Wzbogacanie mieszanek w szczepy probiotyczne wydaje się bardzo zasadne biorąc pod uwagę ich naturalną obecność w mleku kobiecym. ***L. fermentum* CECT 5716 stanowi unikalny szczep probiotyczny, wyizolowany z mleka kobiecego – naturalnego miejsca pochodzenia¹⁹. Badania kliniczne przeprowadzone na grupie niemowląt potwierdzają, że dodatek *L. fermentum* CECT 5716 do mieszanek jest bezpieczny i nie wykazuje żadnych działań niepożądanych³⁰.** W badaniach eksperymentalnych wykazano, że *L. fermentum* CECT 5716 posiada wysoką zdolność adhezji do komórek nabłonkowych, stymuluje komórki kubkowe do produkcji śluzu poprzez aktywację ekspresji genów MUC 2 i MUC5B³¹. Posiada również zdolność fermentacji oligosacharydów i produkcji SCFA (wpływających korzystnie na barierę nabłonkową) oraz glutationu (przeciwutleniacza chroniącego przed negatywnymi skutkami stresu oksydacyjnego). Szczep *L. fermentum* CECT 5716 wykazuje również wysoką aktywność antagonistyczną w stosunku do licznych patogenów zapobiegając ich zasiedlaniu w jelicie niemowląt. W badaniach klinicznych pokazano, że suplementacja szczepem *L. fermentum* CECT 5716 wzmacnia odporność. W grupie suplementowanej obserwowano wzrost stężenia IgA i liczby komórek NK³² oraz wyższą niż w grupie kontrolnej (bez suplementacji) odpowiedź poszczepienną na szczepienie przeciwko grypie³³.

Mieszanki synbiotyczne

Mieszanki synbiotyczne zawierające w swoim składzie zarówno prebiotyczne oligosacharydy oraz probiotyczne szczepy izolowane z mleka kobiecego wydają się najbardziej przypominać swoim składem pokarm kobiecy. Przykładem takiej mieszanki są produkty zawierające probiotyczne szczepy *L. fermentum* CECT 5716 i GOS. Randomizowane badania z grupą kontrolną przeprowadzono na niemowlętach karmionych synbiotyczną mieszanką następną wzbogaconą w *L. fermentum* CECT 5716 i GOS³⁶. Do badania włączono niemowlęta w wieku 6 miesięcy, którym podawano mieszankę synbiotyczną lub mieszankę wzbogaconą tylko w GOS (grupa kontrolna) przez następnych 6 miesięcy (do 12 miesiąca życia). **W tym okresie w**

grupie niemowląt karmionych mieszanką synbiotyczną obserwowano znamienne statystycznie spadki infekcji układu oddechowego o 26% ($p=0,02$) oraz układu pokarmowego o 46% ($p=0,03$) w porównaniu do grupy karmionej mieszanką wzbogaconą jedynie w GOS³⁶. Randomizowane badanie z grupą kontrolną przeprowadzono również na niemowlętach będących w wieku 1. miesiąca, którym podawano początkową mieszankę synbiotyczną przez 5 miesięcy (grupa kontrolna otrzymywała mieszankę wzbogaconą jedynie w prebiotyczne GOS). Badanie to wykazało, że mieszanka synbiotyczna jest dobrze tolerowana i bezpieczna oraz ma korzystne efekty zdrowotne³⁴. **U niemowląt karmionych mieszanką synbiotyczną trzykrotnie rzadziej wystąpiły zakażenia przewodu pokarmowego ($p=0,018$) w porównaniu do dzieci karmionych mieszanką prebiotyczną (wzbogaconą tylko w GOS). Trzyletnia obserwacja niemowląt włączonych do tego badania potwierdziła również długoterminowe bezpieczeństwo synbiotycznej mieszanki początkowej³⁵.**

Przeprowadzone, opisane powyżej, wieloośrodkowe badania randomizowane z grupą kontrolną potwierdzają, że mieszanki synbiotyczne zarówno początkowe jak i następne są bezpieczne, dobrze tolerowane i nie mają negatywnego wpływu na rozwój dziecka w okresie długoterminowym. Synergizm działania obu bioaktywnych składników (prebiotycznego GOS i probiotycznego szczepu *L. fermentum* CECT 5716) korzystnie wpływa na zdrowie dzieci redukując ryzyko infekcji przewodu pokarmowego i układu oddechowego.

Podsumowanie

1. Pierwsze 1000 dni życia dziecka, włączając okres prenatalny, to czas tworzenia mikrobioty jelitowej, która programuje funkcjonowanie organizmu w dalszym życiu.
2. Optymalny skład mikrobiomu jelitowego obserwuje się u niemowląt urodzonych naturalnie i karmionych piersią.
3. Pokarm kobiecy to naturalny synbiotyk zawierający prebiotyczne oligosacharydy (HMO) oraz probiotyczne bakterie z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*.
4. *L. fermentum* CECT 56517 to unikalny szczep probiotyczny wyizolowany z mleka kobiecego
5. Mieszanka synbiotyczna wzbogacona w prebiotyczny GOS i szczep *L. fermentum* CECT 56517 korzystnie wpływa na mikrobiom jelitowy i wzmacnia odporność.

6. W porównaniu do mieszanki wzbogaconej w GOS mieszanka synbiotyczna obniża częstość występowania infekcji układu pokarmowego i oddechowego, co może wynikać z synergizmu działania 2 biologicznie aktywnych komponent: prebiotyków i probiotyków.

Piśmiennictwo

1. Human Microbiome Project Consortium, Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 2012; 486:207–214.
2. Mischke M, Plösch T. The gut microbiota and their metabolites: potential implications for the host epigenome. *Adv Exp Med Biol.* 2016;902:33-44.
3. Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med.* 2014;21;6(237):237ra65.
4. Collado MC, Cernada M, Baüerl C, Vento M, Pérez-Martínez G. Microbial ecology and host-microbiota interactions during early life stages. *Gut Microbes* 2012;3(4):352-365.
5. Goulet O. Potential role of the intestinal microbiota in programming health and disease. *Nutr Rev* 2015;73 Suppl 1:32-40.
6. Cukrowska B. Mikroflora przewodu pokarmowego a układ odpornościowy: modulacja odpowiedzi immunologicznej w okresie noworodkowym i w niektórych stanach patologicznych. Rozprawa habilitacyjna. IP CZD, Warszawa, 2002
7. Tan J, McKenzie C, Potamitis M, Thorburn AN, Mackay CR, Macia L. The role of short-chain fatty acids in health and disease. *Adv Immunol.* 2014;121:91-119.
8. Odenwald MA, Turner JR. Intestinal permeability defects: is it time to treat? *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2013;11(9):1075-83.
9. Mu C, Yang Y, Zhu W. Crosstalk between the immune receptors and gut microbiota. *Curr Protein Pept Sci.* 2015;16(7):622-631.
10. Kumar H, Lund R, Laiho A i wsp. Gut microbiota as an epigenetic regulator: pilot study based on whole-genome methylation analysis. *MBio.* 2014 16;5(6). pii: e02113-14.
11. Cukrowska B, Klewicka E. Programowanie mikrobiotyczne – homeostaza mikrobioty jelitowej a ryzyko chorób cywilizacyjnych. *Standardy Med. Pediatría* 2014;11(6):913-22.
12. Wopereis H, Oozeer R, Knipping K, Belzer C, Knol J. The first thousand days – intestinal microbiology of early life: establishing a symbiosis. *Pediatr Allergy Immunol* 2014; 25(5): 428–438

13. Cukrowska B. Microbial and Nutritional Programming-The Importance of the Microbiome and Early Exposure to Potential Food Allergens in the Development of Allergies. *Nutrients* 2018;10(10):1541.
14. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M i wsp. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(26):11971-11975.
15. Salminen S, Gibson GR, McCartney AL, Isolauri E. Influence of mode of delivery on gut microbiota composition in seven year old children. *Gut*. 2004;53(9):1388-1389.
16. Wu P, Feldman AS, Rosas-Salazar C i wsp. Relative Importance and Additive Effects of Maternal and Infant Risk Factors on Childhood Asthma. *PLoS One*. 2016;22,11(3):e0151705.
17. Rogier EW, Frantz AL, Bruno ME i wsp. Secretory antibodies in breast milk promote long-term intestinal homeostasis by regulating the gut microbiota and host gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111(8):3074-3079.
18. Musilova S, Rada V, Vlkova E, Bunesova V. Beneficial effects of human milk oligosaccharides on gut microbiota. *Benef Microbes* 2014;5(3):273-283.
19. Pérez-Cano FJ, Dong H, Yaqoob P. In vitro immunomodulatory activity of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 and *Lactobacillus salivarius* CECT5713: two probiotic strains isolated from human breast milk. *Immunobiology* 2010;12: 996-1004
20. Fernández L, Langa S, Martín V, i wsp. The microbiota of human milk in healthy women. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2013;59(1):31-42.
21. Soto A, Martín V, Jiménez E, I wsp. Lactobacilli and bifidobacteria in human breast milk: influence of antibiotherapy and other host and clinical factors. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2014;59(1):78-88.
22. Collado MC, Laitinen K, Salminen S, Isolauri E. Maternal weight and excessive weight gain during pregnancy modify the immunomodulatory potential of breast milk. *Pediatr Res* 2012;72(1):77-85.
23. Kramer M.S. Breastfeeding and allergy: the evidence. *Ann Nutr Metab* 2011;59 (Suppl1):20-6.
24. Chu S, Chen Q, Chen Y, Bao Y, Wu M, Zhang J. Cesarean section without medical indication and risk of childhood asthma, and attenuation by breastfeeding. *PLoS One* 2017;18;12(9):e0184920.

25. Knol J, Scholtens P, Kafka C i wsp. Colon microflora in infants fed formula with galacto- and fructo-oligosaccharides: more like breast-fed infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005;40(1):36-42
26. Ben XM, Zhou XY, Zhao WH i wsp.. Supplementation of Milk Formula With Galacto-Oligosaccharides Improves Intestinal Micro-Flora and Fermentation in Term Infants. *Chin Med J (Engl)* 2004;117 (6):927-31
27. Fanaro S, Marten B, Bagna R i wsp. Galacto-oligosaccharides Are Bifidogenic and Safe at Weaning: A Double-Blind Randomized Multicenter Study. *J Pediatric Gastroenterol Nutr* 2009;48 (1):82-8
28. Giovannini M, Verduci E i wsp. Prebiotic Effect of an Infant Formula Supplemented With Galacto-Oligosaccharides: Randomized Multicenter Trial. *J Am Coll Nutr* 2014;33 (5):385-93
29. Joint FAO/WHO Working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada, April 30-May 1, 2002, 1-11.
30. Gil-Campos M, López MA, Rodríguez-Benítez MV i wsp. *Lactobacillus fermentum* CECT 5716 is safe and well tolerated in infants of 1-6 months of age: a randomized controlled trial. *Pharmacol Res* 2012;65(2):231-8
31. Olivares M, Díaz-Ropero MP, Martín R i wsp. Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk. *J Appl Microbiol* 2006;101 (1):72-9
32. Pérez-Cano FJ, Dong H, Yaqoob P. In Vitro Immunomodulatory Activity of *Lactobacillus Fermentum* CECT5716 and *Lactobacillus Salivarius* CECT5713: Two Probiotic Strains Isolated From Human Breast Milk. *Immunobiology*, 2010;215 (12):996-1004
33. Olivares M, Díaz-Ropero MP, Sierra S i wsp. Oral intake of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 enhances the effects of influenza vaccination. *Nutrition* 2007;23 (3):254-60
34. Gil-Campos M, López MÁ, Rodríguez-Benítez MV i wsp. *Lactobacillus fermentum* CECT 5716 is safe and well tolerated in infants of 1-6 months of age: a randomized controlled trial. *Pharmacol Res.* 2012;65(2):231-8.
35. Maldonado-Lobón JA, Gil-Campos M, Maldonado J i wsp. Long-term safety of early consumption of *Lactobacillus fermentum* CECT5716: A 3-year follow-up of a randomized controlled trial. *Pharmacol Res.* 2015;95-96:12-9.

36. Maldonado J, Cañabate F, Sempere L i wsp. Human milk probiotic *Lactobacillus fermentum* CECT5716 reduces the incidence of gastrointestinal and upper respiratory tract infections in infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012;54 (1):55-61