

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Primož TREVEN

**VPLIV PROBIOTIKOV NA MIKROBIOTO MLEČNE ŽLEZE IN
MLEKA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**INFLUENCE OF PROBIOTICS ON MAMMARY GLAND AND MILK
MICROBIOTA**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2014

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Komisije za doktorski študij Univerze v Ljubljani z dne 15.2.2012 je bilo potrjeno, da kandidat izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Bioznanosti, s področja prehrane. Za mentorico je bila imenovana prof. dr. Irena Rogelj in za somentorja prof. dr. Simon Horvat.

Doktorska disertacija je zaključek Podiplomskega študija Bioznanosti, s področja prehrane. Delo je bilo opravljeno na Inštitutu za mlekarstvo in probiotike in v Centru za laboratorijske živali na Katedri za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo, na Oddelku za zootehniko, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani. Poskusi na celičnih linijah so bili izvedeni na Katedri za biologijo, mikrobiologijo, molekularno biologijo in biotehnologijo, na Fakulteti za kmetijstvo in biosistemske vede, Univerze v Mariboru.

Mentorica: prof. dr. Irena Rogelj

Somentor: prof. dr. Simon Horvat

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Peter RASPOR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Irena ROGELJ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Simon HORVAT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: prof. dr. Jagoda ŠUŠKOVIĆ
Univerza v Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisani se strinjam z objavo svojega dela na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddal v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Doktorand:
Primož TREVEN

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dd
DK UDK 579.25/.26:577.2:57.085(043)=163.6
KG probiotiki/*in vitro/in vivo/ Lactobacillus gasseri K7/Lactobacillus rhamnosus GG/mikrobiota/mlečne žleze/mleko/metagenomika/mezenterični limfni vozli*
AV TREVEN, Primož, univ. dipl. biokem.
SA ROGELJ, Irena (mentorica)/HORVAT, Simon (somentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študij Bioznanosti, področje prehrana
LI 2014
IN VPLIV PROBIOTIKOV NA MIKROBIOTO MLEČNE ŽLEZE IN MLEKA
TD Doktorska disertacija
OP XV, 133 str., 15 pregl., 26 sl., 3 pril., 225 vir.
IJ SI
JI sl/en
AI Na vprašanje, kako uživanje probiotikov v času nosečnosti in laktacije vpliva na mikrobioto mleka in mlečne žleze (MŽ), smo poskušali odgovoriti na dveh različnih nivojih. Mehanizem morebitnega endogenega prenosa probiotičnih sevov iz materinega črevesa do MŽ smo proučevali *in vitro*, na celičnem modelu tankega črevesa, vpliv probiotikov na mikrobioto MŽ pa na mišjem modelu, z aplikacijo probiotičnih sevov *Lactobacillus gasseri* K7 (LK7) in *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG). V *in vitro* eksperimentu smo tri ure po dodatku LK7 na apikalno stran epitelnih celic, znotraj dendritičnih celic (DC) zaznali najvišje število bakterij, njihovo število se je po 18-ih urah drastično zmanjšalo, po 24-ih urah pa živih bakterij znotraj DC nismo več zaznali. Dobljeni rezultati so nakazovali možen prehod LK7 skozi epitelni sloj znotraj DC, vendar nam rezultatov ni uspelo ustrezno ponoviti. Signalne poti stimulacije DC s probiotiki so se razlikovale. LGG in LK7 sta stimulirala DC v smeri ERK1/2 (MAPK3/MAPK1) signalne poti, *Escherichia coli* Nissle (EcN) pa v smeri p38 (MAPK14). Aktivin A (homodimer INHBA) je povečal premestitev aktiviranih ERK1/2 v jedro pri stimulaciji DC z LGG in LK7 in zmanjšal pri stimulaciji z EcN. Aplikacija LGG in LK7, mišim med brejostjo in laktacijo, je v večini primerov povečala delež bakterijsko pozitivnih vzorcev in število kopij bakterijske 16S ribosomalne DNA v mezenteričnih limfnih vozlih (MLV), mlečni žlezi (MŽ) in mleku. Poleg tega sta oba probiotika povečala delež firmikut in mlečnokislinskih bakterij (predvsem rodov *Lactobacillus* in *Streptococcus*) v MŽ. V MLV smo zaznali žive bakterije LGG pri treh živalih, LK7 pa pri eni. V MŽ smo zaznali žive bakterije LGG pri dveh živalih. Ocena pestrosti mikrobiote je pokazala, da oba probiotika ugodno vplivata na mikrobioto MLV, saj zmanjšata pestrost in povečata porazdeljenost vrst, sev LGG pa je ugodno vplival tudi na mikrobioto MŽ, saj je metagenomska analiza 16S ribosomalne DNA (rDNA) pokazala večji delež predstavnikov rodov *Lactobacillus* in *Bifidobacterium*.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC UDC 579.25/.26:577.2:57.085(043)=163.6
CX probiotics/*in vitro*/*in vivo*/*Lactobacillus gasseri* K7/*Lactobacillus rhamnosus* GG/microbiota/mammary glands/milk/metagenomics/mesenteric lymph nodes
AU TREVEN, Primož
AA ROGELJ, Irena (supervisor)/HORVAT, Simon (co-advisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme in Biosciences, Field: Nutrition
PY 2014
TI INFLUENCE OF PROBIOTICS ON MAMMARY GLAND AND MILK MICROBIOTA
DT Doctoral dissertation
NO XV, 133 p., 15 tab., 26 fig., 3 ann., 225 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The effect of probiotics consumption during pregnancy and lactation on mammary gland (MG) and milk microbiota was assessed at two different levels. The mechanism of hypothesized endogenous transfer of probiotic strains from mother's intestine to the MG was studied *in vitro* using small intestinal cell culture model and the impact of probiotics on the MG microbiota on a mouse model examining two probiotic strains *Lactobacillus gasseri* K7 (LK7) and *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG). In *in vitro* experiment, the highest number of bacteria inside dendritic cells (DC) were detected 3 hours after the addition of LK7 to the apical side of epithelial cells. After 18 hours, the number of intracellular LK7 decreased drastically and after 24 hours, no live LK7 were detected inside DC. These results suggested a possible translocation of LK7 through epithelial layer inside DC, but the results were not additionally confirmed. Probiotics differentially affected signaling pathways after DC stimulation. LGG and LK7 stimulated DC toward ERK1/2 (MAPK3/MAPK1) pathway whereas *Escherichia coli* Nissle (EcN) toward p38 (MAPK14). Activin A (homodimer INHBA) increased translocation of activated ERK1/2 to the nucleus when DC were stimulated with LGG and LK7 and decreased when DC were stimulated with EcN. Administration of LGG and LK7 to mice during pregnancy and lactation in most cases increased culture-positive samples and the number of copies of bacterial 16S ribosomal DNA in the mesenteric lymph nodes (MLN), MG and milk. Additionally, both strains increased the share of firmicutes and the share of lactic acid bacteria (mostly genera *Lactobacillus* and *Streptococcus*) in the MG. Live LGG were observed in MLN of 3 animals and live LK7 in one. In MG, live LGG were observed in two animals. Both probiotics positively influenced MLN microbiota, since they decreased diversity and increased the distribution of species, while the LGG favorably affected the MG microbiota as it increased the proportion of the genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*.

KAZALO VSEBINE

str.

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	X
KAZALO SLIK	XI
KAZALO PRILOG	XIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIV

1	UVOD	1
1.1	HIPOTEZE	3
2	PREGLED OBJAV	4
2.1	PROBIOTIKI.....	4
2.1.1	Probiotiki in modulacija imunskega odziva	5
2.1.1.1	Glavne komponente imunskega odziva v črevesu.....	6
2.1.1.2	p38 in ERK1/2 regulatorni poti in Th1/Th2/Treg ravnovesje	8
2.1.1.3	Vpliv probiotikov na p38/ERK signalno pot v DC in Th1/Th2 ravnovesje	9
2.2	MIKROBIOTA MATERINEGA MLEKA	11
2.2.1	Črevesno-mlečna in respiratorno-mlečna pot potovanja limfocitov v mlečno žlezo	14
2.2.1.1	Mehanizem potovanja limfocitov po telesu.....	14
2.2.1.2	Črevesno-mlečna in respiratorno-mlečna pot potovanja limfocitov	15
2.3	PREHOD BAKTERIJ V MLEČNO ŽLEZO PO ENDOGENI POTI	17
2.3.1	Možni vplivi fizioloških in hormonskih sprememb v pozni nosečnosti na prehod bakterij v mlečno žlezo po endogeni poti	19
2.3.1.1	Progesteron	19
2.3.1.2	Prolaktin.....	20
2.3.1.3	Aktivin A	20
2.3.2	Vpliv probiotikov na oblikovanje mikrobiote mlečne žleze in mleka	22
3	MATERIALI IN METODE	25
3.1	PRIPRAVA RAZTOPIN.....	25
3.2	PRIPRAVA GOJIŠČ	26
3.3	BAKTERIJSKI SEVI IN GOJENJE BAKTERIJ	27
3.4	RAZVOJ METODE ZA UGOTAVLJANJE LK7 V KOMPLEKSNIH VZORCIH.....	28

3.4.1	Izolacija DNA iz čistih kultur in iz vzorcev blata zdravih prostovoljcev	29
3.4.2	Pomnoževanje delov kodirajočih regij gasericina K7 A in K7 B z verižno reakcijo s polimerazo (PCR)	29
3.5	POSKUSI NA <i>IN VITRO</i> MODELU ČREVESNEGA EPITELIJA	31
3.5.1	<i>In vitro</i> model črevesnega epitelijskega tkiva	32
3.5.2	Celična linija H4-1 in gojenje celic	33
3.5.3	Gojenje H4-1 na poroznih filtrih in spremljanje transepitelne električne upornosti (TEER)	34
3.5.4	Določitev minimalne TEER celic za nepropustnost bakterij	34
3.5.5	Vpliv ActA na rast in diferenciacijo celic H4-1 na filtrih s porami premera 0,4 µm	35
3.5.6	Priprava nezrelih dendritičnih celic (nDC)	35
3.5.7	Priprava 3D modela črevesnega epitelijskega tkiva	36
3.5.8	Prehajanje bakterij LK7 skozi sloj epitelnih celic H4-1 in preživetje znotraj DC	36
3.5.9	Vpliv probiotikov in ActA na aktivacijo kinaz p38 in ERK1/2 v DC	37
3.5.9.1	Barvanje celic z označenimi protitelesi	38
3.5.9.2	Analiza celic z aparatom ImageStream ^X	39
3.5.10	Prikaz in statistična obdelava podatkov	43
3.6	VPLIV PROBIOTIKOV LK7 IN LGG NA MIKROBIOTO MEZENTERIČNIH VOZLOV, MLEČNE ŽLEZE IN MLEKA MIŠI LINIJE FVB/NHAN/HSD	44
3.6.1	Nastanitev in oskrba živali	44
3.6.2	Parjenje živali	45
3.6.3	Potek in izvedba poskusa	46
3.6.3.1	Priprava probiotičnih pripravkov in hranjenje z orogastrično sondo	47
3.6.3.2	Uporaba inhalacijske anestezije	48
3.6.3.3	Depilacija po predelu seskov in trebuha	48
3.6.4	Odvzem vzorcev	48
3.6.4.1	Odvzem vzorcev mleka	48
3.6.4.2	Odvzem vzorcev krvi s kardialno punkcijo	49
3.6.4.3	Raztelesenje in odvzem vzorcev tkiv	49
3.6.5	Analiza vzorcev	50
3.6.5.1	Analiza vzorcev krvi	51
3.6.5.2	Analiza vzorcev mlečne žleze in mleka	51
3.6.5.3	Analiza vzorcev mezenteričnih limfnih vozlov	52
3.6.5.4	Izolacija DNA iz tkiv in mleka	52
3.6.5.5	Izolacija DNA iz spirkov kolonij s trdnih gojišč	53

3.6.5.6	Ugotavljanje prisotnosti sevov LGG in LK7 z metodo PCR	53
3.6.5.7	Ugotavljanje prisotnosti določenih rodov in vrst bakterij z metodo PCR	54
3.6.5.8	Ugotavljanje števila kopij genov za 16S bakterijsko ribosomalno RNA (rDNA) z metodo PCR v realnem času	55
3.6.5.9	Globinsko sekvenciranje metagenoma	56
4	REZULTATI.....	57
4.1	RAZVOJ METODE ZA UGOTAVLJANJE LK7 V KOMPLEKSNIH VZORCIH.....	57
4.1.1	Pojavljanje genskih determinant za gasicina K7 A in K7 B v različnih referenčnih sevih iz rodu <i>Lactobacillus</i>	57
4.1.2	Pojavljanje genskih determinant za gasicina K7 A in K7 B v mikrobioti blata zdravih prostovoljcev, ki niso uživali seva LK7.....	58
4.2	PREHAJANJE BAKTERIJ LK7 PREKO SLOJA EPITELNIH CELIC H4-1 IN PREŽIVETJE ZNOTRAJ DENDRITIČNIH CELIC	61
4.2.1	Rast in diferenciacija celic H4-1 na filtrih s porami premera 3 µm	61
4.2.2	Določitev minimalne TEER za nepropustnost bakterij LK7	61
4.2.3	Prehajanje bakterij LK7 skozi sloj epitelnih celic H4-1 in preživetje znotraj DC	62
4.3	VPLIV PROBIOTIKOV IN AKTIVINA A NA AKTIVACIJO KINAZ P38 IN ERK1/2 V DC	64
4.3.1	Vpliv ActA na rast in diferenciacijo celic H4-1 na filtrih s porami premera 0,4 µm	64
4.3.2	Vpliv probiotikov in ActA na aktivacijo kinaz p38 in ERK 1/2 v DC	65
4.3.2.1	Vpliv nasaditve nDC na porozne filtre na njihovo aktivacijo	65
4.3.2.2	Vpliv probiotikov in ActA na aktivacijo p38 in ERK1/2 v DC	66
4.3.2.3	Aktivacija p38 in ERK1/2 v odlepljenih DC.....	69
4.4	VPLIV PROBIOTIKOV LK7 ^R IN LGG NA MIKROBIOTO MEZENTERIČNIH VOZLOV, MLEČNE ŽLEZE IN MLEKA MIŠI.....	70
4.4.1	Spremljanje mase živali med poskusom.....	70
4.4.2	Prisotnost živih bakterij LGG in LK7^R ter njihove DNA v vzorcih odvzetih tkiv	71
4.4.2.1	Prisotnost živih bakterij LGG in LK7 ^R v vzorcih krvi	71
4.4.2.2	Prisotnost živih bakterij LGG in LK7 ^R ter njihove DNA v vzorcih mezenteričnih vozlov.....	71
4.4.2.3	Prisotnost živih bakterij LGG in LK7 ^R ter njihove DNA v vzorcih mlečne žleze	73
4.4.2.4	Prisotnost živih LGG in LK7 ^R ter njihove DNA v vzorcih mleka	73
4.4.3	Vpliv probiotikov LGG in LK7^R na mikrobioto mezenteričnih limfnih vozlov, mlečne žleze in mleka	73

4.4.3.1	Prisotnost DNA določenih rodov in vrst v vzorcih mezenteričnih limfnih vozlov, mlečne žleze in mleka.....	74
4.4.3.2	Število živih bakterij v vzorcih mezenteričnih vozlov in mlečne žleze	74
4.4.3.3	Število kopij bakterijske 16S rDNA v vzorcih mezenteričnih vozlov, mlečne žleze in mleka.....	76
4.4.3.4	Metagenomska analiza 16S rDNA iz vzorcev mezenteričnih limfnih vozlov, mlečnih žlez in mleka	79
4.4.3.4.1	Analiza kvalitete sekvenciranja	79
4.4.3.4.2	Analiza mikrobiote na nivoju debel.....	80
4.4.3.4.3	Analiza mikrobiote na nivoju družin in rodov.....	83
4.4.3.4.4	Analiza pestrosti mikrobiote.....	88
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	90
5.1	RAZPRAVA.....	90
5.1.1	Razvoj metode za ugotavljanje LK7 v kompleksnih vzorcih	91
5.1.1.1	Pojavljanje genskih determinant za gasicina K7 A in K7 B v različnih referenčnih sevih iz rodu <i>Lacobacillus</i>	91
5.1.1.2	Pojavljanje genskih determinant za gasicina K7 A in K7 B v mikrobioti blata zdravih prostovoljcev, ki niso uživali seva LK7.....	92
5.1.2	Prehajanje in preživetje bakterij LK7 skozi sloj epitelnih celic H4-1 in preživetje znotraj dendritičnih celic.....	93
5.1.2.1	Rast in diferenciacija celic H4-1 na filtrih s porami premera 3 µm	93
5.1.2.2	Prehajanje bakterij LK7 skozi sloj epitelnih celic H4-1 in preživetje znotraj DC.....	94
5.1.3	Vpliv probiotikov in aktivina A na aktivacijo kinaz P38 in ERK1/2 v dendritičnih celicah	95
5.1.3.1	Vpliv probiotikov na aktivacijo p38 in ERK1/2 v dendritičnih celicah	96
5.1.3.2	Vpliv aktivina A na aktivacijo p38 in ERK1/2 v dendritičnih celicah.....	97
5.1.4	Vpliv probiotikov LK7^R in LGG na mikrobioto mezenteričnih limfnih vozlov, mlečne žleze in mleka miši.....	99
5.1.4.1	Prisotnost živih bakterij LGG in LK7 ^R ter njihove DNA v vzorcih odvzetih tkiv	100
5.1.4.2	Vpliv probiotikov LGG in LK7 ^R na mikrobioto mezenteričnih limfnih vozlov, mlečne žleze in mleka.....	102
5.1.4.2.1	Število živih bakterij v odvzetih bioloških vzorcih.....	102
5.1.4.2.2	Število kopij bakterijske 16S rDNA v odvzetih bioloških vzorcih	104
5.1.4.2.3	Metagenomska analiza 16S rDNA	105
5.2	SKLEPI.....	108
6	POVZETEK (SUMMARY).....	110
6.1	POVZETEK.....	110

6.2	SUMMARY	113
7	VIRI	116
ZAHVALA		
PRILOGE		

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Različne podskupine regulatornih celic T (Treg) (Wan in Flavell, 2006: 115).....	7
Preglednica 2: Najbolj zastopani rodovi, ki so jih opazili v do sedaj objavljenih metagenomskih študijah materinega mleka.....	13
Preglednica 3: Bakterijski sevi rodu <i>Lactobacillus</i> , ki smo jih uporabili pri razvoju metode za ugotavljanje LK7 v kompleksnih vzorcih.	28
Preglednica 4: Začetni oligonukleotidi za pomnoževanje delov kodirajočih regij gasericina K7 A.	30
Preglednica 5: Začetni oligonukleotidi za pomnoževanje delov kodirajočih regij gasericina K7 B.	31
Preglednica 6: Začetni oligonukleotidi za ugotavljanje rodu ali vrste bakterij.	54
Preglednica 7: Detekcija genov za gasericin K7 A v različnih referenčnih sevih.	58
Preglednica 8: Detekcija genov za gasericin K7 B v različnih referenčnih sevih.	59
Preglednica 9: Pogostost pojavljanja genskih determinant za gasericina K7 A in K7 B v mikrobioti blata zdravih prostovoljcev, ki niso uživali seva <i>Lactobacillus gasseri</i> K7... ..	60
Preglednica 10: Transepitelna električna upornost (TEER) pred in takoj po dodatku <i>Lactobacillus gasseri</i> K7 (LK7) ter število bakterij LK7 na spodnji strani filtra po 18-ih urah inkubacije.	62
Preglednica 11: Prehajanje <i>Lactobacillus gasseri</i> K7 (LK7) skozi epitelni sloj celic H4-1 in njihovo preživetje znotraj dendritičnih celic (DC).....	63
Preglednica 12: Prisotnost kolonij na ploščah MRS in MRS z rifampicinom (MRS ^R) po nacepljanju vzorcev mezenteričnih limfnih vozlov iz obeh poskusov.	72
Preglednica 13: Kvaliteta sekvenciranja in obdelave podatkov za vzorce mezenteričnih limfnih vozlov (MV), mlečnih žlez (MŽ) in mleka (ML) miši.	80
Preglednica 14: Simulacija sestave mikrobiote mezenterični limfnih vozlov (MV), mlečnih žlez (MŽ) in mleka (ML) na nivoju družin po odstranitvi družin, katerih običajni habitat ni črevesje ali mleko.	86
Preglednica 15: Število odčitkov iz mezenteričnih limfnih vozlov (MV) in mlečnih žlez (MŽ), ki so bili pripisani rodovom mlečnokislinskih bakterij in <i>Bifidobacterium</i>	87

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Vloga ERK signalne poti v dendritičnih celicah (DC) in regulacija razvoja celic T (Pulendran in sod., 2010: 652).....	9
Slika 2: Potovanje IgA in IgG protitelesa-izločujočih celic (PIC) v odvisnosti od mesta njihove aktivacije in izražanja tkivno specifičnih integrinov in njihovih ligandov (Kunkel in Butcher, 2003: 823).....	16
Slika 3: Potencialni izvor bakterij, prisotnih v kolostrumu in materinem mleku (Fernandez in sod., 2012: 4).	18
Slika 4: Imuno-regulatorne funkcije aktivina A (ActA) (Hedger in sod., 2011: 277).....	22
Slika 5: Shematski prikaz uporabljenega 3D modela črevesnega epitelijskega tkiva.....	32
Slika 6: Nasaditev nezrelih dendritičnih celic (nDC) na obrnjene filtre.....	36
Slika 7: Osnovni pogled programa IDEAS 4.0.....	40
Slika 8: Potek analize s programom IDEAS 4.0.....	42
Slika 9: Življenjski prostor poskusnih živali po 14-ih dneh privajanja.	45
Slika 10: Shematski prikaz prvega poskusa.....	47
Slika 11: Shematski prikaz poteka analiz vzorcev.....	50
Slika 12: Razvoj transepitelne električne upornosti (TEER) celic H4-1 na poroznih filterih s premerom 3 μ m.....	61
Slika 13: Vpliv aktivina A (ActA) na transepitelno električno upornost (TEER) epitelnih celic H4-1.	64
Slika 14: Razlike v aktivaciji dendritičnih celic (DC), nasajenih na porozne filtre (skupina DMEM) in nezrelih DC (nDC) po odmrzovanju.....	66
Slika 15: Vpliv probiotikov in aktivina A (ActA) na aktivacijo p38 in ERK1/2, premestitev p-p38 in p-ERK1/2 v jedro ter na perimenter DC iz <i>in vitro</i> modela črevesnega epitelijskega tkiva.....	68
Slika 16: Primerjava v aktivaciji p38 in ERK1/2 med pritrjenimi in nepritrjenimi DC.....	69
Slika 17: Povprečna masa živali med poskusom.	70
Slika 18: Število kolonijских enot (KE), zraslih na krvnem agarju, pri aerobnih (AE) in anaerobnih (AN) pogojih, po nacepljanju mezenteričnih limfnih vozlov (MV) in mlečnih žlez (MŽ).	75
Slika 19: Delež (število) vzorcev mezenteričnih limfnih vozlov (MV) in mlečnih žlez (MŽ), pozitivnih na prisotnost bakterij, zraslih na krvnem agarju pri aerobnih (AE) in anaerobnih (AN) pogojih.....	76
Slika 20: Povezava med praznim ciklom (Ct) in začetnim št. tarč 16S rDNA.	77
Slika 21: Povprečno število kopij bakterijske 16S rDNA v ng genomske DNA (gDNA), izolirane iz vzorcev mezenteričnih limfnih vozlov, mlečnih žlez in mleka.....	78
Slika 22: Sestava mikrobiote mezenteričnih limfnih vozlov na nivoju debel 81	

Slika 23: Sestava mikrobiote mlečnih žlez in mleka na nivoju debel.	82
Slika 24: Sestava mikrobiote mezenteričnih limfnih vozlov na nivoju družin.	84
Slika 25: Sestava mikrobiote mlečnih žlez in mleka na nivoju družin.	85
Slika 26: Analiza pestrosti mikrobiote mezenteričnih limfnih vozlov (MV), mlečnih žlez (MŽ) in mleka (ML) na osnovi ocenjenega števila vseh vrst (indeks S_{Chao1}) in porazdeljenosti med vrstami (indeks $H_{Shannon}$).....	89

KAZALO PRILOG

Priloga A: Rezultati metagenomske analize 16S rDNA – zastopanost pripisanih odčitkov na nivoju debel.

Priloga B: Rezultati metagenomske analize 16S rDNA – zastopanost pripisanih odčitkov na nivoju družin.

Priloga C: Rezultati metagenomske analize 16S rDNA – zastopanost pripisanih odčitkov na nivoju rodov.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

7AAD	7-amino-aktinomicin D
ActA	aktivin A – sinonim za homodimer INHBA (angl. <i>inhibin, beta A</i>)
ANOVA	analiza varianc
APC	antigen-predstavljaljoče celice
cAMP	ciklični adenozin monofosfat
CLR	lektinu-podobni receptorji tipa C (angl. <i>C-type lectin-like receptors</i>)
DC	dendritične celice
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dH ₂ O	destilirana voda
dNTP	deoksiribonukleotid trifosfat
EcN	<i>Escherichia coli</i> Nissle
EDTA	etilendiamin-tetraacetat
ERK1/2	kinaza, regulirana z zunajceličnim signalom 1 in 2 (angl. <i>extracellular signal-regulated kinase 1 and 2</i>) – sinonim za MAPK3 (angl. <i>mitogen-activated protein kinase 3</i>) in MAPK1 (angl. <i>mitogen-activated protein kinase 1</i>)
FAO	Organizacija za kmetijstvo in prehrano (angl. <i>Food and Agriculture organization</i>)
FITC	fluorescin izotiocianat
IFN- γ	interferon- γ
IL	interlevkin
ImS	naprava ImageStreamX
IP	indeks preместitve
JNK	c-Jun N-terminalna kinaza
KA	krvni agar
KE	kolonijske enote
LcS	<i>Lactobacillus casei</i> Shirota
LGG	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG
LK7	<i>Lactobacillus gasseri</i> K7
LPS	lipopolisaharid
MALT	limfatično tkivo, ki je neposredno povezano z mukoznim (angl. <i>mucosa-associated lymphoid tissue</i>)
MAPK	z mitogenom aktivirane proteinske kinaze
MHC II	poglavitni kompleksi tkivne skladnosti II (angl. <i>major histocompatibility complex II</i>)
mi-RNA	mikro RNA

MKB	mlečnokislinske bakterije
MRS ^R	MRS z dodanim rifampicinom
MyD88	diferenciacijski mieloidni protein 88 (angl. <i>differentiation myeloid protein 88</i>)
nDC	nezrele dendritične celice
NF-κB	jedrni transkripcijski dejavnik-κB (angl. <i>nuclear transcription factor-κB</i>)
NK	naravne celice ubijalke (angl. <i>natural killer cells</i>)
NLR	Nod-u podobni receptorji (angl. <i>Nod-like receptors</i>)
OSCAR	človeški, z osteoklasti povezan receptor (angl. <i>human osteoclast-associated receptor</i>)
OTU	operativne taksonomske enote
PBMC	enojedrne celice periferne krvi (angl. <i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. <i>polymerase chain reaction</i>)
<i>pedA</i>	gen za pediocin A
p-ERK1/2	fosforilirana oblika ERK1/2
PFA	paraformaldehid
PIC	celice, ki izdelujejo protitelesa (protitelesa-izločujoče celice)
p38	sinonim za MAPK14 (angl. <i>mitogen-activated protein kinase 14</i>)
p-p38	fosforilirana oblika p38
RALDH2	retinaldehid dehidrogenaza tipa 2
RDB	baza sekvenc ribosomalnih RNA
rDNA	področje na DNA, ki kodira 16S ribosomalno RNA
RK	retinojska kislina
RLR	RIG-I podobni receptorji (angl. <i>RIG-I-like receptors</i>)
RNA	ribonukleinska kislina (angl. <i>ribonucleic acid</i>)
SOCS3	supresor citokinske signalizacije 3
Tc	citotoksični limfociti T
TEER	transepitelna električna upornost (angl. <i>transepithelial electrical resistance</i>)
TGF-β	transformirajoči rastni dejavniki β (angl. <i>transforming growth factor-β</i>)
Th	celice T pomagalk (angl. <i>T-helper cells</i>)
Th1	tip 1 celic T pomagalk
Th2	tip 2 celic T pomagalk
TLR	Toll-u podobni receptorji (angl. <i>Toll-like receptors</i>)
TNF-α	tumorje nekrotizirajoči dejavnik α (angl. <i>tumour necrosis factor-α</i>)
Treg	regulatorni limfociti T
TRIS	tris[hidroksimetil] amino metan
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija (angl. <i>World health organization</i>)
ZO	začetni oligonukleotid
ZTM	Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino

1 UVOD

Prebavno cev odraslega človeka poseljuje kompleksna in raznolika mikrobna združba (mikrobiota), ki ima pomembno vlogo za zdravje posameznika. Mikroorganizmi namreč poseljujejo celotno prebavno cev, ki se začne z ustno votlino in konča z anusom. Glede na različne pogoje, ki vladajo v določenem delu prebavne cevi, je različna tudi mikrobiota.

Naselitev črevesja z mikroorganizmi je potrebna za zorenje črevesnega limfnega tkiva in za vzpostavljanje homeostaze v črevesnem epiteliju, kakor tudi za vzpostavitev učinkovitega prirojenega in pridobljenega imunskega odziva. Naseljevanje se začne takoj po rojstvu, kasneje pa na sestavo črevesne mikrobiote najbolj vpliva način prehranjevanja. Materino mleko ima očitno pomembno vlogo pri oblikovanju mikrobiote novorojenca, saj večina študij kaže, da se črevesna mikrobiota dojenčkov razlikuje od črevesne mikrobiote zalivančkov.

Materino mleko je najboljša hrana za hitro rastočega novorojenčka, saj mu v prvih mesecih življenja zagotavlja vsa potrebna hranila. Razen tega dojenje zagotavlja novorojenčku pasivno zaščito pred infekcijami in ima tudi zaščitno vlogo proti nekaterim imunskim boleznim, ki se pojavijo kasneje v življenju, kot so diabetes tipa 1, Chron-ova bolezen, celiakija in maligni limfom. Zaščitna vloga dojenja je posledica vrste dejavnikov, prisotnih v kolostrumu in mleku, kot so imunski dejavniki, oligosaharidi humanega mleka, protimikrobne snovi in v mleku prisotne bakterije (mikrobiota). Materino mleko že dolgo več ne velja za aseptično tekočino, saj raziskave kažejo, da vsebuje bakterije različnih rodov kot so *Leuconostoc*, *Weissella*, *Lactococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Acinetobacter*, *Micrococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* in *Bifidobacterium*. Osnovni vir bakterij v mleku doječe matere naj bi bila koža in novorojenčkova ustna votlina, ki se z vaginalno in črevesno mikrobioto okuži med porodom. Med dojenjem in negovanjem naj bi se bakterije preko novorojenčkovih ust naselile na področju alveol in v mlečnih vodih. Drugi možni vir vsaj nekaterih vrst bakterij (laktobacili in bifidobakterije) v materinem mleku pa je prenos po črevesno-mlečni poti, preko z mukozo povezanega limfatičnega sistema.

Prehrana v času pred nosečnostjo, v času nosečnosti ter v prvem letu novorojenčka, vpliva ne le na njegovo zdravje, temveč seže njen vpliv tudi v odraslo dobo (zmanjšanje tveganja za razvoj povišanega krvnega tlaka, diabetesa, prekomerne telesne teže, presnovnih in srčno žilnih bolezni). Zato nutricionisti in zdravniki nosečnicam in doječim materam pogosto priporočajo uživanje različnih prehranskih dopolnil, vključno s probiotiki. Probiotiki so po definiciji živi mikroorganizmi, ki pripomorejo gostitelju do boljšega

zdravja, če jih zaužije v zadostnih količinah. Vse več raziskav poroča o različnih pozitivnih učinkih uživanja probiotikov v času nosečnosti in dojenja tako na mamo, kakor tudi na novorojenčka. Ti učinki se kažejo na nivoju sprememb črevesne mikrobiote in na zmanjšani obolevnosti za določenimi akutnimi boleznimi (infekcije) ter kroničnimi obolenji kot so npr. alergije, atopični dermatitis, sindrom razdražljivega črevesa. Vse bolj postaja jasno, da lahko probiotiki, ki jih nosečnica uživa v času pred porodom, po endogeni poti prispejo v novorojenčkova prebavila in ugodno delujejo na njegovo zdravje in razvoj.

Mehanizmi, preko katerih zaužiti probiotiki vplivajo na mikrobioto mlečne žleze in s tem črevesno mikrobioto in zdravje dojenčka, pa so še precejšnja neznanka. Predlagani so različni mehanizmi, ki lahko delujejo samostojno ali v interakciji/kombinaciji:

- direkten prenos bakterij iz črevesja v mlečno žlezo po endogeni poti;
- prehod bakterij v mlečno žlezo z zunanjim vnosom preko areole in bradavice;
- vpliv na imunski sistem matere, ki posredno vpliva na sestavo mikrobiote materinega mleka in dojenčkovega prebavnega trakta.

Objave o direktnem prehodu komercialnih probiotičnih sevov iz črevesa matere v njeno mleko so maloštevilne, vendar kažejo na to, da lahko poleg komenzalnih bakterij (običajno prisotnih v črevesni mikrobioti), tudi probiotične bakterije, ki jih nosečnica ali doječa mati zaužije z mlečnimi izdelki ali prehranskimi dopolnili, prehajajo v materino mleko. Pomembno je dodati, da verjetno ne more preiti v mleko katerakoli bakterija, ampak le tista, ki lahko poseljuje in je prilagojena na specifične ekološke niše.

Na vprašanje, kako uživanje probiotikov v času nosečnosti vpliva na mikrobioto mleka in mlečne žleze, smo poskušali odgovoriti na dveh različnih nivojih. Mehanizem morebitnega endogenega prenosa probiotičnih sevov iz materinega črevesa do mlečnih žlez smo proučevali *in vitro*, na celičnem modelu tankega črevesa. Vpliv na mikrobioto mlečne žleze in mleka smo proučevali z uporabo mišjega modela in probiotičnih sevov *Lactobacillus gasseri* K7 (LK7) in *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG). Poleg odkrivanja možnih mehanizmov prenosa probiotičnih bakterij do mlečne žleze, smo pridobili pomemben vpogled v sestavo mikrobiote mlečne žleze in mleka miši, ki so pogosto modelni organizem na področju raziskovanja probiotikov.

1.1 HIPOTEZE

Glede na rezultate dosedanjih raziskav smo postavili naslednje hipoteze:

- Določene probiotične bakterije lahko stimulirajo nezrele dendritične celice, da privzemajo bakterije preko sloja epitelnih celic, ter jih s tem prenesejo na bazolateralno stran.
- Sposobnost preživetja probiotičnih sevov znotraj dendritičnih celic, po fagocitozi preko sloja epitelnih celic, je sevno specifična in bo vplivala na uspešnost endogenega prenosa sevov po limfatičnem sistemu do mlečne žleze.
- Krmljenje probiotičnih sevov *Lactobacillus gasseri* K7 (LK7) in *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) poskusnim mišim v času brejosti in dojenja, bo vplivalo na sestavo mikrobiote mlečne žleze in mleka ter na prisotnost sevov LK7 in LGG v mlečni žlezi in mleku poskusnih živali.

2 PREGLED OBJAV

2.1 PROBIOTIKI

Pri pregledu literature največkrat naletimo na definicijo probiotikov, ki sta jo leta 2002 priporočili Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) ter Organizacija za kmetijstvo in prehrano (FAO) in ki pravi, da so to živi mikroorganizmi, ki imajo ob zaužitju/aplikaciji v zadostni/ustrezni količini pozitivne učinke na zdravje gostitelja (FAO/WHO, 2006). Pri tem je potrebno poudariti, da se definicija nanaša samo na žive mikroorganizme, čeprav obstajajo dokazi, da imajo pozitivne fiziološke učinke tudi nekateri mrtvi probiotični mikroorganizmi oziroma deli njihovih celic (Taverniti in Guglielmetti, 2011).

Kriteriji za izbiro probiotičnega seva vključujejo varnostni, funkcionalni in tehnološki vidik. Ne glede na to, ali se probiotični sev nahaja v prehranskem dopolnilu ali zdravilu, mora izpolnjevati določene selekcijske kriterije. Sev mora biti (Borchers in sod., 2009; Saarela in sod., 2000):

- natančno taksonomsko identificiran (rod, vrsta, sev);
- primeren/varen za uživanje (ni patogen, ne vsebuje prenosljivih genov za odpornost proti antibiotikom, ne razgrajuje človeške sluzi);
- sposoben preživeti prehod skozi prebavno cev (odporen proti želodčni kislini in žolčnim solem);
- je sposoben vsaj za nekaj časa poseliti črevesje;
- mora imeti dokazane ugodne učinke na zdravje (vsaj en ugodni učinek dokazan v 2. fazi kliničnih študij);
- stabilen med pripravo in shranjevanjem izdelka.

Probiotiki so pogosto predstavniki komensalnih bakterij, izoliranih iz blata dojenčkov in vzorcev biopsij črevesnega tkiva odraslih ljudi. Veliko probiotikov so izolirali iz fermentiranih mlečnih izdelkov in iz ostalih tradicionalnih fermentiranih živil, kot so fermentirano meso, sadje in zelenjava (Fontana in sod., 2013). V zadnjem času se kot dober vir probiotičnih bakterij izpostavlja tudi humano mleko (Fernandez in sod., 2012), saj naj bi bile nekatere bakterije, izolirane iz humanega mleka, uspešne pri zdravljenju mastitisa (Arroyo in sod., 2010) in preprečevanju prenosa infekcije s HIV-1 preko materinega mleka (Martin in sod., 2010). Poleg rodov *Lactobacillus* in *Bifidobacterium*, med probiotičnimi bakterijami pogosto zasledimo tudi predstavnike rodov *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, nekatere seve *Escherichia (E.) coli* in nekatere seve kvasovk (Borchers in sod., 2009).

Natančni mehanizmi ugodnega delovanja probiotikov so v večji meri še neznanka, saj gre najverjetneje za kombinacijo več dejavnikov. Osnovni mehanizmi delovanja probiotikov zajemajo:

- Krepitev epitelne pregrade preko: vpliva na izražanje genov za proteine tesnega stika, povečanega izločanja sluzi in protimikrobnih snovi, preprečevanja celične apoptoze in indukcije izločanja protiteles IgA ter molekul, ki ščitijo celice (Ohland in Macnaughton, 2010).
- Pripenjanje na črevesno sluz in epitelij preko steričnih in hidrofobnih interakcij ter preko različnih adhezivnih glikoproteinov (mucin-vezavnih proteinov) na površini bakterij. Sposobnost pripenjanja na črevesno sluz in epitelij predstavlja osnovni mehanizem ugodnega delovanja probiotikov (Van Tassell in Miller, 2011).
- Učinki na metabolizem preko: zniževanja toksičnih in mutagenih reakcij, dekonjugacije žolčnih soli, hidrolize laktoze in povečevanja dostopnosti različnih hranil (Parvez in sod., 2006).
- Izločanje protimikrobnih snovi: gre za izločanje snovi z nizko molekulsko maso (organske kisline, dekonjugirane žolčne kisline, benzojska kislina, peroksid,..) in snovi z veliko molekulsko maso (bakteriocini), kar omogoča probiotičnim bakterijam večjo kompetitivnost in možnost preživetja v ekološko gosto poseljenih ekoloških nišah in obenem ugodno delovanje na gostitelja (Dobson in sod., 2012).
- Izrivanje potencialnih patogenih bakterij preko kombinacije različnih dejavnikov kot so: krepitev epitelne pregrade in imunskega sistema, zaviranje virulentnih dejavnikov, izločanje protimikrobnih snovi in selektivnih metabolitov ter tekmovanje za nujno potrebna hranila (Corr in sod., 2009).
- Modulacija imunskega sistema: preko vpliva na epitelne celice, limfocite, monocite/makrofage in DC (poglavje 2.1.1).

2.1.1 Probiotiki in modulacija imunskega odziva

Ravnotežje med različnimi populacijami celic T je pomembno za vzdrževanje homeostaze. Porušenje homeostaze privede do pojava različnih imunološko povezanih bolezni kot so alergije in kronične infekcije. V splošnem velja, da so probiotiki, ki inducirajo interlevkin (IL)-12, uporabni za krepitev imunskega odziva gostitelja (npr. pri rakavih obolenjih), medtem ko so probiotiki, ki inducirajo IL-10, primernejši za zmanjševanje vnetnega odziva (npr. pri kroničnih vnetjih). V preteklosti so se probiotiki izkazali pri lajšanju in zdravljenju mnogih bolezni kot so artritis, različne alergije, sindrom razdražljivega črevesa, rak debelega črevesa, itd. (Drisko in sod., 2003). Žal so mehanizmi, preko katerih probiotiki dejansko učinkujejo v dobrobit gostitelja, v večji meri še neznani, zato je veliko študij osredotočenih na njihovo proučevanje. Šele natančno poznavanje mehanizmov

delovanja namreč omogoča izbiro ustreznega probiotičnega seva za specifično bolezensko stanje.

2.1.1.1 Glavne komponente imunskega odziva v črevesu

Splošno znano je, da lahko probiotične bakterije vplivajo na imunski sistem predvsem preko vpliva na epitelne celice, limfocite, monocite/makrofage in dendritične celice (DC). Primarni imunski odziv gostiteljevega imunskega sistema na zaužiti probiotik začnejo črevesni enterociti, s katerimi bakterija pride v stik. To se v največji meri zgodi na posebnih predelih epitelija (s folikli povezan epitelij), ki je sestavljen iz enterocitov in celic M. Na tem področju so prisotne celice B, makrofagi, celice T in DC, ki zajemajo antigene in oblikujejo imunski odziv (Cummings in sod., 2004). Poleg tega pridejo bakterije v stik z imunskim sistemom preko DC, ki neposredno prodrejo v črevesni epitelij in sprejmejo bakterije iz črevesne svetline (Rescigno in sod., 2001). DC skupaj z makrofagi in monociti predstavljajo povezavo med prirojenim in pridobljenim imunskim odzivom, saj delujejo kot antigen-predstavljajoče celice (APC), ki lahko aktivirajo celice T in s tem humoralni imunski odziv. Na svoji površini izražajo različne vzorčno prepoznavne receptorje imunskega odziva, kot so Toll-u podobni receptorji (angl. *Toll-like receptors* (TLR)), lektinu-podobni receptorji tipa C (angl. *C-type lectin-like receptors* (CLR)), RIG-I podobni receptorji (angl. *RIG-I-like receptors* (RLR)) in Nod-u podobni receptorji (angl. *Nod-like receptors* (NLR))(Iwasaki in Medzhitov, 2010).

Stik nezrelih DC (nDC) z antigenom (npr. bakterijo ali virusom) sproži program zorenja, ki zajema zmanjšano sposobnost fagocitoze, izražanje različnih citokinov, kemokinov in ko-stimulatornih molekul, izpostavitve antigenov na površini celice preko poglobitnega kompleksa tkivne skladnosti II (angl. *major histocompatibility complex II* (MHC II)) in potovanje v lokalne limfne vozle, kjer poteka predstavitev antigena limfocitom T (Rescigno in sod., 1999). Naivni limfociti T, v odziv na izpostavljene antigene, citokine in ko-stimulatorne molekule, dozori v citotoksične limfocite T (Tc), regulatorne limfocite T (Treg) ali pa celice T pomagalk (angl. *T-helper cells* (Th)).

Populacija celic Th se lahko glede na citokine, ki jih celice izločajo ob aktivaciji, deli na tri razrede. Tip 1 Th (Th1) izločajo vnetne citokine kot so interferon- γ (IFN- γ), tumorje nekrotizirajoči dejavnik α (angl. *tumour necrosis factor- α* (TNF- α)), IL-2 in IL-12. Th1 s tem aktivirajo makrofage, naravne celice ubijalke (angl. *natural killer cells* (NK)) in spodbudijo nastajanje Tc ter posledično spodbujajo vnetni odziv. Nasprotno pa tip 2 Th (Th2) izločajo protivnetne citokine (IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 in IL13) in s tem spodbujajo humoralni tip imunosti tako, da aktivirajo eozinofilce in spodbujajo limfocite B k izdelavi

protiteles (Sanz in De Palma, 2009). Tretja, najkasneje odkrita populacija celic, Th17 pa izloča IL-17, IL-21, IL-22 in IL-23 in je zelo pomembna pri vnetnem odzivu proti zunajceličnim bakterijam, predvsem v mukusnih tkivih (Barbi in sod., 2013).

Naivne celice T lahko, po stimulaciji T-celičnega receptorja in ob prisotnosti transformirajočega rastnega dejavnika β (angl. *transforming growth factor- β* (TGF- β)), IL-2 in IL-10, dozoriijo v Treg. Treg ločimo v več podskupin glede na površinski fenotip in citokine, ki jih izločajo (Preglednica 1). Treg regulirajo Th1, Th2 in Th17 imunski odziv in vzdržujejo toleranco proti sebi lastnim antigenom. Napake pri delovanju Treg lahko vodijo do alergij (Th2) in avtoimunskih bolezni (Th1 in Th17)(Wan in Flavell, 2006).

Preglednica 1: Različne podskupine regulatornih celic T (Treg) (Wan in Flavell, 2006: 115). CTLA-4 – citotoksični-T limfocitni antigen 4, DC – dendritične celice, EC – epitelne celice, GITR – glukokortikoidni receptor za dejavnik tumorske nekroze, IL – interleukin, LAG – limfocitni aktivacijski antigen, TGF- β – transformirajoči rastni dejavnik β , nTreg – naravne regulatorne celice T, Tr1 – regulatorne celice tipa 1, NK – naravne celice T ubijalke, Th3 – celice T pomagalke tipa 3.

Table 1: Different subsets of regulatory T cells (Treg) (Wan and Flavell, 2006: 115). CTLA-4 – cytotoxic T-lymphocyte antigen-4, DC – dendritic cells, EC – epithelial cells, GITR – glucocorticoid-induced tumour necrosis factor receptor, IL – interleukin, LAG – lymphocyte activation antigen, TGF- β – transforming growth factor- β , nTreg – naturally occurring Tregs, Tr1 – type 1 regulatory T cells, NK – natural killer T cells, Th3– type 3 T helper cells.

regulatorne celice (Treg)	površinski označevalec	izražanje Foxp3	izločanje citokinov	citokini za delovanje	citokini za razvoj	celice vključene v razvoj
nTreg	CD25, CTLA-4, GITR, LAG	da	TGF- β	TGF- β	IL-2, TGF- β	EC, DC
Tr1	ni znano	ne	IL-10	IL-10	IL-10	DC, NK, nTreg
Th3	ni znano	da	TGF- β	TGF- β	TGF- β	nTreg

Razmerje med Th1, Th17 in Th2 odloča o tipu imunskega odziva. Pri tem imajo ključno vlogo profesionalne APC, predvsem DC. Do sedaj so bile opisane tri glavne signalne poti, preko katerih lahko DC inducirajo Th2 in Treg imunski odziv: preko jedrnega transkripcijskega dejavnika- κ B (angl. *nuclear transcription factor- κ B* (NF- κ B)), preko β -katenina in preko kinaze regulirane z zunajceličnim signalom 1/2 (angl. *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) 1/2)(Pulendran in sod., 2010).

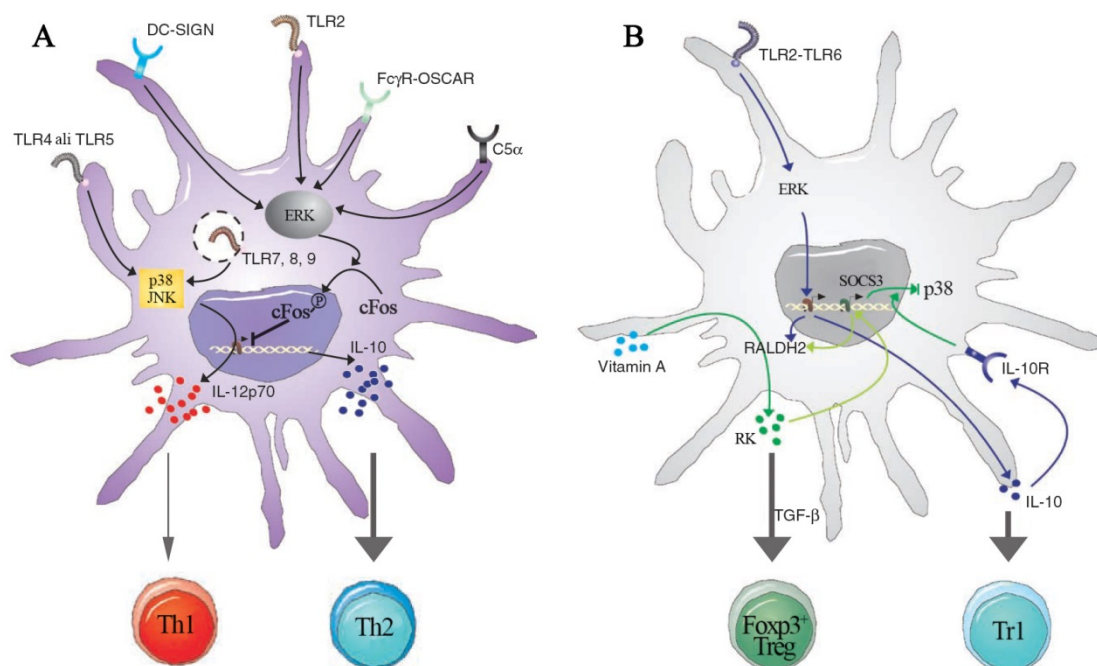
2.1.1.2 p38 in ERK1/2 regulatorni poti in Th1/Th2/Treg ravnovesje

Aktivacija TLR-jev z bakterijskimi ali virusnimi antigeni povzroči aktivacijsko kaskado različnih znotrajceličnih signalnih poti, ki določajo tip imunskega odziva. Vsi TLR-ji, z izjemo TLR3, aktivirajo diferenciacijski mieloidni protein 88 (angl. *differentiation myeloid protein* 88 (MyD88)), kar sproži signalno pot preko z mitogenom aktiviranih proteinskih kinaz (MAPK) in NF- κ B (Brown in sod., 2011). MAPK delimo v tri skupine ERK, c-Jun N-terminalne kinaze (JNK) in p38. Njihova skupna lastnost je, da je za njihovo aktivacijo potrebna fosforilacija, ki sproži odcepitev od pritrjenih proteinov v citosolu in potovanje v jedro, kjer lahko aktivirajo različne induktorske proteine (Yang in sod., 2013).

Signalizacija preko TLR-jev 4, 5, 7, 8, in 9 sproži robustno aktivacijo p38 in JNK, kar vodi v produkcijo IL-12 in spodbujanje Th1 imunskega odziva (Slika 1A) (Dillon in sod., 2004; Poudel in sod., 2013; Pulendran in sod., 2010). Določeni ligandi TLR2 pri DC povzročijo povečano signalizacijo preko ERK1/2. Posledično je pri DC, ki so bile stimulirane preko ligandov TLR2, opaziti povečano fosforilacijo transkripcijskega dejavnika c-Fos, v primerjavi s tistimi, ki so bile stimulirane z LPS iz *E. coli* ali flagelinom. Aktivacija ERK1/2 tako sproži Th2 imunski odziv preko povečanega izražanja IL-10 in inhibicijo IL-12p70, delno tudi preko cFos, ki je represor izražanja IL-12 (Agrawal in sod., 2003; Dillon in sod., 2004; 2006).

Poleg stimulacije preko TLR2, lahko tovrstni mehanizem opazimo tudi pri stimulaciji preko cikličnega adenozin monofosfata (cAMP), proteinov komplemента C5a in iC3b ter signalizaciji preko človeškega z osteoklasti povezanega receptorja (angl. *human osteoclast-associated receptor* (OSCAR)), kanabinoidnega receptorja CB2 in receptorja Fc γ R (Pulendran in sod., 2010). Tudi stimulacija preko dimera TLR2-TLR6 vodi v aktivacijo ERK (Slika 1 B), izražanje IL-10 ter izražanje retinaldehid dehidrogenaze tipa 2 (RALDH2). To povzroči pretvorbo retinala v retinojsko kislino (RK), ki preko avtokrinega delovanja povzroči izražanje supresorja citokinske signalizacije 3 (SOCS3) in zavrtje aktivacije p38. IL-10 in RK inducirata razvoj Treg in s tem omejita vnetni odziv (Dillon in sod., 2006; Manicassamy in sod., 2009).

Aktivacijo p38 (tvorba fosfo-p38(p-p38)) povezujejo z zorenjem DC in vnetnim odzivom (Th1), medtem ko aktivacijo ERK1/2 (tvorba fosfo-ERK1/2 (p-ERK1/2)) povezujejo s protivnetnimi Th2 imunskim odzivom. Riet in sod. (2009) ugotavljajo, da lahko razmerje med p-p38 in p-ERK1/2 v DC nakazuje tip aktivacije limfocitov T.



Slika 1: Vloga ERK signalne poti v dendritičnih celicah (DC) in regulacija razvoja celic T (Pulendran in sod., 2010: 652). (A) Signalizacija preko TLR-jev 4, 5, 7, 8 in 9 povzroči robustno aktivacijo p38 in JNK, kar vodi v izražanje IL-12 in razvoj Th1. Signalizacija preko različnih receptorjev povzroči povečano in podaljšano aktivacijo ERK, kar stabilizira transkripcijski dejavnik cFos, ki zavre izražanje IL-12p70 in poveča izražanje IL-10, kar podpira razvoj Th2. (B) Signalizacija preko dimera TLR2-TLR6 aktivira ERK in posledično izražanje IL-10 ter pretvorbo retinala v retinojsko kislino (RK) preko retinaldehid dehidrogenaze tipa 2 (RALDH2). To povzroči izražanje supresorja citokinske signalizacije 3 (SOCS3), ki zavre aktivacijo p38 in vnetnih citokinov. IL-10 in RK pa inducirata razvoj Treg in s tem omejitev vnetnega odziva.

Figure 1: Role of ERK signalling pathway in dendritic cells (DC) and regulation of T-cell development (Pulendran et al, 2010: 652). (A) Signalling through TLRs 4, 5, 7, 8 and 9 induces robust activation of p38 and JNK, which leads to the induction of IL-12 and Th1 responses. Signalling through diverse receptors induces enhanced and sustained activation of ERK1/2, which results in the stabilization of the transcription factor c-Fos that suppresses IL-12 and enhances IL-10, thus favouring a Th2 bias. (B) Signalling through TLR2-TLR6 leads to ERK activation, which mediates induction of retinaldehyde dehydrogenase-2 (RALDH2). This results in the conversion of retinal to retinoic acid (RK), which then exerts an autocrine effect on DCs to induce suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3), which suppresses activation of p38 and proinflammatory cytokines. Further, IL-10 and RK program DCs to induce Treg cells and limit inflammatory responses.

2.1.1.3 Vpliv probiotikov na p38/ERK signalno pot v DC in Th1/Th2 ravnovesje

Odkrivanje mehanizmov regulacije imunskega odziva je eno izmed najbolj proučevanih področij probiotičnih bakterij. Giaghi in sod. (2012) poročajo, da je stimulacija nDC s toplotno deaktiviranim sevom LGG povzročila znižanje nivoja izražanja p38 v primerjavi s

kontrolno skupino (LPS) in povečala izražanje mikro RNA (miR)-155, ki blokira p38 signalno pot. To se ujema tudi s profilom izločanja citokinov, saj je tovrstna stimulacija DC povzročila povečano izločanje IL-10 in pri nižjem razmerju bakterije:DC tudi zmanjšano izločanje IL-12 (Giahi in sod., 2013).

Hoarau in sod. (2006) so ugotovili, da lahko supernatant, ki ga dobimo pri fermentaciji hidrolizata sirotke z *Bifidobacterium breve* C50 (BbC50sn), inducira povečano produkcijo IL-10 in podaljša preživetje aktiviranih DC preko TLR2 signalne poti. Ko so v različnih kombinacijah uporabili inhibitorje MAPK (p38 in ERK), glikogen sintaza kinaze 3 (GSK3) in fosfoinozimid 3-kinaze (PI3K) so ugotovili, da je produkcija IL-10 v DC odvisna od ERK in PI3K signalne poti, produkcija IL-12 pa od GSK3, pri čemer je bila signalna pot preko p38 vpletena v obeh primerih. Poudariti velja, da sta imeli blokadi ERK in p38 nasprotno učinke na produkcijo IL-12, saj je blokada ERK povečala, blokada p38 pa zmanjšala produkcijo IL-12 (Hoarau in sod., 2008). Da je signalna pot preko p38 vpletena tako v produkcijo IL-10, kakor tudi IL-12 potrjuje tudi študija, v kateri so proučevali vpliv sedmih potencialnih probiotičnih bakterij na stimulacijo nDC. Inhibitor p38 je namreč ob stimulaciji nDC z *Bifidobacterium breve* b99, zmanjšal tako produkcijo TNF- α , IL-6, IFN- γ , kakor tudi IL-10 (Latvala in sod., 2008).

Objave o vplivu probiotikov na p38 in ERK signalno pot v DC so maloštevilne, nekaj več pa je študij o tovrstnem vplivu na makrofagih, ki prav tako spadajo v skupino APC. Različni sevi laktobacilov lahko različno stimulirajo makrofage k izločanju IL-10 in IL-12. *Lactobacillus (L.) plantarum* ATCC 14917 na primer lahko inducira mišje peritonealne makrofage k izločanju visokih ravni IL-10, medtem ko probiotični sev *Lactobacillus casei* Shirota (LcS) inducira IL-12 in nizko raven IL-10 (Kaji in sod., 2010). Kinetična analiza aktivacije ERK, p38 in JNK je pokazala, da *L. plantarum* hitreje in intenzivneje aktivira MAPK, še posebej ERK, kot pa LcS. Blokiranje ERK signalne poti je povzročilo nižjo produkcijo IL-10 in večjo produkcijo IL-12. Pri hkratni stimulaciji makrofagov z obema bakterijama, pa je prišlo do sinergističnega učinka na produkcijo IL-10. Avtorji ugotavljajo, da je aktivacija preko ERK ključnega pomena za izražanje IL-10 (Kaji in sod., 2010). Aktivacija p38 in JNK ter zaviranje ERK1/2 signalne poti, je predlagani mehanizem tudi za apoptozno delovanje *Lactobacillus reuteri* ATCC PTA 6475 na TNF-aktiviranih mieloidnih celicah (Iyer in sod., 2008) ter za produkcijo TNF- α pri makrofagih, stimuliranih z ekso-polisaharidom iz *Lactobacillus rhamnosus* KL37 (Ciszek-Lenda in sod., 2011).

Študija stimulacije makrofagov z različnimi nepatogenimi, po Gramu pozitivnimi bakterijami, ki jih uporabljajo v živilski industriji ali kot probiotike, je pokazala, da so bakterije stimulirale izražanje IL-10 in SOCS3, ki kontrolira izražanje vnetnih citokinov,

preko zaviranja p38 aktivacijske poti (Latvala in sod., 2011). Zanimiva je tudi študija na mišjem modelu tifoidne vročice, v kateri je krmljenje s sevom *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 povzročilo znižanje vnetnih citokinov, odsotnost aktivacije JNK, zmanjšanje aktivacije p38 ter nespremenjeno aktivacijo ERK1/2 v črevesju proučevanih živali (Martins in sod., 2011). Podobno je kvasovka *Saccharomyces boulardii* zavirala vnetne citokine ob infekciji miši z bakterijo *Salmonella typhimurium* preko zmanjšanja aktivacije vseh treh MAPK, pri čemer je bil vpliv na ERK1/2 manj očit (Martins in sod., 2013).

Kar nekaj študij je pokazalo, da lahko različni probiotiki vplivajo na p38 in ERK1/2 signalno pot in s tem na imunski odziv različnih celic in gostitelja. Pri tem je potrebno poudariti, da so bile te študije opravljene pri različnih fizioloških pogojih in na različnih poskusnih modelih. Dejanski mehanizem delovanja določenega seva na gostitelja je tako lahko multifunkcijski in obenem zajema tako preprečevanje infekcij, kakor tudi lajšanje avtoimunskih bolezni. Tako je na primer uživanje probiotične bakterije LcS povečalo aktivnost celic NK preko povečanja izražanja IL-12 (Takeda in sod., 2006), znižalo pojavnost raka (Aso in sod., 1995) in znižalo nivo alergen-specifičnih protiteles IgE (Ivory in sod., 2008).

2.2 MIKROBIOTA MATERINEGA MLEKA

Materino mleko že dolgo več ne velja za aseptično tekočino, saj raziskave kažejo, da vsebuje 10^3 - 10^4 bakterij v mililitru mleka in tako predstavlja stalen vir bakterij, ki poseljujejo dojenčkov prebavni trakt (Martin in sod., 2012; Perez in sod., 2007). Prve raziskave o mikrobioti materinega mleka so bile osnovane na klasičnih mikrobioloških metodah. Pokazale so, da materino mleko vsebuje bakterije različnih rodov kot so *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, in *Weissella*. Do sedaj so izolirali preko 200 različnih vrst bakterij, najpogosteje pa: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius*, *Lactobacillus (L.) salivarius*, *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. rhamnosus*, *Bifidobacterium breve* in *Bifidobacterium bifidum* (Jeurink in sod., 2013).

Za študije raznolikosti mikrobnih združb se v zadnjem času največ uporablja od gojenja neodvisne metode, ki slonijo na karakterizaciji nukleinskih kislin. Večina jih sloni na pomnoževanju genov za 16S ribosomalno RNA (rDNA) in primerjavi njihovih zaporedij z zaporedji ostalih mikroorganizmov, shranjenih v različnih bazah podatkov (Zoetendal in sod., 2004). Uporaba teh metod je potrdila prevlado stafilokokov in streptokokov, prisotnost mlečnokislinskih bakterij (MKB), bifidobakterij (Gueimonde in sod., 2007; Martin in sod., 2007a; Martin in sod., 2009), pa tudi prisotnost DNA nekaterih vrst

bakterij, ki pripadajo po Gramu negativnim bakterijam (Collado in sod., 2009; Collado in sod., 2012; Martin in sod., 2007b).

Še korak dlje v proučevanju mikrobiote materinega mleka pa je omogočil razvoj metod t.i. sekvenciranja naslednje generacije (angl. *next generation sequencing*). Do sedaj so bile objavljene le tri študije mikrobioma materinega mleka (Preglednica 2). Prvo so objavili Hunt in sod. (2011), kjer so na vzorcih mleka 16-ih mater proučevali spremembo mikrobiote (sekvenciranje 16S rDNA) v treh časovnih točkah v razmiku štirih tednov. Študija je pokazala, da je kljub temu, da je vsak vzorec vseboval več sto operativnih taksonomskih enot (OTU, angl. *operational taxonomic unit*), bilo le 9 OTU prisotnih v vseh vzorcih. Teh 9 OTU je predstavljalo več kot polovico celotne združbe v posameznem vzorcu, kar je nasprotno kot pri črevesni mikrobioti, kjer je variabilnost znatno večja in je le majhen delež OTU prisoten pri vseh posameznikih (Turnbaugh in sod., 2009). Opazili so precejšnjo variabilnost med posameznimi preiskovankami, ki pa se časovno ni spreminjala.

Rezultati druge študije so pokazali, da je sestava bakterijske populacije kolostruma mater, ki so rodile z načrtovanim carskim rezom drugačna, kot sestava bakterijske populacije tistih, ki so rodile vaginalno ali pa z urgentnim carskim rezom. Te razlike lahko ostanejo vidne do šestega meseca dojenja. To nakazuje, da je najverjetneje za prenos bakterij v mlečno žlezo zelo pomemben fiziološki stres in hormonski signal, ki ga nosečnica doživi ob porodu. Podobno kot pri črevesni mikrobioti se je pokazalo, da se sestava mleka žensk s prekomerno telesno težo razlikuje od tistih z normalno telesno težo (Cabrera-Rubio in sod., 2012).

Nedavno so Ward in sod. (2013) objavili prvo študijo metagenoma iz združenih vzorcev materinega mleka, kjer ni šlo za tarčno sekvenciranje 16S rDNA, temveč za naključno sekvenciranje kratkih odsekov v celotni populaciji izolirane DNA (angl. »shotgun sequencing«). Tako so lahko z analizo odprtih bralnih okvirov proučili metagenom materinega mleka na funkcionalni ravni. Po pričakovanjih je večji del odprtih bralnih okvirov pripadalo genom, ki bakterijam omogočajo preživetje v mleku (metabolizem ogljikovih hidratov, geni za odgovor na stresne pogoje, bakteriocinski geni,...).

Vse tri raziskave so pokazale precejšnje neujemanje pri določitvi najbolj zastopanih rodov. Takšna razhajanja avtorji pripisujejo socialno-ekonomskim, kulturnim, genetskim in prehranskim razlikam, saj so bile študije narejene v ZDA in Evropi. Zelo verjetno je, da so razhajanja rezultatov vsaj delno tudi posledica različnih postopkov pridobivanja vzorcev, izolacije DNA in uporabe različnih začetnih oligonukleotidov (ZO) pri pomnoževanju 16S rDNA, kar navajajo tudi nekateri avtorji (Zoetendal in sod., 2004).

Preglednica 2: Najbolj zastopani rodovi, ki so jih opazili v do sedaj objavljenih metagenomskih študijah materinega mleka. Podčrtani so najbolj zastopani rodovi v vseh treh študijah.

Table 2: The most abundant bacterial genera observed in published metagenomic studies of breast milk. Underlined genera were among the most represented in all three studies.

Vir	Cabrera-Rubio in sod. (2012)	Hunt in sod. (2011)	Ward in sod. (2013)
Vzorci	kolostrum, 1 in 6 mesecev po porodu	tri časovne točke v okviru štirih tednov	1 vzorec v obdobju med 9-30 dni po porodu
Št. preiskovank	18	16	10
Način odvzema	aseptično, ročno	aseptično, električna črpalka	ročno in z električno črpalko
Država študije	Španija	ZDA	ZDA
Metoda	16S rDNA pmnoževanje in sekvenciranje s 454 GS-FLX (Roche)	16S rDNA pmnoževanje in sekvenciranje s 454 GS-FLX (Roche)	sekvenciranje metagenoma z Illumina GAIIx Genome Analyzer (Illumina)
Najbolj zastopani rodovi	<i>Leuconostoc</i>	<u><i>Staphylococcus</i></u>	<u><i>Staphylococcus</i></u>
	<i>Weissella</i>	<u><i>Streptococcus</i></u>	<i>Pseudomonas</i>
	<u><i>Staphylococcus</i></u>	<i>Serratia</i>	<i>Edwardsiella</i>
	<u><i>Streptococcus</i></u>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pantoea</i>
	<i>Lactococcus</i>	<u><i>Corynebacterium</i></u>	<i>Treponema</i>
	<i>Acinetobacter</i>	<i>Ralstonia</i>	<u><i>Streptococcus</i></u>
	<i>Citrobacter</i>	<i>Propionibacterium</i>	<i>Campylobacter</i>
	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>Sphingomonas</i>	<u><i>Corynebacterium</i></u>
	<i>Veillonella</i>	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Thermoanaerobacter</i>
	<i>Enterococcus</i>	<i>Granulicatella</i>	<i>Mycoplasma</i>
	<u><i>Corynebacterium</i></u>	<i>Prevotella</i>	<i>Lactobacillus</i>
	<i>Lysinibacillus</i>	<i>Veillonella</i>	<i>Propionibacterium</i>
	<i>Carnobacterium</i>	<i>Actinomyces</i>	<i>Escherichia</i>
	<i>Rothia</i>	<i>Candidatus</i>	
	<i>Gamella</i>	<i>Finegoldia</i>	

Glavni vir bakterij v materinem mleku naj bi bila predvsem koža in novorojenčkova ustna votlina, ki se z vaginalno in črevesno mikrobioto okužita med porodom. Bakterije naj bi se med dojenjem in negovanjem preko novorojenčkovih ust naselile na področju alveol in v mlečnih vodih (Heikkila in Saris, 2003). Študija dojenja z ultrazvočnim slikanjem je pokazala, da obstaja določena stopnja protitoka (Ramsay in sod., 2004), ki bi lahko omogočil prenos bakterij iz otrokove ustne votline v mlečne vode. Vpliv dojenja na mikrobioto mlečne žleze potrjuje tudi študija Cabrera-Rubio in sod. (2012), ki je pokazala večjo prisotnost tipičnih predstavnikov mikrobiote ustne votline (*Veillonella*, *Leptotrichia*, in *Prevotella*) v vzorcih mleka 1 in 6 mesecev po porodu, v primerjavi z vzorci

kolostruma. Podobno kot velja za mikrobioto materinega mleka, spada rod *Streptococcus* med najbolj zastopane rodove v mikrobioti ustne votline (Nasidze in sod., 2009). Možen vir bakterij v mleku je lahko tudi koža matere, saj so predstavniki kot so *Staphylococcus*, *Corynebacteria* in *Propionibacteria*, ki jih običajno najdemo na koži odraslih (Grice in sod., 2009), pogosto prisotni tudi v materinem mleku.

Kljub nekaterim podobnostim med mikrobioto materinega mleka in mikrobioto ustne votline ter kože dojenčka, obstajajo tudi občutne razlike, ki nakazujejo, da kontaminacija preko dojenčkovih ust in kože ni edini vir mikrobiote materinega mleka (Hunt in sod., 2011). Raziskave kažejo, da ima biološka tekočina, ki se izloča v mlečnih žlezah že v zadnjih dveh tednih pred porodom (in torej ni bila izpostavljena stiku z otrokom), podobno bakterijsko sestavo kot kolostrum in mleko po porodu. Prav tako ni dobre razlage za prisotnost striktnih anaerobov kot so bifidobakterije, saj niso tipični predstavniki mikrobiote ustne votline ali kože (Gueimonde in sod., 2007; Martin in sod., 2009). Primerjava laktobacilov iz mleka, prebavnega trakta in kože matere je namreč pokazala, da se laktobacili, ki jih običajno najdemo v mleku, razlikujejo od tistih na koži (Martin in sod., 2003). Na podlagi teh opažanj je mogoče sklepati, da vsaj nekatere skupine bakterij (npr. laktobacili in bifidobakterije) lahko pridejo v materino mleko tudi po endogeni poti (t. i. črevesno-mlečna pot), preko z mukozo povezanega limfatičnega sistema (Perez in sod., 2007).

2.2.1 Črevesno-mlečna in respiratorno-mlečna pot potovanja limfocitov v mlečno žlezo

2.2.1.1 Mehanizem potovanja limfocitov po telesu

Dejstvo, da je v mleku opaziti protitelesa, specifična proti različnim antigenom iz prebavnih in dihalnih poti, predstavlja direkten dokaz, da med temi tkivi obstaja imunološka povezava (Brandtzaeg, 2003). Že iz študij v sedemdesetih letih je razvidno, da celice, ki izločajo protitelesa (protitelesa-izločujoče celice (PIC)) in ki so bile inducirane v črevesnem limfoidnem tkivu (mezenteričnih limfnih vozlih in Peyerjevih ploščicah), poseljujejo različna z mukusom obdana tkiva (npr. urogenitalni trakt, mlečna žleza, žleze slinavke, črevesje,..), kjer izločajo predvsem IgA (Roux in sod., 1977; Weisz-Carrington in sod., 1979). Obratno pa IgA PIC, ki so inducirane v limfoidnem tkivu zgornjega prebavno-respiratornega trakta (usta, žrelo, grlo, požiralnik, bronhij, pljuča), poseljujejo predvsem žleze slinavke in dihala in manj prebavni trakt. IgG PIC so, ne glede na njihov izvor aktivacije, nezmožne prodreti do mukusnih tkiv in jih v večji meri najdemo v limfoidnih tkivih in na mestih kroničnega vnetja. Iz tega so sklepali, da je potovanje IgA PIC odvisno predvsem od mesta njihove aktivacije, kar pa ne velja za IgG PIC. Že zgodnje študije so

tako nakazovale, da obstaja dobro nadzorovan mehanizem, ki omogoča potovanje različnih limfocitov na različna mesta po telesu, kjer opravljajo svojo vlogo aktivacije imunskega sistema in izločanja protiteles (Kunkel in Butcher, 2003).

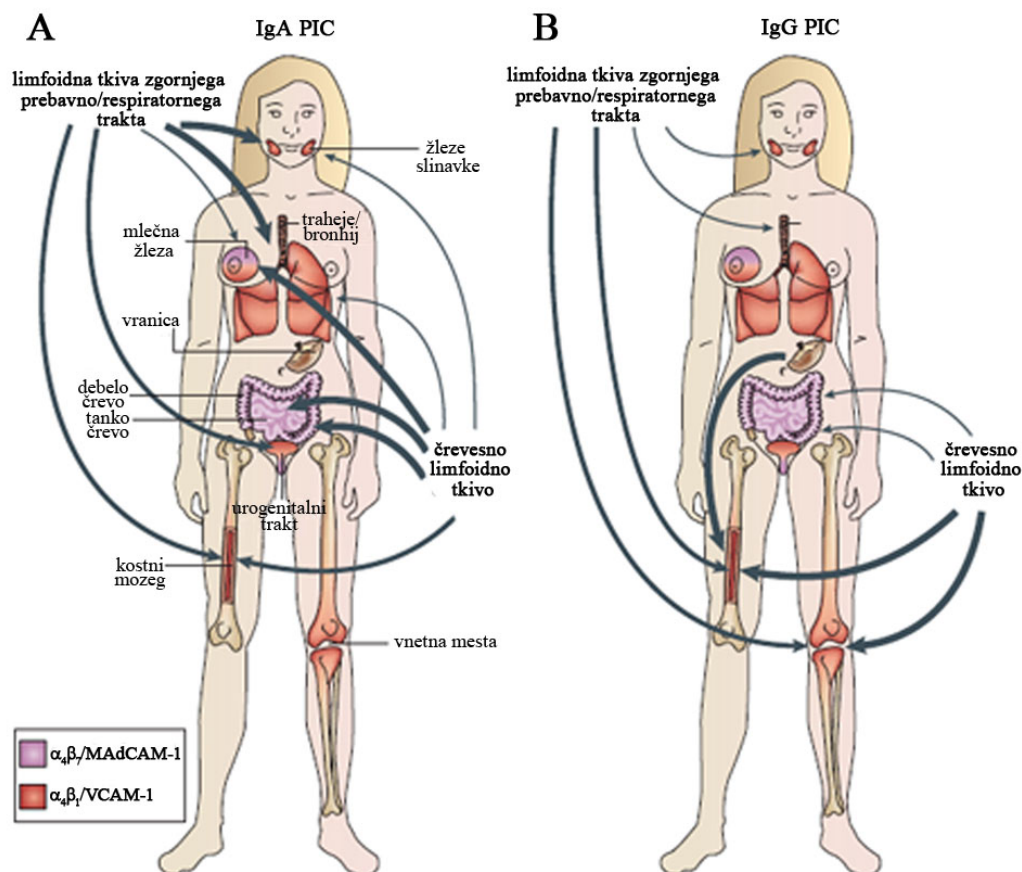
Levkociti, ki krožijo po telesu, se pripnejo na endotelij preko interakcij med integrini na površini levkocitov in njihovimi ligandi, ki jih izražajo endotelne celice. S tem levkocitom omogočijo, da se pripnejo na določen endotelij in s kotaljenjem zaznajo še ostale signalne molekule (npr. kemokine), ki nato omogočijo, da se ti vezani levkociti prebijejo čez endotelij in pridejo v ekstravaskularni prostor in do epitelija (Ward in Marelli-Berg, 2009). Pri potovanju limfocitov po telesu igrajo najpomembnejšo vlogo integrin $\alpha_4\beta_7$, ki se veže na MAdCAM-1 (angl. *mucosal addressin cell-adhesion molecule 1*)« ter integrin $\alpha_4\beta_1$ in ligand VCAM-1 (angl. *vascular cell-adhesion molecule 1*)(Rott in sod., 1996). Različno izražanje integrinov na različnih limfocitih in različno izražanje njihovih ligandov v tkivih, lahko deloma pojasni selektivno potovanje limfocitov na različna mesta v telesu (Slika 2). MAdCAM-1 izražajo endotelne celice prebavnega trakta (tanko in debelo črevo), v manjši meri pa tudi endotelne celice mlečne žleze, urogenitalnega trakta ter placent. VCAM-1 izraža večina kapilarnih venul na različnih mestih, ki niso nujno povezana s tkivi, ki so prekrita z mukozo (npr. kostni mozeg, koža, vnetna mesta, dihalne poti). Izjema so mlečna žleza, urogenitalni trakt in placenta, kjer endotelne celice izražajo MAdCAM-1 in VCAM-1 (Kunkel in Butcher, 2003).

Kemokini so majhne molekule (7–10 kDa), ki spadajo v skupino citokinov. V človeškem telesu je pribl. 50 različnih kemokinov, večina od njih je inducibilnih in kontrolira potovanje in aktivacijo levkocitov na različna mesta v telesu. V večini primerov predstavljajo ligand za določen kemokinski receptor. Med najbolj proučenimi kemokinskimi receptorji je CC kemokinski receptor (CCR) 7, ki igra ključno vlogo pri rekrutiranju celic v različna limfatična tkiva (Worbs in Forster, 2007). Izražanje CCR7 na površini aktiviranih DC in limfocitov T je ključnega pomena za potovanje teh celic do perifernih limfnih vozlov (Bromley in sod., 2005; Forster in sod., 1999). Kemokini in njihovi receptorji tako v kombinaciji z različnimi integrini omogočajo dodatno specifičnost potovanja različnih levkocitov na različna mesta v telesu (Kunkel in Butcher, 2003).

2.2.1.2 Črevesno-mlečna in respiratorno-mlečna pot potovanja limfocitov

Aktivacija celic B v največji meri poteka v limfatičnem tkivu, ki je neposredno povezano z mukoznim (angl. *mucosa-associated lymphoid tissue (MALT)*)«. Največji MALT se nahaja v črevesju, kjer stalno vzorčenje in vdiranje različnih črevesnih antigenov povzroča aktivacijo limfocitov B. Aktivirani limfociti B (limfoblasti), ob aktivaciji začnejo izražati

različne receptorje in integrine, ki jim omogočijo potovanje na različna mesta v telesu, kot je na primer mlečna žleza (Brandtzaeg, 2010).



Slika 2: Potovanje IgA in IgG protitelesa-izločujočih celic (PIC) v odvisnosti od mesta njihove aktivacije in izražanja tkivno specifičnih integrinov in njihovih ligandov (Kunkel in Butcher, 2003: 823). (A) največ IgA PIC nastane v limfnem tkivu prebavnega in zgornjega prebavno-respiratornega trakta ter potuje glede na mesto njihove aktivacije. Del specifičnosti potovanja lahko pripišemo izražanju tkivno specifičnih ligandov za integrine, ki se nahajajo na endoteliju tarčnega tkiva (B) največ IgG PIC potuje v kostni mozeg in vnetna mesta, ne glede na mesto njihove aktivacije. Debelina puščic odgovarja relativnemu številu celic, ki potujejo na določeno mesto, barva organov pa izražanju integrinov in njihovih ligandov (v okvirju).

Figure 2: Distinctive trafficking patterns of IgA and IgG antibody-secreting cells (ASCs) depending on their site of induction and expression of tissue specific integrins and their ligands (Kunkel and Butcher, 2003: 823). (A) most of IgA ASCs is induced in upper aerodigestive lymphoid tissue and traffics regarding to their site of induction. Part of this specificity is due to the expression of tissue-specific integrin ligands on the endothelium in target tissues. (B) most of IgG ASCs mainly traffic to the bone marrow or inflammatory sites irrespective of their site of induction. Arrow thickness corresponds to the relative amount of IgA or IgG ASCs that traffic to each site. The colour of the organs corresponds to the expression of the integrins and their corresponding ligands (in frame).

Osnovna značilnost limfoblastov, ki izvirajo iz prebavnega trakta, je izražanje integrina $\alpha_4\beta_7$ in receptorja CCR10. Endotelne celice v mlečni žlezi izražajo MAdCAM-1, kar

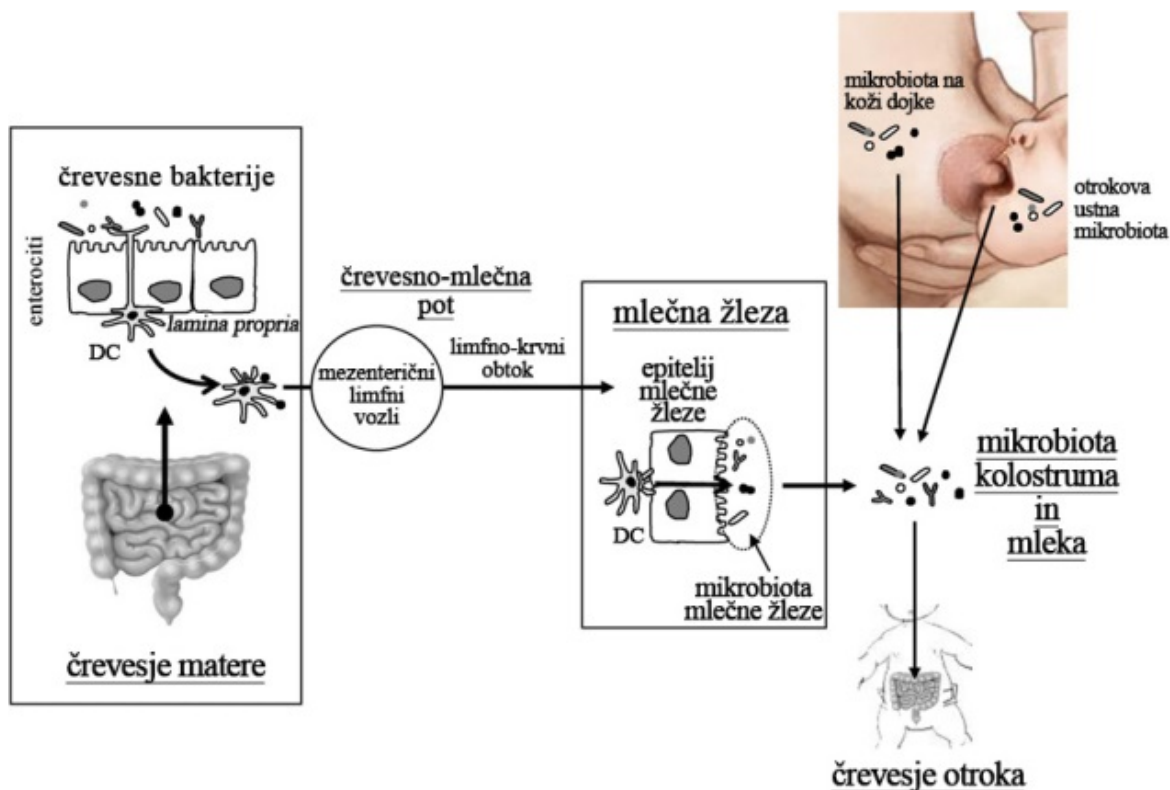
omogoči vezavo aktiviranih limfoblastov (Nishimura, 2003; Van der Feltz in sod., 2001). Gradient kemoatraktanta CCL28, ki ga izločajo epitelne celice, povzroči prehajanje vezanih limfoblastov, ki izražajo receptor CCR10, preko endotelija proti epiteliju in spreminjanje limfoblastov v IgA PIC (Morteau in sod., 2008). Z mukusom povezani imunski odziv nastaja tudi v MALT prebavno-respiratornega trakta, vendar imajo te celice drugačen vzorec potovanja, kot limfoblasti iz prebavnega trakta. Na svoji površini izražajo integrin $\alpha_4\beta_1$ in pa receptor CCR10, kar jim omogoča potovanje v mlečno žlezo, kostni mozeg in urogenitalni trakt. Endotelne celice mlečne žleze namreč izražajo poleg MAdCAM-1 tudi VCAM-1, kar je ključnega pomena za t.i. respiratorno-mlečno pot potovanja limfocitov (Bourges in sod., 2008; Low in sod., 2010). Če povzamemo, med nosečnostjo in laktacijo aktivirani limfociti B potujejo iz prebavnega trakta in zgornjega dela prebavil ter respiratornega trakta v mlečno žlezo, kjer v mleko izločajo protitelesa, specifična proti antigenom, ki se tam nahajajo – to predstavlja osnovo črevesno-mlečne in respiratorno-mlečne poti.

2.3 PREHOD BAKTERIJ V MLEČNO ŽLEZO PO ENDOGENI POTI

Nekatere študije nakazujejo, da bakterije, ki so jih zasledili v popkovnični krvi, amniotični tekočini, mekoniju (Bearfield in sod., 2002; Dasanayake in sod., 2005; Jimenez in sod., 2005), kolostrumu in mleku (Donnet-Hughes in sod., 2010), prihajajo iz materine črevesne mikrobiote po endogeni poti, preko z mukozo povezanega limfatičnega sistema (Martin in sod., 2004). Mehanizem, ki bakterijam omogoča, da preidejo črevesni epitelij, se izognejo imunskemu sistemu in dosežejo mekonij ter kolostrum že med nosečnostjo, še ni povsem znan. Najverjetneje igrajo ključno vlogo celice prirojenega imunskega odziva (DC in makrofagi), ki domujejo v prebavnem traktu in bi lahko bili prenašalci bakterij iz črevesja matere do mlečne žleze (Slika 3). DC namreč lahko prodrejo v črevesni epitelij in sprejmejo bakterije iz črevesne svetline ter pri tem ne spremenijo integritete epitelija. S svojimi dendriti prodrejo skozi črevesni epitelij, pri tem pa izražajo proteine tesnega stika, kar omogoči ohranitev integritete epitelija in nemoteno vzorčenje bakterij iz črevesne svetline (Rescigno in sod., 2001).

Tovrstni mehanizem najverjetneje ni prisoten samo pri DC, saj so Vazques-Torres in sod. (1999) pokazali, da so CD18⁺ celice (vključno z makrofagi) ključnega pomena pri širjenju ne-invazivne salmonelle. Prav tako lahko celice M v Payer-jevih ploščah in limfatičnih foliklih vzorčijo črevesne bakterije in jih posredujejo DC, ki jih nato transportirajo do mezenteričnih limfnih vozlov, saj lahko bakterije znotraj DC ostanejo žive več dni (Macpherson in Uhr, 2004). Od tam bi lahko bakterije, preko črevesno-mlečne poti potovanja limfocitov (glej poglavje 2.2.1), prešle v druga tkiva prekrita z mukusom, kot so

mlečna žleza, urogenitalni trakt in žleze slinavke. Običajno aktivirane DC potujejo do perifernih limfnih vozlov, kjer antigene predstavijo limfocitom T. Vendar pa je znano, da je v posebnih primerih povečane migracije DC, lahko opaziti preliv DC preko perifernega vozla (Randolph in sod., 2005).



Slika 3: Potencialni izvor bakterij, prisotnih v kolostrumu in materinem mleku (Fernandez in sod., 2012: 4).

DC – dendritične celice.

Figure 3: Potential sources of the bacteria present in human colostrum and milk (Fernandez et al, 2012: 4).
DC – dendritic cells

Na možnost potovanja bakterij iz črevesja v mlečno žlezo so nakazali tudi Perez in sod. (2007) na mišjem modelu. Izkazalo se je, da je imelo 3 dni pred kotitvijo večje število brejih miši povečano prisotnost bakterij v mezenteričnih limfnih vozlih (70 % živali), v primerjavi z nebregimi (10 % živali). Dan po kotitvi je imelo le še 40 % živali prisotne bakterije v mezenteričnih limfnih vozlih, kar 80 % živali pa v mlečni žlezi, kar nakazuje, da so bakterije v tem času prešle iz mezenteričnih limfnih vozlov do mlečne žleze, najverjetneje pod vplivom različnih hormonov, ki se izločajo ob kotitvi. Da so za transport najverjetneje odgovorne enojedrne celice iz periferne krvi, so pokazali z raziskavo na 7-ih prostovoljkah in njihovih otrocih. Genetski profil bakterij, prisotnih v blatu mame, se je ujema z genetskim profilom bakterij v njeni krvi, v enojedrnih celicah, prisotnih v mleku

in bakterij v blatu njenega otroka. Poleg tega je bila pri ženskah v laktaciji večja pestrost bakterij, prisotnih v enojedrnih celicah, izoliranih iz periferne krvi (Donnet-Hughes in sod., 2010; Perez in sod., 2007).

Kljub prepričljivim dokazom o endogenem potovanju bakterij v mlečno žlezo, obstaja še vedno kar nekaj odprtih vprašanj. Ni še namreč jasno, na kakšen način bakterije reagirajo s celicami imunskega sistema, da jih njihov imunski odziv ne uniči, ampak omogoči prehod do mlečne žleze in ostalih tkiv ter v katerem obdobju nosečnosti in dojenja je prehajanje najintenzivnejše.

2.3.1 Možni vplivi fizioloških in hormonskih sprememb v pozni nosečnosti na prehod bakterij v mlečno žlezo po endogeni poti

Med nosečnostjo se pod vplivom različnih hormonov (npr. prolaktin, progesteron,...) in lokalnih rastnih dejavnikov, začnejo iz ozkih vodov razvijati alveole. Parenhimsko tkivo postopoma nadomešča maščobne blazinice v nerazviti mlečni žlezi. Epitelne celice se razvijejo v sloj, ki je ločen od stromalnega tkiva s tankim slojem mioepitelnih celic. Pred laktacijo se alveole povečajo in razvijejo v grozdasto strukturo, medtem ko mlečni vodi ostanejo zoženi. Manjše količine mleku podobne tekočine se lahko izločijo že nekaj tednov pred porodom. Ob porodu se epitelne celice transformirajo v popolne celice izločalke, ki nato stalno izločajo mleko v alveolarni lumen, kjer se hrani do ustrezne stimulacije, ki sproži krčenje mioepitelnih celic in iztiskanje mleka v mlečne vode. Ti se združijo v mlečne sinuse, ki vodijo do vrha bradavice. Pretok krvi čez mlečno žlezo je v času nosečnosti zelo povečan, kar omogoča neprekinjen dotok različnih plazemskih in imunskih celic ter snovi za tvorbo mleka (Neville, 1999). Povečan pretok krvi in limfe ter izločanje oksitocina, ki povzroči krčenje mioepitelnih celic, tako lahko olajša prehod bakterij v mlečno žlezo (Fernandez in sod., 2012). Tovrstne fiziološke spremembe zagotavljajo dobre pogoje za nastanek biofilma na mlečnih vodih in areoli (Martin in sod., 2004). Hormonske spremembe, ki spremljajo nosečnost, lahko pripravijo ugodne pogoje za celice imunskega sistema, da prenesejo bakterije do mlečne žleze in ostalih mukoznih tkiv.

2.3.1.1 Progesteron

Progesteron ima pomembno vlogo pri razvoju in delovanju mlečne žleze, saj pospešuje izločanje kemokinov in citokinov, ki povzročijo potovanje monocitov in makrofagov do mlečne žleze (Santos in sod., 2009). Poleg tega progesteron deluje immunosupresivno na več ravneh (Szekeres-Bartho in sod., 2001). Progesteron zavira signalno pot, ki poteka preko TLR-jev. S tem vpliva na regulacijo zorenja fagosomov, ki so ključnega pomena za

citotoksičnost makrofagov (Blander in Medzhitov, 2004; Sun in sod., 2012). DC, izolirane iz kostnega mozga podgan, so imele ob prisotnosti progesterona nižjo raven izločanja vnetnih citokinov TNF in IL-1 β , obenem pa je bila nespremenjena raven izločanja protivnetnega citokina IL-10 in sposobnost fagocitoze (Butts in sod., 2007). Do podobnih zaključkov so prišli Xu in sod. (2011). Ugotavljajo, da imajo DC, izolirane iz kostnega mozga miši, ob prisotnosti progesterona nižjo raven izločanja vnetnega citokina IL-12 in višjo raven izločanja protivnetnega citokina IL-10. Poleg tega so imele s progesteronom tretirane DC manjšo sposobnost aktivacije limfocitov T.

2.3.1.2 Prolaktin

Med razvojem mlečne žleze igra pomembno vlogo prolaktin, hormon, ki ga v največji meri izločajo posebne celice spodnjega režnja hipofize – laktotrofi. Je poli-peptidni hormon s širokim spektrom delovanja, predvsem pri reprodukciji in vzdrževanju homeostaze. Med nosečnostjo in laktacijo sodeluje pri razvoju mlečne žleze, sintezi mleka in vzdrževanju izločanja mleka (Freeman in sod., 2000). Najvišje serumske vrednosti doseže v zadnjem tromesečju nosečnosti (Oleary in sod., 1991). Vpliva na proteine tesnega stika (klavdine) in s tem povečuje paracelični transport Ca²⁺ (Charoenphandhu in sod., 2009). Prolaktin sodeluje tudi pri regulaciji imunskega sistema, ki pa je odvisna od njegove koncentracije (Reber, 1993). Pri nižjih koncentracijah stimulira izražanje T-bet, transkripcijskega dejavnika, ki usmerja v razvoj Th1. Pri višjih koncentracijah, ki so primerljive tistim v zadnjem tromesečju nosečnosti, pa zavira izražanje T-bet in s tem usmerja v razvoj Th2 (Tomio in sod., 2008).

2.3.1.3 Aktivin A

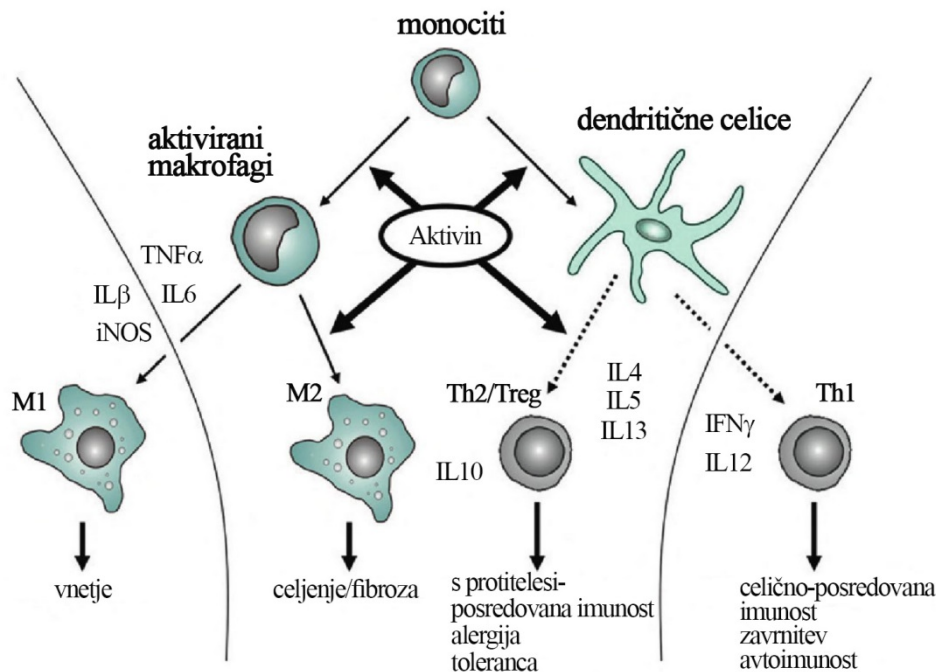
Aktivin A (ActA) je hormon in rastni dejavnik, katerega koncentracije v plazmi se v zadnjem tromesečju nosečnosti povečajo tudi do 69-krat (Fowler in sod., 1998; O'Connor in sod., 1999). Spada v skupino aktivinov, ki so del nad-družine TGF- β . Aktivini delujejo kot hormoni, saj pospešujejo izločanje folikulotropina iz hipofize (Corrigan in sod., 1991). Novejše raziskave kažejo, da je pglavitna vloga ActA predvsem regulacija imunosti ter vnetja in fibroze. Proizvaja ga veliko različnih vrst celic kot so epitelne celice, hepatociti, keratinociti v koži, folikularne celice v jetrih, nevronske celice, endoteljske celice, celice gladkega mišičja, stromalne celice kostnega mozga, nevtrofilci, mastociti, monociti/makrofagi, DC in nekateri podtipi celic T (Hedger in sod., 2011). Delovanje ActA je regulirano z izločanjem folastatina, antagonista, ki se z visoko afiniteto veže na ActA (Nakamura in sod., 1990).

Vse več je dokazov, da ActA lahko deluje vnetno, kakor tudi protivnetno in igra pomembno vlogo pri uravnavanju izločanja citokinov, od katerih je odvisen imunski odziv (Slika 4). Njegovo delovanje je dvolično, saj učinkuje vnetno ob začetku vnetnega odziva, kasneje pa učinkuje protivnetno na celice, ki so v »vnetnem« stanju. Ob pojavu vnetnega dražljaja in različnih vnetnih mediatorjev različne vrste celic (predvsem monociti, makrofagi in DC) začnejo izločati ActA preko aktivacije TLR-jev ter MyD88-odvisne in MyD88-neodvisne signalne poti. Obe poti nato preko fosforilacije MAPK (p38, ERK1/2 in JNK) aktivirata transkripcijski dejavnik, aktivatorski protein 1 (AP-1) (Hedger in sod., 2011). Vnetno delovanje ActA so dokazali na monocitih/makrofagih iz različnih vrst. ActA lahko spodbudi monocite/makrofage k izločanju različnih vnetnih mediatorjev, kot so IL-1 β , TNF- α , IL-6, NO, prostaglandini-E2 in tromboksani (Nusing in Barsig, 1999; Nusing in sod., 1995; Yamashita in sod., 2004). Poleg tega ActA stimulira potovanje mastocitov na mesto vnetja (Funaba in sod., 2006). Kot smo že omenili, lahko ActA deluje tudi protivnetno, saj lahko zavre pretvorbo prekursorja IL-1 β v aktivno obliko (Ohguchi in sod., 1998), izločanje ključnih vnetnih citokinov kot so TNF- α , IL-18 in IL-6 ter blokira učinkovanje IL-1 β ter IL-6 na monocite, limfocite in hepatocite (Hedger in sod., 2011).

ActA ima podobno kot na monocite/makrofage, velik vpliv na razvoj in aktivacijo DC in stimulacijo limfocitov T. Raziskave na miših, ki so jih opravili Semitekolou in sod. (2009) so pokazale, da pri alergijski bolezni dihal pri miših zavira tako Th1, kakor tudi antigen-specifični Th2 imunski odziv, preko aktivacije antigen-specifičnih Treg. Poleg tega lahko pri miših stimulira razvoj populacije CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg (Huber in sod., 2009), ki je ključnega pomena pri razvoju in vzdrževanju avtoimunosti in imunski homeostazi (Sakaguchi in sod., 2006).

Številne študije nakazujejo, da ActA lahko zavira zorenje DC, ki predstavljajo glavne regulatorje antigen-specifičnega imunskega odziva (Robson in sod., 2009; Segerer in sod., 2008). To lahko predstavlja pomembno imuno-regulatorno funkcijo, saj interakcija med celicami T in nDC lahko povzroči imunosupresivni imunski odziv in toleranco (Jonuleit in sod., 2000). nDC aktivirajo TGF- β , ActA in inhibin A, vendar je pri zadnjih dveh opaziti nepopolno aktivacijo in oslABLjeno zmožnost aktivacije celic T, čeprav brez opaznih razlik v izločanju citokinov in kemokinov (Segerer in sod., 2008). Podobno vlogo ActA so ugotovili pri tkivih, ki so povezana z nosečnostjo. Pri tem igra zelo pomembno vlogo koncentracija, saj je bilo izločanje vnetnih mediatorjev v tkivih iz rodil nosečnic, ki so rodile s carskim rezom, pospešeno pri nizkih koncentracijah ActA in zavrtlo pri visokih koncentracijah (Keelan in sod., 2000). Serum nosečnic ima zaviralni učinek na aktivacijo nDC (Bozorgmehr in sod., 2012; Della Bella in sod., 2011). Della Bella in sod. (2011) so nakazali, da gre tovrstni učinek najverjetneje pripisati prav visokim koncentracijam ActA v

zadnjem stadiju nosečnosti, saj so opazili pri dodatku ActA serumu ne-nosečih žensk enak učinek na nDC, kakor pri serumu nosečnic.



Slika 4: Imuno-regulatorne funkcije aktivina A (ActA) (Hedger in sod., 2011: 277). iNOS – inducibilna NO sintaza, IFN – interferon, TNF – tumorje nekrotizirajoči dejavnik, IL – interlevkin, Th – celice T pomagalke, Treg – regulatorne celice T; M – populacija makrofagov.

Figure 4: Immunoregulatory functions of activin A (ActA) (Hedger et al, 2011: 277). iNOS – inducible NO synthase, IFN – interferon, TNF – tumour necrosis factor, IL – interleukin, Th –helper T cells, Treg – regulatory T cells; M – macrophage population.

Tako rezultati kliničnih, kakor tudi eksperimentalnih študij nakazujejo, da je za normalno nosečnost značilen Th2 imunski odziv, ki je povezan s povečano sintezo protiteles in z zmanjšanim celično posredovanim Th1 imunskim odzivom (Szekeres-Bartho in sod., 2001). Sprememba imunološkega stanja matere v zadnjem stadiju nosečnosti najverjetneje pospeši prenos bakterij in njihovih komponent iz materinega črevesja v krvni in limfni sistem (Donnet-Hughes in sod., 2010).

2.3.2 Vpliv probiotikov na oblikovanje mikrobiote mlečne žleze in mleka

Vse več raziskav poroča o različnih pozitivnih vplivih uživanja probiotikov v času nosečnosti in dojenja tako na mamo, kakor tudi na novorojenčka. Ti učinki se kažejo na nivoju sprememb črevesne mikrobiote novorojenčka (Gronlund in sod., 2011; Grzeskowiak in sod., 2012; Gueimonde in sod., 2006) in pa na zmanjšani obolevnosti za

določenimi akutnimi ter kroničnimi boleznimi, kot so npr. nosečniški diabetes (Asemi in sod., 2013), vaginalne infekcije in z njimi povezani splavi (Myhre in sod., 2011; Stojanović in sod., 2012), ekcemi (Rautava in sod., 2012b), pojavnost prebavnih težav (Ortiz-Andrellucchi in sod., 2008), preobčutljivost (Huurre in sod., 2008) in atopični dermatitis (Kopp in sod., 2008).

Mehanizmi delovanja zaužitih probiotikov na mikrobioto mlečne žleze in s tem na črevesno mikrobioto in zdravje dojenčka pa so še precejšnja neznanka. Predlagani so različni mehanizmi, ki lahko delujejo samostojno ali v interakciji/kombinaciji (Fernandez in sod., 2012):

- direkten prenos bakterij iz črevesja v mlečno žlezo po endogeni poti;
- prehod bakterij v mlečno žlezo z zunanjim vnosom preko areole in bradavice;
- vpliv na imunski sistem, ki posredno vpliva na sestavo mikrobiote materinega mleka in dojenčkovega prebavnega trakta.

Objave o direktnem prehodu komercialnih probiotičnih sevov iz črevesa matere v njeno mleko so maloštevilne, vendar kažejo na to, da lahko poleg komensalnih bakterij (običajno prisotnih v črevesni mikrobioti), tudi probiotične bakterije iz mlečnih izdelkov in prehranskih dopolnil, prehajajo v materino mleko po endogeni poti (Jimenez in sod., 2008). Probiotično bakterijo *Escherichia coli* Nissle 1917 so zasledili v limfnih žlezah in Peyer-jevih ploščicah 6 ur po oralni aplikaciji (Schultz in sod., 2005). Probiotični sev LGG so v mezenteričnih vozlih miši zaznali 24 ur po oralni aplikaciji (Kandasamy in sod., 2011). Finskim raziskovalcem je pri raziskavi bakterijske raznolikosti humanega mleka uspelo določiti DNA seva LGG v mleku doječih mater, vendar na osnovi rezultatov omenjene raziskave ni mogoče trditi, da je sev prešel v materino mleko po endogeni poti, saj je njegova prisotnost lahko tudi posledica zunanjega vnosa preko areole in bradavice (Heikkila in Saris, 2003). LGG je namreč probiotični sev, na katerem je bilo opravljenih že veliko raziskav in se ga pogosto uporablja v mlečnih izdelkih (Salminen, 1996), zlasti na Finskem. Iz dosedanjih raziskav je razvidno, da uživanje LGG v času nosečnosti vpliva tudi na imunski sistem mlečne žleze (Prescott in sod., 2009), kar lahko privede do spremenjenega procesa kolonizacije mlečne žleze ter posledično do spremenjenega dojenčkovega prebavnega trakta (Schultz in sod., 2004).

Študija na 352-ih prostovoljkah z infekcijskim mastitisom je pokazala, da predstavlja uživanje probiotičnih sevov *Lactobacillus fermentum* CECT 5716 in *Lactobacillus salivarius* CECT 5713 dobro alternativo zdravljenju infekcijskega mastitisa z antibiotiki (Arroyo in sod., 2010). Prostovoljke, ki so seva dnevno uživale, so imele v mleku manjše število stafilokokov in manjše celokupno število bakterij. Poleg tega so raziskovalci

potrdili prisotnost obeh sevov v mleku prostovoljk, ki so bile na probiotični terapiji. Po uživanju *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 v času nosečnosti so v probiotični skupini zasledili povečano prisotnost *Lactobacillus reuteri* v materinem mleku, kar avtorji pripisujejo prehodu testiranega seva v materino mleko (Abrahamsson in sod., 2009).

Naša pilotna raziskava na dveh doječih materah, ki sta en teden uživali liofiliziran pripravek seva LK7, je pokazala prisotnost DNA seva K7 v mleku ene matere (Bogovič Matijašič in sod., 2009). LK7 je sev z dokazanimi probiotičnimi lastnostmi, ki je bil izoliran iz blata teden dni starega dojenčka (Bogovič-Matijašič in Rogelj, 2000). S svojimi bakteriocini in drugimi metaboliti *in vitro* zavira rast širokega spektra bakterijskih vrst, zmanjša vezavo *E. coli* na Caco-2 celično linijo, prašičjo in človeško sluz ter preživi prehod skozi prebavila in vsaj začasno kolonizira črevesno sluznico konvencionalnih in gnotobiotičnih prašičev (Rogelj in Bogovič Matijašič, 2006). Njegova prisotnost v blatu že po prvem tednu dojenja nakazuje na to, da je prišel v otrokovo črevo z dojenjem, preko materinega mleka.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 PRIPRAVA RAZTOPIN

V poskusih smo uporabljali sledeče raztopine:

- **Fosfatni pufer (PBS)** smo pripravili tako, da smo v 850 ml destilirane vode (dH₂O) raztopili 8 g NaCl (Merck, 1.06404), 0,2 g KCl (Sigma, 31248) 1,80 g Na₂HPO₄×2H₂O (Merck, 1.06580), 0,24 g KH₂PO₄ (Merck, 1.05104), uravnali pH na 7,4 in dodali dH₂O do enega litra ter avtoklavirali 15 min pri 121 °C.
- **Anaerobni diluent** smo pripravili tako, da smo v 900 ml dH₂O ob rahlem gretju raztopili 8,5 g NaCl, 1 g peptona (Merck, 1.02239), 2 g svinjske želatine (Fluka, 48724), 0,557 g CysHCl×H₂O (Merck, 1.02839) in dodali dH₂O do enega litra ter avtoklavirali 15 min pri 121 °C.
- **0,5 M EDTA** smo pripravili tako, da smo v 400 ml dH₂O raztopili 74 g EDTA (Sigma, E5134) ob dodajanju NaOH (Merck, 1.06498) do pH 8,0 in dopolnili z dH₂O do enega litra ter avtoklavirali 15 min pri 121 °C.
- **10 x Tris-EDTA (TE) pufer** smo pripravili tako, da smo v 80 ml dH₂O 0,12 g Tris, 0,2 ml 0,5 M EDTA, s HCl (37 %; Merck 1.00317) umerili pH na 8,0 in z dH₂O dopolnili do 100 ml ter avtoklavirali 15 min pri 121 °C.
- **50 x Tris-acetat-EDTA (TAE) pufer** smo pripravili tako, da smo zatehtali 242 g Trizma baze (Sigma, T6066), 57,1 g ledocetne kisline (Merck, 1.00063), dodali 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) in dopolnili z dH₂O do enega litra ter avtoklavirali 15 min pri 121 °C.
- **0,25 % tripsina-EDTA** smo pripravili tako, da smo 2,5 g tripsina (Sigma, T4799) raztopili v 1 l 0,5 mM EDTA in sterilizirali s filtracijo preko filtra s porami velikosti 0,22 µm (Corning, #431174).
- **Rekonstituirano mleko** smo pripravili tako, da smo 6 g posnetega mleka v prahu (Merck, 1.15363) raztopili v 60 ml dH₂O vode ter avtoklavirali 15 min pri 110 °C.
- **Fiksacijski pufer** smo pripravili tako, da smo 4 g paraformaldehida (PFA; Sigma, P6148) raztopili v 90 ml PBS, motno raztopino gredli do 58 °C in po kapljicah dodajali NaOH, dokler ni raztopina postala bistra. Nato smo raztopino ohladili na sobno temperaturo, uravnali pH na 7,3 in dopolnili s PBS do 100 ml.
- **Pufer za spiranje 1 (P1)** smo pripravili tako, da smo 2 ml toplotno deaktiviranega seruma govejega zarodka (FBS; Gibco, 10500) dodali k 98 ml PBS (2 % FBS v PBS).
- **Pufer za spiranje 2 (P2)** smo pripravili tako, da smo v 99,9 ml pufera P1 dodali 0,1 ml detergenta Triton X-100 (Sigma, T9284).

3.2 PRIPRAVA GOJIŠČ

Pri gojenju bakterij smo uporabljali sledeča gojišča:

- **Tekoče gojišče MRS** (Merck, 1.10661) smo pripravili po navodili proizvajalca, in sicer smo 52,2 g gojišča raztopili v 1 l dH₂O, razdelili v epruvete po 10 ml in avtoklavirali 15 min pri 118 °C.
- **MRS agar** (Merck, 1.10660) smo pripravili po navodili proizvajalca, in sicer smo 13,64 g gojišča raztopili v 200 ml l dH₂O in avtoklavirali 15 min pri 118 °C. Še tekoč agar smo razlili v petrijevke.
- **Tekoče in trdno gojišče MRS z dodatkom rifampicina (MRS^R)** smo pripravili tako, da smo pred uporabo oziroma razlitjem na petrijevko gojišču dodali založno raztopino rifampicina v metanolu (12,5 mg/ml; Sigma, R3501) do končne koncentracije 125 µg/ml.
- **Tekoče gojišče BHI** (Brain Heart Infusion; Merck, 1.10493) smo pripravili po navodilih proizvajalca in sicer smo 37 g gojišča raztopili v 1 l dH₂O, razdelili v epruvete po 10 ml in avtoklavirali 15 min pri 121 °C.
- **Modificirano gojišče M2** smo pripravili, kot je opisano v delu Hobson (1969).

Pri gojenju celičnih kultur smo uporabljali sledeča gojišča:

- **DMEM Advanced** (Gibco, 12491) je že pripravljeno gojišče DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) z izboljšano formulacijo, pri kateri je potrebno gojišču dodati manj seruma govejega zarodka (FBS).
- **DMEM brez FBS (DMEM^{-FBS})** smo pripravili tako, da smo gojišču DMEM Advanced dodali penicilin (100 IE/ml; Sigma, P3032), streptomycin (1 mg/ml; Sigma, S9137) in L-glutamin (2 mM; Sigma, G1326).
- **Kompletni DMEM (DMEM^K)** smo pripravili tako, da smo DMEM^{-FBS} dodali deaktiviran FBS (Gibco, 10500) v končni koncentraciji 5 % (v/v).
- **DMEM brez antibiotikov (DMEM^{-ATB})** smo pripravili tako, da smo gojišču DMEM Advanced dodali L-glutamin (2 mM) in deaktiviran FBS v končni koncentraciji 5 % (v/v).
- **RPMI** (Sigma, R8758) je že pripravljeno gojišče RPMI (Roswell Park Memorial institute medium) z dodanim L-glutaminom (0,3 g/l), ki ga običajno uporabljamo za gojenje suspenzijskih celic.
- **Kompletni RPMI (RPMI^K)** smo pripravili tako, da smo gojišču RPMI dodali deaktiviran FBS v končni koncentraciji 10 % (v/v).

3.3 BAKTERIJSKI SEVI IN GOJENJE BAKTERIJ

V poskusih smo uporabljali sledeče bakterijske seve:

- ***Lactobacillus gasseri* K7 (LK7)** je izolat iz blata teden dni starega dojenčka z *in vitro* in *in vivo* dokazanimi probiotičnimi lastnostmi, izoliran na Katedri za mlekarstvo, Oddelka za zootehniko, Biotehniške fakultete v Ljubljani. Tvori bakteriocina gasicin K7 A in gasicin K7 B. Sev je deponiran v zbirki mikroorganizmov na Inštitutu za mlekarstvo in probiotike, Oddelka za Zootehniko, Biotehniške fakultete v Ljubljani, pod oznako IM 105 ter v češki zbirki mikroorganizmov (Czech Collection of Microorganisms) pod oznako CCM 7710.
- ***Lactobacillus gasseri* K7 Rif^r (LK7^R)** je derivat seva LK7, ki je z zaporednim precepljanjem v gojišča z naraščajočo koncentracijo rifampicina pridobil odpornost proti rifamicinu. Sev je deponiran v zbirki mikroorganizmov na Inštitutu za mlekarstvo in probiotike, Oddelka za Zootehniko, Biotehniške fakultete v Ljubljani, pod oznako IM 238.
- ***Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG)** je izolat s številnimi dokazanimi probiotičnimi lastnostmi. Sev je deponiran v ameriški celični zbirki (American Type Cell Collection; ATCC) pod oznako ATCC 53103. LGG je tržna znamka v lasti Finske mlekarske korporacije Valio.
- ***Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN)** je eden redkih predstavnikov po Gramu negativnih mikroorganizmov s številnimi dokazanimi probiotičnimi lastnostmi. Probiotični učinki so se pokazali pri zelo različnih prebavnih motnjah, kot so npr. driske in sindrom razdražljivega črevesa. Sev EcN je komercialno dostopen v izdelku Mutaflor nemškega podjetja Ardeypharm.
- **Različne seve rodu *Lactobacillus*** (Preglednica 3) smo uporabili pri razvoju metode za ugotavljanje LK7 v kompleksnih vzorcih (poglavje 3.4).

LK7, LGG in različne seve iz rodu *Lactobacillus* smo gojili v tekočem gojišču MRS (Merck, 1.10661) pri 37 °C. Pred poskusi smo laktobacile, ki so bili hranjeni pri -80 °C, inokulirali (1 % v/v) v sveže gojišče MRS in gojili 18 ur pri 37 °C. Po 18-ih urah smo precepljanje ponovili, tako da smo v poskusih uporabljali 18-urno kulturo po dvakratnem precepljanju. EcN smo gojili na enak način, vendar v gojišču BHI (Merck, 1.10493). Pri LK7^R smo pri prvem precepljanju uporabili gojišče MRS z dodatkom rifampicina (Calbiochem, 557303) v končni koncentraciji 125 µg/ml (MRS^R).

Po 18-ih urah in po dvakratnem spiranju s PBS je bilo število LK7 in LK7^R približno 4×10^8 kolonijских enot (KE)/ml, LGG približno 6×10^8 KE/ml, EcN pa 1×10^9 KE/ml. Ta števila smo uporabljali za izračun volumnov kulture, ki so bili potrebni za pripravo

ustrezne koncentracije bakterij za poskuse. Dejansko število bakterij pa smo ugotavljali med vsakim poskusom posebej.

Pri ugotavljanju števila kopij 16S bakterijske rDNA v različnih bioloških vzorcih z metodo PCR v realnem času (poglavje 3.6.5.8) smo za pripravo standardne premice uporabili *Bacteroides thetaiotaomicron* DSM2079, ki smo ga gojili v modificiranem M2 (Hobson, 1969) pri 37 °C in pri anaerobnih pogojih.

Preglednica 3: Bakterijski sevi rodu *Lactobacillus*, ki smo jih uporabili pri razvoju metode za ugotavljanje LK7 v kompleksnih vzorcih.

Table 3: Bacterial strains belonging to genus *Lactobacillus*, which were used in development of method for detection of LK7 in complex samples.

Bakterijski sev	Vir ¹	Lastnosti
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	ATCC	Tipski sev
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CCDM 109	CCDM	Izolat iz blata dojenčka
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CCDM 149	CCDM	Izolat iz blata dojenčka
<i>Lactobacillus gasseri</i> CCDM 214	CCDM	Izolat iz blata dojenčka
<i>Lactobacillus gasseri</i> CCDM 215	CCDM	Izolat iz blata dojenčka
<i>Lactobacillus gasseri</i> CCDM 332	CCDM	Izolat iz blata dojenčka
<i>Lactobacillus gasseri</i> CCDM 335	CCDM	Izolat iz blata dojenčka
<i>Lactobacillus gasseri</i> CCDM 340	CCDM	Izolat iz blata dojenčka
<i>Lactobacillus gasseri</i> CCDM 377	CCDM	Izolat iz blata dojenčka
<i>Lactobacillus gasseri</i> DSM 20243	DSM	Tipski sev
<i>Lactobacillus gasseri</i> FAM 17266	FAM	Izolat iz človeške sline
<i>Lactobacillus gasseri</i> FAM 17828	FAM	Izolat iz vaginalnega trakta
<i>Lactobacillus gasseri</i> LF221	IML-PRO	Izolat iz blata dojenčka, tvori bakteriocina, acidocin LF221 A in acidocin LF221 B
<i>Lactobacillus johnsonii</i> ATCC 11506	ATCC	Izolat iz človeškega blata, tvori laktacin F
<i>Lactobacillus johnsonii</i> FAM 1158	FAM	Izolat iz sira
<i>Lactobacillus johnsonii</i> NCC 533	NCC	Izolat iz človeškega blata
<i>Lactobacillus johnsonii</i> FAM 17265	FAM	Izolat iz blata piščanca

¹ATCC – American Type Culture Collection, ZDA; CCDM – Culture Collection of Dairy Microorganisms Lacto-Flora, Češka; DSM – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Nemčija; FAM – Federal Dairy Research Station, Švica; IML-PRO – Zbirka inštituta za mlekarstvo in probiotike, Slovenija; NCC – Nestle Culture Collection, Švica

3.4 RAZVOJ METODE ZA UGOTAVLJANJE LK7 V KOMPLEKSNIH VZORCIH

Razvoj metode za ugotavljanje prisotnosti LK7 v kompleksnih vzorcih je temeljil na rezultatih predhodnih raziskav, ki so pokazale, da sev proizvaja dva specifična bakteriocina, gasericin K7 A in gasericin K7 B (Rogelj in Bogovič Matijašič, 2006). V prvi fazi smo izdelali vrsto začetnih oligonukleotidov (ZO), specifičnih za dele regij, ki kodirajo gasericin K7 A in K7 B. V drugi fazi smo izolirali DNA iz čistih kultur sevov iz rodu *Lactobacillus* ter iz blata 45-ih zdravih prostovoljcev, ki niso uživali seva LK7. Nove

in že obstoječe ZO, specifične za dele regij, ki kodirajo gasericin K7 A in K7 B, smo nato uporabili pri verižni reakciji s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction* (PCR)), kjer smo poskušali izbrati par ZO, ki bi bil primeren za določanje LK7 v kompleksnih vzorcih. Izbrani par ZO smo nato uporabili pri proučevanju vpliva probiotikov LK7 in LGG na mikrobioto mezenteričnih vozlov, mlečne žleze in mleka miši linije FVB/NHan/Hsd (poglavje 3.6).

3.4.1 Izolacija DNA iz čistih kultur in iz vzorcev blata zdravih prostovoljcev

Pri izolaciji DNA smo uporabili 45 vzorcev blata zdravih prostovoljcev (23 moških in 22 žensk), ki niso nikoli uživali seva LK7. Vsi prostovoljci so podpisali pisno privolitev. Etično sprejemljivost raziskave je odobrila Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko (36/12/11). Po odvzemu smo vzorce do analiz hranili pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Odtaljen vzorec blata (0,1 g) smo razredčili z 9,9 ml anaerobnega diluenta. Razredčeni vzorec (1 ml) smo centrifugirali 5 min pri $12000 \times g$ in pelet dvakrat sprali s PBS. Pelet smo nato resuspendirali v 500 μl TE pufra, ki je vseboval 5 mg/ml lizocima (Sigma, L6876) in 25 U/ml mutanolizina (Sigma, M9901). Mešanico smo 2 h inkubirali pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po encimski obdelavi smo mešanico sonicirali s sonikatorjem Soniprep 150 (MSE Scientific Instruments, VB) v treh ciklih po 30 s delovanja in 15 s odmora. Med sonikacijo smo mešanico hladili z raztopino ledu in vode. Celokupno DNA smo nato izolirali s kompletom za izolacijo DNA Maxwell 16 Tissue DNA Purification Kit (Promega, AS1030) in z uporabo aparata Maxwell TM 16 (Promega, ZDA), po navodilih proizvajalca. Morebitne inhibitorje PCR smo odstranili z uporabo kolone Zymospin IV-HRC (Zymo Research, C1010), po navodilih proizvajalca.

Za izolacijo DNA iz kulture LK7 in čistih kultur sevov rodu *Lactobacillus* (Preglednica 1), smo uporabili 1 ml sveže 18-urne kulture ter postopali enako kot pri 1 ml razredčenega vzorca blata.

3.4.2 Pomnoževanje delov kodirajočih regij gasericina K7 A in K7 B z verižno reakcijo s polimerazo (PCR)

ZO, ki smo jih uporabili za pomnoževanje delov kodirajočih regij gasericina K7 A in K7 B, so navedeni v Preglednici 4 in 5. Nekateri ZO so bili uporabljeni že v predhodnih študijah, nekatere pa smo izdelali za namene te študije. Kot osnova za izdelavo sta nam služili že znani nukleotidni zaporedji gasericina K7 A (številka GenBank: EF392861) in K7 B (številka GenBank: AY307382)(Zorič Peternel in sod., 2010). Pri izdelavi primernih

ZO z enakimi temperaturami prileganja smo si pomagali s programskim paketom LightCycler probe design (v1.0, Applied Science, Nemčija).

Preglednica 4: Začetni oligonukleotidi za pomnoževanje delov kodirajočih regij gasericina K7 A. AcP – aktivna podenota, CP – komplementarna podenota, IP – domnevni protein imunosti, ES – končni del zaporedja.

Table 4: Oligonucleotide primers for amplification of parts of gassericin K7 A coding regions. AcP – active subunit, CP – complementary subunit, IP – putative immunity protein, ES – end sequence.

Ime	Tarčni gen	Nukleotidno zaporedje (5'→3')	Dolžina pomnožka (bp)	Program PCR
LFA 185 ^a	AcP	GTTGCAGGATCATGTG	84	94 °C (60 s),
LFA 268 ^a	AcP	TGTTGCAGCTCCGTTA		55 °C (30 s), 72 °C (30 s)
BOJA ^b	CP	TGGCGGATCAGTACAATGTG	204	94 °C (60 s),
BOJB ^b	AcP	TGATGTTGCAGCTCCGTTAG		52 °C (30 s), 72 °C (30 s)
GasA_1F ^c	CP	TGCATGGAGAGGTGCACG	118	95 °C (30 s),
GasA_1R ^c	CP	CCAGCCCACACATTGTACTGAT		60 °C (30 s), 72 °C (40 s)
GasA_2F ^c	AcP	GGATCATGTGGTAAAGGTGCAGTA	105	
GasA_2R ^c	AcP	TCCACTAGCAGTTTGTAGAACCAAT		
GasA_3F ^c	IP	CACCAATATAGTAGCTCTAATACAGACAC	106	
GasA_3R ^c	IP	ATATTTTGGATTATTTTACCTGCATAGGC		
GasA_4F ^c	ES	GCTTTACCTGCTTTAATTTGATTATCAACA	110	
GasA_4R ^c	ES	GCTAAGAACTCAAACGCTGCC		

^aČanžek Majhenič in sod. (2003); ^bZorič Peternel in sod. (2010); ^cizdelani v tej študiji

Reakcijo smo izvajali v napravi za PCR (Mastercycler gradient, Eppendorf, Nemčija). Mešanico PCR (25 µl) smo sestavili iz:

- 1 x Green GoTaq Flexi pufra (Promega, M891A);
- 1,5 mM MgCl₂ (Promega, A351B);
- 0,2 mM deoksiribonukleotid trifosfata (dNTP; Thermo Scientific, R0192);
- 0,5 µM vsakega od ZO (Preglednica 4 in 5);
- 0,625 U GoTaq DNA polimeraze (Promega, M830A);
- 2 µl 100-krat v vodi redčene vzorčne DNA.

Reakcijo smo začeli z začetno dvominutno denaturacijo pri 95 °C, kateri je sledilo 30 ciklov denaturacije, prileganja in podaljševanja pri pogojih specifičnih za vsak par ZO (Preglednica 4 in 5). Reakcijo smo končali s 5 min podaljševanja pri 72 °C. Po končani reakciji smo pomnožke PCR nanесли na 1,8 % agarozni gel. Gel smo pripravili s segrevanjem agaroze (Lonza, 5004) v 1 x pufuru TAE. Po ločbi fragmentov DNA z elektroforezo pri napetosti 90 V smo agarozni gel obarvali s fluorescenčnim barvilom

SYBR Safe (Invitrogen, S33102) in nato obarvane fragmente pogledali pod UV pri 254 nm.

Preglednica 5: Začetni oligonukleotidi za pomnoževanje delov kodirajočih regij gasicina K7 B. AP – domnevni dodatni transportni protein, CP – komplementarna podenota, AcP – aktivna podenota, TP – domnevni transportni protein, IP – domnevni protein imunosti.

Table 5: Oligonucleotide primers for amplification of parts of gassericin K7 B coding regions. AP – putative additional transport protein, CP – complementary subunit, AcP – active subunit, TP – putative transport protein, IP – putative immunity protein.

Ime	Tarčni gen	Nukleotidno zaporedje (5'→3')	Dolžina pomnož-ka (bp)	Program PCR
B 348 ^a	AP	ACCTACAGTAGACGGCTTGA	616	95 °C (30 s), 55 °C (30 s), 72 °C (30 s)
B 833 ^a	CP	GCTCCACCTACTCCACCTAT		
K7B c.f. for. ^a	CP	TGGGAGAAATAAATTGGGCTG	165	95 °C (60 s), 56 °C (30 s), 72 °C (20 s)
K7B c.f. rev. ^a	CP	TTCCGAATCCACCAGTAGC		
K7 LFB 1193 ^b	AcP	GGAGCTACTCGCGGAGTAAG	70	96 °C (30 s), 55 °C (30 s), 72 °C (30 s)
K7 LFB 1262 ^b	AcP	CTCCTAACGCACAGGCAGTC		
GasB_1F ^c	TP	TGATAAGCATACGTTGCGGTCAT	102	95 °C (30 s), 60 °C (30 s), 72 °C (40 s)
GasB_1R ^c	TP	TCTGGCCTACAACCTAACAAACAATTC		
GasB_2F ^c	AP	AATTTCTCGACAATGATTATTATCCAGCC	118	
GasB_2R ^c	AP	CCGTTGGTTCAACAACGCC		
GasB_3F ^c	CP	GAAATGCAGTTTGC GGTCCT	105	
GasB_3R ^c	CP	TTCTTATCTTTCCGAATCCACCAGTAG		
GasB_4F ^c	AcP	GAATTAAGAAATGTAATGGGTGGAAACAAG	102	
GasB_4R ^c	AcP	TGGTCCGAATCCTCTGCACCAA		
GasB_5F ^c	IP	TTGTATTGGCCAATTTATGTTTTTTGAAGT	116	
GasB_5R ^c	IP	CCTATTACAAACGATATGGCCAAAATTAGT		

^aČanžek Majhenič (2008); ^bČanžek Majhenič in sod. (2003); ^cizdelani v tej študiji

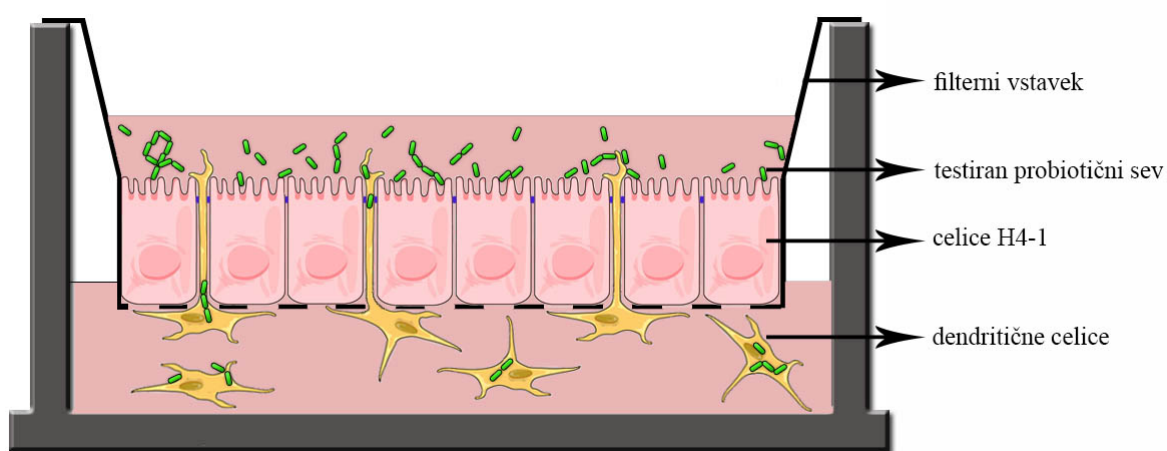
3.5 POSKUSI NA *in vitro* MODELU ČREVESNEGA EPITELIJA

Na modelu črevesnega epitelijskega tkiva smo želeli ugotoviti ali DC zajemajo testirane probiotične bakterije in ali je preživetje različnih sevov probiotičnih bakterij znotraj DC različno. Ker je bilo odprtih veliko vprašanj o sami izvedbi poskusa, smo se odločili najprej preizkusiti sev LK7. Pri tem je bilo potrebno proučiti rast in diferenciacijo celic H4-1 na vložnih filtrih, saj se celice na poroznih filtrih obnašajo drugače kot v stekleničkah. Zelo pomembna za ovrednotenje samega poskusa je določitev minimalne stopnje diferenciacije, ki je potrebna, da celice tvorijo tesne stike in tako ne prepuščajo več bakterij preko porozne membrane. Z aparatom ImageStream^X smo proučevali tudi vpliv ActA na aktivacijo kinaz p38 in ERK1/2 v DC, pri čemer je bilo potrebno preveriti tudi vpliv ActA na

transepitelno električno upornost (angl. *transepithelial electrical resistance* (TEER)) epitelnih celic H4-1.

3.5.1 *In vitro* model črevesnega epitelijskega

Shema modela črevesnega epitelijskega je prikazana na Sliki 5. Na zgornjo stran poroznega filtra smo nasadili celično linijo H4-1. Celična linija H4-1 predstavlja enterocite tankega črevesa.



Slika 5: Shematski prikaz uporabljenega 3D modela črevesnega epitelijskega. Dendritične celice lahko prevzemajo testirani probiotični sev preko sloja H4-1 epiteljskih celic in jih prenašajo na bazolateralno stran. Izražanje tesnih stikov (modra) omogoča dendritičnim celicam ohranitev integritete enosloja.

Figure 5: Schematic presentation of used 3D model of intestinal epithelium. Dendritic cells can take the tested probiotic strain across monolayer of H4-1 epithelial cells. Expression of tight junctions (blue) enables dendritic cells to maintain monolayer integrity.

Celice po nasaditvi sprva rastejo kot enosloj. Po dosegu konfluentnosti se začnejo diferencirati v celice, podobne absorpcijskim enterocitom, ki izražajo lastnosti epiteljskih celic tankega črevesa. Ker postane enosloj električno aktiven šele po vzpostavitvi tesnih stikov, lahko z merjenjem TEER preverjamo stopnjo diferenciacije (Fantini, 1992). Po dosegu ustrezne TEER smo filtre obrnili in na bazolateralno stran epiteljskega sloja nasadili nDC, izolirane iz monocitov periferne krvi zdravih prostovoljcev. Po treh urah inkubacije smo filtre zopet obrnili ter na zgornjo stran dodali različne seve probiotičnih bakterij. Na ta način smo v *in vitro* pogojih simulirali črevesni epitelij.

3.5.2 Celična linija H4-1 in gojenje celic

Celična linija H4 je bila pridobljena iz tankega črevesa 20 tednov starega zarodka. Celice imajo v *in vitro* pogojih lastnosti nezrelih človeških enterocitov (Nanthakumar in sod., 2000; Sanderson in sod., 1996). V laboratoriju Katedre za biologijo, mikrobiologijo, molekularno biologijo in biotehnologijo Univerze v Mariboru, so celično linijo H4 klonirali z metodo omejenega redčenja ter tako pridobili celično linijo H4-1 (Cencič in Langerholc, 2010). Za razliko od celic H4, so celice H4-1 sposobne diferenciacije in tvorbe TEER. Celice H4-1 niso kancerogenega izvora in predstavljajo dobro alternativo celični liniji Caco-2. Poleg tega je TEER, ki jo dosegajo, bližje fiziološkim vrednostim, kakor pri celicah Caco-2 (Langerholc in sod., 2011).

Celice H4-1 smo običajno gojili v gojišču DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) z izboljšano formulacijo DMEM Advanced (Gibco, 12491), pri kateri je potrebno gojišču dodati manj seruma govejega zarodka (FBS). Že pripravljenemu gojišču DMEM Advanced smo dodali penicilin (100 IE/ml; Sigma, P3032), streptomycin (1 mg/ml; Sigma, S9137) in L-glutamin (2 mM; Sigma, G1326). Takšno gojišče smo označili z DMEM^{-FBS}. Pred uporabo smo gojišču dodali še toplotno dezaktiviran FBS (Gibco, ZDA 10500) v končni koncentraciji 5 % (v/v) – DMEM^K. Gojišče z L-glutaminom in FBS (brez antibiotikov) smo označili z DMEM^{ATB}.

Delo s celičnimi kulturami je vedno potekalo v sterilnih pogojih, v brezprašni komori (laminar). Celice H4-1 smo gojili v stekleničkah s površino dna 25 cm² (Costar Corning, ZDA). Vzdrževali smo jih v DMEM^K gojišču pri fizioloških pogojih (v inkubatorju pri 37 °C v aerobnih razmerah s 5 % CO₂ in nasičeno vodno paro). Gojišče smo menjali 3-krat tedensko. Morfologijo in preraščenost celic v stekleničkah smo spremljali z opazovanjem pod svetlobnim mikroskopom. Ko so celice postale konfluentne, smo jih presadili. Celice smo najprej sprali z 2 ml 0,25 % raztopine tripsina-EDTA. Celice smo nato prekrili s tripsin-EDTA ter inkubirali 10 minut pri fizioloških pogojih, da so se celice odlepili od podlage. Odlepljene celice smo resuspendirali v 5 ml DMEM^{-FBS}, celotno vsebino prenesli v centrifugirko ter centrifugirali 5 minut pri 22 °C in pri 120 x g. Supernatant smo odlili, pelet pa resuspendirali v 10 ml DMEM^{-FBS}. V primeru, ko smo celice potrebovali za nasaditev na filtre, smo celice prešteli s hemocitometrom ter 2 ml suspenzije (petino celic) vrnili v gojitveno posodico in dodali 8 ml DMEM^K.

3.5.3 Gojenje H4-1 na poroznih filtrih in spremljanje transepitelne električne upornosti (TEER)

Celice H4-1 smo gojili v stekleničkah s površino 25 cm². Ko so celice prerasle površino, smo jih tripsinizirali ter prešteli s hemocitometrom.

V poskusu smo uporabljali dve vrsti poliestrskih filtrov Transwell (Costar Corning, ZDA): 6,5 mm široke z 0,33 cm² gojitvene površine (velikost por: 3 μm; kat. št.: 3472), vstavljene v gojitveno ploščo s 24-imi vdolbinicami in 12 mm široke z 1,12 cm² gojitvene površine (velikost por: 0,4 μm; kat. št.: 3460), vstavljene v gojitveno ploščo z 12-imi vdolbinicami. V ploščo s 24-imi vdolbinicami smo vstavili 12 filtrov premera 6,5 mm. Spodaj smo dodali 600 μl DMEM^K, zgoraj pa smo na vsak filter nasadili 5 x 10⁴ celic H4-1 (v 100 μl DMEM^K). Pri gojenju na filtrih premera 12 mm smo spodaj dodali 1,5 ml DMEM^K, zgoraj pa 1 x 10⁶ celic H4-1 (v 0,5 ml DMEM^K). Velikost por na 6,5 mm filtrih je onemogočala jasno sliko pod svetlobnim mikroskopom, zato je bilo merjenje TEER edini pokazatelj rasti in diferenciacije celic. Vsake 3 dni smo celicam zamenjali medij tako, da smo odvzeli medij najprej spodaj in nato še zgoraj. Svež medij smo dodali v obratnem vrstnem redu. Po sedmih dneh gojenja smo začeli vsakodnevno meriti TEER.

Integriteto oz. transepitelno električno upornost (TEER) celic, ki so rasle na poroznem filtru, smo merili z Millicell-ERS Volt/Ohm metrom (EMD Millipore, ZDA) in pripadajočim parom elektrod. Pred pričetkom merjenja smo zamenjali medij (DMEM^K) na obeh straneh filtrov. Nato smo eno elektrodo pomočili v gojišče nad filtrom s plastjo celic, drugo pa v gojišče v predel pod filtrom ter merili upornost celične plasti oz. razliko v napetosti med apikalno (zgornjo) in bazolateralno (spodnjo) površino celic. Upornost smo izračunali po enačbi (1):

$$R[\Omega * cm^2] = (Rv - Rf)[\Omega] * P[cm^2] \quad \dots(1)$$

pri čemer je R – upornost celic, Rv – izmerjena upornost celic in filtra, Rf – upornost filtra brez celic in P – površina filtra.

3.5.4 Določitev minimalne TEER celic za nepropustnost bakterij

Za določitev minimalne TEER, ki je potrebna, da bakterije spontano ne prehajajo preko sloja epitelnih celic, smo uporabili 12 filtrov premera 6,5 mm. Celice H4-1 smo gojili na filtrih 12 dni in nato obe strani membrane sprali z DMEM^{ATB} ter izmerili začetni TEER. Nato smo membrane še dvakrat sprali z DMEM^{ATB}. Na apikalno stran smo dodali 2 x 10⁶

KE prekonočne kulture LK7 v 100 μ l DMEM^{ATB} in na bazolateralno stran 600 μ l DMEM^{ATB}. Po treh urah inkubacije pri fizioloških pogojih smo apikalno stran sprali s PBS in celice inkubirali še nadaljnjih 15 ur (skupaj 18 ur). Zatem smo spodnji medij razmazali na trdno gojišče MRS (Merck, 1.10660) ter inkubirali pri 37 °C v anaerobnih pogojih. Po 72-ih urah smo prešteli zrasle kolonije.

3.5.5 Vpliv ActA na rast in diferenciacijo celic H4-1 na filtrih s porami premera 0,4 μ m

Za opredelitev vpliva ActA na TEER smo uporabili 8 filtrov premera 12 mm. Po 12-ih dneh gojenja celic H4-1 smo v medij na bazolateralni strani epitelija dodali ActA v končni koncentraciji 100 ng/ml (Sigma, SRP3003). Morfologijo in preraščenost celic na filtrih smo spremljali z opazovanjem pod svetlobnim mikroskopom. TEER smo 8 ur merili na vsake dve uri ter še po 24-ih in 30-ih urah.

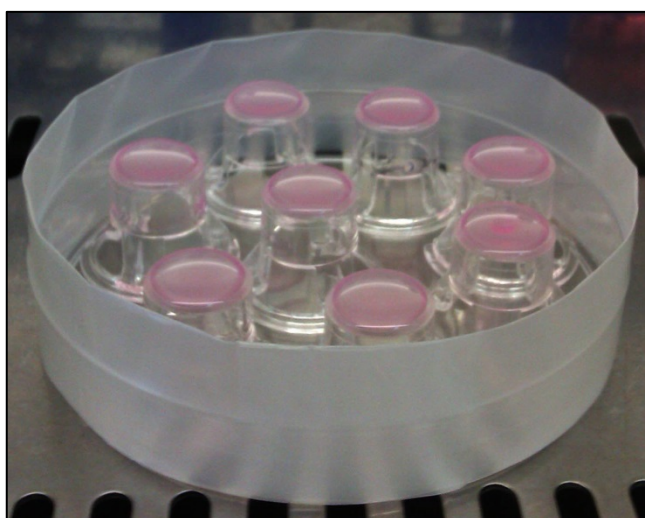
3.5.6 Priprava nezrelih dendritičnih celic (nDC)

nDC iz krvi zdravih prostovoljcev so pripravili na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino (ZTM, doc. dr. Urban Švajger) po standardnem protokolu opisanem v Švajger in sod. (2011). Če povzamemo, so v skladu s smernicami ZTM iz venske krvi zdravih prostovoljcev pridobili zgoščeno levkocitno plast (angl. *buffy coat*), iz katere so izolirali enojedrne celice periferne krvi (angl. *peripheral blood mononuclear cells* (PBMC)). Iz PBMC so z magnetno ločbo izolirali CD14 pozitivne celice, ki so jih nato gojili ob prisotnosti IL-4 ter granulocitne in makrofagne kolonije stimulirajočega dejavnika (angl. *colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage) – CSF2*). Po petih dneh so nDC predstavljale nepritrjeno frakcijo. Nepritrjene celice so suspendirali v zamrzovalnem mediju, razdelili po 1 ml v ohlajene zamrzovalne ampule in postopoma ohladili do temperature tekočega dušika (-196 °C).

Na dan poskusa smo celice delno odtalili na vodni kopeli (37 °C) ter sterilno prenesli v centrifugirko, hlajeno na ledu. Po kapljicah smo med rahlim mešanjem dodali 20 ml ohlajenega medija RPMI (Sigma, R8758) z dodanim 10 % FBS - RPMI^K (brez dodanih antibiotikov). Celice smo centrifugirali na 120 x g pri sobni temperaturi. Pelet smo nato resuspendirali v 2 ml RPMI^K, ogretega na sobno temperaturo. Resuspendirane celice smo pustili počivati eno uro pri sobni temperaturi. Zatem smo celice prešteli na hemocitometru in pripravili ustrezno koncentracijo živih nDC v RPMI^K.

3.5.7 Priprava 3D modela črevesnega epitelija

Priprava 3D modela je potekala po prirejenem protokolu Mileti in sod. (2009). Ko so celice dosegle ustrezno TEER, smo naslednji dan odmrznili nDC (poglavje 3.5.6) in pripravili 3D model črevesnega epitelija. Iz vdolbinic smo najprej odvzeli medij (najprej spodaj, nato zgoraj). Zgornji del filtrov smo dvakrat sprali z DMEM^{-ATB}, spodnji pa z RPMI. S pinceto smo pobrali vstavljene filtre iz vdolbinic in jih obrnjene postavili v petrijevko z dvignjenim robom iz plasti parafilma. Na filter smo previdno dodali 70 μ l (v primeru 6,5 mm filtrov) oz. 200 μ l (v primeru 12 mm filtrov) suspenzije nDC (Slika 6). V obeh primerih smo dodali 3×10^5 nDC suspendiranih v RPMI^K. Ob obrnjene filtre smo dodali 5 ml DMEM, da se celice niso izsušile, petrijevko pokrili in 3 h inkubirali pri fizioloških pogojih.



Slika 6: Nasaditev nezrelh dendritičnih celic (nDC) na obrnjene filtre.

Figure 6: Seeding of immature dendritic cells (nDC) on inverted filter inserts.

Po treh urah smo medij previdno odvzeli s površine filtra, filtre zopet obrnili in vstavili v čiste vdolbinice. Tako pripravljen 3D model črevesnega epitelija smo uporabljali pri proučevanju prehajanja in preživetja bakterij skozi sloj epitelnih celic H4-1 in ugotavljanju vpliva ActA na aktivacijo kinaz p38 in ERK1/2.

3.5.8 Prehajanje bakterij LK7 skozi sloj epitelnih celic H4-1 in preživetje znotraj DC

Poskuse smo izvajali na filtrih premera 6,5 mm in s porami 3 μ m. Med pripravo modela (poglavje 3.5.7) smo prekonočno kulturo LK7 5 min centrifugirali pri 3500 x g pri 4 °C ter dvakrat sprali s PBS. Pelet smo resuspendirali v ustrezni količini DMEM^{-ATB}, da je bila koncentracija bakterij 3×10^8 KE/ml. Poskuse smo izvajali po naslednjih korakih:

1. Na apikalno stran 3D modela črevesnega epitelija smo dali 100 μl suspenzije bakterij, na bazolateralno stran pa 600 μl RPMI^K. Razmerje med bakterijami in nDC je tako znašalo 1:100.
2. Filtre smo inkubirali 2 h pri fizioloških pogojih.
3. Po dveh urah smo odvzeli medij na spodnji strani (vzorec ob času 0 – V_0).
4. Apikalno stran epitelija smo 3-krat sprali s PBS, da smo odstranili nepritrjene bakterije.
5. Na zgornjo stran smo dodali DMEM^{ATB}, na spodnjo pa RPMI^K. Pri filtrih, kjer so bile nasajene nDC, smo na obe strani dodali gentamicin v končni koncentraciji 100 $\mu\text{g/ml}$. Ker gentamicin ne prodira v celice, smo tako odstranili zunajcelične bakterije. Pri filtrih brez nDC (kontrolni) smo gentamicin dodali samo na zgornjo stran.
6. Filtre smo inkubirali eno uro pri fizioloških pogojih.
7. Po eni uri smo zgornji in spodnji medij z gentamicinom zamenjali z DMEM^{ATB} in RPMI^K ter vzorčili po treh, 18-ih in 24-ih urah (od časa 0) inkubacije pri fizioloških pogojih.
8. Po določenem času smo odvzeli spodnji medij (vzorec ob času X - V_x) ter zgornjo stran 3-krat sprali s PBS.
9. Spodnjo stran filtra in dno vdolbinice smo najprej sprali s 300 μl raztopine tripsin-EDTA in dodali k vzorcu V_x .
10. Na spodnjo stran smo dodali novih 300 μl tripsin-EDTA, inkubirali 5 min pri fizioloških pogojih, sprali in dodali k vzorcu V_x .
11. Vzorca V_0 in V_x smo centrifugirali pri 300 x g, dvakrat sprali s PBS in DC lizirali z dodatkom 100 μl Tritona X-100 (0,25 %) za pol ure.
12. Vseh 100 μl smo razmazali na trdno gojišče MRS ter inkubirali pri 37 °C v anaerobnih pogojih. Po 72-ih urah smo prešteli zrasle kolonije.

3.5.9 Vpliv probiotikov in ActA na aktivacijo kinaz p38 in ERK1/2 v DC

Poskuse smo izvajali na filtrnih filtrih premera 12 mm in s porami 0,4 μm . Glede na izkušnje iz prejšnjih poskusov smo se odločili za uporabo filtrov s porami 0,4, saj nam ti filtri omogočajo pregled celic pod svetlobnim mikroskopom, poleg tega smo na teh filtrih pričakovali boljšo rast celic H4-1. Med pripravo modela (poglavje 3.5.7) smo prekonočne kulture LK7, LGG in EcN 5 min centrifugirali pri 3500 x g pri 4 °C ter dvakrat sprali s PBS. Pelet smo resuspendirali v ustrezni količini DMEM^{ATB}, da je bila koncentracija bakterij $1,1 \times 10^8$ KE/ml. Kot pozitivno kontrolo smo pripravili raztopino lipopolisaharida (LPS) v DMEM^{ATB} v koncentraciji 10 $\mu\text{g/ml}$. Poskuse smo izvajali po naslednjih korakih:

1. Na apikalno stran 3D modela črevesnega epitelija smo dali 266 μl suspenzije bakterij ali raztopino LPS, na bazolateralno stran pa 800 μl RPMI^K ali pa RPMI^K z dodatkom ActA v končni koncentraciji 100 ng/ml. Razmerje med bakterijami in nDC je tako znašalo 1:100.
2. Filtre smo inkubirali 2 h pri fizioloških pogojih.
3. Po dveh urah smo odvzeli spodnji medij, v katerem so bile nepritrjene DC (Vzorec V₁).
4. Apikalni del epitelija smo dvakrat sprali s PBS.
5. Spodnjo stran filtra smo najprej sprali s 500 μl raztopine tripsin-EDTA, kar je predstavljalo prvi del vzorca V₂. Da bi preprečili nadaljnjo razgradnjo celic s tripsinom, smo v epice za vzorec V₂ predhodno dodali 200 μl RPMI^K.
6. Drugi del vzorca V₂ (frakcija pritrjenih DC) smo dobili tako, da smo na spodnjo stran dodali novih 500 μl tripsin-EDTA, inkubirali 5 min pri fizioloških pogojih, sprali in dodali k vzorcu V₂.
7. Vzorca V₁ in V₂ smo centrifugirali pri 300 x g in dvakrat sprali s PBS.
8. Vzorcem smo dodali 250 μl fiksacijskega pufra (4 % PFA v PBS).
9. Fiksacija je potekala 15 min pri sobni temperaturi.
10. Zatem smo dodali 500 μl PBS in centrifugirali pri 300 x g pri sobni temperaturi.
11. Fiksirane celice smo shranili v pufru za spiranje (pufer P1: 2 % FBS v PBS) pri 4 °C do barvanja z označenimi protitelesi.

3.5.9.1 Barvanje celic z označenimi protitelesi

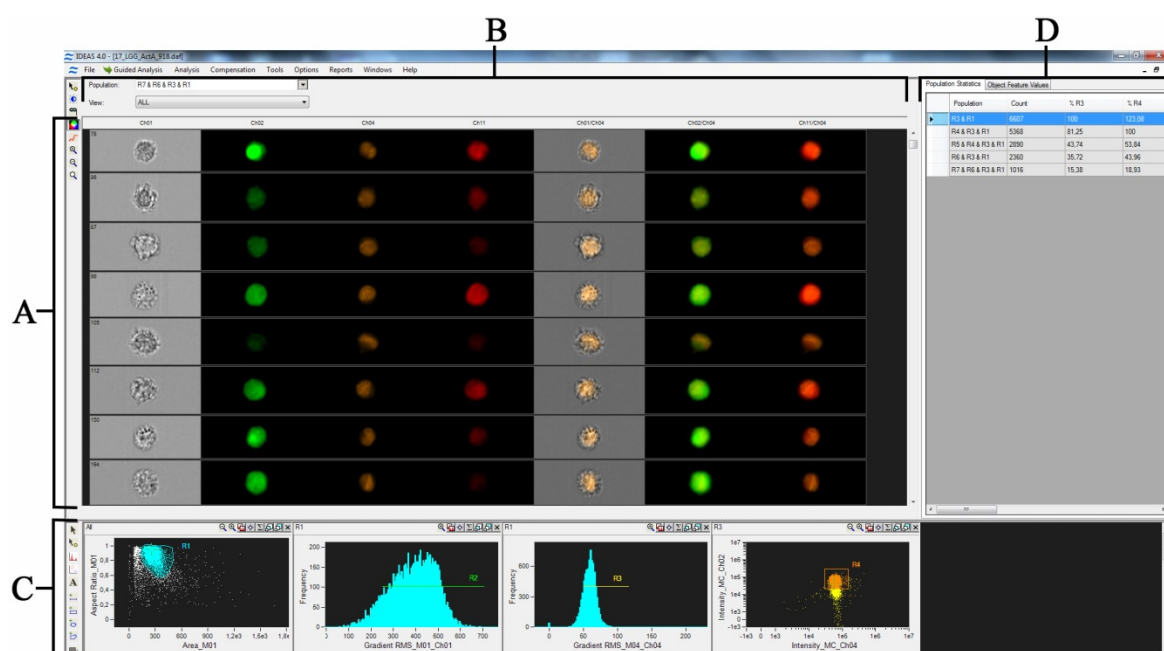
Prisotnost aktiviranih p38 in ERK1/2 smo detektirali z vezavo primarnih protiteles, specifičnih za fosforilirano obliko p38 in ERK1/2 (mišja anti-p-p38 IgG in kunčja anti-p-ERK1/2 IgG) in vezavo sekundarnih protiteles, specifičnih za mišja in kunčja protitelesa, konjugirana s fluorescein izotiocianatom – FITC (anti-mišja IgG-FITC) in s Cruzfluor-647 (anti-kunčja IgG-CFL 647). Jedra smo obarvali s 7-amino-aktinomycinom D (7AAD), ki se veže na nukleinske kisline. Postopek barvanja smo izvedli po naslednjih korakih:

1. Vzorce smo dobro premešali na vibracijskem mešalniku in prenesli v 5 ml polistirenske epruvete z okroglim dnom (Corning, 352054) ter 5 min centrifugirali pri 400 x g in 4 °C.
2. Pelet smo resuspendirali v 50 μl vsakega od ustrezno redčenih primarnih protiteles:
 - mišja anti-p-p38 IgG (Cell Signaling Technology, 9216), redčena v pufru za redčenje (pufer P2: 0,1 % Triton X-100 v pufru 1), v razmerju 1:800;
 - kunčja anti-p-ERK1/2 IgG (Cell Signaling Technology, 4370), redčena v pufru P2, v razmerju 1:200.
3. Vzorce smo inkubirali 30 min pri sobni temperaturi.

4. Nato smo dodali 2 ml pufra P2, premešali na vibracijskem mešalniku, centrifugirali pri 400 x g in 4 °C in zavrgli supernatant.
5. Pelet smo resuspendirali v 50 µl vsakega od ustrezno redčenih sekundarnih protiteles:
 - kozja anti-mišja IgG-FITC (Sigma, ZDA), redčena v pufu P2, v razmerju 1:200;
 - kozja anti-kunčja IgG-CFL 647 (Santa Cruz Biotechnology, ZDA), redčena v pufu P2, v razmerju 1:100.
6. Vzorce smo inkubirali 30 min v temi pri sobni temperaturi.
7. Nato smo dodali 2 ml pufra P1, premešali na vibracijskem mešalniku, centrifugirali pri 400 x g in 4 °C in zavrgli supernatant.
8. Na koncu smo pelet resuspendirali v 45 µl PBS. Deset minut pred analizo smo vzorcu dodali 10 µl 7-amino-aktinomicina D (7AAD; Sigma, A9400) v koncentraciji 1 mg/ml.

3.5.9.2 Analiza celic z aparatom ImageStream^X

ImageStream^X (ImS; Amnis, ZDA) je v osnovi pretočni citometer, ki omogoča tudi posnetke posameznih celic s 40-kratno povečavo na podlagi svelobnega in laserskega mikroskopa (vzbujanje s 488 nm in 658 nm laserjem). Za razliko od pretočne citometrije se pri ImS podatki zbirajo kot slike (Slika 7 A), ki si jih lahko predstavljamo kot dvodimenzionalne prostorske mreže, pri katerih tretjo dimenzijo predstavlja intenziteta zajetega signala za vsako točko (McGrath in sod., 2008). Slike se zajemajo s 40-kratno povečavo, kar omogoča analizo na podcelični ravni. Posebna lastnost ImS analize je, da s kombiniranjem različnih spremenljivk, kot so velikost, oblika, tekstura ter intenziteta signala svetlega polja in fluorescence, lahko ločimo različne populacije celic (Slika 7 B). V primerjavi s pretočno citometrijo je prednost ImS, da iz slik lahko določimo lokacijo fluorescenčnega barvila in s tem lahko izločimo lažno pozitivne rezultate (npr. barvilo zunaj celic). V primerjavi s fluorescenčnim mikroskopiranjem, ImS omogoča statistično bolj opredeljive rezultate, saj lahko posnamemo do 1000 celic/s oziroma več deset tisoč celic na vzorec (Barteneva in sod., 2012).



Slika 7: Osnovni pogled programa IDEAS 4.0. (A) galerija slik posameznih celic, kjer je vsaka celica v svoji vrstici. (B) Vsaka celica je posneta na več načinov. Navpično so prikazani različni kanali in njihove kombinacije. stolpec 1 – svetlo polje, stolpec 2 – p-p38-FITC; stolpec 3 – 7AAD, stolpec 4 – p-ERK1/2-CFL 647, stolpec 5 – kombinacija svetlega polja in 7AAD, stolpec 6 – kombinacija p-p38-FITC in 7AAD, stolpec 7 – kombinacija p-ERK1/2-CFL 647 in 7AAD. (C) grafična analiza populacij celic (podrobneje na Sliki 8). (D) podokno za statistično analizo.

Figure 7: Basic view of the program IDEAS 4.0. (A) image gallery of individual cells, where each cell is in each row. (B) Each cell is recorded in several ways. Different channels and their combinations are shown vertically: Column 1 – bright field, column 2 - p-p38-FITC, column 3 - 7AAD, column 4 - p-ERK1/2-CFL 647, column 5 - a combination of a bright field, and 7AAD, column 6 - a combination of p-p38-FITC and 7AAD, column 7 - a combination p-ERK1/2-CFL 647 and 7AAD. (C) graphical analysis of cell populations (for details see Figure 8). (D) statistical analysis panel.

Prisotnost aktiviranih p38 smo detektirali s 488 nm vzbujevalnim laserjem in emisijskim filtrom pri 480-560 nm (kanal 2), jedro DNA z emisijskim filtrom 595-660 nm (kanal 4) ter p-ERK1/2 s 658 nm vzbujevalnim laserjem in emisijskim filtrom pri 660-740 nm (kanal 11).

Analiza s programsko opremo, ki je bila razvita za obdelavo podatkov, zajetih z ImS (*Image Data Exploration Analysis Software* - IDEAS), je osnovana na določitvi dvodimenzionalnih področij (»maskiranja«) znotraj posameznih slik celic. Osnova za določeno »masko« so ostre spremembe intenzitet na sliki, zajeti na določenem kanalu. Zaradi razlike v intenziteti med obarvanim jedrom in citosolom lahko »maskiramo« npr. jedro. Takšna maska pa je potem lahko osnova za analizo prisotnosti določenega označevalca v jedru. To nam omogoča vrsto specifičnih analiz, med drugim tudi analizo podcelične lokalizacije določenega označevalca, razlik v morfologiji celic in organelov ter

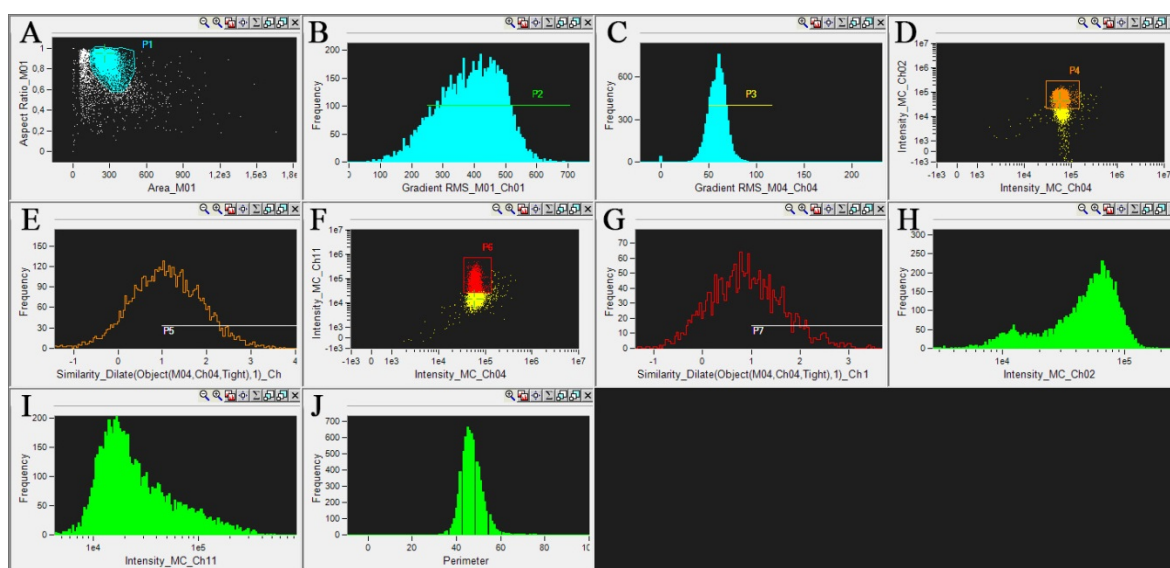
endocitozo označenih delcev. Pogovorno okno programa IDEAS je sestavljeno iz treh sklopov, ki so medsebojno povezani (Slika 7). Galerija slik, ki so bile posnete na različnih kanalih, je interaktivno povezana z grafično analizo populacij, kjer lahko za vsako od slik vidimo njen položaj na določenem grafu in obratno, za vsako točko na grafu lahko pogledamo posneto sliko. Statistično poročilo se sprotno prilagaja izbrani populaciji.

Z ImS smo analizirali do 10000 celic oziroma celoten vzorec, če je bilo celic manj. Analizirali smo sledeče parametre:

- povprečna intenziteta p-p38 in p-ERK1/2;
- indeks premestitve (IP) p-p38 in p-ERK1/2 v jedro (srednja vrednost logaritemsko transformiranega Pearsoovega koeficienta korelacije – merilo za stopnjo, do katere sta dve sliki linearno povezani; večji IP – večja stopnja premestitve v jedro);
- perimeter (premer med robom celice in koncem izrastkov – razraščenost celice).

Potek analize s programom IDEAS 4.0.735 je prikazan na Sliki 8. Analiza je potekala po sledečem vrsten redu in hierarhiji:

- določitev populacije celic, ki so pretežno okrogle oblike, in po 1 celica na sliko – populacija P1;
- določitev populacije celic iz populacije P1, ki so izostrene v svetlem polju – populacija P2;
- določitev populacije celic iz populacije P2, ki so izostrene na jedro – populacija P3;
- določitev populacije celic iz populacije P3, ki imajo zadostno obarvana jedra in zadosten signal za p-p38 – populacija P4;
- določitev populacije celic iz populacije P4, kjer je prišlo do premestitve p-p38 v jedro (populacija P5) – osnova za izračun IP_{p-p38} ;
- določitev populacije celic iz populacije P3, ki ima zadostno obarvana jedra in zadosten signal za p-ERK1/2 – populacija P6;
- določitev populacije celic iz populacije P6, kjer je prišlo do premestitve p-ERK1/2 v jedro (populacija P7) – osnova za izračun $IP_{p-ERK1/2}$;
- izris grafa frekvence intenzitete p-p38 pri populaciji P3 (služi za izračun povprečne intenzitete signala za p-p38);
- izris grafa frekvence intenzitete p-ERK1/2 pri populaciji P3 (služi za izračun povprečne intenzitete signala za p-ERK1/2);
- izris grafa frekvence perimetra pri populaciji P3 (služi za izračun povprečnega perimetra).



Slika 8: Potek analize s programom IDEAS 4.0. (A) izbira populacije, ki predstavlja samo enojne sorazmerno okrogle celice – populacija P1. (B) določitev populacije celic iz populacije P1, ki so izostrene v svetlem polju – populacija P2. (C) določitev populacije celic iz populacije P2, ki so izostrene na jedro – populacija P3 (D) določitev populacije celic iz populacije P3, ki imajo zadostno obarvana jedra in zadosten signal za p-p38 – populacija P4. (E) določitev populacije celic iz populacije P4, kjer je prišlo do premestitve p-p38 v jedro (populacija P5) – osnova za izračun IP_{p-p38} . (F) določitev populacije celic iz populacije P3, ki ima zadostno obarvana jedra in zadosten signal za p-ERK1/2 – populacija P6. (G) določitev populacije celic iz populacije P6, kjer je prišlo do premestitve p-ERK1/2 v jedro (populacija P7) – osnova za izračun $IP_{p-ERK1/2}$. (H) graf frekvence intenzitete p-p38 pri populaciji P3 (služi za izračun povprečne intenzitete signala za p-p38). (I) graf frekvence intenzitete p-ERK1/2 pri populaciji P3 (služi za izračun povprečne intenzitete signala za p-ERK1/2). (J) grafa frekvence perimetra pri populaciji P3 (služi za izračun povprečnega perimetra).

Figure 8: Analysis with IDEAS 4.0 program. (A) selection of the population, which represents single and relatively round cells – population P1. (B) determination of cell population from a population of P1, which are focused on bright field – population P2. (C) determination of cell population from a population of P2, which are focused on nucleus – population P3. (D) determination of the cell population from a population of P3, which have sufficiently stained nucleus and sufficient signal for p-p38 (population P4) – the basis for the IP_{p-p38} calculation. (E) determination of the cell population from a population of P4, where the nuclear translocation of p-p38 occurred – population P5. (F) determination of the cell population from a population of P3, which have sufficiently stained nucleus and sufficient signal for p-ERK1/2 – population P6. (G) determination of the cell population from a population of P6, where the nuclear translocation of p-ERK1/2 occurred (population P7) – the basis for $IP_{p-ERK1/2}$ calculation. (H) frequency graph of the intensity of signal for p-p38 in a population of P3 (used to calculate the average signal intensity for p-p38). (I) frequency graph of the intensity of signal for p-ERK1/2 in a population of P3 (used to calculate the average signal intensity for p-ERK1/2). (J) frequency graph of the perimeter of the cells in a population of P3 (used to calculate the average perimeter of cells).

3.5.10 Prikaz in statistična obdelava podatkov

Rezultate smo analizirali s programom IDEAS 4.0.735 (Amnis, ZDA) in SigmaPlot 11.0 (Systat Software, Nemčija). Prikaz dobljenih rezultatov v obliki grafov in statistično analizo smo izvedli s programom SigmaPlot. Zaradi majhnega števila ponovitev na skupino (2-4), nenormalne porazdelitve (test normalne porazdelitve po metodi Kolmogorov-Smirnov) in nehomogenosti varianc (test homogenosti varianc po metodi Levene-Median), smo običajno izvedli neparametrično analizo varianc (ANOVA) na rangih po metodi Kruskal-Wallis. Statistično značilne razlike med posameznimi skupinami smo nato ugotavljali s testom mnogoterih primerjav po Dunn-u.

Pri primerjavi aktivacije p38 in ERK1/2 med pritrjenimi in odlepljenimi DC (poglavje 4.3.2.3) smo podatke iz skupine, stimulirane z ActA, in kontrolne skupine (RPMI) združili, kar nam je omogočilo uporabo enosmerne ANOVA in testa mnogoterih primerjav po metodi Holm-Sidak. V vseh primerih so bile p-vrednosti, manjše od 0,05, opredeljene kot statistično značilne.

3.6 VPLIV PROBIOTIKOV LK7 IN LGG NA MIKROBIOTO MEZENTERIČNIH VOZLOV, MLEČNE ŽLEZE IN MLEKA MIŠI LINIJE FVB/NHAN/HSD

Poskus na miših je potekal v prostorih Centra za laboratorijske živali na Katedri za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo, na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete. Veterinarska uprava republike Slovenije (VURS) je dne 27.5.2011 izdala dovoljenje za izvajanje poskusov na živalih, številka 34401-17/2011/5, z veljavnostjo treh let.

3.6.1 Nastanitev in oskrba živali

V poskusih smo uporabljali miši specifičnih patogenov proste (SPF; angl. *specific pathogen free*) inbridirane linije FVB/NHanHsd, ki smo jih naročali v vzrejnem centru Harlan (Italija). Ob prihodu smo v karanteni nastanili po 5 samic v večje individualno prezračevane kletke (IVC, angl. *individually ventilated cage*) za podgane (904 cm² talne površine; Techniplast, Italija). Kletke IVC predstavljajo samostojno mikrobiološko enoto s svojimi individualnimi filtri, kamor je preko prezračevalne naprave dovajan filtriran zrak (preko filtrov HEPA). Samce smo nastanili posamično v manjše IVC kletke za miši (501 cm² talne površine). Vsako žival smo ustrezno označili z ušesno ščipalko, da smo lahko tekom poskusa identificirali posamezno žival. V kletke smo dali gnezditveno mrežo, ki se običajno uporablja za privajanje živali na metabolne kletke (Techniplast, Italija). Mrežo smo prekrili z mešanico stelje iz lesenih opilkov (Lignocel, 3/4) in peletov iz koruznih storžev (Rehofix, MK2000) ter v kletko dodali še mišjo hiško (angl. *mouse house*; Techniplast, Italija), kateri smo dno prelepili z rdečim plastificiranim kartonom. V kletko smo dodali še bombažno blazinico (Plexx, 14010), ki mišim omogoča izdelavo gnezda. Živalim v karanteni smo postopoma, vsake 3 dni, odvzeli določen del stelje in jih s tem privajali na življenje na mrežah. Po 14-ih dneh v karanteni smo živali preselili v kolonijo in pričeli s parjenjem (Slika 9).

Dnevno smo živali pregledali in poskrbeli, da so imele na voljo zadostno količino (*ad libitum*) peletirane krme (Altromin, #1324) v krmilniku in vode v napajalniku. V karanteni in koloniji smo imeli 12-urni svetlobni cikel, 21-22 °C in 50-70 % relativno zračno vlago. Enkrat tedensko smo opravili menjavo kletk v posebni brezprašni komori in kletke očistili s pranjem in kemično sterilizacijo. Živali smo v času privajanja tehtali 3-krat tedensko, v času poskusa pa vsak dan. Zdravstveno stanje živali smo preverjali s tehtanjem ter opazovanjem njihovega izgleda in obnašanja (gladka in svetleča dlaka, odziv na dražljaje, živahnost). Nobena žival ni poginila pred načrtovanim žrtvovanjem. Odstranjevanje trupel

poskusnih živali je bilo izvedeno v skladu s predpisi, ki določajo pogoje o načinu neškodljivega odstranjevanja trupel in odpadkov živalskega izvora.



Slika 9: Življenjski prostor poskusnih živali po 14-ih dneh privajanja. Kletke so vsebovale mešanico lesene in peletirane stelje, na katero smo položili gnezditveno mrežo. Dno mišje hiške smo zaprli z rdečim plastificiranim kartonom in jo s ščipalko za perilo pričvrstili na gnezditveno mrežo. Vanjo smo položili bombažno blazinico, ki mišim omogoča izdelavo gnezda.

Figure 9: Living space of experimental animals after 14 days of habituation. Cages contained a mixture of wooden and pelleted bedding on which breeding net was laid. Bottom of the mouse house was closed with red plasticized cardboard, and fixed on the breeding net with clothes-peg. To allow the creation of mice nests, a cotton pad was placed into mouse house.

3.6.2 Parjenje živali

Prvi ponedeljek po prenosu živali v kolonijo smo pričeli s parjenjem. Ker je bil celotni potek poskusa (termini žrtvovanj) odvisen od pričetka brejosti, smo vedno parili od ponedeljka do srede. Parili smo po dve samici z enim samcem. V torek in sredo zjutraj smo samice pregledovali za prisotnost vaginalnega čepa. Pojav vaginalnega čepa sicer ne pomeni uspešne oploditve, ampak zgolj da je prišlo do kopulacije. Brejost živali smo lahko glede na njeno maso in izgled potrdili šele 10. – 12. dan po pojavu čepa. V sredo smo samce in samice ločili in samice brez čepa ponovno parili naslednji ponedeljek. Pri naslednjem parjenju smo uporabili uspešnejše samce. Za en poskus smo parjenje ponovili trikrat. Na dan pojava čepa smo samico nastanili v svežo kletko in ji pripisali poskusno številko.

3.6.3 Potek in izvedba poskusa

Zaradi zapletenosti poskusa, ki je zahteval veliko priprav in dela, smo se odločili, da poskus izvedemo v več sklopih, s po 24 brejih živali. V prvem poskusu smo potencialno breje živali naključno razdelili v 3 skupine in jih žrtvovali ob štirih različnih terminih, kar je pomenilo 2 živali na skupino. Glede na dobljene rezultate iz prvega poskusa in časovni okvir doktorske naloge, smo v drugem poskusu živali žrtvovali samo dvakrat, zato smo imeli po 4 živali na skupino.

Živali so imele tekom poskusov na voljo običajno krmo za laboratorijske glodalce. Živali smo naključno razdelili v 3 skupine:

- Skupina N: kontrolna skupina, kateri smo od 7. dneva brejosti dalje vsakodnevno z orogastrično sondo aplicirali rekonstituirano mleko.
- Skupina G: od 7. dneva brejosti dalje smo živalim vsakodnevno z orogastrično sondo aplicirali 200 μ l suspenzije bakterij LGG ($4,1 \times 10^8$ KE) v rekonstituiranem mleku.
- Skupina K: od 7. dneva brejosti dalje smo živalim vsakodnevno z orogastrično sondo aplicirali 200 μ l suspenzije bakterij LK7 ($3,6 \times 10^8$ KE) v rekonstituiranem mleku.

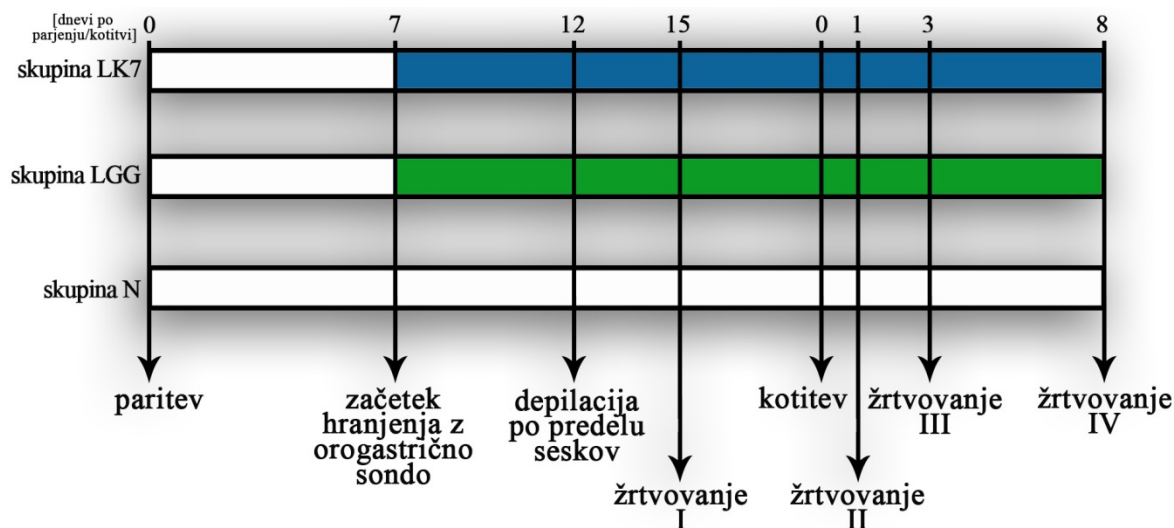
Živali smo označili po enačbi XN_1/N_2 , pri čemer:

- X predstavlja oznako skupine (N, G ali K),
- N_1 predstavlja dan žrtvovanja (1 – 15. dan po paritvi, 2 – dan po kotitvi, 3 – 3. dan po kotitvi, 4 – 8. dan po kotitvi)
- N_2 predstavlja številko paralelke.

Tako je bil na primer vzorec z oznako K3/4 odvzet četrti živali, ki je od 7. dneva brejosti dalje vsakodnevno prejela LK7^R in je bila žrtvovana 3. dan po kotitvi.

Shematski prikaz prvega poskusa je prikazan na Sliki 10. V prvem poskusu smo po treh parjenjih pridobili 22 brejih miši. Ker pojav vaginalnega čepa ne pomeni uspešne oploditve, je prišlo do razlik v številu živali po skupinah. Sedmi dan smo živalim glede na skupino začeli vsakodnevno z orogastrično sondo aplicirali 200 μ l skupini primerne pripravka. Dvanajsti dan smo živali depilirali po predelu seskov in trebuha z namenom zmanjšanja možnosti kontaminacije pri odvzemanju vzorcev mleka. Po dve živali (kjer je bilo to mogoče) iz vsake skupine smo s cervikalno dislokacijo žrtvovali 15. dan po paritvi ter 1., 3. in 8. dan po kotitvi. V brezprašni komori smo pod sterilnimi pogoji odvzeli vzorce krvi, mlečne žleze, vranice, ledvice, jeter ter aksilarnih in mezenteričnih limfnih vozlov. Tretji in osmi dan po kotitvi smo pred žrtvovanjem odvzeli vzorce mleka.

V drugem poskusu smo po treh parjenjih pridobili 25 brejih miši. Glede na rezultate iz prvega poskusa smo pri drugem žrtvovali po 4 živali iz vsake skupine tretji in osmi dan po kotitvi. Odvzeli smo vzorce krvi, mleka, mlečne žleze ter aksilarnih in mezenteričnih limfnih vozlov.



Slika 10: Shematski prikaz prvega poskusa.

Figure 10: Schematic view of first set of experiment.

3.6.3.1 Priprava probiotičnih pripravkov in hranjenje z orogastrično sondo

Za kontrolno skupino smo po 500 μ l rekonstituiranega mleka razdelili v posamezne mikrocentrifugirke. Bakterije sevov LGG in LK7^R smo pripravili kot je opisano v poglavju 3.3. Tako pripravljeno prekonozno kulturo (10 ml) smo 5 min centrifugirali pri 3500 x g pri 4 °C, dvakrat sprali s PBS, pelet resuspendirali v 2 ml rekonstituiranega mleka ter po 500 μ l razdelili v posamezne mikrocentrifugirke. Pripravke smo hranili v hladilniku, pri 4°C in največ teden dni.

Prvi in sedmi dan hranjenja pripravka v hladilniku smo suspenzijo nacepljali na gojišče MRS, da smo preverjali število KE/mL. V poskusu smo aplicirali v povprečju $4,1 \times 10^8$ KE bakterij LGG/žival/dan in $3,6 \times 10^8$ KE bakterij LK7^R/žival/dan.

Za oralno aplikacijo smo uporabljali ravne orogastrične sonde velikosti 1,4 x 38 mm, 20G (Eickemeyer, 405820). Za vsako skupino smo imeli 2 orogastrični sondi. Vedno smo uporabljali isti par sond za isto skupino. Pred aplikacijo smo pripravek ogreli na sobno temperaturo in dobro premešali. Nato smo žival fiksirali ter sondo usmerili na koren jezika

ter tako izzvali požiralni refleks. Počasi smo aplicirali 200 μ l suspenzije ter pazili, da pri aplikaciji nismo čutili nobenega odpora. Po končanem postopku smo sondo najprej dobro sprali s toplo vodo in etanolom ter sterilizirali v sterilizatorju na steklene kroglice (Germinator 500, CellPoint Scientific, ZDA).

3.6.3.2 Uporaba inhalacijske anestezije

Pred depilacijo po predelu seskov in trebuha, odvzemu vzorcev mleka ter žrtvovanjem smo živali anestezirali z inhalacijskim anestetikom. Aparatura za anestezijo (Harvard Aparatus, ZDA) je bila sestavljena iz rotametra za merjenje pretoka O_2 in N_2O , hlapilnik za dodajanje utekočinjenega hlapnega anestetika, anestezijskih mask ter absorpcijske posode za absorbiranje odvečnega anestetika. Kot prenašalni plin smo uporabljali mešanico O_2 in N_2O v razmerju 30 %/70 %. Za doseg globoke anestezije smo uporabljali 3 % izoflurana, za vzdrževanje pa 1,5 %. Celoten postopek smo izvajali v brezprašni komori na grelni blazini (Sanitas SHK18, Hans Dinslage, Nemčija), ki je preprečevala podhladitev. Pred pričetkom smo na hlapilniku nastavili ustrezno koncentracijo izoflurana (3 %). Kletko smo prenesli v brezprašno komoro, žival fiksirali in ji nastavili masko. Po dosegu globoke anestezije smo jo polegali na grelno blazino ter nastavili koncentracijo izoflurana na 1,5 %. Ves čas anestezije smo spremljali njeno dihanje in morebitne znake prebujanja. Po končanem posegu smo odstranili masko, žival položili nazaj v kletko in počakali, da se je prebudila.

3.6.3.3 Depilacija po predelu seskov in trebuha

Živali smo 12. dan depilirali po predelu seskov in trebuha, s čimer smo zmanjšali možnost kontaminacije pri odvzemu vzorcev mleka. S prstom smo razmazali depilacijsko kremo (Weet, Reckitt Benckiser, Velika Britanija) po predelu seskov in trebuha. Kremo smo pustili učinkovati 1 min in jo nato obrisali z mokro gazo, ki smo jo pomakali v mlačno vodo. Kožo smo nato obrisali do suhega in namazali s kremo Bepanthen (Bayer Pharma, Nemčija). Žival smo prestavili nazaj v kletko in jo opazovali do prebujenja.

3.6.4 Odvzem vzorcev

3.6.4.1 Odvzem vzorcev mleka

Vzorci mleka smo odvzeli 3. in 8. dan po kotitvi, neposredno pred žrtvovanjem. Pred samim odvzemom (6-8 ur) smo mladiče žrtvovali z dekapitacijo. Po 6-ih do 8-ih urah smo

samicam intraperitonealno aplicirali 150 μ l raztopine oksitocina (2 IU/žival) v PBS. Po 15-ih minutah smo samico anestezirali z inhalacijskim anestetikom. Celoten postopek odvzema vzorca mleka je bil izveden v brezprašni komori na grelni blazini. Samico smo najprej rahlo masirali po predelu seskov, da smo pospešili izločanje mleka. Predel seskov smo poškopili z dezinfekcijskim sredstvom (Octanisept, Schülke & Mayr, Nemčija) in prvo kapljico iz vsakega seska obrisali z blazinico, prepojeno z etanolom. Posamezne seske smo stiskali od korena proti vrhu in iztisnjene kapljice mleka s kapilarnim vlekrom posesali v sterilno stekleno Pasteurjevo pipeto (John Poulten, VB). Po končanem odvzemu smo mikrocentrifugirko z mlekom zamrznili v tekočem dušiku in nadaljevali z odvzemom vzorcev krvi.

3.6.4.2 Odvzem vzorcev krvi s kardialno punkcijo

Predel prsnega koša smo poškopili z dezinfekcijskim sredstvom ter s palcem in kazalcem privzdignili prsni koš tako, da je bila prsnica dobro vidna. Z iglo smo zabodli vodoravno cca. 0,5 cm globoko ter počasi vlekli. Ko smo pridobili dovolj krvi, smo žival žrtvovali s cervikalno dislokacijo in prenehali z dodajanjem anestetika. Na žival smo pridobili do 500 μ l krvi. Vzorec smo iz brizge prelili v mikrocentrifugirko, prevlečeno s heparinom, (Sarsted Multivette 600, 15.1673) in do analize (v roku treh ur) shranili v hladilniku pri 4 °C.

3.6.4.3 Raztelesenje in odvzem vzorcev tkiv

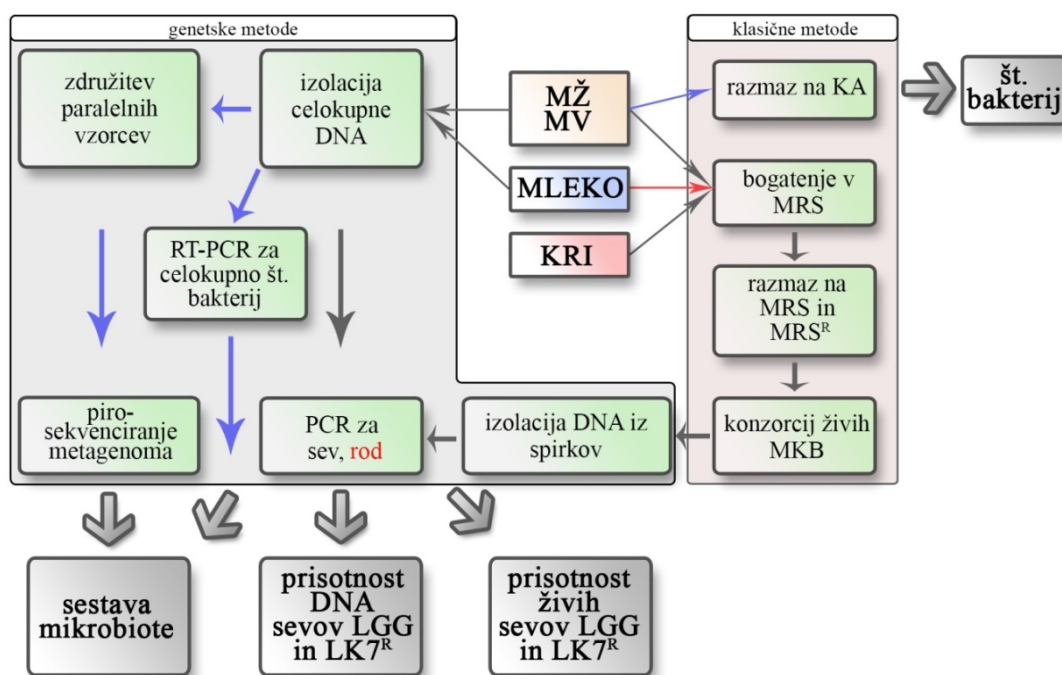
Po odvzemu krvi smo nadaljevali z raztelesenjem in odvzemom organov. Secirno orodje smo sproti čistili s toplo vodo in etanolom ter razkuževali v suhem sterilizatorju na steklene kroglice. Secirali smo v brezprašni komori na podlagi iz plute, prekriti s PVC vrečko, ki smo jo pred tem razkužili z etanolom. Po vsaki secirani živali smo PVC vrečko zamenjali in delovno površino dobro prebrisali z etanolom. Vse vzorce smo takoj prenesli v mikrocentrifugirko, zamrznili v tekočem dušiku ter kasneje prenesli v zamrzovalnik pri -70 °C.

Usmrčeno žival smo fiksirali v razkoračen položaj in dobro poškopili z etanolom. S škarjami smo prerezali kožo najprej po sredini trebuha proti vratu in nato prečno od središča proti vsaki od okončin. Kožo smo nežno povlekli na vsako stran in jo fiksirali na podlago. S čisto pinceto in škarjami smo najprej odvzeli axilarne limfne vozle in nato še vseh 5 parov mlečnih žlez, ki smo jih pred zamrzovanjem razrezali na manjše koščke. Žival smo zopet poškopili z etanolom, s čistim priborom odprli trebušno votlino in s čim manj premikanja črevesja izrezali vranico ter ledvico. Prebavno cev smo odrezali na

področju požiralnika (nekaj mm od želodca) in na področju danke, celotno črevesje potegnili iz trebušne votline in raztegnili tako, da sta bila danka in požiralnik dovolj oddaljena od mezenteričnih limfnih vozlov in da ni prišlo do kontaminacije mezenteričnih limfnih vozlov. S čistim priborom smo odvzeli mezenterične limfne vozle in košček jeter.

3.6.5 Analiza vzorcev

Vzorci smo analizirali s kombinacijo genetskih in klasičnih mikrobioloških metod. Glede na rezultate iz prvega poskusa smo pri analizi vzorcev iz drugega poskusa pri nekaterih postopkih uvedli spremembe in dopolnitve. Shematski prikaz poteka analiz v obeh poskusih je prikazan na Sliki 11.



Slika 11: Shematski prikaz poteka analiz vzorcev. Barva puščic označuje razlike med obema poskusoma: siva – postopki, izvedeni v obeh poskusih, rdeča – postopki, izvedeni samo v prvem poskusu, modra – postopki izvedeni samo v drugem poskusu. MŽ – mlečna žleza, MV – mezenterični limfni vozli, MKB – mlečnokislinske bakterije, LGG – *Lactobacillus rhamnosus* GG, LK7^R – sev *Lactobacillus gasseri* K7 odporen proti rifampicinu, PCR – verižna reakcija s polimerazo, KA – krvni agar, RT-PCR – PCR v realnem času, MRS^R – MRS z dodatkom rifampicina.

Figure 11: Schematic view of sample analysis workflow. Colour of arrows indicate the differences between the two sets of experiment: grey – procedures carried out in both sets, red – procedures carried out only in the first set, blue – procedures carried out only in the second set of the experiment. MŽ – mammary gland, MV – mesenteric lymph nodes, MKB – lactic acid bacteria, LGG – *Lactobacillus rhamnosus* GG, LK7^R – rifampicin resistant strain *Lactobacillus gasseri* K7, PCR – polymerase chain reaction, KA – blood agar, RT-PCR – real time PCR, MRS^R – MRS with addition of rifampicin.

3.6.5.1 Analiza vzorcev krvi

Heparinizirane vzorce krvi smo razdelili na tri dele. Del (100 μ l) smo odpipetirali v 900 μ l tekočega gojišča MRS in bogatili 24 ur pri 37 °C. Po 24-ih urah smo 100 μ l suspenzije razmazali na trdno gojišče MRS in trdno gojišče MRS^R ter po 72 urah zrasle kolonije sprali z gojišča z 2 ml PBS ter shranili pri -20 °C do izolacije DNA (poglavje 3.6.5.5). V primeru, da je izraslo zgolj nekaj kolonij (do 50), smo morfološko različne kolonije pobrali s sterilnim zobotrebcem in jih prenesli v 15 μ l 5 x Green GoTaq Flexi pufra. Mešanico smo nato 15 min inkubirali pri 99 °C ter zamrznili pri -20 °C do analize s PCR (poglavje 3.6.5.6), kjer smo tako prekuhano suspenzijo obravnavali kot izolirano DNA.

Preostali del krvi smo razdelili na polovico in eno polovico zamrznili v tekočem dušiku, drugo polovico pa 15 min centrifugirali pri 3000 x g pri 4 °C ter supernatant (krvna plazma) zamrznili v tekočem dušiku. Oba vzorca smo nato prenesli na -70 °C.

3.6.5.2 Analiza vzorcev mlečne žleze in mleka

Vzorce mlečne žleze smo odmrznili, stehali in prestavili v odrezano sterilno mikrocentrifugirko (12 ml, TPP, Švica). Nato smo dodali polovično količino PBS in ob hlajenju na ledu homogenizirali s paličnim homogenizatorjem (Ultra-turrax T8, Ika, Nemčija). Celoten postopek priprave vzorca smo izvajali ob ognju. Po homogenizaciji smo kovinski del paličnega homogenizatorja razstavili, sprali s curkom destilirane vode in očistili in nato splaknili še z etanolom. Kovinski del paličnega homogenizatorja smo potopili v 70 % etanol in homogenizator vključili za nekaj sekund. Postopek smo ponovili še s sterilnim PBS.

Po končani homogenizaciji smo 100 μ l homogenata odpipetirali v 900 μ l tekočega gojišča MRS in bogatili 24 ur pri 37 °C. Po 24-ih urah smo 100 μ l suspenzije razmazali na trdno gojišče MRS in trdno gojišče MRS^R. Po 72 urah inkubacije pri 37 °C smo zrasle kolonije sprali z gojišča z 2 ml PBS ter shranili pri -20 °C. V drugem poskusu smo vzorec homogenata in njegovo 10-kratno redčitev (v PBS) razmazali tudi na krvni agar (KA; BD, ZDA). Kolonije na ploščah krvnega agarja smo šteli po 48-ih urah aerobne in anaerobne inkubacije pri 37 °C.

V prvem poskusu smo za izolacijo DNA iz vzorcev mlečne žleze v 2-mililitrsko mikrocentrifugirko zatehtali 338 mg homogenata, kar je ustrezalo 225 mg čistega tkiva, pri drugem pa 450 mg homogenata (300 mg čistega tkiva) in vzorec shranili pri -70 °C do nadaljnje obdelave. Ostanek homogenata smo shranili pri -70 °C.

V prvem poskusu smo mleko odmrznili, premešali na vibracijskem mešalniku, 40 µl homogenata odpipetirali v 360 µl tekočega gojišča MRS in bogatili 24 ur pri 37 °C. Po 24-ih urah smo 100 µl suspenzije razmazali na trdno gojišče MRS in trdno gojišče MRS^R ter po 72-ih urah inkubacije pri 37 °C v anaerobnih pogojih pregledali morebitne zrasle kolonije. V drugem poskusu smo celoten vzorec mleka uporabili za izolacijo DNA.

3.6.5.3 Analiza vzorcev mezenteričnih limfnih vozlov

Vzorce mezenteričnih limfnih vozlov smo odmrznili, stehali, dodali 9-kratno količino PBS (cca. 400 µl) in ob hlajenju na ledu homogenizirali s paličnim homogenizatorjem. Po končani homogenizaciji smo 50 µl homogenata odpipetirali v 450 µl tekočega gojišča MRS in bogatili 24 ur pri 37 °C. Po 24-ih urah smo 100 µl suspenzije razmazali na trdno gojišče MRS in trdno gojišče MRS^R ter po 72-ih urah inkubacije pri 37 °C v anaerobnih pogojih zrasle kolonije sprali z gojišča z 2 ml PBS ter shranili pri -20 °C. V drugem poskusu smo 10-krat in 100-krat redčen vzorec homogenata v PBS razmazali tudi na krvni agar (BD, ZDA). Kolonije na ploščah krvnega agarja smo šteli po 48-ih urah aerobne in anaerobne inkubacije pri 37 °C.

3.6.5.4 Izolacija DNA iz tkiv in mleka

Homogenizirane vzorce tkiv smo odmrznili, dodali 1 ml ohlajenega PBS in centrifugirali 5 min pri 14000 x g in 4 °C. Supernatant smo zavrgli in s sterilno pinceto in filter papirčkom obrisali maščobo z roba mikrocentrifugirke. Nato smo dodali 600 µl mešanice 50 mM EDTA, lizocima (10 mg/ml) in mutanolizina (12,5 U/ml) ter dobro premešali. Suspenzijo smo inkubirali v vodni kopeli 2 uri pri 37 °C, pri čemer smo jo vsake pol ure dobro premešali na vibracijskem mešalniku. Po encimski obdelavi smo suspenzijo 5 min centrifugirali pri 14000 x g in 23 °C, odlili supernatant in s sterilno pinceto in filter papirčkom obrisali preostalo maščobo z roba mikrocentrifugirke. Pri nadaljnjem postopku izolacije smo uporabili komercialni komplet za izolacijo DNA (Qiagen stool Mini kit, Qiagen, 51504), pri čemer smo postopek prilagodili našim vzorcem tako, da smo peletu dodali 1,4 ml pufra ASL (iz kompleta), dobro premešali in sonicirali s sonikatorjem Soniprep 150 (MSE Scientific Instruments, VB) v treh ciklih po 30 s delovanja in 15 s odmora. Med sonikacijo smo mešanico hladili z ledeno vodo. Mešanico smo nato 5 min inkubirali pri 95 °C ter se naprej ravnali po navodilih proizvajalca.

Da bi povečali izplen izolacije, smo v drugem poskusu postopek izolacije DNA prilagodili tako, da smo za izolacijo uporabili večjo količino homogenata (300 mg čistega tkiva). Poleg tega smo proizvajalčeva navodila za izolacijo DNA (Qiagen stool Mini kit, Qiagen,

51504) dodatno prilagodili tako, da smo pri postopku obdelave s proteinazo K namesto 200 μ l uporabili 600 μ l supernatanta in posledično na kolono za izolacijo DNA nanесли 600 namesto 200 μ l vzorca. Vezano DNA smo s kolone izprali z dvakratnim izpiranjem s 100 μ l AE pufra (iz kompleta), namesto z enkratnim izpiranjem z 200 μ l.

3.6.5.5 Izolacija DNA iz spirkov kolonij s trdnih gojišč

Genomsko DNA iz bakterij, ki so zrasle na trdnem gojišču MRS in MRS^R po 24-urnem bogatenju, smo izolirali s pomočjo komercialnega kompleta za izolacijo genomske DNA (Wizard Genomic DNA Purification Kit; Promega, A1120). Pri postopkih izolacije smo se držali originalnih navodil proizvajalca (Protokol za izolacijo genomske DNA iz grampozitivnih in gramnegativnih bakterij).

3.6.5.6 Ugotavljanje prisotnosti sevov LGG in LK7 z metodo PCR

Za ugotavljanje prisotnosti seva LGG smo uporabili za sev specifična ZO (Ahluos in Tynkkynen, 2009) LGG_for (5'-CGCCCTTAACAGCAGTCTTCAAAT-3') in LGG_rev (5'-ACGCGCCCTCCGTATGCTTAAACC-3').

Mešanico PCR (25 μ l) smo sestavili iz:

- 1 x Green GoTaq Flexi pufra;
- 1,5 mM MgCl₂;
- 0,2 mM dNTP;
- 1,0 μ M vsakega od ZO;
- 0,625 U GoTaq DNA polimeraze;
- 1 μ l 100-krat v vodi redčene DNA iz vzorca.

Program PCR se je začel z denaturacijo pri 95 °C (1 min), prileganjem ZO pri 65 °C (1 min) in podaljševanjem verige pri 72 °C (1 min). Nato je sledilo 5 ciklov denaturacije pri 95 °C (1 min), prileganja ZO pri 60 °C (1 min) in podaljševanja verige pri 72 °C (1 min) ter 25 ciklov, pri katerih je bilo prileganje ZO pri 55 °C. Sledilo je zaključno podaljševanje verige pri 72 °C (5 min) in inkubacija pri 4 °C (vsaj 15 min). Pomnoške smo preverili z elektroforezo na agaroznem gelu, kot je opisano v poglavju 3.4.2.

Za ugotavljanje potrjevanja prisotnosti seva LK7 smo uporabili par ZO GasA_2F/R po protokolu, ki je opisan v poglavju 3.4.2.

3.6.5.7 Ugotavljanje prisotnosti določenih rodov in vrst bakterij z metodo PCR

V prvem poskusu smo v vzorcih DNA iz mezenteričnih limfnih vozlov, mlečne žleze in mleka ugotavljali prisotnost značilnih nukleotidnih zaporedij za različne rodove in vrste bakterij. Pri tem smo uporabili za rod in za vrsto specifične ZO, ki so navedeni v Preglednici 6. Mešanico PCR (25 μ l) smo sestavili iz:

- 1 x Green GoTaq Flexi pufra;
- 1,5 mM MgCl₂ (pri ZO PrI in RhaII smo uporabili 2 mM);
- 0,2 mM dNTP;
- 0,5 μ M vsakega od ZO;
- 0,625 U GoTaq DNA polimeraze;
- 1 μ l 100-krat v vodi redčene DNA iz vzorca.

Preglednica 6: Začetni oligonukleotidi za ugotavljanje rodu ali vrste bakterij.

Table 6: Oligonucleotide primers for bacterial genus and species determination.

Ime	Tarčni organizem	Nukleotidno zaporedje (5'→3')	Dolžina pomnožka [bp]	Program PCR
LbLMA1-rev ^a R16-1 ^a	<i>Lactobacillus</i> spp.	CTCAAAACTAAACAAAGTTTC CTTGACACACCGCCCGTCA	200-250	95 °C (15 s), 55 °C (30 s), 72 °C (30 s)
Lgas-3 ^b Lgas-2 ^b	<i>Lactobacillus</i> <i>gasseri</i>	AGCGACCGAGAAGAGAGAGA TGCTATCGCTTCAAGTGCTT	360	95 °C (30 s), 65 °C (2 min), 74 °C (2 min)
PrI ^c RhaII ^c	<i>Lactobacillus</i> <i>rhamnosus</i>	CAGACTGAAAGTCTGACGG GCGATGCGAATTTCTATTATT	150-400	95 °C (30 s), 58 °C (30 s), 72 °C (30 s)
EncF ^d EncR ^d	<i>Enterococcus</i> spp.	CCCTTATTGTTAGTTGCCATCATT ACTCGTTGACTTCCCATTGT	144	95 °C (15 s), 61 °C (30 s), 72 °C (45 s)
STR I ^e STR II ^e	<i>Streptococcus</i> spp.	TGTTTAGTTTTGAGAGGTCTTG CGTGGAATTTGATATAGATATTC	150-210	95 °C (30 s), 55 °C (30 s), 72 °C (30 s)
STA I ^e STA II ^e	<i>Staphylococcus</i> spp.	GGAATAACGTGACATATTGTA TTCACCTCGGTTTTGCTTGG	100-200	95 °C (30 s), 55 °C (30 s), 72 °C (30 s)

^aDubernet in sod. (2002); ^bSong in sod. (2000); ^cWalter in sod. (2000); ^dRintila in sod. (2004); ^eForsman in sod. (1997)

Reakcijo smo začeli z začetno dvominutno denaturacijo pri 95 °C, kateri je sledilo 30 ciklov denaturacije, prileganja in podaljševanja pri pogojih, specifičnih za vsak par ZO (Preglednica 6). Reakcijo smo končali s 5 min podaljševanja pri 72 °C. Pomnožke smo preverili z elektroforezo na agaroznem gelu kot je opisano v poglavju 3.4.2.

3.6.5.8 Ugotavljanje števila kopij genov za 16S bakterijsko ribosomalno RNA (rDNA) z metodo PCR v realnem času

Za ugotavljanje števila kopij 16S rDNA je bilo najprej potrebno pripraviti standardno umeritveno premico. Pripravili smo 5- ali 3-kratne zaporedne redčitve vzorcev DNA seva *Bacteroides thetaiotaomicron* DSM2079, izolirane iz 1 ml prekonočne kulture, ki smo jo centrifugirali 5 min pri 12000 x g in pelet dvakrat sprali s PBS. Nato smo nadaljevali po postopku za izolacijo DNA iz tkiv in mleka (poglavje 3.6.5.4). Po končani izolaciji smo spektrofotometrično določili koncentracijo izolirane DNA in glede na izmerjeno koncentracijo DNA izračunali št. kopij tarčne DNA/μl po enačbi (2):

$$k_t = n_t * \frac{c_{DNA} * N_A}{l_{DNA} * M_{bp}} \quad \dots(2)$$

pri čemer je k_t – št. kopij tarčne DNA/μl, n_t – št. tarčnih sekvenc v genomu seva *Bacteroides thetaiotaomicron* DSM2079 [6], c_{DNA} – izmerjena koncentracija DNA [ng/μl], N_A – Avogadrovo število [$6,022 * 10^{23}$ bp/mol], l_{DNA} – dolžina genoma [$4,693 * 10^6$ bp], M_{bp} – povprečna molska masa baznega para v dvoverižni DNA [$6,6 * 10^7$ ng/mol].

V vzorcih izolirane DNA iz tkiv in mleka iz drugega poskusa smo spektrofotometrično (NanoVue 4282; GE Healthcare Life Sciences, Velika Britanija) določili koncentracijo izolirane DNA z merjenjem absorbance pri 260 nm. Nato smo vsak vzorec DNA redčili z Milli-Q (Sigma, 95284) do koncentracije DNA 10 ng/μl.

Za določitev števila kopij 16S rDNA v DNA, izolirani iz različnih vzorcev iz drugega poskusa, smo uporabili ZO, specifična za variabilno regijo V3 na 16 S rDNA, ki pomnožujeta 200 bp dolg produkt (Fierer in sod., 2005):

- Eub338F: 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3';
- Eub518R: 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'.

Reakcijska mešanica (20 μl) za PCR v realnem času je vsebovala:

- 0,2 μM vsakega od ZO;
- 1 x KAPA SYBR FAST Universal 2X qPCR Master Mix (KapaBiosystems, KK4601);
- 1 μl redčitve standardne DNA ali pa 1 μl umerjene genomske DNA vzorca (umerjena na 10 ng/μl).

Reakcijo smo izvajali v aparatu Stratagene Mx3000P (Stratagene, ZDA) po naslednjem programu:

- 2 min pri 50 °C in 2 min pri 95 °C (začetna denaturacija DNA);
- 30 ciklov po: 1 min pri 95 °C, 30 s pri 53 °C in 1 min pri 72 °C;
- 1 min pri 72 °C;
- disociacijska krivulja (1 min pri 95 °C, 1 min pri 70 °C, odčitavanje fluorescence pri vsakem dvigu T za 0,5 °C do končnih 95 °C).

Analize vseh DNA iz vzorcev in redčitev standardne DNA so bile narejene v paralelkah. Po končani reakciji smo dobljene podatke o intenziteti fluorescence pri vsakem ciklu obdelali s programom MxPro QPCR Software (Stratagene, ZDA). Učinkovitost pomnoževanja in št. kopij 16S rDNA v vzorcu smo določili glede na izdelano umeritveno premico. Specifičnost pomnoževanja smo ugotavljali na osnovi disociacijske krivulje. Različni fragmenti se med seboj ločijo po različni temperaturi tališča DNA (vrh krivulje).

3.6.5.9 Globinsko sekvenciranje metagenoma

Vzorci DNA, izolirane iz mezenteričnih limfnih vozlov, mlečnih žlez in mleka iz drugega poskusa na brijih miših, smo analizirali z globinskim sekvenciranjem metagenoma. Ker je metoda razmeroma draga, smo po 4 paralelne vzorce mezenteričnih limfnih vozlov, mlečne žleze in mleka iz vsake skupine združili, tako da smo dobili zgolj 18 vzorcev (3 skupine, 2 časa vzorčenja, 3 tipi vzorcev). Tako smo na primer vzorce mezenteričnih limfnih vozlov miši, žrtvovanih osmi dan po kotitvi in hranjenih z LK7^R (K4/3, K4/4, K4/5, K4/6), združili v vzorec K4-MV. Vsak združen vzorec izolirane DNA je tako vseboval po 20 µl DNA, izolirane iz tkiv štirih živali iz iste skupine. Pri kontrolni skupini, žrtvovani osmi dan po kotitvi, smo uporabili vzorce dveh živali iz prvega poskusa (N4/1 in N4/2), ker smo v drugem poskusu imeli v tej skupini samo dve živali. Združeno DNA smo poslali podjetju DNAVision (Belgija), ki izvaja storitve globinskega sekvenciranja z napravo Roche GS-FLX 454 (Roche, Švica) in bioinformacijske analize dobljenih podatkov.

Za pripravo knjižnice so uporabili ZO 784F and 1061R, ki so specifični za V5-V6 variabilno regijo 16S rDNA (Andersson in sod., 2008). Nadaljnji postopki sekvenciranja in obdelave podatkov so natančneje opisani v publikaciji De Filippo in sod. (2010).

4 REZULTATI

4.1 RAZVOJ METODE ZA UGOTAVLJANJE LK7 V KOMPLEKSNIH VZORCIH

Sev LK7 proizvaja dva specifična bakteriocina, gasericin K7A in gasericin K7B (Rogelj in Bogovič Matijašič, 2006). Genske determinante za oba bakteriocina bi lahko bile primerna tarča za odkrivanje seva LK7 z metodo PCR v vzorcih z bogato mikrobioto, kot so mleko in blato. Seveda pa je bilo potrebno ugotoviti, ali so dovolj specifične, zato smo morali najprej ugotoviti pogostost pojavljanja genov za oba bakteriocina v čim večjem številu sorodnih, referenčnih sevov in blatu zdravih prostovoljcev, ki nikoli niso uživali seva LK7. Za namen poskusa smo izdelali vrsto začetnih oligonukleotidov (ZO), specifičnih za dele regij, ki kodirajo gasericin K7 A in K7 B. Nove in že obstoječe ZO smo nato uporabili pri PCR, kjer smo kot matrično DNA uporabili DNA iz vzorcev čistih kultur sevov iz rodu *Lactobacillus* (skupina *acidophilus*) ter DNA, izolirano iz blata 45-ih zdravih prostovoljcev, ki nikoli niso uživali LK7.

4.1.1 Pojavljanje genskih determinant za gasericina K7 A in K7 B v različnih referenčnih sevih iz rodu *Lactobacillus*

Pojavljanje genskih determinant za gasericin K7 A in K7 B smo preverili na 18-ih referenčnih sevih iz rodu *Lactobacillus* (skupina *acidophilus*). Rezultati so prikazani v Preglednicah 7 in 8. Nekateri sevi vsebujejo le dele genskega klastra za gasericin K7 A. Pomnoževanje z vsemi ZO, specifičnimi za gasericin K7 A, je bilo uspešno pri sevih *Lactobacillus gasseri* 17266, LK7, *Lactobacillus gasseri* LF221 in *Lactobacillus johnsonii* 1158. Pomnoževanje z ZO GasA_2F/R, ki kodira aktivno podenoto gasericina K7 A, je bilo uspešno samo v primerih, ko je bilo uspešno pomnoževanje z vsemi ZO.

Podobno kot pri gasericinu K7 A, smo pri K7 B opazili, da nekateri sevi vsebujejo le dele genskega klastra za gasericin K7 B. Pomnoževanje z vsemi ZO, specifičnimi za gasericin K7 B, je bilo uspešno le pri *Lactobacillus gasseri* LF221 in LK7. Uspešno pomnoževanje z vsemi ZO je sovpadalo s pomnoževanjem z ZO GasB_3F/R in GasB_4F/R, ki kodirajo komplementarno in aktivno podenoto gasericina K7 B.

Skupno je tako izmed 14-ih ZO (Preglednici 4 in 5), testiranih na 18-ih sevih, en par ZO izkazoval specifičnost za celotni genski klaster gasericina K7 A (GasA_2F/R) in 2 para ZO za celotni genski klaster gasericina K7 B (GasB_3F/R in GasB_4F/R), saj so bili ustrezni produkti prisotni zgolj takrat, ko so bili prisotni pomnožki pri vseh uporabljenih ZO.

Preglednica 7: Detekcija genov za gasericin K7 A v različnih referenčnih sevih. AcP – aktivna podenota, CP – komplementarna podenota, IP – domnevni protein imunosti, ES – končni del zaporedja, + – zaznan produkt ustrezne velikosti, - – produkt ustrezne velikosti ni zaznan.

Table 7: Detection of gasericin K7 A genes in different reference strains. AcP – active subunit, CP – complementary subunit, IP – putative immunity protein, ES – end sequence, + – detected product of the appropriate size, - – absence of product of the appropriate size.

Sev	Začetni oligonukleotidi (Proteini, ki jih kodirajo tarčna zaporedja)					
	GasA_1		LFA	GasA_2	GasA_3	GasA_4
	F/R (CP)	BOJA/B (CP-AcP)	185/268 (AcP)	F/R (AcP)	F/R (IP)	F/R (ES)
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	-	-	-	-	-	-
<i>L. acidophilus</i> CCDM 109	-	-	-	-	-	-
<i>L. acidophilus</i> CCDM 149	-	-	-	-	-	-
<i>L. gasseri</i> CCDM 214	-	-	-	-	-	+
<i>L. gasseri</i> CCDM 215	-	+	+	-	-	-
<i>L. gasseri</i> CCDM 332	-	-	-	-	-	+
<i>L. gasseri</i> CCDM 335	+	+	+	-	+	-
<i>L. gasseri</i> CCDM 340	-	+	+	-	+	+
<i>L. gasseri</i> CCDM 377	-	-	-	-	-	+
<i>L. gasseri</i> DSM 20243	-	-	-	-	-	+
<i>L. gasseri</i> FAM 17266	+	+	+	+	+	+
<i>L. gasseri</i> FAM 17828	-	-	-	-	-	-
<i>L. gasseri</i> K7	+	+	+	+	+	+
<i>L. gasseri</i> LF221	+	+	+	+	+	+
<i>L. johnsonii</i> ATCC 11506	-	-	-	-	-	-
<i>L. johnsonii</i> FAM 1158	+	+	+	+	+	+
<i>L. johnsonii</i> NCC 533	-	-	-	-	-	-
<i>L. johnsonii</i> FAM 17265	-	-	-	-	-	-

4.1.2 Pojavljanje genskih determinant za gasericina K7 A in K7 B v mikrobioti blata zdravih prostovoljcev, ki niso uživali seva LK7

Z namenom, da izberemo primerne ZO za detekcijo LK7 z metodo PCR v kompleksnih vzorcih, smo šest izbranih ZO preizkusili na realnih vzorcih, vzorcih blata zdravih prostovoljcev. Poleg štirih ZO, ki so jih že uporabili v preteklih študijah (Čanžek Majhenič in sod., 2003; Zorič Peternel in sod., 2010), smo preizkusili še dva ZO (GasA_2F/R in GasB_4F/R), ki sta v preskusu na referenčnih sevih izkazovala specifičnost za celotni genski klaster gasericina K7 A in K7 B. Kot matrično DNA smo uporabili DNA izolirano iz blata 45-ih zdravih prostovoljcev, ki niso uživali LK7.

Na celokupni bakterijski DNA iz blata prostovoljcev smo z izbranimi ZO v PCR uspeli potrditi prisotnost različnih genskih determinant za gasericina K7 A in K7 B (Preglednica 9). Najpogosteje se je pojavljalo tarčno zaporedje, ki smo ga pomnožili z ZO B 348/833 in kodira del transportnega proteina ter del komplementarne podenote gasericina K7 B.

Odsotnost specifičnega PCR produkta po pomnoževanju genomske DNA iz blata zdravih prostovoljcev z ZO GasA_2F/R in GasB_4F/R nakazuje na smiselnost njune uporabe pri detekciji LK7 v kompleksnih vzorcih. GasA_2F/R smo tako pri nadaljnjih poskusih uporabljali za ugotavljanje prisotnosti LK7 v različnih vzorcih.

Preglednica 8: Detekcija genov za gasericin K7 B v različnih referenčnih sevih. AP – domnevni dodatni transportni protein, CP – komplementarna podenota, AcP – aktivna podenota, TP – domnevni transportni protein, IP – domnevni protein imunosti, + – zaznan produkt ustrezne velikosti, - – produkt ustrezne velikosti ni zaznan.

Table 8: Detection of gasericin K7 B genes in different reference strains. AP – putative additional transport protein, CP – complementary subunit, AcP – active subunit, TP – putative transport protein, IP – putative immunity protein, + – detected product of the appropriate size, - – absence of product of the appropriate size.

Sev	Začetni oligonukleotidi (Proteini, ki jih kodirajo tarčna zaporedja)							
	GasB_ 1F/R (TP)	GasB_ 2F/R (AP)	B 348/833 (AP-CP)	K7B c.f. for/rev (CP)	GasB_ 3F/R (CP)	GasB_ 4F/R (AcP)	LFB 1193/1262 (AcP)	GasB_ 5F/R (IP)
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. acidophilus</i> CCDM 109	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. acidophilus</i> CCDM 149	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. gasseri</i> CCDM 214	-	-	+	+	-	-	+	-
<i>L. gasseri</i> CCDM 215	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>L. gasseri</i> CCDM 332	-	-	+	+	-	-	+	+
<i>L. gasseri</i> CCDM 335	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. gasseri</i> CCDM 340	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. gasseri</i> CCDM 377	+	-	+	-	-	-	+	-
<i>L. gasseri</i> DSM 20243	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. gasseri</i> FAM 17266	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>L. gasseri</i> FAM 17828	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. gasseri</i> K7	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L. gasseri</i> LF221	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L. johnsonii</i> ATCC 11506	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>L. johnsonii</i> FAM 1158	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. johnsonii</i> NCC 533	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>L. johnsonii</i> FAM 17265	-	-	-	-	-	-	-	-

Preglednica 9: Pogostost pojavljanja genskih determinant za gasicina K7 A in K7 B v mikrobioti blata zdravih prostovoljcev, ki niso uživali seva *Lactobacillus gasseri* K7.

Table 9: Prevalence of gasserins K7 A and K7 B gene determinants in faecal microbiota from adult volunteers who didn't consumed *Lactobacillus gasseri* K7.

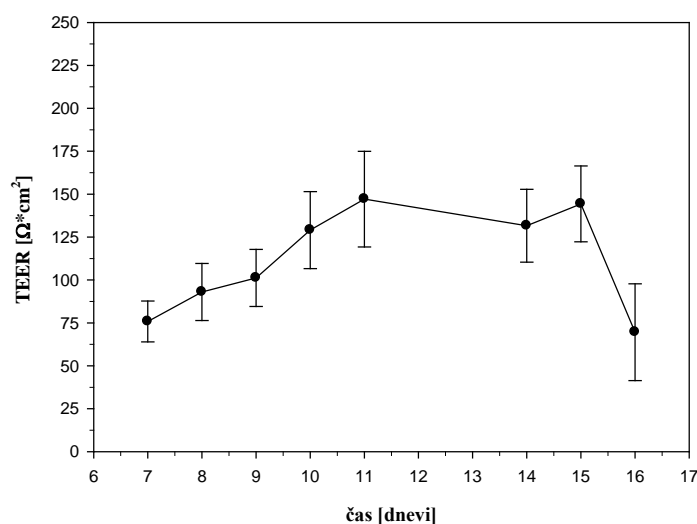
Začetni oligonukleotid	Tarčni gen	Prisotnost v mikrobioti blata ¹ [%]
LFA 185/268	aktivna podenota gasicina K7 A	4,4
BOJA/B	komplementarna/aktivna podenota gasicina K7 A	15,6
GasA_2F/R	aktivna podenota gasicin K7 A	0,0
B 348/833	transportni protein/komplementarna podenota gasicina K7 B	22,2
K7B c.f. for/rev	komplementarna podenota gasicina K7 B	20,0
GasB_4F/R	aktivna podenota gasicina K7 B	0,0

¹(št. pozitivnih vzorcev/št vseh)*100

4.2 PREHAJANJE BAKTERIJ LK7 PREKO SLOJA EPITELNIH CELIC H4-1 IN PREŽIVETJE ZNOTRAJ DENDRITIČNIH CELIC

4.2.1 Rast in diferenciacija celic H4-1 na filtrih s porami premera 3 μm

Po pričakovanjih so celice na poroznih filtrih rasle počasneje kot v stekleničkah. Velikokrat se je zgodilo, da celice po 7 dneh niso razvile ustrezne TEER. Poleg tega smo pogosto opazili neenakomerno rast TEER na vstavljenih filtrih na isti plošči. Na Sliki 12 je prikazan razvoj TEER celic H4-1 na poroznih filtrih s premerom 3 μm . Celice so največji TEER dosegle med 11. in 14. dnem ($139 \pm 16 \Omega \cdot \text{cm}^2$), zato smo vse nadaljnje poskuse izvajali v tem obdobju gojenja. Po 15-ih dneh gojenja so celice začele propadati, kar se je odražalo tudi v padcu upornosti.



Slika 12: Razvoj transepitelne električne upornosti (TEER) celic H4-1 na poroznih filtrih s premerom 3 μm . Pred vsakim merjenjem smo zamenjali medij na obeh straneh filtra. Rezultati so podani kot povprečna vrednost 8 meritev \pm standardna napaka.

Figure 12: Development of transepithelial resistance (TEER) of H4-1 cells on porous filters with diameter of 3 μm . Before each measurement, medium on both sides of the filter was replaced. Results are shown as the mean value of 8 measurements \pm standard error.

4.2.2 Določitev minimalne TEER za nepropustnost bakterij LK7

Da bi ugotovili pri katerem TEER bakterije ne morejo več spontano prehajati skozi epitelij, smo epitelne celice, ki smo jih na filtrih s porami premera 3 μm gojili 12 dni, izpostavili bakterijam za 18 ur. Tik pred dodatkom 2×10^6 KE prekonočne kulture LK7 na apikalno

stran epitelija, smo izmerili TEER. TEER smo izmerili še takoj po dodatku, nato pa smo bakterije z epitelijem 18 ur inkubirali pri fizioloških pogojih. Po 18-ih urah smo preverili število LK7 na spodnji strani filtra. Rezultati so prikazani v Preglednici 10, kjer je razvidno, da TEER takoj po dodatku bakterij pade za približno 30 %. Ugotovili smo, da je minimalna TEER, pri kateri bakterije spontano ne prehajajo epitelija približno $130 \Omega \cdot \text{cm}^2$, oziroma po dodatku bakterij upornost ne sme pasti pod $100 \Omega \cdot \text{cm}^2$.

Preglednica 10: Transepitelna električna upornost (TEER) pred in takoj po dodatku *Lactobacillus gasseri* K7 (LK7) ter število bakterij LK7 na spodnji strani filtra po 18-ih urah inkubacije. TEER smo izmerili pred in takoj po dodatku 2×10^6 kolonijskih enot (KE) prekonočne kulture LK7 na apikalno stran epitelialnih celic H4-1. Podano je število KE LK7 v mediju na spodnji strani filtra po 18-ih urah inkubacije pri fizioloških pogojih.

Table 10: Transepithelial electrical resistance (TEER) before and immediately after the addition of *Lactobacillus gasseri* K7 (LK7) and number of LK7 bacteria on the lower side of the filter after 18 hours of incubation at physiological conditions. TEER was measured before and immediately after the addition of 2×10^6 colony-forming units (KE) of overnight culture of LK7 on the apical side of epithelial cells H4-1. Number of KE of LK7 in medium on lower side of the filter after 18 hours of incubation at at physiological conditions.

TEER pred dodatkom LK7 [$\Omega \cdot \text{cm}^2$]	TEER takoj po dodatku LK7 [$\Omega \cdot \text{cm}^2$]	KE po 18-ih urah na spodnji strani filtra
58	12	8
60	12	120
61	22	8
75	29	124
93	44	23
105	41	120
108	68	0
113	71	0
116	91	11
141	70	0
205	118	0
345	197	0

4.2.3 Prehajanje bakterij LK7 skozi sloj epitelialnih celic H4-1 in preživetje znotraj DC

Prehajanje LK7 skozi sloj epitelialnih celic H4-1 in preživetje prevzetih bakterij znotraj DC, smo proučevali na *in vitro* modelu črevesnega epitelija (Poglavje 3.5.1). Ustrezno diferencirane epitelne celice H4-1 smo za 2 uri izpostavili bakterijam LK7 v razmerju 1:100 (nDC:LK7). Po dvourni inkubaciji smo prvič vzorčili medij RPMI^K (V_0). Ta vzorec nam je služil kot prvi kontrolni vzorec spontanega prehajanja bakterij. Pritrjene DC smo

nato izpostavili gentamicinu, ki ne prodre v celice, uniči pa morebitne zunajcelične bakterije. Pri filtrih brez nDC (negativna kontrola) smo gentamicin dodali samo na zgornjo stran. Po eni uri inkubacije smo zgornji in spodnji medij zamenjali z DMEM^{ATB} in RPMI^K ter nato preživetje znotraj DC spremljali z vzorčenjem spodnjega medija z DC, v različnih terminih med inkubacijo pri fizioloških pogojih. Po lizi DC z detergentom Triton x-100 smo določali število preživelih bakterij na trdnem gojišču MRS.

V prvem poskusu smo vzorčili po treh, 18-ih in 24-ih urah od dodatka LK7, kar pomeni, da je bilo vzorčenje po treh urah, takoj po menjavi medija, ki je vseboval gentamicin. Kot je razvidno iz Preglednice 11, smo pri vsakem vzorčenju vzorčili na 4-ih filtrih, pri čemer sta 2 služila kot negativni kontroli (filtra brez nasajenih nDC in brez dodatka gentamicina na spodnjo stran). Izmed vseh vzorcev V₀ (takoj po dveh urah), smo bakterije ugotovili pri dveh kontrolnih filtrih, ki so bili vzorčeni po treh urah (ni prikazano), kar kaže na to, da je pri teh dveh filtrih prišlo do spontanega prehajanja bakterij. V skladu s tem je bilo število bakterij v mediju na spodnji strani filtra po treh urah neštevno (Preglednica 11; Kontrola (brez nDC) >300 KE).

Preglednica 11: Prehajanje *Lactobacillus gasseri* K7 (LK7) skozi epitelni sloj celic H4-1 in njihovo preživetje znotraj dendritičnih celic (DC). nDC – nezrele dendritične celice, KE – kolonijske enote.

Table 11: Crossing of *Lactobacillus gasseri* K7 (LK7) through the epithelial layer of H4-1 cells and their survival within dendritic cell (DC). nDC – immature dendritic cells, KE – colony-forming units.

t [h]	Prisotnost nDC [KE]		Kontrola (brez nDC) [KE]	
3	70	92	>300	>300
18	6	1	0	0
24	0	0	0	0

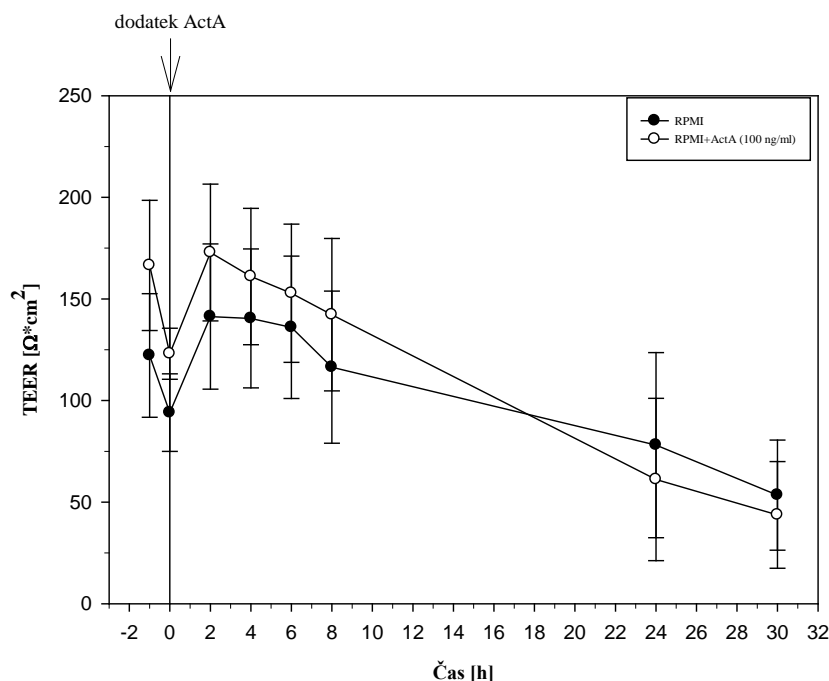
Tri ure po dodatku LK7 na apikalno stran epitelnih celic je bilo število bakterij znotraj DC največje. Po 18-ih urah se je to število drastično zmanjšalo, po 24-ih urah pa živih bakterij znotraj DC nismo več zaznali. Trend padanja števila znotrajceličnih bakterij v odvisnosti od časa je nakazoval časovno omejeno preživetje LK7 znotraj DC. To smo želeli potrditi z dodatnimi eksperimenti, vendar nam zaradi časovne omejitve in težav s celično linijo žal ni uspelo.

4.3 VPLIV PROBIOTIKOV IN AKTIVINA A NA AKTIVACIJO KINAZ p38 IN ERK1/2 V DC

4.3.1 Vpliv ActA na rast in diferenciacijo celic H4-1 na filtrih s porami premera 0,4 μm

Rast in diferenciacija celic na poroznih filtrih s porami premera 0,4 μm je bila podobna kot na filtrih s porami 3 μm . Možnost opazovanja celic pod svetlobnim mikroskopom nam je olajšala oceno ali so celice primerne za poskus. Tudi tu smo pogosto opazili neenakomerno rast TEER na filtrih na isti plošči, kar se kaže tudi v precejšnji standardni napaki pri proučevanju vpliva ActA na TEER epitelnih celic H4-1 (Slika 13).

Padeč TEER pri obeh skupinah celic (z in brez dodatka ActA) kaže na to, da so bile celice v zadnji fazi razvoja in so pričele odmirati. Kljub temu je bilo dve uri po dodatku ActA opaziti podoben TEER kakor pred dodatkom, kar pomeni, da ActA v našem poskusu ni direktno vplival na spremembo integritete epitelija, saj smo v poskusih uporabili zgolj dvourno inkubacijo ob prisotnosti ActA.



Slika 13: Vpliv aktivina A (ActA) na transepitelno električno upornost (TEER) epitelnih celic H4-1. ActA (100 ng/ml) smo dodali v medij RPMI na spodnji strani filtra 15. dan gojenja na poroznih filtrih (čas 0). Rezultati so podani kot povprečna vrednost 4-ih meritev \pm standardna napaka.

Figure 13: Effect of activin A (ActA) on transepithelial electrical resistance (TEER) of H4-1 epithelial cells. ActA (100 ng/ml) was added in RPMI medium on the bottom side of the filters on 15th day of cultivation on porous filters (time 0). Results are shown as the mean value of 4 measurements \pm standard error.

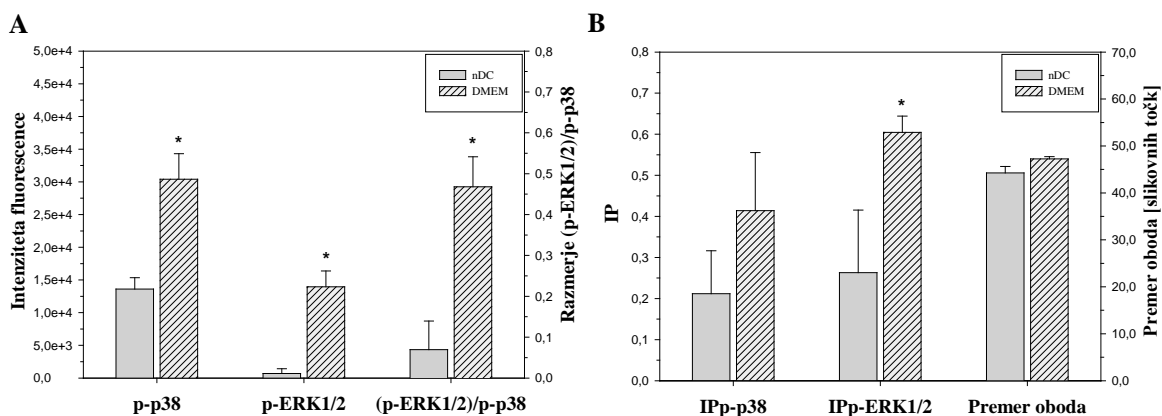
4.3.2 Vpliv probiotikov in ActA na aktivacijo kinaz p38 in ERK 1/2 v DC

Vpliv probiotikov in ActA na aktivacijo p38 in ERK1/2 v DC smo proučevali na *in vitro* modelu črevesnega epitelija, kjer smo na apikalno stran za 2 uri dodali probiotične kulture LK7, LGG in EcN. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili LPS, kot negativno pa medij DMEM^{ATB}. V primeru proučevanja vpliva ActA smo spodnjemu mediju RPMI^K dodali ActA (skupina ActA) in jo primerjali s kontrolno skupino brez dodatka ActA (skupina RPMI). Po dveh urah smo pridobili dve frakciji DC: tiste, ki so ostale pritrjene na poroznem filtru in tiste, ki so se odlepile od filtra. Obe frakciji smo barvali s specifičnimi protitelesi za p-p38 in p-ERK1/2 ter analizirali z ImS.

4.3.2.1 Vpliv nasaditve nDC na porozne filtre na njihovo aktivacijo

Da bi proučili kako nasaditev nDC na porozne filtre vpliva na aktivacijo DC, smo delež nDC po odmrzovanju pustili v centrifugirki ter jih hranili pri fizioloških pogojih toliko časa, kolikor je trajal poskus na filterih (skupaj 5h: 3 h za pripravo modela in 2 uri za poskus). nDC iz centrifugirke, smo fiksirali istočasno kot tiste, ki smo jih nasadili na porozne filtre in so predstavljale kontrolno skupino DMEM (na apikalno stran dodan DMEM^{ATB}, na bazolateralno pa RPMI^K).

Primerjava med nDC po odmrzovanju in nasajenimi na porozne filtre pokaže, da je nasaditev nDC na filtre povzročila statistično značilno aktivacijo p38 in ERK1/2 ter povečanje njunega razmerja v prid ERK1/2 (Slika 14 A). Pri nDC je bil opazen določen nivo aktivacije p38, kar je najverjetneje posledica samega odmrzovanja celic. Tako pri aktivaciji p38, kakor tudi pri aktivaciji ERK1/2 smo opazili povečano premestitev aktiviranih molekul v jedro – povečan indeks premestitve, vendar so bile razlike statistično značilne zgolj pri premestitvi pERK1/2 (Slika 14 B). Enako velja pri razraščenosti celic (perimeter), saj smo kljub temu, da smo pri odstranitvi celic iz filtra uporabili tripsin, še vedno opazili večjo razraščenost pri skupini DMEM.



Slika 14: Razlike v aktivaciji dendritičnih celic (DC), nasajenih na porozne filtre (skupina DMEM) in nezrelih DC (nDC) po odmrzovanju. (A) Povprečna intenziteta fluorescence p-p38, p-ERK1/2 in njuno razmerje v nDC in DMEM skupini. (B) Indeks premestitve p-p38 (IP_{p-p38}) in p-ERK1/2 ($IP_{p-ERK1/2}$) v jedro ter perimenter pri nDC in DMEM skupini. Rezultati so podani kot povprečna vrednost treh meritev pri nDC in 7 pri DMEM skupini \pm standardna napaka. * - statistično značilna razlika glede na nDC skupino ($p < 0,05$).

Figure 14: Differences in the activation of dendritic cells (DC) seeded onto porous filters (DMEM group) and immature DC (nDC) after thawing. (A) Mean fluorescence intensity of p-p38, p-ERK1/2 and their ratio in nDC and DMEM group. (B) Translocation index of p-p38 (IP_{p-p38}) and p-ERK1/2 ($IP_{p-ERK1/2}$) into nucleus and perimeter of the nDC and DMEM group. Results are shown as the mean value of 3 measurements in nDC group and 8 in DMEM group \pm standard error. * - statistically significant difference compared to the nDC group ($p < 0.05$).

4.3.2.2 Vpliv probiotikov in ActA na aktivacijo p38 in ERK1/2 v DC

Pri proučevanju vpliva probiotikov na aktivacijo p38 v DC primerjamo znotraj skupine RPMI (Slika 15, skupina RPMI). Pri tej skupini smo na apikalno stran za 2 uri dodali probiotične kulture (LK7, LGG, EcN), pozitivno kontrolo (LPS) in negativno kontrolo (medij DMEM^{ATB}), na spodnjo stran pa medij RPMI. Predvsem dodatek EcN ali LPS je povzročil statistično značilno povečanje aktivacije p38 v primerjavi z negativno kontrolo (Slika 15 A, skupina RPMI). Tudi dodatek probiotikov LK7 in LGG je povzročil aktivacijo p38, vendar v primerjavi z LPS v veliko manjši meri. Podoben trend je bil prav tako opažen pri aktivaciji ERK1/2 (Slika 15 B, skupina RPMI), a je le pri dodatku EcN opaziti statistično značilne razlike v primerjavi z negativno kontrolo.

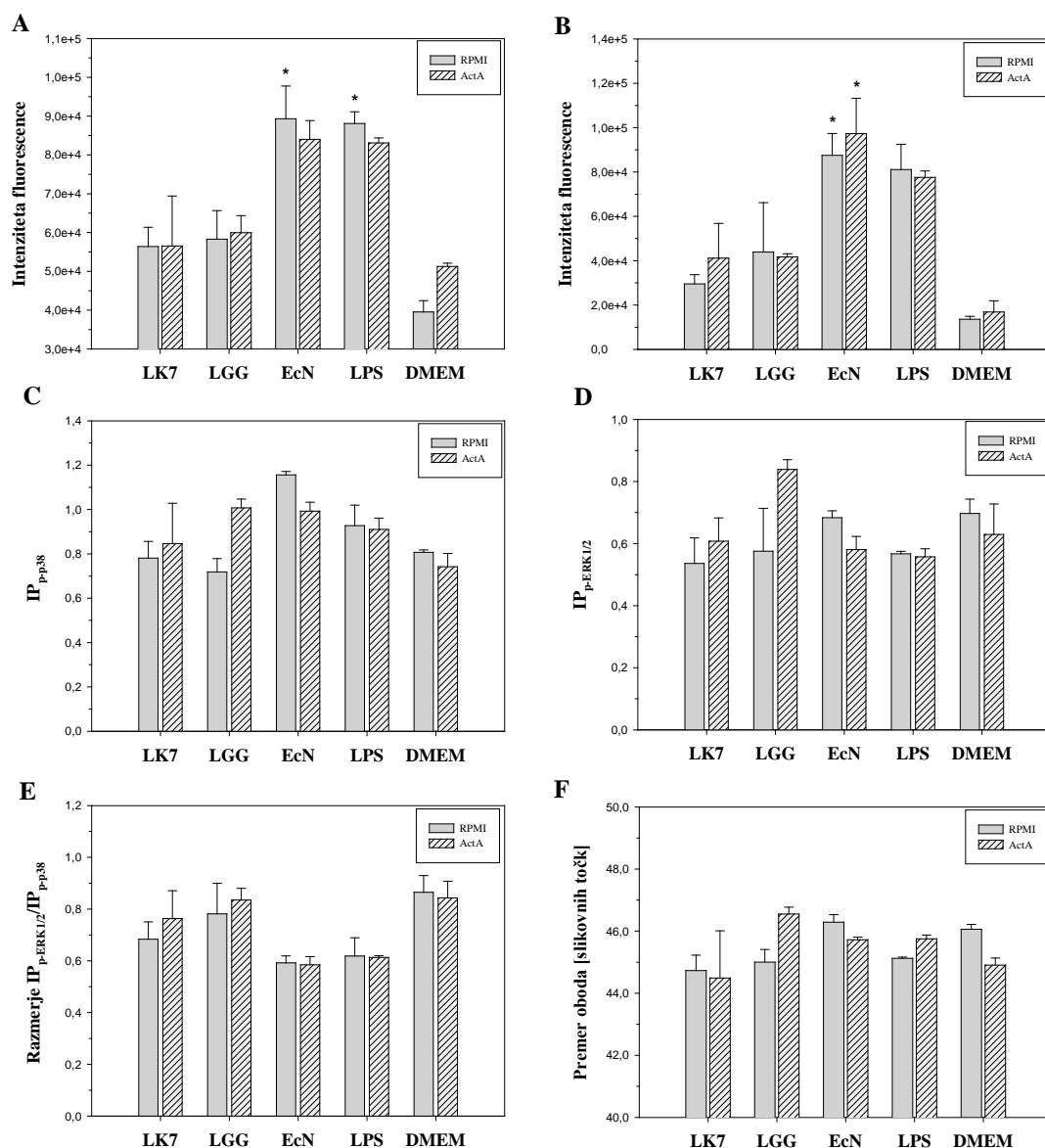
Indeks premestitve p-p38 (IP_{p-p38}) v jedro je bil največji pri skupini EcN, pri čemer je bil pri ostalih dveh probiotikih pod nivojem negativne kontrole (Slika 15 C, skupina RPMI). Analiza varianc je pokazala statistično značilne razlike med posameznimi skupinami, vendar s testi mnogoterih primerjav razlik nismo uspeli odkriti. Indeks premestitve p-ERK1/2 ($IP_{p-ERK1/2}$) v jedro se statistično ni razlikoval od negativne kontrole (Slika 15 D,

skupina RPMI). Najnižji $IP_{p-ERK1/2}$ je bil izmerjen pri skupini LK7, največji pa pri EcN in negativni kontroli (DMEM). Pri interpretaciji tega rezultata je potrebno upoštevati, da je število celic, pri katerih smo opazili aktivacijo ERK1/2, zelo majhno, še posebno pri negativni kontroli (138-400 celic), kar poveča standardne napake pri izračunu indeksa premestitve aktiviranih kinaz v jedro. Padec razmerja med premeščenimi p-ERK1/2 in p-p38 (razmerje $IP_{p-ERK1/2}/IP_{p-p38}$) pa kaže na to, da je dodatek probiotikov in LPS na apikalno stran epitelija povzročil predvsem povečano aktivacijo in premestitev p38, pri čemer je pojav najbolj izrazit pri EcN (Slika 15 E, skupina RPMI).

Podatek o perimetru nam pove, kakšna je morfologija celice, saj večji perimeter celice pomeni večjo razraščanost. Neparometrična analiza varianc (ANOVA) na rangih je pri perimetru (Slika 15 F, skupina RPMI) pokazala statistično značilne razlike med skupinami, vendar s testi mnogoterih primerjav med posameznimi skupinami razlik nismo odkrili. Povprečni perimeter je bil pri dodatku LK7, LGG in LPS na apikalno stran epitelija približno enak. Največji perimeter so imele DC v EcN skupini.

Pri proučevanju vpliva ActA na aktivacijo p38 v DC primerjamo med skupinama RPMI (kontrolna skupina). Pri tej skupini smo na apikalno stran za 2 uri dodali probiotične kulture (LK7, LGG, EcN), pozitivno kontrolo (LPS) in negativno kontrolo (medij DMEM^{ATB}), na spodnjo stran pa medij RPMI ter skupino ActA, kjer smo na spodnjo stran k RPMI dodali še ActA. Kljub temu, da statistična analiza ni pokazala razlik pri vplivu ActA na aktivacijo DC v primerjavi s kontrolno skupino, je pri nekaterih vzorcih opaziti občutnejše razlike. ActA je pri aktivaciji p38 (intenziteta fluorescence p-p38) vplival predvsem na negativno kontrolo (DMEM) in s tem zmanjšal razlike med negativno kontrolo in probiotičnimi skupinami. Dodatek ActA je povzročil razlike v odzivu DC na različne probiotike. Medtem ko je ActA povzročil povečan perimeter, povečano premestitev p-p38 in p-ERK1/2 pri LGG, je bil pri EcN učinek nasproten.

Zelo zanimiv je podatek, da je seštevek števila celic iz skupin LK7, LGG, EcN in LPS, pri katerih smo opazili aktivacijo ERK1/2 (Slika 8 G, populacija P7), statistično značilno večje ob dodatku ActA (ni prikazano). ActA je povečal tudi število celic, pri katerih smo zaznali aktivacijo p38 (Slika 8 D, populacija P4), vendar sprememba ni statistično značilna. Pri tem je potrebno omeniti, da smo tekom analize pogosto opazili večje število celic pri ActA skupini, česar pa nismo opazili po štetju celic z ImS, najverjetneje zaradi sorazmerno majhnega števila ponovitev in velikih standardnih napak, ki nastanejo tudi tekom postopka barvanja.

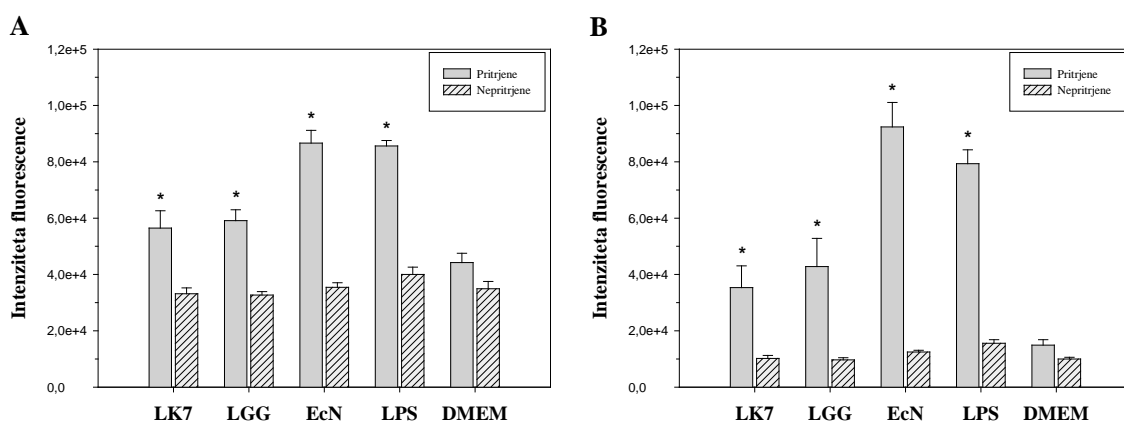


Slika 15: Vpliv probiotikov in aktivina A (ActA) na aktivacijo p38 in ERK1/2, premestitev p-p38 in p-ERK1/2 v jedro ter na perimer DC iz *in vitro* modela črevesnega epitelijskega tkiva. (A) Povprečna intenziteta fluorescence p-p38. (B) Povprečna intenziteta fluorescence p-ERK1/2. (C) Indeks premestitve p-p38 (IP_{p-p38}) v jedro. (D) Indeks premestitve p-ERK1/2 (IP_{p-ERK1/2}) v jedro. (E) Povprečno razmerje med premeščenimi p-ERK1/2 in p-p38 (razmerje IP_{p-ERK1/2}/IP_{p-p38}). (F) Povprečni perimer. Rezultati so podani kot povprečna vrednost treh meritev ± standardna napaka, z izjemo LPS, kjer sta samo 2 meritvi. * - statistično značilna razlika glede na DMEM-RPMI skupino (p<0,05).

Figure 15: Effect of probiotics and activin A (ActA) on p38 and ERK1/2 activation, translocation of p-p38 and p-ERK1/2 to the nucleus and perimer of DC from *in vitro* model of intestinal epithelium. (A) Mean fluorescence intensity of p-p38. (B) Mean fluorescence intensity of p-ERK1/2. (C) Translocation index of p-p38 (IP_{p-p38}) into nucleus. (D) Translocation index of p-ERK1/2 (IP_{p-ERK1/2}) into nucleus. (E) Mean ratio between translocated ERK1/2 and p-p38 (ratio IP_{p-ERK1/2}/IP_{p-p38}). (F) Mean perimeter. Results are shown as the mean value of 3 measurements ± standard error, with exception of LPS group where are only 2 measurements. * - statistically significant difference compared to the DMEM-RPMI group (p<0.05).

4.3.2.3 Aktivacija p38 in ERK1/2 v odlepljenih DC

V odlepljenih DC ni bilo statistično značilnih razlik med posameznimi probiotiki v vseh merjenih parametrih. Če primerjamo rezultate pritrjenih DC z odlepljenimi DC opazimo, da so odlepljene DC aktivirane na istem nivoju kot so aktivirane pritrjene DC v primeru, ko na apikalni strani ni prisotnih bakterij ali LPS (Slika 16; DMEM). Iz tega lahko sklepamo, da se v času, ko je apikalna stran epitelija izpostavljena različnim probiotikom in LPS, DC aktivirajo predvsem preko direktnega stika.



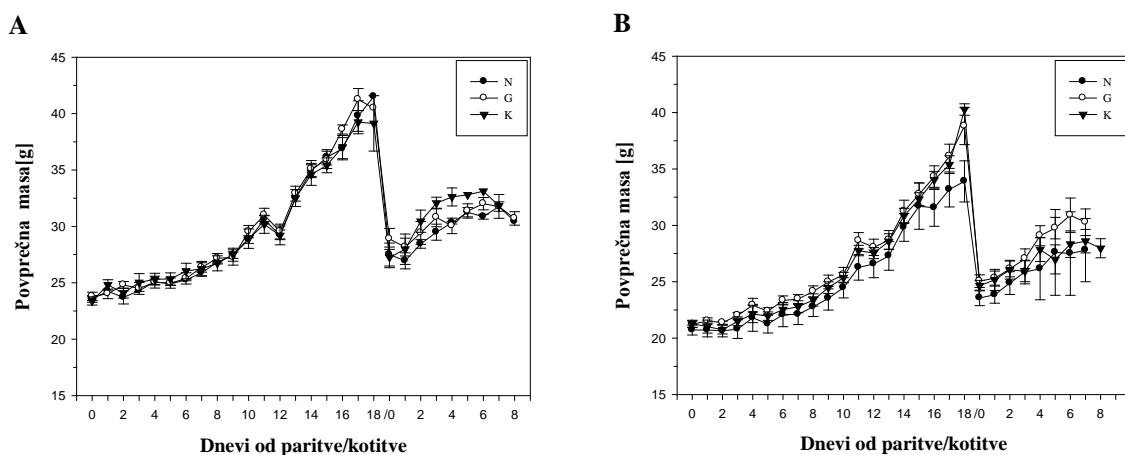
Slika 16: Primerjava v aktivaciji p38 in ERK1/2 med pritrjenimi in nepitrjenimi DC. (A) Povprečna intenziteta fluorescence p-p38. (B) Povprečna intenziteta fluorescence p-ERK1/2. Rezultati so podani kot povprečna vrednost 4 do 6 meritev \pm standardna napaka. * - statistično značilna razlika glede na skupino nepitrjenih celic iz iste skupine ($p < 0,05$).

Figure 16: Comparison of the activation of p38 and ERK1/2 between attached and floating DC. (A) Mean fluorescence intensity of p-p38. (B) Mean fluorescence intensity of p-ERK1/2. Results are shown as the mean value of 4 to 6 measurements \pm standard error. * - statistically significant difference compared to the DMEM-RPMI group ($p < 0.05$).

4.4 VPLIV PROBIOTIKOV LK7^R IN LGG NA MIKROBIOTO MEZENTERIČNIH VOZLOV, MLEČNE ŽLEZE IN MLEKA MIŠI

4.4.1 Spremljanje mase živali med poskusom

Živali smo med poskusom vsak dan tehtali (Slika 17). V obeh poskusih se masa med skupinami ni razlikovala. V prvem poskusu je bila povprečna teža samic ob pričetku parjenja višja, kakor v drugem poskusu (23,6g/21,1g). V poskusih je bilo opaziti rahel padec v teži (v povprečju za 2,4 %) na tisti dan, ko smo živali depilirali po predelu seskov. Živali so kotile 17-18 dni po uspešnem parjenju. Ker je v drugem poskusu ena samica iz skupine N mladiče zavrгла, ena pa splavila, smo imeli v skupini N4 samo dve živali, kar se odraža tudi v rahlem odstopanju povprečne mase skupine N od ostalih dveh skupin (Slika 17 B). Povprečne telesne mase in nihanja v masi med brejostjo in po kotitvi so primerljive z izmerjenimi vrednostmi za linijo FVB/N (Grubb in sod., 2014).



Slika 17: Povprečna masa živali med poskusom. (A) Povprečne mase živali v skupinah v prvem poskusu. (B) Povprečne mase živali v skupinah v drugem poskusu. N – kontrolna skupina, G – skupina hranjena z *Lactobacillus rhamnosus* GG, K – skupina hranjena z *Lactobacillus gasseri* K7, odpornim proti rifampicinu. Rezultati so podani kot povprečna vrednost 4 do 9 meritev \pm standardna napaka.

Figure 17: The average weight of the animals during the experiment. (A) The average weight of the animals in groups for the first experiment. (B) The average weight of the animals in groups for the second experiment. N – control group, G – group fed with *Lactobacillus rhamnosus* GG, K – group fed with rifampicin resistant *Lactobacillus gasseri* K7. Results are shown as the mean value of 4 to 9 measurements \pm standard error.

4.4.2 Prisotnost živih bakterij LGG in LK7^R ter njihove DNA v vzorcih odvzetih tkiv

Za ugotavljanje morebitne translokacije apliciranih bakterij in prisotnosti živih bakterij LGG in LK7^R v vzorcih smo sterilno odvzete vzorce najprej bogatili v hranljivem gojišču MRS, nato pa razmazali na trdno gojišče MRS in trdno gojišče MRS^R. Na izolirani DNA iz zraslih kolonij smo nato z uporabo za sev LGG in gasericin K7 A specifičnih ZO, v PCR preverjali prisotnost značilnih genskih determinant za oba seva. Ker se genski klaster za gasericin A lahko pojavi tudi pri drugih laktobacilih, smo v študiji uporabili LK7, ki je odporen proti rifampicinu (LK7^R). To nam je omogočilo dodatno selektivno določanje LK7 na MRS gojišču z dodanim rifampicinom (MRS^R).

4.4.2.1 Prisotnost živih bakterij LGG in LK7^R v vzorcih krvi

V prvem poskusu smo zrasle kolonije na MRS opazili pri 5-ih vzorcih krvi (miši N1/1, G1/2 G2/1 G4/1, K2/1), pri drugem pa je na MRS zraslo do največ 10 kolonij pri treh vzorcih krvi (K3/4, G3/6, G4/5). V obeh primerih pri vzorcih iz miši iz skupine K ni bilo prisotnih bakterij, odpornih proti rifampicinu. S PCR nismo potrdili prisotnosti LGG ali LK7^R v spirkih zraslih kolonij na MRS.

4.4.2.2 Prisotnost živih bakterij LGG in LK7^R ter njihove DNA v vzorcih mezenteričnih vozlov

Seznam vzorcev mezenteričnih vozlov iz poskusov, pri katerih so zrasle kolonije na MRS in MRS^R, so prikazani v Preglednici 12. V konzorcijih bakterij, spranih s trdnih gojišč MRS (spirki) vzorcev G3/1 in G4/2, smo potrdili prisotnost vrste *L. rhamnosus* in tudi seva LGG. Pri živali G3/1 smo prisotnost LGG potrdili tudi v vzorcu DNA, izolirane direktno iz tkiva. V spirkih iz MRS in MRS^R vzorca K1/2 smo potrdili tudi prisotnost vrste *L. gasseri* in seva LK7^R. V vseh ostalih vzorcih DNA, izoliranih iz spirkov in direktno iz tkiv mezenteričnih vozlov, nismo potrdili prisotnosti rodu *Lactobacillus*, vrst *L. rhamnosus* in *L. gasseri* ter sevov LGG in LK7^R.

Preglednica 12: Prisotnost kolonij na ploščah MRS in MRS z rifampicinom (MRS^R) po nacepljanju vzorcev mezenteričnih limfnih vozlov iz obeh poskusov. Vzorci so označeni po enačbi XN_1/N_2 , pri čemer X predstavlja oznako skupine (N – kontrolna skupina, G – skupina hranjena z *Lactobacillus rhamnosus* GG ali K – skupina hranjena z *Lactobacillus gasseri* K7, odpornim proti rifampicinu), N_1 predstavlja dan žrtvovanja (1 – 15. dan po paritvi, 2 – dan po kotitvi, 3 – 3. dan po kotitvi, 4 – 8. dan po kotitvi) in N_2 predstavlja številko paralelke. + – prisotne kolonije, - – ni prisotnih kolonij, / – ni podatka.

Table 12: The presence of colonies on MRS and MRS with rifampicin (MRS^R) plates from mesenteric lymph nodes samples from both experiments. Samples are marked by the formula XN_1/N_2 , where X stands for group code (N – control group, G – group fed with *Lactobacillus rhamnosus* GG or K – group fed with rifampicin resistant *Lactobacillus gasseri* K7), N_1 stands for the day of sacrifice (1 – 15 days after mating, 2 – day after delivery, 3 – 3 days after delivery, 4 – 8 days after delivery) and N_2 for number of the replicate. + – colonies present, - – colonies not present, / – no data.

Vzorec	1. poskus		Vzorec	2. poskus	
	MRS	MRS ^R		MRS	MRS ^R
N1/1	+	/	N3/2	-	/
N2/1	+	/	N3/3	+	/
N3/1	+	/	N3/4	-	/
N4/1	+	/	N3/5	+	/
N4/2	+	/	N4/3	+	/
G1/1	+	/	N4/4	-	/
G2/1	-	/	G3/3	-	/
G3/1	+	/	G3/4	+	/
G4/1	+	/	G3/5	+	/
G1/2	+	/	G3/6	+	/
G2/2	-	/	G3/7	+	/
G3/2	+	/	G4/4	+	/
G4/2	+	/	G4/5	-	/
G4/3	+	/	G4/6	+	/
K1/1	-	-	G4/7	+	/
K2/1	-	-	K3/3	-	-
K3/1	+	+	K3/4	+	+
K4/1	+	-	K3/5	-	-
K1/2	+	+	K3/6	+	-
K2/2	-	-	K4/3	+	-
K3/2	-	-	K4/4	+	-
K4/2	+	+	K4/5	+	+
			K4/6	+	+

4.4.2.3 Prisotnost živih bakterij LGG in LK7^R ter njihove DNA v vzorcih mlečne žleze

MKB, zrasle na trdnem gojišču MRS, smo pridobili iz vzorcev mlečnih žlez živali N3/1, N4/1, N4/2, G3/1, G4/1 in K4/2 iz prvega poskusa. V drugem poskusu sta zgolj vzorca N3/5 in G3/4 vsebovala žive MKB. Iz dobljenih spirkov smo pri vzorcih G3/1 in G4/1 potrdili prisotnost vrste *L. rhamnosus* in seva LGG. Pri vzorcu G3/1 smo prisotnost DNA rodu *Lactobacillus* in seva LGG potrdili tudi v DNA, izolirani direktno iz tkiva mlečne žleze. Pri živali G3/1 smo tako potrdili prisotnost LGG tako v mezenteričnih limfnih vozlih, kakor tudi v mlečni žlezi. Vzorec K4/2 je vseboval tudi MKB, odporne proti rifampicinu, vendar seva LK7^R nismo uspeli potrditi. V vseh ostalih vzorcih DNA, izoliranih direktno iz tkiv mlečnih žlez, nismo potrdili prisotnosti rodu *Lactobacillus*, vrst *L. rhamnosus* in *L. gasseri* ter sevov LGG in LK7^R.

4.4.2.4 Prisotnost živih LGG in LK7^R ter njihove DNA v vzorcih mleka

V prvem poskusu smo tako kot vzorce krvi, mezenteričnih vozlov in mlečne žleze, tudi del vzorca mleka bogatili v tekočem gojišču MRS in razmazali na MRS in MRS^R. Ker pri nobenem od vzorcev nismo uspeli pridobiti živih MKB, smo v drugem poskusu vzorce iz iste skupine združili in združen vzorec mleka uporabili za izolacijo DNA. V DNA, izolirani iz vzorcev mleka, sevov LGG in LK7^R nismo uspeli potrditi.

4.4.3 Vpliv probiotikov LGG in LK7^R na mikrobioto mezenteričnih limfnih vozlov, mlečne žleze in mleka

Proučevanje vpliva probiotikov LGG in LK7^R na mikrobioto mezenteričnih vozlov mlečne žleze in mleka je potekalo na tri načine. V prvem poskusu smo s PCR preverjali prisotnost DNA določenih rodov in vrst v vzorcih iz tkiv izolirane DNA. V drugem poskusu smo najprej ovrednotili število živih bakterij, ki so zrasle na neselektivnem gojišču (krvni agar). V vzorcih DNA, izoliranih direktno iz tkiv, smo s PCR preverili število kopij bakterijske 16S rDNA, iz katerega lahko ocenimo število bakterij v analiziranih vzorcih. Z metagenomsko analizo DNA vzorcev smo nato želeli pridobiti podrobnejši vpogled v sestavo mikrobiote mezenteričnih vozlov, mlečne žleze in mleka.

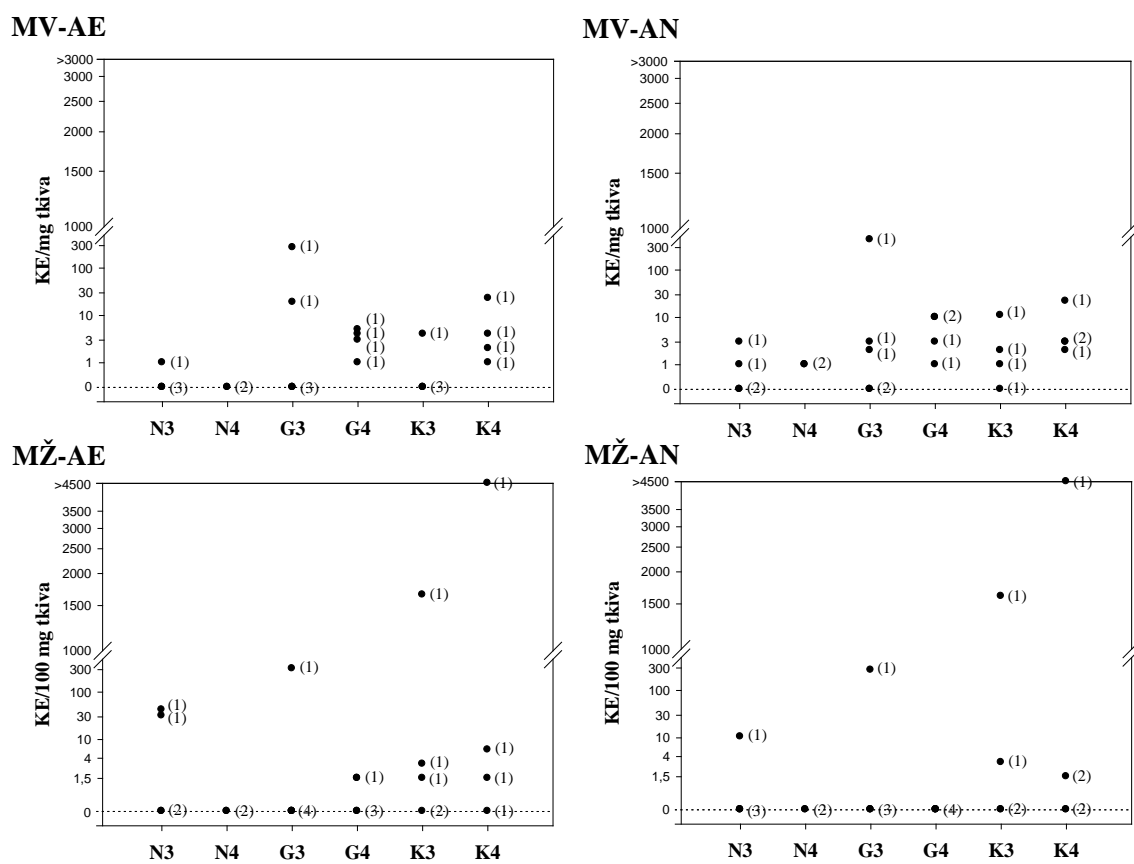
4.4.3.1 Prisotnost DNA določenih rodov in vrst v vzorcih mezenteričnih limfnih vozlov, mlečne žleze in mleka

Na vzorcih DNA, izoliranih direktno iz tkiv, pridobljenih v prvem poskusu, smo s PCR preverili prisotnost *Lactobacillus* spp., *L. gasseri*, *L. rhamnosus*, *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp. in *Staphylococcus* spp. Vrste rodu *Lactobacillus* smo zaznali samo v primeru vzorca DNA, izolirane iz mlečne žleze živali G3/1, pri ostalih vzorcih omenjenih vrst in rodov nismo potrdili. Dejstvo, da smo pri vzorcu mlečne žleze G4/1 ter pri vzorcih mezenteričnih limfnih vozlov G3/1 in K1/2 potrdili prisotnost živih LGG in LK7^R, nismo pa potrdili prisotnosti DNA rodu *Lactobacillus*, nakazuje na to, da sta bila seva prisotna v zelo majhnih količinah in smo njuno DNA najverjetneje izgubili tekom izolacije ali pa je bila koncentracija pod mejo detekcije.

4.4.3.2 Število živih bakterij v vzorcih mezenteričnih vozlov in mlečne žleze

V drugem poskusu smo vzorec homogenata tkiv mezenteričnih limfnih vozlov ali mlečnih žlez in njegovih 10-kratnih redčitev razmazali tudi na krvni agar (KA), ki je zelo hranljivo neselektivno gojišče. Plošče KA smo inkubirali aerobno in anaerobno, s čimer smo poskušali pridobiti informacijo o tipu bakterij, ki so prisotne v obeh tkivih. Rezultati štetja kolonij, izraslih na ploščah KA, so prikazani na Sliki 18.

Število kolonijskih enot (KE) pri pozitivnih vzorcih je bilo v posameznih skupinah zelo različno in je v večini primerov znašalo manj kot 10 KE na mg oz. 100 mg tkiva. V splošnem je bilo število pozitivnih vzorcev večje pri vzorcih mezenteričnih limfnih vozlov (pozitivnih 19 od 23-ih vzorcev), kot pri vzorcih mlečnih žlez (pozitivnih 12 od 23-ih vzorcev). V mezenteričnih limfnih vozlih je bilo opaziti večji delež vzorcev, pri katerih so bakterije zrasle pri anaerobnih pogojih (pozitivnih 18 od 23 vzorcev), medtem ko je bilo v mlečnih žlezah pogosteje opaziti rast bakterij pri aerobnih pogojih (pozitivnih 14 od 23 vzorcev). Tako pri vzorcih mezenteričnih limfnih vozlov kot vzorcih mlečnih žlez smo, razen pri mlečnih žlezah N4 (samo 2 vzorca), opazili več pozitivnih vzorcev 8. dan po kotitvi.

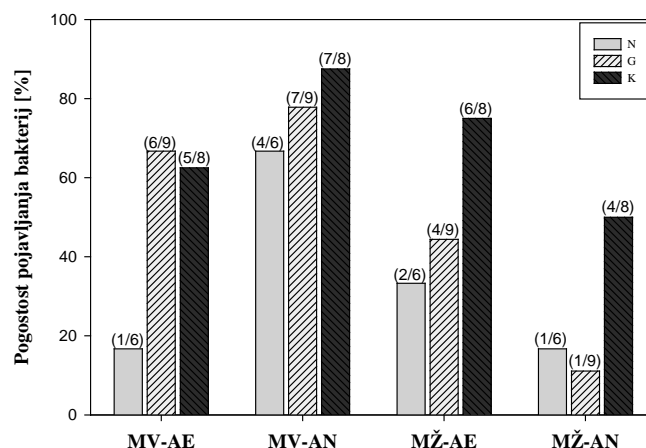


Slika 18: Število kolonijskih enot (KE), zrastle na krvnem agarju, pri aerobnih (AE) in anaerobnih (AN) pogojih, po nacepljanju mezenteričnih limfnih vozlov (MV) in mlečnih žlez (MŽ). Vzorci so označeni po enačbi XN_1 , pri čemer X predstavlja oznako skupine (N – kontrolna skupina, G – skupina hranjena z *Lactobacillus rhamnosus* GG ali K – skupina hranjena z rifampicin odporim proti *Lactobacillus gasseri* K7, odpornim proti rifampicinu) in N_1 predstavlja dan žrtvovanja (3 – 3. dan po kotitvi, 4 – 8. dan po kotitvi). V oklepaju je podano število živali.

Figure 18: Number of colony-forming units (KE) had grown under aerobic (AE) and anaerobic (AN) conditions from mesenteric lymph nodes (MV) and mammary glands (MŽ). Samples are marked by the formula XN_1 , where X stands for group code (N – control group, G – group fed with *Lactobacillus rhamnosus* GG or K – group fed with rifampicin resistant *Lactobacillus gasseri* K7) and N_1 stands for the day of sacrifice (3 – 3 days after delivery, 4 – 8 days after delivery). The number of animals is given in parenthesis.

Zaradi majhnega števila živali v posamezni skupini smo podatke za tretji in osmi dan žrtvovanja združili in predstavili na Sliki 19. Čeprav razlike v številu pozitivnih vzorcev med skupinami niso bile statistično značilne, kar je delno posledica majhnega števila živali v posamezni skupini, lahko opazimo manjši delež pozitivnih vzorcev (prisotnost bakterij) pri kontrolni (N) skupini in večji pri probiotičnih skupinah (G in K). To je še posebej očitno pri pogostosti pojavljanja bakterij, izraslih pri aerobnih pogojih, pri vzorcih mezenteričnih vozlov. Manjše razlike pa opazimo tudi med probiotičnima skupinama G in

K, in sicer v številu bakterijsko pozitivnih vzorcev mlečnih žlez. Delež pozitivnih vzorcev je večji pri skupini K.

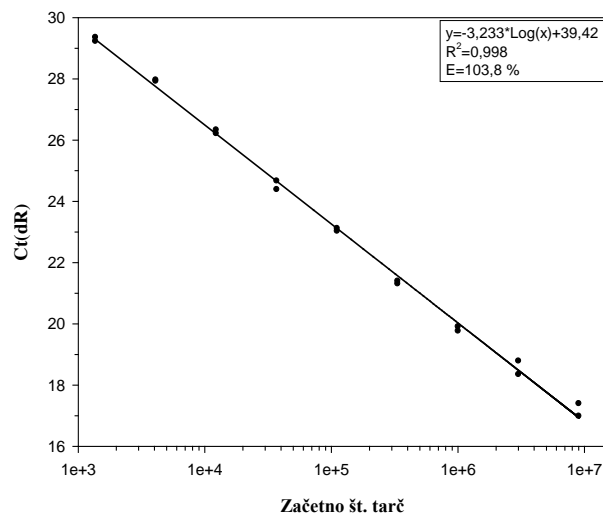


Slika 19: Delež (število) vzorcev mezenteričnih limfnih vozlov (MV) in mlečnih žlez (MŽ), pozitivnih na prisotnost bakterij, zraslih na krvnem agarju pri aerobnih (AE) in anaerobnih (AN) pogojih. Podatki vzorcev pridobljenih na 3. in 8. dan žrtvovanja so združeni. Število pozitivnih vzorcev od vzorcev vseh živali v skupini je podano v oklepaju. N – kontrolna skupina, G – skupina hranjena z *Lactobacillus rhamnosus* GG, K – skupina hranjena z *Lactobacillus gasseri* K7, odpornim proti rifampicinu.

Figure 19: Proportion (number) of samples of mesenteric lymph nodes (MV) and mammary glands (MW), positive for the presence of bacteria, grown on blood agar under aerobic (AE) and anaerobic (AN) conditions. Data samples obtained 3 and 8 day of sacrifice are combined. Number of positive samples against to total number of animals is given in parenthesis. N – control group, G – group fed with *Lactobacillus rhamnosus* GG, K – group fed with rifampicin resistant *Lactobacillus gasseri* K7.

4.4.3.3 Število kopij bakterijske 16S rDNA v vzorcih mezenteričnih vozlov, mlečne žleze in mleka

Število kopij bakterijske 16S rDNA v posameznih vzorcih smo določili na podlagi umeritvene premice, ki smo jo pripravili iz 3-kratnih redčitev DNA *Bacteroides thetaiotaomicron* DSM2079 (Slika 20). Glede na koncentracijo DNA (spektrofotometrična meritev) smo izračunali število kopij v standardnem vzorcu in 3-kratnih redčitvah. Koeficient regresijske korelacije (R^2) in učinkovitost pomnoževanja (E) dobljene umeritvene premice sta bila znotraj zahtevanih kriterijev ($R^2 \geq 0,985$, $E > 90\%$ in $E < 105\%$). Območje linearnosti je obsegalo od $9,09 \times 10^6$ do $1,38 \times 10^3$ kopij tarčne DNA. Disociacijska krivulja je vsebovala vedno samo en vrh pomnoževanja. Pri kontrolnem vzorcu brez matrične DNA pomnoževanja v območju umeritvene premice nismo zaznali.



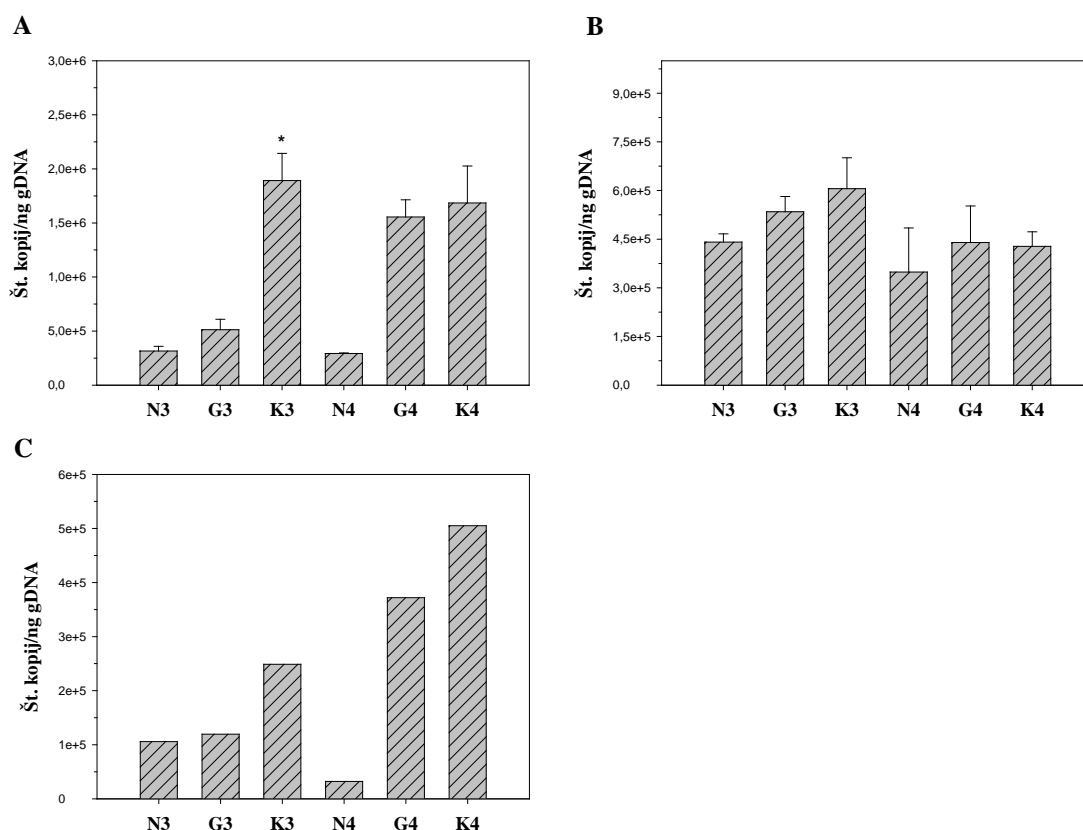
Slika 20: Povezava med praznim ciklom (Ct) in začetnim št. tarč 16S rDNA. Umeritvena premica je bila pripravljena iz 3-kratnih redčitev znane koncentracije DNA *Bacteroides thetaiotaomicron* DSM2079. Enačba regresijske premice, odgovarjajoči R^2 in učinkovitost pomnoževanja (E) so prikazani v okvirju.

Figure 20: Correlation between threshold cycle (Ct) and initial 16S rDNA target sequences. The calibration line was prepared from 3-fold dilutions of known concentration of *Bacteroides thetaiotaomicron* DSM2079 DNA. Equation of the regression line, the corresponding R^2 and efficiency (E) of amplification are shown in the frame.

Povprečno število kopij bakterijske 16S rDNA na mg izolirane genomske DNA iz vzorcev mezenteričnih limfnih vozlov, mlečnih žlez in mleka je prikazano na Sliki 21. Rezultati so prikazani neodvisno od velikosti tkiva, saj smo pri PCR reakciji vedno uporabili 10 ng genomske DNA. Rezultati so tako podani kot število kopij bakterijske DNA glede na celokupno izolirano DNA.

V skladu s štetjem aerobnih in anaerobnih bakterij na krvnem agarju je bilo pri vseh treh tipih vzorcev najmanjše št. kopij bakterijske 16S rDNA prisotno pri kontrolni skupini, tako tretji (N3) kakor tudi osmi dan (N4) po kotitvi. Očitnejše razlike so bile pri vzorcih mezenteričnih limfnih vozlov (Slika 21 A), kjer je bilo št. kopij pri LK7 skupini tretji dan po kotitvi (K3) statistično značilno večje v primerjavi s kontrolno skupino. Podobno razliko smo opazili pri obeh probiotičnih skupinah tudi osmi dan po kotitvi (G4, K4), vendar zaradi samo dveh živali pri kontrolni skupini osmi dan po kotitvi (N4) razlike niso bile statistično značilne.

Pri vzorcih mlečne žleze so bile razlike manj očitne, kazale pa so podobno sliko kot vzorci mezenteričnih vozlov, le da je bilo opaziti manjše število kopij 16S rDNA osmi dan po kotitvi v primerjavi s tretjim dnevom po kotitvi.



Slika 21: Povprečno število kopij bakterijske 16S rDNA v ng genomske DNA (gDNA), izolirane iz vzorcev mezenteričnih limfnih vozlov, mlečnih žlez in mleka. (A) Vzorci mezenteričnih limfnih vozlov. (B) Vzorci mlečnih žlez. (C) Vzorci mleka. Vzorci so označeni po enačbi XN_1 , pri čemer X predstavlja oznako skupine (N – kontrolna skupina, G – skupina hranjena z *Lactobacillus rhamnosus* GG, K – skupina hranjena z rifampicin odporne *Lactobacillus gasseri* K7) in N_1 predstavlja dan žrtvovanja (3 – 3. dan po kotitvi, 4 – 8. dan po kotitvi). Rezultati so podani kot povprečna vrednost 4-ih meritev \pm standardna napaka, razen pri N4 (2 meritvi) in vzorcih mleka, kjer so bili vzorci združeni pred izolacijo DNA, zato ni podanih standardnih napak. * - statistično značilna razlika glede na skupino N3 ($p < 0,05$).

Figure 21: Average number of copies of bacterial 16S rDNA in mg of genomic DNA (gDNA) isolated from samples of mesenteric lymph nodes, mammary glands and milk. (A) Samples of mesenteric lymph nodes. (B) Samples of mammary glands. (C) Milk samples. Samples are marked by the formula XN_1 , where X stands for group code (N – control group, G – group fed with *Lactobacillus rhamnosus* GG, K – group fed with rifampicin resistant *Lactobacillus gasseri* K7) and N_1 stands for the day of sacrifice (3 – 3 days after delivery, 4 – 8 days after delivery). Results are shown as the mean values of 4 measurements \pm standard error, except for N4 (2 measurements) and milk samples, where samples were pooled before DNA isolation, and therefore there is no standard error given. * - statistically significant difference compared to the N3 group ($p < 0,05$).

Da bi pridobili čim večjo koncentracijo DNA, smo vzorce mleka združili pred izolacijo DNA. Kljub temu smo uspeli izolirati zelo majhne količine genomske DNA (5-50 ng/ μ l), kar se odrazilo tudi v najnižjem št. kopij bakterijske rDNA v primerjavi z mezenteričnimi limfnimi vozli in mlečnimi žlezami. Razlike v številu kopij bakterijske rDNA vzorcev

mleka so bile med posameznimi skupinami podobne razlikam pri mezenteričnih limfnih vozlih, vendar zaradi združevanja vzorcev statistična analiza ni bila izvedljiva.

4.4.3.4 Metagenomska analiza 16S rDNA iz vzorcev mezenteričnih limfnih vozlov, mlečnih žlez in mleka

4.4.3.4.1 Analiza kvalitete sekvenciranja

Izmed 18-ih poslanih vzorcev izolirane DNA (6 iz mezenteričnih limfnih vozlov, 6 iz mlečnih žlez in 6 iz mleka) je bila pri štirih vzorcih DNA, izolirane iz mleka, količina pomnožene DNA premajhna za sekvenciranje, en vzorec DNA iz mleka pa je bil izločen iz analize zaradi neustreznosti dobljenih zaporedij. Z metagenomskim sekvenciranjem so iz preostalih 13-ih vzorcev pridobili 210848 odčitkov s srednjo dolžino 270 bp (Preglednica 13). Odčitke so nato selekcionirali glede na sledeče kriterije:

- dolžina odčitka brez črtne kode in ZO mora znašati vsaj 240 bp;
- odčitek lahko vsebuje največ 2 nedoločeni bazi (N);
- začetni del odčitka se skoraj popolnoma ujema s črtno kodo in ZO, kar pomeni, da je na tem področju dovoljeno največ eno neujemanje (insercija ali delecija).

Izbrane odčitke so razdelili v operativne taksonomske enote (OTU) glede na njihovo medsebojno filogenetsko razdaljo oziroma podobnost (Schloss in Handelsman, 2004):

- OTU = 0,2 (najmanj 80 % podobnost med odčitki znotraj OTU okvirno predstavlja deblo);
- OTU = 0,1 (najmanj 90 % podobnost med odčitki znotraj OTU okvirno predstavlja družino);
- OTU = 0,05 (najmanj 95 % podobnost med odčitki znotraj OTU okvirno predstavlja rod).

Glede na podatke iz baze sekvenc ribosomalnih RNA – RDB so posameznim odčitkom pripisali deblo, družino in rod (Wang in sod., 2007). Pri tem je potrebno poudariti, da so meje podobnosti, s katerimi določimo deblo, družino, rod in vrsto (OTU=0,2; 0,1; 0,05; 0,03), zgolj okvirne in jih uporabljamo zaradi lažje obdelave in primerjave rezultatov (Schloss in Handelsman, 2004). Iz Preglednice 13 je razvidno, da so v primerjavi z vzorci mlečnih žlez, vzorci mezenteričnih limfnih vozlov vsebovali večje število odčitkov, katerim ni bilo mogoče pripisati debela, saj je srednji odstotek neznanih odčitkov pri mezenteričnih limfnih vozlih znašal kar 41 %. Pri vseh vzorcih je opaziti občutno nižji odstotek odčitkov, katerim je bilo mogoče pripisati rod, zaradi česar smo podatke o pripisanih rodovih uporabljali zgolj za oceno najbolj zastopanih rodov znotraj posamezne družine.

Preglednica 13: Kvaliteta sekvenciranja in obdelave podatkov za vzorce mezenteričnih limfnih vozlov (MV), mlečnih žlez (MŽ) in mleka (ML) miši. Paralelni vzorci (n=4) iz posamezne skupine so bili združeni pred sekvenciranjem. Vzorci so označeni po enačbi XN_1 , pri čemer X predstavlja oznako skupine (N – kontrolna skupina, G – skupina hranjena z *Lactobacillus rhamnosus* GG, K – skupina hranjena z *Lactobacillus gasseri* K7, odpornim proti rifampicinu) in N_1 predstavlja dan žrtvovanja (3 – 3. dan po kotitvi, 4 – 8. dan po kotitvi). OTU – operativne taksonomske enote.

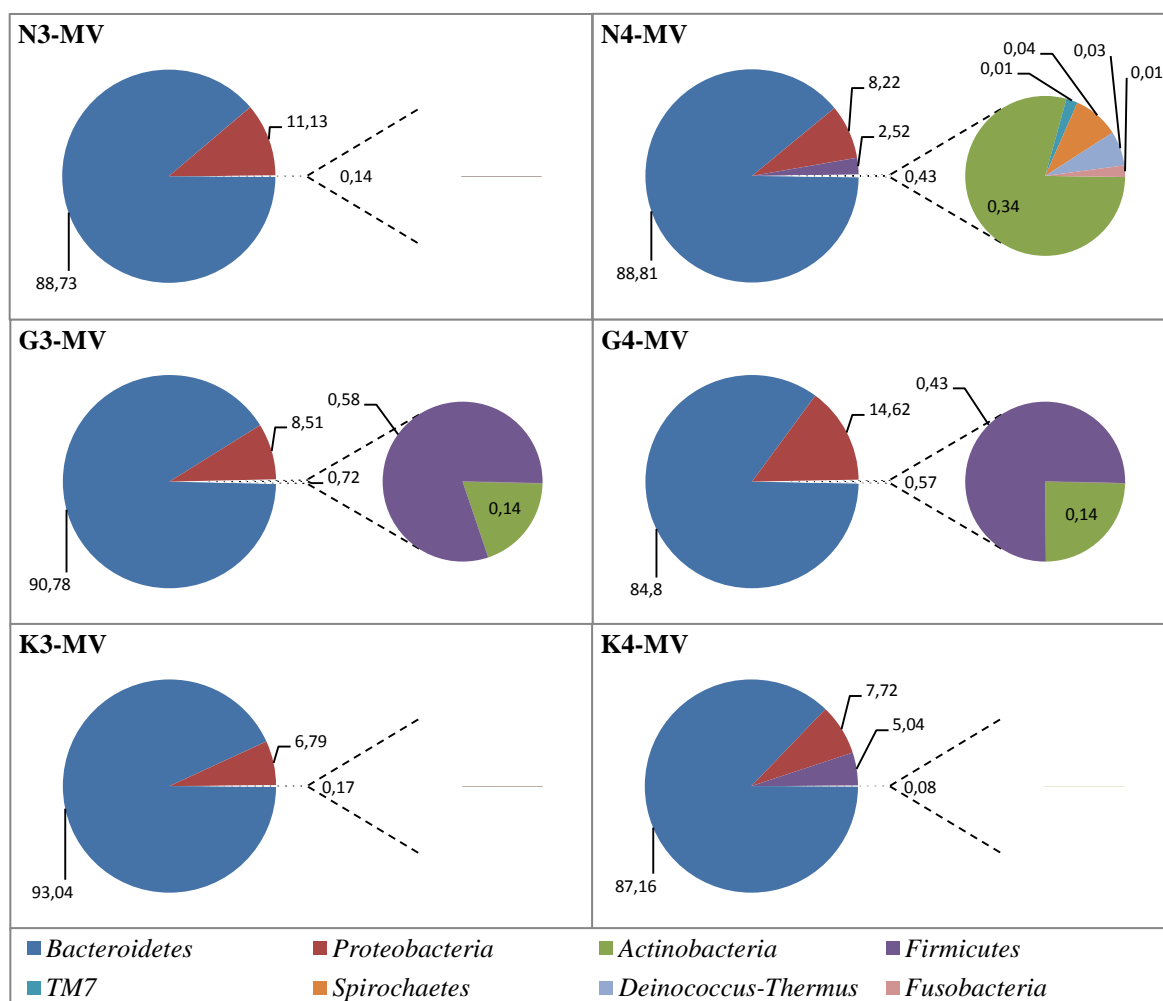
Table 13: The quality of sequencing and analysis of the data of mouse mesenteric lymph nodes (MV), mammary glands (MG) and milk (ML). Parallel samples (n = 4) from each group were pooled prior to sequencing. Samples are marked by the formula XN_1 , where X stands for group code (N – control group, G – group fed with *Lactobacillus rhamnosus* GG, K – group fed with rifampicin resistant *Lactobacillus gasseri* K7) and N_1 stands for the day of sacrifice (3 – 3 days after delivery, 4 – 8 days after delivery). OTU – operational taxonomic units.

Vzorec	Št. odčitkov	Št. odčitkov po selekciji	% neznanih odčitkov	% odčitkov pripisanih deblu (OTU=0,2)	% odčitkov pripisanih družini (OTU=0,1)	% odčitkov pripisanih rodu (OTU=0,05)
N3-MV	13230	8502	40,93	59,07	58,86	23,94
G3-MV	9766	4997	40,96	59,04	58,70	22,47
K3-MV	12338	4895	52,18	47,82	47,46	17,71
N4-MV	12284	8897	18,41	81,59	80,56	32,78
G4-MV	9454	3366	58,56	41,44	41,30	18,42
K4-MV	20067	11372	34,58	65,42	64,76	26,06
N3-MŽ	11419	6156	8,22	91,78	90,74	44,90
G3-MŽ	14056	11444	3,19	96,81	94,98	63,26
K3-MŽ	12591	9555	6,48	93,52	92,80	42,26
N4-MŽ	11680	7629	10,13	89,87	89,07	33,94
G4-MŽ	16423	13468	1,28	98,72	97,45	49,08
K4-MŽ	25491	24268	0,33	99,67	94,08	93,66
K4-ML	42049	40862	0,23	99,77	95,46	95,22

4.4.3.4.2 Analiza mikrobiote na nivoju debel

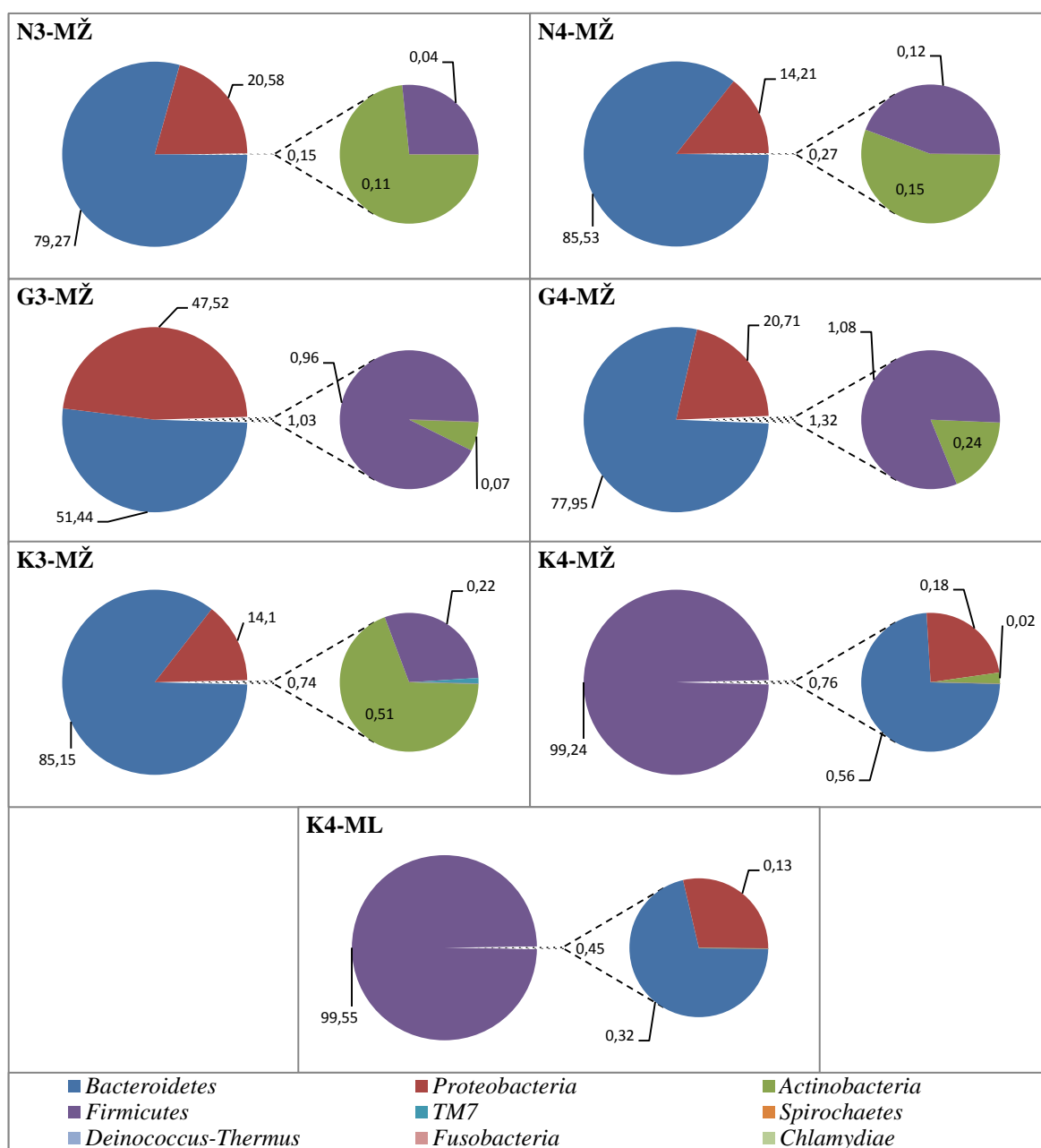
Pri vseh vzorcih mezenteričnih limfnih vozlov in mlečnih žlez (Sliki 22 in 23) smo opazili prevlado bakteroidet in proteobakterij, saj so skupno predstavljale najmanj 98 % celotne populacije. Izjemo predstavljata le vzorca mlečnih žlez in mleka iz skupine, hranjene z LK7 in žrtvovane 8. dan po kotitvi (K4-MŽ in K4-ML). Prevladovanje firmikut (predvsem rodu *Streptococcus*) v združenih vzorcih K4-MŽ in K4-ML lahko pripišemo velikemu številu bakterij v mlečni žlezi pri eni živali iz skupine K4 (Slika 18 MŽ-AE, MŽ AN). Tudi v združenem vzorcu mezenteričnih vozlov iste skupine je opazen povišan delež firmikut (predvsem streptokokov), česar pa nismo opazili pri konvencionalni mikrobiološki analizi, štetju KE na ploščah krvnega agarja (Slika 18 MV-AE, MV-AN).

Delež firmikut, med katere spadajo tudi laktobacili, je pri vzorcih mezenteričnih limfnih vozlov (Slika 22) iz skupine LGG tretji dan po kotitvi največji (0,58 %) in osmi dan po kotitvi najmanjši (0,43 %). Pri vzorcih mlečne žleze je v primerjavi s kontrolno skupino odstotek firmikut povečan pri obeh probiotičnih skupinah in pri obeh časih žrtvovanja (Slika 23).



Slika 22: Sestava mikrobiote mezenteričnih limfnih vozlov na nivoju debel. Rezultati so prikazani kot deleži (%) glede na celokupno število pripisanih odčitkov. Paralelni vzorci ($n=4$) iz posamezne skupine so bili združeni pred sekvenciranjem. Vzorci so označeni po enačbi XN_1 , pri čemer X predstavlja oznako skupine (N – kontrolna skupina, G – skupina hranjena z *Lactobacillus rhamnosus* GG, K – skupina hranjena z *Lactobacillus gasseri* K7, odpornim proti rifampicinu) in N_1 predstavlja dan žrtvovanja (3 – 3. dan po kotitvi, 4 – 8. dan po kotitvi).

Figure 22: Composition of the microbiota of mesenteric lymph nodes at the phylum level. Results are shown as proportions (%) based on the total number assigned reads. Parallel samples ($n = 4$) from each group were pooled prior to sequencing. Samples are marked by the formula XN_1 , where X stands for group code (N – control group, G – group fed with *Lactobacillus rhamnosus* GG, K – group fed with rifampicin resistant *Lactobacillus gasseri* K7) and N_1 stands for the day of sacrifice (3 – 3 days after delivery, 4 – 8 days after delivery).



Slika 23: Sestava mikrobiote mlečnih žlez in mleka na nivoju debel. Rezultati so prikazani kot deleži (%) glede na celokupno število pripisanih odčitkov. Paralelni vzorci ($n=4$) iz posamezne skupine so bili združeni pred sekvenciranjem. Vzorci so označeni po enačbi XN_1 , pri čemer X predstavlja oznako skupine (N – kontrolna skupina, G – skupina hranjena z *Lactobacillus rhamnosus* GG, K – skupina hranjena z *Lactobacillus gasseri* K7, odpornim proti rifampicinu) in N_1 predstavlja dan žrtvovanja (3 – 3. dan po kotitvi, 4 – 8. dan po kotitvi).

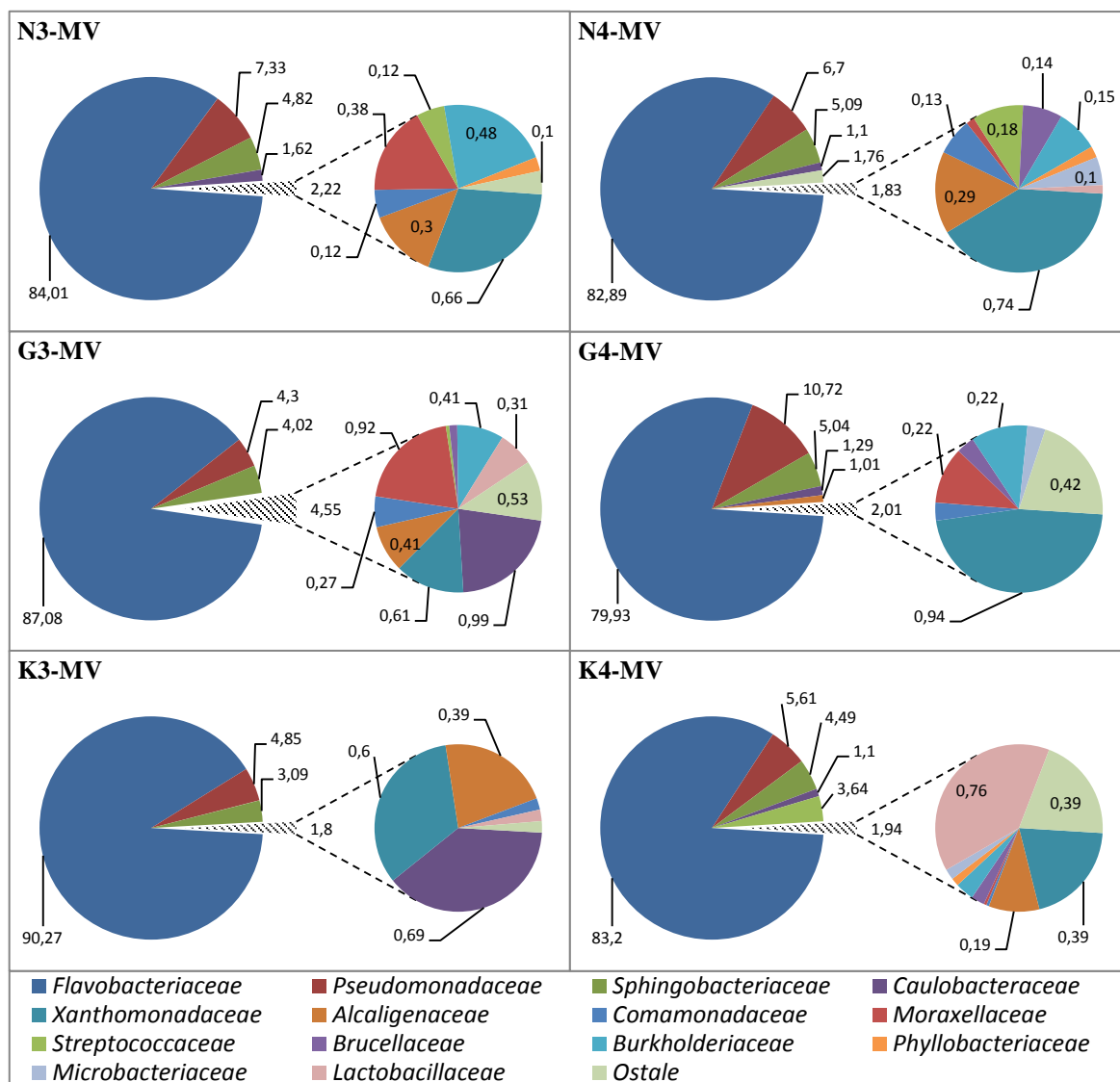
Figure 23: Composition of the microbiota of mammary glands and milk at the phylum level. Results are shown as proportions (%) based on the total number assigned reads. Parallel samples ($n = 4$) from each group were pooled prior to sequencing. Samples are marked by the formula XN_1 , where X stands for group code (N – control group, G – group fed with *Lactobacillus rhamnosus* GG, K – group fed with rifampicin resistant *Lactobacillus gasseri* K7) and N_1 stands for the day of sacrifice (3 – 3 days after delivery, 4 – 8 days after delivery).

4.4.3.4.3 Analiza mikrobiote na nivoju družin in rodov

Iz podatkov o družinah in rodovih je razvidno, da 6 družin (*Flavobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Sphingobacteriaceae*, *Caulobacteraceae*, *Xanthomonadaceae*, *Alcaligenaceae*) predstavlja več kot 95 % populacije, tako pri mezenteričnih limfnih vozlih, kakor pri mlečni žlezi (Slika 24 in 25). Med posameznimi vzorci so razmerja med družinami zelo podobna, razen pri obeh vzorcih mlečne žleze in mleka K4, ki so bili preraščeni s streptokoki. Kljub temu so razmerja znotraj ostanka podobna kot pri ostalih vzorcih (Slika 25 K4, K4-ML; mali krog). Najbolj zastopani rodovi (*Flavobacterium*, *Elizabethkingia*, *Pseudomonas*, *Pedobacter*, *Sphingobacterium*, *Brevundimonas*, *Stenotrophomonas*, *Rhodanobacter*, *Bordetella*) znotraj teh šestih družin so predstavniki aerobnih po Gramu negativnih bakterij, katerih običajna habitata sta predvsem voda in zemeljska prst. Njihova prisotnost je tako najverjetneje posledica kontaminacije vzorcev z aerosoli in vodo (PBS), ki smo jo uporabljali pri redčenju vzorcev. Pogosto je določen delež zaporedij, značilnih za te rodove, tudi posledica kontaminacije PCR reagentov (Grahn in sod., 2003; Spangler in sod., 2009; Tanner in sod., 1998). Pri globinskem sekvenciranju je namreč pojavljanje zaporedij, ki so posledica kontaminacije, neposredno povezano s koncentracijo tarčne DNA v vzorcih (Willner, 2012).

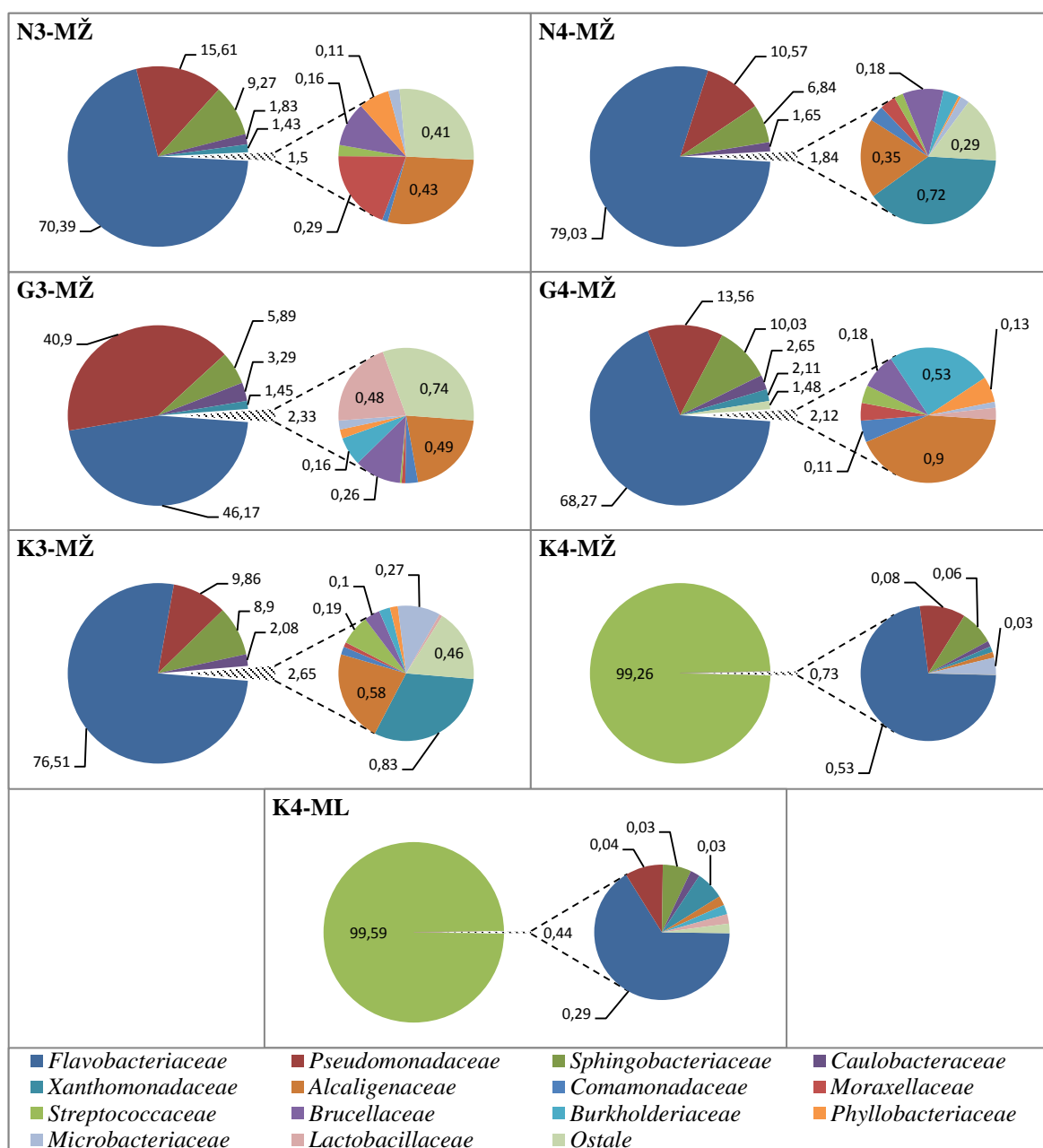
Glede na podatke iz literature smo naredili simulacijo sestave mikrobiote tako, da smo izločili družine, katerih običajni habitat (najbolj zastopanih rodov) so predvsem voda, morski sediment in zemeljska prst. Simulirana sestava mikrobiote je prikazana na Preglednici 14. Ostalo je zelo malo odčitkov (srednja vrednost je 62 odčitkov/vzorec, oziroma 6 družin/vzorec), ki so bili večinoma pripisani predstavnikom po Gramu pozitivnih anaerobov in fakultativnih anaerobov. Tako pri mlečni žlezi, kakor pri mezenteričnih limfnih vozlih, je ostalo več odčitkov pri vzorcih živali, žrtvovanih 8. dan po kotitvi. Prav tako imajo ti vzorci povečan delež striktnih anaerobov, kar je še posebej opazno pri vzorcih mlečnih žlez.

Vzorci mezenteričnih limfnih vozlov živali, žrtvovanih tretji dan po kotitvi (N3, G3, K3), so vsebovali malo odčitkov, pretežno pripisanih družinam MKB. Pri vzorcih mezenteričnih limfnih vozlov, odvzetih osmi dan po kotitvi, opazimo veliko pestrost pri kontrolni skupini (20 družin), med katerimi je četrtnina odčitkov pripadala predstavnikom striktnih anaerobov, največ družinama *Clostridiaceae* in *Porphyromonadaceae*. Pri skupini LK7 (K4-MV) opazimo povečano število odčitkov, pripisanih družinama *Streptococcaceae* in *Lactobacillaceae* (Preglednica 14).



Slika 24: Sestava mikrobiote mezenteričnih limfnih vozlov na nivoju družin. Rezultati so prikazani kot deleži (%) glede na celokupno število pripisanih odčitkov. Paralelni vzorci (n=4) iz posamezne skupine so bili združeni pred sekvenciranjem. Vzorci so označeni po enačbi XN_1 , pri čemer X predstavlja oznako skupine (N – kontrolna skupina, G – skupina hranjena z *Lactobacillus rhamnosus* GG, K – skupina hranjena z *Lactobacillus gasseri* K7, odpornim proti rifampicinu) in N_1 predstavlja dan žrtvovanja (3 – 3. dan po kotitvi, 4 – 8. dan po kotitvi).

Figure 24: Composition of the microbiota of mesenteric lymph nodes at the family level. Results are shown as proportions (%) based on the total number assigned reads. Parallel samples (n = 4) from each group were pooled prior to sequencing. Samples are marked by the formula XN_1 , where X stands for group code (N – control group, G – group fed with *Lactobacillus rhamnosus* GG, K – group fed with rifampicin resistant *Lactobacillus gasseri* K7) and N_1 stands for the day of sacrifice (3 – 3 days after delivery, 4 – 8 days after delivery).



Slika 25: Sestava mikrobiote mlečnih žlez in mleka na nivoju družin. Rezultati so prikazani kot deleži (%) glede na celokupno število pripisanih odčitkov. Paralelni vzorci (n=4) iz posamezne skupine so bili združeni pred sekvenciranjem. Vzorci so označeni po enačbi XN_1 , pri čemer X predstavlja oznako skupine (N – kontrolna skupina, G – skupina hranjena z *Lactobacillus rhamnosus* GG, K – skupina hranjena z *Lactobacillus gasseri* K7, odpornim proti rifampicinu) in N_1 predstavlja dan žrtvovanja (3 – 3. dan po kotitvi, 4 – 8. dan po kotitvi).

Figure 25: Composition of the microbiota of mammary glands and milk at the family level. Results are shown as proportions (%) based on the total number assigned reads. Parallel samples (n = 4) from each group were pooled prior to sequencing. Samples are marked by the formula XN_1 , where X stands for group code (N – control group, G – group fed with *Lactobacillus rhamnosus* GG, K – group fed with rifampicin resistant *Lactobacillus gasseri* K7) and N_1 stands for the day of sacrifice (3 – 3 days after delivery, 4 – 8 days after delivery).

Preglednica 14: Simulacija sestave mikrobiote mezenterični limfnih vozlov (MV), mlečnih žlez (MŽ) in mleka (ML) na nivoju družin po odstranitvi družin, katerih običajni habitat ni črevesje ali mleko. V preglednici je navedeno število odčitkov, pripisanih izbranim družinam. Paralelni vzorci (n=4) iz posamezne skupine so bili združeni pred sekvenciranjem. * - predstavniki striktnih anaerobov. Vzorci so označeni po enačbi XN_1 , pri čemer X predstavlja oznako skupine (N – kontrolna skupina, G – skupina hranjena z *Lactobacillus rhamnosus* GG, K – skupina hranjena z *Lactobacillus gasseri* K7, odpornim proti rifampicinu) in N_1 predstavlja dan žrtvovanja (3 – 3. dan po kotitvi, 4 – 8. dan po kotitvi).

Table 14: Simulation of microbiota composition of mesenteric lymph nodes (MV), mammary glands (MŽ) and milk (ML) at the family level after removal of families, whose usual habitat is not the intestine or milk. The table shows the number of readings assigned to selected families. Parallel samples (n = 4) from each group were pooled prior to sequencing. * - representatives of strict anaerobes, Samples are marked by the formula XN_1 , where X stands for group code (N – control group, G – group fed with *Lactobacillus rhamnosus* GG, K – group fed with rifampicin resistant *Lactobacillus gasseri* K7) and N_1 stands for the day of sacrifice (3 – 3 days after delivery, 4 – 8 days after delivery).

	N3-MV	G3-MV	K3-MV	N4-MV	G4-MV	K4-MV	N3-MŽ	G3-MŽ	K3-MŽ	N4-MŽ	G4-MŽ	K4-MŽ	K4-ML
<i>*Bacteroidaceae</i>				1							10		
<i>*Bifidobacteriaceae</i>										1	17		
<i>*Clostridiaceae</i>				16							1		
<i>*Coriobacteriaceae</i>											3		
<i>*Erysipelotrichaceae</i>											1		
<i>*Fusobacteriaceae</i>				1									
<i>*Lachnospiraceae</i>	1			7	1					1	47		
<i>*Porphyromonadaceae</i>				9	1				5		3		
<i>*Prevotellaceae</i>									1				
<i>*Rikenellaceae</i>	1				1						4		
<i>*Ruminococcaceae</i>				5				2		1	35		
<i>Actinomycetaceae</i>				1			1						
<i>Bacillaceae</i>				22									
<i>Corynebacteriaceae</i>				5		2			10	2			
<i>Enterobacteriaceae</i>			1	2			11		3	3	12		
<i>Enterococcaceae</i>		2		8				4					
<i>Lactobacillaceae</i>		9	1	2		56		52	2		8		4
<i>Leuconostocaceae</i>				1									
<i>Micrococcaceae</i>		1		4									
<i>Neisseriaceae</i>								1					
<i>Propionibacteriaceae</i>				1	1	1		2	1	1	3		
<i>Spirochaetaceae</i>				3									
<i>Staphylococcaceae</i>				3	1	17		40		1	1		
<i>Streptococcaceae</i>	6	1		13		268	2	1	17	3	12	22662	38845
<i>Veillonellaceae</i>				9									

Pri vseh vzorcih mlečnih žlez se pojavljajo *Streptococcaceae*. V primerjavi s kontrolno skupino so vzorci obeh probiotičnih skupin vsebovali večje število odčitkov tako 3. kakor tudi 8. dan po kotitvi. Poleg tega je bilo pri probiotičnih skupinah prisotno večje število družin iz skupine MKB. Ker so znotraj MKB nekateri rodovi pomembni pri razvoju črevesne mikrobiote, smo MKB analizirali tudi na nivoju rodov in predstavili na Preglednici 15.

Pri analizi rodov iz skupine MKB in bifidobakterij smo ugotovili, da z izjemo vzorca N4-MV, ostali kontrolni vzorci ne vsebujejo rodu *Lactobacillus* (Preglednica 15). Med vzorci mezenteričnih limfnih vozlov je večje število odčitkov za *Lactobacillus* opaziti pri skupini LK7, 8. dan po kotitvi, med vzorci mlečnih žlez pa pri skupini LGG, 3. dan po kotitvi. Vzorec iz LGG skupine (G4-MŽ) je vseboval tudi bifidobakterije, ki sicer ne spadajo v skupino MKB, so pa zelo pomembne pri vzpostavitvi homeostaze v črevesju. V skladu z analizo na nivoju debel so imeli vzorci mlečne žleze, mleka in mezenteričnih limfnih vozlov iz skupine LK7, 8. dan po kotitvi (K4), povečano število streptokokov.

Preglednica 15: Število odčitkov iz mezenteričnih limfnih vozlov (MV) in mlečnih žlez (MŽ), ki so bili pripisani rodovom mlečnokislinskih bakterij in *Bifidobacterium*. Paralelni vzorci (n=4) iz posamezne skupine so bili združeni pred sekvenciranjem. Vzorci so označeni po enačbi XN_1 , pri čemer X predstavlja oznako skupine (N – kontrolna skupina, G – skupina hranjena z *Lactobacillus rhamnosus* GG ali K – skupina hranjena z *Lactobacillus gasseri* K7, odpornim proti rifampicinu) in N_1 predstavlja dan žrtvovanja (3 – 3. dan po kotitvi, 4 – 8. dan po kotitvi).

Table 15: Number of reads from mesenteric lymph nodes (MV) and mammary glands (MŽ), that were assigned to genera of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium*. Parallel samples (n = 4) from each group were pooled prior to sequencing. Samples are marked by the formula XN_1 , where X stands for group code (N – control group, G – group fed with *Lactobacillus rhamnosus* GG or K – group fed with rifampicin resistant *Lactobacillus gasseri* K7) and N_1 stands for the day of sacrifice (3 – 3 days after delivery, 4 – 8 days after delivery).

	N3-MV	G3-MV	K3-MV	N4-MV	G4-MV	K4-MV	N3-MŽ	G3-MŽ	K3-MŽ	N4-MŽ	G4-MŽ	K4-MŽ	K4-ML
<i>Bifidobacterium</i>										1	16		
<i>Weisella</i>				1									
<i>Pediococcus</i>											4		
<i>Lactococcus</i>				2			2		4				
<i>Enterococcus</i>		2		8				2					
<i>Lactobacillus</i>		9	1	2		56		52	2		4		4
<i>Streptococcus</i>	6	1		11		263		1	13	3	12	22657	38828

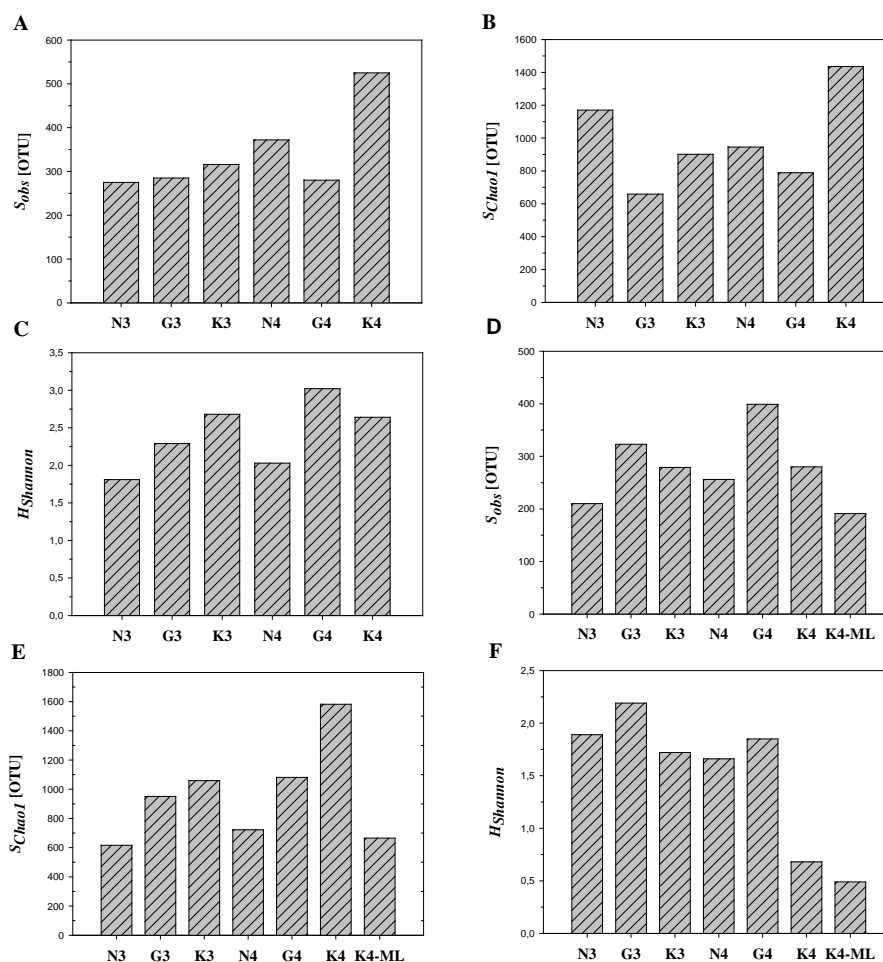
4.4.3.4.4 Analiza pestrosti mikrobiote

Pestrost mikrobiote v določenem vzorcu lahko opišemo z dvema parametroma: bogastvo vrst in pogostost oziroma enakomernost vrst. Vrstno bogastvo pomeni število različnih vrst (taksonov) v vzorcu, to je število prisotnih OTU. Vrstna enakomernost na drugi strani pa je merilo za enakost števila posameznikov znotraj vsake vrste (taksona), kar pomeni, da so v vzorcu z visoko enakomernostjo zaporedja enakomerno porazdeljena po različnih OTU. Podjetje, ki je izvedlo globinsko sekvenciranje, je v okviru bioinformacijske analize opravilo tudi analizo pestrosti mikrobiote na nivoju vrste (OTU=0,03; najmanj 97 % podobnost med odčitki znotraj OTU) in sicer s tremi parametri:

- celokupno število opaženih OTU – S_{obs} ;
- Chao1 indeks ocene bogastva, kjer dobimo oceno vseh predvidenih OTU v vzorcu – S_{Chao1} ;
- neparametrični Shannon-ov indeks pestrosti, ki ovrednoti entropijo taksonov v vzorcu oziroma s kakšno gotovostjo bomo napovedali takson na slepo izbranemu zaporedju iz vzorca - $H_{Shannon}$ (večji $H_{Shannon}$ pomeni enakomernejšo porazdelitev OTU med taksoni).

V vzorcih mezenteričnih limfnih vozlov iz tretjega dneva po kotitvi med skupinami ni očitnejših razlik v številu opaženih OTU, medtem ko osmi dan po kotitvi pri LGG skupini opazimo manjše število OTU, pri skupini LK7 pa večje (Slika 26 A), v primerjavi s kontrolno skupino. Izračun Chao1 indeksa ocene bogastva za vzorce mezenteričnih limfnih vozlov (Slika 26 B) pokaže, da je tretji dan ocenjeno število vseh vrst v vzorcu občutno manjše pri obeh probiotičnih skupinah. Takšnih razlik pri vzorcih, odvzetih osmi dan po kotitvi, ni bilo, saj je bila razlika pri LGG skupini občutno manjša, pri skupini LK7 pa je opaziti celo večje ocenjeno število vseh vrst. Aplikacija probiotičnih bakterij je v obeh probiotičnih skupinah povečala porazdeljenost med vrstami v posameznih vzorcih (večji $H_{Shannon}$) pri obeh časih žrtvovanja.

Pri vzorcih mlečnih žlez je uživanje obeh probiotikov povzročilo povečano število opaženih vrst (predvsem LGG) in večje ocenjeno število vseh vrst v vzorcih (predvsem LK7; Slika 26 D in E). Učinek aplikacije probiotičnih bakterij na porazdeljenost med vrstami ni bila tako izrazita. Kljub temu lahko opazimo rahlo povečan $H_{Shannon}$ pri LGG skupini pri obeh žrtvovanjih. Za skupino LK7 pri osmem dnevu žrtvovanja opazimo zelo nizki vrednosti $H_{Shannon}$ v mlečni žlezi in mleku, kar je posledica že omenjenega velikega števila bakterij (streptokokov) v mlečni žlezi pri eni živali iz skupine K4 (Slika 18 MŽ-AE, MŽ-AN).



Slika 26: Analiza pestrosti mikrobiote mezenteričnih limfnih vozlov (MV), mlečnih žlez (MŽ) in mleka (ML) na osnovi ocenjenega števila vseh vrst (indeks S_{Chao1}) in porazdeljenosti med vrstami (indeks $H_{Shannon}$). Število opaženih (S_{obs}) operativnih taksonomskih enot (OTU) v vzorcih MV (A) in vzorcih MŽ (D). Chao1 indeks ocene bogastva (S_{Chao1}) v vzorcih MV (B) in vzorcih MŽ (E). Neparametrični Shannon indeks pestrosti ($H_{Shannon}$) v vzorcih MV (C) in MŽ (F). Paralelni vzorci ($n=4$) iz posamezne skupine so bili združeni pred sekvenciranjem. Vzorci so označeni po enačbi XN_1 , pri čemer X predstavlja oznako skupine (N – kontrolna skupina, G – skupina hranjena z *Lactobacillus rhamnosus* GG, K – skupina hranjena z rifampicin resistant *Lactobacillus gasseri* K7, odpornim proti rifampicinu) in N_1 predstavlja dan žrtvovanja (3 – 3. dan po kotitvi, 4 – 8. dan po kotitvi).

Figure 26: Analysis of the diversity of microbiota in mesenteric lymph nodes (MV), mammary glands (MŽ) and milk (ML) based on the estimated total number of species (S_{Chao1} index) and distribution among species ($H_{Shannon}$ index). The number of observed (S_{obs}) operational taxonomic units (OTU) in samples of MV (A) and MŽ samples (D). Chao1 richness index estimates (S_{Chao1}) in samples of MV (B) and samples MŽ (E). Nonparametric Shannon diversity index ($H_{Shannon}$) in samples of MV (C) and MŽ (F). Parallel samples ($n=4$) from each group were pooled prior to sequencing. Samples are marked by the formula XN_1 , where X stands for group code (N – control group, G – group fed with *Lactobacillus rhamnosus* GG, K – group fed with rifampicin resistant *Lactobacillus gasseri* K7) and N_1 stands for the day of sacrifice (3 – 3 days after delivery, 4 – 8 days after delivery).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Glavni namen doktorskega dela je bil proučiti vpliv probiotikov na mikrobioto mlečne žleze in mleka. Glede na dosedanje raziskave lahko probiotiki vplivajo na mikrobioto materinega mleka na tri načine, ki so med sabo najverjetneje tesno povezani. Probiotiki, zaužiti med nosečnostjo in dojenjem, lahko vplivajo na imunski sistem matere, kar posredno vpliva na sestavo mikrobiote, prisotne v mlečni žlezi. Poleg tega lahko, podobno kot komenzalne bakterije (običajno prisotne v črevesni mikrobioti), tudi probiotične bakterije preidejo v mlečno žlezo preko zunanega vnosa ali pa po endogeni poti, preko z mukozo povezanega limfoidnega sistema, in s tem direktno vplivajo na sestavo mikrobiote mlečne žleze. Pri našem delu smo se osredotočili na proučevanje morebitnega direktnega prehoda probiotičnih bakterij v mlečno žlezo in na proučevanje sprememb mikrobiote mlečne žleze in mleka, ki jih posredno povzroči uživanje probiotika v času nosečnosti. Pri tem smo uporabili dva različna pristopa, ki spadata med priporočila za dokazovanje učinkovitosti določenega probiotika, in sicer: *in vitro* poskus in poskus *in vivo* na živalskem modelu (FAO/WHO, 2006).

Mehanizem morebitnega endogenega prenosa probiotičnih bakterij v mlečno žlezo smo proučevali na 3D modelu črevesnega epitelija tankega črevesa, kjer smo uporabili celično linijo H4-1 (ima lastnosti črevesnih enterocitov) in nezrele dendritične celice (nDC), izolirane iz periferne krvi zdravih prostovoljcev. Naš prvi cilj je bil ugotoviti, ali DC prevzemajo probiotične bakterije LK7 čez sloj epitelialnih celic H4-1 in koliko časa so bakterije sposobne preživeti znotraj DC. Pri tem smo želeli vključiti še vpliv hormonskih sprememb, ki so prisotne predvsem v zadnjem tromesečju nosečnosti in vplivajo na spremembo imunskega sistema matere, zato smo v zadnji ponovitvi poskusa mediju dodali aktivin A (ActA). Po ugotovitvah Della Bella in sod. (2011) naj bi prav povečane koncentracije ActA v zadnjem tromesečju nosečnosti vplivale na spremenjeno aktivacijo DC. Glede na neponovljivost rezultatov v poskusu prevzemanja LK7 skozi sloj epitelialnih celic smo se osredotočili na proučevanje vpliva ActA in probiotikov LK7, LGG in EcN, na aktivacijo nDC preko proteinskih kinaz p38 in ERK1/2, ki sta ključnega pomena pri zorenju DC in regulaciji aktivacije celic T.

Za ugotavljanje LK7 v vzorcih, ki smo jih pridobili v poskusu na brejih miših, smo najprej razvili metodo za ugotavljanje prisotnosti seva LK7 v kompleksnih vzorcih. V ta namen smo tudi z metodo PCR ovrednotili pojavljanje genov za oba bakteriocina (gaseicin K7 A in K7 B) v referenčnih sevih in blatu zdravih prostovoljcev, ki seva niso uživali.

V poskusu na brejih miših smo združili proučevanje morebitnega prehoda probiotikov LGG in LK7 v mlečno žlezo po endogeni poti in vpliva uživanja probiotikov na mikrobioto mlečne žleze in mleka. Poskus smo izvedli v dveh sklopih, pri čemer smo v prvem poskusu zajeli širše časovno območje (od 15-ega dneva po paritvi do osmega dneva po kotitvi), v drugem poskusu pa smo vzorčenje prilagodili glede na rezultate iz prvega.

5.1.1 Razvoj metode za ugotavljanje LK7 v kompleksnih vzorcih

Izhodišče razvoja metode za ugotavljanje prisotnosti seva *Lactobacillus gasseri* K7 v kompleksnih vzorcih je bilo poznavanje genskih determinant za dva specifična bakteriocina, gasicin K7A in gasicin K7B, ki ju proizvaja sev LK7 (Rogelj in Bogovič Matijašič, 2006). V preteklosti so Bogovič Matijašič in sod. (2007) z metodo PCR in uporabo ZO, specifičnih za gasicin K7 A ali K7 B, uspešno sledili sev LK7 med zorenjem sira, ki so ga izdelali iz mleka, v katerega so poleg osnovne starterske kulture dodali tudi sev LK7. Za zanesljivo ugotavljanje LK7 v kompleksnejših vzorcih, kot so mleko in blato, je bilo najprej potrebno ugotoviti, kako pogosto se geni za oba bakteriocina pojavljajo pri sorodnih vrstah, ki so tipični predstavniki humane mikrobiote. Pogostost pojavljanja genov za oba bakteriocina smo nato ugotavljali še v blatu zdravih prostovoljcev, ki seva niso uživali. V ta namen smo izdelali ZO, ki so bili specifični za vsak gen znotraj genskega klastra za gasicin K7 A in K7 B.

5.1.1.1 Pojavljanje genskih determinant za gasicina K7 A in K7 B v različnih referenčnih sevih iz rodu *Lactobacillus*

Pri testiranju pojavljanja genskih determinant za gasicin K7 A in K7 B v različnih referenčnih sevih sorodnih vrst iz rodu *Lactobacillus* smo ugotovili, da nekateri sevi vsebujejo samo dele genskega klastra za gasicin K7 A, kakor tudi za gasicin K7 B, ne pa celotnega genskega klastra (Preglednici 7 in 8). Ta pojav gre najverjetneje pripisati nepravilnemu parjenju zdrsnjenih vijačnic med podvojevanjem DNA (angl. *slipped strand mispairing*), oziroma nepravilnostim pri procesih rekombinacije (Treangen in sod., 2009). Pri tem je potrebno poudariti, da oba genska klastra obdajajo direktne ponovitve (neobjavljeni podatki), ki so navadno vpletene pri homologni rekombinaciji (Shen in Huang, 1986).

Poleg LK7 smo dobili pomnožke z vsemi ZO, specifičnimi za gene iz genskega klastra za gasicin K7 A, še pri sevih *Lactobacillus (L.) gasseri* FAM 17266, *L. gasseri* LF221 in *L. johnsonii* FAM 1158, iz česar lahko sklepamo, da ti sevi vsebujejo enak ali podoben celotni genski klaster za gasicin K7 A. To domnevo smo potrdili tudi tako, da smo

uporabili kombinacijo ZO GasA_1F in GasA_4R, s čimer smo pomnožili skoraj celotni genski klaster gasicina K7 A (neprikazani rezultati). Znano je, da sta nukleotidni zaporedji za gasicina K7 A in K7 B popolnoma enaki nukleotidnima zaporedjema za bakteriocina, ki ju izloča sev *L. gasserii* LF221, in sicer acidocin LF221 A in LF22 B (Zorič Peternel in sod., 2010). Seva LK7 in *L. gasserii* LF221 sta namreč oba izolata iz blata dojenčka, ki pripadata isti vrsti, pri čemer se razlikujeta v rastnih lastnostih, profilu plazmidov, profilu RAPD, nivoju produkcije bakteriocinov ter v optimalnih pogojih za rast in izločanje bakteriocinov (Rogelj in Bogovič Matijašič, 2006). Zelo zanimiva je prisotnost enakega ali podobnega genskega klastra za gasicin K7 A pri sevu *L. johnsonii* FAM 1158 (izolat iz sira), saj je med sevi, ki izločajo bakteriocine znotraj vrste *L. johnsonii*, do sedaj opisan zgolj sev *L. johnsonii* VPI 11088, ki izloča bakteriocin Laktacin F (Muriana in Klaenhammer, 1991). Sev *L. johnsonii* FAM 1158 tako predstavlja dobrega kandidata za nov sev iz vrste *L. johnsonii*, ki proizvaja bakteriocine, za kar pa bi bilo potrebno proučiti še morebitno izražanje in funkcionalnost gasicina. Za razliko od gasicina K7 A je bilo pomnoževanje z vsemi ZO, specifičnimi za gasicin K7 B, uspešno le pri sevu *Lactobacillus gasserii* LF221, zato smo v nadaljevanju za analizo pojavljanja genskih determinant za oba gasicina v mikrobioti blata zdravih prostovoljcev uporabili ZO GasA_2F/R in tudi GasB_4F/R.

5.1.1.2 Pojavljanje genskih determinant za gasicina K7 A in K7 B v mikrobioti blata zdravih prostovoljcev, ki niso uživali seva LK7

Skupna lastnost ZO GasA_2F/R in GasB_4F/R je, da oba ZO pokrivata regijo, ki kodira aktivno podenoto. Poleg tega je pomnoževanje z GasA_2F/R in GasB_4F/R sovpadalo s pomnoževanjem celotnega genskega klastra za gasicin K7 A in K7 B, iz česar smo sklepali, da lahko predstavljata determinanto za celotni genski klaster obeh gasicinov. Da izberemo primerne ZO za detekcijo LK7 v kompleksnih vzorcih, smo pri PCR, kjer smo kot matrično DNA uporabili DNA, izolirano iz blata 45-ih zdravih prostovoljcev, ki niso uživali LK7, uporabili šest različnih ZO. Poleg izbranih dveh, ki sta predstavljala tudi determinanto za celotni genski klaster, smo uporabili še štiri ZO, ki so jih v preteklih študijah že uporabili pri ugotavljanju nukleotidnega zaporedja za oba gasicina (Čanžek Majhenič in sod., 2003; Zorič Peternel in sod., 2010). Podobno kot pri rezultatih na referenčnih sevih, smo pri vzorcih DNA iz blata zdravih prostovoljcev zaznali samo dele genskega klastra za gasicin K7 A, kakor tudi gasicin K7 B (Preglednica 9). Objave o ugotavljanju pogostosti genov za bakteriocine v celotni mikrobni populaciji v blatu so zelo redke. Mathys in sod. (2007) so uporabili specifične ZO za gen pediocin A (*pedA*) in pokazali, da je gen *pedA* sorazmerno razširjen v mikrobioti novorojenčkov (pozitivnih 11 od 13-ih vzorcev blata), česar pa niso opazili v štirih vzorcih blata odraslih. V naši študiji

so bili določeni deli genskega klastra za bakteriocine LK7 prisotni v 4,4 do 22 % vzorcev (Preglednica 9).

Pri PCR z ZO GasA_2F/R in GasB_4F/R nismo dobili produkta, kar kaže na primernost ZO za določanje prisotnosti genskih klastrov za gassericin K7 A in K7 B. Ker bi neuspešnost pomnoževanja lahko bila posledica slabše učinkovitosti pomnoževanja in s tem višje meje detekcije, smo z metodo PCR v realnem času preverili učinkovitost pomnoževanja z obema ZO. Pri tem smo uporabili DNA iz čiste kulture LK7 in DNA, izolirane iz blata miši, z dodanim sevom LK7. Pomnoževanje z obema ZO je bilo učinkovito in specifično, vendar je bila meja detekcije z GasA_2F/R sedemkrat nižja ($9,5 \cdot 10^1$ KE/ml) v primerjavi z GasB_4F/R (Treven in sod., 2013).

Kot smo ugotovili iz študije na 45-ih LK7 negativnih vzorcih, je pojavljanje celotnega genskega klastra za LK7 zelo redek pojav tudi v tako pestri združbi kot je črevesna mikrobiota. Ker pa se geni za gassericin K7 A in K7 B pojavljajo tudi v sevu *L. gasseri* LF221, pojavljanje kodirajočih regij za oba gassericina še ne pomeni 100 % potrditev prisotnosti seva, ampak je to potrebno potrditi z uporabo ustreznih kontrol (npr. placebo) ali pa dodatnih selekcij (npr. uporaba seva odpornega proti rifampicinu), česar smo se poslužili tudi pri *in vivo* študiji na bregjih miših.

5.1.2 Prehajanje in preživetje bakterij LK7 skozi sloj epitelnih celic H4-1 in preživetje znotraj dendritičnih celic

3D modeli črevesnega epitelija predstavljajo alternativo poskusom na živalih in se vse pogosteje uporabljajo pri proučevanju vpliva bakterij na črevesje in imunski sistem (Cencič in Langerholc, 2010). Na modelu črevesnega epitelija, sestavljenega iz epitelnih celic H4-1 in nDC, smo želeli ugotoviti ali DC zajemajo testirane probiotične bakterije in ali je preživetje različnih sevov probiotičnih bakterij znotraj DC različno. Za endogeni prenos bakterij v mlečno žlezo naj bi bilo ključnega pomena, da DC prevzemajo bakterije skozi epitelni sloj in jih pri tem ne uničijo (Martin in sod., 2004). Obenem smo želeli dobiti dodatno informacijo, ali lahko visoke koncentracije ActA v krvi nosečnic v zadnjem tromesečju nosečnosti vplivajo na ta pojav.

5.1.2.1 Rast in diferenciacija celic H4-1 na filtrih s porami premera 3 μ m

Celice H4-1 so imele podobno kinetiko rasti na poroznih filtrih, kot so jo opazili pri celicah Caco-2 (Fajdiga, 2006), le da so dosegle nižjo TEER. TEER, ki so jo dosegle celice H4-1, je bila blizu izmerjenim vrednostim pri *ex vivo* meritvah električne upornosti na mišjem

debelem črevesu ($132 \Omega \cdot \text{cm}^2$) in podganjem tankem črevesu ($61 \Omega \cdot \text{cm}^2$), kar naj bi predstavljalo fiziološke vrednosti (Gitter in sod., 2000; Gitter in sod., 1998). Pri gojenju celic na poroznih filtrih smo se pogosto srečevali s težavo, da se je TEER zelo razlikovala med posameznimi filtri na isti plošči, pri čemer smo pri nekaterih filtrih izmerili upornost tudi do $1000 \Omega \cdot \text{cm}^2$.

Tvorba tesnih stikov preprečuje spontano prehajanje bakterij skozi epitelni sloj. Pri študijah invazivnosti bakterij na celicah Caco-2 je običajno pogoj za izvedbo poskusa, da epitelne celice dosežejo TEER vsaj $200 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (Burkholder in Bhunia, 2010). V našem poskusu je bila ta meja pri $130 \Omega \cdot \text{cm}^2$, saj nad to vrednostjo spontanega prehajanja bakterij LK7 nismo opazili (Preglednica 10). Kljub temu smo poskuse izvajali le v primerih, ko je bila TEER v vseh filtrih večja od $200 \Omega \cdot \text{cm}^2$.

5.1.2.2 Prehajanje bakterij LK7 skozi sloj epitelnih celic H4-1 in preživetje znotraj DC

Poskus prevzemanja LK7 skozi epitelni sloj in preživetje prevzetih bakterij znotraj DC smo izvedli v treh ponovitvah. Pri prvi ponovitvi smo pri dveh filtrih, kjer nismo nasadili DC na apikalno stran epitelija (kontrola), bakterije opazili v mediju na spodnji strani filtra že po dveh urah. Pojav je bil najverjetneje posledica predrtja epitelnega sloja pri menjavanju medija na zgornji in spodnji strani filtra, saj pri ostalih filtrih z in brez nasajenih DC, bakterij na spodnji strani filtra po dveh urah nismo opazili. Pri prvem eksperimentu smo, tri ure po dodatku LK7 na apikalno stran epitelnih celic H4-1, znotraj DC zaznali prisotnost živih bakterij (70 in 91 KE). Število bakterij v DC se je že po 18-ih urah zmanjšalo pod zanesljivo mejo detekcije (6 in 1 KE), po 24-ih urah pa živih bakterij znotraj DC nismo več zaznali (Preglednica 11), kar je bilo skladno s podatki iz literature. Rescigno in sod. (2001) poročajo, da se le majhen delež komensalnih bakterij, ki jih dodamo na apikalno stran epitelija (1 na 10000), prenese na spodnjo stran, pri čemer je bila polovica teh bakterij prostih v mediju, polovica pa znotraj ali tesno ob DC. Poleg tega DC veljajo za neučinkovite pri uničevanju bakterij, saj so komensalne bakterije *Enterobacter cloacae* zasledili v DC iz mezenteričnih limfnih vozlov še 60 ur po oralni aplikaciji (Macpherson in Uhr, 2004). Nasprotno pa je število živih bakterij nepatogenega seva *E.coli* znotraj DC znatno upadlo že 6 ur po direktni izpostavitvi DC (Schoppet in sod., 2000).

Dobljeni rezultati so nakazovali možen prehod LK7 skozi epitelni sloj znotraj DC, vendar nam rezultatov ni uspelo ustrezno potrditi. V dveh ponovitvah poskusa, kljub časovni prilagoditvi vzorčenja in dodatka ActA, ki naj bi zavrl popolno aktivacijo DC in povečal fagocitozno sposobnost nDC (Della Bella in sod., 2011), v DC nismo zaznali živih

bakterijskih celic. Razlogov za neponovljivost rezultatov je lahko več, najverjetneje pa je bil v našem primeru glavni vzrok v težavah s celično linijo, saj nismo uspeli nagojiti celične linije do ustrezne transepitelijske električne upornosti (TEER). Višja TEER, ki smo jo dobili, in posledično večja diferenciranost epitelnih celic H4-1 je najverjetneje onemogočila DC, da bi prevzele bakterije LK7 na apikalni strani. Pri drugi in tretji ponovitvi je povprečna TEER na dvanajsti dan gojenja na poroznih filterjih znašala 291 in 578 $\Omega \cdot \text{cm}^2$, kar je več kakor pri prvi ponovitvi (264 $\Omega \cdot \text{cm}^2$). Možno je, da je celična linija tvorila kriptam podobno strukturo, ki je onemogočila prehajanje bakterij preko epitelnega sloja. Gitter in sod. (2000) namreč navajajo, da so imele kripte debelega črevesa miši več kot 3-krat višjo TEER (429 $\Omega \cdot \text{cm}^2$) v primerjavi z ostalim epitelijem. Za kripte je značilna predvsem izločalna funkcija, kjer, razen v patoloških primerih, bakterije običajno niso prisotne (Mansfield in Urban, 1996). Drugi možen vzrok bi lahko bil v nDC, ki smo jih dobili od drugega darovalca. Znano je, da se lastnosti DC med darovalci lahko zelo razlikujejo, vendar velja prevzemanje bakterij preko epitelija in aktivacija nDC za osnovni imunski proces (Rescigno in sod., 1999), ki se naj ne bi razlikoval med darovalci v takšni meri, zato se nam ta vzrok zdi manj verjeten.

Iz navedenih rezultatov ne moremo zagotovo potrditi prve zastavljene hipoteze, da DC prevzemajo LK7 skozi epitelij celic H4-1. Ker smo imeli težave z zagotavljanjem primerljive TEER med posameznimi ponovitvami, smo ocenili, da bi bilo ponavljanje eksperimentov še z ostalimi probiotičnimi bakterijami časovno prezahtevno. Tako nam zaradi težav s celično linijo ni uspelo potrditi druge zastavljene hipoteze in proučiti vpliva različnih probiotičnih sevov na sposobnost njihovega preživetja znotraj dendritičnih celic. Odločili smo se, da se raje posvetimo proučevanju možnih signalizacijskih poti, torej ugotavljanju vpliva probiotikov in ActA na aktivacijo p38 in ERK1/2 v nDC. V tem poskusu smo uporabili filtre z manjšimi porami (0,4 μm), saj smo na njih pričakovali stabilnejšo rast celic H4-1.

5.1.3 Vpliv probiotikov in aktivina A na aktivacijo kinaz P38 in ERK1/2 v dendritičnih celicah

Odločili smo se za proučevanje aktivacije proteinskih kinaz p38 in ERK1/2, ker obstajajo indici, da njuna aktivacija napoveduje tip aktivacije DC in njihovo sposobnost stimulacije celic T (van Riet in sod., 2009). Ker na stimulacijo celic T vpliva še veliko drugih dejavnikov, smo se zavedali, da je pri interpretaciji tovrstnih rezultatov potrebna še posebna previdnost.

Nezrele dendritične celice (nDC) so suspenzijske celice, ki se ob stimulaciji/aktivaciji pritrjujejo na podlago in kasneje med nadaljnjim zorenjem zopet odlepijo (Burns in sod., 2004). Pri pripravi našega 3D modela smo nDC nasadili na bazolateralno stran epitelija tako, da smo filtre obrnili in 3 ure pustili, da so se nDC pritrjile na podlago. Predvidevali smo, da pri tem poteče vsaj delna aktivacija nDC. Aktivacija p38 in ERK1/2 poteka sorazmerno hitro, saj se začne premeščanje aktiviranih molekul v jedro že 15 minut po stimulaciji ter nadaljuje sorazmerno s trajanjem stimulacije (Costa in sod., 2006; Gong in sod., 2010). V poskusu smo na apikalno stran epitelija dodali probiotike ali LPS za dve uri, saj smo pričakovali, da bo v tem času stimulacija dosegla DC na bazolateralni strani epitelija in povzročila aktivacijo p38 in ERK1/2.

Izkazalo se je, da je pritrjevanje nDC na obrnjene porozne filtre povzročilo aktivacijo tako p38 kakor tudi ERK1/2 ter povečalo vrednosti ostalih merjenih parametrov (Slika 14). Najverjetnejši razlog za aktivacijo je prisotnost epitelija na zgornji strani filtra, ki lahko izloča različne aktivacijske molekule (Sanz in De Palma, 2009), ki so povzročile pritrnitev nDC. Nekoliko povečano aktivacijo p38 pri nDC (Slika 14 A, nDC) gre pripisati posledicam odmrzovanja celic, saj je znano, da mehanski stres povzroči povečano aktivacijo p38 in zmanjšano aktivacijo ERK1/2 (Shiratsuchi in Basson, 2005).

5.1.3.1 Vpliv probiotikov na aktivacijo p38 in ERK1/2 v dendritičnih celicah

Tudi pri gojenju H4-1 na filtrih premera 0,4 μm smo imeli težave z različno TEER med posameznimi filtri na isti plošči, kar se je najverjetneje odrazilo v precejšnjih standardnih napakah pri meritvah aktivacije p38 in ERK1/2 in posledično statistično neznačilnih razlikah. Kljub temu se je izkazalo, da je dodatek LPS povzročil močno aktivacijo p38 in ERK1/2 (Slika 15). Stimulacija epitelnih celic z EcN je povzročila aktivacijo p38 in ERK1/2 na istem nivoju kakor LPS, medtem ko je bila stimulacija s probiotikoma LGG in LK7 občutno nižja. V skladu z našimi opažanji Giahi in sod. (2012) poročajo, da je stimulacija nDC s toplotno inaktiviranim sevom LGG, povzročila znižanje nivoja izražanja p38 v primerjavi z LPS. TLR4, preko katerih poteka tudi aktivacija p38 (Slika 1), običajno prepoznava LPS po Gramu negativnih bakterij, TLR2 pa lipoteihoično kislino in nekatere druge lipoproteine iz po Gramu pozitivnih bakterij (Dogi in sod., 2008; Elson in sod., 2007; Pietrocola in sod., 2011). Za EcN je znano, da lahko stimulira aktivacijske poti, ki so odvisne od TLR4 in tudi od TLR2 (Grabig in sod., 2006), medtem ko pri LGG poteka stimulacija makrofagov predvsem preko TLR2 (Miettinen in sod., 2008). Pričakovali bi, da bo stimulacija z LGG povzročila večjo aktivacijo ERK1/2 kakor LPS, vendar je v našem poskusu stimulacija epitelnih celic z LPS povzročila večjo aktivacijo ERK1/2 v DC kakor

stimulacija z LGG. Shi in sod. (2002) poročajo, da lahko tudi LPS povzroči aktivacijo ERK1/2 v makrofagih.

Indeks premestitve aktiviranih molekul p38 ali ERK1/2 (IP_{p-p38} in $IP_{p-ERK1/2}$) je sicer neposredno povezan z aktivacijo/fosforilacijo, vendar nam podatek o premestitvi natančneje pokaže učinek aktivacije, saj je premestitev ključna za efektorsko delovanje proteinskih kinaz (Costa in sod., 2006; Gong in sod., 2010). Pri IP_{p-p38} je bilo opaziti podoben trend, kakor pri merjenju povprečne intenzitete fluorescence (Slika 15 A in C), pri $IP_{p-ERK1/2}$, pa je bil, presenetljivo, trend podoben kakor pri perimetru (Slika 15 D in F). Ti rezultati nakazujejo, da je signalizacija preko ERK1/2 vplivala na razraščeno celic (perimeter), česar pri pregledu literature nismo zasledili. Signalizacija preko ERK1/2 je sicer ključna za proliferacijo in povečanje števila dendritičnih izrastkov pri nevronskih celicah (Alonso in sod., 2004), vendar podobnih podatkov za DC nismo našli.

Pričakovali smo, da bo razmerje med p-ERK1/2 in p-p38 pri stimulaciji z LPS manjše (manj p-ERK1/2), kakor pri stimulaciji s probiotiki, saj naj bi stimulacija z LPS preko TLR4 stimulirala predvsem p38 (glej poglavje 2.1.1.2). Izkazalo se je, da smo pričakovan trend opazili samo pri razmerju premeščenih p-ERK1/2 in p-p38 (Slika 15 E), ne pa pri razmerju intenzitet p-ERK1/2 in p-p38 (ni prikazano). Opažena razlika bi lahko bila posledica hitrejšega potovanja p-p38 v jedro pri stimulaciji z LPS v primerjavi s p-ERK1/2 in s tem manjše razmerje med premeščenimi p-ERK1/2 in p-p38. Pri tem ne smemo spregledati tudi dejstva, da gre lahko v našem primeru še za dodatni vpliv epitelijskega tkiva, ki prav tako igra pomembno vlogo pri imunskem odzivu v črevesju in ga v našem poskusu nismo ovrednotili.

5.1.3.2 Vpliv aktivina A na aktivacijo p38 in ERK1/2 v dendritičnih celicah

Delovanje ActA je odvisno od njegove koncentracije, saj naj bi na DC v nizkih koncentracijah deloval vnetno, pri visokih koncentracijah pa protivnetno (Hedger in sod., 2011; Keelan in sod., 2000). Pri proučevanju vpliva ActA na DC smo tako po zgledu ostalih študij (Della Bella in sod., 2011; Segerer in sod., 2008) uporabili razmeroma visoko koncentracijo ActA (100 ng/ml). Iz študij na nediferenciranih epitelih IEC-6 je razvidno, da ActA vpliva predvsem na proliferacijo in diferenciacijo epitelih celic, kar je ključnega pomena pri celjenju ran (Dignass in sod., 2000; Sonoyama in sod., 2000). Ker poročil o vplivu ActA na integriteto in TEER epitelih celic nismo našli, smo preverili, ali ActA vpliva na TEER diferenciranih celic H4-1. Po pričakovanjih smo glede na dobljeni rezultat (Slika 14) in opazovanje celic pod svetlobnim mikroskopom ugotovili, da ActA v času dveh ur ne vpliva na integriteto in TEER epitelijskega tkiva.

Presenetljivo se je vpliv ActA pokazal predvsem v premestitvi p-p38 in p-ERK1/2 (razmerje $IP_{p-ERK1/2}/IP_{p-p38}$) v jedro in perimetru DC. Pričakovali smo, da bo ActA vplival predvsem v smeri povečane aktivacije ERK1/2 in povečanja razmerja med p-ERK1/2 in p-p38 ter s tem k Th2 tipu aktivacije. Izkazalo se je, da je bil učinek ActA odvisen predvsem od povzročitelja stimulacije, saj pri LPS praktično nismo opazili učinka, kar potrjuje opažanja, da ActA tudi v času pozne nosečnosti ne vpliva na osnovni obrambni mehanizem pri stimulaciji z LPS (Della Bella in sod., 2011). Pri stimulaciji DC z EcN je ActA učinkoval tako, da je znižal indeks premestitve obeh kinaz in s tem ni vplival na razmerje. Obratno pa je pri po Gramu pozitivnih probiotikih (predvsem LGG) povečal indeks premestitve p-ERK1/2 v primerjavi s p-p38 in posledično njuno razmerje, ki je prišlo na raven kontrolne skupine. Segerer in sod. (2008) navajajo, da se vpliv ActA kaže predvsem v večjem številu podosomov kot posledica nepopolnega zorenja. V našem poskusu smo povečan perimenter zaznali zgolj pri LGG in LPS, medtem ko je bil pri EcN in LK7 manjši ali nespremenjen. Zelo majhna razraščanost DC (perimeter) je najverjetneje tudi posledica uporabe tripsina, s katerim smo odlepili celice iz filtrov.

Morebitna aktivacija p38 in ERK1/2 v odlepljenih DC bi lahko pomenila, da so na spodnjo stran epitelija prešle različne aktivacijske molekule ali pa da so DC dozorele do te mere, da so se že odlepile od podlage. Zato smo morebitno aktivacijo p38 in ERK1/2 spremljali tudi v odlepljenih DC in rezultate primerjali z aktivacijo MAPK v pritrjeni frakciji DC (Slika 16). Ugotovili smo, da je bil za aktivacijo p38 in ERK1/2 potreben neposreden stik med DC in epitelinimi celicami, saj so bile nepritrjene DC aktivirane na istem nivoju, kot so bile aktivirane pritrjene DC v primeru, ko na apikalni strani ni bilo prisotnih bakterij ali LPS.

Rezultati nakazujejo, da je aktivacija p38 in ERK1/2 odvisna od povzročitelja stimulacije, saj sta probiotika LGG in LK7 usmerila stimulacijo DC v smeri ERK1/2 signalne poti, EcN pa v smeri p38. Vpliv ActA se kaže predvsem na nivoju premeščanja aktiviranih molekul v jedro, kjer se zopet pojavijo razlike med probiotiki, saj po Gramu pozitivna LGG in LK7 nakazujeta povečano aktivacijo ERK1/2. To potrjuje domnevo, da ActA spremeni imunski odziv DC proti Th2 celični aktivaciji, sprememba pa je odvisna predvsem od povzročitelja stimulacije. Ker smo v našem poskusu uporabili nDC zgolj enega darovalca v treh tehničnih ponovitvah, pri čemer smo pri nekaterih vzorcih izgubili eno ponovitev (LPS), statistično naših domnev nismo mogli potrditi. Da bi potrdili naše domneve, bi bilo potrebno poskus ponoviti še na vsaj dveh darovalcih, kar pa zaradi časovnih omejitev doktorskega študija ni bilo izvedljivo.

5.1.4 Vpliv probiotikov LK7^R in LGG na mikrobioto mezenteričnih limfnih vozlov, mlečne žleze in mleka miši

Vse več raziskav potrjuje, da uživanje probiotikov med nosečnostjo in dojenjem ugodno vpliva ne samo na zdravje nosečnice/matere, ampak tudi na zdravje in razvoj novorojenčka (Rautava in sod., 2012c). S poskusom na brejih miših smo želeli proučiti predvsem mikrobiološki vidik vpliva uživanja probiotikov v času nosečnosti in po njej, na mikrobioto mlečne žleze in mleka. Želeli smo odgovoriti na vprašanje, ali uživanje probiotičnih sevov LGG in LK7 v času brejosti in po njej vpliva na mikrobiološko sestavo mezenteričnih limfnih vozlov in mlečne žleze miši. Pri tem smo proučevali tudi možnost endogenega prehoda LGG in LK7 v mlečno žlezo in mleko.

Inbridirana linija miši FVB/N je posebej primerna za takšne poskuse, saj je zanjo značilna dobra plodnost, velika gnezda in posledično dobra mlečnost (Silver, 1995; Taketo in sod., 1991). Ta lastnost nam je olajšala pridobivanje zadostnih količin vzorcev mleka ter omogočila izpeljavo študije na manjšem številu poskusnih živali. Ker smo želeli v največji možni meri omejiti prenos bakterij v mlečno žlezo po zunanji poti, preko kontaminacije seskov, smo miši nastanili na gnezditvene mreže, ki se običajno uporabljajo za privajanje živali na metabolne kletke. Ker so miši koprofagi, ki jejo lastno blato tudi direktno po izločanju, smo s tem le delno preprečili stik živali z njihovimi iztrebki (Ebino in sod., 1988). Gnezditvene mreže predstavljajo potencialen stres za miši, saj jim ne omogočajo naravnega obnašanja in postavitve primerne gnezda. Da bi zmanjšali stres, ki ga povzročajo tovrstne mreže, smo vanje vgradili mišje hiške s plastificiranim dnom in bombažno blazinico (Slika 9). Tako smo jim omogočili, da se vedejo naravno in si lahko izdelajo primerno gnezdo. Ugotovljeno je bilo, da podobne gnezditvene posodice ne vplivajo na funkcijo metabolne kletke, saj samice blato in urin izločajo zunaj gnezditvene posodice (v preostali del kletke) in s tem ohranjajo svoje gnezdo čisto (Plum in sod., 1999), kar smo opazili tudi v našem poskusu. Miši smo 12-ti dan po paritvi depilirali po področju mlečnih žlez in seskov, s čimer smo zmanjšali možnost kontaminacije pri odvzemu vzorcev mleka in raztelešenju živali. Kljub temu, da veljajo miši FVB/N za zelo reproduktivno linijo, pri kateri je uspešnost paritve običajno večja od 90 % (Silver, 1995), je bila uspešnost paritev sorazmerno nizka (v povprečju 43 %), kar je podaljšalo izvajanje poskusa. Najverjetnejši razlog za to so gnezditvene mreže, čeprav smo samce in samice nanje postopoma privajali 14 dni pred paritvijo.

Samice, pri katerih smo opazili vaginalni čep, smo razdelili v tri skupine in jim glede na skupino, od 7. dneva po paritvi naprej, dnevno aplicirali rekonstituirano mleko z ali brez dodatka probiotikov LK7^R in LGG. Sev LK7^R je odporen proti rifampicinu, kar nam je omogočilo dodatno selekcijo pri določanju prisotnosti LK7^R s PCR, specifično za genski

klaster gasicin K7 A. Dnevno dozo probiotikov (povprečno $3,6 \cdot 10^8$ KE LK7^R, $4,1 \cdot 10^8$ KE LGG), ki smo jo izbrali glede na prejšnje poskuse na miših (Ji in sod., 2012; Kandasamy in sod., 2011), smo aplicirali z orogastrično sondo, s čimer smo zagotovili časovno in kvantitativno primerljiv vnos probiotikov pri vseh živalih. S spremljanjem telesne mase smo dobili informacijo o stopnji brejosti in zdravstvenem stanju brejih miši. Poleg tega smo maso spremljali zaradi morebitnega vpliva probiotikov na prirast in maso (Angelakis in sod., 2013). Izkazalo se je, da LK7^R in LGG nista vplivala na prirast in maso živali v času brejosti in po njej.

Obstoj endogene poti prehoda bakterij v mlečno žlezo so na mišjem modelu nakazali že Perez in sod. (2007), zato smo poskus osnovali predvsem glede na njihove izsledke. Ugotovili so, da bakterije v večjem številu prehajajo v mlečno žlezo v obdobju od petega dneva pred kotitvijo do dneva po kotitvi, zato smo v prvem poskusu žrtvovanja načrtovali na:

- 15-ti dan po paritvi, ko smo pričakovali povečano število bakterij v mezenteričnih limfnih vozlih;
- dan po kotitvi, ko naj bi zaznali povečano število bakterij v mlečni žlezi;
- tretji in osmi dan po kotitvi, da bi ugotovili morebiten prehod bakterij v mlečno žlezo tudi v začetnem obdobju laktacije.

Predvidevali smo, da bomo največje število probiotičnih bakterij LGG ali LK7^R zaznali v mlečni žlezi ob časih, pri katerih so Perez in sod. (2007) ugotovili, da preide v mlečno žlezo tudi največ komensalnih bakterij (dan po kotitvi). Ker so rezultati prvega poskusa nakazovali, da je verjetnost prisotnosti bakterij LGG v mlečnih žlezah in mezenteričnih limfnih vozlih večja tretji in osmi dan po kotitvi, smo v drugem poskusu živali žrtvovali zgolj na tretji in osmi dan, s čimer smo pridobili večje število (4) živali na žrtvovanje in skupino.

5.1.4.1 Prisotnost živih bakterij LGG in LK7^R ter njihove DNA v vzorcih odvzetih tkiv

Prisotnost živih bakterij LGG in LK7^R smo ugotavljali s kombinacijo klasičnih mikrobioloških in genetskih metod (Slika 11). Homogenizirane vzorce smo 24 ur bogatili v tekočem gojišču MRS (selektivno za MKB) ter nato razmazali na plošče MRS in MRS^R. Iz spirkov plošč MRS (konzorcij živih MKB) in MRS^R smo izolirali DNA in s PCR, specifično za sev LGG in gasicin K7 A, ugotavljali prisotnost živih bakterij sevov LGG in LK7^R. V predposkusih smo ugotovili, da s tovrstnim postopkom lahko zasledimo tudi 1 živo bakterijo na mg mlečne žleze. Poleg sledenja živih LK7^R in LGG smo izolirali genomsko DNA direktno iz tkiv mezenteričnih limfnih vozlov in mlečne žleze ter s PCR

ugotavljali prisotnost DNA proučevanih probiotikov. Meja detekcije pri tem postopku je bila 100-krat višja zaradi izgub pri izolaciji genomske DNA in pa zelo majhni količini prokariontske DNA v primerjavi z evkariontsko. Pri izolaciji genomske DNA namreč izoliramo tako evkariontsko kakor tudi prokariontsko (bakterijsko), s čimer dobimo nizko razmerje med tarčno in ostalo DNA, ki pa vpliva na učinkovitost PCR (Cullen in Hirsch, 1998).

Bakterije naj bi iz črevesja v mlečno žlezo prehajale znotraj DC ali pritrjene na DC, ki po krvi (limfi) potujejo iz mezenteričnih limfnih vozlov v oddaljena mukusna tkiva, kot je mlečna žleza (Langa, 2006; Martin in sod., 2004; Perez in sod., 2007). Izolacija MKB iz človeške krvi ni tako zelo redek pojav, saj so iz človeške krvi izolirali kar 125 od 485-ih sevov laktobacilov, ki so deponirani v zbirki PROSAFE (mikrobna zbirka za namene ovrednotenja varnosti MKB v prehrani ljudi)(Vankerckhoven in sod., 2004), med katerimi so bili tudi sevi z enakim genetskim profilom kakor LGG (Vancanneyt in sod., 2006). V našem poskusu smo prisotnost živih MKB ugotavljali v krvi, ki smo jo pred žrtvovanjem aseptično odvzeli s kardialno punkcijo. Pri vseh pozitivnih vzorcih je zraslo zgolj nekaj morfološko različnih kolonij. V prvem poskusu je bila večina (4/5) pozitivnih vzorcev iz krvi odvzete 4 dni pred kotitvijo (15. dan) in dan po kotitvi, kar bi lahko bila posledica povečanega prehoda MKB v tem obdobju. Celokupno je bilo pozitivnih 8 vzorcev krvi, vendar v nobenem nismo potrdili prisotnosti sevov LGG in LK7.

Prisotnost živih bakterij LGG in LK7 v mezenteričnih vozlih smo potrdili pri treh vzorcih miši (2 za LGG (miši G3/1 in G4/2) in 1 za LK7 (miš K1/2)). DC lahko prevzete komensalne bakterije transportirajo do mezenteričnih limfnih vozlov (Macpherson in Uhr, 2004), kar dokazujejo tudi drugi raziskovalci, saj poročajo o prisotnosti bakterij v mezenteričnih limfnih vozlih odraslih miši (Ma in sod., 1990; Maragkoudakis in sod., 2009; Zhou in sod., 2000). Kandasamy in sod. (2011) so miši hranili z LGG, LGG z izraženim zelenim fluorescentnim proteinom (LGG-ZFP) in LGG z izraženim zelenim fluorescentnim proteinom in IL-2, kot fuzijskim proteinom. Ugotovili so, da so vsi trije sevi prisotni v mezenteričnih limfnih vozlih in vranici 24 ur po zaužitju in da je kljub temu prisotnost protiteles IgG, ki so specifična za LGG, zelo nizka. Predvidevajo, da je imunski sistem LGG prepoznal kot komensalno bakterijo, zaradi česar ni bilo sistemske aktivacije imunskega sistema.

Objave o prehodu probiotičnih sevov iz črevesa v mlečno žlezo oziroma mleko mater so maloštevilne, objav o študijah prehoda na živalskem modelu pa do sedaj nismo zasledili. V prvem poskusu smo pri dveh vzorcih zaznali prisotnost živih bakterij seva LGG v mlečni žlezi (miši G3/1 in G4/1), pri čemer smo pri eni živali potrdili prisotnost LGG v mlečni žlezi in mezenteričnih vozlih. Ker prisotnost LGG nismo potrdili tudi v krvi, ne moremo

zagotovo trditi, da je sev prešel v mlečno žlezo po endogeni poti. Poudariti pa velja, da so miši živele na gojitvenih mrežah in bile depilirane po predelih seskov, s čimer smo močno zmanjšali možnost zunanje kontaminacije, saj so težje prišle v stik z lastnimi iztrebki. Ker smo želeli statistično ovrednotiti pojavljanje LGG in LK7 v mezenteričnih limfnih vozlih in mlečni žlezi, smo v drugem poskusu živali žrtvovali samo tretji in osmi dan po kotitvi, vendar pojava LGG ali LK7 v odvzetih tkivih nismo uspeli potrditi. Menimo, da LGG lahko preide v mlečno žlezo miši, vendar je pogostost takšnega dogodka nizka. Najverjetnejši razlog, zakaj v mleku nismo uspeli potrditi živih MKB, so zelo majhne količine vzorca, saj smo v povprečju uspeli pridobiti le 100 μ l mleka na žival.

5.1.4.2 Vpliv probiotikov LGG in LK7^R na mikrobioto mezenteričnih limfnih vozlov, mlečne žleze in mleka

Trije različni pristopi (število živih bakterij, število kopij 16S bakterijske rDNA in metagenomska analiza bakterijske 16S rDNA), ki smo jih uporabili pri proučevanju mikrobiote mezenteričnih limfnih vozlov in mlečne žleze, se med seboj dopolnjujejo in nam nudijo popolnejšo sliko o vplivu probiotikov. Razlogi za neuspešno potrjevanje različnih rodov in vrst v prvem poskusu so najverjetneje že omenjena izguba DNA med izolacijo direktno iz tkiv ter velik delež evkariontske DNA in posledično nizka koncentracija bakterijske DNA (pod pragom občutljivosti uporabljene metode).

5.1.4.2.1 Število živih bakterij v odvzetih bioloških vzorcih

V drugem poskusu smo homogenizirane vzorce tkiv razmazali na krvni agar (KA) in nacepljene na plošče inkubirali v aerobnih in anaerobnih pogojih. Na ploščah, ki smo jih inkubirali v aerobnih pogojih, so zrasle predvsem kolonije aerobnih bakterij in pa tudi nekaterih fakultativno anaerobnih bakterij. Na ploščah, ki smo jih inkubirali v anaerobnih pogojih, pa predvsem fakultativni anaerobi in nekateri manj striktni anaerobi, saj so med homogenizacijo vzorci prišli v stik s kisikom iz zraka. Število kolonijskih enot (KE) pri pozitivnih vzorcih je bilo v posameznih skupinah zelo različno (Slika 18), zato rezultate podajamo kot število oz. delež bakterijsko pozitivnih vzorcev. Rezultate smo statistično ovrednotili s Fischerjevim eksaktnim testom, ki ni pokazal statistično značilnih razlik.

Glede na število bakterijsko pozitivnih vzorcev lahko zaključimo, da je mlečna žleza miši razmeroma slabo/redko poseljena, saj je bilo bakterijsko pozitivnih zgolj 12 od 23-ih vzorcev (cca. 52 %). Podobne rezultate so prikazali Perez in sod. (2007), saj so 3 dni po kotitvi zabeležili 5 pozitivnih vzorcev od 11-ih, 14 dni po kotitvi pa zgolj 2 od 11-ih. Poudariti pa je potrebno, da pri mikrobiološki analizi mlečne žleze miši nismo analizirali

celotne mlečne žleze, temveč samo manjšo količino homogenata, zato negativni rezultati ne pomenijo popolne sterilnosti posameznih vzorcev. V primerjavi z materinim mlekom, kjer je običajno prisotnih od $1 \cdot 10^2$ do $1 \cdot 10^5$ KE/ml mleka (Heikkila in Saris, 2003; Martin in sod., 2003; Perez in sod., 2007), smo pri pozitivnih vzorcih mlečne žleze miši določili od $1,5 \cdot 10^1$ do $4,5 \cdot 10^5$ KE/g tkiva, kar lahko smatramo za primerljive vrednosti.

Prehajanje bakterij iz črevesja v mezenterične limfne vozle je pri zdravih odraslih miših sicer redek, a normalen pojav, ki je odvisen od propustnosti epitelijskega in pa stimulacije imunskega odziva (Wells in sod., 1988). V poskusu so Perez in sod. (2007) ugotovili, da pride do povečane prisotnosti aerobnih in anaerobnih bakterij v mezenteričnih vozlih pet dni pred kotitvijo ter v mlečni žlezi dan po kotitvi, kasneje pa prisotnost bakterij postopoma pade. Pojav spremlja razširitev odvodnih limfnih žil in povečanje mezenteričnih limfnih vozlov. V našem poskusu smo opazili največji delež bakterijsko pozitivnih vzorcev osmi dan po kotitvi tako pri mlečnih žlezah kakor tudi pri mezenteričnih limfnih vozlih. Povečana prisotnost bakterij v mlečni žlezi je lahko posledica povečane frekvence sesanja mladičev, ki s tem omogočajo poseljevanje mlečnih vodov in same mlečne žleze. Pri mezenteričnih limfnih vozlih pa bi lahko bila povečana prisotnost bakterij posledica vpliva probiotikov, saj smo večji delež bakterijsko pozitivnih vzorcev opazili pri probiotičnih skupinah (17 vzorcev) kot pri kontrolni skupini (6 vzorcev). Povečano število bakterijsko pozitivnih vzorcev mlečnih žlez je nenazadnje lahko tudi posledica novega vala prehoda bakterij iz mezenteričnih vozlov v mlečno žlezo, saj ni znano, koliko časa je ta prehod možen in ali obstaja še kakšno obdobje v času laktacije, ko je bakterijam omogočen prehod v mlečno žlezo (Jeurink in sod., 2013; Perez in sod., 2007). Ker smo v mezenteričnih vozlih zasledili predvsem večji delež anaerobov, lahko sklepamo, da so bakterije v vozlih izvirale predvsem iz črevesja. Kljub manjšemu številu živali v kontrolni skupini smo opazili, da sta oba probiotika vplivala na prisotnost bakterij v mezenteričnih vozlih (Slika 19), saj je bil delež bakterijsko pozitivnih vzorcev večji pri obeh probiotičnih skupinah, z očitnejšo razliko pri aerobni inkubaciji. Probiotična seva *Lactobacillus acidophilus* LAFTI 110 in *Lactobacillus paracasei* LAFT1 126 sta na primer, vplivala na prenos anaerobnih bakterij v mezenterične limfne vozle pri BALB/c miših in povečano fagocitozno sposobnost peritonealnih makrofagov (Paturi in sod., 2008).

Pri mlečni žlezi je bil, v primerjavi s kontrolno skupino (N), delež bakterijsko pozitivnih vzorcev večji zgolj pri skupini K (miši krmljene z LK7^R), pri čemer je bilo opaziti večje število vzorcev mlečnih žlez, pozitivnih na prisotnost bakterij, ki so zrastle na krvnem agarju pri aerobnih pogojih. Večji del teh bakterij je najverjetneje izviralo iz kože, ustne votline mladiča in okolja, kar je običajno tudi pri materinem mleku (Cabrera-Rubio in sod., 2012). Pri eni živali iz te skupine (K4/5) smo opazili nadpovprečno število (> 4500

KE/100 mg tkiva) po Gramu pozitivnih kokov, kar je lahko posledica subkliničnega mastitisa, saj zunanjih znakov mastitisa pri tej živali nismo opazili.

5.1.4.2.2 Število kopij bakterijske 16S rDNA v odvzetih bioloških vzorcih

Najprej smo z analizo števila kopij bakterijske 16S rDNA želeli ovrednotiti prisotnost bakterijske DNA v bioloških vzorcih in primernost vzorcev za metagnomsko analizo. Število kopij bakterijske 16S rDNA ni nujno povezano s številom živih bakterij, saj celice, ki so bile močno prizadete samo na nivoju metabolizma, lahko ohranijo integriteto tako celične membrane kakor tudi DNA še več dni po izpostavitvi škodljivemu dejavniku, kot je npr. oksidativni stres s H₂O₂ (Zotta in sod., 2009). Horizontalno prenesena bakterijska DNA iz matere na zarodek namreč lahko predstavlja tudi kontrolirano stimulacijo nerazvitega črevesnega imunskega sistema zarodka in novorojenca (Rautava in sod., 2012a; Satokari in sod., 2009).

Ker smo želeli dobiti rezultate, ki bi bili neodvisni od velikosti vzorca in napak pri izolaciji, smo v PCR uporabili enake količine izolirane gDNA (10 ng) in rezultate podali kot število kopij na ng genomske DNA (Slika 21). Rezultati so se delno ujeli z rezultati štetja na ploščah, prišli pa smo tudi do nekaterih dodatnih ugotovitev. Statistična analiza ANOVA na rangih po metodi Kruskal-Wallis in nato test mnogoterih primerjav po Dunn-u je, glede na kontrolno skupino, za vzorce mezenteričnih vozlov, vzorčenih tretji dan po kotitvi, pokazala statistično značilno večje število kopij bakterijske 16S rDNA/ng gDNA v LK7^R skupini (K3). Ker smo imeli v kontrolni skupini, vzorčeni osmi dan po kotitvi (N4), samo dve živali (dva vzorca), statistična analiza rezultatov za 8. dan ni pokazala razlik, čeprav je bilo, v primerjavi s kontrolno skupino, število kopij 16S rDNA občutno večje pri vzorcih mezenteričnih limfnih vozlov iz obeh probiotičnih skupin (G4 in K4). Manjše število kopij bakterijske 16S rDNA v vzorcih mlečnih žlez osmi dan po kotitvi (Slika 21 B), je najverjetneje posledica povečane količine evkariontske DNA, izolirane iz celic tkiva mlečne žleze. Po nekaterih podatkih se količina tkivne DNA v mlečni žlezi v času od tretjega do osmega dneva po kotitvi poveča za 19,5 % (Knight in Peaker, 1982). Zanimivo je, da se števila kopij bakterijske DNA v mleku zelo dobro ujema z rezultati števila kopij bakterijske DNA iz mezenteričnih limfnih vozlov in slabše z rezultati za mlečne žleze. Verjetno so bakterije v mlečni žlezi prisotne v obliki biofilma (Martin in sod., 2003), kar lahko prispeva k razlikam v številu bakterij v mleku in mlečni žlezi. Potrebno je poudariti, da je v mleku delež tkivne DNA veliko manjši. Kljub temu, da smo iz mleka uspeli izolirati zelo majhne količine celokupne gDNA, je bilo število kopij na ng gDNA sorazmerno veliko.

5.1.4.2.3 Metagenomska analiza 16S rDNA

Kljub temu, da cene globinskega sekvenciranja padajo, metoda še vedno velja za razmeroma drago. Zato smo po 4 paralelne vzorce mezenteričnih limfnih vozlov, mlečne žleze in mleka iz vsake skupine združili, tako da smo dobili zgolj 18 vzorcev (3 skupine, 2 časa vzorčenja, 3 tipi vzorcev). Tako smo na primer DNA, izolirano iz vzorcev mezenteričnih limfnih vozlov miši, žrtvovanih osmi dan po kotitvi in hranjenih z LK7^R (K4/3, K4/4, K4/5, K4/6), združili v vzorec K4-MV. Z združevanjem vzorcev smo sicer izgubili možnost statističnega ovrednotenja, lahko pa smo proučili zastopanosti debel, družin in rodov v vzorcih vseh treh skupin iz poskusa.

V podjetju, ki je izvajalo sekvenciranje, iz petih vzorcev mleka niso uspeli pomnožiti zadostne količine 16S rDNA za metagenomsko sekvenciranje. Najverjetnejši razlog za neuspeh pomnoževanja je bila zelo nizka koncentracija bakterijske DNA v vzorcih mleka, saj vzorci niso vsebovali minimalne zahtevane koncentracije gDNA (25 ng/μl), ki jo je predpisal izvajalec sekvenciranja. Pri podatkih o kvaliteti sekvenciranja in analize (Tabela 13) izstopa velik odstotek neznanih odčitkov pri vzorcih mezenteričnih limfnih vozlov. Neznani odčitki lahko pripadajo vrstam, ki niso vpisane v bazo RDB (Cole in sod., 2009), ali pa so posledica napak v procesu eksperimenta (Clemente in sod., 2011). Poleg tega je v bazi RDB večja zastopanost zaporedij iz kultivabilnih vrst bakterij (Schloss in Handelsman, 2004), v črevesju pa pogosto najdemo redke in nekultivabilne vrste bakterij (Stewart, 2012). Glede na to, da je delež znanih zaporedij na nivoju rodov daleč od ocenjenega števila vseh bakterijskih rodov v naravi (Schloss in Handelsman, 2004), ni presenetljivo, da je bil odstotek odčitkov, ki smo jim pripisali rod, najnižji.

Iz rezultatov na vseh treh nivojih (deblo, družina in rod) smo lahko sklepali, da je večina dobljenih zaporedij posledica kontaminacij, ki izvirajo iz reagentov PCR, vode in PBS. Znano je, da pride kontaminacija reagentov z mikrobo DNA bolj do izraza pri vzorcih z zelo nizko koncentracijo tarčne DNA (Champlot in sod., 2010; Teletchea in sod., 2005). Najpogosteje se kot posledica kontaminacije pojavljajo: *E. coli*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Phylobacterium*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium* in druge, večinoma po Gramu negativne aerobne bakterije (Grahn in sod., 2003; Hughes in sod., 1994; Spangler in sod., 2009; Tanner in sod., 1998). Če upoštevamo regresijsko enačbo Willner in sod. (2012), je teoretično pri 0,06 ng tarčne DNA (približno $6,4 \cdot 10^4$ kopij) kar 91 % zaporedij posledica kontaminacije. Glede na poročila izvajalca sekvenciranja, so pri naših vzorcih, po pomnoževanju s PCR, dobili zelo nizke koncentracije DNA, zato so bili primorani uporabiti metodo ugnezdene PCR. Praktično nemogoče je, da bi vsi vzorci vsebovali tako velike in podobne deleže aerobnih, po Gramu negativnih bakterij, ki so značilni za okolje in vodo, zato smo iz rezultatov izločili tovrstne

odčitke (Preglednica 14). Zavedamo se, da smo s tem najverjetneje odstranili tudi nekatere odčitke, ki so izvirali iz vzorcev, vendar smo na ta način lahko izpostavili tiste, za katere je zelo malo verjetno, da so posledica kontaminacije.

Rezultati tako simulirane metagenomske analize bioloških vzorcev se v precejšnji meri ujemajo z rezultati štetja na ploščah in ugotavljanja števila kopij bakterijske DNA, saj je bilo več odčitkov pri vzorcih, odvzetih osmi dan po kotitvi. Že iz rezultatov na nivoju debel, preden smo izločili odčitke, ki so po našem mnenju posledica kontaminacije (Slika 22 in 23), je razvidno, da je aplikacija probiotikov vplivala predvsem na povečan delež firmikut. Spremembe bi lahko bile direktna posledica apliciranih probiotikov, ki spadata v deblo firmikut (Cui in sod., 2013). Ji in sod. (2012) so ugotovili, da je aplikacija LGG odraslim mišim BALB/c rahlo povečala delež firmikut v blatu in zmanjšala v tankem črevesu živali. V našem poskusu se je kazal povečan delež firmikut pri probiotičnih skupinah v povečanem deležu MKB, predvsem rodov *Lactobacillus* in *Streptococcus* (Preglednica 15). Možno je, da odčitki za rod *Lactobacillus* pripadajo sevoma LGG in LK7, vendar tega nismo uspeli dokazati zaradi izgube kultivabilnosti sevov in nizke koncentracije njune DNA, izolirane direktno iz tkiv, ki je bila pod mejo detekcije uporabljene metode. Druga možnost je, da je povečan delež MKB v črevesu, ki ga je povzročila aplikacija probiotikov, povzročil povečano vzorčenje različnih MKB iz črevesja (Berg in Garlington, 1979).

Pojavljanje striktnih anaerobov, katerih običajni habitat je prebavni trakt, nakazuje, da so nekatere bakterije tako v mezenteričnih limfnih vozlih kakor tudi v mlečni žlezi, izvirale iz črevesja. V mlečni žlezi so se pojavili rodovi, kot so *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Turicibacter*, *Barnesiella*, *Alistipes*, ki so tipični predstavniki črevesne mikrobiote ljudi in glodavcev. Streptokoke smo opazili pri vseh vzorcih mlečnih žlez. Podobne rezultate navajajo tudi pri metagenomski analizi mikrobiote materinega mleka (Cabrera-Rubio in sod., 2012; Hunt in sod., 2011; Ward in sod., 2013). Poleg tega je bil, skladno z rezultati analiz mikrobiote materinega mleka, rod *Streptococcus* prisoten pri vseh vzorcih mlečne žleze miši. Rod *Lactobacillus* se je pojavljal izključno pri vzorcih mlečnih žlez ali mleka iz probiotičnih skupin, kar so pri testiranju dveh probiotikov za zdravljenje mastitisa pri doječih materah opazili tudi Jimenez in sod. (2008).

Pri skupini K4, kjer je najverjetneje prišlo do subkliničnega mastitisa pri eni od živali, smo opazili prevlado streptokokov v mleku in mlečni žlezi. Zanimivo je, da smo opazili povečano število 16S rDNA, pripisane streptokokom, tudi v mezenteričnih limfnih vozlih te skupine (K4). Pri klasični mikrobiološki analizi štetja kolonijjskih enot na ploščah krvnega agarja (Slika 18 MV-AE, MV-AN) povečanega števila živih bakterij v mezenteričnih vozlih nismo opazili, kar nakazuje na to, da bakterije v mezenteričnih

limfnih vozlih niso bile več žive in smo tako detektirali zgolj njihovo DNA. Podobno so Lasagno in sod. (2012) sistemski imunski odgovor in prehod bakterij iz mlečne žleze v mezenterične limfne vozle, opazili pri subkliničnem mastitisu s *Streptococcus uberis* pri kozah.

Izračun ocene pestrosti mikrobiote je opravilo podjetje, ki je izvajalo sekvenciranje. Pri tem so uporabili podatke, ki so vključevali tudi odčitke, ki smo jih kasneje označili kot kontaminacija. Ker so bili deleži zaporedij, ki so pripadali kontaminantom, med posameznimi vzorci približno enaki, smo sklepali, da k pestrosti mikrobiote največ prispevajo odčitki, ki niso posledica kontaminacije, saj so se njihovi deleži med vzorci razlikovali. Poleg tega je Chao1 neparametrična cenilka, ki pri izračunu vrstne pestrosti upošteva tudi številčnost osebkov in temelji na predpostavki, da redke vrste v vzorčnih enotah podajo največ informacij o številu vrst, ki v vzorčnih enotah manjkajo (Budja, 2008; Chao in sod., 2005). V našem primeru so bile redke vrste (z majhnim številom pripisanih zaporedij) sestavljene iz odčitkov, ki niso bili posledica kontaminacije, torej so te vrste, oziroma odčitki, največ prispevali k izračunu vrstne pestrosti.

Če izvzamemo skupino K4, kjer smo večji delež streptokokov najverjetneje opazili zaradi subkliničnega mastitisa pri enem vzorcu, sta oba probiotika zmanjšala ocenjeno število vseh vrst ter povečala porazdeljenost med vrstami tako tretji, kakor tudi osmi dan po kotitvi. Najverjetneje je aplikacija probiotikov povzročila povečano aktivacijo imunskega sistema in povečano vzorčenje različnih bakterij iz črevesne svetline. Tako za LGG kakor za LK7 je bilo ugotovljeno, da stimulirata prirojeni imunski odziv, ki se pokaže kot povečano izločanje protiteles IgA v sluznici vitega črevesa (Gorbach, 2000; Hacin, 2010). Manjše število in povečana porazdeljenost lahko pomenita tudi manjšo možnost pojava sistemskih infekcij, saj je s tem zmanjšana možnost preraščanja določene vrste.

Obratno kakor pri mezenteričnih limfnih vozlih, smo pri vzorcih mlečnih žlez opazili povečano število vseh ocenjenih vrst pri obeh probiotičnih skupinah in povečano porazdeljenost med vrstami zgolj pri LGG skupini. Večja pestrost lahko ugodno vpliva na razvoj imunskega sistema novorojenčka, vendar je porazdeljenost in zastopanost določenih vrst lahko ključnega pomena. Manjša porazdeljenost med vrstami pomeni večjo zastopanost določene vrste, ki lahko preraste ostale vrste, kar lahko poveča možnost infekcije mlečne žleze (Delgado in sod., 2008). Pri LGG skupini smo ugotovili povečano prisotnost laktobacilov (tretji dan po kotitvi) in pa prisotnost bifidobakterij (osmi dan po kotitvi), ki naj bi ugodno vplivale na razvoj in zdravje novorojenčka (Martin in sod., 2009; Martin in sod., 2003). Pri LK7 opazimo predvsem prevlado streptokokov. Streptokoki so običajno prisotni v mleku in mlečni žlezi, vendar pa med njimi najdemo tudi vrste, ki povzročajo mastitis (Delgado in sod., 2009).

Iz rezultatov poskusov na brejih miših lahko potrdimo tretjo zastavljeno hipotezo, da krmljenje s probiotikoma LGG in LK7 v času brejosti in laktacije vpliva na mikrobioto mezenteričnih limfnih vozlov in mlečne žleze. Ker smo žive bakterije LGG opazili zgolj pri dveh živalih lahko sklepamo, da je prehod živih bakterij LGG iz črevesja v mlečno žlezo mogoč, vendar je pogostost prehajanja nizka. Možno je, da tudi LK7 preide v mlečno žlezo, saj smo ga zasledili v mezenteričnih limfnih vozlih ene živali, vendar ga v našem poskusu v mlečni žlezi nismo potrdili. Oba seva vplivata na število živih bakterij in število kopij bakterijske 16S rDNA v mezenteričnih limfnih vozlih, mlečni žlezi in mleku. Največji vpliv smo opazili pri deležu laktobacilov, saj sta oba probiotika povečala pogostost pojavljanja in delež laktobacilov v mezenteričnih vozlih in mlečni žlezi ali mleku. Tudi ocena pestrosti mikrobiote je pokazala, da oba probiotika ugodno vplivata na mikrobioto mezenteričnih limfnih vozlov, saj zmanjšata pestrost in povečata porazdeljenost vrst. Glede na oceno pestrosti mikrobiote v mlečni žlezi pa izgleda, da LGG ugodneje vpliva na mikrobioto mlečne žleze, saj poveča ocenjeno število vseh vrst, poveča porazdeljenost med vrstami in poveča delež rodov *Lactobacillus* in *Bifidobacterium*.

5.2 SKLEPI

Prisotnost bakterij znotraj dendritičnih celic (DC) tri ure po dodatku LK7 na apikalno stran epitelnih celic je nakazala možen prehod LK7 skozi epitelni sloj znotraj DC, vendar prve zastavljene hipoteze ne moremo zagotovo potrditi, saj rezultatov zaradi težav s celično linijo H4-1 nismo uspeli ustrezno ponoviti.

Ker je bilo tudi preverjanje druge hipoteze (sposobnost preživetja probiotikov znotraj DC je sevno specifična) onemogočeno, saj je bilo vezano na celično linijo H4-1, smo raziskave preusmerili v proučevanje signalizacijskih poti stimulacije nezrelih DC (nDC) s probiotiki brez ali ob prisotnosti aktivina A in ugotovili, da:

- je aktivacija proteinskih kinaz p38 in ERK1/2 v DC odvisna predvsem od povzročitelja stimulacije, saj je stimulacija epitelnih celic z LGG in LK7 usmerila aktivacijo DC v smeri aktivacije ERK1/2, EcN in LPS pa v smeri p38;
- se vpliv ActA kaže predvsem v nivoju premestitve aktiviranih p38 in ERK1/2 v jedro in je prav tako odvisen od načina stimulacije, saj je stimulacija z LGG in LK7 povečala razmerje premestitve p-ERK1/2 proti p-p38, medtem ko stimulacija z LPS ali EcN razmerja ni spremenila.

Potrdili smo tretjo zastavljeno hipotezo, da krmljenje probiotičnih sevov LK7 in LGG poskusnim mišim v času brestosti in laktacije vpliva na sestavo mikrobiote mezenteričnih limfnih vozlov in mlečne žleze ter na prisotnost sevov LK7 in LGG v mlečni žlezi in mleku poskusnih živali, saj je:

- aplikacija LGG in LK7 povečala pogostost pojavljanja živih bakterij v mezenteričnih limfnih vozlih in povečala število kopij bakterijske DNA v mezenteričnih limfnih vozlih in mleku v primerjavi s kontrolno skupino, zgolj aplikacija LK7 pa je povečala pogostost pojavljanja živih bakterij v mlečni žlezi;
- aplikacija LGG povečala delež firmikut v mezenteričnih limfnih vozlih tretji dan po kotitvi in zmanjšala osmi dan po kotitvi;
- aplikacija LGG in LK7 v primerjavi s kontrolno skupino povečala delež firmikut in povečala delež rodu *Lactobacillus* in skupine MKB v mlečni žlezi tako tretji kakor tudi osmi dan po kotitvi;
- aplikacija LGG in LK7 ugodno vplivala na mikrobioto mezenteričnih limfnih vozlov, saj je zmanjšala ocenjeno število vseh vrst in povečala porazdeljenost med vrstami;
- aplikacija LGG in LK7 povečala ocenjeno število vseh vrst v mlečni žlezi, zgolj aplikacija LGG pa je tudi povečala porazdeljenost med vrstami;
- je prehod živih bakterij LGG in LK7 iz črevesja v mlečno žlezo sicer mogoč, vendar sklepamo, da je pogostost prehajanja nizka.

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Materino mleko vsebuje bakterije različnih rodov, ki lahko prihajajo iz kože in novorojenčkove ustne votline, ki se z vaginalno in črevesno mikrobioto okuži med porodom. Med dojenjem in negovanjem naj bi se bakterije preko novorojenčkovih ust naselile na področju alveol in v mlečnih vodih. Drugi možni vir vsaj nekaterih vrst bakterij (laktobacili in bifidobakterije) v materinem mleku naj bi bil prenos po črevesno-mlečni poti, preko z mukozo povezanega limfatičnega sistema. Probiotiki so po definiciji živi mikroorganizmi, ki pripomorejo gostitelju do boljšega zdravja, če jih zaužije v zadostnih količinah. Vse več raziskav poroča o različnih pozitivnih učinkih uživanja probiotikov v času nosečnosti in dojenja tako na mamo kakor tudi na novorojenčka. Glede na dosedanje raziskave, lahko probiotiki vplivajo na mikrobioto materinega mleka na tri načine, ki so med seboj najverjetneje tesno povezani. Probiotiki, zaužiti med nosečnostjo in dojenjem, lahko vplivajo na imunski sistem matere, kar posredno vpliva na sestavo bakterij, ki so prisotne v mlečni žlezi. Poleg tega, lahko podobno kot komenzalne bakterije (običajno prisotne v črevesni mikrobioti), tudi probiotične bakterije preidejo v mlečno žlezo preko zunanjega vnosa ali pa po endogeni poti, preko z mukozo povezanega limfoidnega sistema in s tem direktno vplivajo na sestavo mlečne žleze.

Na vprašanje, kako uživanje probiotikov v času nosečnosti in laktacije vpliva na mikrobioto mleka in mlečne žleze, smo poskušali odgovoriti na dveh različnih nivojih. Mehanizem morebitnega endogenega prenosa probiotičnih sevov iz materinega črevesa do mlečnih žlez smo proučevali *in vitro* na celičnem modelu tankega črevesa. Model je bil sestavljen iz epitelnih celic H4-1 na zgornji strani poroznega filtra in nezrelih dendritičnih celic, izoliranih iz monocitov periferne krvi zdravih prostovoljcev, na spodnji strani filtra. Vpliv probiotikov na mikrobioto mlečne žleze in mleka smo proučevali z uporabo mišjega modela in probiotičnih sevov *Lactobacillus gasseri* K7 (LK7) in *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG). Poleg odkrivanja možnih mehanizmov prenosa probiotičnih bakterij do mlečne žleze smo pridobili pomemben vpogled v sestavo mikrobiote mlečne žleze in mleka miši, ki so pogosto modelni organizem na področju raziskovanja probiotikov. Za ugotavljanje LK7 v vzorcih, ki smo jih pridobili v poskusu na brejih miših, smo najprej razvili metodo za ugotavljanje seva LK7 v kompleksnih vzorcih.

Razvoj metode za ugotavljanje prisotnosti LK7 v kompleksnih vzorcih je temeljil na poznavanju genskih determinant dveh specifičnih bakteriocinov, gasicina K7A in gasicina K7B, ki ju tvori sev. Kot smo ugotovili iz študije na 45-ih LK7 negativnih vzorcih blata odraslih ljudi, je pojavljanje celotnega genskega klastra za gasicin K7 A

zelo redek pojav tudi v tako pestri združbi kot je črevesna mikrobiota. Ker pa so geni za oba gasicina (K7 A in K7 B) prisotni tudi v sevu *L. gasseri* LF221, pojavljanje kodirajočih regij za oba gasicina še ne pomeni 100 % potrditev prisotnosti seva LK7, ampak je to potrebno potrditi z uporabo ustreznih kontrol (npr. placebo) ali pa dodatnih selekcij (npr. uporaba seva odpornega proti rifampicinu), česar smo se poslužili tudi pri študiji na brejih miših.

Iz dobljenih rezultatov na *in vitro* modelu črevesnega epitelijskega sloja ne moremo zagotovo odgovoriti na vprašanje ali DC prevzemajo LK7 skozi sloj celic H4-1 ali ne. Prehod LK7 skozi epitelni sloj znotraj DC in trend padanja števila živih znotrajceličnih bakterij v odvisnosti od časa smo namreč opazili zgolj v prvem poskusu. V ponovitvah poskusa teh opažanj nismo uspeli potrditi.

Poleg prehajanja bakterij smo na modelu črevesnega epitelijskega sloja proučevali tudi vpliv probiotikov in ActA na aktivacijo p38 in ERK1/2 v DC. Rezultati nakazujejo, da je aktivacija p38 in ERK1/2 odvisna predvsem od povzročitelja stimulacije, saj probiotika LGG in LK7 stimulirata DC v smeri ERK1/2 signalne poti, EcN pa v smeri p38 signalne poti. Vpliv ActA se je pokazal predvsem na nivoju premeščanja aktiviranih molekul v jedro, kjer so se zopet pojavile razlike med probiotiki, saj sta po Gramu pozitivna LGG in LK7 povečala premestitev aktiviranih ERK1/2 v jedro. Opažanja so v skladu z domnevo, da ActA spremeni imunski odziv DC proti Th2 celični aktivaciji, sprememba pa je odvisna predvsem od povzročitelja stimulacije. Ker smo v našem poskusu uporabili zgolj enega darovalca in tri tehnične ponovitve, pri čemer smo pri nekaterih skupinah izgubili eno ponovitev (LPS), statistično naših domnev nismo potrdili. Za to bi bilo potrebno poskus ponoviti še z DC vsaj dveh darovalcev, kar pa zaradi časovnih omejitev doktorskega študija ni bilo izvedljivo.

Rezultatov poskusov na brejih miših kažejo, da krmljenje s probiotikoma LGG in LK7 v času brejosti in laktacije vpliva na mikrobioto mezenteričnih limfnih vozlov in mlečne žleze. V mezenteričnih limfnih vozlih smo opazili žive bakterije LGG pri dveh živalih, in sicer pri eni živali tretji in pri eni živali osmi dan po kotitvi. Glede na to, da smo žive bakterije LGG v mlečni žlezi opazili zgolj pri dveh živalih, lahko sklepamo, da je prehod živih bakterij LGG iz črevesja v mlečno žlezo mogoč, vendar je pogostost prehoda nizka. Možno je, da tudi LK7 preide v mlečno žlezo, saj smo ga zasledili v mezenteričnih limfnih vozlih ene živali 15. dan po paritvi, vendar ga nato v mlečni žlezi nismo potrdili. Oba seva sta vplivala na število živih bakterij in število kopij bakterijske 16S rDNA v mezenteričnih limfnih vozlih, mlečni žlezi in mleku. Analiza rezultatov globinskega sekvenciranja 16S rDNA je pokazala, da je aplikacija LGG in LK7 mišim v času brejosti in laktacije povečala delež firmikut in MKB (predvsem rodov *Lactobacillus* in *Streptococcus*) v mlečni žlezi

tako tretji kakor tudi osmi dan po kotitvi. Polega tega je probiotični sev LGG povečal delež firmikut v mezenteričnih limfnih vozlih tretji dan po kotitvi in zmanjšal osmi dan po kotitvi. Tudi ocena pestrosti mikrobiote je pokazala, da oba probiotika ugodno vplivata na mikrobioto mezenteričnih limfnih vozlov, saj zmanjšata pestrost in povečata porazdeljenost vrst. Glede na oceno pestrosti mikrobiote v mlečni žlezi pa izgleda, da LGG ugodneje vpliva na mikrobioto mlečne žleze, saj poveča ocenjeno število vseh vrst, poveča porazdeljenost med vrstami in poveča delež rodov *Lactobacillus* in *Bifidobacterium*.

Na osnovi dobljenih rezultatov *in vitro* eksperimentov in *in vivo* poskusov na brejih miših lahko sklepamo, da uživanje probiotikov LGG in LK7 vpliva na mikrobioto mlečne žleze in mleka tako preko prehajanja bakterij v mlečno žlezo kakor tudi preko imunskega sistema, ki pa zaradi vpliva aktivina A med brejostjo reagira drugače, kot v običajnih razmerah. Ugotovili smo, da je pogostost prehoda zaužitih probiotikov LGG in LK7 najverjetneje majhna, kljub temu pa je uživanje obeh probiotikov spremenilo mikrobioto mezenteričnih limfnih vozlov in mlečne žleze. Možnost vpliva na mikrobioto mlečne žleze in mleka lahko pomeni tudi možnost vpliva na zdravje mlečne žleze in nenazadnje tudi na zdravje novorojenčka.

6.2 SUMMARY

Breast milk contains various genera of bacteria, which may come from the skin and newborn oral cavity, which is infected with vaginal and intestinal microbiota during childbirth. During breast-feeding and nursing bacteria from neonatal mouth supposed to colonize the area of alveoli and in milk ducts. Another possible source of at least some types of bacteria (lactobacilli and bifidobacteria) in breast milk, is entero-mammary pathway via mucosa associated lymphoid system. Probiotics by definition are live microorganisms, which when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host. There is an increasing number of research reports on a variety of positive effects of consumption of probiotics during pregnancy and breastfeeding on mother and also on newborn. Based on previous studies probiotics may affect mother's milk microbiota in three ways, which appear to be linked to each other. Probiotics, consumed during pregnancy and lactation can affect the immune system of the mother, which indirectly affect the composition of the bacteria that are present in the mammary gland. Moreover, similarly as the commensal bacteria (normally present in the intestinal microbiota), the probiotic bacteria pass into the mammary gland via the external input or by the endogenous route via the mucosa associated lymphoid system, and thereby directly influence the composition of the mammary gland.

We tried to answer the question of how the consumption of probiotics during pregnancy and lactation affect the mammary gland and milk microbiota, on two different levels. The mechanisms of eventual endogenous transfer of probiotic strains from mother's intestine to the mammary glands were studied *in vitro* small intestinal cell culture model. The model was made up of epithelial cells H4-1 on the upper side of the porous filter and the immature dendritic cells (nDC) isolated from peripheral blood monocytes of healthy volunteers at the lower side of the filter. Impact of probiotics on the mammary gland and milk microbiota were studied using a mouse model and the probiotic strains *Lactobacillus gasseri* K7 (LK7) and *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG). In addition to identifying potential mechanisms of probiotic bacteria transfer to the mammary gland, we have gained important insights into the composition of the mammary gland and milk microbiota of mice which are often used as model organism in research of probiotics. To determine LK7 in the samples which were obtained from the mice experiment, we first developed a method for the identification of the LK7 strain in complex samples.

The development of method for the detection of LK7 in complex samples was based on the fact that the strain produces two specific bacteriocins gasericin K7 A and gasericin K7 B. As we have seen from a study on 45 LK7 negative faecal samples from adult volunteers, the appearance of the entire gene cluster for LK7 is very rare even in such a diverse

community such as the intestinal microbiota. However, since the genes for gaseicin K7 A and gaseicin K7 B appear in the strain *L. gasseri* LF221 as well, the appearance of coding regions for both gaseicins does not mean indisputable conformation of the strain. Therefore, the presence of the LK7 strain must be confirmed with the use of appropriate controls (e.g. placebo) or additional selections (e.g. using strains resistant to rifampicin), which we have used in the study on pregnant mice.

From the results obtained from the *in vitro* experiment on small intestinal cell culture model, we cannot definitely say whether DC acquire LK7 through a layer of H4-1 cells or not. Translocation of LK7 cells through epithelial layer inside DC and a decreasing number of live LK7 inside DC over time, was observed only at first attempt. In the next two repetitions we were unable to confirm this observations.

Beside translocation of bacteria, the influence of probiotics and ActA on activation of p38 and ERK1/2 in DC was also studied using small intestinal cell culture model. The results indicate that activation of p38 and ERK1/2 depends essentially on the mode of stimulation where probiotics LGG and LK7 direct stimulation toward ERK1/2 pathway and EcN toward p38. Impact of ActA was seen primarily at the level of translocation of activated molecules to the nucleus, where again some differences between probiotics were noticed. Gram-positive LGG and LK7 showed increased translocation of activated ERK1/2 to the nucleus. This supports the idea that ActA modifies the immune response of DC against Th2 cell activation and that the change depends largely on the method of stimulation. Because in our experiment we had only one donor and three technical replicates, of which we lose one replicate in some groups (LPS), our hypothesis was not confirmed statistically. It would be necessary to repeat the experiment with at least two donors, but due to time constraints of doctoral study this was not feasible.

Results of experiments on pregnant mice suggest that feeding with probiotics LGG and LK7 during pregnancy and lactation affects the microbiota of mesenteric lymph nodes and mammary gland. Live LGG were observed in mesenteric lymph nodes of 3 animals. Given that live LGG bacteria in mammary gland were observed only in two animals, we can conclude that translocation of live LGG from the intestine into the mammary gland is possible, but occurs rarely. It is possible that also LK7 translocates into the mammary gland, as we have observed the strain in the mesenteric lymph nodes of one animal, but in our experiment live LK7 was not confirmed in the mammary gland. However, both strains effected the incidence of live bacteria and the number of copies of bacterial 16S rDNA in the mesenteric lymph nodes, mammary gland and milk. The analysis from results of 16S rDNA deep-sequencing showed that administration of LGG and LK7 to mice during pregnancy and lactation increased the share of firmicutes and the share of LAB group

(mostly genera *Lactobacillus* and *Streptococcus*) in the mammary gland on the third, as well as on the eighth day after parturition. In addition, the probiotic strain LGG increased the proportion firmicutes in the mesenteric lymph nodes on the third day after birth, and decreased on the eighth day after parturition. An assessment of the diversity of microbiota showed that both probiotics beneficially effected on the microbiota of mesenteric lymph nodes, as they reduced the diversity and increased the distribution of species. According to the assessment of the diversity of microbiota in the mammary gland we can conclude that LGG favorably affects the microbiota of the mammary gland, because there was an increased proportion of the genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*.

Taken together the results from *in vitro* experiments and results from pregnant mice we can conclude that consumption of LGG and LK7 can influence on mammary gland and milk microbiota by translocation of bacteria to mammary gland as well as via the immune system, which reacts differently than usual due to the impact of activin A. We have found that translocation of ingested probiotics LGG and LK7 is probably very rare, however both probiotics changed bacterial composition in the mesenteric lymph nodes and mammary gland. The ability to influence the bacterial composition of mammary glands and milk can also mean a potential impact on the health of the mammary gland and ultimately the health of the newborn.

7 VIRI

- Abrahamsson T. R., Sinkiewicz G., Jakobsson T., Fredrikson M., Bjorksten B. 2009. Probiotic lactobacilli in breast milk and infant stool in relation to oral intake during the first year of life. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 49, 3: 349-354.
- Agrawal S., Agrawal A., Doughty B., Gerwitz A., Blenis J., Van Dyke T., Pulendran B. 2003. Cutting edge: different Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos. *Journal of Immunology*, 171, 10: 4984-4989.
- Ahluos T., Tynkkynen S. 2009. Quantitative strain-specific detection of *Lactobacillus rhamnosus* GG in human faecal samples by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 106, 2: 506-514.
- Alonso M., Medina J. H., Pozzo-Miller L. 2004. ERK1/2 activation is necessary for BDNF to increase dendritic spine density in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Learning & Memory*, 11, 2: 172-178.
- Andersson A. F., Lindberg M., Jakobsson H., Backhed F., Nyren P., Engstrand L. 2008. Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. *PLoS ONE*, 3, 7: e2836, doi: 10.1371/journal.pone.0002836: 8 str.
- Angelakis E., Merhej V., Raoult D. 2013. Related actions of probiotics and antibiotics on gut microbiota and weight modification. *Lancet Infectious Diseases*, 13, 10: 889-899.
- Arroyo R., Martin V., Maldonado A., Jimenez E., Fernandez L., Rodriguez J. M. 2010. Treatment of infectious mastitis during lactation: antibiotics versus oral administration of lactobacilli isolated from breast milk. *Clinical Infectious Diseases*, 50, 12: 1551-1558.
- Asemi Z., Samimi M., Tabassi Z., Naghibi Rad M., Rahimi Foroushani A., Khorammian H., Esmailzadeh A. 2013. Effect of daily consumption of probiotic yoghurt on insulin resistance in pregnant women: a randomized controlled trial. *European Journal of Clinical Nutrition*, 67, 1: 71-74.
- Aso Y., Akaza H., Kotake T., Tsukamoto T., Imai K., Naito S. 1995. Preventive effect of a *Lactobacillus casei* preparation on the recurrence of superficial bladder cancer in a double-blind trial. The BLP Study Group. *European Urology*, 27, 2: 104-109.
- Barbi J., Pardoll D., Pan F. 2013. Metabolic control of the Treg/Th17 axis. *Immunological Reviews*, 252, 1: 52-77.
- Barteneva N. S., Fasler-Kan E., Vorobjev I. A. 2012. Imaging flow cytometry: coping with heterogeneity in biological systems. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 60, 10: 723-733.

- Bearfield C., Davenport E. S., Sivapathasundaram V., Allaker R. P. 2002. Possible association between amniotic fluid micro-organism infection and microflora in the mouth. *BJOG-An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 109, 5: 527-533.
- Berg R. D., Garlington A. W. 1979. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. *Infection and Immunity*, 23, 2: 403-411.
- Blander J. M., Medzhitov R. 2004. Regulation of phagosome maturation by signals from Toll-like receptors. *Science*, 304, 5673: 1014-1018.
- Bogovič-Matijašič B., Rogelj I. 2000. *Lactobacillus* K7 - A new candidate for a probiotic strain. *Food Technology and Biotechnology*, 38, 2: 113-119.
- Bogovič Matijašič B., Koman Rajšp M., Perko B., Rogelj I. 2007. Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in cheese by *Lactobacillus gasseri*. *International Dairy Journal*, 17, 2: 157-166.
- Bogovič Matijašič B., Obermajer T., Zorič Peternel M., Trachatova S., Spanova A., Rogelj I. 2009. Detection of the *Lactobacillus gasseri* K7 probiotic strain in feces and in human milk with molecular methods. *Medicinski razgledi*, 48, 3: 137-137.
- Borchers A. T., Selmi C., Meyers F. J., Keen C. L., Gershwin M. E. 2009. Probiotics and immunity. *Journal of Gastroenterology*, 44, 1: 26-46.
- Bourges D., Meurens F., Berri M., Chevaleyre C., Zanello G., Levast B., Melo S., Gerdtz V., Salmon H. 2008. New insights into the dual recruitment of IgA(+) B cells in the developing mammary gland. *Molecular Immunology*, 45, 12: 3354-3362.
- Bozorgmehr M., Zarnani A. H., Nikoo S., Moazzeni S. M. 2012. Suppressive effect of pregnant serum on murine dendritic cell function. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 38, 5: 797-803.
- Brandtzaeg P. 2003. Mucosal immunity: integration between mother and the breast-fed infant. *Vaccine*, 21, 24: 3382-3388.
- Brandtzaeg P. 2010. The mucosal immune system and its integration with the mammary glands. *Journal of Pediatrics*, 156, Suppl. 2: S8-S15.
- Bromley S. K., Thomas S. Y., Luster A. D. 2005. Chemokine receptor CCR7 guides T cell exit from peripheral tissues and entry into afferent lymphatics. *Nature Immunology*, 6, 9: 895-901.
- Brown J., Wang H., Hajishengallis G. N., Martin M. 2011. TLR-signaling networks: an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk. *Journal of Dental Research*, 90, 4: 417-427.
- Budja S. 2008. Primerjava ocen vrstne pestrosti pajkov (Arachnida: aranea) v treh gozdovih v Sloveniji. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 49 str.
- Burkholder K. M., Bhunia A. K. 2010. *Listeria monocytogenes* uses *Listeria* adhesion protein (LAP) to promote bacterial transepithelial translocation and induces expression of LAP receptor Hsp60. *Infection and Immunity*, 78, 12: 5062-5073.

- Burns S., Hardy S. J., Buddle J., Yong K. L., Jones G. E., Thrasher A. J. 2004. Maturation of DC is associated with changes in motile characteristics and adherence. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 57, 2: 118-132.
- Butts C. L., Shukair S. A., Duncan K. M., Bowers E., Horn C., Belyavskaya E., Tonelli L., Sternberg E. M. 2007. Progesterone inhibits mature rat dendritic cells in a receptor-mediated fashion. *International Immunology*, 19, 3: 287-296.
- Cabrera-Rubio R., Collado M. C., Laitinen K., Salminen S., Isolauri E., Mira A. 2012. The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *American Journal of Clinical Nutrition*, 96, 3: 544-551.
- Cencič A., Langerholc T. 2010. Functional cell models of the gut and their applications in food microbiology — A review. *International Journal of Food Microbiology*, 141: S4-S14.
- Champlot S., Berthelot C., Pruvost M., Bennett E. A., Grange T., Geigl E. M. 2010. An efficient multistrategy DNA decontamination procedure of PCR reagents for hypersensitive PCR applications. *PLoS ONE*, 5, 9: e13042, doi: 10.1371/journal.pone.0013042: 15 str.
- Chao A., Chazdon R. L., Colwell R. K., Shen T. J. 2005. A new statistical approach for assessing similarity of species composition with incidence and abundance data. *Ecology Letters*, 8, 2: 148-159.
- Charoenphandhu N., Nakkrasae L. I., Kraidith K., Teerapornpuntakit J., Thongchote K., Thongon N., Krishnamra N. 2009. Two-step stimulation of intestinal Ca(2+) absorption during lactation by long-term prolactin exposure and suckling-induced prolactin surge. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism*, 297, 3: E609-E619.
- Ciszek-Lenda M., Nowak B., Srottek M., Gamian A., Marcinkiewicz J. 2011. Immunoregulatory potential of exopolysaccharide from *Lactobacillus rhamnosus* KL37: effects on the production of inflammatory mediators by mouse macrophages. *International Journal of Experimental Pathology*, 92, 6: 382-391.
- Clemente J. C., Jansson J., Valiente G. 2011. Flexible taxonomic assignment of ambiguous sequencing reads. *BMC Bioinformatics*, 12: 8, doi: 10.1186/1471-2105-12-8: 15 str.
- Cole J. R., Wang Q., Cardenas E., Fish J., Chai B., Farris R. J., Kulam-Syed-Mohideen A. S., McGarrell D. M., Marsh T., Garrity G. M., Tiedje J. M. 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, 37, Database issue: D141-D145.
- Collado M. C., Delgado S., Maldonado A., Rodriguez J. 2009. Assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women by quantitative real-time PCR. *Letters in Applied Microbiology*, 48, 5: 523-528.
- Collado M. C., Laitinen K., Salminen S., Isolauri E. 2012. Maternal weight and excessive weight gain during pregnancy modify the immunomodulatory potential of breast milk. *Pediatric Research*, 72, 1: 77-85.

- Corr S. C., Hill C., Gahan C. G. M. 2009. Understanding the mechanisms by which probiotics inhibit gastrointestinal pathogens. *Advances in Food and Nutrition Research*, 56: 1-15.
- Corrigan A. Z., Bilezikjian L. M., Carroll R. S., Bald L. N., Schmelzer C. H., Fendly B. M., Mason A. J., Chin W. W., Schwall R. H., Vale W. 1991. Evidence for an autocrine role of activin-B within rat anterior-pituitary cultures. *Endocrinology*, 128, 3: 1682-1684.
- Costa M., Marchi M., Cardarelli F., Roy A., Beltram F., Maffei L., Ratto G. M. 2006. Dynamic regulation of ERK2 nuclear translocation and mobility in living cells. *Journal of Cell Science*, 119, 23: 4952-4963.
- Cui C., Shen C. J., Jia G., Wang K. N. 2013. Effect of dietary *Bacillus subtilis* on proportion of Bacteroidetes and Firmicutes in swine intestine and lipid metabolism. *Genetics and Molecular Research*, 12, 2: 1766-1776.
- Cullen D. W., Hirsch P. R. 1998. Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR. *Soil Biology and Biochemistry*, 30, 8-9: 983-993.
- Cummings J. H., Antoine J. M., Azpiroz F., Bourdet-Sicard R., Brandtzaeg P., Calder P. C., Gibson G. R., Guarner F., Isolauri E., Pannemans D., Shortt C., Sandra S., Tuijelaars S., Watzl B. 2004. PASSCLAIM - Gut health and immunity. *European Journal of Nutrition*, 43: 118-173.
- Čanžek Majhenič A. 2008. "Začetni oligonukleotidi specifični za gasericin K7 A in gasericin K7 B." Osebni arhiv. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 8 str.
- Čanžek Majhenič A., Bogovič Matijašič B., Rogelj I. 2003. Chromosomal location of the genetic determinants for bacteriocins produced by *Lactobacillus gasserii* K7. *Journal of Dairy Research*, 70, 2: 199-203.
- Dasanayake A. P., Li Y. H., Wiener H., Ruby J. D., Lee M. J. 2005. Salivary *Actinomyces naeslundii* genospecies 2 and *Lactobacillus casei* levels predict pregnancy outcomes. *Journal of Periodontology*, 76, 2: 171-177.
- De Filippo C., Cavalieri D., Di Paola M., Ramazzotti M., Poullet J. B., Massart S., Collini S., Pieraccini G., Lionetti P. 2010. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 33: 14691-14696.
- Delgado S., Arroyo R., Jiménez E., Fernández L., Rodríguez J. M. 2009. Infectious mastitis during lactation: an underrated condition (I). *Acta Pediatrica Española*, 67, 2: 77-84.
- Delgado S., Arroyo R., Martín R., Rodríguez J. M. 2008. PCR-DGGE assessment of the bacterial diversity of breast milk in women with lactational infectious mastitis. *BMC Infectious Diseases*, 8: 51, doi: 10.1186/1471-2334-8-51: 8 str.

- Della Bella S., Giannelli S., Cozzi V., Signorelli V., Cappelletti M., Cetin I., Villa M. L. 2011. Incomplete activation of peripheral blood dendritic cells during healthy human pregnancy. *Clinical and Experimental Immunology*, 164, 2: 180-192.
- Dignass A. U., Schulte K. M., Jung S., Harder-d'Heuresse J., Wiedenmann B. 2000. Activin A modulates intestinal epithelial cell function *in vitro*. *Gastroenterology*, 118, 4: A823-A823.
- Dillon S., Agrawal A., Van Dyke T., Landreth G., McCauley L., Koh A., Maliszewski C., Akira S., Pulendran B. 2004. A Toll-like receptor 2 ligand stimulates Th2 responses *in vivo*, via induction of extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and c-Fos in dendritic cells. *Journal of Immunology*, 172, 8: 4733-4743.
- Dillon S., Agrawal S., Banerjee K., Letterio J., Denning T. L., Oswald-Richter K., Kasprovicz D. J., Kellar K., Pare J., van Dyke T., Ziegler S., Unutmaz D., Pulendran B. 2006. Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance. *Journal of Clinical Investigation*, 116, 4: 916-928.
- Dobson A., Cotter P. D., Ross R. P., Hill C. 2012. Bacteriocin production: a probiotic trait? *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 1: 1-6.
- Dogi C. A., Galdeano C. M., Perdigon G. 2008. Gut immune stimulation by non pathogenic Gram(+) and Gram(-) bacteria. Comparison with a probiotic strain. *Cytokine*, 41, 3: 223-231.
- Donnet-Hughes A., Perez P. F., Dore J., Leclerc M., Levenez F., Benyacoub J., Serrant P., Segura-Roggero I., Schiffrin E. J. 2010. Potential role of the intestinal microbiota of the mother in neonatal immune education. *Proceedings of the Nutrition Society*, 69, 3: 407-415.
- Drisko J. A., Giles C. K., Bischoff B. J. 2003. Probiotics in health maintenance and disease prevention. *Alternative Medicine Review: a Journal of Clinical Therapeutic*, 8, 2: 143-155.
- Dubernet S., Desmasures N., Gueguen M. 2002. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiology Letters*, 214, 2: 271-275.
- Ebino K. Y., Yoshinaga K., Saito T. R., Takahashi K. W. 1988. A simple method for prevention of coprophagy in the mouse. *Laboratory Animals*, 22, 1: 1-4.
- Elson G., Dunn-Siegrist I., Daubeuf B., Pugin J. 2007. Contribution of Toll-like receptors to the innate immune response to Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Blood*, 109, 4: 1574-1583.
- Fajdiga S. 2006. Vpliv sevov iz rodov *Salmonella* in *Lactobacillus* na raven izražanja interleukina 8 in proteina toplotnega stresa 70 v celicah Caco-2. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 123 str.
- FAO/WHO. 2006. Probiotics in food: Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations: 56.str

<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512e/a0512e00.pdf> (september 2013)

- Fernandez L., Langa S., Martin V., Maldonado A., Jimenez E., Martin R., Rodriguez J. M. 2012. The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacological Research*, 69: 1-10.
- Fierer N., Jackson J. A., Vilgalys R., Jackson R. B. 2005. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 7: 4117-4120.
- Fontana L., Bermudez-Brito M., Plaza-Diaz J., Munoz-Quezada S., Gil A. 2013. Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *British Journal of Nutrition*, 109, Suppl. 2: S35-S50.
- Forsman P., Tilsala-Timisjarvi A., Alatosava T. 1997. Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S rRNA spacer regions. *Microbiology-UK*, 143: 3491-3500.
- Forster R., Schubel A., Breitfeld D., Kremmer E., Renner-Muller I., Wolf E., Lipp M. 1999. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell*, 99, 1: 23-33.
- Fowler P. A., Evans L. W., Groome N. P., Templeton A., Knight P. G. 1998. A longitudinal study of maternal serum inhibin-A, inhibin-B, activin-A, activin-AB, pro-alpha C and follistatin during pregnancy. *Human Reproduction*, 13, 12: 3530-3536.
- Freeman M. E., Kanyicska S., Lerant A., Nagy G. 2000. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiological Reviews*, 80, 4: 1523-1631.
- Funaba M., Murakami M., Ikeda T., Ogawa K., Tsuchida K., Sugino H. 2006. Identification of tocopherol-associated protein as an activin/TGF-beta-inducible gene in mast cells. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 1763, 8: 900-906.
- Giahi L., Aumueller E., Elmadfa I., Haslberger A. G. 2012. Regulation of TLR4, p38 MAPkinase, IkappaB and miRNAs by inactivated strains of lactobacilli in human dendritic cells. *Beneficial Microbes*, 3, 2: 91-98.
- Giahi L., Elmadfa I., Hoseini M., Klein P. 2013. Heat-inactivated *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus delbrueckii* induce efficient maturation and differential cytokine production in human monocyte derived dendritic cells. *Food and Agricultural Immunology*, 24, 1: 95-109.
- Gitter A. H., Bendfeldt K., Schulzke J. D., Fromm M. 2000. Trans/paracellular, surface/crypt, and epithelial/subepithelial resistances of mammalian colonic epithelia. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology*, 439, 4: 477-482.
- Gitter A. H., Fromm M., Schulzke J. D. 1998. Impedance analysis for the determination of epithelial and subepithelial resistance in intestinal tissues. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 37, 1-2: 35-46.

- Gong X., Ming X., Deng P., Jiang Y. 2010. Mechanisms regulating the nuclear translocation of p38 MAP kinase. *Journal of Cellular Biochemistry*, 110, 6: 1420-1429.
- Gorbach S. L. 2000. Probiotics and gastrointestinal health. *American Journal of Gastroenterology*, 95, 1, Suppl. 1: S2-S4.
- Grabig A., Paclik D., Guzy C., Dankof A., Baumgart D. C., Erckenbrecht J., Raupach B., Sonnenborn U., Eckert J., Schumann R. R., Wiedenmann B., Dignass A. U., Sturm A. 2006. *Escherichia coli* strain Nissle 1917 ameliorates experimental colitis via toll-like receptor 2- and toll-like receptor 4-dependent pathways. *Infection and Immunity*, 74, 7: 4075-4082.
- Grahn N., Olofsson M., Ellnebo-Svedlund K., Monstein H. E., Jonasson J. 2003. Identification of mixed bacterial DNA contamination in broad-range PCR amplification of 16S rDNA V1 and V3 variable regions by pyrosequencing of cloned amplicons. *FEMS Microbiology Letters*, 219, 1: 87-91.
- Grice E. A., Kong H. H., Conlan S., Deming C. B., Davis J., Young A. C., Bouffard G. G., Blakesley R. W., Murray P. R., Green E. D., Turner M. L., Segre J. A. 2009. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science*, 324, 5931: 1190-1192.
- Gronlund M. M., Grzeskowiak L., Isolauri E., Salminen S. 2011. Influence of mother's intestinal microbiota on gut colonization in the infant. *Gut Microbes*, 2, 4: 227-233.
- Grubb S. C., Bult C. J., Bogue M. A. 2014. Mouse phenome database. *Nucleic Acids Research*, 42, Database issue: D825-D834.
- Grzeskowiak L., Gronlund M. M., Beckmann C., Salminen S., von Berg A., Isolauri E. 2012. The impact of perinatal probiotic intervention on gut microbiota: double-blind placebo-controlled trials in Finland and Germany. *Anaerobe*, 18, 1: 7-13.
- Gueimonde M., Laitinen K., Salminen S., Isolauri E. 2007. Breast milk: a source of bifidobacteria for infant gut development and maturation? *Neonatology*, 92, 1: 64-66.
- Gueimonde M., Sakata S., Kalliomaki M., Isolauri E., Benno Y., Salminen S. 2006. Effect of maternal consumption of *Lactobacillus* GG on transfer and establishment of fecal bifidobacterial microbiota in neonates. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 42, 2: 166-170.
- Hacin B. 2010. Mehanizmi probiotičnega delovanja izbranih laktobacilov človeškega in živalskega izvora. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta: 163 str.
- Hedger M. P., Winnall W. R., Phillips D. J., de Kretser D. M. 2011. The regulation and functions of activin and follistatin in inflammation and immunity. *Vitamins and Hormones*, 85: 255-297.
- Heikkila M. P., Saris P. E. J. 2003. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *Journal of Applied Microbiology*, 95, 3: 471-478.

- Hoarau C., Lagaraine C., Martin L., Velge-Roussel F., Lebranchu Y. 2006. Supernatant of *Bifidobacterium breve* induces dendritic cell maturation, activation, and survival through a Toll-like receptor 2 pathway. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117, 3: 696-702.
- Hoarau C., Martin L., Faugaret D., Baron C., Dauba A., Aubert-Jacquin C., Velge-Roussel F., Lebranchu Y. 2008. Supernatant from *Bifidobacterium* differentially modulates transduction signaling pathways for biological functions of human dendritic cells. *PLoS ONE*, 3, 7: e2753, doi: 10.1371/journal.pone.0002753: 10 str.
- Hobson P. N. 1969. Rumen bacteria. V: *Methods in microbiology*. Norris J. N., Ribbons D. W. (eds.). London, Academic Press: 133-149.
- Huber S., Stahl F. R., Schrader J., Luth S., Presser K., Carambia A., Flavell R. A., Werner S., Blessing M., Herkel J., Schramm C. 2009. Activin A promotes the TGF-beta-induced conversion of CD4(+)CD25(-) T cells into Foxp3(+) induced regulatory T cells. *Journal of Immunology*, 182, 8: 4633-4640.
- Hughes M. S., Beck L. A., Skuce R. A. 1994. Identification and elimination of DNA-sequences in Taq DNA-polymerase. *Journal of Clinical Microbiology*, 32, 8: 2007-2008.
- Hunt K. M., Foster J. A., Forney L. J., Schutte U. M. E., Beck D. L., Abdo Z., Fox L. K., Williams J. E., McGuire M. K., McGuire M. A. 2011. Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. *PLoS ONE*, 6, 6: e21313, doi: 10.1371/journal.pone.0021313: 8 str.
- Huurre A., Laitinen K., Rautava S., Korkeamaki M., Isolauri E. 2008. Impact of maternal atopy and probiotic supplementation during pregnancy on infant sensitization: a double-blind placebo-controlled study. *Clinical and Experimental Allergy*, 38, 8: 1342-1348.
- Ivory K., Chambers S. J., Pin C., Prieto E., Arques J. L., Nicoletti C. 2008. Oral delivery of *Lactobacillus casei* Shirota modifies allergen-induced immune responses in allergic rhinitis. *Clinical and Experimental Allergy*, 38, 8: 1282-1289.
- Iwasaki A., Medzhitov R. 2010. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science*, 327, 5963: 291-295.
- Iyer C., Kusters A., Sethi G., Kunnumakkara A. B., Aggarwal B. B., Versalovic J. 2008. Probiotic *Lactobacillus reuteri* promotes TNF-induced apoptosis in human myeloid leukemia-derived cells by modulation of NF-kappa B and MAPK signalling. *Cellular Microbiology*, 10, 7: 1442-1452.
- Jeurink P. V., van Bergenhenegouwen J., Jimenez E., Knippels L. M. J., Fernandez L., Garssen J., Knol J., Rodriguez J. M., Martin R. 2013. Human milk: a source of more life than we imagine. *Beneficial Microbes*, 4, 1: 17-30.
- Ji Y. S., Kim H. N., Park H. J., Lee J. E., Yeo S. Y., Yang J. S., Park S. Y., Yoon H. S., Cho G. S., Franz C. M. A. P., Bomba A., Shin H. K., Holzapfel W. H. 2012. Modulation of the murine microbiome with a concomitant anti-obesity effect by *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus sakei* NR28. *Beneficial Microbes*, 3, 1: 13-22.

- Jimenez E., Fernandez L., Maldonado A., Martin R., Olivares M., Xaus J., Rodriguez J. M. 2008. Oral administration of *Lactobacillus* strains isolated from breast milk as an alternative for the treatment of infectious mastitis during lactation. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 15: 4650-4655.
- Jimenez E., Fernandez L., Marin M. L., Martin R., Odriozola J. M., Nueno-Palop C., Narbad A., Olivares M., Xaus J., Rodriguez J. M. 2005. Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. *Current Microbiology*, 51, 4: 270-274.
- Jonuleit H., Schmitt E., Schuler G., Knop J., Enk A. H. 2000. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine*, 192, 9: 1213-1222.
- Kaji R., Kiyoshima-Shibata J., Nagaoka M., Nanno M., Shida K. 2010. Bacterial teichoic acids reverse predominant IL-12 production induced by certain *Lactobacillus* strains into predominant IL-10 production via TLR2-dependent ERK activation in macrophages. *Journal of Immunology*, 184, 7: 3505-3513.
- Kandasamy M., Selvakumari Jayasurya A., Moochhala S., Huat Bay B., Kun Lee Y., Mahendran R. 2011. *Lactobacillus rhamnosus* GG secreting an antigen and Interleukin-2 translocates across the gastrointestinal tract and induces an antigen specific immune response. *Microbiology and Immunology*, 55, 10: 704-714.
- Keelan J. A., Zhou R. L., Mitchell M. D. 2000. Activin A exerts both pro- and anti-inflammatory effects on human term gestational tissues. *Placenta*, 21, 1: 38-43.
- Knight C. H., Peaker M. 1982. Mammary cell-proliferation in mice during pregnancy and lactation in relation to milk-yield. *Quarterly Journal of Experimental Physiology and Cognate Medical Sciences*, 67, 1: 165-177.
- Kopp M. V., Hennemuth I., Heinzmann A., Urbanek R. 2008. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of probiotics for primary prevention: No clinical effects of *Lactobacillus* GG supplementation. *Pediatrics*, 121, 4: E850-E856.
- Kunkel E. J., Butcher E. C. 2003. Plasma-cell homing. *Nature Reviews Immunology*, 3, 10: 822-829.
- Langa S. 2006. Interactions between lactic acid bacteria, intestinal epithelial cells and immune cells. Development of *in vitro* models. PhD thesis. Madrid, Complutense University of Madrid: 237 str.
- Langerholc T., Maragkoudakis P. A., Wollgast J., Gradisnik L., Cencic A. 2011. Novel and established intestinal cell line models - an indispensable tool in food science and nutrition. *Trends in Food Science and Technology*, 22, Suppl. 1: S11-S20.
- Lasagno M. C., Vissio C., Reinoso E. B., Raspanti C., Yaciuk R., Larriestra A. J., Odierno L. M. 2012. Development of an experimentally induced *Streptococcus uberis* subclinical mastitis in goats. *Veterinary Microbiology*, 154, 3-4: 376-383.
- Latvala S., Miettinen M., Kekkonen R. A., Korpela R., Julkunen I. 2011. *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Streptococcus thermophilus* induce suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS3) gene expression directly and indirectly via interleukin-10 in

- human primary macrophages. *Clinical and Experimental Immunology*, 165, 1: 94-103.
- Latvala S., Pietila T. E., Veckman V., Kekkonen R. A., Tynkkynen S., Korpela R., Julkunen I. 2008. Potentially probiotic bacteria induce efficient maturation but differential cytokine production in human monocyte-derived dendritic cells. *World Journal of Gastroenterology*, 14, 36: 5570-5583.
- Low E. N., Zagieboylo L., Martino B., Wilson E. 2010. IgA ASC accumulation to the lactating mammary gland is dependent on VCAM-1 and alpha4 integrins. *Molecular Immunology*, 47, 7-8: 1608-1612.
- Ma L., Deitch E., Specian R., Steffen E., Berg R. 1990. Translocation of *Lactobacillus murinus* from the gastrointestinal tract. *Current Microbiology*, 20, 3: 177-184.
- Macpherson A. J., Uhr T. 2004. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science*, 303, 5664: 1662-1665.
- Manicassamy S., Ravindran R., Deng J., Oluoch H., Denning T. L., Kasturi S. P., Rosenthal K. M., Evavold B. D., Pulendran B. 2009. Toll-like receptor 2-dependent induction of vitamin A-metabolizing enzymes in dendritic cells promotes T regulatory responses and inhibits autoimmunity. *Nature Medicine*, 15, 4: 401-409.
- Mansfield L. S., Urban J. F. 1996. The pathogenesis of necrotic proliferative colitis in swine is linked to whipworm induced suppression of mucosal immunity to resident bacteria. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 50, 1-2: 1-17.
- Maragkoudakis P. A., Papadelli M., Georgalaki M., Panayotopoulou E. G., Martinez-Gonzalez B., Mentis A. F., Petraki K., Sgouras D. N., Tsakalidou E. 2009. *In vitro* and *in vivo* safety evaluation of the bacteriocin producer *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198. *International Journal of Food Microbiology*, 133, 1-2: 141-147.
- Martin R., Heilig G. H., Zoetendal E. G., Smidt H., Rodriguez J. M. 2007a. Diversity of the *Lactobacillus* group in breast milk and vagina of healthy women and potential role in the colonization of the infant gut. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 6: 2638-2644.
- Martin R., Heilig H. G., Zoetendal E. G., Jimenez E., Fernandez L., Smidt H., Rodriguez J. M. 2007b. Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk among healthy women. *Research in Microbiology*, 158, 1: 31-37.
- Martin R., Jimenez E., Heilig H., Fernandez L., Marin M. L., Zoetendal E. G., Rodriguez J. M. 2009. Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 4: 965-969.
- Martin R., Langa S., Reviriego C., Jimenez E., Marin M. L., Olivares M., Boza J., Jimenez J., Fernandez L., Xaus J., Rodriguez J. M. 2004. The commensal microflora of human milk: new perspectives for food bacteriotherapy and probiotics. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 3-4: 121-127.

- Martin R., Langa S., Reviriego C., Jimenez E., Marin M. L., Xaus J., Fernandez L., Rodriguez J. M. 2003. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *Journal of Pediatrics*, 143, 6: 754-758.
- Martin V., Maldonado-Barragan A., Moles L., Rodriguez-Banos M., Campo R. d., Fernandez L., Rodriguez J. M., Jimenez E. 2012. Sharing of bacterial strains between breast milk and infant feces. *Journal of Human Lactation*, 28, 1: 36-44.
- Martin V., Maldonado A., Fernandez L., Rodriguez J. M., Connor R. I. 2010. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 by lactic acid bacteria from human breastmilk. *Breastfeeding Medicine*, 5, 4: 153-158.
- Martins F. S., Elian S. D. A., Vieira A. T., Tiago F. C. P., Martins A. K. S., Silva F. C. P., Souza E. L. S., Sousa L. P., Araujo H. R. C., Pimenta P. F., Bonjardim C. A., Arantes R. M. E., Teixeira M. M., Nicoli J. R. 2011. Oral treatment with *Saccharomyces cerevisiae* strain UFMG 905 modulates immune responses and interferes with signal pathways involved in the activation of inflammation in a murine model of typhoid fever. *International Journal of Medical Microbiology*, 301, 4: 359-364.
- Martins F. S., Vieira A. T., Elian S. D. A., Arantes R. M. E., Tiago F. C. P., Sousa L. P., Araujo H. R. C., Pimenta P. F., Bonjardim C. A., Nicoli J. R., Teixeira M. M. 2013. Inhibition of tissue inflammation and bacterial translocation as one of the protective mechanisms of *Saccharomyces boulardii* against *Salmonella* infection in mice. *Microbes and Infection*, 15, 4: 270-279.
- Mathys S., von Ah U., Lacroix C., Staub E., Mini R., Cereghetti T., Meile L. 2007. Detection of the pediocin gene *pedA* in strains from human faeces by real-time PCR and characterization of *Pediococcus acidilactici* UVA1. *BMC Microbiology*, 7: 55, doi: 10.1186/1472-6750-7-55: 10 str.
- McGrath K. E., Bushnell T. P., Palis J. 2008. Multispectral imaging of hematopoietic cells: Where flow meets morphology. *Journal of Immunological Methods*, 336, 2: 91-97.
- Miettinen M., Veckman V., Latvala S., Sareneva T., Matikainen S., Julkunen I. 2008. Live *Lactobacillus rhamnosus* and *Streptococcus pyogenes* differentially regulate Toll-like receptor (TLR) gene expression in human primary macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, 84, 4: 1092-1100.
- Mileti E., Matteoli G., Iliev I. D., Rescigno M. 2009. Comparison of the immunomodulatory properties of three probiotic strains of *Lactobacilli* using complex culture systems: prediction for *in vivo* efficacy. *PLoS ONE*, 4, 9: e7056, doi: 10.1371/journal.pone.0007056: 16 str.
- Morteau O., Gerard C., Lu B., Ghiran S., Rits M., Fujiwara Y., Law Y., Distelhorst K., Nielsen E. M., Hill E. A., Kwan R., Lazarus N. H., Butcher E. C., Wilson E. 2008. An indispensable role for the chemokine receptor CCR10 in IgA antibody-secreting cell accumulation. *Journal of Immunology*, 181, 9: 6309-6315.
- Muriana P. M., Klaenhammer T. R. 1991. Cloning, phenotypic expression, and DNA sequence of the gene for lactacin F, an antimicrobial peptide produced by *Lactobacillus* spp. *Journal of Bacteriology*, 173, 5: 1779-1788.

- Myhre R., Brantsaeter A. L., Myking S., Gjessing H. K., Sengpiel V., Meltzer H. M., Haugen M., Jacobsson B. 2011. Intake of probiotic food and risk of spontaneous preterm delivery. *American Journal of Clinical Nutrition*, 93, 1: 151-157.
- Nakamura T., Takio K., Eto Y., Shibai H., Titani K., Sugino H. 1990. Activin-binding protein from rat ovary is follistatin. *Science*, 247, 4944: 836-838.
- Nanthakumar N. N., Fusunyan R. D., Sanderson I., Walker W. A. 2000. Inflammation in the developing human intestine: A possible pathophysiologic contribution to necrotizing enterocolitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 11: 6043-6048.
- Nasidze I., Li J., Quinque D., Tang K., Stoneking M. 2009. Global diversity in the human salivary microbiome. *Genome Research*, 19, 4: 636-643.
- Neville M. C. 1999. Physiology of lactation. *Clinics in Perinatology*, 26, 2: 251-279.
- Nishimura T. 2003. Expression of potential lymphocyte trafficking mediator molecules in the mammary gland. *Veterinary Research*, 34, 1: 3-10.
- Nusing R. M., Barsig J. 1999. Induction of prostanoid, nitric oxide, and cytokine formation in rat bone marrow derived macrophages by activin A. *British Journal of Pharmacology*, 127, 4: 919-926.
- Nusing R. M., Mohr S., Ullrich V. 1995. Activin-a and retinoic acid synergize in cyclooxygenase-1 and thromboxane synthase induction during differentiation of J774.1 macrophages. *European Journal of Biochemistry*, 227, 1-2: 130-136.
- O'Connor A. E., McFarlane J. R., Hayward S., Yohkaichiya T., Groome N. P., de Kretser D. M. 1999. Serum activin A and follistatin concentrations during human pregnancy: a cross-sectional and longitudinal study. *Human Reproduction*, 14, 3: 827-832.
- Ohguchi M., Yamato K., Ishihara Y., Koide M., Ueda N., Okahashi N., Noguchi T., Kizaki M., Ikeda Y., Sugino H., Nishihara T. 1998. Activin a regulates the production of mature interleukin-1 beta and interleukin-1 receptor antagonist in human monocytic cells. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 18, 7: 491-498.
- Ohland C. L., Macnaughton W. K. 2010. Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 298, 6: G807-G819.
- Oleary P., Boyne P., Flett P., Beilby J., James I. 1991. Longitudinal assessment of changes in reproductive hormones during normal pregnancy. *Clinical Chemistry*, 37, 5: 667-672.
- Ortiz-Andrellucchi A., Sanchez-Villegas A., Rodriguez-Gallego C., Lemes A., Molero T., Soria A., Pena-Quintana L., Santana M., Ramirez O., Garcia J., Cabrera F., Cobo J., Serra-Majem L. 2008. Immunomodulatory effects of the intake of fermented milk with *Lactobacillus casei* DN114001 in lactating mothers and their children. *British Journal of Nutrition*, 100, 4: 834-845.

- Parvez S., Malik K. A., Kang S. A., Kim H. Y. 2006. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology*, 100, 6: 1171-1185.
- Paturi G., Phillips M., Kailasapathy K. 2008. Effect of probiotic strains *Lactobacillus acidophilus* LAFTI 110 and *Lactobacillus paracasei* LAFTI 126 on systemic immune functions and bacterial translocation in mice. *Journal of Food Protection*, 71, 4: 796-801.
- Perez P. F., Dore J., Leclerc M., Levenez F., Benyacoub J., Serrant P., Segura-Roggero I., Schiffrin E. J., Donnet-Hughes A. 2007. Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? *Pediatrics*, 119, 3: 724-732.
- Pietrocola G., Arciola C. R., Rindi S., Di Poto A., Missineo A., Montanaro L., Speziale P. 2011. Toll-like receptors (TLRs) in innate immune defense against *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Artificial Organs*, 34, 9: 799-810.
- Plum C. A., Wilson A. K., Bhattacharyya M. H. 1999. A nest box to facilitate excreta collection from mouse dams through pregnancy, parturition, and lactation. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science*, 38, 3: 71-77.
- Poudel B., Ki H. H., Lee Y. M., Kim D. K. 2013. Induction of IL-12 production by the activation of discoidin domain receptor 2 via NF-kappaB and JNK pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 434, 3: 584-588.
- Prescott S. L., Wickens K., Westcott L. 2009. Supplementation with *Lactobacillus rhamnosus* or *Bifidobacterium lactis* probiotics in pregnancy increases cord blood interferon-gamma and breast milk transforming growth factor-beta and immunoglobulin A detection. *Clinical and Experimental Allergy*, 39, 5: 771-771.
- Pulendran B., Tang H., Manicassamy S. 2010. Programming dendritic cells to induce T(H)2 and tolerogenic responses. *Nature Immunology*, 11, 8: 647-655.
- Ramsay D. T., Kent J. C., Owens R. A., Hartmann P. E. 2004. Ultrasound imaging of milk ejection in the breast of lactating women. *Pediatrics*, 113, 2: 361-367.
- Randolph G. J., Angeli V., Swartz M. A. 2005. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nature Reviews Immunology*, 5, 8: 617-628.
- Rautava S., Collado M. C., Salminen S., Isolauri E. 2012a. Probiotics modulate host-microbe interaction in the placenta and fetal gut: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neonatology*, 102, 3: 178-184.
- Rautava S., Kainonen E., Salminen S., Isolauri E. 2012b. Maternal probiotic supplementation during pregnancy and breast-feeding reduces the risk of eczema in the infant. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 130, 6: 1355-1360.
- Rautava S., Luoto R., Salminen S., Isolauri E. 2012c. Microbial contact during pregnancy, intestinal colonization and human disease. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 9, 10: 565-576.
- Reber P. M. 1993. Prolactin and immunomodulation. *American Journal of Medicine*, 95, 6: 637-644.

- Rescigno M., Granucci F., Citterio S., Foti M., Ricciardi-Castagnoli P. 1999. Coordinated events during bacteria-induced DC maturation. *Immunology Today*, 20, 5: 200-203.
- Rescigno M., Urbano M., Valzasina B., Francolini M., Rotta G., Bonasio R., Granucci F., Kraehenbuhl J. P., Ricciardi-Castagnoli P. 2001. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature Immunology*, 2, 4: 361-367.
- Rinttila T., Kassinen A., Malinen E., Krogus L., Palva A. 2004. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 6: 1166-1177.
- Robson N. C., Wei H., McAlpine T., Kirkpatrick N., Cebon J., Maraskovsky E. 2009. Activin-A attenuates several human natural killer cell functions. *Blood*, 113, 14: 3218-3225.
- Rogelj I., Bogovič Matijašić B. 2006. *Lactobacillus gasseri* LF221 and K7 - from isolation to application. *Biologia*, 61, 6: 761-769.
- Rott L. S., Briskin M. J., Andrew D. P., Berg E. L., Butcher E. C. 1996. A fundamental subdivision of circulating lymphocytes defined by adhesion to mucosal addressin cell adhesion molecule-1 - comparison with vascular cell adhesion molecule-1 and correlation with beta(7) integrins and memory differentiation. *Journal of Immunology*, 156, 10: 3727-3736.
- Roux M. E., McWilliams M., Phillipsquagliata J. M., Weiszcarrington P., Lamm M. E. 1977. Origin of IgA-secreting plasma cells in mammary gland. *Journal of Experimental Medicine*, 146, 5: 1311-1322.
- Saarela M., Mogensen G., Fonden R., Matto J., Mattila-Sandholm T. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84, 3: 197-215.
- Sakaguchi S., Ono M., Setoguchi R., Yagi H., Hori S., Fehervari Z., Shimizu J., Takahashi T., Nomura T. 2006. Foxp3(+)CD25(+)CD4(+) natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunological Reviews*, 212: 8-27.
- Salminen S. 1996. Functional dairy foods with *Lactobacillus* strain GG. *Nutrition Reviews*, 54, 11, Pt 2: 99-101.
- Sanderson I. R., Ezzell R. M., Keding M., Erlanger M., Xu Z. X., Pringault E., LeonRobine S., Louvard D., Walker W. A. 1996. Human fetal enterocytes *in vitro*: modulation of the phenotype by extracellular matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 15: 7717-7722.
- Santos S. J., Aupperlee M. D., Xie J. W., Durairaj S., Miksicek R., Conrad S. E., Leipprandt J. R., Tan Y. S., Schwartz R. C., Haslam S. Z. 2009. Progesterone receptor A-regulated gene expression in mammary organoid cultures. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 115, 3-5: 161-172.

- Sanz Y., De Palma G. 2009. Gut microbiota and probiotics in modulation of epithelium and gut-associated lymphoid tissue function. *International Reviews of Immunology*, 28, 6: 397-413.
- Satokari R., Gronroos T., Laitinen K., Salminen S., Isolauri E. 2009. *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* DNA in the human placenta. *Letters in Applied Microbiology*, 48, 1: 8-12.
- Schloss P. D., Handelsman J. 2004. Status of the microbial census. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68, 4: 686-691.
- Schoppet M., Huppertz H. I., Simm A., Bubert A. 2000. Infection of dendritic cells by enterobacteriaceae. *Medical Microbiology and Immunology*, 188, 4: 191-196.
- Schultz M., Gottl C., Young T. J., Iwen T., Vanderhoof T. A. 2004. Administration of oral probiotic bacteria to pregnant women causes temporary infantile colonization. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 38, 3: 293-297.
- Schultz M., Watzl S., Oelschlaeger T. A., Rath H. C., Gottl C., Lehn N., Scholmerich J., Linde H. J. 2005. Green fluorescent protein for detection of the probiotic microorganism *Escherichia coli* strain Nissle 1917 (EcN) *in vivo*. *Journal of Microbiological Methods*, 61, 3: 389-398.
- Segerer S. E., Müller N., Brandt J., Kapp M., Dietl J., Reichardt H. M., Rieger L., Kämmerer U. 2008. The glycoprotein-hormones activin A and inhibin A interfere with dendritic cell maturation. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 6: 17, doi: 10.1186/1477-7827-6-17: 10 str.
- Semitekolou M., Alissafi T., Aggelakopoulou M., Kourepini E., Kariyawasam H. H., Kay A. B., Robinson D. S., Lloyd C. M., Panoutsakopoulou V., Xanthou G. 2009. Activin-A induces regulatory T cells that suppress T helper cell immune responses and protect from allergic airway disease. *Journal of Experimental Medicine*, 206, 8: 1769-1785.
- Shen P., Huang H. V. 1986. Homologous recombination in *Escherichia coli* - dependence on substrate length and homology. *Genetics*, 112, 3: 441-457.
- Shi L., Kishore R., McMullen M. R., Nagy L. E. 2002. Lipopolysaccharide stimulation of ERK1/2 increases TNF-alpha production via Egr-1. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 282, 6: C1205-C1211.
- Shiratsuchi H., Basson M. D. 2005. Activation of p38 MAPK alpha by extracellular pressure mediates the stimulation of macrophage phagocytosis by pressure. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 288, 5: C1083-C1093.
- Silver L. M. 1995. *Mouse genetics: concepts and applications*. New York, Oxford University Press: 351 str.
- Song Y. L., Kato N., Liu C. X., Matsumiya Y., Kato H., Watanabe K. 2000. Rapid identification of 11 human intestinal *Lactobacillus* species by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers derived from the 16S-23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA. *FEMS Microbiology Letters*, 187, 2: 167-173.

- Sonoyama K., Rutatip S., Kasai T. 2000. Gene expression of activin, activin receptors, and follistatin in intestinal epithelial cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 278, 1: G89-G97.
- Spangler R., Goddard N. L., Thaler D. S. 2009. Optimizing Taq polymerase concentration for improved signal-to-noise in the broad range detection of low abundance bacteria. *PLoS ONE*, 4, 9: e7010, doi: 10.1371/Journal.Pone.0007010: 9 str.
- Stewart E. J. 2012. Growing unculturable bacteria. *Journal of Bacteriology*, 194, 16: 4151-4160.
- Stojanović N., Plečaš D., Plešinac S. 2012. Normal vaginal flora, disorders and application of probiotics in pregnancy. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 286, 2: 325-332.
- Sun Y. X., Cai J. J., Ma F., Lu P. P., Huang H. F., Zhou J. 2012. miR-155 mediates suppressive effect of progesterone on TLR3, TLR4-triggered immune response. *Immunology Letters*, 146, 1-2: 25-30.
- Svajger U., Pohleven J., Kos J., Strukelj B., Jeras M. 2011. CNL, a ricin B-like lectin from mushroom *Clitocybe nebularis*, induces maturation and activation of dendritic cells via the toll-like receptor 4 pathway. *Immunology*, 134, 4: 409-418.
- Szekeres-Bartho J., Barakonyi A., Par G., Polgar B., Palkovics T., Szereday L. 2001. Progesterone as an immunomodulatory molecule. *International Immunopharmacology*, 1, 6: 1037-1048.
- Takeda K., Suzuki T., Shimada S. I., Shida K., Nanno M., Okumura K. 2006. Interleukin-12 is involved in the enhancement of human natural killer cell activity by *Lactobacillus casei* Shirota. *Clinical and Experimental Immunology*, 146, 1: 109-115.
- Taketo M., Schroeder A. C., Mobraaten L. E., Gunning K. B., Hanten G., Fox R. R., Roderick T. H., Stewart C. L., Lilly F., Hansen C. T., Overbeek P. A. 1991. Fvb/N - an inbred mouse strain preferable for transgenic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 6: 2065-2069.
- Tanner M. A., Goebel B. M., Dojka M. A., Pace N. R. 1998. Specific ribosomal DNA sequences from diverse environmental settings correlate with experimental contaminants. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 8: 3110-3113.
- Taverniti V., Guglielmetti S. 2011. The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). *Genes and Nutrition*, 6, 3: 261-274.
- Teletchea F., Maudet C., Hanni C. 2005. Food and forensic molecular identification: update and challenges. *Trends in Biotechnology*, 23, 7: 359-366.
- Tomio A., Schust D. J., Kawana K., Yasugi T., Kawana Y., Mahalingaiah S., Fujii T., Taketani Y. 2008. Prolactin can modulate CD4(+) T-cell response through receptor-mediated alterations in the expression of T-bet. *Immunology and Cell Biology*, 86, 7: 616-621.

- Treangen T. J., Rocha E. P. C., Abraham A. L., Touchon M. 2009. Genesis, effects and fates of repeats in prokaryotic genomes. *FEMS Microbiology Reviews*, 33, 3: 539-571.
- Treven P., Turkova K., Trmcic A., Obermajer T., Rogelj I., Matijasic B. B. 2013. Detection and quantification of probiotic strain *Lactobacillus gasseri* K7 in faecal samples by targeting bacteriocin genes. *Folia Microbiologica*, 58, 6: 623-630.
- Turnbaugh P. J., Hamady M., Yatsunencko T., Cantarel B. L., Duncan A., Ley R. E., Sogin M. L., Jones W. J., Roe B. A., Affourtit J. P., Egholm M., Henrissat B., Heath A. C., Knight R., Gordon J. I. 2009. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, 457, 7228: 480-484.
- Van der Feltz M. J. M., De Groot N., Bayley J. P., Lee S. H., Verbeet M. P., De Boer H. A. 2001. Lymphocyte homing and Ig secretion in the murine mammary gland. *Scandinavian Journal of Immunology*, 54, 3: 292-300.
- van Riet E., Everts B., Retra K., Phylipsen M., van Hellemond J. J., Tielens A. G., van der Kleij D., Hartgers F. C., Yazdanbakhsh M. 2009. Combined TLR2 and TLR4 ligation in the context of bacterial or helminth extracts in human monocyte derived dendritic cells: molecular correlates for Th1/Th2 polarization. *BMC Immunology*, 10: 9, doi: 10.1186/1471-2172-10-9: 12 str.
- Van Tassell M. L., Miller M. J. 2011. *Lactobacillus* adhesion to mucus. *Nutrients*, 3, 5: 613-636.
- Vancanneyt M., Huys G., Lefebvre K., Vankerckhoven V., Goossens H., Swings J. 2006. Intraspecific genotypic characterization of *Lactobacillus rhamnosus* strains intended for probiotic use and isolates of human origin. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 8: 5376-5383.
- Vankerckhoven V. V., Autgaerden T. V., Huys G., Vancanneyt M., Swings J., Goossens H. 2004. Establishment of the PROSAFE collection of probiotic and human lactic acid bacteria. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 16, 2-3: 131-136.
- Vazquez-Torres A., Jones-Carson J., Baumler A. J., Falkow S., Valdivia R., Brown W., Le M., Berggren R., Parks W. T., Fang F. C. 1999. Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes. *Nature*, 401, 6755: 804-808.
- Walter J., Tannock G. W., Tilsala-Timisjarvi A., Rodtong S., Loach D. M., Munro K., Alatosava T. 2000. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1: 297-303.
- Wan Y. Y., Flavell R. A. 2006. The roles for cytokines in the generation and maintenance of regulatory T cells. *Immunological Reviews*, 212: 114-130.
- Wang Q., Garrity G. M., Tiedje J. M., Cole J. R. 2007. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 16: 5261-5267.
- Ward S. G., Marelli-Berg F. M. 2009. Mechanisms of chemokine and antigen-dependent T-lymphocyte navigation. *Biochemical Journal*, 418: 13-27.

- Ward T. L., Hosid S., Ioshikhes I., Altosaar I. 2013. Human milk metagenome: a functional capacity analysis. *BMC Microbiology*, 13: 116, doi: 10.1186/1471-2180-13-116: 12 str.
- Weisz-Carrington P., Roux M. E., Mcwilliams M., Phillipsquagliata J. M., Lamm M. E. 1979. Organ and isotype distribution of plasma cells producing specific antibody after oral Immunization - evidence for a generalized secretory immune system. *Journal of Immunology*, 123, 4: 1705-1708.
- Wells C. L., Maddaus M. A., Simmons R. L. 1988. Proposed mechanisms for the translocation of intestinal bacteria. *Reviews of Infectious Diseases*, 10, 5: 958-979.
- Willner D., Daly J., Whiley D., Grimwood K., Wainwright C. E., Hugenholtz P. 2012. Comparison of DNA extraction methods for microbial community profiling with an application to pediatric bronchoalveolar lavage samples. *PLoS ONE*, 7, 4: e34605, doi: 10.1371/journal.pone.0034605: 12 str.
- Worbs T., Forster R. 2007. A key role for CCR7 in establishing central and peripheral tolerance. *Trends in Immunology*, 28, 6: 274-280.
- Xu Y. P., He H., Li C. W., Shi Y. Z., Wang Q., Li W., Song W. G. 2011. Immunosuppressive effect of progesterone on dendritic cells in mice. *Journal of Reproductive Immunology*, 91, 1-2: 17-23.
- Yamashita S., Maeshima A., Kojima I., Nojima Y. 2004. Activin A is a potent activator of renal interstitial fibroblasts. *Journal of the American Society of Nephrology*, 15, 1: 91-101.
- Yang S. H., Sharrocks A. D., Whitmarsh A. J. 2013. MAP kinase signalling cascades and transcriptional regulation. *Gene*, 513, 1: 1-13.
- Zhou J. S., Shu Q., Rutherford K. J., Prasad J., Gopal P. K., Gill H. S. 2000. Acute oral toxicity and bacterial translocation studies on potentially probiotic strains of lactic acid bacteria. *Food and Chemical Toxicology*, 38, 2-3: 153-161.
- Zoetendal E. G., Collier C. T., Koike S., Mackie R. I., Gaskins H. R. 2004. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. *Journal of Nutrition*, 134, 2: 465-472.
- Zorič Peternel M., Čanžek Majhenič A., Holo H., Nes I., Salehian Z., Berlec A., Rogelj I. 2010. Wide-inhibitory spectra bacteriocins produced by *Lactobacillus gasseri* K7. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2, 4: 233-240.
- Zotta T., Parente E., Ricciardi A. 2009. Viability staining and detection of metabolic activity of sourdough lactic acid bacteria under stress conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, 6: 1119-1124.

ZAHVALA

Disertacijo, ki jo držite v rokah, dojemam kot zaključek formalnega izobraževanja in kot zaključek določenega obdobja v mojem življenju. Na tej poti so mi pomagali številni tako strokovno kakor tudi osebno, velikokrat pa tudi oboje. Zato bi se na tem mestu rad zahvalil prav vsem, ki ste mi kdajkoli bili v pomoč in oporo. Posebej pa bi želel izpostaviti ljudi, ki so v veliki meri pripomogli k nastanku tega dela.

Posebna zahvala gre mentorici prof. dr. Ireni Rogelj, ki me je sprejela pod svoje okrilje in mi omogočila, da sem lahko spoznal lepote raziskovalnega dela. Njeni nasveti in spodbuda predvsem takrat, ko je šlo kaj narobe, so bili neprecenljivi. S svojo odločnostjo in pragmatičnostjo mi je postavila zgled, kako se lotiti marsikaterega problema.

Hvala tudi somentorju prof. dr. Simonu Horvatu, ki me je uvedel v delo z laboratorijskimi živalmi in mi omogočil izvedbo poskusa na miših. Poleg strokovnosti sta njegova pozitivna energija in mišljenje tisto, kar še kako potrebuje vsak mladi raziskovalec.

Hvala članoma komisije prof. dr. Jagodi Šušković in prof. dr. Petru Rasporju za hiter in temeljit pregled doktorske disertacije in njuno fleksibilnost pri dogovarjanju terminov za zagovor.

Posebna zahvala gre tudi dr. Bojani Bogovič Matijašić, katero je že kolega dr. Trmčič pred leti v svoji zahvali opisal kot »dobro vilo«. Očitno njena dobrotu ni bila rezervirana samo zanj, saj bi tudi meni brez nje bilo veliko težje. Pri njej sem vedno dobil odgovor na mnoga moja smiselna in nesmiselna vprašanja tudi takrat, ko je bila zasuta z delom. Hvala!

Hvala Vesni Mrak, brez katere si res ne predstavljam poskusa na miškah. Njena brezpogojna pomoč in sposobnost udejanjiti še teko zakomplicirano idejo je bila ključna pri izvedbi poskusa.

Hvala prof. dr. Avreliji Cencič, ki mi je omogočila delo s celično linijo H4-1 v njenem laboratoriju na Katedri za biologijo, mikrobiologijo, molekularno biologijo in biotehnologijo, na FKBPV, Univerze v Mariboru. Na žalost se je njena življenjska pot končala mnogo, mnogo prezgodaj, da bi se ji še enkrat lahko zahvalil za pomoč. Hvala njeni celotni ekipi na čelu z dr. Tomažem Langerholcem za dobro delovno vzdušje in vso pomoč v času mojega bivanja v Mariboru. Hvala Lidiji, Tinetu, Mariu in Eneku, ki so zaradi mene mnogokrat ostajali v službi dlje, kot so si želeli.

Hvala dr. Urbanu Švajgru iz Zavoda RS za transfuzijsko medicino, za izolacijo nezrelih dendritičnih celic in nasvete pri rokovanju z njimi.

Hvala celotnemu kolektivu Inštituta za mlekarstvo in probiotike, saj so mi velikokrat priskočili na pomoč in vsak dan naredili moje delovno okolje prijetno in zabavno. Posebej hvala mojim zdajšnjim in bivšim »cimrom« iz pisarne »MR-jev«. V zadnjih štirih letih sem z njimi preživel več časa kot z domačimi in samo njim se lahko zahvalim, da je moje življenje v tem času minevalo v mirnem in prijetnem vzdušju.

Omeniti velja še nekoga, za katerega je ob njegovem odhodu na Univerzo Cornell prof. dr. Rogljeva dejala: »On je tavžentroža!« Da, kolega dr. Aljoša Trmčić je bil kot zdravilo za vse težave in njegovi nasveti so bili nasveti sodelavca in prijatelja obenem.

Nazadnje pridejo na vrsto prijatelji in družina, čeprav imajo največ zaslug za to, da danes pišem to zahvalo. Hvala očetu in mami, da sta me podpirala vsa ta leta – moj doktorat je vajuin uspeh! Hvala bratu Petru za vso podporo in reševanje vseh tehničnih zagat. Hvala tudi Mihi, Anji, Nini, Gašperju, Zvonku in Jožici, moji drugi družini, ki mi upam da ni zamerila, ker sem imel v zadnjih štirih letih nekoliko manj časa zanjo.

In hvala tebi Urška, prav za vse!

PRILOGE

Priloga A: Rezultati metagenomske analize 16S rDNA – zastopanost pripisanih odčitkov na nivoju debel. Rezultati so prikazani kot deleži (%) glede na celokupno število pripisanih odčitkov. Paralelni vzorci (n=4) iz posamezne skupine so bili združeni pred sekvenciranjem. Vzorci so označeni po enačbi XN₁-Z, pri čemer X predstavlja oznako skupine (N – kontrolna skupina, G – skupina hranjena z *Lactobacillus rhamnosus* GG, K – skupina hranjena z *Lactobacillus gasseri* K7, odpornim proti rifampicinu), N₁ predstavlja dan žrtvovanja (3 – 3. dan po kotitvi, 4 – 8. dan po kotitvi) in Z predstavlja tip vzorca (MŽ – mlečna žleza, MV – mezenterični limfni vozli, ML – mleko).

Annex A: Results of metagenomic analysis of 16S rDNA – abundance of assigned reads of at the phylum level. Results are shown as proportions (%) based on the total number assigned reads. Parallel samples (n = 4) from each group were pooled prior to sequencing. Samples are marked by the formula XN₁-Z, where X stands for group code (N – control group, G – group fed with *Lactobacillus rhamnosus* GG, K – group fed with rifampicin resistant *Lactobacillus gasseri* K7), N₁ stands for the day of sacrifice (3 – 3 days after delivery, 4 – 8 days after delivery) and Z stands for sample type (MŽ – mammary gland, MV – mesenteric lymph nodes, ML – milk).

Deblo/Vzorec	N3-MŽ	N4-MŽ	G3-MŽ	G4-MŽ	K3-MŽ	K4-MŽ	N3-MV	N4-MV	G3-MV	G4-MV	K3-MV	K4-MV	K4-ML
Celokupno št. odčitkov	6156	7629	11444	13468	9555	24268	8502	8897	4997	3366	4895	11372	40862
Št. pripisanih odčitkov	5650	6856	11079	13295	8936	24188	5022	7259	2950	1395	2341	7440	40766
% pripisanih odčitkov	91,78 %	89,87 %	96,81 %	98,72 %	93,52 %	99,67 %	59,07 %	81,59 %	59,04 %	41,44 %	47,82 %	65,42 %	99,77 %
<i>Actinobacteria</i>	0,11 %	0,15 %	0,07 %	0,24 %	0,51 %	0,02 %	0,00 %	0,34 %	0,14 %	0,14 %	0,00 %	0,08 %	0,00 %
<i>Bacteroidetes</i>	79,27 %	85,53 %	51,44 %	77,95 %	85,15 %	0,56 %	88,73 %	88,81 %	90,78 %	84,80 %	93,04 %	87,16 %	0,32 %
<i>Chlamydiae</i>	0,00 %	0,00 %	0,01 %	0,02 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Deinococcus-Thermus</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,03 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Firmicutes</i>	0,04 %	0,12 %	0,96 %	1,08 %	0,22 %	99,24 %	0,14 %	2,52 %	0,58 %	0,43 %	0,17 %	5,04 %	99,55 %
<i>Fusobacteria</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,01 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Proteobacteria</i>	20,58 %	14,21 %	47,52 %	20,71 %	14,10 %	0,18 %	11,13 %	8,22 %	8,51 %	14,62 %	6,79 %	7,72 %	0,13 %
<i>Spirochaetes</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,04 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>TM7</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,01 %	0,00 %	0,00 %	0,01 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %

Priloga B: Rezultati metagenomske analize 16S rDNA – zastopanost pripisanih odčitkov na nivoju družin. Rezultati so prikazani kot deleži (%) glede na celokupno število pripisanih odčitkov. Paralelni vzorci (n=4) iz posamezne skupine so bili združeni pred sekvenciranjem. Vzorci so označeni po enačbi XN₁-Z, pri čemer X predstavlja oznako skupine (N – kontrolna skupina, G – skupina hranjena z *Lactobacillus rhamnosus* GG, K – skupina hranjena z *Lactobacillus gasseri* K7, odpornim proti rifampicinu), N₁ predstavlja dan žrtvovanja (3 – 3. dan po kotitvi, 4 – 8. dan po kotitvi) in Z predstavlja tip vzorca (MŽ – mlečna žleza, MV – mezenterični limfni vozli, ML – mleko).

Annex B: Results of metagenomic analysis of 16S rDNA – abundance of assigned reads of at the family level. Results are shown as proportions (%) based on the total number assigned reads. Parallel samples (n = 4) from each group were pooled prior to sequencing. Samples are marked by the formula XN₁-Z, where X stands for group code (N – control group, G – group fed with *Lactobacillus rhamnosus* GG, K – group fed with rifampicin resistant *Lactobacillus gasseri* K7), N₁ stands for the day of sacrifice (3 – 3 days after delivery, 4 – 8 days after delivery) and Z stands for sample type (MŽ – mammary gland, MV – mesenteric lymph nodes, ML – milk).

Družina /Vzorec	N3-MŽ	N4-MŽ	G3-MŽ	G4-MŽ	K3-MŽ	K4-MŽ	N3-MV	N4-MV	G3-MV	G4-MV	K3-MV	K4-MV	K4-ML
Celokupno št. odčitkov	6156	7629	11444	13468	9555	24268	8502	8897	4997	3366	4895	11372	40862
Št. pripisanih odčitkov	5586	6795	10870	13124	8867	22831	5004	7167	2933	1390	2332	7364	39005
% pripisanih odčitkov	90,74 %	89,07 %	94,98 %	97,45 %	92,80 %	94,08 %	58,86 %	80,56 %	58,70 %	41,30 %	47,64 %	64,76 %	95,46 %
<i>Acetobacteraceae</i>	0,00 %	0,00 %	0,01 %	0,01 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Acidimicrobidae\incertae\ sedis</i>	0,00 %	0,01 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Actinomycetaceae</i>	0,02 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,01 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Aeromonadaceae</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,06 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Alcaligenaceae</i>	0,43 %	0,35 %	0,49 %	0,90 %	0,58 %	0,01 %	0,30 %	0,29 %	0,41 %	1,01 %	0,39 %	0,19 %	0,01 %
<i>Bacillaceae</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,31 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Bacteroidaceae</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,08 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,01 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Bifidobacteriaceae</i>	0,00 %	0,01 %	0,00 %	0,13 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Bradyrhizobiaceae</i>	0,04 %	0,03 %	0,03 %	0,02 %	0,01 %	0,00 %	0,00 %	0,03 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,08 %	0,00 %
<i>Brucellaceae</i>	0,16 %	0,18 %	0,26 %	0,18 %	0,10 %	0,00 %	0,00 %	0,14 %	0,07 %	0,07 %	0,00 %	0,05 %	0,00 %
<i>Burkholderiaceae</i>	0,00 %	0,07 %	0,16 %	0,53 %	0,07 %	0,00 %	0,48 %	0,15 %	0,41 %	0,22 %	0,00 %	0,07 %	0,01 %
<i>Burkholderiales\incertae\ sedis</i>	0,02 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,03 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %

se nadaljuje

nadaljevanje priloge B

Družina/Vzorec	N3-MŽ	N4-MŽ	G3-MŽ	G4-MŽ	K3-MŽ	K4-MŽ	N3-MV	N4-MV	G3-MV	G4-MV	K3-MV	K4-MV	K4-ML
<i>Caulobacteraceae</i>	1,83 %	1,65 %	3,29 %	2,65 %	2,08 %	0,01 %	1,62 %	1,10 %	0,99 %	1,29 %	0,69 %	1,10 %	0,01 %
<i>Cellulomonadaceae</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,03 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Chitinophagaceae</i>	0,00 %	0,01 %	0,05 %	0,01 %	0,01 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Clostridiaceae</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,01 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,22 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Comamonadaceae</i>	0,02 %	0,07 %	0,07 %	0,11 %	0,05 %	0,00 %	0,12 %	0,13 %	0,27 %	0,07 %	0,04 %	0,01 %	0,00 %
<i>Coriobacteriaceae</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,02 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Corynebacteriaceae</i>	0,00 %	0,03 %	0,00 %	0,00 %	0,11 %	0,00 %	0,00 %	0,07 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,03 %	0,00 %
<i>Cytophagaceae</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,01 %	0,00 %
<i>Deinococcaceae</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,03 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Enterobacteriaceae</i>	0,20 %	0,04 %	0,00 %	0,09 %	0,03 %	0,00 %	0,00 %	0,03 %	0,00 %	0,00 %	0,04 %	0,00 %	0,00 %
<i>Enterococcaceae</i>	0,00 %	0,00 %	0,04 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,11 %	0,07 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Erysipelotrichaceae</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,01 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Flavobacteriaceae</i>	70,39 %	79,03 %	46,17 %	68,27 %	76,51 %	0,53 %	84,01 %	82,89 %	87,08 %	79,93 %	90,27 %	83,20 %	0,29 %
<i>Fusobacteriaceae</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,01 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Halothiobacillaceae</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,01 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Hyphomicrobiaceae</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,02 %	0,00 %	0,00 %	0,04 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Incertae Sedis XI</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,01 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,10 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Incertae Sedis XIV</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,02 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Lachnospiraceae</i>	0,00 %	0,01 %	0,00 %	0,36 %	0,00 %	0,00 %	0,02 %	0,10 %	0,00 %	0,07 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Lactobacillaceae</i>	0,00 %	0,00 %	0,48 %	0,06 %	0,02 %	0,00 %	0,00 %	0,03 %	0,31 %	0,00 %	0,04 %	0,76 %	0,01 %
<i>Legionellaceae</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,03 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Leuconostocaceae</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,01 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Methylobacteriaceae</i>	0,00 %	0,03 %	0,02 %	0,02 %	0,01 %	0,00 %	0,00 %	0,01 %	0,03 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %

se nadaljuje

nadaljevanje priloge B

Družina/Vzorec	N3-MŽ	N4-MŽ	G3-MŽ	G4-MŽ	K3-MŽ	K4-MŽ	N3-MV	N4-MV	G3-MV	G4-MV	K3-MV	K4-MV	K4-ML
<i>Microbacteriaceae</i>	0,04 %	0,04 %	0,05 %	0,03 %	0,27 %	0,03 %	0,00 %	0,10 %	0,00 %	0,07 %	0,00 %	0,04 %	0,00 %
<i>Micrococcaceae</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,06 %	0,03 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Moraxellaceae</i>	0,29 %	0,07 %	0,02 %	0,09 %	0,03 %	0,00 %	0,38 %	0,03 %	0,92 %	0,22 %	0,00 %	0,01 %	0,00 %
<i>Nakamurellaceae</i>	0,00 %	0,03 %	0,01 %	0,01 %	0,11 %	0,00 %	0,00 %	0,03 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Neisseriaceae</i>	0,00 %	0,00 %	0,01 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Nocardiaceae</i>	0,04 %	0,00 %	0,00 %	0,02 %	0,01 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Oxalobacteraceae</i>	0,00 %	0,01 %	0,02 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,03 %	0,20 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Paenibacillaceae</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,03 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Parachlamydiaceae</i>	0,00 %	0,00 %	0,01 %	0,02 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Pasteurellaceae</i>	0,00 %	0,01 %	0,07 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,01 %
<i>Peptococcaceae</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,04 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Phyllobacteriaceae</i>	0,11 %	0,01 %	0,05 %	0,13 %	0,05 %	0,00 %	0,06 %	0,04 %	0,03 %	0,00 %	0,00 %	0,03 %	0,00 %
<i>Porphyromonadaceae</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,02 %	0,06 %	0,00 %	0,00 %	0,13 %	0,00 %	0,07 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Prevotellaceae</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,01 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Propionibacteriaceae</i>	0,00 %	0,01 %	0,02 %	0,02 %	0,01 %	0,00 %	0,00 %	0,01 %	0,00 %	0,07 %	0,00 %	0,01 %	0,00 %
<i>Pseudomonadaceae</i>	15,61 %	10,57 %	40,90 %	13,56 %	9,86 %	0,08 %	7,33 %	5,09 %	4,30 %	10,72 %	4,85 %	5,61 %	0,04 %
<i>Rhizobiaceae</i>	0,00 %	0,01 %	0,02 %	0,05 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,03 %	0,00 %	0,07 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Rhodobacteraceae</i>	0,00 %	0,00 %	0,03 %	0,02 %	0,01 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,03 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Rhodocyclaceae</i>	0,00 %	0,01 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Rikenellaceae</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,03 %	0,00 %	0,00 %	0,02 %	0,00 %	0,00 %	0,07 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Ruminococcaceae</i>	0,00 %	0,03 %	0,02 %	0,27 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,70 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Sinobacteraceae</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,01 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Sphingobacteriaceae</i>	9,27 %	6,84 %	5,89 %	10,03 %	8,90 %	0,06 %	4,82 %	6,70 %	4,02 %	5,04 %	3,09 %	4,49 %	0,03 %

se nadaljuje

nadaljevanje priloge B

Družina/Vzorec	N3-MŽ	N4-MŽ	G3-MŽ	G4-MŽ	K3-MŽ	K4-MŽ	N3-MV	N4-MV	G3-MV	G4-MV	K3-MV	K4-MV	K4-ML
<i>Sphingomonadaceae</i>	0,09 %	0,00 %	0,01 %	0,02 %	0,08 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,03 %	0,00 %
<i>Spirochaetaceae</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,04 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Staphylococcaceae</i>	0,00 %	0,01 %	0,37 %	0,01 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,04 %	0,00 %	0,07 %	0,00 %	0,23 %	0,00 %
<i>Streptococcaceae</i>	0,04 %	0,04 %	0,01 %	0,09 %	0,19 %	99,26 %	0,12 %	0,18 %	0,03 %	0,00 %	0,00 %	3,64 %	99,56 %
<i>Veillonellaceae</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,13 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Vibrionaceae</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,02 %	0,00 %	0,07 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Xanthomonadaceae</i>	1,43 %	0,72 %	1,45 %	2,11 %	0,83 %	0,01 %	0,66 %	0,74 %	0,61 %	0,94 %	0,60 %	0,39 %	0,03 %

Priloga C: Rezultati metagenomske analize 16S rDNA – zastopanost pripisanih odčitkov na nivoju rodov. Rezultati so prikazani kot deleži (%) glede na celokupno število pripisanih odčitkov. Paralelni vzorci (n=4) iz posamezne skupine so bili združeni pred sekvenciranjem. Vzorci so označeni po enačbi XN₁-Z, pri čemer X predstavlja oznako skupine (N – kontrolna skupina, G – skupina hranjena z *Lactobacillus rhamnosus* GG, K – skupina hranjena z *Lactobacillus gasseri* K7, odpornim proti rifampicinu), N₁ predstavlja dan žrtvovanja (3 – 3. dan po kotitvi, 4 – 8. dan po kotitvi) in Z predstavlja tip vzorca (MŽ – mlečna žleza, MV – mezenterični limfni vozli, ML – mleko).

Annex C: Results of metagenomic analysis of 16S rDNA – abundance of assigned reads of at the genus level. Results are shown as proportions (%) based on the total number assigned reads. Parallel samples (n = 4) from each group were pooled prior to sequencing. Samples are marked by the formula XN₁-Z, where X stands for group code (N – control group, G – group fed with *Lactobacillus rhamnosus* GG, K – group fed with rifampicin resistant *Lactobacillus gasseri* K7), N₁ stands for the day of sacrifice (3 – 3 days after delivery, 4 – 8 days after delivery) and Z stands for sample type (MŽ – mammary gland, MV – mesenteric lymph nodes, ML – milk).

Rod/Vzorec	N3-MŽ	N4-MŽ	G3-MŽ	G4-MŽ	K3-MŽ	K4-MŽ	N3-MV	N4-MV	G3-MV	G4-MV	K3-MV	K4-MV	K4-ML
Celokupno št. odčitkov	6156	7629	11444	13468	9555	24268	8502	8897	4997	3366	4895	11372	40862
Št. pripisanih odčitkov	2764	3009	7240	6610	4038	22730	2035	2916	1123	620	867	2963	38910
% pripisanih odčitkov	44,90 %	39,44 %	63,26 %	49,08 %	42,26 %	93,66 %	23,94 %	32,78 %	22,47 %	18,42 %	17,71 %	26,06 %	95,22 %
<i>Acetivibrio</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,07 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Achromobacter</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,32 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Acidocella</i>	0,00 %	0,00 %	0,01 %	0,02 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Acidovorax</i>	0,00 %	0,00 %	0,04 %	0,03 %	0,02 %	0,00 %	0,00 %	0,07 %	0,09 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Acinetobacter</i>	0,58 %	0,17 %	0,03 %	0,02 %	0,05 %	0,00 %	0,93 %	0,07 %	2,32 %	0,32 %	0,00 %	0,03 %	0,00 %
<i>Actinomyces</i>	0,04 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,03 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Actinotalea</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,07 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Aeromonas</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,07 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Afipia</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,02 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Agromyces</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,07 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Alcaligenes</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,02 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Alistipes</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,06 %	0,00 %	0,00 %	0,05 %	0,00 %	0,00 %	0,16 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Anaerococcus</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,02 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,09 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Anoxybacillus</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,03 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %

se nadaljuje

nadaljevanje priloge C

Rod/Vzorec	N3-MŽ	N4-MŽ	G3-MŽ	G4-MŽ	K3-MŽ	K4-MŽ	N3-MV	N4-MV	G3-MV	G4-MV	K3-MV	K4-MV	K4-ML
<i>Arcicella</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,03 %	0,00 %
<i>Arthrobacter</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,07 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Asticcacaulis</i>	0,04 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Bacteroides</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,15 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,03 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Barnesiella</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,03 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,10 %	0,00 %	0,16 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Bifidobacterium</i>	0,00 %	0,03 %	0,00 %	0,24 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Blautia</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,05 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Bordetella</i>	0,40 %	0,20 %	0,30 %	0,67 %	0,54 %	0,00 %	0,34 %	0,41 %	0,27 %	0,81 %	0,46 %	0,17 %	0,00 %
<i>Bosea</i>	0,00 %	0,00 %	0,01 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Bradyrhizobium</i>	0,04 %	0,03 %	0,03 %	0,03 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,10 %	0,00 %
<i>Brevundimonas</i>	3,58 %	3,72 %	4,90 %	5,26 %	4,56 %	0,01 %	3,98 %	2,71 %	2,40 %	2,90 %	1,85 %	2,70 %	0,01 %
<i>Burkholderia</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,09 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,07 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,03 %	0,00 %
<i>Buttiauxella</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,06 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Chryseobacterium</i>	0,00 %	0,03 %	0,03 %	0,00 %	0,10 %	0,00 %	0,15 %	0,21 %	0,18 %	0,48 %	0,00 %	0,07 %	0,00 %
<i>Cloacibacterium</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,96 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Clostridium</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,02 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,48 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Collinsella</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,05 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Corynebacterium</i>	0,00 %	0,07 %	0,00 %	0,00 %	0,25 %	0,00 %	0,00 %	0,17 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,07 %	0,00 %
<i>Deinococcus</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,07 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Delftia</i>	0,00 %	0,07 %	0,03 %	0,03 %	0,02 %	0,00 %	0,00 %	0,10 %	0,09 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Desulfosporosinus</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,03 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Desulfotomaculum</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,07 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Devosia</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,03 %	0,00 %	0,00 %	0,10 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %

se nadaljuje

nadaljevanje priloge C

Rod/Vzorec	N3-MŽ	N4-MŽ	G3-MŽ	G4-MŽ	K3-MŽ	K4-MŽ	N3-MV	N4-MV	G3-MV	G4-MV	K3-MV	K4-MV	K4-ML
<i>Dokdonia</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,03 %	0,00 %
<i>Dorea</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,12 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Dyella</i>	0,00 %	0,00 %	0,01 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Elizabethkingia</i>	0,14 %	0,10 %	0,10 %	0,24 %	0,40 %	0,00 %	0,15 %	0,34 %	0,27 %	1,77 %	0,35 %	0,51 %	0,00 %
<i>Empedobacter</i>	0,00 %	0,00 %	0,04 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Enhydrobacter</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,17 %	0,02 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Enterococcus</i>	0,00 %	0,00 %	0,03 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,27 %	0,18 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Escherichia/Shigella</i>	0,18 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Ethanoligenens</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,62 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Faecalibacterium</i>	0,00 %	0,00 %	0,01 %	0,08 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Flavobacterium</i>	42,08 %	54,40 %	20,75 %	40,38 %	49,73 %	0,13 %	61,72 %	59,91 %	67,50 %	54,35 %	74,39 %	58,76 %	0,08 %
<i>Fusobacterium</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,03 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Gemella</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,02 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,10 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Geobacillus</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,72 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Herbaspirillum</i>	0,00 %	0,00 %	0,01 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,03 %	0,53 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Hydrocarboniphaga</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,03 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Ilumatobacter</i>	0,00 %	0,03 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Janthinobacterium</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,03 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Klebsiella</i>	0,00 %	0,03 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Lactobacillus</i>	0,00 %	0,00 %	0,72 %	0,06 %	0,05 %	0,00 %	0,00 %	0,07 %	0,80 %	0,00 %	0,12 %	1,89 %	0,01 %
<i>Lactococcus</i>	0,07 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,10 %	0,00 %	0,00 %	0,07 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Legionella</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,07 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Mesorhizobium</i>	0,11 %	0,00 %	0,00 %	0,08 %	0,02 %	0,00 %	0,10 %	0,03 %	0,09 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %

se nadaljuje

nadaljevanje priloge C

Rod/Vzorec	N3-MŽ	N4-MŽ	G3-MŽ	G4-MŽ	K3-MŽ	K4-MŽ	N3-MV	N4-MV	G3-MV	G4-MV	K3-MV	K4-MV	K4-ML
<i>Methylobacterium</i>	0,00 %	0,07 %	0,03 %	0,03 %	0,02 %	0,00 %	0,00 %	0,03 %	0,09 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Microbacterium</i>	0,04 %	0,07 %	0,07 %	0,06 %	0,40 %	0,02 %	0,00 %	0,07 %	0,00 %	0,16 %	0,00 %	0,10 %	0,00 %
<i>Micrococcus</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,03 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Nakamurella</i>	0,00 %	0,07 %	0,01 %	0,02 %	0,25 %	0,00 %	0,00 %	0,07 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Niastella</i>	0,00 %	0,00 %	0,04 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Novosphingobium</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,02 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Ochrobactrum</i>	0,33 %	0,40 %	0,39 %	0,35 %	0,22 %	0,00 %	0,00 %	0,34 %	0,18 %	0,16 %	0,00 %	0,13 %	0,00 %
<i>Oscillibacter</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,06 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Paenibacillus</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,07 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Paludibacter</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,07 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Parabacteroides</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,02 %	0,12 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Paracoccus</i>	0,00 %	0,00 %	0,04 %	0,05 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,09 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Pediococcus</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,06 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Pedobacter</i>	17,26 %	14,06 %	8,02 %	18,79 %	18,90 %	0,05 %	11,25 %	15,29 %	10,06 %	10,16 %	7,84 %	10,66 %	0,03 %
<i>Pelomonas</i>	0,00 %	0,10 %	0,01 %	0,12 %	0,02 %	0,00 %	0,29 %	0,03 %	0,53 %	0,16 %	0,12 %	0,00 %	0,00 %
<i>Phyllobacterium</i>	0,11 %	0,03 %	0,07 %	0,14 %	0,05 %	0,00 %	0,05 %	0,07 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,07 %	0,00 %
<i>Prevotella</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,02 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Propionibacterium</i>	0,00 %	0,03 %	0,03 %	0,03 %	0,02 %	0,00 %	0,00 %	0,03 %	0,00 %	0,16 %	0,00 %	0,03 %	0,00 %
<i>Pseudomonas</i>	31,33 %	23,70 %	60,90 %	26,75 %	21,47 %	0,08 %	17,84 %	12,41 %	11,13 %	24,03 %	13,03 %	13,87 %	0,04 %
<i>Pseudoxanthomonas</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,03 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Psychrobacter</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,09 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Ralstonia</i>	0,00 %	0,17 %	0,22 %	0,92 %	0,15 %	0,00 %	1,18 %	0,31 %	1,07 %	0,48 %	0,00 %	0,13 %	0,01 %
<i>Rhizobium</i>	0,00 %	0,03 %	0,03 %	0,09 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,07 %	0,00 %	0,16 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %

se nadaljuje

nadaljevanje priloge C

Rod/Vzorec	N3-MŽ	N4-MŽ	G3-MŽ	G4-MŽ	K3-MŽ	K4-MŽ	N3-MV	N4-MV	G3-MV	G4-MV	K3-MV	K4-MV	K4-ML
<i>Rhodanobacter</i>	0,18 %	0,10 %	0,06 %	0,06 %	0,05 %	0,00 %	0,20 %	0,14 %	0,00 %	0,00 %	0,12 %	0,00 %	0,00 %
<i>Rhodococcus</i>	0,07 %	0,00 %	0,00 %	0,03 %	0,02 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Roseburia</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,08 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Rothia</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,03 %	0,09 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Rudaea</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,03 %	0,00 %
<i>Ruminococcus</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,02 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Sphingobacterium</i>	1,19 %	0,90 %	0,58 %	0,80 %	0,15 %	0,00 %	0,29 %	0,99 %	0,18 %	1,13 %	0,46 %	0,34 %	0,00 %
<i>Sphingomonas</i>	0,18 %	0,00 %	0,01 %	0,03 %	0,17 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,07 %	0,00 %
<i>Staphylococcus</i>	0,00 %	0,03 %	0,55 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,16 %	0,00 %	0,57 %	0,00 %
<i>Stenotrophomonas</i>	2,03 %	1,23 %	1,85 %	3,19 %	1,63 %	0,00 %	1,08 %	0,99 %	1,42 %	1,94 %	1,27 %	0,71 %	0,01 %
<i>Streptococcus</i>	0,00 %	0,10 %	0,01 %	0,18 %	0,32 %	99,68 %	0,29 %	0,38 %	0,09 %	0,00 %	0,00 %	8,88 %	99,79 %
<i>Subdoligranulum</i>	0,00 %	0,03 %	0,01 %	0,12 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>TM7_genera\incertae\sedis</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,02 %	0,00 %	0,00 %	0,03 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Tepidimonas</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,07 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Thiofaba</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,03 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Treponema</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,10 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Turicibacter</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,02 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Variovorax</i>	0,04 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Vibrio</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,18 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
<i>Weissella</i>	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,03 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Primož TREVEN

**VPLIV PROBIOTIKOV NA MIKROBIOTO MLEČNE
ŽLEZE IN MLEKA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2014