БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ „СТЕФАН АНГЕЛОВ“

Ирина Маринова Готова

ПРОУЧВАНЕ НА ИМУНОРЕГУЛАТОРНИ СВОЙСТВА НА МЛЕЧНОКИСЕЛИ БАКТЕРИИ И ПОДБОР НА ЩАМОВЕ ЗА ПРОДУКТИ СЪС ЗДРАВНИ ПОЛЗИ

АВТОРЕФЕРАТ

за присъждане на образователна и научна степен **„ДОКТОР”**

Код: 010612

Научни ръководители: Чл.- кор. Христо Найденски, двмн
Проф. д-р Жечко Димитров

СОФИЯ
2019

Дисертационният труд съдържа 170 страници, в които са поместени 42 фигури и 25 таблици. Използвани са 331 литературни източника, от които 9 са на български автори.

Автор: Ирина Маринова Готова

Списък на използваните съкращения

ГИТ – гастроинтестинален тракт

МКБ – млечнокисели бактерии

CFU – Colony Forming Unit

FAO – Food and Agriculture Organization

WHO – World Health Organization

GRAS – Generally Regarded As Safe

QPS – Quality Presumption of Safety (Квалифицирана Презумпция за Безопасност), е въведена от EFSA, аналогична на GRAS-статуса система за оценка безопасността на микроорганизмите в храни и фуражи

PCR – Polymerase Chain Reaction

ROS – Reactive Oxygene Species

АК – аминокиселина

ЕЦМ – екстрацелуларен матрикс

ИС – имунна система

КП – криопротектор

ХС – хранителна среда

APC – антиген представящи клетки

БП - Биоактивни пептиди

ACE – Angiotensin-converting enzyme

BSH – Bile Salt Hydrolase

SOD – Superoxide dismutase

IL- Интерлевкин

IBD - Inflammatory bowel disease

TNF-α Tumor Necrosis Factor alpha

TGF-β Transforming Growth Factor beta

IFN - Interferon

TRFLP – Terminal restriction fragment length polymorphism

ELISA – Enzime linked immunosorbent assays

ВЪВЕДЕНИЕ

Добре известен факт е, че урбанизираният начин на живот, с неговите негативни страни, води до дисбаланс в човешката микрофлора. В това число се включват: стресът, неправилното хранене, масовата и дори безразборна употреба на лекарствени средства и антибиотици, както и замърсената околна среда в големите градове. В нашето съвремие все повече хора в активна възраст и дори деца, страдат от възпалитени чревни заболявания или хранителни алергии. Причините и механизмите за повечето от тях все още се изясняват, но учените по цял свят активно работят и научните изследвания сочат, че полезни ефекти за здравето на човека могат и трябва да бъдат търсени сред свойствата на пробиотичните бактерии.

Пробиотиците дават естествена и щадяща организма алтернатива за справяне с локални дисфункции на гастро-интестиналния тракт, както и свързаните с това състояния на единични, остри и/или хронични възпалителни процеси. Пробиотичните бактерии имат потенциала да повлияват и върху имунния отговор в желана посока, но есенциално важно за бъдещите проучвания е изясняването на механизмите на имунологичното действие.

През последните години науката и индустрията усилено се стремят да задоволят нарастващото търсене, след като веднъж вече беше събуден интересът на съвременния човек към пробиотични продукти.

Отдавна съществуваща в Япония, разпространила се в Европа, в Азия и в САЩ, „ модата” на пробиотичните продукти, към настоящия момент, се е превърнала в многообещаваща възможност за винаги отвореня пазар на иновации, целящи подобряване качеството на живот на хората. Ето защо, разработката на пробиотични продукти представлява интерес, както от чисто научна, така и от икономическа гледна точка.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел: Изследване на адхезивни и имунорегулаторни свойства на МКБ. Подбор на щамове за разработване на лиофилизирани пробиотични препарати.

Задачи:

1. Идентифициране на видовата принадлежност и щамовата идентичност на изолати МКБ чрез съвременни генетични методи
2. Адаптиране на TRFLP метод за безкултивационно определяне на основни бацтериални групи в човешката интестинална микрофлора.
3. Изследване на адхезивната способност на МКБ с цел първоначален подбор на пробиотични щамове и установяване на природата на адхезивните фактори за най-силно адхезиращите щамове. Изследване на експресията на бактериални гени свързани с адхезивната способност с помощта на Real- time PCR техники.
4. Оценка на цитокини, свързани със съответния тип имунен отговор (клетъчно-медииран, хуморален и възпалителен), индуцирани от изследваните изолати. Подбор на щамове с потенциал да повлияват имунния отговор в макроорганизма.
5. Изолиране и пречистване на биоактивни пептиди, освободени от МКБ, способни да индуцират значимо различни цитокини.
6. Провеждане на клинични изпитания на подбран пробиотичен щам.
7. Разработване на технологична схема за производство на лиофилизирани полибактериални, синбиотични препарати.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Микроорганизми и клетъчни линии

1.1. Референтни щамове

1.2. Изследвани изолати

1.3. Клетъчни линии и спленоцити

2. Хранителни среди и буфери

2.1. Среди за култивиране на бактерии

2.2. Среди за култивиране на клетъчни линии и спленоцити

2.3. Буфери

3. Криопротекторни смеси

4. Молекулярни методи за идентификация и типиране

4.1. Типиране на ниво род - Родово специфичен PCR

4.2. Типиране на ниво вид

4.3. Типиране на ниво щам - Пулсова електрофореза

4.4. Безкултивционен метод за определяне на бактериалното разнообразие в сложни матрици - TRFLP

5. Адхезия и молекулни основи на адхезията

5.1. Оценка на адхезивната способност на щамове МКБ към епителни клетъчни линии

5.2. Установаване природата на адхезивните фактори

5.3. Определяне на повърхностно-протеиновите адхезивни фактори

5.4. Real-time PCR методи за определяне експресията на структурни гени от важност за адхезията на бактерии към човешки мукус

6. Култивиране и поддържане на клетъчни линии за оценка индукцията на цитокини

6.1. Епителни човешки клетъчни линии - CaCo-2 и HT-29

6.2. Моноцитна човешка клетъчна линия - THP1

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

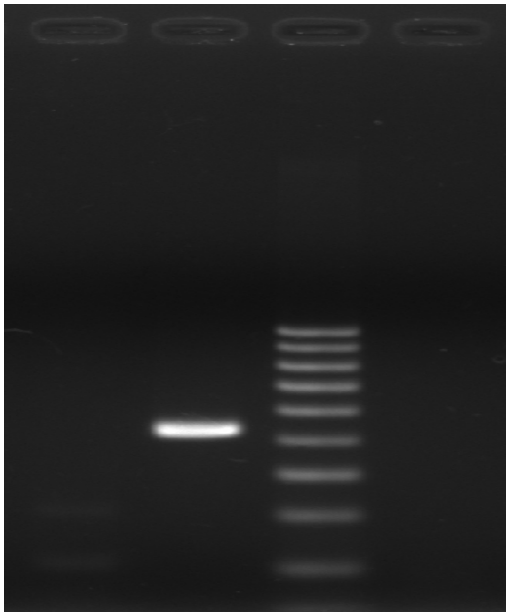
1. ХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА ВИДОВАТА ПРИНАДЛЕЖНОСТ И ЩАМОВАТА ИДЕНТИЧНОСТ НА МКБ ЧРЕЗ ДНК МЕТОДИ

Изолатите са първоначално групирани според източника, от който са изолирани като киселомлечни и интестинални. След трикратно изолиране и пречистване през единични колонии и микроскопско наблюдение, морфологично са отдиференцирани: група на коки, група на различни пръчки и група на бифидобактерии. Идентифицирането чрез молекулярни мртоди във всяка от групите следва определен системен ход, при който се започва с определяне на родовата принадлежност (с използването на родово-специфични праймери). Следва методът ARDRA (с използването на рестриктазни ензими или комбинации от такива). В случаите, когато това е необходимо за различаване на видове, които дават еднакви рестриктни профили, дори при прилагане на комбинации от рестриктазни реакции, се извършва видово-специфичен PCR с употребата на видово-специфични праймери. След това се преминава към определяне на щамовата идентичност с различни по сила методи, в зависимост от търсената точност на резултатите или време за изпълнение на анализа.

1.1. Родово-специфичен PCR

Родово-специфичният PCR е бърз метод за определяне на родовата принадлежност. Използваните праймерни двойки и условията на PCR-реакциите са описани в раздел „Материали и методи”. На следната фигура е показан агарозен гел, където за да се демонстрира специфичността на праймерите (в конкретния случай - праймери за род *Bifidobacterium),* са използвани стандартни щамове от различни родове: *L. gasseri* ATCC 33323, *B. longum* ATCC 15707; *E. coli* ATCC 55244. От важност при родово-специфичния PCR е удостоверяването на специфичността на реакцията, тоест - наличие на PCR амплификация само за представителите на съответния род със съответните родово-специфични праймерни двойки. Ясно се вижда, че само бифидобактериите дават сигнал с родово-специфичната праймерна двойка за *Bifidobacterium*, а представители на родовете *Lactobacillus* и *Escherichia* не дават сигнал.

Присъствието на молекулен маркер е, за да се онагледи молекулната маса на получения амплификант, тъй като той е различен за различните родове, например за р. *Bifidobacterium* е 520 bp а за р. *Lactobacillus* е 700 bp.

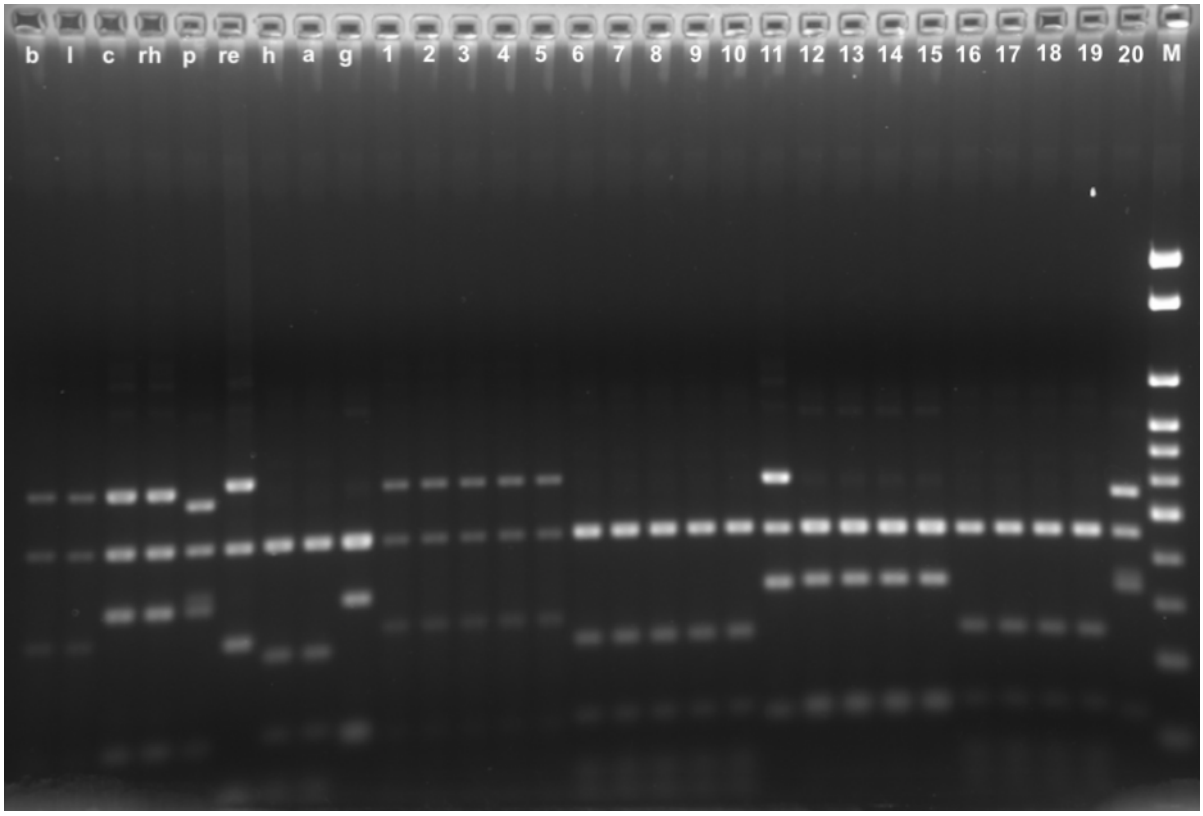


Фигура 1. PCR с праймери, специфични за р. *Bifidobacterium* 1) *L. gasseri* ATCC 33323; 2) *B. longum* ATCC 15707; 3) Молекулен маркер 100 bp ladder; 4) *E. coli* ATCC 55244;

1.2. ARDRA анализ на 16S рибозомална ДНК

ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) – методът се основава на полиморфизма на 16S рибозомалния ген, като се анализира PCR амплифицирана ДНК чрез рестриктни реакции с ендонуклеази. Използваните праймерни двойки и условията на PCR-реакциите са описани в раздел „Материали и методи”. Следва получените амплификанти да се третират с рестриктазни ензими за получаване на специфични профили от различен брой фрагменти с различна молекулна маса.

Амплификантите на всички изследвани изолати от род *Lactobacillus* са третирани с ензим *Hae III* (Фиг. 2). В лявата част на фигурата са нанесени референтни щамове от р. *Lactobacillus,* където ясно се вижда, че не е възможно всички бактериални видове да бъдат различени чрез ARDRA само с един ензим, тъй като има видове, които дават еднакви профили, например: *L. bulgaricus* и *L. lactis.* Това води до необходимостта от ARDRA анализ с поне още един ензим.



Фигура 2. ARDRA на изолати и референтни щамове след ДНК хидролиза с ензима *Hae – III,*

Където: С букви са означени референтните щамове: **b**- *L. bulgaricus*, **l**- *L. lactis,* **c**- *L. casei*, **rh**- *L. rhamnosus*, **p**- *L. plantarum*, **re**- *L. reuteri*, **h**- *L. helveticus*, **a**- *L. acidophilus*, **g**- *L. gasseri*; С цифри са означени неидентифицираните изолати от р. *Lactobacillus*: 1- KM053, 2- KM058, 3- KM120, 4- KM144, 5- KM181, 6- DS012, 7- DS040, 8- DS048, 9- DS197, 10- DS200, 11- DS031, 12- In004, 13- In007, 14- In008, 15- In0011, 16- In002a, 17- In002b, 18- In009, 19- In215 , 20- In012; **M**- молекулен маркер 100 bp.

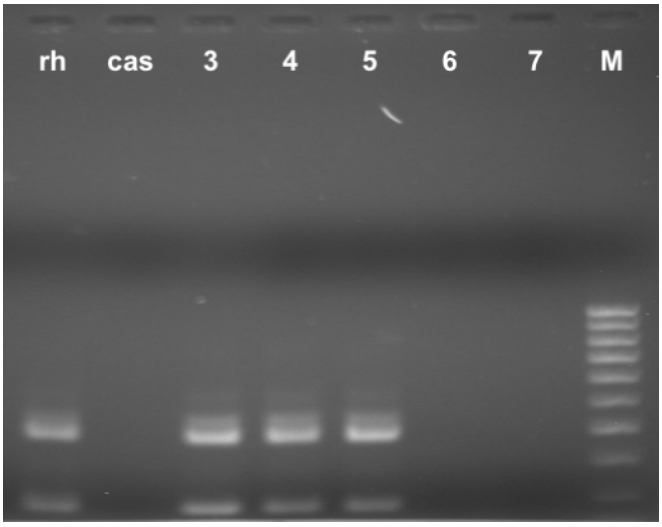
Както се вижда на Фиг. 2, лактобацили, които не се отличават само с една реакция с ензима *Hae III* са *L. helveticus*, *L. acidophilus,* но в това число е и видът *L. crispatus,* който не е показан на снимката. Тези три вида остават неразличими и след прилагането на ензима *Msp I.* В този случай се прави рестрикция с ензима *Eco RI*, която води до специфичен профил само на *L. helveticus* (фрагменти 0,8 и 0,7 kbp). Остават обаче, неразличими двойката профили на видовете *L. acidophilus* и *L. crispatus,* които могат да бъдат отличени с помощта на PCR с видово-специфични праймери при условия и праймери, посочени в методичната част. Други такива двойки профили, неразличими дори с комбинация от

рестриктни ензимни са видовете- *L. casei* и *L. rhamnosus*, както и на - *L. gasseri* и *L. johnsonii*. За тяхното идентифициране също бяха използвани видовоспецифичен PCR, със съответните видовоспецифични праймери.

За случаите, в които рестриктните профили след реакция с *Hae III* отговарят на тези на стандартните щамове от *Lactobacillus bulgaricus, L. delbrueckii* или *L. lactis,* се прави допълнителна рестрикция с ензима *Msp I*, който може да отличи само подвида *delbrueckii,* но не може да разграничи подвидове *bulgaricus* и *lactis*. Тогава се налага използването на трета реакция с ензима *Eco RI*, който дава напълно различни профили за видовете *L. bulgaricus* и *L. lactis*, като двата получени фрагмента при *L. bulgaricus* са, съответно 0,9 и 0,6 kbp, а при *L. lactis* – 1,48 и 0,02 kbp (последният фрагмент е толкова малък, че на практика изглежда, че няма срязване).

За идентифициране на бифидобактерии, беше използвана комбинация от ензимите *Cfo I* и *Alu I.* Това се налага, тъй като при ензимна рекция с *Cfo I*, се отличава единствено *B. bifidum,* а *B. longum* и *B. breve* дават еднакви по размер и разположение фрагменти, както е показано на Фиг. 15. За целта се прилага ензима *Alu I,* при което се получават различни профили и вече могат да бъдат различени.

1.3. Видово-специфичен PCR



Фигура 3. Видово-специфичен PCR с праймери за *L. rhamnosus.*

На пътеки: 1) Референтен щам *L. rhamnosus* ATCC 8530; 2) Референтен щам *L. casei* ATCC 334; 3), 4) и 5) – повторения на изолати за разграничаване между *L. casei* и *L. rhamnosus*; 6) и 7) изолат DS031; M – молекулен маркер100 bp ladder ;

На Фиг. 3 са представени резултати от прилагането на видово-специфичен PCR за разграничаване на видовете *L. casei* от *L. rhamnosus,* след използването на съответната видово-специфична праймерна двойка (секвенциите са поместени в раздел „Материали и Методи”).

Както се вижда, референтният щам *L. rhamnosus* ATCC 8530 дава сигнал с видово-специфичната праймерна двойка за същия вид, докато референтният щам *L. casei* ATCC 334 няма никаква амплификация с тази праймерна двойка, което доказва специфичността на праймерната секвенция.

Други изолати, които не принадлежат на вида *L. rhamnosus* също не биха дали сигнал, но в случая, на гела са дозирани изолати, които след ARDRA и ензимни реакции с *Hae III* и *Msp I* са останали неразличими поради сходство.

Чрез техниките ARDRA и видово-специфичен PCR е определена видовата принадлежност на изследваните изолати. По този начин с помощта на двата ензима *Hae III* и *Msp I*, приложени за всички изолати, с контекстно допълване с ензим *Eco RI* рестрикция в описаните специални случаи, както и с видово-специфични PCR реакции при видовете, неразличими чрез ARDRA, се достига до възможност за отличаване на представителите на различните видове в род *Lactobacillus*.

Сред работните изолати бяха идентифицирани представители на следните лактобацилни видове: 5 щама от *L. bulgaricus;* 5 щама - *L. helveticus;* 1 щам *L. casei;* 4 щама *L. gasseri*, 4 щама *L. acidophilus* и 1 щам *L. plantarum,* от които общо 11 щама с киселомлечен и 9 щама с интестинален произход.

Също така с киселомлечен произход, морфологично определени като коки (общо 6 изолата), бяха идентифицирани като представители на *S. thermophilus,* а тези с типична морфология на бифидобактерии (общо 5 изолата), бяха определени като *B. longum* и резултатите от идентификацията на всички работни изолати са представени таблично.

Таблица 1. Видова принадлежност на изследваните изолати след идентификация с молекулярни методи.

№	Щам *		Вид
1	KM053	Киселомлечен	*L. bulgaricus*
2	KM058	Киселомлечен	*L. bulgaricus*
3	KM120	Киселомлечен	*L. bulgaricus*
4	KM144	Киселомлечен	*L. bulgaricus*
5	KM181	Киселомлечен	*L. bulgaricus*
6	KMc21	Киселомлечен	*S. thermophilus*
7	KMc43	Киселомлечен	*S. thermophilus*
8	KMc54	Киселомлечен	*S. thermophilus*
9	DKc59	Киселомлечен	*S. thermophilus*
10	KMc69	Киселомлечен	*S. thermophilus*
11	KMc182	Киселомлечен	*S. thermophilus*
12	DS012	Киселомлечен	*L. helveticus*
13	DS040	Киселомлечен	*L. helveticus*
14	DS048	Киселомлечен	*L. helveticus*
15	DS197	Киселомлечен	*L. helveticus*
16	DS200	Киселомлечен	*L. helveticus*
17	DS031	Киселомлечен	*L. casei*
18	In004	Интестинален	*L. gasseri*
19	In007	Интестинален	*L. gasseri*
20	In008	Интестинален	*L. gasseri*
21	In011	Интестинален	*L. gasseri*
22	In002a	Интестинален	*L. acidophilus*
23	In002b	Интестинален	*L. acidophilus*
24	In009	Интестинален	*L. acidophilus*
25	In215	Интестинален	*L. acidophilus*
26	In012	Интестинален	*L. plantarum*
27	Inb001	Интестинален	*B. longum*
28	Inb002	Интестинален	*B. longum*
29	Inboo3	Интестинален	*B. longum*
30	Inb006	Интестинален	*B. longum*
31	Inb010	Интестинален	*B. longum*

1.4. Пулсова електрофореза

PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis) е метод, известен като златен стандарт за получаване на щамово-специфични ДНК профили. Той се основава

на фрагментен полиморфизъм на бактериалната ДНК след рестриктни реакции с ендонуклеази. При конвенционалните електрофорези, се използва единично електрично поле за придвижване на биомолекулите през матрицата, според съотношението на тяхната маса-заряд и е ефективно за разделянето на ДНК фрагменти с размер до около 20 Kbp. Разделянето на по-големи ДНК фрагменти по същия начин, ще доведе до ко-миграция на фрагменти и появата им в гела като големи петна. Тъй като при пулсовата електрофореза се използват рядко режещи ендонуклеази, се получават неголям брой фрагменти с размер до около 500-600 Kbp. Така през 1984, Schwartz и Cantor изобретяват пулсовата електрофореза, за да се справят с този проблем и получените макрофрагменти от ДНК се разделят в агарозен гел с помощта на пулсиращо електрично поле, където на фрагменти с определен диапазон от молекулни маси отговарят импулси с определена продължителност. Обикновено, се използва градиент на продължителността на импулсите. Времето за преориентация на фрагментите с различна молекулна маса под въздействие на импулсите е различно и поради това те се движат с различна скорост, което води до тяхното разделяне в гела.

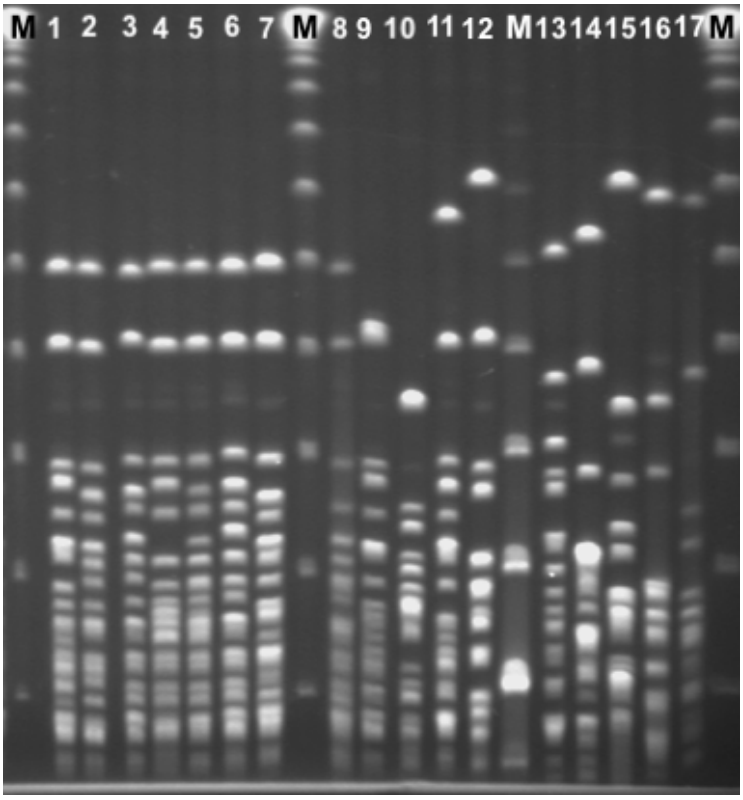
PFGE е метод с отлична повторяемост и лесен за стандартизиране, но има своите специфики. Съществено важно за получаването на добри резултати с PFGE е качеството на ДНК. Бактериалната ДНК трябва да е в интактно състояние, като за целта клетките се имобилизират в агарозни блокове и се третират с мурамидазни и протеазни ензими, така че да остане единствено интактната ДНК. По този начин се елиминират неспецифичните фрагменти, които биха довели до понижаване качеството на образа. Също така при електрофоретичния процес се използват специални агарози с много ниска електроендоосмоза, което ги прави пригодни за работа в пулсиращо електрично поле, така че целостта на фрагментите не се уязвява.

Рестрикционният полиморфизъм зависи от избора на ендонуклеазните ензими (обикновено разпознаващи 6 - 8 нуклеотидни бази). Докато GC съдържанието на някои видове лактобацили и лактококи е ниско (35–40%), то при други видове то е средно високо (около 50% за *L. delbrueckii* group, например). Ето защо, при PFGE на представители от видовете *L. casei, L. acidophilus, L. rhamnosus* и др. се използват рестриктазни ензими, чиито сайт за рязане се състои от 6 GC нуклеотидни бази. При щамове от видовете *L. delbrueckii* (включително *L. bulgaricus*), *L. salivarius, L. fermentum, L. brevis*, чието

GC съдържание е по-високо, се използват ензими, разпознаващи 4 GC бази от общо 6 бази в сайта на рязане.

Предварителното установяване на видовата принадлежност подпомага избора на рестриктази и условията за разделяне при PFGE зависят силно от GC-съдържанието на бактериалната ДНК. В раздел „Материали и методи" са посочени използваните рестриктази и условията за провеждане на PFGE според видовата принадлежност на изпитваните щамове.

PFGE има голямото предимство пред останалите методи за генотипиране с възможността фрагментите, изграждащи целия геном да са презентирани в един гел. Това е един от факторите за изключителната дискриминираща сила на PFGE. На следващата фигура е птредставена снимка на гел, на който са нанесени определяните изолати от сирена, с цел удостоверяване уникалността на всеки от щамовете помежду им и измежду такива от съществуващите в колекцията на ЕлБи Булгарикум.



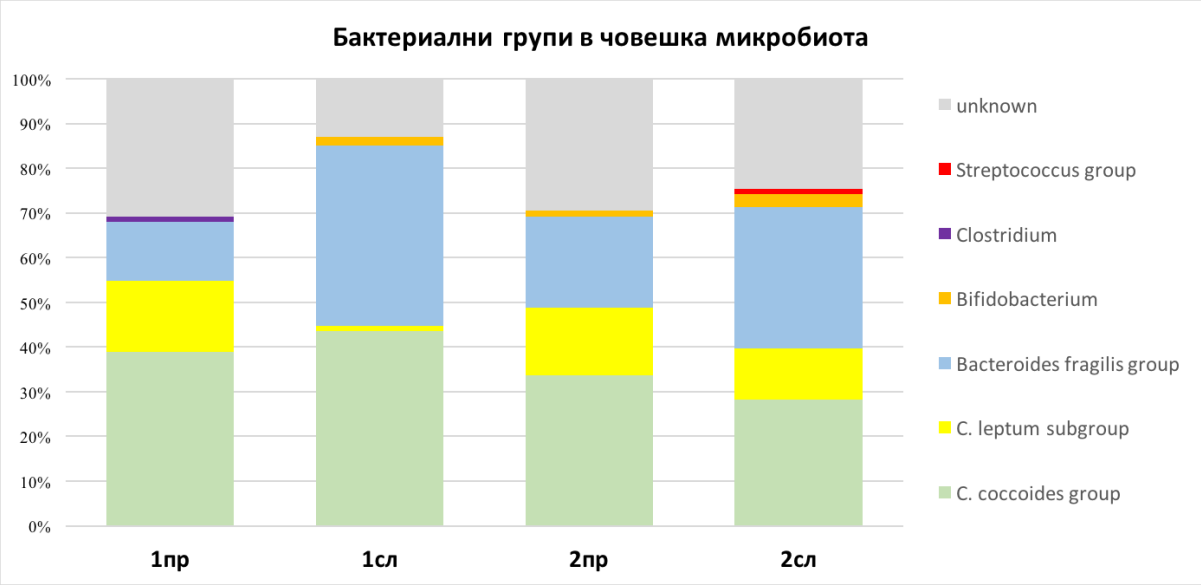
Фигура 4. PFGE анализ на щамове *L. helveticus* с помощта на ензима *Apa I* :
На пътеки от 1 до 12 щамове *L. helveticus* от колекцията на ЕлБи Булгарикум, използвани за сравнение; Неизвестни изолати на пътеки, съответно: 13) - DS012, 14) - DS040, 15) - DS048, 16) - DS0197 и 17) - DS200; **M** - молекулярен маркер ДНК (50-1000 kbp).

Съвсем отчетливо се наблюдават отлики между дозираните щамове и може да се заключи, че изследваните изолати са 5 различни щама и са уникални.

При използването на представения системен подход от последователно подбрани молекулярни методи и комбинации от ензимни реакции с подходящи рестриктазни ензими, може да се твърди, че достоверно са определени видовата принадлежност и щамовата идентичност на изследваните изолати.

1.5. Безкултивационен метод за оценка на основни бактериални групи в чоешка микробиота чрез метода TRFLP

Изолирането и култивирането на интестинални бактерии е трудно, а за някои видове, дори невъзможно. Чрез този анализ може сравнително бързо (в рамките на деня) и лесно, безкултивационно да се проследява в най-общи линии индивидуалното интестинално бактериално разнообразие.



Фигура 5. Оценка на бактериалното разнообразие при доброволци, преди и след като са приемали пробиотични бактерии в продължение на един месец.

Както е видно на следната фигура 5, двама доброволци, приемали произволно избрани пробиотични препарати за 1 месец, са променили състава на своята микробиота. Например графиката сочи, че Доброволец 1 е загубил *Clostridium* групата, за сметка на новопопаднали представители на *Bifidobacterium* групата. Добровоелец 2 е увеличил количеството на представители от *Bifidobacterium* групата и е добавил де ново *Streptococcus*

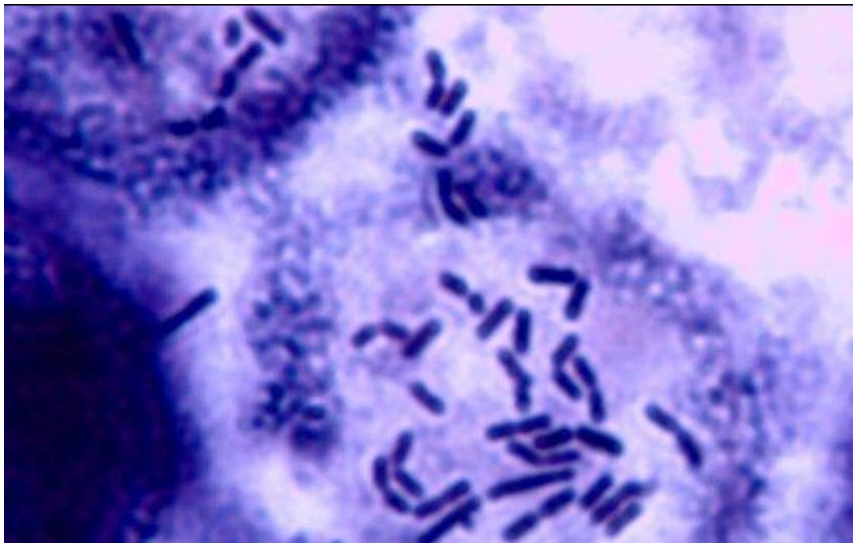
групата. Разбира се, този състав е силно зависим от индивидуалната диета в последните 12-24 ч. преди пробовземането и не удостоверява евентуалното колонизиране на дадени щамове, но при продължителното му прилагане, би могло да доведе до оформянето на тенденции за влиянието на консумацията на определени храни или пробиотици в даден индивид.

2. АДХЕЗИЯ И МОЛЕКУЛНИ ОСНОВИ НА АДХЕЗИЯТА

1.1. Оценка на адхезията на МКБ към чревен епител

Адхезията към клетките на чревния епител се счита за първата стъпка към трайно колонизиране от лактобацили, които да окажат благотворно влияние върху гостоприемника (Hynonen & Palva, 2013). Caco-2 е клетъчна линия, изолирана от човешки аденокарцином на колона и едно от приложенията ú е при проучване на способността за адхезията на МКБ, тъй като образува монослой, морфологично и функционално наподобяващ чревния епител (Hidalgo *et al.,* 1989). В литературата са докладвани множество щамове, които демонстрират адхезия към Caco-2 клетъчна линия, като сред най-силно адхезиращите е световно известният пробиотичен щам *L. rhamnosus* GG (Lee *et al.,* 2000).

На следващата фигура е представена, снимка на адхезия.



Фигура 6. Силна адхезия върху единична Caco-2 еукариотна клетка на изолата In012, който след идентификация е определен като *L. plantarum*.

Ясно се вижда, че броят на бактериалните клетки в междуклетъчното пространство на монослоя е много по-малък от броя на задържаните бактерии върху еукариотните клетки. Това доказва едно качествено промиване след провеждане на опита и следователно, може да се твърди, че бактериите не са просто фиксирани след инкубиране върху монослоя, а са специфично задържани върху еукариотната клетка.

Оценяването на способността за адхезиране измежду изследваните изолати се извърши трикратно, като се използваха клетъчна линия Caco-2 и клетъчна линия HT-29, а получените резултатите са представени в таблица 2, където е посочен броят на адхезиралите бактериални клетки към една средностатистическа еукариотна клетка (при концентрация в един мililитър среда от 10^8 бактериални клетки).

Таблица 2. Щамове, адхезирали със съответния брой бактериални клетки към една еукариотна клетка.

Вид (изолат)	**Под 5 бактерии**	**Между 5 и 10 бактерии**	**Между 10 и 15 бактерии**	**Над 15 бактерии**
L. plantarum	-	-	-	In012
L. gasseri	-	In011	In007; In008	In004
L. acidophilus	In002a; In002b	In009; In215	-	-
L. bulgaricus	KM058; KM120;KM181	KM144	-	-
L. helveticus	DS040; DS048; DS197	DS200	DS012	-
L. casei	-	DS031	-	-

Както е видно, най-силно адхезиращият щам, с над 15 адхезирали бактериални клетки при използване и на двете клетъчни линии е изолат In012, който след идентификация е определен като *L. Plantarum* и изолат In004 също с над 15 адхезирали клетки, който след идентификация е определен като *L. gasseri*. За сравнение, световният пробиотичен щам *L. rhamnosus* GG при различни опити показа средно 19 адхезирали бактериални клетки към 1 еукариотна клетка, а изследваният In012 - средно 20 адхезирали бактерии към една еукаритона клетка. Трябва да се отбележи, че и двата най-силно адхезиращи щама са с интестинален произход, което увеличава вероятността

да колонизират в ГИТ и респективно увеличава пробиотичния им потенциал Най-силна адхезия сред щамовете изолирани от домашни млечни продукти показа изолат DS012, в последствие определен като *L. helveticus*, което от своя страна би съчетало пробиотични с технологични свойства на дадения щам.

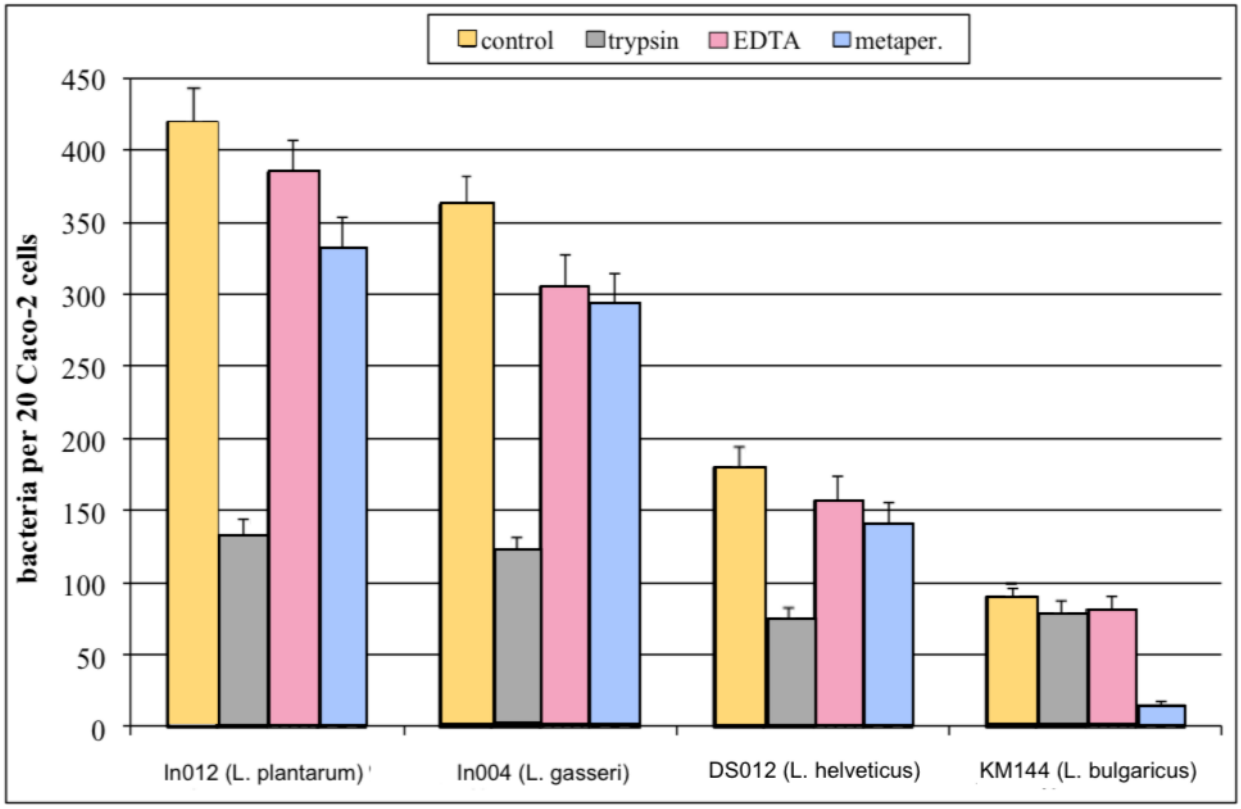
Може да се обобщи, че са открити щамове способни да адхезират към чревен епител специфично, което е предпоставка за устойчиво задържане на лактобацилите в ГИТ на гостоприемника, изключването на патогени и предпазването на епитела, както сочат множеството литературни данни (Tropcheva *et al.,* 2014; Zhang et al., 2013).

1.2. Установяване природата на адхезивните фактори

Механизмите на адхезия и колонизиране на гостоприемника са обект на усилено изследване чрез множество различни стратегии, поради множеството повърхностно-асоциирани клетъчни фактори, експресирани от лактобацилите (Wang *et al.,* 2017). Два щама с интестинален и два щама с киселомлечен произход, които показаха най-изявена адхезираща способност бяха насочени към изследване на адхезивните фактори. За тази цел, клетъчни суспензии от изолати: In012 от вида *L. plantarum*, In004 (*L. gasseri)*, DS012 (*L. helveticus)* и KM144 (*L. bulgaricus)* в PBS бяха третирани с различни разтвори. Разтворите на 0,25 процентен трипсин, 50 mM метапериодова киселина и 50 mM EDTA, са подбрани така, че да се установи природата на факторите определящи адхезията на изследваните изолати. Броят на адхезиралите бактерии след тези третиранията и първоначално адхезиралите (без третиране) бактерии е изброен върху 20 еукариотни клетки, за да се избегне случаен свръх висок или свръх нисък резултат. Графично е изразен броят на адхезиралите бактерии преди и след третирането на следната Фиг. 7.

Като резултат от третирането с Трипсин се наблюдава силно понижена способност за адхезия на три от изследваните изолати, което свидетелства за протеинова природа на молекулите участващи в механизма на адхезия на тези щамове. За разлика от тях, единствено изолат KM144 понижи значително адхезията си след третиране с метапериодова киселина и не понижи адхезията си след третиране с трипсин. Това категорично доказва, че при този щам ключови за адхезивната му способност са екзополизахаридни молекули. След третирането с EDTA практически не се наблюдава промяна на адхезията, което

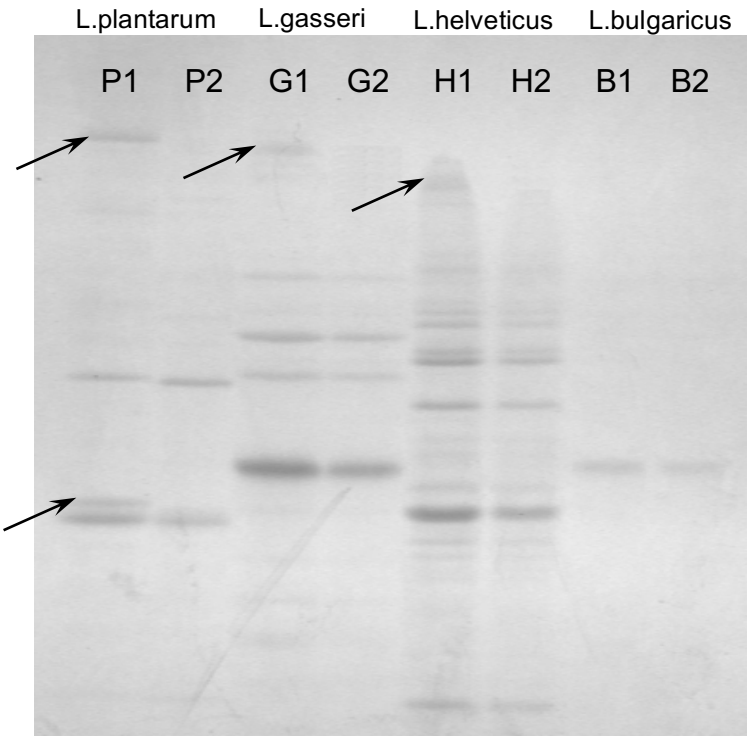
изключва вероятността в механизма на адхезия на изследваните щамове да участват калциеви йони



Фигура 7. Влияние на третирането с разтвори на трипсин, метапериодова киселина и EDTA върху адхезията на изследваните изолати.

1.3. Определяне на повърхностно-протеиновите адхезивни фактори

След установяване на протеинова природа на адхезивните фактори при три от изполатите, се подходи към детектиране на повърхностните протеини, участващи в адхезията на тези щамове. За целта бяха екстрахирани повърхностните протеини от четирите най-силно адхезиращи щама. Повърхностно-протеиновите екстракти бяха разделени на две. Едната половина от екстрактите отбелязани с буква, отговаряща на видовата им принадлежност и индекс 1 не бяха инкубирани с епителен монослой. Другата половина, отбелязани със същите букви и индекс 2 са инкубирани с Caco-2 монослой. Така приготвените екстракти бяха нанесени на съседни пътеки в полиакриламиден гел (SDS-PAGE) и снимка от получените резултати е представена на следващата фигура 8.



Фигура 8. Детекция на повърхностни протеини свързани с адхезиращата способност на изследваните изолати.

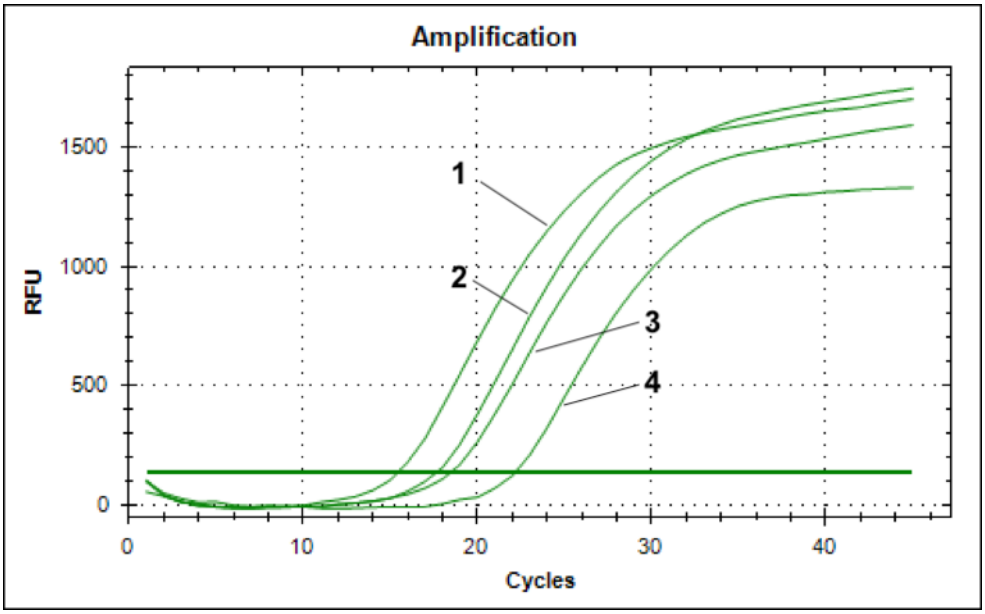
Със стрелките са отбелязани линиите на протеините екстрахирани без контакт с епителния монослой, а на съседните пътеки (след контакт с монослоя) се вижда, че на кореспондиращите места липсват линии. Следователно, може да се заключи, че протеините са задържани върху еукариотните клетки на Caco-2 монослоя. Съвсем очаквано и съответстващо на установяването на екзополизахариди, участващи в адхезията на изолат КМ144 (*L. bulgaricus),* не се наблюдава промяна в профила на изолираните повърхностни протеини.

1.4. Real-time PCR методи за определяне експресията на структурни гени с важност за адхезията на бактерии към човешки мукус.

Мукусният слой играе роля в защитата на чревния епител срещу увреждане, но също така се счита, че е от решаващо значение за адхезията на *Lactobacillus* в стомашно-чревния тракт. Следователно, адхезията, проявена от лактобацили върху муцин, привлича вниманието като един от критичните фактори, допринасящи за устойчивите благоприятни ефекти на *Lactobacillus* в постоянно променяща се чревна среда. Сред досега установените фактори на муцинова адхезия при *Lactobacillus*, вероятно най-широко проученото е семейството на

т.н. мукус-свързващи протеини (MUB), първоначално открити при *L. reuteri* 1063 и *Lactobacillus acidophilus* NCFM. MUB е голям протеин с молекулно тегло над 300 KDa (Nishiyama *et al.,* 2016). Съществуват и допълнителна група протеини, чиято странична (извън основните им функции) роля има отношение към мукусната адхезия като протеинът EF-Tu (elongation factor Tu). Тези протеини не съдържат типичен консервативен мотив за закрепване на клетъчната повърхност и тяхната клетъчно-повърхностна локализация се влияе от условията на околната среда, поради което може да изглеждат като незначителни фактори на адхезия, но проявяват специфични взаимодействия с въглехидратни вериги.

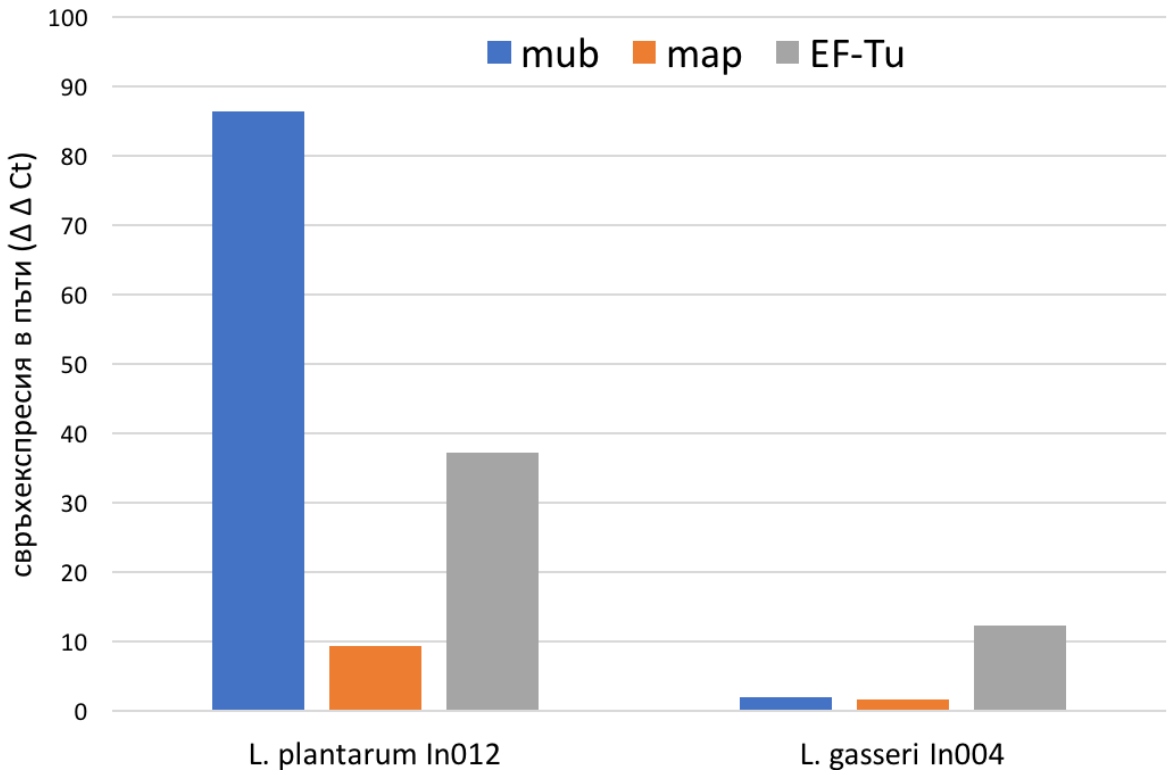
За да оценим експресията на структурни гени кодиращи подбраните протеини, с отношение към ммукусната адхезия, беше използвана Rt-PCR техника и съответните генно-специфични праймерни двойки. Използвахме двата най-силно адхезиращи щама *L. plantarum* In012 и *L. gasseri* In004. За изпълнение на метода, бактериалните щамове бяха инкубирани в стандартна бульонна среда MRS, с добавен 0.01% муцин (SIGMA), след което се изолира и пречисти тотално РНК. От него беше синтезирана кДНК и се подходи към изпълнение на Rt-PCR, с SYBR Green и реперен ген - GDPH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene).



Фигура 9. Real-time PCR за оценка експресията на гена *mub* от щама *L. plantarum* In012. Линии: **1** – *mub* в среда с 0,01% муцин; **2** – *GDPH* в среда с 0,01% муцин; **3** – *GDPH* в среда с 0% муцин; **4** – *mub* в среда с 0% муцин.

На Фиг.9 е показана графиката от qPCR, където са изобразени qPCR линиите (с муцин и без муцин) на един от трите изследвани гена (mub), заедно с qPCR линиите на реперния ген GDPH. Онагледена е значителната свръхекспресия на генът mub в среда с 0,01% муцин (линия 1), в сравнение с експерсията на същия ген в среда с 0% муцин (линия 4). Експресията не реперния ген GDPH не се променя значително при добавяне на 0,01% муцин в средата. Нивата на експресия на изследваните 3 гена са изчислени посредством: нормализирана експресия спрямо реперния ген GDPH и от друга страна- относителна експресия, съотнасяйки нивата на експресия в среда с муцин и в среда без муцин.

.



Фигура 10. Увеличение (в пъти) на експресията на три структурни гена за щамовете *L. plantarum In012* и *L. gasseri* In004 в среда с 0,01% муцин в сравнение с експресията при среда без муцин.

На Фиг. 10 е представено графично увеличението в пъти на експресията на трите избрани гена за двата избрани щама *L. plantarum In012* и *L. gasseri* In004 в среда с добавен муцин, спрямо нивото им на експресия в среда без муцин, като real-time PCR сигналите са съотнесени спрямо този на реперния ген.

Ясно изразена е свръхекспресията на Mub-кодиращите гени, както и на допълнителните EF-Tu при най-силно адхезиращият щам, което затвърждава специфичността на механизмите на адхезия.

3. УСТАНОВЯВАНЕ СПОСОБНОСТТА НА МКБ ЗА ПОВЛИЯВАНЕ НА ИМУННИТЕ СИГНАЛИ

Пробиотиците могат да повлияват имунната система чрез различни техни метаболити, компоненти на клетъчните стени и ДНК. Тези продукти могат да бъдат разпознати от клетките гостоприемници, чувствителни към тях поради наличието на специфичен рецептор (Cummings *et al.,* 2004).

Основните целеви клетки в ГИТ обикновено са епителните и имунокомпетентните клетки, които осъществяват взаимодействието на гостоприемника с микроорганизмите. В чревната лигавица се намират голямо разнообразие от имунни клетки, което позволява взаимодействието с имунната система (Perdigon *et al.,* 1993)

3.1. Измерване на индукцията на цитокини чрез използване на различни лабораторни модели.

Цитокините са секреторни протеини, които имат съществена роля в регулирането и определянето на естеството на имунните отговори в човешкия организъм. Те участват практически във всяка фаза на имунитета и възпаление, Специфичните цитокини, които се произвеждат в отговор на имунната атака, ще определят дали се развива имунен отговор и дали този отговор ще бъде хуморален, клетъчно-медииран или алергичен. Функциите на тези протеини са разнообразни и включват участие в нормалния Т-клетъчно-опосредстван имунитет, възпалителния отговор, раковите заболявания, автоимунност, алергии и др. Различните патологични състояния са придружени от промени в нивата на различни цитокини (Borish and Rosenwasser, 1996) ето защо измерването на производството на цитокини е широко използвано (Katial *et al*., 1998, Papadopoulos *et al.,* 2014).

За да се осъществи предварителен подбор на щамове според тяхна способност да модулират експресията на различни цитокини е необходимо да бъдат създадени условия за взаимодействие между бактериалните клетки и клетките на чревния епител и/или имунокомпетентни клетки. Използвани са

няколко лабораторни модела, според естеството на съответния цитокин, а тъй като за някои цитокини са възможни и повече от един, в тези случаи се направи и сравнение между съответните анализи.

Например, за определянето на сигналния пептид интерлевкин – 8 (IL-8) използвахме човешки епителни клетъчни линии, защото той се образува най-вече от епителни клетки.

Определянето на сигналния пептид IL-1 се осъществи единствено чрез използването на лабораторен метод от система от две клетъчни линии. Едната - от човешки епителни клетки (HT-29 или Caco-2), а другата от моноцитни човешки клетки (THP-1), които бяха закупени от Американската колекция (ATCC). Двете клетъчни линии са култивирани на платки- кладенец в кладенец с полупропусклива мембрана помежду си, така че да могат да контактуват и да обменят сигнали. Тази система дава възможност за оценка на голям брой щамове. Цитокините IL-10 и TNF alpha (който за разлика от повечето може да се определя при използване и на единични имунокомпетентни клетки, например макрофаги и на спленоцитната система), бяха определени на горепосочрната спрегната система и на спленоцити.

Спленоцити използвахме императивно за определянето на IL-4 и IFN-γ, но също и за IL-10 и TNF alpha, докато за сигналният пептид TGF-beta, който също се образува от епителни клетки, но и от моноцитни, използвахме трите лабораторни модела: човешки епителни клетъчни линии, спрегната система от клетъчни линии и миши спленоцити.

3.2. Подбор на щамове спрямо индукцията на цитокини, участващи във възпалителните процеси

Цитокини, които се получават предимно от едноядрени фагоцити, са особено ефективни за стимулиране на клетъчната инфилтрация и увреждане на локални тъкани, а това са характеристики на възпаление. Такива са: тумор некрозис фактор (TNF), IL-6, IL-8 и някои други от членовете на семейството на малките цитокини - хемокини (Borish and Rosenwasser, 1996).

Про-инфламаторни цитокини като: TNF-α, IL-1, IL-6 и интерферони са сред първите цитокини, произведени в отговор на попаднали в организма патогенни бактерии (Tracey & Cerani, 1993), но когато са свръхекспресирани водят до нежелани реакции, като активиране на неутрофилните клетки, което от своя

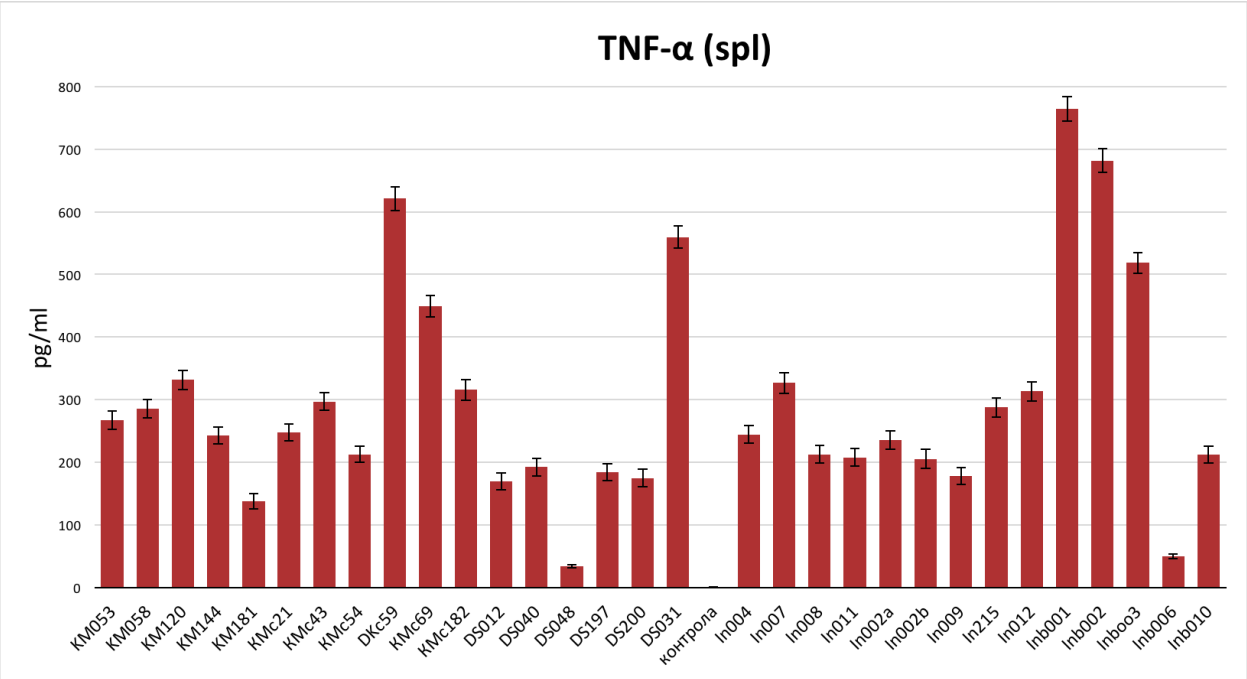
страна може да доведе до увреждане на чревната лигавица и епител и образуване на язви. Във формирането и балансирането на възпалителните процеси участват голям брой сигнални пептиди. Например, интестиналният епител е способен да освобождава някои провъзпалителни хемокини като IL-8, който е един от най-мощните хемоатрактанти за неутрофили (Bai *et al.,* 2004). IL-8 може да бъде индуциран от TNF-α. От друга страна, различни популации на регулаторни Т-клетки проявяват своя възпалително-модулиращ ефект чрез секретиране на специфични цитокини, включително IL-10 или други регулаторни цитокини като TGF-β. IL-10, продуциран от лимфоцити, може да инхибира продукцията на TNF-a и други видове цитокини,стимулиращи активността на Th-1, като ролята му е да ограничи и в крайна сметка да прекрати имунния и възпалителен отговор, както е посочено от Moore *et al*., 2001.

В литературата има доказателства, че определени пробиотични щамове помагат да се регулира възпалението и да се модулира имунната система на гостоприемника чрез повишената способност да се влияе върху секрецията на тези важни цитокини (Plaza-Diaz *et al*., 2017). Този ефект е демонстриран както in-vitro (Hsieh *et al.,* 2013;), така и in vivo при различни животински модели (Jeon *et al*., 2012; Oksaharju *et al*., 2013) и клинични проучвания (Timmerman *et al*., 2004, Paramsothy, 2017).

Ето защо, една от основните задачи при търсенето на щамове, повлияващи възпалителните процеси, е създаването на профил от различни цитокини, участващи във формирането на възпаление. Това включва: високи стойности на регулаторните цитокини IL-10 и TGF-β и ниски стойности на про-инфламаторните цитокини IL-8, IL-6 и TNF-α, дори способност за понижаването им, също така високо съотношение на IL-10 спрямо TNF-α. За целта беше извършено култивиране и поддържане на клетъчните линии (посочени в глава „Материали и Методи”); приготвяне на двукомпонентната спрегната оценъчна система от клетъчни линии, в това число – активиране и зреене; приготвяне на микробиалните концентрати от пречистени и идентифицирани щамове. Така приготвени, оценъчната система и бактериалните клетки се инкубират при условия близки до тези в дебелото черво (pH, редокс-потенциал, йонна сила и др.). Същевременно, за оценка на съответните цитокини, се пречистиха и слпеноцити от далаци на миша линия BALB/c.

Финалното количествено определяне на концентрацията на различните цитокини се извърши чрез имуносорбентни методи (ELISA китове), съответстващи на всеки от измерваните цитокини и тип лабораторен модел (човешки/миши). Резултатите се обработват статистически за съставяне на цитокинов профил и последващ щамов подбор.

Основен про-инфламаторен цитокин, който беше отчетен е сигналният пептид тумор-некрозис фактор алфа (TNF-α). Както подсказва името, TNF-α и неговият хомолог TNF-β първоначално са били открити като секреторни пептиди, които индуцират антитуморен имунитет (Beutler & Cerami, 1989). Те са директно цитотоксични срещу ракови клетки, стимулират антитуморни имунни отговори от имунни клетки и когато се прилагат in vivo, индуцират хеморагична некроза на тумори, но повишената продукция е вредна, особено при хора, страдащи от възпалителни заболявания. Допълнителните активности на TNF включват стимулиране на костна резорбция, разграждане на хрущял и активиране на В-клетки и моноцити. TNF увеличава капацитета на моноцитите да произвеждат възпалителни медиатори, включително IL-6 и IL-8 (Borish and Rosenwasser, 1996).

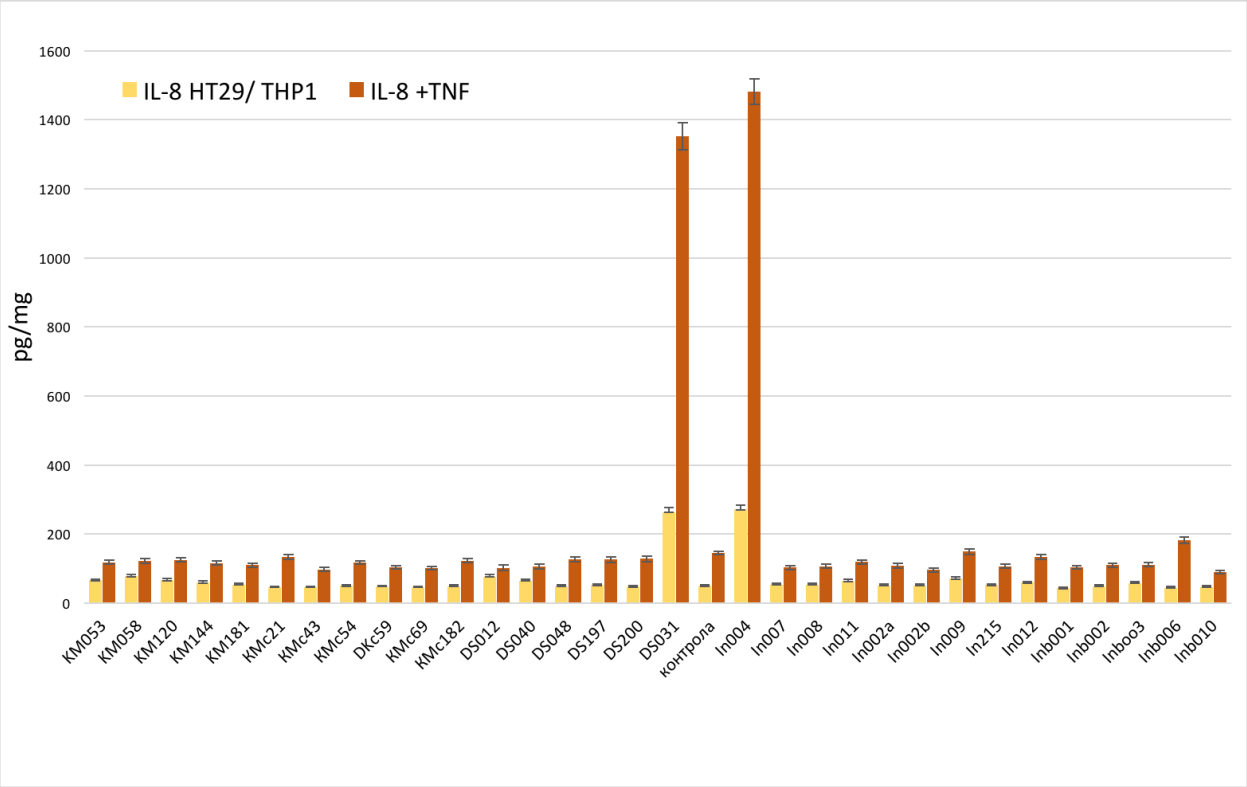


Фигура 11. Оценка на сигналния пептид TNF-α.

На Фигура 11. са представени резултатите от експресията на TNF-α, след като използвахме система от спленоцити.

Очаквано, всички щамове индуцират този цитокин, тъй като най-мощният индуктор на този цитокин от моноцитите са липополизахаридите. Щамовете MKc059 и Inb001 показват драстично увеличение, за разлика от щам Inb006, който е с най-ниската идукция.

Увеличеното индуциране на про-възпалителния цитокин TNF-α може да бъде фактор за предизвикване на прекалена индукция на IL-8 и възпалителен шок в организма, въпреки че не е задължително условие за повишени нива на IL-8. Затова ние го оценихме и в присъствието на TNF-α, за да сравним със стойностите, получени без TNF-α и по този начин да проверим дали съществуват щамове, които биха могли да регулират тази индукция. На фигура 12 са представени резултатите от измерването на IL-8 и способността на някои от изследваните щамове да понижават секрецията му. В оранжев цвят са резултатите от лабораторните опити извършени в еднокладенчови платки с епителна клетъчна линия и стимулирани чрез добавяне на TNF-α, а в жълт цвят са резултатите получени от използването на спрегната система от двукладенчови платки с моноцитна и епителна линии.



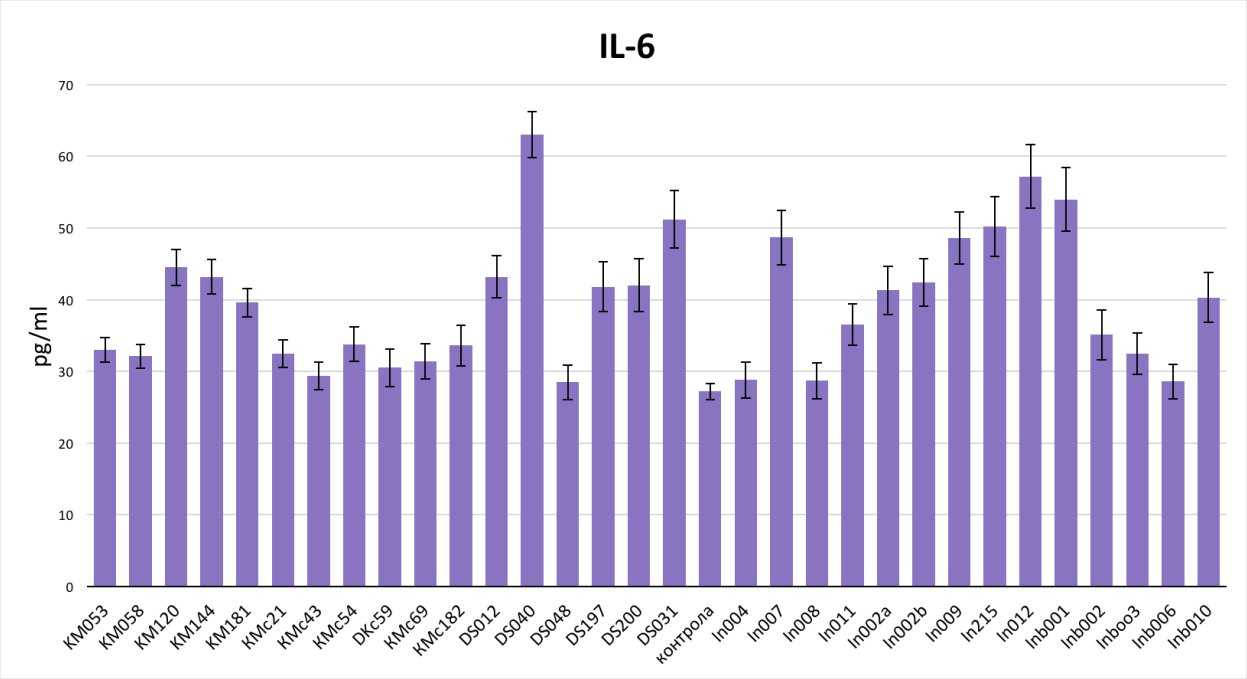
Фигура 12. Оценка на IL-8, при различни условия.

При резултатите получени на спрегната клетъчна линия (в жълт цвят на графиката), с най-малко увеличение, спрямо контролата, се отличават щамовете Inb001 и MKc182. Също може да се отбележи, че тези два щама са представители съответно на групата на изследваните бифидобактерии и на *S. thermophilus*, които са показали понижение в група като цяло. Останалите изолати на лактобацили с интестинален произход, не показват понижение, а дори щамът In004 е с над 5 пъти увеличение, спрямо контролата. Сред изолатите от кисели млека и сирена не се наблюдава значително увеличаване, а по-скоро превес на понижена индукция на експресията на IL-8. Изключение прави един от киселомлечните изолати (DS031), който се откроява с многократно увеличение над контролата. Същевременно, от резултатите получени след инкубиране върху епителна клетъчна линия Caco-2 и в присъствие на TNF-α, се наблюдава обща тенденция към понижаване на индукцията на IL-8, спрямо контролата. Също така прави впечатление, че много повече щамове са я понижили в сравнение с другия лабораторен модел. Отново изолатът DS031 изпъква с високи нива на индукция, като същият щам е показал много високи стойности и при индукцията на TNF-α, което подкрепя тезата, че засилената индукция на TNF-α може да резултира в увеличение на други възпалителни цитокини като IL-8. Щамове с такъв цитокинов профил не биха били подходящи за влагане в продукти с противъзпалително действие. При използването на втория лабораторен модел като най-силно понижаващи IL-8 също се откроява представител на бифидобактериите – Inb010, от щамовете с интестинален произход. От изолираните от киселомлечни продукти, най-добри резултати е показал щам KMc043. В подкрепа на тезата изказана по-рано, щамът In004 от 5-кратно увеличение на IL-8, вече при наличието и на провъзпалителния цитокин TNF-a, е достигнал повече от десетократно увеличение, което in vivo би могло да доведе до възпалителен шок в организма.

Противоречиви резултати при използването на лабораторен модел, включващ допълнително индуциране с TNF-α, показва бифидобактериялният щам Inb006 - увеличение на изследвания цитокин, а при спрегната клетъчна линия, същият е показал дори слабо понижение спрямо контролата.

Сигналният пептид интерлевкин-6 (IL-6) се произвежда от различни имунни клетки. Една от важните биологични активности на този хемокин е способността да стимулира крайните етапи на зреенето на B-лимфоцитите, но също е основен

индуктор в синтезата на протеини при акутни реакции, като С-реактивен протеин CRP (Borish and Rosenwasser, 1996). Именно този показател, изследван в периферната кръв се следи като маркер за възпаление. На следната фигура 13 са представени резултатите от определянето на IL-6.



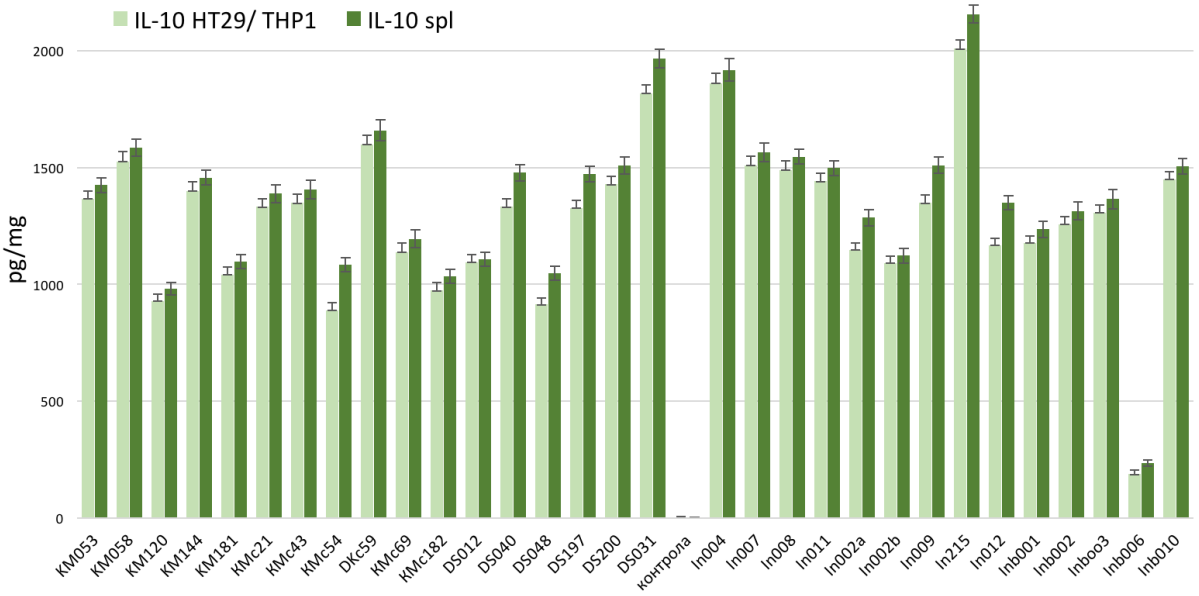
Фигура 13. Определяне на IL-6.

Отново се забелязва, че изолат DS031 е сред щамовете с висока индукция, което допълва профила му на про-възпалително действие. Повечето от изследваните изолати са показали умерена индукция на този цитокин, със стойности близки до контролата, като групата на интестиналните изолати общо е показала по-високи стойности.

Два цитокина имат предимно антиинфламаторни ефекти и това са IL-10 и TGF-β (transforming growth factor-β). За да се допълни охарактеризирането на антиинфламаторния потенциал на щамовете, тези два цитокина бяха изследвани.

IL-10 се произвежда от множество имунни клетки и още е известен като “фактор инхибиращ синтезата на цитокини”. Той е първоначално идентифициран при мишки, в които е била инхибирана Th1 пролиферацията и производството на интерферон гама и IL-2 (Fiorentino *et al.*, 1998). При последващи изследвания на активността на този цитокин при хора, е

установено, че инхибира също производството на: IL-6, IL-8, IL-12, TNF, както и много други. В организма появата му е много по-късно от останалите цитокини (не по-рано от 8 часа след стимулация), което кореспондира с тезата за регулация на възпалението чрез подтискане на про-инфламаторните цитокини (Borish and Rosenwasser, 1996). На Фиг. 14 са представени резултатите от индукцията на IL-10, при използване отново на два лабораторни модела – спрегната клетъчна линия и спленоцити.

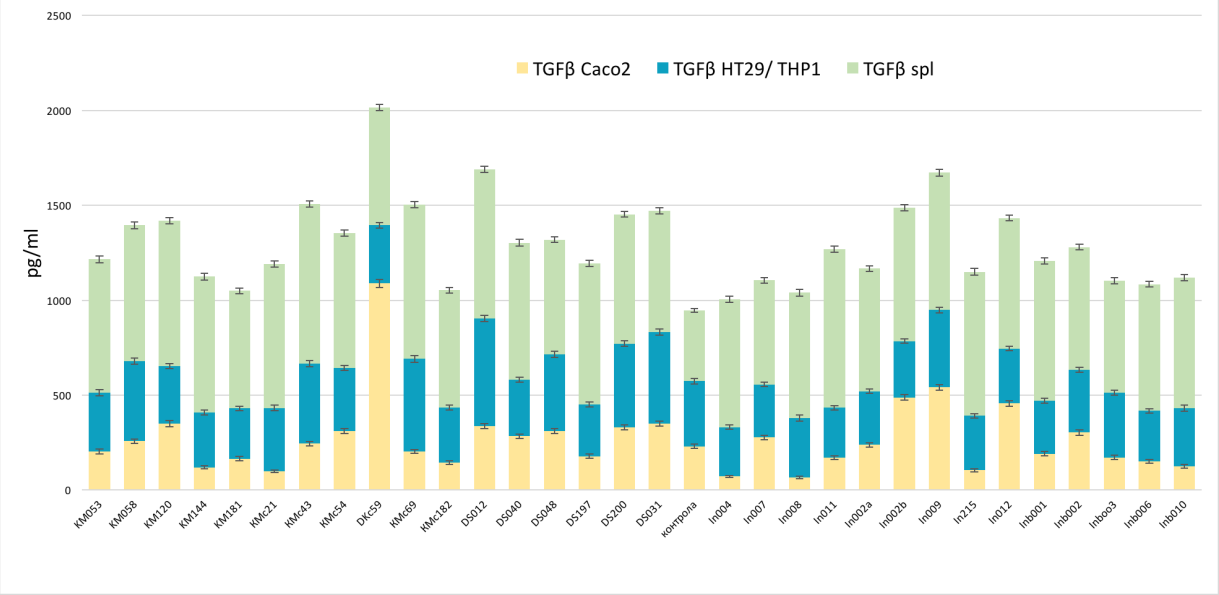


Фигура 14. Определяне на IL-10 индукцията от МКБ при спрегнати епителни клетъчни линии и спленоцити.

Отчетливо изпъкват два щама от изолатите с интестинален произход In004 и безспорно най-високият резултат на In215. Щамът In004 (идентифициран като *L. gasseri)* би бил много подходящ за включване в състава на противовъзпалителни формули, но тъй като при отчитането на про-инфламаторните цитокини, нивата на IL-8 бяха повече от десет пъти над тези на контролата, то този щам става неподходящ за консумация от хора с чревно възпаление. Сред изолатите от групата на бифидобактериите също се откроява един щам Inb010, който същевременно при отчитането на проинфламаторния IL-8 е показал търсеното понижение. Трябва да се отбележи, че висок резултат е показал DS031, който е от групата на киселомлечните изолати и преди това беше определен като про-инфламаторен на база оценката на предишните три цитокина. Също така, Inb006 (идентифициран като бифидобактерия), е показал

най-ниската индукция на IL-10 и заедно с предходните резултати, не притежава необходимия профил за включване в пробиотични продукти с противовъзпалителни свойства.

За да се получи по-пълен профил на противовъзпалителния потенциал, изследваните щамове, бяха оценени и за способността им да индуцират TGF-beta. TGF-β са семейство от поне 5 пептида, които регулират клетъчния растеж, имайки едновременно стимулиращ и инхибиращ ефект (Sporn & Roberts, 1993). Произвежда се от множество имунни клетки, но като неактивен прекурсор, който се нуждае от протеолитично отцепване, за да се активира (Borish and Rosenwasser, 1996). По тази причина, при определянето на TGF-β е необходимо предварително деконюгиране чрез действие на киселина (1 н солна киселина за 1 час). Този регулаторен цитокин се освобождава както от епителните, така и от имунокомпетентните клетки. Фигура 15 представя значителната разлика между продуцирането на TGF-β от трите различни лабораторни модела, които използвахме: епителната клетъчна линия Caco-2, комбинираните клетъчни линии (епителни клетки/моноцити) и спленоцити.



Фигура 15. Определяне на TGF-β индукцията от МКБ при използване на три различни оценъчни системи.

Caco-2 синтезира TGF-β дори без да е индуцирана от бактерии, както показва високото ниво на контролата. Стойностите на TGF-β, получени от

спленоцити, са многократно по-високи от тези на епителните и комбинираните клетъчни линии, което показва различната сила на тези три аналитични модела.

С цел обобщаване на резултатите от анализите на основни цитокини, свързани с антиинфламаторния ефект, условно разделихме изследваните щамове на групи, според произхода им и според степента на индукция- под и над средната стойност за всеки цитокин. Обобщените резултати с броят на щамовете по групи е представен в следната Таблица 3.

Таблица 3. Брой щамове, разделени в групи според произхода си и степента на индукция на съответния цитокин, над и под средната стойност.

Цитокини	ИНТЕСТИНАЛНИ		КИСЕЛОМЛЕЧНИ		Индукция, pg/ml
	> Ср.	< Ср.	> Ср.	< Ср.	Средна ст-т
TNF-α	5 бр.	9 бр.	6 бр.	11 бр.	295,6
IL-8	2 бр.	12 бр.	2 бр.	15 бр.	68,7
IL-6	8 бр.	6 бр.	8 бр.	9 бр.	39,6
IL-10	7 бр.	7 бр.	10 бр.	7 бр.	1371
TGF-β	5 бр.	9 бр.	11 бр.	6 бр.	697,4

Следва да се отбележи, че сред изследваните щамове при индукцията на цитокини свързани с отключването на възпалителни процеси, разпределението на броя щамове с интестинален и киселомлечен произход е приблизително равен, а при индукцията на регулаторните цитокинни с функция да потушават възпалителни процеси, броят на киселомлечните щамове е по-голям.

Таблица 4. Щамове с най-изявена активност по отношение на цитокини, свързани с възпалителни процеси в организма.

щам	TNFα,pg/ml	IL-8,pg/ml	IL-6,pg/ml	IL-10,pg/ml	TGF-β,pg/ml
L.gasseri In004	244,7	271,6	28,8	1860,6	72,6
L.gasseri In007	326,6	48,7	48,7	1508,5	277,3
B.longum Inb010	212	40,3	40,3	1449,1	125,4
L.bulgaricus KM058	285,8	32,1	32,1	1527,1	257,5
S.thermophilus KMc043	297,1	29,4	29,4	1348,2	244,3
СРЕДНА СТ-Т	**295,6**	**68,7**	**39,6**	**1371**	**697,4**

С цел изпълнение на задачата да се подберат щамове с оптимален антиинфламаторен цитокинов профил, най-изявените щамове са представени в Таблица 4, на фона на средната стойност за всеки от цитокините, получена от всички 31 изследвани щама.

От таблицата се вижда, че от щамовете демонстрирали силна адхезия, *L. gasseri* In004, има способността да повлиява имунния отговор, което кореспондира със заключението от предходната глава. Прави впечатление обаче, както беше отбелязано по-рано, че този щам е с прекалена индукция на про-инфламаторните IL-8 и TNF-α, за да бъде определен като антиинфламаторен, въпреки силната индукция на IL-10. За разлика от него, щамът In007, който също е от групата на лактобацилите с интестинален произход, демонстрира оптимален антиинфламаторен профил, с високи стойности на IL-10 и способност за понижаване на IL-8 в присъствие на TNF-α, както и умерена индукция на TGF-β. Друг щам от групата на бифидобактериите Inb010, значително превъзхожда останалите със способността си силно да подтиска IL-8, дори и допълнително стимулиран от TNF-α и същевременно да има една от най-високите стойности за индукция на IL-10. От групата на изолатите с киселомлечен произход, могат да се отличат *L. bulgaricus* KM058, който показва забележителна индукция на IL-10, както и на TGF-β, но не чак толкова ниски нива на IL-8. По отношение на изолатите от групата на *S. thermophilus*, щамът KMc043 показва най-оптимален антиинфламаторен профил, за разлика от щам KMc059.

Като се вземе предвид важността на различните цитокини, участващи в противовъзпалителните механизми на организма, бяха подбрани 4 щама: KM058, KMc043, Inb010 и In007, за да участват в състава на лиофилизиран пробиотичен препарат.

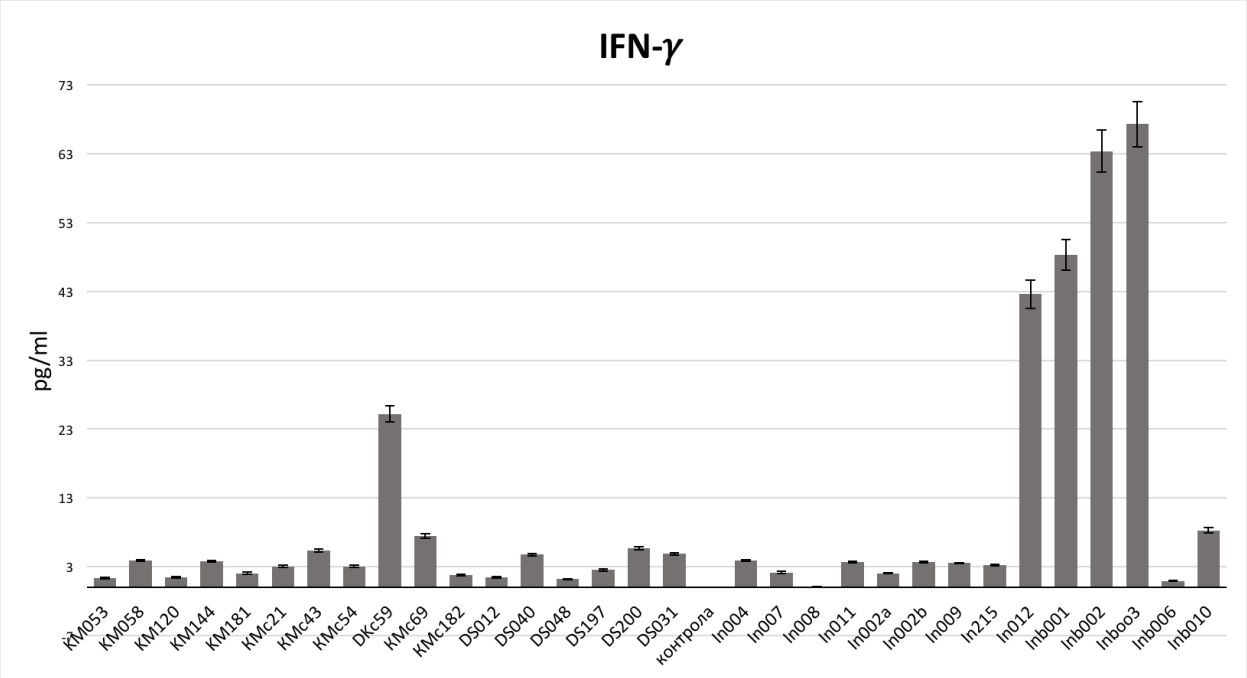
Докато при гореописаните сигнални пептиди подходящи оценъчни системи са епителни клетъчни линии и спрегнати клетъчни линии, то при оценка на цитокините свързани с определяне на клетъчно-медиирания и хуморален отговор би трябвало да се използват спленоцити от лабораторни мишки.

3.3. Подбор на щамове спрямо индукцията на цитокини, участващи в клетъчно-медиирания имунен отговор

Най-важният цитокин, отговорен за активиране на макрофаги и следователно за клетъчно-медииран имунитет, е IFN-γ (Farar & Schreiber, 1993). Той се произвежда най-вече от Т-лимфоцити, но може също да се получи от цитотоксични Т-клетки и NK (natural killer) - клетки. IFN-γ медиира експресия на IgG рецептора, стимулира антиген представянето и производство на цитокини от моноцити и също стимулира моноцит-ефекторните функции, включително адхезия, фагоцитоза, секреция, респираторния порив, бактерицидна и туморицидна активност. Крайният резултат е натрупването на макрофаги в местата на имунни отговори, а тяхното активиране ги прави способни да убиват вътреклетъчни патогени. В допълнение към неговите ефекти върху фагоцитите, IFN-γ стимулира умъртвяване чрез NK- клетките и неутрофили. Също така, IFN-γ стимулира антиген-специфична В-клетъчна пролиферация и диференциация. Накрая, както при другите интерферони, IFN-γ инхибира вирусната репликация (Borish and Rosenwasser, 1996).

Клетъчно-медиирания имунен отговор рядко се повлиява чрез пробиотични МКБ. Както беше изяснено, освен за профилактика срещу вирусни инфекции, IFN-γ участва и при унищожаването на туморни клетки. С цел предварителен подбор на щамове с евентуални способности да модулират клетъчно-медииран имунен отговор, оценихме експресията на IFN-γ и IL-1. За пълноценно изследване индукцията на IFN-γ е необходимо използването на спленоцитни клетки, изолирани и пречистени от миши далаци, тъй като разнообразието на имунни клетки в тази система е много голямо и по този начин се осигурява наличието на имунокомпетентни клетки – от антиген-представящи (дендритни, В-клетки и макрофаги) до Т-хелперни клетки от различни класове и др.

На фигура 16 са показани резултатите от оценката на експресията на IFN-γ от страна на имунокомпетентни клетки в спленоцитна система, индуцирани с различни щамове млечнокисели бактерии.

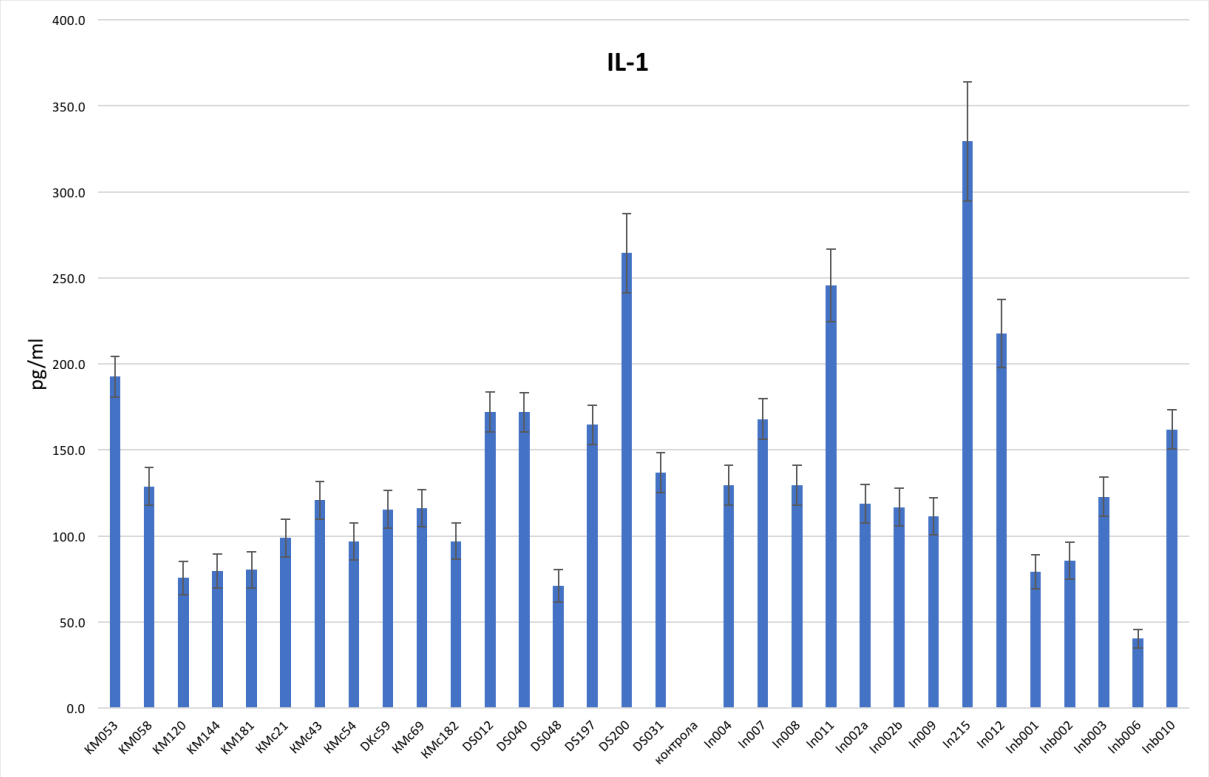


Фигура 16. Определяне на IFN-γ индукция от МКБ върху спленоцити.

Основно се открояват представители на изолатите от групата на бифидобактериите като щамове индуциращи IFNγ и най-вече Inb003 (*B.longum*), който демонстрира и добри адхезивни свойства. Също така, важен факт е откриването на технологични щамове, които биха могли да участват в разработването на функционални храни, допринасящи за повлияване на устойчивостта срещу вируси. DKc059 (*S. thermophilus)* показва умерена индукция на IFN-γ.

Една от основните биологични активности на Интерлевкин-1 (IL-1) е като активатор на лимфоцитите. Отсъствието на този цитокин води до състояние на толерантност или изобщо на липса на имунен отговор, а продукцията му по време на имунен отговор пък води до редица промени свързани със симптоми на заболяване (като например треска). IL-1 стимулира секрецията на IL-2, който си взаимодейства с NK-клетките, като по този начин индуцират по-мощен цитотоксичен ефект и повлияват защитата на организма.

На фигура 17 са дадени резултатите от индукцията на IL-1 за щамовете, които са показали такава активност.



Фигура 17. Определяне на индукцията на сигналния пептид IL-1.

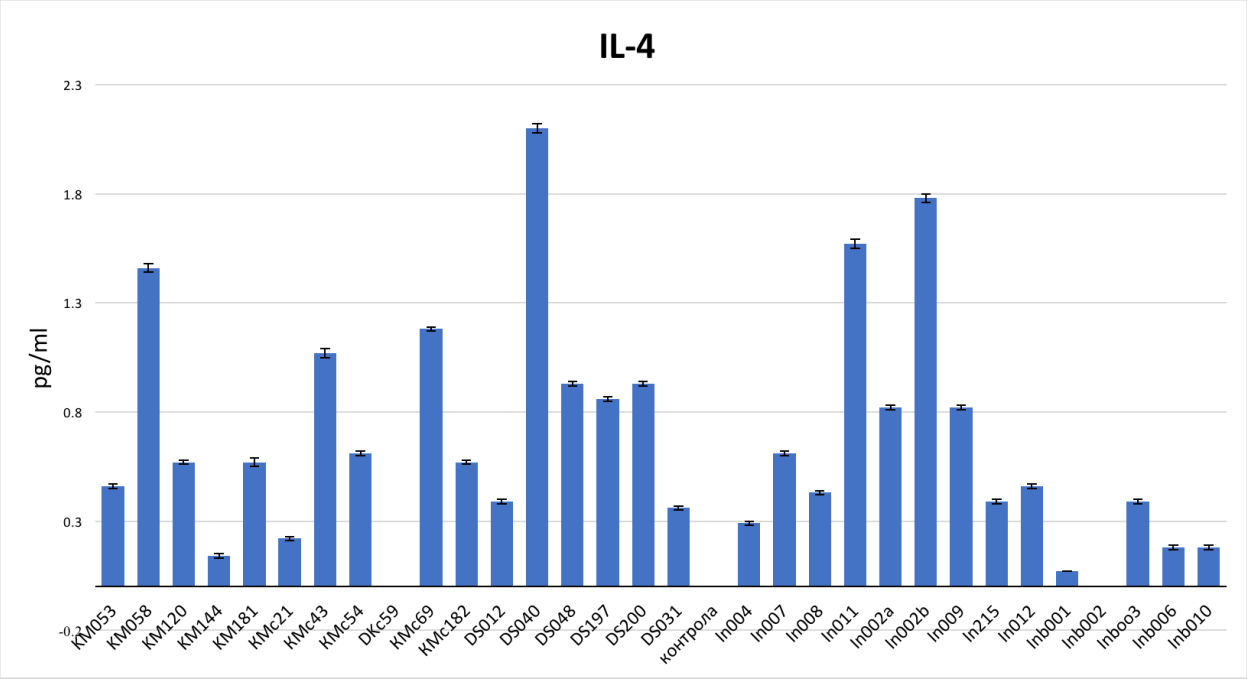
Прави впечатление, че сред щамовете, индуциращи IL-1, лактобацилите от групата на интестиналните изолати имат предимство, но важен факт е откриването и на щамове с умерена активност сред изолатите с киселомлечен произход, които са технологично пригодни.

3.4. Подбор на щамове спрямо индукцията на цитокини, участващи в хуморалния имунен отговор

Не е възможно еднозначното групиране на цитокините според единствен източник или биологична активност. Също така, даден цитокин може да индуцира синтезата на много други цитокини, дори собствената си.

Хуморалният имунитет се отнася до производството на антитела и свързаните с това процеси, включително продуцирането на цитокини. След като веднъж напуснат костния мозък, В-клетките преминават през т.н. превключване на изотипа и активиране на вече зрелите в имуноглобулин-секретиращи В-клетки. В механизма на превключването на изотипа участие взима IL-4. Този цитокин първоначално е идентифициран като растежен фактор за В-клетки, който управлява оптималното стимулиране на В-клетките от антигени (Paul &

Ohara, 1987). Синтезира се от определени Т- клетки и може да бъде пълноценно оценен в лабораторни условия чрез спленоцити. На фигура 34 са представени резултатите от експресията на IL-4.



Фигура 18. Определяне на IL-4 в спленоцитна система

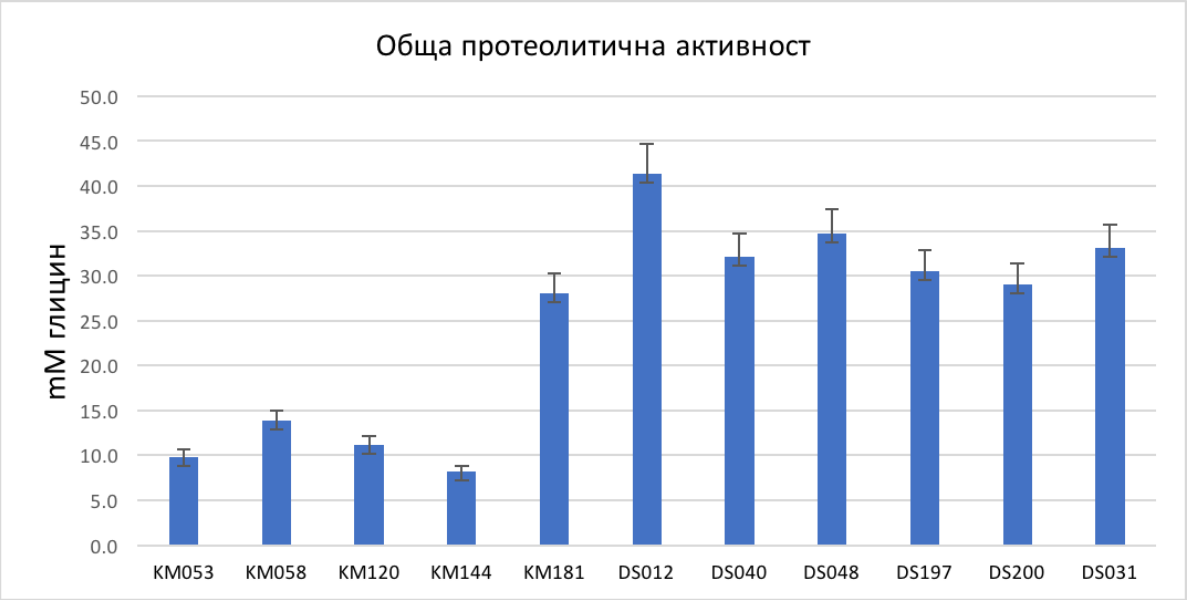
Открояващите се резултати след оценката на този цитокин, принадлежат на изолати: DS040, KM058, Inb002 и In011, които са представители както на интестиналните, така и на изолати от кисело мляко и домашно сирене, което е предимство при разработване на функционални пробиотични храни. Значими резултати от оценката на IL-4, допълват имуномодулиращия профил единствено на KM058. Другите три изявени щама също са показали над средната активност, но не са сред първите резултати по отношение на останалите изследвани цитокини.

3.5. Изследване способността на МКБ да освобождават биоактивни пептиди с имуномодулиращо действие

В процеса, на ферментация на млякото, както и в процеса на зреене на сиренета, определени щамове МКБ могат да освобождават биоактивни пептиди (БП), разграждайки протеиновите фракции на казеина и на суроватъчните протеини с помощта на протеолитични ензими. Тъй като БП са нискомолекулни,

може да се заключи, че щамове с по-добра протеолитична активност е принципно по-вероятно да освобождават БП. По тази причина, за осъществяване на поставената задача по откриването на щамове, освобождаващи биоактивни пептиди с имуномодулиращо действие, най-напред се определи тяхната протеолитична активност.

Общата протеолитична активност беше определена по метода на Church (Church *et al.,* 1983), като отчитането се извършва след като съответните проби, съдържащи ултрафилтрирани пептиди, се дериватизират с орто-фталовдиалдехид (OPA). Методът на Church е по-подходящ в случая от метода на Hull, поради зависимостта на резултатите както от количеството на пептидите, така и от степента на протеолиза. При метода на Hull, резултатът зависи от концентрацията на тирозиновите и триптофановите остатъци, без значение от степента на протеолиза, а OPA реагира с първичните аминогрупи, следователно и с тези освободени след протеолиза. На фигура 19 са представени резултатите от определянето на протеолитичната активност на пръчковидните бактерии изолирани от кисели млека и сирена.

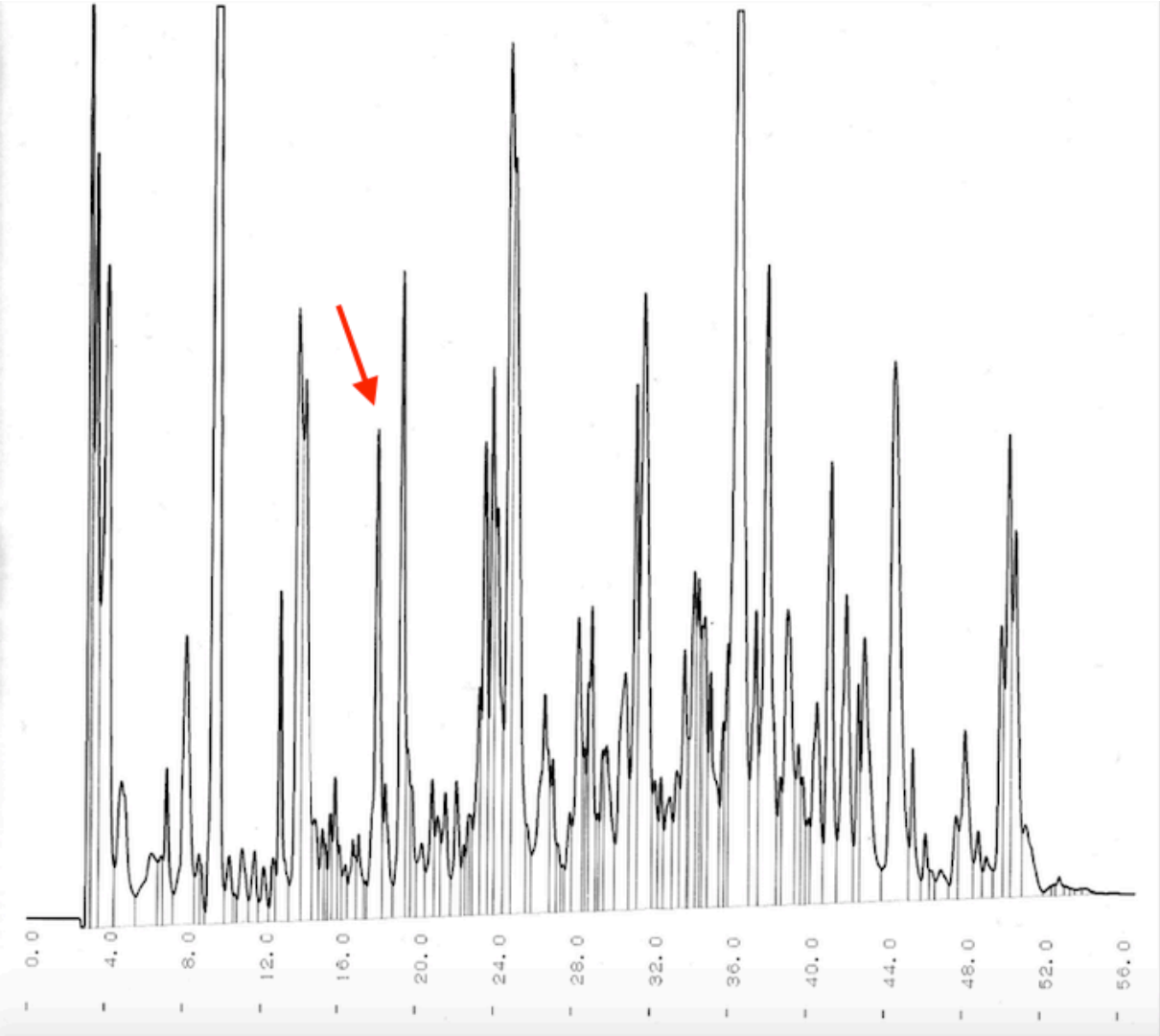


Фигура 19. Обща протеолитична активност на щамове изолирани от домашни кисели млека и сирена.

От изолатите в тази група, най-значима протеолитична активност демонстрира изолат DS012, който след идентификация беше определен като представител на вида *L. helveticus*, както и останалите щамове с най-значими

резултати. Освен тях, се откроява само един изолат (КМ181), представител на вида *L. bulgaricus* и щам DS031, представител на вида *L. casei*. Сред изпитваните 11 щама, общо 7 щама бяха определени като такива с висока протеолитична активност и бяха насочени към оценка на цитокинова индукция за двата избрани цитокина.

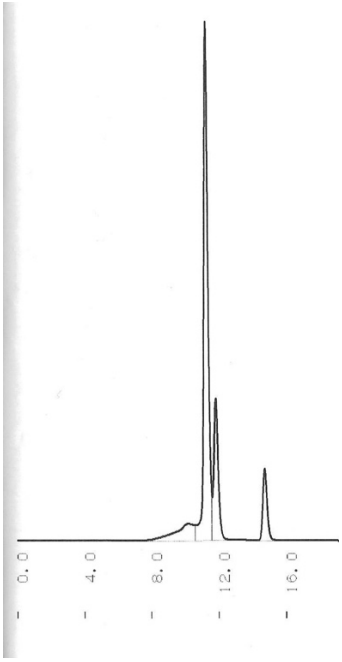
За да се достигне до оценяване на цитокинова индукция чрез ELISA техниката, е необходимо разделянето и дефинирането на активните пептидни фракции и разделянето и дефинирането на конкретните единични пептиди. Това се осъществи посредством обратно-фазово HPLC разделяне и колекциониране във фракционен колектор на пептидни фракции от 1мл на всяка минута.



Фигура 20. Първоначално обратнофазово-HPLC разделяне на пептиди освободени при зреенето на бяло саламурено сирене от щам КМ181 (*L. bulgaricus).*

Получаването на единични пептиди е следствие от провеждането на дву-етапно хроматографско разделяне при съответните температура, колони и градиентни режими на елуентите (посочени в раздел: “Материали и Методи”). Важно е да се отбележи, че при първият етап на разделяне, колекционираните фракции изпитани за цитокинова индукция, съдържат повече от един пептид. Следователно, не е възможно да се определи кой точно или колко пептида в дадена фракция са индуцирали изследвания цитокин.

Всяка фракция, получена след първоначалното фракциониране и показала цитокинова индукция, подлежи на повторно разделяне и отново колекциониране на пептидни фракции от 1 мл на всяка минута, като при това второ разделяне се използва много по-плавен градиентен режим на елуента, за да бъде възможно колекционирането на вече единични пептиди. Така получените единични пептиди се насочват отново за оценка на цитокинова индукция. Двата етапа на разделяне са демонстрирани в две хроматограми на Фиг. 20 и 21.



Фигура 21. Вторично обратнофазово-HPLC разделяне на пептиди освободени при зреенето на бяло саламурено сирене от щам КМ181 (*L. bulgaricus).*

Както е видно от първата хроматограма, след началното обратнофазово разделяне се получават множество пикове, които попадат в голям брой пептидни фракции. С червена стрелка е отбелязана фракцията, колекционирана

на 18-та минута, която след инкубиране със спленоцити и последваща оценка чрез ELISA е дала цитокинова индукция на IL-4. Тази активна фракция, съдържаща повече от един пептид, е подложена на повторно хроматграфско разделяне до единични пептиди (Фиг. 21).

Именно вторичното разделяне е в основата на определянето на конкретния биоактивен пептид, тъй като следва повторно ELISA оценяване на цитокиновата индукция на пептидните фракции, съдържащи вече единични пептиди получени след второто разделяне.

Същинското оценяване на имуномодулираща способност от страна на БП се извърши при съвместно инкубиране с миши спленоцити, тъй като е необходима аналитична система, която да съдържа пълен набор от имуномпетентни клетки, отговарящи на сложните каскадни реакции в организма. При оценяването на имунорегулаторна способност от БП, антиген-представящите клетки, ако бъдат стимулирани от определени пептиди, след това стимулират Th1 или Th2 клетки, които експресират цитокини, съответстващи на типа имунна реакция.

Чрез ELISA техника бяха оценени цитокините IFN-γ и IL-4, като основни представители, съответно на клетъчно-медиирания и хуморален имунен отговор с презумпцията, че се оценяват технологични щамове, които биха освободили БП в рамките на някакъв кисело-млечен продукт. По този начин, може да се получи функционална храна с определени полезни за здравето ефекти, като подобряване устойчивостта на организма срещу патогени.

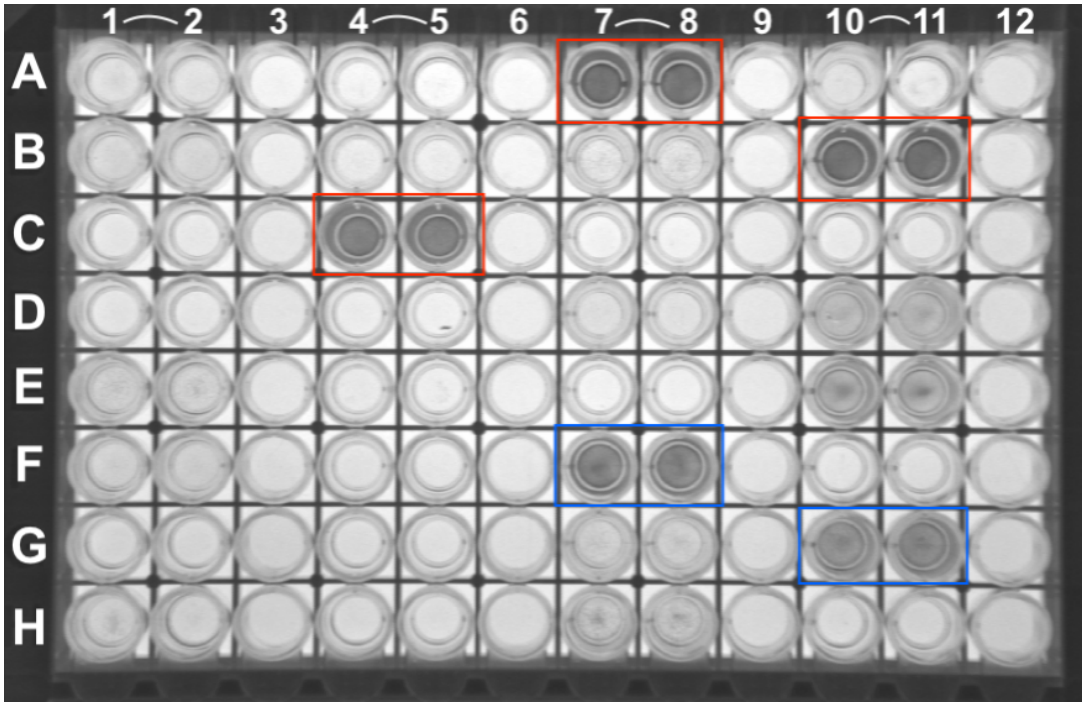
От седемте щама, определени като добри протеолитици и след дву-етапното хроматографско разделяне до единични пептиди, при оценката на IFN-γ, три щама дадоха положителна индукция, а останалите са дали пептидни фракции с никаква или пренебрежимо слаба индукция. Стойностите от измерената индукция от всяка ямка (над 1 pg/ml) са представени в следващата Таблица 5., като са използвани означенията на ямките с координати по редове (с главни латински букви) и по колони (с цифри), кореспондиращи със следната Фиг. 22.

На Фиг. 22 е представена снимка от определяне индукцията на IFN-γ чрез ELISA техника в 96-ямкова плака. Там са нанесени единични пептидни фракции, освободени от четири щама измежду изследваните общо седем щама. При

нанасянето, единичните фракции на всеки щам са повторени във всеки две съседни колони и през една празна колона за прегледност.

Таблица 5. Концентрация на IFN-γ (pg/ml) след индуцирането на спленоцити от единични пептидни фракции, със съответните координати кореспондиращи на ямките на Фиг. 22

ямка	IFN-γ, pg/ml	щам
C4	4.95	*L. casei* DS031
C5	4.99	
A7	7.54	*L. helveticus* DS012
A8	7.50	
F7	2.24	
F8	2.19	
B10	6.02	*L. bulgaricus* KM181
B11	5.98	
G10	1.16	
G11	1.11	



Фигура 22. Снимка от оценката на IFN-γ след индуцирането на спленоцити от единични пептидни фракции, освободени от следните щамове: 1 и 2- DS048 (*L.*

helveticus), 4 и 5- DS031 (*L. casei*), 7 и 8- DS012 (*L. helveticus*), 10 и 11- KM181 (*L. bulgaricus*).

Представените на Фиг.22 щамове са четири от изследваните единадесет щама и са показали най-значима протеолитична активност и съвсем очаквано, именно три от тях освобождават пептидни фракции с положителна цитокинова индукция. Както е видно, от различните щамове са получени различен брой единични пептиди, индуциращи с различна сила IFN-γ, като колкото по-интензивно е оцветяването, толкова по-значимо е индуцирането, както се потвърждава от измерената концентрация в ямките. Също така, пептидните фракции на всеки от изпитваните щамове бяха умишлено повторени в съседни кладенци, с цел да се провери повторяемостта на резултатите. Както се вижда при сравнение на интензитетите на оцветяване на всеки две съседни ямки с положителна индукция и съответните им измерени концентрации в pg/ml от кореспондиращите таблици, възпроизводимостта на анализа е много добра.

В колони 4 и 5, където са повторени фракциите получени от щам *L. casei* DS031, се откроява една, но с голям интензитет на оцветяването. В колони 7 и 8 от плаката се виждат фракциите от изолат DS012 (*L. helveticus)*, проявили от силна към незначителна индукция на IFN-γ, а в колони 10 и 11 са нанесени пептидните фракции от единствения представител на *L. bulgaricus* със силна протеолитична активност (KM181), който е дал най-голям брой пептидни фракции, индуциращи IFN-γ. Може да се обобщи, че са открити три пептидни фракции с висока (оградени в червено), две със средна (оградени в синьо) и още няколко със слаба цитокинова индукция.

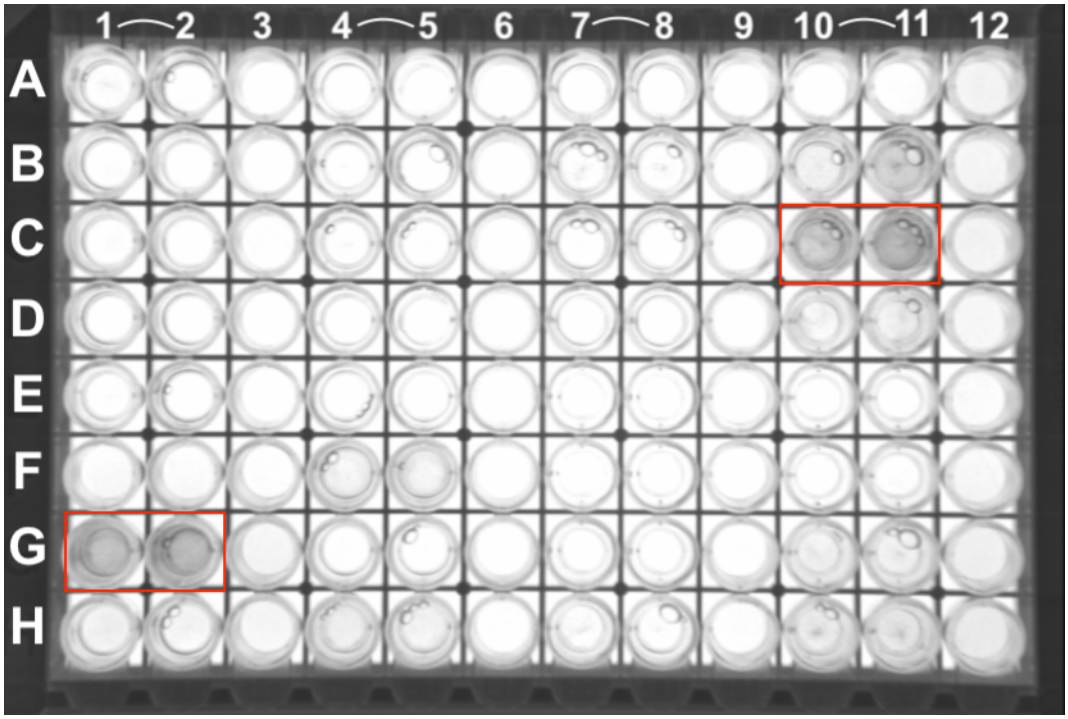
Значимо и рядко срещано е откриването на щам *L. bulgaricus,* който да притежава такава активност, а това го прави подходящ за включване в закваски за производство, както на киселомлечни продукти, така и на сирена с допълнителни здравословни ефекти.

За оценката на другия избран цитокин - IL-4, който е основен участник в хуморалния имунен отговор, се подходи по същия начин. Резултатите от измерената цитокинова индукция са предствени на Таблица 6, като са използвани означенията на ямките по редове (с главни латински букви) и по колони (с цифри), кореспондиращи със следната Фиг. 23.

Таблица 6. Концентрация на IL-4 (pg/ml) след индуцирането на спленоцити от единични пептидни фракции, със съответните координати кореспондиращи на ямките на Фиг. 23

ямка	IL-4, pg/ml	щам
G1	0.63	*L. helveticus* DS048
G2	0.66	
C10	0.71	*L. bulgaricus* KM181
C11	0.77	

*В таблицата са дадени резултати за концентрация на IL-4, която е по-висока от 0.50 pg/ml.



Фигура 23. Снимка от оценката на IL-4 след индуцирането на спленоцити от единични пептидни фракции, освободени от следните щамове: 1 и 2- DS048 (*L. helveticus*), 4 и 5- DS031 (*L. casei*), 7 и 8- DS012 (*L. helveticus*), 10 и 11- KM181 (*L. bulgaricus*).

От всички 11 изолата с киселомлечен произход, които бяха изпитани за способност да освобождават БП, само два щама освобождават пептиди индуциращи IL-4: *L. helveticus* DS048 и *L. bulgaricus* KM181. Също така, тук не се наблюдава освобождаване на повече от една активна фракция от даден щам. Важно уточнение е, че пептидните фракции са нанесени в ямките на плаките в една и съща последователност, както при оценката на IFN-γ, така и при IL-4.

Това е с цел да се открие или отхвърли възможността даден щам да освобождава БП с различна имуномодулираща насоченост. Тъй като един от двата щама проявили способност да индуцират IL-4, отново е щам *L. bulgaricus* КМ181, то прави впечатление, че активната фракция се намира в трета (по вертикалата) ямка, където при оценката на IFN-γ не се открива такава. Следователно, сред изпитваните щамове, не се открива такъв, чиито пептидни фракции да имат едновременно активност спрямо различни цитокини, но щам *L. bulgaricus* КМ181 е способен да освобождава БП, индуциращи различни цитокини.

Пептидите с най-значима индукция, на IFN-γ и IL-4, освободени съответно от *L. helveticus* DS012 и *L. bulgaricus* КМ181, бяха секвенирани и са представени, както следва:

L. helveticus DS012 - **Glu-Leu-Gln-Asp-Lys-Ile-His**

L. bulgaricus KM181 - **Leu-Leu-Tyr-Gln-Glu**

4. КЛИНИЧНИ ИЗПИТАНИЯ НА ПОДБРАН ПРОБИОТИЧЕН ЩАМ

При клиничното изпитание, проведено за подбран щам *L. gasseri* In007 всички доброволци завършиха това рандомизирано, плацебо-контролирано проучване. Цитокините, които се отчетоха в кръвните проби на доброволците, бяха подбрани, така че да се потвърдят или отхвърлят резултатите за същите цитокини, получени in vitro. В тази връзка, очаквано, от списъка на тестваните in vivo цитокини, IL-4 не показа стастистически значимо изменение в нивата преди и след 30-дневния прием на лиофилизирания щам, както и между контролната група и представителната. Съвсем различна картина се наблюдава при резултатите на IL-8. Този цитокин при лабораторните опити даде една много висока индукция при допълнително стимулиране с TNF-a, от което можеше да се предположи, че в организма този щам би могъл да действа про-инфламаторно, въпреки отличните резултати, които демонстрира за антиинфламатрония IL-10. Тази противоречивост на резултатите получени in vitro не се потвърди при резултатите от доброволци. Почти пълната липса на индукция на IL-8, която получихме е желателна, за да се избегне про-възпалителния ефек Таблица 7, което се потвърждава и от отрицателните

резултати на кръвния маркер на възпалението С-реактивен протеин (<6 mg/l се счита за отрицателен).

Таблица 7. Концентрация на IL-8 и IL-10 в кръвна плазма на доброволци (pg/ml, p < 0,05).

Експериментални групи	брой доброволци	Тип на Интерлевкини			
		IL-8		IL-10	
Представителна група - преди прием	20	0.39	±0.05	2.59	±0.29
Представителна група - след прием	20	0.70	±0.09	2.53	±0.32
Плацебо група - преди прием	18	0.86	±0.11	2.83	±0.34
Плацебо група - след прием	18	1.12	±0.19	2.68	±0.24

Същевременно обаче, очакваните високи нива на IL-10, не се потвърдиха при доброволци. Забелязва се малка разлика, основно при поддържане на нивото на този цитокин сред представителната група в сравнение с лекото му понижение сред контролната група (Таблица 7). Това изключва силния противовъзпалителен ефект, предположен in vitro.

Корелацията между in vitro и in vivo резултатите е видима за IFN-γ. Стойностите от представителната и плацебо групата са близки, но когато се изчислява, увеличението на IFN-γ в представителната група е 26,7%, в сравнение с увеличението от 10% на групата, приемала плацебо. Тази разлика от почти 17% реално увеличение на цитокина сега е видима (Таблица 8). Също така, получените in vivo резултати за TGF-ß (Таблица 8) напълно потвърдиха, че щам *L. gasseri* In004 е способен да индуцира този противовъзпалителен цитокин.

Таблица 8. Концентрация на IFN-γ и TGF- ß в кръвна плазма на доброволци (pg/ml, p < 0,05).

Експериментални групи	брой доброволци	Тип на Цитокини			
		INF-γ		TGF-β	
Представителна група - преди прием	20	4.01	±0.39	244.60	±21.50
Представителна група - след прием	20	5.08	±0.40	306.55	±23.00
Плацебо група - преди прием	18	5.87	±0.48	256.72	±19.20
Плацебо група - след прием	18	6.49	±0.50	205.22	±16.50

Съвсем нов поглед върху целия имунологичен ефект, който оказва приема на определен бактериален щам над макроорганизма, се открива чрез оценката на имуноглобулини. Ние избрахме да проследим нивата на имуноглобулини А (IgA) и G (IgG).

Таблица 9. Концентрация на IgA и IgG в кръвна плазма на доброволци (pg/ml, p < 0,05).

Експериментални групи	брой доброволци	Тип на Имуноглобулини			
		IgA		IgG	
Представителна група - преди прием	20	2.10	±0.12	10.53	±0.95
Представителна група - след прием	20	2.58	±0.15	10.54	±0.92
Плацебо група - преди прием	18	2.29	±0.14	10.92	±1.10
Плацебо група - след прием	18	2.31	±0.15	10.89	±1.02

Увеличаването на IgA с повече от 20% сред представителната група в сравнение с непромененото му ниво сред групата, приемала плацебо идва да покаже имуномодулаторните свойства на избрания щам. Освен това никой от доброволците не е получил наднормени нива на IgA след приема на избрания щам (Референтни стойности на IgA: 0,7 ÷ 4,0 mg/l), което е в подкрепа на положителния ефект. Не са открити разлики по отношение на промените на IgG както в представителната, така и в плацебо групата, преди и след прием на щам или плацебо.

Може да се предположи, че увеличаването на секреторния IgA може да се дължи на факта, че пробиотиците влизат директно в контакт с лимфоидната тъкан, свързана с лигавицата, стимулирайки локалния имунитет и хуморален имунен отговор.

ТЕХНОЛОГИЧНА ЧАСТ

Целта е да се получат хранителни добавки във вид на капсули и сашета, съдържащи лиофилизирани култури на избрани щамове с имуномодулиращи свойства.

За да се постигне максимална концентрация на жизнеспособни клетки от вече селектираните щамове с определени имуномодулиращи свойства, се налага оптимизиране на условията за ферментация и последващата лиофилизация, както и на състава на сместа за капсуловане.

След получаването на желания добив от биомаса, лиофилизация и капсуловане, паралелно се подходи към оформянето на статистически значимо in-vivo изпитване на ефектите на подбраните имуномодулиращи щамове и към

определяне преживяемостта на клетките по време на съхранение в капсулован вид.

1. ФЕРМЕНТАЦИЯ И ДОБИВ НА БИОМАСА

От направените опити с изпитване на различни цитокинови експресии се откроиха щамове с различна насоченост и се подбраха такива, които да влязат в състава на хранителни добавки съответно: за повишаване на общия имунен отговор и други за понижаване вероятността от задействане на възпалителна реакция в чревния тракт. Следователно изпитанията се осъществиха за две отделни комбинации от следните щамове, представители на съответния вид:

Комбинация 1	**Комбинация 2**
In004 (*L. gasseri)*	In007 (*L. gasseri)*
In012 (*L. plantarum)*	Inb010 (*B. longum)*
Inb003 (*B. longum)*	KMc043 (*S. thermophilus)*
KM144 (*L. bulgaricus)*	KM058 (*L. bulgaricus)*
KMc043 (*S. thermophilus)*	

За получаването на подбраните комбинации от щамове в лиофилизиран вид, се извършиха ферментации, съответно, по отделно за щамовете: *L. gasseri L. plantarum, B. Bifidum* и съвместно за щамовете *L. bulgaricus и S. thermophilus*. Бяха направени опити за ферментация на интестиналните лактобацили с три различни хранителни среди: MRS, модифицирана среда на основата на MRS и добавки на соли (Ср1) и среда на основата на сухо мляко и добавки (Ср2). Полученият добив на биомаса при развитие в обогатена среда 1 и обогатена среда 2 е много близък. Предвид факта, че МКБ се развиват на богати хранителни среди, оптималното съотношение между добив на жизнеспособни клетки и цена на средата за култивиране в промишлени условия, предопредели използването на хранителна среда – Ср2. За условията, при които да протече ферментацията в различните хранителни среди се взеха предвид литературни данни. Sashihara *et al.,* (2007) изследват влиянието на условията на култивиране върху имуностимулиращата активност и продукцията на интерлевкин-12 на щам *L. gasseri* при миши модели. Резултатите показват, че продукцията на IL-12 се увеличава с растежа на бактериалните клетки и е по-висока в стационарно фазови клетки, отколкото в логаритмично фазовите клетки и също така е по-

висока в клетките, отглеждани в киселинно pH и намалява, когато клетките се инкубират в буфер при неутрално pH преди топлинна обработка. Тези наблюдения показват влиянието на pH на културалната среда и в допълнение, съответстват на характеристиките на автолизата. Вследствие на което, се установява, че целостта на бактериалните клетки е необходима за стимулиращия ефект върху продукцията на IL-12 и че киселинното pH и топлинната обработка допринасят за стимулирането чрез инхибиране на активността на автолизини, които са присъщи за бактериите. Резултатите предполагат, че култивирането до стационарната фаза при кисело pH е необходимо за ефективното производство на пробиотици с имуностимулаторна активност (Sashihara *et al.,* 2007). Според други автори, от данните за култивирането на щам *L. gasseri*, културата навлиза в стационарна фаза след 7-я час, при pH от 5,7 до 6,2, като най висок добив се постига при pH 5,9 (Baltova & Dimitrov, 2014). На Таблица 10 са показани брой живи клетки след ферментация на щам *L. gasseri* на съответните хранителни среди и в два режима на ферментация: с разбъркване (при 100 оборота в минута на бъркалката и поддържане на pH 5,9 и в присъствието на азот) и при статична нощна ферментация, където процесът се прекратява на 16-я час (pH от 4,6).

Таблица 10. Брой живи клетки на мililитър на щам *L. gasseri In007,* при различни условия на ферментация, CFU/ml.

Хранителна среда	Ферментация с разбъркване	Статична ферментация
	Инокулум – 5%; **Време** - 7ч. **T** - 37ºC; **pH** - 5,7	**Инокулум** - 0,5%; **Време** - 16ч. **T** - 37ºC; **pH** - 4,6
MRS	$3,0 . 10^{9}$	$2,2 . 10^{9}$
Cp 1	$4,8 . 10^{9}$	$4,9 . 10^{9}$
Cp 2	$9,7 . 10^{9}$	$8,1 . 10^{9}$

На базата на получените резултати, най-добър добив се получава при използване на Cp2, с pH 5,7 на ферменторна система с разбъркване и неутрализация с NaOH, поради което, при аналогични условия се извърши ферментация на другия избран щам *L. gasseri* In004.

За разлика от тях, с цел получаване на оптимални резултати за добив на биомаса от щамовете *L. bulgaricus u S. thermophiles,* бяха култивирани само на ферменторна система. Инокулирането е с по 2,5% инокулум от всеки от щамовете – общо 5%, който съдържа $4,6\times10^{8}$ CFU/mL. Провежда се

ферментация на 43°C при поддържане на pH 5,6 - 5,7 и се неутрализира с 4 M NaOH с разбъркване при 200 оборота на бъркалката и подаване на азот през микро - филтър. Развитието на бактериите беше следено на всеки час и се установи, че максимално натрупване на клетки се наблюдава на 5-тия час от развитието на културата, поради което ферментация с продължителност 5 - 5,5 часа е достатъчна.

Тази комбинация е основата, към която след лиофилизиране, чрез сухо смесване се добавят също така лиофилизирани монокултури на останалите избрани щамове. *При същите условия на ферментация са получени комбинация от щамовете L. bulgaricus KM058 и S. thermophiles KM043 за смесване с лиофилизираните монокултури, за получаване на K2.*

След като е получена набогатената смес от съответните монокултури или комбинирани култури, се пристъпва към подготовка за лиофилизация

2. ЛИОФИЛИЗИРАНЕ НА ПРОБИОТИЧНИ ЩАМОВЕ

За да се улесни и удължи съхранението на бактериите се използва метод за отстраняване на клетъчната вода за обратимо инактивиране на микроорганизмите. Такъв метод е лиофилизирането, което се счита за щадящ метод на дехидратация. За да се улесни оцеляването на клетките по време на изсушаването, често се подготвят предварително, като се използва матрица, която предпазва клетките от различни вредни натоварвания по време на замразяването и сушенето (Wessman *et al.,* 2013). Счита се, че ключов фактор за подпомагане на клетъчната преживяемост е способността на съставките на криопротекторната смес да замени водата по време на дехидратацията, като по този начин поддържа структурата на протеините и мембраните на клетката и в сухо състояние. Дизахариди като захароза, но също и трехалоза показват това свойство, докато полимери като нишесте не могат (Jain, *et al.*, 2009). Полимерите се считат за твърде големи, за да взаимодействат с мембранните липиди по същия начин, както дизахаридите. Друго свойство, което е важно за успешното сушене чрез замразяване на микроорганизми, е способността на поддържащата матрица да се втвърди (т.е. да стане аморфно твърдо вещество) по време на сушене чрез замразяване (Wessman *et al.,* 2013).

Множество са използваните протектиращи добавки към смесите за лиофилизиране на МКБ. За да се защити жизнеспособността на пробиотиците по време на дехидратацията, преди лиофилизацията се добавят различни средства за защита като обезмаслено мляко, суроватъчен протеин, глюкоза, малтодекстрин и трехалоза (Martín *et al.*, 2015). Други автори показват подобрена жизнеспособност, когато се използват глицерин и манитол като протективни средства преди лиофилизация и заключават, че така се увеличава възможността за използване на пребиотици като криопротектори (Savini *et al.*, 2010). Следователно влиянието на добавките върху процентите на преживяемост на пробиотичните бактерии и проверката на подходящата комбинация, която осигурява ефективен агент за сушене чрез замразяване, е съобразно технологичната и икономическа оценка (Jalali *et al.,* 2012).

Предвид литературните данни и натрупаният опит при употребата на сухо мляко като основен криопротектор, се направиха експерименти с добавка на захароза и малтодекстрин. Също така, при експериментите с различни криопротекторни смеси, се разработи и такава без мляко, която е подходяща за хора с лактозен интолеранс. Съставът на двете криопротектирни смеси (КПС) е посочен в раздел “Материали и Методи”. Извънклетъчните криопротектори (захароза) не проникват през клетъчната мембрана, а служат за балансиране на разликата в осмотичното налягане, докато вътреклетъчните криопротектори (глицерол) проникват през клетъчната мембрана и намаляват образуването в клетките на ледени кристали, които могат да разкъсат клетъчните мембрани. Концентрацията на глицерола е минимална, така че да не препятства равномерното замразяване и изсушаване на сместа и доброто разпрашаване на готовия продукт.

След ферментацията, клетките се концентрират като се центрофугират и се освобождават от хранителната среда, след което се смесват с криопротекторите и следва лиофилизация.

Основни етапи на лиофилизацията са: замразяване на продукта, първично сушене – сублимация и вторично сушене. За успешното лиофилизиране е важно сублимационната температура на продукта да е с не по-малко от 10 градуса по-ниска от евтектичната точка на замразяваната смес, в противен случай е възможно образуването на размекнати участъци - язви. В такива участъци не е възможно последващо оптимално сушене и се влошава

добива и качеството на готовия продукт. В направените лабораторни опити, се установи, че евтектичната точка на смесите за сушене е от порядъка на (-20)°C, следователно, се зададе температура на сублимация от около (-32)°C през целия етап на сублимационното сушене. Заедно с температурата на контактната течност и налягането в камерата на лиофилизатора е важен фактор за формирането на температурата на продукта. Зададен беше вакуум при 0,4 mbar, като по този начин вътрешната енергия на продукта не се увеличава, а следователно и температурата му. При увеличаване на температурата на контактната течност, се повишава и налягането, поради засилената сублимация и когато вакуумпомпата не може да го компенсира, се повишава и температурата на продукта. За да се избегне частично размразяване на продукта, температурата на контактната течност се увеличава стъпаловидно, с продължителна задръжка на съответната температура, според интензитета на сублимация. Амплитудата на съответните параметри по време на процеса ясно показва, че температурата на контактната течност не се покачва над (-30)°C, което означава че балансът между температура и налягане е постигнат по време на целия процес и е гаранция за качествено сушене.

По време на вторичното сушене, вакуумът се увеличава на 0,2 mbar, тъй като повечето от водата в сместа за сушене е елиминирана, а в края на процеса водното съдържание е не повече от 3 - 4%.

Допълнителни условия за постигането на краен продукт с ниска влажност и висока преживяемост на клетките са дебелината на слоя в тавите (1- 1,5 см), също така разхерметизирането на лиофилизационната камера след края на процеса да се извършва с микрофилтриран азот, както и влагосъдържанието в помещението за колекциониране на лиофилизата да е до 30%.

В следващата Таблица 11 са дадени резултатите за броя жизнеспособни клетки подготвени за лиофилизация и брой клетки след лиофилизация (при употребата на различните КПС). Забелязва се една добра преживяемост на културите при процеса на сублимационно сушене, както при КПС 1, съдържаща мляко, така и при безмлечната смес, на фона на контролата.

Таблица 11. Брой жизнеспособни клетки на подбрани пробиотични щамове (след центрофугиране) преди и след лиофилизация

Щам	**Преди лиофилизация,** CFU/mL	**След лиофилизация,** CFU/g		
		КПС 1	КПС 2	Контрола
(L. bulgaricus) *(S. thermophilus)*	$1,5\times10^{8}$ $8,0\times10^{9}$	$5,9\times10^{8}$ $3,2\times10^{10}$	$4,6\times10^{8}$ $2,8\times10^{10}$	$4,1\times10^{8}$ $1,8\times10^{10}$
In004 (L. gasseri)	$1,6\times10^{8}$	$7,6\times10^{8}$	$9,3\times10^{8}$	$4,4\times10^{8}$
In012 (L. plantarum)	$3,1\times10^{8}$	$1,4\times10^{9}$	$9,0\times10^{8}$	$8,6\times10^{8}$
KM058 (L. bulgaricus) *KM043 (S. thermophilus)*	$1,0\times10^{8}$ $9,2\times10^{9}$	$3,9\times10^{8}$ $4,8\times10^{10}$	$3,8\times10^{8}$ $4,5\times10^{10}$	$3,1\times10^{8}$ $3,9\times10^{10}$
In007 (L. gasseri)	$1,9\times10^{8}$	$9,5\times10^{8}$	$8,8\times10^{8}$	$8,7\times10^{8}$
Inb010 (B. longum)	$1,9\times10^{8}$	$9,3\times10^{8}$	$8,9\times10^{8}$	$8,5\times10^{8}$

Полученият висок брой жизнеспособни клетки след лиофилизация и на двете пробиотични комбинации, е основание за прилагането на посочената технологична схема за производството им, в това число и криопротектиращите смеси на млечна и безмелечна основа.

След смесване на сухите компоненти, от получените концентрати на предложените щамове за всяка от двете комбинации, се получава следната активност по отношение на брой клетки:

- общото съдържание на млечнокисели бактерии в К1 е $3,4\times10^{10}$ CFU/g.
- общото съдържание на млечнокисели бактерии в К2 е $5,0\times10^{10}$ CFU/g.

Към тези полибактериални сухи смеси се добави и 10 % пребиотик - инулин, също в сухо състояние (Jardine Sh., 2009).

Може да се обобщи, че една от основните цели при получаването на лиофилизирани концентрати е постигната, а именно висок титър жизнеспособни клетки (достигайки до и над 10^{8} CFU/g) за всеки от щамовете, участващи в двете разработени пробиотични комбинации. Резултатите напълно съответстват на концентрацията на пробиотици, необходима за постигане на in vivo ефект, цитирана като над 10^{6} cfu/ml в тънкото черво и над 10^{8} cfu/g в колона. Дори ако в някои случаи не е необходима жизнеспособност, тя е полезен индикатор за броя на наличните клетки, независимо от това, кой клетъчен компонент може да бъде активен (Minelli & Benini, 2009; Vasiljevic & Shah, 2008; Sanders, 2003).

ИЗВОДИ

1) Чрез ДНК типиране е определена видовата принадлежност и щамовата идентичност на 31 изолата МКБ.
2) Най-значима адхезия проявяват щамове *L. gasseri* In004 и *L. plantarum* In012. Доказано е, че способността им да адхезират се дължи на фактори с протеинова природа.
3) Чрез разработен метод е доказана ролята на конкретни повърхностни протеини за адхезия на подбрани щамове МКБ към човешки епител.
4) Доказана е високата свръхекспресия на гените *mub* и *map* при адхезия към мукус на щамовете *L. gasseri* In004 и *L. plantarum* In012 чрез използването на real time PCR техники .
5) Открити са както щамове с интестинален произход (*L. gasseri* In007), така и киселомлечни (*L. bulgaricus* KM058 и *S. thermophilus* KMc043), способни значимо да индуцират синтезата на основния регулаторен цитокин IL-10 и същевременно да подтискат синтеза на проинфламаторния IL-8.
6) Разработен е цялостен методичен подход за изолиране и пречистване на единични нискомолекулни пептиди от лабораторни моделни сирена. Идентифицирани са биоактивните пептиди с най-значимо имунорегулаторно действие и е определена аминокиселинната секвенция на два от тях.
7) Щам *L. bulgaricus* KM181, изолиран от домашно кисело мляко, е способен да освобождава различни биоактивни пептиди, значмо индуциращи продукцията на IL- 4 и IFN-γ.

ПРИНОСИ

- **Приноси с научен характер**

1) Определена е природата на адхезините на щамове МКБ, способни да адхезират към човешки епител. Разработен е метод за молекулярна характеристика на повърхностни адхезивни протеини.
2) За първи път е изследвана способността на подбран щам *L. bulgaricus* да освобождава биоактивни пептиди, способни да индуцират значимо различни цитокини.
3) Разработен е нов методичен подход за изолиране и пречистване на биоактивни пептиди, с влияние върху имунния отговор, в следствие на което е определена секвенцията на два от тях.
4) Модифициран е методичен подход, включващ TRFLP и течно-хроматографски техники за безкултивационно определяне на бактериални групи в човешки интестинален тракт.

- **Приноси с приложен характер**
- Подбрани са щамове с най-значима адхезия към епител и мукус.
- Открити са щамове, които са способни да индуцират значимо или да инхибират продукцията на цитокини, свързани с различен тип имунен отговор и респективно са подходящи за включване в пробиотични продукти с конкретна насоченост.
- Селектирани са пробиотични щамове, включително *L. bulgaricus* и *S. thermophilus,* с които е разработена комбинация подходяща за включване в пробиотични продукти за хора страдащи от IBD и е предложена технологична схема за производството им.
- Селектирани са пробиотични щамове, които са подходящи за закваски за бяло саламурено сирене с повишено съдържание на биоактивни пептиди с имунорегулаторно действие.
- Проведено е клинично изпитание на щам *L. gasseri,* за удостоверяване на пробиотичните му свойства in vivo.
- Разработен и внедрен е продукт с подбрани пробиотични щамове – “LB Lact”.

Публикации свързани с темата

1. **Gotova**, I., Dimitrov, Zh., Najdenski, H. (2017) Selected *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains from bulgarian yogurt demonstrate significant anty-inflammatory potential. *ACTA microbiologica Bulgarica*. **33**(3): 137 – 142.

2. **Gotova**, I., Dimitrov, Zh., Najdenski, H. (2017) Clinical assessment of Lactobacillus gasseri strain, selected by in-vitro tests*. Int J Micro Biotech.* **2**(4): 156 – 160.

3. Dimitrov, Zh., **Gotova**, I., Chorbadjiyska, E. (2014) In-vitro characterization of the adhesive factors selected probiotics to Caco- 2 epithelium cell line. *Biotechnology and Biotechnological equipment*. **28**(6): 1079 – 1083. IF: 0,379

4. Dimitrov, Zh. and **Gotova**, I. (2014) Selected lactic acid bacteria strains reduce the expression of interleukin-8 in epithelial cells. *J. BioSci Biotech*. ISSN: 1314 – 6246.

Участия в научни форуми

1. **Gotova**, I., Dimitrov, Zh. And Naidenski, H. (2016) Detection of bioactive peptides with immunomodulatory properties in Bulgarian cheese, related by LAB during ripening. Proceedings of the 7-th workshop on experimental models and methods in biomedical research. 16 – 18 May, Sofia, Bulgaria.

2. **Gotova,** I.M. and Dimitrov, Zh.P. (2015) Anti-inflammatory potential of selected lactic acid bacteria from Bulgarian yogurt. International Conference and Exhibition on Gastrointestinal Therapeutics. 25 – 27 August, Valencia, Spain.

3. **Gotova,** I. and Dimitrov, Zh. (2014) Evaluation of anti-inflammatory potential of LAB strains according to their ability to modulate the production of IL-10, TGF-ß and IL-8. Conference on Gut Microbiology. 16 – 19 Jun, Aberdeen, UK.