

Рецензия

на дисертационен труд на **Ирина Маринова Готова**

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

представен за защита пред научно жури, сформирано със заповед № I-24/05.03.2019 на Директора на Институт по микробиология „Стефан Ангелов” при БАН за получаване на образователната и научна степен “Доктор” по професионално направление 4.3. Биологични науки (микробиология)

Рецензент: доц. д-р Пенка Петрова

Основен аспект, свързан с разработването на функционални храни е подборът на микроорганизми, които да притежават специфични пробиотични свойства. Според последната дефиниция на Световната здравна организация и Международната научна асоциация за про- и пребиотици, пробиотиците са „живи микроорганизми, които прилагани подходящо и в определени количества имат положителен здравен ефект върху хората”. Особено перспективно е изолирането на млечно кисели бактерии от естествени местообитания - домашно приготвени кисели млека, или такива с човешки произход, а изучаването на пробиотичния потенциал на млечно киселите бактерии е предпоставка за влагането им не само в млечните продукти, но и в различни други хранителни продукти и препарати с профилактично или терапевтично действие.

Приемът на хранителни добавки, съдържащи пробиотици имат доказан положителен ефект върху здравето на консуматора, като през последните години са натрупани много данни, доказващи успешната превенция и лечение на чревни инфекции чрез пробиотици, антитуморен ефект, положително влияние при сърдечни заболявания. Свойствата, които трябва да притежават потенциалните пробиотични щамове според много автори са свързани с техния човешки произход (да са безопасни за използване от хората); те трябва да

бъдат резистентни към стомашните киселини и жлъчния сок (да имат добра преживяемост при преминаване през стомашно-чревния тракт); да са способни на адхезия към чревните епителни клетки (изискване за сполучлива колонизация *in vivo*), да продуцират антимикробни субстанции или бактериоцини (да проявяват антагонизъм към патогени); и да са способни да модулират на имунния отговор.

Настоящата дисертация разглежда имуномодулиращото действие на подбрани български пробиотични щамове, като се цели разработването на нов полибактериален препарат с доказани здравни ползи за потребителя. Темата за разработване на пробиотични препарати и научните доказателства за тяхното влияние върху човешкия организъм е особено актуална през последното десетилетие.

Дисертационният труд съдържа 170 стр. и необходимите раздели – въведение – 1 стр., литературен обзор (58 стр.), цел и задачи, материали и методи (21 стр.), резултати и обсъждане (51 стр.), изводи и приноси – 2 стр. и използвана литература – 24 стр. Доказателственият материал е представен в 25 таблици и 42 фигури. Цитирани са 331 литературни източника, четири от тях на български автори, а останалите – на чуждестранни. Над 60% от разглежданата литература е от последните десет години, а част от източниците са от 2017 г. и съдържат компетентно обсъждане на най-новите данни за имуномодулиращите ефекти и адхезивните свойства на бактерии в състава на пробиотични препарати.

Литературният обзор е подробен и логично структуриран. Разглежда основните характеристики на млечнокиселите бактерии (МКБ) – таксономична, морфологична и биохимична, като подробно са описани родовете и видовете, които по-късно ще бъдат изследвани. Дефинирани са понятията пробиотик, пребиотик и синбиотик, изброени са критериите, на които трябва да отговарят щамовете с претенции за пробиотично действие, описани са и повлияваните здравни проблеми. Направен е преглед на индустриално значимите щамове, включени в промишлените производства на пробиотици. Представени са интересни и информативни схеми на нивата на взаимодействието на ендогенната микрофлора с гостоприемника и механизмите на действие на пробиотичните щамове – укрепването на чревната бариера и модулиране на

имунната система. Докторантът обобщава компетентно и уверено сложните и противоречиви данни за механизмите на адхезия на МКБ. Направен е преглед на синтеза на биологично-активни пептиди, тяхната аминокиселинна последователност и активност, като по-подробно са разгледани имуномодулиращите ефекти – способност за повлияване на имунните сигнали и имунния отговор, алергичните реакции и смущенията в ГИТ. Литературният обзор завършва с изводи, които ясно очертават необходимостта от последващите научни цели и задачи.

Целта на работата е формулирана точно и ясно. Фокусът на подбор на щамове е с цел разработване на комбиниран препарат, който да съдържа пробиотични щамове с повишена способност за адхезия и с доказано имунорегулаторно действие. Поставените задачи изчерпателно показват пътя за постигане на поставената цел, от идентифицирането на щамове, до разработването на технология за производство на синбиотик.

Разделът „Материали и методи“ включва описание на използваните колекционни щамове и всички процедури по идентификация, характеристика и изследване на новоизолираните щамове и техните свойства. Освен култивирането на бактерии, са описани и методите за поддържане и анализ на епителни, моноцитна човешка и спленоцитна клетъчни линии. Присъстват и подробни протоколи за генетичните методи за анализ – видовоспецифичен PCR, пулсова електрофореза и др., както и за методите за оценка на адхезия и анализа на молекулните механизми за това явление. Описани са подходите за оценка на индукцията на цитокини. Тъй като темата е интердисциплинарна, в тази глава присъстват микробиологични, генетични, имунологични и методи и подходи, статистически анализи и технологична част.

Раздел „Резултати и обсъждане“ обхваща няколко глави.

Първата дава доказателства за идентификацията на колекцията от щамове чрез родово- и видовоспецифичен PCR, ARDRA и пулсова електрофореза. Достоянство на работата е въвеждането на безкултивационен метод за оценка на бактериалните групи в човешката микробиота.

Втората глава разглежда изследване на адхезионните свойства на МКБ към чревен епител. Идентифицирани механизмите на адхезия при различните

щамове. На молекулно ниво е доказано наличието на повърхностно-протеинови адхезивни фактори и тяхната генна експресия.

Третата и най-съществена част от работата е посветена на изучаване на антивъзпалителните свойства на МКБ и изследването на цитоксичния и хуморалния имуномодулиращи ефекти. Ясно е формулирано на какви условия трябва да отговарят щамове с претенции за пробиотици: присъствието им да води до повишаване на стойностите на регулаторните цитокини IL10 и TNF- β и до намаляване на стойностите на провъзпалителните цитокини IL8, IL6 и TNF- α .

В резултат на експериментите са селектирани четири щама с оптимален антиинфламаторен профил. Направен е и пълен скрининг на колекцията за щамове, способни да повлияват клетъчно-медиерания имуноен отговор, напр. да водят до повишена синтеза на INF4 и INF γ . Такива щамове са рядкост. Прилагането им има антитуморен ефект, а също би допринесло за повишена устойчивост на консуматора на вирусни инфекции. Чрез новоразработен подход е доказано, че два щама – *Lb. helveticus* DS012 и *Lb. bulgaricus* KM181, са способни да синтезират имуномодулиращи пептиди, които индуцират продукцията на INF γ и INF4.

Като заключително изследване е проведен клиничен експеримент за изследване на нивата на цитокините и INF γ на доброволци, консумирали ежедневно, в продължение на 30 дни пробиотичен щам *L. gasseri*. Ин виво, нивата на INF4 не се оказват така надеждно повишени, както ин витро, но тези на INF8 и INF10 са по-ниски от очакваното, което е много позитивен резултат.

В последния етап от работата е предложена завършена технологична схема за лиофилизиране на синбиотични комбинации с имуномодулиращо действие, с готова блок-схема, позволяваща промишлено производство. Оптимизирани са условията на ферментация за получаване на голямо количество биомаса от избрани пробиотични щамове, режимът на лиофилизация и съставът на сместа за капсуловане на готовия препарат, като са разработени две различни комбинации от щамове, съдържащи *L. gasseri*, *L. plantarum*, *L. bulgaricus*, *Str. thermophilus* и *B. longum*.

Прави впечатление прекрасния доказателствен материал – фигурите и много от снимките са цветни и с много добро качество.

Раздел „Изводи и приноси“ изтъква седем извода и десет приноса, четири научни и шест научно-приложни.

Постиженията на работата са свързани с:

- (1) доказването на вероятният механизъм за адхезията на два щамове лактобацили чрез модерни молекулярни подходи,
- (2) селекцията на щамове с имуномодулиращо действие,
- (3) разработване на методика за изолиране и пречистване на нискомолекулни пептиди с имунорегулаторно действие,
- (4) създаване на подход за безкултивационно определяне на бактериални групи в човешкия ГИТ.

Като цяло, дисертационният труд представлява завършено изследване със значителни приноси в научен и приложен план. Доказателственият материал е с много добро качество и разкрива дисертантката като утвърден млад изследовател, който е усвоил сложни методики в различни научни области и има критичен поглед върху експерименталните данни.

Въпрос: Могат ли създадените в хода на тази дисертация комбинации от пробиотични бактериални щамове да бъдат приложени като част от състава на хранителни продукти – например пробиотично кисело мляко, кисело-млечни напитки или сирена? Необходима ли е добавка на типични производствени щамове за постигане на такава цел?

В заключение считам, че по актуалност, обем на изследванията и постигнати научни резултати, дисертационният труд е значимо и завършено научно изследване, което напълно отговаря на изискванията за присъждане на научната и образователна степен „Доктор“. С работата са свързани 4 научни публикации, една от тях е с импакт фактор, а h-индекса на докторантката е 2. Като давам изцяло положителната си оценка, препоръчвам на членовете на Научното Жури да присъдят на Ирина Готова Научната и образователна степен „Доктор“.

20.05. 2019 г.

(доц. д-р П. Петрова)