



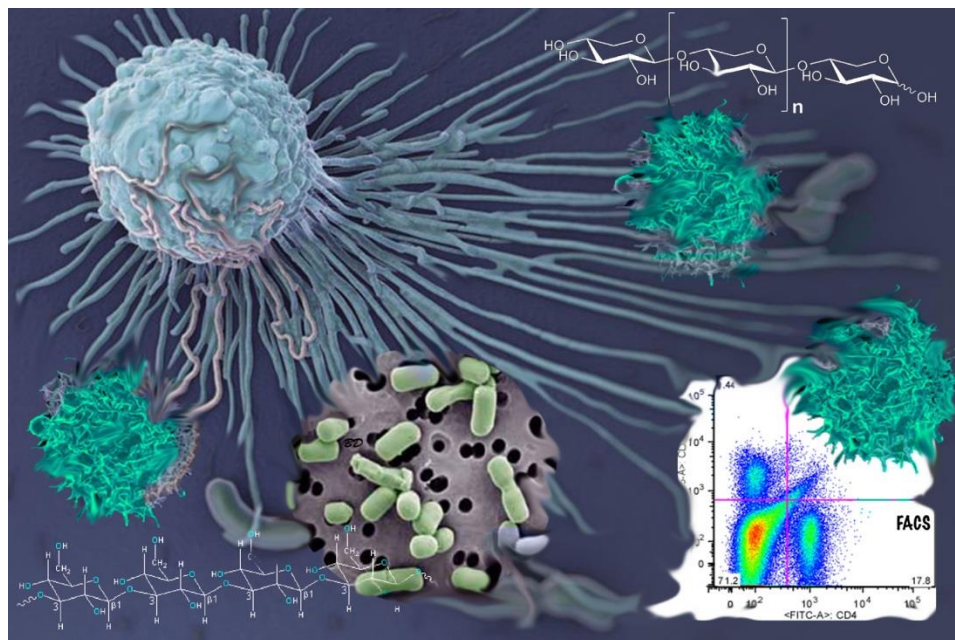
Павлина Яворова Средкова

**ИМУНОМОДУЛАТОРНИ СВОЙСТВА НА
ПРОБИОТИЦИ И ПРЕБИОТИЦИ**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертационен труд
за присъждане на образователната и научна степен «доктор»

област на висше образование: **4. Природни науки, математика и информатика,**
професионално направление: **4.3 Биологически науки**
научна специалност: **Клетъчна биология**



Научен ръководител:
проф. д-р Балик Маломиров Джамбазов

Пловдив, 2017 г.



ПЛОВДИВСКИ УНИВЕРСИТЕТ «ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ»

БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ

Катедра «Биология на развитието»



Павлина Яворова Средкова

**ИМУНОМОДУЛАТОРНИ СВОЙСТВА НА
ПРОБИОТИЦИ И ПРЕБИОТИЦИ**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертационен труд
за присъждане на образователната и научна степен «доктор»

област на висше образование: **4. Природни науки, математика и информатика,**
професионално направление: **4.3 Биологически науки**
научна специалност: **Клетъчна биология**

Научен ръководител:
проф. д-р Балик Маломиров Джамбазов

Пловдив, 2017 г.

Дисертационният труд съдържа 103 страници, 2 таблици, 30 фигури и 212 литературни източника.

Експериментите, включени в настоящия дисертационен труд са проведени в лабораторията по Клетъчна биология към катедра «Биология на развитието», Биологически факултет на ПУ «Паисий Хилендарски» и в секция Medical Inflammation Research към Каролински институт, Стокхолм, Швеция.

Дисертационният труд е обсъден и предложен за защита на разширен катедрен съвет на катедра „Биология на развитието“ при Биологически факултет на ПУ „П. Хилендарски“ проведен на 20.09.2017 г.

Откритото заключително заседание на научното жури ще се състои на 11.12.2017 г. от 11:00 часа в 15 аудитория на Биологически факултет (гр. Пловдив ул. Тодор Самодумов № 2, Стария град).

Материалите по защитата са предоставени за свободен достъп на интересуващите се в библиотеката на ПУ „Паисий Хилендарски“.

Научно жури:

проф. д-р Василий Щерев Ишев, дм
проф. дбн Искра Витанова Иванова
проф. д-р Вяра Николаева Иванова
доц. д-р Соня Костадинова Трифонова
проф. д-р Балик Маломиров Джамбазов

Автор: Павлина Яворова Средкова

Заглавие: Имуномодулаторни свойства на пробиотици и пребиотици

Университетско издателство „Паисий Хилендарски“, 2017 г.

1. Въведение

Човешкото тяло съдържа голям брой бактерии и други микроорганизми (археи, гъби и вируси), които формират т. нар. микрофлора (микробиота). Микроорганизмите, които обитават кожата и лигавиците на здрави нормални хора формират „нормалната микробиота“ на организма. Геномите на тези микросимбионти колективно се дефинират като „микробиом“. Съвременните изследвания показват, че нормалната микробиота осигурява първа линия на защита срещу различни патогени, подпомага разграждането на редица вещества в организма, играе роля в деградацията на токсините и допринася за узряването на имунната система.

От големия брой предполагаеми функции и полезни ефекти, които различните микроорганизми изпълняват в човешкото тяло, засега само една малка част от тях са изследвани. Например, известно е, че нормалната човешка микробиота:

- предотвратява колонизацията от патогени, като се конкурират с тях за местата за свързване и за основните хранителни вещества;
- елиминира конкурентите и чуждите бактерии чрез производството на вещества, вариращи от относително неспецифични мастни киселини и пероксиди до високо специфични бактериоцини;
- извършва ферментация и абсорбция на въглехидрати, което позволява на гостоприемника да използва някои нормално неразградими въглехидрати;
- синтезира и отделя витамини в излишък от собствените си нужди, които могат да бъдат абсорбирани като хранителни вещества от техния гостоприемник (напр. редица чревни бактерии отделят витамин К и витамин В12, а млечнокиселите бактерии произвеждат някои витамини В-групата);
- осигурява непрекъснат и динамичен ефект върху червата и имунната система на гостоприемника;
- стимулира развитието на определени тъкани.

От друга страна, редица изследвания доказват, че микробиотата може да повлияе на множество заболявания, включително цъолиакия, колит, недोхранване, затлъстяване, вагиноза, астма, диабет, рак, алергии, сърдечно-съдови заболявания, множествена склероза, аутизъм и др. На този етап не се знае дали дисбиозата (дисбалансът) в популациите от микроорганизми е причина или ефект от всяка отделна болест. Известно е обаче, че изкуственото манипулиране на микробиотата с цел възстановяване на баланса от микроорганизми може да доведе до разработването на нови методи за лечение на много заболявания.

През последните години като основно средство за манипулиране на чревната микрофлора се използват различни видове диети. Смята се, че благоприятните промени в чревната микрофлора се дължат на увеличения брой бактерии от родовете *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* известни като „пробиотици“. Интересът към тези микроорганизми се засилва още повече от факта, че те могат да метаболизират определени въглехидрати (пребиотици), които на практика са неразградими за еукариотните клетки и остават неусвоени в човешкия организъм. Предполага се, че пребиотиците имат няколко благоприятни ефекти, включително насърчаване растежа на бактериите, стимулиране на чревната перисталтика, производство на къси верижни мастни киселини и съкратено време за преминаване през чревния тракт. За да бъдат класифицирани като пребиотици, въглехидратите трябва да отговарят на определени критерии – устойчивост на стомашна киселинност, устойчивост на хидролиза от ензими на бозайници, устойчивост на стомашно-чревна абсорбция, ферментация от чревна микрофлора; селективно стимулиране на растежа и/или активността на тези чревни бактерии, които допринасят за здравето и благополучието на гостоприемника.

В крайна сметка се оказва, че структурата на микробиотата, различните пребиотици и комбинациите между тях имат различни имуномодулаторни активности и ефекти върху гостоприемника. Имайки предвид всички тези особености на пробиотиците, пребиотиците и тяхното влияние върху имунния отговор на организма, изучаването на имуномодулаторните им свойства е от изключително значение за здравето на човека и за борбата с редица заболявания. Настоящата дисертация има принос именно към изясняване на имуномодулаторните свойства на някои пробиотици и пребиотици.

2. Литературен обзор

Литературният обзор включва следните основни раздели:

- 2.1. Микрофлора на гастроинтестиналния тракт
- 2.2. Бактериална ферментация и метаболизъм в гастроинтестиналния тракт
- 2.3. Мукозно-епителна бариера на гастроинтестиналния тракт
- 2.4. Пробиотици
- 2.5. Пребиотици
- 2.6. Синбиотици
- 2.7. Механизми на действие на пробиотиците
- 2.8. Имуномодулаторни свойства на пробиотиците и пребиотиците
- 2.9. Безопасност и потенциални рискове при използване на пробиотици

3. Цел и задачи

Основна **цел** на настоящия дисертационен труд е да се изследва ефекта на различни пребиотици и техните метаболитни продукти върху адхезията на някои пробиотични щамове от род *Lactobacillus* и имуномодулаторните им свойства при нормални физиологични условия и условия на възпаление.

За постигането на поставената цел бяха формулирани следните **задачи**:

- (1) Проучване на съществуващите и най-често използвани пребиотици в експериментални модели и клиничната практика за изучаване и подобряване на имуномодулаторните свойства на пробиотиците;
- (2) Подбор на *in vitro* моделни системи, подходящи за изследване на адхезивните свойства на пробиотични щамове;
- (3) Подбор на *in vivo* модел за изследване на имуномодуляция;
- (4) Изследване на адхезивната способност на пробиотични щамове, култивирани в присъствие на различни пребиотици;
- (5) Анализ на цитокиновия профил при нормално физиологично състояние и състояние на възпаление след стимулиране с метаболитни продукти, получени от култивиране на пробиотици с различни пребиотици;
- (6) Изследване на профила на имунокомпетентните клетки при нормално физиологично състояние и състояние на възпаление след стимулиране с метаболитни продукти, получени от култивиране на пробиотици с различни пребиотици;
- (7) Установяване на механизмите за имуномодуляция чрез пробиотици/ пребиотици.

Тъй като е трудно да се изследва и докаже прякото въздействие на пробиотиците/пребиотиците върху гостоприемника и още повече върху неговата имунна система, **иновативния експериментален подход** в настоящата дисертация е, че се изследва *ex vivo* **директното влияние на метаболитните продукти**, получени от пробиотици култивирани в присъствие на определени пребиотици, **върху имунната функция при нормално и активирано състояние**.

4. Материали и методи

4.1. Бактериални щамове (пробиотици)

Пробиотичните щамове от род *Lactobacillus* са закупени от Националната банка за промишлени микроорганизми и клетъчни култури (НБПМКК) гр. София в лиофилизирана форма и са съхранявани при -20°C до установяване на култури. За изследване на адхезията са използвани щамовете *Lactobacillus acidophilus* (NBIMCC 11), *Lactobacillus rhamnosus* (*L. casei* subsp. *rhamnosus*, NBIMCC 1010), *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (NBIMCC 8458), а за имуномодулаторните свойства – два щам на вида *Lactobacillus brevis*: щам NBIMCC 3448 и щам NBIMCC 8429.

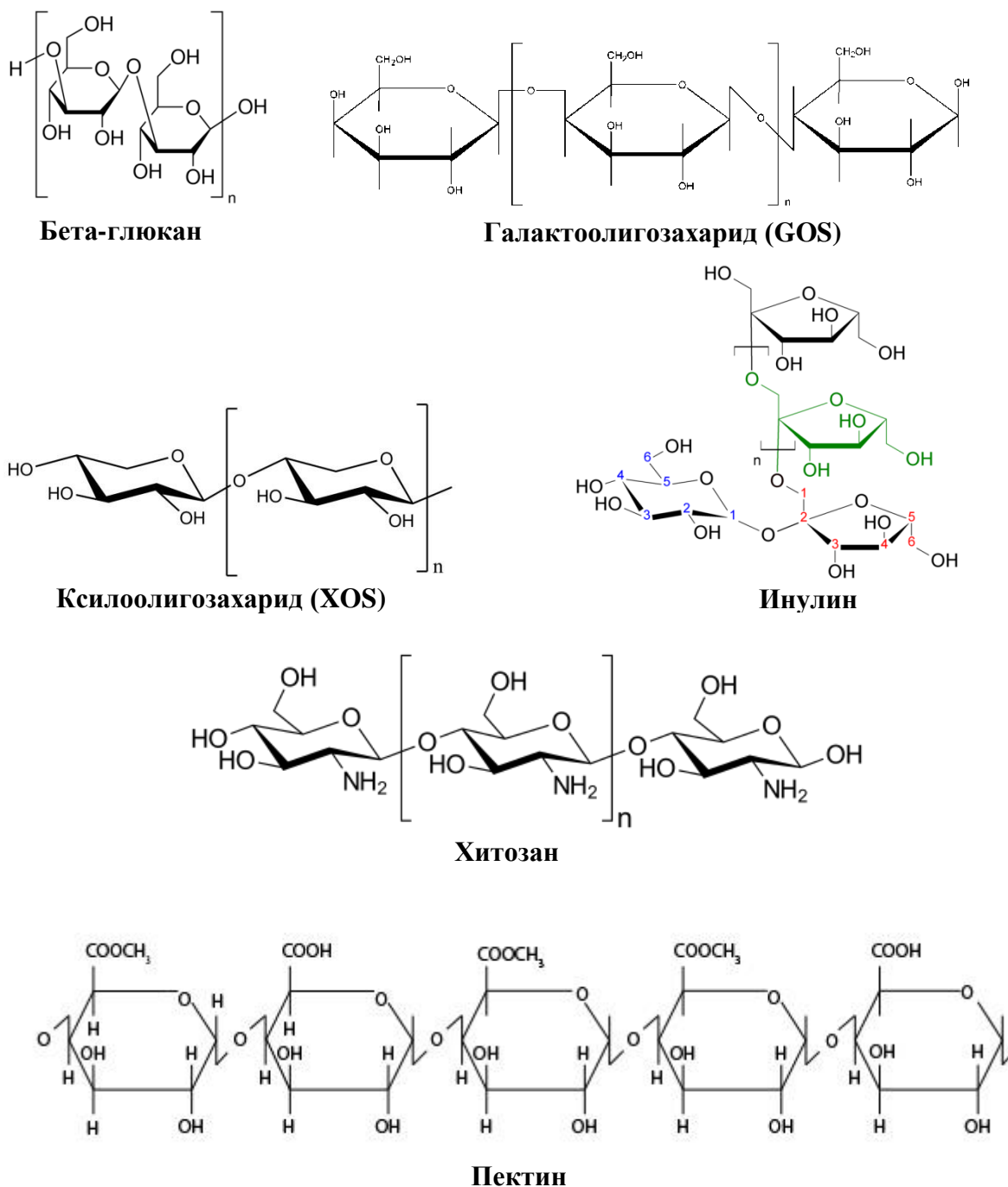
Всички щамове са култивирани в MRS бульон при 37°C в продължение на 18-20 часа и след това субкултивирани два пъти преди третирането с пребиотици. Микроорганизмовите култури от млечнокисели бактерии са съхранявани при -80°C в MRS бульон, съдържащ 20% глицерол.

4.2. Пребиотици

В експериментите са използвани следните пребиотици (Фигура 1): ечемичен бета-глюкан (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, САЩ), галактоолигозахарид (Techno Food Ingredients Co., Ltd., Guangzhou, Китай), ксилоолигозахарид (Shandong Longlive Bio-Technology, Shandong, Китай), инулин (Naya Labs, Washington D.C., САЩ), хитозан 1000 (Equilibra, Torino, Италия), ябълков пектин (Sigma-Aldrich). Всички пребиотични вещества са разтворени в стерилна хранителна среда DMEM без антибиотици и серум. Прахообразният комплекс „хитозан 1000/хромов хлорид“ е разтворен в стерилна хранителна среда DMEM, съдържаща 0.1M оцетна киселина, за да се получи основен разтвор от 50 mg/mL. Пребиотичните разтвори са съхранявани при 4°C до тяхното използване.

4.3. Клетъчни линии и условия на култивиране

За изследване на адхезивните способности на пробиотичните бактериални щамове са използвани три клетъчни линии от човешки аденокарцином на дебелото черво закупени от Европейската колекция за автентични клетъчни култури (ECACC, Salisbury, Великобритания): Caco-2 (ECACC 86010202, клетъчна линия, изолирана от първичен тумор на дебелото черво), HT-29 (ECACC 91072201, клетъчна линия, изолирана от първичен колоректален тумор) и LS 180 (ECACC 87021202, муцин-секретиращи клетки, получени от аденокарцином на дебелото черво Dukes тип B (McCool et al., 1994).



Фигура 1. Структурни формули на използваните пребиотици.

Всички клетъчни линии са култивирани в хранителна среда DMEM, допълнена с 10% топлинно-инактивиран фетален говежди серум (FBS) и антибиотици от 100 U/ml пеницилин и 100 µg/ml стрептомицин (Sigma-Aldrich, Германия). Клетъчните линии са култивирани първоначално в матрочета от 25 cm² (TPP, Швейцария) при 37°C, 5% CO₂, 95% атмосферен въздух и висока влажност. При достигне 70-80% конfluентност на монослоя, клетките са трипсинизирани с 0.25% разтвор на трипсин/0.53 mM EDTA и прехвърлени в по-големи матрочета (75 cm²) за намножаване.

4.4. Култивиране на пробиотици с различни пребиотици

Културите от различните пробиотични щамове *Lactobacillus* в експоненциална фаза на растеж са центрофугирани при 4000 rpm/min за 15 минути при 4°C. След отстраняване на MRS супернатанта, бактериалните клетки са ресуспендирани в DMEM без антибиотици и FBS.

За нуждите на тестовете за адхезия, бактериалните клетки от всеки щам бяха разделени в 7 епруветки, за да се установят няколко култури от всеки пробиотичен щам (*L. rhamnosus* 1010, *L. acidophilus* 11, *L. paracasei* 8458). Към шест от епруветките за всеки щам са добавяни поотделно различни пребиотици (бета-глюкан, галактоолигозахарид, ксилоолигозахарид, инулин, хитозан и пектин), а седмата епруветка се запазва като контролна култура без пребиотици, и към нея се добавя еквивалентно количество хранителна среда. Пребиотичният разтвор беше добавен към съответните щамове на *Lactobacillus* в крайна концентрация от 15 mg/ml. Пробиотичните щамове заедно с добавените пребиотици се култивират статично в продължение на 18 часа при 37°C. В края на инкубационния период, бактериалната концентрация във всички култури (включително и контролните) е определена чрез измерване на оптичната плътност при 600 nm и изчислената концентрация е проверена чрез броене на клетките в камера на Bürker. Преди инокулиране и ко-култивиране с конфлуентни Caco-2, HT-29 и LS 180 клетки, бактериалните култури се разреждат, за да се достигне приблизителна концентрация от 1×10^8 бактерии/ml.

За нуждите на *ex vivo* тестовете за имуномодулация, по аналогичен начин, клетките от двата щамове на *Lactobacillus brevis* (NBIMCC 3448 и NBIMCC 8429) бяха разделени в отделни културални съдове, към които бяха добавени 15 mg/ml пребиотици (ксилоолигозахарид, инулин, пектин или хитозан) или само DMEM за контролните култури и култивирани за 18 часа при 37°C без разклащане. В края на инкубационния период, бактериалните култури се центрофугират в продължение на 15 минути при 4000 rpm/min. След това, супернатантите без клетки са стерилизирани чрез Minisart® NY25 0.2 µm полиамидни филтри (Sartorius Lab Instruments, Goettingen, Германия). Стерилните супернатанти от отделните щамове са съхранявани при -20°C преди провеждането на *ex vivo* експериментите.

4.5. Анализ на адхезивната способност на пробиотиците

След оценка на жизнеспособността на клетъчните линии Caco-2, HT-29 и LS 180 с трипаново синьо, клетките са залагани в 12-ямкови плаки с гъстота 5×10^4 клетки/ямка и са култивирани при стандартни условия, описани по-горе. Когато клетъчните култури достигнат 70% конфлуентност, хранителната среда се подменя всеки ден за период от 7 до 10 дни. 48 часа преди провеждането на теста за адхезия, към HT-29 клетките се добавя 2 mM натриев бутират, за да се индуцира клетъчна диференциация.

Анализът за адхезия е проведен съгласно метода, описан от Duary et al. с леки модификации (Duary et al., 2011). Един час преди прибавянето на пробиотиците, хранителната среда се отстранява и клетъчните монослоеви се промиват с D-PBS, след което се добавя 1 ml DMEM без антибиотици и FBS. Към ямките с Caco-2, HT-29 и LS 180 клетки се прибавят съответните пробиотични щамове (третираны с пребиотици или

контролни) в концентрация 4×10^6 бактерии/ml. Плаките се инкубират за 1 час при 37°C , 5% CO_2 и висока влажност. В края на инкубационния период, клетъчните монослое се промиват пет пъти с D-PBS, за да се отстранят несвързаните бактерии. След това, клетките се отделят от плаките, чрез инкубиране с разтвор на трипсин/EDTA при стайна температура в продължение на 10-15 минути. За да се освободят прикрепените млечнокисели бактерии от клетките, клетките се лизират с 0.9% Triton X100, разтворен в PBS. Получените лизати, съдържащи клетъчно асоциирани бактерии се разреждат серийно в D-PBS и се посяват върху MRS агар (2%). Плаките се инкубират за 24-48 часа при 37°C и образуваните колонии (B1, CFU/ml) се изброяват. Адхезията се изразява като процент от възстановените жизнеспособни бактерии в сравнение с първоначалната популация (B0, CFU/ml), добавена към клетъчните монослое. Процентът на адхезия е изчислен чрез използване на следната формула:

Адхезия (%) = $(B1/B0) \times 100$. Всички адхезионни тестове са заложи и анализирани с три повторения.

4.6. *Ex vivo* изследване на имуномодулаторните свойства на пробиотици

За изследване на имуномодулаторните свойства на селектираните пробиотици/ пребиотици при нормални физиологични условия и условия на възпаление, беше избран миши модел на колаген индуциран артрит (CIA), тъй като при този модел 1) се активира както хуморалния, така и Т-клетъчния имуен отговор, 2) имунния отговор не зависи пряко от чревната микрофлора и 3) има публикувани материали за благотворното влияние на определени пробиотици върху пациенти с ревматоиден артрит или върху животински модели за ревматоиден артрит.

Използваните DBA/1 мишки (общо 8 мъжки, на възраст 8 седмици, 19-22 g). Мишките са отглеждани при стерилни контролирани условия на средата и цикъл от 12/12 часа (светло/тъмно) в полистиренови клетки съдържащи дървени стърготини. Животните са хранени със стандартна храна за гризачи и вода *ad libitum*.

За предизвикване на CIA, четири мишки са инжектирани подкожно в основата на опашката със 100 μg говежди СII, емулгиран 1:1 в CFA (Difco Laboratories, Detroit, MI, САЩ) в общ обем от 100 μl . Другите четири мишки (контролна група) са инжектирани със 100 μl стерилен DPBS. Четиринадесет дни по-късно мишките са умъртвени, като са взети лимфните възли и слезката, за да се изследва *ex vivo* производството на цитокини и клетъчния имуен фенотип. Пригответената суспензия от клетки на лимфните възли (LNC) е филтрувана през 40 μm филтър (FALCON®, Becton Dickinson, Le Pont De Claix, Франция). Получената суспензия от единични клетки е промита два пъти с DPBS. Слезките са хомогенизирани и червените кръвни клетки лизирани с 0.84% разтвор на амониев хлорид (pH 7.4). След филтруване през 40 μm клетъчен филтър, клетките се колекционирани чрез центрофугиране и промити два пъти с DMEM без серум. Изолираните LNC и спленоцити от четирите СII-имунизирани мишки се смесват заедно в обща суспензия. Същото е направено с клетките от неимунизирани (контролни) мишки. Пригответените две групи клетки, активирани (при условия на възпаление в резултат на CIA) и контролни (при нормални физиологични условия), са използвани по-нататък при *ex vivo* тестовете.

Всички процедури с мишките са извършени съгласно Нормативната уредба на Европейския съюз за опити с животни и са одобрени от Етичната комисия за експерименти с животни.

4.7. *Ex vivo* стимулиране

Приготвените клетки са заложени в 96-ямкови с концентрация 1×10^6 клетки/mL и стимулирани отново с 50 $\mu\text{g/mL}$ говежди СII в хранителна среда DMEM, допълнена с 10% топлинно инактивиран FCS, 100 U/mL пеницилин и 100 $\mu\text{g/ml}$ стрептомицин. Клетките са култивирани при 37°C в инкубатор с 5% CO₂ при висока влага за 48 часа в присъствието на 20% метаболитни продукти (супернатанти от пробиотичните щамове, култивирани с различни пребиотични добавки). Към контролните проби е добавена само хранителна среда DMEM. Всички проби са заложени в три повторения. В края на инкубационния период, супернатантите са колекционирани за анализ на продуцираните цитокини и замразени при -20°C до тяхната употреба. Клетките са анализирани незабавно чрез FACS.

4.8. Ензимно-свързан имуносорбентен метод (ELISA) за анализ на цитокини

Нивата на цитокините IFN- γ , IL-6, IL-17A, TNF- α и IL-10 в супернатантите, колекционирани след *ex vivo* стимулиране, бяха измерени, чрез използване на ELISA-ките от R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN, САЩ) съгласно препоръките на производителя. Абсорбцията е измерена при 450 nm с помощта на ELISA-спектрофотометър ELx800™ (BioTek, Winooski, VT, САЩ), а концентрациите на цитокините са изчислени съгласно стандартните криви от стойностите на рекомбинантните цитокини.

4.9. Флоуцитометричен анализ (FACS)

В края на *ex vivo* стимулирането, клетките са оцветени, чрез използване на 10-цветен панел от флуорохром-белязани антители, насочени към различни миши повърхностно-клетъчни маркери, включително CD3, CD4, CD8, CD11b, CD19, CD25, CD45, CD279(PD-1), MHCII и LIVE/DEAD (BD Biosciences, San Jose, CA, САЩ). Флоуцитометричният анализ е извършен съгласно стандартни настройки на флоуцитометър LSR II (BD Biosciences). Фрагментите и мъртвите клетки бяха изключени от анализа, чрез общи процедури за избор на популация (гейтване). Данните от флоуцитометрията бяха анализирани, чрез софтуер FlowJo (FlowJo LLC, САЩ).

4.10. Статистически анализ

Резултатите са представени, като средни стойности \pm стандартно отклонение (SD). За да се сравнят непараметричните данни за статистическа значимост, е приложен теста Mann-Whitney U или теста Kruskal-Wallis, използвайки програмата StatView (SAS Institute). Стойности на P < 0.05 се считат за значими. Всички резултати са сравнени спрямо тези от контролите.

5. Резултати

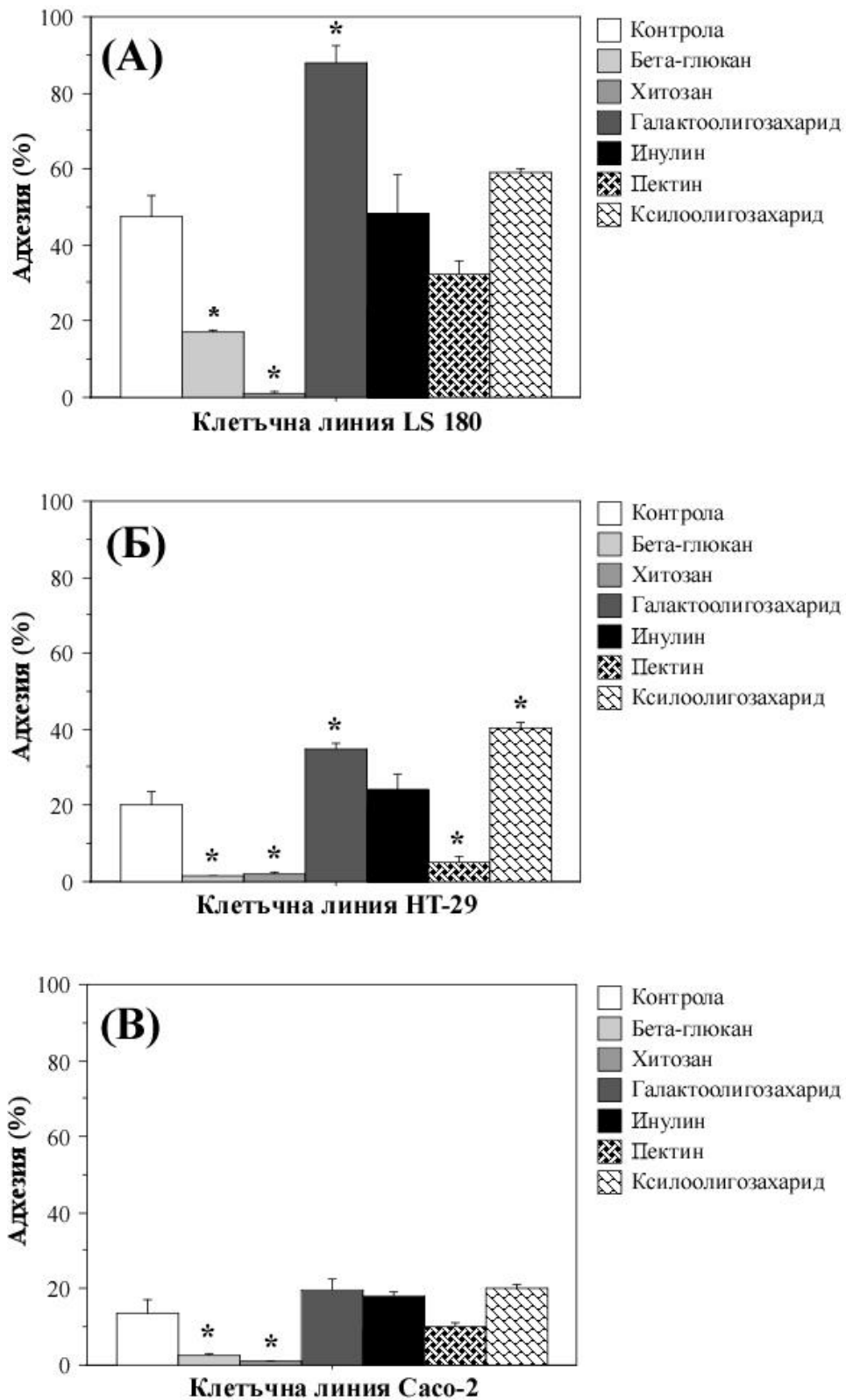
5.1. Адхезивни свойства на пробиотични щамове от род *Lactobacillus*, култивирани в присъствие на различни пребиотици

За изследване на адхезивната способност, пробиотичните щамове *Lactobacillus rhamnosus* 1010, *Lactobacillus paracasei* 8458 и *Lactobacillus acidophilus* 11 са култивирани в хранителна среда, съдържаща специфични пребиотици (инулин, бета-глюкан, галактоолигозахарид, ксилоолигозахарид, пектин, хитозан) в продължение на 18 часа при 37°C, 5% CO₂ и висока влажност в инкубатор за клетъчни култури. Контролните култури за трите щамове млечнокисели бактерии са култивирани в същата хранителна среда без пребиотик при същите условия и времеви период.

Анализът на адхезивната способност е проведен чрез използване на три различни клетъчни линии, изолирани от дебело черво на човек – LS 180, HT-29 и Caco-2. Изчислените проценти на адхезия за пробиотичния щам *Lactobacillus rhamnosus* 1010 са показани на Фигура 2. Резултатите демонстрират значително намалена способност за свързване на *L. rhamnosus* 1010 към трите чревни клетъчни линии след култивиране с бета-глюкан и хитозан. Инкубирането на млечнокиселите бактерии с ксилоолигозахариди и галактоолигозахариди засилва техните адхезивни свойства спрямо HT-29 клетките и LS 180 клетките (само в присъствие на галактоолигозахариди) като се отчита статистически значима разлика в сравнение с нетретираните контролни култури (Фигура 2А и 2Б). За инкубираните с инулин *L. rhamnosus* 1010 бактерии, беше отчетена умерена тенденция за повишена адхезия (Фигура 2Б и 2В). Инкубирането с пектин като цяло намалява адхезивните свойства на *L. rhamnosus* 1010, въпреки, че статистическа значимост е отчетена само за клетъчна линия HT-29 (Фигура 2).

Като обобщение можем да заключим, че култивирането на пробиотичния щам *Lactobacillus rhamnosus* 1010 в хранителна среда, съдържаща бета-глюкан, хитозан или пектин води до намаляване на неговите адхезивни способности спрямо чревните клетки от дебелото черво, докато култивирането на същия щам в присъствие на галактоолигозахариди или ксилоолигозахариди засилва адхезивните му качества. Липсата на влияние върху способността за прикрепване при добавка от инулин сравнено с контролната култура показва, че инулина най-вероятно не се усвоява от *Lactobacillus rhamnosus* 1010 или получените метаболити на повлияват адхезията.

За установяването на тази хипотеза са необходими допълнителни тестове, детектиращи начална и крайна концентрация на добавения инулин или концентрацията на получените метаболити от неговото евентуално разграждане от *L. rhamnosus* 1010. Има съобщения, че други щамове на *Lactobacillus rhamnosus* (например *L. rhamnosus* LBA, *L. rhamnosus* GG) успешно метаболизират инулин (Alp Avci et al., 2017; de Souza Oliveira et al., 2012; Roller et al., 2004).



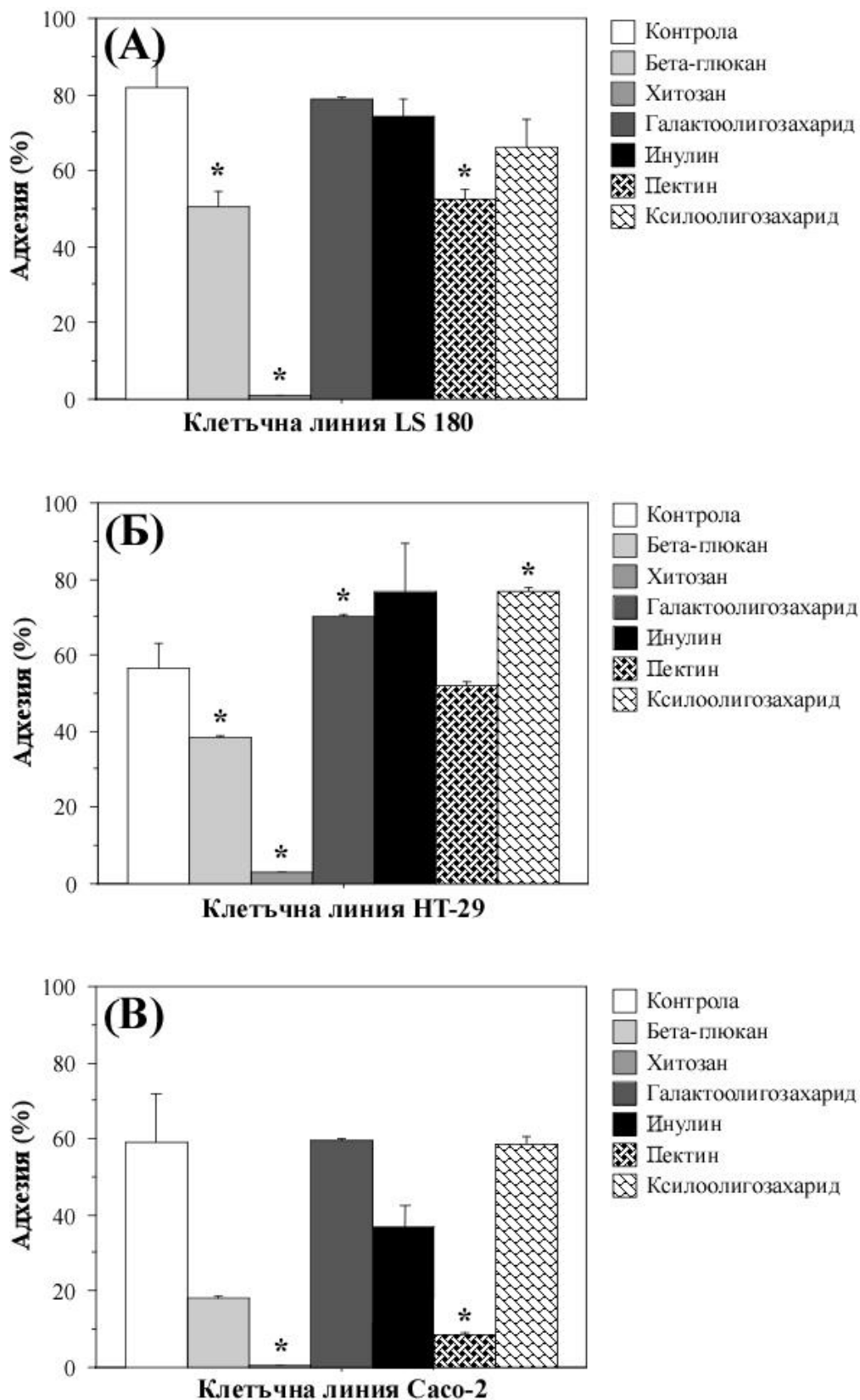
Фигура 2. Адхезия на *Lactobacillus rhamnosus* 1010 към човешки клетки от дебелото черво след култивиране в присъствие на различни пребиотици. Графиките представят процентната адхезия на този щам млечнокисели бактерии към LS 180 клетки (А), HT-29 клетки (Б) и Caco-2 клетки (В). Данните са представени като средни стойности ± средна стандартна грешка. * $p < 0.05$.

Блиски резултати бяха получени от анализа на адхезивната способност на другия изследван пробиотичен щам – *L. acidophilus* 11 (Фигура 3). Отново, както при *L. rhamnosus* 1010, инкубирането с бета-глюкан, хитозан или пектин води до намалена способност за прикрепване на *L. acidophilus* 11 към човешките ентеноцитоподобни клетъчни линии в сравнение с контролната култура (без пребиотици). Ксилоолигозахаридите и галактоолигозахариди значително подобряват адхезията на *L. acidophilus* 11, макар че отчетените стойности имат статистическа значимост спрямо контролната култура само при HT-29 клетките (Фигура 3Б). И тук, присъствието на инулин в хранителната среда не повлиява значително адхезивните качества на *L. acidophilus* 11 (Фигура 3).

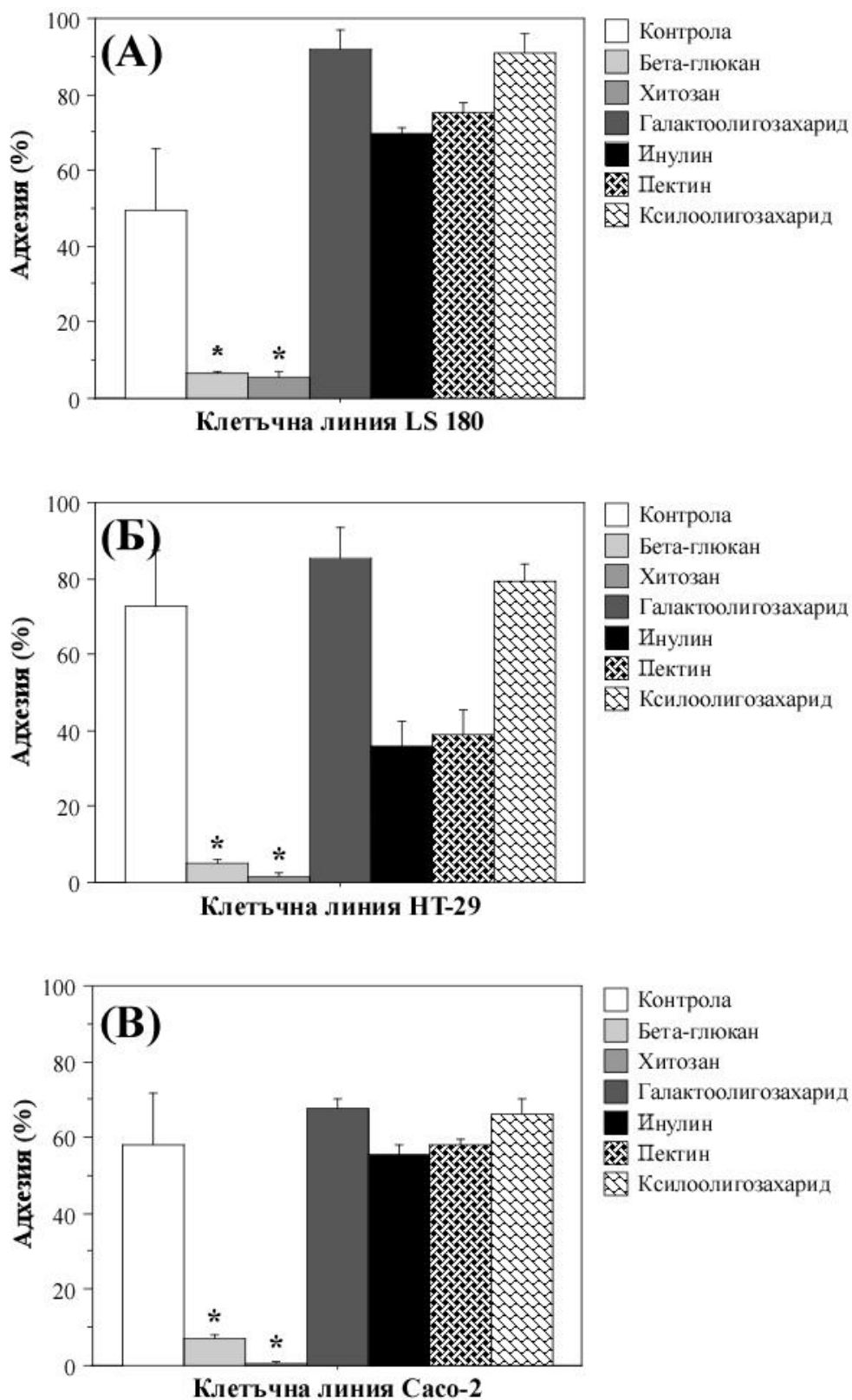
При сравнение на способността за прикрепване на контролните култури (без добавка на пребиотици) от двата пробиотични щама млечнокисели бактерии (*L. rhamnosus* 1010 и *L. acidophilus* 11), става ясно, че *L. acidophilus* 11 притежава по-добри адхезивни качества, тъй като при него процента на адхезия към използваните чревни клетки достига стойности от приблизително 60% (при клетъчни линии Сасо-2 и HT-29) до 80% (при клетъчна линия LS 180) (Фигура 3). При *L. rhamnosus* 1010 тези стойности са от приблизително 20% (при клетъчни линии Сасо-2 и HT-29) до максимум от 50% (при клетъчна линия LS 180) (Фигура 2). Може би донякъде това определя и факта, че при различните изследвания и клинични изпитания на пробиотици за подобряване здравословното състояние на човека, много по-често се използват щамове от *L. acidophilus*.

Ако се направи сравнение към коя чревна клетъчна линия бактериалните щамове се прикрепват най-добре, се вижда, че процента на адхезия и за двата щама е най-висок за клетъчна линия LS 180, следван от този за клетъчна линия HT-29 и най-нисък за Сасо-2 (Фигури 2 и 3). Най-вероятно това е свързано с възможността на LS 180 клетките да продуцират муцин, който улеснява адхезията на бактериалните клетки, в това число и на изследваните пробиотични щамове.

Ефектите от инкубацията с различни пребиотици върху адхезивните свойства на *L. paracasei* 8458 са показани на Фигура 4. Способностите за свързване на този щам към човешките чревни клетки са значително редуцирани след култивиране в хранителна среда, съдържаща бета-глюкан или хитозан (Фигура 4). При добавяне към хранителната среда на галактоолигозахариди или ксилоолигозахариди се наблюдава тенденция за повишена адхезия на *L. paracasei* 8458, докато присъствието на инулин в хранителната среда не показва подчертано изразен ефект (Фигура 4). Интересно е, че добавката от ябълков пектин води до повишена адхезия на бактериалните клетки от този щам към LS 180 клетките и тенденция към по-силен ефект, отколкото този при инкубацията с инулин (Фигура 4А, 4Б, 4В). Тези резултати се различават от данните, получени с другите два вида млечнокисели бактерии, като се демонстрира щам-специфичен ефект на въздействие върху адхезията от страна на ябълковия пектин. Прави впечатление, че контролната култура (без пребиотици) на *L. paracasei* 8458 има приблизително сходна степен на адхезия (50-60%) към трите използвани клетъчни линии (Фигура 4).



Фигура 3. Адхезия на *Lactobacillus acidophilus* 11 към човешки клетки от дебелото черво след култивиране в присъствие на различни пребиотици. Графиките представят процентната адхезия на този шам млечнокисели бактерии към LS 180 клетки (А), HT-29 клетки (Б) и Caco-2 клетки (В). Данните са представени като средни стойности \pm средна стандартна грешка. * $p < 0.05$.



Фигура 4. Адхезия на *Lactobacillus paracasei* 8458 към човешки клетки от дебелото черво след култивиране в присъствие на различни пребиотици. Графиките представят процентната адхезия на този щам млечнокисели бактерии към LS 180 клетки (А), HT-29 клетки (Б) и Caco-2 клетки (В). Данните са представени като средни стойности ± средна стандартна грешка. * $p < 0.05$.

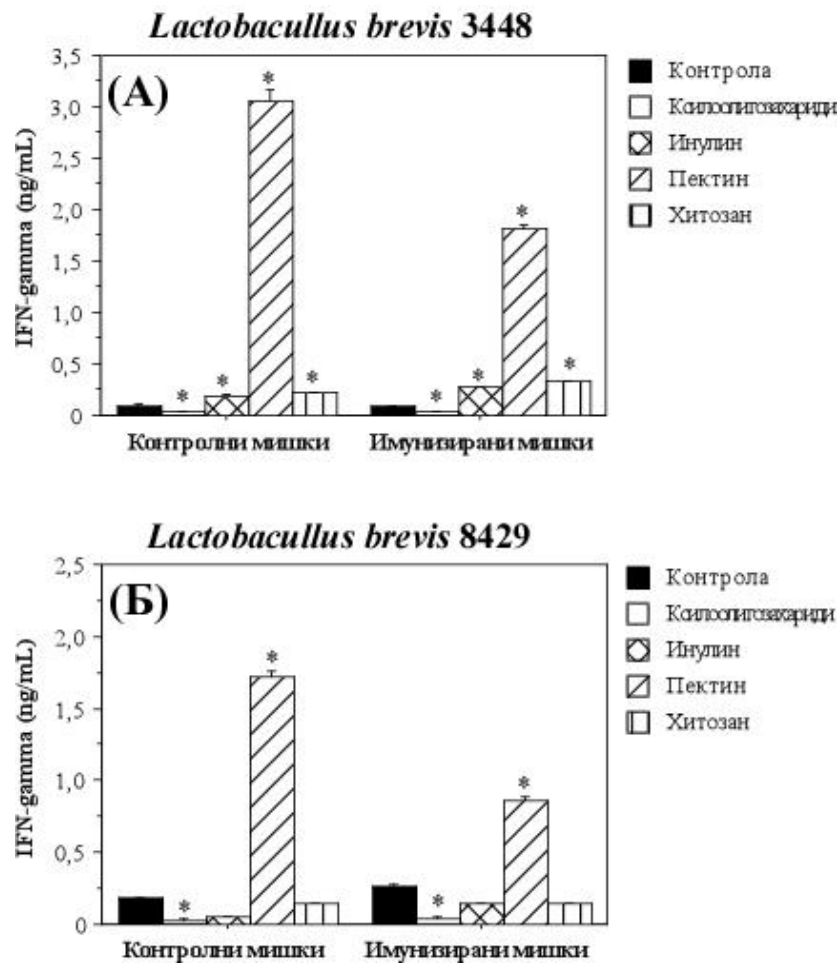
Сравнявайки процентите на адхезия на всеки изследван щам (*Lactobacillus rhamnosus* 1010, *Lactobacillus acidophilus* 11 и *Lactobacillus paracasei* 8458) към трите използвани човешки чревни клетъчни линии (LS 180, HT-29 и Caco-2) е очевидно, че най-високите нива на свързване на *L. rhamnosus* 1010 и *L. acidophilus* 11 са постигнати с клетъчна линия LS 180. Адхезията на тези бактериални щамове към клетъчните линии HT-29 и Caco-2 е по-ниска, особено към Caco-2 клетките. От друга страна, контролната култура на *L. paracasei* 8458 и културите, инкубирани с галактоолигозахариди, ксилоолигозахариди, пектин и инулин, показаха висок процент на адхезия към Caco-2 клетките. Най-високите нива на адхезия на *L. paracasei* 8458 са детектирани спрямо HT-29 клетките (при контролата, както и при наличие на галактоолигозахариди или ксилоолигозахариди) и LS 180 клетките (за контролата и при добавките от инулин, пектин, ксилоолигозахариди и галактоолигозахариди). Както вече беше споменато, по-високата адхезивна способност на изследваните пробиотични щамове към HT-29 и LS 180 клетките може да бъде обяснена с продукцията на муцин от тези клетъчни линии, което е установено както за LS 180 клетките (McCool et al., 1994), така и за HT-29 клетки, третиран с натриев бутират (Velcich et al., 1995).

5.2. Имуномодулаторни свойства на пробиотични щамове от род *Lactobacillus*, култивирани в присъствие на различни пребиотици

В настоящия дисертационен труд са изследвани имуномодулаторните свойства на метаболитните продукти от два пробиотични щама на *Lactobacillus brevis* (*L. brevis* 3448 и *L. brevis* 8429), получени след инкубирането им с четири различни пребиотици (ксилоолигозахариди, инулин, пектин и хитозан). Анализирани са *ex vivo* промените в нивата на определени цитокини (IFN- γ , IL-6, IL-17A, TNF- α and IL-10), както и профила на имунните клетки (тяхното процентно представяне). Проведените експерименти бяха организирани така, че да може да се оцени дали метаболитните продукти от два щама (*L. brevis* 3448 и *L. brevis* 8429) на един и същ вид (*Lactobacillus brevis*), култивирани с четири различни пребиотици като енергийни източници, дават подобни имуномодулаторни ефекти при нормални физиологични условия и условия на възпаление. За получаване на максимално естествени „нормални физиологични условия“ и „условия на възпаление“ беше използван миши модел за ревматоиден артрит – колаген-индуциран артрит (CIA).

Както е показано на Фигура 5А, продукцията на IFN- γ беше значително намалена и при двата случая (контролни и имунизирани мишки), когато мишите клетки бяха ко-култивирани с метаболитни продукти, получени от *L. brevis* 3448 и ксилоолигозахариди в сравнение с култивирането на изследвания щам само в хранителна среда без добавка от пребиотици (контрола). Подобни резултати бяха отчетени и за другия пробиотичен щам (*L. brevis* 8429), когато се култивира в присъствие на ксилоолигозахариди (Фигура 5Б). Добавянето на метаболитни продукти, получени от инкубирането на *L. brevis* 3448 с други пребиотици (инулин, пектин и хитозан), води до повишена секреция на IFN- γ , като на-високи стойности са отчетени за пектина (Фигура 5А). При другият изследван щам (*L. brevis* 8429) бяха детектирани повишени нива на IFN- γ със статистическа значимост само за пектина и при двете клетъчни култури (от неимунизирани и СИ-

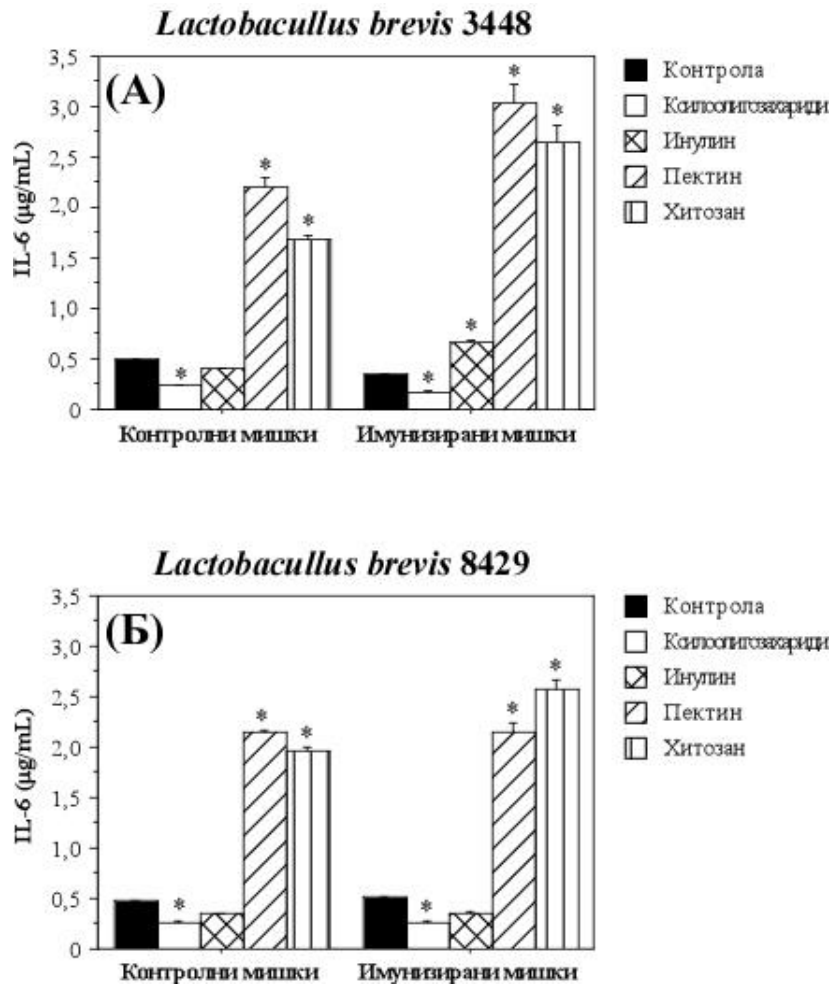
имунизираните мишки) (Фигура 5Б). Данните показват, че метаболитните продукти от щам *L. brevis* 8429 и другите пребиотици (инулин и хитозан) не променят значително продукцията на IFN- γ в сравнение с контролите (без пребиотици) (Фигура 5Б).



Фигура 5. Ефекти на метаболитните продукти от два щам *Lactobacillus brevis*, инкубирани с различни пребиотици (ксилоолигозахариди, инулин, пектин, хитозан) върху продукцията на IFN- γ от миши клетъчни култури, получени от лимфни възли и спленоцити от неимунизираните (контролни) мишки и СП-имунизираните мишки след 48 часова експозиция. Като отрицателни контроли са използвани клетъчни култури без стимулиране с метаболити от пребиотици (само хранителна среда). Резултатите са представени като средни стойности \pm SE от трипликати. * P < 0.05.

Метаболитните продукти от култивирането на двата бактериални щам (*L. brevis* 3448 и *L. brevis* 8429) с ксилоолигозахариди инхибират също и секрецията на IL-6 в сравнение с контролните групи (без пребиотици) в миши култури от имунизираните и неимунизираните мишки (Фигура 6А и 6Б). Този спад в нивата на IL-6 е най-ясно проявен в случая на щам *L. brevis* 3448 и групата на СП-имунизираните мишки (Фигура 6А). Повишени нива на IL-6 бяха открити при всички миши клетъчни култури след третиране с метаболитни продукти от пектин и хитозан с по-високи стойности за групата на имунизираните и СП-рестимулираните мишки (Фигура 6А и 6Б).

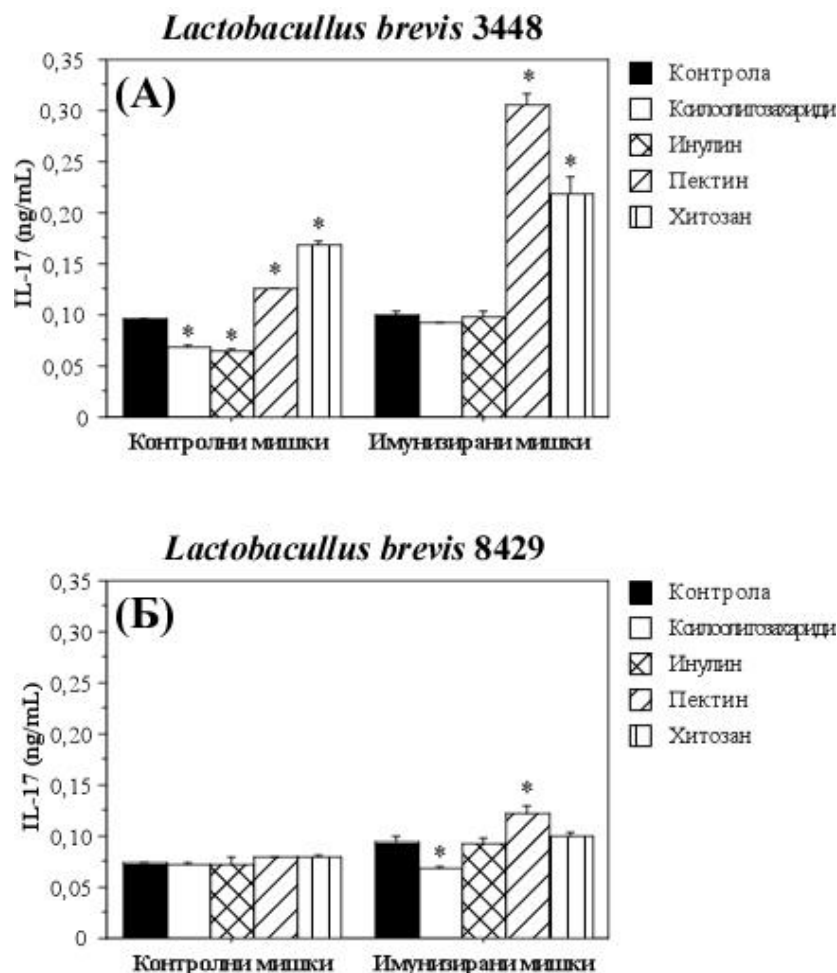
Леко повишение в производството на IL-6 (но статистически значимо) беше отчетено само в групата на имунизираните мишки, когато клетките се ко-култивират съвместно с метаболитни продукти от *L. brevis* 3448 и инулин (Фигура 6А). С малки изключения, изглежда, че комбинацията на *L. brevis* и инулин като пребиотик, не води до имуномодулаторни ефекти върху клетъчните култури от бозайници.



Фигура 6. Ефекти на метаболитните продукти от два щама *Lactobacillus brevis*, инкубирани с различни пребиотици (ксилоолигозахариди, инулин, пектин, хитозан) върху продукцията на IL-6 от миши клетъчни култури, получени от лимфни възли и спленоцити от неимунизирани (контролни) мишки и СП-имунизирани мишки след 48 часова експозиция. Като отрицателни контроли са използвани клетъчни култури без стимулиране с метаболити от пребиотици (само хранителна среда). Резултатите са представени като средни стойности \pm SE от трипликати. * $P < 0.05$.

Резултатите от ELISA анализа показаха по-ниски нива на IL-17 в сравнение с контролите в групата на неимунизираните мишки, когато имунните клетки са третирани с метаболитни продукти от *L. brevis* 3448 и ксилоолигозахариди или инулин (Фигура 7А). Повишени концентрации на IL-17 бяха открити в тази група, както и в групата на имунизирани мишки, когато клетките са ко-култивирани с продукти от *L.*

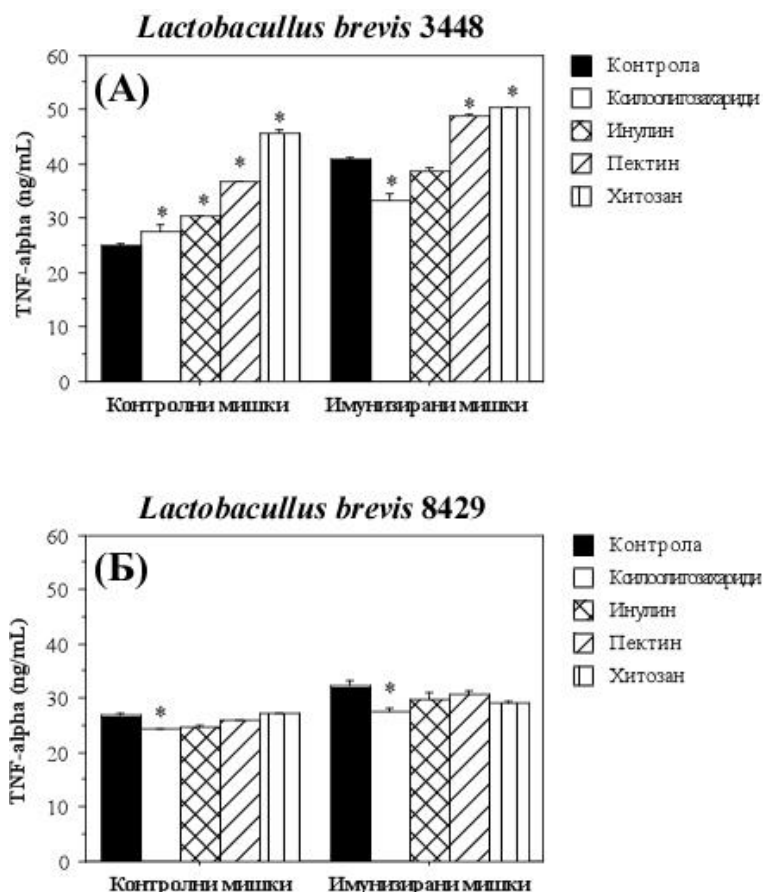
brevis 3448 и пектин или хитозан (Фигура 7А). При другият пробиотичен щам (*L. brevis* 8429), беше детектирана по-ниска концентрация на IL-17 след съвместно култивиране с ксилоолигозахариди и по-висока концентрация на IL-17 след добавяне на пектин. Тези промени се наблюдават само в групата на имунизираните мишки (Фигура 7Б).



Фигура 7. Ефекти на метаболитните продукти от два щама *Lactobacillus brevis*, инкубирани с различни пребиотици (ксилоолигозахариди, инулин, пектин, хитозан) върху продукцията на IL-17 от миши клетъчни култури, получени от лимфни възли и спленцити от неимунизирани (контролни) мишки и СП-имунизираны мишки след 48 часова експозиция. Като отрицателни контроли са използвани клетъчни култури без стимулиране с метаболити от пребиотици (само хранителна среда). Резултатите са представени като средни стойности \pm SE от трипликати. * P < 0.05.

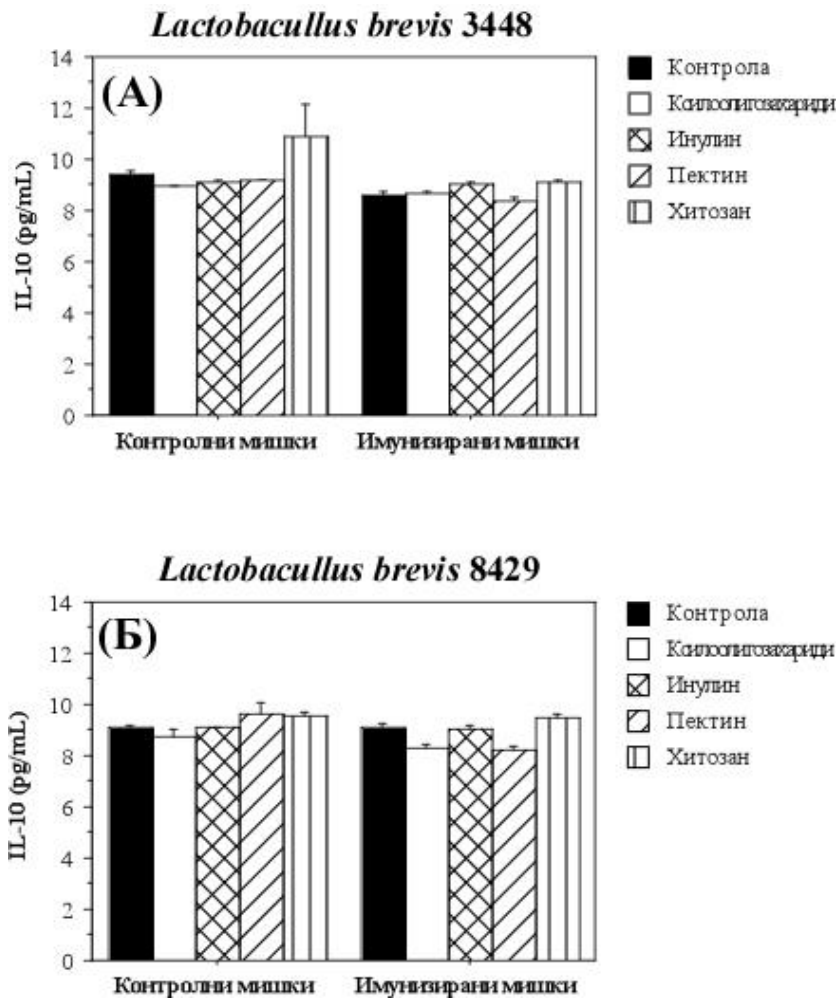
Всички супернатанти, получени от култивирането на *L. brevis* 3448 с четирите различни пребиотици (ксилоолигозахариди, инулин, пектин и хитозан), водят до стимулиране секрецията на TNF- α в групата на клетъчни култури, получени от контролни (неимунизираны) мишки (Фигура 8А). В групата на имунизираны мишки, метаболитните продукти от ксилоолигозахариди водят до намаляване на производството на TNF- α в сравнение с контролата, докато тези от пектин и хитозан

повишават концентрацията на TNF- α (Фигура 8А). Отново, инулинът няма ефект върху продуцирането на цитокини от имунните клетки при състояния на възпаление. При анализ на супернатантите от *L. brevis* 8429, инкубиран с изследваните пребиотици, само ксилоолигозахаридите показаха значителен ефект върху продукцията на TNF- α , който се изразяваше в намаляване на концентрацията на този цитокин и в двете култури – от контролни и имунизирани мишки (Фигура 8Б).



Фигура 8. Влияние на метаболитните продукти от изследваните пробиотични щамове и пребиотици върху секрецията на TNF- α в миши култури, получени от лимфни възли и спленоцити от неимунизирани (контролни) мишки и СП-имунизирани мишки след 48 часова експозицията. Като отрицателни контроли бяха използвани клетъчни култури без добавки (само хранителна среда). Резултатите са представени като средни стойности \pm SE от трипликати. * P < 0.05.

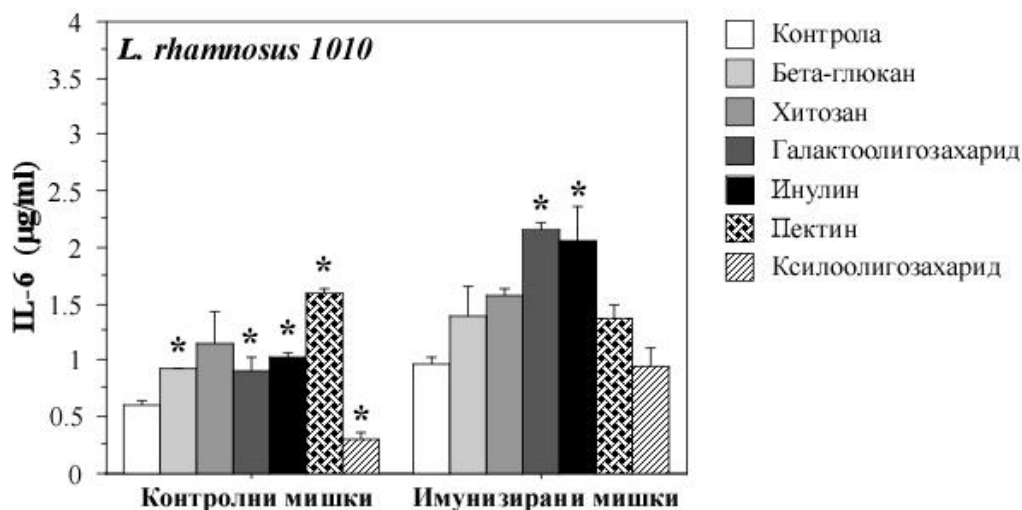
Изненадващо, нито една от супернатантите, получени от двата пробиотични щамове на *Lactobacillus brevis* (3448 и 8429) и четирите пребиотици, имаше някакъв ефект върху продукцията на IL-10 – нито в контролната група, нито в групата на имунизирани мишки (Фигура 9А и 9Б). Изглежда, че пробиотиците и техните продукти повлияват основно провъзпалителните цитокини (Th1), въпреки че много изследвания демонстрират повишаване нивата на антивъзпалителните цитокини (Th2) след третиране с пробиотици.



Фигура 9. Влияние на метаболитните продукти от изследваните пробиотични щамове и пребиотици върху секрецията на противовъзпалителния цитокин **IL-10** в миши култури, получени от лимфни възли и спленоцити от неимунизирани (контролни) мишки и СП-имунизирани мишки след 48 часова експозицията. Като отрицателни контроли бяха използвани клетъчни култури без добавка (само хранителна среда). Резултатите са представени като средни стойности \pm SE от трипликати.

В допълнение към избраните два щамове на *Lactobacillus brevis* за изследване на имуномодулаторните свойства, бяха анализирани и ефектите върху имунните клетки на метаболитните продукти на щамовете, използвани за изследване на адхезивната способност (*Lactobacillus rhamnosus* 1010, *Lactobacillus acidophilus* 11 и *Lactobacillus paracasei* 8458) инкубирани с различните пребиотици (бета-глюкан, хитозан, галактоолигозахариди, инулин, пектин, ксилоолигозахариди). За целта бяха отчетени ефектите на метаболитните продукти върху продукцията на IL-6, тъй като този цитокин се секретира както от Т-клетките, така и от макрофагите и участва в голяма част от сигналните пътища на имунната система.

На Фигура 10 са показани отчетените нива на IL-6 след стимулиране на клетъчни култури от неимунизирани и имунизирани мишки с метаболитни продукти, получени от инкубирането на *Lactobacillus rhamnosus* 1010 с различни пребиотици.



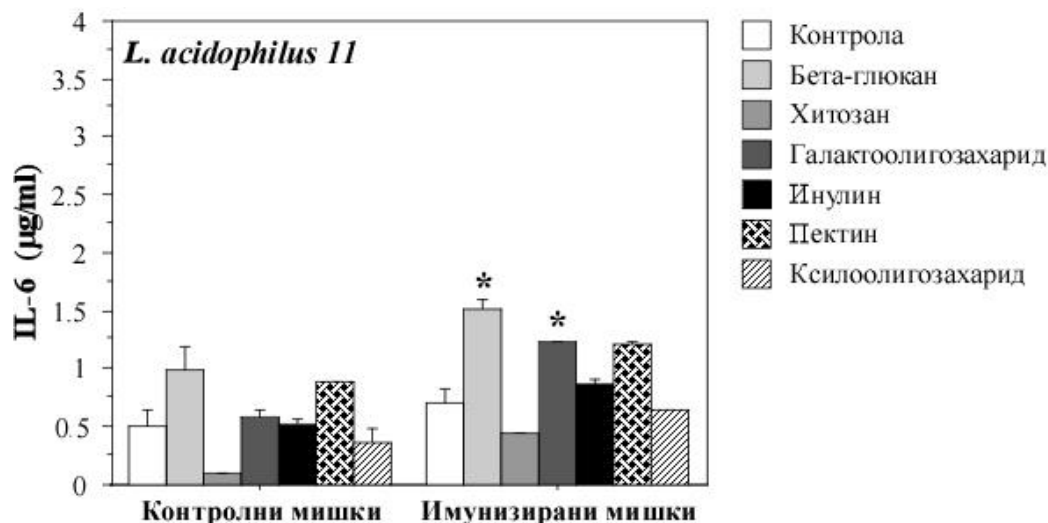
Фигура 10. Влияние на метаболитните продукти, получени от инкубирането на пробиотичния щам *Lactobacillus rhamnosus* 1010 с различни пребиотици (бета-глюкан, хитозан, галактоолигозахариди, инулин, пектин, ксилоолигозахариди) върху продукцията на **IL-6** от миши клетъчни култури, получени от лимфни възли и спленцити от неимунизирани (контролни) мишки и СП-имунизирани мишки след 48 часова експозиция. Като отрицателни контроли са използвани клетъчни култури без стимулиране с метаболити от пребиотици (само хранителна среда). Резултатите са представени като средни стойности \pm SE от трипликати. * $P < 0.05$.

От фигурата се вижда, че подобно на метаболитните продукти от двата щама на *Lactobacillus brevis*, ксилоолигозахаридите и тук водят до инхибиране секрецията на **IL-6**, като това инхибиране има статистическа значимост само при контролните (неимунизирани) мишки. Явно след като веднъж е активирана секрецията на **IL-6** в резултат на имунизацията, регулацията на концентрацията на този цитокин е по-трудна и изисква повече време.

Останалите метаболити в една или друга степен водят до стимулиране на продукцията на **IL-6** (индуциране на провъзпалителен отговор), като повишените концентрации на **IL-6** спрямо контролните клетки при имунизирани мишки са статистически значими за галактоолигозахаридите и инулина (Фигура 10).

Значително по различен е профила на графиката при другия изследван щам – *Lactobacillus acidophilus* 11 (Фигура 11). Прави впечатление, че стойностите на **IL-6** са занижени като при нормални физиологични условия (контролни мишки), така и при възпалителни условия (имунизирани мишки) след стимулиране с метаболити от инкубирането на *L. acidophilus* 11 с хитозан, макар че не се достига статистическо значение. Това корелира и с резултатите от тестовете за адхезия, където хитозана силно инхибира адхезивната способност на тези млечнокисели бактерии към изследваните три човешки клетъчни линии, изолирани от дебелото черво (Фигура 3). Единствените статистически значими резултати за промяна в концентрацията на **IL-6** (повишена) при този пробиотичен щам бяха отчетени за бета-глюкана и галактоолигозахаридите при групата на имунизирани мишки (Фигура 11).

Останалите тествани пребиотици и техните продукти от инкубирането с *L. acidophilus* 11 нямат ефект върху продукцията на IL-6.



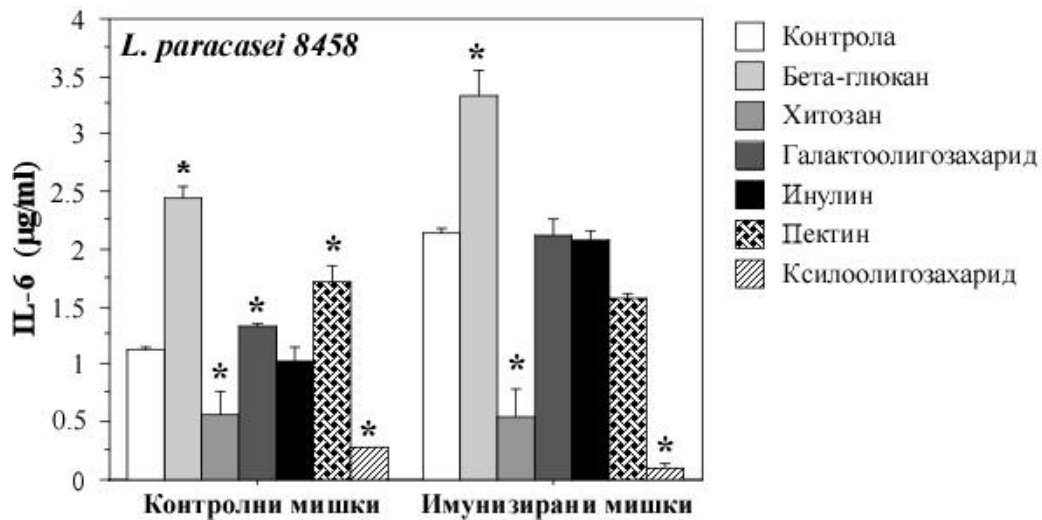
Фигура 11. Влияние на метаболитните продукти, получени от инкубирането на пробиотичния щам *Lactobacillus acidophilus* 11 с различни пребиотици (бета-глюкан, хитозан, галактоолигозахариди, инулин, пектин, ксилоолигозахариди) върху продукцията на IL-6 от миши клетъчни култури, получени от лимфни възли и спленоцити от неимунизирани (контролни) мишки и СП-имунизирани мишки след 48 часова експозиция. Като отрицателни контроли са използвани клетъчни култури без стимулиране с метаболити от пребиотици (само хранителна среда). Резултатите са представени като средни стойности \pm SE от трипликати. * P < 0.05.

ELISA данните за *Lactobacillus paracasei* 8458 (Фигура 12) показват, че метаболитните продукти от ксилоолигозахаридите и хитозана потискат секрецията на IL-6 с много добре изразена статистическа разлика в сравнение с контролите, докато бета-глюкана води до повишаване нивата на синтезирания IL-6 както при клетъчните култури, представящи нормални физиологични условия (контролни мишки), така и при имунизирани мишки, представящи условия на възпаление и активирана имунна система (Фигура 12). Галактоолигозахаридите и пектина стимулират секрецията на IL-6 само при контролните мишки, а инулина не оказва пряк ефект и при двете клетъчни култури.

Ако се сравнят данните за адхезивната способност на *Lactobacillus paracasei* 8458 от Фигура 4 и продукцията на IL-6 от Фигура 12 се вижда, че метаболитните продукти от бета-глюкана и хитозана значително инхибират адхезивните способности на този лактобацилен щам, докато при продукцията на IL-6, бета-глюкана води до повишаване на неговата концентрация, а хитозана – до намаляване на концентрацията (Фигура 12).

Това показва, че няма пряка зависимост между повишените/понижените нива на определен цитокин и повишена/намалена адхезивна способност на съответния пробиотичен щам, въпреки че в някои случаи могат да бъдат наблюдавани определени корелации. Активирането на имунната система на гостоприемника може да стане чрез

определени рецептори след адхезия или чрез сигнални молекули без да е необходимо прикрепването на съответните бактерии.



Фигура 12. Влияние на метаболитните продукти, получени от инкубирането на пробиотичния щам *Lactobacillus paracasei* 8458 с различни пребиотици (бета-глюкан, хитозан, галактоолигозахариди, инулин, пектин, ксилоолигозахариди) върху продукцията на **IL-6** от миши клетъчни култури, получени от лимфни възли и спленцити от неимунизирани (контролни) мишки и СП-имунизирани мишки след 48 часова експозиция. Като отрицателни контроли са използвани клетъчни култури без стимулиране с метаболити от пребиотици (само хранителна среда). Резултатите са представени като средни стойности \pm SE от трипликати. * P < 0.05.

Освен измерване концентрацията на някои основни цитокини, беше проведен и флоуцитометричен (FACS) анализ, за да се установи дали изследваните метаболитни продукти могат да индуцират промени в основните имунни клетъчни популации. Данните от имунофенотипния анализ са обобщени в Таблица 1. FACS анализът показва, че като цяло, експресията на повърхностния маркер CD45⁺ (маркер характерен за всички левкоцити, известен още като „общ левкоцитен антиген“, LCA) е намалена във всички проби от имунизирани мишки в сравнение с тези от контролните (неимунизирани) мишки (Таблица 1), дори за нетретираните клетки (култивирани само в хранителна среда). Напълно очаквано, тази тенденция се запазва и за следващия маркер (CD19⁺) (Таблица 1), което показва, че намаляването на клетъчната численост е свързано с редукция на В-клетките поради тяхната диференциация в плазмени клетки след имунизация/активиране, но не се дължи на изследваните метаболитни продукти.

След анализиране на Т-клетъчната популация (CD3⁺), беше установена редукция на Т-клетките след третиране с метаболитни продукти от пектин и хитозан, като този ефект беше по-силен в културите от контролни мишки (Таблица 1, CD3⁺, с удебелен шрифт). Следователно, това е причината за допълнителното намаляване на CD45⁺ клетките, след третиране с пектин или хитозан (Таблица 1, CD45⁺, с удебелен шрифт), което означава загуба на Т-клетки. Вероятно, в културите от СП-имунизирани мишки,

тази загуба е частично компенсирана от пролиферацията на СП-специфични Т-клетки след СП-рестимулация. Не са намерени значителни промени в популациите на CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки (Таблица 1).

Таблица 1. Флоуцитометричен анализ на имунните клетъчни субпопулации CD45⁺, CD19⁺, CD3⁺, CD4⁺ и CD8⁺ след *in vitro* рестимулиране на мишите клетъчни култури с СП и ко-култивиране с метаболитни продукти, получени от инкубацията на два щама *Lactobacillus brevis* (3448 и 8429) и четири пребиотици (кисилоолигозахариди, инулин, пектин и хитозан). Клетките са оцветени чрез използване на 10-цветен панел за посочените клетъчно-повърхностни маркери и анализирани чрез FACS. Специфичните клетъчни популации са представени като процент (%) от общия брой клетки.

	Пребиотици	CD45 ⁺	CD19 ⁺	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	Група
<i>L. brevis</i> 3448	Хранителна среда	89.1	53.3	27.2	16.2	7.28	Контролни мишки
	Кисилоолигозахариди	88.9	52.5	27.9	16.3	7.55	
	Инулин	88.8	48.9	27.8	16.7	7.37	
	Пектин	83.2	48.7	24.8	15.7	6.78	
	Хитозан	85.4	49.6	25.0	16.9	7.27	
	Хранителна среда	83.8	46.5	28.1	17.3	8.34	Имунизирани мишки
	Кисилоолигозахариди	83.6	45.8	28.6	17.6	8.63	
	Инулин	83.3	44.7	29.0	17.8	8.44	
	Пектин	80.8	45.4	25.9	16.5	7.96	
	Хитозан	83.0	46.4	27.1	17.8	8.74	
<i>L. brevis</i> 8429	Хранителна среда	88.1	48.7	26.7	16.2	7.24	Контролни мишки
	Кисилоолигозахариди	89.3	50.7	28.1	17.3	7.56	
	Инулин	89.3	48.1	28.1	17.4	7.25	
	Пектин	83.5	50.5	25.3	15.7	6.49	
	Хитозан	87.4	49.4	24.9	16.6	7.34	
	Хранителна среда	81.8	44.7	26.8	16.8	8.38	Имунизирани мишки
	Кисилоолигозахариди	82.7	46.9	27.6	17.5	8.58	
	Инулин	83.0	44.3	27.4	17.1	8.65	
	Пектин	81.1	46.9	27.0	16.8	8.12	
	Хитозан	83.0	44.5	27.3	18.4	8.69	

След това решихме да проверим дали метаболитните продукти от изследваните пребиотици могат да повлияят специфично клетките с имунорегулаторни свойства ($CD4^+CD25^+$). Беше установено, че супернатантите от двата щама *Lactobacillus brevis* (3448 и 8429) инкубирани с пектин, както и *Lactobacillus brevis* 3448 инкубиран с хитозан, водят до увеличаване на популацията от наскоро активираните Т-клетки с регулаторни свойства (Таблица 2, $CD4^+CD25^+$, с удебелен шрифт). При нетретираните клетки от имунизирани мишки (само хранителна среда) процентът на регулаторните ($CD4^+CD25^+$) клетки също се повишава в сравнение с нетретираните клетки от контролните мишки (само хранителна среда), което се дължи на индуцираното възпалително състояние (Таблица 2). Фактът, че изследваните метаболитни продукти причиняват подобно увеличаване на регулаторните $CD4^+CD25^+$ клетки в двете култури от имунизирани и контролни мишки предполага, че този ефект не зависи от възпалителния процес.

За да се изследва участието на пробиотиците/пребиотиците в сигнализацията чрез PD-1 сигналния път, бяха анализирани също промените в $CD279$ (PD-1) експресиращите Т-клетки. Изменения в Т-клетъчната субпопулация $CD4^+CD279^+$ не бяха детектирани (Таблица 2).

FACS анализът на $CD8^+CD279^+$ Т-клетките показва леко завишени проценти на тези клетки при стимулиране с метаболити от пектин и хитозан в културите от двете експериментални групи – контролните и имунизирани мишки (Таблица 2, $CD8^+CD279^+$, с удебелен шрифт).

Неутрофилите и макрофагите са първите клетки, които мигрират към мястото на възпаление или нараняване. Тъй като неутрофилите са клетки с кратък полуживот и трудно могат да бъдат анализирани след по-продължително *in vitro* култивиране, ние анализирахме дали изследваните бактериални метаболити имат някакви ефекти върху макрофагите.

Метаболитните продукти от ксилоолигозахаридите нямат ефект или леко намаляват процента на макрофагите (Таблица 2, $CD11b^+MHCII^+$). Метаболитите от другите пребиотици (инулин, пектин, хитозан) водят до увеличаване на броя на макрофагите в различна степен в сравнение с контролите. Изключение беше установено само при щам *Lactobacillus brevis* 8429 инкубиран с пектин, където и в двете култури (от контролни и имунизирани мишки) беше детектиран понижен брой макрофаги (Таблица 2, $CD11b^+MHCII^+$, с удебелен шрифт).

Таблица 2. Флоуцитометричен анализ на имунните клетъчни субпопулации CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD279⁺, CD8⁺CD279⁺ и CD11b⁺МНСII⁺ след *in vitro* рестимулиране на мишите клетъчни култури с СII и ко-култивиране с метаболитни продукти, получени от инкубацията на два щама *Lactobacillus brevis* (3448 и 8429) и четири пребиотици (ксилоолигозахариди, инулин, пектин и хитозан). Клетките са оцветени чрез използване на 10-цветен панел за посочените клетъчно-повърхностни маркери и анализирани чрез FACS. Специфичните клетъчни популации са представени като процент (%) от общия брой клетки.

	Пребиотици	CD4 ⁺ CD25 ⁺	CD4 ⁺ CD279 ⁺	CD8 ⁺ CD279 ⁺	CD11b ⁺ МНСII ⁺	Група	
<i>L. brevis</i> 3448	Хранителна среда	2.59	2.70	0.58	5.34	Контролни мишки	
	Ксилоолигозахариди	2.47	2.59	0.63	5.34		
	Инулин	2.88	2.70	0.60	9.08		
	Пектин	4.35	2.67	0.93	6.10		
	Хитозан	3.55	2.47	0.94	8.44	Имунизирани мишки	
	Хранителна среда	3.86	2.27	0.64	4.43		
	Ксилоолигозахариди	3.88	2.34	0.68	4.58		
	Инулин	3.62	2.45	0.70	5.38		
Пектин	4.14	2.62	0.80	5.33	Имунизирани мишки		
Хитозан	4.16	2.84	0.85	6.97			
<i>L. brevis</i> 8429	Хранителна среда	2.42	2.98	0.53		5.00	Контролни мишки
	Ксилоолигозахариди	2.48	2.43	0.52		4.92	
	Инулин	2.94	2.68	0.50	10.5		
	Пектин	5.19	2.57	1.17	3.44		
	Хитозан	3.83	2.87	0.71	11.3	Имунизирани мишки	
	Хранителна среда	3.85	2.45	0.57	4.68		
	Ксилоолигозахариди	3.48	2.49	0.67	3.73		
	Инулин	3.47	2.48	0.59	7.09		
Пектин	4.98	2.55	0.95	2.80	Имунизирани мишки		
Хитозан	3.85	2.48	0.83	8.48			

6. Обсъждане

Адхезията към чревната повърхност се счита за една от основните характеристики на бактериите с пробиотичен потенциал (Piatek et al., 2012). Тя се определя като механизъм, който защитава гостоприемника от патогенна инвазия и е ефективен, дори когато бактериалното свързване е временно (Candela et al., 2008). Това потвърждава необходимостта от проучване на факторите, които влияят върху адхезионните свойства на пробиотичните бактерии. Един от тези фактори могат да бъдат пребиотиците, които обикновено се прилагат в смес с пробиотици (синбиотици), за да се стимулира растежа и активността на бактериите в червата. Ето защо, ние избрахме да проучим потенциалното влияние на шест търговски пребиотични вещества, върху адхезивните свойства на три щама млечнокисели бактерии, принадлежащи към видовете с индустриално приложение като пробиотици.

Способността за прикрепване на млечнокиселите бактерии варират значително между отделните щамове и видове (Jacobsen et al., 1999; Piatek et al., 2012). Например, има данни, показващи доста разнообразен обхват на адхезионни свойства на *Lactobacillus rhamnosus* - от по-малко от 1% процент на адхезия до 20% адхезия и повече (Gopal et al., 2001; Markowicz et al., 2014; Mousavi et al., 2016; Tuomola and Salminen, 1998). Различните проценти на адхезия са определени и за различни щамове на *Lactobacillus acidophilus* и *Lactobacillus paracasei* (Candela et al., 2008; Xu et al., 2009; Živković et al., 2016). В нашите изследвания, ние отчетохме висок процент на адхезия за контролните култури (без добавки на пребиотици) при трите изследвани щама *Lactobacillus*, което отново потвърждава голямата вариация в адхезивните свойства на различните щамове млечнокисели бактерии. Друг пример, който подкрепя този факт е видът *Lactobacillus plantarum* - съобщените проценти на адхезия за различни щамове *L. plantarum* варират от 6.7% до 80% (Moussavi and Adams, 2010; Tuomola and Salminen, 1998).

Като цяло се счита, че пребиотиците имат благоприятно въздействие върху растежа и активността на пробиотичните бактерии. Интересното е, че при изследване на клетъчната адхезия се оказва, че не всички пребиотични вещества имат положителен ефект върху това свойство. Нашите резултати показват, че пребиотичните полизахариди бета-глюкан и хитозан значително намаляват адхезивните свойства на изследваните млечнокисели бактерии. И трите щама *Lactobacillus* (*Lactobacillus rhamnosus* 1010, *Lactobacillus paracasei* 8458 и *Lactobacillus acidophilus* 11) инкубирани с тези пребиотици проявяват намалена способност за свързване с човешките клетъчни линии (LS 180, HT-29 и Caco-2), изолирани от дебело черво. По отношение на бета-глюкана, нашите резултати се различават от предишни съобщения. Russo и колектив демонстрират, че бета-глюканите увеличават растежа, жизнеспособността и колонизационната способност на пробиотичните микроорганизми (Russo et al., 2012). Нашето предположение е, че причината за тези различни ефекти е най-вероятно произходът на веществата, използвани в изследванията. В нашите експерименти сме използвали бета-глюкан от ечемик, докато Russo и колегите му изучават ефекта на бактериалния бета-глюкан. Arena et al. съобщават за стимулиращ ефект на ечемичен

бета-глюкан върху пробиотичните характеристики на четири щама *Lactobacillus* (Arena et al., 2014). Въпреки това, не е установено силно повишаване на адхезивните свойства и дори един от шамовете е показал намалена адхезия към Сасо-2 клетките в присъствието на бета-глюкан (Arena et al., 2014). Механизмът, водещ до отрицателен ефект на бета-глюкана и хитозана върху адхезията на млечнокиселите бактерии не е известен, но може да се предположи, че пребиотичните полизахариди взаимодействат с повърхностните молекули, които определят бактериалната адхезия към чревната повърхност. Третирането с бета-глюкан и хитозан може да доведе до специфично или неспецифично свързване с бактериалните адхезини или пространствено възпрепятстват свързването на тези адхезини. За потвърждаване на тази хипотеза са необходими допълнителни експерименти.

Настоящото изследване демонстрира, че инкубирането на лактобацилни щамове с различни пребиотици води до специфични ефекти върху адхезивните свойства на тези млечнокисели бактерии: инкубирането на *Lactobacillus rhamnosus* 1010, *Lactobacillus paracasei* 8458 и *Lactobacillus acidophilus* 11 с бета-глюкан или хитозан драстично намалява адхезията на бактериите към чревните клетъчни линии; ксилоолигозахаридите и галактоолигозахаридите стимулират адхезията на изследваните млечнокисели бактерии, докато ябълковият пектин проявява специфични за щам ефекти. Тези данни представляват основа за бъдещи изследвания на механизмите, които модулират бактериалната адхезия в присъствието на различни пребиотици.

Предполага се, че имуномодулаторните свойства и благоприятното влияние върху здравето на пробиотичните бактерии са специфични за всеки щам. Този феномен е разгледан подробно от Skivka (Skivka, 2015). В допълнение, много важен фактор, който определя имуномодулиращия потенциал на пробиотиците, е използваният пребиотик и неговите метаболитни продукти. Повечето *in vivo* проучвания с перорално приложение на пробиотици не осигуряват прецизен контрол върху наличните за бактериите субстрати, тъй като винаги присъстват много други хранителни компоненти. Ето защо, какви са точните имунни механизми, чрез които пробиотичните микроорганизми оказват благотворно въздействие, все още не са напълно установени. Следователно, противоречията между данните от различни изследвания може да се дължат на използвания пробиотичен щам, пребиотици или различни експериментални състояния, като целеви заболявания, клетки или антигени.

В настоящото изследване, нашата стратегия беше да се изследват преките ефекти на метаболитните продукти, получени в резултат на култивирането на два щама *Lactobacillus brevis* с четири различни пребиотици, върху секрецията на някои цитокини и фенотипа на имунните клетки при нормално състояние и състояние на индуцирано възпаление. По този начин можем да предвидим какви ще бъдат ефектите на някои пробиотично-пребиотични комбинации, ако се прилага превантивен протокол върху здрави индивиди или терапия върху лица с определено заболяване.

Повечето проучвания разглеждат косвените ефекти на пробиотиците/ пребиотиците върху имунната система (чрез промяна на чревната микрофлора) главно

чрез инхибиране на експресията на провъзпалителни цитокини и повишени нива на антивъзпалителни цитокини, но все още няма доказателствата за техните директни ефекти (Shokryazdan et al., 2017). Нашите данни ясно показват, че метаболитите от *Lactobacillus brevis* и ксилоолигозахариди намаляват нивата на IFN- γ , IL-6, IL-17 и TNF- α , но концентрацията на IL-10 не се повлиява. Този ефект е сходен и в двата случая – на нестимулирани клетки (от контролни мишки) и стимулирани клетки (от имунизирани мишки).

В съответствие с нашите резултати, намалени серумни нива на IFN- γ и IL-1 β , както и липсата на ефект върху продукцията на IL-10, също са установени при мишки, хранени с ксилоолигозахариди, в сравнение с мишки приемали стандартна храна (Hansen et al., 2013). Като възможен механизъм авторите предлагат индиректен SCFA-медиран противовъзпалителен ефект на ксилоолигозахаридите (Hansen et al., 2013). Нашите резултати от директния тест на метаболитните продукти от ксилоолигозахариди (включително SCFA) върху имунните клетки потвърждават, че тези продукти намаляват нивото на провъзпалителните цитокини.

Няколко клинични изследвания, свързани с ефектите на пробиотични добавки върху активността на заболяването и нивата на възпалителните цитокини при пациенти с ревматоиден артрит (Alipour et al., 2014; Vaghef-Mehrabany et al., 2014; Zamani et al., 2016), както и *in vivo* проучвания с животински модели за ревматоиден артрит (Amdekar et al., 2014; Amdekar et al., 2011; Kano et al., 2002; So et al., 2008) също показват понижени нива на IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-12, IL-17, TNF- α и IFN- γ и повишени концентрации на антивъзпалителните цитокини IL-10 и TGF- β . При тези изследвания орално са прилагани пробиотични щамове от *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* и *Bifidobacterium bifidum* (отделно или в комбинация), култивирани в среда MRS или MRS+10% обезмаслено мляко (за *Lactobacillus delbrueckii*) без добавяне на пребиотици.

При нашето изследване върху директния ефект на метаболитните продукти от *Lactobacillus brevis* и пребиотиците инулин, пектин или хитозан, ние отчетохме противоположни резултати. За разлика от цитираните публикации и нашите данни за ксилоолигозахаридите, нивата на IFN- γ , IL-6, IL-17 и TNF- α бяха повишени в сравнение с контролите като най-високи стойности бяха регистрирани за метаболитите от пектина. Подобно на резултатите от кссилоолигозахаридите, продукцията на IL-10 не беше повлияна. Тези данни показват, че имуномодулаторните свойства на пробиотиците зависят не само от щам, но и от използваните пребиотици. Това означава, че един пробиотичен щам може да упражнява различни имуномодулиращи свойства върху имунната система в зависимост от хранителната диета и наличните хранителни компоненти в храносмилателната система за нуждите на чревната микрофлора.

Теоретично, прилагането на грешна комбинация от пробиотичен щам и пребиотик или фибри за лечение на определено заболяване може да причини неблагоприятни, вместо благотворни ефекти. Въпреки, че има много други защитни механизми, това

трябва да се има предвид, когато за лечение на различни заболявания се използват пробиотици, пребиотици или синбиотици.

Доказано е, че косвената имуномодулираща активност на пробиотиците/ пребиотиците се дължи на късоверижните мастни киселини (SCFA), които активират G-протеин свързаните рецептори 41 и 43 (GPR41 и GPR43) върху чревните епителни клетки, индуцирайки бързо продуциране на различни цитокини и хемокини (Kim et al., 2013). Вероятно тези рецептори участват и в установените директни имуномодулаторни ефекти на метаболитните продукти (съдържащи SCFA), тествани в настоящото изследване, тъй като те се експресират и от макрофаги/моноцити (Ang and Ding, 2016).

Нашите флоуцитометрични (FACS) анализи показаха разлики в броя на макрофагите в зависимост от използваните пребиотици. Макрофагите могат да продуцират IFN- γ , IL-6, TNF- α , IL-12 (Kano et al., 2002), които да доведат до последващо активиране на Т-клетките и секреция на други цитокини (например IL-17). Нашите данни показват, че различните пребиотици имат различни ефекти върху продукцията на цитокини. При определени условия тези промени в цитокиновия баланс могат да изместят имунния отговор в различни посоки.

Третирането на клетки с метаболитни продукти от *Lactobacillus brevis* и пектин или хитозан увеличава броя на анергичните CD8⁺CD279⁺ Т-клетки и регулаторните CD4⁺CD25⁺ Т-клетки, но метаболитите от ксилоолигозахариди нямат такъв ефект. Тъй като при мишките CD4⁺ Т регулаторни клетки са хомогенна популация, в която всички CD4⁺CD25⁺ клетки са регулаторни Т-клетки, не е включен вътреклетъчният маркер FoxP3.

Като заключение можем да обобщим, че метаболитните продукти, получени от инкубирането на различни пробиотични щамове с различни пребиотици, могат да имат различни ефекти върху имунния отговор. Това може да бъде от решаващо значение, когато за лечение на дадени аутоимунни заболявания се използват определени пробиотици, пребиотици или синбиотици.

7. ИЗВОДИ

След обобщение на резултатите от проведените изследвания могат да се направят следните по-важни изводи:

1. Бета-глюканът и хитозанът драстично намаляват адхезивните свойства на *Lactobacillus rhamnosus* 1010, *Lactobacillus paracasei* 8458 и *Lactobacillus acidophilus* 11.
2. Ксилоолигозахаридите и галактоолигозахаридите стимулират адхезията на изследваните млечнокисели бактерии към епителоподобните чревни клетъчни линии.
3. Ябълковият пектин проявява щам-специфичен ефект – инхибира адхезията на *Lactobacillus rhamnosus* 1010 и *Lactobacillus acidophilus* 11, и не влияе върху адхезивните способности на *Lactobacillus paracasei* 8458.
4. Инулинът не оказва влияние върху адхезията на изследваните щамове млечнокисели бактерии.
5. Изследваните бактериални щамове се прикрепват много по-лесно към клетъчни линии LS 180 и HT-29, отколкото към Сасо-2, което се дължи на способността за продукция на муцин от първите две клетъчни линии.
6. Метаболитните продукти от ксилоолигозахаридите водят до намаляване концентрацията на IFN- γ , IL-6, IL-17 и TNF- α както при условия на възпаление, така и при нормално физиологично състояние.
7. Метаболитните продукти от инулин, пектин и хитозан водят до повишаване концентрацията на IFN- γ , IL-6, IL-17 и TNF- α като този ефект е най-силно изразен за пектина.
8. Нито един от изследваните пребиотици не повлиява пряко секрецията на антивъзпалителния цитокин IL-10.
9. Метаболитни продукти от изследваните пребиотици повлияват основно макрофагите, като ефектите са пребиотик-специфични и щам-специфични.
10. Метаболитните продукти от пектин и хитозан причиняват загуба на Т-клетки (CD3⁺) и повишена численост на регулаторните (CD4⁺CD25⁺) и анергични (CD8⁺CD279⁺) Т клетки.

8. Литература, цитирана в автореферата

- Alipour, B., Homayouni-Rad, A., Vaghef-Mehrabany, E., Sharif, S.K., Vaghef-Mehrabany, L., Asghari-Jafarabadi, M., Nakhjavani, M.R., and Mohtadi-Nia, J. (2014). Effects of *Lactobacillus casei* supplementation on disease activity and inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis patients: a randomized double-blind clinical trial. *International journal of rheumatic diseases* 17, 519-527.
- Alp Avci, G., Ozcelik, B., and Kesepara, C. (2017). Effect of inulin and *Auricularia polytricha* extract on proliferation of *Lactobacillus rhamnosus*. *Hittite Journal of Science and Engineering* 4, 17-21.
- Amdekar, S., Singh, V., Kumar, A., Sharma, P., and Singh, R. (2014). *Lactobacillus acidophilus* protected organs in experimental arthritis by regulating the pro-inflammatory cytokines. *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB* 29, 471-478.
- Amdekar, S., Singh, V., Singh, R., Sharma, P., Keshav, P., and Kumar, A. (2011). *Lactobacillus casei* reduces the inflammatory joint damage associated with collagen-induced arthritis (CIA) by reducing the pro-inflammatory cytokines: *Lactobacillus casei*: COX-2 inhibitor. *Journal of clinical immunology* 31, 147-154.
- Ang, Z., and Ding, J.L. (2016). GPR41 and GPR43 in obesity and inflammation – protective or causative? *Frontiers in immunology* 7, 28.
- Arena, M.P., Caggianiello, G., Fiocco, D., Russo, P., Torelli, M., Spano, G., and Capozzi, V. (2014). Barley beta-glucans-containing food enhances probiotic performances of beneficial bacteria. *International journal of molecular sciences* 15, 3025-3039.
- Candela, M., Perna, F., Carnevali, P., Vitali, B., Ciati, R., Gionchetti, P., Rizzello, F., Campieri, M., and Brigidi, P. (2008). Interaction of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with human intestinal epithelial cells: adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production. *International journal of food microbiology* 125, 286-292.
- de Souza Oliveira, R.P., Perego, P., de Oliveira, M.N., and Converti, A. (2012). Effect of inulin on the growth and metabolism of a probiotic strain of *Lactobacillus rhamnosus* in co-culture with *Streptococcus thermophilus*. *LWT - Food Science and Technology* 47, 358-363.
- Duary, R.K., Rajput, Y.S., Batish, V.K., and Grover, S. (2011). Assessing the adhesion of putative indigenous probiotic lactobacilli to human colonic epithelial cells. *The Indian journal of medical research* 134, 664-671.
- Gopal, P.K., Prasad, J., Smart, J., and Gill, H.S. (2001). In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *International journal of food microbiology* 67, 207-216.
- Hansen, C.H.F., Frokiaer, H., Christensen, A.G., Bergstrom, A., Licht, T.R., Hansen, A.K., and Metzdorff, S.B. (2013). Dietary xylooligosaccharide downregulates IFN-gamma and the low-grade inflammatory cytokine IL-1beta systemically in mice. *Journal of Nutrition* 143, 533-540.
- Jacobsen, C.N., Rosenfeldt Nielsen, V., Hayford, A.E., Moller, P.L., Michaelsen, K.F., Paerregaard, A., Sandstrom, B., Tvede, M., and Jakobsen, M. (1999). Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Applied and environmental microbiology* 65, 4949-4956.
- Kano, H., Mogami, O., and Uchida, M. (2002). Oral administration of milk fermented with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1 to DBA/1 mice inhibits secretion of proinflammatory cytokines. *Cytotechnology* 40, 67-73.
- Kim, M.H., Kang, S.G., Park, J.H., Yanagisawa, M., and Kim, C.H. (2013). Short-chain fatty acids activate GPR41 and GPR43 on intestinal epithelial cells to promote inflammatory responses in mice. *Gastroenterology* 145, 396-406.e310.
- Markowicz, C., Olejnik-Schmidt, A., Borkowska, M., and Schmidt, M.T. (2014). SpaCBA sequence instability and its relationship to the adhesion efficiency of *Lactobacillus casei* group isolates to Caco-2 cells. *Acta biochimica Polonica* 61, 341-347.
- McCool, D.J., Forstner, J.F., and Forstner, G.G. (1994). Synthesis and secretion of mucin by the human colonic tumour cell line LS180. *The Biochemical journal* 302 (Pt 1), 111-118.

- Mousavi, E., Makvandi, M., Teimoori, A., Ataei, A., Ghafari, S., Najafian, M., Ourang, Z., and Samarbaf-Zadeh, A. (2016). In vitro adherence of Lactobacillus strains isolated from the vaginas of healthy Iranian women. *Journal of the Chinese Medical Association* 79, 665-671.
- Moussavi, M., and Adams, M.C. (2010). An in vitro study on bacterial growth interactions and intestinal epithelial cell adhesion characteristics of probiotic combinations. *Current microbiology* 60, 327-335.
- Piatek, J., Gibas-Dorna, M., Olejnik, A., Krauss, H., Wierzbicki, K., Zukiewicz-Sobczak, W., and Glowacki, M. (2012). The viability and intestinal epithelial cell adhesion of probiotic strain combination--in vitro study. *Annals of agricultural and environmental medicine : AAEM* 19, 99-102.
- Roller, M., Rechkemmer, G., and Watzl, B. (2004). Prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics Lactobacillus rhamnosus and Bifidobacterium lactis modulates intestinal immune functions in rats. *The Journal of nutrition* 134, 153-156.
- Russo, P., Lopez, P., Capozzi, V., de Palencia, P.F., Duenas, M.T., Spano, G., and Fiocco, D. (2012). Beta-glucans improve growth, viability and colonization of probiotic microorganisms. *International journal of molecular sciences* 13, 6026-6039.
- Shokryazdan, P., Faseleh Jahromi, M., Navidshad, B., and Liang, J.B. (2017). Effects of prebiotics on immune system and cytokine expression. *Medical microbiology and immunology* 206, 1-9.
- Skivka, L.M. (2015). Immunomodulatory properties of the human intestinal microbiota and prospects for the use of probiotics for prophylaxis and correction of inflammatory processes. *Biotechnologia Acta* 8, 28-44.
- So, J.S., Lee, C.G., Kwon, H.K., Yi, H.J., Chae, C.S., Park, J.A., Hwang, K.C., and Im, S.H. (2008). Lactobacillus casei potentiates induction of oral tolerance in experimental arthritis. *Molecular immunology* 46, 172-180.
- Tuomola, E.M., and Salminen, S.J. (1998). Adhesion of some probiotic and dairy Lactobacillus strains to Caco-2 cell cultures. *International journal of food microbiology* 41, 45-51.
- Vaghef-Mehrabany, E., Alipour, B., Homayouni-Rad, A., Sharif, S.-K., Asghari-Jafarabadi, M., and Zavvari, S. (2014). Probiotic supplementation improves inflammatory status in patients with rheumatoid arthritis. *Nutrition* 30, 430-435.
- Velcich, A., Palumbo, L., Jarry, A., Laboisse, C., Racevskis, J., and Augenlicht, L. (1995). Patterns of expression of lineage-specific markers during the in vitro-induced differentiation of HT29 colon carcinoma cells. *Cell Growth Differ* 6, 749-757.
- Xu, H., Jeong, H.S., Lee, H.Y., and Ahn, J. (2009). Assessment of cell surface properties and adhesion potential of selected probiotic strains. *Letters in applied microbiology* 49, 434-442.
- Zamani, B., Golkar, H.R., Farshbaf, S., Emadi-Baygi, M., Tajabadi-Ebrahimi, M., Jafari, P., Akhavan, R., Taghizadeh, M., Memarzadeh, M.R., and Asemi, Z. (2016). Clinical and metabolic response to probiotic supplementation in patients with rheumatoid arthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *International journal of rheumatic diseases* 19, 869-879.
- Živković, M., Miljković, M.S., Ruas-Madiedo, P., Markelić, M.B., Veljović, K., Tolinački, M., Soković, S., Korać, A., and Golić, N. (2016). EPS-SJ Exopolisaccharide Produced by the Strain Lactobacillus paracasei subsp. paracasei BGSJ2-8 Is Involved in Adhesion to Epithelial Intestinal Cells and Decrease on E. coli Association to Caco-2 Cells. *Frontiers in microbiology* 7.

ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Оригинални научни приноси:

- За първи път се изследва прекия ефект на пребиотиците инулин, бета-глюкан, галактоолигозахарид, ксилоолигозахарид, пектин и хитозан върху адхезивната способност на *Lactobacillus rhamnosus* 1010, *Lactobacillus paracasei* 8458 и *Lactobacillus acidophilus* 11 като се демонстрира, че различните пребиотици имат различни ефекти върху пробиотичните щамове.
- За първи път се изследва прекия ефект на метаболитните продукти от инкубирането на щамовете *Lactobacillus brevis* 3448 и *Lactobacillus brevis* 8429 с ксилоолигозахариди, инулин, пектин и хитозан върху имунния отговор *ex vivo* при нормално физиологично състояние и състояние на възпаление, като се показва, че метаболитите влияят основно върху секрецията на провъзпалителните цитокини, макрофагите и регулаторните Т-клетки.

Научни приноси с потвърдителен характер:

- Потвърдена е щамовата специфичност на имуномодулаторните и адхезивни способности на пробиотиците.
- Потвърдена е хипотезата, че пребиотиците влияят върху пробиотичния потенциал и могат да променят пробиотичните ефекти на бактериите в една или друга посока.

Научно-приложни приноси:

- Познаването на имуномодулаторните свойства на конкретни пробиотични щамове, инкубирани с различни пребиотици дава възможност за селекция на подходяща комбинация за лечение или облекчаване на симптомите на различни заболявания, включително автоимунни, алергични и туморни.

СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИЯТА

Sredkova P., Iliev I., Dzhambazov B., Batsalova T. 2017. Prebiotic treatment influence the adhesion properties of three *Lactobacillus* strains. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences (IJCMAS)*, 6(9): 2914-2924.

Sredkova P., Batsalova T., Moten D., Dzhambazov B. 2017. Prebiotics can change the immunomodulatory properties of the probiotics. *Central European Journal of Immunology*, 42: accepted (импакт фактор за 2016 г. - 0.776)

Участие в научни форуми във връзка с дисертацията

Sredkova P., Batsalova T., Moten D., Zheleva P., Iliev I., Dzhambazov B. 2014. Adhesion properties of *Lactobacillus* strains treated with oligosaccharides and beta-glucane. 3rd *Balkan Scientific Conference on Biology*, Plovdiv, Bulgaria, May 30 – June 1, 2014.

БЛАГОДАРНОСТИ

Изказвам най-сърдечната си благодарност и признателност на проф. д-р Балик Джамбазов за оказаната ми помощ при реализацията на настоящата работа.

Благодаря на д-р Цветелина Бацалова за подкрепата и съдействието, което получих през годините за осъществяването на дисертационния труд.

Изказвам благодарности и към всички преподаватели от катедра "Биология на развитието" за предоставените ми възможности за практическа работа.

IMMUNOMODULATORY PROPERTIES OF PROBIOTICS AND PREBIOTICS

Pavlina Yavorova Sredkova

(PhD thesis – SUMMARY)

Gut microbiota has a major impact on the gastrointestinal metabolism and nutrient absorption, and thereby plays a critical role for maintaining of the human health. During the last years, different probiotics and prebiotics have been suggested as an effective approach for health improvement by using their capacity to modulate the immune system.

In the present study, we investigated the adhesion properties of three lactobacilli strains (*Lactobacillus rhamnosus* 1010, *Lactobacillus acidophilus* 11, and *Lactobacillus paracasei* 8458) as well as the immunomodulating properties of metabolic products from two strains *Lactobacillus brevis* (3448 and 8429) cultured with different prebiotics.

Using *in vitro* model system based on cell lines derived from colon epithelial cells, we have determined the adherence ability of the studied bacterial strains following treatment with different prebiotics (inulin, pectin, chitosan, galacto-oligosaccharides, xylooligosaccharides and beta-glucan). Our results demonstrated significant reduction of lactobacilli adhesion after treatment with beta-glucan and chitosan. Conversely, xylooligosaccharides- and galacto-oligosaccharides-treated bacteria showed enhanced ability to adhere to enterocyte-like cell lines. Treatment with inulin did not show pronounced effect on lactobacilli adhesion, while apple pectin exhibited species-specific effects.

The cytokine secretion and the profile of the immune cells in inflammatory conditions by using a collagen-induced arthritis (CIA) model, an animal model for RA, was also examined. Metabolic products from xylooligosaccharides decreased the levels of IFN- γ , IL-6, IL-17 and TNF- α in both cultures, from immunized and non-immunized mice. In contrast, the metabolic products from inulin, pectin and chitosan increased the concentrations of these cytokines with highest values for the pectin. Neither of investigated prebiotics influenced the secretion of IL-10. In addition, we found changes in the percentage of macrophages, which were different for the tested prebiotics. Also, the metabolic products from pectin and chitosan caused loss of T-cells (CD3⁺) and increased percentages of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells and CD8⁺CD279⁺ anergic T cells. Hence, our data indicate that the immunomodulating properties of the probiotics are strain-specific and prebiotic-dependent.

Therefore, the metabolic products resulting from culturing of different probiotic strains with different prebiotics can have different effects on the immune response.