



**ПЛОВДИВСКИ УНИВЕРСИТЕТ „ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ“
БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА „БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ“**

ИВИЦА ДИМОВ

**„ИЗСЛЕДВАНЕ СИНЕРГИСТИЧНИЯ ЕФЕКТ
НА ПРЕБИОТИЧНИ ОЛИГОЗАХАРИДИ ВЪРХУ
ЕНЗИМИ ОТ ВЪГЛЕХИДРАТНАТА ОБМЯНА
И АНТИОКСИДАНТНАТА ЗАЩИТА НА ОРГАНИЗМА“**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за придобиване на образователна и научна степен
„Доктор“ по докторска програма „Биохимия“
Професионално направление 4.3 „Биологически науки“
Област на висшето образование 4. „Природни науки, математика и
информатика“

**Научни ръководители: проф. д-р Илия Илиев
доц. д-р Анелия Биволарска**

Пловдив, 2021

Дисертационният труд се състои от 146 машинописни страници. Той е онагледен с 50 фигури и 32 таблици. В библиографската справка са включени 217 литературни източника на латиница.

Докторантът работи като асистент в катедра по медицинска биохимия към Фармацевтичен факултет на Медицински университет – Пловдив.

Експерименталните изследвания са проведени в катедра по Биохимия и микробиология към Биологическия факултет на Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“ и в лабораториите на Технологичен център на ПУ „Паисий Хилендарски“.

Дисертационният труд е обсъден от катедрен съвет на катедра „Биохимия и микробиология“ към Биологическия факултет на ПУ „Паисий Хилендарски“, състоял се на 30.06.2021 г. и насрочен за публична защита пред научно жури, сформирано със заповед Р-33-3326 на Ректора на ПУ „Паисий Хилендарски“.

Дисертационният труд е насрочен за защита пред научно жури в състав:

1. Проф. Ана Манева, д.б.н.
2. Проф. Диана Иванова, д.б.н.
3. Проф. Искра Иванова, д.б.н.
4. Доц. д-р Соня Костадинова, д.б.
5. Проф. д-р Илия Илиев, д.б.

Резервни членове: Проф. д-р Василий Ишев, д.м.

Доц. д-р Тонка Василева, д.б.

Публичната защита на дисертационният труд ще се състои на 15.10.2021 г. от 14:00 часа в зала Компас на ПУ „Паисий Хилендарски“ на заседание на научно жури.

Изразявам своите най-дълбоки благодарности на:

Научните ми ръководители проф. д-р Илия Илиев и доц. д-р Анелия Биволарска за гласуваното доверие, безрезервната подкрепа, проявеното търпение, безценните съвети и техния висок професионализъм и компетентно ръководство.

Членовете на научното жури за градивната критика и отзивчивостта.

Колегите от катедра по медицинска биохимия, ФФ, МУ – Пловдив и катедра по Биохимия и микробиология на ПУ „Паисий Хилендарски“ за подкрепата, толерантността и приятелството.

Семейството и приятели за подкрепата, вярата, доверието и мотивацията.

От автора

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

ГИТ – гастроинтестинален тракт

ФОЗ – фруктоолигозахариди

ГалОЗ – галактоолигозахариди

SD – стандартно отклонение

DP – степен на полимеризация

RT – време на задържане

CFU/mL – колонии формиращи единици за милилитар

ROS – реактивни кислородни видове

H₂O₂ – водороден пероксид

Hb – хемоглобин

GSH – редуциран глутатион

GSSG – окислен глутатион

SOD – супероксид дисмутаза

CAT – каталаза

GR – глутатион редуктаза

FRAP – желязо редуцираща способност

AGEs – продукти с напреднало гликиране

SCFAs – късоверижни мастни киселини

ВЪВЕДЕНИЕ

Развитието на пребиотиците като хранителни добавки в търсене на максимален ефект върху поддържане баланса на чревната микробиота на човека, предизвиква засилен научен интерес през последните две десетилетия. Пребиотиците са несмилаеми хранителни съставки, които селективно стимулират растежа, състава и активността на чревната микрофлора и по този начин подобряват здравето и благосъстоянието на гостоприемника. Предимно са късоверижни олигозахари с ниска степен на полимеризация, изградени от 3 до 10 монозахаридни остатъка. Въпреки че голям брой олигозахариди са били предложени като пребиотици, с такъв статус са някои от тях, като инулиновия тип фруктоолигозахариди, трансгалактоолигозахаридите и лактулозата.

От друга страна, световните проучвания насочват все повече вниманието си към изследване функцията на оксидативния стрес, при развитието на различни патофизиологични заболявания. Нарушенията, предизвикани от оксидативния стрес на клетъчно и тъканно ниво, са предпоставка за развитие на метаболитен синдром, с риск за прогресиране в по-сериозни усложнения – захарен диабет тип 2, сърдечно-съдови заболявания, стеатоза на черния дроб, астма, както и някои ракови заболявания.

В контекста на решаването на здравословните проблеми на съвременното общество, все повече научни изследвания докладват за положителните ефекти на пребиотиците при борбата с физиологичните нарушения, предизвикани от оксидативния стрес. Основният механизъм на действие на пребиотиците е свързан с растежа и развитието на полезната микрофлора в ГИТ на гостоприемника и получаване на късоверижни мастни киселини. Те подпомагат нормалното функциониране на чревната лигавица, стимулират имунната система, като потискат производството на провъзпалителните цитокини, подобряват глюкозната хомеостаза и др.

Обект на проучване в настоящия дисертационен труд е синергистичният ефект на пребиотичните олигозахариди и пробиотични млечнокисели бактерии върху ензими от въглехидратната обмяна и антиоксидантната защита на организма, след трансформация в различни дялове на ГИТ при използване на симулирани условия в *in vitro* гастроинтестинална система.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд е да се изследва синергистичният ефект на комбинация от пребиотични олигозахариди и пробиотични млечнокисели бактерии върху ензими от въглехидратната обмяна и антиоксидантната защита при еритроцити след метаболитни трансформации в условия на *in vitro* система на гастроинтестинален тракт.

За реализирането на тази цел са поставени следните **задачи**:

1. Да се изследват структурните промени на пребиотични олигозахариди и полизахариди и техния пребиотичен потенциал в условия, симулиращи стомах в *in vitro* система на гастроинтестинален тракт.
2. Да се изследва метаболизирането на модифицираните пребиотични олигозахариди и полизахариди и пребиотичния им потенциал, поставени в условия, симулиращи тънки черва в *in vitro* система на гастроинтестинален тракт в присъствие на пробиотичен щам *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14.
3. Да се изследва метаболизирането на модифицираните пребиотични олигозахариди и полизахариди и пребиотичният им потенциал, поставени в условия, симулиращи тънки черва в *in vitro* система на гастроинтестинален тракт в присъствие на комбинация от пробиотични млечнокисели бактерии.
4. Да се изследва ефектът на пребиотични олигозахариди върху активността на ензими, отговорни за пъроначалната хидролиза на въглехидрати *in vitro*.
5. Да се изследва влиянието на метаболитите и остатъчните фракции от пребиотични олигозахариди и полизахариди, получени в условията на *in vitro* система на гастроинтестинален тракт в присъствие на пробиотични млечнокисели бактерии, върху метаболизма на еритроцити в *in vitro* модел предизвикана хипергликемия.

МАТЕРИАЛИ

1. Пребиотични олигозахариди и полизахариди

Лактулоза; Галактоолигозахарид; Фруктоолигозахарид; Инулин; β -глюкан; Полизахарид, изолиран от *Plantago major*; Пребиотик, съдържащ лактулоза и β -глюкан (Център по технологии на ПУ „Паисий Хилендарски“).

2. Микроорганизми

За изследване на пребиотичния потенциал са използвани три вида млечнокисели бактерии: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14, *Streptococcus thermophilus* St81 и *Lactobacillus acidophilus* A₁, предоставени от колекцията на катедра „Биохимия и микробиология“ на Биологическия факултет, ПУ „Паисий Хилендарски“.

3. Реактиви, стандарти и ензими

Използваните реактиви, стандарти и ензими са представени в дисертационния труд.

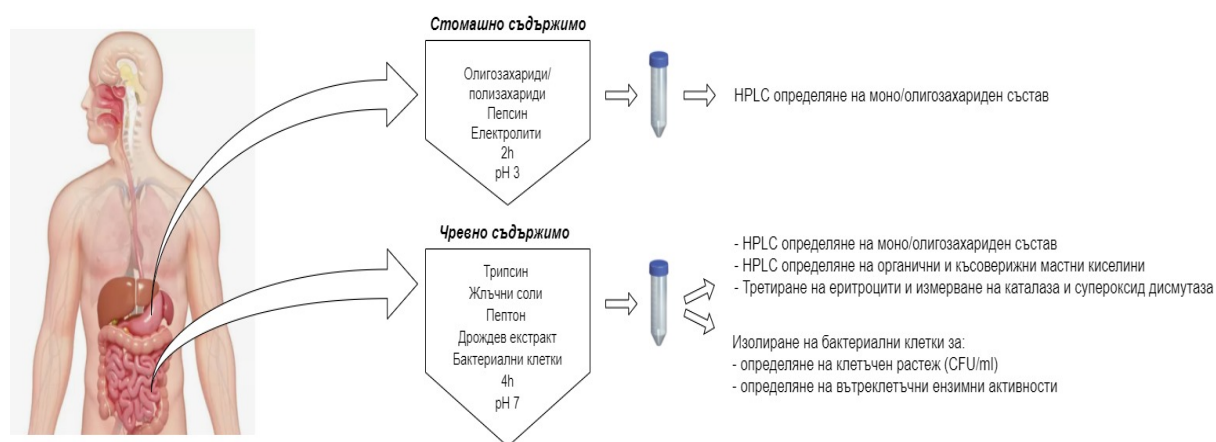
4. Човешки еритроцити

Еритроцитите са изолирани от кръв, взета от 10 млади мъже, клинично здрави, без хронични заболявания, неприемащи медикаменти, 27 ± 3 годишна възраст.

МЕТОДИ

1. *In vitro* модел на гастроинтестинален тракт

Експерименталния модел включва изследване със специално конструирана система на *in vitro* ГИТ – стомах и черва. Той е представена на фиг. 1.



Фигура 1. Схема на заложените експерименти и последващите анализи.

2. Пробоподготовка

2.1. Изолитране на бактериални клетки за определяне на ензимна активност.

2.2. Дезинтегриране на клетки от използваните щамове при анализ на ензимните активности.

2.3. Изолитране на еритроцити.

2.4. Третиране на еритроцити с олигозахариди.

2.5. Третиране на еритроцити с проби, получени след ферментация на пребиотични олигозахариди, в присъствие на пребиотични щамове.

2.5. Лизиране на еритроцити по метода на Ferreira *et al.* (1999).

3. Спектрофотометрични методи

3.1. Количествено определяне на белтък по метода на Bradford (1976).

3.2. Определяне на концентрация на хемоглобин с готов колориметричен тест, предлаган от фирма Human (*Hemoglobin liquid color Photometric colorimetric test, cyanmethemoglobin method – Wiesbaden, Germany*).

3.3. Определяне на ензимна активност на млечнокисели бактерии

3.3.1. Определяне на ензимна активност на α -галактозидаза по метода на Petek *et al.* (1976).

3.3.2. Определяне на ензимна активност на β -галактозидаза по метода на Lim & Chae (1989).

3.3.3. Определяне на ензимна активност на α -глюкозидаза по метода на Dewi *et al.* (2007).

3.3.4. Определяне на ензимна активност на β -глюкозидаза по метода на Martin & Akin (1988).

3.3.5. Определяне на ензимна активност на инулиназа по метода на Miller (1959).

3.4. Определяне на ензимна активност на α -амилаза по метода на Bernfeld (1955).

3.5. Определяне на активност на ензими от вълехидратния метаболитъм на еритроцити

3.5.1. Определяне на ензимна активност на хексокиназа по метода на Bergmeyer *et al.* (1983).

3.5.2. Определяне на ензимна активност на лактат дехидрогеназа с готов колориметричен кит за лабораторни цели, предоставен от *Chema diagnostic (Monsano An Italy)*.

3.6. Определяне на антиоксидантна активност на еритроцити

3.6.1. Определяне на ензимна активността на глутатион редуктаза по метода на Mavis & Stellwagen (1968).

3.6.2. Определяне на желязо редуциращата способност (FRAP) по метода на Benzie & Strain (1996).

3.6.3. *Определяне на активността на каталаза с готов колориметричен тест, предлаган за лабораторни цели от фирма Arbor Assays (DetectX[®] Catalase Colorimetric Activity Kit – Arbor Assays: Interactive Assay Solutions, Michigan, USA).*

3.6.4. *Определяне на активността на супероксид дисмутаза с готов колориметричен тест, предлаган за лабораторни цели от фирма Arbor Assays (DetectX[®] Superoxide Dismutase (SOD) Colorimetric Activity Kit – Arbor Assays: Interactive Assay Solutions, Michigan, USA).*

4. Хроматографски методи

4.1. Определяне на монозахариден и олигозахариден състав

Монозахаридният и олигозахаридният състав се определят на високоефективна течна хроматографска система Shimadzu (Japan), свързана с аутосемплер Nexera X2, SIL-30AC, термостат CTO-20AC и детектор RID-20A, Shimadzu (Japan). Десет μL от проба са инжектирани и елюирани в колона Tracer 5 μm 15 x 0.46 (Technohroma, Spain) с подвижна фаза 65:35 ацетонитрил:вода, скорост на потока 0.78 mL/min и температура 35°C. Резултатите са анализирани с LabSolution, Nexera-XR-RF софтуер. Идентифицирането на пиковете е осъществено по времената на задържане спрямо стандарти на монозахаридите и олигозахаридите: глюкоза, галактоза, фруктоза, захароза, лактулоза, малтоза, малтотриоза, рафиноза, галактоолигозахарид, фруктоолигозахарид и инулин. Изведени са уравнения, описващи площта на пика (y) и концентрацията на монозахаридите или олигозахаридите (x , mg/mL).

4.2. Определяне на органични и късоверижни мастни киселини

Органичните и късоверижните мастни киселини са определени на високоефективна течна хроматографска система Konik-Tech, with UV Detector (Konik-tech, $\lambda = 210 \text{ nm}$). Използвана е колона Aminex HPL-87H 5 μm (250 x 4.6 mm) при изократна подвижна фаза, съдържаща 0.005 M H₂SO₄, скорост на потока 0.6 mL/min, температура на колоната 40°C. Идентифицирането на пиковете е осъществено по времената на задържане спрямо стандарти на органични и късоверижни мастни киселини: D-лактат, L-лактат, ацетат, пропионат и бутират с концентрации от 1.56 mmol/L до 25 mmol/L. Изведени са корелационни уравнения, описващи площта на пика (y) и концентрацията на органичните и късоверижните мастни киселини (x , mmol/L). Стандартните прави са с линейни участъци между концентрацията (1.56 mmol/L – 25 mmol/L) и с коефициент на корелация $r^2 > 0.999$.

5. Определяне на клетъчен растеж

Бактериалните клетки са култивирани на MRS среда с 2% агар-агар за 24 h при 37°C. Посяти са със система *Eddy jet 2W*, като са използвани 50 µl от проба. Колонии формиращи единици за милилитър (CFU/mL), са определени на *Sphere Flash*.

6. Статистически методи

Статистическите анализи са направени със статистическа програма SPSS, версия 19.0 (*SPSS Inc., Chicago, IL, USA*) и GraphPad Prism version 7.00 for Windows (*GraphPad Software, La Jolla California USA*).

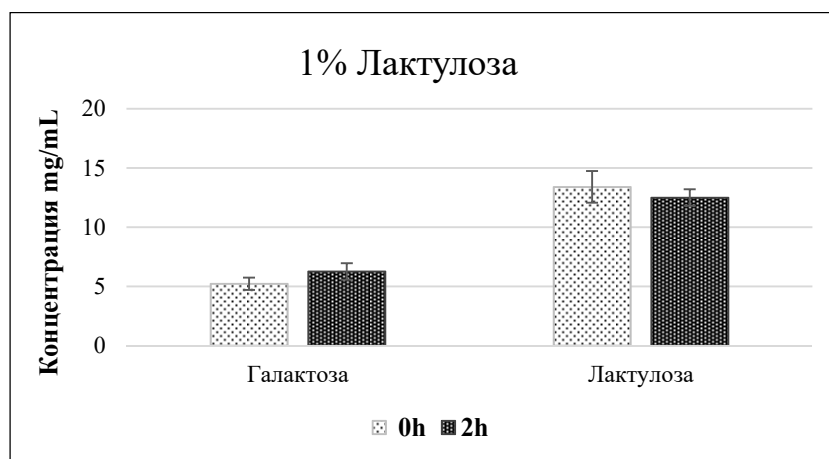
РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

Глава I. Структурни промени на пребиотични олигозахариди и полизахариди в симулиран модел на гастроинтестинален тракт

1. Структурни промени при пребиотични олигозахариди

В условията на експеримента на симулиран *in vitro* стомах, се постави количество от изследваните пребиотици, равно на 1% спрямо обема на съдържимото. Отчетоха се промените във въглехидратната композиция на разтвора, симулиращ стомашен сок, при сравнение на нулев и втори час от инкубирането.

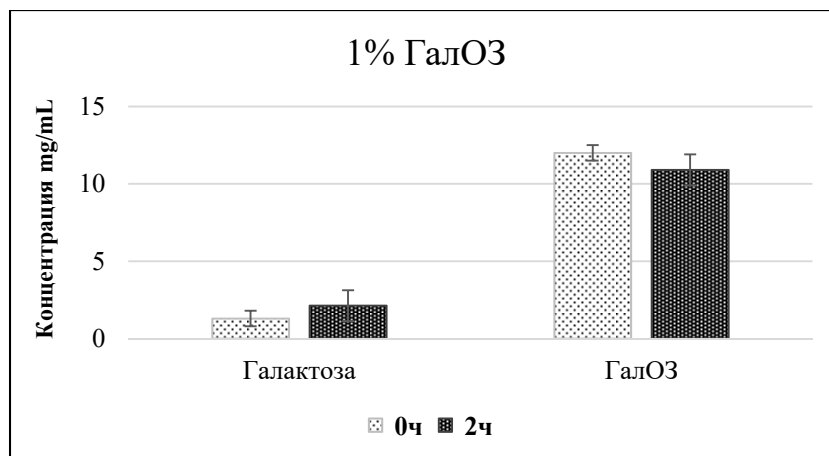
При лактулозата се наблюдава частично хидролизиране на втория час, при отчетено завишаване концентрацията на галактозата, в резултат на разкъсването на гликозидната връзка между галактозата и фруктозата (Фиг. 2).



Фигура 2. Хидролиза на 1% лактулоза в условия, симулиращи стомашен сок.

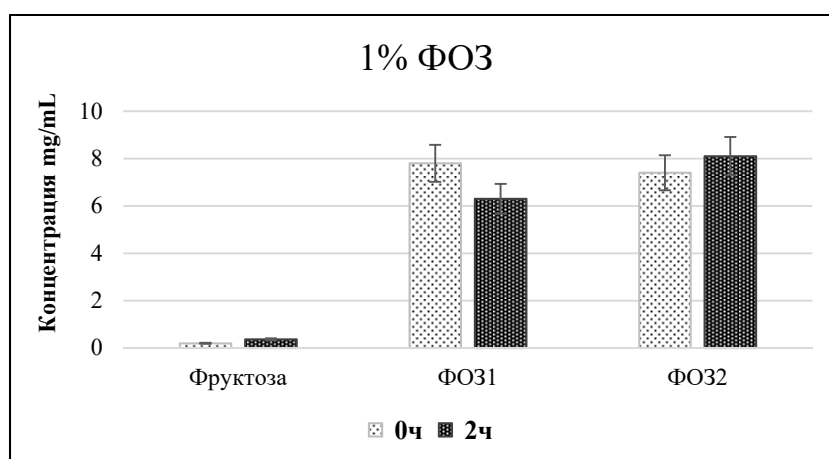
При изследване на структурните промени на ГалОЗ в симулирани условия на стомашен сок, се наблюдава частично хидролизиране и увеличаване с 30% количеството на галактозата след 2 h третиране в описаните условия (Фиг. 3). Това е в резултат на химичното разкъсване на гликозидните връзки в ГалОЗ. Въпреки това ГалОЗ показват висока степен на резистентност към стомашния сок, което ги запазва като структура и следователно съхранява и техния пребиотичен потенциал.

При проведения експеримент, с участието на ФОЗ с различна степен на полимеризация (DP 4 и 6), се проследи до каква степен те са резистентни на хидролиза. В условия на симулиран стомашен сок се наблюдава частична хидролиза на ФОЗ₁ (DP 4), за сметка на увеличено съдържание на фруктоза. ФОЗ₂ (DP 6) се оказаха по-устойчиви на хидролиза при изследваните условия (Фиг. 4).



Фигура 3. Хидролиза на 1% ГалОЗ в условия, симулиращи стомашен сок.

Фруктоолигозахаридите от инулинов тип, които ние използвахме са сравнително по-неустойчиви на киселите условия на стомашния сок, но сравнително краткото време на експозиция ги предпазва от хидролиза.



Фигура 4. Хидролиза на 1% ФОЗ, съдържащ ФОЗ₁ (DP 4) и ФОЗ₂ (DP 6) в условия, симулиращи стомашен сок.

В условията, симулиращи тънки черва, при проследяване в динамика до четвъртия час, се установи по-пълно хидролизиране и усвояване на лактулозата и нейните монозахаридни компоненти. Причината за наблюдаваните промени се крие, не само в променените физиологични условия, но и от присъствието на млечнокисели бактерии, важни като част от полезната микрофлора (Табл. 1).

Галактоолигозахаридите са едни от първите олигозахариди с доказан пребиотичен ефект. Те се синтезират в резултат на трансгалактозидазна реакция в присъствие на лактоза над 15%. Те притежават различна степен на полимеризация, но като структура са много сходни.

Таблица 1. Остатъчна концентрация на монозахариди и олигозахариди, получени след ферментация на 1% лактулоза в условия, симулиращи тънки черва в присъствие на *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14.*

Време (h)	Фруктоза (mg/mL)	Галактоза (mg/mL)	Лактулоза (mg/mL)
0	0.67 ± 0.2	5.82 ± 0.3	11.04 ± 0.25
1	0.57 ± 0.21	9.11 ± 0.25	8.93 ± 0.27
2	0.6 ± 0.18	9.5 ± 0.19	7.7 ± 0.27
3	0	11.3 ± 0.15	7.7 ± 0.18
4	0	34.6 ± 0.31	7.27 ± 0.41

*Изразени като средни стойности от три измервания ± SD.

При изследване динамиката на утилизацията на ГалОЗ в тънките черва се наблюдава драстично намаляване на олигозахаридите с над 70% след 4 h инкубация (Табл. 2). Постепенното увеличаване концентрацията на галактозата вероятно е резултат от слабото ѝ метболизиране от страна на присъстващия пробиотичен щам *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14 в *in vitro* системата. Изследваните ГалОЗ съдържат фракции с различна степен на полимеризация от 4 до 8. От получените резултати се вижда, че в значително по-висока степен се хидролизират ГалОЗ в симулираните условия на тънките черва, в присъствие на L14 (Табл. 2). Вероятната причина е стимулираната секреция на ензима β-галактозидаза от пробиотика, който хидролизира гликозидните връзки в структурата на ГалОЗ, отцепвайки галактозни единици. От друга страна, увеличената концентрация на галактоза в края на инкубационния период свидетелства, че щамът трудно усвоява този въглехидрат в първите четири часа на инкубация.

Таблица 2. Остатъчна концентрация на монозахариди и олигозахариди, получени след ферментация на 1% ГалОЗ в условия, симулиращи тънки черва в присъствие на *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14.*

Време (h)	Галактоза (mg/mL)	ГалОЗ (mg/mL)
0	6.76 ± 0.5	5.92 ± 0.38
1	6.15 ± 0.34	5.39 ± 0.29
2	7.48 ± 0.28	4.79 ± 0.54
3	7.64 ± 0.18	2.25 ± 0.19
4	7.87 ± 0.32	1.63 ± 0.11

*Изразени като средни стойности от три измервания ± SD.

В резултат на процесите, протичащи в условията на симулирани тънки черва, се получава частично увеличение в количеството на FOZ_1 за сметка на FOZ_2 , което е резултат на хидролизата на FOZ_2 със DP 6 до FOZ_1 (DP 4) и фруктоза. Усвояването на получената фруктоза се регистрира по-ясно на четвъртия час от процеса, което се осъществява от присъстващия пребиотичен щам *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14 (Табл. 3) в условия, симулиращи тънките черва. Вероятно използваният пробиотичен щам секретира ензими, които хидролизират гликозидните връзки в използваните FOZ (екзоинулиназа, ендоинулиназа).

Таблица 3. Остатъчна концентрация на монозахариди и олигозахариди, получени след ферментация на 1% FOZ в условия, симулиращи тънки черва в присъствие на *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14.*

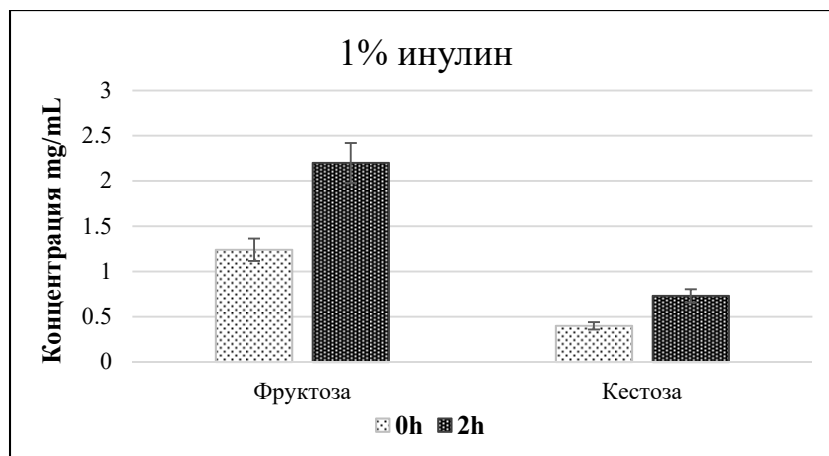
Време (h)	Фруктоза (mg/mL)	FOZ_1 (mg/mL)	FOZ_2 (mg/mL)
0	0.8 ± 0.11	7 ± 0.5	6.3 ± 0.7
1	0.8 ± 0.09	6.9 ± 0.41	6.1 ± 0.55
2	0.7 ± 0.15	9 ± 0.56	5.5 ± 0.42
3	0.6 ± 0.2	8 ± 0.29	5.5 ± 0.29
4	0.6 ± 0.1	7.6 ± 0.44	5.2 ± 0.47

*Изразени като средни стойности от три измервания \pm SD.

2. Структурни промени при полизахариди с пребиотичен потенциал

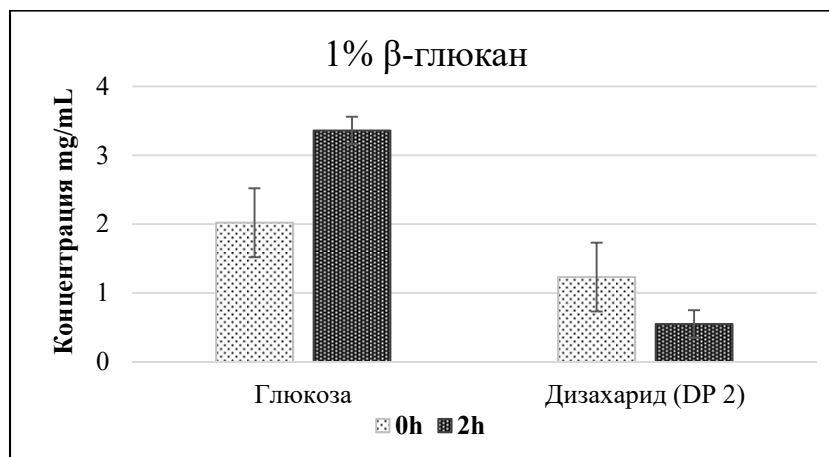
Инулинът е полифруктозан с DP от 10 до 20 фруктозни остатъка. Известно е, че той е чувствителен към кисела среда и се хидролизира до фруктоза. Ето защо е важно да се знае до каква степен се хидролизира в условия на симулиран стомашен сок и какво се случва с неговата утилизация в условия на *in vitro* тънки черва. Нашите данни показват, че в киселото рН, каквото е в стомаха, се отделя фруктоза и тризахаридът кестоза. Техните нива се увеличават пропорционално спрямо продължителността на хидролитичния процес (Фиг. 5).

В условия, симулиращи стомашен сок установихме, че настъпва частична хидролиза на молекулата на β -глюкана, чрез отцепване основно на терминалните глюкозни остатъци. Допълнително доказателство за този процес са получените данни и за хидролизата на дизахаридите (целобиоза), отцепвани от структурата на β -глюкана. Наблюдава се увеличаване количеството на свободната глюкоза с около 50% след 2 часа инкубация в условия, симулиращи стомашен сок (Фиг. 6).



Фигура 5. Хидролиза на 1% инулин в условия, симулиращи стомашен сок.

Бета-глюканът показва сравнително добра резистентност към стомашния сок за време на инкубация 2 часа (Фиг. 6). Това от една страна дава информация за възможната активация на микробиома в тънките черва, но от друга се запазва имунностимулиращият ефект на β -глюкана, докладван от редица автори (Cárdenas-Reyna *et al.*, 2017; Choromanska *et al.*, 2018).

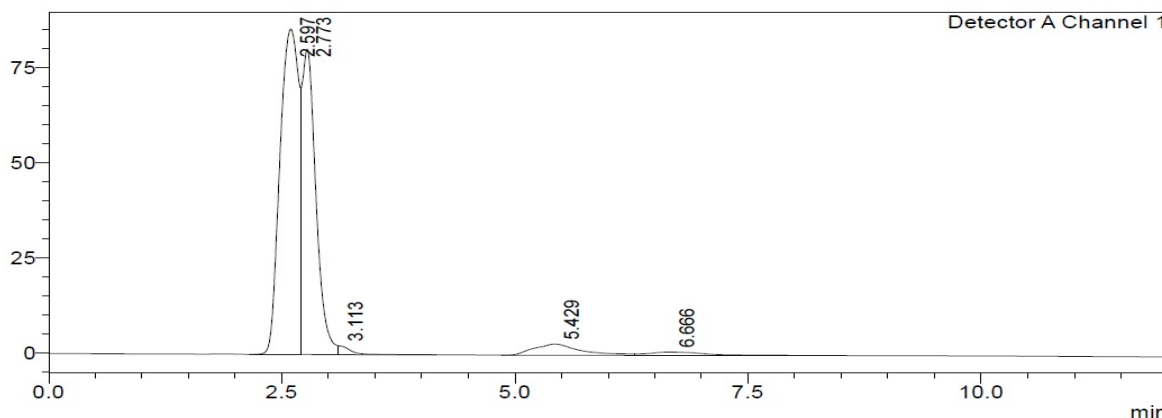


Фигура 6. Хидролиза на 1% β -глюкан в условия, симулиращи стомашен сок.

В последния експеримент от първия етап на настоящото изследване се проследи възможността да се хидролизира полизахарид от *Plantago major*. Известно е терапевтичното действие на полизахарида от живовляк, повлияващ от една страна функционирането на имунната система на човека, а от друга, действащ като филмираещ агент на стомашно-чревната лигавица (Gomez-Flores *et al.*, 2000; Lans *et al.*, 2007; Najafian *et al.*, 2018). Полизахаридът от живовляк по структура се отнася към пектиновите полизахариди, за които е характерно наличието на много и различни по структура мономери и много разклонена верига (Lukova *et al.*, 2020).

В резултат на хидролазните процеси в условия, симулиращи стомашно съдържимо, използваният полизахарид, получен от листа на *Plantago major*, частично се хидролизира до монозахариди – главно галактоза (RT

5.429) и олигозахарид (RT 6.666) с DP по-високо от 6 (Фиг. 7). Вероятно отделената галактоза е терминално разположена в структурата на полизахарида и е лесно достъпна на въздействието върху гликозидната връзка, с която се свързва към основната молекула.



Фигура 7. HPLC профил на продуктите, получени след хидролиза на полизахарид в условия, симулиращи стомашен сок при 2 h.

От резултатите получени от метаболизирането на инулина в условия, симулиращи тънки черва, може да заключим, че продължава хидролитичният процес и нивото на фруктозата се увеличава (Табл. 4), както и това на кестозата. Обяснението за настъпилите промени в структурата на инулина, вероятно се крие в секрецията на хидролазни ензими, в конкретност инулиназа от пробиотичния щам *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14.

Таблица 4. Остатъчна концентрация на монозахариди и олигозахариди, получени след ферментация на 1% инулин в условия, симулиращи тънки черва в присъствие на *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14. *

Време (h)	Фруктоза (mg/mL)	Кестоза (mg/mL)
0	3.38 ± 0.21	2.18 ± 0.2
1	3.4 ± 0.1	2.15 ± 0.31
2	4.45 ± 0.25	1.36 ± 0.06
3	5.4 ± 0.2	2.02 ± 0.17
4	5.6 ± 0.15	1.95 ± 0.27

*Изразени като средни стойности от три измервания ± SD.

В условията, симулиращи процесите в тънките черва се потвърждава процеса на хидролиза и усвояване на глюкозните единици, получени от β-глюкана и от съпътстващите олигозахариди. При проследяване количеството на глюкозата в продължение на 4 часа в условия, симулиращи тънки черва се наблюдава средно с 30% увеличение на концентрацията ѝ, което

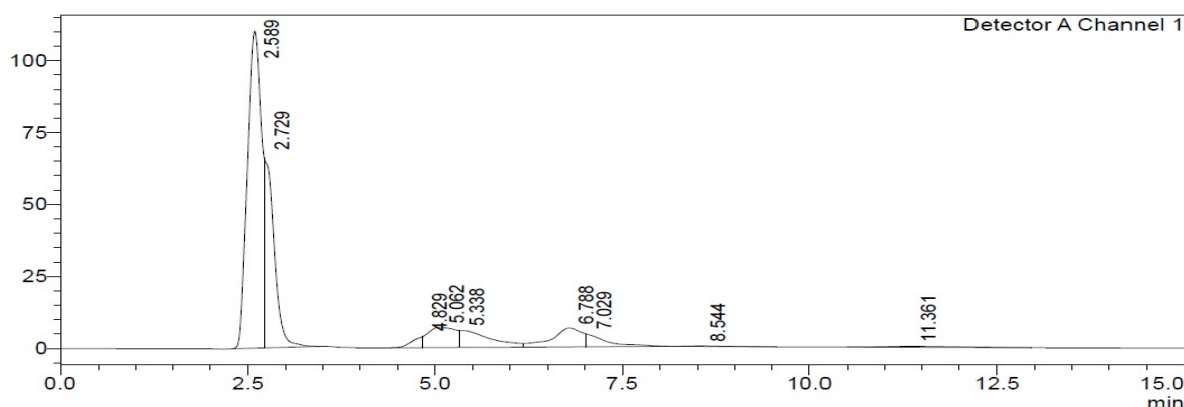
вероятно се дължи на секретирани глюкохидролази от съответния пробиотик. Поради същата причина се наблюдава и нарастване количеството на дизахариди от типа на целобиоза, които са отчупени от основната верига на β -глюкана. По-големи олигозахаридни фрагменти не се отчитат (Табл. 5).

Таблица 5. Остатъчна концентрация на монозахариди и олигозахариди, получени след ферментация на 1% β -глюкан в условия, симулиращи тънки черва в присъствие на *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14.*

Време (h)	Глюкоза (mg/mL)	DP 2 (mg/mL)	DP 3 (mg/mL)
0	2.7 ± 0.48	2.2 ± 0.19	0
1	2.9 ± 0.6	2.06 ± 0.25	0
2	4.08 ± 0.4	2.5 ± 0.3	0
3	4.4 ± 0.25	2.37 ± 0.27	0.2 ± 0.05
4	3.8 ± 0.35	3.3 ± 0.2	0.1 ± 0.07

*Изразени като средни стойности от три измервания ± SD.

В условия, симулиращи чревно съдържимо, хидролизата на полизахарида (RT 2.729) и производството на монозахариди продължават. Съдържанието на монозахариди вероятно е: галактуронова киселина, галактоза и рамноза. Това е доказано в проучване, проведено от Lukova и колеги (Lukova *et al.*, 2017). Олигозахаридите с DP 6 и по-високо от 6 също се отцепват от полизахарида на живовляка (RT-6.788 и RT-7.029) (Фиг. 8).



Фигура 8. HPLC профил на продуктите, получени след хидролиза на полизахарид в условия, симулиращи тънки черва при 4h в присъствие на *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14.

Получените данни за изменения на структурите на полизахарида от живовляк в симулирани гастроинтестинални условия, хвърлят светлина за възможните механизми на взаимодействие на полизахарида и неговите фрагменти върху епителните клетки на чревната лигавица. Тези данни са в потвърждение на формираните към момента тези, обясняващи наблюдавания здравословен ефект.

Глава II. Метаболитни промени при пробиотичен щам *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14, култивиран в *in vitro* ГИТ в присъствие на пребиотици

Получаването на данни за стимулиране растежа на пробиотичния щам *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14, в присъствие на лактулоза като единствен въглехидратен източник, разкрива потенциал за специфичното ѝ утилизиране. При изследване активността на ензимите, участващи в ензимната хидролиза на лактулоза се установи, че при пробиотичен щам *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14 се стимулира основно секрецията на β -галактозидаза до третия час на инкубирането (0.45 ± 0.08 U/mg протеин) (Табл. 6).

Таблица 6. Динамика на ензимните активности на *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14 в симулирани условия на тънки черва в присъствие на 1% лактулоза.*

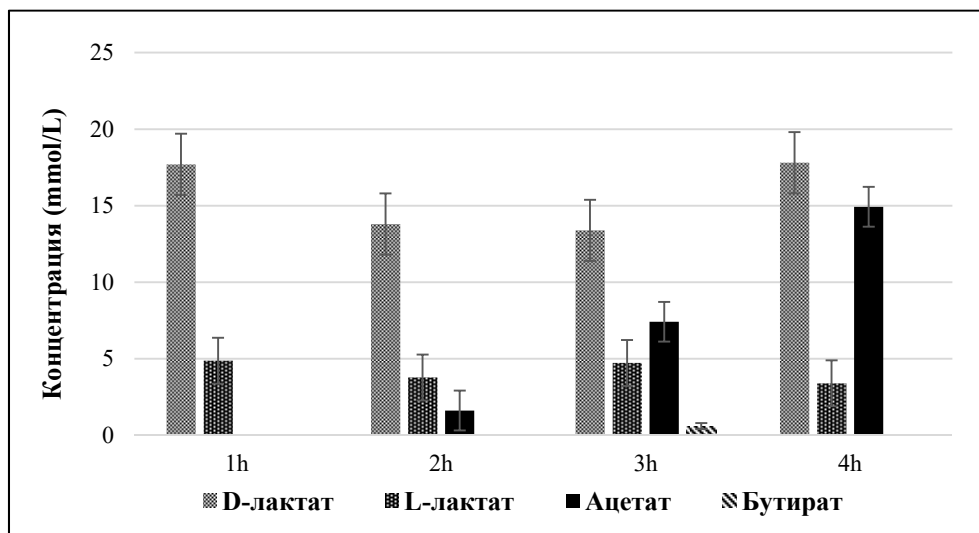
Време (h)	α -галактозидаза (U/mg)	β -галактозидаза (U/mg)	α -глюкозидаза (U/mg)
2	0	0.46 ± 0.05	0.03 ± 0.01
3	0.04 ± 0.009	0.45 ± 0.08	0
4	0	0	0

*Изразени като средни стойности от три измервания \pm SD.

На фиг. 9 са представени данни, които сочат, че пробиотичният щам L14 метаболизира основно фруктозата и частично галактозата до D-лактат (18 mmol/L) още в първия час на инкубирането. Съотношението на D-лактат/L-лактат е $17:5 \text{ mmol/L}$, което се запазва в приблизително същите граници до четвъртия час на инкубация. Важен момент е получаването на ацетат на 2 h от култивирането (около 1.6 mmol/L), което се увеличава до 15 mmol/L на 4 h от инкубирането. Епизодично е отчетено минимално количество бутират на 3 h. Получените данни показват, че дори в симулирани условия на тънки черва, типичният представител на хомоферментативните лактобацили *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14 променя метаболизма си от хомоферментативен към смесен тип. Механизмът, индуциращ метаболитната промяна към смесена ферментация, не е изяснен в настоящия момент в детайли и най-вероятно тази промяна може да бъде идентифицирана чрез изучаване експресията на гени, отговорни за синтеза на специфични ензими от метаболитните пътища (Garrigues *et al.*, 1997). Гладуването най-вероятно е един от факторите, който изменя метаболизма от хомоферментативен към смесен тип (Borch *et al.*, 1991; Ignatova *et al.*, 2009).

В резултат на настъпилите частични хидролизни процеси на ГалОЗ в условия, симулиращи стомах, се получават монозахаридни и дизахаридни остатъци. Последните са лесно усвоими от използвания пробиотичен щам

L14 в първите 2 h на инкубиране в условия, симулиращи тънките черва. Проучването на Fara и колеги съобщава, че щамът *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CRL450 притежава висока β -галактозидазна активност и синтезира ГалОЗ от лактоза и лактулоза (Fara *et al.*, 2020).



Фигура 9. Концентрация на органични и късоверижни мастни киселини при култивиране на *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14 в симулирани условия на тънки черва в присъствие на 1% лактулоза.

В табл. 7 са показани данните за вътреклетъчната ензимна активност на *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14, в присъствие на 1% ГалОЗ в условия, симулиращи тънките черва. Бета-галактозидазата проявява най-висока активност на 4-тия час от инкубирането (0.13 U/mg протеин), което се обяснява с индуцирането и от присъстващите в средата нехидролизирани ГалОЗ. Данните за ензимната активност показват индуциране на α -глюкозидаза до третия час и липсата на α -галактозидаза през целия период на инкубиране.

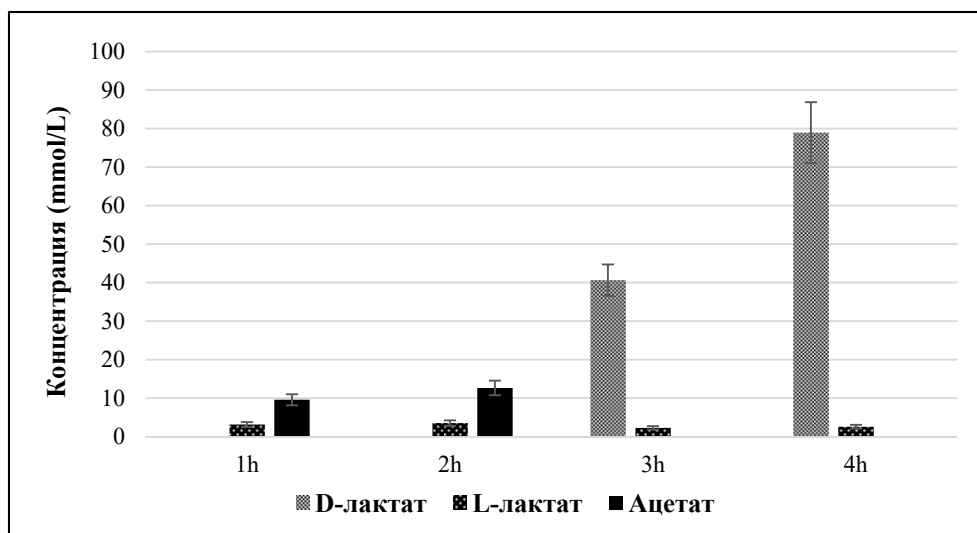
Таблица 7. Динамика на ензимните активности на *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14 в симулирани условия на тънки черва в присъствие на 1% ГалОЗ.*

Време (h)	α -галактозидаза (U/mg)	β -галактозидаза (U/mg)	α -глюкозидаза (U/mg)
2	0.02 \pm 0.008	0.04 \pm 0.01	0.14 \pm 0.07
3	0	0.12 \pm 0.05	0.2 \pm 0.04
4	0	0.13 \pm 0.08	0.09 \pm 0.01

*Изразени като средни стойности от три измервания \pm SD.

На фиг. 10 са представени резултатите за отчетените органични киселини в посочени по-горе условия. Профилът на лактата и ацетата при метаболизиране на ГалОЗ драстично се отличава от този при метаболизиране на лак-

тулоза. В началото на процеса основно се получава ацетат и в малки количества L-лактат, като след 2 h количеството на D-лактата рязко се увеличава за сметка на липсата на ацетат. Наблюдава се отново смесен тип ферментация, но с променени съотношения в динамика на L- и D-лактата и ацетата.



Фигура 10. Концентрация на органични и късоверижни мастни киселини при култивиране на *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14 в симулирани условия на тънки черва в присъствие на 1% ГалОЗ.

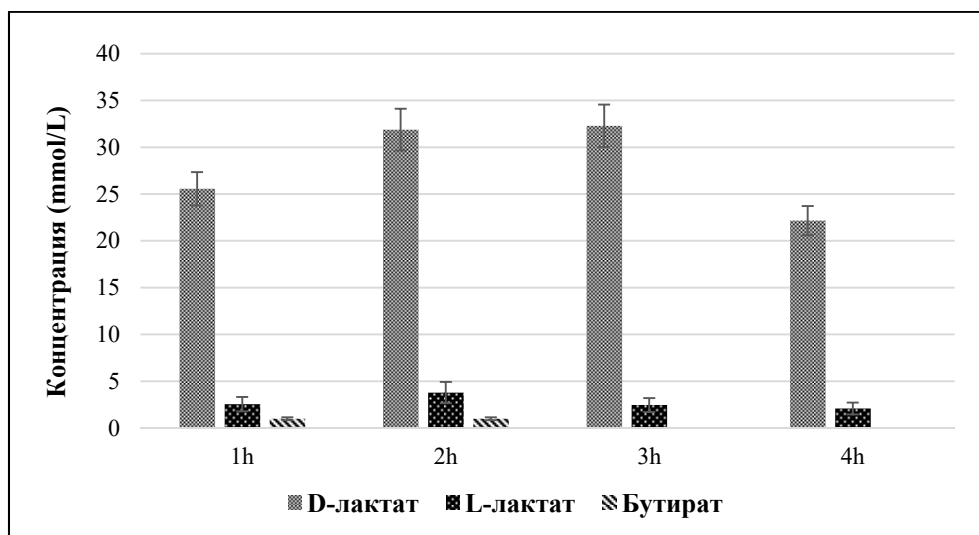
Пребиотичният потенциал на ФОЗ се дължи на специфични гликозидни връзки между фруктозните мономери, които трудно се хидролизират или въобще не се разграждат от ензимите, секретирани в ГИТ на човека (Singh *et al.*, 2017). От данните за метаболитния профил на *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14 в симулирани условия на тънки черва в присъствие на 1% ФОЗ се вижда, че активността на ензимите β -галактозидаза, α -галактозидаза и β -глюкозидаза е по-скоро незначителна или остатъчна от вложените активирани пробиотични бактерии. Наблюдава се индуциране на инулиназната активност след 2-рия час с максимум на 3-тия час от инкубирането, вследствие на наличието на ФОЗ, като единствени въглехидратни субстрати. Тяхното усвояване стартира с хидролизата им до фруктоза (Табл. 8).

Таблица 8. Динамика на ензимните активности на *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14 в симулирани условия на тънки черва в присъстви на 1% ФОЗ.*

Време (h)	β -галактозидаза (U/mg)	α -глюкозидаза (U/mg)	β -глюкозидаза (U/mg)	Инулиназа (U/mg)
2	0.1 \pm 0.009	0	0	0.05 \pm 0.01
3	0.04 \pm 0.01	0.03 \pm 0.007	0.04 \pm 0.009	0.2 \pm 0.05
4	0.05 \pm 0.01	0.04 \pm 0.006	0	0.13 \pm 0.03

*Изразени като средни стойности от три измервания \pm SD.

При проследяване на крайните метаболити, получавани в резултат на инкубиране на L14 в присъствие на ФОЗ, се установи наличие на D-лактат, като основен метаболит. В ограничени количества, в първите два часа на инкубиране се детектира бутират, което вероятно се дължи на активирани метаболитни процеси при внесената активна суспензия от пробиотика. Прави впечатление липсата на ацетат при метаболизирането на ФОЗ (Фиг. 11).



Фигура 11. Концентрация на органични и късоверижни мастни киселини при култивиране на *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14 в симулирани условия на тънки черва в присъствие на 1% ФОЗ.

Инулинът е полифруктозан с разтителен произход. Той се отнася към първо поколение пребиотици и заедно с ГалОЗ и ФОЗ е най-изследваният пребиотик. Заедно с това е известно, че в кисели условия (при $pH < 4$) неговата структура се разцепва до отделни фруктозни единици и ФОЗ от инулинов тип. Доказана е и щамовата специфичност на пробиотиците при усвояването на инулин (Vanderputte *et al.*, 2017). Тези предварителни данни и липсващите данни за степента на хидролиза на инулина в симулирани условия на ГИТ ни послужиха като основа за провеждане на следващия експеримент.

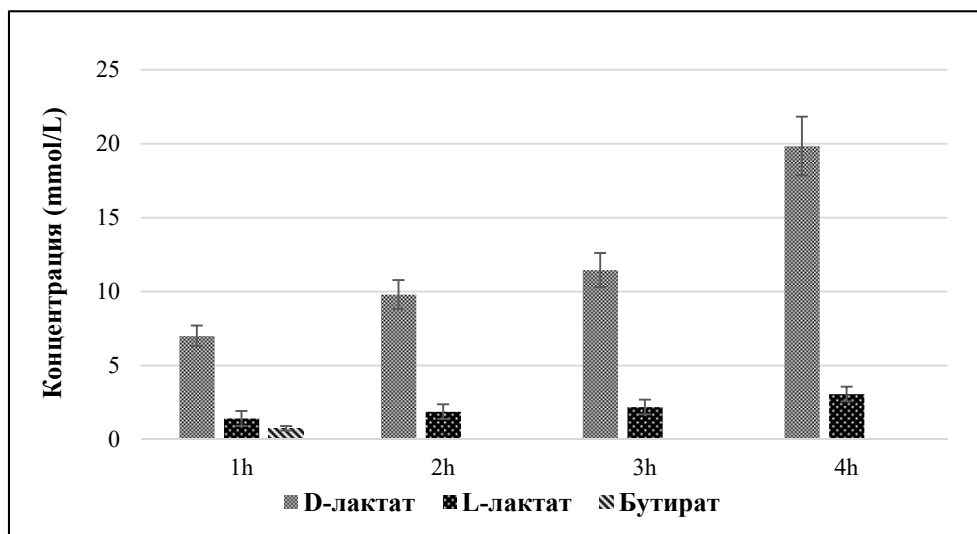
При изследване активността на ензими, секретирани от пробиотичния щам L14, култивиран в *in vitro* симулирани условия на тънко черво, се наблюдава, че основните ензими, които се индуцират от присъствието на лактулоза и ГалОЗ (α -глюкозидаза и β -галактозидаза), не се секретират при наличие на инулин и негови производни. Установи се обаче, че щам L14 притежава макар и слаба инулиназна активност. Последната се проявява най-добре на 4-тия час от инкубирането, което може да се обясни с изчерпването на минималните налични количества от лесно усвоимите фруктоза и ФОЗ и наличие на високомолекулен инулин, чиято хидролиза изисква ензими от типа на инулиназите (Табл. 9).

Таблица 9. Динамика на ензимните активности на *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14 в симулирани условия на тънки черва в присъствие на 1% инулин.*

Време (h)	β -галактозидаза (U/mg)	α -глюкозидаза (U/mg)	Инулиназа (U/mg)
2	0	0.02 \pm 0.001	0.04 \pm 0.005
3	0.04 \pm 0.008	0.07 \pm 0.01	0.08 \pm 0.01
4	0.6 \pm 0.1	0.04 \pm 0.001	0.11 \pm 0.01

*Изразени като средни стойности от три измервания \pm SD.

При изследване на метаболитите, които се получават в резултат на инкубирането на щам L14 в получените по-горе условия се установи, че основно се получава D-лактат. Съотношението между D-лактат и L-лактат е 10:1. Наблюдава се известно количество бутират от късоверижните мастни киселини в началото на процеса, който липсва в по-късните етапи на развитие (Фиг. 12). Вероятно настъпват допълнителни метаболитни трансформации на бутирата. Прави впечатление, че присъствието на инулин и негови по-нискомолекулни деривати инициира типичен хомоферментативен процес при изследвания щам L14.



Фигура 12. Концентрация на органични и късоверижни мастни киселини при култивиране на *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14 в симулирани условия на тънки черва в присъствие на 1% инулин.

Бета-глюканът е високомолекулен полизахарид, който трудно се хидролизира от ензимите в човешкия ГИТ. Неговата частична хидролиза, която се наблюдава в условията, симулиращи стомаха, благоприятства растежа на микробиотата в интестиналния тракт. Данните за активността на β -глюкозидазата в пробиотичния щам потвърждават, че нарастването на клетъчния растеж е следствие от усвояването първоначално на наличната

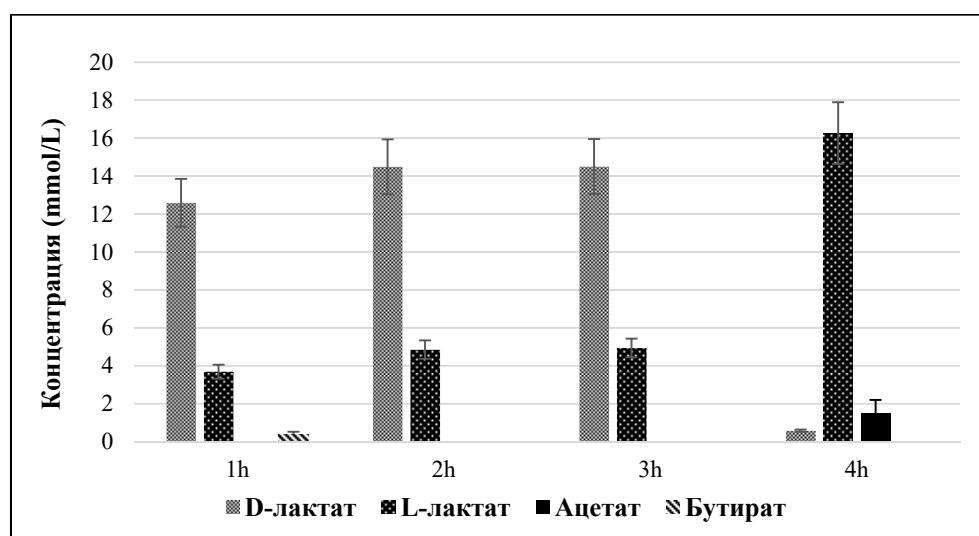
глюкоза, а впоследствие на хидролизирането на наличната целобиоза. Молекулата на β -глюкана е трудно достъпна за хидролиза от щам *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14, поради липсата на ендоглюканазни ензими, които да я разцепват на по-нискомолекулни фрагменти и на екзоглюканази, които да откъсват терминални глюкозни единици от основната структура. Данните за изследваните ензими потвърждават известните факти, че те не се индуцират от β -глюкана и целибиозата (Табл. 10).

Таблица 10. Динамика на ензимните активности на *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14 в симулирани условия на тънки черва в присъствие на 1% β -глюкан.*

Време (h)	α -галактозидаза (U/mg)	α -глюкозидаза (U/mg)	β -глюкозидаза (U/mg)
2	0	0.04 \pm 0.01	0.45 \pm 0.1
3	0.03 \pm 0.009	0.05 \pm 0.01	1.27 \pm 0.16
4	0	0.04 \pm 0.008	1.33 \pm 0.18

*Изразени като средни стойности от три измервания \pm SD.

Профилът на органичните и късоверижните мастни киселини е представен на фигура 13 и показва отново промяната от хомоферментативен към смесен тип метаболизъм при изследвания щам *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14. Наблюдава се съотношение около 3:1 на D-лактат към L-лактат до третия час на процеса. На 4-тия час настъпва рязка промяна в профила на късоверижните мастни киселини с преобладаване на L-лактат, наличие на ацетат и много малки количества D-лактат.



Фигура 13. Концентрация на органични и късоверижни мастни киселини при култивиране на *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14 в симулирани условия на тънки черва в присъствие на 1% β -глюкан.

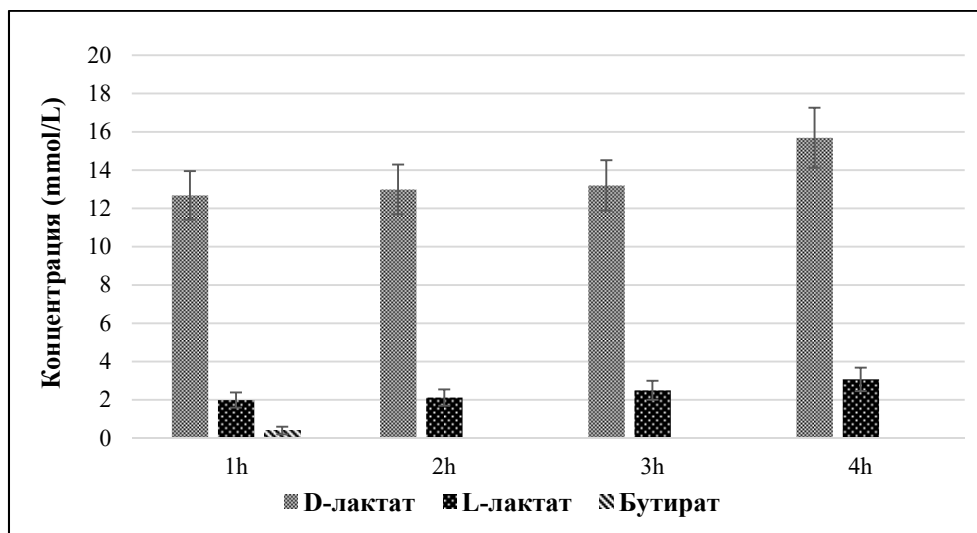
Предположението за частична ензимна хидролиза на полизахарида от живовляк се потвърждава от измерената активност на ензима α -галактозидаза, която би могла да отцепи терминалните галактозни остатъци от структурата на пектиновия полизахарид. Измерената активност на другите два ензима, β -галактозидаза и α -глюкозидаза е по-ниска от тази на α -галактозидазата (Табл. 11).

Таблица 11. Динамика на ензимните активности на *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14 в симулирани условия на тънки черва в присъствие на 0.75% полизахарид от *P. major* L.*

Време (h)	α -галактозидаза (U/mg)	β -галактозидаза (U/mg)	α -глюкозидаза (U/mg)
2	0.05 ± 0.002	0.01 ± 0.005	0.04 ± 0.001
3	0.011 ± 0.001	0.04 ± 0.001	0.05 ± 0.004
4	0.09 ± 0.03	0.08 ± 0.002	0.06 ± 0.003

*Изразени като средни стойности от три измервания ± SD.

Профилът на органичните киселини, получавани по време на инкубация на полизахарида, показва по-скоро хомоферментативен тип на метаболизъм, отчитайки D-лактат:L-лактат в съотношение от 6:1 до 10:1 (Фиг. 14).



Фигура 14. Концентрация на органични и късоверижни мастни киселини при култивиране на *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14 в симулирани условия на тънки черва в присъствие на 0.75% полизахарид от *P. major* L.

Развитието на пребиотици като хранителни добавки, в търсене на максимален ефект върху чревната микробиота на човека, предизвиква научния интерес за изучаване комбинираното въздействие на два и повече пребиотика върху полезната микрофлора. В последните наши експерименти ние

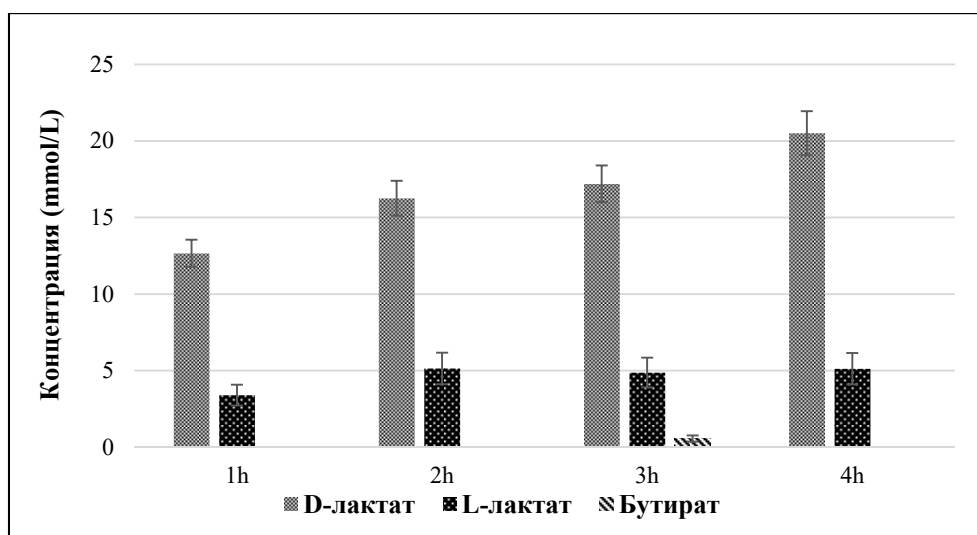
проследяваме влиянието на комбинацията от 0.5% лактулоза и 0.5% β-глюкан върху метаболизма на пробиотичния щам L14 в условия, симулиращи тънко черво. От данните за активността на тестваните ензими ясно се вижда индуцирането на секрецията на β-галактозидаза в резултат на присъствието на лактулоза и на β-глюкозидазата за хидролизирането на β-глюкана. Ако се отчете нивото на ензимните активности на двата ензима се вижда, че активността на β-галактозидазата е 20 пъти по-висока от тази на β-глюкозидазата. Това може да се обясни с много по-достъпната за усвояване молекула на лактулоза (Табл. 12).

Таблица 12. Динамика на ензимните активности на *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14 в симулирани условия на тънки черва в присъствие на 0.5% лактулоза и 0.5% β-глюкан.*

Време (h)	α-галактозидаза (U/mg)	β-галактозидаза (U/mg)	β-глюкозидаза (U/mg)
2	0.02 ± 0.005	0.28 ± 0.05	0.03 ± 0.01
3	0	5.72 ± 0.7	0.25 ± 0.05
4	0	1.02 ± 0.08	0.02 ± 0.005

*Изразени като средни стойности от три измервания ± SD.

Профилът на органичните киселини показва по-скоро хомоферментативен метаболизъм на L14 при съотношение на D-лактат към L-лактат в границите на 5:1 (Фиг.15)



Фигура 15. Концентрация на органични и късоверижни мастни киселини при култивиране на *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14 в симулирани условия на тънки черва в присъствие на 0.5% лактулоза и 0.5% β-глюкан.

ГЛАВА III. Метаболитни промени при пробиотични щамове *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14, *St. thermophilus* St81 и *Lb. acidophilus* A₁ култивирани, в *in vitro* ГИТ в присъствие на пребиотици

Развитието на пробиотичните и пребиотичните продукти на пазара включва комбинация от пребиотични олигозахариди и пробиотични щамове, за да се покрият по-голяма част от изискванията към тях за въздействие върху здравния статус на човека. В тази връзка, ние проследяваме хода на метаболитните процеси в присъствие на три олигозахарида (лактоулоза, ГалОЗ и ФОЗ) при култивиране на два изследвани пробиотична щамове. От данните за динамиката на ензимните активности се вижда, че активността на β -галактозидазата е по-висока за по-продължителен период, което вероятно се дължи на двойно по-голямото количество олигозахариди, чиито гликозидни връзки се хидролизират от този ензим. Нивото на инулиназната активност е с около 50% по-ниско от β -галактозидазата (Табл. 13).

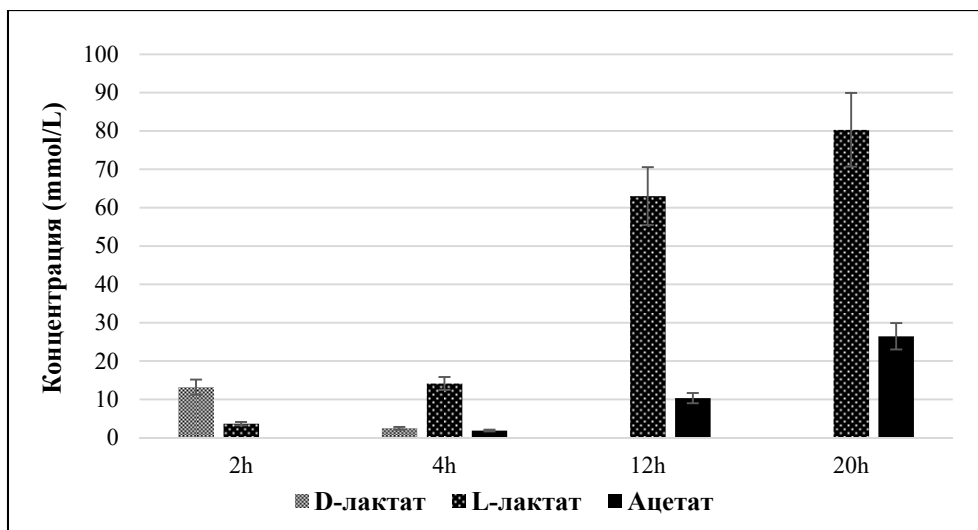
Данните за продуцираните органични киселини показват най-високи нива на L-лактата на 20-тия час на процеса. Заедно с това, количеството на ацетата също е много по-високо в края на процеса. Съотношението на лактат:ацетат е 3:1 (Фиг. 16).

Таблица 13. Динамика на ензимните активности на щамове *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14 и *St. thermophilus* St81, включени в метаболизма на 0.5% ФОЗ, 0.5% ГалОЗ и 0.5% лактулоза.

Време (h)	α -галактозидаза (U/mg)	β -галактозидаза (U/mg)	α -глюкозидаза (U/mg)	Инулиназа (U/mg)
2	0	0.09 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01
3	0.02 ± 0.005	0.7 ± 0.2	0.03 ± 0.008	0.35 ± 0.2
4	0.02 ± 0.004	2.04 ± 0.4	0.03 ± 0.007	0.8 ± 0.1
12	0.03 ± 0.008	1.76 ± 0.5	0.03 ± 0.006	1.16 ± 0.5
20	0.04 ± 0.01	1.14 ± 0.4	0.03 ± 0.01	1.34 ± 0.4

*Изразени като средни стойности от три измервания ± SD.

Интерес представлява да се изучи в бъдеще кой от двата пробиотика секретира по-голямо количество ацетат, като в първите два часа на култивирането се продуцират само L-и D-лактат. Освен това, остават неизяснени въпросите за превключване от хомоферментативен на смесен тип метаболизъм.



Фигура 16. Концентрация на органични и късоверижни мастни киселини при култивиране на шамове *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14 и *St. thermophilus* St81 в присъствие на 0.5% ФОЗ, 0.5% ГалОЗ и 0.5% лактулоза в условия, симулиращи тънки черва.

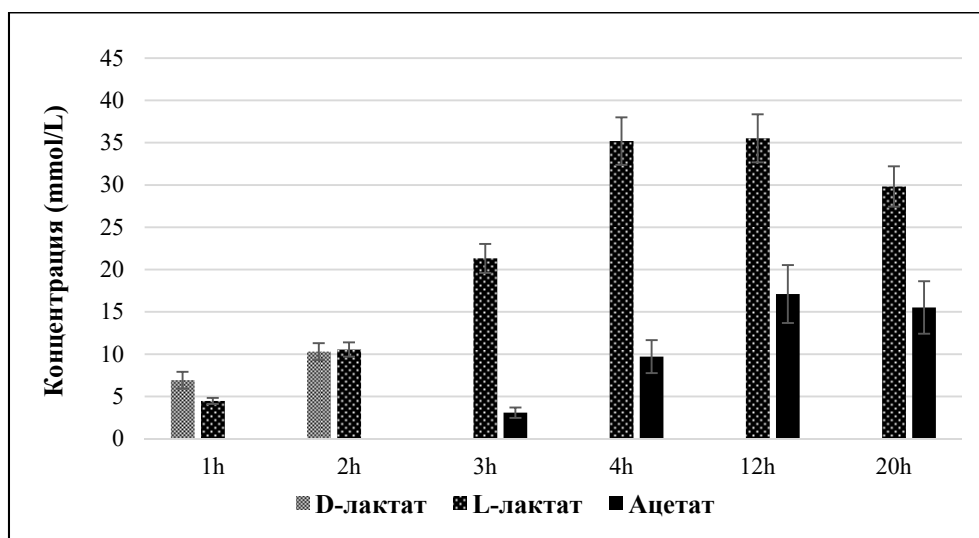
В следващия експеримент се проследи метаболитният профил на трите култивирани пробиотични щама *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14, *St. thermophilus* St81 и *Lb. acidophilus* A₁ в присъствие на използваните пребиотици (ФОЗ, ГалОЗ и лактулоза). От данните за секретирания ензими виждаме, че до 12-тия час почти с еднаква скорост се усвояват ГалОЗ и ФОЗ, поради високите активности на инулиназата и β-галактозидазата, която остава с висока активност до края на инкубационния период (Табл. 14).

Таблица 14. Динамика на ензимните активности на шамове *Lb. bulgaricus* L14, *St. thermophilus* St81 и *Lb. acidophilus* A₁, включени в метаболизма на 0.5% ГалОЗ, 0.5% ФОЗ и 0.5% лактулоза.

Време (h)	α-галактозидаза (U/mg)	β-галактозидаза (U/mg)	α-глюкозидаза (U/mg)	Инулиназа (U/mg)
2	0.1 ± 0.005	0.13 ± 0.04	0.05 ± 0.02	0.08 ± 0.01
3	0	0.1 ± 0.02	0.01 ± 0.001	0.11 ± 0.08
4	0.02 ± 0.006	1.19 ± 0.19	0.05 ± 0.01	1.3 ± 0.1
12	0.01 ± 0.004	2.19 ± 0.24	0.03 ± 0.01	1.15 ± 0.09
20	0.01 ± 0.001	2.02 ± 0.41	0.02 ± 0.01	1 ± 0.07

*Изразени като средни стойности от три измервания ± SD.

При изследване на метаболитните процеси в присъствие на три пробиотични щама от три различни вида, се наблюдава значително увеличаване количеството на ацетата след 4-тия час на инкубиране (Фиг. 17). Съотношението между L-лактата и ацетата е почти 2:1. Присъствието на по-голямо количество ацетат вероятно би способствало процесите на синтез на бутират в *in vivo* условия, в присъствие на останалите микроорганизми от микробиома на дебелото черво.



Фигура 17. Концентрация на органични и късоверижни мастни киселини при култивиране на щамове *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14, *St. thermophilus* St81 и *Lb. acidophilus* A₁, в присъствието на 0.5% ГалОЗ, 0.5% ФОЗ и 0.5% лактулоза.

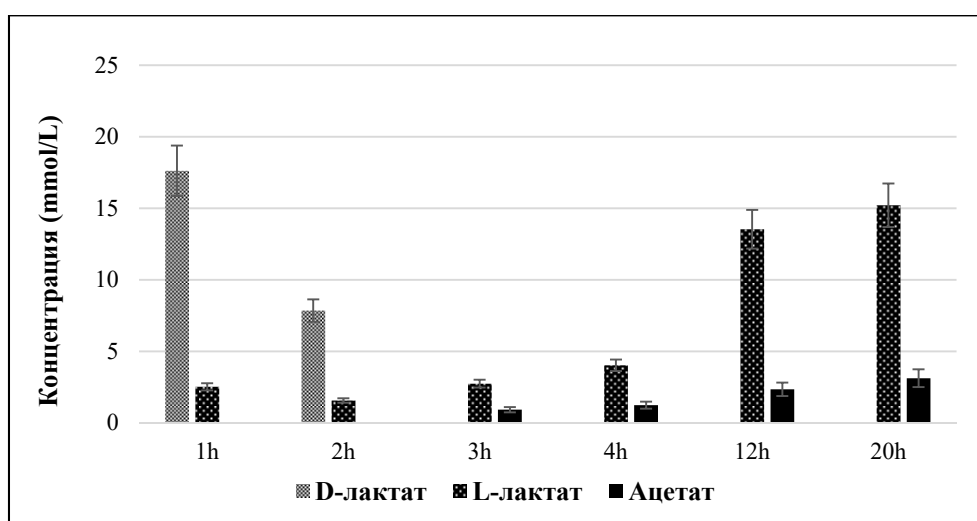
В последния експеримент беше проследен клетъчният растеж и метаболизмът на трите пробиотични щама в присъствие на 3 таблетки пребиотик, съдържащи в своята структура лактулоза и β -глюкан. Количеството на лактулоза и β -глюкан съответства на 0.5% лактулоза и 1% β -глюкан в експерименталния обем. От табл. 15 виждаме плавно индуциране и покачване активността на β -галактозидазата, която достига своя максимум на 12-тия час от инкубирането, след което се понижава. Това показва, че лактулозата се е усвоила и метаболизирала от трите пробиотични култури, и вероятно е отговорна за растежа на клетките. Бета-глюканът, поради своята сложна структура, вероятно частично се разгражда. Това може да се обясни с наличие на индуцираната β -глюкозидаза с максимална активност на 4-тия час от инкубационния период.

От анализа на получените органични киселини се вижда отново преминаване от хомоферментативен към смесен метаболизъм. В началото на инкубационния период нивото на D-лактат е високо, докато накрая L-лактат основно присъства в пробите. Ацетат се продуцира след 3-тия час. Съотношението между L-лактата и ацетата е почти 5:1 (Фиг. 18).

Таблица 15. Динамика на ензимните активности на щамове *Lb. bulgaricus* L14, *St. thermophilus* St81 и *Lb. acidophilus* A₁, включени в метаболизма на 3 таблетки пребиотик.

Време (h)	α -галактозидаза (U/mg)	β -галактозидаза (U/mg)	α -глюкозидаза (U/mg)	β -глюкозидаза (U/mg)
2	0.03 ± 0.01	0.53 ± 0.11	0.09 ± 0.01	0.03 ± 0.001
3	0.02 ± 0.005	0.59 ± 0.14	0.03 ± 0.01	0.2 ± 0.01
4	0.03 ± 0.006	1.34 ± 0.58	0.08 ± 0.02	0.4 ± 0.1
12	0	4 ± 0.87	0.14 ± 0.02	0.03 ± 0.01
20	0.01 ± 0.001	2.39 ± 0.19	0.13 ± 0.01	0

*Изразени като средни стойности от три измервания ± SD.



Фигура 18. Концентрация на органични и късоверижни мастни киселини при култивиране на щамове *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14, *St. thermophilus* St81 и *Lb. acidophilus* A₁, в присъствието на 3 таблетки пребиотик.

Основното познание за ензимната активност на лактобацили може да позволи създаване на нов дизайн на нови по-ефективни пребиотици, а може също така да цели и идентифициране на потенциални ензимни индикатори на главната метаболитна активност, при оценка на тяхното влияние върху гастроинтестиналния тракт. Използвайки гликотехнология, пребиотиците могат да бъдат моделирани така, че да съдържат определени монозахариди и/или комбинация от връзки, които индуцират или усилват специфичната гликозидазна активност на пробиотични щамове *Lactobacillus* или други пробиотични микроорганизми.

Глава IV. Ефект на пребиотични олигозахариди върху ензими от въглехидратната обмяна и антиоксидантната защита при *in vitro* третиране еритроцити в условия на хипергликемия

В следващия етап на изследването ние проследяваме влиянието на получените метаболити от изследваните олигозахариди, в резултат на метаболитните процеси осъществявани в условия, симулиращи ГИТ и съпътстващите пребиотични щамове, върху антиоксидантните ензими, каталаза и супероксид дисмутаза в еритроцити, в условия на *in vitro* индуцирана хипергликемия. Използваните проби със съпътстващите метаболити, включени в експеримента са представени в табл. 16.

Таблица 16. Проби използвани за третиране на еритроцити за определяне на каталазна и супероксид дисмутазна активност.

Използвана комбинация от захари с пребиотичен ефект	Пребиотични щамове	Продължителност на ферментационния процес	Концентрация на органични киселини (mmol/L)
0.5% ГалОЗ 0.5% ФОЗ 0.5% лактулоза	<i>Lb. bulgaricus</i> L 14 и <i>St. thermophilus</i> St 81	4 h	D-лактат – 2.47 L-лактат – 14.15 Ацетат – 1.88
		12 h	L-лактат – 63 Ацетат – 10.32
		20 h	L-лактат – 80.3 Ацетат – 26.46
0.5% ГалОЗ 0.5% ФОЗ 0.5% лактулоза	<i>Lb. bulgaricus</i> L14, <i>St. thermophilus</i> St 81 и <i>Lb. acidophilus</i> A ₁	4 h	L-лактат – 35.19 Ацетат – 9.71
		12 h	L-лактат – 35.52 Ацетат – 17.11
		20 h	L-лактат – 29.83 Ацетат – 13.51
1% ГалОЗ 1% ФОЗ	<i>Lb. bulgaricus</i> L14 и <i>St. thermophilus</i> St 81	4 h	L-лактат – 25.64 Ацетат – 1.62
		12 h	L-лактат – 88.28 Ацетат – 7.42
		20 h	L-лактат – 86.98 Ацетат – 14.93
0.75% полизахарид от <i>Plantago major</i>	<i>Lb. bulgaricus</i> L14	4 h	D-лактат – 15.69 L-лактат – 3.07
3 таблетки пребиотик	<i>Lb. bulgaricus</i> L14, <i>St. thermophilus</i> St 81 и <i>Lb. acidophilus</i> A ₁	4 h	L-лактат – 4.02 Ацетат – 1.24
		12 h	L-лактат – 13.53 Ацетат – 2.35
		20 h	L-лактат – 15.21 Ацетат – 3.12

Супероксид дисмутазната активност е изключително важна за еритроцитите, тъй като се счита за първата линия на защита срещу ROS. Катализира преобразуването на супероксидните аниони до по-малко реактивния водороден пероксид (Lewandowski *et al.*, 2018), който в последваща реакция, катализирана от каталаза, се обезврежда до вода и кислород. Това определя тези два антиоксидантни ензима от изключителна важност за поддържане на ниски нива на оксиданти в еритроцитите, нужно за нормалното им функциониране и оцеляване.

При еритроцитите използвани за контрола, активността на каталазата се увеличава в трите подгрупи (при третиране с 5 mM, 50 mM и 100 mM глюкоза) в двата времеви диапазона, 24 h и 48 h (Табл. 17).

Присъствието на ГалОЗ, ФОЗ и лактулоза по 0.5% и пробиотични щамове *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14 и *St. thermophilus* St81 след 4 h инкубация в условия, симулиращи тънки черва, оказва по-значително увеличение в активността на каталазата единствено при еритроцити, третирани с 50 mM глюкоза за 24 h. В другите подгрупи не се наблюдават съществени различия. Същата тенденция се запазва и при проби, получени от 12 h и 20 h от третирането на посочените комбинации, в условия на *in vitro* ГИТ (Табл. 17). От получените резултати може да заключим, че активността на каталазата се поддържа в еднакви нива в присъствие на съответните проби. Това се дължи или на поддържащия ефект на изетите проби върху каталазната активност или на адаптивните механизми на самите еритроцити и невъзможността на органичните и късоверижните мастни киселини да окажат благоприятен ефект върху антиоксидантната защита.

Таблица 17. Ензимна активност на каталаза, изразена в U/g Hb в еритроцити, третирани с метаболити, получени след ферментация на 0.5% ГалОЗ, 0.5% ФОЗ и 0.5% лактулоза в присъствие на *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14 и *St. thermophilus* St81.

Проби	Глюкоза 5 mM		Глюкоза 50 mM		Глюкоза 100 mM	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h
Контрола	850	1085	926	1264	1030	1263
0.5% ГалОЗ + 0.5% ФОЗ + 0.5% лакт. 4h L14 + St81	826	1012	1161	1247	1097	1283
0.5% ГалОЗ + 0.5% ФОЗ + 0.5% лакт. 12h L14 + St81	877	1112	1102	1241	1121	1216
0.5% ГалОЗ + 0.5% ФОЗ + 0.5% лакт. 20h L14+St81	851	1106	994	1111	1157	1204

По отношение на супероксид дисмутаза, при същите условия на хипергликемия в контролната група еритроцити, се наблюдава спад на активността, както при 50 mM глюкоза, така и при 100 mM глюкоза спрямо подгрупата, която симулира концентрация на глюкоза в нормални физиологични условия. Тази тенденция се запазва и в двата времеви интервала (Табл. 18).

Таблица 18. Ензимна активност на супероксид дисмутаза, изразена в U/g Hb в еритроцити, третирани с метаболити, получени след ферментация на 0.5% ГалОЗ, 0.5% ФОЗ и 0.5% лактулоза в присъствие на *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14 и *St. thermophilus* St81.

Проби	Глюкоза 5 mM		Глюкоза 50 mM		Глюкоза 100 mM	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h
Контрола	871	868	578	483	538	464
0.5% ГалОЗ + 0.5% ФОЗ + 0.5% лакт. 4h L14 + St81	651	604	555	725	414	441
0.5% ГалОЗ + 0.5% ФОЗ + 0.5% лакт. 12h L14 + St81	631	604	516	930	424	435
0.5% ГалОЗ + 0.5% ФОЗ + 0.5% лакт. 20h L14 + St81	626	682	520	864	230	478

В нормални физиологични условия, с добавяне на 5 mM глюкоза, ензимната активност на супероксид дисмутаза се понижава спрямо контролата в трите проби и в двата времеви участъка, в диапазон между 25 – 30% (Табл. 18). При хипергликемия, предизвикана от 50 mM глюкоза и присъствие на метаболити, получени от изследваните олигозахариди по 0.5% и двата пробиотични щама, се наблюдава увеличение на супероксид дисмутазната активност на 48 h, спрямо 24 h. При еритроцити, третирани с проба, взета след 4 часа инкубиране в условия, симулиращи тънките черва, се наблюдава увеличение с 35%, а при тези третирани с проба от 12 часа от ферментацията, увеличението е с 48%. При проба, взета след 20 часа инкубация, ензимната активност на супероксид дисмутаза се увеличава с 44% (Табл. 17). Това бихме могли да обясним с активирането на вероятен компенсаторен механизъм, индуциран от окислителния стрес и увеличените нива на супероксидните аниони (Rajab & Haider, 2018; Morabito *et al.*, 2019). Дали този компенсаторен механизъм е индуциран от наличните късовежните мастни киселини в добавените проби, не може да се твърди на този етап на експеримента. Липсват и данни в световната литература. При влагане на 100 mM концентрация на глюкоза, активирането на подобен протективен ефект не се наблюдава и активността на ензима остава ниска. Тези резултати подкрепят литературните данни, които сочат, че силно из-

разената хипергликемия при *in vivo* и *in vitro* изследвания, предизвиква спонтанно гликиране на белтъците и загубата на тяхната функция (Viskupicova *et al.*, 2015; Rajab & Haider, 2018; Morabito *et al.*, 2020).

В табл. 19 са представени резултатите на каталазната активност на третираните еритроцити с проби, в които присъстват по 0.5% ГалОЗ, 0.5 % ФОЗ и 0.5% лактулоза, метаболизирани чрез добавянето на 3 пробиотични щама: *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14, *St. thermophilus* St81 и *Lb. acidophilus* A₁. Няма значителна промяна, в сравнение с предишните резултати. При третиране на еритроцити с проба, получена от четвъртия час от ферментацията на съответните олигозахариди и пробиотични щамове, продължителност 24 h, увеличение със 17%, спрямо контролната проба, се наблюдава при силно изразена хипергликемия (100 mM глюкоза). При пробата взета от 12 h, в същите условия на хипергликемия и времетраене, се забелязва увеличение на каталазната активност с 23%, спрямо контролата. Това може би се дължи на високата концентрация на ацетат в тази проба (17 mmol/L). При еритроцитите, третирани 48 h и наличие на 100 mM глюкоза не се наблюдават разлики спрямо контролата. Това вероятно се дължи на продължителността на процеса на необратимото увреждане на белтъците от високите нива на глюкоза.

Таблица 19. Ензимна активност на каталаза, изразена в U/g Hb в еритроцити, третирани с метаболити, получени след ферментация на 0.5% ГалОЗ, 0.5% ФОЗ и 0.5% лактулоза в присъствие на *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14, *St. thermophilus* St81 и *Lb. acidophilus* A₁.

Проби	Глюкоза 5 mM		Глюкоза 50 mM		Глюкоза 100 mM	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h
Контрола	850	1085	926	1264	1030	1263
0.5% ГалОЗ + 0.5% ФОЗ + 0.5% лакт. 4h L14 + St81 + A ₁	1050	1049	1042	1210	1245	1200
0.5% ГалОЗ + 0.5% ФОЗ + 0.5% лакт. 12h L14 + St81 + A ₁	993	1177	1000	1195	1350	1202
0.5% ГалОЗ + 0.5% ФОЗ + 0.5% лакт. 20h L14 + St81 + A ₁	903	1051	1001	1219	1055	1282

За разлика от третиранията с предишните проби, тук активността на супероксид дисмутаза (Табл. 20) при подгрупата с наличие на 5 mM глюкоза, не се понижава значително (варира от 3 до 16%). При хипергликемия, предизвикана от 50 mM глюкоза, при продължителност на третиране 48 h, се забелязва увеличение на активността, както спрямо контролата (35%), така и спрямо пробите, третирани 24 h (увеличение от 15 – 25%). Това се потвърждава и от предишните данни за активността на ензима, което сочи действието

на супероксид дисмутаза като добър защитен механизъм на еритроцитите. Този ефект може би се дължи и на наличието на ацетат в тези проби. Няма литературни данни, които описват наличието на специфични рецептори за късоверижни мастни киселини по еритроцитната мембрана, чрез които би се свързал ацетатът и активирал вътреклетъчните сигнални пътища.

Таблица 20. Ензимна активност на супероксид дисмутаза, изразена в U/g Hb в еритроцити, третирани с метаболити, получени след ферментация на 0.5% ГалОЗ, 0.5% ФОЗ и 0.5% лактулоза в присъствие на *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14, *St. thermophilus* St81 и *Lb. acidophilus* A₁.

Проби	Глюкоза 5 mM		Глюкоза 50 mM		Глюкоза 100 mM	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h
Контрола	871	868	578	483	538	464
0.5% ГалОЗ + 0.5% ФОЗ + 0.5% лакт. 4h L14 + St81 + A ₁	866	846	586	758	449	551
0.5% ГалОЗ + 0.5% ФОЗ + 0.5% лакт. 12h L14 + St81 + A ₁	806	802	567	752	476	511
0.5% ГалОЗ + 0.5% ФОЗ + 0.5% лакт. 20h L14 + St81+A ₁	729	740	625	740	468	521

С двукратно увеличаване концентрацията на ГалОЗ и ФОЗ и метаболизирането им от *Lb. bulgaricus* L14 и *St. thermophilus* St81 в условия, симулиращи ГИТ, метаболитите в получените проби не променят значително каталазната активност на третираните еритроцити. Получените резултати са представени в табл. 21. От това можем да заключим, че концентрацията на олигозахаридите не оказва влияние върху подобряване на каталазната активност.

Таблица 21. Ензимна активност на каталаза, изразена в U/g Hb в еритроцити, третирани с метаболити, получени след ферментация на 1% ГалОЗ и 1% ФОЗ в присъствие на *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14 и *St. thermophilus* St81.

Проби	Глюкоза 5mM		Глюкоза 50mM		Глюкоза 100mM	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h
Контрола	850	1085	926	1264	1030	1263
1% ГалОЗ + 1% ФОЗ 4h L14 + St81	970	1059	1035	1179	1148	1100
1% ГалОЗ + 1% ФОЗ 12h L14 + St81	941	931	1213	1233	1150	1195
1% ГалОЗ + 1% ФОЗ 20h L14 + St81	946	1106	1042	1109	1105	1152

Активността на супероксид дисмутазата, третирана със същите проби, при наличие на 50 mM глюкоза и продължителност 24 h, се понижава средно с 18% при трите проби спрямо контролата от същия времеви интервал. Почти двукратно увеличение активността на ензима се наблюдава при същите проби, но с третиране продължило 48 h в сравнение с контролата и пробите от 24 h. Активността на ензима в еритроцитите, в условия на екстремна хипергликемия (100 mM глюкоза), не показва значителни разлики спрямо контролите и в двата диапазона от време (Табл. 22).

Таблица 22. Ензимна активност на супероксид дисмутаза, изразена в U/g Hb в еритроцити, третирани с метаболити, получени след ферментация на 1% ГалОЗ и 1% ФОЗ в приствие на *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14 и *St. thermophilus* St81.

Проби	Глюкоза 5 mM		Глюкоза 50 mM		Глюкоза 100 mM	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
Контрола	871	868	578	483	538	464
1% ГалОЗ + 1% ФОЗ 4h L14 + St81	771	880	494	933	458	577
1% ГалОЗ + 1% ФОЗ 12h L14 + St81	840	874	450	977	551	524
1% ГалОЗ + 1% ФОЗ 20h L14 + St81	976	912	484	947	546	522

От получените резултати можем да заключим, че протективните механизми, индуцирани от 50 mM глюкоза в еритроцитите, се запазват и даже се увеличават до втория ден от третирането, докато 100 mM глюкоза оказва пагубен ефект върху еритроцитния метаболизъм. Хемолизата, ериптозата, натрупване на калций, загубата на глутатион и повишаването на съотношението GSSG/GSH, се предизвикват от високата глюкозна концентрация (Viskupicova *et al.*, 2015).

Метаболитите, получени при инкубация на полизахарида, изолиран от листата на *P. major*, показват завишение с 20% на активността на каталазата в условия, симулиращи физиологичните, след 24-тия час. Активността се понижава с 41% при еритроцити, третирани с 100 mM глюкоза за период от 48 h (Табл. 23).

Таблица 23. Ензимна активност на каталаза, изразена в U/g Hb в еритроцити, третирани с метаболити, получени след ферментация на 0.75% полизахарид от листа на *P. major* в приствие на *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14.

Проби	Глюкоза 5 mM		Глюкоза 50 mM		Глюкоза 100 mM	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
Контрола	850	1085	926	1264	1030	1263
0.75% полизахарид от <i>Plantago major</i> 4h L14	1085	1141	973	1257	1037	739

Активността на супероксид дисмутазата при физиологични условия и в двата времеви интервала се понижава. В присъствието на 50 mM глюкоза, след третиране продължило 48 h, отново се наблюдава по-висока активност спрямо контролата, както и спрямо пробата от 24 h. Пробите, с наличие на най-силно изразена хипергликемия, при продължителност на третиране 48 h, показват с 26% по-висока ензимна активност, спрямо контролата (Табл. 24).

Таблица 24. Ензимна активност на супероксид дисмутаза, изразена в U/g Hb в еритроцити, третирани с метаболити, получени след ферментация на 0.75% полизахарид от листа на *P. major* в присъствие на *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14.

Проби	Глюкоза 5 mM		Глюкоза 50 mM		Глюкоза 100 mM	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
Контрола	871	868	578	483	538	464
0.75% полизахарид от <i>Plantago major</i> 4h L14	734	755	463	542	510	627

Данните за активностите на двата ензима не са еднозначни, но това може би се дължи на активиране на други антиоксидантни ензими, глутатион пероксидазата, които вземат участие в обезвреждането на водородния пероксид, натрупал се като резултат от реакцията, катализирана от супероксид дисмутазата. Тези ензими не успяват да компенсират свръхпроизводството на H₂O₂ от супероксид дисмутазата. Настъпилият дисбаланс между SOD/CAT би могъл да обясни прогресиращите усложнения, предизвикани от оксидативния стрес и натрупалите се ROS. Еритроцитите са много податливи на окислително увреждане поради високата степен на полиненаситени мастни киселини в техните мембрани и високата концентрация на вътреклетъчен кислород и хемоглобин, който чрез своите оксидоредукционни характеристики е основният производител на свободни кислородни видове (Matés *et al.*, 1999; Skrzep-Poloczek *et al.*, 2020).

Можем да заключим, че метаболитите и фрагментите от полизахарида от листа на *P. major*, активират защитните системи в еритроцитите, в условия на висок оксидативен стрес, предизвикан от висока хипергликемия. Вътреклетъчните механизми на този ефект не са ни известни и няма данни за такива резултати в научната литература. Хипергликемията е причина за различни промени в тъканите и клетките. Еритроцитите, като най-разпространени клетки в човешкото тяло са също податливи на тези промени. Структурата, функциите и продължителността на живота им се нарушават. Това може да се дължи на високото производство на ROS и индуциране на оксидативен стрес, който причинява липидна пероксидация и нарушаване на фосфолипидния бислой на клетъчната мембрана (Pazzini *et al.*, 2015).

В табл. 25 и 26 са представени резултатите от ензимните активности на двата антиоксидантни ензима в еритроцити, третирани с метаболити, получени след инкубиране на 3 таблетки пребиотик в присъствие на *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14, *St. thermophilus* St81 и *Lb. acidophilus* A₁.

Относно каталазата, метаболитите, получени от ферментацията на пребиотика не оказват съществени разлики в трите подгрупи, спрямо контролите. Може да се отбележи единствено незначително завишена активност при трите проби с присъствие на 50 mM глюкоза на 24 час, спрямо контролата. Противоположни са данните след 48 часа третиране на еритроцитите, когато активността се понижава.

Таблица 25. Ензимна активност на каталаза, изразена в U/g Hb в еритроцити, третирани с метаболити, получени след ферментация на 3 таблетки пребиотик в присъствие на *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14, *St. thermophilus* St81 и *Lb. acidophilus* A₁.

Проби	Глюкоза 5 mM		Глюкоза 50 mM		Глюкоза 100 mM	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
Контрола	850	1085	926	1264	1030	1263
3 таблетки пребиотик 4h L14 + St81 + A ₁	898	1147	1013	1181	1118	1045
3 таблетки пребиотик 12h L14 + St81 + A ₁	838	1118	1100	1142	1064	1252
3 таблетки пребиотик 20h L14 + St81 + A ₁	890	1080	1005	1116	1071	1160

Интересни са резултатите за супероксид дисмутаза при еритроцити, третирани с метаболити и наличие на 50 mM глюкоза. Потвърждават се резултатите от предишните проби и показват увеличена активност във всички проби инкубирани 48 h, спрямо контролата (от 20% до 48%) и спрямо тези инкубирани 24 h.

Таблица 26. Ензимна активност на супероксид дисмутаза, изразена в U/g Hb в еритроцити, третирани с метаболити, получени след ферментация на 3 таблетки пребиотик в присъствие на *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14, *St. thermophilus* St81 и *Lb. acidophilus* A₁.

Проби	Глюкоза 5 mM		Глюкоза 50 mM		Глюкоза 100 mM	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
Контрола	871	868	578	483	538	464
3 таблетки пребиотик 4h L14 + St81 + A ₁	849	865	511	678	449	473
3 таблетки пребиотик 12h L14 + St81 + A ₁	845	812	490	865	432	436
3 таблетки пребиотик 20h L14 + St81 + A ₁	863	820	543	600	403	497

Предполага се, че оксидативният стрес е от решаващо значение за развитието на съдови усложнения при захарен диабет тип 2. Той ускорява образуването и генерирането на ROS в тялото. Свободните радикали могат да увредят телесните тъкани като например чернодробните клетки (Wang *et al.*, 2017; Zepeda-Hernández *et al.*, 2021). Високи нива на ROS се наблюдават при пациенти със захарен диабет тип 2. Това може да се дължи на промени в производството на антиоксидантните ензими, като супероксид дисмутаза (Asmat *et al.*, 2016; Zepeda-Hernández *et al.*, 2021).

Потенциалните антиоксидантни функции на пробиотиците и пребиотиците могат да включват секреция на антиоксидантни метаболити, модулация на антиоксидантната активност и инхибиране на ензими, свързани с производството на ROS (Wang *et al.*, 2017). Друг потенциален механизъм, чрез който пробиотични щамове оказват своя противодиабетен ефект е, че някои от тях благоприятстват производството на SCFAs, които водят до секрецията на инкретинови хормони, GLP – 1 и пептид YY (Wang *et al.*, 2020; Kassaian *et al.*, 2020).

Получените от нас резултати подкрепят все повече натрупаните данни за положителните ефекти на пребиотиците при захарен диабет тип 2, затлъстяване, чернодробна стеатоза, възпаление и инсулинова резистентност. Задълбоченият метаанализ на Wang и колеги, включващ 34 проучвания при 1346 участници, разпределени сред здрави, затлъстели и диабетно болни групи съобщава, че пребиотиците водят до понижение с 0.58 % на гликирания хемоглобин (HbA_{1c}) (95% CI – 0.83, – 0.32%) (Wang *et al.*, 2019). Нараства и броят на отделните проучвания, които позволяват анализ на самите подгрупи. Това е важно за изясняване подробностите по отношение на дозировката и продължителността на приемане на хранителните добавки. Най-значимите ефекти върху контрола на глюкозата се наблюдават при прием на ≥ 10 g/ден. Добавките са по-ефективни, когато се прилагат в течности, а не в твърди вещества, което повдига важни въпроси относно моделите на консумация на тези пребиотици в реални ситуации (Robertson, 2020). Други метаанализи също показват ефектите на различните пребиотици върху засегнатите показатели при захарен диабет тип 2- понижени нива на HbA_{1c}, глюкоза на гладно, НОМА-IR (Mahboobi *et al.*, 2018; Ardeshirlarijani *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2020; Tao *et al.*, 2020; Ojo *et al.*, 2020).

В заключение, микробиотата е един от решаващите фактори, които благоприятстват човешкия метаболизъм и здравословното състояние или обратно, водят до появата и развитието на различни патологии. Връзката между микробиота и редица патологични състояния е докладвана от редица учени. Следователно, е напълно логично да се разглежда микробната общност като потенциална цел на клиничните стратегии за идентифициране и лечение на различни патологични заболявания.

Простото наблюдение на промените във взаимоотношенията между различните бактериални видове, като причинен фактор за развитието на

патологичните процеси, има научни ограничения. Това може да е по-скоро последица, отколкото причина за тяхното развитие. Изследванията на метагеномиката подчертават как метаболитният потенциал на микробиотата е много по-сложен от простото таксономично наблюдение на присъстващите видове. Ето защо, би било по-подходящо да се опитаме да разберем напълно молекулярните механизми, лежащи в основата на връзките на различните патологии и чревна дизбиоза.

С нашето изследване ние успяхме да установим, че метаболитите получени от пребиотични олигозахариди и полизахариди в *in vitro* система, симулираща ГИТ, подпомагат растежа и развитието на пробиотични щамове млечнокисели бактерии, но също така предпазват и подпомагат защитните механизми на еритроцити, в условия на хипергликемия.

ИЗВОДИ

1. В условия, симулиращи *in vitro* стомах в система на гастроинтестинален тракт, се наблюдава различна степен на хидролиза на изследваните пребиотични олигозахариди. Най-висока резистентност проявява лактулозата, а най-чувствителни са фруктоолигозахаридите (лактоулоза < галактоолигозахариди < фруктоолигозахариди = 6% < 9% < 19%).
2. От изследваните олигозахариди в условия, симулиращи *in vitro* тънки черва в система на гастроинтестинален тракт, пробиотичният щам *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14, показва най-висок клетъчен растеж при метаболизиране на лактулозата и нейните деривати.
3. В условия, симулиращи *in vitro* стомах в система на гастроинтестинален тракт, се наблюдава различна степен на хидролиза на изследваните полизахариди. Отделената фруктоза при третирането на инулина е 2.2 mg/mL, отделената глюкоза при третиране на β -глюкана е 3.4 mg/mL, а отделената галактоза от полизахарида на *P. major* е 1.42 mg/mL.
4. От изследваните полизахариди в условия, симулиращи *in vitro* тънки черва в система на гастроинтестинален тракт, пробиотичният щам *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14, показва най-висок клетъчен растеж при метаболизиране на инулина и неговите деривати.
5. От изследваните олигозахариди в условия, симулиращи *in vitro* тънки черва в система на гастроинтестинален тракт, пробиотичният щам *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14 показва преминаване от хомоферментативен метаболитен тип при наличие на глюкоза в средата, към смесен тип, най-добре изразен при лактулозата и β -глюкана.
6. Профилът на активираните ензими, отговорни за хидролизата на специфичните гликозидни връзки в структурите на изследваните олигозахариди и полизахариди, секретирани от пробиотичния щам *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* L14, доказва техния индуцируем характер. Доказано е, че β -галактозидазата се активира в присъствие на лактулоза и ГалОЗ, инулиназата се активира в присъствие на инулин и ФОЗ, а β -глюкозидазата се активира при наличие на фрагменти от β -глюкан.
7. Установи се статистически значимо повишение на активността на глутатион редуктазата на еритроцити, в условия на *in vitro* индуцирана хипергликемия при третиране с 1% лактулоза, 1% инулин, 1% ГалОЗ, 1% ФОЗ и 5% ФОЗ.

8. Фруктоолигозахаридите от инулиов тип понижават активността на слюнчената α -амилаза в *in vitro* условия.
9. Метаболитите и фрагментите, получени от ГалОЗ, ФОФ, лактулоза, полизахарид от *P. major* и таблетирани пребиотици, в условия на *in vitro* хипергликемия индуцирана от 50 mM глюкоза, при продължителност на третиране 48 часа, увеличават активността на супероксид дисмутаза-та в диапазон между 11 – 50%, спрямо контролата.

ПРИНОСИ

1. За първи път са представени данни, докладващи промените в състава и степента на полимеризация на вложените олигозахариди и полизахариди, третирани в условия, симулиращи *in vitro* стомах, което позволява да бъдат изчислени с по-голяма точност пребиотичните индекси.
2. Доказана е за първи път спецификата при метаболизиране на олигозахариди и полизахариди с пребиотичен потенциал в условия, симулиращи *in vitro* тънко черво. В зависимост от типа пробиотици и щамовата специфичност, се наблюдава промяна от хомоферментативен към смесен метаболитен път на усвояването на монозахаридните компоненти на пробиотици със сложна химична структура.
3. За първи път е доказана в *in vitro* условия възможността за въздействие върху антиоксидантни ензими (глутатион редуктаза, каталаза и супероксид дисмутаза) на еритроцити при наличие на хипергликемия, на метаболитите и остатъчните олигозахариди, получени в условия, симулиращи ГИТ.

НАУЧНИ ТРУДОВЕ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИЯТА

Публикации:

1. **Ivica Dimov**, Mariya Choneva, Ilija Iliev, Anelia Bivolarska „Effect of oligosaccharides on enzymes of carbohydrate metabolism and antioxidant protection in *in vitro* treated erythrocytes under conditions of hyperglycemia“ *Journal of IMAB* – под печат (служебна бележка изходящ № 05-21/07.05.21 г.)

2. **Ivica Dimov**, Daniela Mollova, Tonka Vasileva, Veselin Bivolarski, Mariana Nikolova, Paolina Lukova, Anelia Bivolarska, Ilija Iliev “Effect of polysaccharides obtained from *Plantago major* L. leaves on *Lactobacillus bulgaricus* L14 in an *in vitro* model system of the gastrointestinal tract“ *Proceedings of the 5th Balkan Scientific Conference on Biology*, 15-16 April 2021 pp. 25-34

3. **Ivica Dimov**, Anelia Bivolarska, Ilija Iliev „Effect of oligosaccharides on salivary α -amylase *in vitro*“ *KNOWLEDGE – International Journal* Vol. 40.4, June 2020 pp.741-745, ISSN 1857-923X

4. Mariya Choneva, **Ivica Dimov**, Krasimir Boyanov, Iliyan Dimitrov, Tatyana Vlaykova, Anelia Bivolarska “Influence of prebiotics on the antioxidant and the lipid profile of patients with type I diabetes mellitus” *KNOWLEDGE – International Journal* Vol. 40.4, June 2020 pp.735-740, ISSN 1857-923X

Конференции:

1. **Ivica Dimov**, Mariya Choneva, Ilija Iliev, Anelia Bivolarska „Effect of oligosaccharides on enzymes of carbohydrate metabolism and antioxidant protection in *in vitro* treated erythrocytes under conditions of hyperglycemia“ Jubilee 30-th Annual Assembly of IMAB, 18-21 October 2020, Varna, Bulgaria

2. Iliyan Dimitrov, **Ivica Dimov**, Krasimir Boyanov, Milen Hristozov, Anelia Bivolarska „Influence of prebiotics and gut microbiota on glycemic control in diabetes“ Пети фармацевтичен бизнес форум и научно-практическа конференция „Бъдещето на фармацията: традиции, научни изследвания и открития“ 26 – 28.10.2021 г. Варна, България

3. Mariya Choneva, **Ivica Dimov**, Krasimir Boyanov, Iliyan Dimitrov, Tatyana Vlaykova, Anelia Bivolarska “HOW DO PREBIOTICS INFLUENCE THE ANTIOXIDANT PROFILE OF RATS WITH STREPTOZOTOCIN INDUCED TYPE 1 DIABETES MELLITUS?” 12th International Scientific and Practical Internet Conference “Modern Movement of Science” Dnipro 2021, Ukraine

Examination of the synergistic effect of prebiotic oligosaccharides on enzymes from carbohydrate metabolism and antioxidant protection of the organism

Ivica Dimov

The development of prebiotics as dietary supplements in search of a maximum effect on maintaining the balance of the human intestinal microbiota has aroused increasing scientific interest in the last two decades.

This study examines the synergistic effect of prebiotic oligosaccharides and probiotic lactic acid bacteria on enzymes from carbohydrate metabolism and antioxidant protection of the body, after metabolic transformation into different parts of the GIT, using simulated conditions in an *in vitro* gastrointestinal system model.

The main knowledge of the enzymatic activity of *Lactobacillus*, can be utilized to create a new design of more effective prebiotics or to identify potential enzyme indicators of major metabolic activity, assessing their impact on the gastrointestinal tract. Using glycotecnology, prebiotics can be modeled to contain certain monosaccharides and / or a combination of linkages that induce or enhance the specific glycosidase activity of probiotic *Lactobacillus* strains or other probiotic microorganisms.

Changes in the relationships between different bacterial species is commonly viewed as a causal factor for the development of pathological processes. However, this has scientific limitations as it be a consequence rather than a cause of their development. Studies of metagenomics emphasize the metabolic potential of the microbiota as much more complex. Therefore, it would be more appropriate to try to fully understand the molecular mechanisms underlying the links between the various pathologies and intestinal dysbiosis.

In our study, we found that metabolites derived from prebiotic oligosaccharides and polysaccharides, in an *in vitro* system simulating GIT, support the growth and development of probiotic strains of lactic acid bacteria. The metabolites also supported the protective mechanisms of human erythrocytes. Furthermore, the specificity of the metabolism of oligosaccharides and polysaccharides with prebiotic potential under conditions simulating an *in vitro* small intestine has been demonstrated. Depending on the type of prebiotics and strain specificity, there is a change from the homofermentative pathway to a mixed metabolic pathway of absorption and utilization of monosaccharide components of prebiotics.

