



Endogenní inhibiční látky v mléce

*Vorlová, L., Navrátilová, P., Bartáková, K., Dluhošová, S.
Veterinární univerzita Brno, ČR*

INHIBIČNÍ LÁTKY V MLÉČE

I. ENDOGENNÍ = PŘIROZENÉ (NATIVNÍ)

Žádoucí → přirozená ochrana hostitelského organismu = PŘIROZENÝ BEZPEČNOSTNÍ POTENCIÁL MLÉKA

- ▶ Nejdůležitější zástupci v mléce:
 - ▶ laktoferin,
 - ▶ lysozym,
 - ▶ laktoperoxidázový systém,
 - ▶ xantinoxidáza,
 - ▶ Ig,
 - ▶ proteoso-pepton,..

II. EXOGENNÍ = CIZORODÉ (RIL).....!

Endogenní = přirozené inhibiční látky

- ▶ Látky bílkovinné povahy → **enzymy + syrovátkové bílkoviny** = biologicky aktivní biomolekuly
- ▶ Časově i teplotně limitovaná účinnost
- ▶ Potenciál snížení použití antibiotik
- ▶ Významné protektivní působení:
 - ▶ **ochrana dojnice**,
 - ▶ **ochrana mléčné žlázy (resp. imunita vemene)**,
 - ▶ **ochrana mléka** zejména proti mikrobiální zkáze cestou pozitivního **ovlivnění mikrobiomu syrového mléka**
 - ▶ **ochrana narozeného mláděte**

Lysozym *nativní enzym mléka*

- kombinací typů (c, g) s 3D strukturou podobnou α -laktalbuminu
- je považován za **endogenní antibiotikum**
- **lýza bakteriální buněčné stěny G^+** → snížení bakteriální rezistence → odumírání (muramidasa → katalyzuje hydrolýzu β -(1→4)vazby mezi N-acetylmuramidovou kyselinou a N-acetylglukosaminem bakteriálních peptidoglykanů)
- **synergie** v baktericidním působení s laktoferinem a Ig
- inaktivace některých virů, zvýšení efektu antibiotik, protizánětlivý a antihistaminový účinek; aktivace imunitních buněk a antitumorózní aktivita
- T **75 °C /15 min.** resp. **80 °C/15 s** zůstává více než **75 % aktivity**
- mléko kravské **0,4 mg/L** (mléko humánní 0,4g/L)
- **↑ kolostrum, ↑ mastitida, ↑ se zvýšeným počtem SB**

Laktoperoxidáza (LP) *nativní enzym mléka*

- ▶ v mléce všech savců
- ▶ $LP + H_2O_2 + SCN^- = \text{LAKTOPEROXIDÁSOVÝ SYSTÉM}$
- ▶ katalýza štěpení peroxidu vodíku na kyslík → hypothiokyanátová kyselina $HOSCN$ → **oxiduje sulfhydrylové skupiny** mikrobiálních enzymů a jiných membránových proteinů → **usmrcuje nebo inhibuje růst** širokého spektra bakterií, virů, hub, plísní a protozoí
- ▶ **bakteriostaticky G⁺** *Listeria* spp., *Staphylococcus* spp. a *Streptococcus* spp.
- ▶ **baktericidně G⁻** *E.coli*, *Salmonella* spp., *Pseudomonas* spp., *Campylobacter* spp. a *H. pylori*
- ▶ LP z kravského mléka relativně termorezistentní → **indikátorová funkce** vysoké pasterace
- ▶ **možno použít pro konzervaci syrového mléka** v zařízeních např. rozvojových zemí, kde není možné chlazení → zachování jeho původní kvality (při dodržení správné hygienické praxe)

Laktoferin (= laktotransferin)

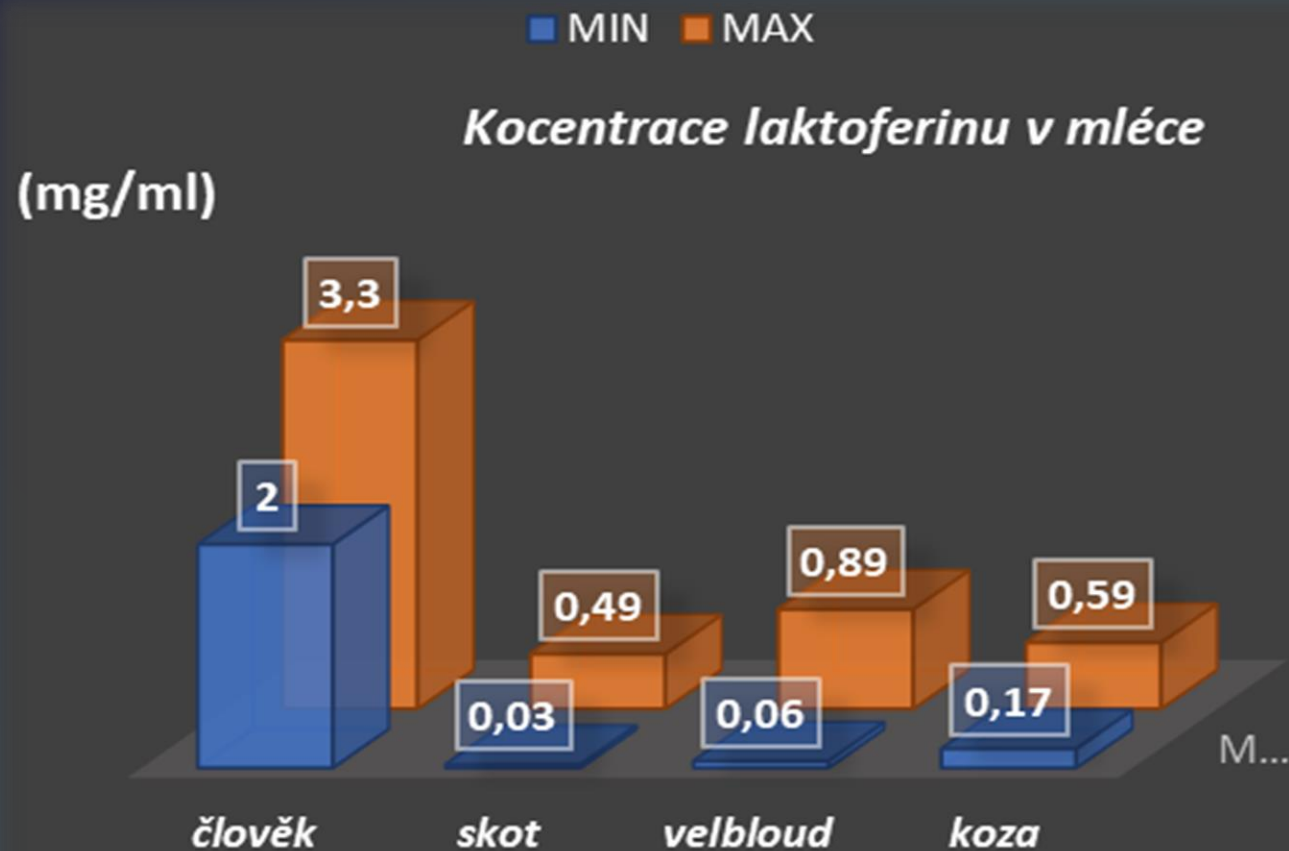
- ▶ = „červený protein“ syrovátková metalobílkovina (zdroj nehemového Fe)
- ▶ syntetizován epiteliálními buňkami mléčné žlázy, vysoká koncentraci v sekundárních granulích neutrofilů
- ▶ **klíčová složka prvotní imunitní** obrany savců proti atakům vnějšího prostředí
- ▶ vzrůstající mezinárodní zájem - zvyšováním vrozené imunitní obrany jako **alternativa ke konvenční aplikaci antibiotik**
- ▶ dle saturace železem : **apo-LF** (0-6 % Fe)
holo-LF (76-100 % Fe)
- ▶ saturace rozdílná u jednotlivých species → bovinní LF **20-30%**, nízká v humánním LF **6-8%**
- ▶ tři různé izoformy laktoferinu **α, β, γ**
- ▶ bovinní LF **vysoký stupeň homologie** s humánním LF (77%) → **velmi podobné účinky**

Laktoferin - *koncentrace (vliv faktorů)*

- druh savce (nejvyšší v humánním)
- plemeno (mléčná vyšší)
- výživa (↑ seno a šrot)
- Individualita (genetika)
- pořadí laktace (vzestup s pořadím laktace)
- stádium laktace
 - kolostrum (pokles na hodnotu zral. mléka 15.-30. den) – **stání na sucho** (až 100x vyšší) → **maximální koncentrace**
- zdravotní stav
 - v **mastitidním** mléce **stoupá**.
 - Nové trendy – **funkce indikátorová** → **časná identifikace mastitíd v preklinické fázi**

Koncentrace laktoferinu v mléce některých druhů savců

(Wang et al., 2017)



Laktoferin - vliv tepelného ošetření mléka

- Vyšší saturace Fe zvyšuje termostabilitu (možnost využití přídatku Fe?)
- Antibakteriální aktivita **není** ovlivněna standardním pasteračním režimem (**72 °C/15 s**).
- Při tepelném režimu nízké pasterace (**63 °C/30 min**) snížení obsahu nativního laktoferinu o 40 %.
- **UHT ohřev** denaturace a kompletní **ztráta inhibiční** kapacity vůči *Escherichia coli*
- Ve **sprejově sušeném** mléce jsou ztráty LF aktivity **nepodstatné**.

Laktoferin – biologické funkce

Multifunkční protein s řadou aktivit:

- Antibakteriální
- Antivirová
- Antifungální
- Antiparazitární
- Imunomodulační a protizánětlivý
- Antikancerogenní
- Enzymatická
- Bifidogenní
- Antioxidační
- Vliv na růst, obnovu a strukturu kostí
- Udržování homeostázy Fe v těle a v buňkách

Antibakteriální aktivita

- ▶ Intenzivně studována již 22 let
- ▶ **Bakteriostatická funkce** → vazba železa → inhibice růstu a exprese virulenčních faktorů (i blokace vzniku biofilmu bakterií)
- ▶ **LF v kombinaci s lysozymem silnější bakteriostatické účinky**
- ▶ **Baktericidní účinek** spočívá v přímé interakci s bakteriálním povrchem → poškození vnější membrány:
 - ▶ G^- → interakce s lipopolysacharidy.
 - ▶ G^+ → vazba k molekulám kyseliny lipoteichoové a tím usnadnění účinnosti antibakteriálních sloučenin (lysozym, antibiotika)
- ▶ u laktujících dojnic snižuje riziko mastitid = **selektivní antibiotikum**

Antivirová aktivita

- LF inhibuje replikaci širokého spektra RNA a DNA virů
- nejrozšířenější hypotéza působení LF: vazbou na glykosaminoglykan **virových receptorů jejich blokování** → inhibice prvního kontaktu viru s hostitelskou buňkou a prevence vzniku infekce
- LF je silně antivirózní, když je přítomen **v čase infekce**, ale pokud se použije později **v terapii** je mnohem **méně účinný**
- *herpes simplex, hepatitída B a C, humánní cytomegalovirus, hantavirus, HIV, rotaviry, polioviry, adenoviry, humánní papillomavirus, koronaviry*

Imunomodulační a protizánětlivý účinek

- ▶ LF je **modulátorem imunitního** systému a **inhibitorem zánětlivé kaskády**
- ▶ Mnoho buněk imunitního systému (T i B lymfocyty, destičky, epitheliální buňky) má receptory pro LF
- ▶ LF se svým kladným nábojem **váže** s negativním nábojem molekul na povrchu různých buněk imunitního systému a to je spojeno se spouštěcím mechanismem buněčné imunitní odpovědi, jako je **aktivace, diferenciaci a proliferaci**.
- ▶ LF může **zabránit** rozvoji zánětu a následnému **poškození** tkáně způsobenému uvolňováním **prozánětlivých cytokinů** a reaktivních forem **kyslíku**

Antikancerogenní aktivita

- ▶ Podobně jako u zánětu má LF schopnost **modulovat produkci cytokinů** u rakoviny
- ▶ LF může vyvolat apoptózu a **zástavu růstu nádoru** *in vitro*.
- ▶ LF může být **internalizován** do buněčného jádra, místa účinku většiny léků proti rakovině, a používá se jako cílcí ligand k dosažení aktivního dodávání protirakovinných léků **do nádorové tkáně**
- ▶ pokud jde o klinické studie, perorální konzumace 3 g/den bovinního laktoferinu významně ovlivnila **růst adenomatózních polypů** v tlustém střevě
- ▶ bylo prokázáno, že podávání lidského rekombinantního laktoferinu **zvýšilo přežití** v průměru 65 % pacientů s pokročilým stadiem **nemalobuněčného karcinomu plic**.

Aplikace a bezpečnostní aspekty laktoferinu

- Průmyslová výroba z odstředěného mléka nebo ze syrovátky.
- Široké a vzrůstající využití LF v **podpoře a obnově zdraví**
Nařízení EP a Rady (ES) č. 258/97 (resp. č. 2015/2283)
 - **uvedení bovinního LF na trh jako nové složky potravin**
- Aplikace do řady oborů:
 - *suplementace kojenecké mléčné výživy,*
 - *výroba potravin a nápojů (suplementace, konzervace, jedlé obaly),*
 - *výživa pro sportovce, potraviny pro zvláštní lékařské účely a náhradu celodenní stravy pro regulaci hmotnosti,*
 - *doplňky stravy,*
 - *farmaceutické přípravky,*
 - *kosmetika, dentální hygiena,*
 - *krmiva pro zvířata .*



DĚKUJI ZA POZORNOST

Poděkování

Práce vznikla za finanční podpory projektu

NAZV QK21010326