

v mléce. Dalšími zájmy je ověřit vhodnost krmných doplňků na bázi sladkovodních řas na kvalitu mléka malých přežvýkavců a jejich vlivu na obsah omega-3 a omega-6 mastných kyselin. Konečným cílem bude navržení vhodných technologických postupů ke zlepšení dietetických vlastností mléčných produktů z kozího a ovčího mléka, analyzovat vybrané parametry chovného prostředí, které mohou mít na kvalitu produktů vliv.

Klíčové informace:

- Ve dnech 19.-21. ledna proběhla ve Výzkumném ústavu živočišné výroby, v. v. i., oponentní řízení průběžných zpráv projektů Národní agentury pro zemědělský výzkum (NAZV) a rozvoje organizace.
- Řešitelé obhajovali průběh řešení celkem dvanácti pětiletých úkolů za loňský rok.
- Pro sedm z nich byl rok 2015 prvním rokem projektu.



PERMEA
Membrane Conference of Visegrad Countries

15–19 May, 2016
Prague, Czech Republic

One place, one date, two conferences
where industry meets science...



MELPRO
membrane and electromembrane processes

www.permea2016.cz

Organised by Czech Membrane Platform **CZEMP**

IMUNOMODULAČNÍ EFEKT KRAVSKÉHO KOLOSTRA NA LIDSKÉ MONONUKLEARNÍ BUŇKY

Hyršlová Ivana¹, Bártová Jiřina², Staňková Barbora³,
Janatová Tatjana², Krausová Gabriela¹,
Čurda Ladislav⁴, Kolesár Libor⁵

¹ VÚM s.r.o. Praha, ² Stomatologická klinika, VFN Praha;

³ IV. Interní klinika, 1. LF UK, Praha; ⁴ Ústav mléka tuků
a kosmetiky, VŠCHT Praha, ⁵ IKEM, Praha

Immunomodulatory effects of bovine colostrum to human mononuclear cells

Abstrakt

Kolostrum je bohatým zdrojem esenciálních, bioaktivních a imunomodulačních látek pro výživu a růst mládat, ale také pro rozvoj jejich pasivní imunity. Kravské kolostrum je v současné době používáno v doplňcích stravy, proto bylo cílem této práce rozšířit znalosti o imunomodulačním efektu kravského kolostra. Imunomodulační efekt kravského kolostra byl porovnáván na základě produkce vybraných cytokinů lidskými mononukleárními buňkami (hPBMCs) po třídenní stimulaci obnoveným neodtučněným a odtučněným kravským kolostrum, které byly stanoveny pomocí multiplexové analýzy. Při stanovení imunomodulačního efektu došlo po stimulaci lidských mononukleárních buněk odtučněným kravským kolostrum ke zvýšené produkci Th2 cytokinů IL-10, IL-4 a IL-5 v porovnání s kravským mlékem. Zvýšená produkce IL-10 a IL-4 vede k inhibici produkce Th1 cytokinů.

Klíčová slova: kravské kolostrum, cytokiny, mononukleární buňky

Abstract

Colostrum is a rich source of essential, bioactive and immunomodulatory compounds important for a growth and a nutrition of newborns, and also for developing their passive immunity. In recent year, bovine colostrum is used in dietary supplements, therefore we decided to extend knowledges about the immunomodulatory effect of bovine colostrum to human health. The immunomodulatory effects of bovine defatted or fatted colostrum were compared on the basis of secretion of cytokines by human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) after the 3-day stimulation *in vitro*. Luminex multiplex analysis was used to analyze the production of cytokines. Our results has shown that bovine defatted colostrum stimulate the secretion of Th2 cytokines IL-10, IL-4 and IL-5 in compared with bovine

milk. Increased production of IL-4 and IL-10 leads to inhibit the production of Th1 cytokines.

Keywords: Bovine colostrum, cytokine, mononuclear cells

ÚVOD

V posledních několika letech vzrostl zájem o potraviny s pozitivním vlivem na lidské zdraví. Kolostrum je definováno jako první mléko se specifickým složením produkované savci po porodu. Kromě esenciálních živin obsahuje kolostrum celou řadu bioaktivních látek důležitých pro výživu, ochranu a růst mláďat (Godhia a Patel, 2013). Mezi bioaktivní látky kolostra patří růstové faktory (TGF- α a β , IGF, EGF), imunoglobuliny, laktoperoxidasa, laktoferin, lysozym, vitamíny (A, E a B12), imunomodulační peptidy a oligosacharidy. V současné době na trhu nalezneme převážně doplňky stravy, které obsahují odtučněné nebo neodtučněné kravské kolostrum nebo jeho bioaktivní látky jako imunoglobuliny a laktoferin. Hlavními výhodami kravského kolostra jsou jeho celoroční dostupnost a množství, které lze získat v porovnání se sezonním kozím kolostrumem.

Cílem předkládané práce bylo rozšíření znalostí o imunomodulačním efektu obnoveného odtučněného nebo neodtučněného kravského kolostra, které je používáno do doplňků stravy. Imunomodulační efekt byl posuzován na základě produkce vybraných cytokinů mononukleárními buňkami izolovanými z periferní krve zdravých dárců.

MATERIÁL A METODY

Kolostrum a sušené mléko

K testování bylo použito lyofilizované odtučněné a tučné kravské kolostrum od firmy Ingredia (ČR) a sušené kravské mléko (Gemermilk RS s.r.o., Rimavská Sobota; sušina 95,6 %).

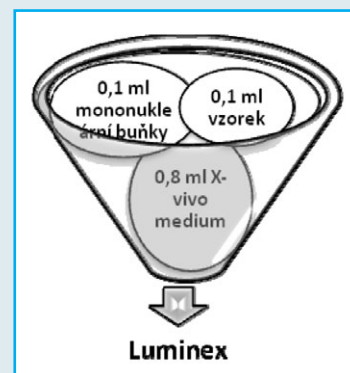
Izolace mononukleárních buněk

Mononukleární buňky použité v této práci byly získány centrifugací krve od osmi zdravých pacientů ve věku 25-35 let (Krevní transfuzní stanice, Všeobecná Fakultní Nemocnice, Praha) na Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich,

Švýcarsko) gradientovou centrifugací (Obr. 1). Mononukleární buňky byly po separaci dvakrát promyty 50 ml média X-vivo (Cambrex, USA), poprvé při 400 g po dobu 10 minut, po druhé při 200 g také po dobu 10 minut. Po druhém promytí byly získané mononukleární buňky resuspendovány v 5 ml média X-vivo. Počet mononukleárních buněk byl stanoven mikroskopicky s využitím Bürkerovy komůrky. Zbytek suspenze byl poté naředěn médiem X-vivo tak, aby finální koncentrace mononukleárních buněk byla 10^7 /ml.

Stimulace

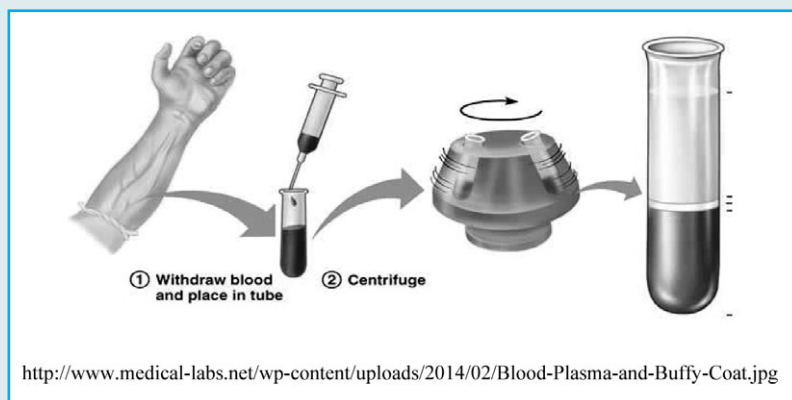
Izolované mononukleární buňky byly stimulovány různými variantami kravského kolostra po dobu třech dnů podle následujícího schématu uváděného na obrázku 2. Po stimulaci byly supernatanty odebrány a zamrazeny při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do stanovení cytokinů multiplexovou metodou.



Obr. 2 Izolace mononukleárních buněk

Stanovení cytokinů multiplexovou metodou

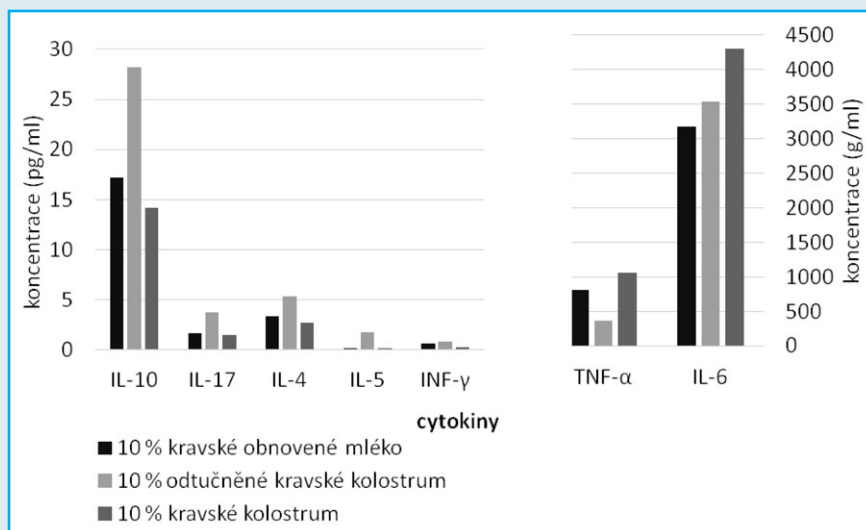
Pro stanovení vybraných cytokinů (IL-17, IL-4, IL-5, IL-6, TNF- α a INF- γ) byl použit kit Fluorokine MAP Human Base Kit A (R&D Systems, USA). Prvním krokem laboratorního postupu bylo navlhčení membrán v jamkách destičky promývacím roztokem (100 μ l do každé jamky) a následné odsátí obsahu vakuovou pumpou. Poté byly přidány naředěné a promíchané mikropartikule (50 μ l do každé jamky a během 15 minut bylo napipetováno 50 μ l standardu a vzorků. Destička byla překryta fólií a inkubována při laboratorní teplotě 3 hodiny na horizontální orbitální třepačce při 500 rpm. Po inkubaci byla odsáta tekutina za pomoci vakuové pumpy a jamky destičky třikrát promyty 100 μ l promývacího roztoku. V dalším kroku do každé jamky bylo přidáno 50 μ l připraveného biotin - antibody mixu. Destička byla poté překryta fólií a po dobu jedné hodiny probíhala inkubace na horizontální orbitální třepačce při 500 rpm. Po inkubaci byly opět jamky třikrát promyty 100 μ l promývacího roztoku. Po důkladném promytí bylo přidáno 50 μ l připraveného streptavidinu - PE a překryto fólií. Inkubace probíhala po dobu 30 min na horizontální orbitální třepačce. Následuje opět trojí promytí 100 μ l promývacího roztoku. Poté byly mikropartikule s navázanými cytokiny resuspendovány ve 100 μ l promývacího roztoku a inkubovány 2 min na třepačce a do 90 minut analyzovány přístrojem LUMINEX[®] 200 TM analyzer (Luminex Corporation, USA).



Obr. 1 Izolace mononukleárních buněk

Výsledky a diskuze

Kolostrum je důležitým zdrojem proaktivních a imunomodulačních látek pro novorozence, kteří ještě nemají plně vyvinutý imunitní systém po narození (Shing a kol., 2009). Mezi imunomodulační látky kolostra se obecně řadí cytokiny, chemokiny, imunoglobuliny a růstové faktory (Uruakpa a kol., 2002). V posledních několika letech velmi vzrostl zájem o rozvoj nových postupů a metod pro stanovení celé řady biologických faktorů. Imunoanalytické stanovení (enzymatické, RIA) nabízejí obecně vyšší specifitu, senzitivitu a reprodukovatelnost v porovnání s biotesty. Mezi úspěšné metody k široké detekci proteinů se řadí proteomika a antibody-based protein arrays metod. Hlavními výhodami zmíněných antibody-based protein arrays je možnost stanovení širokého spektra proteinů a potřeba malého objemu vzorku (Kverka a kol., 2007; Joos a kol., 2002). Ke stanovení vybraných cytokinů v této práci byla použita multiplexové reakce na mikrokuličkách (bead arrays), která je kombinací průtokové cytometrie a imunoanalytického stanovení. Tato metoda poskytuje skutečně kvantitativní určení koncentrace proteinu na rozdíl od proteinových čipů (protein array), kde jsou výsledky často pouze kvalitativní nebo semikvantitativní. Kverka a kol. (2007) ve své práci zjišťovali profil cytokinů v lidském kolostru a mléce pomocí stejné metody. Kromě již dřív stanovených popsaných látek jako jsou interleukin IL-8, growth factors (EGF), angiogenin a dalších, také stanovili 32 dosud nepopsaných cytokinů. Dále také poukazují na variabilní složení spektra cytokinů u jednotlivých vzorků lidského kolostra a mléka. Vyšší koncentrace cytokinů (IL-1 β , IL-6, TNF- α , INF- γ) obsažená v kravském a kozím kolostru může ovlivňovat imunitní odpověď stejně jako v lidském kolostru (Hagiwara a kol., 2000; Wan a kol., 2010). Kravské kolostrum obsahuje i další imunomodulační látky jako laktoferin a insulin growth factors (IGF)-1, které mohou mít schopnost regulovat sekreci cytokinů (Ginjala a Pakkanen, 1998; Stelwagen a kol., 2009). Imunomodulační vlastnosti kolostra byly popsány v několika studiích (Biswas a kol. 2007; Davis a kol., 2007; Playford 2000), Imunomodulační efekt odtučněného kravského kolostra na lidské mononukleární buňky byl zkoumán v práci Biswas a kol. (2007), kdy mononukleární buňky izolované také z krve zdravých dárců jako v této studii byly stimulovány dvěma odlišnými koncentracemi kolostra (0,1 a 10,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) po dobu 18 a 24 hodin. Po stimulaci byly sledovány hladiny IL-12 a INF- γ . Výsledky popsané práci Biswas a kol. (2007) poukazovaly na schopnost kravského kolostra podporovat produkci Th1 cytokinů. Toto zjištění může být užitečné v prevenci a léčbě některých mikrobiálních infekcí.



Obr. 1 Porovnání produkce IL-17, IL-4, IL-5, IL-6, TNF- α a INF- γ mononukleárními buňkami po stimulaci kravským kolostrum a mlékem

V předložené studii byl imunomodulační efekt odtučněného a neodtučněného kravského kolostra nebo mléka porovnáván na základě produkce interferonu- γ , interleukinů 10, 17, 5, 6 a 4 a TNF- α mononukleárními buňkami izolovaných z periferní krve osmi zdravých dárců. Po stimulaci lidských mononukleárních buněk kravským odtučněným kolostrum došlo ke zvýšené produkci Th2 cytokinů IL-10, IL-4 a IL-5 v porovnání s kontrolou, které podporují protizánětlivou imunitní reakci a inhibují produkci Th1 cytokinů (Obr. 3). V dalších studiích Wan a kol. (2010) and Yoshiaka a kol. (2005) testovali vliv podávání kravského kolostra myších *in vivo* and *in vitro*. Jejich výsledky ukazují, že imunomodulační efekt kravského kolostra je pleiotropní a může napomáhat udržet rovnováhu mezi Th1/Th2 imunitní odpovědí.

Na závěr je nutné říci, že v rámci této studie byl sledován vybraný soubor cytokinů, ale kravské kolostrum může ovlivnit sekreci i dalších cytokinů a chemokinů, které mají vliv na imunomodulaci. Proto pro přesnější pochopení mechanismu ovlivňování sekrece cytokinů po stimulaci kravským kolostrum nebo jeho kombinací se synbiotiky je nutné provést další studii na dalších specifických buněčných populacích.

Poděkování:

Tato práce vznikla v rámci institucionální podpory VÚM s.r.o., rozhodnutí č. RO 1416 a projektu Ministerstva zemědělství č. QJ1210376.

Použitá literatura:

- F. O. URUAKPA, M. A. H. ISMOND AND E. N. T. AKOBUNDU (2002): Colostrum and its benefits: a review. *Nutr Res* 22, pp. 755-767.
 GODHIA, M. L., & PATEL, N. (2013): Colostrum-its Composition, Benefits as a Nutraceutical-A Review. *Curr. Res. Nutr Food Sci J.* 1 (1), pp. 37-47.
 P. BISWAS, A. VECCHI, P. MANTEGANI, B. MANTELLI, C. FORTIS AND A. LAZZARIN (2007): Immunomodulatory effects of bovine colostrum in human peripheral blood mononuclear cells. *New Microbiol.* 30, pp. 447-454.
 K. STELWAGEN, E. CARPENTER, B. HAIGH, A. HODGKINSON AND T. T. WHEELER (2009): Immune components of bovine colostrum and milk. *J. Animal. Sci.* 87, pp 3-9.

- R. J. PLAYFORD (2000): Peptide therapy and the gastroenterologist: colostrum and milk-derived growth factors. *Clinical Nutrition*, 20, pp. 101-106.
- C. M. SHING, J.M. PEAKE, K. SUZUKI, D. G. JENKINS AND J. S. COOMBES, J. S (2009): Bovine colostrum modulates cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells stimulated with lipopolysaccharide and phytohemagglutinin. *J Interferon Cytokine Res*, 29 (1), pp. 37-44.
- K. HAGIWARA, S. KATAOKA, H. YAMANAKA, R. KIRISAWA AND H. IWAI (2000): Detection of cytokines in bovine colostrum. *Vet Immunol Immunopathol.*, 76, (3), pp.183-19.
- M. KVERKA, J. BURIANOVA, R. LODINOVA-ZADNIKOVA, I. KOCOURKOVA, J. CINOVA, L. TUCKOVA AND H. TLASKALOVA-HOGENOVA (2007): Cytokine profiling in human colostrum and milk by protein array. *Clinical chemistry*, 53 (5), pp. 955-962.
- T.O. JOOS, D. STOLL, M.F. TEMPLIN (2002): Miniaturized multiplexed immunoassays. *Curr. Opin. Chem. Bio*, 6, pp. 76-80.
- Z. X. WAN, F. ZHANG, Q. GENG, P. Y. WANG, H. ZHOU AND Y. M. ZHANG (2010): Effect of orally administered bovine colostrum on cytokine production in vivo and in vitro in immunosuppressed mice. *Inter. dairy J.*, 20, pp. 522-527.
- V. GINJALA AND R. PAKKANEN (1998): Determination of Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1) and Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF-1) in bovine colostrum Samples. *J Immunoassay Immunochem.*, 19, pp. 195-207.
- Y. YOSHIOKA, S. KUDO, H. NISHIMURA, T. YAJIMA, K. KISHIHARA, K. SAITO AND Y. YOSHIKAI (2005): Oral administration of bovine colostrum stimulates intestinal intraepithelial lymphocytes to polarize Th1-type in mice. *Inter. J. Immunopharmacol.*, 5, pp. 581-590.

Přijato do tisku: 10. 3. 2016

Lektorováno: 25. 3. 2016

RYCHLÉ SPECIFICKÉ TESTY PRO KONTROLU PŘÍTOMNOSTI REZIDUÍ INHIBIČNÍCH LÁTEK V MLÉČE

Pavína Navrátilová¹, Jana Vyhnálková¹,
Jaroslava Jeřábková²

¹ Ústav hygieny a technologie mléka, Veterinární farmaceutická univerzita Brno, Palackého tř. 1946/1, Brno

² Státní veterinární ústav Jihlava, Rantířovská 93, Jihlava

Application of rapid tests in screening of residues of inhibitory substances in raw milk

Souhrn

Kontrola přítomnosti reziduí inhibičních látek v mléce je významným hygienickým ukazatelem jakosti syrového mléka podle současné legislativy EU. Důležitou součástí systému kontroly RIL v mléce jsou rychlé specifické testy, nacházející uplatnění v mlékárenském průmyslu. Text článku uvádí přehled vybraných rychlých testů využívaných v České republice, jejich princip, výhody a nevýhody použití.

Klíčová slova: rezidua inhibičních látek, rychlé testy, využití, princip

Summary

Control of the presence of residues of inhibitory substances in milk is one of significant sign of quality of raw milk according EU legislation. Rapid specific tests are important part of system of control residues of inhibitory substances, which are used mainly in the dairy industry. Article describes overall summary of some rapid tests used in Czech Republic, their principle, advantages and disadvantages during their usage.

Key words: residues of inhibitory substances, rapid test, use, principle

Úvod

Jedním z důležitých znaků jakosti syrového mléka je kontrola přítomnosti reziduí inhibičních látek (RIL). Přítomnost RIL v syrovém mléce je kontrolována v souladu se současnou legislativou z důvodu zajištění bezpečnosti mléka a mléčných výrobků pro spotřebitele. Nejvýznamnější skupinu inhibičních látek tvoří veterinární léčivé přípravky, především látky s antimikrobiálním účinkem - antibiotika a chemoterapeutika.

Detekce reziduí inhibičních látek (RIL) má nejen hygienický význam (ochrana zdraví spotřebitele), ale je i středem zájmu zpracovatelů mléka, protože zejména antimikrobiální látky působí problémy při výrobě mléčných výrobků, v jejichž technologickém procesu výroby se využívají čisté mlékařské kultury.

Podle současné legislativy, která stanovuje závazné znaky jakosti syrového kravského mléka a jiných druhů mlék (Nařízení Komise (EU) 1662/2006), musí provozovatelé potravinářských podniků zavést postupy s cílem zajistit, že syrové mléko nebude uvedeno na trh, pokud obsahuje rezidua antibiotik v množství, které pro jakoukoli z látek uvedených v příloze Nařízení Komise (EU) č.37/2010, překračuje hodnoty povolené tímto nařízením - maximální reziduální limity (MRL). Z tohoto pohledu zodpovědnost za jakost mléka nese dodavatel mléka a následně i zpracovatel, který mléko přijímá a zpracovává na mléčné produkty (pokud se mléko nezpracovává přímo na farmě). V mlékárenském průmyslu proto musí být veškeré přijímané mléko před zpracováním kontrolováno na přítomnost RIL. V příjmových laboratořích mlékárenského průmyslu i v laboratořích pro kontrolu jakosti mléka je důležité zvolit vhodné screeningové metody pro detekci RIL.

Mikrobiologické inhibiční metody jsou využívány jako screeningové metody. Jejich nevýhodou je náročná příprava, schopnost detekovat pouze antimikrobika a poměrně dlouhá inkubační doba. Proto byly a jsou stále vyvíjeny nové specifické testy, k jejichž přednostem patří rychlé provedení, jednoduchost a citlivost. Tyto testy nacházejí uplatnění zejména v mlékárenské praxi a v prvovýrobě mléka.