

VILNIAUS UNIVERSITETAS
VILNIAUS UNIVERSITETO IMUNOLOGIJOS INSTITUTAS

Jurgita Kazlauskaitė

**EGZOGENINIŲ LIZUOJANČIŲ FERMENTŲ IR MAISTO BALTŲMŲ
HIDROLIZATŲ POVEIKIS IMUNINEI SISTEMAI**

Daktaro disertacija

Biomedicinos mokslai, biologija (01B)

Imunologija, serologija, transplantacija (B500)

Vilnius, 2009

Disertacija rengta 2006-2009 m. Vilniaus universiteto Imunologijos institute.

Mokslinis vadovas:

habil. dr. Gediminas Arvydas Biziulevičius (Vilniaus universiteto Imunologijos institutas, biomedicinos mokslai, biologija – 01B, imunologija, serologija, transplantacija – B500).

Konsultantas:

dr. Genė Biziulevičienė (Vilniaus universiteto Imunologijos institutas, biomedicinos mokslai, biologija – 01B, imunologija, serologija, transplantacija – B500).

TURINYS

SANTRUMPOS.....	4
1. ĮVADAS	4
2. LITERATŪROS APŽVALGA	10
2.1. Žmogaus mikroflora	10
2.2. Fermentinė mikroorganizmų lizė.....	12
2.2.1. Lizuojančių fermentų substratas – mikroorganizmų ląstelės sienelė	12
2.2.2. Autolizė.....	14
2.2.3. Imunologiškai aktyvūs lizės produktai	17
2.2.3.1. Lipopolisacharidai	17
2.2.3.2. Peptidoglikanas ir muramo rūgšties peptidai.....	20
2.2.3.3. β-gliukanai	21
2.3. Antimikrobiniai ir imunostimuliuojantys peptidai	23
2.4. Maisto baltymų fermentinių hidrolizatų įtaka organizmui	33
2.4.1. Maisto baltymų fermentinių hidrolizatų poveikis vėžio vystymuisi	33
2.4.2. Antivirusinės maisto baltymų fermentinių hidrolizatų savybės	35
2.4.3. Maisto baltymų fermentinių hidrolizatų poveikis kraujotakos sistemai....	35
2.4.4. Maisto baltymų fermentinių hidrolizatų įtaka nervų ir virškinimo sistemoms	36
2.4.5. Maisto baltymų fermentinių hidrolizatų poveikis imuninei sistemai	37
2.4.5.1 Maisto baltymų fermentinių hidrolizatų poveikis uždegimui.....	38
2.4.5.2 Uždegiminės reakcijos.....	39
2.4.6. Antimikrobinis maisto baltymų fermentinių hidrolizatų aktyvumas.....	41
3. DARBO METODAI IR MEDŽIAGOS	43
3.1. Maisto baltymų fermentinių hidrolizatų paruošimas.....	43
3.2. Maisto baltymų hidrolizatų antimikrobinio aktyvumo įvertinimas	43
3.2.1. Mikroorganizmų biomasės paruošimas	43
3.2.2. Antimikrobinio aktyvumo nustatymas	44
3.3. Eksperimentiniai gyvūnai	44
3.4. Fagocituojančių ląstelių fagocitinio aktyvumo įvertinimas.....	45
3.4.1. Fagocitinio aktyvumo įvertinimas fluorimetriniu metodu.....	45
3.4.2. Fagocitinio aktyvumo įvertinimas tėkmės citometrijos metodu.....	46
3.5. Kazeino tripsininio hidrolizato priešuždegiminio poveikio įvertinimas	47
3.5.1. Ūminio uždegimo modelis.....	47
3.5.2. Hematologinių rodiklių nustatymas.....	48
3.5.3. Citokinų koncentracijos nustatymas	48
3.5.4. Kontaktinio hiperjautrumo reakcija.....	49
3.6. Lizocimo ir lizosubtilino poveikio pieno somatinių ląstelių kiekiui tyrimas ...	49
3.7. Statistinė rezultatų analizė	50
4. REZULTATAI.....	51
4.1. Antimikrobinis maisto baltymų fermentinių hidrolizatų poveikis.....	51
4.2. Maisto baltymų hidrolizatų poveikis fagocituojančių ląstelių aktyvumui.....	58
4.3. Kazeino tripsininio hidrolizato poveikis uždegiminėms reakcijoms.....	60
4.4. Egzogeninių antimikrobinų fermentų preparatų, lizocimo ir lizosubtilino, poveikis somatinių ląstelių kiekiui piene.....	64
5. REZULTATŲ APTARIMAS.....	68
6. IŠVADOS	77
7. DISERTACIJOS TEMA PASKELBTŲ PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS	78
8. LITERATŪROS SĄRAŠAS	80

SANTRUMPOS

ACE	angiotenziną konvertuojantis fermentas (angl. angiotensin converting enzyme)
BA	bazofilai (angl. basophils)
BPI	baktericidinis pralaidumą didinantis baltymas (angl. bactericidal permeability increasing protein)
CD	diferenciacijos antigenas (angl. cluster of differentiation)
CSF	kolonijas stimuliuojantis faktorius (angl. colony stimulating factor)
DGGE	elektroforezė denatūruojančiame gradiente (angl. denaturing gradient gel electrophoresis)
DNR	deoksiribonukleorūgštis (angl. deoxyribonucleic acid)
ELISA	imunofermentinis metodas (angl. enzyme-linked immunosorbent assay)
EO	eozinofilai (angl. eosinophils)
FISH	fluorescuojanti <i>in situ</i> hibridizacija (angl. fluorescence <i>in situ</i> hybridization)
FITC	fluoresceinizotiocianatas (angl. fluorescein isothiocyanate)
GM-CSF	granulocitų makrofağų kolonijas stimuliuojantis faktorius (angl. granulocyte macrophage colony stimulating factor)
HBSS	Henkso subalansuotas druskų tirpalas (angl. Hank's buffered salt solution)
Hgb	hemoglobinas (angl. haemoglobin)
HLA-DR	žmogaus leukocitų antigenas DR (angl. human leucocyte antigen DR)
ICAM-1	tarpląstelinės adhezijos molekulė 1 (angl. inter-cellular adhesion molecule 1)
IFN-γ	interferonas γ (angl. interferon γ)
Ig	imunoglobulinas (angl. immunoglobulin)
IL	interleukinas (angl. interleukin)
LBP	lipopolisacharidus prisijungiantis baltymas (angl. lipopolysaccharide binding protein)
LY	limfocitai (angl. lymphocytes)
LPS	lipopolisacharidai (angl. lipopolysaccharides)
MAP	mitogenu aktyvinamas baltymas (angl. mitogen activated protein)
MCH	vidutinis hemoglobino kiekis eritrocite (angl. mean cell haemoglobin)
MCHC	vidutinė hemoglobino koncentracija eritrocite (angl. mean corpuscular hemoglobin concentration)
MCV	vidutinis eritrocito tūris (angl. mean corpuscular volume)
MIP	makrofağų uždegiminiai baltymai (angl. macrophage inflammatory protein)
MO	monocitai (angl. monocytes)
MPV	vidutinis trombocito tūris (angl. mean platelet volume)
NE	neutrofilai (angl. neutrophils)
NF-IL6	transkripcijos faktorius IL6 (angl. nuclear factor IL6)
NF-κB	transkripcijos faktorius κ B (angl. nuclear factor κ B)
PAF	trombocitus aktyvuojantis faktorius (angl. platelet activating factor)
PCV	hematokritas (angl. packed cell volume)
PLT	trombocitai (angl. platelets)
RBC	eritrocitai (angl. red blood cells)
RDW	eritrocitų pasiskirstymo plotis (angl. red blood cell distribution width)
RFLP	restrikcijos fragmento ilgio polimorfizmas (angl. restriction fragment length polymorphism)
Tlr4	angl. toll-like receptor 4
TNF-α	naviko nekrozės faktorius (angl. tumor necrosis factor)
WBC	leukocitai (angl. white blood cells)

1. ĮVADAS

Daugumos pasaulio klinikinėje praktikoje naudojamų imunostimuliatorių pagrindas yra mikrobinių ląstelių komponentai, tokie kaip lipopolisacharidai, muramo rūgšties peptidai bei kiti peptidoglikano fragmentai, β -gliukanai, nukleorūgščių dariniai ir kt. (Werner, 1996). Tokie preparatai dažniausiai yra vartojami *per os*. Minėtų imunologiškai aktyvių komponentų (atskirų arba jų kompleksų) gamybos technologija remiasi jų ekstrakcija iš mikroorganizmų biomasės arba pastarosios suardymu mechaniniu, ultragarsiniu ar fermentiniu būdais. Fermentinis skaidymas, kuris pastaruoju metu tampa vis populiariesnis, yra atliekamas naudojant skirtingo specifškumo egzogeninius lizuojančius (mikroorganizmų ląstelių sienelę ardančius) fermentus arba sudarant sąlygas mikroorganizmų autolizės vyksmui.

Gamtoje pasitaiko nišų, kuriose aptinkamos stebėtinai didelės mikroorganizmų biomasės sankaupos. Viena tokių yra gyvūnų virškinimo sistema. Žmogaus žarnyne yra daugiau nei kilogramas mikroorganizmų (Biziulevičius, 2004; Kraehenbuhl ir Corbett, 2004). Buvo iškeltas klausimas – ar būtų galima pasinaudoti šia natūralia mikroorganizmų biomase organizmo imuninei būklei pagerinti, sukeliant žarnyno mikroorganizmų lizę *in situ*? Kai kurie techniniai sprendimai, kaip tokį procesą įvykdyti praktikoje, jau rasti. Žmonių imuninės sistemos stiprinimui *per os* naudojami kiaušinio baltymo lizocimas (Sava, 1996), proteolizinių fermentų kompleksai (Wobenzymas, Phlogenzymas ir kt.) (Kleine, 1997), o kitų gyvūnų – bakterinis lizocimas, lizosubtilinas bei jo dariniai (Valstybinės Veterinarijos Tarnybos instrukcija, 1993; 1993a). Teigiami rezultatai rodo, kad egzogeninių antimikrobinių fermentų panaudojimo imunostimuliacijos tikslais sritį galima ir toliau tobulinti ir plėsti. Tai buvo padaryta šio darbo metu, įvertinant egzogeninių fermentinių preparatų įtaką karvių pieno somatinių ląstelių kiekiui. Padidėjęs somatinių ląstelių kiekis – vienas iš karvių pieno liaukose vykstančių uždegiminių reakcijų indikatorių.

Tuo tarpu žarnyno mikrofloros autolizės skatinimo *in situ* darbai yra dar tik užuomazgos stadijoje. Pagrindinė problema – medžiagų, kurios, sukeldamos mikroorganizmų autolizę organizme, neturėtų pašalinio poveikio, atradimas. Problemos sprendimą palengvino pastebėjimai, kad pieno baltymo – kazeino – tripsininis hidrolizatas skatina mikroorganizmų autolizę *in vitro* (Biziulevičius ir kt., 2002), o naudojant *per os*, ir organizmo apsaugines funkcijas (Biziulevičius ir kt., 2003).

Apie tai, kad maisto baltymai yra ne tik būtina gyvybės palaikymui maisto sudedamoji dalis, tačiau ir pagrindinis sėkmingam organizmo funkcionavimui reikalingų bioaktyvių peptidų šaltinis, žinoma labai seniai. Ypatingas dėmesys skiriamas maisto baltymų sudėtyje esantiems antimikrobiniais ir imunostimuliuojantiems peptidams bei akcentuojamos jų praktinio pritaikymo galimybės. Iš paskelbtų duomenų aišku, jog tikslių įrodymų apie maisto baltymų antimikrobinį peptidų veikimo mechanizmą nėra, tačiau manoma, jog jie, kaip ir organizme natūraliai sintetinami katijoniniai antimikrobiniai peptidai, veikia savo elektrostatiniais krūviais depoliarizuodami mikrobinės ląstelės sienelės struktūrą (Meisel, 1998; Tirelli ir kt., 1997; Pellegrini, 2003; Clare ir kt., 2003; Floris ir kt., 2003).

Iškeltos hipotezės (Biziulevičius, 2004), kad maisto baltymai, virškinimo fermentais suardyti iki peptidų, aktyvina žarnyno mikrofloros autolizę, o šio proceso metu atsipalaidavę imunologiškai aktyvūs komponentai stimuliuoja imuninę sistemą, patvirtinimui buvo patikrinti keletos maisto baltymų hidrolizatų antimikrobinis ir imunostimuliuojantis aktyvumai ir įvertinta, ar maisto baltymų vartojimas galėtų tapti imuninės sistemos stiprinimo būdu.

Darbo tikslas

Nustatyti egzogeninių lizuojančių fermentų ir maisto baltymų hidrolizatų poveikį imuninei sistemai.

Uždaviniai

1. Įvertinti maisto baltymų, kazeino, α -laktalbumino, β -laktoglobulino, ovalbumino ir serumo albumino, fermentinių hidrolizatų gebėjimą stimuliuoti natūraliai besiautolizuojančių ir natūraliai nesiautolizuojančių mikroorganizmų autolizę;
2. Įvertinti minėtų maisto baltymų fermentinių hidrolizatų gebėjimą stimuliuoti fagocituojančių ląstelių, pilvaplėvės makrofagų bei kraujo monocitų ir granulocitų, fagocitinį aktyvumą;
3. Nustatyti, ar egzistuoja ryšys tarp minėtų maisto baltymų fermentinių hidrolizatų gebėjimo stimuliuoti mikroorganizmų autolizę ir imuninę sistemą (fagocituojančių ląstelių fagocitinį aktyvumą);
4. Įvertinti maisto baltymo fermentinio hidrolizato, pasižyminčio stipriausiomis fagocituojančias ląsteles stimuliuojančiomis savybėmis, priešuždegiminį poveikį;
5. Nustatyti egzogeninių lizuojančių fermentinių preparatų, lizocimo, lizosubtilino, šių abiejų preparatų mišinio bei jų kombinacijų su vitaminais, poveikį karvių pieno somatinių ląstelių skaičiui.

Ginamieji teiginiai

1. Maisto baltymų kazeino, α -laktalbumino, β -laktoglobulino, ovalbumino ir serumo albumino fermentiniai hidrolizatai stimuliuoja tiek mikroorganizmų, kuriems būdinga natūrali autolizė, tiek natūraliai nesiautolizuojančių mikroorganizmų autolizę;
2. Minėtų maisto baltymų hidrolizatai stimuliuoja BALB/c linijos pelių fagocitinių ląstelių (pilvaplėvės makrofagų bei kraujo monocitų ir granulocitų) fagocitinį aktyvumą;
3. Tarp minėtų maisto baltymų hidrolizatų antimikrobinio ir imunostimuliuojančio veikimo egzistuoja tiesioginis ryšys;
4. Kazeino tripsininis hidrolizatas nepasižymi priešuždegiminėmis savybėmis.

5. Egzogeninių lizuojančių fermentų preparatai – efektyvi priemonė, mažinanti somatinių ląstelių skaičių karvių piene.

Darbo aktualumas ir naujumas

Pagrindinis imuninės sistemos uždavinys – apsaugoti organizmą nuo patogenų. Atsparumas mikrobinėms infekcijoms yra aktuali problema šiuo metu, kuomet pastebimas vis didėjantis mikroorganizmų atsparumas antibiotikams. Didelė dalis antibiotikų – vieno didžiausių žmonijos atradimų, išgelbėjusių milijardus gyvybių – šiuo metu tapo nebeveiksmingi. Dėl ilgalaikio, o dažnai ir neracionalaus antibiotikų vartojimo mikroorganizmų atsparumas didėja. Vis dažniau pasitaiko susirgimų jau užmirštomis infekcinėmis ligomis, tokiomis kaip tuberkuliozė, difterija ar kt. Todėl naujų imuninės sistemos stiprinimo būdų, lemiančių organizmo savaiminį atsparumą įvairioms infekcijoms ir padedančių išvengti antibiotikų vartojimo, paieška yra svarbus tikslas. Maisto baltymai ir fermentiniai preparatai, tokie kaip lizosubtilinas ir lizocimas, kurie buvo panaudoti mūsų darbe, yra efektyvios antimikrobinės gydymosi priemonės, pasižyminčios ir imunitetą stiprinančiomis savybėmis.

Imuninės sistemos stiprinimas ypatingai svarbus žmonėms, turintiems imuninės sistemos nepakankamumą, kuris gali būti tiek įgimtas, tiek įgytas įvairių ligų, tokių kaip vėžys, AIDS ir kt., ar jų gydymo, kuomet naudojama chemoterapija ar imunosupresuojantys medikamentai, metu.

Faktų, jog dalis maisto baltymų hidrolizatų ar atskirų peptidų pasižymi antimikrobinėmis ir/arba imunostimuliuojančiomis savybėmis, gausu, tačiau priežastys, lemiančios šiuos aktyvumus, nėra pakankamai aiškios. Šio darbo rezultatai rodo ryšį tarp antimikrobinio ir imunostimuliuojančio aktyvumų. Tai leido pateikti maisto baltymų bifunkcinio veikimo teoriją: maisto baltymai virškinimo trakte suskaldomi iki biologiškai aktyvių peptidų, kurie, sukeldami mikroorganizmų autolizę, sąlygoja imunologiškai aktyvių mikrobinių ląstelių sienelių komponentų atpalaidavimą, o pastarieji veikia imuninę sistemą.

Nors apie fermentinių antimikrobinių preparatų panaudojimą gydymo ir imunostimuliacijos tikslais žinoma labai daug, tačiau jų poveikis somatinių ląstelių skaičiui karvių piene nebuvo tirtas, todėl pirmą kartą ištirtas egzogeninių antimikrobinių fermentų preparatų gebėjimą sumažinti pieno somatinių ląstelių skaičių.

Darbo praktinė reikšmė

Žinant, kad tiek egzogeninių lizuojančių fermentų preparatai, tiek autolizinių fermentų aktyvinimui naudojami maisto baltymų hidrolizatai organizme, atlikę savo funkciją, proteolizinių fermentų yra suskaidomi iki amino rūgščių ir panaudojami organizmo reikmėms, galima prognozuoti dideles jų pritaikymo imuninės sistemos stiprinimui galimybes. Viena jų – maisto baltymų hidrolizatų panaudojimas funkcinio maisto kūrimui. Funkcinis maistas – maistas arba maisto komponentai, turintys sveikatą gerinančių savybių. Be abejo, funkcinio maisto kūrime turi dalyvauti kelių mokslo sričių specialistai: enzimologai, imunologai, mikrobiologai, gydytojai, mitybos specialistai.

Sėkmingas egzogeninių fermentinių preparatų pritaikymas karvių pieno somatinių ląstelių, atspindinčių organizmo imuninės sistemos būklę, skaičiaus sumažinimui leidžia tikėtis jų pripažinimo gyvulininkystėje ir pieno pramonėje, kuriai ypač svarbi apdorojamo pieno kokybė.

2. LITERATŪROS APŽVALGA

2.1. Žmogaus mikroflora

Suaugusio žmogaus organizme yra apie 10^{13} ląstelių, būdingų eukariotams, bei apie 10^{14} ląstelių, būdingų prokariotams (10 % - 90 %, atitinkamai) (Hooper ir kt., 2002; Tlaskalová-Hugenová ir kt., 2004).

Stabili suaugusiojo mikroflora sudaryta iš autochtoninių (nuolatinių) ir alochtoninių (laikinių) mikroorganizmų rūšių. Suaugusio žmogaus organizmą kolonizuoja 400 – 1000 mikroorganizmų (bakterijų, grybų, virusų ir pirmuonių) rūšių (Tlaskalová-Hugenová ir kt., 2004; Mai ir Morris, 2004; Noverr ir Huffnagle, 2004). Iš šios rūšių įvairovės dominuoja tik 30 – 40 (daugiausia bakterijų) rūšių, t.y. jos sudaro 99 % visos populiacijos (Hooper ir kt., 2002). 60 % visų rūšių nekultivuojamos *ex vivo* įprastiniais metodais, todėl jų identifikavimui pasitelkiami molekuliniai metodai, pagrįsti 16S rDNR sekų panašumu, FISH, DGGE, RFLP, kokybinė dot-blot hibridizacija ir 16S rDNR sekvenavimas (Mai ir Morris, 2004).

Dauguma mikrofloros rūšių (97 %) yra griežti anaerobai ir tik 3 % sudaro aerobai (fakultatyviniai anaerobai). Burnos ertmėje aptinkama daugiau nei 500 rūšių bakterijų, kolonizuojančių dantis, liežuvį, gleivinę. Čia dominuoja streptokokai ir *Actinomyces* sp., o taip pat *Porphyromonas gingivalis* (Tlaskalová-Hugenová ir kt., 2004). Tuo tarpu nosies ertmėje, nosiaryklėje aptinkami stafilokokai, streptokokai ir gramneigiami kokai (Tlaskalová-Hugenová ir kt., 2004). Pastarieji mikroorganizmai kolonizuoja ir distalinę moterų urogenitalinio trakto dalį. Oda taip pat nuolat sąveikauja su aplinkoje esančiomis bakterijomis. Nors sąlygos (drėgmė, temperatūra ir mitybinių medžiagų gausa) ypač tinkamos bakterijoms, tačiau odos anatominiai ypatumai riboja sėkmingą jų augimą. Daugiausia odą kolonizuoja gramteigiamų obligatinių aerobų (*Micrococcus*) arba fakultatyvinių anaerobų (*Staphylococcus* ir *Corynebacterium*) genčių atstovai (Tlaskalová-Hugenová ir kt., 2004).

Tačiau didžiausia dalis mikrofloros lokalizuojasi žarnyne. Mikrobu kompozicija ir kiekis įvairiuose žarnyno segmentuose skiriasi. Daugiausia mikroorganizmų yra distalinėje plonosios žarnos dalyje (apie 10^8 /ml turinio) ir gaubiamojoje žarnoje (10^{12} /g turinio). Daugiau nei 90 % čia esančios populiacijos sudaro *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Escherichia* genčių atstovai. Mažą, tačiau nuolat aptinkamą mikrofloros dalį, sudaro *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Streptococcus* bei *Staphylococcus* genčių atstovai (Tlaskalová-Hugenová ir kt., 2004; Noverr ir Huffnagle, 2004). Į žarnyno populiacijos sudėtį įeina ir grybai, iš kurių gausiausia *Candida* genties atstovų, t.y. *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. lambica*, *C. guilliermondii* (Rastall, 2004; Khatib ir kt., 2001). Virškinamąjį traktą kolonizuoja ir kiti grybai, tokie kaip *Rhodotorula* sp., *Saccharomyces* sp., *Geotrichum candidum*, *Blastoshizomyces capitatus*, *Yarrowia lipolytica*, *Cryptococcus* sp. (Khatib ir kt., 2001; Bernhardt ir Knoke, 1997). Normalioje mikrofloroje grybų yra apie 10^3 /ml žarnos turinio.

Virškinamajame trakte mikroflora suformuoja sudėtingą ekosistemą (Yan ir Gilbert, 2004), kurią galima įsivaizduoti kaip „judantį termostata“, skirtą mikroorganizmams gyvuoti. Tokia simbiozė teikia abipusę naudą. Mikroorganizmus tenkina reikiama temperatūra ir maistinių medžiagų gausa. Tuo tarpu jie patys padeda šeimininkui įsisavinti maistą, t.y. gamina fermentus, reikalingus maisto medžiagų metabolizmui; moduluoja metabolinius procesus (pavyzdžiui, bilirubiną verčia į tirpias urobilinogeno formas arba transformuoja kancerogeninius ksenobiotikus bei fitoestrogenus); palengvina įvairių toksinių medžiagų pašalinimą; apsaugo epitelines ląsteles nuo patogeninių mikroorganizmų kolonizacijos; išskiria vitaminus bei kitas organizmui reikalingas medžiagas ir t.t. (Hooper ir kt., 2002; Mai ir Morris, 2004). Mikrofloros nauda šeimininko organizmui neabejojama. Mažiau žinomas reiškinys, vadinamas „V. Bocci teorija“, kuri teigia, kad žmogaus mikroflora yra „nepripažintas organas, pasižymintis lemtingu imunostimuliuojančiu veikimu“. Vykstant mikrofloros natūraliai autolizei, išsiskiria mikrobinės

ląstelės sienelės fragmentai, turintys teigiamą įtaką organizmo imuninei sistemai (Bocci, 1992). Nepaprastai didelis mikroorganizmų kiekis makroorganizme, esant normaliai pastarojo būklei, yra pastovus ar bent panašus dydis, tačiau konkrečių mikrobinių ląstelių, lygiai kaip ir bet kurių kitų ląstelių, būvis nuolat keičiasi. Mikroorganizmų ląstelės auga, dauginasi, miršta ir visi šie procesai vienokiu ar kitokiu būdu yra susiję su jų autolizine sistema.

2.2. Fermentinė mikroorganizmų lizė

Mikrobinės ląstelės lizė – sudėtingas daugiapakopis procesas, kurio metu vyksta struktūrinių elementų degradacija, lemianti ląstelės žūtį. Ypač svarbus ląstelės sienelės irimo etapas, kuris vyksta tiek tam tikrų fiziko-cheminių veiksnių (pH, temperatūros, slėgio ir t.t.), tiek specifinių fermentų, vadinamų lizuojančiais arba tiesiog antimikrobiniais, įtakoje (Biziulevičius ir kt., 2002). Sienelės suardyme gali dalyvauti tiek viduląsteliniai lizuojantys fermentai (autoliziniai), tiek egzogeniniai lizuojantys fermentai. Ir vieni ir kiti savo katalitinio veikimo pobūdžiu yra analogiški, skirtinga tik jų lokalizacijos vieta mikrobinėje ląstelėje.

2.2.1. Lizuojančių fermentų substratas – mikroorganizmų ląstelės sienelė

Pagrindinis bakterinės ląstelės sienelės struktūrinis komponentas – peptidoglikanas (mureinas) aptinkamas tiek gramteigiamose (40-95% sausos ląstelės sienelės masės), tiek gramneigiamose (10-20% sausos ląstelės sienelės masės) bakterijose. Peptidoglikanas suteikia ląstelei tvirtumą, t.y. atsparumą osmotiniams ir mechaniniams pažeidimams, o kartu ir elastingumą, dinamiškumą, reikalingą saugiam ląstelės augimui ir dalijimuisi (Захарова ir Павлова, 1985). Peptidoglikanas - heteropolimeras, kurio polisacharidinės grandinės sudarytos iš dviejų aminosacharidų: N-acetil-D-gliukozamino ir N-acetil-muramo rūgšties, sujungtų β -1,4-glikozidiniu ryšiu. Prie kiekvienos N-acetil-muramo rūgšties liekanos karboksilo grupės yra prijungtas peptidinis subvienetas, dažniausiai sudarytas iš keturių amino rūgščių: L-alanino, D-

glutamino, L-lizino (arba diaminopimelato) bei D-alanino. Dalis peptidinių subvienetų, esančių gretimose polisacharidinėse grandinėse, sujungti peptidiniu tilteliu (Кислухина ir kt., 1990; Koch, 2003; Salazar ir Asenjo, 2007; Vollmer ir kt., 2008).

Be šio polimero į gramteigiamų bakterijų sienelės sudėtį įeina ir baltymai, lipidai, teichoinės rūgštys. Gramneigiamų bakterijų peptidoglikano sluoksnis įsiterpęs tarp citoplazminės ir išorinės membranų. Pastarosios pagrindinės sudėtinės dalys - lipoproteinai ir lipopolisacharidai (LPS). LPS sudaryti iš lipofilinės dalies, t.y. lipido A, ir hidrofilinio domeno – polisacharido. Lipidą A sudaro dvi fosforilintos D-gliukozamino molekulės, sujungtos β -1,6-glikozidiniu ryšiu, bei riebiųjų rūgščių grandinės (Кислухина, 2002).

Grybinės ląstelės sienelė – gyvybiškai svarbus ląstelės elementas, suteikiantis mechaninio stiprumo, galinčio atlaikyti osmotinio slėgio pokyčius, pasižymintis plastinėmis savybėmis, leidžiančiomis ląstelei augti bei dalintis, palaikantis ląstelės vientisumą ir formą.

Grybų ląstelės sienelės pagrindinė sudėtinė dalis – polisacharidai (80-90 % sausos ląstelės sienelės masės), tokie kaip celiuliozė, chitinas, gliukanai, mananai, kurie sudaro mikrofibrilinę ląstelės sienelės dalį. Prie jų jungiasi kiti grybų ląstelės sienelės komponentai – baltymai ir glikolipidai (Шкляр, 1977; Lipke ir Ovalle, 1998; Bowman ir Free, 2006).

Daugelio grybų ląstelės sieniei tvirtumo suteikia chitinas. Tai nedidelę sausos ląstelės sienelės masės dalį (1-2 % mielėse ir 10-20 % filamentiniuose grybuose) sudarantis, tačiau struktūriškai svarbus komponentas. Chitinas - N-acetil-D-gliukozamino linijinės struktūros homopolimeras, kuriame monomerai sujungti β -1,4-glikozidine jungtimi. Chitinas gali būti sujungtas su β -gliukanais ir mananais, kurie, savo ruožtu, yra pagrindiniai mielių struktūriniai polisacharidai. Kiekvienas šių komponentų sudaro apie 40 % sausos mielių ląstelės sienelės masės (Шкляр, 1977; Lipke ir Ovalle, 1998; Selitrennikoff, 2001; Bowman ir Free, 2006; Salazar ir Asenjo, 2007).

2.2.2. Autolizė

Bakterinėse ląstelėse - peptidoglikanas, o grybinėse - chitinas ir β -gliukanas yra tos ląstelės sienelės struktūros, kurias pažeidus gali suirti ne tik sienelė, bet ir visa ląstelė. Todėl viduląsteliniai fermentai, galintys suardyti šių struktūrų ryšius ir iššaukti ląstelės degradaciją, ir vadinami autolizuojančiais arba autolizinais. Bakterijų autolizuojantys fermentai – tai peptidoglikano hidrolazės, unikali fermentų klasė, dalyvaujanti įvairiuose ląstelėje vykstančiuose procesuose, susijusiuose su ląstelės sienelės formavimusi ir degradavimu, t.y. ląstelių augime bei žuvime, morfogenezėje, sporų formavime (Кислухина ir kt., 1990; Goldman ir Branstorm, 1999; Vollmer ir kt., 2008). Terminas autolizė reiškia ląstelės susinaikinimą (savidestrukciją), viduląstelinių fermentų sąlygotą struktūrų depolimerizaciją. Vykstant hidrolizei trimatė polimero struktūra suardoma į atskirus elementus. Pavyzdžiui, veikiant amidazėms susidaro atskiros peptidoglikano grandinės; veikiant glikozidazėms – mažesnio polimerizacijos laipsnio fragmentai ir kt.

Pagal hidrolizuojamą ryšį bakterijų autolizinais skirstomi į lizuojančias glikozidazes (N-acetil-muramidazes ir N-acetil-D-gliukozaminidazes), amidazes bei endopeptidazes (Ghuysen ir kt., 1966; Ghuysen ir kt., 1967; Strominger ir Ghuysen, 1967; Østlie ir kt., 1999; Smith ir kt., 2000; Bowman ir Free, 2006; Salazar ir Asenjo, 2007; Vollmer ir kt., 2008). Lizuojančios glikozidazės hidrolizuoja β -1,4 ryšius tarp N-acetil-muramo rūgšties ir N-acetil-D-gliukozamino. N-acetil-muramidazės (lizocimo) atveju redukuojančiame gale susidaro N-acetil-muramo rūgštis, o N-acetil-D-gliukozaminidazės atveju - N-acetil-D-gliukozaminas. Amidazės (dažniausiai N-acetil-muramil-L-alaninamidazė) suardo ryšius, esančius tarp peptidoglikano ir peptidinių subvienetų. Endopeptidazės hidrolizuoja peptidines jungtis peptidiniuose subvienetuose ir tilteliuose. Aprašyta dar viena lizuojančių fermentų klasė – lizuojančios transglikozilazės, ardančios tą patį ryšį kaip ir N-acetil-muramidazės, tačiau atpalaiduojančios kitą reakcijos produktą, t.y. anhidromuropeptidą (Höltje, 1996; van Heijenoort, 2001; Vollmer ir kt., 2008).

Grybų autolizuojantys fermentai skirstomi į lizuojančias β -gliukanazes, chitinazes ir endopeptidazes (Шкляр, 1977; Кислухина, 2002).

Autolizę gali sąlygoti vienas ar keletas autolizuojančių fermentų. Pavyzdžiui, muramidazė, kaip vienintelis autolizinas aptinkamas *Lactobacillus acidophilus*, *Strep. cremoris*, *Strep. faecium*, *Strep. pneumoniae*, *Staph. aureus* ir kt. Bacilose randami dviejų tipų fermentai: N-acetil-D-gliukozaminidazės ir amidazė. Šių tipų autolizinais aptinkami daugumoje bakterijų. Žymiai sudėtingesnis autolizuojantis kompleksas būdingas *E. coli* ląstelei: dvi lizuojančios glikozidazės, amidazė ir ne mažiau kaip dvi endopeptidazės (Захарова ir Павлова, 1985; Кислухина ir kt., 1990).

Bakterijose autolizuojantys fermentai lokalizuojasi ląstelės sienelėje, periplazminėje erdvėje ir/arba citoplazminėje membranoje. Pavyzdžiui, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *E. coli* autolizuojanti amidazė yra sienelėje. Tuo tarpu *B. licheniformis* šis fermentas lokalizuotas su sienele sąveikaujančiose citoplazminės membranos vietose; *Micrococcus lysodeikticus* ir *Staph. aureus* aptinkamas ir membranoje, ir sienelėje. *Lactococcus lactis* N-acetil-muramidazė asocijuota su citoplazmine ląstelės membrana ir sienele. *E. coli* nustatytos trys su išorine membrana susijusios transglikozilazės (Кислухина ir kt., 1990; Кислухина, 2002).

Sąveikos tarp autolizinių ir sienelės struktūrų stiprumas yra nevienodas. *B. subtilis* amidazė sudaro stiprų ryšį su sienele, o *B. megaterium* amidazė lengvai pereina į tirpią formą. Silpnas ryšys su ląstelės sienelės komponentais būdingas ir *Staph. aureus* bei *Staph. epidermidis* autolizuojantiems kompleksams. *Strep. pneumoniae* ryšio tarp amidazės ir sienelės stiprumas priklauso nuo terpės joninės jėgos: esant druskoms fermentas stipriai surištas su sienele, vandeninėje suspensijoje amidazė pereina į tirpią formą (Захарова ir Павлова, 1985).

Bakterinių ląstelių autolizės reguliacija vyksta įvairių sistemų ir mechanizmų pagalba. Autolizę gali sukelti aplinkos faktorių (pH, temperatūra, slėgis) pokyčiai, kai kurios cheminės medžiagos (mineralinės druskos, organiniai tirpikliai, paviršiaus aktyvios medžiagos). Tačiau ypatingą vaidmenį

tiesioginėje autolizuojančio aktyvumo kontrolėje atlieka teichoinės, teichuroninės ir lipoteichoinės rūgštys, fosfolipidai. *Strep. pneumoniae* lipoteichoinė rūgštis (Forsmano antigenas) yra specifinis šios bakterijos autolizuojančios amidazės inhibitorius. Už šį poveikį atsakingas į antigeno sudėtį įeinantis cholinas. Būtent jis susiriša su amidaze, slopindamas fermento veikimą. Lipoteichoinės rūgštys inhibuoja *Strep. faecium* bei *L. acidophilus* muramidazę ir *B. subtilis* amidazę. Kai kuriose bacilose autolizės sistemą reguliuoja sienelės teichuroninės rūgštys. Kaip autolizės reguliatoriai žinomi ir baltyminiai junginiai, esantys ląstelės sienelės sudėtyje. Pavyzdžiui, *B. subtilis* autolizuojanti amidazė yra aktyvuojama baltymo-modifikatoriaus, kurį produkuoja pati bakterija. Šis baltymas neturi fermentinio aktyvumo, tačiau, sudaręs kompleksą su amidaze, aktyvuoja pastarąją. Autolizinių aktyvavimas gali būti susijęs ir su proteolize. Yra žinoma, kad *Strep. faecalis* paveikus tripsinu muramidžė iš latentinės surištos formos pereina į aktyvią laisvą formą. Tokį poveikį turi ne tik tripsinas, bet ir juo hidrolizuoti baltymai (Захарова ir Павлова, 1985; Кислухина ir kt., 1990; Кислухина, 2002). Apie baltymų fermentinių hidrolizatų įtaką autolizės aktyvavimui šiame darbe bus dar ne kartą kalbama.

Autolizės proceso baigtis priklauso ne tik nuo fermentų aktyvumo, bet ir nuo antrojo etapo – protoplasto dezintegracijos – greičio (Захарова ir Павлова, 1985). Protoplasto destrukcijai didžiausią įtaką turi osmotinis slėgis bei specifiniai reguliaciniai faktoriai. Tai paties mikroorganizmo sintetamos termostabilios baltyminės-lipidinės kilmės paviršiaus aktyvios medžiagos, ardančios protoplastą.

Nors grybinėse ląstelėse vykstantys autolizės procesai išnagrinėti kur kas mažiau, tačiau galima teigti, kad grybų ir bakterijų autolizuojančių fermentų veikimo mechanizmai ir principai yra labai panašūs (Захарова ir Павлова, 1985)

Mikroorganizmų autolizės pasekoje atsipalaiduoja biologiškai aktyvūs sienelės komponentai, tokie kaip lipopolisacharidai, peptidoglikanai ir muramo

rūgšties peptidai, β -gliukanai ir kt. Jų poveikis organizmo imuninei sistemai gana gerai žinomas.

2.2.3. Imunologiškai aktyvūs lizės produktai

2.2.3.1. Lipopolisacharidai

Stipriausias imunostimuliuojantis veikimas būdingas lipopolisacharidams (LPS). Tai - pagrindiniai gramneigiamų bakterijų išorinės membranos komponentai. Viena iš jo sudėtinių dalių – lipidas A, kuris ir yra imunoreaktyvus lipopolisacharido centras (Alexander ir Rietschel, 2001).

LPS atpažįsta komplemento sistema ir antikūnai, sąlygojantys mikrobu opsonizaciją ir lizę. Atsako į mikroorganizmus metu, svarbiausios yra fagocitinės ląstelės (monocitai, makrofagai ir polimorfonukleariniai leukocitai), kurios opsonizuotas bakterijas atpažįsta komplemento ir Fc receptorių pagalba (Nau ir Eiffert, 2002). Be to, šios ląstelės gausiai ekspresuoja diferenciacijos antigenus CD14 ir Tlr4 receptorius tiesiogiai sąveikaujančius su mikroorganizmų sienelės fragmentais (Alexander ir Rietschel, 2001; Nau ir Eiffert, 2002; Paulsen, 2000; Ginsburg, 2002). Lipopolisacharidų prisijungimą prie CD14 receptoriaus katalizuoja ūminės fazės baltymas LBP. CD14 receptorius jungiasi su lipopolisacharidais esant netgi labai mažoms šių molekulių koncentracijoms (<10 ng/ml). Ši sąveika paleidžia visą kaskadą uždegiminių ir priešuždegiminių mediatorių ir sutelkia imunines ląsteles. LPS aktyvuoti makrofagai tampa metaboliškai aktyvūs ir ima produkuoti antimikrobinius agentus (lizocimą, katijoninius peptidus, laktoferiną, rūgštines hidrolazes) bei uždegiminius mediatorius, kurių pagrindinis yra naviko nekrozės faktorius TNF- α (Alexander ir Rietschel, 2001; Nau ir Eiffert, 2002; Paulsen, 2000; Heinzelmann ir kt., 1997; Van Amersfoort ir kt., 2003). Kadangi Kupferio ląstelėse TNF- α mRNR transkribuojama konstitutyviai, todėl po fagocitų sąveikos su LPS, šis citokinas pradedamas produkuoti vienas pirmųjų. Po signalo indukuojama ir interleukinai IL-1, IL-6, bei tęsiama TNF- α mRNR sintezė. Pradedami

produkuoti ir IL-8, IL-12, trombocitus aktyvuojantis faktorius PAF, chemokinais, eikozanoidais. Šie mediatoriai kartu su komplemento komponentais C3a ir C5a į infekcijos židinį pritraukia polimorfonuklearinius fagocitus ir juos aktyvuoja. Neutrofilų migraciją lemia vazodilatacija bei suintensyvėjusi adhezijos molekulių ekspresija endotelinių ląstelių, makrofagų ir neutrofilų paviršiuje. Prasideda daugiabranduolių polimorfonuklearinių ląstelių intravaskuliarinė agregacija, adhezija prie endotelio, diapedezė ir mediatorių tokių kaip TNF- α , leukotrienas B₄ ir PAF produkavimas. Jų paviršiuje pradeda ekspresuoti CD14, CD11/CD18 ir keletas komplemento bei Fc receptorių, kurie įgalina ląsteles atpažinti ir fagocituoti LPS. Neutrofilai taip pat pradeda sekretuoti baktericidinius agentus, t.y. lizocimą, bakterijų pralaidumą didinantį baltymą, fermentus, reaktyviojo deguonies radikalus. Endotelinės ląstelės taip pat reaguoja į LPS produkuodamos IL-1, IL-6, eikozanoidus, vazoaktyvius agentus, endoteliną 1, chemokinus ir kolonijas stimuliuojantį faktorių CSF. Skirtingų ląstelių populiacijų išskiriami mediatoriai aktyvuoja T ir B limfocitus. Pastarieji sekretuoja IL-2, interferoną IFN- γ ir granulocitų makrofagų kolonijas stimuliuojantį faktorių GM-CSF. IL-2 ir GM-CSF dalyvauja vienbranduolių ir daugiabranduolių fagocitų proliferacijoje ir aktyvavime, o IFN- γ padidina LPS poveikį makrofagams (Van Amersfoort ir kt., 2003; Lehner, 2001).

LPS inicijuoja ir humoralinį atsaką, t.y. aktyvuoja tris komplemento kelius: lektininį, prisijungdamas prie manozę surišančio baltymo lektino, alternatyvų, prisijungdamas prie komplemento faktoriaus C3, bei klasikinį, per komponentą C1q (Van Amersfoort ir kt., 2003; Lehner, 2001; Kindt ir kt., 2007). Pastarasis kelias aktyvuojamas esant imunoglobulinams IgG ir IgM. Visais trimis atvejais prie molekulės lieka prisitvirtinęs C3b, kuris palengvina makrofagų ir neutrofilų fagocitozę ir leidžia ant mikrobinės ląstelės paviršiaus įsiterpti membranos atakos kompleksui, C5-C9, sąlygojančiam ląstelės lizę. Atsipalaidavusiems C3a ir C5a būdingas kraujagyslių pralaidumą, makrofagų ir neutrofilų paviršiuje adhezijos molekulių ekspresiją didinantis ir šias ląsteles aktyvuojantis poveikis. Be to šie komplemento komponentai aktyvuoja

granulocitus ir putliąsias ląsteles, kurios produkuoja įvairius vazoaktyvius junginius, pavyzdžiui, histaminą, palengvinančius fagocitų invaziją. Mediatoriai TNF- α , IL-1 ir IL-6 stimuliuoja parenchimines kepenų ląsteles, kurios ima išskirti ūmios fazės baltymus, t.y. C-reaktyvų baltymą, serumo amiloidą A, LBP, hemopeksiną, haptoglobiną, komplemento komponentus C3 ir C9, α_1 -rūgštinį glikoproteiną, α_2 -makroglobuliną ir kai kuriuos proteinazės inhibitorius (Van Amersfoort ir kt., 2003; Lehner, 2001).

Normaliomis fiziologinėmis sąlygomis imuninės ląstelės nuolat susiduria su mikrofloros atpalaiduotais LPS. Yra nustatyta, kad nuolatinė organizmo sąveika su mažomis šio endotoksino koncentracijomis yra būtina palaikant imuninės sistemos budrumą (Van Amersfoort ir kt., 2003). Tai įrodo ir sveikų individų organizmuose randami maži LPS kiekiai. Be to yra žinoma, 'endotoksino tolerancija' – fenomenas, kuris parodo, kad pakartotinos LPS dozės susilpnina imuninį atsaką į šį endotoksiną, sušvelnina metabolinius pokyčius, tokius kaip karštis ir uždegimas, bei sumažina letalumą (Lehner, 2001). Daugelis *in vivo* bandymų parodė, kad profilaktika LPS'u apsaugo nuo uždegimo sukeltų pažeidimų. Tai aiškinama makrofagų supresavimu, t.y. pagrindinio uždegiminio mediatoriaus TNF- α , o taip pat IL-6, IL-1 α ir IL-1 β , CSF ir IFN- γ produkcijos sumažinimu (Van Amersfoort ir kt., 2003). Sumažėja ir TNF- α mRNR, o tai siejama su citokino kontrole transkripciniame lygyje. Tikslus makrofagų supresijos mechanizmas nėra galutinai išnagrinėtas, tačiau turimi duomenys rodo, kad tai gali būti sumažėjusios Tlr4 ekspresijos pasekmė. Tai taip pat gali būti susiję su pažeistu G baltymu ir fosfolipazės D, fosfatidilinozitol-3 kinazės ekspresija. Pastebėta supresuota signalo transdukcija per mitogenu aktyvinamo baltymo MAP kinazių kaskadą bei transkripcijos faktorių NF- κ B (Van Amersfoort ir kt., 2003).

Taigi fiziologinėmis sąlygomis mažos ir subalansuotos visų minėtų biologiškai aktyvių medžiagų koncentracijos sąlygoja bendrą antimikrobinio, antivirusinio ir priešvėžinio mechanizmo aktyvavimą (Paulsen, 2000).

2.2.3.2. Peptidoglikanas ir muramo rūgšties peptidai

Peptidoglikanas yra traktuojamas kaip potencialus imunostimuliatorius. Peptidoglikano fragmentai, kaip ir lipopolisacharidai bei β -gliukanai, aktyvuoja monocitus, makrofagus, neutrofilus ir NK ląsteles, o signalą perduoda per CD14 receptorių ir indukuoja citokinų TNF- α , IL-1 β , IL-6 ir CSF produkavimą. Žinoma, kad kai kurių rūšių bakterijų peptidoglikanas sąlygoja IL-10 gamybą T ląstelėse ir monocituose (Dziarski ir kt., 1998; Heinzelmann ir kt., 2000; Kricek ir kt., 1997; Meshcheryakova ir kt., 2001). Taip pat žinoma, jog peptidoglikano fragmentai sinergiškai veikia kartu su citokiniais IL-2 bei IL-4 ir stimuliuoja limfocitų proliferaciją bei diferenciaciją. Minimali ir biologiškai aktyvi šio heteropolimero struktūra - muramo rūgšties dipeptidas, pasižymintis gana plačiu biologinių poveikių spektru. Nustatyta, jog muramo rūgšties peptidai stiprina imuninę atsaką į antigeną, t.y. didina monocitų paviršiuje esančio žmogaus leukocitų antigeno HLA-DR, pagrindinio antigeno pateikimo receptoriaus, ekspresiją (Heinzelmann ir kt., 2000). Be to šių ląstelės sienelės fragmentų veikimo pasekoje suintensyvėja ir endotelinų ląstelių ekspresuojamos tarpląstelinės adhezijos molekulės ICAM-1 ir jos receptoriaus - β_2 integrino (CD18), esančio leukocitų paviršiuje, ekspresija. Sintetinis muramo rūgšties dipeptido analogas turi savybę supresuoti B limfocitų Ige produkciją, todėl tiriamas kaip potencialus priešalerginis vaistas (Kricek ir kt., 1997). Priešalerginis veikimas siejamas su pagrindinio šio imunoglobulino sintezės mediatoriaus IL-4 mRNR sintezės inhibavimu. Nustatyta, kad profilaktiškai duodami muramo rūgšties peptidai padidina organizmo rezistentiškumą infekcijoms bei septinio šoko metu sumažina toksinį LPS poveikį (Meshcheryakova ir kt., 2001; Dutta, 2002). Jie taip pat pasižymi priešvėžiniu veikimu (Dutta, 2002).

Kitas svarbus muramo rūgšties peptidų poveikis - žmogaus imunodeficito viruso (ŽIV) replikacijos inhibicija (Dutta, 2002). Sintetinis analogas – murabutidas (N-acetil-muramil-L-alanil-D-glutamino-O-n-butil esteris) padidina ŽIV imunoterapijai naudojamų citokinų IFN- α ir IL-2

efektyvumą (Bahr, 2003). Nustatyta, jog murabutidas supresuoja viruso replikaciją infekuotose monocituose/makrofaguose, NK ląstelėse, dendritinėse ląstelėse, limfocituose. Priešingai nei kitų antiretrovirusinių vaistų, jų poveikis, per imuninės sistemos moduliaciją, virusui yra ilgalaikis. Be to imuninė viruso kontrolė neprovokuoja vaistams atsparių formų vystymosi (Bahr, 2003). Klinikiniai tyrimai taip pat parodė murabutido, tiek kaip papildomo, tiek kaip vienintelio antivirusinio preparato, efektyvumą ir ilgo vartojimo saugumą.

2.2.3.3. β -gliukanai

β -gliukanai – vieni pagrindinių mielių ir grybų ląstelės sienelės sudėtinių dalių. Tai junginiai, pasižymintys ypač plačiu biologinio ir imunofarmakologinio veikimo spektru. Jų imuninę sistemą stimuliuojančios ir infekcijų komplikacijas mažinančios savybės buvo nustatytos ir kai kurių laboratorinių gyvūnų, tokių kaip krevetės, žuvis, pelės, žiurkės, triušiai, jūrų kiaulytės, avys, galvijai, ir žmogaus organizmuose (Williams ir kt., 1996; Mueller ir kt., 2000; Rodríguez ir kt., 2003; Xiao ir kt., 2004; Salazar ir Asenjo, 2007; Goodridge ir kt., 2009). Šios savybės kinta priklausomai nuo β -gliukanų fizinės būsenos, t.y. tirpumo vandenyje, molekulinės masės, molekulės šakotumo laipsnio ir konformacijos. Būtent šios fizinės savybės lemia β -gliukanų biologinių aktyvumų įvairovę. β -gliukanams būdingas antimikrobinis, priešvėžinis bei imuninę sistemą stiprinantis poveikiai. Jie, jungdamiesi prie specifinio β -gliukanų receptoriaus, aktyvina makrofagus, neutrofilus, eozinofilus, NK ląsteles, įvairias limfocitų subpopuliacijas bei fibroblastus ir endotelines ląsteles (Williams, 1996; Rodríguez ir kt., 2003; Xiao ir kt., 2004; Goodridge ir kt., 2009). Pagrindinis šių fragmentų taikinytis – makrofagai. Juose pastebėtas ryškus, nuo β -gliukanų priklausomas, transkripcijos faktorių NF- κ B bei NF-IL6 aktyvavimas. Sąveika su makrofagais lemia suaktyvintą fagocitozę, oksidacinį stresą ir eilės leukotrienų, prostaglandinų ir citokinių, iš kurių svarbiausias - TNF- α , produkavimą (Xiao ir kt., 2004; Mueller ir kt., 2000; Lee ir kt., 2001; Vetvicka ir Yvinv, 2004;

Goodridge ir kt., 2009). NK ląstelių produkuojamas IFN- γ padidina organizmo atsparumą virusinėms infekcijoms. Nustatyta β -gliukanų ir komplemento receptoriaus CR3 sąveika. Buvo pastebėta, kad netirpios didelės β -gliukano molekulės tiesiogiai aktyvuoja leukocitus ir stimuliuoja uždegiminių citokinų gamybą, tuo tarpu mažos ir vandenyje tirpios β -gliukanų molekulės jungiasi su CR3 lektino domenu ir įgalina receptorių sąveikauti su komplementu opsonizuotomis vėžio ląstelėmis, kurios kitu atveju nesukelia nuo CR3 priklausomo atsako (Ross ir kt., 1999; Paulsen, 2000; Lee ir kt., 2002; Ishibashi ir kt., 2002; Rondanelli ir kt., 2009). Tai paaiškina duomenis, rodančius, jog šie ląstelės sienelės komponentai papildo makrofagų ir neutrofilų atsaką nestimuliuodami uždegiminių citokinų produkcijos. In vitro bandymais parodytas transkripcijos faktorių kompleksų (NF- κ B ir NF-IL6) aktyvavimas, kuris neturėjo jokio poveikio citokinų mRNR sintezei, tačiau tirpaus β -gliukano indukuotas NF- κ B transkripcijos faktorius skiriasi nuo LPS aktyvuoto NF- κ B, o tai reiškia, kad šių abiejų molekulių signalas perduodamas skirtingais keliais.

Taip pat nustatyta, kad β -gliukanai inhibuoja vėžinių ląstelių augimą. Tai siejama su tirpių molekulių įtaka CR3 receptoriams, padidinta citokinų TNF- α , IL-2 ir IFN- γ produkcija, suintensyvėjusia NO sinteze (Ross ir kt., 1999; Sveinbjornsson ir kt., 1996; Rondanelli ir kt., 2009). Be to dauguma pastaruoju metu vartojamų priešvėžinių vaistų supresuoja organizmo imuninę sistemą, o tai sąlygoja sunkias mikrobines infekcijas, kurios dažnai baigiasi mirtimi. Šiuo atveju β -gliukanai, stimuliuodami imunitetą, gali būti naudingi kaip adjuvantai. Manoma, kad ateityje β -gliukanų preparatai bus skiriami pacientams, infekuotiems bakterijomis, kurioms būdingas daugybinis vaistų atsparumas.

Buvo ištirtas profilaktiškai skiriamų gliukanų poveikis eksperimento būdu sukeltam septiniam šokui. Nustatyta, kad šis imunoaktyvus fragmentas žymiai sumažino bakteremiją pelėse (*E. coli* ląstelių periferiniame kraujyje sumažėjo net 95 %) ir padidino cirkuliuojančių neutrofilų kiekį (Williams ir kt., 1996). Šie rezultatai buvo patvirtinti klinikiniais tyrimais. Jų metu

nustatyta, jog profilaktiškai duodamas β -gliukanas patikimai sumažino sergamumą sepsiu ir padidino imuninės sistemos kompetenciją. Teigiamas efektas septinio šoko atžvilgiu aiškinamas moduluojama citokinų ekspresija (šiuo atveju supresuojama citokino TNF- α produkcija).

Žinant dabartinio bioterorizmo grėsmę buvo ištirtas β -gliukano poveikis *Bacillus anthracis* infekcijai ir nustatyta, jog, duodamas profilaktiškai *per os*, jis žymiai padidino išgyvenusių gyvūnų skaičių (Vetvicka ir kt., 2002).

Apie mikroorganizmų ląstelės sienelės komponentų poveikį imuninei sistemai žinoma daug, o praktikoje jau naudojami jų pagrindu sukurti preparatai. Pavyzdžiui, β -gliukano preparatai - betafektinas, krestinas, lentinanas, šizofilanas; sintetiniai muramo rūgšties dipeptido analogai - murabutidas, romurtidas, temurtidas (Werner ir kt., 1996). Kai kurie preparatai yra tiesiog minėtų imunostimuliatorių koncentratas (pvz., *Haemophilus influenzae*, *Strep. pneumoniae*, *Strep. pyogenes*, *Staph. aureus*, *Neisseria catarrhalis*, *E. coli* lizatai) (Werner ir kt., 1996).

Kaip jau buvo minėta, tokių imunostimuliatorių šaltinis – organizme esanti mikroflora, gausiausia žarnyne. Natūralus antimikrobinis agentas – katijoniniai peptidai ir jų analogai – maisto baltymai.

2.3. Antimikrobiniai ir imunostimuliuojantys peptidai

Organizmas savo apsaugai naudoja visą eilę antimikrobinių ir imunostimuliuojančių peptidų. Dalį šių bioaktyvių peptidų organizmas sintetina pats. Kiti į organizmą patenka kartu su maistu. Imuninei sistemai ypač didelės įtakos turi katijoniniai antimikrobiniai peptidai (Andreu ir Rivas, 1998; Yeaman ir Yount, 2003; Zhang ir Falla, 2004; Jenssen ir kt., 2006; Rizza ir kt., 2008).

Organizmo sintetinti katijoniniai antimikrobiniai peptidai skiriasi savo ilgiu, sekomis bei antrinėmis struktūromis, tačiau jiems visiems būdingas amfipatiškumas (Andreu ir Rivas, 1998; Bulet ir kt., 2004; Zhang ir Falla, 2004; McPhee ir kt., 2005; Jenssen ir kt., 2006; Mookherjee ir Hancock, 2007;

Pieters ir kt., 2009). Katijoninė prigimtis (krūvis siekia nuo + 2 iki + 9) lemia jų selektyvią sąveiką su neigiamai įkrautu gramteigiamų ir gramneigiamų bakterijų, grybų bei virusų paviršiumi ir tolerantiškumą eukariotinėms ląstelėms, turinčioms neutralias membranas (Ginsburg, 2001; Zhang ir Falla, 2004; Rizza ir kt., 2008; Pieters ir kt., 2009). Be to, antimikrobiniai katijoniniai peptidai yra palyginti nedideli, t.y. juos sudaro 12-100 amino rūgščių (Cudic ir Otvos, 2002; Jenssen ir kt., 2006). Toks katijoninių antimikrobinių peptidų, aptinkamų daugybėje bakterijų, augalų ir gyvūnų rūšių, funkcinis konservatyvumas pažymi jų svarbą įgimtai imuninei sistemai, o jų biologinis aktyvumas parodo, jog tai yra efektorinės molekulės, palaikančios ryšį tarp įgimtos bei įgytos organizmo apsaugos sistemų. Šios baktericidinės molekulės reikšmingos ne tik tiesiogiai eliminuojant mikroorganizmus, bet ir palaikant šeimininko mikrofloros homeostazę. Jie toleruoja komensalinius mikrobus ir kartu su jų pagalba apsaugo organizmą nuo patogenų kolonizavimo. Be to, vis daugėja įrodymų, jog šios molekulės pasižymi ir imunostimuliuojančiomis savybėmis, t.y. skatina fagocitozę, stimuliuoja prostaglandinų sintezę, neutralizuoja LPS poveikį, pagerina įvairių imuninės sistemos ląstelių akumuliaciją ir telkimąsi uždegiminėse vietose, pagerina angiogenezę, žaizdų gijimą (Cudic ir Otvos, 2002; McPhee ir kt., 2005; Jenssen ir kt., 2006; Kruse ir Kristensen, 2008). Žinduolių sintetinami peptidai aktyviai dalyvauja įgyto imuniteto atsake, pavyzdžiui, jie chemotaktiškai veikia žmogaus monocitus, neutrofilus, T ląsteles bei įtakoja dendritinių ląstelių vystymąsi (McPhee ir kt., 2005; Jenssen ir kt., 2006) Katijoniniai antimikrobiniai peptidai turi svarbų vaidmenį įgimtos imuninės sistemos procesų suderinime (McPhee ir kt., 2005; Jenssen ir kt., 2006).

Pagal struktūrinius ypatumus katijoniniai antimikrobiniai peptidai skirstomi į: turinčius α -spirales, β -klostes, kovalentinių ar disulfidinių jungčių pagalba sudarytas kilpas, linijinę struktūrą (Lockwood ir Mayo, 2003; Zhang ir Falla, 2004; Sang ir Blecha, 2008). Nepriklausomai nuo peptidų sekų bei struktūros įvairovės, veikimo mechanizmas yra panašus. Pirmiausiai vyksta elektrostatinė sąveika su ląstelių paviršiumi, tuomet – membranos pralaidumo

padidėjimas. Išorinis mikrobinės ląstelės membranos paviršius sudarytas iš cviterioninio fosfatidiletanolamino ir anijoninių fosfatidilglicerolio lipidų, kardiolipino, fosfatidilserino, lipopolisacharidų (gramneigiamose bakterijose) ir teichoinių rūgščių (gramteigiamose), sąlygojančių ląstelių neigiamą paviršiaus krūvį. Eukariotinių ląstelių išorė – elektriškai neutrali, savo sudėtyje turinti cviterioninių fosfolipidų (fosfatidiletanolaminas, fosfatidilcholinai ar sfingomielinas) ir cholesterolio (Bulet ir kt., 2004; Bechinger, 2004; Hancock ir Sahl, 2006; Sang ir Blecha, 2008; Lohner, 2009). Šis membranų krūvių skirtumas ir lemia katijoninių antimikrobinių peptidų specifiškumą mikrobinių ląstelių atžvilgiu. Kitas katijoninių peptidų selektyvumo parametras – transmembraninis potencialas, kuris normaliose žinduolinėse ląstelėse siekia nuo -90 iki -110 mV, o bakterinėse – nuo -130 iki -150 mV (Bechinger, 2004). Po elektrostatinės sąveikos vyksta katijoninių molekulių kaupimasis ant taikinio membranos, peptido struktūriniai pokyčiai (konformacijos, agregacijos ir orientacijos), indukuoti sąveikos su lipidiniu dvisluoksniu, membranos depoliarizacija, pralaidumo padidėjimas ir, galiausiai, greita mikrobinės ląstelės mirtis. Antimikrobinių peptidų veikimo mechanizmui paaiškinti įvairūs autoriai naudoja tris skirtingus modelius: ‘statinės-šulo’, ‘kilimo’ ir ‘toroidinių porų’. Pirmasis modelis aiškina, kad membranos pralaidumas yra padidėjimas antimikrobiniams peptidams suformuojant transmembraninius kanalus (Bulet ir kt., 2004; Bechinger, 2004; Yeaman ir Yount, 2003; Lohner, 2009). Kanalus formuojantys peptidai yra orientuojami į statinės tipo žiedą, kurio viduje yra vandeniui užpildyta pora. Šiame kanale gali būti įsitvirtinę pavieniai transmembraniniai peptidai ar jų kompleksas, t.y. ‘šulas’. Hidrofobiniai peptidų paviršiai sąveikauja su membranos lipidais, tuo tarpu hidrofilinės dalys suformuoja poros sienelę. Šis procesas vyksta esant netgi mažoms katijoninių peptidų koncentracijoms. Pirminiam kanalui susidaryti užtenka peptidų dimero.

Remiantis ‘kilimo’ modeliu, antimikrobiniai peptidai padengia membranos paviršius ir sukelia fosfolipidų išsidėstymo pokyčius, kas sąlygoja membranos tankio sumažėjimą ir selektyvinių savybių susilpninimą. Pasiekus

kritinei peptidų koncentracijai, jie pradeda veikti kaip detergentai, t.y. tiesiog ištirpina membranas arba suardo jų integralumą suformuodami trumpalaikes poras (Bulet ir kt., 2004; Bechinger, 2004; Yeaman ir Yount, 2003; Lohner, 2009).

‘Toroidinių porų’ modelis apjungia abu anksčiau minėtus membranų lizės mechanizmus. Membranų paviršius, kaip ir ‘kilimo’ modelio atveju, padengiamas antimikrobiniais peptidais (pralaidumo padidimui užtenka žymiai mažesnės jų koncentracijos), kurie suformuoja transmembraninius kanalus (kaip ir ‘statinės-šulo’ modelyje), tačiau į jų sienelių sudėtį tarp peptidų spiralių įsiterpia ir lipidai (Ginsburg, 2001; Lockwood ir kt., 2003; Jenssen ir kt., 2006).

Šie visi mechanizmai yra bendri visų klasių katijoniniams antimikrobiniais peptidams. Kiekvienas modelis akcentuoja membranos pralaidumo padidėjimo svarbą, kadangi per suformuotas poras prasideda nekontroliuojamas jonų ir metabolitų tekėjimas, įvyksta ląstelės depoliarizacija, sumažėja kvėpavimo ir biopolimerų sintezės efektyvumas, o tai iššaukia ląstelės mirtį. Tačiau yra įrodymų, kad membranos disfunkcija ne visuomet baigiasi ląstelės žūtimi (Shai, 2002; Lockwood ir kt., 2003; Jenssen ir kt., 2006). Ląstelės žūtis yra nulemta papildomų, antrinių padidėjusio membranos pralaidumo sukeltų procesų, tokių kaip specifinių baltymų sintezės inhibavimas, DNR sintezės slopinimas, vandenilio peroksido produkavimas arba autolizės sistemų aktyvavimas (Cudic ir Otvos, 2002; Lockwood ir kt., 2003; Bechinger, 2004; Otvos, 2005; Jenssen ir kt., 2006; Hancock ir Sahl, 2006; Zaiou, 2007). Pastaruoju atžvilgiu labai įdomūs I. Ginsburgo darbai (Ginsburg, 2001; Ginsburg, 2004), kurie teigia, kad organizme esančių antimikrobinų katijoninių peptidų (ir kai kurių baltymų), tokių kaip baktericidiniai/pralaidumą padidinantys peptidai, defensinai, katepsinai, lizocimas, elastazė veikimo mechanizmas yra paremtas mikroorganizmų autolizės skatinimu. Įrodymų apie mikroorganizmo ląstelės žūtį, sukeltą ne tiesioginės membranos suardymo, o dėl už ląstelės sienelės sintezę atsakingų fermentų inhibicijos (alternatyvus katijoninių antimikrobinų peptidų veikimo

būdas) atsiranda vis daugiau (McPhee ir kt., 2005; Jenssen ir kt., 2006; Zaiou, 2007; Hancock ir Sahl, 2006; Ginsburg ir Koren, 2008). Apie maisto baltymuose esančių peptidų gebėjimą aktyvinti mikroorganizmų autolizinę sistemą bus kalbama skyriaus pabaigoje.

Baltymai, kuriuos organizmas gauna su maistu (maisto baltymai) yra ne tik energijos bei amino rūgščių, būtinų augimui ir vystymuisi, tačiau ir labai svarbių biologiškai aktyvių peptidų šaltinis. Be jau minėto antimikrobinio ir imunostimuliuojančio poveikio, biologškai aktyviems peptidams būdingos ir opioidinės agonistinės arba antagonistinės, kraujo spaudimą mažinančios, antitrombinės, kalcį surišančios ir kt. savybės (Tirelli ir kt., 1997; Schanbacher ir kt., 1997; Xu, 1998; Korhonen ir Pihlanto, 2003; Meisel ir kt., 2003; Teschemacher, 2003; Aimutis, 2004; Hayes ir kt., 2007). Peptidai atpalaiduojami, o tuo pačiu ir aktyvuojami baltymų fermentinės hidrolizės, vykstančios virškinamajame trakte, arba maisto technologinio apdorojimo metu (Meisel, 1998). Svarbiausi šių, įvairiomis biologinėmis savybėmis pasižyminčių, peptidų šaltiniai yra pienas ir kiaušiniai, tačiau jie taip pat aptinkami ir mėsoje bei augaluose. Bioaktyvius peptidus dažniausiai sudaro nuo 3 iki 20 amino rūgščių liekanų. Dauguma šių peptidų pasižymi polifunkciškumu, t.y. jiems būdingi du ar daugiau biologiniai aktyvumai. Skirtingą biologinį efektą lemia ir kai kuriuose peptidų regionuose randamos persiklojančios sekos, sąlygojančios ir dalinę apsaugą nuo proteolizės. Tokie regionai pavadinti „strateginėmis zonomis“ (Meisel, 1997; Meisel ir Bockelmann, 1999).

Antimikrobinio bei imunostimuliuojančiu poveikiu pasižymintys peptidai, atpalaiduojami maisto baltymų fermentinės hidrolizės metu, dar vadinami „mitybinio imuniteto“ komponentais (Pellegrini, 2003). Žinių apie juos santrauka pateikta 1 ir 2 lentelėse.

1 lentelė. Maisto baltymų sudėtyje esantys imunologiškai aktyvūs peptidai (pagal Cudic ir Otvos, 2002; Meisel ir kt., 2003; Pellegrini, 2003; Otvos, 2005; Jenssen ir kt., 2006; Hancock ir Sahl, 2006; Mookherjee ir Hancock, 2007; Zaiou, 2007; Kitazawa ir kt., 2007).

PEPTIDO PIRMTAKAS	PROTEAZĖ	FRAGMENTAS	FRAGMENTO AMINO RŪGŠČIŲ SEKA	FRAGMENTO PAVADINIMAS
α -laktalbuminas	Tripsinas	f(18-19)	YG	Laktoimunopeptidas
	Tripsinas	f(50-51)	YG	Laktoimunopeptidas
	Tripsinas	f(18-20)	YGG	Laktoimunopeptidas
Laktoferinas	Pepsinas	f(17-41)	FKCRRWQWRMCK LGAPSITCVRRAF	Laktoferinas B
α_{s1} -kazeinas	Tripsinas	f(194-199)	TTMPLW	α_{s2} -imunokazokininas
	Tripsinas	f(59-79) 5P	QMEAEΣΣΣΣΣEIVPN BVEQK	Kazeinofosfopeptidas
α_{s2} -kazeinas	Tripsinas	f(1-32) 4P	KNTMEHVΣΣΣΣEESII Σ QETYKQEKNMMAINP SK	Kazeinofosfopeptidas
β -kazeinas	Pepsinas	f(63-68)	PGPIP	Kazeinoimunopeptidas
	Pepsinas	f(191-193)	LLY	Kazeinoimunopeptidas
	Pepsinas	f(193-202)	YQQPVLGPVR	β -kazokininas 10
	Pepsinas	f(193-209)	LLYQEPVLGPVRGP FPIIV	-
	Pepsinas	f(60-66)	YFPFGPI	β -kazomorfinas 7
	Pepsinas	f(1-25) 4P	RELEELNVPGEIVEΣ LΣΣΣEESITR	Kazeinofosfopeptidas
	Pepsinas	f(1-28) 4P	RELEELNVPGEIVEΣ LΣΣΣEESITRINK	Kazeinofosfopeptidas
	Aktinzė E	f(108-111)	EMPF	Q2
	Aktinzė E	f(114-118)	YPVEP	B-kazochemotidas
	Aktinzė E	f(114-119)	YPVEPF	Q3
κ -kazeinas	Chimozinas	f(106-109)	TVVR	Kazeinoimunopeptidas
Ryžių albuminas			GYPMYPLR	Oryzatenzinas
Kviečių glutenas				Imunopeptidai

Σ – fosfoserinas.

2 lentelė. Maisto baltymų sudėtyje esantys antimikrobiniai peptidai (pagal Cudic ir Otvos, 2002; Pellegrini, 2003; Meisel ir kt., 2003; Clare ir kt., 2003; Floris ir kt., 2003; Otvos, 2005; McPhee ir kt., 2005; Gauthier ir kt., 2006; Hancock ir kt., 2006; Jenssen ir kt., 2006; Mookherjee ir Hancock, 2007; Zaiou, 2007).

PEPTIDO PIRMTAKAS	PROTEAZĖ	FRAGMENTAS	FRAGMENTO AMINO RŪGŠČIŲ SEKA	VEIKIAMI MIKROORGANIZMAI
Lizocimas	Klostripainas	f(98-112)	IVSDGNGMNAWV AWR	Gram+, gram- bakterijos
		f(88-114)	ITASVNCAKKIVS DGNGMNAWVA WRNR	Gram+, gram- bakterijos
Ovotransferinas	Rūgštinė proteazė	f(109-200)		Gram+, gram- bakterijos
α -laktalbuminas	Tripsinas	f(1-5)	EQLTK	Gram+ bakterijos
	Tripsinas	f(17-31)-S-S-(109-114)	GYGGVSLPEWVC TTF ALCSEK	Gram+ bakterijos
	Chimotripsinas	f(61-68)-S-S-(75-80)	CKDDQNP ISCDKF	Gram+ bakterijos
β -laktoglobulinas	Tripsinas	f(15-20)	VAGTWY	Gram+ bakterijos
	Tripsinas	f(25-40)	AASDISLLDAQSA	Gram+ bakterijos

2 lentelės tęsinys.

			PLR	
	Tripsinas	f (78-83)	IPAVFK	Gram+ bakterijos
	Tripsinas	f (92-100)	VLVLDTDYK	Gram+ bakterijos
Laktoferinas	Pepsinas	f(17-41)	FKCRRWQWRMK KLGAPSITCVRRA F	Gram+, gram- bakterijos, mielės, grybai, parazitai, virusai
	Pepsinas	f(17-42)	FKCRRWQWRMK KLGAPSITCVRRA FA	Gram+, gram- bakterijos, mielės, grybai, parazitai, virusai
	Pepsinas	f(1-11)-S-S-(17-47)	APRKNVRWCTI FKCRRWQWRMK KLGAPSITCVRRA FAL ECIR	Gram+, gram- bakterijos
	Pepsinas	f(1-16)-S-S-(45-48)	APRKNVRWCTIS QPEW CIRA	Gram+, gram- bakterijos
	Pepsinas	f(1-42)-S-S-(43-48)	APRKNVRWCTIS QPEWFKCRRWQ WRMKKLGAPSIT CVRRAFA LECIRA	Gram+, gram- bakterijos
	Pepsinas	f(277-288)		Gram+, gram- bakterijos
	Pepsinas arba chimozinas	f(267-285)		Gram+, gram- bakterijos
	Pepsinas arba chimozinas	f(267-288)		Gram+, gram- bakterijos
α_2 -kazeinas	Pepsinas	f(165-203)	KTKLTEEEKNRL NFLKKISQRYQKF ALPQYLKTVYQH QK	Gram+, gram- bakterijos
	Pepsinas	f(164-179)	LKKISQRYQKFAL PQY	Gram+, gram- bakterijos
	Pepsinas	f(183-207)	VYQHQAAMKPWI QPKTKVIPYVRYL	Gram+, gram- bakterijos
	Pepsinas	f(150-188)		Gram+, gram- bakterijos
	Chimozinas	f(164-207)		Gram+, gram- bakterijos
	Chimozinas	f(175-207)		Gram+, gram- bakterijos
	Chimozinas	f(181-207)		Gram+, gram- bakterijos
Avies α_2 - kazeinas	Pepsinas	f(165-170)		Gram+, gram- bakterijos
	Pepsinas	f(165-181)		Gram+, gram- bakterijos
	Pepsinas	f(184-208)		Gram+, gram- bakterijos
	Pepsinas	f(203-208)		Gram+, gram- bakterijos
α_1 -kazeinas	Chimozinas	f(1-23)	RPKHPIKHQGLPQ EVLNENLLRF	Gram+, gram- bakterijos, mielės
	Pepsinas	f(99-109)		Gram+, gram- bakterijos
		f(10-14)	GLPQE	Gram+, gram- bakterijos
		f(1-7)	RPKHPIK	Gram+, gram- bakterijos
		f(1-9)	RPKHPIKHQ	Gram+, gram- bakterijos
κ -kazeinas	Chimozinas	f(17-21)		Gram+, gram- bakterijos
	Chimozinas	f(106-169)		Gram+, gram- bakterijos
	Pepsinas	f(18-24)		Gram+, gram- bakterijos
	Pepsinas	f(30-32)		Gram+, gram- bakterijos
	Pepsinas	f(139-146)		Gram+, gram- bakterijos
β -kazeinas	Tripsinas	f(19-25)		Gram+, gram- bakterijos
	Tripsinas	f(50-56)		Gram+, gram- bakterijos
	Tripsinas	f(64-77)		Gram+, gram- bakterijos
	<i>Lb. helveticus</i> proteinazė	f(184-210)	QELLLNPTHQYPV TQPLATVHNPISV	Gram+, gram- bakterijos

Vieni baktericidinių peptidų yra lizocimo, suskaldyto klostripainu, 98-112 ir 88-114 fragmentai, kurie veikia tiek gramteigiamas, tiek gramneigiamas

bakterijas, o taip pat ir grybą *C. albicans*. Baktericidinės savybės būdingos ir peptidui, išskirtam iš ovotransferino, vieno svarbiausių kiaušinio baltymo antibakterinių komponentų. Šio baltymo 109-200 fragmentas (OTAP-92 peptidas) inhibuoja *Staph. aureus* bei *E. coli* augimą (Pellegrini, 2003). Identifikuota ir keletas α -laktalbumino - pieno baltymo - antimikrobiškai veikiančių peptidų, t.y. LDT1 (1-5 fragmentas), LDT2 (17-31-S-S-109-114 fragmentas) ir LDC (61-68-S-S-75-80 fragmentas). Pastarieji peptidai labiausiai aktyvūs gramteigiamų bakterijų atžvilgiu, nors silpnas poveikis pastebėtas ir prieš *Bordetella bronchiseptica* bei *Klebsiella pneumoniae*. Hidrolizavus vieną pagrindinių pieno baltymų, t.y. β -laktoglobuliną, taip pat aptinkama antibakterinių peptidų. 15-20, 25-40, 78-83 ir 92-100 fragmentai, kaip ir α -laktalbumino peptidai, veikia tik gramteigiamas bakterijas (*B. subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Staph. lentus* ir kt.) (Pellegrini, 2003; Clare ir kt., 2003). Laktofericinas B – geriausiai ištirtas antimikrobiškai veikiantis peptidas, išskirtas iš galvijų pieno baltymo laktoferino. Tai 17-41 fragmentas, veikiantis ir gramteigiamas, ir gramneigiamas bakterijas, o taip pat ir *C. albicans* ir *Trichophyton mentagrophytes*. Baktericidinis poveikis būdingas ir kitiems laktoferino peptidams, t.y. 17-42, 1-11-S-S-17-47, 1-16-S-S-45-48, 1-16-S-S-43-48 ir 1-42-S-S-43-48 fragmentams, kurie inhibuoja tokių patogenų, kaip *Listeria monocytogenes*, enterotoksigeninių *E. coli* bei *Pseudomonas fluorescens* augimą (Floris ir kt., 2003; Hayes ir kt., 2007). Iš žmogaus laktoferino išskirti laktofericiniai H (18-31 ir 20-38 fragmentai) pasižymi burnos ertmės patogenus (*Strep. mutans*, *P. gingivalis* ir kt.) inhibuojančiomis savybėmis. Identifikuota keletas dar vieno pieno baltymo – kazeino – peptidų, pasižyminčių antimikrobiniu poveikiu. Kazocidas-1 (α_{s2} -kazeino 165-203 fragmentas) inhibuoja *E. coli* ir *Staph. carnosus* augimą. Izracidas (α_{s1} -kazeino 1-23 fragmentas) padidina pelių rezistentiškumą *Staph. aureus* bei *C. albicans*, o kazecidas – *Sarcina*, *Diplococcus pneumonia*, *Strept. pyogenes*, *Strep. aureus* ir *B. subtilis* infekcijoms (Pellegrini, 2003). Izracidas taip pat inhibuoja *Staph. aureus* ir *L. monocytogenes* (pagrindinių mastito sukėlėjų) augimą (Hayes ir kt., 2007). Antibakterinis poveikis taip pat būdingas α_{s2} -

kazeino 164-179, 183-207 fragmentams ir κ -kazeidinui (κ -kazeino 17-21 fragmentas). Pastarasis peptidas veikia ne tik patogenines gramteigiamas ir gramneigiamas bakterijas, tokias kaip *Strep. aureus* IFO 3060, *E. coli* IFO 3301 ir kt., bet taip pat yra citotoksiškas pelių blužnies limfocitams. κ -kazeiną hidrolizavus chimozinu, gaunamas glikomakropeptidas, kuris gali jungtis su žarnyno patogeninėmis bakterijomis, tokiomis kaip *Salmonella* sp., enterohemoraginė *Escherchia coli* (EHEC O157), *Morganella morganii* ir tokiu būdu apsaugoti sveiką žarnyno mikroflorą (Nakajima ir kt., 2005). β -kazeino 184-210 fragmentas, gautas panaudojus *Lb. helveticus* proteinazę, antimikrobiškai veikia *Staph. aureus*, *Enterobacter faecium*, *Yersinia enterocolitica* ir *Salmonella* sp. (Hayes ir kt., 2007).

Dauguma minėtų pieno baltymų, o taip pat jų hidrolizės metu gauti peptidai stimuliuoja imuninių ląstelių funkcijas, proliferaciją bei antikūnų sintezę (Sandré ir kt., 2001; Meisel ir kt., 2003; Gauthier ir kt., 2006; Möller ir kt., 2008). Pavyzdžiui, hidrolizuotas α -laktalbuminas padidina B limfocitų imuninį atsaką. Toks pat poveikis būdingas ir laktoferino hidrolizatui, kuris padidina IgA, IgG ir IgM produkciją. Kadangi (kaip ir α -laktalbumino atveju) nėra vienas iš atskirų peptidų nepasižymi tokiu poveikiu, manoma, jog pasireiškia bendras keletų peptidų aktyvumas (Meisel ir kt., 2003). Nustatyta, kad laktoferinas B stimuliuoja neutrofilus aktyvuojančio interleukino-8 (IL-8) produkciją (Meisel ir kt., 2003). Geriausiai ištirtas kazeino peptidų poveikis imuninei sistemai. α_{s1} -kazeino 194-199 fragmentas, o taip pat ir κ -kazeino 106-109 (glikomakropeptidas) bei β -kazeino 54-59, 63-68, 191-193 ir 193-202 fragmentai stimuliuoja peritoneumo makrofagų fagocituojantį aktyvumą ir padidina pelių rezistentiškumą bakterinėms (pavyzdžiui, *K. pneumoniae*) infekcijoms (Meisel ir kt., 2003; Sandré ir kt., 2001). Glikomakropeptidas inhibuoja LPS ir fitohemagliutininu indukuotą pelių splenocitų ir Peyer'io plokštelių ląstelių proliferaciją (Gauthier ir kt., 2006; Möller ir kt., 2008). C galinė β -kazeino 193-209 seka, į kurios sudėtį įeina β -kazokinino 193-202 dekapeptidas, indukuoja žymų žiurkių limfocitų proliferacinį atsaką. Tuo tarpu β -kazomorfinas 7 (β -kazeino 60-66 fragmentas) inhibuoja žmogaus lamina

propria limfocitų proliferacija, nors, pridėjus mažus kiekius naloksono (opioidinis antagonistas), šis peptidas pradeda veikti priešingai. Be to pastebėta, kad *in vitro* mažos β -kazomorfino 7 ir β -kazokinino 10 (β -kazeino 193-202 fragmentas) koncentracijos ($<10^{-7}$ mol/l) slopina žmogaus periferinio kraujo limfocitų proliferaciją, o aukštesnės, atvirkščiai, stimuliuoja. α -laktalbumino 18-19, 50-51 ir 18-20 peptidai, kaip ir kazeino 38-39 fragmentas padidina minėtų kraujo limfocitų proliferaciją ir baltymų sintezę juose. Pastarieji di- ir tripeptidai naudojami ŽIV užsikrėtusių žmonių imuninės sistemos stiprinimui (Meisel ir kt., 2003). Didelį susidomėjimą kelia kazeino fosfopeptidų imunostimuliuojančios savybės. Įrodyta, kad α_{s1} -kazeino 59-79 5P, α_{s2} -kazeino 1-32 4P ir β -kazeino 1-25 4P ir 1-28 4P peptidai didina pelių blužnies ląstelių IgG produkciją (Möller ir kt., 2008). Be to pelių, maitintų kazeino fosfopeptidais, kraujo serumo IgA lygis yra aukštesnis nei kontrolinių pelių. Žmogaus kraujo limfocitai, inkubuoti su įvairiais kazeino fosfopeptidais, taip pat sąlygoja reikšmingai padidėjusią IgG produkciją *in vitro* (Meisel ir kt., 2003).

Maisto baltymų fermentinės hidrolizės metu atsipalaiduojančių peptidų imunostimuliuojančio poveikio mechanizmai nėra gerai ištyrinėti, tačiau manoma (tai patvirtina ir aukščiau išdėstyti faktai), kad jų veikla yra susijusi su fagocituojančių ląstelių aktyvavimu (Devine ir Hancock, 2002; Meisel, 1998; Xu, 1998). Žinoma, kad limfocitai ir makrofagai ekspresuoja receptorius daugeliui biologiškai aktyvių mediatorių. Žmogaus periferinio kraujo limfocitų tyrimai rodo, kad opioidiniai maisto baltymų sudėtyje esantys peptidai limfocitų ir fagocitų imunoreaktyvumą gali veikti per šių ląstelių paviršiuje esančius opiatų receptorius (Meisel ir kt., 2003). Kazeino fosfopeptidų imunostimuliuojantis aktyvumas aiškinamas ir fosfoserilo liekanų buvimu. Žinoma taip pat, kad peptidai, savo sudėtyje turintys glutamino, gali pakeisti laisvą glutamino rūgštį, reikalingą limfocitų proliferacijai.

Iš maisto baltymų kilusių peptidų antimikrobinio poveikio molekuliniai mechanizmai pradėti tirti visiškai neseniai. Jų veikimas yra siejamas su peptidų baziškumu, hidrofobiškumu bei struktūriniais ypatumais (Clare ir kt., 2003;

(Matin ir Otani, 2001). Visais šiais požiūriais jie daug kuo panašūs į pačiame organizme sintetintus katijoninius peptidus. Tačiau yra vis daugiau pagrindo manyti, kad antimikrobinių peptidų veikimo principas yra susijęs ir su autolizinės sistemos skatinimu (Cudic ir Otvos, 2002; McPhee ir Hancock, 2005; Jenssen ir kt., 2006; Hancock ir Sahl, 2006; Zaiou, 2007; Ginsburg ir Koren, 2008). Kaip buvo minėta, lizocimas (vienas iš maisto baltymų) savo katijoninės prigimties dėka skatina mikroorganizmų autolizę.

Pastaruoju metu vis didesnis dėmesys atkreipiamas į fermentinių maisto baltymų hidrolizatų (peptidų sancaupų, kuriose apstu katijoninės prigimties peptidų) poveikį organizmui. Šiame darbe taip pat buvo pasirinkti baltymų hidrolizatai, o ne atskiri biologiškai aktyvūs peptidai, kadangi atskirų bioaktyvių peptidų sintezė ar jų išgryninimas iš maisto baltymų - gana sudėtingas ir ekonomiškai brangus procesas. Be to, kaip rodo įvairių tyrimų rezultatai, baltymų hidrolizatai taip pat pasižymi įvairiomis, biologiškai aktyviems peptidams būdingomis, savybėmis. Yra pastebėta, kad kai kuriais atvejais baltymų hidrolizatai pasižymi keletą kartų stipresnėmis, jiems būdingomis, savybėmis, nei jų baltymai pirmtakai (Kawai ir kt., 2003; Wakabayashi ir kt. 2006).

2.4. Maisto baltymų fermentinių hidrolizatų įtaka organizmui

2.4.1. Maisto baltymų fermentinių hidrolizatų poveikis vėžio vystymuisi

Yra nemažai įrodymų (tiesa, vis dar prieštarū) apie maisto baltymų įtaką vėžio etiologijai. Studijos su gyvūnais rodo, jog tam tikri baltymai ir peptidai gali įtakoti kancerogenezę. Yra žinoma, jog kazeinas pasižymi antimutageninėmis savybėmis. Tai ypatingai svarbi savybė žinant, jog vėžio vystymesi mutagenezė ir kancerogenezė yra glaudžiai susijusios (Van Boekel ir kt., 1993; Bosselaers ir kt., 1994; Parodi, 2007). Be to, įrodyta, jog kazeiną hidrolizavus pepsinu, jo antimutageninės savybės sustiprėjo. Pieno baltymai (bet ne atskiros amino rūgštys), palyginus su kitais maisto baltymais, pasižymi geresnėmis supresinėmis savybėmis storosios žarnos ar krūties naviko atveju.

Ši savybė priklauso nuo didelio cistino/cisteino ir γ -glutamilcisteino dipeptidų kiekio, kurie yra glutationo sintezės šaltinis. Yra įrodyta, jog pacientų, sergančių vėžiu, glutationo kiekis plazmoje yra mažesnis nei sveikų žmonių. Glutationas – unikalus ląstelių antioksidantas, tiesiogiai arba fermentų pagalba suardantis reaktyviojo deguonies rūšis, detoksikuojantis kancerogenus, palaikantis imuninę sistemą. Eksperimentų, kuriuose vėžio prevencijai buvo naudojami išrūgų baltymai, metu nustatytas ne tik padidėjęs glutationo lygis serume ir audiniuose, bet ir padidėjusi blužnies limfocitų proliferacija, suintensyvėjusi fagocitozė ir NK ląstelių, T_H ir citotoksinių T ląstelių aktyvumas.

Imuninės sistemos vaidmuo vėžio prevencijoje yra sudėtingas ir taip pat prieštaringas. Naudojant ląstelių kultūras nustatyta, jog intaktinis baltymas gali turėti imunosupresuojantį poveikį, tuo tarpu po proteolitinės hidrolizės pastebimas imunostimuliuojantis efektas. Baltymų hidrolizė su skirtingais fermentais taip pat gali lemti skirtingą imuninį atsaką. Taigi virškinimo procesas yra svarbus etapas, lemiantis poveikį imuninei sistemai.

Priešvėžinį potencialą turi ir kiti išrūgų baltymai, t.y. β -laktoglobulinas, α -laktalbuminas ir serumo albuminas. Laktoferinas taip pat inhibuoja naviko vystymąsi plonojoje žarnoje ir kitose organizmo vietose. Šis baltymas veikia indukuodamas apoptozę, inhibuodamas angiogenezę, moduliudamas kancerogenus metabolizuojančius fermentus ir, galbūt, veikdamas kaip geležies „surišėjas“ (Van Boekel ir kt., 1993; Bosselaers ir kt., 1994; Parodi, 2007). Laktoferinas ir jo hidrolizatas skiriamas *per os* padidina $CD4^+$, $CD8^+$ ir NK ląstelių proliferaciją blužnyje, padidina IL-18 produkciją žarnyno epitelyje. IL-18 potencialus IFN- γ produkcijos stimulatorius, taip pat padidina NK ir citotoksinių T ląstelių aktyvumą. Žmogaus NK ląstelių aktyvumą padidina ir kviečių gluteno hidrolizatas, skirtas 6 dienas po 3 g (Horiguchi ir kt., 2005).

2.4.2. Antivirusinės maisto baltymų fermentinių hidrolizatų savybės

Nemažai duomenų pateikiama ir apie baltymų antivirusinį poveikį. Karvės pieno glikoproteinų mišinys *in vitro* efektyviai veikia žmogaus rotavirusą (Pan ir kt., 2006). Laktoferinas aktyvus prieš žmogaus imunodeficito virusą, hepatito B, C ir G virusus, herpes virusą, žmogaus papilomos virusą, žmogaus citomegalo virusą, alfavirusą, rotavirusą, enterovirusą, adenovirusą, poliovirusą ir kt (Marshall, 2004; Jenssen, 2005; Pan ir kt., 2006). Antivirusinės maisto baltymų, tokių kaip laktoferinas, serumo albuminas, α -laktalbuminas, β -laktoglobulinas, lizocimas ir kt., savybės dar labiau sustiprinamos cheminių modifikacijų (acilinimo ir amininimo) pagalba (Pan ir kt., 2006).

2.4.3. Maisto baltymų fermentinių hidrolizatų poveikis kraujotakos sistemai

Yra duomenų, kad kazeino ir sojos baltymų hidrolizatai įtakoja žmogaus kraujagyslių endotelinių ląstelių funkcijas, veikdami jų proliferaciją ir vazoaaktyvių medžiagų išskyrimo reguliavimą (Ringseis ir kt., 2005; Hirota ir kt., 2007). Inkubuojant ląsteles su minėtų baltymų hidrolizatais pastebimas vazoaaktyvių medžiagų, tokių kaip tromboksanas B₂, 6-keto-prostaglandinas F_{1 α} , endotelinas-1 ir azoto oksidas išskyrimas (Ringseis ir kt., 2005). Kraujagyslių endotelio disfunkcija yra susijusi su ateroskleroze ir jos sukeltomis ligomis, tokiomis kaip hipertenzija. Tai įrodo ir darbų su žiurkėmis, kurioms spontaniškai indukuotas kraujo spaudimo padidėjimas, rezultatai (Hirota ir kt., 2007). Nustatyta, jog sojos pupelių pepsininis baltymų hidrolizatas pasižymėjo antihipertenzinėmis savybėmis, t.y. sumažino sistolinį ir diastolinį kraujo spaudimą. Tiriamųjų grupių plazmos ir širdies angiotenziną konvertuojančio fermento (ACE) aktyvumas buvo mažesnis nei kontrolinės grupės žiurkių. Sojos pupelių baltymų hidrolizatas neturėjo žymaus poveikio plazmos lipidams, elektrolitams, aortos sienelės storiui. Be to, epidemiologiniai tyrimai rodo, kad asmenims vartojantiems tradicinį japonišką maistą, kurio

nemažą dalį sudaro sojos produktai, būdingas mažesnis kraujo spaudimas bei plazmos lipidų kiekis nei asmenims, vartojantiems vakarietiškus maisto produktus (Yang ir kt., 2004).

ACE aktyvumo slopinančių savybių turi ir bičių duonelės baltymų pepsininis, tripsininis ir papaininis hidrolizatai. Be to, šie hidrolizatai pasižymi antioksidaciniu poveikiu. Mokslininkai teigia, jog bičių duonelė yra naudinga ne tik kaip maisto papildas sveikiems individams bet ir žmonėms, sergantiems įvairiomis ligomis, tokiomis kaip vėžys, širdies ir kraujagyslių ligos, hipertenzija, diabetas (Nagai ir kt., 2005; Nagai ir kt., 2006)

2.4.4. Maisto baltymų fermentinių hidrolizatų įtaka nervų ir virškinimo sistemoms

Yra duomenų, jog α -s1 kazeino tripsininis hidrolizatas skirtas žiurkėms *i.p.* ir *per os* (minimali dozė – 15 mg/kg), turi nerimą slopinantį poveikį. Šis aktyvumas prilygsta diazepamo (3 mg/kg) poveikiui, tačiau priešingai, nei pastarasis preparatas, kazeino tripsininis hidrolizatas nepasižymi šalutiniu poveikiu (Violle ir kt., 2006; Messaoudi ir kt., 2009). Atlikus tyrimus su žmonėmis, buvo nustatyta, jog ir pastarųjų atžvilgiu α -s1 kazeino tripsininis hidrolizatas pasižymi antistresinėmis savybėmis (Messaoudi ir kt., 2005). Yra duomenų, jog tas pats hidrolizatas (skiriamas *per os*) turėjo teigiamą poveikį žiurkių, kurioms indukuotas chroniškas švelnus stresas, miego kokybei (Guesdon ir kt., 2006). Palyginus su kontrolinės grupės žiurkėmis, kurių miego trukmė streso metu žymiai sutrumpėjo, žiurkės, gavusios α -s1 kazeino tripsininio hidrolizato, miego sutrikimų nepatyrė, t.y. jų lėtojo miego fazės trukmė išliko nepakitusi, o greitojo miego fazės trukmė netgi nežymiai pailgėjo. Buvo atliktas ir šio baltymo hidrolizato įtakos moterims, turinčioms streso požymių, tyrimas (Kim ir kt., 2007). Rezultatai rodo, jog α s1-kazeino tripsininis hidrolizatas (dozė – 150 mg/d), 30 dienų skirtas *per os*, teigiamai veikė su stresu susijusius simptomus, tokius kaip virškinimo negalavimai,

širdies ir kraujagyslių sistemos darbas, emocinė būseną, protinę veiklą, socialinės problemos ir kt.

Sojos ir pieno baltymai bei jų hidrolizatai pasižymi nutukimą mažinančiu poveikiu (Aoyama ir kt., 2000). Eksperimentas aliktas su pelėmis, kurioms parinkus atitinkamą dietą buvo sukeltas nutukimas. Vėliau pelės buvo maitinamos maistu, kurio 35 % sudarė sojos arba pieno baltymai arba šių baltymų hidrolizatai. Rezultatai rodo, kad greičiausiai svoris mažėjo tų pelių, į kurių dietą buvo įtrauktas sojos baltymų hidrolizatas.

2.4.5. Maisto baltymų fermentinių hidrolizatų poveikis imuninei sistemai

Intensyviai tiriamas maisto baltymų hidrolizatų poveikis imuninei sistemai. Karvės pieno išrūgų baltymų (κ -kazeino, α -laktalbumino, β -laktoglobulino, gamaglobulinų ir serumo albuminų) hidrolizatai, tirti *in vitro*, supresavo T ir B limfocitų proliferaciją, veikiant mitogenams. Jie taip pat slopino citokinų sekreciją ir aktyvuotų CD25⁺ T ląstelių blastų formavimąsi (Cross ir Gill, 1999). Kitų bandymų rezultatai rodo teigiamą įvairių išrūgų baltymų hidrolizatų poveikį limfocitų proliferacijai *in vitro* (Gauthier ir kt., 2006; Mercier ir kt., 2004; Rutherford-Markwicka ir kt., 2005; Rutherford-Markwick ir Gill, 2005).

Išrūgų baltymų koncentratas, turtingas glikomakropeptidais, supresuoja konkanavalinu A indukuotas T ląsteles ir LPS stimuliuotas B ląsteles, tuo tarpu fermentiniai (pepsininiai ir pankreatininiai) hidrolizatai šio efekto neturi (Gauthier ir kt., 2006). Prieštaringi rezultatai aiškinami tyrimų metodiniais nesutapimais, t.y. naudotos nevienodos ląstelės, mitogenai, proliferacijos nustatymo metodai, pelės, hidrolizavimo sąlygos, fermentai. Iš literatūroje pateiktų duomenų matyti, jog maisto baltymų hidrolizatų imunomoduliuojantis poveikis ypatingai priklauso nuo hidrolizei naudojamo fermento (Mercier ir kt., 2004).

In vitro bandymų metu nustatyta, jog laktoferino pepsininis hidrolizatas žymiai padidina splenocitų išskiriamų imungoblinų IgM, IgG ir IgA sekreciją (Gauthier ir kt., 2006).

Yra žinoma, jog β -kazeinas, hidrolizuotas proteinaze K, aktinaze E, papainu, *in vitro* chemotaktiškai veikia pelių makrofagus ir žmogaus monocitus (Kitazawa ir kt., 2007).

Pepsininis laktoferino hidrolizatas padidino B ląstelių ir Peyer'io plokštelių ląstelių proliferaciją (Gauthier ir kt., 2006). Taip pat įrodyta, kad šis hidrolizatas inhibuoja mitogenų indukuotą blastogenezę.

Pankreatininis žaliadumblio *Chlorella vulgaris* (baltymais turtingas ir kaip maisto papildas naudojamas dumblis) baltymų hidrolizatas taip pat turi poveikį tiek įgimtam, tiek specifiniam imuniniam atsakui (Morris ir kt., 2007). Tai įrodyta atliekant tyrimus su pelėmis. Nustatyta, jog žaliadumblio baltymų hidrolizatas turėjo statistiškai reikšmingą įtaką hemopoezei, t.y. jam veikiant pagausėjo kaulų čiulpų ląstelių, leukocitų, granulocitų ir limfocitų kiekis. Šis preparatas taip pat žymiai padidino pilvaplėvės eksudato ląstelių skaičių, bei pilvaplėvės makrofagų fagocitinį aktyvumą. Tyrimo rezultatai rodo, jog *Chlorella vulgaris* baltymų hidrolizatas stimuliuoja funkcines T_H ir B ląstelių savybes.

Yra duomenų, kad žuvies baltymų hidrolizatas aktyvina pilvaplėvės makrofagų fagocitinį aktyvumą. Plonosios žarnos gleivinėje pastebėtas žymus IgA produkuojančių ląstelių skaičiaus padidėjimas, o žarnyne – sekretorinių IgA molekulių. Žarnyne taip pat pastebėtas žymus IL4, IL10, IL6 bei IFN- γ , TNF- α produkuojančių ląstelių skaičiaus padidėjimas (Duarte ir kt., 2006).

Intensyviausiai tiriama išrūgų baltymų hidrolizatų įtaka specifiniam imunitetui, t.y. poveikis limfocitų aktyvavimui, proliferacijai, citokinų ir antikūnų sekrecijai. Atlikta tik keletas tyrimų, susijusių su baltymų įtakos įgimtai imuninei sistemai nustatymu.

2.4.5.1 Maisto baltymų fermentinių hidrolizatų poveikis uždegimui

Yra duomenų, kad kazeino hidrolizatas, paruoštas naudojant *Aspergillus oryzae* proteazę, inhibuoja ūmaus ir chroniško uždegimo reakcijas (Hatori ir kt., 2008). Priešuždegiminiu poveikiu pasižymi ir laktoferino baltymas skiriamas *per os* (Wakabayashi ir kt. 2006). Priešuždegiminį poveikį rodo ir

laktoferino baltymo koncentratas, kuris *in vitro* supresavo LPS stimuliuotų monocitų produkuojamo IL-6 išskyrimą (Kawai ir kt., 2003). *Per os* skirtas laktoferinas padidina IL-18 produkciją žarnyno epitelinėse ląstelėse, žarnyno gleivinėje padidina CD4⁺, CD8⁺ ir NK ląstelių skaičių. Taip pat padidina limfinių mazgų, blužnies ląstelių skaičių, padidina pilvaplėvės makrofagų ir blužnies NK ląstelių aktyvumą, stimuliuoja IL-12 ir IFN- γ produkavimą (Wakabayashi ir kt. 2006).

2.4.5.2 Uždegiminės reakcijos

Uždegimas – fiziologinis atsakas į įvairius dirgiklius, tokius kaip infekcija ar audinių pažeidimai, susiformavęs evoliucijos eigoje, kaip apsauginė organizmo reakcija. Uždegimo metu lokalizuojamas patogeninis faktorius, taip neleidžiant jam pasklisti po organizmą. Uždegimo židinyje sudaromos sąlygos patogeninio faktoriaus sunaikinimui, vyksta specifinės ir nespecifinės apsauginės reakcijos (Adomaitienė ir kt., 2001; Kindt ir kt., 2007).

Uždegimas gali būti ūminis, kylantis per keletą sekundžių ar minučių, pavyzdžiui, atsakas į organų sužeidimą, arba lėtinis, trunkantis mėnesius, metus, pavyzdžiui, artritas.

Pagrindiniai išoriniai uždegimo požymiai – pažeistos vietos patinimas (lot. *tumor*), paraudimas (lot. *rubor*), karštis (lot. *calor*) ir skausmas (lot. *dolor*) (Adomaitienė ir kt., 2001; Kindt ir kt., 2007). Vystantis uždegimui padidėja kraujagyslių spindis, t.y. įvyksta vazodilatacija, lemianti kraujo kiekio padidėjimą pažeistoje vietoje. Padidėjęs kraujo tūris pažeidžia audinius ir sąlygoja paraudimą. Taip pat padidėja kraujagyslių pralaidumas, sąlygojantis kraujo skysčių eksudaciją į audinį ir tuo pačiu audinio patinimą. Keletos valandų bėgyje įvyksta ekstravazacija – leukocitai pro kraujagysles migruoja į uždegimo vietą. Čia vyksta fagocitozė, mediatorių, dalyvaujančių uždegiminėse reakcijose, išskyrimas. Karštį sąlygoja sustiprėjusi kraujotaka, suaktyvėjęs metabolizmas uždegimo židinyje, o skausmą – nervų galūnių

dirginimas, kurį sukelia biologiškai aktyvios medžiagos, tokios kaip histaminas, serotoninas, bradikininas, o taip pat uždegimo židinio acidozė, padidėjęs osmotinis slėgis. Papildomas uždegimo požymis – audinio ar organo funkcijos praradimas (lot. *functio laesa*). Funkcija sutrikdoma dėl skausmo, struktūrinių pokyčių bei neuroendokrininės reguliacijos sutrikimo.

Ankstyvoje uždegiminio atsako stadijoje dominuojančios ląstelės yra neutrofilai (Huerrre ir Gounon, 1996; Adomaitienė ir kt., 2001; Kindt ir kt., 2007). Jų infiltracija į audinius intensyviausia pirmąsias šešias uždegiminės reakcijos valandas. Patekę į audinį aktyvinti neutrofilai ekspresuoja daugiau Fc receptorių, taip sąlygodami efektyvų antikūnais ar komplementu padengtų patogenų inaktyvumą. Taip pat aktyvinamas reaktyviųjų deguonies ir azoto junginių išskyrimas. Be to, neutrofilai produkuoja katijoninius antimikrobinius peptidus, tokius kaip laktoferinas, baktericidinis pralaidumą didinantis baltymas BPI, katelicidiniai, serprocidiniai, defensinai ir kt. (Weiss, 2003). BPI gali jungtis su LPS, taip neutralizuodamas bakterijos endotoksinį poveikį (Levy, 2000).

Neutrofilai taip pat išskiria uždegiminius mediatorius, tokius kaip makrofagų uždegiminiai baltymai MIP-1 α , MIP-1 β ir chemokinai, į uždegimo vietą pritraukiantys makrofagus. Aktyvuoti audinių makrofagai išskiria IL-1, IL-6 ir TNF- α , kurie veikia tiek vietišškai, tiek sistemiškai. Pastarieji citokinai indukuoja koaguliaciją ir kraujagyslių pralaidumo padidėjimą. IL-1 ir TNF- α stimuliuoja kraujagyslių endotelio ląstelių adhezijos molekulių, tokių kaip E-selektino, ICAM-1 ir VCAM-1, ekspresiją. IL-1 ir TNF- α taip pat veikia makrofagus ir endotelines ląsteles, skatindami jų produkuojamų chemokinių gamybą. TNF- α aktyvina makrofagų ir neutrofilų fagocitozę ir lizuojančių fermentų išskyrimą į aplinką.

Makrofagai gali būti aktyvinami įvairiausių stimulų. Tlr receptoriai, esantys šių ląstelių paviršiuje, atpažįsta mikrobinius komponentus, tokius kaip LPS, peptidoglikanai, flagelinai (Adomaitienė ir kt., 2001; Kindt ir kt., 2007; Gordon, 2007). Aktyvuoti makrofagai pasižymi didesniu fagocitiniu aktyvumu ir uždegiminių mediatorių išskyrimu. Fagocitozės metu makrofagai gali

suardyti tiek egzogeninius antigenus, tiek endogenines daleles, tokias kaip žuvusios šeimininko ląstelės, ląstelinės nuolaužos, aktyvinti krešėjimo faktoriai.

Pagrindinė makrofagų ir neutrofilų funkcija – fagocitozė. Šis procesas susideda iš kelių etapų: antigeno atpažinimo ir prisijungimo, antigeno patekimo į vidų ir jo suardymo (Adomaitienė ir kt., 2001; Kindt ir kt., 2007). Fagocitozė prasideda nuo makrofago ir antigeno sąveikos, kurią palengvina opsoninai, tokie kaip IgG Fc fragmentas ir komplemento komponentas C3b. Opsoninai jungiasi su makrofagų paviršiuje esančiais Fcγ R(Fc) ir komplemento receptoriais (Huerrre ir Gounon, 1996). Antigeno ir fagocitinės ląstelės sąveika sąlygoja pseudopodijų susiformavimą. Pastarosioms susiliejus susidaro membrana dengta struktūra – fagosoma, kuri judėdama fagocitinės ląstelės viduje, susilieja su lizosoma ir suformuoja fagolizosomą. Fagolizosomoje gausu antimikrobinių medžiagų, tokių kaip lizuojantys fermentai (pavyzdžiui, lizocimas, azoto oksido sintetazė), antimikrobiniai peptidai (pavyzdžiui, defensinai), reaktyviojo deguonies junginiai (pavyzdžiui, O₂⁻), suardančių antigeną. Tuomet fagolizosomos turinys pašalinamas egzocitozės būdu.

2.4.6. Antimikrobinis maisto baltymų fermentinių hidrolizatų aktyvumas

Literatūroje nemažai įrodymų pateikiama apie antibakterinį maisto baltymų poveikį. Pavyzdžiui, nustatyta, jog α-laktalbumino ir β-laktoglobulino hidrolizatai turi bakteriostatinių savybių (Pihlanto-Lepälä ir kt., 1999). Bakterijų augimo slopinimui įtakos turi proteolizuojančių fermentų specifiškumas. Pastebėta, jog tiek fermentų aktyvumas, tiek hidrolizės laipsnis turėjo įtakos išrūgų baltymų hidrolizatų bakteriostatiniam poveikiui. Tuo tarpu fermentais nesuardyti baltymai tiriamoms bakterijoms poveikio neturi (Pihlanto-Lepälä ir kt., 1999).

Antibakteriniu poveikiu pasižymi ir avies išrūgų baltymų α-laktalbumino ir β-laktoglobulino hidrolizatai, kurie inhibuoja visų tirtų bakterijų (*Escherichia coli* HB101, *E. coli* Cip812, *Bacillus subtilis* Cip5265,

Staphylococcus aureus 9973) augimą (El-Zahar ir kt., 2004). Yra žinoma, kad galvijų laktoferino hidrolizatas taip pat pasižymi antibakterinėmis savybėmis (Kawai ir kt., 2003). Pabandžius *in vivo* įvertinti jo terapinį efektą mastitu sergančioms karvėms, nustatyta, kad po 14 dienų laktoferino pepsininio hidrolizato leidimo tiesiai į pieno liauką, piene visiškai neliko mastitą sukėlusių mikroorganizmų, tokių kaip koagulazės nekoaguliuojantys stafilokokai, streptokokai, *St. aureus*, *E. coli* bei sumažėjo somatinių ląstelių skaičius (Kawai ir kt., 2003). Su tuo pačiu hidrolizatu atlikus eksperimentą *in vitro*, buvo nustatyta, kad jis antimikrobiškai veikia plazmos nekoaguliuojančius stafilokokus, streptokokus, enterokokus, *Klebsiella pneumoniae*, mieliagrybius ir *Prototheca zopfii* (Kawai ir kt., 2007). Be to, laktoferino hidrolizatas aktyvino neutrofilų O_2^- produkciją.

Klinikinių tyrimų metu pastebėta, kad kaip maisto papildą vartojant laktoferiną, žarnyno mikrofloroje pagausėja bifidobakterijų (Wakabayashi ir kt. 2006). Manoma, kad laktoferinas patekęs į žarnyną yra suskaidomas ir patenka į kraują, taip veikdamas sistemiškai. Taip pat manoma, jog pirmiausia jis veikia žarnyno imuninę sistemą ir tik vėliau sistemiškai paveikia visą imunitetą (Wakabayashi ir kt. 2006).

Konglicinino, vieno iš sojos baltymų, pepsininis hidrolizatas taip pat pasižymi antibakteriniu poveikiu, t.y. jis veikia *E. coli* O138 kamieną (Shen ir kt., 2007). Šis poveikis buvo stebimas tiek *in vitro*, tiek *in vivo* eksperimentuose. Pasak eksperimentą atlikusių mokslininkų, antibakterinio veikimo mechanizmas - neaiškus. Manoma, kad konglicinino hidrolizatas reguliuoja žarnyno mikrofloros balansą. (Shen ir kt., 2007).

Visai neseniai paskelbta, kad ir lizocimo fermentiniai hidrolizatai veikia antimikrobiškai. Taip pat žinoma, kad kazeino tripsininis hidrolizatas skatina mikroorganizmų autolizę *in vitro*, o naudojant *per os*, ir organizmo apsaugines funkcijas.

Ar įvairūs kitų maisto baltymų hidrolizatai aktyvina mikrobu autolizinę sistemą bei stimuliuoja organizmo imunitetą? Jeigu taip, ar egzistuoja ryšys tarp šių dviejų efektų?

3. DARBO METODAI IR MEDŽIAGOS

3.1. Maisto baltymų fermentinių hidrolizatų paruošimas

Maisto baltymų hidrolizė buvo vykdoma pagal aprašytus metodus (Biziulevičius ir kt., 2002; Maehashi ir kt., 1999). Darbe naudoti: kazeinas (Agrolitas Imex, Lietuva), α -laktalbuminas, β -laktoglobulinas, ovalbuminas ir serumo albuminas (Sigma, JAV). Baltymai buvo hidrolizuoti tripsinu, α -chymotripsinu, pepsinu arba pankreatinu (Sigma, JAV). Kiekvienas baltymas buvo ištirpintas distiliuotame vandenyje 80° C temperatūroje. Baltymo tirpalo koncentracija – 50 g/l. Tuomet tirpalas atvėsintas iki 40° C temperatūros, pH pakoreguotas iki 8 (išskyrus hidrolizę pepsinu, kur pH 2) ir hidrolizuotas fermentu. Fermento tirpalo koncentracija – 20 mg/l. Fermento-substrato (baltymo) santykis – 1 : 2500. Hidrolizės laikas – 2 h. Hidrolizatai buvo pavirinti 20 min (proteazei inaktyvuoti), atvėsinti ir liofilizuoti.

3.2. Maisto baltymų hidrolizatų antimikrobinio aktyvumo įvertinimas

3.2.1. Mikroorganizmų biomasės paruošimas

Mikroorganizmų kamienai buvo gauti iš AB „Biosintezė“, Lietuva. Antimikrobinio aktyvumo įvertinimas atliktas pagal aprašytą metodiką (Biziulevičius ir kt., 2002). Tam tikslui buvo panaudoti 10 gramteigiamų bakterijų, priklausančių *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptomyces* gentims, 9 gramneigiamų bakterijų, priklausančių *Escherichia*, *Methylococcus* ir *Proteus* gentims, bei 5 grybų (mielių), priklausančių *Candida*, *Rhodothorula* ir *Saccharomyces* gentims, kamienai.

Bacillus kamienai buvo auginami mėsos mitybinėje terpėje (1 % mėsos ekstrakto, 1 % peptono, 0,5 % NaCl). Kiti bakterijų (išskyrus *Methylococcus*) kamienai buvo auginami smegenų-širdžių terpėje (0,35 % smegenų-širdžių ekstrakto, 2,2 % peptono, 0,2 % mielių ekstrakto, 0,2 % gliukozės, 0,5% NaCl). Bakterijos buvo auginamo kolbose kratytuvuose 37°C temperatūroje.

Pasibaigus logaritminei augimo fazei, mikroorganizmų ląstelės buvo nucentrifuguotos, dukart praplautos 0,004 M fosfatiniu buferiu, kurio pH 7,2. Gauta biomasė buvo liofilizuota.

3.2.2. Antimikrobinio aktyvumo nustatymas

Maisto baltymų hidrolizatų antimikrobinio aktyvumo, t.y. jų pajėgumo aktyvuoti mikroorganizmų autolizinę sistemą (autolizės aktyvavimo rodiklis) nustatymui buvo paruošta mikrobinės biomasės suspensija distiliuotame vandenyje. Suspensija buvo paruošta spensija buvo maišoma lygiais tūriais su 4 mg/ml hidrolizato tirpalu distiliuotame vandenyje. Kontrolei buvo naudotas distiliuotas vanduo. Reakcijos mišinių optiniai tankiai (520 nm) buvo matuoti iškart sumaišius komponentus (D_0) ir po 60 min inkubavimo 37°C temperatūroje (D_{60}). Autolizės laipsnis (I) tiek bandomuosiuose, tiek kontroliniuose pavyzdžiuose (I_b ir I_k , atitinkamai) buvo įvertintas pagal sekančią formulę:

$$I = [(D_0 - D_{60}) : D_0] \times 100 \%,$$

tuomet buvo skaičiuojamas autolizės aktyvavimo rodiklis (K_A):

$$K_A = I_b : I_k .$$

Natūraliai nesiautolizuojančių mikroorganizmų ($I_k=0$) atžvilgiu autolizės aktyvavimo rodiklis buvo išreiškiamas iššauktos autolizės intensyvumu (I_b).

3.3. Eksperimentiniai gyvūnai

Bandymų su gyvūnais atlikimui buvo gautas Lietuvos Valstybinės Maisto ir Veterinarijos Tarnybos leidimas atlikti laboratorinius bandymus su gyvūnais (Nr. 0162). Bandymams buvo panaudotos 22-24 g svorio BALB/c linijinės pelės, kurios buvo laikomos (22±2)°C temperatūroje, maitinamos įprastu pašaru ir girdomos vandeniu *ad libitum*.

3.4. Fagocituojančių ląstelių fagocitinio aktyvumo įvertinimas

Maisto baltymų hidrolizatų imunostimuliuojantis efektas buvo įvertintas jų įtakos pelių fagocituojančių ląstelių aktyvumui atžvilgiu. Pelės penkių dienų laikotarpyje kartą dienoje *per os* gavo vieną iš hidrolizatų. Hidrolizatai (1 mg/g svorio) buvo įvedami ištirpinus juos 0,5 ml distiliuoto vandens. Kontrolinės grupės pelėms buvo skiriamas tik analogiškas kiekis distiliuoto vandens. Tiek bandomosiose, tiek kontrolinėse grupėse buvo po 6 pelės.

Išskyrus fagocituojančias ląsteles jų fagocitinis aktyvumas buvo įvertintas dviem metodais: fluorimetriniu bei tėkmės citometrijos.

3.4.1. Fagocitinio aktyvumo įvertinimas fluorimetriniu metodu

Pilvaplėvės makrofagų fagocituojantis aktyvumas buvo matuojamas remiantis aprašyta metodika (Miliukienė ir kt., 2003). Vietoje FITC žymėtų *Saccharomyces cerevisiae* ląstelių buvo naudotos FITC žymėtos opsonizuotos *E. coli* bakterijos (Sigma, JAV).

Išskiriant makrofagus, pelei buvo atliekama cervikalinė dekapitacija. Iš širdies buvo paimtas kraujas, kuris vėliau buvo naudojamas kraujo fagocitinių ląstelių fagocituojančio aktyvumo įvertinimui. Į pilvaplėvės ertmę švirkštu buvo įvesta 5 ml Henkso subalansuoto druskų tirpalo (angl. Hank's balanced salt solution (HBSS)), sumaišyto su 2 µl heparino. Po 2 min pilvaplėvės ląstelių suspensija buvo ištraukiama švirkštu, centrifuguojama ir du kartus praplaunama HBSS. Tuomet ląstelių suspensija 3 h buvo inkubuojama HBSS 37°C temperatūroje 5 % CO₂ sąlygomis. Po 3 h makrofagai prisitvirtino prie stiklo paviršiaus. Neprisitvirtinusios ląstelės buvo pašalintos 3 kartus praplaunant HBSS. Pagal morfologiją ir dažymo (Gimzos dažais) charakteristikas 96 % prie stiklo prisitvirtinusių ląstelių buvo makrofagai. Ląstelių gyvybingumas, nustatytas naudojant 0,4 % tripano mėlio (Merck, Vokietija) tirpalą, buvo 98 %.

Fagocitinio aktyvumo matavimui į Petri lėkšteles su makrofagais buvo dedamos HBSS suspenduotos (koncentracija – 5×10^5 ląstelių/ml) fluoresceinu žymėtos opsonizuotos *E. coli* ląstelės. Galutinis bakterijų ir makrofagų santykis – 400:1. Lėkštelės buvo inkubuojamos 60 min 37°C temperatūroje. Po inkubavimo fagocitinės ląstelės buvo 3 kartus praplaunamos fosfatinu buferiu. Nefagocituotų *E. coli* ląstelių fluorescencijos užslopinimui (angl. quenching), į suspensiją buvo dedama 100 μl 0,04 % tripano mėlio fosfatiname buferyje pH 4,5 ir laikoma 2 min. Praplovus fosfatinu buferiu fagocitinės ląstelės buvo lizuojamos pridėjus 500 μl 0.5% Tritono X-100 (BDH Chemicals, Anglija), ištirpinto fiziologiniame tirpale, turinčiame 0,01 M fosfatinio buferio pH 7,4. Gauto tirpalo fluorescencijos (sužadavimo bangos ilgis – 493 nm, emisijos – 520 nm) intensyvumas buvo matuojamas fluorescenciniu spektrofotometru (MPF-4, Hitachi, Japonija). Vieno makrofago fagocituotų FITC žymėtų *E. coli* ląstelių skaičius buvo išskaičiuotas naudojantis iš anksto paruošta kalibracine kreive.

Hidrolizatų imunostimuliuojančio aktyvumo rodiklis (K_I) buvo skaičiuojamas kaip makrofagų fagocitinio aktyvumo (A) bandomuosiuose ir kontroliniuose pavyzdžiuose (A_b ir A_k , atitinkamai) santykis, t.y.:

$$K_I = A_b : A_k ,$$

A buvo išreiškiamas vieno makrofago fagocituotų fluoresceinizotiocianatu (FITC) žymėtų *E. coli* ląstelių skaičiumi.

3.4.2. Fagocitinio aktyvumo įvertinimas tėkmės citometrijos metodu

Kraujo fagocituojančių ląstelių (monocitų ir granulocitų) fagocitinis aktyvumas, remiantis bendraisiais fagocitozės įvertinimo tėkmės citometrija principais (Lehmann ir kt., 2000), buvo nustatytas naudojant PHAGOTEST® (ORPEGEN Pharma, Vokietija) rinkinį. Pagal gamintojo instrukciją 100 μl heparinizuoto kraujo buvo inkubuojama 10 min 37°C temperatūroje su 20 μl FITC žymėtų opsonizuotų *E. coli* ląstelių. Po inkubavimo nefagocituotų *E. coli* ląstelių fluorescencijos užslopinimui į suspensiją buvo dedama 100 μl

‘užslopinimo’ tirpalo. Tuomet buvo du kartus praplaunama 3 ml plovimo buferio. Po kiekvieno plovimo buvo centrifuguojama 5 min 1500 aps./min 4°C temperatūroje. Eritrocitų lizavimui buvo dedama 2 ml lizavimo tirpalo ir 20 min inkubuojama tamsoje, kambario temperatūroje. Tada ląstelių suspensija vieną kartą buvo plaunama 3 ml plovimo buferio ir dedamas DNR dažas. Po 10 min inkubavimo leduose fagocituojančių ląstelių fagocitinis pajėgumas buvo matuojamas tēkmės citometru FACS Calibur[®] (Becton Dickinson Biosciences, JAV).

Hidrolizatų imunostimuliuojančio aktyvumo rodiklis (K_I) buvo skaičiuojamas kaip makrofagų fagocituojančio aktyvumo (A) bandomuosiuose ir kontroliniuose pavyzdžiuose (A_b ir A_k , atitinkamai) santykis, t.y.:

$$K_I = A_b : A_k ,$$

A buvo išreiškiamas vidutiniu fagocituojančių ląstelių fluorescencijos intensyvumu (santykiniais vienetais).

3.5. Kazeino tripsininio hidrolizato priešuždegiminio poveikio įvertinimas

Kazeino tripsininio hidrolizato poveikio uždegimui įvertinimas buvo atliktas panaudojant ūminio uždegimo modelį ir kontaktinio hiperjautrumo reakciją.

3.5.1. Ūminio uždegimo modelis

Ūminis uždegimas buvo sukeltas pagal aprašytą metodiką (Jain ir kt., 2001). Kazeino tripsininis hidrolizatas pelėms (n=6) buvo skiriamas taip pat, kaip ir įvertinant jo imunostimuliuojantį aktyvumą, t.y. jos gavo 1 mg/g svorio dozę, ištirpintą 0,5 ml distiliuoto vandens, *per os* kartą dienoje penkių dienų laikotarpyje. Kontrolinei grupei (n=6) buvo duodamas vanduo. Praėjus 24 h po paskutinio maitinimo buvo sukeliama ūmi edema, t.y. į kairiąją pelių pėdą buvo suleidžiama 10 μl 1 % karagenano (Sigma, JAV) tirpalo. Dar po 24 h buvo vykdoma pelių dekapitacija, sveriami limfoidiniai organai ir pėdos,

atliekami kraujo tyrimai (nustatomi bendri hematologiniai rodikliai ir citokinų koncentracijos).

3.5.2. Hematologinių rodiklių nustatymas

Bendrųjų hematologinių rodiklių (leukocitų, neutrofilų, limfocitų, monocitų, eozinofilų, bazofilų, eritrocitų, hemoglobino, hematokrito, vidutinio eritrocitų tūrio, vidutinės hemoglobino koncentracijos eritrocite, vidutinio hemoglobino kiekio eritrocite, eritrocitų pasiskirstymo pločio, trombocitų ir vidutinio trombocitų tūrio) matavimas buvo atliekamas aparatu HEMAVET (CDC Technologies Inc., JAV). Kraujas buvo imamas iš dekapituotų pelių širdies. Jo krešėjimas buvo stabdomas heparinu (Merck, Vokietija).

3.5.3. Citokinų koncentracijos nustatymas

Citokinų koncentracijos kraujo serume buvo nustatomos imunofermentiniu metodu (ELISA), naudojant „Tumor Necrosis Factor Alpha Mouse, ELISA Biotrak™ System“ ir „Interleukin-10 Mouse, ELISA Biotrak™ System“ rinkinius (Amersham Biosciences, Anglija), pagal gamintojo pateiktas instrukcijas. Remiantis šiomis instrukcijomis, pirmiausia į mikroplokštelės duobutes buvo sulašinama po 50 µl buferio, standartinių ar serumo pavyzdžių bei inkubuojama 3 h kambario temperatūroje. Tuomet neprisirišusios medžiagos buvo atplaunamos fosfatiniu buferiu ir įlašinama po 50 µl antikūnų, konjuguotų su biotinu. Pavyzdžiai buvo inkubuojami 1 h kambario temperatūroje. Po praplovimo buvo įpilama po 100 µl streptavidinokrienų peroksidazės konjugato ir inkubuojama 30 min. Tuomet pavyzdžiai dar kartą buvo praplaunami buferiu ir įlašinama po 100 µl tetrametilbenzidino dihidrochlorido substrato. Po 30 min inkubavimo tamsoje buvo įlašinama po 100 µl reakcijos stabdymo tirpalo (2 N H₂SO₄) ir išmatuojamas optinis tankis (540 nm). Naudojantis standartinių pavyzdžių gautais optiniais tankiais ir žinomomis koncentracijomis buvo brėžiama standartinė kreivė, iš kurios nustatoma serumo pavyzdžių citokinų koncentracija.

3.5.4. Kontaktinio hiperjautrumo reakcija

Kontaktinio hiperjautrumo reakcija buvo indukuota 2,4-dinitrofluorbenzolu (DNFB, Sigma, JAV). Pelėms buvo (n=6) išskustas 1 cm x 1 cm odos plotas (dešiniajame šone) ir įtrintas 20 µl 0,3 % DNFB. Po 24 h pelėms buvo pradama duoti *per os* kazeino tripsininis hidrolizatas. Preparatas, kaip ir ūmaus uždegimo atveju, buvo skiriamas kartą dienoje 5 dienų laikotarpyje. Kontrolinei grupei (n=6) buvo duodamas vanduo. Praėjus 24 h po paskutinio maitinimo į kairiąją užpakalinę pėdą buvo įvedama 10 µl 0,3 % DNFB tirpalo. Dar po 24 h pelės buvo dekapituojamos, sveriami limfoidiniai organai bei pėdos, atliekami hematologiniai tyrimai, kurie buvo atlikti taip, kaip aprašyta 3.5.2. skyriuje. Citokinų koncentracijos nustatymas buvo atliktas taip, kaip aprašyta 3.5.3. skyriuje.

3.6. Lizocimo ir lizosubtilino poveikio pieno somatinių ląstelių kiekiui tyrimas

Bandymai buvo atlikti Lietuvos Veterinarijos Akademijos mokomajame ūkyje, padedant Akademijos specialistams. Bandymui naudoti egzogeninių fermentų preparatai lizocimas ir lizosubtilinas buvo gauti iš AB „Biosintezė“, Lietuva.

Bandymams buvo atrinktos antros ir trečios laktacijos Lietuvos juodmargių veislės karvės be klinikinių mastito požymių. Pagrindiniai atrankos požymiai buvo: panašus gyvūno svoris (550 ± 50 kg) ir panašus somatinių ląstelių skaičius piene ($(700 \pm 250) \times 10^3$ ląstelių/ml). Kiekvienos grupės gyvūnai buvo laikomi įprastinėmis auginimo sąlygomis. Bandymo trukmė – 10 dienų. Bandymai atlikti pagal 1 schemą.

1 schema. Lizocimo ir lizosubtilino poveikio pieno somatinių ląstelių skaičiui tyrimo schema.

Bandymas	Grupė	Gyvūnų skaičius (n)	Preparato pavadinimas ir dozė
I	1 (kontrolinė)	5	0
	2	5	5,0 mg/kg svorio lizosubtilino
	3	5	10,0 mg/kg svorio lizosubtilino
	4	5	20,0 mg/kg svorio lizosubtilino
II	1 (kontrolinė)	5	0
	2	5	50,0 mg/kg svorio lizocimo
	3	5	100,0 mg/kg svorio lizocimo
	4	5	200,0 mg/kg svorio lizocimo
III	1 (kontrolinė)	10	0
	2	10	200 mg/kg svorio lizocimo
	3	10	20 mg/kg svorio lizosubtilino
	4	10	200 mg/kg svorio lizocimo + vitaminai A, C, E
	5	10	20 mg/kg svorio lizosubtilino + vitaminai A, C, E
	6	10	200 mg/kg svorio lizocimo + 20 mg/kg svorio lizosubtilino
	7	10	200 mg/kg svorio lizocimo + 20 mg/kg svorio lizosubtilino + vitaminai A, C, E

I ir II bandymo metu somatinių ląstelių skaičius buvo skaičiuojamas kiekvieną dieną bei dieną prieš bandymą vakarinio melžimo piene (naudojant aparatą ‘Somascope’). Dieną prieš eksperimentą bei po 10 bandymo dienų ūkyje įprastomis metodikomis buvo nustatyti riebalų, baltymų ir laktozės kiekiai karvių piene.

III bandymo metu somatinių ląstelių skaičius buvo skaičiuojamas dieną prieš eksperimento pradžią, ketvirtą, septintą ir dešimtą bandymo dienomis bei penktą dieną po bandymo pabaigos.

3.7. Statistinė rezultatų analizė

Tyrimų rezultatų analizė buvo atlikta standartine MS Excel programa. Buvo apskaičiuoti aritmetiniai duomenų vidurkiai, vidutiniai kvadratiniai nuokrypiai. Skirtumų palyginimui buvo panaudotas Stjudento t testas. Rezultatai buvo laikomi statistiškai reikšmingais, kai $P < 0,05$. Statistinio ryšio nustatymui buvo apskaičiuotas Pirsono tiesinės koreliacijos koeficientas r_{xy} .

4. REZULTATAI

4.1. Antimikrobinis maisto baltymų fermentinių hidrolizatų poveikis

Nustatyta 20-ies įvairių maisto baltymų hidrolizatų (5 maisto baltymų, hidrolizuotų 4 skirtingais virškinimo proteolizininiais fermentais) įtaka 20-ies natūraliai besiautolizuojančių ir 4-ių natūraliai nesiautolizuojančių mikroorganizmų kamienų autolizės procesui *in vitro* (4 - 9 lentelės).

4 lentelė. Mikroorganizmų natūralios autolizės intensyvumas (I_k) ir kazeino hidrolizatų antimikrobinio aktyvumo (autolizės skatinimo) rodiklis K_A . Rezultatai pateikti kaip šešių pakartojimų vidurkiai.

Mikroorganizmas	I_k (%)	K_A gautas panaudojus kazeiną hidrolizuotą:			
		Tripsinu	α - chimotoripsinu	Pankreatinu	Pepsinu
<i>Gram⁺ bakterijos</i>					
<i>B. mesentericus</i> 66	17,7	1,48	1,38	1,30	1,42
<i>B. subtilis</i> SK-52	16,0	1,45	1,35	1,28	1,39
<i>B. subtilis</i> 65-10	16,8	1,73	1,61	1,52	1,68
<i>B. subtilis</i> 65-42	18,4	2,78	2,59	2,45	2,67
<i>B. subtilis</i> 65-1482	17,6	1,94	1,80	1,71	1,86
<i>Bifidobacterium</i> sp.	8,0	8,69	8,08	7,64	8,34
<i>L. fermentii</i> 90TC4	26,3	1,57	1,46	1,38	1,51
<i>L. plantarum</i> 8PA3	7,0	2,99	2,78	2,63	2,87
<i>Gram⁻ bakterijos</i>					
<i>E. coli</i> K12	14,5	2,41	2,24	2,12	2,31
<i>E. coli</i> M17	5,1	6,31	5,86	5,55	6,06
<i>E. coli</i> MRE-600	2,5	15,04	13,99	13,23	14,44
<i>E. coli</i> O2	1,0	11,40	10,60	10,03	10,94
<i>M. capsulatus</i> 122	5,5	2,95	2,74	2,59	2,83
<i>M. capsulatus</i> 170	6,2	4,40	4,09	3,87	4,22
<i>Methylococcus</i> sp. M6-58	0,5	22,00	20,46	19,36	21,12
<i>P. vulgaris</i>	5,2	2,02	1,87	1,78	1,94
<i>Mielės</i>					
<i>C. salmonicola</i> 779	8,6	2,57	2,39	2,26	2,47
<i>C. tropicalis</i> 909	4,9	2,88	2,67	2,53	2,76
<i>R. aurantiaca</i> 528	8,4	2,98	2,77	2,62	2,86
<i>S. cerevisiae</i> 12	1,9	4,79	4,45	4,21	4,59

5 lentelė. Mikroorganizmų natūralios autolizės intensyvumas (I_k) ir α -laktalbumino hidrolizatų antimikrobinio aktyvumo (autolizės skatinimo) rodiklis K_A . Rezultatai pateikti kaip šešių pakartojimų vidurkiai.

Mikroorganizmas	I_k (%)	K_A gautas panaudojus α -laktalbuminą hidrolizuotą:			
		Tripsinu	α - chimotoripsinu	Pankreatinu	Pepsinu
<i>Gram⁺ bakterijos</i>					
<i>B. mesentericus</i> 66	17,7	1,35	1,19	1,12	1,23
<i>B. subtilis</i> SK-52	16,0	1,32	1,17	1,10	1,20
<i>B. subtilis</i> 65-10	16,8	1,57	1,40	1,31	1,43
<i>B. subtilis</i> 65-42	18,4	2,53	2,25	2,11	2,31
<i>B. subtilis</i> 65-1482	17,6	1,77	1,57	1,47	1,61
<i>Bifidobacterium</i> sp.	8,0	7,89	7,04	6,60	7,21
<i>L. fermentii</i> 90TC4	26,3	1,43	1,27	1,19	1,30
<i>L. plantarum</i> 8PA3	7,0	2,72	2,42	2,27	2,48
<i>Gram⁻ bakterijos</i>					
<i>E. coli</i> K12	14,5	2,19	1,95	1,83	2,00
<i>E. coli</i> M17	5,1	5,74	5,11	4,80	5,24
<i>E. coli</i> MRE-600	2,5	13,69	12,18	11,43	12,48
<i>E. coli</i> O2	1,0	10,37	9,23	8,66	9,46
<i>M. capsulatus</i> 122	5,5	2,68	2,39	2,24	2,45
<i>M. capsulatus</i> 170	6,2	4,00	3,56	3,34	3,65
<i>Methylococcus</i> sp.	0,5	20,02	17,82	16,72	18,26
M6-58					
<i>P. vulgaris</i>	5,2	2,00	1,64	1,54	1,67
<i>Mielės</i>					
<i>C. salmonicola</i> 779	8,6	2,34	2,08	1,95	2,13
<i>C. tropicalis</i> 909	4,9	2,62	2,33	2,18	2,39
<i>R. aurantiaca</i> 528	8,4	2,71	2,41	2,26	2,47
<i>S. cerevisiae</i> 12	1,9	4,36	3,88	3,64	3,98

6 lentelė. Mikroorganizmų natūralios autolizės intensyvumas (I_k) ir β -laktoglobulino hidrolizatų antimikrobinio aktyvumo (autolizės skatinimo) rodiklis K_A . Rezultatai pateikti kaip šešių pakartojimų vidurkiai.

Mikroorganizmas	I_k (%)	K_A gautas panaudojus β -laktoglobulino hidrolizuotą:			
		Tripsinu	α - chimotoripsinu	Pankreatinu	Pepsinu
<i>Gram⁺ bakterijos</i>					
<i>B. mesentericus</i> 66	17,7	1,35	1,19	1,12	1,23
<i>B. subtilis</i> SK-52	16,0	1,32	1,17	1,10	1,20
<i>B. subtilis</i> 65-10	16,8	1,57	1,40	1,31	1,43
<i>B. subtilis</i> 65-42	18,4	2,53	2,25	2,11	2,31
<i>B. subtilis</i> 65-1482	17,6	1,77	1,57	1,47	1,61
<i>Bifidobacterium</i> sp.	8,0	7,89	7,04	6,60	7,21
<i>L. fermentii</i> 90TC4	26,3	1,43	1,27	1,19	1,30
<i>L. plantarum</i> 8PA3	7,0	2,72	2,42	2,27	2,48
<i>Gram⁻ bakterijos</i>					
<i>E. coli</i> K12	14,5	2,19	1,95	1,83	2,00
<i>E. coli</i> M17	5,1	5,74	5,11	4,80	5,24
<i>E. coli</i> MRE-600	2,5	13,69	12,18	11,43	12,48
<i>E. coli</i> O2	1,0	10,37	9,23	8,66	9,46
<i>M. capsulatus</i> 122	5,5	2,68	2,39	2,24	2,45
<i>M. capsulatus</i> 170	6,2	4,00	3,56	3,34	3,65
<i>Methylococcus</i> sp. M6-58	0,5	20,02	17,82	16,72	18,26
<i>P. vulgaris</i>	5,2	2,00	1,64	1,54	1,67
<i>Mielės</i>					
<i>C. salmonicola</i> 779	8,6	2,34	2,08	1,95	2,13
<i>C. tropicalis</i> 909	4,9	2,62	2,33	2,18	2,39
<i>R. aurantiaca</i> 528	8,4	2,71	2,41	2,26	2,47
<i>S. cerevisiae</i> 12	1,9	4,36	3,88	3,64	3,98

7 lentelė. Mikroorganizmų natūralios autolizės intensyvumas (I_k) ir ovalbumino hidrolizatų antimikrobinio aktyvumo (autolizės skatinimo) rodiklis K_A . Rezultatai pateikti kaip šešių pakartojimų vidurkiai.

Mikroorganizmas	I_k (%)	K_A gautas panaudojus ovalbumino hidrolizuotą:			
		Tripsinu	α - chimotripsinu	Pankreatinu	Pepsinu
<i>Gram⁺ bakterijos</i>					
<i>B. mesentericus</i> 66	17,7	1,21	1,12	1,07	1,17
<i>B. subtilis</i> SK-52	16,0	1,19	1,10	1,04	1,15
<i>B. subtilis</i> 65-10	16,8	1,42	1,31	1,25	1,37
<i>B. subtilis</i> 65-42	18,4	2,28	2,11	2,00	2,20
<i>B. subtilis</i> 65-1482	17,6	1,59	1,47	1,40	1,53
<i>Bifidobacterium</i> sp.	8,0	7,13	6,60	6,26	6,87
<i>L. fermentii</i> 90TC4	26,3	1,29	1,19	1,13	1,24
<i>L. plantarum</i> 8PA3	7,0	2,45	2,27	2,15	2,36
<i>Gram⁻ bakterijos</i>					
<i>E. coli</i> K12	14,5	1,98	1,83	1,74	1,90
<i>E. coli</i> M17	5,1	5,17	4,80	4,54	4,98
<i>E. coli</i> MRE-600	2,5	12,33	11,43	10,83	11,88
<i>E. coli</i> O2	1,0	9,35	8,66	8,21	9,00
<i>M. capsulatus</i> 122	5,5	2,42	2,24	2,12	2,33
<i>M. capsulatus</i> 170	6,2	3,61	3,34	3,17	3,48
<i>Methylococcus</i> sp.	0,5	18,04	16,72	15,84	17,38
M6-58					
<i>P. vulgaris</i>	5,2	1,66	1,54	1,45	1,60
<i>Mielės</i>					
<i>C. salmonicola</i> 779	8,6	2,11	1,95	1,85	2,03
<i>C. tropicalis</i> 909	4,9	2,36	2,19	2,07	2,28
<i>R. aurantiaca</i> 528	8,4	2,44	2,26	2,15	2,35
<i>S. cerevisiae</i> 12	1,9	3,93	3,64	3,45	3,78

8 lentelė. Mikroorganizmų natūralios autolizės intensyvumas (I_k) ir serumo albumino hidrolizatų antimikrobinio aktyvumo (autolizės skatinimo) rodiklis K_A . Rezultatai pateikti kaip šešių pakartojimų vidurkiai.

Mikroorganizmas	I_k (%)	K_A gautas panaudojus serumo albumino hidrolizuotą:			
		Tripsinu	α - chimotoripsinu	Pankreatinu	Pepsinu
<i>Gram⁺ bakterijos</i>					
<i>B. mesentericus</i> 66	17,7	1,23	1,15	1,08	1,18
<i>B. subtilis</i> SK-52	16,0	1,20	1,13	1,06	1,16
<i>B. subtilis</i> 65-10	16,8	1,44	1,35	1,26	1,38
<i>B. subtilis</i> 65-42	18,4	2,31	2,17	2,03	2,22
<i>B. subtilis</i> 65-1482	17,6	1,61	1,51	1,42	1,55
<i>Bifidobacterium</i> sp.	8,0	7,21	6,78	6,34	6,95
<i>L. fermentii</i> 90TC4	26,3	1,30	1,22	1,15	1,26
<i>L. plantarum</i> 8PA3	7,0	2,48	2,33	2,18	2,39
<i>Gram⁻ bakterijos</i>					
<i>E. coli</i> K12	14,5	2,00	1,88	1,76	1,93
<i>E. coli</i> M17	5,1	5,24	4,92	4,61	5,05
<i>E. coli</i> MRE-600	2,5	12,48	11,73	10,98	12,03
<i>E. coli</i> O2	1,0	9,46	8,89	8,32	9,12
<i>M. capsulatus</i> 122	5,5	2,45	2,30	2,15	2,36
<i>M. capsulatus</i> 170	6,2	3,65	3,43	3,21	3,52
<i>Methylococcus</i> sp. M6-58	0,5	18,26	17,16	16,06	17,60
<i>P. vulgaris</i>	5,2	1,68	1,58	1,47	1,62
<i>Mielės</i>					
<i>C. salmonicola</i> 779	8,6	2,13	2,00	1,88	2,06
<i>C. tropicalis</i> 909	4,9	2,39	2,25	2,10	2,30
<i>R. aurantiaca</i> 528	8,4	2,47	2,32	2,18	2,38
<i>S. cerevisiae</i> 12	1,9	3,98	3,74	3,50	3,83

9 lentelė. Įvairių maisto baltymų hidrolizatų įtaka natūraliai nesiautolizuojančių mikroorganizmų ($I_k=0$) autolizės intensyvumui (I_b).

Mikroorganizmas	I_b (%) gautas panaudojus:																			
	Kazeinas hidrolizuotas*				α -Laktalbuminas hidrolizuotas*				β -Laktoglobulinas hidrolizuotas*				Ovalbuminas hidrolizuotas*				Serumo albuminas hidrolizuotas*			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
<i>B.mesentericus</i> 1	19,9	18,51	17,51	19,10	17,91	16,92	15,92	17,31	18,11	16,12	15,12	16,52	16,32	15,12	14,33	12,42	16,52	15,52	14,53	15,92
<i>C. lambica</i> 522	8,2	7,63	7,22	7,87	7,38	6,97	6,56	7,13	7,46	6,64	6,23	6,81	6,72	6,23	5,90	6,48	6,81	6,40	5,60	6,56
<i>M. acidoxilos</i>	3,9	3,63	3,42	3,74	3,51	3,32	3,12	3,39	3,55	3,16	2,96	3,24	3,20	2,96	2,81	3,08	3,24	3,04	2,85	3,12
<i>S. albobriseolus</i>	56,7	52,73	49,90	54,43	51,03	48,20	45,36	49,33	51,60	45,93	43,09	47,06	46,50	43,10	40,82	44,80	47,06	44,23	41,40	45,36

* Fermentai: 1 – tripsinas; 2 – α -chimotripsinas; 3 – pankreatinas; 4 – pepsinas.

Visi hidrolizatai skatino be išimties visų tirtų mikroorganizmų autolizinę sistemą, t.y. pasižymėjo antimikrobinio aktyvumu. Tiriant hidrolizatų poveikį natūraliai besiautolizuojančių mikroorganizmų autolizei, antimikrobinio aktyvumo rodiklis K_A svyravo nuo 1,04 (ovalbumino pankreatininis hidrolizatas *B. subtilis* SK-52 atžvilgiu) iki 22,0 (kazeino tripsininis hidrolizatas *Methylococcus* sp. M6-58 atžvilgiu) (4 ir 7 lentelė). Visi hidrolizatai labiausiai aktyvūs buvo *Methylococcus* sp. M6-58, *E. coli* MRE-600 ir enteropatogeninės *E. coli* O2 kamienų atžvilgiu. Tuo tarpu *B. subtilis* SK-52, *B. mesentericus* 66 ir *L. fermentii* 90TC4 kamienų autolizę hidrolizatai skatino menkai. Hidrolizatų antimikrobinis aktyvumas natūraliai nesiautolizuojančių mikroorganizmų atžvilgiu buvo taip pat skirtingas. Iššauktos autolizės intensyvumas svyravo nuo 2,81 % ovalbumino pankreatininio hidrolizato *M. acidoxilos* kamieno atveju iki 56,7 % *Streptomyces albogriseolus* kamieną veikiant kazeino tripsininis hidrolizatu (9 lentelė). Nepriklausomai nuo tiriamojo mikroorganizmo kamieno prigimties (natūraliai besiautolizuojantis ar natūraliai nesiautolizuojantis) stipriausiomis antimikrobinėmis savybėmis pasižymėjo kazeino hidrolizatai, silpniausiomis – ovalbumino. Lyginant virškinimo fermentų atžvilgiu, labiausiai mikroorganizmų autolizinę sistemą stimuliuojo tripsininiai hidrolizatai, mažiausiai – pankreatininiai.

Pagal pajėgumą skatinti mikroorganizmų autolizę, fermentinius hidrolizatus galima būtų išdėstyti tokia tvarka: tripsininiai hidrolizatai > pepsininiai hidrolizatai > chimotripsininiai hidrolizatai > pankreatininiai hidrolizatai. Vertinant antimikrobinį hidrolizatų aktyvumą maisto baltymų atžvilgiu, eilė būtų tokia: kazeino hidrolizatai > α -laktalbumino hidrolizatai > β -laktoglobulino hidrolizatai > serumo albumino hidrolizatai > ovalbumino hidrolizatai.

4.2. Maisto baltymų hidrolizatų poveikis fagocituojančių ląstelių aktyvumui

Maisto baltymų hidrolizatų gebėjimas stimuliuoti fagocituojančių ląstelių fagocitinį aktyvumą *in vivo* (imunostimuliuojantis aktyvumas) pateiktas 10 lentelėje.

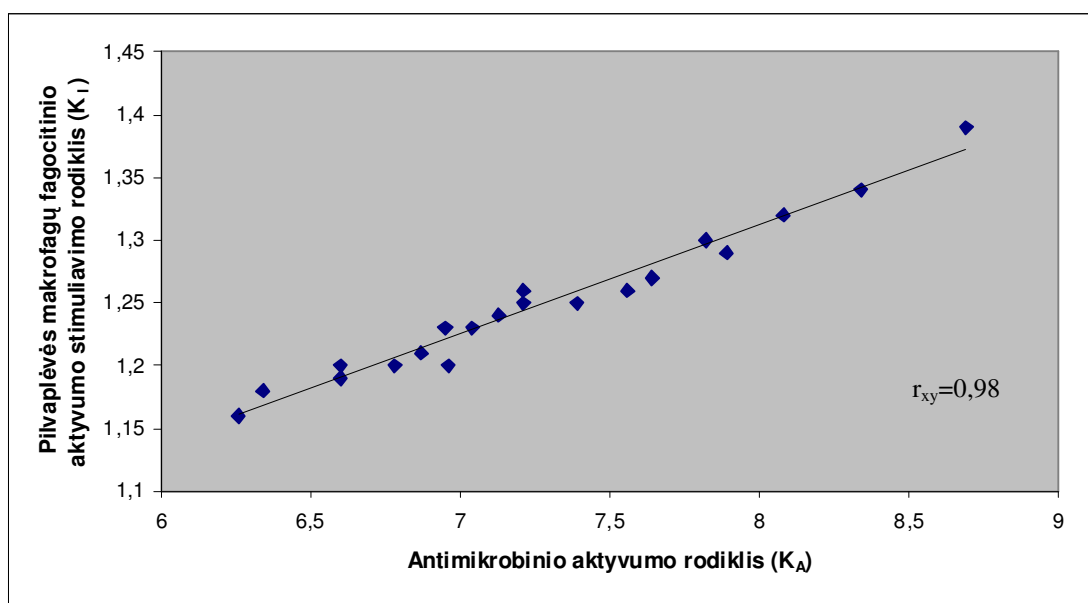
10 lentelė. Maisto baltymų hidrolizatų imunostimuliuojantis aktyvumas (gebėjimo stimuliuoti fagocituojančių ląstelių fagocitinį aktyvumą rodiklis) (K_I). K_I apskaičiuotas pagal makrofagų fagocituojančio aktyvumo ($n=6$) vidutinės reikšmės.

Hidrolizatas	K_I	
	Pilvaplėvės makrofagų atžvilgiu (fluorimetrinis metodas)	Kraujo fagocitinių ląstelių atžvilgiu (tėkmės citometrijos metodas)
Kazeinas hidrolizuotas		
tripsinu	1,39	1,34
pepsinu	1,34	1,30
chimotripsinu	1,32	1,29
pankreatinu	1,27	1,20
α -Laktalbuminas hidrolizuotas		
tripsinu	1,30	1,27
pepsinu	1,26	1,25
chimotripsinu	1,25	1,21
pankreatinu	1,20	1,14
β -Laktoglobulinas hidrolizuotas		
tripsinu	1,29	1,27
pepsinu	1,26	1,20
chimotripsinu	1,23	1,16
pankreatinu	1,19	1,13
Serumo albuminas hidrolizuotas		
tripsinu	1,25	1,23
pepsinu	1,23	1,19
chimotripsinu	1,20	1,15
pankreatinu	1,18	1,13
Ovalbuminas hidrolizuotas		
tripsinu	1,24	1,18
pepsinu	1,21	1,16
chimotripsinu	1,20	1,16
pankreatinu	1,16	1,10

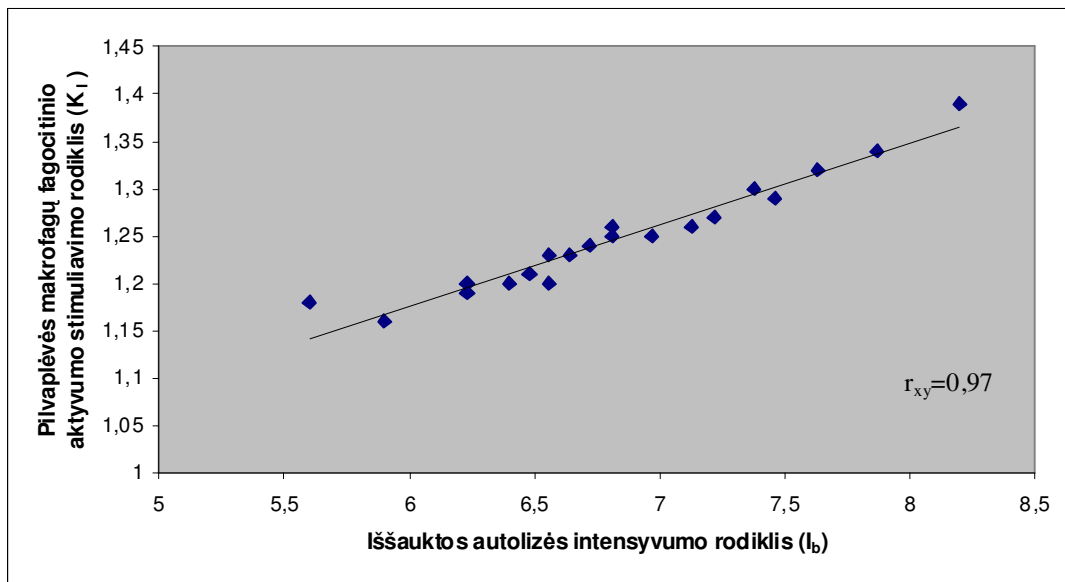
Lyginant 10 lentelės ir 4 - 9 lentelių duomenis, galima išvelgti tam tikrą analogiją tarp hidrolizatų antimikrobinio aktyvumo ir jų imunostimuliuojančio aktyvumo. Pirma, visi tirti hidrolizatai, be gebėjimo stimuliuoti mikroorganizmų autolizę, pasižymėjo ir pilvaplėvės makrofagų bei kraujo monocitų ir granulocitų fagocitinį aktyvumą skatinančiu poveikiu. Imunostimuliuojančio aktyvumo rodiklis K_I svyravo nuo 1,10 iki 1,39 (10 lentelė). Antra, pagal imunostimuliuojančio aktyvumo rodiklį fermentiniai hidrolizatai išsidėsto ta pačia kaip antimikrobinio aktyvumo atveju seka, t.y.

tripsininiai hidrolizatai > pepsininiai hidrolizatai > chimotripsininiai hidrolizatai > pankreatininiai hidrolizatai. Ta pati tendencija stebima imunostimuliuojančio aktyvumo seką vertintinant maisto baltymų atžvilgiu, t.y. kazeino hidrolizatai > α -laktalbumino hidrolizatai > β -laktoglobulino hidrolizatai > serumo albumino hidrolizatai > ovalbumino hidrolizatai. Stipriausiai fagocituojančių ląstelių aktyvumą skatino kazeino tripsininis hidrolizatas, o silpniausiai – ovalbumino pankreatininis hidrolizatas.

Maisto baltymų hidrolizatų imunostimuliuojančio aktyvumo priklausomybės nuo antimikrobinio aktyvumo pavyzdžiai pateikti 1 ir 2 pav. Paveiksluose nurodyti maisto baltymų hidrolizatų antimikrobinio poveikio *Bifidobacterium sp.* kamienui, kuriam būdinga natūrali autolizė, ir natūraliai nesiautolizuojančiam *C. lambica* 522 kamienui, tyrimo duomenys. Priklausomybė yra tiesiogiai proporcinga. Ryšys apibrėžiamas taip: $K_I = f(K_A)$.



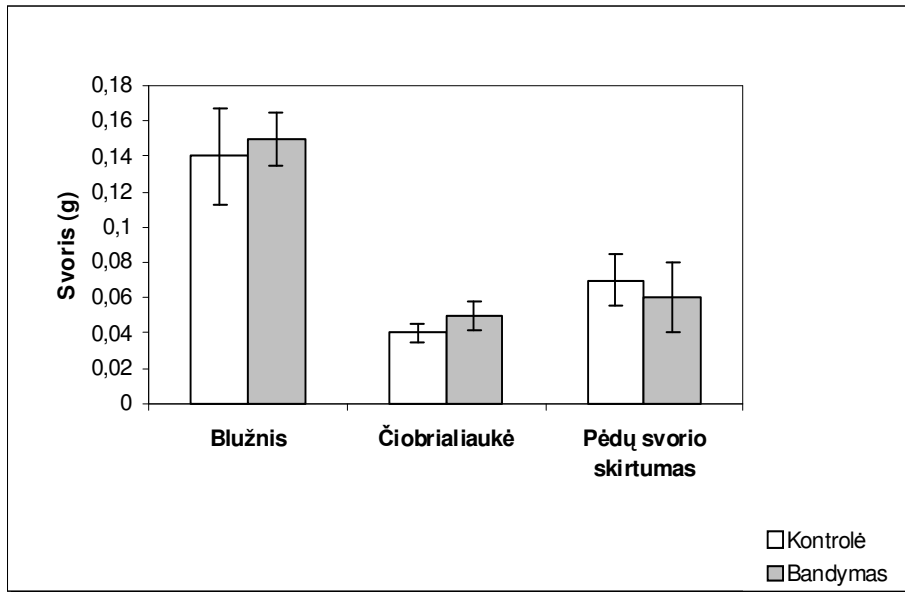
1 pav. Maisto baltymų imunostimuliuojančio aktyvumo priklausomybė nuo jų antimikrobinio aktyvumo *Bifidobacterium sp.* atžvilgiu.



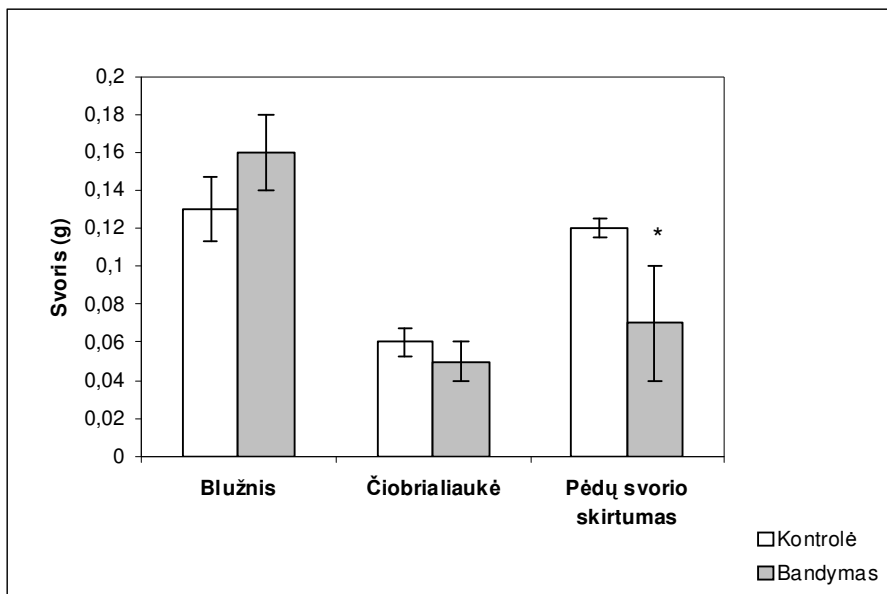
2 pav. Maisto baltymų imunostimuliuojančio aktyvumo priklausomybė nuo jų antimikrobinio aktyvumo *C. lambica* 522 atžvilgiu.

5.3. Kazeino tripsininio hidrolizato poveikis uždegimui

Įvertinta, ar maisto baltymų hidrolizatų savybę stimuliuoti imuninę sistemą būtų galima panaudoti uždegiminių procesų profilaktikai. Tam tikslui pasirinktas efektyviausias (parodęs didžiausią fagocituojančias ląsteles skatinantį aktyvumą) kazeino tripsininis hidrolizatas bei ūminio uždegimo (pėdos edema) ir kontaktinio hiperjautrumo modeliai pelėse. Rezultatai, gauti vertinant limfoidinių organų svorius (3 ir 4 pav.), citokinų TNF- α ir IL-10 koncentracijas (5 ir 6 pav.) ir hematologinius rodiklius (11 ir 12 lentelės), rodo, jog kazeino tripsininis hidrolizatas nepasižymi prieš uždegiminiu efektu. Vienintelis statistiškai reikšmingas rezultatas, rodantis profilaktinį poveikį, yra sumažėjęs pelių pėdų svorio skirtumas kontaktinio hiperjautrumo atveju (4 pav.). Tiriamosios grupės pelių pėdų svorių skirtumas 41,7 % buvo mažesnis nei kontrolinės grupės pelių.

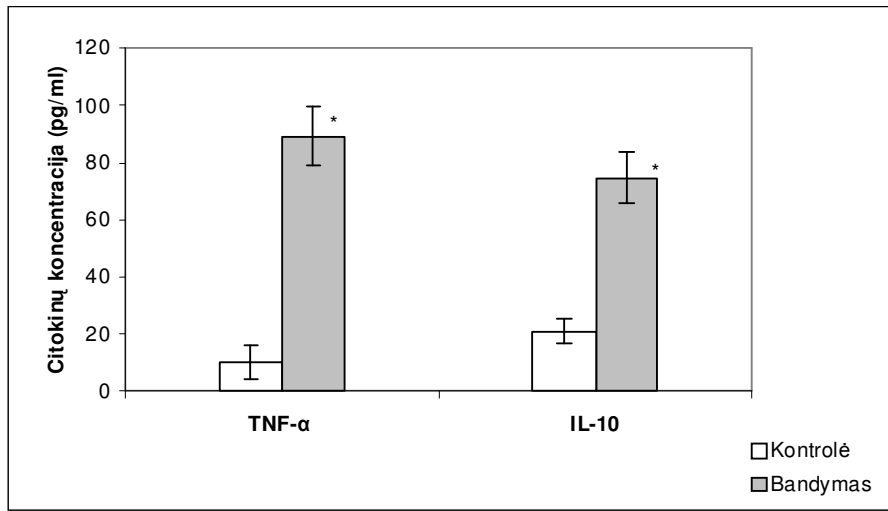


3 pav. Kazeino tripsininio hidrolizato poveikis limfoidinių organų svoriams ir pėdų svorio skirtumui (ūminio uždegimo modelis). Kazeino tripsininis hidrolizatas buvo duodamas *per os* vieną kartą per dieną, penkias dienas. Hidrolizato dozė - 1 mg/g svorio. Kiekvieną grupę sudarė 6 gyvūnai. Rezultatai pateikti kaip duomenų vidurkiai \pm SN. Statistiškai reikšmingų pakitimų nėra.

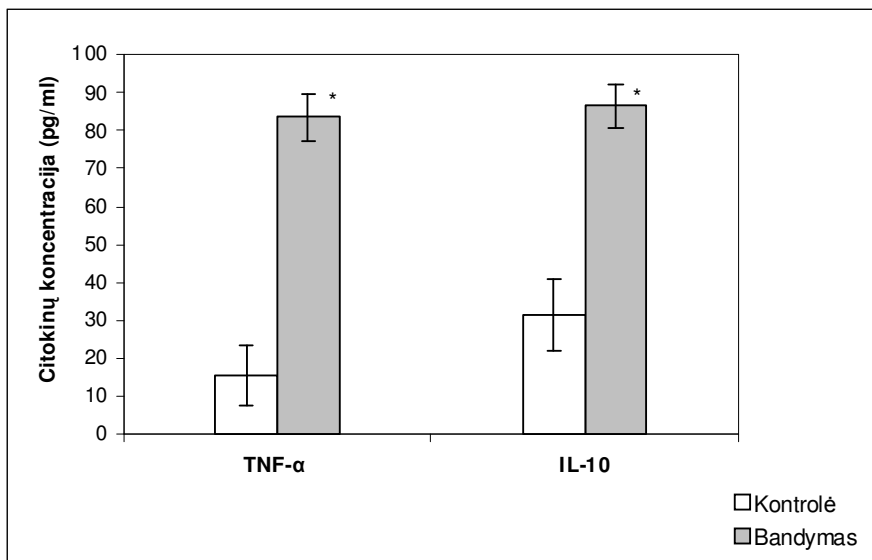


4 pav. Kazeino tripsininio hidrolizato poveikis limfoidinių organų svoriams ir pėdų svorio skirtumui (kontaktinio hiperjautrumo reakcijos modelis). Kazeino tripsininis hidrolizatas buvo duodamas *per os* vieną kartą per dieną, penkias dienas. Hidrolizato dozė - 1 mg/g svorio. Kiekvieną grupę sudarė 6 gyvūnai. Rezultatai pateikti kaip duomenų vidurkiai \pm SN. * $P < 0,05$

Tiek kontaktinio hiperjautrumo, tiek ūminio uždegimo atveju kraujo serume nustatytos padidėjusios citokinų TNF- α ir IL-10 koncentracijos (5 ir 6 pav.).



5 pav. Kazeino tripsininio hidrolizato poveikis citokinų IL-10 ir TNF- α koncentracijai pelių kraujo serume (ūminio uždegimo modelis). Kazeino tripsininis hidrolizatas buvo duodamas *per os* vieną kartą per dieną, penkias dienas. Hidrolizato dozė - 1 mg/g svorio. Kiekvieną grupę sudarė 6 gyvūnai. Rezultatai pateikti kaip duomenų vidurkiai \pm SN. * $P < 0,001$



6 pav. Kazeino tripsininio hidrolizato poveikis citokinų IL-10 ir TNF- α koncentracijai pelių kraujo serume (kontaktinio hiperjautrumo reakcijos modelis). Kazeino tripsininis hidrolizatas buvo duodamas *per os* vieną kartą per dieną, penkias dienas. Hidrolizato dozė - 1 mg/g svorio. Kiekvieną grupę sudarė 6 gyvūnai. Rezultatai pateikti kaip duomenų vidurkiai \pm SN. * $P < 0,001$

11 lentelė. Kazeino tripsininio hidrolizato poveikis pelių hematologiniams rodikliams (ūminio uždegimo modelis).

Hematologinis rodiklis	Pelių grupė (n=6)	
	Kontrolinė	Bandomoji
WBC ($\times 10^9/l$)	3,54±1,02	4,77±1,17
NE ($\times 10^9/l$)	0,43±0,13	0,69±0,27
LY ($\times 10^9/l$)	2,39±0,83	3,33±0,89
MO ($\times 10^9/l$)	0,42±0,08	0,54±0,13
EO ($\times 10^9/l$)	0,03±0,005	0,03±0,01
BA ($\times 10^9/l$)	0,002±0,0004	0,001±0,001
RBC ($\times 10^{12}/l$)	8,45±1,01	10,06±1,49
Hgb (g/l)	112,3±5,7	117,5±5,2
PCV ($\times 10^{-2} l/l$)	39,03±3,60	45,5±7,45
MCV ($\times 10^{-15} l/l$)	46,37±4,84	46,82±0,50
MCH ($\times 10^{-12} g/l$)	12,73±1,48	12,63±0,52
MCHC ($\times 10 g/l$)	29,4±2,47	27,53±1,36
RDW (%)	17,75±3,81	21,42±1,47
PLT ($\times 10^{11}/l$)	1,18±0,097	1,06±0,049
MPV ($\times 10^{-15} l$)	43,2±9,3	38,5±5,2

Statistiškai reikšmingų pakitimų nėra.

12 lentelė. Kazeino tripsininio hidrolizato poveikis pelių hematologiniams rodikliams (kontaktinio hiperjautrumo reakcijos modelis).

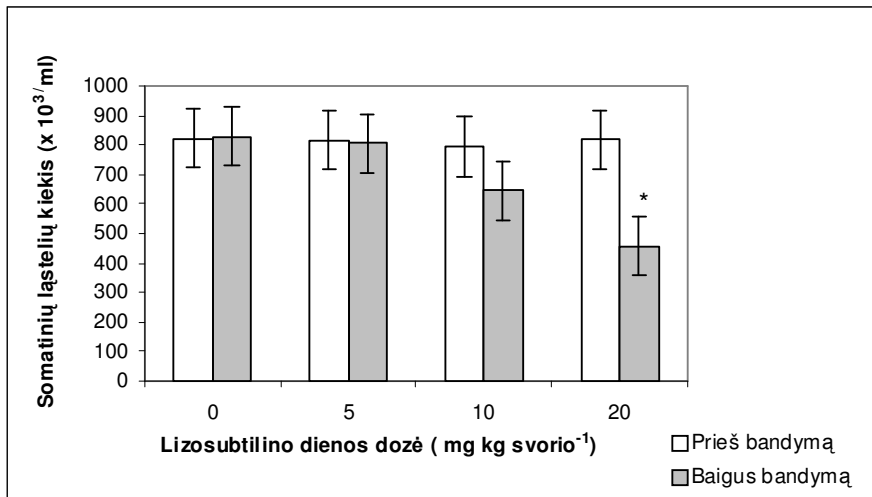
Hematologinis rodiklis	Pelių grupė (n=6)	
	Kontrolinė	Bandomoji
WBC ($\times 10^9/l$)	4,51 ± 0,76	4,13 ± 0,58
NE ($\times 10^9/l$)	0,42 ± 0,11	0,65 ± 0,15
LY ($\times 10^9/l$)	3,89 ± 0,40	3,07 ± 0,45
MO ($\times 10^9/l$)	0,44 ± 0,11	0,46 ± 0,06
EO ($\times 10^9/l$)	0,01 ± 0,005	0,008 ± 0,004
BA ($\times 10^9/l$)	0,002 ± 0,0008	0,002± 0,0004
RBC ($\times 10^{12}/l$)	9,31 ± 0,54	10,42 ± 0,61
Hgb (g/l)	119,3 ± 2,1	124,3 ± 6,1
PCV ($\times 10^{-2} l/l$)	45,03 ± 1,35	46,28 ± 1,57
MCV ($\times 10^{-15} l/l$)	46,82 ± 0,26	47,05 ± 0,24
MCH ($\times 10^{-12} g/l$)	13,6 ± 0,89	12,87 ± 0,25
MCHC ($\times 10 g/l$)	27,95 ± 1,60	27,13 ± 0,49
RDW (%)	19,2 ± 0,42	19,91 ± 0,93
PLT ($\times 10^{11}/l$)	1,28 ± 0,053	1,34 ± 0,028
MPV ($\times 10^{-15} l$)	44,2 ± 2,6	37,3 ± 4,7

Statistiškai reikšmingų pakitimų nėra.

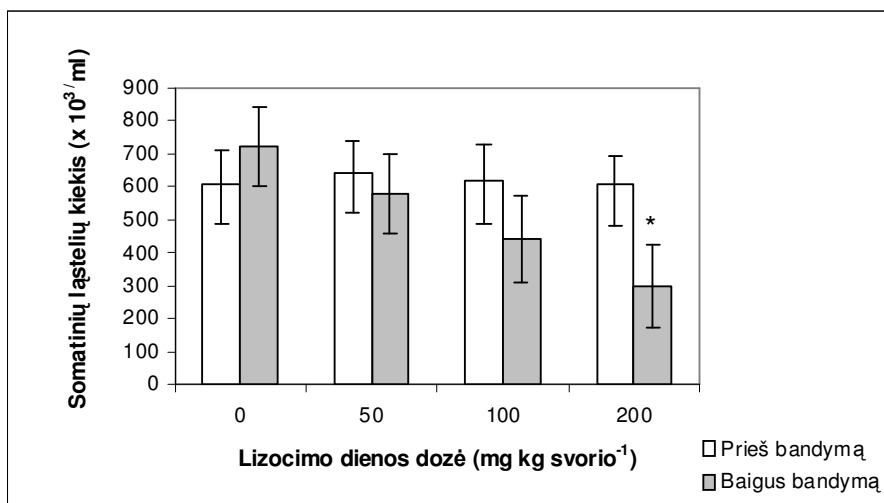
Hematologinių tyrimų rezultatai rodo, jog, abiejų uždegiminių modelių atvejais, statistškai reikšmingų skirtumų tarp kontrolinių ir tiriamųjų gyvūnų grupių kraujo rodiklių nėra.

4.4. Egzogeninių antimikrobinių fermentų preparatų, lizocimo ir lizosubtilino, poveikis somatinių ląstelių kiekiui piene

Įvertinta, ar galima sumažinti somatinių ląstelių kiekį (padidėjęs somatinių ląstelių kiekis rodo tešmenyje vykstančias uždegimines reakcijas) karvių piene pašarų papildais naudojant antimikrobinių fermentų preparatus. Rezultatai, pateikti 7 ir 8 pav., rodo, kad toks būdas yra veiksmingas.

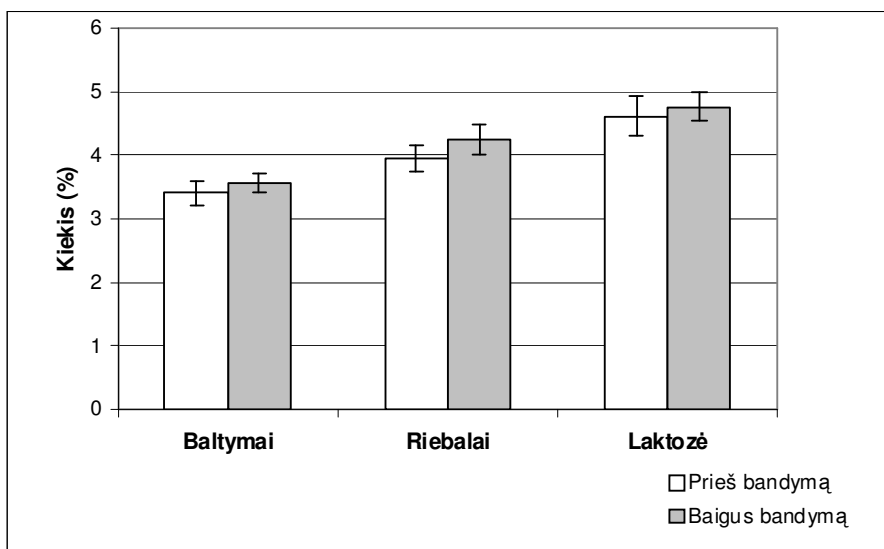


7 pav. Lizosubtilino poveikis somatinių ląstelių kiekiui piene. Lizosubtilinas karvėms (n=5) buvo duodamas vieną kartą per dieną, dešimt dienų. Rezultatai pateikti kaip duomenų vidurkiai ± SN. * $P < 0,05$.

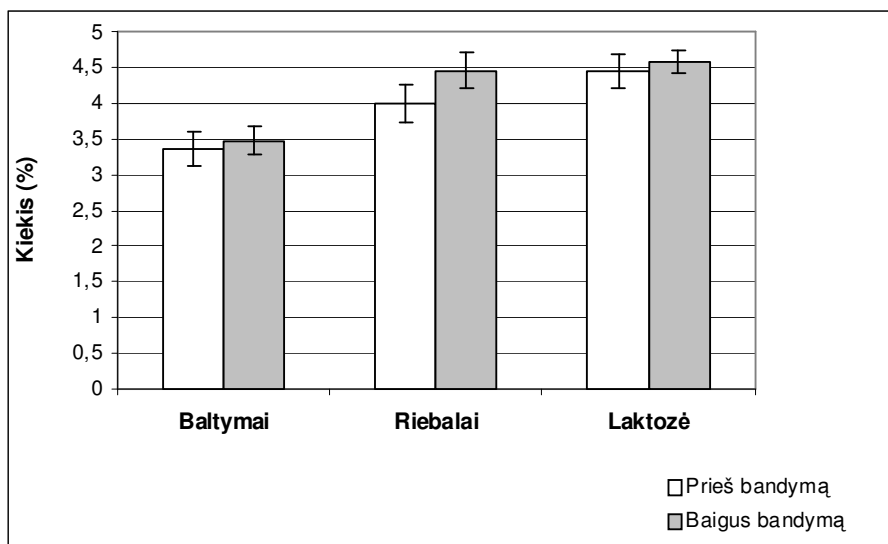


8 pav. Lizocimo poveikis somatinių ląstelių kiekiui piene. Lizocimas karvėms (n=5) buvo duodamas vieną kartą per dieną, dešimt dienų. Rezultatai pateikti kaip duomenų vidurkiai ± SN. * $P < 0,05$.

Efektyviausiai (ir statistiškai reikšmingai) somatinių ląstelių kiekį mažino didžiausios išbandytos lizosubtilino ir lizocimo dozės (20 mg/kg svorio ir 200 mg/kg svorio, atitinkamai). Taip pat nustatyta, jog šie fermentiniai preparatai neturėjo reikšmingos įtakos baltymų, riebalų ir laktozės kiekiams piene (9 ir 10 pav.).

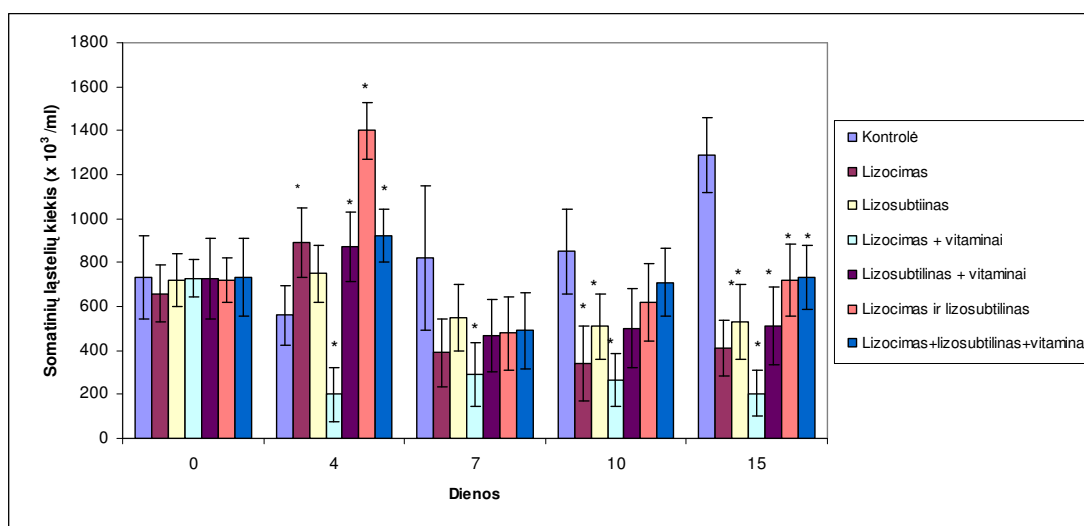


9 pav. Lizosubtilino poveikis baltymų, riebalų ir laktozės kiekiams piene. Lizosubtilinas karvėms (n=5) buvo duodamas vieną kartą per dieną, dešimt dienų. Rezultatai pateikti kaip duomenų vidurkiai ± SN. Statistiškai reikšmingų pakitimų nėra.



10 pav. Lizocimo poveikis baltymų, riebalų ir laktozės kiekiams piene. Lizocimas karvėms (n=5) buvo duodamas vieną kartą per dieną, dešimt dienų. Rezultatai pateikti kaip duomenų vidurkiai ± SN. Statistiškai reikšmingų pakitimų nėra.

Palyginamojo bandymo rezultatai (11 pav.) rodo, kad po keturių, septynių ir dešimties dienų fermentinių preparatų ir vitaminų davimo žymus somatinių ląstelių skaičiaus sumažėjimas pastebėtas karvių, kurioms buvo skirtas lizocimo ir vitaminų kompleksas, piene ($P < 0,001$).



11 pav. Fermentinių preparatų ir vitaminų poveikis karvių pieno somatinių ląstelių skaičiui. Lizocimas ir/ar lizosubtilinas (su ar be vitaminų) karvėms (n=10) buvo duodamas vieną kartą per dieną, dešimt dienų. Lizocimo dozė buvo 200 mg/kg svorio, lizosubtilino – 20 mg/kg svorio. Rezultatai pateikti kaip duomenų vidurkiai ± SN. * $P < 0,001$.

Dešimtą tyrimo dieną statistiškai reikšmingas ($P < 0,001$) somatinių ląstelių skaičiaus sumažėjimas pastebėtas ir karvių, gavusių tik lizocimo ir lizosubtilino bei lizosubtilino su vitaminais kompleksą, piene. Prieštaringi rezultatai pastebimi ketvirtą eksperimento dieną, kuomet visų tiriamų gyvūnų, išskyrus gavusių lizocimo ir vitaminių mišinį, somatinių ląstelių skaičius, palyginus su kontrolinės grupės karvių somatinių ląstelių skaičiumi, žymiai išaugo. Penkioliką dieną somatinių ląstelių skaičius, palyginus su kontroline karvių grupe, sumažėjo visose tiriamose grupėse.

5. REZULTATŲ APTARIMAS

1976 m. P. Jollès paskelbė hipotezę, kad lizocimas organizmui yra ne tiek svarbus kaip jo apsauginis antimikrobinis faktorius, kiek svarbūs yra jo poveikio metu atsiradusių mikrobinės lizės produktų imunostimuliuojantys efektai. 1981 m. Y. Namba ir kt. įrodė šios hipotezės teisingumą. Tais pačiais 1981-ais metais minėtasis P. Jollès pirmą kartą paskelbė ir užpatentavo pastebėjimus, kad kazeino (pagrindinio pieno baltymo) sudėtyje esantys biologiškai aktyvūs peptidai pasižymi imunostimuliuojančiu poveikiu (Jollès ir kt., 1981; Jollès ir kt., 1982). Netrukus pasirodė kiti jo ir bendraautorių darbai (Parker ir kt., 1984; Berthou ir kt., 1987; Gattegno ir kt., 1988; Migliore-Samour ir Jollès, 1988; Migliore-Samour ir kt., 1989), kuriuose buvo pateikta smulkesnė šių imunostimuliuojančių peptidų charakteristika. P. Jollès, bendradarbiaudamas su kitais mokslininkais, nustatė, kad įvairiose stuburinių organizmo vietose (tame tarpe ir žarnyne) funkcionuoja genai, atsakingi už imunologiškai aktyvių kazeino peptidų sintezę. 1981-aisiais metais O. Kisluchina ir kt. pirmą kartą aprašė kazeino tripsininio hidrolizato gebėjimą stimuliuoti mikroorganizmų autolizę (Кислухина ir kt., 1981). Įdomu, kad panašiu metu pasirodė ir I. Ginsburgo bei bendraautorių pirmieji darbai (Neeman ir kt., 1974; Lahav ir kt., 1975; Ginsburg ir kt., 1976) apie tai, jog organizme apstu katijoninių antimikrobinių peptidų ir baltymų (įskaitant lizocimą), sugebančių sukelti mikroorganizmų autolizę. Apjungus šiuos faktus su literatūros apžvalgoje minėta V. Bocci teorija apie organizmui labai svarbų žarnyno mikroorganizmų autolizės produktų imunostimuliuojantį veikimą (Bocci, 1992), galima būtų pasakyti, kad šio darbo dalis apie įvairių maisto baltymų hidrolizatų dvigubą (antimikrobinį/imunostimuliuojantį) poveikį yra tik logiška daugiamečių įvairių autorių darbų tąsa.

Ankstesnių tyrimų rezultatai parodė, kad kazeino tripsininis hidrolizatas skatino 24 mikroorganizmų (bakterijų ir grybų) kamienų autolizę (Biziulevičius ir kt., 2002). Panaudojus naujagimių veršelių kolibakteriozės modelį, buvo įrodyta, kad tas pats kazeino tripsininis hidrolizatas teigiamai

veikia gyvūnų imuninę sistemą (Biziulevičius ir kt., 2003). Skiriamas profilaktiškai jis skatino organizmo rezistentiškumą infekcijai; hematologiniai rodikliai (hemoglobino ir hematokrito lygiai; bendro baltymo, γ -globulinų ir sulfhidrilinių grupių kiekiai; lizocimo ir baktericidiniai aktyvumai), baigus profilaktiką ar gydymą šiuo preparatu, buvo statistiškai reikšmingai didesni nei atitinkami kontrolinės grupės rodikliai. Analogiški, imunostimuliuojantį veikimą patvirtinantys rezultatai gauti ir tiriant veršelių kraują praėjus trimis mėnesiams po gydymo/profilaktikos (Biziulevičius ir kt., 2003).

Šio darbo rezultatai rodo, kad antimikrobinis poveikis būdingas ne tik kazeino tripsininiam hidrolizatui. Ir kitų maisto baltymų, t.y. α -laktalbumino, β -laktoglobulino, ovalbumino ir serumo albumino, hidrolizatai, gauti panaudojus virškinimo fermentus tripsiną, chimotripsiną, pankreatiną ir pepsiną, stimuliuo mikroorganizmų, priklausančių skirtingoms taksonominėms grupėms, autolizinę sistemą. Skyrėsi tik poveikio stiprumas tiek mikroorganizmo kamieno, tiek baltymo bei virškinimo fermento atžvilgiais.

Literatūros apžvalgoje buvo minėta, kad į maisto baltymų sudėtį įeinančių peptidų imunostimuliuojančio aktyvumo mechanizmai nėra gerai žinomi. Dauguma mokslininkų sieja peptidų imunostimuliuojantį aktyvumą su jų gebėjimu skatinti fagocitinių ląstelių veiklą (Devine ir Hancock, 2002; Meisel, 1998; Schanbacher ir kt., 1997; Sandré ir kt., 2001). Pastarosios ląstelės yra svarbiausia nespecifinio imuniteto dalis, užtikrinanti sėkmingą organizmo imuninės sistemos funkcionavimą. Tai ir lėmė mūsų pasirinkimą maisto baltymų hidrolizatų imunostimuliuojantį poveikį vertinti pagal fagocituojančių ląstelių fagocitinį aktyvumą.

Įvertinus maisto baltymų hidrolizatų gebėjimą stimuliuoti organizmo imuninę sistemą, nustatyta, kad fagocitinių ląstelių aktyvumą stimuliuoja visi maisto baltymų hidrolizatai (10 lentelė). Aktyvinami buvo tiek pilvaplėvės makrofagai, tiek kraujo fagocitinės ląstelės (monocitai ir granulocitai), tačiau vertėtų atkreipti dėmesį į tai, kad maisto baltymų hidrolizatų gebėjimas aktyvinti tiek vienas, tiek kitas fagocituojančias ląsteles buvo praktiškai

vienodas. Įdomu pažymėti, kad maitinantis pieno produktais, kazeino sudėtyje esantys peptidai patenka ir į kraujotakos sistemą (LeBlanc ir kt., 2002).

Tolimesniam duomenų aiškinimui svarbu yra ir tai, jog skirtingi maisto baltymų hidrolizatai tiek pagal savo imunostimuliuojantį, tiek pagal antimikrobinį aktyvumą (4 - 10 lentelės) ir baltymo, ir hidrolizuojančio fermento atžvilgiais išsidėsto pagal tas pačias sekas, t.y. kazeino hidrolizatai > α -laktalbumino hidrolizatai > β -laktoglobulino hidrolizatai > serumo albumino hidrolizatai > ovalbumino hidrolizatai; tripsininiai hidrolizatai > pepsininiai hidrolizatai > chimotripsininiai hidrolizatai > pankreatininiai hidrolizatai. Statistinė rezultatų analizė parodė, kad tarp maisto baltymų hidrolizatų antimikrobinio ir imunostimuliuojančio aktyvumų egzistuoja tiesioginis ryšys ($r_{xy} > 0,9$, 1 ir 2 pav.), t.y. kuo labiau maisto baltymų hidrolizatas pajėgus skatinti mikroorganizmų autolizę, tuo stipresnis jo poveikis imuninei sistemai.

Buvo iškelta hipotezė (Biziulevičius, 2004) apie galimą maisto baltymų vaidmenį mitybos imunologijoje: maisto baltymai, suardyti virškinimo proteolizininiais fermentais iki peptidų, aktyvuoja mikroorganizmų autolizę *in situ* (žarnyne), o autolizės proceso metu atsipalaiduojantys imunologiškai aktyvūs mikrobinių ląstelių komponentai savo ruožtu stimuliuoja šeimininko (besimaitinančiojo baltymais) imuninę sistemą. Šio darbo rezultatai ne tik patvirtino hipotezės teisingumą (bent dalinai, nes vis dar trūksta tiesioginių įrodymų, kad maisto baltymų sudėtyje esančių peptidų gebėjimas sukelti mikroorganizmų autolizę *in vitro* pasireiškia ir *in vivo*), tačiau ir leido sukurti mokslinę teoriją: *maisto baltymams, suardytiems virškinimo proteolizininiais fermentais iki peptidų, būdingas bifunkcinis (antimikrobinis/ imunostimuliuojantis) veikimas. Baltymų imunostimuliuojantis aktyvumas tiesiogiai priklauso nuo jų antimikrobinio aktyvumo (gebėjimo skatinti mikroorganizmų autolizę).*

Teorija nėra tik fundamentinė. Jau dabar ją galima būtų taikyti praktikoje, pvz., *in vitro* modeliuojant atskirų maisto baltymų poveikį organizmo imuninei sistemai. Tam tiesiog reikėtų hidrolizuoti baltymą virškinimo proteolizininiais fermentais ir tada įvertinti jo gebėjimą stimuliuoti

mikroorganizmų autolizę. Teorija galėtų rasti pritaikymą ir kuriant funkcinį maistą arba jo komponentus (Ashwell, 2002). Jau dabar sėkmingai vartojami įvairūs funkcinio maisto produktai, tarp jų ir produktai, kurių sudėtyje yra probiotikų, turintys imuninę sistemą skatinančių savybių. Iš literatūroje pateiktų duomenų (LeBlanc ir kt., 2002; LeBlanc ir kt., 2004) matyti, jog probiotikų veikimas yra susijęs su probiotinių mikroorganizmų savybe aktyviai sintetinti proteolizinius fermentus, veikimo specifiškumu besiskiriančius nuo natūralių virškinimo fermentų tripsino ir chimotripsino. Taigi probiotikai minėtų proteolizinių fermentų pagalba maisto baltymus gali suardyti iki kitokių nei įprasta peptidų. Kuo didesnė iš maisto baltymų kilusių peptidų įvairovė, tuo didesnė ir tikimybė, kad jų tarpe bus ir pasižyminčių antimikrobinėmis bei imunostimuliuojančiomis savybėmis. Ateityje vertėtų išsiaiškinti, ar probiotikų teigiamas poveikis imuninei sistemai nėra susijęs su mūsų pastebėjimais apie peptidų imunostimuliuojančio veikimo ryšį su mikroorganizmų autolizės skatinimu, o jei susijęs, tai tuo pačiu įnešti ir savo indėlį į funkcinio maisto veikimo mechanizmų mokslinį pagrindimą. Dar 1996 m. R. Chandra išreiškė mintį, kad jau prasidėjo nauja, imuninės sistemos skatinimo maistu, era, t.y., sukurtas pakankamas pagrindas maisto medžiagų panaudojimui kovai su infekcijomis bei kitomis ligomis (Chandra, 1996). Taigi tikėtina, kad nustatytas neįprastas maisto baltymų vaidmuo mitybos imunologijoje, pasitarnaus tolimesnei šios mokslo šakos plėtrai (bent tos jos dalies, kuri yra susijusi su maisto baltymais).

Imuninės sistemos stiprinimas yra ypač aktualus individams, kurių organizmas linkęs į uždegiminių procesų vystymąsi, todėl buvo nuspręsta išsiaiškinti, ar galima imunitetą stiprinančius maisto baltymų hidrolizatus panaudoti uždegiminių procesų profilaktikai. Buvo sprendžiamas klausimas, ar baltymų hidrolizatų vartojimas *per os* užkirstų kelią uždegimo išsivystymui. Darbui pasirinktas kazeino tripsininis hidrolizatas ir, skiriant jį profilaktiškai, įvertintas jo poveikis sukeltam uždegimui. Rezultatai, pateikti 3 pav. ir 11 lentelėje, rodo, jog ūminės edemos profilaktikai skirtas kazeino tripsininis hidrolizatas praktiškai neturi įtakos nei pėdų svorių skirtumui (edemos

inhibicijai), nei limfoidinių organų svoriams, nei hematologiniams rodikliams, t.y. preparatas nepasižymėjo apsauginiu priešuždegiminiu poveikiu. Kontaktinio hiperjautrumo atveju tiriamųjų pelių pėdų svorio skirtumas buvo statistiškai reikšmingai ($P < 0,05$) mažesnis nei kontrolinės grupės (4 pav.), tačiau nepastebėta jokie statistiškai patikimo kazeino tripsininio hidrolizato poveikio pelių limfoidinių organų svoriams (4 pav.) ir kraujo rodikliams (12 lentelė). Abiejų uždegiminių modelių atvejais nustatytos statistiškai reikšmingai padidėjusios citokinų TNF- α (pagrindinio prouždegiminio mediatoriaus), ir IL-10 (priešuždegiminio faktoriaus) koncentracijos (5 ir 6 pav.). TNF- α koncentracija tiriamosios grupės pelių serume buvo 8,6 karto didesnė ūminio uždegimo atveju bei 5,4 karto didesnė kontaktinio hiperjautrumo reakcijos atveju. IL-10 koncentracija buvo 3,6 karto didesnė ūminio uždegimo atveju ir 2,7 karto didesnė kontaktinio hiperjautrumo reakcijos atveju, lyginant su kontroline grupe. Šis uždegimą moduluojančių citokinų koncentracijų padidėjimas neturėtų būti žalingas organizmui, tuo labiau, kad kiti rodikliai, t.y. blužnies ir čiobrialiaukės (pagrindinių imuninės sistemos organų) svoriai liko nepakitę, o pėdos edemos inhibicija kontaktinio hiperjautrumo reakcijos atveju netgi buvo akivaizdi. Žinant, jog TNF- α skatina kitų citokinų, tarp jų ir IL-10 gamybą, o pastarajam būdingas grįžtamasis neigiamas (supresuojantis TNF- α sintezę) ryšys, gali būti, jog šis abiejų mediatorių koncentracijų padidėjimas buvo tiesiog laikinas (būdingas šiam uždegimo etapui). Be to, tokį reiškinį galėjo iššaukti ir fagocituojančių ląstelių, kurias, kaip mes galvojame, suaktyvina mikrobinės lizės produktai, ir tų pačių lizės produktų sąveika (Labro, 2000; Ginsburg, 2002). Neatmetama galimybė, jog kazeino tripsininio hidrolizato dozė ar jo naudojimo laikotarpis buvo pasirinkti netinkamai. Bet koku atveju, norint pritaikyti baltymų hidrolizatus uždegiminių reakcijų profilaktikai, būtini tolimesni išsamūs tyrimai.

Antroji šio darbo dalis yra susijusi su naujų egzogeninių antimikrobinių fermentų panaudojimo imunostimuliacijos tikslais būdų paieška. Somatinių ląstelių kiekis piene yra pripažintas pieno kokybės ir karvių sveikatos būklės įvertinimo rodiklis (Rivas ir kt., 2001; Schukken ir kt., 2003; Green ir kt.,

2004; Robert-Granie ir kt., 2004; de Haas ir kt., 2005; Hillerton ir Berry, 2005). Padidėjęs somatinių ląstelių kiekis - indikatorius, rodantis, kad karvė serga slaptuoju tešmens uždegimu (mastitu). Ši ligos forma neturi jokių klinikinių požymių ir nustatoma tik tiriant somatinių ląstelių skaičių. Pagal ES standartus sveikų karvių piene, skirtam žmonių maistui, jų gali būti iki 300 tūkst./ml, tačiau sergančios karvės piene somatinių ląstelių kiekis gali išaugti iki keletos milijonų/ml (Harmon, 1994; Booth, 2000). Be to 60 % sveikos karvės pieno somatinių ląstelių sudaro epitelinės ląstelės (likusi dalis – leukocitai), tačiau karvei sergant mastitu, 75 % somatinių ląstelių sudaro leukocitai. Mastitu sergančių karvių pienas ir jo produktai kenksmingi žmogaus sveikatai. Pasaulyje vykdomos įvairios mastito kontrolės programos, tarp jų ir genetinė atranka, užtikrinanti atsparumą mastitui. Pagrindinis tokių programų kriterijus – somatinių ląstelių kiekis piene (Shook, 1993; Beaudeau-Ciorbaru, 1994; Hillerton, 1996; Kadarmideen ir Pryce, 2001; Samoré ir kt., 2003; Kadarmideen, 2004; Barnouin ir kt., 2004; Juozaitiene ir kt., 2004). Be to, padidėjęs somatinių ląstelių kiekiui piene, jame sumažėja riebalų, laktozės, kalcio, vitaminų, kazeino kiekiai.

Mažesnis somatinių ląstelių kiekis piene siejamas su mažesniu uždegimu, didesniu priemilžiu, geresne pieno produktų kokybe, mažesne rizika žmonių sveikatai, todėl yra ieškoma vis naujų būdų, pagerinančių šį rodiklį (Dekkers ir kt., 1996). Šios srities mokslininkai atkreipė dėmesį į natūralius organizmo apsauginius mechanizmus (Sordillo ir kt., 1997; Malinowski, 2002). Šiuo atžvilgiu vienas iš perspektyvių natūralių somatinių ląstelių kiekio mažinimo būdų – vitaminų, kuriais papildomos dietos, vartojimas (Oldham ir kt., 1991; Politis ir kt., 1995; Hemingway, 1999).

Išnagrinėjus medžiagą apie somatinių ląstelių kiekio karvių piene mažinimo priemones (mastito priežasčių likvidavimas, organizmo stiprinimas vitaminais bei mikroelementais ir kt.), buvo nuspręsta ištirti, ar problemos sprendimui būtų galima pritaikyti Lietuvoje gaminamus egzogeninių antimikrobinių fermentų preparatus - lizosubtiliną ir lizocimą.

Lizosubtilinas – baltyminis bakterijų *Bacillus subtilis* SK-52 arba *B. subtilis* 402 gyvybinės veiklos produktas. Lizosubtilino, gauto iš *B. subtilis* 402, sudėtyje yra dvi lizuojančios endopeptidazės ir N-acetilmuramil-L-alaninamidazė. Lizosubtilino, gauto iš *B. subtilis* SK-52, kompleksą sudaro dvi lizuojančios endopeptidazės. Šiame darbe buvo panaudotas lizosubtilinas G10x, išskirtas iš *B. subtilis* SK-52.

Lizocimas – fermentas, plačiai paplitęs įvairiose gyvybės formose. Tai vienas geriausiai išnagrinėtų ir praktikoje naudojamų fermentų (Werner ir kt., 1996; Sava, 1996; Malinowski, 2001; Proctor ir Cunningham, 1988; Fuglsang ir kt., 1995). Darbe buvo panaudotas bakterinis lizocimas G3x, išgautas iš *B. subtilis* G-28. Lizocimas G3x veterinarijos praktikoje sėkmingai naudojamas jau daugiau kaip 15 metų.

Abiejų preparatų antimikrobinis poveikis yra plačiai išnagrinėtas (Мицкуте, 1984; Абрамов ir Шебченка, 1991; Biziulevichius ir Arestov, 1997; Biziulevičius ir Žukaitė, 2002) bei pritaikytas praktikoje mikroorganizmų sukeltų infekcijų gydymui (Valstybinės Veterinarijos Tarnybos instrukcija, 1993, 1993a). Šie preparatai pasižymėjo teigiamu profilaktiniu poveikiu. Profilaktiškai skiriami preparatai teigiamai veikė ir virškinamąjį traktą bei bendrą organizmo vystymąsi (Абрамов ir Шебченка, 1991; Biziulevichius ir kt., 1997). Be to, nustatyta, kad lizosubtilinas, skiriamas *per os*, padidina γ globulinų kiekį kraujyje ir jo baktericidinį aktyvumą (Biziulevichius ir kt., 1997). Šie rodikliai yra tiesiogiai susiję su atsparumo ligoms padidėjimu, t.y. imuninės sistemos sustiprėjimu, kas sietina su antimikrobinių preparatų veikimo pasekoje atsipalaidavusių imunologiškai aktyvių produktų veikla. Taigi gyvūno organizmo rezistentiškumo aplinkos faktoriams padidinimui minėtus preparatus tikrai verta naudoti. Be to, šie preparatai atitinka tokioms medžiagoms keliamus reikalavimus, t.y. jie nekenksmingi gyvūnams ir aplinkai, juos lengva dozuoti ir taikyti, greitas jų metabolizmas ir pašalinimas, jie nesikaupia organizme.

Šios darbo dalies rezultatai rodo, jog pašarų papildais naudojant imuninę sistemą stimuliuojančiomis savybėmis pasižyminčius antimikrobinių

fermentų preparatus, galima efektyviai sumažinti somatinių ląstelių kiekį karvių piene (7 ir 8 pav.). Nors geriausią (ir statistiškai patikimą) poveikį parodė didžiausios lizosubtilino ir lizocimo preparatų dozės (20 mg/kg svorio ir 200 mg/kg svorio, atitinkamai), tačiau somatinių ląstelių kiekį iki leistinos normos sumažino tik lizocimas (8 pav.). Jis šį kiekį sumažino vidutiniškai 50,4 % ir neturėjo praktiškai jokios įtakos baltymų, riebalų bei laktozės kiekiams piene (10 pav.). Išvardintų pieno komponentų kiekiui reikšmės neturėjo ir lizosubtilinas (9 pav.). Kadangi eksperimentai su lizocimu ir lizosubtilinu buvo atlikti pakankamai skirtingomis sąlygomis (tyrimas su lizosubtilinu buvo atliktas ankstyvą pavasarį, o su lizocimu – rudenį), todėl rezultatai sunkiai palyginami. Dėl pastarosios priežasties buvo atliktas palyginamasis bandymas. Be to, faktas, kad *in vitro* lizocimo ir lizosubtilino mišinys pasižymi stipresnėmis lizuojančiomis savybėmis, nei kiekvienas atskirai (Kuznetsova ir kt., 1985), paskatino ištirti, kaip abiejų fermentinių preparatų mišinys veikia *in vivo*.

Šiame palyginamajame bandyme visi gyvūnai buvo laikomi vienodomis sąlygomis ir tuo pačiu metu gaudavo fermentinius preparatus ar jų mišinius. Dešimtą dieną karvių, kurioms buvo skiriamas lizosubtilinas arba lizocimas, piene buvo pastebėtas somatinių ląstelių skaičiaus sumažėjimas vidutiniškai 40,6 % ir 58,5 %, atitinkamai. Šie rezultatai artimi pirmųjų bandymų metu gautiems rezultatams. Iš gautų rezultatų aišku, jog lizuojančios glikozidazės, t.y. lizocimas, veikia efektyviau nei lizuojančios endopeptidazės (lizosubtilinas). Penkioliktą bandymo dieną gauti atskirai naudojamų lizosubtilino ir lizocimo rezultatai patvirtino pastaruosius spėjimus. Tuo tarpu rezultatų, gautų naudojant lizosubtilino ir lizocimo mišinį, nebuvo tikėtasi. Ketvirtą bandymo dieną buvo pastebimas žymus somatinių ląstelių kiekio padidėjimas, septintą ir dešimtą dienomis – minėtų ląstelių skaičius piene sumažėjo, tačiau statistiškai reikšmingas somatinių ląstelių sumažėjimas piene buvo pastebėtas tik penkioliktą eksperimento dieną. Geriausi rezultatai gauti naudojant lizocimo ir vitaminų A, C ir E mišinį. Jau ketvirtą eksperimento dieną, naudojant lizocimo ir vitaminų kombinaciją, somatinių ląstelių kiekio

sumažėjimas piene buvo statistiškai reikšmingas ($P < 0,001$). Dešimtą dieną po pastarosios kombinacijos skyrimo pradžios somatinių ląstelių kiekis sumažėjo 64,3 %. Tuo tarpu kitų preparatų sąlygotas somatinių ląstelių skaičiaus padidėjimas piene ketvirtą bandymo dieną nevisiškai aiškus. Gali būti, kad šį rezultatą sąlygojo mikrobinės lizės produktai, veikiantys kaip imunostimuliatoriai ar imunosupresoriai (Ginsburg, 2002). Dar sunkiau paaiškinamas somatinių ląstelių skaičiaus padidėjimas penkioliktą bandymo dieną kontrolinės karvių grupės piene. Bet kokiu atveju šio bandymo rezultatai labiau patvirtina galimybę pritaikyti lizuojančius fermentus somatinių ląstelių kiekio sumažinimui piene, nei tokią galimybę atmeta. Lizocimas ir lizosubtilinas nėra vieninteliai dėmesio verti fermentiniai preparatai. Rinkoje yra daug lizuojančių fermentinių preparatų. Kai kurie jų - lizoamidazė, lizostafinas, mutanolizinas - jau yra naudojami veterinarijoje karvių uždegiminių ligų gydymui (Blackburn ir Pollack, 1990; Oldham ir kt., 1991; Daley ir Odham, 1992; Demidova ir kt., 1998).

Šio darbo rezultatai rodo, jog mikrobinės ląstelės sienelę lizuojantys fermentai (tiek egzogeniniai, tiek autolizuojantys, indukuojami maisto baltymų hidrolizatu) pasižymi ne tik antimikrobiniumi, bet ir netiesioginiu imuninę sistemą stimuliuojančiu poveikiu. Darbų su maisto baltymų hidrolizatais rezultatai patvirtino hipotezę (Biziulevičius, 2004), teigiančią, jog maisto peptidai aktyvuoja žarnyno mikrofloros autolizę *in situ*, o atsipalaidavę mikrobinių ląstelių sienelės komponentai veikia imuninę sistemą. Nors tirtų maisto baltymų hidrolizatai nepasižymėjo apsauginiu prieš uždegiminiu efektu, tačiau egzogeninių fermentų preparatų somatinių ląstelių kiekį piene mažinantis ir tuo pačiu uždegimą slopinantis poveikis – akivaizdus. Vis dėlto galima teigti, kad tiek maisto baltymų hidrolizatai, tiek egzogeniniai lizuojantys fermentai yra efektyvios antimikrobinės priemonės, pasižyminčios ir imunostimuliuojančiu poveikiu.

6. IŠVADOS

1. Kazeino, α -laktalbumino, β -laktoglobulino, ovalbumino ir serumo albumino hidrolizatai, gauti panaudojus virškinimo fermentus tripsiną, chimotripsiną, pankreatiną ir pepsiną, stimuliuo visų natūraliai besiautolizuojančių mikroorganizmų autolizę. Jų antimikrobinio aktyvumo rodiklis K_A buvo nuo 1,04 iki 22,0.
2. Minėti maisto baltymų fermentiniai hidrolizatai skatino natūraliai nesiautolizuojančių mikroorganizmų autolizinę sistemą. Iššauktos autolizės intensyvumas I_b svyravo nuo 2,81 % iki 56,7 %.
3. Minėti maisto baltymų fermentiniai hidrolizatai skatino fagocituojančių ląstelių fagocitinį aktyvumą. Pilvaplėvės makrofagų fagocitinis aktyvumas buvo skatinamas nuo 1,16 iki 1,39 karto. Kraujo monocitų bei granulocitų fagocitinis aktyvumas buvo skatinamas nuo 1,10 iki 1,34 karto.
4. Tarp maisto baltymų fermentinių hidrolizatų antimikrobinio ir imunostimuliuojančio (fagocituojančių ląstelių fagocitinį aktyvumą skatinančio) poveikių buvo nustatyta tiesioginė priklausomybė ($r_{xy} > 0,9$). Kuo labiau maisto baltymų hidrolizatas skatino mikroorganizmų autolizę, tuo stipresnis buvo jo poveikis imuninei sistemai.
5. Kazeino tirpsininis hidrolizatas nepasižymėjo apsauginiu priešūždegiminiu poveikiu, tačiau kontaktinio hiperjautrumo reakcijos atveju 41,7 % slopino pelės pėdos edemą. TNF- α kiekis šiuo atveju buvo 5,4 karto, o IL-10 – 2,7 karto didesnis lyginant su kontroline grupe.
6. Efektyviausiai somatinių ląstelių kiekį karvių piene sumažino lizocimo ir vitaminų A, C bei E mišinys. Dešimtą dieną nuo šio mišinio skyrimo pradžios somatinių ląstelių kiekis piene sumažėjo 64,3 %.

7. DISERTACIJOS TEMA PASKELBTŲ PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

1. Biziulevičius, G.A., Kazlauskaitė, J., Lukauskas, K., Ramanauskienė, J., Sederevičius, A. (2003) An enzymatic cow immunity-targeted approach to reducing milk somatic cell count: 1. A preliminary study using lysosubtilin. *Food and Agricultural Immunology*, 15, 289-292.
2. Sederevičius, A., Ramanauskienė, J., Lukauskas, K., Kazlauskaitė, J., Biziulevičius, G.A. (2005) An enzymatic cow immunity-targeted approach to reducing milk somatic cell count: 2. A study using lysozyme. *Food and Agricultural Immunology*, 16, 193-198.
3. Kazlauskaitė, J., Biziulevičius, G.A., Žukaitė V., Biziulevičienė G., Miliukienė V., Šiaurys A. (2005) Oral tryptic casein hydrolysate enhances phagocytosis by mouse peritoneal and blood phagocytic cells but fails to prevent induced inflammation. *International Immunopharmacology*, 5, 1936-1944.
4. Biziulevičius, G.A., Kislukhina O.V., Kazlauskaitė, J., Žukaitė V. (2006) Food-protein enzymatic hydrolysates possess both antimicrobial and immunostimulatory activities: 'a cause and effect' theory of bifunctionality. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 46, 131-138.
5. Sederevičius, A., Balsytė J., Lukauskas, K., Kazlauskaitė, J., Biziulevičius, G.A. (2006) An enzymatic cow immunity-targeted approach to reducing milk somatic cell count: 3. A comparative field trial. *Food and Agricultural Immunology*, 17, 1-7.
6. Biziulevičius, G.A., Biziulevičienė G., Kazlauskaitė J. (2007) Lysozyme and similar lytic enzyme preparations should be considered antibiotics. *Medical Hypotheses*, 68, 1420-1420.
7. Biziulevičius, G.A., Kazlauskaitė, J. (2007) Following Hippocrates' advice 'Let food be thy medicine and medicine be thy food': An alternative method for evaluation of the immunostimulatory potential of food proteins. *Medical Hypotheses*, 68, 712-713.

8. Biziulevičius, G.A., Kazlauskaitė, J. (2007) Pushing 'bad bugs' into committing suicide: Activation of microbial autolysis within the gut using food-grade substances as a prospective method for treatment of intestinal infections and/or immunity enhancement. *Medical Hypotheses*, 69, 1161-1162.
9. Biziulevičius, G.A., Biziulevičienė G., Kazlauskaitė J. (2008) A list of enzyme preparations covered by the term enzybiotics should not be restricted to bacteriophage-encoded peptidoglycan hydrolases (lysins). *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 60, 531-532.
10. Biziulevičius, G.A., Kazlauskaitė, J. (2008) Cheese: Everyday, gourmet or medicinal food? *Medical Hypotheses*, 70, 454-455.
11. Biziulevičius, G.A., Biziulevičienė G., Kazlauskaitė J. (2008) Human body as an operable reactor ('walking fermentator') for self-purposed production of immunostimulatory microbial lysis products. *Medical Hypotheses*, 71, 600-623.
12. Biziulevičius, G.A., Kazlauskaitė, J. (2008) Prospects for *in situ* within a host enzymatic production of immunostimulatory microbial lysis products. *Central European Journal of Immunology*, 33, 159.

8. LITERATŪROS SĄRAŠAS

- Абрамов С.С., Шебченка И.С. (1991) Ферментные препараты при профилактике и комплексной терапии диареи телят. Ветеринария 9, 49-51.
- Adomaitienė D., Janulevičiūtė N., Kazakevičius R., Vaičiuvėnas V. (2001) *Klinikinės imunologijos įvadas*. Kaunas. Šviesa.
- Aimutis W.R. (2004) Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticariogenesis. *J. Nutr.* 134, 989S-995S.
- Alexander C., Rietschel E.T. (2001) Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J. Endotoxin Res.* 3, 168-201.
- Andreu D., Rivas L. (1998) Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers* 47, 415-433.
- Aoyama T., Fukui K., Akamori T., Hashimoto Y., Yamamoto T., Takamatsu K., Sugano M. (2000) Effect of soy and milk whey protein isolates and their hydrolysates on weight reduction in genetically obese mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64, 2594-2600.
- Ashwell M. (2002) Concepts of functional foods. ILSI Europe Concise Monograph Series, Brussels: ILSI Europe.
- Bahr G.M. (2003) Non-specific immunotherapy of HIV-1 infection: potential use of the synthetic immunomodulator murabutide. *J. Antimicrob. Chemother.* 51, 5-8.
- Barnouin J., Chassagne M., Bazin S., Boichard D. (2004) Management practises from questionnaire surveys in herds with very low somatic cell score through a national mastitis program in France. *J. Dairy Sci.* 87, 3989-3999.
- Beaudeau-Ciorbaru R. (1994) Immunomodulation by bacterial fractions. *Int. J. Immunopharmacol.* 16, 469-473.
- Bechinger B. (2004) Structure and function of membrane-lytic peptides. *Crit. Rev. Plant Sci.* 23, 1-22.
- Bernhardt H., Knoke M. (1997) Mycological aspects of gastrointestinal microflora. *Scand. J. Gastroenterol.* 222, 102-106.

- Berthou J., Migliore-Samour D., Lifchitz A., Delettré J., Floc'h F., Jollès P. (1987) Immunostimulating properties and three-dimensional structure of two tripeptides from human and cow caseins. *FEBS Lett.* 218, 55-58.
- Biziulevičius G.A., Arestov I.G. (1997) In vivo studies on lysosubtilin. 1. Efficacy for prophylaxis and treatment of gastrointestinal disorders in newborn calves. *Vet. Res.* 28, 19-35.
- Biziulevičius G.A., Kislukhina O.V., Žukaitė V., Normantienė T., Arestov I.G. (2002) Stimulation of microbial autolytic system by tryptic casein hydrolysate. *Int. J. Antimicrob. Agents* 20, 361-365.
- Biziulevičius G.A., Žukaitė V. (2002) Comparative antimicrobial activity of lysosubtilin and its acid-resistant derivative, Ferosorb. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 20, 65-68.
- Biziulevičius G.A., Žukaitė V., Normantienė T., Biziulevičienė G., Arestov I.G. (2003) Non-specific immunity-enhancing effects of tryptic casein hydrolysate versus Ferosorb for treatment/prophylaxis of newborn calf colibacillosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 39, 155-161.
- Biziulevičius G.A. (2004) How food-borne peptides may give rise to their immunostimulatory activities: a look through the microbiologist's window into the immunologist's garden (hypothesis). *Br. J. Nutr.* 92, 1009-1012.
- Blackburn P., Pollack J. (1990) Method of treating mastitis and other staphylococcal infections. European Patent 359873.
- Bocci V. (1992) The neglected organ: bacterial flora has a crucial immunostimulatory role. *Perspect. Biol. Med.* 35, 251-260.
- Booth J. M. (2000). Are there any real benefits in reducing cell counts? *Cattle Pract.* 8, 223-226.
- Bosselaers I.E.M., Caessens P.W.J.R., Boekel M.A.J.S., Van Alink G.M. (1994) Differential effects of milk proteins, BSA and soy protein on 4NQO- or MNNG-induced SCEs in V79 cells. *Food Chem. Toxicol.* 32, 905-909.
- Bowman S.M., Free S. J. (2006) The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays.* 28, 799-808.

- Brown G.D., Gordon S. (2003) Fungal β -glucans and mammalian immunity. *Immunity*. 19, 311-315.
- Bulet P., Stöcklin R., Menin L. (2004) Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol. Rev.* 198, 169-184.
- Chabance B., Marteau P., Rambaud J.C., Migliore-Samour D., Boynard M., Perrotin P., Guillet R., Jollès P., Fiat A.M. (1998) Casein peptide release and passage to the blood in humans during digestion of milk or yogurt. *Biochimie* 80, 155-165.
- Chandra R.K. (1996) Nutrition, immunity and infection: from basic knowledge of dietary manipulation of immune responses to practical application of ameliorating suffering and improving survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 14304-14307.
- Clare D.A., Catignani G.L., Swaisgood H.E. (2003) Biodefence properties of milk: the role of antimicrobial proteins and peptides. *Curr. Pharmaceut. Design* 9, 1239-1255.
- Cross M.L., Gill H.S. (1999) Modulation of immune function by a modified bovine whey protein. *Immunol. Cell Biol.* 77, 345-50.
- Cudic M., Otvos L. (2002) Intracellular targets of antibacterial peptides. *Curr. Drug Targets* 3, 101-106.
- Daley M.J., Odham E.R., (1992) Lysostaphin: immunogenicity of locally administered recombinant protein use in mastitis therapy. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 31, 301-312.
- de Haas Y., Barkema H.W., Schukken Y.H., Veerkamp R.F. (2005) Association between somatic cell count patterns and the incidence of clinical mastitis. *Prev. Vet. Med.* 67, 55-68.
- Dekkers J.C.M., Van Erp T., Schukken Y.H. (1996) Economic benefits of reducing somatic cell count under the milk quality program in Ontario. *J. Dairy Sci.* 79, 396-401.
- Demidova L.D., Yurkov V.M., Yezhov V.A., Kozlovskii A.G., Kulaev I.S. (1998) Lysomast, the new remedy to cure mastitis-affected cows. *Veterinariya (Moscow)* 6, 42-44.

- Devine D.A., Hancock R.E.W. (2002) Cationic peptides: distribution and mechanisms of resistance. *Curr. Pharmaceut. Design* 8, 703-714.
- Duarte J., Vinderola G., Ritz B., Perdígón G., Matar C. (2006) Immunomodulating capacity of commercial fish protein hydrolysate for diet supplementation. *Immunobiology*. 211, 341-350.
- Dutta R.C. (2002) Peptide immunomodulators versus infection; an analysis. *Immunol. Lett.* 83, 153-161.
- Dziarski R., Tapping R.I., Tobias P.S. (1998) Binding of bacterial peptidoglycan to CD14. *J. Biol. Chem.* 15, 8680-8690.
- El-Zahar K., Sitohy M., Choiset Y., Metro F., Haertle T., Chobert J.-M. (2004) Antimicrobial activity of ovine whey protein and their peptic hydrolysates. *Milchwissenschaft*. 59, 653-656.
- Floris R., Recio I., Berkhout B., Visser S. (2003) Antibacterial and antiviral effects of milk proteins and derivatives thereof. *Curr. Pharmaceut. Design* 9, 1257-1275.
- Fuglsang C.C., Johansen C., Christgau S., Adler-Nissen J. (1995) Antimicrobial enzymes: applications and future potential in the food industry. *Trends Food Sci. Technol.* 6, 390-396.
- Gattegno L., Migliore-Samour D., Saffar L., Jollès P. (1988) Enhancement of phagocytic activity of human monocyte-macrophage cells by immunostimulating peptides from human casein. *Immunol. Lett.* 18, 27-31.
- Gauthier S.F., Pouliot Y., Saint-Sauveur D. (2006) Immunomodulatory peptides obtained by the enzymatic hydrolysis of whey proteins. *Int. Dairy J.* 16, 1315-1323.
- Ghuysen J.M., Tipper D.J., Strominger J.L. (1966) Enzymes that degrade bacterial cell walls. *Methods Enzymol.* 8, 685-699.
- Ginsburg I., Lahav M., Ne'eman N., Duchan Z., Chanes S., Sela M.N. (1976) The interaction of leukocytes and their hydrolases with bacteria in vitro and in vivo: the modification of the bactericidal and bacteriolytic reactions by cationic and anionic macromolecular substances and by anti-inflammatory agents. *Agents Actions* 6, 292-305.

- Ginsburg I. (2001) Cationic peptides from leukocytes might kill bacteria by activating their autolytic enzymes causing bacteriolysis: why are publications proposing this concept never acknowledged? (letter). *Blood* 97, 2530-2531.
- Ginsburg I. (2002) The role of bacteriolysis in the pathophysiology of inflammation, infection and post-infectious sequelae. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 110, 753-770.
- Ginsburg I (2004) Bactericidal cationic peptides can also function as bacteriolysis-inducing agents mimicking beta-lactam antibiotics; it is enigmatic why this concept is consistently disregarded. *Med. Hypotheses* 62, 367-374.
- Ginsburg I., Koren E. (2008) Are cationic antimicrobial peptides also ,double-edged swords‘? *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 6, 453-462.
- Goldman A.C., Branstorm A. (1999) Targeting cell wall synthesis and assembly in microbes: similarities and contrasts between bacteria and fungi. *Curr. Pharmaceut. Design* 5, 473-501.
- Goodridge H.S., Wolf A.J., Underhill D.M. (2009) Beta-glucan recognition by the innate immune system. *Immunol. Rev.* 230, 38-50.
- Gordon S. (2007) The macrophage: past, present and future. *Eur. J. Immunol.* 37, S9–S17.
- Green M.J., Greem L.E., Schukken Y.H., Bradley A.J., Peeler E.J., Barkema H.W., de Haas Y., Collis V.J., Medley G.F. (2004). Somatic cell counts distribution during lactation predicts clinical mastitis. *J. Dairy Sci.* 87, 1256-1264.
- Guesdon B., Messaoudi M., Lefranc-Millot C., Fromentin G., Tome D., Even P.C. (2006) A tryptic hydrolysate from bovine milk alpaS1-casein improves sleep in rats subjected to chronic mild stress. *Peptides* 27, 1476-1482.
- Hancock R.E.W., Sahl H.G. (2006) Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat. Biotechnol.* 24, 1551-1557.
- Harmon R. J. (1994) Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *J. Dairy Sci.* 77, 2103-2122.

- Hatori M., Ohki K., Hirano S., Yang X. P., Kuboki H., Abe C. (2008) Effects of a casein hydrolysate prepared from *Aspergillus oryzae* protease on adjuvant arthritis in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72, 1983-1991.
- Hayes M., Stanton C., Fitzgerald G. F., Ross R.P. (2007) Putting microbes to work: dairy fermentation, cell factories and bioactive peptides. Part II: Bioactive peptide functions. *Biotechnol. J.* 2, 435–449.
- Heinzelmann M., Mercer-Jones M.A., Gardner S.A., Wilson M.A, Polk H.C., Jr. (1997) bacterial cell wall products increase monocyte HLA-DR and ICAM-1 without affecting lymphocyte CD18 expression. *Cellul. Immunol.* 176, 127-134.
- Heinzelmann M., Polk H.C., Jr., Chernobelsky A., Stites T.P., Gordon L.E. (2000) Endotoxin and muramyl dipeptide modulate surface receptor expression on human mononuclear cells. *Immunopharmacology* 48, 117-128.
- Hemingway R.G. (1999) The influences of dietary selenium and vitamin E intakes on milk somatic cell counts and mastitis in cows. *Vet. Res. Commun.* 23, 481-489.
- Hillerton J.E. (1996) Control of mastitis. In: Philips C.J.C., editor. *Progress in dairy science*. Wallingford: CAB International. p. 171-190.
- Hillerton J.E., Berry E.A. (2005) Treating mastitis in the cow – a traditional or an archaism. *J. Appl. Microbiol.* 98, 1250-1255.
- Hirota T., Ohki K., Kawagishi R., Kajimoto Y., Mizuno S., Nakamura Y., Kitakaze M. (2007) Casein hydrolysate containing the antihypertensive tripeptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro improves endothelial functions independent of blood pressure-lowering effects: contribution of the inhibitory action of angiotensin-converting enzyme. *Hypertens. Res.* 30, 489-496.
- Höltje J.-V. (1996) Lytic transglycosylases. In: Jollès P.(ed.) *Lysozymes: Model Enzymes in Biochemistry and Biology*. Basel: Birkhäuser Verlag; p.p. 425-429.

- Hooper L.V., Midtvedt T., Gordon J.I. (2002) How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu. Rev. Nutr.* 22, 283-307.
- Horiguchi N., Horiguchi H., Suzuki Y. (2005) Effect of wheat gluten hydrolysate on the immune system in healthy human subjects. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69, 2445-2449.
- Huerre M.R., Gounon P. (1996) Inflammation: patterns and new concepts. *Res. Immunol.* 147, 417-734.
- Ishibashi K., Miura N.N., Adachi Y., Ogura N., Tamura H., Tanaka S., Ohno N. (2002) Relationship between the physical properties of *Candida albicans* cell wall β -glucan and activation of leukocytes in vitro. *Int. Immunopharmacol.* 2, 1109-1122.
- Jain N.K., Patil C.S., Singh A., Kulkarni S.K. (2001) A simple technique to evaluate inflammatory pain along with anti-inflammatory studies in carragenan induced paw edema. *Indian J. Pharmacol.* 33, 114-115.
- Jenssen H. (2005) Anti herpes simplex virus activity of lactoferrin/lactoferricin – an example of antiviral activity of antimicrobial protein/peptide. *Cell.Mol. Life Sci.* 62, 3002-3013.
- Jenssen H., Hamill P., Hancock R.E. (2006) Peptide antimicrobial agents. *Clin. Microbio. Rev.* 19, 491-511.
- Jollès P. (1976) A possible physiological function of lysozyme. *Biomedicine* 25, 275-276.
- Jollès P., Migliore-Samour D. (1981) Nouvelles substances biologiquement actives, leur obtention à partir de caséine humaine et compositions les contenant. *Brevet Français* 2 513 881.
- Jollès P., Parker F., Floc'h F., Migliore-Samour D., Alliel P., Zerial A., Werner G.H. (1982) Immunostimulating substances from human casein. *J. Immunopharmacol.* 3, 363-369.
- Juozaityene V., Zakas A., Juozaitis A. (2004) Relationship of somatic cell count with milk yield and composition in the herds of Black-and White cattle. *Medycyna Wet.* 60, 701-704.

- Kadarmideen H.N., Pryce J.E. (2001) Genetic and economic relationship between somatic cell count and clinical mastitis and their use in selection for mastitis resistance in dairy cattle. *Anim. Sci.* 73, 19-28.
- Kadarmideen H.N. (2004) Genetic correlations among body condition score, somatic cell score, milk production, fertility and conformation traits in dairy cows. *Anim. Sci.* 79, 191-201.
- Kawai K., Nagahata H., Lee N.Y., Anri A., Shimazaki K. (2003) Effect of infusing lactoferrin hydrolysate into bovine mammary glands in subclinical mastitis. *Vet. Res. Commun.* 27, 539-548.
- Kawai K., Shimazaki K., Higuchi H., Nagahata H. (2007) Antibacterial activity of bovine lactoferrin hydrolysate against mastitis pathogens and its effect on superoxide production of bovine neutrophils. *Zoonoses Public Health.* 54, 160-164.
- Khatib R., Riederer K.M., Ramanathan J., Baran J., Jr. (2001) Faecal fungal flora in healthy volunteers and inpatients. *Mycoses* 44, 151-156.
- Kim J.H., Desor D., Kim Y.T., Yoon W.J., Kim K.S., Jun J.S., Pyun K.H., Shim I. (2007) Efficacy of α -s1-casein hydrolysate on stress-related symptoms in women. *Eur. J. Clin. Nutr.* 61, 536–541.
- Kindt T.J., Goldsby R.A., Osborne B.A. (2007) *Kuby Immunology* (sixth edition). New York. W.H. Freeman and Company.
- Кислухина О.В., Кузнецова Т.А., Калунянц К.А., Бандоян А.К. (1981) Способ получения активатора автолиза микроорганизмов. Изобретение СССР 969715.
- Кислухина О.В., Калунянц К.А., Аленова Д.Ж. (1990) Ферментативный лизис микроорганизмов. Алма-Ата: Рауан.
- Кислухина О.В. (2002) Ферменты в производстве пищи и кормов. Москва: Делипринт; с.с. 102-150.
- Kitazawa H., Yonezawa K., Tohno M., Shimosato T., Kawai Y., Saito T., Wang J.M. (2007) Enzymatic digestion of the milk protein β -casein release potent chemotactic peptide (s) for monocytes and macrophages. *Int. Immunopharmacol.* 7, 1150-1159.

- Kleine M.W. (1997) Introduction to oral enzyme therapy. *Int. J. Immunother.* 13, 59-65.
- Koch A.L. (2003) Bacterial wall as target for attack: past, present and future research. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 673-687.
- Korhonen H., Pihlanto A. (2003) Food-derived bioactive peptide – opportunities for designing future foods. *Curr. Pharmaceut. Design* 9, 1297-1308.
- Kraehenbuhl P., Corbett M. (2004) Immunology. Keeping the gut microflora at bay. *Science.* 224, 1624-1625.
- Kricek F., Zunic M., Ruf C., De Jong G., Dukor P., Bahr G.M. (1997) Suppression of in vivo IgE and tissue IL-4 mRNA induction by SDZ 280.636, a synthetic muramyl dipeptide derivative. *Immunopharmacology* 36, 27-39.
- Kruse T., Kristensen H.H. (2008) Using antimicrobial host defense peptides as anti-infective and immunomodulatory agents. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 6, 887-895.
- Kuznetsova T.A., Kislukhina O.V., Avizhienis V.J. (1985) Lysis of microorganisms by enzyme preparations. *Fermentnaya i Spirtovaya Promyshlennostj (Moscow)* 6, 38-39.
- Labro M.-T. (2000) Interference of antibacterial agents with phagocyte functions: immunomodulation or “immuno-fairy tales”? *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 615-650.
- Lahav M., Ne’eman N., James J., Ginsburg I. (1975) The effect of leukocyte hydrolases on bacteria, III: bacteriolysis induced by extracts of different leukocyte populations and the inhibition of lysis by macromolecular substances. *J. Infect. Dis.* 131, 149-157.
- LeBlanc J.G., Matar J., Valdéz J.C., LeBlanc J., Perdigon G. (2002) Immunomodulating effects of peptidic fractions issued from milk fermented with *Lactobacillus helveticus*. *J. Dairy Sci.* 85, 2733-2742.
- LeBlanc J., Fliss I., Matar C. (2004) Induction of a humoral immune response following an *Escherichia coli* O157:H7 infection with an

- immunomodulatory peptidic fraction derived from *Lactobacillus helveticus* - fermented milk. Clin. Diag. Lab. Immunol. 11, 1171-1181.
- Lee J.N., Lee D.Y., Ji I.H., Kim G.E., Kim H.N., Sohn J., Kim S. (2001) Purification of soluble β -glucan with immune-enhancing activity from the cell wall of yeast. Biosci. Biotechnol. Biochem. 65, 837-841.
- Lee D.Y., Ji I.H., Hang H.I., Kim C.W. (2002) High-level TNF- α secretion and macrophage activity with soluble β -glucans from *Saccharomyces cerevisiae*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 66, 233-238.
- Lehmann A.K., Sornes S., Halstensen A. (2000) Phagocytosis: measurement by flow cytometry. J. Immunol. Methods 243, 229-242.
- Lehner M.D. (2001) Immunomodulation by endotoxin tolerance in murine models of inflammation and bacterial infection. University of Konstanz, Germany.
- Levy O. (2000) A neutrophil derived anti-infective molecule: bactericidal/permeability-increasing protein. Antimicrob. Agents Chemother. 44, 2925-2931.
- Lipke P.N., Ovalle R. (1998) Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. J. Bacteriol. 180, 3735-3740.
- Lockwood N.A., Mayo K.H. (2003) The future for antibiotics: bacterial membrane disintegrators. Drugs Future 28, 911-923.
- Lohner K. (2009) New strategies for novel antibiotics: peptides targeting bacterial cell membranes. Gen. Physiol. Biophys. 28, 105-116.
- Maehashi K., Matsuzaki M., Yamamoto Y., Udaka S. (1999) Isolation of peptides from an enzymatic hydrolysate of food proteins and characterization of their taste properties. Biosci. Biotechnol. Biochem. 63, 555-559.
- Mai V., Morris J.G., Jr. (2004) Colonic bacterial flora: changing understandings in the molecular age. J. Nutr. 134, 459-464.
- Malinowski E. (2001) Lysozyme dimer in therapy and prophylaxis of animal disease. Princeton-Poznan:Nika Health Products.

- Malinowski E. (2002) The use of some immunomodulators and non-antibiotic drugs in a prophylaxis and treatment of mastitis. *Polish J. Vet. Sci.* 5, 197-202.
- Marshall K. (2004) Therapeutic applications of whey protein. *Altern. Med. Rev.* 9, 136-156.
- Matin M.A., Otani H. (2001) Antimicrobial and cytotoxic peptides released from milk proteins by the action of mammalian gastrointestinal proteinases. *Curr. Res. Adv. Agric. Biol. Chem.* 1, 23-36.
- McPhee J.B., Hancock R.E. (2005) Therapeutic potential of host defence peptides. *J. Pept. Sci.* 11, 677-678.
- Meisel H. (1997) Biochemical properties of bioactive peptides derived from milk proteins: potential nutraceuticals for food and pharmaceutical applications. *Livestock Prod. Sci.* 50, 125-138.
- Meisel H. (1998) Overview on milk protein-derived peptides. *Int. Dairy J.* 8, 363-373.
- Meisel H., Bockelmann W. (1999) Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and thropho-functional properties. *Antonie van Leeuwenhoek Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 76, 207-215.
- Meisel H., FitzGerald R.J. (2003) Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. *Curr. Pharmaceut. Design* 9, 1289-1295.
- Mercier A., Gauthier S.F., Fliss I. (2004) Immunomodulating effects of whey proteins and their enzymatic digests. *Int. Dairy J.* 14, 175-183.
- Meshcheryakova E., Guryanova S., Makarov E., Alekseeva L., Andronova T., Ivanov V. (2001) Prevention of experimental septic shock by pretreatment of mice with muramyl peptides. *Int. Immunopharmacol.* 1, 1857-1865.
- Messaoudi M., Lefranc-Millot C., Desor D., Demagny B., Bourdon L. (2005) Effects of a tryptic hydrolysate from bovine milk alphaS1-casein on hemodynamic responses in healthy human volunteers facing successive mental and physical stress situations. *Eur. J. Nutr.* 44, 128-132.

- Messaoudi M., Lalonde R., Schroeder H., Desor D. (2009) Anxiolytic-like effects and safety profile of a tryptic hydrolysate from bovine alpha s1-casein in rats. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 23, 323-330.
- Мицкуте Г.И. (1984) Биосинтез, получения и свойства лизоцима *Bacillus subtilis* G-28: Автореф. дисс. канд. биол. наук. Минск, 16 с.
- Migliore-Samour D., Jollès P. (1988) Casein, a prohormone with an immunomodulating role for the newborn? *Experientia* 44, 188-193.
- Migliore-Samour D., Floc'h F., Jollès P. (1989) Biologically active casein peptides implicated in immunomodulation. *J. Dairy Res.* 56, 357-362.
- Miliukienė V., Biziulevičienė G., Pilinkienė A. (2003) Quantitative evaluation of macrophage phagocytosing capacity by a fluorometric assay. *Acta Biol. Hung.* 54, 347-355.
- Möller N. P., Scholz-Ahrens K.E., Roos N., Schrezenmeir J.(2008) Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *Eur. J. Nutr.* 47, 171-182.
- Mookherjee N., Hancock R.E. (2007) Cationic host defence peptides: innate immune regulatory peptides as a novel approach for treating infections. *Cell Mol. Life Sci.* 64, 922-933.
- Morris H.J., Carrillo O., Almarales A., Bermúdez R.C., Lebeque Y., Fontaine R., Llauradó G., Beltrán Y. (2007) Immunostimulant activity of an enzymatic protein hydrolysate from green microalga *Chlorella vulgaris* on undernourished mice. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 456-460.
- Mueller A., Raptis J., Rice P.J., Kalbfleisch H., Stout R.D., Ensley H.E., Browder W., Williams D.L. (2000) The influence of glucan polymer structure and solution conformation on binding to (1→3)- β-D-Glucan receptors in a human monocyte-like cell line. *Glycobiology* 10, 339-46.
- Nagai T., Nagashima T., Suzuki N., Inoue R. (2005) Antioxidant activity and angiotensin I-converting enzyme inhibition by enzymatic hydrolysates from bee bread. *Z. Naturforsch.* 60c, 133-138.
- Nakajima K., Tamura N., Kobayashi-hattori K., Yoshida T., Hara-Kudo Y., Ikedo M., Sugita-Konishi Y., Hattori M. (2005) Prevention of intestinal

- infection by glycomacropeptide. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69, 2294-2301.
- Namba Y., Hidaka Y., Taki K., Morimoto T. (1981) Effect of oral administration of lysozyme or digested bacterial cell walls on immunostimulation in guinea pigs. *Infect. Immun.* 31, 580-583.
- Nau R., Eiffert H. (2002) Modulation of release of proinflammatory bacterial compound by antibacterials: potential impact on course of inflammation and outcome in sepsis and meningitis. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 95-110.
- Neeman N., Lahav M., Ginsburg I. (1974) The effect of leukocyte hydrolases on bacteria, II: the synergistic action of lysozyme and extracts of PMNs, macrophages, lymphocytes and platelets in bacteriolysis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 146, 1137-1145.
- Noverr M.C., Huffnagle G.B. (2004) Does the microbiota regulate immune responses outside the gut? *Trend Microbiol.* 12, 562-568.
- Oldham E.R., Ebenhart R.J., Muller L.D. (1991) Effects of supplemental vitamin A or beta-carotene during the dry period and early lactation on udder health. *J. Dairy Sci.* 74, 3775-3781.
- Østlie H.M., Vegarud G., Langsrud T. (1999) Autolytic systems in propionic acid bacteria. *Lait* 79, 105-112.
- Ottaviani E., Franchini A., Prinzenberg E.-M., Erhardt G., Jollès P. (1999) Detection of casein fragments in an invertebrate and in a vertebrate using *in situ* hybridization. *Life Sci.* 65, 1707-1714.
- Otvos L.Jr. (2005) Antibacterial peptides and proteins with multiple cellular targets. *J. Pept. Sci.* 11, 697-706.
- Pan Y., Lee A., Wan J., Coventry M.J., Michalski W.P., Shiell B., Roginski H. (2006) Antiviral properties of milk proteins and peptides. *Int. Dairy J.* 16, 1252-1261.
- Parker F., Migliore-Samour D., Floc'h F., Zerial A., Werner G.H., Jollès J., Casaretto M., Zahn H., Jollès P. (1984) Immunostimulating hexapeptide from human casein. Amino acid sequence, synthesis and biological properties. *Eur. J. Biochem.* 145, 677-682.

- Parodi P.W. (2007) A role for milk proteins and their peptides in cancer prevention. *Curr. Pharm. Des.* 13, 813-828.
- Paulsen S.M. (2000) Expression of lysozyme in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) – in vivo studies. University of Tromso, Norway.
- Pellegrini A. (2003) Antimicrobial peptides from food proteins. *Curr. Pharmaceut. Design* 9, 1225-1238.
- Pieters R.J., Arnusch C.J., Breukink E. (2009) Membrane permeabilization by multivalent anti-microbial peptides. *Protein Pept. Lett.* 16, 736-742.
- Pihlanto-Lepälä A., Marnila P., Hubert L., Rokka T., Korhonen H.J., Karp M. (1999) The effect of alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin hydrolysates on the metabolic activity of *Escherichia coli* JM103. *J. Appl. Microbiol.* 87, 540-545.
- Politis I., Hidioglou M., Batra T.R., Gilmore J.A., Gorewit R.C., Scherf H. (1995) Effects of vitamin E on immune function of dairy cows. *Am. J. Vet. Res.* 56, 179-184.
- Proctor V.A., Cunningham F.E. (1988). The chemistry of lysozyme and its use as a food preservative and a pharmaceutical. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 26, 359-395.
- Rastall R.A. (2004) Bacteria in the gut: friends or foes and how to alter the balance. *J. Nutr.* 134, 2022S-2026S.
- Ringseis R., Matthes B., Lehmann V., Becker K., Schöps R., Ulbrich-Hofmann R., Eder K. (2005) Peptides and hydrolysates from casein and soy protein modulate the release of vasoactive substances from human aortic endothelial cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1721(1-3), 89-97.
- Rivas A.L., Quimby F.M., Blue J., Coksaygan O. (2001) Longitudinal evaluation of bovine mammary gland health status by somatic cell counting, flow cytometry, and cytology. *J. Vet. Diagn. Invest.* 13, 399-407.
- Rizza M.D., Dellavalle P.D., Narancio R., Cabrera A., Ferreira F. (2008) Biomolecules as host defense weapons against microbial pathogens. *Recent Pat. DNA Gene Seq.* 2, 82-96.

- Robert-Granie C., Foulley J-L., Maza E., Rupp R. (2004) Statistical analysis of somatic cell scores via mixed model methodology for longitudinal data. *Animal. Res.* 53, 259-273.
- Rodríguez A., Cuesta A., Ortuño J., Esteban M.A., Meseguer J. (2003) Immunostimulant properties of a cell wall-modified whole *Saccharomyces cerevisiae* strain administered by diet to seabream (*Sparus aurata* L.) *Vet. Immunol. Immunopathol.* 96, 183-192.
- Rondanelli M., Opizzi A., Monteferrario F. (2009) The biological activity of beta-glucans. *Minerva Med.* 100, 237-245.
- Ross G.D., Větvička V., Yan J., Xia Y., Větvičková J. (1999) Therapeutic intervention with complement and β -glucan in cancer. *Immunopharmacology* 42, 61-74.
- Rutherford-Markwick K.J., Gill H.S. (2005). Immunomodulating activity of protein concentrates derived from bovine milk whey in mice. *Nutr. Res.* 25, 157-166.
- Rutherford-Markwick K.J., Johnson D., Crossa M., Gill H.S. (2005) Modified milk powder supplemented with immunostimulating whey powder concentrate (IMUCARE) enhances immune function in mice. *Nutr. Res.* 25, 197-208.
- Salazar O., Asenjo J. A. (2007) Enzymatic lysis of microbial cells. *Biotechnol. Lett.* 29, 985-994.
- Samoré A.B., Schneider M., del P., Canavesi F., Bagnato A., Groen A. F. (2003) Relationship between somatic cell count and functional longevity assessed using survival analysis in Italian Holstein-Friesian cows. *Livestock Prod. Sci.* 80, 211-220.
- Sandré C., Gleizes A., Forestier F., Gorges-Kergot R., Chilmonczyk S., Léonil J., Moreau M., Labarre C. (2001) A peptide derived from bovine β -casein modulates functional properties of bone marrow-derived macrophages from germfree and human flora-associated mice. *J. Nutr.* 131, 2936-2942.
- Sang Y., Blecha F. (2008) Antimicrobial peptides and bacteriocins: alternatives to traditional antibiotics. *Anim. Health Res. Rev.* 9, 227-235.

- Sava G. (1996) Pharmacological aspects and therapeutic applications of lysozymes. In: Jollès P. (ed.) *Lysozymes: Model Enzymes in Biochemistry and Biology*. Basel: Birkhäuser Verlag; p.p. 433-449.
- Selitrennikoff C.P. (2001) Antifungal proteins. *Appl. Env. Microbiol.* 67, 2883-2894.
- Schanbacher F.L., Talhouk R.S., Murray F.A. (1997) Biology and origin of bioactive peptides in milk. *Livestock Prod. Sci.* 50, 105-123.
- Schukken Y.H., Wilson D.J., Welcome F., Garrison-Tikofsky L., Gonzalez R.N. (2003) Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. *Vet. Res.* 34, 579-591.
- Shai Y. (2002) Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers* 66, 236-248.
- Shen C.-L., Chen W.-H., Zou S.-X. (2007) *In vitro* and *in vivo* effects of hydrolysates from conglycinin on intestinal microbial community of mice after *Echerichia coli* infection. *J. Appl. Microbiol.* 102, 283-289.
- Smith T.J., Blackman S.A., Foster S.J. (2000) Autolysins of *Bacillus subtilis*: multiple enzymes with multiple functions. *Microbiology* 146, 249-262.
- Sordillo L.M., Shafer-Weaver K., DeRosa D. (1997) Immunobiology of the mammary gland. *J. Dairy Sci.* 80, 1851-1865.
- Strominger J.L., Ghuyssen J.M. (1967) Mechanisms of enzymatic bacteriolysis. *Science* 156, 213-221.
- Sveinbjornsson B., Olsen R., Seternes O.M., Seljelid R. (1996) Macrophage cytotoxicity against murine methA sarcoma involves nitric oxide-mediated apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 223, 643-649.
- Шкляр Б.Х. (1977) Ферментативный лизис дрожжей. Минск: Наука и техника.
- Teschemacher H. (2003) Opioid receptor ligands derived from food proteins. *Curr. Pharmaceut. Design* 9, 1331-1344.
- Tirelli A., De Noni I., Resmini P. (1997) Bioactive peptides in milk products. *Ital. J. Food Sci.* 9, 91-98.

- Tlaskalová-Hugenová H., Štěpánková R., Hudcovic T., Tučková L., Cukrowska B., Lodinová-Žádníková R., Kozáková H., Rossmann P., Bártoová J., Sokol D., Funda D.P., Borovská D., Řeháková Z., Šinkora J., Hofman J., Drastich P., Kokešová A. (2004) Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunol. Lett.* 93, 97-108.
- Van Amersfoort E.S., Van Berkel T.J.C., Kuiper J. (2003) Receptors, mediators and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 379-414.
- Van Boekel M.A., Weerens C.N., Holstra A., Scheidtweiler C.E., Alink G.M. (1993) Antimutagenic effects of casein and its digestion products. *Food Chem. Toxicol.* 31, 731-737.
- Van Heijenoort J. (2001) Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. *Glycobiology* 11, 25R-36R.
- Vetvicka V., Terayama K., Mandeville, R., Brousseau, P., Kournikakis, B., Ostroff G. (2002) Pilot Study: Orally-administered yeast β 1,3-glucan prophylactically protects against anthrax infection and cancer in mice. *JANA.* 5, 3-5.
- Vetvicka V., Yvin J.-C. (2004) Effects of marine β -1,3 glucan on immune reactions. *Int. Immunopharmacol.* 4, 721-730.
- Violle N., Messaoudi M. Lefranc-Millot C., Desor D., Nejdí A., Demagny B., Schroeder H. (2006) Ethological comparison of the effect of bovine alpha s1-casein tryptic hydrolysate and diazepam on the behaviour of rats in two models of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 84, 517-23.
- Vollmer W., Joris B., Charlier P., Foster S. (2008) Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 259–286.
- Vollmer W., Blanot D., Pedro M.A. (2008) Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 149–167.
- VVT (Valstybinė Veterinarijos Tarnyba) (1993) Lizocimo G3X vartojimo veterinarijoje instrukcija.

- VVT (Valstybinė Veterinarijos Tarnyba) (1993a) Lizosubtilino G10X vartojimo veterinarijoje instrukcija.
- Williams D.L., Mueller A., Browder W. (1996) Glucan-based macrophage stimulators. *Res. Perspect.* 5, 392-399.
- Williams D.L. (1997) Overview of (1→3)-β-D-glucan immunobiology. *Mediators Inflamm.* 6, 247-250.
- Xiao Z., Trincado C.A., Murtaugh M.P. (2004) β-Glucan enhancement of T cell IFNγ response in swine. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102, 315-320.
- Xu R.J. (1998) Bioactive peptides in milk and their biological and health implications. *Food Rev. Int.* 14, 1-16.
- Yan S.S., Gilbert J.M. (2004) Antimicrobial drug delivery in food animals and microbial food safety concerns: an overview of in vitro and in vivo factors potentially affecting the animal gut microflora. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56, 1497-1521.
- Yang H.Y., Yang S.C., Chen J.R., Tzeng Y.H., Han B.C. (2004) Soyabean protein hydrolysate prevents the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Br. J. Nutr.* 92, 507-512.
- Yeaman M.R., Yount N.Y. (2003) Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol. Rev.* 55, 27-55.
- Wakabayashi H., Yamauchi K., Takase M. (2006) Lactoferrin research, technology and applications. *Int. Dairy J.* 16, 1241-1251.
- Weiss J. (2003) Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) and lyppolysaccharide-binding protein (LBP): structure, function and regulation in host defence against gram-negative bacteria. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 785-780.
- Werner G.H., Jollès P. (1996) Immunostimulating agents: what next? A review of their present and potential medical applications. *Eur. J. Biochem.* 242, 1-19.
- Zaiou M. (2007) Multifunctional antimicrobial peptides: therapeutic targets in several human diseases. *J. Mol. Med.* 85, 317-329.

Zhang L., Falla T.J. (2004) Cationic antimicrobial peptides – an update. *Expert Opin. Investig. Drugs* 13, 97-106.

Zhang L., Falla T.J. (2009) Host defense peptides for use as potential therapeutic. *Curr. Opin. Investig. Drugs*. 10, 164-171.

Захарова И.Я., Павлова И.Н. (1985) Литические ферменты микроорганизмов. Киев: Наукова Думка.

Finansinė parama

LVMSF parama projektui "Neįprastas maisto baltymų vaidmuo imunologijoje (mokslinė teorija)" (registracijos Nr. T-04049; Sutarties Nr. T-27/04). Projekto vadovas – habil. dr. G. A. Biziulevičius.

LVMSF parama darbui "Maisto baltymų bifunkcinio (antimikrobinio/imunostimuliuojančio) poveikio teorija" (registracijos Nr. T-05016; sutarties Nr. T-74/05). Darbo vadovas – habil.dr. G. A. Biziulevičius.

Padėka

Dedikuoju šią disertaciją savo darbo vadovui šviesios atminties habil. dr. Gediminui Arvydui Biziulevičiui, kuris tikėjo savo darbų rezultatų ateities sėkme ir manimi.

Taip pat dėkoju visiems, rėmusiems mane šio darbo metu:

dr. Genei Biziulevičienei, dr. Almantui Šiauriui, dr. Aidai Vaitkuvieni, prof. habil. dr. Vytui Tamošiūnui – už pagalbą, vertingus patarimus, pastabas ir pasiūlymus.