

AKTIVNOSTI ENZIMA U HUMANOM MLEKU U TOKU PRVOG MESECA LAKTACIJE

Gordana Kocić¹, Ljiljana Bjelaković², Tatjana Cvetković¹, Zoran Pop-Trajković³, Marina Jonović³, Bojko Bjelaković², Dušan Sokolović¹, Tatjana Jevtović¹ i Dušica Stojanović⁴

Dinamika aktivnosti enzima u humanom kolostrumu i mleku menja se u zavisnosti od stimulacije laktacije. Za cilj studije bilo je postavljeno izučavanje aktivnosti alkalne fosfataze, amilaze, transaminaza (ALT i AST) i laktat dehidrogenaze (LDH) u uzorcima humanog kolostruma i zrelog mleka dobijenog manuelnim istiskivanjem u prvom mesecu laktacije. U studiju je bilo uključeno 45 žena, dobne starosti 18-39 godina, koje su se porodile na Klinici za ginekologiju i akušerstvo Kliničkog centra u Nišu, normalnim porođajem, bez postojanja komplikacija. Uzorci kolostruma i mleka skupljani su mehaničkim istiskivanjem mleka u tri intervala: prvi uzorak kolostruma je dobijen odmah nakon pojave prvih kapi mleka nakon porođaja; drugi uzorak je dobijen nakon 24 časa i treći nakon mesec dana. Uzorci su skupljani u jutarnjim časovima, pre podoja deteta i čuvani u sterilnim epruvetama u zamrzivaču do izvođenja analiza. Aktivnost pomenutih enzima se smanjuje (statistički značajno kod amilaze) u periodu nakon mesec dana, što znači da prati količinu proteina. Aktivnost transaminaza (ALT i AST) i alkalne fosfataze pokazuje tendenciju pada aktivnosti nakon mesec dana, ali je statistički značajna razlika dobijena kod AST. Aktivnost alkalne fosfataze pokazuje dinamiku koja upućuje na visoko statistički značajan pad nakon mesec dana. Aktivnost enzima u humanom mleku predstavlja značajno polje istraživanja, jer se potenciraju značaj i prednosti humanog mleka nad kravljim, u kome su enzimi pasterezacijom uglavnom uništeni. Povećana aktivnost određenih enzima može biti koristan i validan dijagnostički marker mehaničke iritacije tkiva, deskvamacije epitela i porasta koncentracije inflamatornih ćelija u toku mastitisa. *Acta Medica Medianae* 2010;49(2):20-24.

Ključne reči: humano mleko, kolostrum, alkalna fosfataza, amilaza, transaminaze, laktat-dehidrogenaza

Biohemijski Institut, Medicinski fakultet Niš¹
Klinika za pedijatriju, Medicinski fakultet Niš²
Klinika za ginekologiju i akušerstvo, Medicinski fakultet Niš³
Zavod za zaštitu zdravlja Niš⁴

Kontakt: Gordana Kocić
Biohemijski Institut, Medicinski fakultet Niš
Bulevar dr Zorana Đinđića 81, 18000 Niš, Srbija
email: gkocic@medfak.ni.ac.rs

Uvod

Mleko predstavlja osnovu ishrane, medijum koji je oličenje savršenstva prirode u preživljavanju i odgoju potomstva sisara. Sa hemijskog aspekta mleko predstavlja stabilnu emulziju masti u koloidnom rastvoru belančevina i pravom rastvoru laktoze i mineralnih materija. Veliki nutritivni i biohemijsko-metabolički značaj mleka u ishrani novorođene dece i odojčadi potiče i od bogatsva vitaminima, enzimima, ako i ćelijskim elementima koji imaju aktivnu ulogu u odbrani od infekcija (1-4).

Iako na prvi pogled mleko deluje kao homogena tečnost, u njegovom sastavu se mogu ultrastrukturalno zapaziti sledeći elementi: surutka (bogata peptidima, mineralima i ugljenim hidratima), masne globule, koje predstavljaju lipoproteinske komplekse, micle proteina, u prvom redu kazeina i membranski vezikularni kompleksi, poznati kao egzozomi (1-5).

Izučavanje aktivnosti enzima u mleku datira još od kraja XIX veka. Sa prvim nalazima aktivnosti enzima u kolostrumu i mleku usledio je niz kliničkih i eksperimentalnih studija koje su imale za cilj da objasne razloge, tj. izvore enzima u mleku. Enzimi mogu biti prisutni u različitim fazama mleka, zavisno koja im je osnovna lokalizacija, kakva su im fizičko-hemijska svojstva i šta je glavni razlog njihovog prisustva u mleku. Prisustvo enzima u mleku je posledica spontane difuzije enzima male molekulske mase iz plazme, aktivne sekrecije iz aplikalnih delova epitela mlečnih žlezdi ili kao rezultat izlaska iz somatskih ćelija prisutnih u sekretovanom mleku, najčešće leukocita ili drugih ćelija makrofagnog porekla. Početkom XXI veka već se znalo da se u humanom kolostrumu i mleku može naći preko sedamdeset različitih enzima. Čak i posle više od jednog veka izučavanja enzima u mleku, još uvek se sa sigurnošću ne može ustanoviti kakva je prava uloga i značaj enzima u mleku. Za pojedine od njih, kao što je ksantin oksidaza, laktoperoksidaza i lizozim, aktivna antimikrobna uloga u produkciji slobodnih radikala nedvosmisleno je dokazana. Drugi enzimi imaju ulogu da pomognu varenje različitih materija u još uvek nerazvijenom digestivnom traktu novorođenčeta (pankreasna lipaza i amilaza). Enzimi koji su porekla iz apikalnih delova epitelnih ćelija povećavaju se u toku zapaljenskih procesa različite etiologije, kada

dolazi do povećane deskvamacije epitela. Drugi razlog povećanja aktivnosti u toku zapaljenskih procesa je i ekstravazacija leukocita u područje inflamacije. Ukoliko se radi o inflamaciji sistemskog karaktera, enzimi u mleku se povećavaju kao posledica prelaska iz plazme po osnovu gradijenta koncentracije. Ali rezultati izvesnog broja studija pokazali su da je aktivnost pojedinih enzima daleko veća u mleku i ne može se dovesti u korelativnu vezu sa povećanjem aktivnosti u kolostrumu. Jedan od razloga povećanja aktivnosti enzima u mleku je izlazak iz mioepitelnih ćelija kao posledica mehaničkog pritiska (izmuzavanja). Na podatak da se pojedini enzimi u mleku nalaze kao posledica odvajanja apikalnog dela epitelnih ćelija, upućuje činjenica da su njihovi supstrati često odsutni u mleku, kao i podatak da za izvestan broj enzima pH sredina mleka daleko odstupa od optimalne. Činjenica da veliki broj enzima u mleku ima neku korisnu ulogu za digestivni trakt novorođenčeta, predstavlja jednu od privilegija dojenja nad veštačkom ishranom (4-6).

Imajući u vidu podatak da se dinamika aktivnosti enzima u humanom kolostrumu i mleku menja u odnosu na uslove stimulacije laktacije, mehanički pritisak pri istiskivanju mleka, kao i u odnosu na prisutnu količinu proteina i ćelija u mleku, za cilj ove studije je postavljeno izučavanje aktivnosti alkalne fosfataze, amilaze, transaminaza (ALT i AST) i laktat dehidrogenaze (LDH) u uzorcima humanog kolostruma i mleka dobijenog manuelnim istiskivanjem.

Ispitanici i metode

U studiju je bilo uključeno 35 žena, dobne starosti 18-39 godina, koje su se porodile na Klinici za ginekologiju i akušerstvo Kliničkog centra u Nišu, normalnim porođajem, bez postojanja komplikacija, kao što je dijabetes, hipertenzija ili eklampsija. Sve žene su bile bez akutnih ili hroničnih bolesti i na uobičajenoj, nevegetarijanskoj ishrani. Uzorci kolo-

struma i mleka su skupljani mehaničkim istiskivanjem mleka u tri intervala: prvi uzorak kolostruma je dobijen odmah nakon pojave prvih kapi mleka nakon porođaja; drugi uzorak je dobijen nakon 24 časa i treći nakon mesec dana. Uzorci su skupljani u jutarnjim časovima, pre podoja deteta i čuvani u sterilnim epruvetama u zamrzivaču do izvođenja analiza.

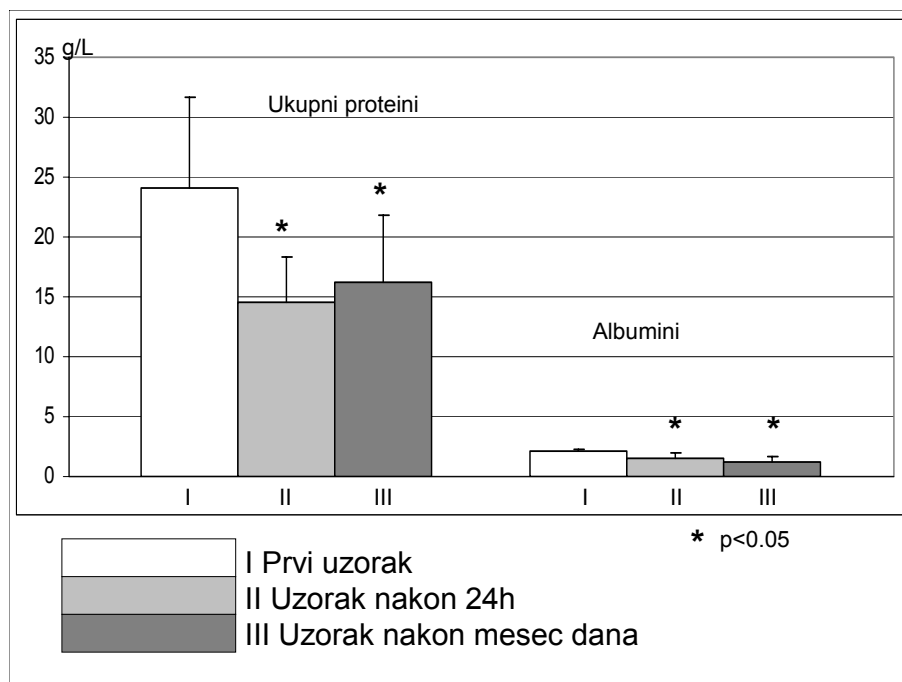
Aktivnost enzima alkalne fosfataze, amilaze, transaminaza (ALT i AST) i laktat dehidrogenaze (LDH) određivana je gotovim testovima firme Bio Systems na biohemijskom analizatoru marke A25. Na isti način su određivani i ukupni proteini i albumin.

Statistička analiza podrazumevala je određivanje srednje vrednosti i standardne devijacije, a statistička analiza je vršena Anova testom. Statistička značajnost bila je u uzorcima gde je $t > 0,05$.

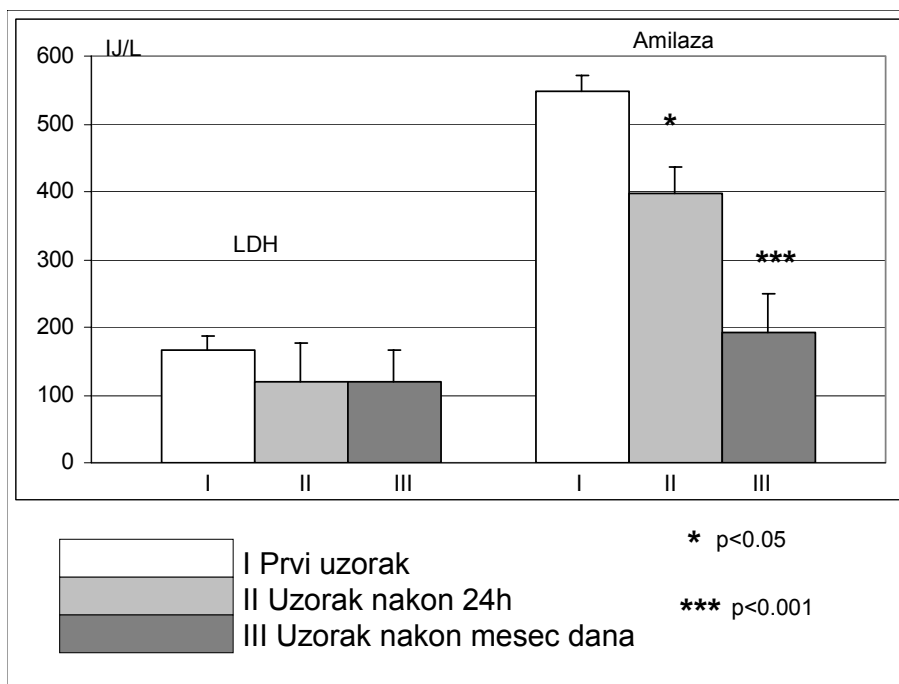
Rezultati

Rezultati istraživanja prikazani su na Grafikona 1, 2 i 3. Na Grafikonu 1 prikazana je količina ukupnih proteina i albumina u mleku u dinamici koja je opisana. Kod prvog uzorka mleka, kolostrum ima žučkastu boju i veoma je viskozozan. U njemu je koncentracija proteina uobičajeno najveća. Takvi podaci su dobijeni i u našem istraživanju, gde količina ukupnih proteina i albumina značajno odstupa drugog dana i nakon mesec dana u odnosu na prvi uzorak.

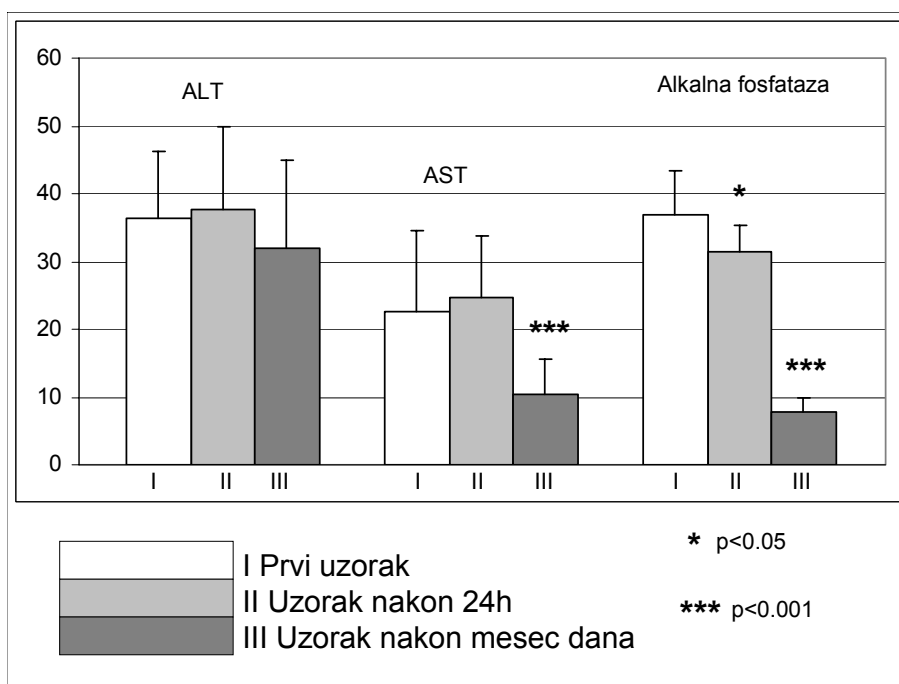
Na Grafikonu 2 je prikazana aktivnost laktat dehidrogenaze (LDH) i amilaze. Može se zaključiti da se i aktivnost pomenutih enzima smanjuje (statistički značajno kod amilaze) u periodu nakon mesec dana, što znači da prati količinu proteina. Na Grafikonu 3 je prikazana aktivnost transaminaza (ALT i AST) i alkalne fosfataze. Transaminaze takođe pokazuju tendenciju pada aktivnosti nakon mesec dana, ali je statistički značajna razlika dobijena kod AST. Aktivnost alkalne fosfataze pokazuje dinamiku koja upućuje na visoko statistički značajan pad nakon mesec dana.



Grafikon 1. Dinamika kretanja ukupnih proteina i albumina u kolostrumu i zreloom mleku



Grafikon 2. Dinamika kretanja aktivnosti laktat dehidrogenaze (LDH) i amilaze u kolostrumu i zrelom mleku



Grafikon 3. Dinamika kretanja aktivnosti transaminaza (ALT i AST) i alkalne fosfataze u kolostrumu i zrelom mleku

Diskusija

Tokom prvih dva do sedam dana nakon porođaja luči se kolostrum, prvo mleko, koje obezbeđuje novorođenom detetu sve što je potrebno. Sledeće dve nedelje luči se prelazno mleko, da bi u trećoj nedelji mleko sazrelo. Prosečan sastav humanog mleka je oko 86-87% vode i 13-14% suve materije. Suvu materiju čine sledeće supstance: od organskih materija uglavnom proteini (oko 2,5%) u kolostrumu a do 1,5% u zrelom mleku, i to najvećim delom kazein, laktalbumini i laktoglobulini. Kazein je glavni protein mleka, prisutan u najmanje četiri forme, a pred-

stavlja punovredni protein, bogat svim esencijalnim amino kiselinama. Hranljivost mleka i mlečnih proizvoda rezultat je prisustva esencijalnih amino kiselina. Niz podataka poslednjih godina bacio je svetlo na značaj dojenja upravo sa aspekta štetnosti kravljeg kazeina. To se naročito odnosi na β -kazein tipa A. Ovaj tip kazeina odgovoran je i za imunogene efekte kravljeg mleka i razvoj dijabetesa tipa 1, ali i neuropsihijatrijske defekte u većem stepenu kod one dece koja su hranjena kravljim mlekom. Zbog toga, ishrana humanim mlekom predstavlja najprirodniji način ishrane novorođene dece i odojčadi i treba je negovati koliko god je to moguće. Albumin najvećim delom

dolazi iz seruma tako da se može uzeti kao marker barijere plazma-mleko (5,6).

Količina proteina u kolostrumu je veća iz razloga što novorođenče brzo napreduje, a nema toliku fizičku snagu da duže vreme aktivno sisa. Stoga, mala količina unetog mleka treba da zadovolji sve potrebe novorođenog deteta. Dobijeni podaci ovog istraživanja (Grafikon 1) potvrdili su dinamiku koja je opisana u literaturi.

Laktat-dehidrogenaza je NAD-zavisni enzim uključen u metabolizam glukoze u aerobnim i anaerobnim uslovima. Stoga se distribucija izoenzimskih formi menja u zavisnosti od opskrbljenosti tkiva kiseonikom i metaboličke aktivnosti tkiva. Glavni izvor ovog enzima u mleku je epitel mlečne žlezde. U nekim studijama je pokazano da aktivnost LDH korelira sa aktivnom sekrecijom mleka, tako da predstavlja konstitutivnu komponentu. Nalaz povećane aktivnosti u prvom kolostrumu može biti posledica generalno povećane količine proteina, kao i izlaska enzima iz mioepitelnih i mišićnih ćelija usled mehaničkog istiskivanja mleka (1,2,4). U pogledu specifične aktivnosti enzima u odnosu na ukupnu količinu proteina, može se zaključiti da se enzim i nakon mesec dana održava u visokoj koncentraciji (Grafikon 2).

Amilaza je enzim koji pripada klasi hidrolitičkih enzima uključenih u digestiju skroba. Spada u prve enzime izolovane u mleku, još s kraja XIX veka. Kasnije je pokazano da je glavna komponenta α -amilaza, a interesantno je da je aktivnost amilaze u humanom mleku preko 20-40 puta veća, nego u kravljem mleku. Ovaj enzim pokazuje homologiju sa salivarnom amilazom, a aktivnost je oko 15-140 puta veća nego u plazmi. Takvo saznanje ukazuje da prisustvo enzima u mleku nije rezultat pasivne difuzije iz plazme, niti prisustva u apikalnom delu izvodnih kanala, već produkt aktivne sekrecije. S obzirom da u mleku nema skroba, jedna od pretpostavki je da je amilaza neophodna za razgradnju oligosaharidnih jedinica kojima je bogato mleko (5,7,8). Ali oligosaharidi mleka sadrže monosaharide tipa fukoze i N-acetil neuraminske kiseline, koje α -amilaza ne može da razlaže, jednako kao što ne može ni glavni disaharid laktozu. Jedna od hipoteza je i da se amilaza stvara kao kompenzatorna komponenta u nerazvijenom digestivnom enzimskom sistemu novorođenog deteta, koje ima svega 0,2-0,5% ukupne aktivnosti amilaze odraslih osoba. Ovaj enzim može razlagati polisaharidni omotač bakterija, pa mu je i antimikrobno dejstvo neosporno. Pad aktivnosti u periodu laktacije nakon mesec dana, u skladu je sa padom proteina ali i

sa razvojem digestivnog sistema odojčeta, kome je sve manje potrebno prisustvo ovog enzima. Bogatstvo majčinog mleka amilazom objašnjava zbog čega deca, koja su na ishrani humanim mlekom bolje i ranije podnose ugljenohidratne obroke od dece koja su na veštačkoj ishrani (9,10).

Otkriće alkalne fosfataze u humanom mleku datira s početka XX veka. Alkalna fosfataza je membranski enzim, naročito su lipoproteinske strukture Goldži kompleksa bogate njime. Stoga nije začuđujuće što se u velikoj koncentraciji nalazi sekretovan u mleku. U pogledu strukturne homologije, alkalna fosfataza mleka je u većoj meri homologna enzimu u jetri i placenti, jer pored strukturne homologije, slična je i veza sa fosfatidil-inozitolom u lipoproteinski kompleks membrane. Takve membranske masne globule se aktivno sekretuju u mleko. Kompleksnija izučavanja strukture i porekla pokazala su da su mleku prisutne dve forme enzima, jedna poreklom iz mukopitelih ćelija i druga poreklom iz citoplazme (11,12). Bogatstvo epitela kanalića ovim enzimom upućuje na dokaz zbog čega se ovaj enzim može uzeti markerom mastitisa. I u našem istraživanju bilo je uzoraka mleka u kojima je aktivnost alkalne fosfataze bila veoma visoka, što je rezultat mastitisa nastalog kao posledica mehaničkog trenja usled izmuzavanja i zadržavanja mleka (Grafikon 3).

Transaminaze alanin-transferaza (ALT-GPT) i aspartat-transferaza (AST-GOT) imaju zadatak prenosa amino grupe sa amino kiseline na α -keto glutarnu kiselinu, mada se reakcija može odvijati i u reverzibilnom smeru. Poreklo ALT je strogo citozolarno, dok je AST lokalizovan u citoplazmi i mitohondrijama. Aktivnost ovih enzima povećava se u mleku tokom mastitisa. AST može biti povećan i kao posledica mehaničkog nadražaja na okolno mišićno tkivo i mioepitelne ćelije. Nakon mesec dana aktivnost enzima u mleku se smanjuje, ali odnos aktivnosti AST/ALT je manji od 1, što ukazuje da ne imitira u potpunosti odnos koji postoji u plazmi (1,2,13).

U zaključku se može konstatovati da aktivnost enzima u humanom mleku predstavlja značajno polje istraživanja, sa aspekta funkcionalnog značaja i prednosti humanog mleka nad kravljim, u kome su enzimi uglavnom pasterizacijom uništeni. Sa druge strane, povećana aktivnost određenih enzima može biti koristan i validan dijagnostički marker mehaničke iritacije tkiva, deskvamacije epitela i porasta koncentracije inflamatornih ćelija u toku mastitisa.

Literatura

1. Fox PF, Kelly AL. Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects—Part 1. *Int Dairy J* 2006; 16: 500–16.
2. Kelly AL, O'Flaherty FO, Fox PF. Indigenous proteolytic enzymes in milk: A brief overview of the present state of knowledge. *Int Dairy J* 2006; 16: 563–72.
3. Kitchen BJ. Review of the Progress of Dairy Science, bovine mastitis: Compositional changes and related diagnostic tests. *J Dairy Res* 1981; 48: 167–88.
4. Velonà T, Abbiati L, Beretta B, Gaiaschi A, Flaùto U, Tagliabue P, Galli CL, Restani P. Protein profiles in breast milk from mothers delivering term and preterm babies. *Pediatr Res* 1999;45:658-63.
5. Heyndrickx GV. Further investigations on the enzymes in human milk. *Paediatrics* 1963;31:1019-30.
6. Zimecki M, Kruzal ML. Milk-derived proteins and peptides of potential therapeutic and nutritive value. *J Exp Ther Oncol* 2007; 6(2):89-106.
7. Kunz GMJ, C., Kinne-Saffran E, Rudloff S. Human milk oligosaccharides are minimally digested in vitro. *Journal of Nutrition* 2002; 130: 3014–20.
8. Miller JB, McVeigh P. Human milk oligosaccharides, 130 reasons to breast feed. *Br J Nutr* 1999; 82: 333–4.
9. Lindberg T, Skude G. Amylase in human milk. *Pediatrics* 1982; 70: 235–43.
10. Heitlinger LA, Lle PC, Dillon WP, Labenthal F. Mammary amylase, a possible alternative pathway of carbohydrate digestion in infancy. *Pediatric Res* 1983; 17: 15–18.
11. Bingham EW, Garver K, Powlem D. Purification and properties of alkaline phosphatase in the lactating bovine mammary gland. *J Dairy Sci* 1992; 75: 3394–401.
12. Bingham EW, Malin EL. Alkaline phosphatase in the lactating bovine mammary gland and the milk fat globule membrane. Release by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Comp Biochem Physiol* 1992; 102: 213–18.
13. Qin YD, Luo X, Huang DL, Xu CZ. Dynamic changes of enzymes activities and growth factors contents in human colostrum. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 2004; 39(7): 449-52.

ENZYME ACTIVITY OF HUMAN MILK DURING THE FIRST MONTH OF LACTATION

Gordana Kocić, Ljiljana Bjelaković, Tatjana Cvetković, Zoran Pop-Trajković, Marina Jonović, Bojko Bjelaković, Dušan Sokolović, Tatjana Jevtović and Dušica Stojanović

The dynamic of enzyme activities in human colostrum and milk changes, depending on the lactation stimulation. The aim of the study was to study the activity of alkaline phosphatase, amylase, transaminases (ALT and AST) and lactate dehydrogenase (LDH) in the samples of human colostrum and mature milk obtained by manual squeezing. The study involved 35 women, 18-39 years of age, who had given birth at the Clinic for Gynecology and Obstetrics, Faculty of Medicine in Niš, with normal delivery, without any complications reported. The samples of colostrum and milk were collected by mechanical squeezing of milk during three intervals: the first sample of colostrum was obtained immediately after the appearance of the first drops of milk after childbirth; the second sample was obtained after 24 hours, and the third after one month. The samples were collected in the morning, and kept in sterile test tubes in the freezer until the performance of analysis. The activity of these enzymes was reduced (statistically significant for amylase) in the period after one month, which means that it corresponded to the amount of protein. The activity of transaminases (ALT and AST) and alkaline phosphatase activity showed a tendency to fall after a month, but statistically significant difference was obtained with AST. The dynamic of alkaline phosphatase activity showed statistically significant decrease after one month. Enzyme activity in human milk represents an important field of research, from the aspect of functional importance and benefits of human milk compared to the cow's milk, in which enzymes are generally destroyed by pasteurization. On the other hand, increased activity of certain enzymes may be a useful and valid diagnostic marker of mechanical tissue irritation, epithelial desquamation and increase of the concentration of inflammatory cells during mastitis. *Acta Medica Medianae* 2010;49(2):20-24.

Key words: *human milk, colostrum, alkaline phosphatase, amylase, transaminase, lactate-dehydrogenase*