

Received: 2005.06.13  
Accepted: 2005.06.20  
Published: 2005.08.12

## Rola laktoferryiny w prawidłowym rozwoju noworodka

### The role of lactoferrin in the proper development of newborns

Jolanta Artym, Michał Zimecki

Zakład Terapii Doświadczalnej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu

#### Streszczenie

Siara i mleko matki zawierają, oprócz składników o wartości odżywczej, białka i peptydy o właściwościach regulacyjnych niezbędne do prawidłowego rozwoju oseska. Jednym z nich jest laktoferryina (LF) – białko należące do rodziny transferyn, wykazujące wiele różnorodnych działań przeciwmikrobiologicznych i immunotropowych. LF jest białkiem opornym na działanie enzymów proteolitycznych przewodu pokarmowego, w przeciwieństwie do innych białek mleka, np. kazeiny. U noworodków, ze względu na mniejszą efektywność enzymów trawiennych i słabą barierę jelitową pozostaje dłużej w jelicie i może wchłaniać się do krwiobiegu. Silne działanie bakteriobójcze wykazują ponadto peptydy powstałe podczas enzymatycznej degradacji białka. LF jest absorbowana z jelita z udziałem swoistych receptorów na komórkach kosmków jelitowych. Podawana doustnie LF stymuluje zarówno lokalną odpowiedź immunologiczną w tkance limfacyjnej związanej z jelitem, jak i odpowiedź ogólnoustrojową. LF odgrywa ważną rolę w przyswajaniu składników odżywczych. Absorpcja żelaza w jelicie noworodka zachodzi przy współdziałaniu receptorów LF. Dostarczanie żelaza w postaci skompleksowanej z LF jest korzystniejsze niż w postaci preparatów mineralnych, gdyż wolne żelazo może sprzyjać tworzeniu toksycznych pochodnych tlenu. LF zwiększa także przyswajanie innych metali, takich jak mangan i cynk oraz ułatwia wchłanianie cukrów. LF pełni funkcję ochronną wobec komórek nabłonka jelita. Stymuluje proliferację nabłonka jelita cienkiego i okrężnicy oraz wzrost grudek chłonnych jelita. Właściwości te wskazują na możliwość zastosowania LF u przedwcześnie urodzonych dzieci i osób z uszkodzeniem śluzówki jelita. LF odpowiada za utrzymanie odpowiedniego składu mikroflory jelitowej. Hamuje wzrost bakterii patogennych, głównie enterobakterii i gronkowców, a promuje namnażanie się niepatogennych bakterii *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Mechanizm działania przeciwbakteryjnego LF polega m.in. na degradacji adhezyn fimbrialnych oraz enzymów bakteryjnych niszczących IgA. U noworodków karmionych sztuczną dietą, w przeciwieństwie do karmionych naturalnie, rozwija się niekorzystna flora bakteryjna (z dominacją *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Bacteroides*, *Escherichia*). Naturalna flora jelitowa gwarantuje utrzymanie niskiego pH, wytwarza niektóre witaminy (K i B), zwiększa aktywność komórek NK, limfocytów T i makrofagów, promuje wytwarzanie przeciwciał i zmniejsza ryzyko wystąpienia alergii. W doświadczeniach na zwierzętach stwierdzono, że LF chroni przed translokacją bakterii jelitowych i rozwojem bakteriemii i endotoksemii. Mechanizm ochronnego działania LF w bakteriemii polega m.in. na stymulacji układu siateczkowo-śródbłonkowego i mielopojezy. W endotoksemii LF obniża wytwarzanie cytokin prozapalnych, tlenku azotu i reaktywnych form tlenu oraz chroni śluzówkę jelita. LF może również wpływać na rozwój układu immunologicznego noworodków. Promuje dojrzewanie komórek prekursorowych dla limfocytów T i B pobranych od myszy nowo narodzonych. LF zwiększa też aktywność cytotoksyczną komórek NK i LAK, znacznie niższą krótko po urodzeniu niż w późniejszym okresie życia. LF chroni przed toksycznością reaktywnych form tlenu. Może to być szczególnie ważne, gdy mieszanki są dodatkowo wzbogacone w żelazo, stymulujące tworzenie wolnych rodników. Od wielu lat wiadomo, że karmienie naturalne jest najkorzystniejsze dla rozwoju noworodka. W przypadku, gdy konieczne jest odżywianie sztuczne, należy stosować mieszanki mleczne jak najbliższe składem mleku ludzkemu. Mleko krowie zawiera 40–50 razy mniej LF i mniej innych składników o znaczeniu ochronnym: lizozymu, innych białek ser-

watki oraz immunoglobulin. Trzykrotnie wyższy poziom soli mineralnych niż w mleku ludzkim może ponadto stanowić niebezpieczne obciążenie dla nerek noworodka. W świetle przedstawionych badań wydaje się uzasadnione uzupełnianie mieszanek dla niemowląt w LF. Mieszanki takie są już dostępne handlowo w niektórych krajach (USA, Japonia). W Polsce nie produkuje się mieszanek wzbogaconych w LF.

**Słowa kluczowe:** noworodek • siara • mleko • laktoferyna • ochrona jelita • mikroflora jelitowa • immunostymulacja

## Summary

Colostrum and milk contain, in addition to nutritional constituents, also proteins crucial for the normal development of the offspring. Lactoferrin (LF) belongs to the family of iron-binding proteins and exhibits a wide spectrum of antimicrobial and immunotropic properties. LF is particularly resistant to proteolytic degradation in alimentary tract, in contrast to other milk proteins, e.g. casein. In any case, LF-derived peptides also possess potent antibacterial activities. LF is absorbed from the intestine by means of specific receptors located on brush border cells. Administered orally, LF stimulates both local and systemic immune response. LF plays a role in the absorption of nutrients. The protein can deliver such metal ions as iron, manganese, and zinc and facilitate the absorption of sugars. LF stimulates the proliferation of gut endothelial cells and the growth of gut-associated lymphatic follicles. This property suggests the possibility of applying LF in premature infants and patients with damaged intestinal mucus. LF controls the proper composition of the gut microflora. It suppresses the growth of pathogenic bacteria while promoting the multiplication of nonpathogenic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. Newborns fed an artificial diet develop harmful microflora (*Enterococcus*, *Enterobacter*, *Bacteroides*, *Escherichia*). The non-pathogenic microflora ensures low pH, produces some vitamins, increases the activity of NK cells, T lymphocytes, and macrophages, promotes the production of protective immunoglobulins, and lowers the risk of allergies. In studies on mice, LF was found to be protective in bacteremia and endotoxemia. The protein stimulates the activity of reticulo-endothelial system cells and elicits myelopoiesis, thus increasing the killing and clearance of bacteria. In the model of experimental endotoxemia, LF inhibits the activity of pro-inflammatory cytokines, nitric oxide, and reactive forms of oxygen. LF can also promote the differentiation of T and B cells from their immature precursors and increases the activity of NK and LAK cells. It also protects against the toxicity of reactive oxygen radicals. This property may be particularly relevant when baby food, based on modified cow's milk, contains mineral iron, which may be a source of harmful free radicals. In summary, it is obvious that natural human milk has the best value for newborns. Supplementation of artificial baby food with LF seems essential to improve the protective and immunoenhancing property of this kind of diet. It is clear that cow's milk is not appropriate for human newborns. Cow's milk contains 50 times less LF, only traces of lysozyme, and lower concentrations of other whey proteins and immunologically relevant immunoglobulins. Therefore commercially available baby foods (United States, Japan) are supplemented with LF.

**Key words:** newborn • colostrum • milk • lactoferrin • protection of gut • gut microflora • immunostimulation

**Full-text PDF:** [http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol\\_59/8022.pdf](http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_59/8022.pdf)

**Word count:** 6263

**Tables:** –

**Figures:** –

**References:** 129

**Adres autora:** prof. Michał Zimecki, Zakład Terapii Doświadczalnej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, ul. Wejgła 12, 53-114 Wrocław, e-mail: zimecki@iitd.pan.wroc.pl

**Wykaz skrótów:** LF – laktoferyna; BLF – laktoferyna bydłęca; HLF – laktoferyna ludzka; holo-LF – laktoferyna wysyciona żelazem; apo-LF – laktoferyna wolna od żelaza; RFT – reaktywne formy tlenu; GALT – tkanka limfatyczna związana z przewodem pokarmowym (gut-associated lymphoid tissue), \*OH – rodnik hydroksylowy; NO\* – tlenek azotu



## WPROWADZENIE

Najlepszym pokarmem dla noworodka i niemowlęcia jest siara, a potem mleko matki. Zawierają one liczne aktywne biologicznie składniki, do których możemy zaliczyć: białka, węglowodany, tłuszcze, minerały, witaminy, hormony, enzymy, czynniki wzrostowe, komórki odpornościowe i cytokiny. Obecność tych substancji rozszerza zakres wpływu matki daleko poza proste odżywianie dziecka, ułatwiając przejście z bezpiecznego środowiska wewnątrzmacicznego do świata zewnętrznego. Szczególne znaczenie mają białka, które są łatwo trawione i zaspokajają zapotrzebowanie dziecka na wszystkie główne aminokwasy. Wiele z nich, wraz z immunoglobulinami zawartymi w mleku, stanowi ponadto czynniki chroniące przed patogenami oraz stymulujące rozwój układu odpornościowego dziecka. Ułatwienie asymilacji innych składników odżywczych wpływa również na wzrost i różnicowanie innych tkanek. Jednym z głównych białek mleka pełniących taką rolę jest laktoferryina (LF). Białko to należy do rodziny transferyn wykazujących zdolność chelatowania żelaza. Jest jednym z podstawowych składników odporności wrodzonej ustroju. Poza mlekiem LF obecna jest w innych wydzielinach komórek nabłonkowych ustroju (np. ślinie, wydzielinie dróg oddechowych, dróg rodnych, soku żołądkowym i innych) oraz neutrofilach, skąd może być uwalniana podczas degranulacji tych komórek [65,68]. Zjawisko to jest przyczyną wzrostu stężeń LF w tkankach i krążeniu podczas zakażeń, zapalenia i urazów [64]. LF ma właściwości przeciwmikrobiologiczne: wykazuje aktywność wobec wielu bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich, wirusów otoczkowych i bezotoczkowych oraz różnych rodzajów grzybów i pasożytów [88]. Ma ponadto działanie przeciwwzapalne [6,59], przeciwnowotworowe [113], immunoregulatorowe [12,67] oraz uczestniczy w regulacji hemopoezy [5,98]. Jak dotąd laktoferryinie poświęcono wiele badań laboratoryjnych, przedklinicznych i klinicznych. Uzyskane wyniki wskazują na jej przydatność w profilaktyce i terapii chorób autoimmunologicznych i neoplastycznych, niedoborów immunologicznych, odnowie funkcji układu immunologicznego po chemioterapii, w zakażeniach, sepsie oraz bakteriemii i endotoksemii. Zachęcające wyniki badań pozwoliły zastosować białko w postaci dodatków do produktów przemysłu mleczarskiego i farmaceutycznego, które znalazły już zastosowanie w profilaktyce i leczeniu różnych schorzeń u noworodków, dzieci i osób dorosłych.

Celem artykułu jest wskazanie na szczególne znaczenie LF w prawidłowym rozwoju noworodków i niemowląt, które mogą spożywać białko wraz z pokarmem matki lub, gdy karmienie naturalne nie jest możliwe, w postaci modyfikowanych odżywek wzbogaconych w to białko.

## LAKTOFERRYINA W SIARZE I MLEKU LUDZKIM

Laktoferryina jest jednym z głównych białek ludzkiej siary i mleka (w siarze stanowi około 30% całkowitej zawartości białka, w mleku dojrzałym 15–20%) [68]. Noworodek w ciągu pierwszych dni po urodzeniu otrzymuje duże ilości LF w siarze. LF jest głównym białkowym składnikiem serwatki ludzkiej siary [70]. Stężenie LF w siarze wynosi 5–15 mg/ml [97]. Uwzględniając ilość płynu wypijaną przez dziecko (około 80 ml/kg m.c./dzień), można oszacować, że spożywa ono 400–1200 mg LF/kg m.c./dzień. Ilości LF

dostarczanej w mleku w późniejszym okresie życia dziecka są również duże, gdyż zawartość białka w dojrzałym mleku wynosi powyżej 1,5 mg/ml, a ilości płynu spożywanego przez dziecko są większe (około 870 ml/dzień u niemowląt 4–6 miesięcznych) [15]. Dieta noworodków i niemowląt żywionych naturalnie zawiera LF obecną w mleku matki. W przypadku dzieci, które z różnych przyczyn nie mogą być karmione piersią, w LF można wzbogacić mieszanki tworzone np. na bazie mleka krowiego lub odżywki sojowej. Takie zastosowanie znalazła już LF izolowana z mleka krowiego (BLF) – odżywki dla niemowląt wzbogacone w bydlęcą LF są dostępne na rynku (głównie japońskim i amerykańskim) już od lat 80 XX wieku [16,63]. W fazie prób klinicznych znajduje się obecnie rekombinacyjna LF ludzka (rHLF) [82].

## AKTYWNOŚĆ LAKTOFERRYINY PODANEJ DOUSTNIE

Laktoferryinie przypisuje się liczne funkcje biologiczne, jak choćby zdolność chelatowania żelaza i ułatwanie jego absorpcji, aktywność przeciwmikrobiologiczną, przeciwwzapalną, skierowaną przeciw reaktywnym formom tlenu i inne. Ujawnienie tych licznych funkcji wymaga jednak, by białko podane doustnie przetrwało proces trawienia, tak aby natywna LF lub jej funkcjonalne fragmenty przez odpowiednio długi czas mogły przebywać w jelitach.

Podatność LF na enzymy trawienne przewodu pokarmowego i stopień hydrolizy białka podanego doustnie pozostaje, jak dotąd, problemem niewyjaśnionym do końca. Na podstawie dotychczas przeprowadzonych badań *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo* można wnioskować, że LF odznacza się dość dużą opornością na proteolityczne działanie enzymów trawiennych. Jak się okazało w testach *in vitro*, LF zawarta w mleku ludzkim wykazała szczególnie małą podatność na działanie enzymów jelita cienkiego: trypsyny i chymotrypsyny. W przeciwieństwie do HLF, BLF okazała się bardziej podatna na trawienie trypsyną: enzym zniósł aktywność przeciwmikrobiologiczną białka i zredukował zdolność do sekwestracji żelaza [9]. Niezwykła oporność ludzkiej LF na proteolizę może odzwierciedlać rozwój ewolucyjny białka, tak, by mogło ono przetrwać w swej natywnej postaci w jelicie noworodka. Badania *ex vivo* z użyciem zawartości wyplukanej z żołądka i jelita cienkiego noworodków szczurzych ssących mleko matki i młodych odstawionych już od ssania wykazały, że degradacja znakowanej I<sup>125</sup> LF zarówno w żołądku, jak i w jelicie cienkim noworodków ssących mleko była dużo mniejsza niż w grupie zwierząt niessących [11]. Trawienie białka w jelicie cienkim noworodków było minimalne, ale znacznie wzrosło w drugiej grupie zwierząt, dając kilka fragmentów peptydowych o niższych niż wyjściowa masach molekularnych. Badania u nowo narodzonych prosiąt z użyciem białek znakowanych N<sup>15</sup> wykazały, że LF wieprzowa i bydlęca (białko heterologiczne) dodane do mleka były trawione w równym stopniu, a stopień ich degradacji wzrastał w próbkach pobranych z dalszych części jelita cienkiego [26]. W treści środkowej części jelita stwierdzono obecność 44,5% strawionej LF bydlęcej i 49,8% strawionej LF wieprzowej, te same wartości dla końcowego odcinka jelita cienkiego wynosiły: 82,3 i 84,4%. W obu przypadkach trawienie LF było znacznie mniejsze niż trawienie kazeiny. Co ważne, z badań tych wynika, że homologiczna i heterologiczna LF podlegają *in vivo* trawieniu w podobnym zakre-

się, co wskazuje na możliwość leczniczego zastosowania również białek obcych gatunkowo. Należy w tym miejscu wspomnieć, iż nie tylko natywna postać LF wykazuje liczne działania biologiczne. Podobną aktywnością odznaczają się hydrolizaty białka, głównie te, które zawierają fragment laktoferrycynowy (N-końcowy fragment złożony z reszt aminokwasowych 1–47 ludzkiej LF oraz 17–41 bydlęcej LF, bogaty w aminokwasy zasadowe), ale również inne peptydy – pochodne LF. Dotyczy to m.in. aktywności przeciwmikrobiologicznej (laktoferrycyna charakteryzuje się nawet większą aktywnością niż natywne białko), przeciwzapalnej, przeciwnowotworowej i immunomodulującej [43,76,121,122]. Zatem LF, nawet częściowo zdegradowana podczas przejścia przez przewód pokarmowy, zachowuje wiele ze swych funkcji.

Nie do końca poznane są też dalsze losy w ustroju LF i/lub jej fragmentów peptydowych powstałych po trawieniu w przewodzie pokarmowym. Nie ma wciąż jednoznacznej odpowiedzi, czy LF może ulegać wchłanianiu w jelicie i z krwią trafiać do różnych narządów i komórek, czy jej działanie ogólnoustrojowe wynika ze stymulacji jedynie lokalnej odporności związanej z jelitem. Faktem jest, że białko podane doustnie wykazuje duży zakres aktywności: okazało się skuteczne w zwalczaniu infekcji, zapalenia i nowotworów, nie tylko związanych z przewodem pokarmowym, ale również schorzeń dotyczących odległych tkanek, takich jak na przykład skóry, wątroby, układu moczowego czy płuc [44,107,112,115]. O ile u osobników dorosłych, osoczowa LF jest prawie wyłącznie pochodzenia neutrofilowego, są dane wskazujące, iż u noworodków we krwi można znaleźć białko podane wcześniej doustnie. Wynika to niewątpliwie ze specyficzności rozwojowych noworodków – niedojrzałości niektórych narządów i układów, dość znacznej szczególnie u dzieci urodzonych przedwcześnie. We wczesnym okresie po urodzeniu stwierdza się słabą barierę jelitową oraz mniejszą ilość i efektywność enzymów trawiennych. Słaba bariera jelitowa warunkuje stosunkowo dużą „prześląkliwość” nabłonka jelit, która ułatwia penetrację nierozłożonych białek z przewodu pokarmowego (jest to *notabene* przyczyną odczynów uczuleniowych i nietolerancji mleka u niemowląt) [4,71]. U noworodków, a szczególnie u wcześniaków, stwierdza się również niedojrzałość nerek, objawiającą się mniejszą liczbą nefronów, małą powierzchnią kłębuszków, krótszymi kanalikami o mniejszej zdolności resorpcyjnej i wydalniczej. U 20% noworodków w pierwszych dniach życia stwierdza się proteinurię, a u 25% glukozurię. W pierwszych tygodniach po urodzeniu odbywa się stałe wydłużanie się nefronu, czemu towarzyszy wzrost objętości cewek [71]. U noworodków nie jest również w pełni rozwinięta bariera krew-mózg oraz krew-płyn mózgowo-rdzeniowy. Tymi faktami można prawdopodobnie wyjaśnić niewielki stopień degradacji enzymatycznej LF w przewodzie pokarmowym noworodka oraz obecność białka w kale, a także możliwość absorpcji nienaruszonych lub częściowo zdegradowanych cząsteczek LF z jelita do krążenia i późniejszą jego obecność w surowicy, płynie mózgowo-rdzeniowym czy moczu.

Obecność prawie nienaruszonych cząsteczek LF matczyngo pochodzenia stwierdzono w moczu przedwcześnie urodzonych noworodków ludzkich [52]. Podaną doustnie ludzką LF wykryto metodą Western-blotting w kale i mo-

czu 2,5- i 5-tygodniowych noworodków z bardzo małą masą urodzeniową, karmionych mlekiem ludzkim wzbogaconym w HLF. Autorzy badań sugerują, że obecność niestrawionej LF można wyjaśnić zarówno brakiem trawienia egzogenego białka jak i uwalnianiem białka endogenego w przewodzie pokarmowym noworodków [35]. Białko wyizolowane z kału za pomocą metod chromatograficznych zachowywało zdolność sekwestracji żelaza, co sugeruje, że spożyta LF jest funkcjonalna i może uzupełniać i/lub wzmacniać aktywność endogennej LF uwalnianej w przewodzie pokarmowym noworodków [103]. Co najmniej 2% spożytej ludzkiej LF reagującej ze swoistymi przeciwciałami (oznaczenie metodą ELISA) wykryto w kale niemowląt w wieku 1,5, 3 oraz 17 miesięcy karmionych mlekiem ludzkim [93]. Co ważne, ilość białka nie zależała od wieku dzieci oraz dodatkowej diety stałej wprowadzanej stopniowo u starszych dzieci. W przypadku zastosowania odżywek wzbogaconych w ludzką lub bydlęcą LF, wysyconych częściowo lub całkowicie żelazem, ilość białka wydalanego z kałem zależała od rodzaju użytej LF. Dla odżywek wzbogaconych w bydlęcą LF ilość ta osiągała nawet 200 mg/dzień [103]. BLF podana doustnie nowo narodzonemu prosiętom pojawiła się w krążeniu, osiągając najwyższe stężenia po 2 h od podania [41]. Badania immunohistochemiczne potwierdziły, iż LF ulegała endocytozie i była transportowana przez komórki nabłonka. Absorbowana do krwi była wykrywana również w żółci (maksymalne stężenie 12 h po podaniu), a stąd reabsorbowana do krwi. Badania te dostarczyły dowodu na istnienie swoistego jelitowo-wątrobowego krążenia LF u noworodków. BLF była również wykrywana w płynie mózgowo-rdzeniowym prosiąt, podobnie jak inne białka (m.in.  $\beta$ -laktoglobulina) zawarte w siarze bydlęcej, którą karmiono zwierzęta [42].

Większa oporność na trawienie i możliwość wchłaniania LF u noworodków może stanowić przykład przystosowania ewolucyjnego, gdzie obecność natywnej postaci białka w jelicie oraz krwi może odgrywać szczególną rolę w ochronie przed infekcjami i rozwoju układu immunologicznego dziecka. Na podstawie dotychczasowych badań trudno stwierdzić, czy wielokierunkowa aktywność biologiczna LF wynika bardziej z jej działania miejscowego na nabłonek i tkanki chłonne związane z jelitem (GALT), czy raczej obejmuje bezpośrednie działanie LF lub jej funkcjonalnych fragmentów na poszczególne tkanki i komórki, co byłoby możliwe po wchłonięciu białka z jelit do krążenia. Koncepcja wspólnego układu odpornościowego błon śluzowych (sformułowana przez Bienenstocka w końcu lat 70 XX w.) zakłada, że kontakt z antygenem w obrębie GALT, dzięki migracji limfocytów do węzłów i grudek chłonnych oraz śledziony, a stąd do innych tkanek limfatycznych związanych ze śluzówkami, powoduje rozwój ogólnoustrojowej odpowiedzi immunologicznej chroniącej również inne tkanki (np. skóry, układu oddechowego czy moczowo-płciowego). Zgodnie z tą teorią, LF działając lokalnie na odpowiedź immunologiczną jelita mogłaby stymulować reakcje systemowe. Potwierdzają to obserwacje, że podana doustnie LF stymulowała zarówno lokalną, związaną z jelitem [23,62], jak i ogólnoustrojową odpowiedź immunologiczną, mierzoną wytwarzaniem niektórych cytokin, indukacją mielopoety, proliferacją komórek immunologicznych i wzrostem ich aktywności [23,62,129]. Dodatkowym potwierdzeniem działania białka na śluzów-



kę jelit jest obecność licznych swoistych receptorów na powierzchni rąbka szczeroczkowego jelita [51,56]. Receptory są również zaangażowane w proces internalizacji białka przez enterocyty i jego absorpcji w jelicie [3,41,79]. Nie można wykluczyć jednakże udziału w aktywności podanej doustnie LF jej bezpośredniego działania na poszczególne tkanki ustroju. Na wielu komórkach (m.in. limfocytach, monocytach, makrofagach, neutrofilach, eozynofilach, komórkach tłuszczowych, komórkach nerwowych, hepatocytach) stwierdzono obecność nieswoistych i/lub swoistych receptorów białka [105]. Oddziałując z tymi strukturami, LF może w niektórych przypadkach ulegać internalizacji do komórek i bezpośrednio wpływać na ich aktywność (m.in. regulując proces transkrypcji genów przez bezpośrednie interakcje z DNA) [45] lub też, nie ulegając internalizacji, może aktywować szlaki wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnałów [24].

#### UDZIAŁ LAKTOFERRYINY W PRYSWAJANIU SKŁADNIKÓW ODŻYWCZYCH

LF obecna w mleku matki ułatwia przyswajanie ważnych składników odżywczych, głównie żelaza, przez organizm dziecka [13,32]. Zgadza się to z faktem, iż biodostępność żelaza z ludzkiego mleka jest niezwykle wysoka – stąd wchłanianie się 50% żelaza, podczas gdy z mleka krowiego jedynie 5% [96]. Przypadki niedoboru tego pierwiastka u dzieci karmionych piersią są rzadkie, co koreluje z dużą zawartością LF w mleku ludzkim w porównaniu do krowiego. Najnowsze badania wskazują, że absorpcja żelaza w jelicie noworodka może zachodzić przez szlak pobierania zależny od receptora HLF [104]. Suzuki i wsp. wykazali znacznie większy pobór żelaza przez ludzkie komórki raka okrężnicy linii Caco-2 transfekowane genem receptora HLF w porównaniu z komórkami kontrolnymi o konstytutywnie niskiej ekspresji receptora [106]. Wykazano również *in vitro* pobór żelaza związanego do LF przez komórki biopłatów dwunastniczych [17]. Swoisty receptor ludzkiej LF zidentyfikowano na komórkach nabłonka jelit płodów ludzkich [56]. Receptor LF znaleziono także na komórkach jelita u wielu gatunków zwierząt: myszy [51], świń [34], królików [77], małp [19]. W badaniach na Caco-2 wykazano ponadto, że LF może wiązać się do receptora na powierzchni nabłonka jelit (od strony szczytowej enterocytów), po czym następuje internalizacja białka, co wskazuje, że LF może być zaangażowana w pobór żelaza ze światła jelita [3]. W przeciwieństwie do LF, transferryna była pobierana od strony podstawobocznej komórek jelita, co wskazuje na jej udział w pozyskiwaniu żelaza z płynów ustrojowych. Jak już wspomniano, znaczna część LF pozostaje niestrawiona w przewodzie pokarmowym noworodka, białko to zatem może ułatwiać absorpcję żelaza. Brak natomiast, jak dotąd, dowodów uzyskanych z badań *in vivo* potwierdzających ten fakt. Istnieją nieliczne badania, w których na podstawie oznaczeń związków związanych z metabolizmem żelaza, udało się wskazać na przypuszczalny udział LF w absorpcji tego pierwiastka. Na modelu zwierzęcym wykazano, że podana *p.o.* wysycona żelazem LF podnosiła hematokryt oraz ilość hemoglobiny u szczurów z indukowaną doświadczalnie anemią dużo skuteczniej niż suplementacja żelaza mineralnego [44]. To wskazuje, iż żelazo skompleksowane z LF wchłania się z jelita dużo łatwiej niż wolne jony. U noworodków/niemowląt karmionych od urodzenia do

6 miesięcy życia mieszankami mleka modyfikowanego, wzbogaconego w bydlęcą LF wykryto zwiększone stężenia osoczowej ferrytyny w 90 i 150 dniu życia w porównaniu z dziećmi żywionymi taką samą mieszanką, ale bez dodatku LF [16]. Dodatek większej ilości LF (100 mg/ml) spowodował większy wzrost stężeń ferrytyny w porównaniu z dodatkiem LF w ilości 10 mg/ml. Może to wskazywać na udział białka w absorpcji żelaza. Nie stwierdzono natomiast wzrostu hematokrytu ani poziomu żelaza i hemoglobiny we krwi dzieci. Ciekawych wyników dostarczyła niewielka próba kliniczna, obejmująca 8 niemowląt w wieku 2–10 miesięcy [20]. Dzieci karmione mlekiem ludzkim pozbawionym LF, a absorpcję żelaza określano pośrednio poprzez pomiar inkorporacji  $Fe^{58}$  do erytrocytów. Jedynie u najmłodszych dzieci stwierdzono istotnie wyższą absorpcję żelaza z pełnego mleka niż mleka pozbawionego LF. Oczywiście trudno wnioskować na podstawie tak mało licznej grupy badanej, ale istnieje możliwość, że LF odgrywa większą rolę we wchłanianiu żelaza tylko u młodszych niemowląt, gdzie duża część białka pozostaje niestrawiona w przewodzie pokarmowym.

Podobne znaczenie może mieć LF ludzka lub bydlęca użyta do wzbogacania mieszanek odżywczych dla niemowląt oraz osób wymagających jego suplementacji (np. niedożywionych, z anemią z niedoboru żelaza, alkoholików itp.) [8,16,32].

Dostarczenie żelaza w postaci skompleksowanej z LF wydaje się znacznie bardziej korzystne niż suplementacja tego mikroelementu w postaci preparatów zawierających jego mineralną postać (np. siarczan żelaza) ze względu na to, iż wolne żelazo dostarczone do przewodu pokarmowego może indukować uszkodzenia jelita przez rodniki tlenowe, powodując m.in. peroksydację tłuszczów [111]. Wolne żelazo jest katalizatorem tzw. reakcji Habera-Weissa (cyklu Fentona) prowadzącej do wytworzenia m.in. najgroźniejszego wśród reaktywnych form tlenu – rodnika hydroksylowego ( $\cdot OH$ ). Może ponadto ułatwiać wzrost zależnej od żelaza patogennej mikroflory jelita [118].

Laktoferryina w ludzkim mleku jest wysycona żelazem jedynie w kilku procentach (<10%), większe ilości pierwiastka związane są do frakcji tłuszczowej i kazeinowej mleka oraz niskomolekularnych chelatorów (cytrynianów) [33,47], chociaż egzogenne żelazo dodane do mleka jest wiązane przez LF. W związku z tym, niektórzy rolę LF w suplementacji żelaza widzą raczej bardziej w sekwestracji egzogenne żelazo dostającego się do jelita noworodka np. z żółcią (a w późniejszym okresie życia także z innymi pokarmami), niż wiązaniu i transporcie żelaza endogenne w mleku [13]. Poprawę suplementacji żelaza można byłoby zatem uzyskać dodając żelazo mineralne do mleka. Jak się jednak okazało, w tym przypadku należy zachować dużą ostrożność, gdyż wysycona żelazem LF (holo-LF) może indukować w makrofagach duże ilości tlenku azotu ( $NO^{\cdot}$ ) [28] – czynnika, który często wiąże się z toksycznymi uszkodzeniami jelita i osłabieniem bariery jelitowej [78], stwierdzanymi również u noworodków [31].

Co ciekawe, część badaczy silnie wiąże wiązanie żelaza przez LF łączy z jego niedostępnością dla jelita noworodka, uznając, że LF nie ma wpływu na jego wchłanianie [30], a niektórzy uważają nawet, iż LF nie tylko nie zwiększa, ale wręcz hamuje absorpcję pierwiastka z diety [40].

LF może wpływać również na wchłanianie innych pierwiastków z pożywienia. We frakcji serwatkowej mleka większość manganu jest związana do LF [69]. W testach *in vitro* z wykorzystaniem pęcherzyków utworzonych z rąbka szczoteczki nabłonka jelita małą stwierdzono zależny od receptora LF pobór Mn związanego do białka, choć powinowactwo LF wysyczonej Mn było niższe niż LF wysyczonej żelazem [18]. Istnieje doniesienie sugerujące, iż LF może ułatwiać transport cynku przez barierę jelitową [1], choć nie udało się potwierdzić takiego działania białka w testach *in vivo*. U niemowląt karmionych przez 6 miesięcy odżywką wzbogaconą w bydlęcą LF nie stwierdzono wzrostu poziomu osoczowego Zn, co podważa udział białka w absorpcji tego mikroelementu [16].

LF obecna w mleku może również ułatwiać absorpcję węglowodanów (glukozy i galaktozy powstałych z hydrolizy laktozy) przez komórki nabłonka jelit, przyczynia się zatem do lepszego wykorzystania składników odżywczych zawartych w diecie [87].

#### LAKTOFERRYNA CHRONI I PROMUJE WZROST TKANEK JELITA

LF stymuluje wzrost i działa ochronnie na nabłonek jelita. Jest to niezwykle istotne ze względu na to, iż jelito bierze udział nie tylko w aktywnym wchłanianiu pożywienia, ale również chroni organizm przed szkodliwym działaniem patogennych bakterii i antygenów pokarmowych.

W testach *in vitro* zaobserwowano, że HLF zwiększa wbudowywanie tymidyny do DNA szczurzych komórek krypt (czyli miejsc, gdzie komórki dzielą się umożliwiając odnowę złuszczonego nabłonka) [84], a działanie to nie zależało od stopnia wysycenia białka żelazem [85]. Ciekawe wyniki dały testy *in vitro*, gdzie HLF dodana do mieszanek używanych do żywienia niemowląt z nietolerancją pokarmów związaną z atrofią śluzówki jelita, zwiększała proliferację szczurzych komórek krypt o 35% ponad grupę kontrolną [83]. Te same badania wykazały, że odżywki bez dodatku LF nie tylko nie stymulowały, ale wręcz hamowały proliferację tych komórek (14% hamowania dla mieszanek na bazie modyfikowanego mleka krowiego, 30% dla mieszanek sojowych i 45% dla mieszanek opartych o hydrolizowaną kazeinę). LF podawana przewlekłe stymulowała wzrost jelita u mysich noworodków ssących transgeniczne matki wydzielające HLF w mleku: zwiększała masę i (w mniejszym stopniu) długość jelita cienkiego, co było związane ze wzrostem masy śluzówki jelita [124]. Jelita myszy karmionych HLF wytwarzały również więcej maltazy, a mniej laktazy, wykazywały zatem większy stopień dojrzałości. Podawana łącznie z witaminą A nowo narodzone cielec stymulowała wzrost jelita cienkiego i okrężnicy (stymulowała dojrzewanie nabłonka i grudek chłonnych jelita) [100]. Dojrzewanie śluzówki jelita pod wpływem LF mogłoby ograniczyć infekcje związane z translokacją bakterii z jelita do krwi, a także ograniczyć rozwój alergii pokarmowych u dzieci, które w tym wieku są szczególnie częste i wynikają z niedojrzałości tkanki limfatycznej przewodu pokarmowego, słabości bariery nabłonkowo-śluzowej i małej efektywności enzymów trawiennych u niemowląt. LF może więc promować zarówno wzrost jak i dojrzewanie jelita, co wskazuje na możliwość jej zastosowania jako czynnika terapeutycznego u przed-

wczesnie urodzonych dzieci, a także u osób cierpiących na choroby jelit powodujące uszkodzenia śluzówki.

#### LAKTOFERRYNA WPŁYWA NA USTALENIE PRAWIDŁOWEGO SKŁADU MIKROFLORY JELITA

LF ogranicza rozwój mikroflory patogennej oraz promuje wzrost flory fizjologicznej, która dodatkowo chroni przed zakażeniami mikroorganizmami patogennymi oraz nadmiernym wzrostem mikroorganizmów komensalnych (np. drożdżaków, pałeczek okrężnicy, gronkowców). Badania na myszach dostarczyły dowodów na hamowanie przez LF nadmiernego wzrostu patogennych bakterii w jelicie, głównie enterobakterii i gronkowców, bez jednoczesnego ujemnego wpływu na bakterie symbiotyczne [108]. Na modelu mysim wykazano hamowanie infekcji *Helicobacter pylori* przez LF bydlęcą (ale nie ludzką) i *Helicobacter felis* przez LF ludzką [25,116] oraz *Clostridium sp.* przez LF bydlęcą [109]. Duże ilości LF w mleku ludzkim hamują wzrost zależnych od żelaza bakterii z rodzajów: *Bacteroides*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Salmonella* i *Staphylococcus* w jelicie noworodków [118]. LF może również działać bakteriostatycznie na patogenne bakterie jelitowe w sposób niezależny od sekwestracji żelaza. Podana doustnie myszom zwiększała absorpcję węglowodanów zawartych w diecie, ograniczając ich dostępność dla bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* obecnych w jelicie i, w efekcie, działając bakteriostatycznie [87]. Laktoferryina ogranicza zasiedlenie przewodu pokarmowego przez mikroflorę patogenną utrudniając adhezję enteropatogennych bakterii do komórek nabłonka jelitowego [21,22]. Bakterie te (głównie enteropatogenne *E. coli*) stanowią główną przyczynę biegunek u małych dzieci. LF wiąże się do fimbrialnych adhezyn bakterii i uniemożliwia im kolonizację nabłonka, co stanowi pierwszy etap infekcji. Podobne do LF właściwości blokowania adhezji bakterii do nabłonka jelita mają inne składniki mleka: przeciwciała IgA oraz wolny komponent wydzielniczy (glikoproteina stabilizująca IgA). Wszystkie one pełnią rolę ochronną przeciwko zakażeniom enteropatogenami u dzieci karmionych piersią. Laktoferryina w ludzkim mleku hamuje również nadmierny rozwój mikroflory grzybiczej w jelicie. Ta aktywność wydaje się związana jedynie z zawartością apo-LF; dodatek żelaza ją znosi [2].

Noworodki karmione piersią (bez dodatkowej suplementacji żelaza) rozwijają dominującą naturalną mikroflorę jelita składającą się głównie z niepatogennych bakterii kwasu mlekowego (*Lactobacillus*) i *Bifidobacterium* [117]. Pierwotna kolonizacja jelita noworodka przez bakterie zasiedlające pochwę i odbył matki powstaje już podczas porodu. Dalsze zasiedlanie odbywa się w pierwszych godzinach życia, a na jego przebieg duży wpływ ma karmienie piersią. Zapewnia ono dziecku odpowiednią dietę, ale pozwala również na bezpośredni fizyczny kontakt z matką. Codzienna pielęgnacja dziecka ułatwia kolonizację jelita przez korzystne bakterie jelitowe kolonizujące przewód pokarmowy matki. Podczas ssania dziecko otrzymuje bakterie zasiedlające sutek i skórę matki, a mleko ludzkie stwarza optymalne warunki do ich dalszego namnażania. Czynniki, które istotnie mogą zaburzyć proces kolonizacji jelita dziecka to przedwczesny poród oraz sztuczne żywienie. Przedwczesny poród często wymaga umieszczenia dziecka w inkubatorze na oddziale intensywnej terapii, unie-



możliwiając bliski kontakt noworodka z matką i sprzyjając zasiedleniu jelit przez bakterie bytujące na oddziale szpitalnym. Często początkowo nie jest również możliwe naturalne żywienie dziecka. W przeciwieństwie do zdrowych dzieci karmionych mlekiem matki, u wcześniaków i noworodków żywionych sztucznie, mikroflora jelit jest zdominowana przez bakterie z rodzajów *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Bacteroides* i *Escherichia* [120], drobnoustroje potencjalnie patogenne. Bakterie kwasu mlekowego i bifidobakterie zapewniają liczne korzyści organizmowi gospodarza: wytwarzają kwasy organiczne obniżające pH w jelitach, dostarczają składników odżywczych i wzrostowych komórkom nabłonka okrężnicy, redukują poziom cholesterolu w surowicy, eliminują karcynogeny, wytwarzają witaminę K i B, zapobiegają biegunkom i zaparciom. Zwalczają mikroflorę patogenną poprzez współzawodnictwo o składniki pokarmowe, kompetycję o wiązanie się z receptorami na powierzchni komórek nabłonka (uniemożliwiając patogenom przyleganie do tych komórek, co stanowi wstępny etap zakażenia), stymulację wytwarzania naturalnych przeciwciał reagujących krzyżowo z komórkami patogenów. Naturalna mikroflora jelit wzmacnia ponadto odporność: zwiększa aktywność komórek NK, limfocytów T i makrofagów oraz promuje wytwarzanie przeciwciał [81]. Niedawne badania wskazują ponadto, iż większe ilości *Bifidobacterium* w jelicie obniżają ryzyko rozwoju chorób atopowych u dzieci z grup wysokiego ryzyka (ze stwierdzonym występowaniem atopii w rodzinie) [54].

Wzrost potencjalnie patogennej flory jelita jest ograniczany przede wszystkim przez niskie pH jelita ustalone przez dominację naturalnej mikroflory oraz współzawodnictwo o składniki odżywcze. Kolonizację jelit przez korzystną mikroflorę ułatwiają specyficzne wymagania tych bakterii w zakresie żelaza. *Lactobacillus* nie potrzebuje żelaza do swojego wzrostu, wykorzystując mangan i kobalt [119]. W świetle tych danych ciekawe jest, że tylko LF wysyczona w różnym stopniu żelazem (naturalna i holo-LF) promowała wzrost *L. acidophilus* w testach *in vitro* [57]. Możliwe jest, że nie odgrywa tutaj roli dostarczanie bakteriom jonów  $Fe^{3+}$ , ale raczej zmiany konformacyjne występujące w cząsteczce LF po ich związaniu. Podobną aktywność wykazano dla hydrolizatów pepsynowych i trypsynowych białka [57]. Wzrost *Lactobacillus* obniża pH w jelicie grubym do 5,0, podczas gdy wartość ta u dzieci karmionych odżywkami wynosi 5,9–8,2 [117]. *Bifidobacterium* wymaga wprawdzie do wzrostu żelaza, ale nabywa je wykorzystując unikalny system pozyskiwania tego pierwiastka, który może funkcjonować przy pH 5,0 i używać żelaza związanego do LF [80]. Stymulację wzrostu różnych szczepów *Bifidobacterium* uzyskano *in vitro* wzbogacając medium hodowlane m.in. w różne składniki wyizolowane z ludzkiego i krowiego mleka [57,90]. Oprócz LF wzrost bakterii promowała  $\alpha$ -laktoalbumina i składniki cukrowe mleka (N-acetylglukozamina) oraz mucyny jelitowe [90]. Co ciekawe, *Bifidobacterium* jest jednym z nielicznych rodzajów bakterii, które są bardzo odporne na bakteriobójcze działanie LF i jej fragmentów [7]. Na powierzchni oraz wewnątrz komórek tych bakterii wykryto licznie występujące białka wiążące LF, co może mieć znaczenie zarówno w ochronie przed bakteriobójczym działaniem LF, jak i w promowaniu przez LF wzrostu tych bakterii [58]. Korzystny wpływ na ustalanie się flory jelitowej u noworodków potwierdzono również w badaniach przedklinicz-

nych i klinicznych. Badania na noworodkach szczurzych, które zakażano *Lactobacillus* oraz *E. coli* i pocono roztworem LF wykazały, że LF wprawdzie nie stymulowała wzrostu *Lactobacillus*, ale zastosowana łącznie z tymi bakteriami znacznie ograniczała zakażenie *E. coli* [102]. Szczury otrzymujące LF i *Lactobacillus* miały ponadto lepiej rozwiniętą tkankę chłonną jelita, co sugeruje, że kombinacja obu czynników (ale żaden z nich z osobna) może przyspieszać dojrzewanie GALT. Wcześniej podanie takiej kombinacji łagodziło ponadto związane z infekcją *E. coli* zmiany zapalne w jelicie. Wyniki te sugerują, że LF użyta łącznie z *Lactobacillus* może chronić przed inwazją patogennych bakterii jelitowych i związanym z tym zapaleniem jelit. LF stymulowała wzrost bifidobakterii u myszy germ-free inokulowanych doustnie symbiotyczną mikroflorą wyizolowaną z kału noworodków [46]. Podobną aktywność LF wykazała u noworodków ludzkich, choć w tym przypadku znaczną przewagę *Bifidobacterium* w jelitach uzyskano dopiero po 3 miesiącach stosowania mieszanek mlecznych wzbogaconych w LF [95]. Niektórzy badacze stosunkowo małą efektywność LF w regulacji mikroflory jelit noworodków wiążą z brakiem innych składników w mieszankach, takich jak np. sIgA, lizozymu, cytrynianu czy dwuwęglanów, które mogą działać aktywnie lub synergistycznie z LF [120]. W najnowszych badaniach (próbą randomizowana obejmująca 102 noworodków) wykazano jednak dużą skuteczność karmienia mieszankami mlecznymi wzbogaconymi w częściowo zhydrolizowane białka serwatkowe w ustalaniu korzystnej mikroflory jelitowej [99]. U dzieci karmionych takimi mieszankami stwierdzono znacznie większe ilości bifidobakterii w kale niż w grupie noworodków otrzymujących standardowe mieszanki. Karmienie niemowląt mieszankami wzbogaconymi w białka serwatkowe łagodziło objawy niemowlęcej kolki jelitowej [72], co można również uznać za wskaźnik ustalenia mikroflory jelitowej sprzyjającej lepszemu trawieniu pokarmu. U dzieci żywionych takimi mieszankami incydenty płaczu (miara nasilenia kolki) stały się znacznie rzadsze w porównaniu do grupy kontrolnej otrzymującej standardowe mieszanki.

Bakterie kwasu mlekowego i bifidobakterie mogą się znajdować w pożywieniu (głównie w fermentowanych przetworach mlecznych) lub gotowych preparatach farmaceutycznych i tą drogą mogą być dostarczane do przewodu pokarmowego [50]. Bakterie te zalicza się do tzw. probiotyków (żywe drobnoustroje, które podawane w pożywieniu wywierają korzystny wpływ na organizm przez regulację równowagi mikroflory jelitowej i inne oddziaływanie). Substancje zawarte w pożywieniu, nieulegające trawieniu i wchłanianiu w jelicie cienkim, a promujące wzrost wspomnianych drobnoustrojów w jelicie grubym nazywane są prebiotykami. Do tej grupy związków zalicza się m.in. laktulozę, inulinę i galaktooligosacharydy. Za prebiotyk można też uznać powszechną w mleku ludzkim laktozę, która jest słabo trawiona, ale odgrywa niezwykle ważną rolę w stymulacji rozwoju naturalnej flory jelitowej dziecka. Synbiotyki natomiast zawierają probiotyki i prebiotyki. U niemowląt nie zaleca się uzupełniania diety w jogurty i kefir oparte na mleku krowim ze względu na możliwość pojawienia się alergii na składniki mleka krowiego. U najmłodszych dzieci możliwa jest suplementacja bakterii probiotycznych i prebiotyków w postaci preparatów farmaceutycznych oraz wzbogaconych w nie

odżywek mlecznych. Firma Nestle wprowadziła na polski rynek modyfikowane mleko następne (NAN 2 Bifidus i Junior Bifidus) oraz kaszki wzbogacone w bakterie probiotyczne, a firma Nutricia modyfikowane mleko początkowe i następne (Bebiko Omneo i Bebilon) z dodatkami prebiotycznych oligosacharydów.

#### LAKTOFERYNA CHRONI PRZED TRANSLOKACJĄ BAKTERII JELITOWYCH I ROZWOJEM BAKTERIEMII ORAZ ENDOTOKSEMII

Szczególne znaczenie należy przypisać LF w ochronie jelita podczas zakażenia ogólnego i bakteriemii/endotoksemii. Ochrona w postaci błony śluzowej jelita stanowi podstawowy element w zapobieganiu przechodzeniu bakterii z jelita do krwi. Mechanizmy odpornościowe jelita noworodka (a szczególnie wcześniaka) różnią się znacznie od tych u starszych niemowląt, dzieci i dorosłych [27,37,74]. Poszczególne ich elementy, które powstrzymują translokację bakterii z jelita do krążenia (m.in. warstwa śluzu pokrywająca nabłonek, wydzielnicze IgA, naturalne antybiotyki peptydowe, komórki odpornościowe i zorganizowana tkanka immunologiczna w blaszce właściwej śluzówki jelita) po urodzeniu są w znacznym stopniu niedojrzałe i dopiero wraz z wiekiem podlegają ostatecznemu ukształtowaniu. W związku z tym u noworodków ułatwione jest przechodzenie bakterii do krążenia i związane z tym uogólnione zakażenia. Z tego faktu, po części, wynika duża podatność noworodków na rozwój ostrych zakażeń z tendencją do przechodzenia w zakażenia ogólne i sepsę (ich częstość waha się w przedziale 1–5/1000 urodzeń, z 30–50% śmiertelnością) [92]. Najgroźniejsze są zakażenia wcześniaków z bardzo małą masą urodzeniową. Stanowią one przyczynę prawie 45% przypadków późnych zgonów na neonatologicznych oddziałach intensywnej opieki.

Profilaktyczną i leczniczą rolę LF w endogennej bakteriemii i/lub endotoksemii (związanej z translokacją bakterii jelitowych do krążenia) potwierdzono w wielu doświadczeniach na zwierzętach.

Model zwierzęcy służący do badania tego zjawiska uzyskuje się, gdy dorosłe myszy karmi się mlekiem krowim, czemu towarzyszy silne namnożenie patogennych bakterii w jelicie. Dodatek BLF do mleka istotnie je hamował, co było spowodowane hamowaniem nadmiernego wzrostu jelitowych bakterii patogennych (głównie enterobakterii i gronkowców), ale nie symbiotycznych [108]. Regulacja składu mikroflory przewodu pokarmowego noworodka jest niezwykle istotna ze względu na to, iż translokacja bakteryjna może być indukowana jedynie przerostem patogennej mikroflory jelitowej wynikającym z zaburzenia równowagi ekologicznej jelita, bez istotnego uszkodzenia jego funkcji i upośledzenia odporności [108].

Podawana doustnie LF zapobiegała rozwojowi bakteriemii związanej z translokacją bakterii jelitowych u noworodków szczurzych po dojelitowym podaniu *E. coli* [28]. We krwi zwierząt otrzymujących LF stwierdzono tysiąckrotnie, a w wątrobie dwukrotnie mniej CFU (colony forming units) bakterii w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi. Efekt taki wynikał zarówno z bezpośredniego wpływu białka na redukcję liczby bakterii w jelicie, jak i z pośredniego działania aktywującego makrofagi rezydujące w ścianie jelita i wątrobie. LF *in vitro* razem z lizozymem była bakterio-

bójca (co odpowiada sytuacji *in vivo*: lizozym jest uwalniany w jelicie oraz obecny w mleku matki i może wykazywać synergistyczną aktywność z endogenną i egzogenną LF). Stymulowała ponadto uwalnianie zwiększonych ilości NO<sup>o</sup> oraz TNF- $\alpha$  przez makrofagi, czyniąc je zatem bardziej skutecznymi w zabijaniu drobnoustrojów. Należy zauważyć, iż ta grupa fagocytów odgrywa główną rolę w zapobieganiu translokacji bakterii z jelita [27]. LF podana doustnie nie ulega całkowitemu strawieniu w przewodzie pokarmowym noworodka, a jelito jest przepuszczalne dla białka. Poza miejscowym działaniem bakteriobójczym i immunoregulatorowym w przewodzie pokarmowym, LF może zatem przechodzić z jelita do krążenia i zmniejszać toksyczne skutki translokacji bakterii jelitowych do krwi i innych narządów. BLF zastosowana doustnie zmniejszała śmiertelność nowo narodzonych prosiat, którym dożylnie podano endotoksynę (czyli w modelu już istniejącej endotoksemii), co było związane z blokowaniem wiązania LPS do monocytów/makrofagów i prawdopodobnym hamowaniem wytwarzania cytokin prozapalnych [66]. LF oraz wydzielnicze IgA zawarte w ludzkim mleku hamowały indukowane endotoksyną uwalnianie cytokin prozapalnych przez komórki jelita, przyczyniając się do złagodzenia zapalenia [39]. LF podana w diecie, działając immunoregulacyjnie, miała protekcyjny wpływ na rozwój zapalenia okrężnicy u szczurów [110]. LF zapobiegała również wystąpieniu szoku septycznego u myszy po dożylnym podaniu *E. coli* [123] oraz wykazała ochronny wpływ w endotoksemii indukowanej LPS [60,61,73,126]. Ochronne działanie LF wynika z regulacji wytwarzania/uwalniania cytokin i innych czynników uczestniczących w odpowiedzi zapalnej – hamowania czynników prozapalnych (m.in. TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-8, histaminy, reaktywnych form tlenu) oraz stymulowania czynników antyzapalnych (m.in. IL-10, IL-4 i IL-6) [59,60,61,73,126]. Znaczenie może mieć również aktywacja układu siateczkowo-śródbłonkowego (monocytowo-makrofagowego) [123] oraz stymulacja mielopozy [125] i aktywacja granulocytów obojętnochłonnych [89], niezwykle ważnego składnika odporności wrodzonej stanowiącego „pierwszą linię obrony” ustroju podczas zakażeń. Inny mechanizm protekcyjnego działania białka może wiązać się z ochroną jelita. W endotoksemii po podaniu LPS białko podane różnymi drogami (*p.o.*, *i.p.* oraz *i.v.*) wyraźnie chroniło warstwę nabłonka jelitowego, a szczególnie jego spójność w obrębie warstwy kosmków jelitowych oraz stymulowało wytwarzanie śluzu, ograniczało zatem translokację bakterii i rozwój sepsy [59,61]. Podobne działanie LF wykazała w eksperymentalnie indukowanym zapaleniu jelita grubego u szczurów [110] i myszy [43].

#### LAKTOFERYNA STYMULUJE ROZWÓJ UKŁADU IMMUNOLOGICZNEGO NOWORODKA

Układ odpornościowy noworodka w porównaniu z osobnikami dorosłymi jest niedojrzały. Wiąże się to z jednej strony z niedorozwojem układu limfatycznego (dla przykładu struktura śledziona i węzłów chłonnych wykształca się dopiero w pierwszych miesiącach po urodzeniu) i niedostatecznym rozwojem systemów naturalnej odporności wrodzonej (mniejsza aktywność wykazują monocyty/makrofagi, komórki NK i neutrofile, obniżony jest poziom składników dopełniacza). Drugą przyczyną niedojrzałości immunologicznej noworodka jest sterylność środowiska wewnątrzmacicznego, co utrudnia nabywanie kompetencji immunologicznej w wyniku kontaktu z antygenami zewnętrznymi [71].





Laktoferryina podana w diecie, jak już wspomniano, może stymulować rozwój zarówno swoistych, jak i nieswoistych mechanizmów obronnych jelita oraz odporności systemowej. Dzieje się to poprzez stymulację syntezy nieswoistych przeciwciał IgA oraz IgG w jelicie, stymulację uwalniania niektórych cytokin przez komórki nabłonka i odpornościowe jelita, wzrost liczby oraz aktywację komórek B, T i NK w jelicie, śledzionie oraz krwi obwodowej [23,62,129]. LF stymuluje dojrzewanie limfocytów. Wykazano, że LF działa na prekursorowe komórki T w grasicy powodując nabycie przez nie fenotypu komórek pomocniczych (Th) CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> [127]. LF promowała też dojrzewanie limfocytów B izolowanych ze śledziony nowo narodzonych myszy [128]. LF zwiększa również aktywność cytotoksyczną komórek NK i LAK, która po urodzeniu jest znacznie mniejsza niż w późniejszym okresie życia [48,101]. Może to w oczywisty sposób wpływać na proces dojrzewania układu immunologicznego noworodka.

Nie można zapomnieć o szerokich właściwościach przeciwmikrobiologicznych białka i jego pochodnych. Dzięki nim LF staje się „sprzymierzeńcem” układu immunologicznego w walce z zakażeniami i przyczynia się do ochrony nie tylko jelita, ale wszystkich tkanek szczególnie narażonego na infekcje organizmu noworodka [88].

#### LAKTOFERRYNA CHRONI PRZED STRESEM OKSYDACYJNYM

LF jako antyoksydant [10], może chronić nie tylko tkanki jelita i system immunologiczny, ale również cały rozwijający się organizm noworodka (który jest szczególnie podatny na uszkodzenia tlenowe) przed toksycznością reaktywnych form tlenu (głównie podczas infekcji) [36]. Schorzenia takie jak krwotoki dojamowe, retinopatia wcześniacza, dysplazja oskrzeli i płuc oraz nekrotyczne zapalenie jelit są częste u przedwczesnie urodzonych noworodków, a w ich patogenezie duży udział mają reaktywne formy tlenu (RFT). Uszkodzenia tlenowe u tych dzieci wynikają głównie z niedojrzałości systemów antyoksydacyjnych organizmu. Żelazo do diety wcześniaków wprowadza się stosunkowo wcześnie, by uzupełnić niedobory pierwiastka związane z erytropoezą i szybkim wzrostem organizmu. Stosowanie u takich noworodków pokarmu naturalnego lub odżywek wzbogaconych w żelazo stanowi niebezpieczeństwo powstawania dużych ilości RFT i związanych z nimi uszkodzeń. Jak się okazało, naturalne mleko ludzkie (nie wzbogacone w żelazo) w układzie *in vitro* indukuje wytwarzanie bardzo niewielkich ilości RFT [94]. Mleko wzbogacone w żelazo, a szczególnie odżywki oparte na modyfikowanych białkach mleka krowiego suplementowane żelazem, mają duży potencjał do tworzenia rodników, w tym bardzo groźnych <sup>•</sup>OH i produktów peroksydacji lipidów. Dodatek LF (szczególnie postaci apo-) w znacznym stopniu redukuje ilość tworzonych RFT, co najprawdopodobniej należy łączyć ze zdolnością białka do sekwestracji żelaza (następstwo działania holo-LF było wyraźnie mniejsze). Powyższe wyniki potwierdzono *in vivo*: suplementacja żelaza w diecie szczerów znacznie zwiększała tworzenie RFT [53], a dodatek LF zapewniał ochronę przed uszkodzeniem jelita powodowanym przez te związki [86]. Hamując uwalnianie tlenu azotu (cząsteczka zaliczana do RFT) LF może przyspieszyć dojrzewanie układu immunologicznego noworodków. NO<sup>•</sup> i jego pochodne są zaangażowane w postaktywacyjną śmierć apoptotyczną limfocytów T, która

redukuje liczbę długo żyjących komórek pamięci T CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> [114]. Zjawisko większej podatności na śmierć aktywowanych komórek jest indukowane przez syntezę tlenu azotu, a modulacja tego szlaku może zwiększyć liczbę komórek pamięci zdolnych do odpowiedzi proliferacyjnej po ponownym kontakcie z antygenem.

W świetle przedstawionych danych nie są zaskakujące wyniki badań porównawczych niemowląt karmionych mlekiem matki (a więc dużą dawką LF) oraz syntetycznymi odżywkami niezawierającymi białka. W badaniach tych wykazano istotny wzrost odporności na infekcje bakteryjne przewodu pokarmowego [13,49], innych narządów oraz zakażenia uogólnione i szok septyczny [38,91] u dzieci karmionych piersią, choć oczywisty jest udział również innych składników obecnych w mleku (np. przeciwciał, niektórych cytokin, komórek odpornościowych, lizozymu, pochodnych kazeiny i innych) [37,75,99]. Najnowsze badania wskazują również, że karmienie piersią zmniejsza ryzyko zachorowania dzieci na różnego rodzaju choroby alergiczne, łącznie z alergią pokarmową [38]. Użyte w karmieniu niemowląt białka mleka ludzkiego (w tym LF) nie mają, jako składniki zgodne gatunkowo, właściwości immunogennych. Hamowaniu natomiast nadmiernej reakcji immunologicznej na nieszkodliwe antygeny pokarmowe sprzyja TGF-β (transformujący czynnik wzrostu), obecny w mleku ludzkim. Właściwości przeciwalergiczne ma również LF [29].

Opracowanie skutecznych i wydajnych technik izolacji białek (w tym LF) z mleka krowiego oraz syntezy rekombinacyjnej ich ludzkich postaci pozwala wzbogacać w te składniki mieszanki dla niemowląt, dzięki czemu noworodki, które z różnych powodów nie mogą być karmione piersią, otrzymują w diecie ważne dla ich rozwoju białka. Taka suplementacja pozwala na prawidłowy rozwój jelita (i innych organów) noworodków, szczególnie wcześniaków, co poprawia przeżycie i zmniejsza zapadalność na różne choroby u tych dzieci. Mleko krowie istotnie różni się zawartością niektórych składników ważnych dla rozwoju i obronności noworodka od mleka ludzkiego. Dla przykładu mleko krowie ma znacznie mniej lizozymu i immunoglobulin (są to głównie IgG o mniejszym znaczeniu ochronnym), a o wiele więcej kazeiny. Mniejsza jest w mleku krowim zawartość LF: podczas gdy stanowi ona około 15% całkowitej zawartości białek mleka ludzkiego, w mleku krowim jest to jedynie około 0,3%. Mleko krowie zawiera trzykrotnie więcej soli mineralnych niż mleko ludzkie, co stanowi duże i niebezpieczne obciążenie nerek noworodka i niemowlęcia. Powyższe dane wskazują, że mleko krowie w swojej naturalnej postaci nie nadaje się do żywienia najmłodszych dzieci, a może wręcz stanowić zagrożenie dla zdrowia i życia dziecka. Z tego względu zostało zastąpione przetworami mlecznymi na bazie mleka krowiego modyfikowanego, tak, by w zakresie aktualnych możliwości technologicznych, upodobnić je do mleka matki. Zmiany te obejmują m.in. zmniejszenie ilości białek w ogóle i kazeiny na korzyść białek serwatkowych, zmianę tłuszczu zwierzęcego na olej roślinny, eliminację soli mineralnych. W niektórych krajach (USA, Japonia) do przetworów mlecznych dla niemowląt dodaje się również laktoferryinę. W Polsce nie jest dostępne mleko modyfikowane wzbogacone w dodatkowe ilości LF (ponad te obecne w sposób naturalny w mleku krowim). W świetle przedstawionych danych taka suplementacja (najlepiej w białko ludzkie) wydaje się jednak uzasadniona.

Należy podkreślić, iż na podstawie dotychczas przeprowadzonych badań przedklinicznych i klinicznych (w tym również dotyczących noworodków i niemowląt oraz starszych dzieci) suplementacja diety w LF wydaje się cał-

kowiec bezpieczna. Podawanie białka nawet w dużych dawkach (2–7 mg/osobę/dzień) było dobrze tolerowane i nie wiązało się z wystąpieniem żadnych działań niepożądanych.

## PIŚMIENICTWO

- [1] Ainscough E.W., Brodie A.M., Plowman J.E.: Zinc transport by lactoferrin in human milk. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1980; 33: 1314–1315
- [2] Andersson Y., Lindquist S., Lagerqvist C., Hernell O.: Lactoferrin is responsible for the fungistatic effect of human milk. *Early Hum. Dev.*, 2000; 59: 95–105
- [3] Ashida K., Sasaki H., Suzuki Y.A., Lonnerdal B.: Cellular internalization of lactoferrin in intestinal epithelial cells. *Biometals*, 2004; 17: 311–315
- [4] Axelsson I., Jakobsson I., Lindberg T., Polberger S., Benediktsson B., Raiha N.: Macromolecular absorption in preterm and term infants. *Acta Paediatr. Scand.*, 1989; 78: 532–537
- [5] Bagby G.C.Jr., Rigas V.D., Bennett R.M., Vandenbark A.A., Garewal H.S.: Interaction of lactoferrin, monocytes, and T lymphocyte subsets in the regulation of steady-state granulopoiesis *in vitro*. *J. Clin. Invest.*, 1981; 68: 56–63
- [6] Baveye S., Ellass E., Mazurier J., Spik G., Legrand D.: Lactoferrin: a multifunctional glycoprotein involved in the modulation of the inflammatory process. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 1999; 37: 281–286
- [7] Bellamy W., Takase M., Wakabayashi H., Kawase K., Tomita M.: Antibacterial spectrum of lactoferrin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *J. Appl. Bacteriol.*, 1992; 73: 472–479
- [8] Bethell D.R., Huang J.: Recombinant human lactoferrin treatment for global health issues: iron deficiency and acute diarrhea. *Biometals*, 2004; 17: 337–342
- [9] Brines R.D., Brock J.H.: The effect of trypsin and chymotrypsin on the *in vitro* antimicrobial and iron-binding properties of lactoferrin in human milk and bovine colostrum. Unusual resistance of human apolactoferrin to proteolytic digestion. *Biochim. Biophys. Acta*, 1983; 759: 229–235
- [10] Britigan B.E., Serody J.S., Hayek M.B., Charniga L.M., Cohen M.S.: Uptake of lactoferrin by mononuclear phagocytes inhibits their ability to form hydroxyl radical and protects them from membrane auto-oxidation. *J. Immunol.*, 1991; 147: 4271–4277
- [11] Britton J.R., Koldovsky O.: Gastric luminal digestion of lactoferrin and transferrin by preterm infants. *Early Hum. Dev.*, 1989; 19: 127–135
- [12] Brock J.: Lactoferrin: a multifunctional immunoregulatory protein? *Immunol. Today*, 1995; 16: 417–419
- [13] Brock J.H.: Lactoferrin in human milk: its role in iron absorption and protection against enteric infection in the newborn infant. *Arch. Dis. Child.*, 1980; 55: 417–421
- [14] Bullen J.J., Rogers H.J., Leigh L.: Iron-binding proteins in milk and resistance to *Escherichia coli* infection in infants. *Br. Med. J.*, 1972; 1: 69–75
- [15] Butte N.F., Goldblum R.M., Fehl L.M., Loftin K., Smith E.O., Garza C., Goldman A.S.: Daily ingestion of immunologic components in human milk during the first four months of life. *Acta Paediatr. Scand.*, 1984; 73: 296–301
- [16] Chierici R., Sawatzki G., Tamisari L., Volpato S., Vigi V.: Supplementation of an adapted formula with bovine lactoferrin. 2. Effects on serum iron, ferritin and zinc levels. *Acta Paediatr.*, 1992; 81: 475–479
- [17] Cox T.M., Mazurier J., Spik G., Montreuil J., Peters T.J.: Iron binding proteins and influx of iron across the duodenal brush border. Evidence for specific lactotransferrin receptors in the human intestine. *Biochim. Biophys. Acta*, 1979; 588: 120–128
- [18] Davidson L.A., Lonnerdal B.: Fe-saturation and proteolysis of human lactoferrin: effect on brush-border receptor-mediated uptake of Fe and Mn. *Am. J. Physiol.*, 1989; 257: G930–G934
- [19] Davidson L.A., Lonnerdal B.: Specific binding of lactoferrin to brush-border membrane: ontogeny and effect of glycan chain. *Am. J. Physiol.*, 1988; 254: G580–G585
- [20] Davidsson L., Kastenmayer P., Yuen M., Lonnerdal B., Hurrell R.F.: Influence of lactoferrin on iron absorption from human milk in infants. *Pediatr. Res.* 1994; 35: 117–124
- [21] de Araujo A.N., Giugliano L.G.: Lactoferrin and free secretory component of human milk inhibit the adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *BMC Microbiol.*, 2001; 1: 25
- [22] de Oliveira I.R., de Araujo A.N., Bao S.N., Giugliano L.G.: Binding of lactoferrin and free secretory component to enterotoxigenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2001; 203: 29–33
- [23] Debbabi H., Dubarry M., Rautureau M., Tome D.: Bovine lactoferrin induces both mucosal and systemic immune response in mice. *J. Dairy Res.*, 1998; 65: 283–293
- [24] Dhennin-Duthille I., Masson M., Damiens E., Fillebeen C., Spik G., Mazurier J.: Lactoferrin upregulates the expression of CD4 antigen through the stimulation of the mitogen-activated protein kinase in the human lymphoblastic T Jurkat cell line. *J. Cell Biochem.*, 2000; 79: 583–593
- [25] Dial E.J., Romero J.J., Headon D.R., Lichtenberger L.M.: Recombinant human lactoferrin is effective in the treatment of *Helicobacter felis*-infected mice. *J. Pharm. Pharmacol.*, 2000; 52: 1541–1546
- [26] Drescher K., Roos N., Pfeuffer M., Seyfert H.M., Schrezenmeier J., Hagemeyer H.: Recovery of 15N-lactoferrin is higher than that of 15N-casein in the small intestine of suckling, but not adult miniature pigs. *J. Nutr.*, 1999; 129: 1026–1030
- [27] Duffy L.C.: Interactions mediating bacterial translocation in the immature intestine. *J. Nutr.*, 2000; 130(Suppl.2S): 432S–436S
- [28] Edde L., Hipolito R.B., Hwang F.F., Headon D.R., Shalwitz R.A., Sherman M.P.: Lactoferrin protects neonatal rats from gut-related systemic infection. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2001; 281: G1140–G1150
- [29] Elrod K.C., Moore W.R., Abraham W.M., Tanaka R.D.: Lactoferrin, a potent tryptase inhibitor, abolishes late-phase airway responses in allergic sheep. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1997; 156: 375–381
- [30] Fairweather-Tait S.J., Balmer S.E., Scott P.H., Minski M.J.: Lactoferrin and iron absorption in newborn infants. *Pediatr. Res.*, 1987; 22: 651–654
- [31] Ford H., Watkins S., Reblock K., Rowe M.: The role of inflammatory cytokines and nitric oxide in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *J. Pediatr. Surg.*, 1997; 32: 275–282
- [32] Fransson G.B., Keen C.L., Lonnerdal B.: Supplementation of milk with iron bound to lactoferrin using weanling mice: effects on hematology and tissue iron. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 1983; 2: 693–700
- [33] Fransson G.B., Lonnerdal B.: Iron in human milk. *J. Pediatr.*, 1980; 96: 380–384
- [34] Gislason J., Iyer S., Douglas G.C., Hutchens T.W., Lonnerdal B.: Binding of porcine milk lactoferrin to piglet intestinal lactoferrin receptor. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1994; 357: 239–244
- [35] Goldman A.S., Garza C., Schanler R.J., Goldblum R.M.: Molecular forms of lactoferrin in stool and urine from infants fed human milk. *Pediatr. Res.*, 1990; 27: 252–255
- [36] Goldman A.S., Goldblum R.M., Hanson L.A.: Anti-inflammatory systems in human milk. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1990; 262: 69–76
- [37] Hanson L.A., Brinton C., Carlsson B., Dahlgren U., Mellander L., Sutton A., Soderstrom T.: The mucosal immune response in the neonate. *Acta Paediatr. Scand.*, 1982; 296(Suppl.): 53–55
- [38] Hanson L.A., Korotkova M., Haversen L., Mattsby-Baltzer I., Hahn-Zoric M., Silfverdal S.A., Strandvik B., Teleme E.: Breast-feeding, a complex support system for the offspring. *Pediatr. Int.*, 2002; 44: 347–352
- [39] Hanson L.A., Mattsby-Baltzer I., Engberg I., Roseanu A., Elverfors J., Motas C.: Anti-inflammatory capacities of human milk: lactoferrin and secretory IgA inhibit endotoxin-induced cytokine release. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1995; 371A: 669–672
- [40] Hanson L.H., Sawicki V., Lewis A., Nuijens J.H., Neville M.C., Zhang P.: Does human lactoferrin in the milk of transgenic mice deliver iron to suckling neonates? *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2001; 501: 233–239
- [41] Harada E., Itoh Y., Sitizyo K., Takeuchi T., Araki Y., Kitagawa H.: Characteristic transport of lactoferrin from the intestinal lumen into the bile via the blood in piglets. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, 1999; 124: 321–327



- [42] Harada E., Sugiyama A., Takeuchi T., Sitizyo K., Syuto B., Yajima T., Kuwata T.: Characteristic transfer of colostral components into cerebrospinal fluid via serum in neonatal pigs. *Biol. Neonate*, 1999; 76: 33–43
- [43] Haversen L.A., Baltzer L., Dolphin G., Hanson L.A., Mattsby-Baltzer I.: Anti-inflammatory activities of human lactoferrin in acute dextran sulphate-induced colitis in mice. *Scand. J. Immunol.*, 2003; 57: 2–10
- [44] Haversen L.A., Engberg I., Baltzer L., Dolphin G., Hanson L.A., Mattsby-Baltzer I.: Human lactoferrin and peptides derived from a surface-exposed helical region reduce experimental *Escherichia coli* urinary tract infection in mice. *Infect. Immun.*, 2000; 68: 5816–5823
- [45] He J., Furmanski P.: Sequence specificity and transcriptional activation in the binding of lactoferrin to DNA. *Nature*, 1995; 373: 721–724
- [46] Hentges D.J., Marsh W.W., Petschow B.W., Thal W.R., Carter M.K.: Influence of infant diets on the ecology of the intestinal tract of human flora-associated mice. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 1992; 14: 146–152
- [47] Hirai Y., Kawakata N., Satoh K., Ikeda Y., Hisayasu S., Orimo H., Yoshino Y.: Concentrations of lactoferrin and iron in human milk at different stages of lactation. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, 1990; 36: 531–544
- [48] Horwitz D.A., Bakke A.C., Abo W., Nishiya K.: Monocyte and NK cell cytotoxic activity in human adherent cell preparations: discriminating effects of interferon and lactoferrin. *J. Immunol.*, 1984; 132: 2370–2374
- [49] Howie P.W., Forsyth J.S., Ogston S.A., Clark A., Florey C.D.: Protective effect of breast feeding against infection. *BMJ*, 1990; 300: 11–16
- [50] Hozyasz K.: Probiotyki i prebiotyki – nowe propozycje w żywieniu niemowląt. *Medycyna Rodzinna*, 2002; z.17
- [51] Hu W.L., Mazurier J., Montreuil J., Spik G.: Isolation and partial characterization of a lactotransferrin receptor from mouse intestinal brush border. *Biochemistry*, 1990; 29: 535–541
- [52] Hutchens T.W., Henry J.F., Yip T.T., Hachey D.L., Schanler R.J., Motil K.J., Garza C.: Origin of intact lactoferrin and its DNA-binding fragments found in the urine of human milk-fed preterm infants. Evaluation by stable isotopic enrichment. *Pediatr. Res.*, 1991; 29: 243–250
- [53] Kadiiska M.B., Burkitt M.J., Xiang Q.H., Mason R.P.: Iron supplementation generates hydroxyl radical *in vivo*. An ESR spin-trapping investigation. *J. Clin. Invest.*, 1995; 96: 1653–1657
- [54] Kalliomaki M., Kirjavainen P., Eerola E., Kero P., Salminen S., Isolauri E.: Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2001; 107: 129–134
- [55] Kawakami H., Hiratsuka M.: Effects of iron-saturated lactoferrin on iron absorption. *Agric. Biol. Chem.*, 1988; 52: 903–908
- [56] Kawakami H., Lonnerdal B.: Isolation and function of a receptor for human lactoferrin in human fetal intestinal brush-border membranes. *Am. J. Physiol.*, 1991; 261: G841–G846
- [57] Kim W.S., Ohashi M., Tanaka T., Kumura H., Kim G.Y., Kwon I.K., Goh J.S., Shimazaki K.: Growth-promoting effects of lactoferrin on *L. acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* *Biometals*, 2004; 17: 279–283
- [58] Kim W.S., Tanaka T., Kumura H., Shimazaki K.: Lactoferrin-binding proteins in *Bifidobacterium bifidum*. *Biochem. Cell Biol.*, 2002; 80: 91–94
- [59] Kruzel M.L.: Rola laktoferyny w rozwoju ostrych stanów zapalnych. *Post. Hig. Med. Dosw.*, 2003; 57: 377–404
- [60] Kruzel M.L., Harari Y., Mailman D., Actor J.K., Zimecki M.: Differential effects of prophylactic, concurrent and therapeutic lactoferrin treatment on LPS-induced inflammatory responses in mice. *Clin. Exp. Immunol.*, 2002; 130: 25–31
- [61] Kruzel M.L., Harari Y., Chen C.Y., Castro G.A.: Lactoferrin protects gut mucosal integrity during endotoxemia induced by lipopolysaccharide in mice. *Inflammation*, 2000; 24: 33–44
- [62] Kuhara T., Iigo M., Itoh T., Ushida Y., Sekine K., Terada N., Okamura H., Tsuda H.: Orally administered lactoferrin exerts an antimetastatic effect and enhances production of IL-18 in the intestinal epithelium. *Nutr. Cancer*, 2000; 38: 192–199
- [63] Kuwata H., Yamauchi K., Teraguchi S., Ushida Y., Shimokawa Y., Toida T., Hayasawa H.: Functional fragments of ingested lactoferrin are resistant to proteolytic degradation in the gastrointestinal tract of adult rats. *J. Nutr.*, 2001; 131: 2121–2127
- [64] LaForce F.M., Boose D.S.: Release of lactoferrin by polymorphonuclear leukocytes after aerosol challenge with *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 1987; 55: 2293–2295
- [65] Lash J.A., Coates T.D., Lafuze J., Baehner R.L., Boxer L.A.: Plasma lactoferrin reflects granulocyte activation *in vivo*. *Blood*, 1983; 61: 885–888
- [66] Lee W.J., Farmer J.L., Hilty M., Kim Y.B.: The protective effects of lactoferrin feeding against endotoxin lethal shock in germfree piglets. *Infect. Immun.*, 1998; 66: 1421–1426
- [67] Legrand D., Elass E., Pierce A., Mazurier J.: Lactoferrin and host defence: an overview of its immuno-modulating and anti-inflammatory properties. *Biometals*, 2004; 17: 225–229
- [68] Lonnerdal B., Iyer S.: Lactoferrin: molecular structure and biological function. *Annu. Rev. Nutr.*, 1995; 15: 93–110
- [69] Lonnerdal B., Keen C.L., Hurley L.S.: Manganese binding proteins in human and cow's milk. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1985; 41: 550–559
- [70] Lonnerdal B., Woodhouse L.R., Glazier C.: Compartmentalization and quantitation of protein in human milk. *J. Nutr.*, 1987; 117: 1385–1395
- [71] Lucassen P.L., Assendelft W.J., Gubbels J.W., van Eijk J.T., Douwes A.C.: Infantile colic: crying time reduction with a whey hydrolysate: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Pediatrics*, 2000; 106: 1349–1354
- [72] Łozińska D., Twardowska I.: Neonatologia. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 1993
- [73] Machnicki M., Zimecki M., Zagulski T.: Lactoferrin regulates the release of tumour necrosis factor alpha and interleukin 6 *in vivo*. *Int. J. Exp. Pathol.* 1993; 74: 433–439
- [74] Mannick E., Udall J.N.Jr.: Neonatal gastrointestinal mucosal immunity. *Clin. Perinatol.*, 1996; 23: 287–304
- [75] Marshall K.: Therapeutic applications of whey protein. *Altern. Med. Rev.*, 2004; 9: 136–156
- [76] Mattsby-Baltzer I., Roseanu A., Motas C., Elverfors J., Engberg I., Hanson L.A.: Lactoferrin or a fragment thereof inhibits the endotoxin-induced interleukin-6 response in human monocytic cells. *Pediatr. Res.*, 1996; 40: 257–262
- [77] Mazurier J., Montreuil J., Spik G.: Visualization of lactotransferrin brush-border receptors by ligand-blotting. *Biochim. Biophys. Acta*, 1985; 821: 453–460
- [78] Mercer D.W., Smith G.S., Cross J.M., Russell D.H., Chang L., Cacioppo J.: Effects of lipopolysaccharide on intestinal injury; potential role of nitric oxide and lipid peroxidation. *J. Surg. Res.*, 1996; 63: 185–192
- [79] Mikogami T., Heyman M., Spik G., Desjeux J.F.: Apical-to-basolateral transepithelial transport of human lactoferrin in the intestinal cell line HT-29cl.19A. *Am. J. Physiol.*, 1994; 267: G308–G315
- [80] Miller-Catchpole R., Kot E., Haloftis G., Furmanov S., Bezkorovainy A.: Lactoferrin can supply iron for the growth of *Bifidobacterium breve*. *Nutr. Res.*, 1997; 17: 205–213
- [81] Mitsuoka T.: Bifidobacteria and their role in human health. *J. Int. Microbiol.*, 1990; 6: 263–267
- [82] Nandi S., Suzuki Y.A.: Expression of human lactoferrin in transgenic rice grains for the application in infant formula. *Plant Sci.*, 2002; 163: 713–722
- [83] Nichols B.L., McKee K., Putman M., Henry J.F., Nichols V.N.: Human lactoferrin supplementation of infant formulas increases thymidine incorporation into the DNA of rat crypt cells. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 1989; 8: 102–109
- [84] Nichols B.L., McKee K.S., Henry J.F., Putman M.: Human lactoferrin stimulates thymidine incorporation into DNA of rat crypt cells. *Pediatr. Res.*, 1987; 21: 563–567
- [85] Nichols B.L., McKee K.S., Huebers H.A.: Iron is not required in the lactoferrin stimulation of thymidine incorporation into the DNA of rat crypt enterocytes. *Pediatr. Res.*, 1990; 27: 525–528
- [86] Nimmagudda R., Bagchi D., Bagchi M., Tran M.X., Steijns J., Braun S.: Cytoprotection by lactoferrin in oxygen radical mediated gastrointestinal injury. *Biochem. Arch.*, 1999; 15: 323–336
- [87] Ogata T., Teraguchi S., Shin K., Kingaku M., Fukuwatari Y., Kawase K., Hayasawa H., Tomita M.: The mechanism of *in vivo* bacteriostasis of bovine lactoferrin. W: Spik G, Legrand D., Mazurier J., Pierce A., Perraudin J.P. (red.), *Advances in Lactoferrin Research*. Plenum Press, New York, 1998
- [88] Orsi N.: The antimicrobial activity of lactoferrin: current status and perspectives. *Biometals*, 2004; 17: 189–196
- [89] Oseas R., Yang H.H., Baehner R.L., Boxer L.A.: Lactoferrin: a promoter of polymorphonuclear leukocyte adhesiveness. *Blood*, 1981; 57: 939–945
- [90] Petschow B.W., Talbott R.D.: Response of bifidobacterium species to growth promoters in human and cow milk. *Pediatr. Res.*, 1991; 29: 208–213
- [91] Pisacane A., Graziano L., Mazzarella G., Scarpellino B., Zona G.: Breast-feeding and urinary tract infection. *J. Pediatr.*, 1992; 120: 87–89

- [92] Polin R.A., St. Geme J.W.3rd: Neonatal sepsis. *Adv. Pediatr. Infect. Dis.*, 1992; 7: 25–61
- [93] Prentice A., MacCarthy A., Stirling D.M., Vasquez-Velasquez L., Ceesay S.M.: Breast-milk IgA and lactoferrin survival in the gastrointestinal tract—a study in rural Gambian children. *Acta Paediatr. Scand.*, 1989; 78: 505–512
- [94] Raghuvver T.S., McGuire E.M., Martin S.M., Wagner B.A., Rebouche C.J., Buettner G.R., Widness J.A.: Lactoferrin in the preterm infants' diet attenuates iron-induced oxidation products. *Pediatr. Res.*, 2002; 52: 964–972
- [95] Roberts A.K., Chierici R., Sawatzki G., Hill M.J., Volpato S., Vigi V.: Supplementation of an adapted formula with bovine lactoferrin: 1. Effect on the infant faecal flora. *Acta Paediatr.*, 1992; 81: 119–124
- [96] Saarinen U.M., Siimes M.A., Dallman P.R.: Iron absorption in infants; high bioavailability of breast milk iron as indicated by the extrinsic tag method of iron absorption and by the concentration of serum ferritin. *J. Pediatr.*, 1977; 91: 36–39
- [97] Sanchez L., Calvo M., Brock J.H.: Biological role of lactoferrin. *Arch. Dis. Child.*, 1992; 67: 657–661
- [98] Sawatzki G., Rich I.N.: Lactoferrin stimulates colony stimulating factor production *in vitro* and *in vivo*. *Blood Cells*, 1989; 15: 371–385
- [99] Schmelzle H., Wirth S., Skopnik H., Radke M., Knol J., Bockler H.M., Bronstrup A., Wells J., Fusch C.: Randomized double-blind study of the nutritional efficacy and bifidogenicity of a new infant formula containing partially hydrolyzed protein, a high beta-palmitic acid level, and nondigestible oligosaccharides. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 2003; 36: 343–351
- [100] Schottstedt T., Muri C., Morel C., Philipona C., Hammon H.M., Blum J.W.: Effects of feeding vitamin A and lactoferrin on epithelium of lymphoid tissues of intestine of neonatal calves. *J. Dairy Sci.*, 2005; 88: 1050–1061
- [101] Shau H., Kim A., Golub S.H.: Modulation of natural killer and lymphokine-activated killer cell cytotoxicity by lactoferrin. *J. Leukoc. Biol.*, 1992; 51: 343–349
- [102] Sherman M.P., Bennett S.H., Hwang F.F., Yu C.: Neonatal small bowel epithelia: enhancing anti-bacterial defense with lactoferrin and *Lactobacillus GG*. *Biometals*, 2004; 17: 285–289
- [103] Spik G., Brunet B., Mazurier-Dehaine C., Fontaine G., Montreuil J.: Characterization and properties of the human and bovine lactotransferrins extracted from the faeces of newborn infants. *Acta Paediatr. Scand.*, 1982; 71: 979–985
- [104] Suzuki Y.A., Lonnerdal B.: Baculovirus expression of mouse lactoferrin receptor and tissue distribution in the mouse. *Biometals*, 2004; 17: 301–309
- [105] Suzuki Y.A., Lonnerdal B.: Characterization of mammalian receptors for lactoferrin. *Biochem. Cell Biol.*, 2002; 80: 75–80
- [106] Suzuki Y.A., Shin K., Lonnerdal B.: Molecular cloning and functional expression of a human intestinal lactoferrin receptor. *Biochemistry*, 2001; 40: 15771–15779
- [107] Tanaka K., Ikeda M., Nozaki A., Kato N., Tsuda H., Saito S., Sekihara H.: Lactoferrin inhibits hepatitis C virus viremia in patients with chronic hepatitis C: a pilot study. *Jpn. J. Cancer Res.*, 1999; 90: 367–371
- [108] Teraguchi S., Shin K., Ogata T., Kingaku M., Kaino A., Miyauchi H., Fukuwatari Y., Shimamura S.: Orally administered bovine lactoferrin inhibits bacterial translocation in mice fed bovine milk. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995; 61: 4131–4134
- [109] Teraguchi S., Shin K., Ozawa K., Nakamura S., Fukuwatari Y., Tsuyuki S., Namihira H., Shimamura S.: Bacteriostatic effect of orally administered bovine lactoferrin on proliferation of *Clostridium* species in the gut of mice fed bovine milk. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995; 61: 501–506
- [110] Togawa J., Nagase H., Tanaka K., Inamori M., Umezawa T., Nakajima A., Naito M., Sato S., Saito T., Sekihara H.: Lactoferrin reduces colitis in rats via modulation of the immune system and correction of cytokine imbalance. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2002; 283: G187–G195
- [111] Troost F.J., Saris W.H., Haenen G.R., Bast A., Brummer R.J.: New method to study oxidative damage and antioxidants in the human small bowel: effects of iron application. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2003; 285: G354–G359
- [112] Ushida Y., Sekine K., Kuhara T., Takasuka N., Iigo M., Maeda M., Tsuda H.: Possible chemopreventive effects of bovine lactoferrin on esophagus and lung carcinogenesis in the rat. *Jpn. J. Cancer Res.*, 1999; 90: 262–267
- [113] Varadhachary A., Wolf J.S., Petrak K., O'Malley B.W.Jr., Spadaro M., Curcio C., Forni G., Pericle F.: Oral lactoferrin inhibits growth of established tumors and potentiates conventional chemotherapy. *Int. J. Cancer*, 2004; 111: 398–403
- [114] Vig M., Srivastava S., Kandpal U., Sade H., Lewis V., Sarin A., George A., Bal V., Durdik J.M., Rath S.: Inducible nitric oxide synthase in T cells regulates T cell death and immune memory. *J. Clin. Invest.*, 2004; 113: 1734–1742
- [115] Wakabayashi H., Uchida K., Yamauchi K., Teraguchi S., Hayasawa H., Yamaguchi H.: Lactoferrin given in food facilitates dermatophytosis cure in guinea pig models. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2000; 46: 595–602
- [116] Wang X., Hirno S., Willen R., Wadstrom T.: Inhibition of *Helicobacter pylori* infection by bovine milk glycoconjugates in a BALB/cA mouse model. *J. Med. Microbiol.*, 2001; 50: 430–435
- [117] Weinberg E.D.: Human lactoferrin: a novel therapeutic with broad spectrum potential. *J. Pharm. Pharmacol.*, 2001; 53: 1303–1310
- [118] Weinberg E.D.: Iron, infection and sudden infant death. *Med. Hypotheses*, 2001; 56: 731–734
- [119] Weinberg E.D.: The *Lactobacillus* anomaly: total iron abstinence. *Perspect. Biol. Med.*, 1997; 40: 578–583
- [120] Wharton B.A., Balmer S.E., Scott P.H.: Faecal flora in the newborn. Effect of lactoferrin and related nutrients. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1994; 357: 91–98
- [121] Yamauchi K., Tomita M., Giehl T.J., Ellison R.T. III: Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin-derived lactoferrin peptide fragment. *Infect. Immun.*, 1993; 61: 719–728
- [122] Yoo Y.C., Watanabe S., Watanabe R., Hata K., Shimazaki K., Azuma I.: Bovine lactoferrin and lactoferricin inhibit tumor metastasis in mice. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1998; 443: 285–291
- [123] Zagulski T., Lipiński P., Zagulska A., Broniek S., Jarząbek Z.: Lactoferrin can protect mice against a lethal dose of *Escherichia coli* in experimental infection *in vivo*. *Br. J. Exp. Pathol.*, 1989; 70: 697–704
- [124] Zhang P., Sawicki V., Lewis A., Hanson L., Nuijens J.H., Neville M.C.: Human lactoferrin in the milk of transgenic mice increases intestinal growth in ten-day-old suckling neonates. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2001; 501: 107–113
- [125] Zimecki M., Artym J., Chodaczek G., Kocięba M., Kruzel M.L.: Protective effects of lactoferrin in *Escherichia coli*-induced bacteremia in mice: relationship to reduced serum TNF alpha level and increased turnover of neutrophils. *Inflamm. Res.*, 2004; 53: 292–296
- [126] Zimecki M., Kruzel M.: Protective effect of lactoferrin against LPS-induced endotoxemia is mediated by IL-10. *Proceedings of the 5<sup>th</sup> World Congress on Trauma, Shock, Inflammation and Sepsis*, 2000 Feb 29 – Mar 4; Munich, Germany. *Monduzzi Editore*; 2000
- [127] Zimecki M., Mazurier J., Machnicki M., Wiczorek Z., Montreuil J., Spik G.: Immunostimulatory activity of lactotransferrin and maturation of CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> murine thymocytes. *Immunol. Lett.*, 1991; 30: 119–123
- [128] Zimecki M., Mazurier J., Spik G., Kapp J.A.: Human lactoferrin induces phenotypic and functional changes in murine splenic B cells. *Immunology*, 1995; 86: 122–127
- [129] Zimecki M., Wlaszczyk A., Cheneau P., Brunel A.S., Mazurier J., Spik G., Kubler A.: Immunoregulatory effects of a nutritional preparation containing bovine lactoferrin taken orally by healthy individuals. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1998; 46: 231–240

