 © IMiD, Wydawnictwo Aluna

Ryszard Lauterbach[1], Ewa Kamińska[2], Piotr Michalski[3], Jan Paweł Lauterbach[3]

LAKTOFERYNA – GLIKOPROTEINA O DUŻYM POTENCJALE TERAPEUTYCZNYM

LACTOFERRIN – A GLYCOPROTEIN OF GREAT THERAPEUTIC POTENTIALS

[1]Klinika Neonatologii, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków, Polska
[2]Zakład Farmakologii, Instytut Matki i Dziecka, Warszawa, Polska
[3]Centrum Medyczne „Ujastek", Kraków, Polska

Streszczenie

Laktoferyna jest glikoproteiną zdolną do tworzenia odwracalnych kompleksów z jonami żelaza, która występuje w większości płynów biologicznych. Szczególnie duże jej stężenia zawiera siara i mleko ssaków. Laktoferyna bydlęca wykazuje w ponad 70% zgodność z laktoferyną ludzką i jest stosowana w większości badań klinicznych. W pracy podsumowano najnowsze badania dotyczące mechanizmów odpowiadających za wielokierunkowe działanie laktoferyny, a także omówiono jej potencjalne zastosowanie profilaktyczne i lecznicze. Na podstawie wstępnych wyników własnych obserwacji klinicznych autorzy sugerują korzystny wpływ suplementacji laktoferyną na zmniejszenie częstości występowania martwiczego zapalenia jelit u przedwcześnie urodzonych noworodków o urodzeniowej masie ciała poniżej 1250 g.

Słowa kluczowe: laktoferyna, noworodek z bardzo małą urodzeniową masą ciała (VLBW), sepsa, martwicze zapalenie jelit

Abstract

Lactoferrin is an iron-binding glycoprotein, which is present in most biological fluids with particularly high levels in colostrum and in mammalian milk. Bovine lactoferrin is more than 70% homologous with human lactoferrin. Most of the clinical trials have used bovine lactoferrin for supplementation. This review summarizes the recent advances in explaining the mechanisms, which are responsible for the multifunctional roles of lactoferrin, and presents its potential prophylactic and therapeutic applications. On the ground of the results of preliminary clinical observations, authors suggest beneficial effect of lactoferrin supplementation on the prevalence of necrotizing enterocolitis in infants with birth weight below 1250 grams.

Key words: lactoferrin, very low birth weight newborn, sepsis, necrotizing enterocolitis

DEV PERIOD MED. 2016;XX,2:118-125

WPROWADZENIE

Laktoferyna – określana niekiedy jako białko multipotencjalne – jest endogenną glikoproteiną występującą m.in. w wydzielinach i płynach ustrojowych ssaków; jej duże ilości znajdują się zwłaszcza w siarze i mleku. Należy do rodziny transferyn (siderofilin) i podobnie jak pozostałe białka z tej grupy uczestniczy w homeostazie żelaza, dzięki zdolności do silnego i odwracalnego wiązania (sekwestrowania, chelatowania) jonów Fe, jednak na tym podobieństwa się kończą. Laktoferyna

wykazuje bowiem szereg innych właściwości, takich jak działanie przeciwdrobnoustrojowe (przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, przeciwgrzybicze i przeciwpasożytnicze), imunomodulujące (istotne zwłaszcza w okresie noworodkowym), przeciwzapalne, antyoksydacyjne, przeciwnowotworowe, enzymatyczne, a także wywiera wpływ na tkankę kostną [1-4].

Wyizolowana ponad 70 lat temu z mleka krowiego, została zidentyfikowana w 1960 r. jako laktoferyna bydlęca (bLF). Jej odpowiednikiem w mleku kobiecym jest laktoferyna ludzka (hLF). Wprawdzie białka te charakteryzują się pewnymi różnicami, jednak wykazują znaczne podobieństwo w budowie (ok. 70% zgodności). W ciągu ostatnich 35 lat bLF i hLF były przedmiotem licznych badań przedklinicznych i klinicznych, zaś w ostatniej dekadzie laktoferyna stała się jednym z najintensywniej badanych białek [5]. W związku z łatwiejszą dostępnością laktoferyna bydlęca jest obecnie częściej stosowana w badaniach oceniających skuteczność stosowania tej glikoproteiny w różnych stanach klinicznych. Być może wyniki dalszych badań ujawnią kolejne, nieznane jeszcze właściwości tego wyjątkowo interesującego białka.

Obecnie laktoferyna bydlęca znajduje szerokie zastosowanie jako dodatek do przetworów mlecznych, składnik środków spożywczych specjalnego przeznaczenia medycznego (dla niemowląt i dzieci) oraz suplementów diety dostępnych w Polsce, a także mieszanek mlecznych (m.in. w Japonii, Holandii). Uwzględniając jej znaczenie oraz bezpieczeństwo stosowania, potwierdzone przez Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (*EFSA*), decyzją Komisji Europejskiej z 2012 r. zezwolono na jej wprowadzenie do obrotu jako nowego składnika żywności.

BUDOWA, WŁAŚCIWOŚCI FIZYKO-CHEMICZNE I FARMAKOKINETYCZNE

Laktoferyna jest glikoproteiną o trójwymiarowej strukturze chemicznej i masie cząsteczkowej ok. 80 kDa, zbudowaną z pojedynczego łańcucha polipeptydowego zawierającego ok. 700 aminokwasów. Cząsteczka składa się z 2 symetrycznych płatów N i C, spiętych łącznikiem [3, 6]. Posiadają one zdolność wiązania jonów żelaza z jednoczesnym przyłączeniem anionów węglanowych, przy czym znacznie większe powinowactwo dotyczy Fe^{3+} niż Fe^{2+}. Jony Fe po związaniu z cząsteczką laktoferyny są niedostępne dla otaczających płynów, aż do momentu ich uwolnienia.

Dzięki zdolności wiązania i tworzenia odwracalnych kompleksów z Fe (sekwestrowania) oraz w zależności od stopnia wysycenia żelazem laktoferyna może występować w 3 postaciach, tj. jako wolna, niezwiązana z Fe (apolaktoferyna, apo-LF), związana z dwoma jonami Fe (hololaktoferyna, holo-LF) lub jako postać przejściowa – związana tylko z jednym jonem Fe (monolaktoferyna, mono-LF) [7]. Apolaktoferyna wykazuje większą aktywność przeciwbakteryjną niż holo-LF [1]. Hololaktoferyna jest natomiast bardziej oporna na rozkład termiczny i działanie enzymów proteolitycznych [6].

Powinowactwo laktoferyny do jonów żelaza jest ok. 360 razy większe niż w przypadku transferyny [6]. W przeciwieństwie do transferyny, laktoferyna charakteryzuje się dużą stabilnością w szerokim zakresie pH. Dotyczy to także pH poniżej 6, w którym transferyna traci swe zdolności transportu żelaza, a wówczas przejmuje je laktoferyna, która jest aktywna w pH do 3,5.

Laktoferyna ludzka występuje w postaci 3 izoform (α, β, γ), których odmienność jest związana z różnymi funkcjami tego białka [8, 9]. Jest wydzielana przez komórki nabłonkowe błon śluzowych. Jej największe stężenie występuje we wczesnym pokarmie naturalnym, tj. w siarze (ok. 7 g/l), natomiast pokarm dojrzały zawiera mniejsze ilości hLF (ok. 1g/l), przy czym w mleku kobiet, które urodziły przedwcześnie, stężenie jest większe [10, 11]. Względnie duże stężenia tego białka występują także we łzach (2-3,8 g/l) i we krwi pępowinowej, zaś mniejsze w ślinie (20 mg/l), wydzielinie oskrzeli, płynie nasiennym, soku żołądkowym, płynie mózgowo-rdzeniowym, wydzielinie z pochwy, żółci, moczu [6, 12]. Znaczne ilości laktoferyny znajdują się w ziarnistościach neutrofilów, które są głównym miejscem jej wytwarzania, i z których jest uwalniana podczas ich degranulacji, m.in. w przebiegu sepsy [13]. Stężenie laktoferyny w osoczu w warunkach fizjologicznych wynosi śr. 0,3 mg/l, ale w zakażeniu uogólnionym może wzrosnąć nawet do 200 mg/l. Obecność dużych stężeń laktoferyny na błonach śluzowych i w miejscach dotkniętych procesem zapalnym świadczy o jej istotnej roli jako czynnika biorącego udział w powstawaniu odpowiedzi immunologicznej zarówno komórkowej, jak i humoralnej.

Badania farmakokinetyczne wykazały, że uwolniona z neutrofilów podczas zabiegu chirurgicznego endogenna laktoferyna ludzka charakteryzuje się dwufazową eliminacją. Okres półtrwania w fazie pierwszej wynosił 45 min, zaś w fazie drugiej – 9 godz. Podobny, dwufazowy charakter eliminacji odnotowano u ochotników po dożylnym podaniu znakowanej jodem hLF; wartości $T_{0,5}$ wynosiły odpowiednio 1,26 oraz 16,63 godz. [14]. Laktoferyna i jej kompleksy z Fe ulegają dalszym przemianom w lizosomach makrofagów wątroby i śledziony, w których białko ulega degradacji, a uwolnione żelazo jest magazynowane w hepatocytach w postaci ferrytyny [14].

Laktoferyna bydlęca, stosowana w większości badań klinicznych, wykazuje znaczne podobieństwo budowy chemicznej do laktoferyny ludzkiej. Dotyczy to zarówno składu aminokwasów (77%), jak i peptydów N-końcowych, odpowiedzialnych za aktywność przeciwdrobnoustrojową [4]. Obie laktoferyny różnią się liczbą tzw. miejsc glikozylowanych, przy czym w cząsteczce bLF jest ich 5, a w cząsteczce hLF - 3. Przypuszcza się, że fragmenty te są pomocne w neutralizowaniu niektórych wirusów lub toksyn bakteryjnych [16]. Według niektórych badaczy laktoferyna bydlęca posiada silniejsze właściwości bakteriobójcze w porównaniu do laktoferyny ludzkiej [9].

Badania przemian metabolicznych podanej doustnie bLF wykazały, że w kwaśnym środowisku soku żołądkowego, a także w lizosomach neutrofilów, ulega ona – podobnie jak hLF - hydrolizie do peptydów, z których największą aktywność wykazuje laktoferycyna [3, 5, 17]. Peptydy te są stabilnymi cząsteczkami, zachowującymi właściwości immunologiczne, przeciwdrobnoustrojowe i hamujące

powstawanie guzów nowotworowych. Nie mają one natomiast zdolności wiązania jonów żelaza [17].

Po podaniu dojelitowym u myszy bLF przenika do krwi obwodowej i po 10-20 min jest wykrywana w postaci niezmienionej w wątrobie, nerkach, pęcherzyku żółciowym, śledzionie i mózgu [18].

AKTYWNOŚĆ PRZECIWDROBNOUSTROJOWA

Działanie przeciwbakteryjne

Istnieje wiele mechanizmów, dzięki którym laktoferyna wywiera działanie przeciwbakteryjne. Do najważniejszych należą: sekwestracja żelaza uniemożliwiająca patogenom dostęp do jonów żelaza, które jest podstawowym czynnikiem warunkującym ich namnażanie (działanie głównie bakteriostatyczne), oraz bezpośrednie oddziaływanie na powierzchnię bakterii, które powoduje uszkodzenie błony komórkowej i lizę komórki (działanie bakteriobójcze) [1-4, 19].

Bakteriobójczą aktywność laktoferyny wykazano zarówno w stosunku do bakterii Gram-ujemnych, jak i Gram-dodatnich. W odniesieniu do bakterii Gram-ujemnych polega ona na wiązaniu laktoferyny z lipidem A toksyny lipopolisacharydowej (LPS) bakterii; następstwem jest uszkodzenie ściany komórki i wypływ LPS. W przypadku bakterii Gram-dodatnich laktoferyna wiąże się z kwasami lipotejchojowym i tejchojowym, wchodzącymi w skład ich błony komórkowej. Wszystkie te związki mają ujemny ładunek elektryczny, dzięki czemu zostają przyłączone do silnie dodatniej N-końcowej części cząsteczki laktoferyny-,w wyniku czego następuje rozluźnienie struktury błony komórkowej bakterii. Umożliwia to penetrację lizozymu do wnętrza komórki bakteryjnej, a w konsekwencji jej lizę wskutek unieczynnienia peptydoglikanu [1-3, 20]. Ponadto laktoferyna uszkadza białka decydujące o wirulencji bakterii, dzięki czemu ogranicza ich inwazję do komórek organizmu [21]. U szczurów wykazano ciekawy mechanizm działania bakteriobójczego laktoferyny, polegający na uruchamianiu procesu apoptozy w tych komórkach, które zawierają żywe bakterie [17].

Laktoferyna nie wykazuje działania przeciwbakteryjnego w stosunku do bakterii probiotycznych [4]. Nie zaburza wzrostu bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, gdyż do swego namnażania nie potrzebują one żelaza, oraz promuje namnażanie *Bifidobacterium* poprzez udostępnianie im jonów żelaza. Tym działaniem laktoferyna przypomina prebiotyki [23].

Kolejnym mechanizmem przeciwbakteryjnego działania laktoferyny jest uniemożliwianie tworzenia biofilmu przez bakterie (*Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus mutans*), a także niszczenie biofilmu już istniejącego [2, 24]. Działanie to obserwowano nawet w bardzo małych stężeniach laktoferyny, tj 5-krotnie mniejszych niż stężenie bakteriostatyczne. W badaniu in vitro na przykładzie biofilmu *P. aeruginosa* oraz in vivo na przykładzie biofilmu *E. coli* wykazano, że apolaktoferyna hamuje tworzenie biofilmu, przeciwdziałając adhezji bakterii do komórek nabłonka wskutek pobudzenia ruchliwości komórek tworzących biofilm [24]. Tym samym zmniejsza ich antybiotykooporność, gdyż komórki planktoniczne są bardziej wrażliwe na działanie antybiotyków.

Na modelach zwierzęcych wykazano skuteczność bLF stosowanej doustnie w zakażeniu żołądka wywołanym przez *Helicobacter pylori*, w układowych zakażeniach *S. aureus*, zakażeniach układu moczowego wywołanych przez *E. coli* [5].

Istotne znaczenie ma też wywierane przez laktoferynę działanie synergiczne z niektórymi antybiotykami (np. ryfampicyną, wankomycyną), które powoduje obniżenie wartości MIC (minimalne stężenie hamujące) i MBC (minimalne stężenie bakteriobójcze) [22, 25].

Działanie przeciwwirusowe

Laktoferyna wykazuje działanie przeciwwirusowe wobec wirusów RNA i DNA, zarówno otoczkowych (HSV, HBV, HCV, CMV, HIV, RSV), jak i pozbawionych otoczki (adeno-, entero-, polio-, rotawirusy) [1-4]. Mechanizm działania polega na jej wiązaniu z receptorami błonowymi komórki gospodarza, zbudowanymi z glikozaminoglikanów (zwłaszcza z siarczanem heparanu), co zapobiega interakcji wirusa z komórkami gospodarza i nie dopuszcza do zakażenia, lub na bezpośrednim wiązaniu laktoferyny z cząsteczką wirusa. Podkreśla się także możliwość aktywowania przez laktoferynę makrofagów i nasilenia fagocytozy [1].

W odniesieniu do wirusów polio, HSV1, HSV2 i RSV laktoferyna hamuje wczesną fazę zakażenia, tj. wbudowywanie się do komórki gospodarza, natomiast w przypadku HIV i rotawirusa przeważa działanie hamujące replikację wirusa [3]. W przypadku komórek nabłonkowych działanie przeciwwirusowe może zachodzić także wewnątrz komórek, gdyż obecność laktoferyny stwierdzano w okolicy jąder komórkowych [8].Takie działanie wykazuje laktoferyna np. wobec HCV i HIV [26]. Laktoferyna działa także wirusobójczo na drobnoustroje powodujące grypę i zakażenia grypopodobne, takie jak wirus paragrypy, RSV, grypy H1N1, H3N2 czy H5N1 [27]. Szczególnie wrażliwe na działanie laktoferyny są HBV, HCV, RSV, wirus grypy A (H1N1, H3N2).

Skuteczność doustnie podawanej bLF potwierdzono w badaniach na zwierzętach, w tym na modelu opryszczkowego zapalenia skóry, grypy, rotawirusowego zakażenia żołądka i jelit [5].

Wykazano także działanie synergiczne laktoferyny z acyklowirem (wobec HSV1 i HSV2), cydofowirem, interferonem i rybawiryną(wobec HCV), zydowudyną (wobec HIV) [1, 3].

Działanie przeciwgrzybicze

W mechanizmie działania mykostatycznego laktoferyny znaczącą rolę, podobnie jak w przypadku działania przeciwbakteryjnego, odgrywa zdolność do sekwestrowania żelaza (np. *Aspergillus fumigatus*). Kolejnymi mechanizmami są: bezpośrednie działanie na komórkę grzyba i zmiana przepuszczalności ściany komórkowej, prowadząca do zaburzenia jej struktury i śmierci komórki [1-4, 28], a także aktywacja przez laktoferynę makrofagów i nasilenie fagocytozy [4].

Wykazano zależne od dawki działanie grzybobójcze apo-bLF wobec klinicznych izolatów *Candida albicans*

i *C. krusei*, a także działanie grzybobójcze peptydów laktoferyny wobec *C. albicans* [2].

Na modelach zwierzęcych obserwowano skuteczność doustnego stosowania bLF w zakażeniach wywołanych przez dermatofity (grzybica stóp) i *Candida* spp. (kandydoza błony śluzowej jamy ustnej) [5].

Laktoferyna wykazuje synergiczne działanie przeciwgrzybicze z azolami, amfoterycyną B i 5-fluorocytozyną 1, 25].

Działanie przeciwpasożytnicze

Mechanizm działania jest złożony i nie do końca poznany. Odgrywa w nim rolę zarówno sekwestrowanie żelaza (np. w przypadku działania bójczego na *Pneumocystis carinii*), jak i bezpośrednie oddziaływanie laktoferyny, która wiąże się z siarczanem heparanu, blokując dostęp pasożytowi do receptora (np. *Plasmodium vivax*) [3, 4, 7]. Laktoferyna może też wiązać się z lipidami błony trofozoitu, powodując jej uszkodzenie i zniszczenie pasożyta (np. *Entamoeba histolytica*) lub bezpośrednio hamować wewnątrzkomórkowy rozwój *Toxoplasma gondii* w komórce gospodarza [3, 4]. Uważa się, że może też mieć znaczenie aktywacja układu immunologicznego, prowadząca do pobudzenia fagocytozy [1].

DZIAŁANIE IMMUNOMODULACYJNE

Laktoferyna jest elementem pierwszej linii obrony organizmu przed patogenami, jednak zarówno komórkowe, jak i molekularne mechanizmy jej immunomodulacyjnego działania nie zostały do końca poznane. Wyniki badań *in vitro* oraz *in vivo* sugerują, jako najbardziej prawdopodobny, regulacyjny wpływ laktoferyny na syntezę cytokin i chemokin, na powstawanie reaktywnych form tlenu (RFT) oraz mobilizację komórek układu immunologicznego [11]. Podkreśla się rolę swoistych receptorów LF na powierzchni komórek układu immunologicznego, a zwłaszcza znaczenie jej interakcji z LPS błony komórkowej bakterii Gram-ujemnych i jego receptorem CD14 [29].

Laktoferyna wpływa na aktywację komórek odporności nieswoistej (makrofagi, komórki NK), a także na odpowiedź swoistą, gdyż mobilizuje dojrzewanie limfocytów T odpowiadających za syntezę cytokin (TNF-α, IL-6, IL-1β).Wpływa także na limfocyty B, które nabywają zdolność do prezentacji antygenów limfocytom T [4].

Ważnym aspektem działania LF jest jej regulacyjny wpływ na procesy redox, w których przy udziale nadmiaru jonów żelaza powstają RFT. W przebiegu zakażenia wywierają one silne działanie bójcze wobec patogenów, jednak zbyt duże ich ilości działają toksycznie na organizm. Wiążąc żelazo, LF uniemożliwia reakcje redox i powstawanie RFT, chroniąc organizm przed stresem oksydacyjnym [6, 30].

DZIAŁANIE PRZECIWZAPALNE

W działaniu przeciwzapalnym LF istotną rolę odgrywa mobilizacja układu immunologicznego, prowadząca do zmniejszenia syntezy cytokin prozapalnych (m.in. TNF-α, IL-6, IL-1β) i zwiększenia wytwarzania cytokin przeciwzapalnych (IL-10), oraz zdolność do wiązania i sekwestracji żelaza [2-4, 11, 29].

Laktoferyna, uwalniana w dużych ilościach z neutrofilów w miejscu zapalenia lub urazu, działa immunoregulująco, prawdopodobnie poprzez stymulację różnych receptorów tkankowych.

W badaniach *in vitro* wykazano, że laktoferyna działa hamująco na powstawanie cząstek adhezyjnych ICAM-1 (*Intracellular Adhesion Molecule-1*) oraz zmniejsza syntezę prozapalnych cytokin, takich jak IL-1β i IL-6. Zwiększa też syntezę czynnika TGF-β [31]. Działanie laktoferyny zachodzi na poziomie jądra komórkowego poprzez wiązanie się z czynnikiem transkrypcyjnym NF-κB. Wykazano, że laktoferyna hamuje jego wiązanie z promotorem genu na TNF-α, przez co zmniejsza odpowiedź zapalną w zakażeniu. Poprzez łączenie się z LPS i CD-14 laktoferyna utrudnia uruchamianie reakcji zapalnej w przebiegu sepsy, gdyż hamuje mechanizm aktywacji receptorów TLR-4 przez kompleks LPS/CD-14/TLR-4. Reakcja ta jest podstawą odpowiedzi zapalnej w zakażeniu uogólnionym [32].

W badaniach na modelu zwierzęcym wykazano, że u myszy, którym wstrzyknięto letalną dawkę *E. coli*, profilaktyczne zastosowanie zarówno ludzkiej, jak i wołowej laktoferyny zwiększało przeżywalność w sepsie z 4% do 70%. Po podaniu zwierzętom laktoferyny obserwowano szybką eliminację bakterii z organizmu wskutek bezpośredniego wpływu LF na *E. coli*. Na innym modelu, w którym zwierzętom wstrzyknięto LPS z *E. coli*, wykazano że uprzednie profilaktyczne doustne podanie laktoferyny zmniejszyło śmiertelność z 73,7% do 16,7% [30].

Interesujące wyniki uzyskano w badaniu, w którym na zwierzęcym modelu zapalenia błony śluzowej żołądka spowodowanego przez *Helicobacter felis* wykazano działanie terapeutyczne doustnie podanej laktoferyny [33]. Działanie przeciwzapalne po doustnym podaniu laktoferyny, polegające na stymulacji syntezy IL-10 z równoczesnym hamowaniem syntezy TNF-α, wykazano także w badaniach na zwierzętach, dotyczących zapalenia jelit [30].

Szczególnie ważne dla niedojrzałego przewodu pokarmowego działanie laktoferyny wykazano u cieląt i noworodków szczurzych. Doustne podanie laktoferyny powodowało u nich zmniejszenie stosunku neutrofilów do limfocytów, a także zwiększenie wchłaniania składników pokarmu w dwunastnicy i jelicie cienkim, czemu towarzyszyło zwiększenie długości kosmków, pogłębienie krypt, a także szybsze pojawienie się kłębków Peyera, biorących m.in. udział w wydzielaniu sekrecyjnej IgA [34].

ZNACZENIE LAKTOFERYNY W OKRESIE NOWORODKOWYM

Największe stężenia laktoferyny u człowieka występują w pokarmie naturalnym bezpośrednio po urodzeniu dziecka, czyli w siarze. Może to sugerować istotną rolę laktoferyny dla prawidłowego funkcjonowania organizmu dziecka.

W żołądku, pod wpływem niskiego pH i działania pepsyny, z laktoferyny powstają peptydy – laktoferycyna

i laktoferampina o podobnej aktywności przeciwdrobnoustrojowej, jak związek macierzysty. Natomiast relatywnie wysokie pH w jelicie cienkim u noworodków chroni laktoferynę przed degradacją do laktoferycyny. W jelicie cienkim człowieka w pierwszych tygodniach po urodzeniu wykryto obecność intelektyny, która jest receptorem dla laktoferyny. Prawdopodobnie pośredniczy ona w pobieraniu żelaza od laktoferyny, a także jest mediatorem jej immunomodulacyjnego działania [30]. Na podstawie wyników badań można przyjąć, że laktoferyna jest głównym źródłem żelaza dla organizmu w pierwszym okresie życia [30]. Według niektórych autorów przeciwdrobnoustrojowe i immunomodulujące działanie laktoferyny może być szczególnie ważne właśnie w pierwszych tygodniach życia [35]. Laktoferyna jest bowiem jednym z czynników regulujących równowagę pomiędzy odpowiedzią immunologiczną Th1 i Th2, co jest szczególnie ważne w przypadku noworodków urodzonych przedwcześnie, u których polaryzacja w kierunku odpowiedzi Th2 zwiększa podatność na zakażenia.

W badaniach *in vitro* wykazano, że ludzka laktoferyna działa osłonowo, chroniąc błonę śluzową przed uszkodzeniem wywołanym przez LPS dodany do hodowli komórek jelita Caco-2 [30]. Podobne działanie wykazuje także laktoferyna bydlęca, jednak warunkiem jej integracji z receptorem dla hLF, znajdującym się na komórkach Caco-2, jest brak zanieczyszczeń lipopolisacharydowych w produkcie. Układowe działanie immunomodulujące laktoferyny podanej doustnie zachodzi prawdopodobnie poprzez interakcję z tkanką limfatyczną przewodu pokarmowego – GALT (*gut-associated lymphoid tissue*). Wiadomo też, że laktoferyna wpływa na odpowiedź immunologiczną organizmu, przyspieszając dojrzewanie limfocytów T i B [11] oraz nasilając syntezę cytokin i chemokin [30]. Ważnym działaniem laktoferyny jest jej wpływ na komórki nabłonkowe jelita cienkiego. Stymuluje ona zarówno ich proliferację, jak i różnicowanie, przez co zwiększa się aktywność enzymów trawiennych uwalnianych w jelicie cienkim [11].

Noworodek donoszony, karmiony wyłącznie piersią, przyjmuje około 3 g laktoferyny na dobę w pierwszym tygodniu życia. Noworodek urodzony przedwcześnie ma znacznie mniejsze możliwości dostarczenia do jelit wystarczającej ilości laktoferyny drogą doustną, przede wszystkim ze względu na niedojrzałość morfologiczną i czynnościową przewodu pokarmowego. Należy pamiętać, że zarówno pasteryzacja, jak i zamrażanie pokarmu naturalnego zmniejszają istotnie zawartość laktoferyny. Z badania ELFIN wynika, że aby dawki laktoferyny u noworodków urodzonych przedwcześnie były zbliżone do ilości, którą otrzymują noworodki donoszone w pokarmie matki, powinny one wynosić około 100-200 mg/kg/dobę, a suplementację należałoby kontynuować do 34. tygodnia wieku postkoncepcyjnego [30].

W Stanach Zjednoczonych laktoferyna została uznana przez FDA (*Food and Drug Administration*) za substancję o statusie GRAS (*Generally Regarded as Safe*), tj. bezpieczną dla ludzi. Dowodzą tego także doniesienia o jej dobrym tolerowaniu i braku działań niepożądanych. Należy przy tym podkreślić, że laktoferyna bydlęca ma małe powinowactwo do jej receptora w dwunastnicy i jelicie cienkim [30]. W związku z tym produkowana jest rekombinowana ludzka laktoferyna (talaktoferyna), która powinna mieć zarówno większe powinowactwo do receptora jelitowego, jak i powodować mniejsze teoretyczne działania niepożądane, związane z obecnością białek mleka krowiego. Do chwili obecnej nie ma jednak istotnych klinicznych dowodów na wyższość rekombinowanej laktoferyny ludzkiej nad bydlęcą.

BADANIA KLINICZNE LAKTOFERYNY

Badania kliniczne z zastosowaniem laktoferyny prowadzono zarówno u dorosłych, jak i dzieci, w tym u noworodków przedwcześnie urodzonych. W badaniach klinicznych przeprowadzonych z udziałem dzieci najczęściej stosowano postać bydlęcą laktoferyny.

U dorosłych pacjentów z przewlekłym zakażeniem wywołanym przez *H. pylori* laktoferyna była skuteczna w przypadkach niepoddających się terapii klasycznej [36]. Wykazano też, że doustne przyjmowanie laktoferyny bydlęcej zdecydowanie ograniczało wzrost polipów o typie gruczolaka. Z kolei, stosując talaktoferynę-α uzyskano korzystne wyniki w badaniach I i II fazy u pacjentów z przerzutami raka nerki [30]. Podobne wyniki otrzymano także u chorych z rakiem płuca, z wyjątkiem jego postaci drobnokomórkowej [30].

U dzieci z biegunką wykazano skuteczność tej glikoproteiny, polegającą zarówno na zmniejszeniu częstości występowania biegunki, jak i łagodzeniu jej przebiegu [30].

W przeprowadzonej metaanalizie wyników badań klinicznych z zastosowaniem laktoferyny u dzieci wykazano jej korzystne działanie protekcyjne w zakażeniach przewodu pokarmowego oraz w sepsie u noworodków. W wieloośrodkowym, randomizowanym badaniu kontrolowanym, obejmującym 472 noworodki z bardzo małą urodzeniową masą ciała (VLBW), Manzoni i wsp. [37] wykazali, że podawanie laktoferyny bydlęcej zarówno w monoterapii, jak i w skojarzeniu z *Lactobacillus rhamnosus* zmniejszało częstość wystąpienia późnej sepsy (*LOS – late onset sepsis*) w tej grupie dzieci. Różnice były istotne statystycznie u noworodków ze skrajnie małą urodzeniową masą ciała (<1000 g). Autorzy badania wykazali także ochronne działanie laktoferyny bydlęcej w martwiczym zapaleniu jelit u noworodków (stopień II i wyższe wg klasyfikacji Bella). W tej samej grupie noworodków odnotowano także wyraźne zmniejszenie częstości występowania postaci inwazyjnych zakażeń grzybiczych, z jednoczesną podobną częstością dotyczącą zakażeń powierzchownych skóry i błon śluzowych jamy ustnej. Rzadziej też u noworodków przedwcześnie urodzonych otrzymujących laktoferynę stwierdzano obecność grzybów w wymazach z kału, aspiratu z żołądka lub odbytu. Podobne badanie, przeprowadzone w Indiach, wykazało istotne statystycznie zmniejszenie częstości występowania sepsy o późnym początku, a także trend na granicy istotności statystycznej, wykazujący zmniejszenie umieralności w przebiegu sepsy u noworodków z małą urodzeniową masą ciała, którym podawano laktoferynę [38]. Także Ochoa i wsp. [39] stwierdzili korzystne działanie bLF w postaci zmniejszenia częstości występowania sepsy u noworodków, jednak wykazane przez nich różnice nie

były istotne statystycznie, prawdopodobnie ze względu na małą liczebność grupy.

W przedstawionych powyżej badaniach klinicznych laktoferynę bydlęcą podawano w pierwszych 12 godzinach po urodzeniu w dawce 100-200 mg/kg. Podawanie kontynuowano przez 30 dni, a u noworodków z masą ciała poniżej 1000 g suplementację przedłużano do 45. dnia życia.

W innym badaniu stosowano laktoferynę w postaci żelu w celu ograniczenia występowania VAP (*ventilator associated pneumonia*). Żelem pokrywano błony śluzowe noworodków urodzonych przed 28. tygodniem ciąży, wymagających stosowania wentylacji mechanicznej. Autorzy badania stwierdzili nieistotne statystycznie zmniejszenie częstości występowania VAP u noworodków, u których stosowano żel z laktoferyną [38].

Interesującą, o istotnym znaczeniu dla przebiegu ciąży możliwość zastosowania laktoferyny zaprezentowali Paesano i wsp. [40]. Opierając się na wcześniejszych danych, dotyczących wpływu laktoferyny na zmniejszenie stężenia IL-6 w surowicy, autorzy stosowali doustnie bLF u ciężarnych z niedoborem żelaza i niedokrwistością w skojarzeniu z preparatem siarczanu żelaza. W grupie kobiet otrzymujących laktoferynę w połączeniu z siarczanem żelaza uzyskano znaczną poprawę parametrów hematologicznych, przy czym obserwowano u nich istotne statystycznie mniejsze wartości stężenia IL-6 w surowicy. Co ciekawsze, u pacjentek otrzymujących laktoferynę stężenie prohepcydyny, prekursora hepcydyny, która powoduje internalizację i degradację ferroportyny, uniemożliwiając w ten sposób wykorzystanie w procesie erytropoezy żelaza znajdującego się wewnątrz komórek, było istotnie statystycznie większe. Autorzy tłumaczą to znaczącym hamującym działaniem IL-6 na ekspresję ferroportyny. Jak wiadomo, aktywność ferroportyny w komórkach magazynujących żelazo jest niezbędna do jego transportu do osocza.

Ci sami autorzy, stosując laktoferynę dopochwowo wykazali u kobiet ciężarnych zagrożonych porodem przedwczesnym mniejsze stężenia IL-6 i PGF2α w wydzielinie szyjkowo-pochwowej. Żadna z kobiet otrzymujących w ten sposób laktoferynę wołową nie urodziła przed 37. tygodniem ciąży [40].

W dobie częstych epidemii grypy można przytoczyć także wyniki kolejnych badań, w których wykazano, że podawanie siary dorosłym zabezpiecza ich przed zachorowaniem na grypę z podobnym skutkiem, jaki wykazuje szczepienie stosowane przed okresami największego zagrożenia grypą [11].

Wobec istotnej roli laktoferyny w procesie wchłaniania żelaza z przewodu pokarmowego, zwłaszcza w pierwszych miesiącach życia, producenci mieszanek mlecznych dla niemowląt podjęli próby ich wzbogacenia laktoferyną bydlęcą. W kilku badaniach klinicznych, oceniających zasadność takiej fortyfikacji mieszanek, wykazano korzystny wpływ laktoferyny na poprawę stężenia hemoglobiny we krwi i zapasów żelaza w organizmie [41]. Natomiast podawanie bLF w okresie karmienia pokarmem naturalnym nie tylko nie wpływało korzystnie na opisane wyżej parametry, ale wręcz powodowało ograniczenie wchłaniania żelaza u niemowląt [41]. Prawdopodobnie obecna w pokarmie laktoferyna ludzka wysyciła w sposób wystarczający receptor w jelicie cienkim – intelektynę – odpowiedzialny m.in. za absorpcję jonów żelaza. Podanie bLF mogło w tym przypadku jedynie powodować zaburzenia w aktywacji receptora i wynikające z tego ograniczenie wchłaniania żelaza.

BADANIA WŁASNE

Od trzech lat autorzy niniejszej pracy stosują doustnie laktoferynę bydlęcą w jednorazowej dawce 100 mg na dobę u noworodków urodzonych przedwcześnie z masą ciała poniżej 1250 g. Podawanie bLF rozpoczyna się już w pierwszej dobie życia i kontynuuje przez minimum 30 dni. U dzieci ważących 500-750 g stosowanie laktoferyny przedłuża się do 45 dni. Równocześnie z laktoferyną podawane są probiotyki. Jak wynika ze wstępnych obliczeń, częstość rozpoznania martwiczego zapalenia jelit zmniejszyła się w tym okresie 3,5-krotnie w porównaniu do dwuletniego okresu poprzedzającego wprowadzenie suplementu, i w grupie noworodków z urodzeniową masą ciała poniżej 1250 g wynosiła 1,6% (6/375). W okresie stosowania laktoferyny żadne z dzieci, u których rozpoznano martwicze zapalenie jelit, które nie było powikłaniem wady przewodu pokarmowego, nie wymagało interwencji chirurgicznej. Laktoferyna nie jest stosowana w sytuacjach klinicznych stanowiących przeciwwskazanie do podania doustnego.

Na podstawie trzyletniej obserwacji możemy stwierdzić zarówno korzystne działanie, jak i brak działań niepożądanych podczas suplementacji preparatem laktoferyny bydlęcej w doustnej dawce dobowej 100 mg u noworodków urodzonych przedwcześnie z masą urodzeniową poniżej 1250 g. Jest to zgodne z danymi z piśmiennictwa, w tym z wynikami najnowszego (2015) przeglądu Cochrane [42], dokonanego na podstawie analizy 4 badań klinicznych z udziałem 1103 noworodków przedwcześnie urodzonych. Wykazał on skuteczność i bezpieczeństwo stosowania laktoferyny (w monoterapii i w skojarzeniu z probiotykami) w zapobieganiu wystąpieniu późnej sepsy oraz martwiczego zapalenia jelit w stopniu II i wyższym.

PIŚMIENNICTWO

1. Jenssen H, Hancock REW. Antimicrobial properties of lactoferrin. Biochimie 2009;91:19-29.
2. Artym J. Udział laktoferyny w gospodarce żelazem w organizmie. Część II. Działanie przeciwmikrobiologiczne i przeciwzapalne poprzez sekwestrację żelaza. Postępy Hig Med Dosw. 2010;64:604-616.
3. Gonzalez-Chavez SA, Arevalo-Gallegos S, Rascon-Cruz Q. Lactoferrin: structure, function and applications. Int J Antimicrob Agents. 2009;33:301.e1-301.e8.
4. Garcia-Montoya IA, Siqueiros-Cendon T, Arevalo-Gallegos S, Rascon-Cruz Q. Lactoferrin a multiple bioactive protein: An overview. Biochim Biophys Acta 2012;1820:226-236.
5. Tomita M, Wakabayashi H, Shin K, Yamauchi K, Yaeshima T, Iwatsuki K. Twenty-five years of research on bovine lactoferrin applications. Biochimie 2009;91:52-57.
6. Artym J. Laktoferyna – strażnik procesów przyswajania żelaza. Postępy Biol Komórki. 2015;42(2):283-308.

7. Anand N, Kanwar RK, ML Dubey, Vahishta RK, Sehgal R, Verma AK, Kanwar JR. Effect of lactoferrin protein on red blood cells and macrophages: mechanism of parasite-host interaction. Drug Des Devel Ther. 2015;9:3821-3835.
8. Suzuku YA, Lopez V, Lonnerdal B. Mammalian lactoferrin receptors: structure and function. Cell Mol Life Sci. 2005;62:2560-2575.
9. Buccigrossi V, de Marco G, Bruzzese E, Ombrato L, Bracale I, Polito G, Guarino A. Lactoferrin induces concentration-dependent functional modulation of intestinal proliferation and differentiation. Pediatr Res. 2007;61:410-414.
10. Ronayne de Ferrer PA, Baroni A, Sambucetti ME, Lopez NE, Ceriani Cernades JM. Lactoferrin levels in term and preterm milk. J Am Coll Nutr. 2000;19:370-373.
11. Siqueiros-Cendon T, Arevallo-Gallegos S, Iglesias-Figueroa BF, Garcia-Montoya IA, Salazar-Martinez J, Rascon-Cruz Q. Immunomodulatory effects of lactoferrin. Acta Pharm Sin. 2014;35:557-566.
12. Valenti P, Antonini G. Lactoferrin: an important host defence against microbial and viral attack. Cell Mol Life Sci. 2005;62:2576-2587.
13. Hennart PF, Brasseur DJ, Delogne-Desnoeck JB, Dramaix MM, Robyn CE. Lysozyme, lactoferrin, and secretory immunoglobulin content in breast milk: influence of duration of lactation, nutrition status, prolactin status and parity of mother. Am J Clin Nutr. 1991;53:32-39.
14. Artym J. Udział laktoferyny w gospodarce żelazem w organizmie. Część I. Wpływ laktoferyny na wchłanianie, transport i magazynowanie żelaza. Postępy Hig Med Dośw. 2008;62:599-611.
15. Metz-Boutigue MH, Jolles J, Mazurier J, Schentgen F, Legrand D, Spik G, Montreuil J, Jolles P. Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparison with other transferrins. Eur J Biochem FEBS. 1984;145:659-676.
16. Baker EN, Baker HM. A structural framework for understanding the multifunctional character of lactoferrin. Biochimie 2009;91:3-10.
17. Gifford JH, Hunter HN, Vogel HJ. Lactoferricin: a lactoferrin-derived peptide with antimicrobial antiviral, antitumor and immunological properties. Cell Mol Life Sci. 2005;62:2588-2598.
18. Fisher R, Debbabi H, Blais A, Dubarry M, Rautureau M et al. Uptake of ingested bovine lactoferrin and its accumulation in adult mouse tissues. Int Immunopharmacol 2007;7:1387-1393.
19. Orsi N. The antimicrobial activity of lactoferrin: current status and perspectives. Biometals 2004;17:189-196.
20. Leitch EC, Willcox MD. Elucidation of the antistaphylococcal action of lactoferrin and lysozyme. J Med Microbiol. 1999;48:867-871.
21. Gomez HF, Ochoa TJ, Carlin LG, Cleary TG. Human lactoferrin impairs virulence of *Shigella flexneri*. J Infect Dis. 2003;187:87-95.
22. Venkatesh M, Rong L, Raad I, Versalovic J. Novel synergistic antibiofilm combinations for salvage of infected catheters. J Med Microbiol. 2009;58:936-944.
23. Petschow BW, Talbott RD, Batema RP. Ability of lactoferrin to promote the growth of *Bifidobacterium spp*. in vitro is independent of receptor binding capacity and iron saturation level. J Med Microbiol. 2001;48:541-549.
24. Ammons MC, Copie V. Mini-review: Lactoferrin: a bioinspired, anti-biofilm therapeutic. Biofouling. 2013;29(4):443-455.
25. Venkatesh M, Rong L. Human recombinant lactoferrin acts synergistically with antimicrobials commonly used in neonatal practice against coagulase-negative staphylococci and *Candida albicans* causing neonatal sepsis. J Med Microbiol. 2008;57:1113-1121.
26. Zuccotti GV, Salvini F, Riva E, Agostoni C. Oral lactoferrin in HIV-1 vertically infected children: an observational follow-up of plasma viral load and immune parameters. J Int Med Res. 2006;34:88-94.
27. Wakabayashi H, Oda H, Yamauchi K, Abe F. Lactoferrin for prevention of common viral infections. J Infect Chem. 2014;20:666-671.
28. Kondori N, Baltzer L, Dolphin GT, Mattsby-Baltzer I. Fungicidal activity of human lactoferrin-derived peptides based on the antimicrobial aβ region. Int J Antimicrob Agents. 2011;37:51-57.
29. Latorre D, Puddu P, Valenti P, Gessani S. Reciprocal interactions between lactoferrin and bacterial endotoxins and their role in the regulation of the immune response. Toxins. 2010;2:54-68.
30. Lingappan K, Arunachalam A, Pammi M. Lactoferrin and the newborn: current perspectives. Expert Rev Anti Infect Ther. 2013;11:695-707.
31. Yeom M, Park J, Lee B, Choi SY, Kim KS, Lee M, Hahm DH. Lactoferrin inhibits the inflammatory and angiogenic activation of bovine aortic endothelial cells. Inflamm Res. 2011;60:475-482.
32. Lu YC, Yeh WC, Chashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. Cytokine. 2008;42:145-151.
33. Dial EJ, Lichtenberger LM. Effect of lactoferrin on *Helicobacter felis* induced gastritis. Biochem Cell Biol. 2002;80:113-117.
34. Sherman MP, Bennett SH, Hwang FF, Yu C. Neonatal small bowel epithelia: enhancing anti-bacteria defence with lactoferrin and *Lactobacillus* GG. Biometals. 2004;17:285-289.
35. Levy O. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. Nat Rev Immunol. 2007;7:379-390.
36. Tursi A, Elisei W, Brandimarte G, Giorgetti GM, Modeo ME, Aiello F. Effect of lactoferrin supplementation on the effectiveness and tolerability of a 7-day quadruple therapy after failure of a first attempt to cure *Helicobacter pylori* infection. Med Sci Monit. 2007;13:187-190.
37. Manzoni P, Stolfi I, Messner H; Italian Task Force for the Study and Prevention of Neonatal Fungal Infections-the Italian Society of Neonatology. Bovine lactoferrin prevents invasive fungal infections in very low birth weight infants: a randomized controlled trial. Pediatrics. 2012;129:116-123.
38. Sharma D, Shastri S. Lactoferrin and neonatology – role in neonatal sepsis and necrotizing enterocolitis: present, past and future. J Matern Fetal Neonatal Med. 2016:29(5):763-770.
39. Ochoa TJ, Zegarra J, Cam L, Llanos R, Pezao A, Cruz K, Ze-vera A, Carcamo C, Campas M, Bellomo S. Randomized controlled trial of lactoferrin for prevention of sepsis in Peruvian neonates less than 2500 g. Pediatr Infect Dis J. 2015;34:571-576.

40. Paesano R, Pietropaoli M, Berlutti F, Valenti P. Bovine lactoferrin in preventing preterm delivery associated with sterile inflammation. Biochem Cell Biol. 2012;90:468-475.
41. Chen K, Lan Z, Hua L, Ying Z, Humina X, Jia Shang, Weizheng T, Ping Y, Lingying C, Meng M. Iron metabolism in infants: influence of bovine lactoferrin from iron-fortified formula. Nutrition. 2015;31:304-309.
42. Pammi M, Abrams SA. Oral lactoferrin for the prevention of sepsis and necrotizing enterocolitis in preterm infants. Cochrane Database Syst Rev 2015; Feb 20;2:CD007137.

Wkład Autorów/Author's contributions
Według kolejności/According to the order of the Authorship

Konflikt interesu/Conflicts of interest
Autorzy pracy nie zgłaszają konfliktu interesów.
The Authors declare no conflict of interest.

Nadesłano/Received: 11.05.2016 r.
Zaakceptowano/Accepted: 18.05.2016 r.

Dostępne online/Published online

Adres do korespondencji:
Ryszard Lauterbach
Klinika Neonatologii CMUJ
ul. Kopernika 23, 31-501 Kraków
tel. (12) 424-85-87
e-mail: ryszard@lauterbach.pl