

## KORZYSTNE DZIAŁANIE LAKTOFERYNY NA MIKROBIOTĘ PRZEWODU POKARMOWEGO

Jolanta Artym\*, Michał Zimecki

Zakład Terapii Doświadczalnej, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda we Wrocławiu

Wpłynęło w maju, zaakceptowano w czerwcu 2020 r.

**Streszczenie:** Nasz organizm jest zasiedlony przez biliony symbiotycznych bakterii. Najliczniejsza i najbardziej różnorodna ich populacja kolonizuje jelito, górne drogi oddechowe i układ moczowo-płciowy. Działają one wielokierunkowo, wspierając nasze zdrowie. Kiedy mikrobiota ta funkcjonuje prawidłowo pomaga w przyswajaniu składników odżywczych, reguluje pracę układu odpornościowego, chroniąc śluzówki i cały ustrój przed patogenami, neutralizuje niektóre ksenobiotyki, odtruwa więc organizm i chroni przed nowotworowymi mutacjami. Naturalną pożyteczną mikrobiotę możemy wspomóc przyjmując probiotyki i/lub prebiotyki w produktach spożywczych oraz suplementach diety i lekach. Ich cennym naturalnym źródłem są mleko i produkty nabiałowe, szczególnie fermentowane (np. kefir, jogurty i sery). Wśród substancji prebiotycznych znajdziemy tu m.in. oligosacharydy, lizozym, laktoperoksydazę czy laktoferynę. Białko to promuje wzrost symbiotycznej mikrobioty jelita i dróg rodnych, co potwierdzono w licznych testach. Aktywność taka, w połączeniu z działaniem przeciwmikrobiologicznym wobec drobnoustrojów patogennych, przywraca równowagę mikrobioty w obrębie błon śluzowych, co skutecznie eliminuje czynniki zakaźne i procesy zapalne. Najmłodsze dzieci wspomagają laktoferyną przyjmowaną z mlekiem matki. W późniejszym wieku możemy liczyć na własne, endogenne białko wydzielane przez błony śluzowe i neutrofile albo jego dostawę z nabiałem (nie poddanym agresywnej obróbce termicznej) lub suplementami diety. Na rynku znajdziemy zarówno produkty z samą laktoferyną bydlęcą, dodatkowo z innymi prebiotykami, np. inuliną czy oligosacharydami, a także z probiotykami. Skuteczne są preparaty laktoferynowe przyjmowane doustnie, co potwierdzono w licznych badaniach, także klinicznych. Białko jest względnie odporne na trawienie. Natywne lub w postaci peptydów może docierać do jelita, działać lokalnie na mikrobiotę i układ odpornościowy związany z tutejszą błoną śluzową, i tą drogą wzmacniać odporność ogólnoustrojową.

1. Wprowadzenie. 2. Mikrobiota przewodu pokarmowego. 3. Laktoferyna w przewodzie pokarmowym. 4. Prebiotyczne działanie laktoferyny w przewodzie pokarmowym – testy *in vitro*. 5. Prebiotyczne działanie laktoferyny w przewodzie pokarmowym – testy *in vivo*. 6. Laktoferyna w diecie i suplementach diety. 7. Podsumowanie

### BENEFICIAL EFFECT OF LACTOFERRIN ON THE MICROBIOTA FROM GASTROINTESTINAL TRACT

1. Introduction. 2. Gut microbiota. 3. Lactoferrin in gastrointestinal tract. 4. Prebiotic activity in gastrointestinal tract – *in vitro* tests. 5. Prebiotic activity in gastrointestinal tract – *in vivo* tests. 6. Lactoferrin in diet and nutritional supplements. 7. Summary

**Abstract:** Our organism is colonized by trillions of symbiotic bacteria. The most numerous and varied bacterial population colonizes colon, upper respiratory airways and urogenital system. They act multidirectionally supporting our health. Symbiotic microbiota helps in acquirement of nutrients, regulates action of the immune system protecting mucosa and whole organism against pathogens, neutralizes some xenobiotics, thus acts as a preventive measure against carcinogenic mutations. This beneficial microbiota may be supported by uptake of probiotics and/or prebiotics in foods, diet supplements and drugs. They can be found in milk and dairy products, in particular fermented ones (e.g kefir, yoghurt and cheese), which contain both probiotics and prebiotics, including lactoferrin. This protein has a confirmed action promoting growth of symbiotic microbiota of intestine and urogenital tract. Such activity, associated with antimicrobial action regarding pathogenic microorganisms, restores equilibrium of microbiota within mucous membranes that effectively eliminates pathogens and inflammatory processes. Youngest children are supported by lactoferrin acquired with maternal milk. Later we can rely on our own, endogenous proteins, secreted by mucous membranes and neutrophils and supply of dairy products (not subjected to aggressive thermal processing) or diet supplements. We can find in the market the products containing lactoferrin alone, with another prebiotic, e.g inulin or oligosaccharides, and also with probiotics. Orally taken lactoferrin is effective as proved in a number of clinical studies. The protein is relatively resistant to digestion, may reach intestine, where acts on gut microbiota and local lymphoid tissue. In this way lactoferrin may enhance immunological status of our mucous system.

**Słowa kluczowe:** jelito, laktoferyna, mikrobiota, prebiotyki, probiotyki

**Key words:** intestine, lactoferrin, microbiota, prebiotics, probiotics

### 1. Wprowadzenie

Dieta ma nam dostarczyć wszystkich składników do budowy tkanek, produkcji energii i regulacji różnych procesów życiowych. Powinny się w niej zna-

leżć także składniki o wielokierunkowym działaniu regulacyjnym i ochronnym, które wspomagają naszą odporność, zwalczają groźne drobnoustroje, regulują ogólnoustrojowy metabolizm czy w końcu kontrolują naszą mikrobiotę jelitową. Źródłem takich substancji

\* Autor korespondencyjny: Jolanta Artym, Zakład Terapii Doświadczalnej, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, ul. R. Weigla 12, 53-112 Wrocław; tel. 71 370 99 18; e-mail: limbiol@hirszfeld.pl

aktywnych biologicznie są głównie rośliny, ale także różne produkty pochodzenia zwierzęcego, w tym mleko i jego przetwory. Podczas ostatnich kilkunastu tysięcy lat konsumpcji produktów nabiałowych przystosowaliśmy się do trawienia i wykorzystania jego cennych składników odżywczych. Od najdawniejszych czasów zjadaliśmy głównie łatwiej strawne i bogatsze w składniki odżywcze i regulacyjne produkty z mleka fermentowanego (np. kwaśne mleko, kefir, maślankę, sery, śmietanę, kumys). Zawierają one niezwykle cenne dla nas bakterie fermentacyjne, które mogą wspomóc naszą własną mikrobiotę, ale też dostarczyć wielu wartościowych produktów swojego metabolizmu. W wyrobach fermentowanych znajdziemy bakterie kwasu mlekowego (lactic acid bacteria; LAB), spośród których najpowszechniej występują 2 rodzaje: *Lactobacillus* (m.in. gatunki: *L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. helveticus*, *L. johnsonii*, *L. (para)casei*, *L. reuteri*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* i *L. fermentum*) oraz *Bifidobacterium* (m.in. gatunki: *B. bifidum*, *B. longum*, *B. animalis*, *B. breve*). Pierwsze mają kształt pałeczek, drugie litery Y lub V, oba należą do bakterii Gram-dodatnich, żyją w warunkach beztlenowych, fermentują cukry do kwasu mlekowego, silnie zakwaszając środowisko swojego życia [23, 37, 47, 52].

Bakterie te powszechnie występują w środowisku, tworzą także naszą fizjologiczną mikrobiotę. Jednocześnie wiele szczepów LAB zalicza się do probiotyków, czyli żywych drobnoustrojów, które podane w odpowiedniej ilości wywierają korzystny wpływ na nasze zdrowie [36]. Stosowaliśmy je w diecie od tysięcy lat obserwując, że służą naszej kondycji, dzisiaj ich działanie prozdrowotne potwierdzono w setkach badań. To głównie regulacja mikrobioty jelitowej, a tą drogą: profilaktyka i zwalczanie infekcji żołądkowo-jelitowych, biegunki poantybiotykowej, objawów zespołu jelita drażliwego i nieswoistych chorób zapalnych jelita, zapań, nawracających infekcji dróg oddechowych i moczowopłciowych oraz alergii (np. atopowego zapalenia skóry). Ponadto probiotyki mogą regulować działanie układu odpornościowego, hamować procesy nowotworzenia, obniżać poziom cholesterolu czy ciśnienie krwi. Wiele z tych działań możemy przypisać produktom ich metabolizmu. To m.in.: witaminy z grupy B i witamina K, krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (KKT; octowy, masłowy, propionowy) o działaniu przeciwzapalnym i troficznym dla kolonocytów, kwas gamma-aminomasłowy (gamma-aminobutyric acid; GABA) pełniący funkcję neuroprzekaznika hamującego, bakteriocyny (peptydy hamujące wzrost lub zabijające bakterie), kwas rumenowy (skoniugowany kwas linolowy; conjugated linoleic acid; CLA) o właściwościach przeciwzapalnych, antyoksydacyjnych, antykanцерогенных i antyaterogennych, enzymy (np.  $\beta$ -galaktozydaza, trawiąca dwucukier laktozę), czy egzopolisacharydy (cukry złożone o działaniu bifidogennym). Podczas fermentacji

mleka bakterie probiotyczne za pomocą swoich enzymów proteolitycznych rozkładają białka mleka do licznych bioaktywnych peptydów o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, immunomodulującym, hipotensyjnym, przeciwkrzepliwym i antyoksydacyjnym. Jako przykład można wymienić pochodzące z kazeiny peptydy VPP i IPP hamujące aktywność konwertazy angiotensyny I (angiotensin-I-converting enzyme; ACE) i w ten sposób obniżające ciśnienie krwi [25, 52, 63, 88].

Probiotyki możemy stosować w żywności konwencjonalnej, specjalnie zaprojektowanej żywności prozdrowotnej (funkcjonalnej, czyli z dodatkiem bioaktywnych składników) lub w postaci suplementów diety, środków specjalnego przeznaczenia medycznego lub leków. Bakterie probiotyczne należą do naszej symbiotycznej mikrobioty, stąd nie powinny wywoływać niekorzystnych skutków w organizmie i ze względu na bezpieczeństwo stosowania są uznawane za nieniosące ryzyka dla zdrowia [36]. Często w tych produktach możemy znaleźć także prebiotyki, czyli substancje korzystnie wpływające na kondycję przyjmowanych probiotyków i naszej endogennej mikrobioty. Według aktualnej (z 2007 roku) definicji FAO/WHO prebiotyki to nie będące organizmami żywymi, nie trawione składniki żywności, które wywierają korzystny wpływ na gospodarza poprzez modulację mikrobioty [27, 56]. Zwykle są to substancje roślinne: oligo- i polisacharydy lub związki niecukrowe, które nie trawione przez gospodarza są fermentowane przez jego mikrobiotę, poprawiając jej kondycję. Obecnie coraz częściej stosuje się synbiotyki – preparaty zawierające jeden lub kilka probiotyków i prebiotyków.

Cennym źródłem prebiotyków w naszej diecie mogą być produkty spożywcze, także mleczne. Właściwości prebiotyczne mają liczne składniki mleka: fosforany, laktoza, oligosacharydy (głównie te zawierające N-acetylglukozaminę), nukleotydy,  $\alpha$ -laktoalbumina, laktope-roksydaza, lizozym, peptydowy fragment kazeiny (glikomakropeptyd; GMP) i laktoferyna (LF) [8, 15, 88, 97].

Laktoferyna jest wielofunkcyjną glikoproteiną obecną w ziarnistościach granulocytów obojętnochłonnych (neutrofilów) oraz we wszystkich wydzielinach ssaków, także w sianie i mleku. W dużych ilościach jest zatem dostarczana do organizmu nowo narodzonego dziecka, wpływając korzystnie na jego rozwój. W późniejszym wieku naturalnie występującą w naszym organizmie LF możemy uzupełnić dietą nabiałową lub w suplementach diety. Do dziś potwierdzono 20 różnorodnych fizjologicznych zadań, które LF spełnia w organizmie ssaków [4, 19, 88]. Działa przeciwdrobnoustrojowo (może hamować wzrost lub zabijać komórki różnych drobnoustrojów), immunoregulacyjnie (w zależności od potrzeby może wzmacniać lub wyciszać układ odpornościowy) i przeciwnowotworowo, neutralizuje toksyny bakteryjne, reguluje procesy utleniania-redukcji

przez zwiększanie lub hamowanie tworzenia reaktywnych form tlenu (RFT), jak również reguluje metabolizm żelaza, w tym jego wchłanianie z pokarmu. Potwierdzono ponadto jej udział w regulacji metabolizmu glukozy i lipidów, procesach hematopoetycznych, kościotwórczych oraz gojenia ran, a także działanie hipotensyjne, analgetyczne i przeciwstresowe [3, 18, 19]. Co ważne, w podobny sposób, a nawet silniej, działają peptydy – pochodne natywnej LF, powstające podczas jej trawienia enzymatycznego oraz syntezowane w warunkach laboratoryjnych. Do najbardziej aktywnych spośród nich należą laktoferycyna i laktoferampina uzyskane z płatu N cząsteczki LF [53].

Jedną z dobrze już dziś potwierdzonych właściwości LF jest działanie prebiotyczne, czyli korzystny (ochronny lub promujący wzrost) wpływ na bakterie probiotyczne i bakterie symbiotyczne zasiedlające naturalnie nasz organizm. Jak na razie, najlepiej potwierdzono działanie prebiotyczne LF w zaburzeniach mikrobioty przewodu pokarmowego oraz układu moczowo-płciowego u kobiet [87, 88].

Poniżej dokonano przeglądu literatury prezentującej wyniki badań aktywności prebiotycznej laktoferyny w przewodzie pokarmowym, przypominając wcześniej pokrótce wiadomości na temat mikrobioty zamieszkującej nasze jelita.

## 2. Mikrobiota przewodu pokarmowego

Nasz organizm zasiedlają liczne drobnoustroje: wirusy, archeony, bakterie, grzyby i pierwotniaki, tworząc złożony ekosystem nazywany dawniej mikroflorą, a obecnie mikrobiotą. Najliczniejsze społeczności mikroorganizmów żyją w miejscach kontaktu ze środowiskiem zewnętrznym, a więc na skórze i błonach śluzowych: przewodu pokarmowego, dróg oddechowych i moczowo-płciowych. Przewód pokarmowy, a szczególnie jelito grube, zamieszkuje około 40 bilionów ( $40 \times 10^{12}$ ) bakterii, co stanowi 99% wszystkich „naszych” bakterii. Na mikrobiotę składają się zarówno bakterie symbiotyczne (pożyteczne), jak i zwykle niegroźne, obojętne, choć potencjalnie chorobotwórcze w określonych sytuacjach (tzw. bakterie oportunistyczne) oraz bezwzględnie (zawsze) groźne bakterie patogenne. Tych ostatnich jest najmniej i są zwykle utrzymywane w ryzach przez pożyteczne symbionty oraz układ immunologiczny, co chroni nas przed zakażeniami przewodu pokarmowego. Od dawna podejrzewano, że tajemnica naszego zdrowia tkwi w jelitach, a dziś już jest pewne, że to właśnie nasza mikrobiota jelitowa jest zasadnicza w ochronie nie tylko przed infekcją żołądkowo-jelitową, niestrawnością, biegunką czy zaparciami, ale też przed alergią, chorobami autoimmunizacyjnymi, rakiem, otyłością,

cukrzycą, nadciśnieniem, a nawet chorobami neurodegeneracyjnymi (np. autyzmem) w dzieciństwie czy neurodegeneracyjnymi (np. chorobą Alzheimera) w wieku podeszłym. Przez miliony lat wspólnej ewolucji zbudowaliśmy z naszymi mikrobiontami doskonały układ wzajemnych zależności, który możemy nazwać symbiozą mutualistyczną. To współpraca, z której obie strony czerpią korzyści, a wręcz muszą w niej pozostać, żeby prawidłowo funkcjonować. Oznacza to, że nasza mikrobiota jelitowa musi być sprawna, tzn. odpowiednia pod względem ilościowym, jakościowym i czynnościowym (stan eubiozy), bo tylko taka zapewni nam zdrowie, czyli homeostazę i dobrostan organizmu. Wszystkie zmiany „sprawności” mikrobioty (stan dysbiozy) spowodowane dietą, stylem życia, stresem, przyjmowaniem leków (m.in. antybiotyków) oraz wieloma innymi czynnikami mogą stać się przyczyną wspomnianych chorób [63, 93].

Pierwszych mieszkańców naszego własnego mikroświata zdobywamy już prawdopodobnie w łonie matki, gdzie niektóre z bakterii zasiedlających jej jelita przechodzą do krwi, a z nią do wód płodowych i krążenia płodu. Obecnie liczne doniesienia oparte na nowoczesnych metodach badawczych potwierdzają tak wczesną kolonizację organizmu dziecka, choć równie liczne są badania, które im zaprzeczają. Trudno na razie jednoznacznie ocenić, czy rację mają zwolennicy teorii „sterylnej macicy” („sterile womb”) czy raczej „macicznej kolonizacji” („*in utero colonisation*”) [66]. Bez względu na ostateczne rozwiązanie tej kwestii pewne pozostaje, że masywna kolonizacja organizmu dziecka następuje podczas porodu, gdzie nabywa ono bakterie głównie z dróg rodnych i przewodu pokarmowego matki. Pierwsze 3 lata życia (tzw. krytyczne 1000 dni) to okres, kiedy nie tylko dziecko szybko rośnie i się rozwija, ale też w siłę rośnie jego mikrobiota jelitowa. W tym czasie jest jeszcze bardzo wątpliwa, niestabilna i łatwo może się zmienić pod wpływem licznych czynników. Poza sposobem porodu (naturalny, drogą waginalną vs. cięcie cesarskie), najważniejsze to: dieta (karmienie piersią vs. żywienie sztuczne, za pomocą preparatów mlekozastępczych), stosowanie antybiotyków i innych leków (m.in. niesteroidowych leków przeciwzapalnych), hospitalizacja i wcześniactwo, starsze rodzeństwo i zwierzęta w domu. Obserwacje licznej grupy dzieci potwierdzają, że poród naturalny, wyłącznie karmienie piersią i starsze rodzeństwo zapewniają korzystną mikrobiotę startową w jelicie z przewagą pałeczek kwasu mlekowego z rodzajów *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* [65]. W ciągu pierwszych lat życia ekosystem jelitowy wzbogaca się o kolejne bakterie, dzięki czemu w życiu dorosłym mamy ich już łącznie 500–1000 gatunków należących do 6 gromad: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia* i *Fusobacteria*, ze znaczną przewagą (ponad

90%) dwóch pierwszych. To głównie organizmy beztle- nowe o wielokierunkowych korzystnych działaniach. Jak działają symbionty jelitowe? Pomagają trawić skład- niki pokarmowe, wytwarzają witaminy B i K, chronią przed rozrostem flory patogenicznej, dbają o szczelność nabłonka jelitowego, promują dojrzewanie i nieustan- nie regulują pracę układu immunologicznego oraz jelitowego układu nerwowego [63, 93]. Ten ostatni ma niezwykle rozbudowany system nerwów w obrębie jelita i może być hamowany/pobudzany przez neuro- transmitery wytwarzane przez bakterie. W ten sposób jelito stale komunikuje się z CUN i *vice versa*, a w tę komunikację mocno angażują się mikroby jelitowe. Utworzona w ten sposób oś mózg-jelita-mikrobiota decyduje o wielu aspektach pracy nie tylko układu tra- wiennego, ale też naszej ogólnej fizjologii [80].

Procesy zasiedlania i aktywności mikrobioty jelito- wej na początku naszego życia w dużej mierze regulują różnorodne czynniki obecne w mleku matki, które jest bogate zarówno w związki mikrobiostatyczne i bój- cze, jak i prebiotyczne. Jednym z nich jest laktoferyna. Warto podkreślić, że zwykle działają one addytywnie lub synergistycznie, wzajemnie wzmacniając swoją aktywność [8, 15, 88]. Z tego więc względu, szczegól- nie trudny jest dla oseska okres odstawienia od piersi (odsadzenia u zwierząt), czyli przejście od mleka matki do pokarmów stałych (żywienia typowego dla doro- słych). Wtedy rozwija się tzw. stres odstawieniowy (weaning stress), kiedy gwałtownie spada w jelicie ilość czynników regulujących zarówno liczebność pożą- danych jak i niepożądanych bakterii, aktywność układu immunologicznego i nerwowego, czy wspomagających wzrost i odnowę tkanki samego jelita. W tym okresie bakterie patogenne, jak *Escherichia coli* czy *Salmonella* spp., pozbawione nadzoru, mnożą się nadmiernie, co niszczy równowagę mikrobioty i prowadzi do rozwoju groźnej dysbiozy. To z kolei może być przyczyną zaka- żenia i pojawiania się stanów zapalnych.

### 3. Laktoferyna w przewodzie pokarmowym

Laktoferyna występuje naturalnie w przewodzie pokarmowym ssaków. Ekspresję genu dla LF przez komórki nabłonkowe błony śluzowej potwierdzono, jak dotąd, w dwunastnicy odsadzonych prosiąt [90] oraz dwunastnicy, jelicie czczym, krętym i okrężnicy myszy [50]. Podczas zakażenia/zapalenia jelita wytwarzanie LF lokalnie znacznie wzrasta, co odzwierciedla zarówno jej większą syntezę przez komórki nabłonkowe jelita, jak i uwalnianie przez naciekające śluzówkę neutrofile [50]. W dotychczasowych badaniach poziomy LF w kale dobrze korelowały nie tylko z nasileniem choroby, ale też skutecznością leczenia przewlekłych nieswoistych chorób zapalnych jelita (wrzodziejącego zapalenia jelita

grubego i choroby Crohna), co sugeruje, że w przysz- łości takie oznaczenia mogą być rutynowo stosowane w ocenie stanu tych pacjentów [48].

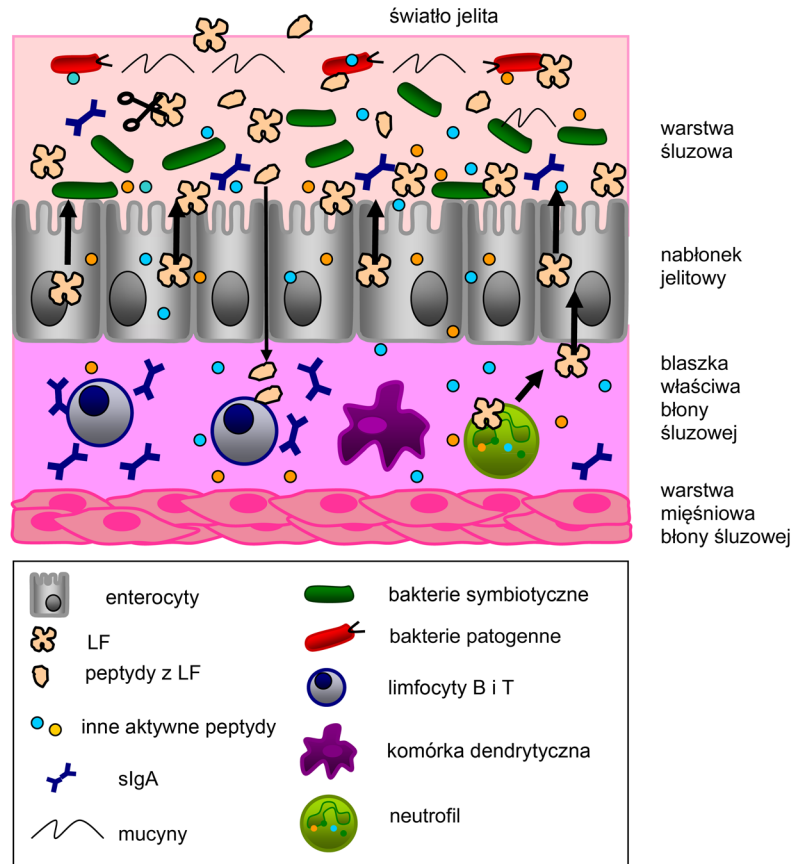
LF w przewodzie pokarmowym działa na różne spo- soby, co jest szczególnie istotne w niedojrzałej i bardzo jeszcze labilnej tkance jelita noworodków. To głównie LF egzogenna, dostarczona z pokarmem matki. Docie- rają tu duże ilości zarówno natywnego, nie strawionego białka, jak i pochodnych peptydów, które, po spełnieniu swoich zadań, są wydalane z kałem (stężenia fekalnej LF u donoszonych noworodków wahają się w przedziale 0,9 do 3,05 mg/ml, wyższe są u wcześniaków) [58].

W licznych badaniach potwierdzono korzystne działanie LF na nabłonek jelitowy. Białko to stymuluje wzrost, różnicowanie i aktywność wydzielniczą ko- mórek nabłonkowych, co optymalizuje procesy trawie- nia i absorpcji składników odżywczych oraz chroni przed działaniem patogenów i alergenów pokarmo- wych [9, 96]. LF chroni także nabłonek jelitowy przed toksycznym działaniem reaktywnych form tlenu (RFT), toksyn bakteryjnych oraz ksenobiotyków takich jak niesteroidowe leki przeciwzapalne (nonsteroidal anti- inflammatory drugs; NSAIDs) [32, 44, 78, 86]. Co ważne, LF chroni także przed zakażeniami przewodu pokarmowego, zarówno wirusowymi, jak i bakteryj- nymi, grzybiczymi czy pierwotniakowymi [3, 34]. W wielu testach wykazano ochronne działanie LF w stanach endotoksemii, bakteriemii, sepsy i martwi- czego zapalenia jelita u noworodków [14, 20, 46, 55, 59, 76], nieswoistego zapalenia jelita grubego [1, 49] oraz po resekcji części jelita [95]. Mechanizm działania LF może m.in. obejmować bezpośrednie hamowanie lub zabijanie komórek drobnoustrojów, aktywację/ hamowanie układu odpornościowego czy zwiększanie szczelności nabłonka jelitowego poprzez stymulację wytwarzania białek połączeń ścisłych [18, 34, 89].

Istotnym aspektem działania LF w tym kontekście jest aktywność prebiotyczna, co przyczynia się do przy- wrócenia równowagi mikrobioty jelitowej i chroni przed namnażaniem patogenów i rozwojem lokal- nego i uogólnionego stanu zapalnego. Kompleksowe działanie LF w zwalczaniu zakażenia/zapalenia, obej- mujące jej właściwości prebiotyczne, podsumowano na Ryc. 1 i 2. Korzystne działanie LF na mikrobiotę jelitową potwierdzono w licznych badaniach *in vitro* (w hodowlach komórkowych) oraz *in vivo* (na zwie- rzętach i ludziach).

### 4. Prebiotyczne działanie laktoferyny w przewodzie pokarmowym – testy *in vitro*

Uzyskane wyniki zależały od rodzaju użytej LF oraz warunków hodowli, co wskazuje możliwy mecha- nizm działania białka. W części badań wykazano bifi-



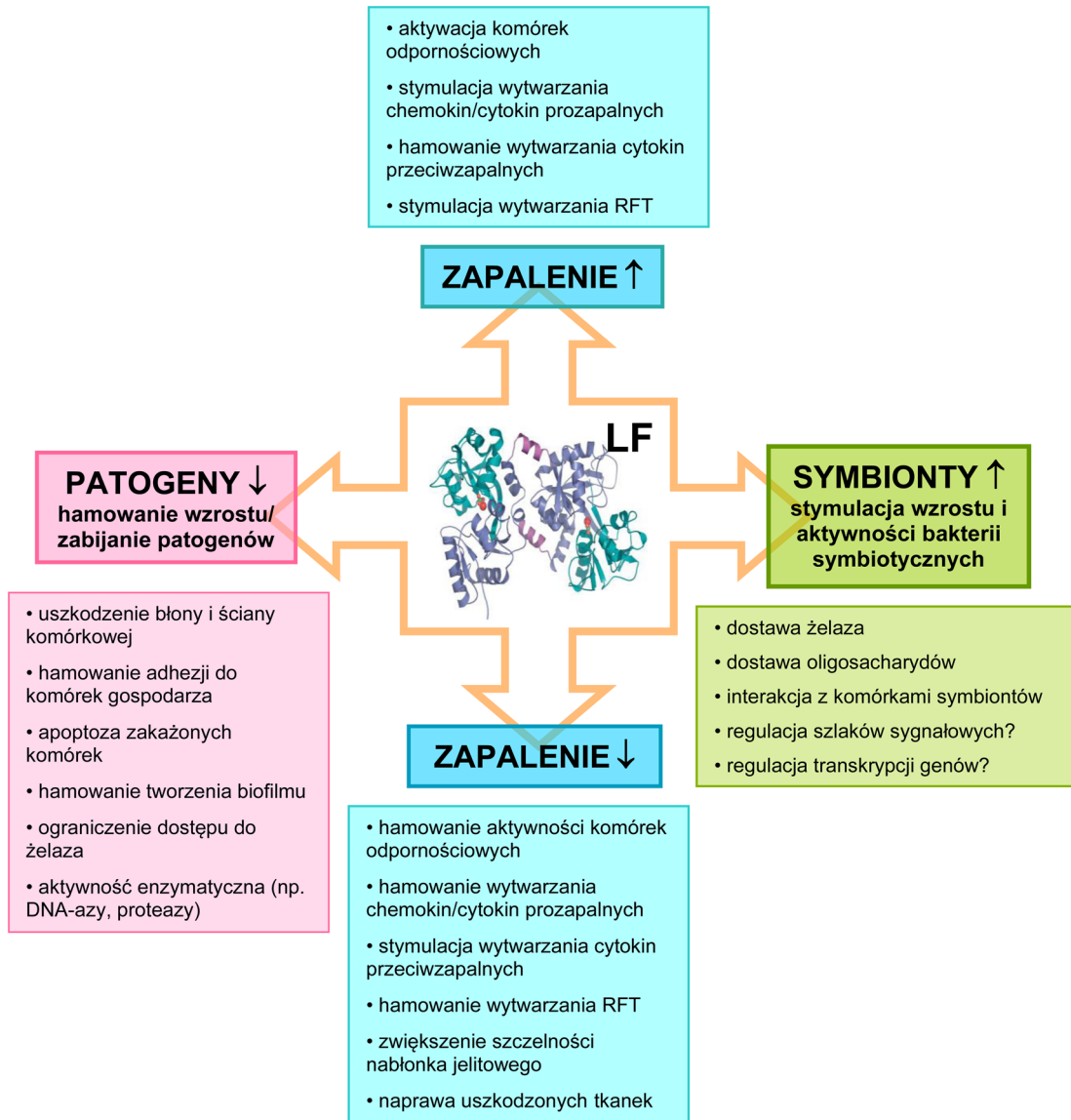
Ryc. 1. Regulacyjne działanie laktoferyny w przewodzie pokarmowym

Pokazano schematyczny przekrój przez błonę śluzową jelita. Komórki nabłonka (enterocyty) wytwarzają laktoferynę, która uwolniona do światła jelita niszczy drobnoustroje patogenne, stymulując jednocześnie wzrost i chroniąc bakterie symbiotyczne. W stanie zdrowia niewielka ilość LF jest też uwalniana przez nieliczne neutrofile naciekające blaszkę właściwą błony śluzowej. Egzogenna LF (dostarczona z pokarmem) jest rozkładana do peptydów przez enzymy trawienne lub pochodzenia bakteryjnego; część z peptydów działa w świetle jelita na patogeny i symbionty, a część przechodzi do blaszki właściwej, gdzie może regulować komórki odpornościowe. Inne elementy ochronne jelita: bariera jelitowa (szczelny nabłonek jelitowy), sIgA, mucyny (śluz złożony z glikoprotein), inne białka przeciwdrobnoustrojowe (np. lizozym, defensyny, białko BPI), substancje bójcze wydzielane przez symbionty (np. KKT, bakteriocyny). Wszystkie te czynniki zapewniają eubiozę, czyli stan równowagi mikrobioty jelitowej, chroniąc przed dysbiozą, zakażeniem i zapaleniem.

dogenne działanie LF wysyczonej żelazem (holo-LF), ale nie postaci pozbawionej jonów żelaza (apo-LF), co sugeruje stymulację wzrostu bifidobakterii na drodze zaopatrzenia je w niezbędne do procesów metabolicznych żelazo. Dodatek ludzkiej LF częściowo (w 30%) wysyczonej jonami żelaza hamował w sposób zależny od dawki wzrost *Bifidobacterium bifidum* var. *pennsylvanicus* w hodowli ubogiej w żelazo [7]. W podobnych warunkach apo-LF hamowała, a holo-LF stymulowała wzrost *Bifidobacterium breve* [60]. Jednocześnie wykryto znakowane radioaktywnie cząsteczki LF w komórkach *B. breve* (zarówno we frakcji błonowej, jak i cytozolowej), co obrazuje możliwość nabywania przez te bakterie żelaza związanego z LF [60]. W innym teście apo-LF i holo-LF stymulowały wzrost 14 szczepów *Bifidobacterium infantis*, *B. breve*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, ale holo-LF działała silniej [72]. Podczas hodowli *B. breve* z holo-LF w medium hodowlanym ubywało cząsteczek holo-LF na korzyść apo-LF,

co sugeruje wykorzystanie żelaza związanego z LF przez namnażające się komórki bakteryjne [10].

Apo-LF i LF wysyczona jonami żelaza w 66% (66% LF) dodane do medium ubogiego w żelazo ograniczały wzrost *B. bifidum*, *B. infantis* i *Bifidobacterium acidophilus*, ale takiego działania nie miała holo-LF. W hodowli *B. infantis* z *E. coli* apo-LF i 66%LF hamowały natomiast jedynie wzrost *E. coli*, nie wpływając na *B. infantis*. Autorzy tłumaczą uzyskane wyniki większym zapotrzebowaniem na żelazo szybko mnożących się patogenów i stąd szybkim zatrzymaniem ich wzrostu [28]. Podobnie działała LF dodana do ludzkiego mleka: częściowo wysyczona żelazem nie wpływała na wzrost *B. breve*, ale hamowała namnażanie *Streptococcus epidermidis* (częstego czynnika etiologicznego sepsy u wcześniaków) [94]. Obserwacje te sugerują, że LF wolna/częściowo wolna od żelaza skrzętnie wyłapuje dostępne w hodowli niewielkie jego ilości i w ten sposób ogranicza namnażanie bakterii patogennych.



**Ryc. 2. Mechanizm kompleksowego działania laktoferyny w zakażeniu/zapaleniu w przewodzie pokarmowym**

Laktoferyna na różne sposoby niszczy/hamuje wzrost drobnoustrojów patogennych, jednocześnie promując drobnoustroje symbiotyczne; w ten sposób normalizuje skład mikrobioty. Podczas wczesnego etapu infekcji LF jednocześnie mobilizuje układ immunologiczny do walki z zakażeniem (czyli czasowo nasila stan zapalny), a następnie wycisza jego aktywność (czyli wygasza stan zapalny). W ten wielokierunkowy sposób pomaga przywrócić stan równowagi mikrobiologicznej i immunologicznej, jednocześnie regenerując uszkodzone tkanki i chroniąc przed nawrotem infekcji; LF – cząsteczka laktoferyny, ? – działanie możliwe, ale na razie nie udowodnione.

Wyniki części testów nie potwierdzają jednak istotnej roli żelaza dostarczanego przez LF do wzrostu bakterii kwasu mlekowego i sugerują inny mechanizm takiej aktywności. Fakt ten nie dziwi szczególnie w przypadku pałeczek *Lactobacillus*, które nie wymagają bezwzględnie żelaza do życia, zastępując je jonami manganu (który pełni analogiczne funkcje jak żelazo, czyli jest kofaktorem licznych enzymów komórkowych) [91]. Apo-LF stymulowała wzrost dwóch szczepów *Lactobacillus rhamnosus* i *Lactobacillus acidophilus*, podczas gdy hamowała namnażanie pozostałych badanych szczepów probiotycznych: *Lactobacillus reuteri*, *L. rhamnosus*, *Lactobacillus coryniformis*, *B. bifidum*,

*B. longum*, *B. lactis* i *B. infantis* oraz bakterii patogennych: *E. coli*, *Staphylococcus aureus* i *Salmonella enterica*. Minimalne stężenia białka potrzebne do zahamowania wzrostu (minimal inhibitory concentration; MIC) znacznie się różniły: dla bakterii probiotycznych wynosiły  $\geq 128$  mg/ml, a dla patogenów 4–32 mg/ml [13]. Podobne obserwacje pochodzą z testów z użyciem LF wysyczonej żelazem w 10–20%. Białko dodane do hodowli w stężeniach 0,6–40 mg/ml znacznie hamowało wzrost patogenów jelitowych: *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, *Salmonella enterica* ser. Typhimurium i *E. coli*, nie zmieniając namnażania bakterii probiotycznych: *L. acidophilus*, *L. plantarum*,

*L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *B. lactis* i *Pediococcus acidilactici*. Zauważono także synergistyczne hamujące działanie LF i nadsącza znad hodowli *L. reuteri* [83]. Apo- i holo-LF w jednakowym stopniu stymulowały wzrost kilku szczepów probiotycznych *B. bifidum*, *B. breve*, *Bifidobacterium thermophilum* i *Bifidobacterium adolescentis* [74]. W innym teście, LF wysycona żelazem w różnym stopniu (< 10%, 30% i 100%), tak samo stymulowała wzrost badanych szczepów bifidobakterii. Dostrzeżono natomiast preferencyjne działanie ludzkiej LF wobec *B. bifidum* i bydłowej LF wobec *B. infantis* i *B. breve*. Pod mikroskopem zaobserwowano wiązanie znakowanych biotyną cząsteczek LF do powierzchni komórek bifidobakterii. Wiązanie to było 40 razy silniejsze niż do komórek *E. coli* i hamowane przez białka kationowe [67].

W dalszych badaniach na powierzchni i w cytozolu komórek *B. bifidum* wykazano białka receptorowe (o m. cząst. 20–69 kDa) wiążące LF, które mogą odpowiadać za jej aktywność. Wiązanie LF było swoiste (nie wykryto wiązania transferyny) [42]. Białka o masie 67–69 kDa wiążące LF wykryto także na błonach komórkowych *B. breve*, *B. infantis* i *B. bifidum* [41] oraz o masie 67 kDa na powierzchni i w cytozolu komórek kilku szczepów *B. longum* [70, 71]. Wyniki późniejszych badań zasugerowały, że białkiem receptorowym wiążącym LF może być dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GAPDH) – białko o aktywności enzymatycznej [77].

Z wyników kilku kolejnych testów możemy wnioskować, że nie tylko natywna LF, ale też peptydy powstające podczas jej enzymatycznej hydrolizy, wiążą się z komórkami bifidobakterii. Miejsce wiązania z receptorem komórkowym leży prawdopodobnie w obrębie płatu N cząsteczki LF [69]. Można przypuszczać, że LF lub jej fragmenty po wnikięciu do komórki bakterii probiotycznej mogą regulować szlaki sygnałowe, m.in. poprzez wiązanie się z DNA i wpływ na transkrypcję genów [30]. Związanie z komórką docelową nie jest jednak niezbędne, gdyż stwierdzono bifidogenne działanie także izolowanego płatu C cząsteczki LF, który nie wiąże się z komórką bakteryjną [40, 69].

Z pepsynowych hydrolizatów ludzkiego mleka wyizolowano 3 peptydy o aktywności bifidogennej, w tym 2 z cząsteczki LF. Oba pochodzą z N-końcowych fragmentów płatów N i C, a pierwszy jest niemal identyczny z laktoferyną. Peptydy te silnie stymulują wzrost *B. longum*, *B. bifidum* i *B. breve* i nie tracą tej aktywności po inkubacji z enzymami trawiennymi [51]. Peptydy z LF zwykle działają silniej niż wyjściowe, natywne białko. Na przykład natywna bydłowa LF stymulowała wzrost *B. breve* w stężeniu 300 µg/ml, a jej pepsynowy hydrolizat już w stężeniu 10 µg/ml. Najsilniej bifidogenne działał niewielki peptyd z końca N cząsteczki złożony z dwóch fragmentów 16- i 6-aminokwasowego

połączonych mostkiem disiarczkowym i nazwany przez autorów bifidogenym peptydem laktoferynowym (bifidogenic lactoferrin peptide; BLP). Jak sugerują badacze, aktywność bifidogennej peptydów zależy właśnie od obecności wiązań -S-S- [62]. Redukcja mostków disiarczkowych w peptydach LF prowadziła do utraty jej aktywności bifidogennej [61].

Apo-LF i jej hydrolizaty pepsynowe hamowały wzrost bakterii patogennych (*E. coli*, *S. enterica* ser. Typhimurium, *Enterococcus faecalis*, *S. aureus*), ale nie szczepów probiotycznych (*L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. fermentum*, *L. coryniformis*, *L. acidophilus*, *B. infantis*, *B. bifidum* i *Pediococcus acidilactici*) [12]. Co istotne, apo-LF/hydrolizaty i nadsącza znad hodowli probiotyków działały synergistycznie. Być może hydrolizaty LF nasilały działanie związków przeciwbakteryjnych wydzielanych przez szczepy probiotyczne. Hydrolizaty LF mogą powstawać wskutek działania endogennych enzymów trawiennych w żołądku i jelicie, ale także pod wpływem proteolitycznej aktywności bytujących tu bakterii symbiotycznych/probiotycznych. Zatem probiotyki i LF wzajemnie nasilają swoje działanie. Cząsteczki LF były hydrolizowane przez peptydazy m.in. szczepów *Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* standardowo używanych do fermentacji mleka w przemyśle mleczarskim [64].

Pewne znaczenie w aktywności bifidogennej LF przypisać można części cukrowej jej cząsteczki. Cukry (m.in. N-acetyloglukozamina, mannoza, galaktoza, kwas sialowy) stanowią około 6% całkowitej masy cząst. ludzkiej LF i 11% bydłowej LF. Mogą być potencjalnym źródłem energii dla bakterii probiotycznych, jak sugerują wyniki kilku testów. LF i jej hydrolizaty pronazowe (frakcja glikopeptydów zawierająca 85% cukrów) stymulowały wzrost niektórych szczepów *Bifidobacterium* izolowanych ze stolca noworodków ludzkich [43]. W innym teście LF dodana do hodowli pozbawionej cukrów indukowała ekspresję genów metabolizmu cukrów w komórkach *B. infantis*, a wraz z pojawieniem się bakteryjnych enzymów – endo-β-N-acetyloglukozaminidaz, po pewnym czasie w hodowli wykryto deglikozylowaną LF [26]. Pałeczki *Lactobacillus* preferują monosacharydy w procesach fermentacyjnych, podczas gdy *Bifidobacterium* zużywają zarówno cukry proste, jak i bardziej złożone oligosacharydy, przekształcając je do kwasów organicznych (octowego, propionowego i masłowego), niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania nabłonka i układu odpornościowego jelita [38].

LF i laktoperoksydaza stymulowały wzrost *B. infantis* w hodowli, ale jeszcze lepiej bifidogenne działała mieszanka kilku białek z mleka: LF, laktoperoksydazy i lizozymu w proporcjach stwierdzanych w mleku ludzkim [54]. Wyizolowane z mleka krowiego α-laktoalbumina i LF silnie promowały wzrost *B. infantis* i *B. breve*, podczas gdy N-acetyloglukozamina i mucyny (glikobiałka

otaczające kuleczki tłuszczu w mleku) – głównie *B. bifidum* var. *pennsylvanicus* [68]. Warto przypomnieć, że wszystkie te białka silnie hamują wzrost różnych patogenów [2], co w połączeniu z aktywnością bifidogenną może skutecznie utrzymywać eubiozę w jelicie i innych śluzówkach organizmu.

### 5. Prebiotyczne działanie laktoferyny w przewodzie pokarmowym – testy *in vivo*

Działanie bifidogenne bydłej LF wykazano na modelu myszy od urodzenia pozbawionych naturalnej mikroflory (germ-free), którym podano bakterie symbiotyczne izolowane z kału niemowląt. Karmienie zwierząt mieszkanką mlekozastępczą z dodatkiem LF (2 mg/ml) znacznie przyspieszyło ustalenie mikroflory jelitowej z dominacją bifidobakterii w porównaniu z kontrolną mieszkanką standardową [31].

U szczurów z indukowanym chemicznie owrzodzeniem żołądka badano aktywność wyizolowanej z mleka LF i jej pepsynowych hydrolizatów [84]. Podane zwierzętom 30 minut przed indukcją uszkodzeń wyraźnie chroniły śluzówkę. Najskuteczniejszy był hydrolizat 24-godzinny, słabiej działała natywna LF. W dodatkowych testach *in vitro* LF i hydrolizaty stymulowały wzrost komercyjnie dostępnego szczepu *B. adolescentis*, jak również namnażanie ludzkich fibroblastów, czym można tłumaczyć obserwowaną ochronę.

Podobny model zastosowano do oceny skuteczności LF i *B. longum* w łagodzeniu uszkodzeń jelita po długotrwałym doustnym zastosowaniu NSAID [24]. Szczurom podawano LF (100 mg/kg m.c.), probiotyk lub łącznie LF/probiotyk doustnie 1 godz. przed każdorazowym podaniem diklofenaku. Wszystkie preparaty chroniły jelito przed uszkodzeniami i stanem zapalnym (mierzonym poziomem mieloperoksydazy, melanodialdehydu i kalprotektyny). Badania molekularne nabłonka jelitowego ujawniły niższą ekspresję receptorów Toll-podobnych 4 (Toll-like receptor 4; TLR-4), wzrost ekspresji receptorów TLR-2 oraz spadek ekspresji podjednostki p65 jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF-κB. Receptor TLR-4 służy komórkom do rozpoznawania cząsteczek lipopolisacharydu (LPS) ze ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych, uczestniczących w patogenezie zapalenia i uszkodzeń śluzówki jelita cienkiego po NSAID. Aktywacja szlaku sygnałowego inicjowanego przez receptor TLR-2 (rozpoznającego m.in. kwas lipoteichojuowy bakterii Gram-dodatnich) stanowi przeciwwagę dla prozapalnego szlaku TLR-4. Co istotne, zarówno LF, jak i probiotyk użyte w monoterapii chroniły jelito przed zapaleniem, ale działały jeszcze skuteczniej, gdy podano je łącznie.

W testach na noworodkach szczurzych wykazano skuteczność LF i *L. casei* var. *rhamnosus* szczep GG

(LGG) w profilaktyce zakażenia *E. coli* [75]. Zwierzętom doustnie podano rekombinowaną ludzką LF (500 mg/kg m.c.), LGG lub LF/LGG, po czym noworodki zakażono doustnie *E. coli*. W tkance i popłuczynach z jelita cienkiego stwierdzono więcej pałeczek *Lactobacillus* oraz znacznie mniej patogennych *E. coli*, a LF i LGG działały synergistycznie. Co ważne, tylko w jelicie zwierząt z grupy LF/LGG zauważono dojrzewające kępki Peyera (skupiska tkanki chłonnej w ścianie jelita). Podany preparat działał zatem nie tylko antibakteryjnie, ale też stymulował rozwój układu immunologicznego niedojrzałego jelita oseska, co sugeruje jego zastosowanie w profilaktyce nekrotycznego zapalenia jelita (necrotizing enterocolitis; NEC) u noworodków.

Ciekawych danych dostarczyło podobne badanie, lecz z użyciem zmodyfikowanego genetycznie szczepu *L. casei* z wprowadzonym genem ludzkiej LF (LF/*L. casei*) [11]. Tak zmienione pałeczki stabilnie wytwarzały LF w hodowli i jelicie myszy po podaniu doustnym i chroniły przed subletalną dawką *E. coli*. Wewnątrz i pomiędzy enterocytami osiedliły się liczne pałeczki *L. casei* wydzielające LF, a w popłuczynach jelita zakażonych zwierząt stwierdzono istotnie mniej *E. coli*. Mniej patogenów było także u zwierząt, którym podano dziki szczep *L. casei*, jednak skuteczność szczepu rekombinowanego była 10-krotnie większa. Zwierzęta z grupy LF/*L. casei* nie miały oznak zakażenia ani zmian histopatologicznych w obrębie jelita. Jak wnioskuje autorzy, takie lub podobne transformowane szczepy *L. casei* wytwarzające LF w przyszłości mogą być doskonałym naturalnym sposobem na selektywną dekontaminację przewodu pokarmowego, utrzymanie eubiozy i ochronę przed zakażeniami, szczególnie u osób obciążonych innymi schorzeniami, w ciężkim stanie (np. z bakteriami, sepsą), po przeszczepach szpiku itp. Jest to sposób na uniknięcie stosowania obciążającej i nie zawsze skutecznej antybiotykoterapii.

Kilka kolejnych testów wykonano w modelu odsadzonych prosiąt, ze względu na podobieństwa fizjologiczne, uznawanym za najlepszy model doświadczalny zapalnych chorób jelita u noworodków ludzkich. 7-dniowym prosiętom podawano preparat z dodatkiem LF rekombinowanej i natywnej izolowanych z mleka krowiego (uzyskanego od krów transgenicznych) [33]. Po 30 dniach zaobserwowano znacznie lepszą kolonizację jelita przez *Bifidobacterium* niż w grupie karmionej mieszkanką kontrolną.

Na podobnym modelu wykazano aktywność bifidogenną fuzyjnego rekombinowanego peptydu LFA-LFC złożonego z laktoferampiny (LFA) i laktoferyny (LFC) – peptydów pochodzących z kationowego regionu płatu N cząsteczki LF [81]. Peptyd LFA-LFC (wytwarzany w komórkach drożdży *Pichia pastoris*) dodawano do paszy prosiąt świeżo odsadzonych i zakażonych doustnie enterotoksycznym szczepem *E. coli*. Po



3 tygodniach żołądek, jelito cienkie i okrężnicę zasiedlało znacznie więcej probiotycznych *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* niż u zwierząt na diecie standardowej. Jednocześnie spadła liczba patogennych *E. coli*. Peptyd był tak skuteczny jak chlortetracyklina, antybiotyk standardowo stosowany u odsadzonych prosiąt jako czynnik ochronny i stymulator wzrostu.

W podobnym teście odsadzonym prosiętom podawano rekombinowany peptyd LFA-LFC wytwarzany przez komórki bakterii *Photorhabdus luminescens* [82]. Obserwowano stymulację namnażania *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* w jelicie oraz poprawę wskaźników wzrostu zwierząt. Poprawiła się także struktura jelita, z wydłużeniem kosmków i pogłębieniem krypt jelitowych. Peptyd chronił też przed enterotoksycznym szczepem *E. coli*. We krwi obwodowej zwierząt karmionych peptydem wzrosło stężenie ochronnych enzymów antyoksydacyjnych i przeciwciał różnych klas (IgA, IgG, IgM), co świadczy o aktywacji zarówno wrodzonej, jak i nabytej odporności.

Ciekawe wyniki pochodzą także z najnowszego badania na modelu nowo narodzonych prosiąt [29]. Tygodniowa suplementacja standardowej diety mlekozastępczej probiotykami lub probiotykami/LF (100 mg/dzień) zwiększała różnorodność mikrobioty w jelicie cienkim i grubym, z widocznym spadkiem udziału potencjalnie patogennych bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*, a wzrostem m.in. gatunku *Faecalibacterium prausnitzii*, który wytwarza duże ilości KKT (głównie kwasu masłowego), o działaniu przeciwzapalnym. Probiotyki ponadto zmieniały system poboru jonów żelaza ( $Fe^{3+}$  i  $Fe^{2+}$ ) endogennej mikrobioty, a apo-LF to działanie odwracała, co może wynikać ze zdolności wiązania jonów  $Fe^{3+}$ . Zmiany w kształtującej się mikrobiocie można zatem wiązać ze zmienioną dostępnością żelaza podczas zastosowanej suplementacji.

W kolejnym badaniu prosiętom podawano mieszanekę wzbogaconą w polidekstrozę, galaktooligosacharydy (GOS), MFGM (milk fat globule membrane) oraz LF [6]. Zanotowano lepsze wskaźniki wzrostu, wydłużenie kosmków jelitowych oraz większą aktywność enzymów jelitowych i neuroprzekazników: wazoaktywnego peptydu jelitowego (vasoactive intestinal peptide; VIP) i hydroksylazy tyrozynowej (tyrosine hydroxylase; TH). W jelicie grubym mniej było potencjalnie patogennych bakterii z rodzajów: *Mogibacterium*, *Collinsella*, *Klebsiella*, *Escherichia/Shigella*, *Eubacterium* i *Roseburia*, a więcej korzystnych *Parabacteroides*, *Clostridium* typu IV, *Lutispora* i *Sutterella*. Szczególnie cenną jest obserwacja wpływu suplementacji na działanie jelitowego układu nerwowego, którego częścią są wspomniane neuroprzekazniki. Jak już wspomniano, ten niezwykle rozbudowany lokalny układ nerwowy reguluje nie tylko pracę układu pokarmowego, ale też, poprzez sieć neuronów i neuroprzekazników, ściśle

stale komunikuje się z CUN, a istotną rolę w tej komunikacji odgrywa mikrobiota jelitowa.

Działanie bifidogenne LF badano także w kilku próbach klinicznych. W pierwszej nie stwierdzono jednak istotnego wpływu bydlęcej LF podawanej (2,8 mg/ml) ze standardowym mlekiem zastępczym zdrowym niemowlętom (n=58) do 14. dnia życia [5, 92]. Skład mikrobioty w kale dzieci karmionych mieszanką kontrolną i z dodatkiem LF był podobny i odmienny niż u dzieci żywionych naturalnie. Przypominał mikrobiotę jelitową osób dorosłych, z dominacją bakterii z rodzajów *Enterococcus*, *Bacteroides* i *Clostridium*, podczas gdy u dzieci karmionych piersią przeważały bakterie z rodzajów *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*. Część podawanej LF była wydalana w niestrawionej postaci. Jak sugerują autorzy badania, małą skuteczność mieszanki wzbogaconej w LF można tłumaczyć krótkim czasem stosowania, jak również brakiem innych składników obecnych w mleku ludzkim, jak sIgA, lizozym, cytrynian czy dwuwęglany, które działają synergistycznie z LF w promowaniu wzrostu bakterii symbiotycznych.

Korzystne działanie LF w badaniu klinicznym zaobserwował natomiast zespół japoński [39]. Niemowlęta (n=9) urodzone między 29–36. tygodniem ciąży były karmione przez 14 dni standardowym mlekiem zastępczym z dodatkiem bydlęcej LF (1 mg/ml). W próbkach stolca więcej było bifidobakterii, a mniej bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* i z rodzaju *Clostridium*, ponadto spadło pH stolca, wzrosła aktywność lizozymu, stężenie fekalnych IgA oraz poziom KKT. W stolcu wszystkich dzieci wykryto natywną bydlęcą LF (średnio 8–9 mg/g stolca).

Również w kolejnym badaniu klinicznym bydlęca LF dodana (1 mg/ml) do standardowej mieszanki mlekozastępczej korzystnie regulowała skład mikrobioty zdrowych niemowląt (n=55) [73]. Analiza stolca wykonana po 30. i 90. dniach wykazała ustalenie mikrobioty jelitowej typu „bifidus” odpowiednio u 14 i 57% dzieci (wobec 8 i 14% w grupie kontrolnej).

W nowszym, kontrolowanym badaniu podawano niemowlętom (n=480) od 14. do 365. dnia życia standardową mieszanekę mlekozastępczą wzbogaconą w bydlęcą LF (0,6 lub 1 mg/ml) oraz prebiotyki: polidekstrozę i GOS [35]. Takie żywienie nie wpływało na współczynniki przyrostu wagi, wskaźniki antropometryczne ani ilość i tolerancję przyjmowanego pokarmu. Poprawiło jednak konsystencję stolca, który był luźniejszy i podobny do stolca dzieci karmionych piersią. W tym badaniu nie analizowano mikrobioty jelitowej, jednak autorzy uzyskane wyniki dyskutują w kontekście korzystnego wpływu LF i innych prebiotyków na ustalenie prawidłowej mikrobioty jelitowej u karmionych sztucznie dzieci.

Pionierskie kontrolowane badanie kliniczne wpływu probiotyków i LF na zdrowie wcześniaków wykonał

zespół lekarzy włoskich pod kierunkiem prof. Paolo Manzoni [55]. Badaniem objęto łącznie 472 noworodki z bardzo niską masą urodzeniową (very-low birth weight; VLBW), którym podawano doustnie bydlęcą LF (100 mg/dzień), LF/LGG lub placebo. W ciągu 30–45 dni obserwacji w obu grupach suplementowanych istotnie rzadziej występowała późna sepsa i śmierć z tego powodu, zakażenia bakteriami Gram-dodatnimi i Gram-ujemnymi, inwazyjne zakażenia grzybicze, NEC i retinopatia wcześniacza. Oba sposoby suplementacji były skuteczne, choć nieco lepsze efekty obserwowano po łącznym podaniu LF i probiotyków.

W kolejnej randomizowanej próbie klinicznej oceniano skuteczność rekombinowanej ludzkiej LF w profilaktyce zakażeń szpitalnych u noworodków VLBW (n = 120) w Stanach Zjednoczonych [76]. LF podawano doustnie co 12 h w dawce 150 mg/kg m.c. od narodzin przez 28 dni. Częstość zakażeń szpitalnych (w tym zakażeń uogólnionych, zakażeń dostępów centralnych, układu moczowego i płuc) spadła o połowę względem grupy placebo. Analiza mikrobioty jelitowej wykazała *Proteobacteria* i *Firmicutes* jako dominujące grupy bakterii u wszystkich dzieci, ale po LF spadł udział patogennych bakterii z rodzajów *Enterobacter* i *Klebsiella*, a wzrósł bakterii *Citrobacter*, które nie wywoływały żadnych infekcji. Co ważne, zanotowano mniej gronkowców *S. aureus* i *S. epidermidis* oraz wywołanych przez nie groźnych zakażeń krwi i wejść centralnych.

W kolejnym badaniu klinicznym (retrospektywnym kohortowym) oceniono skuteczność profilaktyki NEC i późnej sepsy u noworodków VLBW za pomocą podawanych doustnie LF (100 mg/dzień) i LGG [59]. Analizie poddano historyczną grupę dzieci urodzonych w latach 2004–2008 (nie suplementowanych) oraz w latach 2011–2015 suplementowanych LF/LGG. Zanotowano znacznie rzadsze występowanie NEC (1% vs. 3% w grupie historycznej) oraz retinopatii wcześniaczej, ale nie późnej sepsy. Nie stwierdzono żadnych działań niepożądanych LF, ale po podaniu LGG u jednego dziecka rozwinęła się sepsa.

Największa dotąd, wieloośrodkowa kontrolowana próba kliniczna (o akronimie Enteral Lactoferrin in Neonates; ELFIN) przeprowadzona przez zespół badaczy z Wielkiej Brytanii nie potwierdziła ochronnego działania LF w późnej sepsie, NEC i innych powikłaniach u wcześniaków (n = 2203) [22]. Dodatkowo zastosowano probiotyki, łącznie u 1/3 uczestników badania, wybranych zarówno spośród dzieci otrzymujących LF, jak i z grupy placebo. W żadnej z podgrup nie wykazano ochronnego działania LF. Obecnie trwa analiza statystyczna próbek kału i moczu podgrupy ponad 480 noworodków (badanie o akronimie MAGPIE) pod kątem ewentualnych zmian mikrobioty i metabolomu.

Ciekawej obserwacji klinicznej dokonał zespół włoski mierząc zawartość endogennej LF w mleku matek

oraz stolcu ich noworodków (48 par matka–dziecko) bezpośrednio po porodzie i 30 dni później [58]. Zawartość LF była najwyższa w sianie (7 mg/ml), spadając stopniowo do 2,3 mg/ml w mleku dojrzalym. Zarówno u dzieci urodzonych w terminie, jak i wcześniaków, stężenie fekalnej LF było wysokie (znacznie wyższe niż u dzieci starszych i osób dorosłych) i rosło z czasem: z 0,9 do 3,05 mg/ml u dzieci donoszonych oraz z 1,63 do 7,63 mg/ml u wcześniaków. W tej ostatniej grupie zawartość *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* w stolcu korelowała dodatkowo ze stężeniem fekalnej LF; zależności takiej nie stwierdzono u dzieci urodzonych o czasie. Uzyskane wyniki potwierdzają zatem szczególne znaczenie matczynej LF w rozwoju niedojrzałego układu pokarmowego i odpornościowego wcześniaka.

Korzystny wpływ bydlęcej LF i *Lactobacillus brevis* subsp. *coagulans* wykazano w kontrolowanym badaniu klinicznym u dorosłych kobiet (n = 32) z tendencją do zaparć [79]. LF (100 mg/dzień) lub LF/probiotyk podawano doustnie w tabletkach zabezpieczonych przed działaniem kwasu solnego obecnego w żołądku (enteric-coated tablets) przez 2 tygodnie. Stwierdzono normalizację częstości wypróżnień oraz poprawę konsystencji i barwy stolca. W próbkach stolca wykryto więcej bifidobakterii i ścisłych beztlenowców.

W kolejnym kontrolowanym teście klinicznym grupa badaczy australijskich porównała efekty doustnego podawania bydlęcej LF w postaci naturalnej i mikrokapsułkowanej (chronionej przed działaniem kwasu solnego i enzymów trawiennych w żołądku) [17]. Zdrowi wolontariusze (n = 12) zażywali codziennie po 200 lub 600 mg obu preparatów przez 4 tygodnie. Oznaczano stopień trawienia LF, wpływ na aktywację limfocytów T CD4+ (komórki T pomocnicze) i T CD8+ (komórki T cytotoksyczne) obecnych we krwi oraz mikrobiotę jelitową. Stwierdzono mniej aktywowanych limfocytów T CD4+ w badanej puli komórek, co sugeruje działanie przeciwzapalne (podobne dla obu postaci LF). U osób przyjmujących większą dawkę mikrokapsułkowanej LF stwierdzono jej obecność w stolcu. Innowacyjna LF bardziej też zmieniała skład mikrobioty jelitowej (mniej bakterii z grup *Euryarchaeota*, *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, NC10 i *Nitrospirae*, a więcej *Firmicutes* i *Bacteroidetes*).

## 6. Laktoferyna w diecie i suplementach diety

Nasz organizm wytwarza laktoferynę, która „dba” o prawidłową mikrobiotę wszystkich błon śluzowych, także przewodu pokarmowego. Źródłem egzogennej LF mogą być produkty nabiałowe, w których znajdziemy pewne ilości tego białka lub pochodnych peptydów. W najbardziej popularnych w Polsce mleku krowim i kozim ilości LF nie są duże i nie przekraczają 0,1–0,3 mg/ml (co daje w szklance mleka 25–75 mg).

Już w takich niedużych dawkach białko jest jednak aktywne, wpływa m.in. regulacyjnie na układ odpornościowy [98]. Osobną kwestią jest jakość dostępnego nabiału, oceniana jako zawartość bioaktywnych składników, w tym LF. Większość z nich to białka, związki wrażliwe na denaturację, czyli uszkodzenie struktury przestrzennej podczas ogrzewania w wysokiej temperaturze. Mleko poddawane standardowej pasteryzacji (w temperaturze 72–80°C przez 15 sekund) zachowuje większość (80–90%) aktywnej LF. W ogóle nie znajdujemy jednak LF (i innych aktywnych białek) w mleku czy jego przetworach sterylizowanych w ultra wysokiej temperaturze, czyli podczas obróbki UHT (135°C przez kilka sekund w podwyższonym ciśnieniu) oraz mleku suszonym rozpyłowo (mleko w proszku) [2, 19, 89].

LF w dużej części pozostaje nie strawiona w przewodzie pokarmowym noworodka i niemowlęcia, jej losy w układzie trawiennym osób dorosłych do dziś nie są do końca jasne. Wyniki z części badań sugerują, że jest ona bardziej oporna na trawienie niż inne białka i w pewnej ilości (kilka procent dawki przyjętej doustnie) może osiągać jelito. Docierają tu też powstające w wyniku proteolizy aktywne fragmenty peptydowe z cząsteczki LF. W jelicie LF/pochodne peptydy działają lokalnie, na błonę śluzową, mikrobiotę oraz rezydujące tu komórki odpornościowe, w tym grudki chłonne (tzw. kępki Peyera) tworzące tkankę limfatyczną związaną z jelitem (gut-associated lymphoid tissue; GALT). Na GALT oddziałuje również mikrobiota jelitowa oraz przyjęte doustnie probiotyki [47, 63]. Aktywowane limfocyty przemieszczają się do błon śluzowych innych narządów (układu oddechowego i moczowo-płciowego) zwiększając ich odporność (tzw. zintegrowana odporność śluzówkowa). LF/pochodne peptydy oraz mikrobiota jelitowa mogą także pobudzać różnorodne komórki tkanki jelita do wydzielania wielu czynników immunologicznych (np. cytokin, chemokin) oraz neurotransmitterów, a te rozprzestrzeniając się po organizmie warunkują ogólnoustrojowe efekty podanej doustnie LF [4, 16, 85, 89].

W najnowszym badaniu udowodniono, że LF zastosowana doustnie wywiera działanie na cały organizm [45]. Po doustnym podaniu tego białka szczurom po 3–24 godz. stwierdzono zmiany w ekspresji licznych genów leukocytów krwi obwodowej, a efekty były porównywalne z działaniem LF podanej drogą dożylną. Uzyskane wyniki rozwiewają dotychczasowe wątpliwości co do ogólnoustrojowej aktywności LF aplikowanej doustnie.

W żadnym z licznych, dotychczasowych badań (*in vitro*, *in vivo*, w tym klinicznych) nie wykazano toksyczności LF, białko i pochodne peptydy podawane do organizmu różnymi drogami (enteralnie i parenteralnie, m.in. dożylnie, donosowo, dootrzewnowo, śródskórnym) nie wywoływały działań niepożądanych.

Bydlęca LF została zakwalifikowana przez amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (Food and Drug Administration) jako środek powszechnie uznawany za bezpieczny (generally recognized as safe; GRAS). Także europejski odpowiednik FDA, czyli Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (European Food Safety Authority; EFSA) uznał w 2012 roku bydlęcą LF za produkt bezpieczny [21]. Na tej podstawie może być i jest stosowana jako suplement diety oraz składnik żywności funkcjonalnej.

## 7. Podsumowanie

Laktoferyna, zarówno pochodzenia ludzkiego, jak i bydlęca oraz pochodne peptydy działają prebiotycznie na wiele szczepów bakterii symbiotycznych w mikrobiocie przewodu pokarmowego oraz bakterii uznanych za probiotyki. Takie działanie białka potwierdzono w licznych badaniach laboratoryjnych (w hodowlach komórkowych i na zwierzętach) oraz w badaniach na ludziach. Wyniki badań *in vitro* wskazują na możliwy mechanizm ochronnego działania białka. W części testów LF nie wpływała lub hamowała szczepy symbiotyczne/probiotyczne, ale w stężeniach znacznie większych niż te wymagane do zahamowania wzrostu bakterii patogenych. W warunkach *in vivo* może to tłumaczyć regulację mikrobioty jelitowej poprzez hamowanie wzrostu/zabijanie komórek patogenów, z jednoczesnym oszczędzeniem lub promowaniem wzrostu bakterii pożytecznych. Wykazano ponadto prebiotyczne działanie peptydów powstających podczas rozkładu enzymatycznego LF. Możliwy mechanizm działania prebiotycznego LF/peptydów może obejmować: zaopatrzenie w niezbędne żelazo lub cukry oraz aktywację/ochronę komórek bakterii symbiotycznych/probiotycznych poprzez ich interakcje z natywną LF lub pochodnymi fragmentami jej cząsteczki. Udowodniono, że LF wydzielana i obecna na błonach śluzowych w drogach rodnych sprzyja zasiedlaniu i tworzeniu biofilmu przez bakterie symbiotyczne kolonizujące ten nabłonek [87]. Większość drobnoustrojów w jelicie zasiedla jednak śluz wypełniający przestrzeń między nabłonkiem jelitowym a światłem jelita [63], takie działanie LF może więc mieć tu mniejsze znaczenie. Co istotne, inne przeciwdrobnoustrojowe białka mleka działają synergistycznie z LF stymulując wzrost korzystnych bakterii.

W badaniach na zwierzętach i ludziach LF normalizowała skład mikrobioty jelitowej, chroniąc przed zakażeniami i zapaleniem. Najmłodsze dzieci wspomaga laktoferyna przyjmowana z mlekiem matki. W późniejszym wieku możemy liczyć na własne, endogenne białko wydzielane przez błony śluzowe i neutrofile albo możemy je przyjąć z nabiałem (niepoddanym agresywnej obróbce termicznej) lub suplementami diety. Na

rynku dostępne są zarówno produkty z samą laktoferyną bydlęcą (izolowaną z mleka), LF i klasycznym prebiotykami (np. inuliną czy GOS), a także z probiotykami (jako synbiotyki). Preparaty laktoferynowe są skuteczne po podaniu doustnym, co potwierdzono w licznych badaniach, także klinicznych. Białko jest względnie odporne na trawienie, może docierać do jelita (głównie w postaci fragmentów peptydowych), gdzie działa lokalnie na mikrobiotę i układ odpornościowy związany z tutejszą błoną śluzową, a tą drogą może wzmacniać odporność wszystkich śluzówek w organizmie.

Zastosowanie LF jest polecane szczególnie osobom z dysbiozą jelitową spowodowaną przyjmowaniem antybiotyków i innych leków (inhibitorów pompy protonowej, NSAID, metforminy, doustnych preparatów żelaza) oraz paleniem tytoniu, osobom stosującym dietę wysoko przetworzoną, z dużą ilością konserwantów, cukrów prostych, mięsa i tłuszczów nasyconych, a ubogą w warzywa i owoce [56, 62]. Skorzystań z takiej suplementacji mogą też najmłodsze dzieci żywnie sztucznie, gdyż na polskim rynku nie jest dostępne mleko zastępcze z tym białkiem (choć w niektórych krajach, np. w Chinach czy Japonii można je kupić już od ponad 30 lat). Suplementację LF warto też polecić osobom starszym, a szczególnie kobietom podczas i po menopauzie, gdyż zmiany hormonalne często niekorzystnie zmieniają mikrobiotę jelitową.

Styl życia, dieta, podeszły wiek, leki przyczyniają się do rozwoju dysbiozy i wszystkich jej skutków, nie tylko w przewodzie pokarmowym, ale też w metabolizmie ogólnoustrojowym. Warto więc w każdym wieku pamiętać o „dobrych mikrobach” w naszych jelitach i należycie o nie zadbać, m.in. stosując odpowiednią dietę, by móc cieszyć się dobrą kondycją fizyczną i psychiczną przez długi czas.

## Piśmiennictwo

- Alexander D.B., Iigo M., Abdelgied M., Ozeki K., Tanida S., Joh T., Takahashi S., Tsuda H.: Bovine lactoferrin and Crohn's disease: a case report. *Biochem. Cell Biol.* **95**, 133–141 (2017)
- Alexander D.B., Iigo M., Yamauchi K., Suzui M., Tsuda H.: Lactoferrin: an alternative view of its role in human biological fluids. *Biochem. Cell Biol.* **90**, 279–306 (2012)
- Artym J., Zimecki M.: Rola laktoferyny w zakażeniach i zapaleniu. *Forum Zakażeń*, **4**, 329–345 (2013)
- Artym J.: Laktoferyna – niezwykle białko. Wydawnictwo Borgis, Warszawa (2012)
- Balmer S.E., Wharton B.A.: Diet and faecal flora in the newborn: lactoferrin. *Arch. Dis. Child.* **64**, 1685–1690 (1989)
- Berding K., Donovan S.M. i wsp.: Prebiotics and bioactive milk fractions affect gut development, microbiota, and neurotransmitter expression in piglets. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **63**, 688–697 (2016)
- Bezkorovainy A., Topouzian N.: The effect of metal chelators and other metabolic inhibitors on the growth of *Bifidobacterium bifidus* var. *Pennsylvanicus*. *Clin. Biochem.* **14**, 135–141 (1981)
- Bruck W.M., Redgrave M., Tuohy K.M., Lönnnerdal B., Graverholt G., Hernell O., Gibson G.R.: Effects of bovine  $\alpha$ -lactalbumin and casein glycomacropptide-enriched infant formulae on faecal microbiota in healthy term infants. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **43**, 673–679 (2006)
- 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.* **61**, 410–414 (2007)
- Carmona E., Munoz-Robles V., Cuesta R., Gálvez N., Capdevila M., Maréchal J.D., Dominguez-Vera J.M.: Monitoring lactoferrin iron levels by fluorescence resonance energy transfer: a combined chemical and computational study. *J. Biol. Inorg. Chem.* **19**, 439–447 (2014)
- Chen H.L., Lai Y.W., Chen C.S., Chu T.W., Lin W., Yen C.C., Lin M.F., Tu M.Y., Chen C.M.: Probiotic *Lactobacillus casei* expressing human lactoferrin elevates antibacterial activity in the gastrointestinal tract. *Biometals*, **23**, 543–554 (2010)
- Chen P.W., Jheng T.T., Shyu C.L., Mao F.C.: Antimicrobial potential for the combination of bovine lactoferrin or its hydrolysate with lactoferrin-resistant probiotics against foodborne pathogens. *J. Dairy Sci.* **96**, 1438–1446 (2013)
- Chen P.W., Ku Y.W., Chu F.Y.: Influence of bovine lactoferrin on the growth of selected probiotic bacteria under aerobic conditions. *Biometals*, **27**, 905–914 (2014)
- Chissov V.I., Iakubovskaia R.I., Nemtsova E.R., Osipova N.A., Edeleva N.V., Utkin M.M., Zviagin A.A.: Antioxidants treatment of severe post-operative pyoinflammatory and septic complications. *Khirurgiia (Mosk)*, **11**, 14–19 (2008)
- Coppa G.V., Zampini L., Galeazzi T., Gabrielli O.: Prebiotics in human milk: a review. *Dig. Liver Dis.* **38** Suppl. 2, S291–S294 (2006)
- Debbabi H., Dubarry M., Rautureau M., Tomé D.: Bovine lactoferrin induces both mucosal and systemic immune response in mice. *J. Dairy Res.* **65**, 283–293 (1998)
- Dix C., Wright O.: Bioavailability of a novel form of microencapsulated bovine lactoferrin and its effect on inflammatory markers and the gut microbiome: a pilot study. *Nutrients*, **10**, pii: E1115 (2018)
- Drago-Serrano M.E., Compos-Rodriguez R., Carrero J.C., de la Garza M.: Lactoferrin: balancing ups and downs of inflammation due to microbial infections. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, pii: E501 (2017)
- Du M., Liu M., Fan F., Shi P., Tu M.: Structure, function, and nutrition of lactoferrin (w) Mineral containing proteins: roles in nutrition, red. G. Zhao, Springer Nature Singapore Pte Ltd. 2017, s. 33–61
- 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.* **281**, G1140–G1150 (2001)
- EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies: Scientific opinion on bovine lactoferrin. *EFSA Journal*, **10**, 2701 (2012)
- ELFIN Investigators Group: Enteral lactoferrin supplementation for very preterm infants: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*, **393**, 423–433 (2019)
- Felis G.E., Dellaglio F.: Taxonomy of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* **8**, 44–61 (2007)
- Fornai M., Antonioli L. i wsp.: Protective effects of the combination *Bifidobacterium longum* plus lactoferrin against NSAID-induced enteropathy. *Nutrition*, **70**, 110583 (2020)
- Gałęcka M., Basińska A., Bartnicka A.: Probiotyki – implikacje w praktyce lekarza rodzinnego. *Forum Medycyny Rodzinnej*, **12**, 170–182 (2018)

26. Garrido D., Nwosu C., Ruiz-Moyano S., Aldredge D., German J.B., Lebrilla C.B., Mills D.A.: Endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidases from infant gut-associated bifidobacteria release complex N-glycans from human milk glycoproteins. *Mol. Cell. Proteomics*, **11**, 775–785 (2012)
27. Gibson G.R., Buddington R. i wsp.: Dietary prebiotics: current status and new definition. *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods*, **7**, 1–19 (2010)
28. Griffiths E.A., Duffy L.C., Schanbacher F.L., Dryja D., Leavens A., Neiswander R.L., Qiao H., DiRienzo D., Ogra P.: In vitro growth responses of bifidobacteria and enteropathogens to bovine and human lactoferrin. *Dig. Dis. Sci.* **48**, 1324–1332 (2003)
29. Grzywacz K., Butcher J., Romain G., Li J., Stintzi A.: The impact of probiotics and lactoferrin supplementation on piglet gastrointestinal microbial communities. *Biometals*, **32**, 533–543 (2019)
30. He J., Furmanski P.: Sequence specificity and transcriptional activation in the binding of lactoferrin to DNA. *Nature*, **373**, 721–724 (1995)
31. 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.* **14**, 146–152 (1992)
32. Hirotani Y., Ikeda K., Kato R., Myotoku M., Umeda T., Ijiri Y., Tanaka K.: Protective effects of lactoferrin against intestinal mucosal damage induced by lipopolysaccharide in human intestinal Caco-2 cells. *Yakugaku Zasshi*, **128**, 1363–1368 (2008)
33. Hu W., Zhao J., Wang J., Yu T., Wang J., Li N.: Transgenic milk containing recombinant human lactoferrin modulates the intestinal flora in piglets. *Biochem. Cell Biol.* **90**, 485–496 (2012)
34. Jensen H., Hancock R.E.: Antimicrobial properties of lactoferrin. *Biochimie*, **91**, 19–29 (2009)
35. Johnston W.H., Ashley C., Yeiser M., Harris C.L., Stolz S.I., Wampler J.L., Wittke A., Cooper T.R.: Growth and tolerance of formula with lactoferrin in infants through one year of age: double-blind, randomized, controlled trial. *BMC Pediatr.* **15**, 173 (2015)
36. Joint FAO/WHO Working Group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food: guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada, April 30 and May 1 (2002)
37. Jurkowski M., Błaszczuk M.: Charakterystyka fizjologiczno-biochemiczna bakterii fermentacji mlekowej. *Kosmos*, **61**, 493–504 (2012)
38. Karav S., Le Parc A., Leite Nobrega de Moura Bell J.M., Frese S.A., Kirmiz N., Block D.E., Barile D., Mills D.A.: Oligosaccharides released from milk glycoproteins are selective growth substrates for infant-associated Bifidobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **82**, 3622–3630 (2016)
39. Kawaguchi S., Hayashi T., Masano H., Okuyama K., Suzuki T., Kawase K.: A study concerning the effect of lactoferrin-enriched infant formula on low birth weight infants. *Perinatal Medicine*, **19**, 557–562 (1989)
40. Kim W.S., Kafley S., Rahman M.M., Shimazaki K.: Characterization of bovine lactoferrin C-lobe on bifidobacteria and pathogenic bacteria. *Milchwissenschaft*, **67**, 246–249 (2012)
41. 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*, **17**, 279–283 (2004)
42. Kim W.S., Tanaka T., Kumura H., Shimazaki K.: Lactoferrin-binding proteins in *Bifidobacterium bifidum*. *Biochem. Cell Biol.* **80**, 91–94 (2002)
43. Kodama A.: The biotyping of bifidobacterium isolated from healthy infants in Wakayama and Osaka district; bifidobacterium growth promoting activities of human milk casein and lactoferrin. *Pediatr. Int.* **25**, 486 (1983)
44. Kruzel M.L., Harari Y., Chen C.Y., Castro G.A.: Lactoferrin protects gut mucosal integrity during endotoxemia induced by lipopolysaccharide in mice. *Inflammation*, **24**, 33–44 (2000)
45. Kruzel M.L., Olszewska P., Pazdrak B., Krupinska A.M., Actor J.K.: New insights into the systemic effects of oral lactoferrin: transcriptome profiling. *Biochem. Cell Biol.* DOI:10.1139/bcb-2020-0069 (2020)
46. Kruzel M.L., Zimecki M., Actor J.K.: Lactoferrin in a context of inflammation-induced pathology. *Front. Immunol.* **8**, 1438 (2017)
47. Kuśmierska A., Fol M.: Właściwości immunomodulacyjne i terapeutyczne drobnoustrojów probiotycznych. *Probl. Hig. Epidemiol.* **95**, 529–540 (2014)
48. Langhorst J., Boone J.: Fecal lactoferrin as a noninvasive biomarker in inflammatory bowel diseases. *Drugs Today (Barc)*, **48**, 149–161 (2012)
49. Li L., Ren F., Yun Z., An Y., Wang C., Yan X.: Determination of the effects of lactoferrin in a preclinical mouse model of experimental colitis. *Mol. Med. Rep.* **8**, 1125–1129 (2013)
50. Liang L., Wang Z.J., Ye G., Tang X.Y., Zhang Y.Y., Kong J.X., Du H.H.: Distribution of lactoferrin is related with dynamics of neutrophils in bacterial infected mice intestine. *Molecules*, **25**, 1496 (2020)
51. Liepke C., Adermann K., Raida M., Mägert H.J., Forssmann W.G., Zucht H.D.: Human milk provides peptides highly stimulating the growth of bifidobacteria. *Eur. J. Biochem.* **269**, 712–718 (2002)
52. Linares D.M., Gómez C., Renes E., Fresno J.M., Tornadijo M.E., Ross R.P., Stanton C.: Lactic acid bacteria and bifidobacteria with potential to design natural biofunctional health-promoting dairy foods. *Front. Microbiol.* **8**, 846 (2017)
53. Lizzi A.R., Carnicelli V., Clarkson M.M., Di Giulio A., Oratore A.: Lactoferrin derived peptides: mechanisms of action and their perspectives as antimicrobial and antitumoral agents. *Mini Rev. Med. Chem.* **9**, 687–695 (2009)
54. Loh S. Jr, Maznah I.: The effect of different milks and milk proteins on the growth of *Bifidobacterium infantis* ATCC 27920 in vitro. *Malays J. Nutr.* **5**, 61–70 (1999)
55. Manzoni P., Farina D. i wsp.: Bovine lactoferrin supplementation for prevention of late-onset sepsis in very low-birth-weight neonates: A randomized trial. *Jama*, **302**, 1421–1428 (2009)
56. Markowiak P., Śliżewska K.: Effect of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*, **9**, 1021 (2017)
57. Marlicz W., Loniewski I., Grimes D.S., Quigley E.M.: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, proton pump inhibitors, and gastrointestinal injury: contrasting interactions in the stomach and small intestine. *Mayo Clin. Proc.* **89**, 1699–709 (2014)
58. Mastromarino P., Capobianco D., Campagna G., Laforgia N., Drimaco P., Dileone A., Baldassarre M.E.: Correlation between lactoferrin and beneficial microbiota in breast milk and infant's feces. *Biometals*, **27**, 1077–1086 (2014)
59. Meyer M.P., Alexander T.: Reduction in necrotizing enterocolitis and improved outcomes in preterm infants following routine supplementation with *Lactobacillus GG* in combination with bovine lactoferrin. *J. Neonatal.-Perinat. Med.* **10**, 249–255 (2017)
60. Miller-Catchpole R., Kot E., Haloftis G., Furmanov S., Bezkorovainy A.: Lactoferrin can supply iron for the growth of *Bifidobacterium breve*. *Nutr. Res.* **17**, 205–213 (1997)
61. Oda H., Wakabayashi H., Yamauchi K., Abe F.: Lactoferrin and bifidobacteria. *Biometals*, **27**, 915–922 (2014)
62. Oda H., Wakabayashi H., Yamauchi K., Sato T., Xiao J.Z., Abe F., Iwatsuki K.: Isolation of a bifidogenic peptide from the pepsin hydrolysate of bovine lactoferrin. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 1843–1849 (2013)
63. Panasiuk A., Kowalińska J.: Mikrobiota przewodu pokarmowego. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2019

64. Paul M., Somkuti G.A.: Hydrolytic breakdown of lactoferricin by lactic acid bacteria. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **37**, 173–178 (2010)
65. Penders J., Thijs C., Vink C., Stelma F.F., Snijders B., Kummeling I., van den Brandt P.A., Stobberingh E.E.: Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics*, **118**, 511–521 (2016)
66. Perez-Munoz M.E., Arrieta M.C., Ramer-Tait A.E., Walter J.: A critical assessment of the “sterile womb” and “in utero colonization” hypotheses: implications for research on the pioneer infant microbiome. *Microbiome*, **5**, 48 (2017)
67. Petschow B.W., Talbott R.D., Batema R.P.: 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.* **48**, 541–549 (1999)
68. Petschow B.W., Talbott R.D.: Response of bifidobacterium species to growth promoters in human and cow milk. *Pediatric Res.* **29**, 208–213 (1991)
69. Rahman M., Kim W.S., Kumura H., Shimazaki K.: Bovine lactoferrin region responsible for binding to bifidobacterial cell surface proteins. *Biotechnol. Lett.* **31**, 863–868 (2009)
70. Rahman M.M., Kim W.S., Ito T., Kumura H., Shimazaki K.: Examination of bovine lactoferrin binding to bifidobacteria. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* **44**, 529–532 (2008)
71. Rahman M.M., Kim W.S., Ito T., Kumura H., Shimazaki K.: Growth promotion and cell binding ability of bovine lactoferrin to *Bifidobacterium longum*. *Anaerobe*, **15**, 133–137 (2009)
72. Rahman M.M., Kim W.S., Kumura H., Shimazaki K.: Screening of *Bifidobacterium* spp. based on in vitro growth responses to bovine lactoferrin. *Int. J. Food Sci. Technol.* **45**, 453–458 (2010)
73. 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.* **81**, 119–124 (1992)
74. Saito H., Miyakawa H., Ishibashi N., Tamura Y., Hayasawa H., Shimamura S.: Effect of iron-free and metal-bound forms of lactoferrin on the growth of bifidobacteria, *E. coli* and *S. aureus*. *Biosci. Microflora*, **15**, 1–7 (1996)
75. 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*, **17**, 285–289 (2004)
76. Sherman M.P., Sherman J., Arcinue R., Niklas V.: Randomized control trial of human recombinant lactoferrin: a substudy reveals effects on the fecal microbiome of Very Low BirthWeight Infants. *J. Pediatrics*, **173** Suppl, S37–S42 (2016)
77. Shimazaki K., Kushida T., Takase M.: Lactoferrin-binding protein detected in bifidobacteria is GAPDH: a hypothesis of growth promotion of bifidobacteria by lactoferrin using the text mining approach, abstr OIII-3, p. 38. Abstr. 10th Int., Conf. Lactoferrin, Mazatlan Sinaloa, Mexico (2011)
78. Shoji H., Oguchi S., Shinohara K., Shimizu T., Yamashiro Y.: Effects of iron-unsaturated human lactoferrin on hydrogen peroxide-induced oxidative damage in intestinal epithelial cells. *Pediatr. Res.* **61**, 89–92 (2007)
79. Suzuki N., Iida N. i wsp.: Effects of enteric-coated lactoferrin tablets containing *Lactobacillus brevis* subs. coagulans on fecal properties, defecation frequency and intestinal microbiota of Japanese women with a tendency for constipation: a randomized placebo-controlled crossover trial. *Biosci. Microbiota Food Health*, **32**, 13–21 (2013)
80. Szewczyk A., Witecka A., Kiersztan A.: Rola mikrobioty jelitowej w patogenezie chorób neuropsychiatrycznych i neurodegeneracyjnych. *Postepy Hig. Med. Dosw.* **73**, 865–886 (2019)
81. Tang X.S., Shao H., Li T.J., Tang Z.R., Huang R.L., Wang S.P., Kong X.F., Wu X., Yin Y.L.: Dietary supplementation with bovine lactoferrin-lactoferricin produced by *Pichia pastoris* fedbatch fermentation affects intestinal microflora in weaned piglets. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **168**, 887–898 (2012)
82. Tang Z., Tu Q. i wsp.: Effects of dietary supplementation with an expressed fusion peptide bovine lactoferricin-lactoferrampin on performance, immune function and intestinal mucosal morphology in piglets weaned at age 21 d. *Br. J. Nutr.* **101**, 998–1005 (2009)
83. Tian H., Maddox I.S., Ferguson L.R., Shu Q.: Influence of bovine lactoferrin on selected probiotic bacteria and intestinal pathogens. *Biometals*, **23**, 593–596 (2010)
84. Titov E.I., Tikhomirova N.A., Ionova I.I., Gorlov I.F., Slozhenkina M.I., Mosolova N.L., Zlobina E.Y.: Growth stimulating effect of bovine milk lactoferrin on dermal cells and probiotic bacteria. *Emir. J. Food Agr.* **28**, 540–546 (2016)
85. Tomita M., Wakabayashi H., Yamauchi K., Teraguchi S., Hayasawa H.: Bovine lactoferrin and lactoferricin derived from milk: production and applications. *Biochem. Cell Biol.* **80**, 109–112 (2002)
86. Troost F.J., Saris W.H., Brummer R.J.: Recombinant human lactoferrin ingestion attenuates indomethacin-induced enteropathy in vivo in healthy volunteers. *Eur. J. Clin. Nutr.* **57**, 1579–1585 (2003)
87. Valenti P., Rosa L., Capobianco D., Lepanto M.S., Schiavi E., Cutone A., Paesano R., Mastromarino P.: Role of lactobacilli and lactoferrin in the mucosal cervicovaginal defense. *Front. Immunol.* **9**, 376 (2018)
88. Vega-Bautista A., de la Garza M., Carrero J.C., Campos-Rodríguez R., Godínez-Victoria M., Drago-Serrano M.E.: The impact of lactoferrin on the growth of intestinal inhabitant bacteria. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, pii: E4707 (2019)
89. Wang B., Timilsena Y.P., Blanch E., Adhikari B.: Lactoferrin: structure, function, denaturation and digestion. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **59**, 580–596 (2019)
90. Wang Y., Han F., Xu Z.: Developmental gene expression of lactoferrin in duodenum and effect of weaning age on gene expression of lactoferrin in piglets. *Arch. Anim. Nutr.* **60**, 1–9 (2006)
91. Weinberg E.D.: The *Lactobacillus* anomaly: total iron abstinence. *Perspect. Biol. Med.* **40**, 578–583 (1997)
92. Wharton B.A., Balmer S.E., Scott P.H.: Faecal flora in the newborn. Effect of lactoferrin and related nutrients. *Adv. Exp. Med. Biol.* **357**, 91–98 (1994)
93. Wołkowicz T., Januszkiewicz A., Szych J.: Mikrobiom przewodu pokarmowego i jego dysbiozy jako istotny czynnik wpływający na kondycję zdrowotną organizmu człowieka. *Med. Dośw. Mikrobiol.* **66**, 223–235 (2014)
94. Woodman T., Strunk T., Patole S., Hartmann B., Simmer K., Currie A.: Effects of lactoferrin on neonatal pathogens and *Bifidobacterium breve* in human breast milk. *PLoS ONE*, **13**, e0201819 (2018)
95. Wu J., Chen J., Wu W., Shi J., Zhong Y., van Tol E.A., Tang Q., Cai W.: Enteral supplementation of bovine lactoferrin improves gut barrier function in rats after massive bowel resection. *Br. J. Nutr.* **112**, 486–492 (2014)
96. Zhang P., Sawicki V., Lewis A., Nuijens J.H., Neville M.C., Zhang P.: Human lactoferrin in the milk of transgenic mice increases intestinal growth in ten-day-old suckling neonates. *Adv. Exp. Med. Biol.* **501**, 107–113 (2001)
97. Zimecki M., Artym J., Chodaczek G., Kocięba M., Rybka J., Skorska A., Kruzel M.: Glycomacropptide protects against experimental endotoxemia and bacteremia in mice. *EJPAU*, **9**, (2006)
98. Zimecki M., Spiegel K., Właszczuk A., Kübler A., Kruzel M.L.: Lactoferrin increases the output of neutrophil precursors and attenuates the spontaneous production of TNF-alpha and IL-6 by peripheral blood cells. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*, **47**, 113–118 (1999)