

PRACA POGLĄDOWA

LAKTOFERYNA: WIELOKIERUNKOWE DZIAŁANIE W PROFILAKTYCE I LECZENIU ZAKAŻEŃ U NOWORODKÓW URODZONYCH PRZEDWCZEŚNIE

LACTOFERRIN: MULTI-DIRECTIONAL ACTION IN THE PREVENTION AND TREATMENT OF INFECTIONS IN PRETERM NEONATES

✉ IZABELA GASIŃSKA

Klinika Neonatologii i Intensywnej Terapii Noworodka Instytutu Matki i Dziecka w Warszawie



Izabela Gasińska
Instytut Matki i Dziecka,
Klinika Neonatologii i Intensywnej Terapii
Noworodka
ul. Kasprzaka 17a, 01-211 Warszawa
Tel.: 22 32 77 406,
gasinska.izabela@gmail.com

Wpłynęło: 08.10.2018
Zaakceptowano: 09.11.2018
Opublikowano on-line: 14.11.2018

Cytowanie: Gasińska I. Laktoferyna: wielokierunkowe działanie w profilaktyce i leczeniu zakażeń u noworodków urodzonych przedwcześnie.

Postępy Neonatologii 2018;24(2):87–95.
doi: 10.31350/postepyneonatologii/2018/2/PN2018024

Copyright by MAVIPURO Polska Sp. z o.o., Warszawa, 2018.
Wszystkie prawa zastrzeżone. Żadna część niniejszej publikacji nie może być powielana i rozpowszechniana w jakiegokolwiek formie i w jakikolwiek sposób bez zgody wydawcy.

STRESZCZENIE:

Laktoferyna jest multipotencjalną glikoproteiną, występującą w wielu płynach ustrojowych u zwierząt, szczególnie w mleku ssaków. Białko to ma zdolność tworzenia odwracalnych kompleksów z jonami żelaza oraz wpływa na szereg funkcji biologicznych, takich jak modulacja układu immunologicznego, działanie przeciwdrobnoustrojowe, dojrzewanie przewodu pokarmowego i wiele innych. Laktoferyna zawarta w mleku kobiecym ma ważny wpływ na rozwój noworodka: uczestniczy w przyswajaniu z pokarmu składników odżywczych (głównie żelaza); chroni, stymuluje wzrost i dojrzewanie tkanek jelita; wpływa na ustalenie się prawidłowego składu mikroflory w przewodzie pokarmowym. Ponadto laktoferyna chroni przed bakteriami i sepsą, co ma istotne znaczenie dla noworodków urodzonych przedwcześnie. W pracy dokonano przeglądu wybranych badań i opracowań na temat mechanizmów odpowiadających za szerokie działanie laktoferyny zarówno ludzkiej, rekombinowanej, jak i bydłowej oraz przedstawiono jej potencjał terapeutyczny w przypadku noworodków o masie ciała poniżej 1500 g.

SŁOWA KLUCZOWE: laktoferyna, sepsa o późnym początku, noworodek z bardzo małą urodzeniową masą ciała (VLBW), mikrobiom, martwicze zapalenie jelit

ABSTRACT:

Lactoferrin is a multipotential glycoprotein, which is present in many body fluids of animals and particularly in mammalian milk. This protein has the ability to create reversible complexes with iron ions and a lot of biological functions like as immunomodulation, antimicrobial activity, direct effect on gastrointestinal development and many others. Lactoferrin from the human milk has an important effect on the newborn's body. Participates in the absorption of nutrients (mainly iron) from food. It protects, stimulates the growth and maturation of intestinal tissues. It affects the correct composition of the microflora in the gastrointestinal tract. It protects against bacteraemia and sepsis, which is important in the case of newborns born prematurely. The work presents a review of selected studies

and studies on the mechanisms responsible for the broad action of lactoferrin, both human, recombinant and bovine, and its therapeutic potential in neonates with a body weight below 1500 g.

KEY WORDS: lactoferrin, late-onset sepsis, very low birth weight newborn, microbiome, necrotizing enterocolitis

WPROWADZENIE

Laktoferyna została odkryta w 1939 roku jako czerwona frakcja białka w mleku krowim. Po przeszło 20 latach została wyizolowana z mleka krowiego i ludzkiego. Jej charakterystyczną cechą był czerwony kolor podczas inkubacji z jonami żelaza, z tym wiąże się nazwa pochodząca z języka łacińskiego: „lacto” – mleczny i „ferrum” – żelazo [1]. W ciągu następnych 20 lat odkryto strukturę białka, jego właściwości mikrobiologiczne i wpływ na hematopoezę. Laktoferyna jest glikoproteiną mającą zdolność wiązania jonów żelaza. Jest białkiem o strukturze chemicznej zbudowanej z pojedynczego łańcucha polipeptydowego, który zawiera 703 aminokwasy [2]. Jej budowę chemiczną ustalono za pomocą metody krystalograficznej z użyciem promieni Roentgena [2]. Laktoferyna składa się z dwóch części: płata N oraz płata C, połączonych spiralnym mostkiem [2]. Każdy z płatów tworzą dwie domeny: alfa i beta, zwane odpowiednio N1 i N2 oraz C1 i C2 [1]. Zarówno w obrębie płata N, jak i płata C znajduje się oddzielna szczelina wiążąca żelazo [2]. Połączenie żelaza z laktoferyną zmienia strukturę przestrzenną cząsteczki. Białko związane z żelazem nazywamy hololaktoferyną, a niezwiązane – apolaktoferyną [3]. Wiązanie żelaza z laktoferyną polega na otaczaniu cząsteczki żelaza przez domeny. Uwalnianie żelaza następuje wskutek uszkodzenia struktury białkowej (w środowisku kwaśnym, poniżej pH 3,5) lub przez przyłączenie się laktoferyny do receptora białkowego [2, 3]. Laktoferyna jest białkiem kationowym, co umożliwia przyłączenie się do różnych cząsteczek: glikozaminoglikanów, DNA, RNA, lizozymu, receptorów komórkowych [1].

Laktoferyna w organizmie człowieka jest wytwarzana przez komórki nabłonkowe błon śluzowych i uwalniana w największych ilościach do takich wydzielin, jak siara, mleko, łzy, wydzielina śluzówki oskrzeli i dróg rodnych [1, 2]. W mniejszych ilościach występuje w przewodzie pokarmowym, żółci, skórze, w płynie mózgowo-rdzeniowym, płynie stawowym, płynie owodniowym, a także w pocie, moczu i kale [2, 3]. Laktoferyna jest również wytwarzana i gromadzona w ziarnistościach neutrofilów, skąd uwalnia się do krwi [3]. We krwi jej stężenia nie przekraczają 1 µg/ml, ale rosną podczas stanów zapalnych [3]. Dziennie w ustroju powstaje około 5 g LF, z tego 0,5 g jest uwalniane do krążenia. W czasie infekcji bakteryjnej ilość ta wzrasta do 30 g, z tego 1/3 jest uwalniana do krwiobiegu [4, 5].

Określono średnie stężenia laktoferyny w mleku kobiecym. Zawartość laktoferyny w siarze ludzkiej

wynosi powyżej 600 mg/100 ml, natomiast w mleku dojrzalym – ok. 140 mg/100 ml [5]. Po porodzie przedwczesnym w mleku matki stężenie laktoferyny jest wyższe niż w pokarmie kobiety, która urodziła o czasie. Stężenie laktoferyny w mieszankach mlecznych wynosi średnio 14 mg/100 ml. Ocenia się spożycie laktoferyny przez noworodka na 400–1200 mg/kg m.c./dobę [4, 5]. Mleko bankowane jest istotnym źródłem laktoferyny ludzkiej. Aby zachować aktywność LF, sigA i lizozymu, a skutecznie wyeliminować bakterie, należy mleko kobiece pasteryzować w temperaturze 57°C przez 30 minut [6].

DZIAŁANIE LF W ORGANIZMIE NOWORODKA

Laktoferyna pełni w organizmie noworodka ważne funkcje o charakterze regulacyjnym. Uczestniczy w przyswajaniu składników odżywczych (głównie żelaza, a także manganu, cynku oraz wodorowęglanów) z pokarmu [2, 3]. Chroni oraz stymuluje wzrost i dojrzewanie tkanek jelita. Wpływa na kształtowanie się prawidłowego składu mikroflory jelita [3]. Chroni przed bakteriami i sepsą, co jest szczególnie ważne dla noworodków urodzonych przedwcześnie [7]. Chroni przed stresem oksydacyjnym. Promuje dojrzewanie układu immunologicznego. Laktoferyna wykazuje dużą oporność na działanie enzymów proteolitycznych (uszkodzenie struktury białkowej następuje dopiero poniżej pH 3,5) [1, 2]. W przewodzie pokarmowym noworodków tylko w niewielkim stopniu dochodzi do degradacji enzymatycznej LF, co skutkuje obecnością egzogennej LF we krwi, płynie mózgowo-rdzeniowym i stolcu [3]. Hydrolizaty laktoferyny zarówno ludzkiej, jak i bydlęcej, powstające podczas trawienia za pomocą pepsyny, mają silne właściwości bójcze wobec bakterii, grzybów i pierwotniaków (to tzw. laktoferycyna H i B) [8]. Laktoferyna jest usuwana z krążenia w ciągu 24–48 godzin w wyniku endocytozy przez makrofagi i monocyty, może też być usuwana bezpośrednio przez komórki wątrobowe oraz wydzielana przez nerki z moczem, a także przez przewód pokarmowy wraz z kałem [2].

LAKTOFERYNA U NOWORODKÓW URODZONYCH PRZEDWCZEŚNIE

U noworodków urodzonych przedwcześnie możliwość dostarczenia do jelit wystarczającej ilości laktoferyny drogą

doustną jest ograniczona. Wynika to w dużej mierze z morfologicznej i czynnościowej niedojrzałości przewodu pokarmowego. Noworodek donoszony, karmiony wyłącznie piersią, przyjmuje w pierwszych siedmiu dniach życia około 3 g laktoferyny na dobę [3]. W mleku matek, które urodziły przed terminem, odnotowuje się wyższe stężenia laktoferyny [3]. Dzieciom urodzonym przedwcześnie, zwłaszcza z bardzo małą urodzeniową masą ciała, nie można podawać takiej samej ilości laktoferyny pochodzącej z pokarmu naturalnego (mleka matki lub bankowanego), jaką otrzymują noworodki urodzone o czasie. Z przeprowadzonego badania ELFIN wynika, że noworodki niedonoszone do ukończenia 34 tygodnia wieku postkonceptyjnego powinny otrzymywać około 100–200 mg LF/kg/dobę [3].

DZIAŁANIE PRZECIWDROBNOUSTROJOWE LAKTOFERYNY

Laktoferyna jest białkiem wykazującym wielokierunkowe działanie przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, przeciwgrzybicze, a także przeciwpierwotniakowe (tabela 1) [2, 4, 7, 9, 10]. Odkryto wiele mechanizmów odpowiedzialnych za funkcje przeciwdrobnoustrojowe.

DZIAŁANIE PRZECIWBAKTERYJNE I PRZECIWPIERWOTNIAKOWE

Mechanizm działania LF wobec bakterii, grzybów i pierwotniaków polega przede wszystkim na ograniczeniu dostępności żelaza, uszkodzeniu ściany i błony komórkowej oraz cytoszkieletu, co powoduje śmierć komórki [8]. Laktoferyna blokuje również receptory komórkowe, hamuje syntezę DNA i białek [3]. Udowodniono, że LF dzięki swoim właściwościom proteolitycznym rozkłada wydzielane przez bakterie czynniki zwiększające wirulencję (degradacja

proteazy IgA1 produkowanej przez *Haemophilus influenzae* oraz niszczenie antygenów plazmidowych B i C uwalnianych przez szczep M90T *Shigella flexneri*) [2]. Natomiast hamowanie adhezji komórki patogenu do tkanek żywiciela skutkuje ograniczeniem tworzenia się biofilmu [8]. Właściwości przeciwbakteryjne laktoferyny polegają także na modulacji układu immunologicznego przez obniżenie produkcji cytokin prozapalnych, takich jak: Il-6, Il-1, TNF- α , a zwiększenie wytwarzania Il-4 i Il-10 [3]. Ten mechanizm ma szczególne znaczenie w czasie endotoksemii oraz wstrząsu septycznego.

Działanie przeciwpierwotniakowe polega m.in. na ograniczeniu dostępności żelaza, co hamuje namnażanie się *Pneumocystis carinii* oraz *Entamoeba histolytica* [3, 10]. Zarówno laktoferyna ludzka, jak i bydlęca wykazują aktywność bójczą wobec tych drobnoustrojów, zależną od ich stężenia [10]. Laktoferyna, wiążąc się z siarczanem heparynu, blokuje również pasożytowi *Plasmodium vivax* dostęp do receptora na powierzchni komórek [3]. Ponadto powoduje uszkodzenie i zniszczenie pasożyta *Entamoeba histolytica* wskutek przyłączenia się do lipidów błony trofozoitu, a także hamuje wewnątrzkomórkowy rozwój *Toxoplasma gondii* przez aktywację układu immunologicznego gospodarza [3, 10].

DZIAŁANIE PRZECIWWIRUSOWE

LF wiąże się z cząsteczkami na powierzchni wirusa i komórek docelowych, co skutkuje blokowaniem zakażenia komórek [8]. Ponadto unieczynnia enzymy uczestniczące w replikacji wirusa. Działanie to dotyczy zarówno wirusów bezotczkowych, jak i otoczkowych [2, 3]. W badaniach doświadczalnych na szczurach zakażonych wirusem cytomegalii wykazano, że podawanie laktoferyny znacznie obniżało wiremę [2].

Laktoferyna ma udowodnione działanie hamujące połączenie wirusa z komórką docelową; jest ono skierowane

Tab. 1. Aktywność laktoferyny w zwalczaniu drobnoustrojów.

Aktywność laktoferyny w zwalczaniu drobnoustrojów			
bakterii	wirusów	grzybów	pierwotniaków
<i>Streptococcus mutans</i>	Wirus opryszczki	<i>Candida albicans</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>
<i>S. pneumoniae</i>	Cytomegalowirus	<i>C. crusei</i>	<i>Giardia lamblia</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	HIV	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Babesia caballi</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	HCV HBV	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	<i>Cryptosporidium parvum</i>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Wirus brodawczaka	<i>T. rubrum</i>	<i>Encephalitozoon intestinalis</i>
<i>Escherichia coli</i>	Wirus grypy A		<i>Trypanosoma cruzi</i>
<i>Shigella flexnerii</i>	Poliowirus		<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>Salmonella spp.</i>			<i>Pneumocystis carinii</i>
<i>Yersinia spp.</i>			<i>Toxoplasma gondii</i>
<i>Porphyromonas gingivalis</i>			
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>			
<i>Haemophilus influenzae</i>			
<i>Vibrio cholerae</i>			

przeciw adenowirusom, wirusowi opryszczki zwykłej, HIV, a także przeciw wirusom HCV i HBV [2, 3, 8].

DZIAŁANIE IMMUNOMODULUJĄCE LF

Laktoferyna jest naturalnym immunomodulatorem, toteż przez niektórych badaczy jest nazywana „supercytokiną” lub „inteligentną cytokiną” [9]. Białko rozpoznaje aktualną aktywność komórek i reguluje ją w ten sposób, że słaba odpowiedź immunologiczna ulega wzmocnieniu, umiarkowana się nie zmienia, a za silna jest osłabiana. Wykryto obecność swoistych receptorów dla LF na powierzchni komórek układu odpornościowego. Laktoferyna wpływa na granulocyty, makrofagi, komórki dendrytyczne, komórki cytotoksyczne NK i LAK, układ dopełniacza, limfocyty B i T [1, 2, 3, 11]. Działanie to sprzyja zwalczaniu zakażeń, normalizacji odporności po zabiegach chirurgicznych i po chemioterapii oraz gojeniu się ran, a także wspomaga leczenie chorób autoimmunologicznych. Udowodniono, iż LF przez swój regulacyjny wpływ na procesy redox, a w ten sposób na powstawanie wolnych rodników tlenowych, chroni organizm przed stresem oksydacyjnym [2].

ŁAKTOFERYNA W GOSPODARCE ŻELAZEM

Laktoferyna ma kluczowe znaczenie w regulacji stężenia Fe w komórce. W pierwszym okresie życia człowieka jest ona głównym źródłem żelaza. LF zwiększa o 50% biodostępność Fe z mleka kobiecego, natomiast w przypadku mleka krowiego tylko o 10% [5]. Wiąże potencjalnie toksyczne wolne jony Fe w środowisku, co prowadzi do ograniczenia produkcji wolnych rodników tlenowych w reakcji zapalnej [2].

ŁAKTOFERYNA A MIKROBIOM JELITOWY

Karmienie naturalne noworodka sprzyja dominacji flory *Lactobacillus* oraz *Bifidobacterium*. Obecna w mleku kobiecym laktoferyna hamuje rozwój flory patogennej: *Bacteroides*, *Clostridium*, *E. coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, a także hamuje adhezję enteropatogennych bakterii do nabłonka jelitowego [3]. Wiąże również adhezyny bakteryjne oraz hamuje rozwój grzybów w przewodzie pokarmowym [2, 3].

LF wykazuje symbiotyczne działanie z bakteriami *Lactobacillus* w stymulacji GALT [12]. System GALT (gut associated lymphoid tissue) jest to tkanka limfatyczna związana z błonami śluzowymi przewodu pokarmowego, zawierająca ponad 70% limfocytów całego organizmu. System GALT składa się ze zorganizowanych kompleksów komórkowych

(kępki Peyera i samotne grudki chłonne) oraz rozproszonych komórek zlokalizowanych w blaszce właściwej jelita (limfocyty T i B, makrofagi, komórki dendrytyczne) i w nabłonkach pokrywających kosmki jelitowe (limfocyty śród nabłonkowe).

LF działa immunomodulująco na nabłonek jelita cienkiego noworodka [13]. Powoduje rozplem komórek dendrytycznych, co korzystnie wpływa na modulację wydzielania przez limf TH2 cytokin IL-13, IL-4. Wydzielana przez limf TH2 IL-4 wywołuje apoptozę limf TH1, a to zmniejsza liczbę komórek zdolnych do walki z infekcją [13]. Natomiast uwalnianie przez komórki dendrytyczne IL-12 powoduje down-regulację cytokin IL-13, IL-4, dzięki czemu w jelicie pozostaje więcej żywych komórek TH1 [13]. LF stymuluje wzrost i funkcję makrofagów podśluzówkowych [13]. Wzmacnia ochronną rolę komórek Panetha w kryptach jelitowych oraz moduluje podśluzówkową obronę przez wpływ na komórki Th 17 [13].

ŁAKTOFERYNA A NEC. ROZPLEM FLORY PATOLOGICZNEJ ORAZ ROLA KOMÓREK PANETHA

Komórki Panetha w kryptach jelitowych sąsiadują z naczyniami krwionośnymi w kosmkach jelitowych. Bliskość tych struktur sprawia, że substancje wydzielane przez komórki Panetha oddziałują na naczynia [13]. W przypadku rozrostu flory patologicznej w świetle jelita toksyny bakteryjne gromadzą się w kryptach i powodują uszkodzenie komórek Panetha. Uszkodzone komórki Panetha wydzielają do otoczenia TNF- α oraz inne cytokiny zapalne, które wywołują zapalenie (leukocyty oraz płytki przylegają do endotelium i uwalniają mediatory zapalenia), powodują zamknięcie naczyń krwionośnych kosmka jelitowego, co skutkuje jego martwicą [13]. Celem tych reakcji patofizjologicznych jest ograniczenie uogólnienia się infekcji bakteryjnej na cały organizm. Skutkiem ww. reakcji u noworodków urodzonych przedwcześnie może być m.in. rozwinięcie się NEC [13].

BEZPIECZEŃSTWO ŁAKTOFERYNY

LF jest naturalnym białkiem i nie wykazuje toksyczności w dużym stężeniu. W żadnym z dotychczas przeprowadzonych testów *in vitro* oraz *in vivo* (u zwierząt i u ludzi) nie wykazano toksyczności, właściwości mutagennych i kancerogennych tego białka. Dotyczy to laktoferyny bydłowej i ludzkiej, w tym rekombinacyjnej (rHLF), oraz pochodnych peptydów (laktoferycyny i innych). W badaniach wykazano bezpieczeństwo podawania LF zarówno drogą doustną, jak i pozajelitową (*i.v.*, *s.c.* donosowo, na rany, do jam ciała,

na skórę) [4]. BLF i rHLF podawano szczurom w dawkach 200, 600 i 2000 mg/kg m.c./dobę przez 13 tygodni, w tym czasie nie stwierdzono żadnych niepożądanych objawów [14]. Najwyższa dawka oznacza przyjęcie przez osobę o wadze 70 kg jednorazowo aż 140 g LF.

Bydlęca laktoferyna (BLF) została uznana przez Amerykańską Agencję do spraw leków i żywności (FDA) za środek całkowicie bezpieczny. Europejski Urząd do spraw bezpieczeństwa żywności uznał ją za bezpieczny składnik żywności (EFSA) [3]. BLF jest w 77% homologiczna z LF ludzką [3].

Zarówno BLF, jak i LF ludzka są odporne na proteolizę w przewodzie pokarmowym, gdzie wiążą się z enterocytami; można je znaleźć w stolcu niezmiennione [2]. Kwaśna proteoliza w żołądku prowadzi do wytworzenia peptydów laktoferycyn o podwyższonej aktywności w zwalczaniu drobnoustrojów [2]. BLF wykazuje *in vivo* oraz *in vitro* wyraźne działanie przeciwbakteryjne i antybiotykopodobne wobec bakterii Gram(-), Gram(+) oraz grzybów [7, 8]. Działa synergistycznie z vankomycyną w zakażeniach *S. epidermidis* [3]. Podobnie jak laktoferyna ludzka ma działanie immunomodulacyjne. Przyspiesza dojrzewanie jelit, działa probiotycznie i bifidogennie [13].

Talaktoferyna, rekombinowana ludzka laktoferyna, jest produkowana przez *Aspergillus niger* [15]. Strukturalnie jest identyczna z ludzką laktoferyną [15]. TLF, wiążąc się ze specyficznymi receptorami, indukuje produkcję immunomodulacyjnych cytokin i chemokin. Podana doustnie wiąże się z enterocytami górnej części przewodu pokarmowego i w ten sposób inicjuje immunostymulację tkanki [15]. TLF zwiększa odporność wrodzoną i nabytą w wyniku stymulacji komórek dendrytycznych NK – T i limfocytów CD8 [15]. Talaktoferyna sprzyja rozwojowi bakterii Gram(+) w mikrobiomie jelitowym [15].

W badaniach *in vitro* nad wpływem TLF i lizozymu na bakterie *Escherichia coli* zaobserwowano synergistyczne bakteriobójcze działanie tych substancji, jeśli były zastosowane razem [15]. W próbie, w której do badanej kolonii bakteryjnej dodano wyłącznie TLF, nastąpił wzrost liczby bakterii z 10^4 do 10^6 CFU/ml w ciągu dwóch godzin, a w próbie, w której zastosowano wyłącznie lizozym, zaobserwowano spadek liczby bakterii z 10^4 do ok. 10^3 CFU/ml. Natomiast w próbie, w której zastosowano TLF i lizozym, zaobserwowano spadek liczby bakterii z 10^4 do 10^1 CFU/ml [15].

DLACZEGO LAKTOFERYNA BUDZI ZAINTERESOWANIE NEONATOLOGÓW?

Na szczególną uwagę zasługuje pozytywny wpływ LF na zakażenia związane z opieką zdrowotną (późne), martwicze zapalenie jelit, upośledzony rozwój dzieci urodzonych przedwcześnie.

Istotnym czynnikiem zakażeń późnych wywoływanych na OIT przez bakterie Gram(-) jest nieprawidłowa flora przewodu pokarmowego. Rozrost patologicznej flory w mechanizmie translokacji bakteryjnej może prowadzić do SIRS (systemic inflammatory response syndrome) [16]. Translokacja bakteryjna to inwazja flory jelitowej przez śluzówkę do jałowych tkanek. Poprzez uszkodzony nabłonek jelitowy toksyny bakterii i fragmenty drobnoustrojów przedostają się do krążenia. Translokacja bakteryjna ma ścisły związek z powstaniem NEC oraz późnych postaci sepsy [16].

Rozpoznanie SIRS [11] wymaga występowania co najmniej dwóch z poniżej wymienionych objawów (jeden musi być nieprawidłową temperaturą lub liczbą leukocytów):

- temperatura 38,5°C lub 36°C;
- tachykardia definiowana jako średnia częstość rytmu serca 2 SD powyżej normy dla wieku przy braku zewnętrznego bodźca pobudzającego lub bólowego bądź w innym przypadku niewyjaśnione uporczywe przyspieszenie czynności serca, trwające od 0,5 do 4 godzin; albo w przypadku dzieci w wieku poniżej roku bradykardia, określana jako średnia częstość akcji serca >10 centyla dla wieku przy braku stymulacji nerwu błędnego, leków z grupy β -blokerów lub wrodzonej wady serca; albo w inny sposób niewyjaśnione uporczywe zwolnienie czynności serca, trwające pół godziny;
- średnia częstość oddechów 2 SD powyżej normy dla wieku lub wentylacja mechaniczna w ostrym stanie, niezwiązanym z chorobami nerwowo-mięśniowymi oraz wpływem leków zwiotczających;
- zwiększona bądź zmniejszona z wiekiem liczba leukocytów (niezwiązana z leukopenią spowodowaną przez chemioterapię) lub 10% niedojrzałych neutrofilii.

U noworodków urodzonych przedwcześnie może dojść do rozwoju nieprawidłowej flory bakteryjnej, a przyczyny tego są następujące: antybiotykoterapia matki i dziecka, opóźnione wprowadzenie żywienia enteralnego, żywienie mieszkankami sztucznymi, opóźniona laktacja u matki, środowisko OITN, poród przez cięcie cesarskie [17]. Czynniki sprzyjające kształtowaniu się prawidłowej flory jelit u wcześniaków to: żywienie pokarmem matki, wczesne wprowadzenie żywienia enteralnego, racjonalna antybiotykoterapia, probiotyki, prebiotyki, synbiotyki, laktoferyna [3, 17].

PRACE BADAWCZE NAD STOSOWANIEM LAKTOFERYNY W NEONATOLOGII

Przeprowadzono na świecie wiele badań klinicznych z zastosowaniem laktoferyny u dzieci (w tym noworodków), a także u dorosłych. Prowadzono je również z udziałem

noworodków urodzonych przedwcześnie. Badanym podawano doustnie różne postaci LF: bydlęcą (najczęściej) oraz rekombinowaną ludzką – talaktoferynę.

W tej pracy dokonano przeglądu trzech badań: Randomized Controlled Trial of Talactoferrin Oral Solution in Preterm Infants (Sherman); Bovine Lactoferrin Supplementation for Prevention of Late-Onset Sepsis in Very Low-Birth-Weight Neonates (Manzoni); Randomized Controlled Trial of Lactoferrin for Prevention of Sepsis in Peruvian Neonates <2500 Grams (Ochoa).

W badaniu Shermana uczestniczyło 120 noworodków z urodzeniową masą ciała 750–1500 g, o dojrzałości 28 ± 6 Hbd [18]; ocena po urodzeniu: min. 5 pkt. w skali Apgar w pierwszej minucie życia oraz 7 pkt. w piątej minucie. Talaktoferyna została podana w pierwszych 24 godzinach życia dziecka. W grupie otrzymującej talaktoferynę 45 noworodków było karmionych pokarmem kobiecym, natomiast w grupie przyjmującej placebo 46 dzieci. Odpowiednio mleko modyfikowane otrzymywało 15 (talaktoferyna) i 14 (placebo) pacjentów. Wyłączono z rekrutacji noworodki w następujących przypadkach: matka lub dziecko z rozpoznaną w trakcie porodu infekcją bakteryjną, grzybiczą lub wirusową (HIV); ciężka zamartwica urodzeniowa (pH z pępowiny <7,0; Apgar ≤ 3 pkt. w piątej minucie życia), duże wady wrodzone lub zespoły wad; aberracje chromosomowe lub zaburzenia dziedziczne, udokumentowany niedobór odporności, używanie przez matkę narkotyków lub innych nielegalnych substancji, brak zgody rodziców [18].

Badając oddziaływanie talaktoferyny na wyżej wymienione noworodki, brano pod uwagę bezpieczeństwo jej stosowania, czyli występowanie działań niepożądanych, w tym ciężkich, włącznie ze zgonem. Główne punkty końcowe pracy badawczej zakładały zmniejszenie się występowania (po wyżej 72 godz. życia) takich infekcji wtórnych, jak bakterie mia, zapalenie płuc, infekcja układu moczowego, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, NEC. Natomiast poboczne punkty końcowe dotyczyły zmniejszenia się występowania posocznicy, zespołu reakcji zapalnej, zagrożenia NEC, następstw innych chorób [18].

Talaktoferyna była podawana doustnie przez 28 dni w dawce 150 mg/kg co 12 godzin. Placebo podawano także doustnie w dawce (środek)/kg co 12 godzin [18], również przez 28 dni. W badanych grupach noworodków stwierdzono trzy zgony (niezwiązane z terapią TLF), trzy zgony/120 noworodków (2,5% populacji badanej) [18]. Rozpoznano trzy przypadki NEC: dwa w grupie otrzymującej TLF (dzieci przeżyły) oraz jeden przypadek u dziecka przyjmującego placebo i karmionego mieszanką (zakończony zgonem) [18]. Ponadto wystąpiły cztery bakterie mia zarówno w grupie otrzymującej TLF, jak i w grupie przyjmującej placebo (TLF: o etiologii *Streptococcus agalactiae* – 1, gronkowiec koagulazoujemny – 3; placebo: o etiologii *Streptococcus agalactiae* – 1, *Klebsiella pneumoniae* – 1,

gronkowiec koagulazoujemny – 2) [18]. U dzieci otrzymujących TLF nie wystąpiło zapalenie płuc i zakażenie układu moczowego. Pacjenci otrzymujący placebo rozwinęli zapalenie płuc (2 przypadki) oraz zakażenie układu moczowego (2 przypadki).

Odnotowano wewnątrzczaszkowe krwawienie w pierwszej dobie życia u noworodka, który otrzymał talaktoferynę. Doszło do nagłego zgonu dziecka w wieku pięciu miesięcy (po wypisaniu ze szpitala), otrzymującego talaktoferynę. Nie stwierdzono żadnych działań niepożądanych związanych z podawaniem TLF (incydentu wymiotów lub/i biegunki, zaburzeń żołądkowo-jelitowych – wymiotów lub krwawych stolców, nietolerancji pokarmowych, nieprawidłowości w badaniach laboratoryjnych lub radiologicznych, reakcji alergicznych. Ponadto nie odnotowano żadnych ciężkich działań niepożądanych związanych z podawaniem talaktoferyny [18].

W grupie pacjentów z masą urodzeniową poniżej 1000 g otrzymujących talaktoferynę 12 dzieci było karmionych pokarmem matki, dwoje – mlekiem modyfikowanym. Odnotowano 14% infekcji w tej populacji noworodków, w tym jedną bakterie mia (gronkowiec koagulazoujemny) oraz jeden przypadek NEC. W grupie dzieci, którym podawano placebo, pokarm matki otrzymało dziesięcioro, mieszankę czworo, infekcję stwierdzono u 43% badanych. Rozpoznano u tych pacjentów dwie bakterie mia (gronkowiec koagulazoujemny), jedną posocznicę (*Klebsiella* spp.), jedno dziecko rozwinęło NEC [18].

Pozostałe wyniki przeprowadzonego badania: nieco mniejsze (6 dzieci) zagrożenie wystąpieniem NEC u pacjentów, którzy otrzymywali TLF, niż w grupie otrzymującej placebo (8 pacjentów), OR – iloraz szans = 1,4; u noworodków, którym podawano TLF, średni czas trwania tlenoterapii wynosił 14 dni i był o siedem dni krótszy niż w grupie dzieci otrzymujących placebo. Spełniające kryteria rozpoznania BPD u wcześniaków: talaktoferyna – siedmioro dzieci, placebo – dziesięcioro (OR=1,5). Podawanie LF nie wpłynęło na występowanie retinopatii u noworodków, a także nie skróciło czasu hospitalizacji (trwała ona 58 dni zarówno u przyjmujących TLF, jak i placebo) [18].

W badaniu Manzoniego wzięła udział większa liczba noworodków niż w badaniu Shermana. Zakwalifikowano 472 dzieci. Dzieciom przez 30 dni podawano doustnie laktoferynę bydlęcą (LF), LF z *Lactobacillus rhamnosus* GG (LF+LGG) lub placebo [19]. Przypadków sepsy było znacznie mniej wśród pacjentów otrzymujących LF lub LF+LGG niż w grupie dzieci otrzymujących placebo (6% vs 17%). Zgonów z powodu sepsy również było mniej w obu grupach w porównaniu z grupą otrzymującą placebo. W porównaniu z placebo LF + LGG znacząco zmniejszyła liczbę zachorowań na NEC. Różnice były istotne statystycznie u noworodków ze skrajnie małą urodzeniową masą ciała (<1000 g). W badaniu wykazano również ochronne działanie laktoferyny

bydłęcej wobec martwiczego zapalenia jelit u noworodków, poczynając od stopnia II w klasyfikacji Bella. U dzieci, które otrzymywały laktoferynę, odnotowano także wyraźny spadek częstości inwazyjnych zakażeń grzybiczych [19].

W przybliżeniu o połowę mniej liczna niż u Manzoniego była grupa dzieci, które poddał badaniu Ochoa z Peru. Badanie prowadzono u 190 noworodków z urodzeniową masą ciała 500–2500 g przez pierwsze 72 godziny ich życia [20]. Dokonano próby oceny skuteczności suplementacji laktoferyny bydłęcej w zapobieganiu wystąpieniu sepsy u noworodków z masą ciała poniżej 2500 g. Interwencję zastosowano po rozpoczęciu żywienia pacjenta drogą przewodu pokarmowego. W trakcie badania odsetek dzieci z obu grup żywionych wyłącznie pokarmem kobiecym, żywionych wyłącznie mlekiem modyfikowanym oraz w sposób mieszany: mlekiem modyfikowanym i pokarmem kobiecym był zbliżony. Laktoferyna bydłęca była podawana doustnie lub przez sondę dożołądkową w dawce 200 mg/kg/dobę w trzech dawkach przez cztery tygodnie. Grupa kontrolna otrzymywała maltodekstrynę w dawce 200 mg/kg/dobę także w trzech dawkach przez cztery tygodnie. Badanym punktem końcowym było wystąpienie późnych posocznic noworodkowych, rozpoznane na podstawie objawów klinicznych (z dodatnim posiewem krwi oraz z ujemnym posiewem krwi) [20].

Noworodki zakwalifikowane do badania musiały spełnić następujące kryteria: urodzeniowa masa ciała 500–2500 g, poród w szpitalu prowadzącym badanie lub przekazanie w ciągu 72 godzin życia na OION, oddział opieki pośredniej w jednym z trzech szpitali uczestniczących w badaniu [20]. Wśród zakwalifikowanych noworodków 9,5% stanowiły dzieci z masą ciała 500–1000 g, 32,6% z masą w przedziale 1001–1500 g, ok. 42% ważyło przy urodzeniu 1501–2000 g, natomiast dzieci z masą ciała 2001–2500 g było ok. 16% badanej populacji. Średni wiek ciążowy pacjentów wynosił 32 Hbd (26–38), noworodków z ciąż wielopłodowych było nieco więcej w grupie przyjmującej LF (24,2%) niż w grupie kontrolnej (15,8%) [20].

W badanej populacji pacjentów przeprowadzono charakterystykę wyjściową danych demograficznych i klinicznych, nie odnotowano jednak żadnych istotnych różnic, z wyjątkiem okołoporodowych infekcji matczynych, częstszych w grupie otrzymującej placebo. Uwzględniono również w obu grupach czynniki ryzyka późnej sepsy, lecz nie stwierdzono znaczących różnic oprócz czasu leczenia cefalosporynami III i IV generacji, w przybliżeniu trzykrotnie dłuższym w grupie kontrolnej niż w grupie przyjmującej laktoferynę [20].

Nie podlegały kwalifikacji dzieci, u których występowały nieprawidłowości w funkcjonowaniu przewodu pokarmowego, uniemożliwiające doustne podawanie leku, a także dzieci urodzone z nieprawidłowościami mającymi duży wpływ na rozwój i wzrost (aberracje chromosomowe, anomalie rozwojowe mózgu, ciężkie wady wrodzone). Dyskwalifikujący był również dodatni wywiad rodzinny w kierunku

alergii na białka mleka krowiego oraz odległe od szpitala miejsce zamieszkania.

Ochoa i wsp. określili w swym badaniu wpływ LF na klinicznie zdefiniowaną późną sepsę (objawy wystąpiły po 72 godzinach życia noworodka) [20]. Przyjęto w badaniu trzy definicje sepsy: potwierdzoną dodatnim posiewem krwi lub dodatnim posiewem płynu mózgowo-rdzeniowego, prawdopodobną, określoną jako obecność objawów klinicznych oraz objawów infekcji (niestabilność temperatury, częstość akcji serca >2 SD powyżej normy dla wieku, częstość oddechów >60 oddechów/min, stękanie wydechowe lub desaturacje, letarg/zmianę stanu psychicznego, nietolerancja glukozy, określona jako stężenie glukozy w osoczu >10 mmol/l, nietolerancja pokarmu, ciśnienie krwi <2 SD normy dla wieku, powrót kapilarny >3 s, mleczany w osoczu >3 mmol/l) oraz co najmniej dwa nieprawidłowe wyniki badań laboratoryjnych: leukocytoza (WBC liczba $>34\ 000 \times 10^9/l$), leukopenia (liczba krwinek białych $<5000 \times 10^9/l$), niedojrzałe neutrofile $>10\%$, stosunek form pałeczkowatych do całkowitej liczby neutrofilów (I/T) $>0,2$, małopłytkowość $<100\ 000 \times 10^9/l$ i białko C-reaktywne (CRP) >10 mg/dL lub >2 SD powyżej normy dla wieku. Możliwa sepsa była stwierdzana na podstawie objawów klinicznych i objawów zakażenia oraz podwyższonego CRP z ujemnym posiewem krwi [20].

W trakcie badania wystąpiło ogółem 37 przypadków późnej sepsy, z nich 33 dotyczyły pierwszych epizodów, w tym osiem było potwierdzonych dodatnim posiewem krwi (24,2%), 14 prawdopodobnych (42,4%) i 11 możliwych (33,3%) [20]. Sześć z 33 posocznic wystąpiło przed rozpoczęciem interwencji. Odsetek przypadków sepsy u noworodków z masą ciała poniżej 1500 g wyniósł 28,8% (23/80), a w całej populacji badanej 17,4% (33/190). Posocznice rzadziej występowały w grupie przyjmującej LF niż w grupie kontrolnej. Łączna zachorowalność na sepsę w grupie otrzymującej LF wynosiła 12/95 (12,6%), natomiast 21/95 (22,1%) w grupie kontrolnej. U noworodków VLBW (<1500 g) odnotowano osiem przypadków późnych posocznic 8/40 (20,0%), w stosunku do 15/40 (37,5%) w grupie kontrolnej (o 46% mniej zachorowań). Ryzyko względne (RR) pomiędzy grupami wynosiło 0,57 (95% CI – przedział ufności: 0,30–1,09). Wartość RR skorygowana o masę urodzeniową wynosiła 0,57 (95% CI: 0,30–1,07), określono ją przy użyciu GLM (general linear model – ogólny model liniowy) [20].

Nie stwierdzono statystycznie istotnego wpływu laktoferyny na częstość pierwszego epizodu sepsy. Współczynnik ryzyka dla laktoferyny, po skorygowaniu o masę urodzeniową, wynosił 0,507, a granice ufności 95% mieściły się w zakresie od 0,249 do 1,034 ($p=0,062$) [20]. W grupie otrzymującej LF wystąpiły cztery epizody sepsy, potwierdzone dodatnimi posiewami krwi (*Serratia* sp., *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella* sp. i koagulazoujemny *Staphylococcus*), w grupie kontrolnej również stwierdzono cztery przypadki

sepsy (*Pseudomonas* sp., *Streptococcus* grupy B, *Enterococcus faecalis* i koagulazoujemny *Staphylococcus*). Wszystkie patogeny zostały wyizolowane z hodowli krwi, żaden z płynu mózgowo-rdzeniowego [20].

WNIOSKI

W randomizowanych badaniach klinicznych prospektywnych zarówno z talaktoferyną (Sherman), jak i laktoferyną bydlęcą (Manzoni, Ochoa), podawanymi doustnie, nie stwierdzono w porównaniu z placebo żadnych działań niepożądanych badanej substancji, a forma doustna była dobrze tolerowana; niemowlęta, które otrzymywały TLF, mniej były zagrożone infekcjami wtórnymi związanymi z pobytem na oddziale intensywnej terapii (RR 0,52 [95% CI: 0,26–0,99], $p < 0,045$) [18, 19, 20]. Nie odnotowano żadnego przypadku zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych w grupie otrzymującej LF [18, 19, 20]. Dwa noworodki leczone TLF rozwinęły NEC, ale przeżyły. Jedno dziecko otrzymujące placebo i żywione mlekiem modyfikowanym zmarło z powodu NEC [18]. W badaniu Shermana wykazano 14% infekcji u dzieci otrzymujących TLF wobec 36% u pacjentów, którym podano placebo [18]. Spadek ten jest porównywalny z wynikami uzyskanymi przez Manzonię w badaniu z laktoferyną bydlęcą. Jednak różnice pomiędzy grupą badaną a kontrolną nie są istotne statystycznie. Wydaje się, że LF może złagodzić przebieg NEC, ale w celu potwierdzenia tej obserwacji należy przeprowadzić badanie obejmujące liczniejszą grupę dzieci.

Badacze z Peru (Ochoa i wsp.) nie wykazali statystycznie istotnego wpływu LF na częstość pierwszych epizodów sepsy o późnym początku u niemowląt o masie urodzeniowej < 2500 g. Jednakże odnotowano znaczące zmniejszenie (o 46%) częstości przypadków późnej posocznicy w grupie noworodków VLBW [20]. Obliczone przedziały ufności (CI) dla względnego prawdopodobieństwa efektu stosowania laktoferyny sugerują, iż jej działanie zmniejszające ryzyko zachorowania na posocnicę może zostać potwierdzone na większej grupie pacjentów. Choć nie było to istotne statystycznie, wyniki badania, które przeprowadzili Ochoa i wsp., są porównywalne z wynikami uzyskanymi przez Manzonię i spójne z obserwacją zmniejszenia się liczby infekcji u wcześniaków w wyniku działania bydlęcej LF. We włoskich badaniach stwierdzono 66% zmniejszenie się częstości sepsy przy użyciu LF u niemowląt z VLBW (RR 0,34, 95% CI: 0,17–0,70).

PODSUMOWANIE

Laktoferyna jest złożoną cząsteczką, która występuje w wielu płynach biologicznych u zwierząt. Najwyższe

stężenia osiąga w mleku ssaków. Można ją ekstrahować z mleka krowiego, a także produkować metodą inżynierii genetycznej w postaci rekombinowanej ludzkiej laktoferyny. Ma wielokierunkowe działanie i jej znaczenie dla nowo narodzonego dziecka jest nie do przecenienia. Laktoferyna bydlęca jest najlepiej przebadana, a w przeprowadzonych badaniach wykazano bezpieczeństwo jej stosowania oraz potencjał terapeutyczny szczególnie istotny dla noworodków przedwcześnie urodzonych. Na podstawie doniesień piśmiennictwa światowego można wysunąć śmiały wniosek, iż laktoferyna może być skuteczna w profilaktyce i leczeniu poważnych chorób zagrażających życiu, m.in. późnej posocznicy u noworodków urodzonych przedwcześnie. Zastosowanie LF jako antybakteryjnego białka o szerokim spektrum działania jest innowacyjnym podejściem, które powinno zostać potwierdzone przez dalsze badania. Jeśli udowodnią one ochronną rolę LF, będą miały ogromny wpływ na opiekę medyczną nad noworodkami, zwłaszcza urodzonymi przedwcześnie, jako strategia zmniejszająca liczbę zakażeń oraz ograniczająca ich długoterminowe konsekwencje dla wzrostu i rozwoju dzieci.

Opublikowano już wyniki wielu badań klinicznych przeprowadzonych na świecie na temat stosowania laktoferyny w profilaktyce i leczeniu zakażeń u noworodków, ponadto w toku są dalsze prace [21]. Badania w większości dotyczyły noworodków urodzonych przedwcześnie, a podawano im głównie laktoferynę bydlęcą. Badacze stosowali różne schematy dawkowania laktoferyny: stała dawka to 100 mg/dobę [22], 200 mg/dobę [23], natomiast dawki na kg m.c. to 150 mg/kg co 12 godzin [18], 200 mg/kg/dobę [20], 300 mg/kg/dobę [24]. W badaniach były stosowane różne grupy kontrolne. Założone punkty końcowe to wpływ laktoferyny na wystąpienie sepsy z dodatnim posiewem krwi i podejrzenia posocznicy na podstawie objawów klinicznych. Brakuje obserwacji w zakresie następstw długoterminowego podawania laktoferyny.

Kierunki badań nad laktoferyną w neonatologii są następujące: jaki jest wpływ LF na śmiertelność noworodków i wystąpienie NEC; jaki jest wpływ LF na rozwój fizyczny i psychoruchowy dzieci; jak działa LF w populacji podwyższonego ryzyka; jaki jest wpływ LF na starsze niemowlęta.

KONFLIKT INTERESÓW: nie zgłoszono.

PIŚMIENNICTWO

1. Baker E, Baker M. Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:2531–2539 [doi: 10.1007/s00018-005-5368-9].
2. Borkowska A. Laktoferyna w kale jako wykładnik aktywności procesu zapalnego w nieswoistych zapaleniach jelit u dzieci. Praca na stopień doktora nauk medycznych. Akademia Medyczna w Gdańsku. Gdańsk, 2008.
3. Lauterbach R, Kamińska E, Michalski P i wsp. Laktoferyna, glikoproteina o dużym potencjale terapeutycznym. *Developmental Period Medicine* 2016;20(2):118–125.

4. Artym J. Rola laktoferyny w zakażeniach i zapaleniu. *Forum Zakażeń* 2013;4(6):329–345 [doi: 10.15374/fz2013043].
5. Artym J. Laktoferyna – strażnik procesów przyswajania żelaza. *Postępy Biol Komórki* 2015;42(2):283–308.
6. Czank C, Prime DK, Hartman B i wsp. Retention of the immunological proteins of pasteurized human milk in relations to pasteurizer design and practice. *Pediatr Res* 2009;66(4):374–379 [doi: 10.1203/PDR.0b013e3181b4554a].
7. Jenssen H, Hancock R. Antimicrobial properties of lactoferrin. *Science Direct. Biochimie* 2009;91(1):19–29 [doi: 10.1016/j.biochi.2008.05.015].
8. Embleton ND, Berrington J, McGuire W, Stewart Ch i wsp. Lactoferrin: antimicrobial activity and therapeutic potential. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* 2013;18(3):143–149 [doi: 10.1016/j.siny.2013.02.001].
9. Artym J, Zimecki M. Laktoferyna w profilaktyce i leczeniu zakażeń. *Zakażenia XXI wieku* 2018;1(1):27–34 [doi: 10.31350/zakazenia/2018/1/Z2018008].
10. Ordaz-Pichardio C i wsp. Lactoferrin: A protein of the innate immune system capable of killing parasitic protozoa. *Nova Science Publishers Inc.; Hauppauge, NY, USA, 2013*, pp. 177–213.
11. Goldstein B, Giroir B, Randolph A. International pediatric sepsis consensus conference: Definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatr Crit Care Med* 2005;6(1):2–8 [doi: 10.1097/01.PCC.0000149131.72248.E6].
12. Sherman MP, Benett SH, Hwang FF i wsp. Neonatal small bowel epithelia: enhancing anti-bacterial defense with lactoferrin and *Lactobacillus* GG. *Biomaterials* 2004;17(3):285–289 [doi: 10.1023/B:BIOM.0000027706.51112.62].
13. Sherman MP. Lactoferrin and necrotizing enterocolitis. *Clinics in Perinatology* 2013;40(1):79–91 [doi: 10.1016/j.clp.2012.12.006].
14. Appel MJ, Van Veen HA, Vietsch H i wsp. Sub-chronic (13-week) oral toxicity study in rats with recombinant human lactoferrin produced in the milk of transgenic cows. *Food Chem Toxicol* 2006;44(7):964–973 [doi: 10.1016/j.fct.2005.11.012].
15. Lynn E, Ronaldo B, Freda F i wsp. Lactoferrin protect neonatal rats from gut-related systemic infection. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281:G1140–G1150.
16. Papoff P, Ceccarelli G, d’Ettore G i wsp. Gut microbial translocation in critically ill children and effects of supplementation with pre- and probiotics. *International Journal of Microbiology* 2012;2012:151393 [doi: 10.1155/2012/151393].
17. Groer MW, Luciano AA, Dishaw LJ, Ashmeade TL i wsp. Development of the preterm infant gut microbiome: a research priority. *Microbiome* 2014;2:38 [doi: 10.1186/2049-2618-2-38].
18. Sherman M, Adamkin P, Niklas V i wsp. Randomized controlled trial of talactoferrin oral solution in preterm infants. *The Journal of Pediatrics* 2016;175:68–73 [doi: 10.1016/j.jpeds.2016.04.084].
19. Manzoni P, Stol I, Messner H i wsp. Bovine lactoferrin prevents invasive fungal infections in very low birth weight infants: a randomized controlled trial. *Pediatrics* 2012;129(1):116–123 [doi: 10.1542/peds.2011-0279].
20. Ochoa T, Zegarra J, Cam L i wsp. Randomized controlled trial of lactoferrin for prevention of sepsis in Peruvian neonates less than 2500 g. *Pediatr Infect Dis J* 2015;34(6):571–576 [doi: 10.1097/INF.0000000000000593].
<https://clinicaltrials.gov/>
21. <https://clinicaltrials.gov/>
22. Randomized controlled pilot trial of lactoferrin for prevention in infections in very preterm newborns IS; RCTN66482337 [doi: 10.1186/ISRCTN66482337].
23. Akin IM, Atasay B, Dogu F i wsp. Oral lactoferrin to prevent nosocomial sepsis and necrotizing enterocolitis of premature neonates and effect on T-regulatory cells. *Amer J Perinatol* 2014;31(12):1111–1120 [doi: 10.1055/s-0034-1371704].
24. Enteral lactoferrin in neonates ELFIN; RCTN88261002 [doi: 10.1186/ISRCTN88261002].