

Wpływ bydlęcej laktoferyny na aktywność leukocytów krwi obwodowej kurcząt – badania *in vitro*

JOANNA MAŁACZEWSKA, ROMAN WÓJCIK, ANDRZEJ KRZYSZTOF SIWICKI

Zespół Mikrobiologii i Immunologii Klinicznej Katedry Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM, ul. Oczapowskiego 13, 10-719 Olsztyn

Małaczewska J., Wójcik R., Siwicki A. K.

In vitro effect of bovine lactoferrin on the activity of chicken blood leukocytes

Summary

Lactoferrin (LF) is an iron-binding protein from the transferrin family, present in mucosal secretions, granules of neutrophils and the serum of mammals. Many biological functions have been attributed to lactoferrin, including immunomodulatory and anti-inflammatory properties. Its presence has not been detected in poultry and its influence on their mechanisms of resistance has not been investigated.

The aim of present *in vitro* study was to investigate the influence of bovine lactoferrin on the activity of chicken blood leukocytes. After isolation cells were cultured in complete RPMI – 1640 medium containing 0 (control), 2, 1, 0.5, 0.25 and 0.1 mg/ml of bovine LF, lymphocytes for 48 h and granulocytes for 18 h, respectively. Then the effect of LF on the activity of phagocytes (RBA and PKA tests) and lymphocytes (MTT test) was evaluated. The obtained results suggest that bovine lactoferrin has significant influence on the activity of chicken leukocytes *in vitro*. The use of LF increased the ability of chicken granulocytes for respiratory burst, however no stimulation of the killing activity was observed. Bovine lactoferrin also increased the proliferative response of lymphocytes T stimulated by ConA, whereas a similar effect on lymphocytes B stimulated by LPS was not noticed. The observed stimulation of the investigated parameters is encouraging for further research concerning the possibility of the use of LF as immunostimulant in poultry husbandry.

Keywords: lactoferrin, leukocytes activity, chicken, *in vitro*

W wielkotowarowym chowie zwierząt gospodarskich od lat stosowane są immunostymulatory, pozwalające na zwiększenie odporności zwierząt na schorzenia zakaźne, jak również niwelujące immunosupresyjny wpływ stresu związanego z intensywną hodowlą. Na szczególną uwagę zasługują substancje pochodzenia naturalnego, ze względu na swą niską toksyczność oraz wysoki stopień zgodności biologicznej i biodegradowalności, co czyni je bezpiecznymi zarówno dla środowiska, jak i zdrowia ludzi i zwierząt, przy czym najchętniej sięga się po te preparaty, które można podać w najmniej inwazyjny sposób, czyli w paszy. Jedną z takich substancji jest laktoferyna.

Laktoferyna (LF), glikoproteina z rodziny transferyn, obecna jest w mleku, narządach, błonach surowiczych i ich wydzielinach, a także w drugorzędowych ziarnistościach granulocytów obojętnochłonnych ssaków (1). Oprócz najwcześniej poznanej funkcji LF, polegającej na udziale w transporcie żelaza, białku temu przypisuje się również działanie immunomodulujące, przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze, antywirusowe, antynowotworowe i wiele innych (2, 8). W ostatnich latach szczególne zainteresowanie budzą

silne właściwości immunotropowe LF. Wpływa ona zarówno na dojrzewanie komórek układu immunologicznego, jak i reguluje humoralną i komórkową odpowiedź immunologiczną organizmu w procesach zapalnych i infekcjach (1). Badania przeprowadzone z użyciem LF na modelowych gatunkach zwierząt laboratoryjnych, jak myszy, szczury i świnki morskie, dowodzą skuteczności tego białka we wzmacnianiu odporności organizmu na powszechnie występujące czynniki zakaźne (16, 17). W praktyce hodowlanej zaś, paszową LF stosowano do tej pory z największym powodzeniem w hodowli ryb. Mimo że białko to nie występuje w naturalny sposób w organizmach zwierząt zmiennocieplnych, uzyskano obiecujące wyniki badań jej wpływu na układ immunologiczny ryb. Mimo nieobecności tego białka i prawdopodobnie receptorów laktoferynowych na powierzchni ptasich komórek, można domniemywać, że podobnie, jak w przypadku ryb, będzie ono oddziaływało korzystnie na układ immunologiczny ptaków.

Celem niniejszej pracy była ocena wpływu bydlęcej laktoferyny, zastosowanej *in vitro* na aktywność leukocytów wyizolowanych z krwi obwodowej kur-

czą. Wykazanie pozytywnego wpływu LF na aktywność leukocytów kurcząt mogłoby stanowić uzasadnienie podjęcia kolejnych badań *in vivo*, a w dalszej perspektywie wprowadzenia nowego immunostymulatora paszowego w hodowli drobiu.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiła krew pobrana od dziecięciu klinicznie zdrowych, czterotygodniowych kogutów brojlerów Ross-308. Krew otrzymano z Laboratorium Doświadczalnego Katedry Drobiarstwa w Bałdach, należącego do Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie.

Z badanej krwi izolowano limfocyty przez wirowanie w gradiencie z użyciem preparatu Gradisol L (Aqua-Medica), zaś granulocyty z użyciem preparatu Gradisol G (Aqua-Medica). Wyizolowane komórki hodowano w podłożu RPMI-1640 (Sigma) z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydlęcej (Sigma) i 1% antybiotyku (Antibiotic Antimycotic Solution, Sigma), w temperaturze 40°C. Podłoże do hodowli komórek zawierało, odpowiednio: 0 (kontrola), 0,1, 0,25, 0,5, 1,0 i 2,0 mg ml⁻¹ bydlęcej laktoferyny 90% (Sigma). Granulocyty hodowano w podłożu z dodatkiem preparatu przez 18 godzin, zaś limfocyty przez 48 godzin.

W celu oceny aktywności leukocytów stymulowanych LF przeprowadzono badanie aktywności metabolicznej fagocytów – Respiratory Burst Activity (RBA) na podstawie wewnątrzkomórkowego wybuchu tlenowego po stymulacji PMA (Phorbol Myristate Acetate) metodą spektrofotometryczną (OD 620 nm) wg Chung i Secombes (4), badanie zdolności do wewnątrzkomórkowego zabijania bakterii przez komórki żerne – Potential Killing Activity (PKA) metodą spektrofotometryczną (OD 620 nm) wg Rook i wsp. (14) oraz badanie odpowiedzi proliferacyjnej limfocytów stymulowanych mitogenami – ConA (konkanawalina A) i LPS (lipopolisacharyd) (Sigma) przy pomocy metody MTT (3-[4,5-dimethylthiazoly-2yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; 3-[4,5-dimetylo-2tiazolilo]-2,5-difenylo-2H-tetrazolinowy bromek), opisaną pierwotnie przez Mossmana (13). Wyniki testów RBA i PKA przedstawiono w postaci średniej gęstości optycznej (OD), zaś testu MTT w postaci indeksu stymulacji limfocytów (SI), wg wzoru:

$$SI = \frac{\text{średnia OD komórek stymulowanych mitogenem}}{\text{średnia OD komórek niestymulowanych (kontrolnych)}}$$

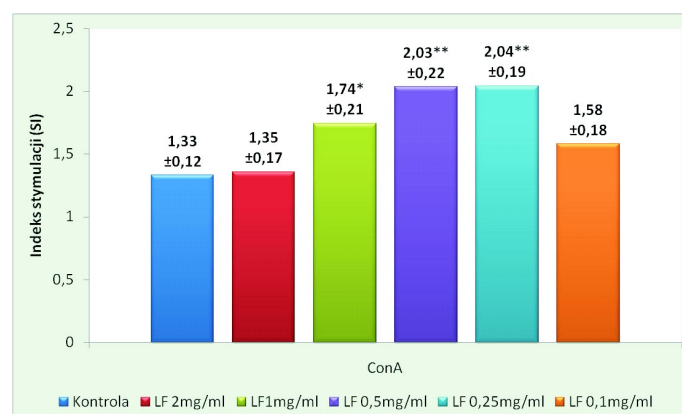
Dane analizowano statystycznie przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). Istotność różnic między grupami weryfikowano przy pomocy testu Bonferroni przy $p < 0,05$ i $p < 0,01$.

Wyniki i omówienie

Białka z rodziny transferyn, takie jak: transferyna, owotransferyna, laktoferyna, melanotransferyna czy wreszcie grupa białek podobnych do transferyny, określanych mianem „transferrin-like”, stanowią niezwykle istotny komponent odporności nieswoistej zwierząt, tak kręgowców, jak bezkręgowców. Większość tych białek wykazuje dość wysoki stopień homologii budowy, a trzech główni przedstawiciele: transferyna,

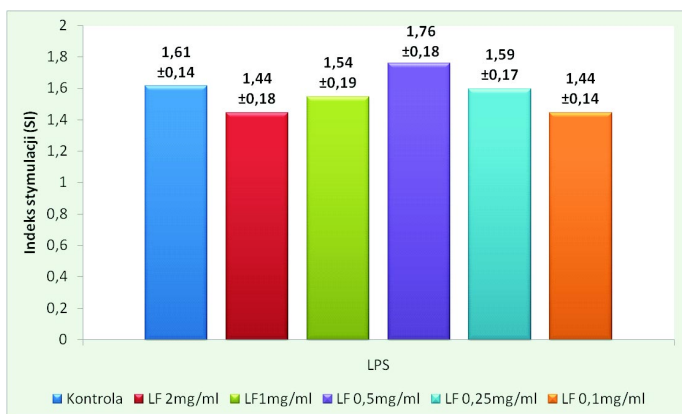
owotransferyna i laktoferyna – zdolność wiązania jonów żelaza. Podobne są również mechanizmy ich wielokierunkowego oddziaływania na organizm. W organizmie ptaków obecne są dwa białka z tej rodziny – surowicza transferyna i owotransferyna, laktoferyna natomiast nie występuje (11). W dostępnym piśmiennictwie brak doniesień o wpływie LF na aktywność komórek immunokompetentnych czy funkcjonowanie układu immunologicznego ptaków. W niniejszym opracowaniu podjęto zatem pierwszą próbę określenia wpływu tego białka na aktywność leukocytów krwi obwodowej kurcząt brojlerów.

Użyta w doświadczeniu bydlęca laktoferyna stymulowała proliferację limfocytów T pod wpływem konkanawaliny A, przy czym skuteczne okazały się trzy pośrednie zastosowane stężenia białka: 1, 0,5 i 0,25 mg/ml. Przy dawkach 0,5 i 0,25 mg/ml uzyskano wysoki, 50% wzrost indeksu stymulacji limfocytów T (ryc. 1). Wyniki te częściowo korespondują z wynikami wcześniejszych badań przeprowadzonych z użyciem limfocytów ssaczych i rybich. Wakabayashi i wsp. (18) uzyskali pod wpływem LF stymulację odpowiedzi proliferacyjnej splenocytów świnek morskich stymulowanych ConA, zaś Mazurier i wsp. (12) – ludzkich limfocytów T, po zastosowaniu fitohemaglutyniny jako mitogenu. Uzyskany efekt autorzy tłumaczyli interakcją LF z receptorami dla tego białka na powierzchni limfocytów. Jednak podobne wyniki badań *in vitro*, przeprowadzonych przez Kamilya i wsp. (10) na limfocytach ryb z gatunku *Catla catla*, stymulowanych ConA, pozwalają domniemywać o istnieniu odmiennego mechanizmu oddziaływania LF, niezwiązanego z obecnością receptorów laktoferynowych na powierzchni stymulowanych komórek. W podobny sposób LF może oddziaływać na ptasie limfocyty. Niebagatelne znaczenie mają z pewnością także wielkości użytych dawek białka. W przypadku ludzkich limfocytów stymulację obserwowano już po zastosowaniu bardzo niskiego stężenia laktoferyny – 0,014 mg/ml, natomiast u ryb korzystne działanie LF obser-



Ryc. 1. Wpływ laktoferyny na aktywność proliferacyjną limfocytów kurcząt stymulowanych ConA

Objaśnienia: * – różnica statystycznie istotna przy $p < 0,05$ w stosunku do kontroli; ** – różnica statystycznie istotna przy $p < 0,01$ w stosunku do kontroli



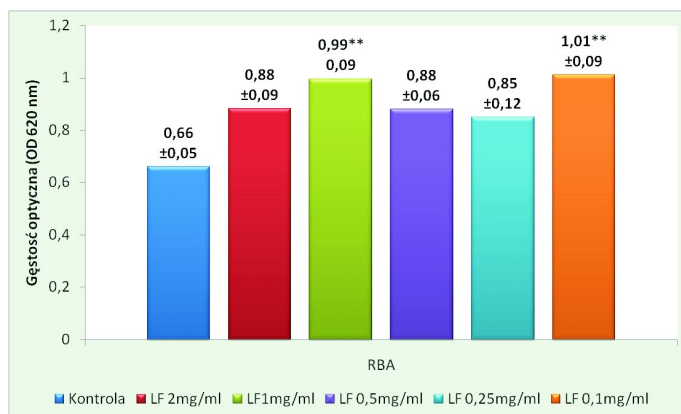
Ryc. 2. Wpływ laktoferyny na aktywność proliferacyjną limfocytów kurcząt stymulowanych LPS

wowano tylko przy najwyższym zastosowanym stężeniu – 0,1 mg/ml. W prezentowanych badaniach własnych skuteczne okazały się dawki jeszcze wyższe. Przy stężeniu 0,1 mg/ml obserwowano wprawdzie wzrost indeksu stymulacji, jednak nie był on statystycznie istotny.

Laktoferyna użyta w badaniach własnych nie stymulowała natomiast aktywności proliferacyjnej limfocytów B poddanych działaniu lipopolisacharydu (ryc. 2). Uzyskany wynik w pewnym stopniu koresponduje z wynikami badań przeprowadzonych przez Dawes i wsp. (5), którzy wykazali wręcz hamujący wpływ LF na proliferację limfocytów bydła stymulowanych LPS *in vitro*. Zdaniem autorów, uzyskany efekt był skutkiem łączenia się LF z LPS. Laktoferyna wykazuje wysokie powinowactwo do lipidu A, będącego częścią składową bakteryjnego LPS (3). Wiążąc się z nim chroni organizm przed zbytnią aktywacją układu immunologicznego, a co za tym idzie – rozwojem wstrząsu septycznego. Zatem LF zastosowana *in vitro*, wiążąc się z LPS, skutecznie obniża jego mitogenne działanie. Hipoteza ta nie znalazła jednak pełnego potwierdzenia w badaniach własnych. Przy żadnej z zastosowanych dawek LF nie zanotowano istotnego spadku proliferacji limfocytów w stosunku do komórek kontrolnych.

W przeprowadzonych badaniach własnych określono również wpływ LF na aktywność heterofili krwi obwodowej kurcząt. Uzyskane wyniki wykazały stymulujący wpływ tego białka na aktywność metaboliczną fagocytów. Nasilenie wewnątrzkomórkowego wybuchu tlenowego po stymulacji PMA wzrastało przy wszystkich zastosowanych stężeniach LF, choć statystycznie istotny wzrost badanego parametru miał miejsce tylko przy dawkach 1 i 0,1 mg/ml (ryc. 3).

Badania przeprowadzone przez Gahr i wsp. (9) potwierdzają korzystny wpływ LF na zdolność ludzkich granulocytów do wybuchu tlenowego. LF powodowała zwiększenie produkcji rodników tlenowych, a nasilenie wybuchu tlenowego było wprost proporcjonalne do użytej koncentracji białka i prawdopodobnie wynikało z interakcji LF z receptorami na powierzchni gra-

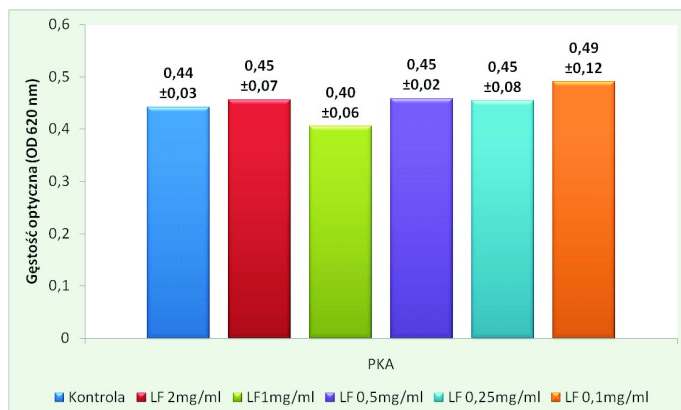


Ryc. 3. Aktywność metaboliczna fagocytów krwi kurcząt (RBA) pod wpływem laktoferyny

Objaśnienia: ** – różnica statystycznie istotna przy $p < 0,01$ w stosunku do kontroli

nulocytów. Najsilniejszą stymulację badanego parametru autorzy uzyskali przy dawce LF 0,5 mg/ml. Podobne wyniki badań uzyskano także u takich gatunków ryb, jak pstrąg tęczowy, *Catla catla* czy dorada (7, 10, 15), przy czym wysokość skutecznej dawki LF zależała od badanego gatunku i wahała się od 10 $\mu\text{g/ml}$ do 1 mg/ml. Analogicznie, jak w przypadku limfocytów, efektu działania LF w tym przypadku nie da się wyjaśnić oddziaływaniem białka na jego receptor komórkowy.

Nie uzyskano natomiast w badaniach własnych stymulacji fagocytów w zakresie ich zdolności do wewnątrzkomórkowego zabijania bakterii (ryc. 4), choć wyniki badań innych autorów wskazują, że LF wywiera pozytywny wpływ na ten parametr odporności. Zastosowanie LF powodowało zwykle znaczący wzrost zdolności do zabijania drobnoustroju przez komórki fagocytujące *in vitro* i szybkie usuwanie patogenu z zakażonego eksperymentalnie organizmu, *in vivo* (18-21). Z drugiej strony, pojawiają się jednak również doniesienia o braku wpływu LF na zdolności fagocytarne komórek. Gahr i wsp. (9) wykazali np., że inkubacja z LF w dawkach 0,05-0,7 mg/ml, nie wpływa na zabijanie *Staphylococcus aureus* przez ludzkie neutrofile i monocyty. Również w badaniach przeprowadzonych przez Diarra i wsp. (6) u bydła LF nie wpły-



Ryc. 4. Wewnątrzkomórkowa aktywność bójcza fagocytów krwi kurcząt (PKA) pod wpływem laktoferyny

wała na fagocytozę i zdolność zabijania bakterii przez neutrofile. Niezgodności te wynikać mogą z zastosowania różnych dawek LF, jak również różnic gatunkowych między badanymi zwierzętami.

Reasumując, uzyskane wyniki badań wskazują na zdolność bydłęcej laktoferyny do stymulowania aktywności limfocytów i granulocytów kurcząt *in vitro*, choć dla potwierdzenia skuteczności działania LF na komórki immunokompetentne ptaków konieczne byłoby przeprowadzenie doświadczeń zakrojonych na szerszą skalę. Biorąc jednak pod uwagę fakt pozytywnych skutków stosowania LF jako immunostymulatora w hodowli ryb, u których to białko również nie występuje w warunkach fizjologicznych, z dużą ostrożnością przedstawione wyniki badań można uznać za zachętę do przeprowadzenia kontrolowanych badań klinicznych nad zastosowaniem tego białka jako dodatku paszowego w hodowli kurcząt, zwłaszcza narażonych na wieloczynnikowy stres hodowlany.

Piśmiennictwo

1. Brock J.: Lactoferrin: a multifunctional immunoregulatory protein? Immunology Today 1995, 16, 417-419.
2. Brock J. H.: The physiology of lactoferrin. Biochem. Cell. Biol. 2002, 80, 1-6.
3. Caccavo O., Afeltra A., Pece S., Giuliani G., Freudenberg M., Galanos C., Jirillo E.: Lactoferrin-Lipid A-Lipopolysaccharide Interaction: Inhibition by Anti-Human Lactoferrin Monoclonal Antibody AGM 10.14. Inf. Immun. 1999, 67, 4668-4672.
4. Chung S., Secombes S. J.: Analysis of events occurring within teleost macrophages during the respiratory burst. Comp. Biochem. Physiol. 1988, 89 B, 539-544.
5. Dawes M. E., Lakritz J., Tyler J. W., Cockrell M., Marsh A. E. D., Estes M., Larson R. L., Steevens B.: Effects of Supplemental Lactoferrin on Serum Lactoferrin and IgG Concentrations and Neutrophil Oxidative Metabolism in Holstein Calves. J. Vet. Int. Med. 2004, 18, 104-108.
6. Diarra M. S., Petitclerc D., Deschenes E., Lessard N., Grondin G., Talbot B. G.: Lactoferrin alone or in combination with penicillin G on bovine polymorphonuclear function and mammary epithelial cells colonisation by Staphylococcus aureus. Vet. Immunol. Immunopathol. 2003, 95, 33-42.
7. Esteban M. A., Rodriguez A., Cuesta A., Meseguer J.: Effects of lactoferrin on non-specific immune responses of gilthead seabream (*Sparus auratus* L.). Fish Shellfish Immunol. 2005, 18, 109-124.
8. Farnaud S., Evans R. W.: Lactoferrin – a multifunctional protein with antimicrobial properties. Mol. Immunol. 2003, 40, 395-405.
9. Gahr M., Speer C. P., Damerau B., Sawatzki G.: Influence of Lactoferrin on the Function of Human Polymorphonuclear Leukocytes and Monocytes. J. Leuk. Biol. 1991, 49, 427-433.
10. Kamilya D., Ghosh D., Bandyopadhyay S., Mal B. C., Maiti T. K.: In vitro effects of bovine lactoferrin, mushroom glucan and Abrus agglutinin on Indian major carp, catla (*Catla catla*) head kidney leucocytes. Aquaculture 2006, 253, 130-139.
11. Lambert L. A., Perri H., Halbrooks P. J., Mason A. B.: Evolution of the transferrin family: Conservation of residues associated with iron and anion binding. Comp. Biochem. Physiol. 2005, 142 B, 129-141.
12. Mazurier J., Legrand D., Hu W. L., Montreuil J., Spik G.: Expression of human lactotransferrin receptors in phytohemagglutinin-stimulated human peripheral blood lymphocytes. Isolation of the receptors by antigand – affinity chromatography. Eur. J. Biochem. 1989, 179, 481-487.
13. Mossman T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods 1983, 65, 55-63.
14. Rook G. A., Steele W., Umar J., Dockrell H. M.: A simple method for the solubilization of reduced NBT and its use as a colorimetric assay for activation of human macrophages by gamma interferon. J. Immunol. Meth. 1985, 82, 161-167.
15. Sakai M., Kobayashi M., Yoshida T.: Activation of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, phagocytic cells by administration of bovine lactoferrin. Comp. Biochem. Physiol. 1995, 110 B, 755-759.
16. Sfeir R. M., Dubarry M., Boyaka P. N., Rautureau M., Tome D.: The Mode of Oral Bovine Lactoferrin Administration Influences Mucosal and Systemic Immune Responses in Mice. J. Nutr. 2004, 134, 403-409.
17. Teraguchi S., Wakabayashi H., Kuwata H., Yamauchi K., Tamura Y.: Protection against infections by oral lactoferrin: Evaluation in animal models. BioMetals 2004, 17, 231-234.
18. Wakabayashi H., Takakura N., Yamauchi K., Teraguchi S., Uchida K., Yamauchi H., Tamura Y.: Effect of lactoferrin feeding on the host anti-fungal response in guinea-pigs infected or immunised with *Trichophyton mentagrophytes*. J. Med. Microbiol. 2002, 51, 844-850.
19. Wilk K. M., Hwang S., Actor J. K.: Lactoferrin modulation of antigen-presenting-cell response to BCG infection. Post. Hig. Med. Dosw. 2007, 61, 277-282.
20. Zagulski T., Lipiński P., Zagulska A., Jarzabek Z.: Antibacterial system generated by lactoferrin in mice *in vivo* is primarily a killing system. Int. J. Exp. Pathol. 1998, 79, 117-123.
21. Zimecki M., Artym J., Chodaczek G., Kocięba M., Kruzel M. L.: Protective effects of lactoferrin in *Escherichia coli*-induced bacteremia in mice: Relationship to reduced serum TNF alpha level and increased turnover of neutrophils. Inflamm. Res. 2003, 53, 292-296.

Adres autora: dr Joanna Małaczewska, ul. Oczapowskiego 13, 10-957 Olsztyn; e-mail: stenia@uwm.edu.pl