

Możliwości zastosowania laktoferyny jako immunostymulatora w hodowli ryb i skorupiaków

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.

Possibilities of applying lactoferrin as an immunostimulant in fish and crustacean farming

Summary

Lactoferrin (LF) is an iron-binding protein from the transferrin family present in mucosal secretions, several organs, secondary granules of neutrophils and the serum of mammals. Many biological functions have been attributed to lactoferrin, including immunomodulatory and anti-inflammatory properties. Although the presence of LF in fish is unknown, it has similar effects in fish as in mammals. In the majority of the investigated fish species LF promoted proliferative response of lymphocytes, modulated macrophage functions or increased phagocytosis and respiratory burst of fish leukocytes *in vitro*. Administration of LF reduced the mortality of fish challenged with pathogenic bacteria and viruses, and enhanced the resistance of fish to parasitic infections. Moreover LF treatment reduced the stress response of aquatic organisms cultured under deteriorating conditions. As a natural protein LF shows very low toxicity, high biocompatibility and biodegradability, and is considered safe for the environment and consumer health as well. Although LF had no effect on the immune system of several fish species, its use as an immunostimulant in aquaculture is still a promising area.

Keywords: lactoferrin, immunostimulant, fish, crustaceans

Akwakultura jest ważną gałęzią przemysłu, a światowa produkcja ryb morskich i słodkowodnych oraz skorupiaków wzrasta z roku na rok. Wiąże się to ze zwiększaniem produktywności gospodarstw hodowlanych w przeliczeniu na jednostkę wykorzystywanej powierzchni, co z kolei staje się przyczyną stresu związanego z przegęszczeniem, pogorszenia warunków środowiskowych, a w efekcie supresji układu immunologicznego zwierząt, objawiającej się ich zwiększoną podatnością na choroby zakaźne. Sukces w hodowli wynika z utrzymania równowagi pomiędzy czynnikami środowiskowymi, działaniami prewencyjnymi i statusem zdrowotnym hodowanych zwierząt. Ten ostatni warunkowany jest sprawnie funkcjonującym systemem odpornościowym. Podstawę mechanizmów obronnych u ryb stanowi odporność nieswoista. Większa aktywność, jak również większa różnorodność komponentów odporności nieswoistej u ryb, w porównaniu do analogicznych parametrów u ssaków, wynika z ich statusu ewolucyjnego i faktu zmiennocieplności. Czynniki te warunkują ograniczony repertuar przeciwciał i ich słabe powinowactwo do antygeny, ograniczoną pamięć immunologiczną i powolną proliferację limfocytów. Odporność swoista w odpowiedzi na antygen rozwija się u ryb bardzo wolno, w porównaniu z natychmiastową i relatywnie niezależną od tempe-

ratury odpowiedzią nieswoistą (13). Na parametry odporności nieswoistej, prócz uwarunkowań genetycznych, wpływ mają czynniki zewnętrzne, takie jak: temperatura środowiska, jego zanieczyszczenie, stres, stosowana dieta i dodatki paszowe, a także szczepienia. Immunosupresyjny wpływ wieloczynnikowego stresu hodowlanego próbuje się od lat równoważyć, stosując różnorodne immunostymulatory, które wzmagają głównie odporność nieswoistą zwierząt. Ten sposób suplementacji okazuje się szczególnie dobroczynny w hodowli narybku, gdzie masowe straty związane są z długim okresem hodowli, niezbędnym do rozwinięcia pełnej immunokompetencji młodego organizmu (13, 15). W ostatnich latach szczególnym zainteresowaniem w akwakulturze cieszą się immunostymulatory naturalnego pochodzenia, z powodu ich zgodności biologicznej, biodegradowalności i bezpieczeństwa stosowania, zarówno dla środowiska naturalnego, jak i zdrowia człowieka. Jednym z takich preparatów jest laktoferyna.

Laktoferyna (LF) jest glikoproteiną z rodziny transferyn, wytwarzaną przez ssące komórki epitelialne, obecną w większości wydzielin organizmu, licznych narządach, a także w drugorzędowych ziarnistościach granulocytów obojętnochłonnych ssaków. Białku temu, prócz roli w metabolizmie żelaza, przypisuje się tak

różne funkcje, jak działanie: przeciwzapalne, przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze, przeciwwirusowe, przeciw pasożytnicze czy antynowotworowe, przy czym najszerszej zbadano do tej pory jego działanie immunotropowe. Wielokierunkowe oddziaływanie LF na układ immunologiczny ssaków możliwe jest dzięki obecności receptorów dla LF na wielu typach ssaczych komórek. Mimo że do tej pory nie wykazano ani obecności LF, ani też receptorów dla tego białka w organizmie ryb, korzystny wpływ LF dodawanej do paszy na aktywność układu immunologicznego różnych gatunków ryb zdaje się potwierdzać podobny mechanizm jej oddziaływania na ich organizm, jak u ssaków (2, 6, 8).

Wpływ laktoferyny na rybie leukocyty *in vitro*

Stosunkowo nieliczne badania dotyczą wpływu LF *in vitro* na parametry odporności u ryb. Pozytywny i wielokierunkowy wpływ tego białka zanotowano u ryb z rodziny karpowatych (*Catla catla*). LF wzmacniała odpowiedź proliferacyjną limfocytów nerki główkowej tego gatunku, stymulowanych Con A, produkcję anionów nadtlenkowych (RBA) i nadtlenu wodoru oraz aktywność bakteriofagocytarną komórek żernych (8). U pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*) komórki nerki główkowej stymulowane LF wykazywały zwiększoną aktywność fagocytozy i pinocytozy, choć jednocześnie LF nie wpływała na zdolność limfocytów do produkcji przeciwciał w warunkach *in vitro* (3, 16), zaś u dorady (*Sparus auratus*) LF wzmacniała jedynie nasilenie wybuchu tlenowego (RBA), nie wpływając na poziom peroksydazy, zdolności fagocytarne czy aktywność cytotoksyczną komórek (5). W badaniach własnych wykazano wzmożoną proliferację limfocytów stymulowanych ConA u pstrąga tęczowego i węgorza europejskiego (*Anguilla anguilla*) i stymulowanych LPS u pstrąga tęczowego w obecności bydłcej LF, a także większe nasilenie wybuchu tlenowego u pstrąga i suma pospolitego (*Silurus glanis*) po stymulacji komórek fagocytydujących tym białkiem (dane niepublikowane).

Laktoferyna jako dodatek paszowy w hodowli ryb

Znacząca ilość badań przeprowadzonych na rybach z zastosowaniem laktoferyny dotyczy przydatności tego białka jako dodatku paszowego, przy czym badaczy interesowały głównie takie oddziaływania LF, jak: wpływ na wykorzystanie paszy i przyrosty, przebieg reakcji stresowej organizmu, wrażliwość na czynniki zakaźne czy wreszcie parametry odporności nieswoistej. W większości przeprowadzonych doświadczeń dodatek LF do paszy nie wpływał na takie parametry, jak jej pobieranie i wykorzystanie, przyrosty czy wreszcie naturalne straty w hodowli. Obserwacje te dotyczą takich gatunków ryb, jak: *Epinephelus coioides*, tilapia nilowa (*Oreochromis niloticus*), dorada (*Sparus auratus*) i łosoś atlantycki (*Salmo salar*) (5, 12, 22, 23). Nie zaobserwowano również wpływu LF na

wskaźniki hematologiczne u tilapii nilowej, poziom witaminy C w wątrobie, poziom białka całkowitego, całkowitej bilirubiny, LDH i GOT w surowicy węgorza japońskiego (*Anguilla japonica*) czy poziom żelaza w wątrobie i białka całkowitego w surowicy łososa atlantyckiego. Natomiast wysokie dawki LF w paszy powodowały obniżenie poziomu żelaza w plazmie i wzrost całkowitej zdolności wiązania żelaza u tilapii nilowej (12, 14, 22).

Wpływ LF na tolerancję stresu środowiskowego

Niewątpliwie pozytywne skutki stosowania LF jako dodatku paszowego związane są z jej wpływem na tolerancję stresu przez organizm. Efekt taki zaobserwowano u różnych gatunków ryb, zarówno morskich, jak i słodkowodnych. U *Epinephelus coioides* LF podawana w paszy zwiększała tolerancję na stres związany z niskim zasoleniem i ekspozycją na powietrze, co objawiało się obniżeniem śmiertelności i zwiększonym poziomem białka szoku termicznego (HSP70s) u badanych ryb (23). U *Plecoglossus altivelis* (ayu, azjatycka ryba słodkowodna, spokrewniona ze śledziem) LF zwiększała odporność na stres spowodowany niedotlenieniem i czynnikami chemicznymi, takimi jak siarczan miedzi i roztwór formaliny (24). U karpia (*Cyprinus carpio*) obniżała odpowiedź na stres spowodowany przegęszczeniem bądź niedotlenieniem, co manifestowało się obniżeniem poziomu kortyzolu, adrenaliny i noradrenaliny w plazmie (7). Podobny był wpływ tego białka na stres związany z przegęszczeniem u pstrąga tęczowego. U japońskiej flądry (*Paralichthys olivaceus*) LF znacząco wydłużała czas przeżycia ryb poddanych letalnemu stresowi termicznemu, zaś ryby poddane subletalnemu stresowi termicznemu wykazywały podwyższony poziom białka szoku termicznego (HSP70s) w skórze (24). Żadnego wpływu LF na odpowiedź stresową organizmu, mierzoną poziomem glukozy, mleczanów i kortyzolu nie zanotowano natomiast u tilapii nilowej (22).

Przypuszcza się, że zwiększenie odporności ryb na stres środowiskowy po podaniu LF wynika z jednoczesnego poprawienia kondycji zwierząt, obniżenia odpowiedzi stresowej organizmu i wreszcie stymulacji układu odpornościowego, choć oczywiście zawsze można spodziewać się odmiennej reakcji, co wynika z różnic gatunkowych, typu działającego stresora, długości czasu podawania LF lub interakcji między powyższymi czynnikami.

Wpływ LF podawanej w paszy na odporność nieswoistą i wrażliwość organizmu na zakażenia

W przypadku licznych gatunków ryb otrzymujących LF w paszy zaobserwowano korzystny wpływ tego białka na badane parametry odporności nieswoistej. Niezależnie od zastosowanej dawki LF u *Epinephelus coioides* obserwowano wzmożoną produkcję śluzu, który stanowi naturalną barierę organizmu, chroniącą

ryby przed infekcjami bakteryjnymi, inwazją pasożytów i bezpośrednią ekspozycją na stresory środowiskowe (23). Zwiększoną sekrecję śluzu pod wpływem LF obserwowano także u pagrusa czerwonego (*Pagrus major*) i karasia złocistego (*Carassius auratus*), u gatunku *Plecoglossus altivelis* zanotowano wzrost liczby komórek wytwarzających śluz, zaś u japońskiego węgorza LF w połączeniu z witaminą C stymulowała bójczą aktywność śluzu w stosunku do *E. coli* (14, 23). LF podnosiła również aktywność komórek fagocytujących, zarówno w zakresie pochłaniania i zabijania drobnoustrojów, jak i zdolności do wybuchu tlenowego u dorady, pstrąga tęczowego i długowąsa żabiego (*Clarias batrachus*), a także naturalną aktywność cytotoksyczną leukocytów u dorady (5, 10, 11, 16, 17). Wyraźną stymulację aktywności fagocytarnej leukocytów zanotowano również u transgenicznego amura białego (*Ctenopharyngodon idellus*) z wprowadzonym genem ludzkiej laktoferyny (21). LF wpływała także na humoralne czynniki rezystencji, wzmagając aktywność surowiczego lizozymu u węgorza japońskiego i długowąsa żabiego, podnosząc poziom surowiczej peroksydazy u dorady, wzmagając aktywację dopełniacza na drodze alternatywnej u pstrąga tęczowego czy wreszcie aktywność mieloperoksydazy i miano naturalnych hemaglutynin u długowąsa żabiego (5, 7, 10, 11, 14).

U niektórych gatunków ryb wywołana przez LF stymulacja odporności przekładała się na zwiększoną oporność organizmu na eksperymentalne zakażenia bakteryjne lub wirusowe. U tilapii nilowej otrzymującej w paszy LF zanotowano istotnie wyższą przeżywalność ryb po zakażeniu *Streptococcus iniae*, u pstrąga tęczowego po zakażeniu *Vibrio anguillarum*, zaś u długowąsa żabiego zwiększoną oporność zwierząt na zakażenie *Aeromonas hydrophila*, przy czym u tego ostatniego LF nie wpływała na niewrażliwość ryb wcześniej szczepionych na zakażenie (test challenge), nie obserwowano również stymulacji odporności swoistej, mierzonej poziomem aglutynin u ryb zaszczipionych (11, 17, 22). Obniżoną wrażliwość organizmu na zakażenia obserwowano także u transgenicznego amura białego z wprowadzonym genem ludzkiej LF, eksperymentalnie zakażanego *Aeromonas hydrophila* i GCHV (grass carp haemorrhage virus). U ryb transgenicznych zaobserwowano dużo późniejsze wystąpienie objawów choroby w porównaniu z rybami kontrolnymi, a także istotnie niższy procent śmiertelności (21, 25).

Nieliczne prace wskazują także na lepszą ochronę ryb otrzymujących w paszy LF przed pasożytniczymi orzęskami. Efekt taki udokumentowano u pagrusa czerwonego w stosunku do *Cryptocaryon irritans* oraz u karasia złocistego w stosunku do kulorzęska (*Ichthyophthirius multifiliis*) (7).

Z drugiej strony, istnieją także doniesienia o braku wpływu LF na odporność u niektórych gatunków ryb. U tilapii nilowej i łososia atlantyckiego białko to nie

wywierało żadnego wpływu na badane parametry odporności nieswoistej. U łososia nie wpływało również na odporność przeciwwakażną ani w stosunku do testowanego czynnika bakteryjnego, ani wirusowego (12, 22). Powyższe różnice w odpowiedzi organizmu na LF wynikać mogą z różnic gatunkowych, a także zastosowanej dawki białka.

Laktoferyna jako adiuwant

Immunostymulatory stosowane są w akwakulturze zazwyczaj samodzielnie, jako środki podnoszące odporność nieswoistą organizmu, tym niemniej niektóre z nich (zwłaszcza glukany) znalazły zastosowanie jako szczepionkowe adiuwanty. Kamilya i wsp. (9) jako pierwsi użyli bydłczej laktoferyny w połączeniu z formalizowaną szczepionką przeciw *Aeromonas hydrophila* u *Catla catla*. Uzyskany efekt w postaci słabej stymulacji swoistej odpowiedzi proliferacyjnej limfocytów i wytwarzania przez nie MAF oraz znacząco wyższego poziomu przeciwciał przeciw antygenowi szczepionkowemu wydaje się świadczyć o adiuwantowym działaniu LF. Z drugiej jednak strony, wysoki poziom przeciwciał uzyskany dzięki stymulacji organizmu tym białkiem nie przełożył się na lepszą ochronę szczepionych zwierząt przed zakażeniem w teście challenge. Dla potwierdzenia ewentualnej przydatności LF na tym polu konieczne są zatem dalsze badania.

Laktoferyna w hodowli skorupiaków

Stosunkowo nieliczne badania przeprowadzone do tej pory na skorupiakach hodowlanych pozwalają przypuszczać, że LF mogłaby znaleźć zastosowanie również w tej gałęzi akwakultury. Intensywna hodowla skorupiaków wiąże się z występowaniem podobnych problemów, jakie napotyka się w hodowli ryb, tj. stresu i związanej z nim zwiększonej podatności na zakażenia bakteryjne i wirusowe. Najczęściej spotykanymi u tej gromady zwierząt czynnikami zakaźnymi są wirusy, choć nierzadko problemy powodują także bakterie oportunistyczne z rodzajów *Vibrio* i *Pseudomonas*. Atakują one przede wszystkim młodociane osobniki, prowadząc do masowych upadków i znacznych strat materialnych. W celu zwiększenia oporności hodowlanych skorupiaków na patogeny do tej pory z powodzeniem stosowano takie immunostymulatory, jak glukany oraz bakteryjne peptydoglikany i lipopolisacharydy (1, 18). Natomiast Chand i wsp. (4) wykazali korzystne działanie LF podawanej w paszy na odporność słodkowodnej krewetki *Macrobrachium rosenbergii*. LF nie wpływała wprawdzie na ilość hemocytów w hemolimfie badanego gatunku, podnosiła natomiast aktywność fenolooksydazy, poziom hemaglutynin i aglutynin oraz szybkość usuwania bakterii z hemolimfy po zakażeniu eksperymentalnym. Ponadto krewetki żywione paszą z dodatkiem LF były mniej wrażliwe na zakażenie *A. hydrophila* i stres azotowy, co objawiało się znacznie niższą śmiertelnością

zwierząt. Korzystny wpływ LF na reakcję stresową, związaną ze zbyt niskim zasoleniem, zanotowano również u morskiej krewetki *Penaeus japonicus* (24).

Perspektywy zastosowania LF jako dodatku paszowego w akwakulturze

Przy stosowaniu immunostymulatorów w akwakulturze bardzo istotną sprawą, ze względu na stosunkowo krótkotrwały efekt działania tych preparatów, jest moment ich podania zwierzętom. Najkorzystniejszy z punktu widzenia minimalizacji strat spowodowanych chorobą jest okres przed jej wybuchem, choć środki te stosowane są również w celu zniwelowania immunosupresji wywołanej przez stres. Kolejnymi czynnikami wpływającymi na oczekiwany efekt końcowy są: droga wprowadzenia leku, jego dawka i długość okresu podawania. Niektóre preparaty stosowane są rutynowo w iniekcji. Ta droga administracji jest czasochłonna, naraża zwierzęta na dodatkowy stres manipulacyjny i staje się zupełnie nieprzydatna w przypadku ryb o wadze poniżej 15 g. Stąd preferowane są środki, które można stosować w immersji lub jako dodatek paszowy. Efekt działania immunostymulatora jest również zależny od użytej dawki. Wysokie dawki mogą nie tylko nie działać stymulująco, lecz wręcz obniżać odpowiedź immunologiczną organizmu. Podobnie długoterminowe stosowanie tych środków powoduje obniżenie ich efektywności. W związku z powyższym przed zastosowaniem jakiegokolwiek immunostymulatora konieczny jest wcześniejszy dobór dawki, czasu i drogi administracji preparatu dla każdego gatunku zwierzęcia z osobna (15).

Powyższe ograniczenia dotyczą również laktoferyny, o czym dobitnie świadczą różnice w wynikach przeprowadzonych do tej pory badań. Z całą pewnością jednak LF cechuje szereg zalet, czyniących ją dobrym immunostymulatorem, nadającym się do zastosowania w akwakulturze. Jako białko naturalnego pochodzenia, LF jest środkiem bezpiecznym dla hodowanych zwierząt, środowiska naturalnego i zdrowia człowieka z powodu swojej biokompatybilności, biodegradowalności i empirycznie potwierdzonej niezwykle niskiej toksyczności. Ponadto, dzięki swojej stosunkowo wysokiej oporności na czynniki fizyczne i chemiczne, jest ona w stanie przetrwać warunki produkcji paszy, kwaśne środowisko żołądka i proteolizę w jelitach, co zapewnia możliwość jej masowego stosowania jako dodatku paszowego, bez wywoływania niepotrzebnego stresu manipulacyjnego u hodowanych zwierząt. Niewątpliwą zaletą LF jest również fakt, że nie jest ona stałym składnikiem diety ryb, jak np. witaminy, co czyni łatwiejszym wprowadzenie jej do paszy w określonym stężeniu (11, 19, 20).

Piśmiennictwo

1. *Bachere E.*: Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture* 2000, 191, 3-11.
2. *Brock J.*: Lactoferrin: a multifunctional immunoregulatory protein? *Immunology Today* 1995, 16, 9, 417-419.

3. *Cecchini S., Caputo A. R., Mecca F.*: Evaluation of in vitro endocytosis and antibody synthesis by rainbow trout head kidney cells treated with bovine lactoferrin. *J. Fish Biol.* 2005, 66, 609-617.
4. *Chand R. K., Sahoo P. K., Kumari J., Pillai B. R., Mishra B. K.*: Dietary administration of bovine lactoferrin influences the immune ability of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) and its resistance against *Aeromonas hydrophila* infection and nitrite stress. *Fish Shellfish Immunol.* 2006, 21, 119-129.
5. *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.
6. *Farnaud S., Evans R. W.*: Lactoferrin – a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Mol. Immunol.* 2003, 40, 395-405.
7. *Kakuta I.*: Reduction of stress response in carp, *Cyprinus carpio* L., held under deteriorating environmental conditions, by oral administration of bovine lactoferrin. *J. Fish Dis.* 1998, 21, 161-167.
8. *Kamalya 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 leukocytes. *Aquaculture* 2006, 253, 130-139.
9. *Kamalya D., Maiti T. K., Joardar S. N., Mal B. C.*: Adjuvant effect of mushroom glucan and bovine lactoferrin upon *Aeromonas hydrophila* vaccination in catla, *Catla catla* (Hamilton). *J. Fish Dis.* 2006, 29, 331-337.
10. *Kumari J., Sahoo P. K.*: Non-specific immune response of healthy and immunocompromised Asian catfish (*Clarias batrachus*) to several immunostimulants. *Aquaculture* 2006, 255, 133-141.
11. *Kumari J., Swain T., Sahoo P. K.*: Dietary bovine lactoferrin induces changes in immunity level and disease resistance in Asian catfish *Clarias batrachus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2003, 94, 1-9.
12. *Lygren B., Sveier H., Hjeltnes B., Waagbo R.*: Examination of the immunomodulatory properties and the effect of disease resistance of dietary bovine lactoferrin and vitamin C fed to Atlantic salmon (*Salmo salar*) for a short-time period. *Fish Shellfish Immunol.* 1999, 9, 95-107.
13. *Magnadottir B.*: Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunol.* 2006, 20, 137-151.
14. *Ren T., Koshio S., Ishikawa M., Yokoyama S., Micheal F. R., Uyan O., Tung H. T.*: Influence of dietary vitamin C and bovine lactoferrin on blood chemistry and non-specific immune responses of Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture* 2007, 267, 31-37.
15. *Sakai M.*: Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture* 1999, 172, 63-92.
16. *Sakai M., Kobayashi M., Yoshida T.*: Activation of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, phagocytic cells by administration of bovine lactoferrin. *Comp. Biochem. Physiol.* 1995, 110B, 755-759.
17. *Sakai M., Otubo T., Atsuta S., Kobayashi M.*: Enhancement of resistance to bacterial infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), by oral administration of bovine lactoferrin. *J. Fish Dis.* 1993, 16, 239-247.
18. *Smith V. J., Brown J. H., Hauton C.*: Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection? *Fish Shellfish Immunol.* 2003, 15, 71-90.
19. *Steijns J. M.*: Milk ingredients as nutraceuticals. *Society of Dairy Technology*, 2001, 54, 3, 81-88.
20. *Tomita M., Wakabayashi H., Yamauchi K., Teraguchi S., Hayasawa H.*: Bovine lactoferrin and lactoferricin derived from milk: production and applications. *Biochem. Cell Biol.* 2002, 80, 109-112.
21. *Weifeng M., Yaping W., Wenbo W., Bo W., Jianxin F., Zuoyan Z.*: Enhanced resistance to *Aeromonas hydrophila* infection and enhanced phagocytic activities in human lactoferrin-transgenic grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Aquaculture* 2004, 242, 93-103.
22. *Welker T. L., Lim C., Yildirim-Aksoy M., Klesius P. H.*: Growth, immune function, and disease and stress resistance of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed graded levels of bovine lactoferrin. *Aquaculture* 2007, 262, 156-162.
23. *Yokoyama S., Koshio S., Takakura N., Oshida K., Ishikawa M., Gallardo-Cigarroa F. J., Catacutan M. R., Teshima S.*: Effect of dietary bovine lactoferrin on growth response, tolerance to air exposure and low salinity stress conditions in orange spotted grouper *Epinephelus coioides*. *Aquaculture* 2006, 255, 507-513.
24. *Yokoyama S., Koshio S., Takakura N., Oshida K., Ishikawa M., Gallardo-Cigarroa F. J., Teshima S.*: Dietary bovine lactoferrin enhances tolerance to high temperature stress in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 2005, 249, 367-373.
25. *Zhong J., Wang Y., Zhu Z.*: Introduction of the human lactoferrin gene into Grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) to increase resistance against GCH virus. *Aquaculture* 2002, 214, 93-101.

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