

**STUDI IMMUNOHISTOKIMIA PADA DISTRIBUSI DAN LOKALISASI
INTRASELULER PROTEIN ANTIMIKROBA DAN PENGATUR KEKEBALAN-
LAKTOFERIN PADA JARINGAN TUBUH TUPAI (*Tupaia javanica*)**

Agungpriyono, S.¹⁾, N. Kusumorini²⁾, D. R. Agungpriyono³⁾, dan C. Choliq⁴⁾

Bagian ¹⁾Anatomi, ²⁾Fisiologi dan Farmakologi, ³⁾Parasitologi dan Patologi,

⁴⁾Klinik Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

Jl. Taman Kencana 3, Bogor 16151

ABSTRACT

The immunolocalization of lactoferrin in the exocrine tissues of the tree shrew was studied at light- and electron-microscopic levels using a polyclonal antibody to lactoferrin. Lactoferrin was detected in the cytoplasm of serous cells. In the submandibular gland, low to moderate immunoreactivity was observed in the serous acinar cells and ductal epithelium. In the parotid gland, groups of serous acini showed positive reaction. The fundic glands showed moderate to strong positive reaction, while cardiac, pyloric, intestinal glands and pancreatic acinar cells showed negative reaction. In the secretory epithelium of the active mammary gland, the immunoreactivity varied from moderate to strong. Secretory epithelium of vesicular gland showed weak to moderate immunoreactivity and those of prostate gland showed weak immunoreactivity. The secretory materials of these glands showed weak immunoreactivity. No positive reaction was observed in the bulbourethral gland. Positive reactions were also detected in the neutrophil leukocyte, Paneth cells and urethral epithelium. The intensity of immunoreactivity reflects qualitative amount of lactoferrin. The immunoreactivities were weak to moderate, indicated might reflect that the concentration of lactoferrin was not high in the normal and healthy tree shrews. In general, the distribution pattern of lactoferrin in exocrine tissues of the tree shrew was similar to those of human. In the electron microscopy, lactoferrin was detected in the lysosomes of serous cells. In the neutrophil leukocyte, blood vessels and interstitial tissues, the protein was found in rER, Golgi apparatus and lysosomes. The presence of lactoferrin in the exocrine tissues, which had close relationship with the external environment, and in the lysosomes might support a morphological function of the lactoferrin as an anti bacteria.

ABSTRAK

Distribusi dan lokalisasi intraseluler laktoferin pada jaringan tubuh tupai dipelajari secara immunohistokimia pada tingkat mikroskopis dan elektron mikroskopis. Immunoreaktivitas terhadap laktoferin ditemukan pada sitoplasma dari sel serous. Pada kelenjar submandibularis, sel-sel asinar serous dan sel-sel epitel duktus menunjukkan reaksi positif dengan intensitas reaksi yang lemah sampai sedang. Pada kelenjar parotis beberapa kelompok sel-sel asinar menunjukkan reaksi positif. Immunoreaktivitas dengan intensitas sedang sampai kuat dijumpai pada kelenjar fundus. Kelenjar kardial, kelenjar pilorus, kelenjar usus dan pankreas menunjukkan reaksi negatif. Immunoreaktivitas pada kelenjar ambing hanya ditemukan pada sel-sel epitel alveoli kelenjar yang aktif dengan intensitas bervariasi, dari sedang sampai kuat. Sekreta pada alveol menunjukkan reaksi positif lemah. Reaksi positif lemah sampai sedang ditemukan pada epitel kelenjar vesicula seminalis, dan intensitas yang lemah pada epitel kelenjar prostat. Sekreta kelenjar aksesori kelamin menunjukkan reaksi positif lemah. Kelenjar bulbourethralis menunjukkan reaksi negatif.

Immunoreaktivitas juga terlihat pada leukosit neutrofil, sel Paneth dan epitel urethra. Intensitas reaksi menunjukkan tingkat konsentrasi/ kandungan laktoferin. Pada umumnya intensitas reaksi yang ditunjukkan adalah lemah sampai sedang, menunjukkan kemungkinan konsentrasi laktoferin yang tidak banyak pada tupai yang normal dan sehat. Secara umum, pola sebaran laktoferin pada tupai mirip dengan yang dilaporkan pada manusia. Pada tingkat ultrastruktur, laktoferin ditemukan terutama pada lisosom dari sel-sel serous. Laktoferin juga ditemukan pada rER, kompleks Golgi dan agregat lisosom dari leukosit neutrofil di kapiler maupun di jaringan interstitial. Adanya laktoferin pada kelenjar-kelenjar eksokrin yang berhubungan dengan bagian luar tubuh dan lokalisasi intraseluler laktoferin yang berkaitan dengan kemampuan fagositik lisosom secara morfologis mendukung fungsi laktoferin sebagai anti mikroba.

PENDAHULUAN

Laktoferin (glikoprotein, BM 75.000 kD), ditemukan oleh Sorensen dan Sorensen (1939) sebagai bagian dari protein air susu sapi. Selain terdapat pada air susu (Johanson, 1960; Masson dan Heremans, 1971), laktoferin juga ditemukan pada cairan sekresi tubuh seperti air mata, saliva dan darah (Masson dan Heremans, 1966, Masson *et al.*, 1969; Harmon dan Newbould, 1980). Laktoferin mempunyai afinitas yang sangat besar dan spesifik terhadap besi. Karena sifat inilah laktoferin dikenal sebagai bakterisida, bakteriostatika juga anti mikroba tertentu, dengan jalan mengambil dan mengikat besi yang sangat dibutuhkan untuk kehidupan mikroorganisme patogen tersebut (Arnold *et al.*, 1977). Selain itu, laktoferin dinyatakan mempunyai kemampuan menstimulasi sistem kekebalan dengan cara meningkatkan pertumbuhan sel-sel kebal (Hashizume *et al.*, 1983) dan mempunyai komponen molekul yang bersifat sebagai zat anti radang (Britigan *et al.*, 1994).

Berdasarkan sifat-sifat spesifik di atas, laktoferin secara luas dipakai dalam bidang penelitian biomedis pada pencegahan dan pengobatan beberapa penyakit asal bakteri, virus, kandida dan protozoa. Laktoferin misalnya ternyata dapat menghambat aktifitas virus HIV (Etiene, 1995). Laktoferin digunakan sebagai makanan tambahan pada susu untuk balita untuk meningkatkan sistem kekebalan. Purifikasi laktoferin telah berhasil dilakukan pada manusia (Luqmani *et al.*, 1991), babi, sapi (Castellino *et al.*, 1970) dan mencit. Pada tikus usaha ini sedang dalam pelaksanaan (Horner *et al.*, 1996).

Tupai (*Scandentia, inaktivora*) sering dikelirukan dengan bajing (*Scuriudae, rodensia*), karena mempunyai penampakan luar yang sekilas mirip. Sebenarnya tupai lebih banyak menunjukkan persamaan morfologis dengan primata (Luckett, 1980; Napier dan Napier 1985). Tupai saat ini mulai banyak dimanfaatkan dalam penelitian biomedis primata (Collins *et al.*, 1982; Collins dan Tsang, 1983; Darai *et al.*, 1992). Distribusi dan lokalisasi

sel-sel penghasil laktoferin telah dipelajari secara immunohistokimia pada manusia (Franklin *et al.*, 1973; Masson dan Taylor, 1978; Reitamo *et al.*, 1980; Denis *et al.*, 1981; Lechene de La Porte *et al.*, 1981; Miyauchi, 1984; Saito dan Nakamura, 1992), sapi (Inoue *et al.*, 1993) dan mencit (Newbold *et al.*, 1997). Namun demikian penelitian serupa pada tupai belum pernah dilaporkan.

Penelitian ini memanfaatkan metoda immunohistokimia spesifik untuk mendeteksi sebaran laktoferin dan lokalisasi intraselulernya pada berbagai sel-sel jaringan tubuh tupai.

BAHAN DAN METODA

Penelitian ini menggunakan 20 ekor *T. javanica* jantan betina dengan berat badan 75-120 gr yang sehat secara klinis. Hewan diperoleh dengan ijin dari habitat aslinya di Propinsi Jawa Tengah dan Jawa Timur. Setelah periode stabilisasi selama 3 hari, hewan dibunuh dengan cara pengambilan darah *intracardial* setelah terlebih dahulu dibius dengan pentobarbital (Nembutal, Abbot Lab., Illinois, USA). Sampel jaringan diambil dari berbagai organ eksokrin: kelenjar ludah parotis, submandibularis, kelenjar nasal, kelenjar labial, kelenjar trakheal, pankreas, lambung, usus, hati, kemudian kelenjar ambing pada hewan betina dan kelenjar aksesoris kelamin pada hewan jantan. Semua organ dicuci dengan larutan PBS (pH 7.4) dan diawetkan dalam larutan Bouin selama 24 jam. Sampel diproses untuk pembuatan blok jaringan parafin. Blok parafin dipotong pada ketebalan 5 mikrometer dengan menggunakan mikrotom. Sayatan diletakkan di atas gelas obyek yang telah dilapisi dengan gelatin. Sayatan/sediaan kemudian diwarnai secara immunohistokimia dengan antisera terhadap laktoferin dengan prosedur Avidin-Biotin Peroxidase Complex (ABC method, Hsu *et al.*, 1981). Antisera dan bahan kimia yang digunakan dalam prosedur immunohistokimia dirangkum pada Tabel 1. Reaksi positif yang terlihat diamati di bawah mikroskop cahaya dan dikelompokkan secara subyektif menurut intensitas reaksi yang diperlihatkan. Untuk pengujian spesifitas reaksi, dilakukan (1) pemakaian sediaan kelenjar ambing sapi sebagai kontrol positif dan (2) penghilangan salah satu langkah dalam prosedur pewarnaan sebagai kontrol negatif. Pengamatan dan pemotretan sediaan dilakukan dengan mikroskop cahaya yang dilengkapi kamera.

Untuk pengamatan dengan elektron mikroskop, sampel jaringan segar yang khusus diambil untuk keperluan ini difiksasi dengan larutan 4% paraformaldehid dalam PBS. Sediaan dipotong beku dengan *cryostat*, diwarnai secara immunohistokimia dengan antisera

terhadap laktoferin (*pre-embedding immunocytochemistry*). Hanya sediaan yang menunjukkan reaksi positif saja yang diproses lebih lanjut. Proses meliputi *embedding* dalam resin (Quetol), pemotongan *ultrathin* dengan ultramikrotom dan pewarnaan kontras dengan *lead nitrate*. Sediaan diamati dengan elektron mikroskop (Hitachi, H-800MU) pada tegangan 100kV.

Tabel 1. Antisera dan reagens yang digunakan pada prosedur pewarnaan immunohistokimia

No	Antisera/ reagens	Pengenceran		Sumber
		Immunohistokimia	Elektron mikroskopis	
1	Rabbit anti bovine Lactoferrin	1 : 12000	1 : 2000	Dr. A. Andren (Swedia), Swedish Agric. University
2	Rabbit anti bovine Lactoferrin	1 : 2000	1 : 500	Dr. Shimazaki (Japan) Obihiro University
3	Normal Serum (Goat)	1 : 10	1 : 5	Life Technologies, Gibco BRL, NY, USA
4	Biotinylated anti rabbit in goat	1 : 50	1 : 20	Dako A/S, Denmark
5	ABC Kit Vectastain PK 6100	-	-	Vector Lab., Burlingame, CA, USA
6	DAB (3,3' - diaminobenzidine tetrahydrochloride)	0.3 %	0.3 %	Dojindo, Japan

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada Tabel 2 diringkas sebaran dan intensitas reaksi sel-sel yang imunoreaktif terhadap laktoferin pada berbagai kelenjar eksokrin tupai.

Secara umum immunoreaktivitas terhadap laktoferin ditemukan pada sitoplasma. Sel-sel yang menunjukkan reaksi positif adalah sel-sel serous, sedangkan sel mukous menunjukkan reaksi negatif. Tidak tampak perbedaan immunoreaktivitas pada kedua jenis antibodi laktoferin yang digunakan, juga pada jenis kelamin dan usia hewan.

Kelompok sel yang imunoreaktif terhadap laktoferin sering dijumpai di sekitar alat penyalur kelenjar (*ductus*) dari organ yang diamati, tetapi material sekreta pada alat penyalur tidak selalu menunjukkan reaksi positif.

Tabel 2. Sebaran dan intensitas reaksi sel-sel penghasil laktoferin pada berbagai kelenjar eksokrin tupai Jawa (*Tupaia javanica*)

No	Kelenjar	Tipe Sekresi	Posisi Sel			
			Asinar		Duktus	
			Jumlah Sel	Intensitas Reaksi	Jumlah Sel	Intensitas Reaksi
1	Tracheal	Mukous	-	-	-	-
2	Nasolabial	Mukous	-	-	-	-
3	Lingual (von Ebner)	Mukous	-	-	-	-
4	Submandibularis	Seromukous	+1~+2	*~**	+2~+3	*~**
5	Parotis	Serous	+2	*~**	+1	*
6	Cardia	Mukous	-	-	NA	NA
7	Fundus	Seromukous	+2~+3	**~***	NA	NA
8	Pylorus	Mukous	-	-	NA	NA
9	Lieberkühn	Mukous	-	-	-	-
10	Brünner	Mukous	-	-	-	-
11	Pankreas	Serous	-	-	-	-
12	Ambing (aktif)	Serous	+3	**~***	+2	**
13	Prostat	Seromukous	+	*	+	*
14	Bulbourethralis	Mukous	-	-	-	-
15	Vesica seminalis	Seromukous	++	*	++	*

Keterangan :

Jumlah sel positif : +1= sedikit, +2= banyak, +3 = sangat banyak, - = negatif.

Intensitas reaksi : * = lemah, ** = sedang, *** = kuat, - = negatif.

NA : *not applicable*

Di samping sel-sel kelenjar eksokrin, immunoreaktivitas terhadap laktoferin juga terlihat pada sel-sel Paneth di kelenjar Lieberkühn (usus), leukosit netrofil/ granulosit dan sel-sel epitel urethra. Adanya laktoferin pada leukosit netrofil/granulosit pada tupai sama dengan yang dilaporkan pada manusia dan hewan lain (Harmon dan Newbould, 1980; Dellmann dan Carithers, 1996). Hal ini sesuai dengan fungsi spesifik leukosit netrofil sebagai salah satu komponen alat pertahanan tubuh, yaitu sebagai anti mikroba pada jaringan interstitial.

Pada kelenjar di saluran pernafasan bagian proksimal (nasal dan trakhea) tidak dijumpai immunoreaktivitas terhadap laktoferin. Pada saluran pencernaan, immunoreaktivitas terhadap laktoferin ditemukan di kelenjar ludah dan lambung. Pada kelenjar ludah submandibularis dan parotis, sel-sel asinar serous dan sel-sel epitel duktus kelenjar menunjukkan reaksi positif dengan intensitas reaksi yang lemah sampai sedang. Sel-sel mukous pada kelenjar submandibularis menunjukkan reaksi negatif. Pada kelenjar parotis

walaupun kebanyakan sel-sel asinar menunjukkan reaksi negatif, tetapi ada kelompok sel-sel yang menunjukkan reaksi positif. Laktoferin terdeteksi pada hampir semua sel-sel serous pada kelenjar yang bersifat seromukous seperti kelenjar submandibularis, sedikit pada sel-sel asinar pada kelenjar serous murni seperti kelenjar parotis, tetapi tidak terdeteksi pada kelenjar mukous murni (Inoue *et al.*, 1993). Pada kelenjar parotis misalnya, laktoferin terdeteksi pada beberapa sel di asinar. Ini menunjukkan kemungkinan bahwa sintesa laktoferin hanya dipunyai oleh sel-sel tertentu pada asinar kelenjar parotis. Kemungkinan lain adalah sel-sel yang tidak menunjukkan immunoreaktivitas terhadap anti laktoferin mengandung terlalu sedikit laktoferin yang dapat dideteksi dengan metode/ prosedur yang digunakan, atau sel-sel tersebut pada saat itu sedang tidak dalam fase aktif mensintesa laktoferin.

Immunoreaktivitas dengan intensitas sedang sampai kuat dijumpai pada sel-sel di kelenjar fundus tetapi tidak pada kelenjar kardia, kelenjar pilorus dan kelenjar usus. Reaksi positif ini terutama terdapat pada daerah basal dari kelenjar fundus.

Pada manusia kelenjar kardia, fundus dan pilorus ditemukan laktoferin (Miyachi, 1984), sedangkan pada tupai laktoferin hanya ditemukan di kelenjar fundus. Kelenjar kardia dan pilorus tupai menunjukkan reaksi negatif terhadap laktoferin.

Laktoferin tidak ditemukan di pankreas manusia sehat (Miyachi, 1984), atau walaupun ada konsentrasinya sangat rendah. Konsentrasi laktoferin akan nyata pada pankreas yang mengalami peradangan (Lechene de la Porte *et al.*, 1981). Pada penelitian ini tidak ditemukan adanya laktoferin pada sel-sel asinar pankreas tupai. Kemungkinan memang tidak ada laktoferin pada pankreas tupai, atau jika pun ada, sangat rendah untuk dapat dideteksi dengan metode yang digunakan.

Pada kelenjar ambing, immunoreaktivitas ditemukan pada sel-sel epitel alveoli kelenjar ambing aktif dengan intensitas bervariasi antar satu sel dengan lainnya, dari sedang sampai kuat. Sekreta pada alveol menunjukkan reaksi positif lemah. Ambing inaktif menunjukkan reaksi negatif terhadap laktoferin. Jumlah sel positif serta intensitas reaksi positif yang diperlihatkan berbeda antara satu alveol dengan alveol lainnya. Hal ini menunjukkan adanya perbedaan fase pada sintesa laktoferin oleh masing-masing sel epitel alveol kelenjar ambing aktif.

Pada kelenjar aksesori kelamin jantan, reaksi positif lemah sampai sedang ditemukan pada sel-sel epitel kelenjar vesicula seminalis, dan reaksi positif lemah pada epitel kelenjar prostat dan sekreta kelenjar-kelenjar aksesori kelamin. Kelenjar bulboethralis

menunjukkan reaksi negatif. Reaksi positif dengan intensitas sedang sampai kuat ditemukan pula pada beberapa sel-sel epitel dari lumen urethra. Laktoferin ditemukan pada kelenjar vesica seminalis (Miyachi, 1984; Wichmann *et al.*, 1989) dan prostat (Miyachi, 1984) manusia, serta pada kelenjar bulboethralis sapi (Inoue *et al.*, 1993). Penyebaran laktoferin pada kelenjar asesoris kelamin tupai mirip dengan yang dilaporkan pada manusia (Wichmann *et al.*, 1989) tetapi tidak dengan sapi (Inoue *et al.*, 1993). Adanya laktoferin pada kelenjar vesicula seminalis dan kelenjar prostat dan juga pada sel-sel epitel urethra, menunjukkan kemungkinan usaha menjaga kebersihan plasma semen dari kontaminasi kotoran/sisa-sisa urin di urethra atau terlibat dalam reaksi immunologis sperma selama dalam perjalanannya di saluran reproduksi betina.

Jika dibandingkan dengan pola penyebaran laktoferin pada manusia (Miyachi, 1984; Lechene de La Porte *et al.*, 1981; Saito dan Nakamura, 1992) dan sapi (Inoue *et al.*, 1993), maka pola penyebaran laktoferin pada tupai mirip dengan pada manusia. Intensitas reaksi menunjukkan tingkat konsentrasi atau kandungan laktoferin pada organ-organ tersebut. Pada umumnya, intensitas reaksi terlihat lemah sampai sedang, menunjukkan kemungkinan konsentrasi laktoferin yang tidak banyak pada tupai yang normal dan sehat. Rendahnya konsentrasi laktoferin pada tupai mirip dengan keadaan yang dilaporkan pada tikus (Horner *et al.*, 1996).

Secara ultrastruktur, immunoreaktivitas terhadap laktoferin dijumpai di lisosom pada sel-sel dari kelenjar yang secara immunohistokimia memperlihatkan reaksi positif terhadap laktoferin. Pada penelitian ini, hanya pada leukosit netrofil saja terdeteksi adanya laktoferin pada rER, kompleks Golgi dan lisosom. Protein disintesis di rER untuk kemudian mengalami proses modifikasi dan pengangkutan di kompleks Golgi (Ross *et al.*, 1995). Adanya laktoferin di rER dan kompleks Golgi dari leukosit netrofil menunjukkan bahwa laktoferin disintesis dan dihasilkan oleh netrofil. Adanya laktoferin di lisosom sel-sel serous paling tidak menunjukkan dua kemungkinan, pertama, laktoferin merupakan bahan dalam lisosom dan berperan pada proses fagositosis, kedua, laktoferin berada sebagai inklusi dalam sitoplasma sel yang bersangkutan. Hal kedua menandakan bahwa laktoferin mungkin tidak berasal dari sel tersebut, melainkan berasal dari netrofil dan kemudian masuk ke dalam sitoplasma sel tersebut melalui proses endositosis.

KESIMPULAN

Laktoferin pada tupai ditemukan pada sel-sel serous di kelenjar ludah, kelenjar fundus lambung, kelenjar ambing, kelenjar aksesori kelamin, sel-sel leukosit netrofil dan sel-sel epitel urethra. Secara ultrastruktur laktoferin terdeteksi pada rER, kompleks golgi dan agregat lisosom dari netrofil dan pada lisosom dari sel-sel serous. Adanya laktoferin pada kelenjar-kelenjar eksokrin yang berhubungan dengan bagian luar tubuh dan lokalisasi intraseluler laktoferin yang berkaitan dengan kemampuan fagositik lisosom secara morfologis mendukung fungsi laktoferin sebagai anti mikroba.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada Dr. Masaaki Nakai, Department of Veterinary Anatomy, Miyazaki University, Jepang atas bantuan teknis dan fasilitas pada studi elektron mikroskopik. Penelitian ini dibiayai oleh Hibah Bersaing VII (No. kontrak : 61/ P2IPT/ DPPM/ 98/ PHBVII/ 1/ V/ 1998), Direktorat Pembinaan Penelitian dan Pengabdian Pada Masyarakat, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

- Arnold R.R., M.F. Cole, and J.R. McGhee. 1977. A bactericidal effect for human lactoferrin. *Science* 197:263-265
- Britigan B.E., J. S. Serod, and M.S. Cohen. 1994. The role of lactoferrin as an anti-inflammatory molecule. *Advances in Exp. Med. and Biol.* 357:143-156
- Castellino, F.J., W.W. Fish, and K.G. Mann. 1970. Structural studies on bovine lactoferrin. *J. Biol. Chem.* 245 : 4269-4275.
- Collins P.M., and W.N. Tsang. 1983. The tree-shrew (*Tupaia belangeri*) as an experimental animal for the study of male reproductive endocrinology in primates. *International Symposium of Comparative Endocrinology, 9th*, Hong Kong.
- Collins P.M., W.N. Tsang, and B. Lofts. 1982. Anatomy and function of the reproductive tract in the captive male tree-shrew (*Tupaia belangeri*). *Biology of Reproduction* 26:169-182
- Darai G., L. Zöller, W. Hofmann, P. Möller, A. Schwaier, and R.M. Flügel. 1982. Spontaneous malignomas in *Tupaia* (tree-shrew). *Am. J. of Primatol.* 2:177-189

- Dellmann H.D., and J.R. Carithers. 1996. *Cytology and Microscopic Anatomy*. Williams & Wilkins. Baltimore
- Denis B., A.E. Clark, and B. Corrin. 1981. Ultrastructural localization of lactoferrin and glycoprotein in human bronchial gland. *Thorax*, 36: 108-115
- Etiene E.M. 1995. Regulatory iron-binding protein and self-reactive antibodies in oregnancy and in AIDS: A conceptual model of immune system pathology and theurapeutic approaches. *Int'l J. of Biosocial and Medical Res.* 14 (1).
- Franklin, R.M., K.R. Kenyon, and T.B. Tomasi. 1973. Immunohistologic studies of human lacrimal gland : Localization of immunoglobulins, secretory component and lactoferrin. *J. Immunol.*, 110: 984-992
- Harmon, R. J., and F.H.S. Newbould. 1980. Neutrophil leucocyte as a source of lactoferrin in bovine milk. *Am. J. Vet. Res.* 41 (10) 1603-1606
- Hashizume S., K. Kuroda, and H. Murakami. 1983. Identification of lactoferrin as an essential growth factor for human lymphocytic cell lines in serum-free medium. *Biochem. Biophys. Acta* 763:337-382
- Horner S., D. Bennat, and D.D. McAbee. 1996. Identification and isolation of rat lactoferrin. *Notre Dame Sci. Quarterly* 35: Abstract 2.
- Hsu S.M., L. Raine, and H. Fanger. 1981. The use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.* 29:577-580 1981.
- Inoue, M., J. Yamada, N. Kitamura, K. Shimazaki, A. Andren, and T. Yamashita. 1993. Immunohistochemical localization of lactoferrin in bovine exocrine glands. *Tissue and Cell.* 25 (5) 791-797.
- Johanson, B. 1960. Isolation of an iron-containing red protein from human milk. *Acta Chem. Scand.* 14 : 510-512.
- Lechene de la Porte, P., C. Figarella, and H. Sarles. 1981. Immunocytochemical localization of lactoferrin in human pancreas. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. Bd.* 362:1293-1296.
- Luckett W.P., 1980. *Comparative Biology and Evolutionary Relationships of Tree Shrews*. New York. Plenum Press, New York.
- Luqmani Y.A., T.A. Campbell, C. Bennet, R.C. Coombes, and I.M. Paterson. 1991. Expression of lactoferrin in human stomach. *Int. J. Cancer.* 49: 684-687.
- Masson P.L., and J.F. Heremans. 1966. Studies on lactoferrin, the iron binding protein of secretions. *Protides Bioi. Fluid. Collog. Bruges* 14: 115-124.

- _____, and E. Schonke. 1969. Lactoferrin, an iron binding protein neutrophilic leucosit. *J. Exp. Med.* 130: 643-658.
- _____. 1971. Lactoferrin in milk from different species. *Comp. Bio. Chem. Physiol.* 39B: 119-129.
- Masson D.Y., and C.R. Taylor. 1978. Distribution of transferrin, ferritin, and lactoferrin in human tissues. *J. Clin. Pathol.* 31: 316-327.
- Miyauchi, J., 1984. Distribution and subcellular localization of lactoferrin in human tissues with special reference to the submandibular gland. *Acta Histochem. Cytochem.* 17 (1): 77-89.
- Napier J.R., and P.H. Napier. 1985. *The Natural History of the Primates.* The MIT Press, Cambridge, Massachusetts
- Newbold R.R., R.B. Hanson, and W.N. Jefferson. 1997. Ontogeny of lactoferrin in the developing mouse uterus: a marker of early hormone response. *Biol Reprod.* 1997 May;56(5):1147-1157.
- Reitamo S., Y.T. Kontinen, and M. Segerber-Kontinen. 1980. Distribution of lactoferrin in the salivary glands. *Histochem.* 66: 285-291.
- Ross M.H., L.J. Romrell, G.I. Kaye. 1995. *Histology. A Text and Atlas.* 3rd ed. Williams & Wilkins. Baltimore, Maryland, USA
- Saito K., and Y. Nakamura. 1992. Lactoferrin and lysozyme in the intrahepatic bile duct of normal livers and hepatolithiasis. An immunohistochemical study. *J. Pathol.*, 14: 147-153.
- Sorensen M., and S.P.L. Sorensen. 1939. The protein in whey. *Comp. Ren. Lab. Carlsberg, Ser. Chem.* 23: 55-59.
- Wichmann, L., A. Vaalasti, T. Vaalasti, and P. Tuohmaa. 1989. Localization of lactoferrin in the male reproductive tract. *Int. J. Androl.* 12: 179-186.