

Received: 2008.08.28
Accepted: 2008.10.13
Published: 2008.11.03

Udział laktoferryiny w gospodarce żelazem w organizmie. Część I. Wpływ laktoferryiny na wchłanianie, transport i magazynowanie żelaza

The role of lactoferrin in the iron metabolism. Part I.
Effect of lactoferrin on intake, transport and iron storage

Jolanta Artym

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

Streszczenie

Żelazo jest jednym z najpowszechniej występujących pierwiastków i jest niezbędne do funkcjonowania większości organizmów. Jest ono katalizatorem reakcji enzymatycznych, zwłaszcza tych, gdzie odbywa się przenoszenie elektronów. Uczestniczy także w transporcie i magazynowaniu tlenu w tkankach. Wchodzi ono w skład hemoprotein, białek zawierających cząsteczkę hemu, takich jak: hemoglobina, mioglobina, cytochromy, oksydazy cytochromowe, katalazy i peroksydazy. Jest też składnikiem białek niezawierających hemu: akonitazy mitochondrialnej – białka z centrum żelazowo-siarkowym oraz metaloflawoprotein, do których należą dehydrogenazy (bursztynianowa, aldehydowa i dehydrogenaza NADH) i oksydaza ksantynowa. Żelazo bierze również udział w wielu przemianach metabolicznych ustroju, m.in. w syntezie i katabolizmie niektórych hormonów, wytwarzaniu związków bogatoenergetycznych, syntezie kolagenu, procesach detoksyfikacyjnych i reakcjach odpornościowych. Ważną rolą żelaza jest jego udział w wytwarzaniu reaktywnych form tlenu, które w małych stężeniach spełniają funkcje fizjologiczne, w wyższych jednak działają toksycznie na komórki powodując ich destrukcję.

W roztworach wodnych żelazo występuje jako jon żelazowy (Fe^{3+}) i jon żelazawy (Fe^{2+}). Choć żelazo trójwartościowe jest trudno rozpuszczalne to organizmy wykształciły mechanizmy pozwalające przyswajać i tę postać żelaza. Metabolizm żelaza obejmuje: wchłanianie, transport, udział w przemianach metabolicznych oraz magazynowanie. Przemiany żelaza przebiegają właściwie w układzie zamkniętym; w warunkach fizjologicznych jedynie małe jego ilości są wchłaniane w przewodzie pokarmowym i jednocześnie małe ilości są wydalane z ustroju. W metabolizmie żelaza zaangażowanych jest wiele białek, w tym: ferrytyna, hemosyderyna, transferryina, receptor transferryiny, przenośnik metali dwuwartościowych (DMT1), cytochrom b, ferroporytyna, hefajstyna, hepcydyna. Do tej rodziny białek zalicza się także laktoferryinę (LF), zawartą w płynach wydzielniczych ssaków i drugorzędowych ziarnistościach neutrofilów. Najlepiej udokumentowany jest udział LF we wchłanianiu żelaza w przewodzie pokarmowym poprzez zależną od receptora LF absorpcję żelaza związanego z białkiem przez komórki nabłonka jelita cienkiego. Swoisty receptor LF znaleziono na komórkach jelita wielu gatunków ssaków. Najbardziej pewny wydaje się udział LF w pozyskiwaniu żelaza z pożywienia u osesków, gdzie proces ten może mieć największe znaczenie fizjologiczne. Wiele danych przemawia ponadto za tym, że LF uczestniczy również w procesach magazynowania żelaza, głównie w wątrobie. Istnieją natomiast sprzeczne dane na temat wpływu LF na transport żelaza do innych komórek ustroju.

Słowa kluczowe:

laktoferryina • transferryina • ferrytyna • chelatowanie żelaza • degradacja laktoferryiny i kompleksów laktoferryina-żelazo • wchłanianie żelaza • dostarczanie żelaza do komórek • magazynowanie żelaza • wskaźniki metabolizmu żelaza • suplementy żelaza • syderopenia • niedokrwistość

Summary

Iron belongs to the most widely distributed elements and is essential for the metabolism of almost all organisms. It is required for enzymatic reactions, in particular of those involving electron transport. It also participates in the transport and storage of oxygen in tissues. Iron is present in hem-containing proteins (hemoproteins) such as: hemoglobin, myoglobin, cytochromes, cytochrome oxidases, catalases and peroxidases. It is also a constituent of proteins which do not contain hem molecule: flavoproteins (succinate and NADH dehydrogenase) and of mitochondrial aconitase. In addition, iron takes part in many metabolic processes, among others in synthesis and catabolism of some hormones, synthesis of high-energy compounds and collagen, detoxification processes and immune reactions. It also participates in formation of reactive oxygen species which may exhibit both beneficial and harmful effects.

Iron occurs in aqueous solutions as ferric (Fe^{+++}) and ferrous (Fe^{++}) ion. Although Fe^{+++} is hardly soluble, the organisms evolved mechanisms allowing to acquire and utilize that element irrespectively of its valency. The iron metabolism encompasses: intake, transport, participation in metabolism and storage. The iron metabolism undergoes in a closed cycle; in the physiological state only small amount of this metal is absorbed in the alimentary duct and disposed from the organism. A number of proteins is involved in iron metabolism including: ferritin, transferrin, transferrin receptor, divalent metal transporter (DMT1), cytochrome b, ferroportin, hephaestin, hepcidin and lactoferrin (LF). A beneficial effect of LF on iron acquisition in the gut is best documented. That process involves a receptor-mediated absorption of iron-bound LF through intestinal epithelial cells. The role of LF in transfer of iron from maternal milk may be of utmost importance. Many observations indicate also that LF participates in the process of iron storage, predominantly in the liver. Contradictory data exist, however, regarding the role of LF in iron transport to other cell types and organs.

Key words: lactoferrin • transferrin • ferritin • iron chelation • degradation of lactoferrin and iron-lactoferrin complexes • iron absorption • iron supply to cells • iron storage • parameters of iron metabolism • iron supplements • sideropenia • anemia

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=871222>

Word count: 7205

Tables: –

Figures: 1

References: 120

Adres autorki: mgr Jolanta Artym, Zakład Terapii Doświadczalnej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda, ul. Weigla 12, 53-114 Wrocław; e-mail: limbiol@iitd.pan.wroc.pl

Wykaz skrótów: **LF** – laktoferryina; **HLF** – laktoferryina ludzka; **rHLF** – rekombinacyjna laktoferryina ludzka; **BLF** – laktoferryina bydłęca; **holo-LF** – laktoferryina wysycona żelazem; **apo-LF** – laktoferryina wolna od żelaza; **TF** – transferryina; **RFT** – reaktywne formy tlenu.

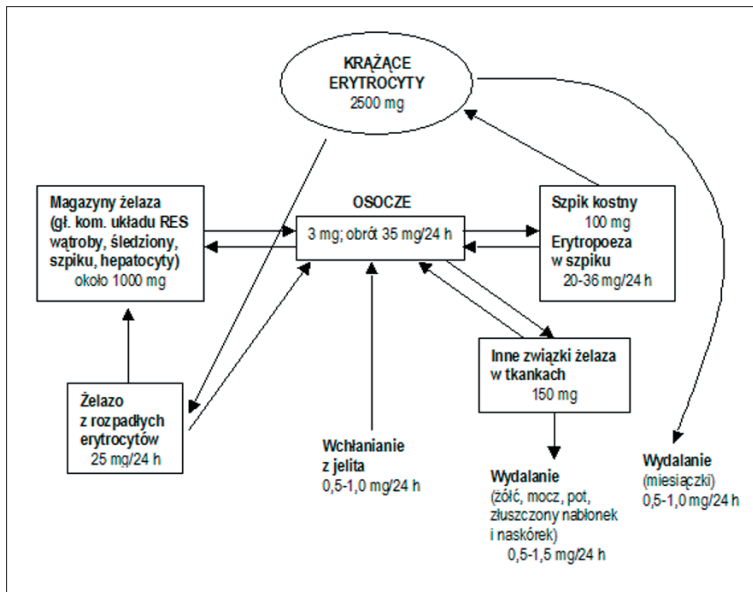
Żelazo jest podstawowym składnikiem odżywczym niemalże wszystkich organizmów. Uczestniczy w wielu procesach metabolicznych. Na homeostazę żelaza składają się: wchłanianie, transport do komórek, udział w metabolizmie ustroju oraz magazynowanie. Wymienione procesy są regulowane przez wiele białek, w tym – jak się wydaje – również laktoferryinę (LF), glikoproteinę obecną w wydzielnicach ustroju, osoczu krwi i ziarnistościach granulocytów. W pracy omówiono dostępne dane na temat udziału LF w procesach absorpcji z przewodu pokarmowego, dostarczania do komórek oraz magazynowania żelaza w ustroju. Wiadomości na temat udziału LF w wyżej wymienionych zjawiskach poprzedzono krótkim przypomnieniem ogólnych wiadomości o metabolizmie żelaza. Druga część artykułu (w przygotowaniu) dotyczyć będzie wpływu LF na

przemiany metaboliczne ustroju przebiegające z udziałem żelaza, głównie procesy oksydacyjno-redukcyjne oraz zwalczanie zakażeń i stanów zapalnych.

ŻELAZO W ORGANIZMIE CZŁOWIEKA

Żelazo jest niezbędnym nieorganicznym składnikiem prawie wszystkich organizmów. Jedyne znane organizmy niewymagające żelaza do życia to bakterie z rodzaju *Lactobacillus*. Żelazo zaliczane jest do mikroelementów ze względu na małe dzienne zapotrzebowanie oraz małą zawartość w ustroju. Wchodzi w skład wielu enzymów, w tym: katalaz, oksydaz, peroksydaz, cytochromów, akonitazy mitochondrialnej, dehydrogenaz, reduktaz rybonukleotydowych, uczestniczących w podstawowych procesach





Ryc. 1. Obrót żelaza w organizmie w warunkach fizjologicznych. W przeciętnej diecie człowiek spożywa 10–15 mg żelaza, z czego wchłania się do krwi około 10%, co w zupełności wystarcza na pokrycie dziennych strat. Do erytropoezy dziennie zużywane jest 20–36 mg żelaza, a ilość ta jest prawie całkowicie pokrywana przez żelazo odzyskane z rozpadłych erytrocytów (25 mg dziennie) i pochodzące z tkankowych magazynów (około 1000 mg w wątrobie, śledzionie, szpiku). Żelazo znajdujące się w organizmie podlega stałej wymianie między tkankami. Ilość żelaza znajdująca się w danej chwili w osoczu krwi (około 3 mg) podlega prawie dziesięciokrotnej wymianie w ciągu doby (co stanowi 35 mg/24 h). Ilość żelaza wydalana w ciągu doby z ustroju równa się tej wchłanianej z pożywienia (około 0,5–1,5 mg/24 h). Do dodatkowej utraty żelaza może dojść podczas krwawień miesięcznych (0,5–1,0 mg/24 h). W stanach patologicznych przedstawione stosunki mogą ulec zmianie. Liczby odpowiadają ilości wchłanianego, zmagazynowanego, zużywanego lub wydalanego żelaza (zmodyfikowane według [66,73,105])

metabolicznych, takich jak synteza kwasów nukleinowych oraz transport tlenu i elektronów. Jony żelaza warunkują aktywność białek transportujących żelazo (hemoglobiny i mioglobiny), jako dodatkowy czynnik lub kofaktor uczestniczą w wielu przemianach metabolicznych ustroju, w tym: syntezie i katabolizmie niektórych hormonów, wytwarzaniu limfokin i innych substancji ważnych dla aktywności limfocytów, procesie fagocytozy, wytwarzaniu związków bogatoenergetycznych, syntezie kolagenu, procesach detoksyfikacyjnych różnych związków, w tym leków, w procesach unieszkodliwiania reaktywnych form tlenu. Wpływają ponadto na cykl komórkowy, różnicowanie i proliferację komórek przez regulację transkrypcji kilku genów (kinazy białkowej C- β , syntazy tlenu azotu, p21), są niezbędne do tworzenia osłonki mielinowej nerwów oraz wypustek komórek nerwowych. Udział żelaza w wielu przemianach metabolicznych wynika z jego właściwości chemicznych: żelazo występuje w dwóch stanach utlenienia, w postaci jonów Fe^{2+} (jonów żelazawych) oraz Fe^{3+} (jonów żelazowych), dzięki czemu może być zarówno akceptorem, jak i donorem elektronów [18,66,71,93,100].

Organizm dorosłego, zdrowego człowieka zawiera 3,5–4,2 g żelaza, z czego około 3 g są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania, reszta to rezerwa czynnościowa znajdująca się w ferrytynie i hemosyderynie. Większa część żelaza (60–70%) pozostaje związana w hemoglobinie krążących erytrocytów, 5–6% wchodzi w skład mioglobiny oraz różnych enzymów, niespełna 1% pozostaje związane z transferyną osoczną i pozaosoczną, a pozostałe 20–30% to żelazo zgromadzone w postaci ferrytyny i hemosyderyny głównie w hepatocytach i makrofagach wątroby [66,93].

METABOLIZM ŻELAZA

Metabolizm żelaza w ustroju obejmuje: 1) absorpcję w przewodzie pokarmowym, 2) transport do wszystkich komórek organizmu, 3) przejście żelaza przez błonę komórkową, 4) udział w procesach metabolicznych, 5) odzyskiwanie żelaza z rozpadłych erytrocytów oraz 6) procesy

magazynowania żelaza. Obrót żelaza w ustroju człowieka przedstawiono schematycznie na ryc. 1. Szczególną cechą przemiany żelaza jest to, że przebiega ona w dużej części w układzie zamkniętym: fizjologicznie małe ilości żelaza są wchłaniane z przewodu pokarmowego i nieznaczne ilości są wydalane [100]. W przeciętnej diecie człowiek spożywa 10–15 mg żelaza w postaci hemowej i niehemowej, z czego wchłania się do krwi około 10%, przy czym żelazo hemowe wchłania się prawie w 22%, a niehemowe – zaledwie w 2–5% [66].

W pożywieniu znajduje się żelazo zarówno dwu-, jak i trójwartościowe. W żołądku jest uwalniane ze związków organicznych i w jego kwaśnym środowisku w znacznej części redukowane do postaci Fe^{2+} , która jest rozpuszczalna w wodzie i wchłaniana w jelicie, w optymalnym pH. Żelazo trójwartościowe w środowisku alkalicznym tworzy nierozpuszczalne kompleksy, które nie wchłaniają się w dalszych częściach przewodu pokarmowego. Mukopolisacharydy w soku żołądkowym tworzą rozpuszczalne związki z żelazem, przechodzące do dwunastnicy, co chroni część Fe^{3+} przed wytrąceniem się tutaj niewchłanianych stratów. Ze wspomnianych względów zmniejszenie kwasności soku żołądkowego upośledza wchłanianie żelaza pokarmowego. Korzystne jest spożywanie w diecie i z suplementami żelaza odpowiedniej ilości związków redukujących, np. kwasu askorbinowego (witaminy C) [5,66,73,100,105].

We wchłanianiu jonów żelaza z pokarmu uczestniczą enterocyty jelita cienkiego, głównie dwunastnicy i górnego odcinka jelita czczego. Komórki te są spolaryzowane. Ich warstwa szczytowa (apikalna), tj. skierowana do światła jelita jest wyspecjalizowana w transporcie jonów żelaza do komórki. W transporcie tym uczestniczą białka importujące żelazo: DMT1 (transporter metali dwuwartościowych) oraz współdziałający z nim dwunastniczy cytochrom b (Dcytb),

który redukuje żelazo zawarte w pokarmie. Podstawna (bazalna) część nabłonka, tj. skierowana w stronę naczyń krwionośnych jest wyposażona w białka uwalniające żelazo: ferroportynę (Fpn) oraz pomocniczą hefajstynę (Heph), która utlenia żelazo z Fe^{2+} do Fe^{3+} , co jest warunkiem jego przejścia z enterocytów do krwi [5,71,93,100]. W komórkach nabłonka jelitowego część żelaza łączy się z wielko-cząsteczkowym białkiem apoferrytyną, tworząc ferrytynę. Jony Fe^{2+} przechodzą przez kanały w cząsteczce ferrytyny do jej wnętrza i tu ulegają utlenieniu do jonów Fe^{3+} ; w tej postaci żelazo jest magazynowane w komórce [100]. Część komórek przekazuje uwalniane z ferrytyny żelazo do łożyska naczyniowego, część komórek wypełnionych żelazem złącza się do światła jelita, skąd żelazo zostaje wydalone [66]. Żelazo wchłonięte do krwi łączy się z białkiem transportującym – transferyną (TF, syderofiliną; postać bez żelaza to apotransferyna). Jedna cząsteczka tego białka wiąże dwa atomy Fe^{3+} i transportuje je do większości komórek ustroju, w tym do szpiku kostnego, gdzie żelazo jest wykorzystywane w procesie erytropoezy, czyli tworzenia krwinek czerwonych. Transferyna wysycana żelazem jest wychwytywana przez swoiste receptory na powierzchni komórek. Kompleks receptor-TF z żelazem ulega internalizacji w procesie endocytozy, a żelazo jest uwalniane w kwaśnym środowisku utworzonego endosomu. Kompleks receptor-TF wraca na powierzchnię komórki, TF w fizjologicznym pH odłącza się od niego i jest gotowa do transportu kolejnych jonów żelaza.

W cytoplazmie jony żelaza są gromadzone w postaci ferrytyny i w ten sposób magazynowane w komórce. Jedna cząsteczka apoferrytyny może związać nawet 4500 atomów żelaza; stąd żelazo może być szybko uruchomione na potrzeby erytropoezy. Żelazo może być ponadto magazynowane w postaci hemosyderyny, którą tworzą micelle żelaza zagregowane z białkiem w części zdenaturowanym. Hemosyderyna prawdopodobnie jest produktem degradacji ferrytyny. W hemosyderynie gromadzą się większe ilości żelaza, ale uwalniane jest ono znacznie trudniej niż z ferrytyny. Żelazo jest magazynowane głównie w hepatocytach, skąd może być uwalniane w razie jego niedoboru. Funkcję recyrkulacji żelaza pełnią natomiast makrofagi wątroby i śledziony, które fagocytują stare lub uszkodzone erythrocyty, a żelazo uwolnione podczas degradacji hemu odprowadzają do krążenia lub magazynują w postaci ferrytyny. Makrofagi te charakteryzują się intensywnym metabolizmem żelaza. Dzięki recyrkulacji żelaza w tych komórkach do krwi trafia w ciągu doby około 20 mg żelaza, czyli 10 razy więcej niż dobowy absorpcja w jelicie [71].

Kontrola homeostazy żelaza na poziomie całego organizmu odbywa się przez kontrolę jego absorpcji w przewodzie pokarmowym oraz uwalniania z tkankowych magazynów (głównie komórek układu siateczkowo-śródbłonkowego). W przypadku niedoboru wzrasta jego wchłanianie w jelitach: mniej żelaza łączy się z apoferrytyną, a więcej przechodzi przez enterocyty do krążenia. W tej sytuacji również makrofagi uwalniają zmagazynowane żelazo. W stanach nadmiaru żelaza większość tego pierwiastka pobieranego przez enterocyty łączy się z apoferrytyną i jest usuwane z przewodu pokarmowego ze złączającym się nabłonkiem (tzw. śluzówkowy blok wchłaniania żelaza) [73]. Jednocześnie następuje zahamowanie uwalniania żelaza z makrofagów. Obecnie za główny czynnik regulujący

wspomniane procesy uważa się hepcydynę – białko wytwarzane w hepatocytach i uwalniane do krążenia [5,71,93]. Hepcydyna hamuje wchłanianie żelaza z enterocytów do krążenia oraz ogranicza uwalnianie żelaza z makrofagów, czego skutkiem jest obniżenie surowiczych poziomów żelaza. Aktywność hepcydyny wynika z jej zdolności do wiązania i inaktywacji ferroportyny, transportera usuwającego żelazo z komórek. Ekspresja hepcydyny jest indukowana przez pulę labilnego żelaza w komórkach. Z kolei za regulację homeostazy żelaza na poziomie komórek u ssaków odpowiadają dwa cytoplazmatyczne białka: IRP1 i IRP2 (iron regulatory proteins). Białka te wiążą się do swoistych niekodujących sekwencji w mRNA m.in. ferrytyny i receptora transferyny. Sekwencje te mają strukturę szpilki do włosów i są określane jako IRE (iron responsive element). IRP wiążą się z IRE w warunkach niedoboru żelaza, czego skutkiem jest zahamowanie translacji mRNA ferrytyny oraz stabilizacja mRNA receptora transferyny. W komórkach o dużym stężeniu żelaza odbywa się odwrotna regulacja, wynikająca z braku interakcji IRP z IRE. Skutkiem regulacji za pomocą białek IRP jest normalizacja komórkowego poziomu żelaza [5,18,71,100]. Przypuszczalnie zasadnicze znaczenie ma regulacja poziomu żelaza w hepatocytach, gdzie wytwarzana jest hepcydyna. Poziom żelaza w hepatocytach musi podlegać takiej regulacji przez białka IRP, by poprzez wpływ na ekspresję hepcydyny, zsynchronizować ilość żelaza uwalnianego z enterocytów i makrofagów z intensywnością jego wykorzystania w organizmie. Na przykład duże stężenia żelaza w hepatocytach, oznaczające jego zapasy w organizmie, indukują wytwarzanie hepcydyny, która hamuje dalsze wchłanianie żelaza w przewodzie pokarmowym i jego uwalnianie z makrofagów [71].

ZABURZENIA METABOLIZMU ŻELAZA

Dla organizmu niekorzystny jest zarówno niedobór, jak i nadmiar żelaza. Pierwszy prowadzi do rozwoju niedokrwistości, drugi – do hemosyderozy lub hemochromatozy. Ze względu na to, że nadmiar żelaza w warunkach fizjologicznych jest wydalany, najczęściej stwierdza się różnego stopnia niedobory żelaza (syderopenie). Są one skutkiem niedostatecznej podaży (błędy i przyzwyczajenia dietetyczne), zwiększonego zapotrzebowania i zużycia (okres wzrostu, ciąża, laktacja, rekonwalescencja), zaburzeń wchłaniania (choroby przewodu pokarmowego) oraz zwiększonej utraty krwi (krwawienia miesięczne, krwawienia z żyłaków odbytu i przelyku oraz owrzodzeń żołądka). Utajone stadia rozwoju niedoboru żelaza są określane jako syderopenia bez niedokrwistości. Towarzyszą im zróżnicowane objawy. Na początku obniża się sprawność fizyczna i umysłowa, charakterystyczna jest niewspółmierna niechęć do jakichkolwiek wysiłków, drażliwość, senność, bóle i zawroty głowy. Objawy te nasilają się w okresie jawnej niedokrwistości (anemii) z niedoboru żelaza. Pojawiają się zaburzenia łaknienia (tzw. łaknienie spaczone: jedzenie ziemi, tynku itp.), apatia, duszność, kołatanie serca, bóle wieńcowe, tachykardia. Zjawisko to wiąże się z niedoborem enzymów zawierających żelazo, biorących udział w cyklu oddechowym komórek, głównie serca i mózgu. Niedobór enzymów zawierających żelazo jest też przyczyną zmian zanikowych śluzówki języka i dziąseł, powstawania zajadów, zmian zanikowych śluzówki żołądka. Dochodzi ponadto do uszkodzenia włosów i paznokci, które stają się kruche



i łamliwe, obniża się odporność na zakażenia. W okresie jawnej niedokrwistości spada liczba erytrocytów i stężenie hemoglobiny we krwi obwodowej.

W celu oceny zapasów żelaza w ustroju stosuje się pomiar stężenia ferrytyny i transferryiny oraz rozpuszczalnych receptorów transferryiny w surowicy. Wykonuje się również badanie tzw. całkowitej zdolności wiązania żelaza (TIBC) przez transferryinę, stężenia żelaza w surowicy, wchłaniania żelaza z przewodu pokarmowego, rzadziej wydalania żelaza z moczem i kinetyki żelaza radioaktywnego. W późniejszym okresie niedoborów, gdy rozwija się niedokrwistość, wartość mają badania: stężenia hemoglobiny i liczby krwinek czerwonych we krwi, średniej objętości krwinki czerwonej (MCV), średniej masy hemoglobiny (MCH) i średniego stężenia hemoglobiny (MCHC) w erytrocycie, rozkładu barwności erytrocytów (HDW) oraz rozkładu objętości erytrocytów (RDW) [58,66,73,105].

Zapobieganie niedoborom żelaza ma podstawowe znaczenie w zapobieganiu niedokrwistości z niedoboru żelaza. Najprostszym sposobem jest wzbogacenie diety w produkty zawierające żelazo. Bogatym źródłem żelaza w pożywieniu są wątróbka, nerki, ziarna słonecznika, soja, kielki pszenicy, otręby, czerwone wino, przy czym należy pamiętać, że najlepiej przyswajalne jest żelazo związane z hemem (to żelazo dwuwartościowe, znajdujące się w pokarmach pochodzenia zwierzęcego: mięso, wędlina, wątróbka, nerki). Niektóre związki (fityniany, szczawiany, taniny, fosforany, wapń) obniżają przyswajalność żelaza z pożywienia, stąd takie pokarmy jak m.in.: mleko, jaja, herbata, kawa, szpinak utrudniają wykorzystanie żelaza z diety. Korzystnie działają: kwas askorbinowy, kwas bursztynowy, fruktoza, cysteina, glutation, zawarte m.in. w sokach owocowych, papryce, kwaszonej kapuście, czerwonym winie. Często wyrównanie niedoborów wymaga użycia preparatów żelaza. Najczęściej stosuje się doustne suplementy żelaza, które jednak nie zawsze charakteryzują się dobrą przyswajalnością i dość często dają uciążliwe objawy niepożądane, takie jak: zaburzenia trawienne, nudności, biegunkę lub zaparcia, metaliczny posmak w ustach, rzadko wysypkę uczuleniową. Objawy te mogą spowodować konieczność odstawienia leku lub zmiany na inny [58,66,105].

LAKTOFERRYNA JAKO WIELOFUNKCJONALNA GLIKOPROTEINA

Laktoferryina (LF) jest glikoproteina należącą do rodziny transferyn wykazujących zdolność chelatowania żelaza. Występuje w wydzielinach komórek nabłonkowych ustroju (w większych ilościach w sianie, mleku, łzach, w mniejszych w ślinie, wydzielinie dróg oddechowych, dróg rodnych, soku żołądkowym i in.) oraz ziarnistościach wtórnych neutrofilów, skąd może być uwalniana podczas degranulacji tych komórek [57,68]. Zjawisko to jest przyczyną wzrostu stężeń LF w tkankach i krążeniu podczas zakażeń, zapalenia i urazów [67]. LF jest jednym z podstawowych składników odporności wrodzonej ustroju. Wykazuje aktywność wobec różnorodnych bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich, wirusów otoczkowych i bezotoczkowych oraz różnych rodzajów grzybów i pasożytów [86]. Ponadto działa przeciwzapalnie [9,65], przeciwnowotworowo [110], immunoregulatorowo [21,69] oraz uczestniczy w regulacji hematopoezy [7,97]. Jak dotąd laktoferryinie poświęcono wiele badań laboratoryjnych, przedklinicznych i klinicznych. Uzyskane

wyniki wskazują na jej przydatność w profilaktyce i terapii chorób autoimmunizacyjnych i neoplastycznych, niedoborów immunologicznych, zakażeń, sepsy, bakteriemii i endotoksemii oraz odnowie funkcji układu immunologicznego po chemioterapii. Zachęcające wyniki badań pozwoliły zastosować białko w postaci dodatków do produktów przemysłu mleczarskiego i farmaceutycznego, które znalazły już zastosowanie jako suplement diety u dzieci i dorosłych.

LAKTOFERRYNA JAKO BIAŁKO WIĄŻĄCE ŻELAZO

Laktoferryina ma dwa miejsca odwracalnie wiążące żelazo z niezwykle dużym powinowactwem (stała dysocjacji (Kd) rzędu 10^{-20} M) do jonu żelazowego (Fe^{3+}) i o wiele mniejszym do jonu żelazawego (Fe^{2+}) [8]. Przyłączeniu żelaza do LF towarzyszy dołączenie anionu węglanowego lub dwuwęglanowego (CO_3^{2-}), a trójwymiarowa budowa ukazuje istnienie kieszeni między dwiema domenami, w których są „chowane” metal i anion. W wiązaniu każdego atomu metalu do białka uczestniczą trzy reszty tyrozynowe, dwie histydynowe oraz arginina wiążąca jeden anion. Przyłączenie/odłączenie żelaza może indukować zmiany struktury przestrzennej białka, gdyż proces ten jest związany z odczepieniem/przyłączeniem protonów (deprotonacja/protonacja) do aminokwasów łańcucha białkowego zaangażowanych w tworzenie mostków wodorowych w obrębie cząsteczki białka. Tak więc po przyłączeniu protonów, przerwanie mostków wodorowych i odłączeniu jonów struktura białka staje się „otwarta” (apo-LF); odłączenie protonów, odnowa mostków wodorowych i przyłączenie jonów „zamyka” cząsteczkę LF (holo-LF) [1,2,118]. Nowsze badania sugerują, że wolna od żelaza cząsteczka LF może fluktuować między postacią „otwartą” i „zamkniętą”, choć przeważa postać „otwarta” [8]. Jony żelaza po związaniu są „schowane” wewnątrz cząsteczki białka i niedostępne dla otaczającego roztworu [26]. Duże powinowactwo do żelaza można w części wytłumaczyć istnieniem niekwalencyjnych interakcji między płacami cząsteczki LF oraz obecnością łańcuchów cukrowych (całkowite usunięcie części cukrowej glikoproteiny prowadzi do utraty zdolności wiązania żelaza) [70]. Ludzka LF (HLF) wykazuje znacznie większe powinowactwo do żelaza niż LF bydlęca (BLF), co wynika z nieco odmiennych interakcji międzydomenowych w cząsteczkach obu białek oraz pewnych różnic w składzie aminokwasowym okolicy wiążącej metal, co sprzyja jego łatwiejszemu uwalnianiu z BLF [82]. Właściwości wiązania jonów LF dzieli z transferyną, która podobnie przyłącza 2 jony Fe^{3+} , przy czym jej powinowactwo do metalu jest około 360-krotnie mniejsze niż LF. Proces przyłączania i odłączania jonów przez obydwie białka jest w dużym stopniu zależny od pH środowiska; TF traci żelazo już w lekko kwaśnym środowisku (pH~6), podczas gdy LF dopiero przy dużym zakwaszeniu (pH<3,5) [2]. Wynika to z pewnych różnic w strukturze cząsteczki, powodujących, że cięcie międzydomenowych mostków wodorowych pod wpływem protonacji w cząsteczkach transferyny występuje łatwo, a w przypadku LF wymaga dodatkowych zmian konformacyjnych cząsteczki [2]. Nowe badania wskazują ponadto, że wyjątkowo stabilne wiązanie żelaza przy niskim pH wynika ze ścisłych interakcji między dwoma płacami cząsteczki LF, które nie występują w TF [8]. Łącznik między płacami stanowi krótki peptyd (10–15 reszt aminokwasowych), tworzący stabilną α -helisę w cząsteczce LF, a płynną, rozciągniętą i nieregularną strukturę

w TF. 1 mg bydłej LF o masie 80 kDa i 2 miejscach wiążących metal/cząsteczkę może związać około 1,4 μg żelaza [83]. Jak się okazało, LF może również wiązać jony żelaza przez dodatkowe, poza wspomnianymi dwoma rowkami, miejsca w cząsteczce [82]. Miejsca te mogą z mniejszym powinowactwem wiązać dodatkowe ilości metalu, nawet w środowisku bogatym w żelazo, gdy białko znajduje się już w stanie całkowitego wysycenia. Zwiększa to dodatkowo jego właściwości stabilizujące wolne żelazo w roztworach. Związanie żelaza stabilizuje cząsteczkę LF i czyni ją mniej podatną na degradację enzymatyczną [19,23] oraz denaturację termiczną [88].

LF endogenna jest wysycona żelazem w niewielkim stopniu (do kilku-kilkunastu procent), występuje zatem w postaci apo-LF [24,38,47,83,109,112]. Dotyczy to zarówno białka obecnego w wydzielinach, jak i wytwarzanego w neutrofilach. Trudno jest ocenić rzeczywisty stopień wysycenia żelazem LF w komórce, ale najprawdopodobniej jest on niewielki. Badania wysycenia LF żelazem przeprowadzano bowiem już po uwolnieniu białka z komórek. Można przypuszczać, że LF uwolniona zarówno z neutrofilów, jak i komórek nabłonkowych może wiązać żelazo w przestrzeni międzykomórkowej i płynach ustrojowych, stąd wysycenie żelazem może nieco wzrastać po uwolnieniu białka z komórki. Jak sugerują niektórzy autorzy, białko uwolnione z aktywnych neutrofilów (np. komórek fagocytujących, zdolnych osiągnąć wybuch oddechowy) nabywa żelazo jeszcze wewnątrz komórki. Jego źródłem może być ferrytyna. Białko uwolnione pasywnie podczas śmierci komórek nie zostaje wysycone żelazem wewnątrzkomórkowo [35,99], co jednak nie wyklucza nabycia żelaza po uwolnieniu z komórki. Procedury stosowane przy izolacji LF z neutrofilów (destrukcja komórek podczas kilkakrotnie powtarzanych procesów zamrażania i rozmrażania zawiesiny komórkowej) również sprzyjają uwolnieniu wewnątrzkomórkowych zapasów żelaza, które może następnie wysycić LF. Nawet niewielka zawartość żelaza (poniżej 20%) nadaje wyizolowanemu białku kolor lekko różowy. Zastosowanie odpowiednich procedur pozwala na całkowite pozabawienie LF żelaza (liofilizat białka uzyskuje kolor biały), jak i znaczne wzbogacenie w żelazo (holo-LF). Obie postaci LF, podobnie jak białko natywne, są używane w badaniach.

Należy zauważyć, iż w układach *in vitro*, w których obecna jest surowica oraz wszystkich *in vivo*, apo-LF może nabyć żelazo z innych białek obecnych w płynach ustrojowych i mających zdolność do jego chelatowania (np. ferrytyny lub transferyny), za czym przemawia duże powinowactwo białka do metalu oraz łatwość jego pozyskiwania i trwałego utrzymywania szczególnie w środowisku kwaśnym [2,39]. Zatem słusznym wydaje się przypuszczenie, że LF dodana do układów *in vitro*, w których znajduje się surowica, nabywa żelazo i staje się postacią holo-. Podobnie, podana doustnie nabywa żelazo z diety. Trudno więc być do końca pewnym, czy wyjściowo używając apo-LF ocenia się efekty działania tej postaci białka, czy raczej już postaci częściowo wysyczonej żelazem.

DEGRADACJA LAKTOFERRYNY – UDZIAŁ LAKTOFERRYNY W MAGAZYNOWANIU ŻELAZA W USTROJU

W usuwaniu LF oraz kompleksów LF-żelazo główną rolę pełni wątroba, w której układzie siateczkowo-śródbłon-

kowym (RES) dochodzi do degradacji białka, a uwolnione żelazo przedostaje się do hepatocytów, gdzie może być magazynowane w postaci ferrytyny [13,91,109]. Wykazano także udział innych komórek wątroby: komórek miąższowych (hepatocytów) oraz komórek śródbłonkowych w procesie usuwania LF z krążenia [89]. Niektóre badania wskazują ponadto na udział śledziony [13] oraz makrofagów otrzewnowych [108] w metabolizmie białka. Degradacja LF w dużej części odbywa się w układzie, w którym dochodzi również do usuwania starych krwinek czerwonych, recyrkulacji żelaza oraz przemiany hemoglobiny w barwniki żółciowe.

Sprawny system usuwania i degradacji LF sprawia, że stężenia białka w surowicy są niewielkie i nawet w warunkach zapalenia z dużą liczbą krążących neutrofilów dość szybko ulegają obniżeniu. W testach, w którym zdrowym dorosłym podano dożylnie ludzką LF znakowaną I^{125} w ciągu pierwszych 24 h wykryto w moczu prawie całą ilość I^{125} w postaci wolnej, co wskazuje na całkowitą eliminację LF z krążenia [13]. Po dożylnym podaniu myszom i małpom rekombinacyjnej HLF (rHLF) (w dawkach do 10 mg/kg m.c.) oznaczone stężenia białka w surowicy wynosiły odpowiednio do 120 i 88 mg/ml, a okres półtrwania ($T_{1/2}$) rHLF był krótszy niż 1,5 h u obu gatunków. Po dootrzewnowym podaniu białka szczurom największe stężenia w surowicy mierzono po upływie 2–4 h, a po 24 h LF nie była już wykrywalna w surowicy [3,4]. Znakowana ludzka LF podana dożylnie myszom była szybko eliminowana z krążenia: już po 15 min od iniekcji w wątrobie wykryto 75% podanego białka [92]. Co ważne, LF wykryto nie tylko w komórkach RES, ale też w komórkach śródbłonka zatok naczyń i ścianek żył centralnych zrazików [92]. Współczynnik usuwania ludzkiej LF wyizolowanej z mleka oraz pochodzenia neutrofilowego podanych dożylnie myszom były podobne [81]. Badania na szczurach, którym podano dożylnie znakowaną I^{125} BLF wykazały eliminację dużej części białka z krążenia w ciągu pierwszych 60 min po iniekcji, z okresem półtrwania około 28 min [59]. Czas ten był prawie 6-krotnie krótszy niż dla TF. Cytowane badania farmakokinetyczne wykazały też, że białko było akumulowane głównie w wątrobie, śledzionie i nerkach.

Ciekawych wyników dostarczyły testy na szczurach, którym podano dożylnie HLF wyizolowaną z mleka i oznaczano stężenia białka we krwi [109]. Okazało się, że białko jest usuwane z krążenia w różnym czasie, zależnie od stopnia wysycenia żelazem: okres półtrwania dla holo-LF wyniósł około 30 min, podczas gdy dla natywnej LF (tj. wysyczonej żelazem 15–20%) – około 60 min, a blokada układu RES wydłużyła ten czas dla holo-LF do około 100 min [109]. W badaniach na ludziach, którym dożylnie podano HLF również wykazano szybszą eliminację z krążenia białka wysyczonego żelazem niż postaci apo-LF [13]. Znacznie szybszą eliminację holo-LF po dożylnym podaniu zanotowano w badaniach na modelu mysim, z okresem półtrwania około 1–2 min [53]. Endogenna LF uwolniona do krążenia podczas degranulacji neutrofilów w czasie zabiegu chirurgicznego była eliminowana dwufazowo: okres półtrwania pierwszej fazy wynosił 45 min, a fazy drugiej, wolniejszej – 9 h [111]. Podobnie, Bennett i Kokociński zanotowali dwufazową eliminację znakowanej radioaktywnym jodem ludzkiej LF po dożylnym po-



daniu zdrowym ochotnikom (dla fazy pierwszej $T_{1/2}=1,26$ h oraz dla fazy drugiej – 16,63 h [13]. Badania u pacjentów bez krążących neutrofilów, którzy otrzymali przeszczep szpiku po wcześniejszym przygotowaniu mieloablacyjnym wykazały, że usuwanie LF z krążenia odbywa się szybko według krzywej logarytmicznej, z początkowym okresem półtrwania 2,2 h [12] lub 3 h [101]. Podniesiony po infuzji szpiku poziom LF we krwi powrócił do stanu wyjściowego po 18 h od przeszczepu [12].

Jak stwierdzono, usunięta z krążenia LF ulega degradacji w lizosomach makrofagowych, przy czym *in vitro* nie jest łatwo rozkładana przez lizosomalne hydrolazy, co może tłumaczyć dość długi czas połowicznego rozkładu białka. Różni się on także w zależności od wysycenia żelazem: postać holo- jest degradowana i znika z makrofagów z okresem półtrwania 14,5 h, a postać apo – 4,2 h [109]. Czas połowicznego rozpadu LF wysyczonej żelazem w wątrobie oznaczony w innym badaniu był jednak znacznie krótszy i wyniósł około 3 h [91]. Większa trwałość holo-LF nie jest zaskoczeniem, gdyż wiadomo, że wiązanie jonów stabilizuje cząsteczkę i postać wysyczona żelazem jest bardziej oporna na degradację przez enzymy proteolityczne [19,23]. Różnic w trawieniu obu postaci białka nie udało się jednak potwierdzić *in vivo*: czas i stopień ich strawienia w żołądku ludzi był taki sam [107], co może się wiązać z czasowym odłączaniem metalu od cząsteczki białka w kwaśnym środowisku soku żołądkowego (nie można wykluczyć ponownego wiązania w słabo alkalicznej treści jelita cienkiego). Żelazo do makrofagów (w tym układu RES wątroby) może dostarczać również TF, ale odmiennie od LF, białko to po związaniu do receptora, endocytozie i oddaniu jonów wewnątrz komórki, ulega uwolnieniu w nienaruszonej postaci. Degradacja i usuwanie TF zachodzi w hepatocytach.

UDZIAŁ LAKTOFERRYINY W DOSTARCZANIU ŻELAZA KOMÓRKOM USTROJU

Na podstawie dotychczasowych danych trudno ostatecznie wnioskować o roli LF w dostarczaniu żelaza komórkom ustroju. Istnieją prace wskazujące, iż LF, analogicznie do TF, może być „dostawcą” tego składnika do komórek. Wysyczona żelazem LF stymulowała proliferację ludzkich limfoblastów T [15] oraz T i B [48] w hodowli zubożonej w surowicę. Działanie LF było podobne do efektu uzyskanego w obecności osoczowej TF, a zanikało, gdy komórki umieszczono w bogatym medium. Wyniki te wskazują zatem, że LF, podobnie jak TF, może skutecznie dostarczać żelazo do komórek. Inne badania jednak nie potwierdziły tych obserwacji. Wysyczona żelazem LF nie stymulowała proliferacji limfocytów T, nie mogła bowiem „zastąpić” TF jako „dostawcy” pierwiastka do komórek [33]. W innym teście wykazano, że LF nie dostarczała żelaza do ludzkich retikulocytów [27]. Komórki ludzkiej białaczki erytroidalnej linii K562 wiązały wprawdzie i internalizowały LF, ale w przeciwieństwie do TF, na wiązanie LF nie wpływał poziom żelaza komórkowego. Uzyskane wyniki wskazują, że komórki nie mogą pobierać żelaza z LF [117]. Badania Ismaila i Brocka wykazały brak internalizacji LF przez komórki linii monocytowej U937 i bardzo niewielki stopień nabywania przez nie żelaza z LF, podczas gdy duże ilości metalu były dostarczane przez TF [55]. Związanie LF do komórek indukowało uwalnianie do medium związanego przez nią żelaza, które dalej było „wyłapywane” przez TF.

Zatem niewielki stopień nabywania żelaza przez komórki podczas inkubacji z holo-LF może wynikać z „transferu” pewnej ilości żelaza związanego do LF na TF. LF hamowała komórkowy pobór żelaza mineralnego z medium, ale nie tego związanego do TF. Pobór żelaza z LF przez monocyty i makrofagi ludzkie stwierdzili Moguilevsky i wsp. [80] oraz Birgens i wsp. [17]. Żelazo dostarczone do komórek było wiązane do ferrytyny. W innych testach na ludzkich monocytach określono właściwości HLF po interakcji z komórkami [16]. Jak się okazało, ponowne wiązanie LF do komórek było uszkodzone prawdopodobnie z powodu zmiany właściwości LF widocznej jako obniżenie wartości punktu izoelektrycznego (bez wpływu na właściwości antygenowe, zdolność wiązania żelaza i masę molekularną). Wyniki te sugerują, że LF nie może raczej funkcjonować jako cykliczny „dostawca” żelaza do komórek. Inne badania wykazały, że LF może się wiązać do powierzchni oraz dostarczać jony żelaza komórkom mieloidalnym linii HL-60 (ludzkiej białaczki promielocytowej) [84]. Proces nie był hamowany przez usunięcie ATP i uszkodzenie cytoszkieletu i był znacznie intensywniejszy po ekspozycji komórek na jony metali wielowartościowych (np. Cu^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} i in.). Około 60% pobranego żelaza pozostawało w komórkach przez 18 h. Zdolność do nabywania żelaza związanego do LF miały też szczurze hepatocyty [75]. Holo-BLF po związaniu do powierzchni tych komórek ulegała internalizacji i kolejno wewnątrzkomórkowej degradacji stając się źródłem żelaza dla komórek. Jak wskazują wstępne badania na myszach, receptory LF na łożysku mogą odgrywać pewną rolę w dostarczaniu żelaza z ustroju matki do płodu. Jak wykazano, u myszy karmionych dietą z małą zawartością żelaza, komórki łożyska ekspresjonowały większą liczbę receptorów LF [103].

Według van Snicka i wsp. wyposażone w receptory kompleksu LF-żelazo makrofagi są zdolne do pobierania metalu z LF i wbudowywania go do ferrytyny [108]. Autor ten jest twórcą tzw. hipotezy laktoferryinowej tłumaczącej występowanie hipoferrerii i niedokrwistości w stanach zapalnych [109]. Według tej hipotezy, ze względu na duże powinowactwo do żelaza, LF uwolniona z aktywowanych granulocytów odbiera żelazo transferryiny lub współzawodniczy z nią o wychwytywanie metalu uwolnionego podczas rozpadu hemoglobiny oraz komórek bakteryjnych i odpornościowych gospodarza i przenosi je do układu siateczkowo-śródbłonkowego, głównie w wątrobie, gdzie jest ono magazynowane i niedostępne dla procesów erytropoezy. Uwolnione po degradacji LF żelazo jest gromadzone w postaci ferrytyny stanowiąc tzw. powolny szlak obrotu żelaza, w którym okres połowicznego obrotu pierwiastka wynosi około 7 dni. W badaniach u zdrowych ludzi (znakowane Fe^{59} białko podane dożylnie) stwierdzono obecność radioaktywności w wątrobie i śledzionie przez kilka tygodni i wolne jej przenoszenie do szpiku kostnego przed pojawieniem się w krążących erytrocytach [13]. Ta powolna droga obrotu żelaza nabiera większego znaczenia w zapaleniu, podczas gdy w stanie zdrowia istnieje równowaga pomiędzy szlakiem „szybkim” (z okresem połowicznego obrotu 24 min) a szlakiem „powolnym” [108]. W warunkach prawidłowych uwalniane żelazo wiąże się z TF, która przenosi je prawie w całości do komórek erytropoetycznych. Konkurencyjne w stosunku do TF wychwytywanie żelaza przez LF neutrofilową doprowadza zatem do czasowego niedoboru tego pierwiastka.

Obniżenie poziomu osoczowego żelaza jest obserwowane u zwierząt i ludzi podczas wielu chorób infekcyjnych i zapalnych oraz ciężkich urazów. Jednocześnie stwierdza się akumulację żelaza w wątrobie (wzrost hepatocytowej puli ferrytyny), śledzionie i lokalnie w miejscach objętych zapaleniem oraz zmniejszone dostarczanie pierwiastka do szpiku kostnego i rozwój anemii (tzw. anemia zapalenia lub chorób chronicznych) [115]. Poziom metalu zaczyna spadać już we wczesnym okresie rozwoju choroby i osiąga wartość często o połowę niższą niż w zdrowiu, a niekiedy, przez krótki czas, żelazo jest w ogóle niewykrywalne we krwi [115]. Gdy organizm wraca do zdrowia, poziom żelaza szybko powraca do prawidłowych wartości. Podobny spadek stężenia jonów metalu we krwi zauważono po dożyłnej iniekcji endotoksyny, niektórych cytokin prozapalnych (np. IL-1), jak również laktoferryiny [60,90,120]. Badania sprzed kilku lat wskazują, że czynnikiem odpowiedzialnym za rozwój anemii w zapaleniu jest, wspomniana już, hepcydyna, której ekspresja prowadzi do opisanych zmian w cyrkulacji żelaza [5]. Podczas przewlekłych stanów zapalnych synteza hepcydyny jest indukowana niezależnie od żelaza przez mediatory zapalenia, np. IL-6 [71]. Nie można wykluczyć jednak istnienia dodatkowych mechanizmów regulujących omawiane procesy, których elementem może być LF. Redukcja poziomu żelaza może być spowodowana przez LF dostarczoną z zewnątrz oraz uwalniania z aktywowanych neutrofilów lub syntetyzowaną *de novo* w tkankach objętych zapaleniem [119]. Potwierdzeniem jest obserwowany podczas endotoksemii u prosiąt szybki spadek poziomu żelaza we krwi z towarzyszącym gwałtownym wzrostem poziomu LF [46].

Mechanizm, w którym LF jest zaangażowana w obniżenie poziomu żelaza poprzez umożliwienie jego magazynowania w układzie RES, może prawdopodobnie w pewnym zakresie uczestniczyć w regulacji poziomu pierwiastka również w stanie zdrowia [119]. Ma on korzystne znaczenie mikrobiostatyczne przez usuwanie żelaza ze środowiska wzrostu drobnoustrojów, a tym samym eliminacji tej patogennej mikroflory, która nie ma zdolności pozyskiwania pierwiastka z wiążących go białek ustroju. Niemniej istnieją badania, które nie potwierdziły związku hipoferremii w zapaleniu z laktoferryiną. Stwierdzono brak korelacji pomiędzy stężeniami LF we krwi a poziomem żelaza w organizmie [11] oraz rozwój hipoferremii nawet w przypadkach głębokiej neutropenii wywołanej przez cyklofosfamid, co wyklucza udział neutrofilów i LF w tym procesie [10,44]. U pacjentów z neutropenią wywołaną silną mieloablacją przed przeszczepem szpiku kostnego podczas rozwoju sepsy zanotowano znaczną hipoferremię, a LF w ich surowicy była praktycznie nieobecna [10]. Jednak u leukopenicznych szczurów podanie endotoksyny nie wywołało hipoferremii, podczas gdy wystąpiła ona u zwierząt z prawidłową liczbą leukocytów [115]. Rozbieżności wyników wskazują prawdopodobnie na istnienie wielu różnych mechanizmów regulacji poziomu żelaza w ustroju, co nie wyklucza udziału w tych procesach laktoferryiny.

Za brakiem znaczącego udziału LF w transporcie żelaza do komórek świadczy brak nieprawidłowości strukturalnych, funkcjonalnych i ilościowych tego białka u osób z rodzinną hemochromatozą, w której dochodzi do zaburzeń metabolizmu żelaza z jego gromadzeniem się w tkankach i skórze. Nie obserwowano m.in. różnic w dostarczaniu żelaza

do makrofagów przez LF wyizolowaną z neutrofilów pacjentów i osób zdrowych [80].

UDZIAŁ LAKTOFERRYINY W POBIERANIU ŻELAZA Z POŻYWIENIA

Wiele dotychczasowych danych sugeruje udział białka w pobieraniu pierwiastka z pożywienia. Niektóre badania wykazały, że odbywa się to poprzez zależną od receptora LF absorpcję żelaza związanego z białkiem przez komórki nabłonka jelit [27,29,63,78,104]. W testach *ex vivo*, pęcherzyki utworzone z błony komórkowej rąbka szczoteczki (brush-border membrane vesicles – BBMV) enterocytów jelita cienkiego noworodków rezusów gromadziły żelazo z cząsteczek ludzkiej LF, wiążącej się do błony komórkowej przez swoisty receptor [29]. Żelazo było pozyskiwane zarówno z natywnej, jak i częściowo strawionej LF. W podobny sposób był dostarczany do BBMV związany z LF mangan, choć powinowactwo wiązania było niższe niż dla Fe-LF. Podobne testy z użyciem BBMV z enterocytów ludzkich wykazały pobieranie żelaza z HLF wyizolowanej z siary [94]. Pobór żelaza związanego z LF był prawie dwukrotnie większy niż żelaza w postaci cytrynianu. Wielkość absorpcji zależała od czasu inkubacji i odczynu środowiska (maksymalna po 1 min, przy pH=7,5). Za udziałem receptora LF przemawia znacznie większy pobór żelaza przez ludzkie komórki nabłonkowe jelita linii Caco-2 transfekowane genem receptora HLF w porównaniu z komórkami kontrolnymi o konstytutywnie niskiej jego ekspresji [104]. W innych testach przedstawiono pobór żelaza związanego do LF przez komórki biopłatów dwunastniczych [27] oraz zróżnicowane komórki nabłonkowe raka okrężnicy (linii HT-29) [79]. W tym ostatnim przypadku liczba receptorów LF wzrastała po obniżeniu wewnątrzkomórkowego stężenia żelaza. Ekspresji receptorów LF towarzyszył większy (o około 30%) pobór żelaza związanego do białka. Cytowane wyniki sugerują, że biosynteza receptorów LF na komórkach nabłonka jelitowego może być regulowana w odpowiedzi na stężenie wewnątrzkomórkowego żelaza, wskazujące na wielkość zapasów tego pierwiastka w ustroju.

Swoisty receptor ludzkiej LF zidentyfikowano na komórkach nabłonka jelit płodów ludzkich [63,104]. Receptor LF znaleziono także na komórkach jelita u wielu innych gatunków ssaków: myszy [50,51,102], świń [43], królików [74] i małp [31]. W badaniach na Caco-2 wykazano, że LF może się wiązać do receptora na powierzchni enterocytów (od strony szczytowej), po czym ulega internalizacji [6]. Stwierdzono również wiązanie LF do receptorów na powierzchni szczytowej komórek ludzkiej linii raka okrężnicy HT-29cl.19A [78]. Absorpcja żelaza związanego z LF może też prawdopodobnie występować z udziałem receptora TF na nabłonku jelit [61]. LF może zatem dostarczać żelazo do komórek za pośrednictwem endocytozy zależnej od receptora, podobnej do tej, którą wykorzystuje transferyna. Nie jest to jednak dokładnie taka sama droga, gdyż LF ma zdolność utrzymywania żelaza w bardzo kwaśnym środowisku (pH poniżej 3,5), a zatem uwalnianie metalu w warunkach endosomu (pH ~5,0) jest niemożliwe [2]. Oddanie żelaza odbywa się dopiero po degradacji LF przez enzymy proteolityczne komórki [78] (przeciwnie do LF, TF oddaje związane żelazo w endosomie, po czym w wyniku egzocytozy „wraca” poza komórkę). W badaniach na ludzkich komórkach nabłonka jelita linii HT-29



stwierdzono, że aż 90% białka ulega degradacji po endocytozie do enterocytów, czemu towarzyszy uwolnienie żelaza [78]. Endocytoza TF odbywa się od strony podstawno-bocznej komórki, sugerując transport żelaza z płynu zewnątrzkomórkowego (czyli jego pozyskiwanie z płynów ustrojowych), podczas gdy endocytoza LF zachodzi od powierzchni szczytowej w kierunku powierzchni podstawno-bocznej enterocytów, wskazując udział w pobieraniu metalu ze światła jelita [6,78]. Dostarczone do komórek jelita żelazo jest odbierane przez TF i w takim kompleksie wchodzi do krążenia. W testach *ex vivo* na komórkach biopłatów z ludzkiej okrężnicy wykazano, że żelazo związane do cząsteczki LF było dostarczane do komórek bez internalizacji białka, co wskazuje, że pobór żelaza może być warunkowany jedynie jego uprzednim dostarczeniem do powierzchni komórki, bez konieczności internalizacji białka „nośnikowego”. W tych samych warunkach TF i oTF nie zwiększały poboru żelaza przez komórki [27].

Udział LF w absorpcji żelaza przez komórki jelita stwierdzony *in vitro* oraz *ex vivo*, wymaga dalszych badań i potwierdzenia *in vivo*. Jak dotąd na modelu zwierzęcym udało się wykazać, że podana *per os* wysycona żelazem LF podnosiła hematokryt oraz poziom hemoglobiny u szczurów z indukowaną doświadczalnie anemią dużo skuteczniej niż suplementacja żelaza mineralnego [62]. To wskazuje, iż żelazo skompleksowane z LF wchłania się z jelita dużo łatwiej niż wolne jony. Proces ten potwierdzają nowe wyniki próby klinicznej, w której LF podawano doustnie kobietom ciężarnym [87]. 300 kobiet w różnym okresie ciąży podzielono na 3 grupy, z których jedna nie otrzymywała suplementacji żelaza, druga przyjmowała doustne preparaty siarczanu żelazawego, a trzecia preparaty BLF wysyconej żelazem w 30% (100 mg dwa razy dziennie). Oznaczenia stężenia hemoglobiny i całkowitego żelaza osocznego po 30 dniach terapii wykazały spadek tych wartości u kobiet nieotrzymujących żadnych preparatów, podczas gdy w grupie przyjmującej LF zarówno stężenia hemoglobiny, jak i żelaza w osoczu wzrosły nawet bardziej niż w grupie przyjmującej preparaty nieorganicznego żelaza. Zaznaczyć należy, że ilości jonów żelaza dostarczane z siarczanem żelazawym (156 mg/dzień) były znacznie większe niż te dostarczane z LF (8,8 mg/dzień). Co ważne, LF nie wywoływała żadnych działań niepożądanych, które często towarzyszą leczeniu za pomocą preparatów nieorganicznego żelaza (nudności, wymioty, bóle brzucha). Autorzy badań sugerują wpływ LF na homeostazę żelaza bezpośredni, bądź pośredni poprzez inne białka zaangażowane w transport żelaza z jelita do krwi [87]. Testy, w których zdrowym dorosłym podawano mleko ludzkie (bogatsze w LF) lub krowie wykazały, że absorpcja żelaza z ludzkiego mleka była znacznie większa [77]. Badania na myszach z nokautem genu LF (LFKO^{-/-} niewytwarzających endogenne białko) wykazały jednak, że LF nie odgrywa istotnej roli w regulacji wchłaniania i gospodarki żelazem ustroju [114]. Wskaźniki homeostazy żelaza (całkowita zdolność wiązania żelaza, poziom żelaza w osoczu, wysycenie TF oraz akumulacja pierwiastka w tkankach) nie różniły się u myszy dzikiego szczepu i myszy nieekspresjonujących LF. Wyniki takie uzyskano zarówno u noworodków LFKO^{-/-} nieotrzymujących LF w diecie, jak i dorosłych myszy LFKO^{-/-}. Można je tłumaczyć najprawdopodobniej dużymi możliwościami kompensacyjnymi organizmu. Bydlęca LF podawana doustnie pacjentom

z zapaleniem wątroby typu C nie wpływała na wskaźniki metabolizmu żelaza: poziomy hemoglobiny, ferrytyny oraz żelaza w surowicy i stopień wysycenia ferrytyny [54,56,64]. Podobnie, doustna aplikacja rekombinacyjnej HLF pacjentom z infekcją *H. pylori* nie wpływała istotnie na surowicze poziomy ferrytyny i żelaza, choć można było obserwować pewien wzrost drugiego ze wskaźników [85].

Osobnego omówienia wymagają wyniki badań wpływu LF na absorpcję żelaza u osesków. LF obecna w mleku matki może prawdopodobnie ułatwiać nabywanie ważnych składników odżywczych, głównie żelaza, przez organizm dziecka, co potwierdza co najmniej kilka obserwacji. Mianowicie mleko to zawiera bardzo duże stężenia LF i część obecnego w nim żelaza jest związana do LF [38]. Biodostępność żelaza z ludzkiego mleka jest niezwykle duża – stąd wchłanianie się 50%, gdy z mleka krowiego jedynie 10% żelaza [96]. Przypadki niedoboru tego pierwiastka u dzieci karmionych piersią są rzadkie, mimo iż mleko ludzkie zawiera względnie małe ilości żelaza (0,2–0,4 mg/l; dla porównania w mieszankach mlecznych dla niemowląt to 8–12mg/l) [72,98]. Dzieci karmione wyłącznie piersią przez okres 8–18 miesięcy rozwijały się prawidłowo, miały prawidłowy poziom hemoglobiny i żelaza w surowicy [77]. Bardzo dobrą przyswajalność żelaza z ludzkiego mleka potwierdziły też testy na zdrowych dorosłych – absorpcja żelaza z mleka ludzkiego była znacznie większa niż z mleka krowiego [77]. To sugeruje bardzo dobrą dostępność tego pierwiastka z mleka ludzkiego, a także to, że odpowiada za nią LF.

Wydaje się, że w przewodzie pokarmowym osesków znaczna część LF pozostaje niestrawiona [30,52], może zatem odgrywać rolę w ułatwianiu absorpcji żelaza. Jak dotąd jednak nie udało się tego jednoznacznie potwierdzić, co może częściowo wynikać z różnic metodologicznych poszczególnych badań. Testy u niemowląt z wykorzystaniem znakowania radioizotopowego (Fe⁵⁹) wykazały większą absorpcję żelaza z mleka matczynego niż z mieszanek mlecznych dla niemowląt [96]. W nielicznych badaniach, na podstawie oznaczeń związków uczestniczących w metabolizmie żelaza, udało się pośrednio wskazać na przypuszczalny udział LF w absorpcji tego pierwiastka. U niemowląt karmionych odżywkami na bazie mleka krowiego niewzbogaconymi w żelazo stwierdzono gorsze wskaźniki gospodarki żelazem niż u dzieci karmionych piersią, mimo że zawartość żelaza w tych odżywkach była większa niż w mleku [95]. W podobnych testach na innej grupie niemowląt wchłanianie żelaza u dzieci karmionych piersią przez 6–7 pierwszych miesięcy życia było znacznie większe niż u dzieci karmionych odżywkami na bazie mleka krowiego [96]. U noworodków/niemowląt karmionych od urodzenia do 6 miesiąca życia mieszankami mleka modyfikowanego wzbogaconego w bydlęcą LF wykryto zwiększone stężenia osoczowej ferrytyny (świadczące o większych zapasach żelaza ustrojowego) w 90 i 150 dniu życia w stosunku do dzieci żywionych taką samą mieszanką, ale bez dodatku LF [25]. Dodatek większej ilości LF (100 mg/ml) dał większy wzrost stężeń ferrytyny w porównaniu z dodatkiem LF w ilości 10 mg/ml. Może to wskazywać na udział białka w absorpcji żelaza. Nie stwierdzono natomiast wzrostu hematokrytu, poziomu żelaza i hemoglobiny we krwi badanych dzieci. Ciekawych wyników dostar-

czyła niewielka próba kliniczna, obejmująca 8 niemowląt w wieku 2–10 miesięcy [32]. Dzieci karmiono mlekiem ludzkim pełnym lub pozbawionym LF, a absorpcję żelaza określano pośrednio poprzez pomiar inkorporacji Fe^{58} do erytrocytów. Jedynie u najmłodszego dziecka stwierdzono istotnie większą absorpcję żelaza z pełnego mleka niż mleka pozbawionego LF. U starszych dzieci absorpcja żelaza była nawet nieco większa z mleka pozbawionego LF. Oczywiście trudno wnioskować na podstawie tak małej grupy badanej, ale istnieje możliwość, że LF odgrywa większą rolę we wchłanianiu żelaza tylko u młodszych niemowląt, u których duża część białka pozostaje niestrawiona w przewodzie pokarmowym.

Część badań na modelach zwierzęcych potwierdziła korzystny wpływ LF na absorpcję żelaza i jego status w organizmie. Na przykład karmienie młodych myszy (ale odstawionych już od matki) mlekiem bez dodatku żelaza spowodowało rozwój anemii, podczas gdy dodatek holo-LF lub mineralnego żelaza zapobiegał niedokrwistości i poprawiał status żelaza w ustroju, podobnie jak stały pokarm standardowo używany do karmienia zwierząt. Działania takiego nie wykazywała apo-LF [37]. Testy na noworodkach małpich nie potwierdziły jednak, by ludzka lub bydlęca LF zwiększały biodostępność żelaza [28]. Model ten jest uznawany za dobre odzwierciedlenie sytuacji u ludzi, m.in. ze względu na podobną fizjologię przewodu pokarmowego i dużą zawartość LF w mleku małpim. W cytowanych badaniach absorpcja żelaza z mieszanek dla niemowląt z dodatkiem i bez ludzkiej lub bydlęcej LF oraz mleka ludzkiego była podobnie duża, co może tłumaczyć brak dalszego jej zwiększenia po dodaniu LF. Obserwowany w tym przypadku brak wpływu LF na wchłanianie żelaza może być ponadto skutkiem użycia heterologicznego białka. Również u noworodków ludzkich karmionych odżywkami wzbogaconymi w żelazo mineralne lub BLF nie stwierdzono różnic w statusie żelaza [34], podobnie jak u niemowląt karmionych piersią i odżywkami wzbogaconymi w żelazo mineralne lub BLF [72].

DODATEK LAKTOFERRYNY DO ODŻYWEK I SUPLEMENTÓW ŻELAZA

Zakładając udział LF we wchłanianiu żelaza z pożywienia, korzystne znaczenie może mieć nie tylko LF ludzka lub bydlęca użyta do wzbogacania mieszanek odżywczych dla niemowląt, ale też zastosowana w preparatach dla osób dorosłych wymagających suplementacji żelaza (np. niedożywionych, z anemią z niedoboru żelaza, kobiet ciężarnych i karmiących, alkoholików itp.) [14,87]. Warto wspomnieć w tym miejscu o badaniach prowadzonych przez amerykańską firmę Ventria Bioscience, produkującą ludzką rekombinacyjną LF w ziarnach ryżu [14]. Taka LF ma właściwości (w tym zdolność do chelatowania żelaza) bardzo zbliżone do natywnej HLF. Białko może być stosowane jako składnik diety opartej na potrawach z ryżu lub po wyizolowaniu może być dodawane do suplementów diety. Mogą one znaleźć szczególne zastosowanie w żywieniu dzieci i dorosłych z krajów uboższych, gdzie duży problem stanowi zarówno ogólne niedożywienie, jak i niedobory żelaza i będąca ich konsekwencją anemia. Szacuje się, że na niedobory żelaza i wynikającą stąd niedokrwistość cierpi obecnie blisko 3 biliony ludzi na świecie [5]. Od około 20 lat m.in. na rynku amerykańskim, francuskim, japońskim są obecne liczne preparaty (suplementy diety) zawierają-

ce LF, często jako jeden z aktywnych składników. Na rynku polskim od kilku lat można nabyć preparat pod nazwą FemiFeral firmy Asa Głubczyce, zawierający poza bydlęcą LF żelazo, kwas foliowy oraz witaminy (B_{12} , B_6 i C).

Dostarczenie żelaza w postaci skompleksowanej z LF wydaje się znacznie bardziej korzystne niż suplementacja tego mikroelementu w postaci preparatów zawierających jego mineralną postać (np. siarczan żelaza) ze względu na to, iż wolne żelazo dostarczone do przewodu pokarmowego może indukować uszkodzenia jelita przez rodniki tlenowe, powodując m.in. peroksydację tłuszczów [106]. Może ponadto ułatwiać wzrost zależnej od żelaza patogennej mikroflory jelita [116]. Laktoferryina w ludzkim mleku jest wysyciona żelazem jedynie w kilku procentach (<10%), większe ilości pierwiastka są związane do frakcji tłuszczowej i kazeinowej mleka oraz niskomolekularnych chelatorów (cytrynianów) [38,49]. Egzogenne żelazo dodane do mleka jest zatem łatwo wiązane przez LF. W związku z tym niektórzy rolę LF w suplementacji żelaza widzą raczej bardziej w sekwestracji egzogennej żelaza dostającego się do jelita noworodka np. z żółcią (a w późniejszym okresie życia także z innymi pokarmami), niż wiązaniu i transporcie żelaza endogennej w mleku [22]. Można byłoby więc zwiększyć przyswajalność żelaza dodając żelazo mineralne do mleka lub wzbogacając preparaty żelaza w LF. Za takim postępowaniem przemawiają wyniki testów chemicznych z użyciem bydlęcej LF [83], które sugerują, że białko może mieć pewne znaczenie w ułatwianiu absorpcji żelaza z jego nieorganicznych preparatów podawanych doustnie. Biodostępność żelaza z $FeSO_4$ jest duża [36], ale jego jony (Fe^{2+}) łatwo ulegają utlenieniu do Fe^{3+} i wytrącają się w postaci nierozpuszczalnej. Dodatek BLF hamował precypitację żelaza, nawet w roztworze zawierającym duże jego stężenia. Można to tłumaczyć istnieniem dodatkowych (poza dwoma „rowkami”) miejsc wiążących żelazo, eksponowanych prawdopodobnie na powierzchni cząsteczki LF [83].

PODSUMOWANIE

Jak się wydaje, poza dość pewnym udziałem białka w magazynowaniu żelaza w wątrobie i pobieraniu pierwiastka przez komórki jelita, funkcja wiązania i dostarczania tego składnika innym komórkom ustroju nie jest głównym zadaniem LF. Może to wynikać z tego, że LF wiąże mocno i znacznie trudniej oddaje jony metalu w porównaniu z TF – typowym białkiem transportującym pierwiastek do komórek, a zatem odzyskiwanie żelaza z kompleksów z LF może być dla ustroju „nieoptymalne” pod względem energetycznym. Podczas gdy głównym „dostarczycielem” żelaza do komórek jest niewątpliwie transferryina, LF może regulować stężenie tych jonów w nadmiarze obecnych w środowisku i niezwiązanych przez TF, a więc potencjalnie toksycznych (przez skompleksowanie i usunięcie ich nadmiaru). Potwierdzeniem takiej roli LF jest zniesienie hamującego wpływu nadmiaru wolnego żelaza w medium (po przekroczeniu zdolności wiążących TF) na proliferację limfocytów [33] oraz zapobieganie mediowanemu przez żelazo uszkodzeniu błon komórkowych monocytów [20] i komórek maziówki stawów u pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów [45]. Wiążąc „niechciane” żelazo LF może zatem redukować tworzenie szkodliwych RFT. W większości przypadków efekt jest znacznie sil-



niejszy lub występuje wyłącznie w odniesieniu do apo-LF. Dowodem takiej roli LF jest zwiększenie ekspresji samego białka i jego receptorów komórkowych, gdy komórki znajdują się w środowisku z dużą zawartością wolnych jonów żelaza [40,41,42,76,113]. Dowodem zaangażowania LF w transport żelaza do enterocytów jest to, iż ekspresja receptorów białka na ich powierzchni jest, podobnie jak receptory TF, regulowana przez poziom żelaza w komórce, w ten sposób, że ich liczba wzrasta, gdy stężenie żelaza spada [79]. Mamy więc do czynienia odpowiednio z regulacją pozytywną (dla komórek innych niż enterocyty) i negatywną (dla enterocytów).

Podsumowując, należy stwierdzić, że pewny wydaje się udział białka w absorpcji żelaza ze światła jelita i prawdopodobny – w jego magazynowaniu w wątrobie. LF uczestniczy zatem głównie w pozyskiwaniu z pożywienia i magazynowaniu tego mikroelementu, podczas gdy jego dystrybucję do tkanek zapewnia TF. Dodatkową rolę LF w gospodarce żelazem w organizmie należy upatrywać w sekwestracji tego mikroelementu, co ma znaczenie dla przebiegu procesów oksydacyjno-redukcyjnych, reakcji zapalnych oraz zwalczania mikroorganizmów. Zagadnieniom tym poświęcono drugą część artykułu (manuskrypt w przygotowaniu).

PIŚMIENNICTWO

- [1] Abdallah F.B., Chahine J.M.: Transferrins, the mechanism of iron release by ovotransferrin. *Eur. J. Biochem.*, 1999; 263: 912–920
- [2] Abdallah F.B., El Hage Chahine J.M.: Transferrins: iron release from lactoferrin. *J. Mol. Biol.*, 2000; 303: 255–266
- [3] Agennix. <http://www.agenix.com> (14.08.2008)
- [4] Andersen J.H.: Technology evaluation: rh lactoferrin, Agennix. *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 2004; 6: 344–349
- [5] Andrews N.C.: Forging a field: the golden age of iron biology. *Blood*, 2008; 112: 219–230
- [6] Ashida K., Sasaki H., Suzuki Y.A., Lönnnerdal B.: Cellular internalization of lactoferrin in intestinal epithelial cells. *Biometals*, 2004; 17: 311–315
- [7] Bagby G.C. Jr., Rigas V.D., Bennett R.M., Vandenbark A.A., Garewal H.S.: Interaction of lactoferrin, monocytes, and T lymphocyte subsets in the regulation of steady-state granulopoiesis *in vitro*. *J. Clin. Invest.*, 1981; 68: 56–63
- [8] Baker H.M., Baker E.N.: Lactoferrin and iron: structural and dynamic aspects of binding and release. *Biometals*, 2004; 17: 209–216
- [9] Baveye S., Ellass E., Mazurier J., Spik G., Legrand D.: Lactoferrin: a multifunctional glycoprotein involved in the modulation of the inflammatory process. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 1999; 37: 281–286
- [10] Baynes R.D., Bezwoda W.R.: Lactoferrin and the inflammatory response. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1994; 357: 133–141
- [11] Baynes R.D., Bezwoda W.R., Derman D.P., Khan Q., Mansoor N.: Lack of correlation between iron stores and plasma lactoferrin concentration. *Scand. J. Haematol.*, 1986; 36: 111–114
- [12] Baynes R.D., Bezwoda W.R., Khan Q., Mansoor N.: Relationship of plasma lactoferrin content to neutrophil regeneration and bone marrow infusion. *Scand. J. Haematol.*, 1986; 36: 79–84
- [13] Bennett R.M., Kokocinski T.: Lactoferrin turnover in man. *Clin. Sci.*, 1979; 57: 453–460
- [14] Bethell D.R., Huang J.: Recombinant human lactoferrin treatment for global health issues: iron deficiency and acute diarrhea. *Biometals*, 2004; 17: 337–342
- [15] Bi B.Y., Lefebvre A.M., Duš D., Spik G., Mazurier J.: Effect of lactoferrin on proliferation and differentiation of the Jurkat human lymphoblastic T cell line. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1997; 45: 315–320
- [16] Birgens H.S., Kristensen L.O.: Impaired receptor binding and decrease in isoelectric point of lactoferrin after interaction with human monocytes. *Eur. J. Haematol.*, 1990; 45: 31–35
- [17] Birgens H.S., Kristensen L.O., Borregaard N., Karle H., Hansen N.E.: Lactoferrin-mediated transfer of iron to intracellular ferritin in human monocytes. *Eur. J. Haematol.*, 1988; 41: 52–57
- [18] Boldt D.H.: New perspectives on iron: an introduction. *Am. J. Med. Sci.*, 1999; 318: 207–212
- [19] Brines R.D., Brock J.H.: The effect of trypsin and chymotrypsin on the *in vitro* antimicrobial and iron-binding properties of lactoferrin in human milk and bovine colostrum. Unusual resistance of human apo-lactoferrin to proteolytic digestion. *Biochim. Biophys. Acta*, 1983; 759: 229–235
- [20] Britigan B.E., Serody J.S., Hayek M.B., Charniga L.M., Cohen M.S.: Uptake of lactoferrin by mononuclear phagocytes inhibits their ability to form hydroxyl radical and protects them from membrane auto-oxidation. *J. Immunol.*, 1991; 147: 4271–4277
- [21] Brock J.: Lactoferrin: a multifunctional immunoregulatory protein? *Immunol. Today*, 1995; 16: 417–419
- [22] Brock J.H.: Lactoferrin in human milk: its role in iron absorption and protection against enteric infection in the newborn infant. *Arch. Dis. Child.*, 1980; 55: 417–421
- [23] Brock J.H., Arzabe F., Lampreave F., Pineiro A.: The effect of trypsin on bovine transferrin and lactoferrin. *Biochim. Biophys. Acta*, 1976; 446: 214–225
- [24] Bullen J.J.: The significance of iron in infection. *Rev. Infect. Dis.*, 1981; 3: 1127–1138
- [25] Chierici R., Sawatzki G., Tamisari L., Volpato S., Vigi V.: Supplementation of an adapted formula with bovine lactoferrin. 2. Effects on serum iron, ferritin and zinc levels. *Acta Paediatr.*, 1992; 81: 475–479
- [26] Chung T.D., Raymond K.N.: Lactoferrin: the role of conformational change in its iron binding and release. *J. Am. Chem. Soc.*, 1993; 115: 6765–6768
- [27] Cox T.M., Mazurier J., Spik G., Montreuil J., Peters T.J.: Iron binding proteins and influx of iron across the duodenal brush border. Evidence for specific lactotransferrin receptors in the human intestine. *Biochim. Biophys. Acta*, 1979; 588: 120–128
- [28] Davidson L.A., Litov R.E., Lönnnerdal B.: Iron retention from lactoferrin-supplemented formulas in infant rhesus monkeys. *Pediatr. Res.*, 1990; 27: 176–180
- [29] Davidson L.A., Lönnnerdal B.: Fe-saturation and proteolysis of human lactoferrin: effect on brush-border receptor-mediated uptake of Fe and Mn. *Am. J. Physiol.*, 1989; 257: G930–G934
- [30] Davidson L.A., Lönnnerdal B.: Persistence of human milk proteins in the breast-fed infant. *Acta Paediatr. Scand.*, 1987; 76: 733–740
- [31] Davidson L.A., Lönnnerdal B.: Specific binding of lactoferrin to brush-border membrane: ontogeny and effect of glycan chain. *Am. J. Physiol.*, 1988; 254: G580–G585
- [32] Davidsson L., Kastenmayer P., Yuen M., Lönnnerdal B., Hurrell R.F.: Influence of lactoferrin on iron absorption from human milk in infants. *Pediatr. Res.*, 1994; 35: 117–124
- [33] Djeha A., Brock J.H.: Effect of transferrin, lactoferrin and chelated iron on human T-lymphocytes. *Br. J. Haematol.*, 1992; 80: 235–241
- [34] Fairweather-Tait S.J., Balmer S.E., Scott P.H., Minski M.J.: Lactoferrin and iron absorption in newborn infants. *Pediatr. Res.*, 1987; 22: 651–654
- [35] Fletcher J.: Iron, the iron-binding proteins and bone marrow cell differentiation. W: Iron and immunity. Cancer and inflammation, red.: M. de Sousa i J.H. Brock. John Wiley & Sons Ltd., 1989
- [36] Forbes A.L., Adams C.E., Arnaud M.J., Chichester C.O., Cook J.D., Harrison B.N., Hurrell R.F., Kahn S.G., Morris E.R., Tanner J.T., Whittaker P.: Comparison of *in vitro*, animal, and clinical determinations of iron bioavailability: International Nutritional Anemia Consultative Group Task Force report on iron bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1989; 49: 225–238
- [37] Fransson G.B., Keen C.L., Lönnnerdal B.: Supplementation of milk with iron bound to lactoferrin using weanling mice: Effects on hematology and tissue iron. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 1983; 2: 693–700
- [38] Fransson G.B., Lönnnerdal B.: Iron in human milk. *J. Pediatr.*, 1980; 96: 380–384
- [39] Fritsch G., Sawatzki G., Treumer J., Jung A., Spira D.T.: Plasmodium falciparum: inhibition *in vitro* with lactoferrin, desferri-ferrithiocin, and desferrirocine. *Exp. Parasitol.*, 1987; 63: 1–9

- [40] Ghio A.J., Carter J.D., Dailey L.A., Devlin R.B., Samet J.M.: Respiratory epithelial cells demonstrate lactoferrin receptors that increase after metal exposure. *Am. J. Physiol.*, 1999; 276: L933-L940
- [41] Ghio A.J., Carter J.D., Samet J.M., Reed W., Quay J., Dailey L.A., Richards J.H., Devlin R.B.: Metal-dependent expression of ferritin and lactoferrin by respiratory epithelial cells. *Am. J. Physiol.*, 1998; 274: L728-L736
- [42] Ghio A.J., Richards J.H., Dittrich K.L., Samet J.M.: Metal storage and transport proteins increase after exposure of the rat lung to an air pollution particle. *Toxicol. Pathol.*, 1998; 26: 388-394
- [43] Gislason J., Douglas G.C., Hutchens T.W., Lönnnerdal B.: Receptor-mediated binding of milk lactoferrin to nursing piglet enterocytes: a model for studies on absorption of lactoferrin-bound iron. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 1995; 21: 37-43
- [44] Gordeuk V.R., Prithviraj P., Dolinar T., Brittenham G.M.: Interleukin 1 administration in mice produces hyperferremia despite neutropenia. *J. Clin. Invest.*, 1988; 82: 1934-1938
- [45] Guillén C., McInnes I.B., Kruger H., Brock J.H.: Iron, lactoferrin and iron regulatory protein activity in the synovium; relative importance of iron loading and the inflammatory response. *Ann. Rheum. Dis.*, 1998; 57: 309-314
- [46] Gutteberg T.J., Rokke O., Andersen O., Jorgensen T.: Early fall of circulating iron and rapid rise of lactoferrin in septicemia and endotoxemia: an early defence mechanism. *Scand. J. Infect. Dis.*, 1989; 21: 709-715
- [47] Gutteridge J.M., Paterson S.K., Segal A.W., Halliwell B.: Inhibition of lipid peroxidation by the iron-binding protein lactoferrin. *Biochem. J.*, 1981; 199: 259-261
- [48] Hashizume S., Kuroda K., Murakami H.: Identification of lactoferrin as an essential growth factor for human lymphocytic cell lines in serum-free medium. *Biochim. Biophys. Acta*, 1983; 763: 377-382
- [49] Hirai Y., Kawakata N., Satoh K., Ikeda Y., Hisayasu S., Orimo H., Yoshino Y.: Concentrations of lactoferrin and iron in human milk at different stages of lactation. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 1990; 36: 531-544
- [50] Hu W.L., Mazurier J., Montreuil J., Spik G.: Isolation and partial characterization of a lactotransferrin receptor from mouse intestinal brush border. *Biochemistry*, 1990; 29: 535-541
- [51] Hu W.L., Mazurier J., Sawatzki G., Montreuil J., Spik G.: Lactotransferrin receptor of mouse small-intestinal brush border. Binding characteristics of membrane-bound and triton X-100-solubilized forms. *Biochem. J.*, 1988; 249: 435-441
- [52] Hutchens T.W., Henry J.F., Yip T.T.: Purification and characterization of intact lactoferrin found in the urine of human milk-fed preterm infants. *Clin. Chem.*, 1989; 35: 1928-1933
- [53] Imber M.J., Pizzo S.V.: Clearance and binding of native and defucosylated lactoferrin. *Biochem. J.*, 1983; 212: 249-257
- [54] Ishibashi Y., Takeda K., Tsukidate N., Miyazaki H., Ohira K., Dosaka-Akita H., Nishimura M.: Randomized placebo-controlled trial of interferon α -2b plus ribavirin with and without lactoferrin for chronic hepatitis C. *Hepatol. Res.*, 2005; 32: 218-223
- [55] Ismail M., Brock J.H.: Binding of lactoferrin and transferrin to the human promonocytic cell line U937. Effect on iron uptake and release. *J. Biol. Chem.*, 1993; 268: 21618-21625
- [56] Iwasa M., Kaito M., Ikoma J., Takeo M., Imoto I., Adachi Y., Yamauchi K., Koizumi R., Teraguchi S.: Lactoferrin inhibits hepatitis C virus viremia in chronic hepatitis C patients with high viral loads and HCV genotype 1b. *Am. J. Gastroenterol.*, 2002; 97: 766-767
- [57] Iyer S., Lonnerdal B.: Lactoferrin, lactoferrin receptors and iron metabolism. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 1993; 47: 232-241
- [58] Janicki K.: *Hematologia*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2001
- [59] Ji B., Maeda J., Higuchi M., Inoue K., Akita H., Harashima H., Sahara T.: Pharmacokinetics and brain uptake of lactoferrin in rats. *Life Sci.*, 2006; 78: 851-855
- [60] Kampschmidt R.F., Mesecher M.: Interleukin-1 from P388D1: effects upon neutrophils, plasma iron, and fibrinogen in rats, mice, and rabbits. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1985; 179: 197-200
- [61] Kawakami H., Dosako S., Lonnerdal B.: Iron uptake from transferrin and lactoferrin by rat intestinal brush-border membrane vesicles. *Am. J. Physiol.*, 1990; 258: G535-G541
- [62] Kawakami H., Hiratsuka M., Dosako S.: Effects of iron-saturated lactoferrin on iron absorption. *Agric. Biol. Chem.*, 1988; 52: 903-908
- [63] Kawakami H., Lonnerdal B.: Isolation and function of a receptor for human lactoferrin in human fetal intestinal brush-border membranes. *Am. J. Physiol.*, 1991; 261: G841-G846
- [64] Konishi M., Iwasa M., Yamauchi K., Sugimoto R., Fujita N., Kobayashi Y., Watanabe S., Teraguchi S., Adachi Y., Kaito M.: Lactoferrin inhibits lipid peroxidation in patients with chronic hepatitis C. *Hepatol. Res.*, 2006; 36: 27-32
- [65] Kruzel M.L.: Rola laktoferyny w rozwoju ostrych stanów zapalnych. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2003; 57: 377-404
- [66] Kuratowska Z.: Niedokrwiistości niedoborowe i achrestyczne. W: *Hematologia kliniczna*, red.: K. Janicki. Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa 1991, 481-512
- [67] LaForce F.M., Boose D.S.: Release of lactoferrin by polymorphonuclear leukocytes after aerosol challenge with *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 1987; 55: 2293-2295
- [68] Lash J.A., Coates T.D., Lafuze J., Baehner R.L., Boxer L.A.: Plasma lactoferrin reflects granulocyte activation *in vivo*. *Blood*, 1983; 61: 885-888
- [69] Legrand D., Ellass E., Pierce A., Mazurier J.: Lactoferrin and host defence: an overview of its immuno-modulating and anti-inflammatory properties. *Biometals*, 2004; 17: 225-229
- [70] Legrand D., Mazurier J., Colavizza D., Montreuil J., Spik G.: Properties of the iron-binding site of the N-terminal lobe of human and bovine lactotransferrins. Importance of the glycan moiety and of the non-covalent interactions between the N- and C-terminal lobes in the stability of the iron-binding site. *Biochem. J.*, 1990; 266: 575-581
- [71] Lipiński P., Starzyński R.R.: Rola białek IRP (iron regulatory proteins) w regulacji ogólnoustrojowej homeostazy żelaza: lekcje płynące z badań na myszach z nokautem genów *Irp1* i *Irp2*. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2006; 60: 322-330
- [72] Lonnerdal B., Hernell O.: Iron, zinc, copper and selenium status of breast-fed infants and infants fed trace element fortified milk-based infant formula. *Acta Paediatr.*, 1994; 83: 367-373
- [73] Maj S.: *Hematologia ogólna*. W: *Hematologia*, red.: S. Maj, B. Mariańska, H. Seyfriedowa. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1996, 11-232
- [74] Mazurier J., Montreuil J., Spik G.: Visualization of lactotransferrin brush-border receptors by ligand-blotting. *Biochim. Biophys. Acta*, 1985; 821: 453-460
- [75] McAbee D.D.: Isolated rat hepatocytes acquire iron from lactoferrin by endocytosis. *Biochem. J.*, 1995; 311: 603-609
- [76] McAbee D.D., Ling Y.Y.: Iron-loading of cultured adult rat hepatocytes reversibly enhances lactoferrin binding and endocytosis. *J. Cell Physiol.*, 1997; 171: 75-86
- [77] McMillan J.A., Landaw S.A., Oski F.A.: Iron sufficiency in breast-fed infants and the availability of iron from human milk. *Pediatrics*, 1976; 58: 686-691
- [78] Mikogami T., Heyman M., Spik G., Desjeux J.F.: Apical-to-basolateral transepithelial transport of human lactoferrin in the intestinal cell line HT-29cl.19A. *Am. J. Physiol.*, 1994; 267: G308-G315
- [79] Mikogami T., Marianne T., Spik G.: Effect of intracellular iron depletion by picolinic acid on expression of the lactoferrin receptor in the human colon carcinoma cell subclone HT29-18-C1. *Biochem. J.*, 1995; 308: 391-397
- [80] Moguilevsky N., Masson P.L., Courtoy P.J.: Lactoferrin uptake and iron processing into macrophages: a study in familial haemochromatosis. *Br. J. Haematol.*, 1987; 66: 129-136
- [81] Moguilevsky N., Retegui L.A., Masson P.L.: Comparison of human lactoferrins from milk and neutrophilic leukocytes. Relative molecular mass, isoelectric point, iron-binding properties and uptake by the liver. *Biochem. J.*, 1985; 229: 353-359
- [82] Moore S.A., Anderson B.F., Groom C.R., Haridas M., Baker E.N.: Three-dimensional structure of diferric bovine lactoferrin at 2.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 1997; 274: 222-236
- [83] Nagasako Y., Saito H., Tamura Y., Shimamura S., Tomita M.: Iron-binding properties of bovine lactoferrin in iron-rich solution. *J. Dairy Sci.*, 1993; 76: 1876-1881
- [84] Olakanmi O., Rasmussen G.T., Lewis T.S., Stokes J.B., Kemp J.D., Britigan B.E.: Multivalent metal-induced iron acquisition from transferrin and lactoferrin by myeloid cells. *J. Immunol.*, 2002; 169: 2076-2084
- [85] Opekun A.R., El-Zaimaity H.M., Osato M.S., Gilger M.A., Malaty H.M., Terry M., Headon D.R., Graham D.Y.: Novel therapies for *Helicobacter pylori* infection. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 1999; 13: 35-42
- [86] Orsi N.: The antimicrobial activity of lactoferrin: current status and perspectives. *Biometals*, 2004; 17: 189-196



- [87] Paesano R., Torcia F., Berlutti F., Pacifici E., Ebano V., Moscarini M., Valenti P.: Oral administration of lactoferrin increases hemoglobin and total serum iron in pregnant women. *Biochem. Cell Biol.*, 2006; 84: 377–380
- [88] Paulsson M.A., Svensson U., Kishore A.R., Naidu A.S.: Thermal behavior of bovine lactoferrin in water and its relation to bacterial interaction and antibacterial activity. *J. Dairy Sci.*, 1993; 76: 3711–3720
- [89] Peen E., Johansson A., Engquist M., Skogh T.: Hepatic and extrahepatic clearance of circulating human lactoferrin: an experimental study in rat. *Eur. J. Haematol.*, 1998; 61: 151–159
- [90] Pekarek R.S., Wannemacher R.W.Jr., Beisel W.R.: The effect of leukocytic endogenous mediator (LEM) on the tissue distribution of zinc and iron. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1972; 140: 685–688
- [91] Regoeczi E., Chindemi P.A., Debanne M.T., Prieels J.P.: Lactoferrin catabolism in the rat liver. *Am. J. Physiol.*, 1985; 248: G8–G14
- [92] Retegui L.A., Moguilevsky N., Castracane C.F., Masson P.L.: Uptake of lactoferrin by the liver. I. Role of the reticuloendothelial system as indicated by blockade experiments. *Lab. Invest.*, 1984; 50: 323–328
- [93] Romanowski T., Sikorska K., Bielawski K.P.: Molekularne podstawy dziedzicznej hemochromatozy. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2006; 60: 217–226
- [94] Rosa G., Trugo N.M.: Iron uptake from lactoferrin by intestinal brush-border membrane vesicles of human neonates. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 1994; 27: 1527–1531
- [95] Saariinen U.M., Siimes M.A.: Iron absorption from infant milk formula and the optimal level of iron supplementation. *Acta Paediatr. Scand.*, 1977; 66: 719–722
- [96] Saariinen U.M., Siimes M.A., Dallman P.R.: Iron absorption in infants: high bioavailability of breast milk iron as indicated by the extrinsic tag method of iron absorption and by the concentration of serum ferritin. *J. Pediatr.*, 1977; 91: 36–39
- [97] Sawatzki G., Rich I.N.: Lactoferrin stimulates colony stimulating factor production *in vitro* and *in vivo*. *Blood Cells*, 1989; 15: 371–385
- [98] Siimes M.A., Salmenpera L., Perheentupa J.: Exclusive breast-feeding for 9 months: risk of iron deficiency. *J. Pediatr.*, 1984; 104: 196–199
- [99] Slater K., Fletcher J.: Lactoferrin derived from neutrophils inhibits the mixed lymphocyte reaction. *Blood*, 1987; 69: 1328–1333
- [100] Spodaryk K.: Metabolizm żelaza i jego udział w hemopoezie. W: *Fizjologia krwi*, red.: Z. Dąbrowski. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1998, 158–172
- [101] Suzuki T., Takizawa-Mizuno M., Yazaki M., Wada Y., Asai K., Kato T.: Plasma lactoferrin levels after bone marrow transplantation monitored by a two-site enzyme immunoassay. *Clin. Chim. Acta*, 1991; 202: 111–117
- [102] Suzuki Y.A., Lönnnerdal B.: Baculovirus expression of mouse lactoferrin receptor and tissue distribution in the mouse. *Biometals*, 2004; 17: 301–309
- [103] Suzuki Y.A., Lopez V., Lönnnerdal B.: Mammalian lactoferrin receptors: structure and function. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2005; 62: 2560–2575
- [104] Suzuki Y.A., Shin K., Lönnnerdal B.: Molecular cloning and functional expression of a human intestinal lactoferrin receptor. *Biochemistry*, 2001; 40: 15771–15779
- [105] Traczyk M.: *Podstawy hematologii dla lekarza praktyka*. Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa 1984
- [106] Troost F.J., Saris W.H., Haenen G.R., Bast A., Brummer R.J.: New method to study oxidative damage and antioxidants in the human small bowel: effects of iron application. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2003; 285: G354–G359
- [107] Troost F.J., Steijns J., Saris W.H., Brummer R.J.: Gastric digestion of bovine lactoferrin *in vivo* in adults. *J. Nutr.*, 2001; 131: 2101–2104
- [108] van Snick J.L., Markowitz B., Masson P.L.: The ingestion and digestion of human lactoferrin by mouse peritoneal macrophages and the transfer of its iron into ferritin. *J. Exp. Med.*, 1977; 146: 817–827
- [109] Van Snick J.L., Masson P.L., Heremans J.F.: The involvement of lactoferrin in the hypsideremia of acute inflammation. *J. Exp. Med.*, 1974; 140: 1068–1084
- [110] Varadhachary A., Wolf J.S., Petrak K., O'Malley B.W.Jr., Spadaro M., Curcio C., Forni G., Pericle F.: Oral lactoferrin inhibits growth of established tumors and potentiates conventional chemotherapy. *Int. J. Cancer*, 2004; 111: 398–403
- [111] Venge P., Nilsson L., Nystrom S.O., Aberg T.: Serum and plasma measurements of neutrophil granule proteins during cardiopulmonary bypass: a model to estimate human turnover of lactoferrin and myeloperoxidase. *Eur. J. Haematol.*, 1987; 39: 339–345
- [112] Wakabayashi H., Matsumoto H., Hashimoto K., Teraguchi S., Takase M., Hayasawa H.: Inhibition of iron/ascorbate-induced lipid peroxidation by an N-terminal peptide of bovine lactoferrin and its acylated derivatives. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1999; 63: 955–957
- [113] Wang Y., Tu Y., Han F., Xu Z., Wang J.: Developmental gene expression of lactoferrin and effect of dietary iron on gene regulation of lactoferrin in mouse mammary gland. *J. Dairy Sci.*, 2005; 88: 2065–2071
- [114] Ward P.P., Mendoza-Meneses M., Cunningham G.A., Conneely O.M.: Iron status in mice carrying a targeted disruption of lactoferrin. *Mol. Cell. Biol.*, 2003; 23: 178–185
- [115] Weinberg E.D.: Iron and infection. *Microbiol. Rev.*, 1978; 42: 45–66
- [116] Weinberg E.D.: Iron, infection and sudden infant death. *Med. Hypotheses*, 2001; 56: 731–734
- [117] Yamada Y., Amagasaki T., Jacobsen D.W., Green R.: Lactoferrin binding by leukemia cell lines. *Blood*, 1987; 70: 264–270
- [118] Ying L., He J., Furmanski P.: Iron-induced conformational change in human lactoferrin: demonstration by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and analysis of effects of iron binding to the N and C lobes of the molecule. *Electrophoresis*, 1994; 15: 244–250
- [119] Zagulski T., Jarząbek Z., Zagulska A., Zimecki M.: The main systemic, highly effective, and quickly acting antimicrobial mechanisms generated by lactoferrin in mammals *in vivo*. Activity in health and disease. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1998; 443: 247–250
- [120] Zagulski T., Zagulska A., Jedra M., Jarząbek Z.: Rabbit plasma iron level after *in vivo* administration of lactoferrin. *Prace i Mater. Zoot.*, 1985; 36: 95–105

Autorka deklaruje brak potencjalnych konfliktów interesów.