

LAKTOFERYNA – STRAŻNIK PROCESÓW PRZYSWAJANIA ŻELAZA

LACTOFERRIN – A SENSOR AND REGULATOR OF IRON ABSORPTION

Jolanta ARTYM

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

Streszczenie: Żelazo jest niezbędne do życia, ale też potencjalnie groźne, bo uczestniczy w tworzeniu toksycznych dla istot żywych reaktywnych form tlenu. Jest powszechne na Ziemi, ale trudno dostępne, bo w tlenowym środowisku o odczynie obojętnym występuje przeważnie w postaci trudno rozpuszczalnych jonów żelazowych (Fe^{3+}). Ze względu na tę dwoistą naturę żelaza, organizmy w drodze ewolucji wykształciły skomplikowane i precyzyjne mechanizmy pozyskiwania, transportu, przechowywania i zużywania tego cennego składnika odżywczego. Pozwalają one bezpiecznie wykorzystywać żelazo w wielu procesach biochemicznych, chroniąc jednocześnie przed jego toksycznym działaniem. Do systemów kontroli homeostazy żelaza u wyższych organizmów należą białka chelatujące, czyli silnie wiążące jony żelaza, a wśród nich siderofiliny: owotransferyna u gadów i ptaków oraz transferyna i laktoferyna u ssaków. Laktoferyna uczestniczy w wielu procesach metabolizmu żelaza: reguluje jego wchłanianie w jelicie, transportuje do tkanek magazynujących i ogranicza dostępność dla patogennych drobnoustrojów. Wpływa również na procesy oksydoredukcyjne, zwiększając bądź zmniejszając dostępność katalizującego je żelaza. W artykule omówiono wspomniane aspekty działania białka, ze szczególnym naciskiem na kontrolę procesów przyswajania żelaza z diety. Przedstawiono też praktyczne możliwości użycia laktoferyny w nutraceutykach: suplementach diety i żywności funkcjonalnej.

Słowa kluczowe: laktoferyna, transferyna, wchłanianie żelaza, receptor laktoferyny, DMT1

Summary: Iron is an essential element for life, although it may be potentially dangerous since it participates in formation of oxygen radicals, toxic for viable organisms. Iron is abundant in Earth although difficult to acquire, because in oxygen milieu and neutral pH it usually exists as weakly soluble ferric ions (Fe^{3+}). Considering this dual nature of iron, organisms have evolved complicated and precise mechanisms of: acquirement, transport, storage and utilization of this precious nutrient. These mechanisms ensure to utilize iron safely in many biochemical processes, protecting at the same time the organism against its toxic action. The control systems of homeostasis encompass chelating proteins, i.e. proteins strongly binding iron, such as siderophilins: ovotransferrin in rep-

tiles and birds or transferrin and lactoferrin in mammals. Lactoferrin participates in many processes of iron metabolism: regulates its intestinal absorption, transports its to storage tissues and restricts its accessibility for pathogenic microorganisms. It also affects red-ox processes by increasing or decreasing accessibility of iron, the catalyzer. In the article the above mentioned aspects of lactoferrin action are described with a particular emphasis on the control of iron acquirement from diet. Recommendations for lactoferrin application as diet supplement or as ingredient of food products are also presented.

Key words: lactoferrin, transferrin, iron absorption, lactoferrin receptor, DMT1

WSTĘP

Żelazo jest na Ziemi pierwiastkiem pospolitym – jego zawartość w skorupie ziemskiej wynosi 5,2%. W organizmach żywych występuje jednak w niewielkich ilościach, stąd jest zaliczane do mikroelementów (pierwiastków śladowych). W ustroju to jednak najpowszechniejszy spośród wszystkich mikroelementów. W drodze ewolucji żelazo stało się jednym z najważniejszych pierwiastków, bez których nie istniałoby życie [58]. Jego niezwykłość dostrzeżono już w starożytności, przypisując mu wręcz „niebiańskie” pochodzenie. Z tych czasów pochodzą określenia żelaza: „jerkat” – „kapiący z nieba” czy „sideros” od słowa „gwiazda”, zachowane do dzisiaj w niektórych językach. Jest niezbędne do życia prawie wszystkich istot: drobnoustrojów, roślin i zwierząt. Jak dotąd, znane są tylko dwa organizmy, które mogą się „obejść” bez żelaza: niepatogenne bakterie z rodzaju *Lactobacillus* oraz patogenne *Borrelia burgdorferi* (oba wykorzystują mangan zamiast żelaza) [73, 74].

Żelazo uczestniczy we wszystkich procesach warunkujących życie. Jest pierwiastkiem niezwykłym, ze względu na swoją „paradoksalną” naturę. Choć jest powszechne w przyrodzie pozostaje słabo dostępne, ponieważ w fizjologicznym pH i w obecności tlenu tworzy trudno rozpuszczalne wodorotlenki. Jest konieczne do życia, ale w nadmiarze szkodliwe ze względu na tworzenie w procesach oksydoredukcyjnych toksycznych dla tkanek reaktywnych form tlenu (RFT). W ustroju musi zatem być zachowana równowaga między żelazem jako nieodzownym składnikiem odżywczym a żelazem jako cytotoksyną. Stąd, organizmy wyższe (w tym ssaki) wykształciły rozbudowane mechanizmy, które precyzyjnie kontrolują nabywanie, transport, magazynowanie oraz zużywanie żelaza. Dzięki nim żelazo w odpowiednich ilościach jest dostarczane, w bezpiecznej postaci przechowywane i udostępniane dla procesów fizjologicznych. Ważnym elementem tego systemu kontroli są związki chelatujące, czyli silnie wiążące żelazo (tzw. chelatory, z gr. *chele* – szczypce). Istotną grupę chelatorów żelaza stanowią białka, do których zaliczamy siderofiliny: owotransferynę (konalbuminę, OTF) u gadów

i ptaków oraz ssaczą transferynę (TF) i laktoferynę (LF) – wszystkie trzy blisko ze sobą spokrewnione. Wolne żelazo wiąże również obecna w osoczu albumina oraz, głównie cytozolowa, ferrytyna. Białkowa część hemoglobiny (Hb) – globina wiąże cząsteczki hemu, podobnie jak osoczowa hemopeksyna. Cząsteczki hemoglobiny wiąże natomiast osoczowa haptoglobina. Jony żelaza związane z białkami chelatującymi są niedostępne dla procesów oksydoredukcyjnych, mogą być jednak w razie potrzeby udostępnione do komórkowych procesów biochemicznych.

W artykule omówiono rolę laktoferyny w przyswajaniu żelaza z pokarmu u ssaków: noworodków i osobników dorosłych, w powiązaniu z regulacją transportu i magazynowania żelaza w ustroju oraz udziału w procesach oksydoredukcyjnych.

ŻELAZO – PIERWIASTEK ŻYCIA

Żelazo, ze względu na obecność niesparowanych elektronów na powłokach zewnętrznych, należy do metali przejściowych. Może być zarówno akceptorem, jak i donorem elektronów, dzięki czemu wchodzi w interakcje z wieloma cząsteczkami, również tlenem. Występuje w dwóch stopniach utlenienia: w postaci zredukowanej, jako jony żelazawe (ang. *ferrous ions*, Fe^{2+}) oraz w postaci utlenionej, jako jony żelazowe (ang. *ferric ions*, Fe^{3+}). Możliwość przyjmowania i oddawania elektronów warunkuje dużą reaktywność żelaza, a zarazem jego udział w wielu przemianach metabolicznych. Żelazo jest kofaktorem enzymów uczestniczących w łańcuchu oddechowym i cyklu Krebsa, takich jak: oksydoreduktaza dinukleotyd nikotynamidoadeninowy-koenzym Q (dehydrogenaza NADH), oksydoreduktaza bursztynian-koenzym Q (dehydrogenaza bursztynianowa), białko Rieskiego (składnik oksydoreduktazy koenzym Q-cytochrom c) i akonitaza mitochondrialna. Wchodzi też w skład reduktazy rybonuklotydowej – enzymu uczestniczącego w procesach syntezy i naprawy DNA. W enzymach tych żelazo obecne jest w postaci niehemowej. Jako składnik hemu występuje w białkach oddechowych: hemoglobinie (w erytrocytach) oraz mioglobinie (w mięśniach), których funkcją jest przenoszenie tlenu. Co ważne, hemoproteiny te mogą pełnić swoje zadanie (tzn. odwracalnie wiązać i przenosić tlen), gdy zawierają jony Fe^{2+} . Żelazo w postaci hemu obecne jest też w cytochromach (a, b, c, P-450) przenoszących elektrony w łańcuchu oddechowym oraz katalazie, rozkładającej nadtlenek wodoru (H_2O_2). Żelazo zatem uczestniczy we wszystkich istotnych procesach życiowych, w tym oddychania tlenowego, tworzenia i detoksyfikacji RFT, unieszkodliwiania różnych związków, w tym ksenobiotyków (np. trucizn i leków), syntezy i katabolizmu różnych związków (m.in. hormonów, kolagenu, mieliny, neuroprzebieżników, kwasów nukleinowych, hemu), reakcjach odpornościowych

czy regulacji cyklu życiowego komórek (poprzez wpływ na ekspresję niektórych genów, np. kinazy białkowej C, syntazy tlenku azotu czy białka p21) [1, 10, 40].

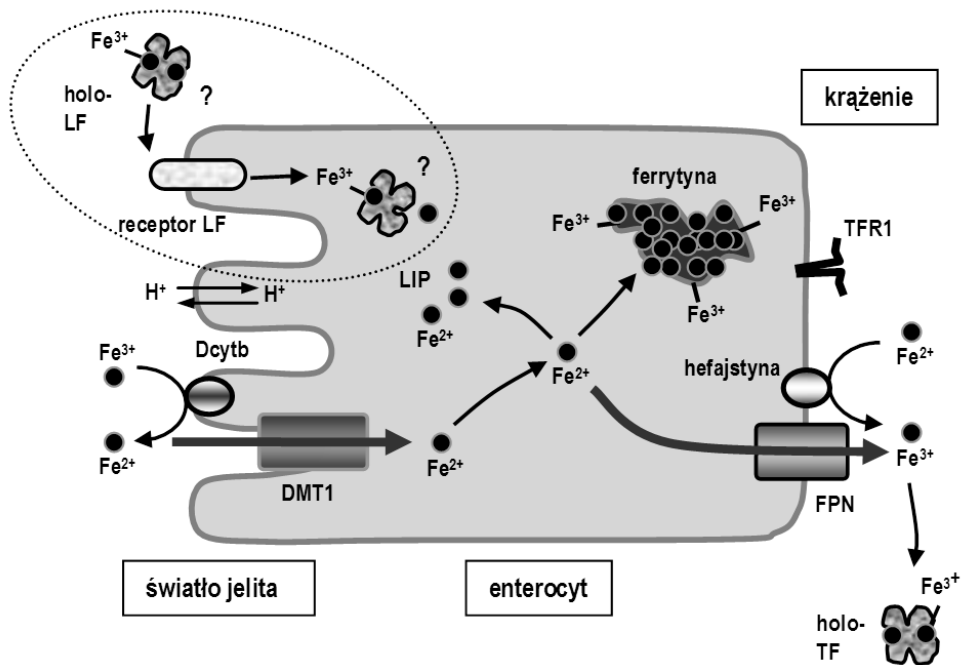
Żelazo nabywamy drogą pokarmową – jest absorbowane z pokarmu przez enterocyty w dwunastnicy i początkowej części jelita czczego w ilości 1-2 mg/dzień. W podobnych ilościach jest usuwane z ustroju ze złuszcządzającymi się komórkami naskórka, nabłonka błon śluzowych układu moczowo-płciowego i pokarmowego, moczem i potem oraz w czasie krwawień. Organizm nie wykształcił specjalnej fizjologicznej drogi pozbywania się nadmiaru żelaza (np. za pomocą wątroby czy nerek), stąd utrzymanie jego homeostazy odbywa się głównie na poziomie absorpcji w jelicie. Żelazo w diecie występuje głównie w postaci jonów Fe^{3+} i przed wchłonięciem do enterocyty jest redukowane do jonów Fe^{2+} przy udziale błonowej reduktazy – dwunastniczego cytochromu b (Dcytb), czemu sprzyja bogate w protony kwaśne środowisko początkowego odcinka jelita. Przez białko DMT1 (ang. *Divalent Metal Transporter 1*) jony Fe^{2+} są transportowane do cytozolu, gdzie po utlenieniu mogą być magazynowane w postaci związanej z ferrytyną lub mogą wejść do tzw. puli labilnego żelaza (ang. *Labile Iron Pool*, LIP), skąd są zużywane w procesach biochemicznych. Mogą również przejść przez enterocyt do jego błony podstawno-bocznej, skąd są wydzielane do krążenia za pomocą białka nośnikowego – ferroportyny (FPN), po uprzednim utlenieniu do jonów Fe^{3+} (za pomocą oksydazy – hefajstyny lub ceruloplazminy, Cp). W takiej postaci żelazo jest wiązane przez cząsteczki TF i przenoszone do różnych tkanek (ryc. 1). Na prawie wszystkich komórkach (poza dojrzałymi erytrocytami) znajdziemy błonowe receptory TF (TFR): TFR1 i TFR2, z których pierwszy odpowiada za transport wysyczonej żelazem TF do wnętrza komórek, a drugi pełni głównie funkcje regulacyjne w metabolizmie żelaza. Komórki intensywnie dzielące się, o dużym zapotrzebowaniu na żelazo (np. erytroidalne, nabłonka jelita, łożyska, nowotworowe) lub magazynujące żelazo (komórki miększu wątroby – hepatocyty i makrofagi wątrobowe – komórki Kupffera) mają na swojej powierzchni szczególnie dużo cząsteczek TFR (nawet 10.000-100.000/komórkę). Przeciwnie, na komórkach nie dzielących się często nie można w ogóle wykryć obecności TFR [27, 54].

FPN jest jedynym dotąd poznanym eksporterem żelaza z komórek, zatem jej działanie jako szczególnie ważne, musi być precyzyjnie regulowane. Regulacja ta odbywa się na dwóch poziomach: komórkowym i ogólnoustrojowym. Pierwszy zapewniają białka cytoplazmatyczne, tzw. białka regulujące żelazo (ang. *Iron Regulatory Protein*, IRP): IRP1 oraz IRP2, które rozpoznają swoistą niekodującą sekwencję określaną jako element reagujący na żelazo (ang. *Iron Responsive Element*, IRE) w mRNA docelowych białek. Taka około 30 nukleotydowa sekwencja tworząca strukturę „szpilki do włosów” znajduje się w mRNA ferroportyny oraz innych białek uczestniczących w metabolizmie żelaza: TFR1, DMT1, ferrytyny czy ALAS2 (ang.

5-Aminolevulinic Acid Synthase 2) – najważniejszego enzymu w biosyntezie hemu. W warunkach niedoboru żelaza w komórce białka IRP wiążą się z sekwencją IRE wspomnianych białek, co indukuje ekspresję TFR1 i DMT1, z jednoczesnym zahamowaniem ekspresji ferrytyny, FPN i ALAS2. W warunkach niedoboru żelaza taka adaptacja pozwala zwiększyć jego pobór i transport do komórki, ograniczając jednocześnie tworzenie zapasów i wypływ z komórek oraz użycie w procesie erytropoezy. Odwrotna regulacja występuje przy nadmiarze żelaza w komórce: hamowana jest ekspresja TFR1 i DMT1, a indukowana ekspresja ferrytyny, FPN i ALAS2. Pozwala to ograniczyć pobór żelaza do komórki przy jednoczesnym magazynowaniu i intensywnym zużyciu w procesie tworzenia krwinek (ryc. 2). Sprawne działanie tego potranskrypcyjnego mechanizmu IRE/IRP jest niezbędne do życia. Zwierzęta z nokautem genów obu białek IRP (IRP1 i IRP2) zamierają już na etapie zarodka, a z nokautem genu IRP2 wykazują znaczne nieprawidłowości gospodarki żelazem [27, 41].

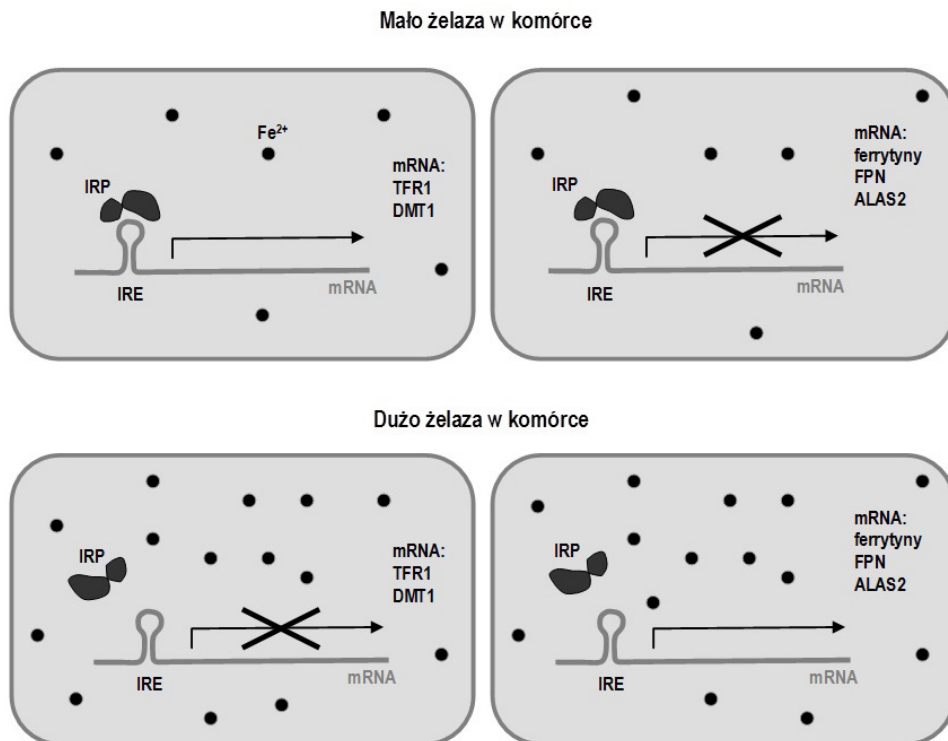
Systemowa regulacja metabolizmu żelaza opiera się na działaniu niewielkiego białka wytwarzanego głównie w wątrobie – hepcydyny, kodowanej przez gen *HAMP* (ang. *Hepcidin Antimicrobial Peptide*). Odkryto ją na początku XXI wieku w osoczu i moczu jako białko o działaniu przeciwmikrobiologicznym. Kilka lat później okazało się, że pełni niezwykle istotną – nadrzędną rolę w homeostazie żelaza [69]. Ekspresja hepcydyny jest regulowana w odpowiedzi na różne czynniki: dostępność żelaza (jego zapasy w wątrobie oraz stężenie w krążeniu), intensywność erytropoezy, hipoksję (stan niedotlenienia) oraz sygnały zapalne.

Hepcydyna działa przez wiązanie się do cząsteczki FPN, co indukuje jej fosforylację, internalizację do komórki oraz degradację w lizosomach. Działa zatem jako negatywny regulator absorpcji żelaza i jego uwalniania. Jej poziom rośnie w odpowiedzi na żelazo i czynniki zapalne, dzięki czemu spada wchłanianie żelaza w jelicie i jego uwalnianie z komórek magazynujących (głównie w wątrobie i śledzionie). Przy niedostatku żelaza, niedotlenieniu i zwiększonym zapotrzebowaniu na nowe erytrocyty poziom hepcydyny spada, dzięki czemu więcej żelaza wchłania się z diety oraz uwalnia z magazynów ustrojowych. Taki mechanizm pozwala utrzymać ogólnoustrojową homeostazę żelaza (ryc. 3). Do tej pory udało się wykryć wiele cząsteczek (i mechanizmów), które regulują ekspresję hepcydyny w odpowiedzi na powyższe warunki fizjologiczne. To m.in. receptor TFR2, błonowe białko hemochromatozy (HFE), błonowe białko BMP6 (ang. *Bone Morphogenetic Protein 6*) oraz jego receptor, hemojuwelina (HJV), matrypaza-2, neogenina, białko GDF15 (ang. *Growth Differentiation Factor 15*), HIF1 (ang. *Hypoxia-Inducible Factor 1*) i HIF2, cytokiny prozapalne (IL-1, IL-6, IFN- γ), wolne rodniki tlenowe oraz bakteryjny lipopolisacharyd (LPS). W ekspresji genu *HAMP* uczestniczą czynniki transkrypcyjne z rodziny SMAD, ERK/MAPK, JAK-STAT3, C/EBP α , CREBH oraz CHOP [27, 31, 69].



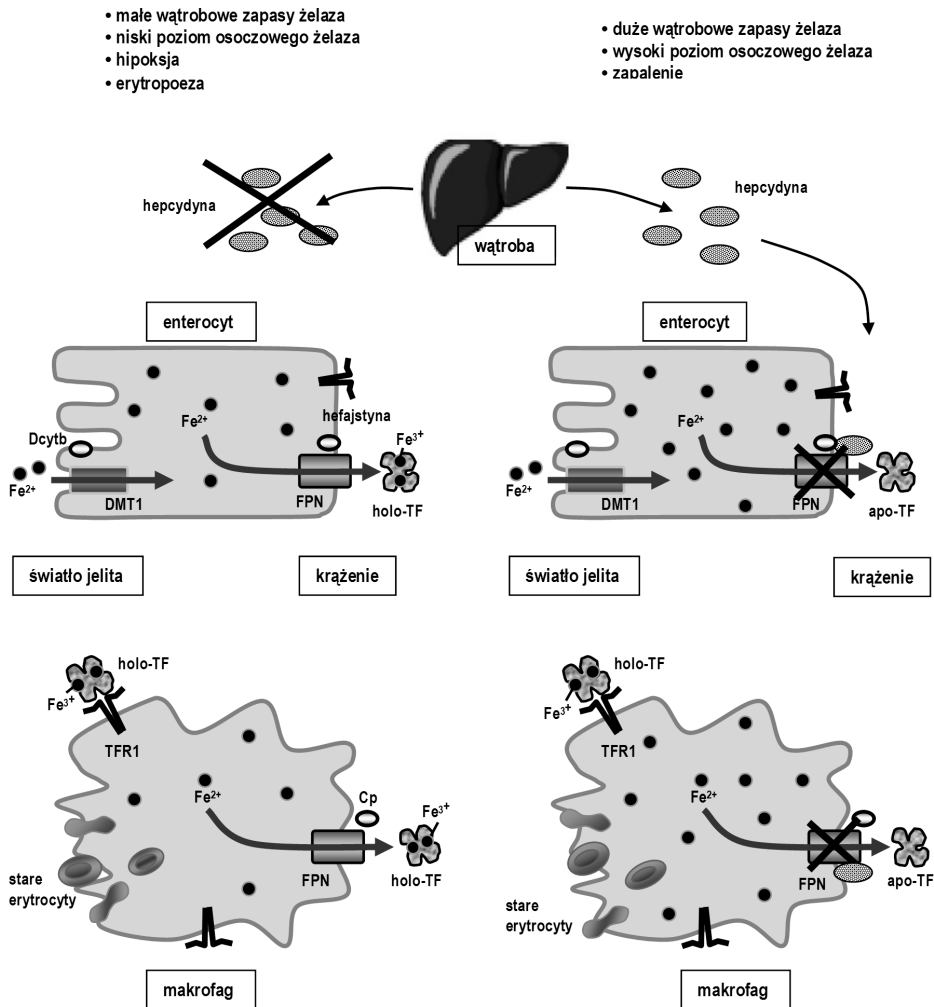
RYCINA 1. Udowodnione i postulowane procesy absorpcji żelaza w jelicie noworodka. Żelazo z diety (Fe^{3+}) jest redukowane przez feroreduktazę (Dcytb) do Fe^{2+} , w takiej postaci jest transportowane przez DMT1 do wnętrza komórki nabłonkowej (enterocyty) z jednoczesnym transportem protonów. Tu trafia do puli LIP, może być przechowywane związane z ferrytyną lub jest transportowane do krwi przez FPN. Po utlenieniu do Fe^{3+} przez hefajstynę jest wiązane przez TF, z którą może wędrować do poszczególnych komórek organizmu. W lewej górnej części schematu (w obwódce) pokazano możliwy pobór żelaza przy udziale LF: białko ze związanymi jonami Fe^{3+} przyłącza się do receptora jelitowego i ulega internalizacji, dostarczając żelazo do wnętrza komórki. Nie jest znany dalszy „los” jonów żelaza uwolnionych z cząsteczki LF

FIGURE 1. Proved and postulated processes of iron absorption in newborn gut. Iron from the diet (Fe^{3+}) is reduced by ferroreductase (Dcytb) to Fe^{2+} , next is transported in such a form by DMT1 into an epithelial cell (enterocyte) with an accompanying transport of protons. In the cell iron traffics to LIP pool, it may be then stored by ferritin or transported to the circulating blood by FPN. After oxidation by hephaestin to Fe^{3+} is bound by TF, which may transport it to all cells of the organism. In the upper left part of the scheme (the rim) a plausible uptake of iron engaging lactoferrin is shown: the protein bearing Fe^{3+} ions binds to an intestinal receptor and is internalized, thus supplying iron for the cell. The subsequent fate of iron ions released by LF is not known so far



RYCINA 2. Regulacja metabolizmu żelaza na poziomie komórkowym za pomocą potranskrypcyjnego mechanizmu IRE/IRP. W warunkach niedoboru żelaza w komórce białka IRP wiążą się z sekwencją IRE białek docelowych, co indukuje translację genów TFR1 i DMT1 oraz hamuje translację genów ferrytyny, FPN i ALAS2. Wzrasta wówczas pobór i transport żelaza do komórki, a ograniczone jest tworzenie jego zapasów i wypływ z komórek oraz użycie w procesie erythropoezy (górna część ryciny). Przy nadmiarze żelaza w komórce białka IRP nie wiążą się do sekwencji IRE docelowych białek. Hamowana jest translacja genów TFR1 i DMT1, a indukowana – genów ferrytyny, FPN i ALAS2. Pozwala to ograniczyć pobór żelaza do komórki przy jednoczesnym magazynowaniu i intensywnym zużyciu w procesie tworzenia krwinek (dolna część ryciny)

FIGURE 2. Regulation of iron metabolism on the cellular level by means of posttranscriptional IRE/IRP mechanism. In conditions of cellular iron deficiency IRP proteins bind to IRE sequences of target proteins that induces translation of TFR1 and DMT1 genes and inhibits translation of ferritin, FPN and ALAS2 genes. These events lead to uptake and transport of iron into cells and to restriction of its storage, outflow from cells and utilization for erythropoiesis (the upper part of the figure). When intracellular iron is in access, IRP proteins do not bind IRE sequences of the target proteins. The translations of TFR1 and DMT1 genes are inhibited, but those of ferritin, FPN and ALAS2, are induced. Such a mechanism allows to restrict uptake of iron by cells with concurrent storage and intense usage of this element in erythropoiesis (bottom part of the figure)



RYCINA 3. Ogólnoustrojowa regulacja metabolizmu żelaza za pomocą hepcydyny. Czynniki, które regulują jej wytwarzanie w wątrobie to: dostępność żelaza (jego zapasy w wątrobie oraz stężenie w krążeniu), intensywność erytropoezy, hipoksja oraz zapalenie. Hepcydyna wiąże się do cząsteczki FPN, co indukuje jej fosforylację, internalizację do komórki oraz degradację w lizosomach. Jest zatem negatywnym regulatorem absorpcji żelaza i jego uwalniania. Jej poziom rośnie w odpowiedzi na żelazo i czynniki zapalne, co prowadzi do degradacji FPN i uniemożliwia uwalnianie żelaza z enterocytów i komórek magazynujących (głównie w wątrobie i śledzionie), skutkiem tego rosną wewnątrzkomórkowe zapasy żelaza, a maleje jego stężenie we krwi (prawa strona ryciny). Przy niedostatkowi żelaza, niedotlenieniu i zwiększonym zapotrzebowaniu na nowe erytrocyty poziom hepcydyny spada, dzięki czemu za pomocą FPN więcej żelaza wchłania się z diety oraz uwalnia z magazynów ustrojowych, zmniejszają się zatem zapasy żelaza w enterocytach i makrofagach, a rośnie jego stężenie w krążeniu (lewa strona ryciny). Taki mechanizm pozwala utrzymać ustrojową homeostazę żelaza

FIGURE 3. Systemic regulation of iron metabolism by hepcidin. The factors that regulate its synthesis in the liver encompass: accessibility of iron (its deposits in liver and concentration in circulation), magnitude of erythropoiesis, hypoxia and inflammation. Hepcidin binds to FPN molecule inducing its phosphorylation, internalization by cells and degradation in lysosomes. Therefore, hepcidin represents a negative regulator of iron absorption and release. Its level increases in response to iron and inflammatory factors that leads to FPN degradation and prevents release of iron from enterocytes and storage cells (mainly in liver and spleen) leading to increase of intracellular deposits of iron, accompanied by decrease of its concentration in the circulating blood (right side of the figure). In states of hypoferremia, hypoxia and increased demand for new erythrocytes, the level of hepcidin falls, in a consequence more iron is absorbed from the diet and from the intracellular deposits with assistance of FPN. The reserves of iron in enterocytes and macrophages diminish but its concentration in the circulation increases (the left side of the figure). Such a mechanism allows maintenance of systemic iron homeostasis

LAKTOFERYNA – BIAŁKO WIĄŻĄCE ŻELAZO

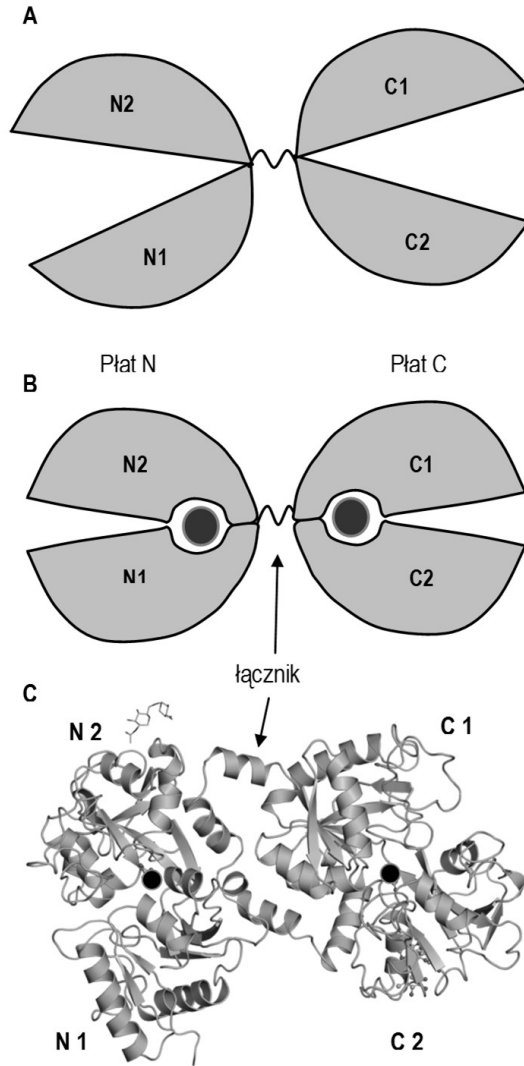
Pierwszym poznany białkiem wiążącym żelazo była owotrasferyna, odkryta w 1889 roku w białku jaja kurzego. W 1944 roku potwierdzono jej zdolność do hamowania wzrostu niektórych mikroorganizmów na skutek odwracalnego wiązania niezbędnego do ich życia żelaza [56, 72]. OTF znajdziemy zarówno w surowicy krwi, jak i jajach ptaków. Jest kodowana przez jeden gen i ekspresjonowana, odpowiednio, w wątrobie i jajowodzie. Pełni funkcje transportowe dla żelaza oraz chroni przed infekcjami i reguluje przebieg procesów zapalnych [25]. Ssacze TF i LF są kodowane przez dwa różne geny. TF powstaje głównie w wątrobie, choć w mniejszych ilościach też w innych tkankach (np. nerkach, jądrach i mózgu), skąd dostaje się do osocza krwi. Źródłem LF są natomiast komórki nabłonkowe o funkcji wydzielniczej oraz neutrofile (granulocyty obojętnochłonne). LF pochodzenia nabłonkowego znajdziemy zatem w różnych wydzielinach ustrojowych: mleku, łzach, ślinie, wydzielinie śluzówki nosa, dróg oddechowych, pokarmowych, rodnych, płynie nasiennym, płynie maziówkowym, mózgowo-rdzeniowym, a także żółci, moczu, kale, pocie, woskownie usznej. To tzw. LF śluzówkowa (związana z błonami śluzowymi). Śluzówki stanowią niejako wrota, przez które do organizmu wnikają zarazki powodując zakażenia. LF jest ważnym składnikiem naszej odporności chroniąc nas przed tymi infekcjami. LF powstająca w neutrofilach jest z nich uwalniana do krążenia i miejsc lokalnie naciekanym przez te komórki. W stanie zdrowia w naszym ustroju powstaje dziennie około 5 g LF neutrofilowej, z czego około 0,5 g jest uwalniane podczas degranulacji komórek. W czasie zakażenia/zapalenia ilości te wzrastają kilkukrotnie. Podczas gdy TF jest obecna głównie w osoczu krwi (w stężeniu 1,8-3,3 mg/ml), LF znajdziemy przede wszystkim w wydzielinach ustrojowych (np. łzach i wydzielinie pochwy w stężeniu 2 mg/ml oraz 0,15 mg/ml), a w mniejszych ilościach we krwi (0,2-0,5 µg/ml). Zasadniczą funkcją TF jest transport jonów żelaza w obrębie orga-

nizmu i ich dostarczanie do komórek. LF można przypisać wiele zadań: działanie mikrobiostatyczne i mikrobiobójcze wobec różnych drobnoustrojów, regulację funkcji układu odpornościowego (w tym działanie zarówno przeciwzapalne, jak i prozapalne), regulację procesów hematopoezy, regulację metabolizmu glukozy i lipidów, regulację funkcji jelita, metabolizmu tkanki kostnej, procesu gojenia ran, hamowanie wzrostu nowotworów, działanie przeciwbólne, hipotensyjne oraz przeciwstresowe [4, 70].

Jedną z najważniejszych funkcji LF jest jednak udział w metabolizmie żelaza. To zadanie białko może pełnić dzięki zdolności mocnego i odwracalnego wiązania jonów żelaza. LF wiąże jony Fe^{3+} z dużym powinowactwem ($K_d \sim 10^{-22}$ M) i utrzymuje je nawet w kwaśnym środowisku (uwalnia dopiero przy $\text{pH} \sim 3,0$) [27, 46]. Zdolność do wiązania żelaza LF dzieli z innymi białkami z rodziny siderofilin – surowiczą TF i OTF, przy czym te ostatnie wiążą jony Fe^{3+} z nieco mniejszą siłą ($K_d \sim 10^{-20}$ M), ale również w odwracalny sposób. TF uwalnia jednak jony żelaza już w lekko kwaśnym środowisku ($\text{pH} \sim 6,0$), a OTF „zachowuje się” w sposób pośredni między LF i TF [8, 25].

Wszystkie trzy siderofiliny cechuje duża homologia struktury, szczególnie w obrębie fragmentów peptydowych uczestniczących w wiązaniu jonów żelaza, co sugeruje wspólne ich pochodzenie oraz wczesne pojawienie się w rozwoju ewolucyjnym [47]. Na przykład, I-rzędowa struktura kurzej OTF jest identyczna w 51% z ludzką TF oraz w 49% z ludzką LF, a ludzka TF w około 60% identyczna z ludzką LF. Jeszcze większa jest zgodność struktury III-rzędowej tych białek [26].

Cząsteczkę siderofilin tworzy pojedynczy glikozylowany łańcuch polipeptydowy (około 700 aminokwasów), który „układa się” w dwa płaty: N- i C-końcowy, spięte wspólną częścią łącznikową (około 10-12 aa). Każdy płat dzieli się jeszcze na dwie mniejsze części, tzw. domeny, które na swoim styku tworzą głębokie zagłębienie (rowek, kieszonkę) wiążący pojedynczy jon Fe^{3+} . Każda cząsteczka siderofiliny ma zatem dwa takie miejsca wiązania jonów żelaza, czyli może przyłączyć dwa jony Fe^{3+} . W wiązaniu jonu żelaza uczestniczą 4 aminokwasy: kwas asparaginowy, histydyna oraz dwie tyrozyny. Dodatkowo do reszty argininy jest przyłączony jon CO_3^{2-} , pomagający ustabilizować związane żelazo. Wiązanie żelaza jest odwracalne, zatem białka mogą występować w postaci apo- (wolnej od żelaza) oraz holo- (ze związanym żelazem). W apo-siderofilinie płat przybiera kształt otwartej muszelki, która się zamyka po związaniu żelaza. Jony Fe^{3+} są więc głęboko schowane wewnątrz cząsteczki białka i niedostępne dla otaczającego roztworu (ryc. 4). Możliwe jest wiązanie żelaza tylko przez jeden płat lub przez oba płaty cząsteczki siderofiliny [8]. Cząsteczka białka z przyłączonym jonem żelaza jest bardziej zwarta/upakowana, a więc bardziej stabilna i mniej podatna na degradację termiczną i enzymatyczną [52]. W warunkach fizjologicznych (czyli w zdrowym organizmie) jedynie część miejsc wiążących żelazo w cząsteczkach siderofilin jest zapełnionych, zwykle 30% w TF oraz 10-20% w LF. Obok siebie występują postaci apo-, monoferyczne (z jednym jonem żelaza) oraz dwuferyczne (z dwoma jonami żelaza) [46]. Gwarantuje to pewną rezerwę i zabezpieczenie na wypadek, gdyby większe ilości



RYCINA 4. Zmiany konformacyjne cząsteczki przykładowej siderofiliny: OTF, TF lub LF po związaniu jonów żelaza. Schematycznie przedstawiono cząsteczkę złożoną z płatu N (domeny N1 i N2) oraz płatu C (domeny C1 i C2) połączonych krótkim łącznikiem: postać „otwarta” apo-siderofiliny (A) oraz holo-siderofilina, gdzie po związaniu jonów Fe³⁺ (czarne kulki) dochodzi do zamknięcia struktury obu płatów (B). Dla porównania przedstawiono schemat typu ribbon (rozdzielczość 2,2 Å) struktury przestrzennej ludzkiej holo-LF „zamkniętej” po związaniu jonów Fe³⁺ (czarne kulki) (C) (za: baza danych Protein Structure European Bioinformatics Institute [53])

FIGURE 4. Conformational changes of siderophilins: OTF, TF or LF following binding iron ions. Schematically presented is the molecule composed of lobe N (N1 and N2 domains) and lobe C (C1 and C2 domains) linked by a short bond: the open form of apo-siderophilin (A) and holo-siderophilin, where binding Fe³⁺ (black balls) results in a closure of both lobes (B). For comparison, the scheme (ribbon diagram, 2.2Å resolution) of the spatial structure of human holo-LF, closed after binding Fe³⁺ ions (black balls) is shown (C) (upon the data base: Protein Structure European Bioinformatics Institute [53])

żelaza trafiły do płynów i wydzielin ustrojowych. Zostaną one wówczas bezpiecznie związane z białkami chelatującymi, by nie uszkodzić tkanek.

OTF, TF i LF mają podobną budowę i funkcje. Zadaniem ptasiej OTF jest zarówno transport żelaza, jak i kontrola zakażeń i zapalenia. U ssaków rola transportu żelaza przypada głównie TF, podczas gdy LF reguluje wiele skomplikowanych procesów, w tym przebieg infekcji i zapalenia. Można przypuszczać, że u wspólnego przodka ptaków i ssaków istniało tylko jedno białko o zdolności wiązania i transportu żelaza. Na etapie powstawania tych dwóch gromad w okresie triasu i jury (przed około 200 mln lat) doszło do pewnego zróżnicowania: OTF u ptaków przyjęła dodatkowe funkcje ochrony przed zakażeniem i zapaleniem, a u ssaków funkcją TF pozostał transport żelaza, ponieważ zadanie ochrony przed infekcją i zapaleniem przejęło nowe białko – LF. Duże podobieństwo OTF, TF i LF sugeruje ich pochodzenie od jednego wspólnego genu. Ten gen u ssaków prawdopodobnie uległ duplikacji dając ostatecznie dwa różne białka, bardzo podobne w budowie, ale dość odmienne w swojej funkcji [25, 26]. Potwierdzeniem teorii wspólnego pochodzenia genów białek związanych z metabolizmem żelaza u ssaków jest ich lokalizacja chromosomalna. Geny ludzkich LF oraz TF i receptora TF (TFR) leżą na chromosomie 3, choć gen LF na jego krótkim ramieniu p, a geny TF i TFR – na długim q [36].

LAKTOFERYNA JAKO REGULATOR WCHŁANIANIA ŻELAZA U NOWORODKÓW

Choć badania nad rolą LF w jelitowej absorpcji żelaza trwają już ponad 30 lat, nie przyniosły dotąd ostatecznych rozstrzygnięć. Najwięcej uwagi poświęcono udziałowi białka w przyswajaniu żelaza u noworodków i niemowląt. Urodzone o czasie, przez kobiety o prawidłowym statusie żelaza i karmione wyłącznie mlekiem matki dzieci nie wykazują niedoborów tego pierwiastka przez pierwsze 6 miesięcy życia [42], choć jego ilości w mleku ludzkim są niewielkie (0,5-0,7 µg/ml) [32]. To sugeruje, że zapasy żelaza z okresu życia płodowego oraz jego dobra biodostępność z mleka matki w całości zaspokajają duże potrzeby rozwijającego się organizmu oseska. Biodostępność żelaza z mleka ludzkiego jest bardzo duża – szacuje się, że stąd wchłania się około 15-43% żelaza. Z mleka krowiego oraz preparatów mlecznych dla niemowląt na bazie mleka krowiego przyswaja się odpowiednio jedynie około 10% oraz 7-14% żelaza [55]. Warto tu dodać, że mleka modyfikowane dla niemowląt zawierają duże ilości żelaza – w zależności od preparatu 4-12 µg/ml. Powyższe obserwacje skłoniły do poszukiwań czynnika warunkującego dobre wchłanianie żelaza z mleka ludzkiego. Okazało się, że może być nim LF. Jej zawartość w sianie i mleku dojrzałym sięga odpowiednio 7 mg/ml i 3 mg/ml, a wysycenie żelazem nie przekracza 5-10% [30, 32]. Mimo tego z LF wiąże się 30-40% obecnego w mleku żelaza, a pozostała część jest związana z frakcją tłuszczową mleka i związkami ni-

skocząsteczkowymi. Mleko nie zawiera natomiast żelaza hemowego. Dla oseska głównym źródłem żelaza może być zatem holo-LF.

Już w 1979 roku zaobserwowano, że biopaty pobrane z ludzkiej dwunastnicy wiążą cząsteczki LF. Białko nie ulegało jednak internalizacji, a jedynie „przekazywało” do wnętrza komórek związane żelazo [17]. Na początku lat 90. XX w. zidentyfikowano i scharakteryzowano swoisty receptor LF (LFR) na powierzchni nabłonka jelita płodu ludzkiego. Receptor ten wiązał silnie ludzką LF (HLF), a słabo LF bydłą i ludzką TF [34]. Później okazało się, że ten receptor jest tożsamy z intelektualną – lektyną na nabłonku jelita rozpoznającą cukry w bakteryjnych ścianach komórkowych [66]. Za pomocą mikroskopu konfokalnego wykazano, że LFR umożliwia pobór LF do komórek [7]. Cząsteczki HLF ulegały internalizacji od strony apikalnej (szczytowej) komórek ludzkiego nabłonka jelitowego linii Caco-2, po czym „lokowały się” w jądrze komórkowym. Przeciwnie, cząsteczki TF wchodziły do komórek od strony bazolateralnej (podstawno-bocznej) i gromadziły się w cytozolu. Uzyskane wyniki sugerują, że LF odpowiada raczej za transport żelaza od strony światła jelita (czyli wchłanianie z treści pokarmowej), a TF – za dostawę żelaza z płynu zewnątrzkomórkowego (czyli płynów ustrojowych). W badaniach na ludzkich komórkach nabłonka jelita linii HT-29 stwierdzono natomiast, że aż 90% LF wchodzącej do komórek ulegało degradacji, po uprzednim uwolnieniu jonów żelaza [48]. Jak więc widać, „losy” LF po pobraniu przez komórkę nie są dokładnie poznane, podobnie jak „losy” dostarczonego tą drogą żelaza (ryc. 1). Można sądzić, że uwolnienie żelaza wymaga wcześniejszej proteolitycznej degradacji cząsteczki LF, która silnie je wiąże i utrzymuje nawet w niskim pH.

Co ważne, okazało się, że liczba receptorów LF na powierzchni enterocytów wzrasta wraz z obniżeniem wewnątrzkomórkowego stężenia żelaza, a zwiększonej liczbie receptorów towarzyszy większy pobór żelaza [49]. Organizm zatem dostosowuje ekspresję jelitowych LFR do swoich zapasów żelaza. Rolę LF i LFR we wchłanianiu żelaza wykazano też w testach na komórkach linii Caco-2 transfekowanych genem ludzkiego LFR. Tak zmienione komórki pobierały prawie 2 razy więcej HLF oraz 3,5 razy więcej związanego z nią żelaza niż komórki kontrolne o konstytutywnie niskiej ekspresji tego genu [63]. Receptory LF wykryto nie tylko na ludzkim nabłonku jelitowym, ale też u innych gatunków ssaków: myszy, królików, świń i małp. Wiązały one preferencyjnie zgodną gatunkowo LF i, co istotne, znacznie „chętniej” postać holo-LF niż nie wysyconą żelazem [62]. Ekspresja jelitowego LFR jest bardzo wysoka w późnym okresie życia płodowego oraz u noworodków, podczas gdy niska u osobników dorosłych [62, 63]. Wskazuje to na jego fizjologiczne znaczenie w początkowym okresie życia. Co ciekawe, LFR jest obecny na nabłonku nie tylko dwunastnicy, ale też jelita czczego i krętego, co może sugerować pobór żelaza z pokarmowej LF na całej długości jelita cienkiego, a nie tylko w jego początkowym odcinku, jak w przypadku absorpcji za pomocą transportera DMT1.

Cechą charakterystyczną okresu noworodkowego jest niedojrzałość układu pokarmowego, który cechuje mniejsza aktywność enzymów trawiennych, wyższe pH w żołądku i niższe w jelicie cienkim niż u osobników dorosłych i słabsza bariera jelito-krew. Stąd procesy trawienia u osesków przebiegają mniej sprawnie. Dodatkowo słabsze trawienie białek u noworodków karmionych naturalnie jest spowodowane obecnością w siarce inhibitorów proteaz. Tymi czynnikami można wytłumaczyć obecność dużej ilości niestrawionej LF w jelicie oraz krążeniu osesków [28, 65]. Samo białko (szczególnie w postaci wysyczonej żelazem) jest też stosunkowo odporne na działanie enzymów proteolitycznych żołądka, trzustki i jelita [12, 13]. Co ważne, stopień trawienia LF zależy od wieku oseska i towarzyszącej diety. W badaniach na szczurach wykazano, że u najmłodszych osobników ssących mleko matki stopień enzymatycznej degradacji białka był minimalny (zatem aktywność biologiczna największa), ale wzrastał u osobników starszych, odsadzonych już od matki [14]. Na podstawie uzyskanych wyników można zatem sądzić, że duża część przyjętej z mlekiem laktoferyny pozostaje w przewodzie pokarmowym osesków i może uczestniczyć w absorpcji żelaza. Rolę tę należy przypisać właśnie białku zawartemu w diecie, a nie endogennemu, gdyż nie udało się wykryć ekspresji LF (na poziomie mRNA i białka) w tkankach jelita cienkiego, ani u noworodków, ani u osobników dorosłych [61, 71]. Zatem LF pokarmowa przy udziale swoistych receptorów jelitowych może wpływać na przyswajanie żelaza.

Charakterystyczna dla początkowego okresu życia jest też słaba kontrola procesów absorpcji żelaza pokarmowego [16, 43]. Badania na nowo narodzonych szczurach wykazały niedostatek transporterów żelaza: DMT1 oraz FPN na komórkach nabłonka jelitowego oraz słabą ich regulację w odpowiedzi na status żelaza [39]. Ekspresja tych białek wzrastała przy niedoborze żelaza dopiero u osesków 20-dniowych, ale nie u 10-dniowych. Podobne obserwacje poczyniono na płodach (w wieku 13,5, 15,5 i 18,5 dni) oraz noworodkach mysich (zaraz po urodzeniu i w dniach 5, 10 i 20) [44]. Wyraźną ekspresję DMT1 zanotowano dopiero w jelicie 20-dniowych zwierząt, wtedy też transporter pojawił się na apikalnej stronie komórek, podczas gdy wcześniej był zlokalizowany głównie w pęcherzykach w cytoplazmie. LFR natomiast pojawiał się już w środkowym i późnym życiu płodowym (czyli podczas rozwoju jelita) i był obecny po urodzeniu, początkowo w rozproszonej lokalizacji, a potem w większym zagęszczeniu na błonie apikalnej.

Uzyskane wyniki wskazują, że noworodki nie są zdolne regulować poziomu wchłanianego żelaza i pobierają go zbyt mało przy niedostatku w diecie oraz za dużo przy jego nadmiarze. Pierwsza sytuacja może zaburzać prawidłowy rozwój psychomotoryczny, a druga prowadzić do stresu oksydacyjnego, na który noworodki są szczególnie wrażliwe (ze względu na mniejszą aktywność systemów antyoksydacyjnych) [16] lub rozwoju zakażeń w wyniku udostępnienia żelaza patogenom drobnoustrojom [55]. Jak dotąd nie opisano dynamiki ekspresji DMT1 u ludzkich noworodków/niemowląt w różnym wieku. U dzieci do 6-9 miesiąca

życia obserwowano jednak brak różnic w absorpcji żelaza w zależności od jego ilości podawanych w diecie (codzienna suplementacja kroplami z mineralnym żelazem lub brak suplementacji). Jednak, już niemowlęta 9-miesięczne otrzymujące żelazo przyswajały go znacznie mniej niż te nie suplementowane [20]. Zatem w tym wieku, który pokrywa się ze stopniowym odstawianiem od piersi i wprowadzaniem diety dodatkowej, pojawia się homeostatyczna regulacja wchłaniania żelaza, zapewniana przez DMT1. Wydaje się natomiast, że zasadniczą rolę regulatora absorpcji żelaza we wcześniejszym okresie życia przejmują laktoferyna obecna w mleku, zwiększając bądź ograniczając pobór żelaza, w zależności od jego aktualnego statusu w ustroju.

Jak dotąd takie regulacyjne działanie białka udało się potwierdzić w kilkudziesięciu testach *in vivo* – na zwierzętach oraz w próbach klinicznych. Poniżej omówiono niektóre z nich. Ciekawe wyniki dały testy na mysich noworodkach bez ekspresji endogennej LF (urodzonych z myszy LFKO^{-/-} z nokautem genu LF) i karmionych mlekiem matek (czyli bez LF) [71]. U osesków nie wystąpiły niedobory żelaza, a wręcz przeciwnie – umiarkowane przeładowanie żelazem (wzrost poziomów oraz wysycenia osoczowej TF i zwiększenie zapasów żelaza w wątrobie). Niewielkiego stopnia przeładowanie żelazem obserwowano również u dorosłych myszy LFKO^{-/-} na standardowej diecie. Testy te potwierdziły, że LF raczej ogranicza niż zwiększa wchłanianie żelaza. Trzeba też pamiętać, że mleko mysie zawiera duże ilości TF (około 10× więcej niż LF) [38], zatem to białko w części może odpowiadać za wchłanianie żelaza, szczególnie przy braku LF. Sytuacja taka byłaby mało prawdopodobna u ludzi, gdzie w mleku występuje głównie LF, a ilości TF są niewielkie.

Podobne wyniki uzyskano w badaniach na 3-10 dniowych ssących prosiętach. Wskaźniki metabolizmu żelaza w grupie otrzymującej bydlęcą holo-LF były gorsze niż w grupie kontrolnej suplementowanej fumaratem żelaza [64]. Tutaj bardzo wyraźnie widać działanie regulacyjne LF: u ssących mleko matki prosiąt status żelaza był prawidłowy, a jego dalsza absorpcja wręcz niepożądana (widoczna po użyciu preparatu organicznego żelaza). Myszy transgeniczne wydzielające ludzką LF do mleka (4 mg/ml lub 12 mg/ml) i karmione paszą z dużą ilością żelaza oraz ich potomstwo zostały użyte w kolejnych testach [30]. U 10-dniowych noworodków karmionych przez takie samice stwierdzono niższe poziomy hemoglobiny, co sugeruje ograniczenie wchłaniania żelaza. U myszy poziom żelaza w mleku wyraźnie dodatnio koreluje z poziomem żelaza osoczowego [76]. U zwierząt na diecie bogatej w żelazo wzrastają więc ilości żelaza w mleku. Można przypuszczać, że LF ograniczyła nadmierne jego przyswajanie przez noworodka.

Podobne działanie białka wykazano w badaniu klinicznym na 8 niemowlętach w wieku 2-10 miesięcy [19]. Dzieci karmiono mlekiem ludzkim pełnym lub pozbawionym LF, a absorpcję żelaza mierzono poziomem wbudowywania do erytrocytów. Tylko u najmłodszego dziecka z mleka pełnego wchłaniało się więcej żelaza,

u pozostałych jego przyswajanie było lepsze z mleka bez LF. Może to wskazywać na działanie LF promujące wchłanianie żelaza tylko w najwcześniejszym okresie życia (gdzie białko jest słabo trawione) lub potwierdzać jego działanie regulacyjne, przez ograniczanie absorpcji żelaza. W innych testach wykazano zwiększenie przyswajania żelaza przez LF. U noworodków/niemowląt ($n=51$) karmionych od urodzenia do 5. miesiąca życia mlekiem modyfikowanym wzbogaconym w bydlęcą LF (0,1 mg/ml lub 1 mg/ml) stwierdzono zwiększone stężenia osoczowej ferrytyny (świadczące o większych zapasach żelaza) w 90. i 150. dniu życia względem dzieci karmionych standardowym preparatem mleka. Uzyskane wyniki były porównywalne z wynikami dzieci karmionych piersią. Obserwowany wzrost korelował z dawką LF: przy 1 mg/ml był większy niż przy 0,1 mg/ml [15]. Bydlęca LF zwiększała również przyswajanie żelaza gdy była dodana (1 mg/ml) do standardowego mleka modyfikowanego, którym karmiono dzieci ($n=16$) w wieku 3-17 tygodni. Absorpcja żelaza wzrosła z 28% u dzieci pijących standardowy preparat mleka do 36% w grupie karmionej mlekiem z LF [57]. U niemowląt ($n=52$) karmionych przez 12 miesięcy mlekiem modyfikowanym na bazie mleka krowiego z zawartością 0,85 mg bydlęcej LF/ml stwierdzono lepsze wskaźniki metabolizmu żelaza niż u dzieci karmionych takim samym preparatem, ale z mniejszą ilością LF (0,12 mg/ml) [35]. Pomiar absorpcji i retencji żelaza w ustroju (na podstawie ilości żelaza wydalanego w stolcu) u noworodków 7-dniowych ($n=36$) nie wykazały różnic po jednorazowym doustnym podaniu wysyczonej żelazem LF bydlęcej (420 mg/osobę) i chlorku żelaza z kwasem askorbinowym. Wchłanianie żelaza związanego z LF nie było więc większe niż żelaza mineralnego [21].

Karmienie młodych, ale już odsadzonych myszy mlekiem krowim (z natury ubogim w żelazo) bez dodatku żelaza powodowało rozwój anemii. Wzbogacenie mleka w holo-LF lub żelazo mineralne poprawiało status żelaza i zapobiegało niedokrwistości, podobnie jak standardowa pasza używana do karmienia zwierząt. Działania takiego nie miała apo-LF [23]. Bardzo ważnych danych dostarczyły testy na podobnych myszach (14-dniowych, odsadzonych) karmionych dietą z nadmiarem żelaza mineralnego oraz z tą samą ilością żelaza, ale skompleksowanego z bydlęcą LF [29]. W pierwszej grupie stwierdzono znaczne zwiększenie zapasów wątrobowego żelaza oraz wyraźne uszkodzenia w obrębie nabłonka dwunastnicy w postaci wakuoli w obszarze połączeń międzykomórkowych (prawdopodobnie jako skutek peroksydacji lipidów indukowanej przez nadmiar żelaza). U zwierząt otrzymujących holo-LF zmiany te były mniejsze, spadły również zapasy żelaza w wątrobie, co wskazuje na jego ograniczone wchłanianie lub lepsze wykorzystanie w procesach metabolicznych. Testy na ssących mleko prosiętach z niedoborem żelaza wykazały, że wchłaniają one i wbudowują do krwinek takie same jego ilości z siarczanu żelaza jak z bydlęcej holo-LF, dodanej do diety [24]. Podobne wyniki uzyskano w badaniach na noworodkach małą [18]. Przyswajanie żelaza

było podobne u zwierząt karmionych mlekiem ludzkim, mlekiem modyfikowanym na bazie mleka krowiego z dodatkiem siarczanu żelaza oraz takim samym preparatem z dodatkiem ludzkiej lub bydłowej LF. Można sądzić, że biodostępność żelaza z zastosowanej formuły oraz ludzkiego mleka była duża i wystarczająca, nie była już więc dalej zwiększana przez LF.

LAKTOFERYNA JAKO REGULATOR WCHŁANIANIA ŻELAZA U OSOBNIKÓW DOROSŁYCH

Laktoferyna może również regulować absorpcję żelaza u osobników dorosłych, choć tutaj jej rola jest niewątpliwie dużo mniejsza niż u osesków. U zdrowych dorosłych proces wchłaniania żelaza w jelicie jest sprawnie regulowany dzięki dostosowanej do potrzeb ustroju ekspresji transporterów żelaza: DMT1 i FPN na enterocytach (o czym była mowa wcześniej). U osobników dorosłych ze względu na sprawne procesy trawienia i wchłaniania więcej LF ulega proteolizie, co prowadzi do uwolnienia związanych jonów żelaza. Tutaj więc dostarczone z LF żelazo wchodzi prawdopodobnie w większości do jelitowej puli żelaza niehemowego i podobnie jak takie żelazo jest przyswajane (czyli przy udziale DMT1 po uprzedniej redukcji za pomocą Dcytb).

Dość liczne badania (na zwierzętach i ludziach) wykazały jednak, że LF sprzyja absorpcji żelaza i poprawia jego status u osobników dorosłych. Podana doustnie wysycona żelazem bydłca LF podnosiła hematokryt i poziom Hb u szczurów z indukowaną doświadczalnie anemią dużo skuteczniej niż suplementacja żelaza mineralnego [33]. W nowszych testach na szczurach z anemią z niedoboru żelaza ludzka rekombinowana LF wysycona żelazem podawana dożołądkowo po miesiącu znacznie poprawiała wskaźniki metabolizmu żelaza: poziom Hb, liczbę krążących erytrocytów oraz stężenia osoczowego żelaza, zwierzęta przybrały też na wadze. Co ważne, wzrosła również ekspresja (na poziomie mRNA) wątrobowej hepcydyny oraz spadła FPN, co jest charakterystyczne dla normalizacji gospodarki żelazem. Poprawiły się ponadto wskaźniki stresu oksydacyjnego: spadł poziom produktów peroksydacji lipidów, a wzrosła aktywność enzymów antyoksydacyjnych. Suplementacja LF była skuteczniejsza i bezpieczniejsza niż podawanie mineralnego żelaza w postaci siarczanu [22]. U dorosłych myszy z indukowanym dietą niedoborem żelaza podana doustnie jednorazowo holo-LF zwiększała poziomy osoczowego żelaza oraz jego zapasy w wątrobie. Nie obserwowano zmiany tych parametrów u zwierząt o prawidłowym statusie żelaza, ale spadały one w grupie zwierząt z cechami przeładowania żelazem na skutek nadmiaru tego składnika w diecie [29]. Uwidacznia się tutaj wyraźne regulacyjne działanie LF w zależności od aktualnego statusu żelaza ustrojowego.

Wyniki testów na zwierzętach potwierdzają próby kliniczne. Takim badaniom poddano grupę 300 kobiet w różnym okresie ciąży ze stwierdzoną anemią z niedoboru żelaza [51]. Po 30 dniach grupa otrzymująca doustnie bydłęcą LF (200 mg/osobę/dzień) miała wyższe poziomy Hb i osoczowego żelaza niż kobiety przyjmujące doustne preparaty nieorganicznego żelaza i odmawiające jakiegokolwiek leczenia. Ilość jonów żelaza dostarczana w postaci mineralnej (156 mg/dzień) była znacznie większa niż ta zapewniana przez LF (8,8 mg/dzień). Co szczególnie ważne, terapia za pomocą LF nie dawała żadnych działań niepożądanych, które często towarzyszą suplementacji żelaza mineralnego (przeważnie to bóle głowy, brzucha, nudności, zaparcia). Podobne wyniki uzyskano w innym badaniu klinicznym, którym objęto kobiety nieciążarne (n=189) i ciężarne (n=75) [50]. Pacjentki podzielono na grupy leczone jak we wcześniejszym teście. W grupie przyjmującej LF obserwowano poprawę wskaźników hematologicznych, u kobiet ciężarnych spadły ponadto poziomy osoczowej IL-6 oraz wzrosły poziomy prohepcydyny (cząsteczki prekursorowej hepcydyny). U kobiet nieciążarnych prawidłowe poziomy IL-6 nie zmieniły się, ale podobnie wzrosły poziomy prohepcydyny. Odwrotnie działał siarczan żelaza: zwiększał poziomy IL-6, a obniżał prohepcydyny. LF wykazuje zatem wyraźne działanie normalizujące homeostazę żelaza, preparat żelaza mineralnego działa wręcz niekorzystnie, nasilając stan zapalny, co dodatkowo rozregulowuje metabolizm żelaza.

Ciekawe wyniki dały też testy kliniczne z udziałem pacjentów (n=148) onkologicznych poddanych chemioterapii i leczonych ludzką erytropoetyną z powodu rozpoznanej anemii [45]. U chorych tych anemia z jednej strony jest skutkiem agresywnego leczenia, a z drugiej wynika z istoty choroby nowotworowej (tzw. anemia chorób przewlekłych przebiegająca z funkcjonalnym niedoborem żelaza). W grupie pacjentów leczonych doustnie za pomocą bydłęcej LF (200 mg/osobę/dzień) stwierdzono podobny wzór odnowy hematopoetycznej oraz normalizacji statusu żelaza i odpowiedzi zapalnej jak w grupie leczonej preparatem glukonianu żelaza. W pierwszej grupie chorych spadły jednak poziomy osoczowej ferrytyny (które są podniesione w przebiegu anemii chorób przewlekłych). W drugiej grupie pacjentów poziomy tego białka wzrosły. Wskazuje to na korzystne działanie regulacyjne LF zmierzające do odzyskania homeostazy żelaza i niepożądane działanie preparatu żelaza. Bydłęca LF podawana pacjentom (n=90) z zapaleniem wątroby typu C nie wpływała wprawdzie na wskaźniki metabolizmu żelaza (poziom Hb, osoczowego żelaza i wysycenie TF), ale ograniczała skutki toksycznego działania żelaza, które są szczególnie nasilone w przewlekłych stanach zapalnych, takich jak hepatitis i odpowiadają za wiele powikłań tych schorzeń [37].

INNE ASPEKTY REGULACYJNEGO WPLYWU LAKTOFERYNY NA METABOLIZM ŻELAZA

Laktoferyna może uczestniczyć w transporcie żelaza do niektórych komórek, podobnie jak TF. Receptory wiążące białko wykryto na wielu komórkach prawidłowych, m.in. hepatocytach, monocytach i makrofagach, komórkach śródbłonka naczyniowego, limfocytach T i B, komórkach łożyska, jak również wielu typach komórek transformowanych nowotworowo, np. białaczki monocytowej czy erytroidalnej. W niektórych testach udało się wykazać, że holo-LF dostarcza żelazo do komórek po uprzednim związaniu się z receptorem lub bez takich interakcji. Podobnie stwierdzono internalizację białka do niektórych komórek, choć w innych przypadkach nie udało się potwierdzić jego wewnątrzkomórkowej lokalizacji. Częsteczki krążącej LF są degradowane w lizosomach makrofagów wątrobowych i śledzionowych, zatem można oczekiwać, że białko będzie tutaj zostawiało przyniesione ze sobą jony żelaza, które po jego degradacji wejdą do komórkowej puli żelaza, np. wbudują się w cząsteczkę ferrytyny. Niewątpliwie głównym zadaniem LF nie jest transport i dostarczanie żelaza do poszczególnych komórek ustroju – to zadanie pozostaje bezsprzecznie „w rękach” TF. W niektórych sytuacjach LF może jednak przejąć funkcję dostarczania żelaza do jego ustrojowych magazynów: śledziony i wątroby [68]. Taka sytuacja ma miejsce w czasie przewlekłego zakażenia/stanu zapalnego czy chorób nowotworowych i odznacza się funkcjonalnym (ale nie faktycznym) niedoborem żelaza. Zgromadzone w magazynach żelazo przez jakiś czas jest słabo dostępne do procesów metabolicznych, co jednocześnie uniemożliwia jego udział w reakcjach zapalnych i ogranicza dostępność dla patogennych drobnoustrojów i szybko rosnących komórek guza. Taki stan przejściowej, funkcjonalnej hipoferremii jest nazywany anemią zapalenia lub anemią chorób przewlekłych [75].

Kolejnym ważnym aspektem działania LF w ustrojowych przemianach żelaza jest jej regulacyjny wpływ na procesy oksydoredukcyjne, w których przy udziale jonów żelaza powstają reaktywne formy tlenu. Te drobne, wszędobylskie, bardzo reaktywne cząsteczki pełnią różne funkcje sygnałowe, ale też w zbyt dużych ilościach uszkadzają wszystkie składniki komórki: białka, błony lipidowe i kwasy nukleinowe [9]. LF może silnie wiązać jony żelaza, tak że nie mogą one wejść w reakcje redoks, co chroni przed stresem oksydacyjnym. Tak się dzieje w środowisku zbliżonym do obojętnego, które najczęściej spotykamy w organizmie. Ale gdy pH spada do wartości około 3-4, jak w fagolizosomach komórek żernych, LF uwalnia swoje żelazo, czyniąc je dostępnym do procesów tworzenia RFT. Wol-

ne rodniki działają silnie bójczo na komórki drobnoustrojów i są ważną bronią w walce z zakażeniami. Dzięki temu LF zwiększa siłę bójczą makrofagów i neutrofilów – głównych komórek fagocytujących zarazki.

Udział LF w tych skomplikowanych składowych metabolizmu żelaza został dokładnie omówiony w innych artykułach przeglądowych i monografii poświęconej LF [2-6].

UŻYCIE LAKTOFERYNY W SUPLEMENTACH DIETY I ŻYWNOŚCI FUNKCJONALNEJ

Gdy uwzględnimy korzystne regulacyjne działanie białka na szeroko pojęty metabolizm ustroju (w tym na homeostazę żelaza) bardzo kusząca jest perspektywa wzbogacenia naszej codziennej diety w LF. Niestety w swojej naturalnej postaci białko jest dostępne dla najmłodszych karmionych mlekiem matki. W mleku krowim, które pijemy w późniejszym życiu, LF jest znacznie mniej (0,1-0,3 mg/ml), a jeszcze mniej jest w mleku poddanym obróbce termicznej (w mleku UHT, jałowionym w temp. 130-140°C właściwie już w ogóle jej nie ma). Termicznie zdenaturowana LF traci też swoje właściwości wiązania i „rozpuszczania” jonów żelaza [67].

Wyjściem jest produkcja suplementów diety zawierających LF albo dodatek tego białka do różnych produktów spożywczych lub służących do higieny. Szczególnie pożądana jest suplementacja mleka modyfikowanego i mieszanek mlecznych na bazie mleka krowiego przeznaczonych do sztucznego żywienia noworodków i niemowląt. W standardowych preparatach tego typu nie ma laktoferyny lub są jej minimalne ilości, co wynika z małej zawartości białka w wyjściowym produkcie i jego zniszczeniu podczas przygotowywania preparatów. Mleko zastępcze uzupełnia się w duże ilości żelaza, w zależności od kraju jest to 4-12 µg/ml, co jest zgodne z rekomendacją Komitetu ds. Żywienia Europejskiego Towarzystwa Gastroenterologii, Hepatologii i Żywienia Dzieci oraz Sekcji ds. Żywienia Amerykańskiego Towarzystwa Pediatricznego (choć kwestionowane przez Sekcję ds. Karmienia Piersią tej organizacji) [55]. Przy wchłanianiu zaledwie 7-14% zawartego w tych preparatach żelaza, pozostaje 86-93%, które może „zalegać” w jelitach do momentu usunięcia ze stolcem, powodując zagrożenie poprzez promowanie patogennej mikroflory (np. *Clostridium* sp.) oraz tworzenia toksycznych RFT. Dziecko w okresie odstawiania od piersi i wprowadzania nowych pokarmów oraz zwiększonej aktywności ruchowej jest szczególnie narażone na kontakt z zarazkami i rozwój infekcji i stanów zapalnych. Rozsądne byłoby więc raczej obniżenie zawartości żelaza w preparatach mlekozastępczych, według aktualnych badań do poziomu 4-8 µg/ml [55].

Innym rozwiązaniem jest dodatek LF do tych produktów, co uczyni żelazo w nich zawarte łatwo „rozpuszczalnym” i jednocześnie bezpiecznym. W niektórych krajach (np. Japonii, Chinach, Kanadzie) można już od co najmniej kilkuna-

stu lat kupić mleka modyfikowane/mieszanki mleczne z dodatkiem bydlęcej LF izolowanej z mleka. W Polsce takie produkty są jak dotąd niedostępne. Nie można też kupić produktów spożywczych z dodatkiem LF, choć są one również dostępne w niektórych krajach, np. Japonii już od prawie 30 lat na rynku są jogurty, mleka smakowe, wody mineralne, soki owocowe czy guma do żucia z dodatkiem LF. Co ciekawe, Japończycy karmią też swoje zwierzęta domowe (psy, koty i rybki akwariowe) karmami wzbogaconymi w LF.

Na rynku niektórych krajów można też kupić środki higieniczne do pielęgnacji jamy ustnej i cery z dodatkiem LF. Pierwsze próby kliniczne wykazały nawet ich użyteczność w profilaktyce i terapii niektórych schorzeń. Na przykład preparat Biotene OralBalance® (GSK Pharmaceutical) w postaci żelu z zawartością laktoperoksydazy, lizozymu i LF jako aktywnych składników, zastosowany do smarowania jamy ustnej wcześniaków zmniejszył częstość występowania zapalenia płuc związanego z użyciem respiratora [60]. Środki do pielęgnacji cery (kremy, żele) oraz jamy ustnej znajdziemy również na rynku polskim. W Polsce (podobnie jak w wielu innych krajach) można też kupić wiele suplementów diety z dodatkiem bydlęcej LF. Preparaty mają różną postać (np. tabletek do połykania, do ssania czy proszku do przygotowania roztworu), przeważnie zawierają też w swoim składzie inne aktywne składniki (np. wyciągi roślinne czy minerały), co sugeruje ich wskazania. W jednym z produktów znajdziemy np. obok LF również żelazo, witaminy z grupy B i kwas foliowy. Takie połączenie może zwiększyć przyswajanie żelaza i jednocześnie ochronić przed jego toksycznym działaniem w przewodzie pokarmowym.

Obecnie wciąż trwają też badania nad LF ludzką rekombinowaną (czyli wytwarzaną przez organizmy transgeniczne). Szczególne nadzieje z punktu widzenia zwalczania powszechnych, szczególnie w ubogich rejonach świata, niedoborów żelaza wiąże się z ryżem ekspresjonującym ludzką LF produkowanym przez amerykańską firmę Ventria Bioscience [11]. Może być on bezpośrednio spożywany lub przetwarzany do różnych produktów, chroniąc przed niedoborami żelaza, a także biegunkami (ze względu na właściwości „ściąające” samego ryżu i działanie przeciwmikrobiologiczne LF).

LF jako chelator żelaza może również znaleźć zastosowanie w przemyśle spożywczym, ograniczając procesy jęlczenia (utleniania) tłuszczów, zarówno roślinnych, jak i zwierzęcych, zawierających podatne na oksydację wielonienasycone kwasy tłuszczowe [59, 67]. Takie korzystne działanie obserwowano np. po dodaniu kompleksu żelazo-bydłęca LF do mleka w proszku wzbogaconego w olej rybi. Obecność LF zahamowała, poprzez ograniczenie peroksydacji lipidów, powstawanie nieprzyjemnego zapachu i metalicznego posmaku podczas przechowywania tego produktu [67]. Podobny efekt można osiągnąć dodając LF do innych wyrobów, np. masła, majonezów, olejów, przetworów rybnych i innych zawierających łatwo utleniające się składniki. Dodatek LF może więc nie tylko poprawić wartość odżywczą, ale też trwałość produktów spożywczych, obecnie często wzbogacanych w żelazo i kwasy tłuszczowe.

PODSUMOWANIE

Jako przedstawiciel rodziny siderofilin LF może silnie wiązać jony żelaza. To warunkuje jej udział w wielu przemianach żelaza w ustroju. Białko reguluje procesy jego wchłaniania, co ma szczególne znaczenie w początkowym okresie życia, ze względu na słaby rozwój innych mechanizmów regulacyjnych. Z wyników dotychczasowych badań można wnioskować, że LF może ułatwiać bądź ograniczać przyswajanie żelaza z diety, dostosowując je do aktualnych potrzeb organizmu. Pozwala to zabezpieczyć udział żelaza we wszystkich procesach metabolicznych, a zatem prawidłowy rozwój psychomotoryczny dziecka, jednocześnie chroniąc jego organizm przed toksycznymi wolnymi rodnikami generowanymi przez nadmiar żelaza. LF może też regulować wchłanianie żelaza z diety u dorosłych, choć tu jej znaczenie wydaje się mniejsze. Białko odgrywa również pewną rolę w dostarczaniu żelaza do komórek, szczególnie magazynujących ten pierwiastek w wątrobie i śledzionie. Ma to znaczenie w rozwoju anemii chorób przewlekłych – reakcji obronnej ustroju przed zakażeniami, zapaleniem czy rakiem. Obrazu LF jako uczestnika i strażnika metabolizmu żelaza uzupełnia jej rola regulatora reakcji redoks, co przyczynia się do ochrony tkanek przed działaniem toksycznych RFT, ale w niektórych sytuacjach wzmacnia zdolność organizmu do walki z zakażeniami. Te niezwykle korzystne działania białka skłoniły do jego użycia w żywności funkcjonalnej, suplementach diety oraz środkach higienicznych, które są już powszechnie dostępne na rynku. W przyszłości preparaty z dodatkiem LF znajdą również niewątpliwie zastosowanie w klinice, w profilaktyce i leczeniu wielu schorzeń, m.in. o podłożu zakaźnym czy zapalnym.

LITERATURA

- [1] AISEN P, ENNS C, WESSLING-RESNICK M. Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *Int J Biochem Cell Biol* 2001; **33**: 940-959.
- [2] ARTYM J, ZIMECKI M. Organizm gospodarza kontra drobnoustroje w walce o żelazo. Rola żelaza w zakażeniach. *Kosmos* 2014; **63**: 345-366.
- [3] ARTYM J, ZIMECKI M. Rola laktoferyny w zakażeniach i zapaleniu. *Forum Zakażeń* 2013; **4**: 329-345.
- [4] ARTYM J. Laktoferyna – niezwykle białko. Wydawnictwo Borgis, Warszawa, 2012.
- [5] ARTYM J. Udział laktoferyny w gospodarce żelazem w organizmie. Część I. Wpływ laktoferyny na wchłanianie, transport i magazynowanie żelaza. *Hig Med Dosw* 2008; **62**: 599-611.
- [6] ARTYM J. Udział laktoferyny w gospodarce żelazem w organizmie. Część II. Działanie przeciwmikrobiologiczne i przeciwzapalne poprzez sekwestrację żelaza. *Postepy Hig Med Dosw* 2010; **64**: 604-616.
- [7] ASHIDA K, SASAKI H, SUZUKI YA, LÖNNERDAL B. Cellular internalization of lactoferrin in intestinal epithelial cells. *Biomaterials* 2004; **17**: 311-315.
- [8] BAKER HM, BAKER EN. Lactoferrin and iron: structural and dynamic aspects of binding and release. *Biomaterials* 2004; **17**: 209-216.
- [9] BARTOSZ G. Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2013.

- [10] BEARD JL. Iron biology in immune function, muscle metabolism and neuronal functioning. *J Nutr* 2001; **131**: 568S-580S.
- [11] BETHELL DR, HUANG J. Recombinant human lactoferrin treatment for global health issues: iron deficiency and acute diarrhea. *Biometals* 2004; **17**: 337-342.
- [12] BRINES RD, BROCK JH. 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 apolactoferrin to proteolytic digestion. *Biochim Biophys Acta* 1983; **759**: 229-235.
- [13] BRITTON JR, KOLDOVSKY O. Gastric luminal digestion of lactoferrin and transferrin by preterm infants. *Early Hum Dev* 1989; **19**: 127-135.
- [14] BRITTON JR, KOLDOVSKY O. Luminal digestion of lactoferrin in suckling and weanling rats. *Am J Physiol* 1987; **253**: G397-403.
- [15] CHERICI 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.
- [16] COLLARD KJ. Iron homeostasis in the neonate. *Pediatrics* 2009; **123**: 1208-1216.
- [17] COX TM, MAZURIEU J, SPIK G, MONTREUIL J, PETERS TJ. 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.
- [18] DAVIDSON LA, LITOV RE, LÖNNERDAL B. Iron retention from lactoferrin-supplemented formulas in infant rhesus monkeys. *Pediatr Res* 1990; **27**: 176-180.
- [19] DAVIDSSON L, KASTENMAYER P, YUEN M, LÖNNERDAL B, HURRELL RF. Influence of lactoferrin on iron absorption from human milk in infants. *Pediatr Res* 1994; **35**: 117-124.
- [20] DOMELLÖF M, LÖNNERDAL B, ABRAMS SA, HERNELL O. Iron absorption in breast-fed infants: effects of age, iron status, iron supplements, and complementary foods. *Am J Clin Nutr* 2002; **76**: 198-204.
- [21] FAIRWEATHER-TAIT SJ, BALMER SE, SCOTT PH, MINSKI MJ. Lactoferrin and iron absorption in newborn infants. *Pediatr Res* 1987; **6**: 651-654.
- [22] FANG YH, FENG X, XU H, WU ZH, XU YJ. Efficacy of iron saturated recombinant human lactoferrin on alleviating iron deficiency anemia in rats. *Beijing Da Xue Xue Bao* 2013; **45**: 417-421.
- [23] FRANSSON GB, KEEN CL, LÖNNERDAL 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.
- [24] FRANSSON GB, THOREN-TOLLING K, JONES B, HAMBRAEUS L, LÖNNERDAL B. Absorption of lactoferrin-iron in suckling pigs. *Nutr Res* 1983; **3**: 373-384.
- [25] GIANSANTI F, LEBOFFE L, PITARI G, IPPOLITI R, ANTONINI G. Physiological roles of ovotransferrin. *Biochim Biophys Acta* 2012; **1820**: 218-225.
- [26] GIANSANTI F, ROSSI P, MASSUCCI MT, BOTTI D, ANTONINI G, VALENTI P, SEGANTI L. Antiviral activity of ovotransferrin discloses an evolutionary strategy for the defensive activities of lactoferrin. *Biochem Cell Biol* 2002; **80**: 125-130.
- [27] GKOUVATSOS K, PAPANIKOLAOU G, PANTOPOULOS K. Regulation of iron transport and the role of transferrin. *Biochim Biophys Acta* 2012; **1820**: 188-202.
- [28] GOLDMAN AS, GARZA C, SCHANLER RJ, GOLDBLUM RM. Molecular forms of lactoferrin in stool and urine from infants fed human milk. *Pediatr Res* 1990; **27**: 252-255.
- [29] HAGIWARA T, OZAWA K, FUKUWATARI Y, HAYASAWA H, HIROHATA Y, ADACHI A, KANDA S, AIHARA K. Effects of lactoferrin on iron absorption in immature mice. *Nutr Res* 1997; **17**: 895-906.
- [30] HANSON LH, SAWICKI V, LEWIS A, NUIJENS JH, NEVILLE MC, ZHANG P. Does human lactoferrin in the milk of transgenic mice deliver iron to suckling neonates? *Adv Exp Med Biol* 2001; **501**: 233-239.
- [31] HENTZE MW, MUCKENTHALER MU, GALY B, CAMASCHELLA C. Two to tango: regulation of mammalian iron metabolism. *Cell* 2010; **142**: 24-38.
- [32] 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 (Tokyo)* 1990; **36**: 531-544.
- [33] KAWAKAMI H, HIRATSUKA M, DOSAKO S. Effects of iron-saturated lactoferrin on iron absorption. *Agric Biol Chem* 1988; **52**: 903-908.

- [34] KAWAKAMI H, LÖNNERDAL B. Isolation and function of a receptor for human lactoferrin in human fetal intestinal brush-border membranes. *Am J Physiol* 1991; **261**: G841-G846.
- [35] KING JC, CUMMINGS GE, GUO N, TRIVEDI L, READMOND BX, KEANE V, FEIGELMAN S, DE WAARD R. A double-blind, placebo-controlled, pilot study of bovine lactoferrin supplementation in bottle-fed infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007; **44**: 245-251.
- [36] KLINTWORTH GK, SOMMER JR, OBRIAN G, HAN L, AHMED MN, QUMSIYCH MB, LIN PY, BASTI S, REDDY MK, KANAI A ET AL. Familial subepithelial corneal amyloidosis (gelatinous drop-like corneal dystrophy): exclusion of linkage to lactoferrin gene. *Mol Vis* 1998; **4**: 31-38.
- [37] 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. *Hepatology Res* 2006; **36**: 27-32.
- [38] LEE EY, BARCELLOS-HOFF MH, CHEN LH, PARRY G, BISSELL MJ. Transferrin is a major mouse milk protein and is synthesized by mammary epithelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol* 1987; **23**: 221-226.
- [39] LEONG WI, BOWLUS CL, TALLKVIST J, LÖNNERDAL B. DMT1 and FPN1 expression during infancy: developmental regulation of iron absorption. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; **285**: G1153-G1161.
- [40] LIEU PT, HEISKALA M, PETERSON PA, YANG Y. The roles of iron in health and disease. *Mol Aspects Med* 2001; **22**: 1-87.
- [41] LIPIŃSKI P, STARZYŃSKI RR. 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 Dosw (online)* 2006; **60**: 322-330.
- [42] LÖNNERDAL 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.
- [43] LÖNNERDAL B. Alternative pathways for absorption of iron from foods. *Pure Appl Chem* 2010; **82**: 429-436.
- [44] LOPEZ V, SUZUKI YA, LÖNNERDAL B. Ontogenic changes in lactoferrin receptor and DMT1 in mouse small intestine: implications for iron absorption during early life. *Biochem Cell Biol* 2006; **84**: 337-344.
- [45] MACCIO A, MADEDDU C, GRAMIGNANO G, MULAS C, SANNA E, MANTOVANI G. Efficacy and safety of oral lactoferrin supplementation in combination with rHuEPO-beta for the treatment of anemia in advanced cancer patients undergoing chemotherapy: open-label, randomized controlled study. *Oncologist* 2010; **15**: 894-902.
- [46] MAJKA G, ŚPIEWAK K, KURPIEWSKA K, HECZKO P, STOCHEL G, STRUŚ M, BRINDELL M. A high-throughput method for the quantification of iron saturation in lactoferrin preparations. *Anal Bioanal Chem* 2013; **405**: 5191-5200.
- [47] MAZURIER J, METZ-BOUTIGUE MH, JOLLES J, SPIK G, MONTREUIL J, JOLLES P. Human lactotransferrin: molecular, functional and evolutionary comparisons with human serum transferrin and hen ovotransferrin. *Experientia* 1983; **39**: 135-141.
- [48] MIKOGAMI T, HEYMAN M, SPIK G, DESJEU JF. Apical-to-basolateral transepithelial transport of human lactoferrin in the intestinal cell line HT-29cl.19A. *Am J Physiol* 1994; **267**: G308-G315.
- [49] 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 Cell* 1995; **308**: 391-397.
- [50] PAESANO R, BERLUTTI F, PIETROPAOLI M, GOOLSBEE W, PACIFICI E, VALENTI P. Lactoferrin efficacy versus ferrous sulfate in curing iron disorders in pregnant and non-pregnant women. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2010; **23**: 577-587.
- [51] 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.
- [52] PAULSSON MA, SVENSSON U, KISHORE AR, NAIDU AS. Thermal behavior of bovine lactoferrin in water and its relation to bacterial interaction and antibacterial activity. *J Dairy Sci* 1993; **76**: 3711-3720.
- [53] Protein Structure European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk>)
- [54] QIAN ZM, LI H, SUN H, KO K. Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway. *Pharmacol Rev* 2002; **54**: 561-587.

- [55] QUINN EA. Too much of a good thing: evolutionary perspectives on infant formula fortification in the United States and its effects on infant health. *Am J Hum Biol* 2014; **26**: 10-17.
- [56] SCHADE AI, CAROLINE L. Raw hen egg white and the role of iron in growth inhibition of *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 1944; **100**: 14-15.
- [57] SCHULZ-LELL G, DÖRNER K, OLDIGS HD, SIEVERS E, SCHAUB J. Iron availability from an infant formula supplemented with bovine lactoferrin. *Acta Paediatr Scand* 1991; **80**: 155-158.
- [58] SHEFTEL AD, MASON AB, PONKA P. The long history of iron in the Universe and in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 2012; **1820**: 161-187.
- [59] SHIOTA M, UCHIDA T, ODA T, KAWAKAMI H. Utilization of lactoferrin as an iron-stabilizer for soybean and fish oil. *J Food Sci* 2006; **71**: 120-123.
- [60] STEFANESCU BM, HETU C, SLAUGHTER JC, O'SHEA TM, SHETTY AK. A pilot study of Biotene OralBalance® gel for oral care in mechanically ventilated neonates. *Contempt Clin Trials* 2013; **35**: 33-39.
- [61] SUZUKI YA, LÖNNERDAL B. Baculovirus expression of mouse lactoferrin receptor and tissue distribution in the mouse. *Biometals* 2004; **17**: 301-309.
- [62] SUZUKI YA, LOPEZ V, LÖNNERDAL B. Mammalian lactoferrin receptors: structure and function. *Cell Mol Life Sci* 2005; **62**: 2560-2575.
- [63] SUZUKI YA, SHIN K, LÖNNERDAL B. Molecular cloning and functional expression of a human intestinal lactoferrin receptor. *Biochemistry* 2001; **40**: 15771-15779.
- [64] SVOBODA M, DRABEK J, FICEK R. Effect of bovine lactoferrin on utilization of orally administered iron in suckling piglets. *Bull Vet Inst Pulawy* 2005; **49**: 471-474.
- [65] TALUKDER MJ, TAKEUCHI T, HARADA E. Transport of colostral macromolecules into the cerebrospinal fluid via plasma in newborn calves. *J Dairy Sci* 2002; **85**: 514-524.
- [66] TSUJI S, UEHORI J, MATSUMOTO M, SUZUKI Y, MATSUHISA A, TOYOSHIMA K, SEYA T. Human intelectin is a novel soluble lectin that recognizes galactofuranose in carbohydrate chains of bacterial cell wall. *J Biol Chem* 2001; **276**: 23456-23463.
- [67] UENO HM, KATO K, UEDA N, MATSUI H, NAKAJIMA H. Native, but not thermally denaturated lactoferrin solubilizes iron in the presence of bicarbonate ions. *Dairy Sci & Technol* 2012; **92**: 25-35.
- [68] VAN SNICK JL, MASSON PL, HEREMANS JF. The involvement of lactoferrin in the hypsidermia of acute inflammation. *J Exp Med* 1974; **140**: 1068-1084.
- [69] VIATTE L, VAULONT S. Hepcidin, the iron watcher. *Biochimie* 2009; **91**: 1223-1228.
- [70] VOGEL HJ. Lactoferrin, a bird's eye view. *Biochem Cell Biol* 2012; **90**: 233-244.
- [71] WARD PP, MENDOZA-MENESES M, CUNNINGHAM GA, CONNEELY OM. Iron status in mice carrying a targeted disruption of lactoferrin. *Mol Cell Biol* 2003; **23**: 178-185.
- [72] WEINBERG ED. Iron and infection. *Microbiol Rev* 1978; **42**: 45-66.
- [73] WEINBERG ED. Iron availability and infection. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1790**: 600-605.
- [74] WEINBERG ED. The lactobacillus anomaly: total iron abstinence. *Persp Biol Med* 1997; **40**: 578-583.
- [75] WESSLING-RESNICK M. Iron homeostasis and the inflammatory response. *Annu Rev Nutr* 2010; **30**: 105-122.
- [76] ZHANG P, SAWICKI V, LEWIS A, HANSON L, MONKS J, NEVILLE MC. The effect of serum iron concentration on iron secretion into mouse milk. *J Physiol* 2000; **522**: 479-491.

Redaktor prowadzący – Paweł Lipiński

Otrzymano: 31.03.2015

Przyjęto: 10.04.2015

Jolanta Artym

Zakład Terapii Doświadczalnej

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN

ul. Weigla 12, Wrocław

e-mail: limbiol@iitd.pan.wroc.pl

tel.: 71 370 99 18

