

## ЛАКТОФЕРИН В КЛИНИЧНАТА ПРАКТИКА

М. Николова, П. Николов и М. Балева

Медицински университет – София

### ВЪВЕДЕНИЕ

Лактоферинът (лактоферин) представлява гликопротеин, причисляван към семейството на трансферините, които са способни да свързват и транспортират ферийони ( $Fe^{3+}$ ) [2, 7, 9]. Изолиран е за първи път през 1939 г. от Соренсен и Соренсен [9], а през 1960 г. е определен от три независими лаборатории за основния желязо-свързващ протеин в човешкото мляко [2, 7, 12]. Впоследствие е доказан в секретите на екзокринните жлези и в специфични гранули на неутрофили. Основният източник на лактоферин в плазмата е дегрануляцията на неутрофили [2, 12]. Поради покачване на нивата му в хода на възпалителни реакции (както в периферната кръв, така и в огнището на възпаление) много автори го класифицират и като острофазов белтък. Лактоферинът притежава голям брой биологични функции, свързани с желязосвързващите му свойства, антимикробно и антипаразитно действие, участие в острата фаза на възпалението, неутрализиране на кислородните радикали, повлиява клетъчния растеж и диференциация и др. [2-6, 8, 10-12].

### СТРУКТУРА И ХАРАКТЕРИСТИКА

Лактоферинът е гликопротеин с молекулно тегло от около 80 kDa, принадлежащ към семейството на трансферините, с висок афинитет към желязото [2]. Молекулната му структура е разкрита през 1984 г. Изолирани са три различни изоформи, наречени условно лактоферин-алфа, лактоферин-бета и лактоферин-гама; първият има же-

лязосвързващи свойства, но няма рибонуклеазна активност, а последните две форми имат рибонуклеазна активност, но нямат желязосвързващи и преносни функции [2, 12].

Молекулата на лактоферина е съставена от една полипептидна верига, съдържаща 703 аминокиселини, разположени пространствено в два глобуларни домена – N- и C-амино терминален, свързани с алфа-ос. Всеки домен се състои от по две области – C1, C2 и N1, N2. Във всеки домен има по едно място за свързване на  $Fe^{3+}$  (всяка молекула лактоферин може да свързва по два ферийона).

Молекулите на лактоферина съдържат различен брой места, подлежащи на гликолиза. Най-често срещаният захарид в молекулата е маноза, около 3% хексози и около 1% хексозамини [2]. Степента на гликолизация варира и се определя пряко от степента на устойчивост на протеази и нивата на рН.

Способността на лактоферина да свързва ферийони е около два пъти по-голяма, отколкото тази на трансферина (последният може да играе роля на донор на йони за лактоферина). В зависимост от свързването с желязото се описват три форми на лактоферина – аполактоферин (несвързан), моноферинна форма (свързан с един ферийон) и хололактоферин (свързан с два желязни йона). Третичната структура на хололактоферина и аполактоферина е различна. Четири аминокиселинни остатъка са особено важни за свързването на желязото (хистидин, два остатъка тирозин и аспаргинова киселина).

Освен желязо, лактоферинът свързва и други субстанции, като липополизахариди, хепарин, гликозаминогликани, ДНК, други метални йони (алуминиеви, магнезиеви, цинкови и др., като афинитетът му към тях е по-малък, отколкото към  $Fe^{3+}$ ), оксалати, карбоксилати и др. Така, лактоферинът повлиява метаболизма и преноса на различни субстанции в организма.

Способността на лактоферина да свързва желязни йони дори и при ниско рН е важна, особено в места на възпаление, където нивата на рН са много ниски. В такива случаи лактоферинът свързва и отдадените от серумния трансферин  $Fe^{3+}$  и блокира бактериалната пролиферация [2, 12].

Лактоферинът е устойчив на протеолитичната активност на трипсина и трипсин-подобните ензими, като степента на устойчивост е пропорционална на степента на насищане с желязо.

### ИЗТОЧНИЦИ НА ЛАКТОФЕРИН В ОРГАНИЗМА

Лактоферинът се доказва още в периода на ембрионалното развитие, не се открива по време на имплантация до средата на гестацията, впоследствие се доказва в неутрофили и в епителните клетки, оформящи репродуктивната и храносмилателната система. Синтезира се в клетките от миелоидния ред (които го складира в специфични гранули, не се синтезира от зрелите неутрофили) и от всички екзокринни жлези, във високи нива се доказва в кърмата и в коластрата, в мукозните секрети, сълзите и др. [2, 3, 10-12]. Синтезира се и в бъбречната тъкан [1].

В периферната кръв нивата на лактоферина са доста вариабилни, но е известно, че се покачват в хода на инфекции, възпалителни заболявания, повишен прием на желязо и туморен растеж [2, 12].

#### РЕГУЛИРАНЕ НА СИНТЕЗА НА ЛАКТОФЕРИН

Регулацията на синтеза на лактоферин се осъществява от факторите и хормоните, контролиращи секрецията на съответните екзокринни жлези – пролактин в млечните жлези, полови хормони в репродуктивните органи, естрогени и епидермален растежен фактор в ендометриума и др. [2, 3, 10-12].

#### РЕЦЕПТОРИ ЗА ЛАКТОФЕРИН

Биологичните функции на лактоферина се опосредстват от специфични рецептори, експресирани по повърхността на различните прицелни клетки (мукозните епителни клетки, хепатоцитите, моноцитите, макрофагите, полиморфонуклеарните левкоцити, лимфоцитите, тромбоцитите, фибробластите, както и по повърхността на различни бактерии) [2, 3, 10-12]. Някои клетки дори имат рецептори, които им позволяват да свързват не само лактоферин, но и други трансферини. Освен мембранни се описват и ядрени рецептори за лактоферин.

#### МЕТАБОЛИЗЪМ НА ЛАКТОФЕРИНА

След като бъде синтезиран и изпълни своите биологични функции, лактоферинът се елиминира от организма по няколко пътя – чрез фагоцитните клетки и трансфер не желязо към феритина; чрез поглъщане от купферовите клетки в черния дроб, хепаталните ендотелни клетки и хепатоцитите; с урината (вкл. доказва се в урината на кърмачета-

та на естествено хранене) [2, 3, 10-12].

#### БИОЛОГИЧНИ ФУНКЦИИ НА ЛАКТОФЕРИНА

Лактоферинът има широк спектър биологични функции, вкл. участие в обмяната на желязото в организма, борба с инфекции и инфестации, регулиране на клетъчния растеж и диференциация, на костния обмен и метаболизма на нуклеиновите киселини и др. По-долу са представени основните биологични функции на лактоферина [2-6, 8-12]:

##### • Лактоферин и желязен метаболизъм

Предполага се, че значението на лактоферина за метаболизма на желязото е свързано със сходството му с молекулата на трансферина. Допуска се, че лактоферинът има значение за обмяната на желязото в огнищата на възпаление. В полза на значението на лактоферина за системната обмяна на желязото говори фактът, че жлъчните му нива силно се влияят от пероралния прием на желязо, както и промяната в експресията на интестинални лактоферинови рецептори при кърмачета в зависимост от нивата на желязото в организма. Значението на лактоферина за системната регулация на желязната обмяна остава недобре изяснено, но е известно, че този гликопротеин притежава голям брой други биологични функции.

##### • Антимикробни свойства

Лактоферинът се смята за част от вродения имунен отговор, но участва и в някои специфични имунни реакции. Експресира се по лигавиците и представлява една от първите линии на защита на организма срещу инфекции. От една страна, потиска пролиферацията на редица бактерии, вируси, фунги

и протозоа, а от друга, може да бъде донор на  $Fe^{3+}$  за някои нуждаещи се от желязо бактерии, като *Lactobacillus sp.* и *Bifidobacterium sp.*, които се числят към нормалната бактериална флора. Лактоферинът има изразен благоприятен ефект върху интестиналната микрофлора, което наред с превантивните му свойства по отношение на развитието на некротизиращ ентероколит при недоносени, има голямо значение в първите седмици от живота на новороденото.

Някои бактерии синтезират сидерофори (хелатори на желязо), които се конкурират с лактоферина за свързване на ферийони. Други високоадаптивни бактерии развиват и експресират специфични рецептори по повърхността си, които свързват лактоферина, променят третичната му структура и водят до дисоциация на  $Fe^{3+}$ .

Лактоферинът има и други потискащи ефекти върху микроорганизмите, несвързани с  $Fe^{3+}$ , обусловени от промяна в пропускливостта на бактериалните мембрани.

Доказан е един продукт на обмяната на лактоферина – катионен пептид, наречен лактоферинин, който има изразен бактерициден ефект. Този белтък има две форми – лактоферинин Н, произхождащ от човешки лактоферин, и лактоферинин В от говежди лактоферин.

Лактоферинът катализира производството на свободни радикали и увеличава бактерицидната активност на неутрофилите.

Има и *in vitro* данни, че лактоферинът може да потисне образуването на биофилми. Липсата на желязо в средата принуждава бактериите да се движат, поради което те не могат да се прикрепват към повърхности.

Лактоферинът може да спомогне и за защита срещу инва-

зията от факултативни вътрешноклетъчни бактерии навътре в клетките посредством предотвратяване на адхезията на клетките на нашественика към клетките на макроорганизма.

Смята се, че протеолитичната активност на лактоферина е отговорна за борбата с бактерии, колонизиращи организма с помощта на специфични протеини, които биват лизирани от лактоферина. Тази функция на лактоферина се инхибира от серин-протеазните инхибитори.

Антимикробната активност на лактоферина има голямо значение при недоносени деца, където кърменето и приемът на лактоферин имат изразен положителен ефект върху развитието на некротизиращ ентероколит.

Лактоферинът има голямо значение за развитието на системния инфламаторен отговор при сепсис – регулира възпалителните процеси в посока физиологичен отговор без бързо развитие на системни инфламаторни промени и септичен шок.

Освен това, лактоферинът регулира експресията на медиатори на вродения имунитет, които впоследствие повлияват адаптивния имунен отговор. Поради това се смята, че този гликопротеин играе ролята на мост между двата типа имунитет – вроден и адаптивен.

Лактоферинът има способност да свързва различни ДНК и РНК вируси и да потиска вирусната репликация в клетъчни култури и да повишава експресията на противовъзпалителни фактори (вкл. интерлевкин-11) в животински модели на възпаление и вирусен хепатит, потиска липидната пероксидация. Основната характеристика на лактоферина, свързана с противовирусното му действие, е способността му да се свързва с

гликозамингликаните в клетъчните мембрани с предотвратяване навлизането на вирусите в клетките и предотвратяване на инфекцията в ранна фаза (HSV, CMV, HIV). Лактоферинът инхибира инфекцирането на човешки хепатоцитни тъканни култури с вируса на хепатит С [13], благодарение на свързването на лактоферина с протеини от обвивката на вируса (Е1 и Е2), като така и възпрепятства адхезията, навлизането и репликацията на вируса в чернодробните клетки [14]. При пациенти с хроничен хепатит С терапията с лактоферин намалява нивата на аланин-аминотрансферазата (АЛАТ) и намалява липидната пероксидация, резултат от оксидативния стрес [15]. Оралният прием на лактоферин променя посоката на имунния отговор към Th1 медираните имунни реакции (вкл. интерлевкин-18) [16]. В комбинация с намалението на титъра на HCV РНК този ефект върху имунния отговор подпомага ефективността на комбинираната терапия с интерферон и рибавирин [17].

#### • **Противопаразитни свойства**

Смята се, че лактоферинът нарушава интегритета на клетъчната мембрана на паразитите (напр. на *Toxoplasma gondii*) и така ги инактивира, освен това някои паразити се съревновават с гостоприемника за желязо (напр. *Pneumocystis carinii*). Има обаче паразити, които успяват да използват лактоферина като донор на желязо.

#### • **Лактоферин и имунна система**

Лактоферинът повлиява клетките на имунната система и клетките на възпалението: повлиява антиген-представящите клетки (макрофаги, дендритни клетки в кожата), клетките на адаптивния имунен отговор (Т-

и В-лимфоцити), има имуномодулиращ ефект и предотвратява развитието на свръхостър инфламаторен отговор при сепсис, модулира разпознаването на химиокини и лимфоцитната миграция. От една страна, той стимулира пролиферацията, диференциацията и активацията на клетките на имунната система и имунния отговор, но от друга, има и противовъзпалителни свойства. Във връзка с антимикробната си активност и способност да се свързва с компоненти на клетъчните стени или техни рецептори, лактоферинът може да потисне процеса на отделянето на проинфламаторни цитокини и кислородни радикали, както и да неутрализира и да участва в метаболизма на последните (антиоксидантна активност).

Лактоферинът води до потискане на продукцията на някои инфламаторни цитокини (тумор некротичен фактор-алфа [TNF $\alpha$ ], интерлевкини [IL IL-1 $\beta$  и IL-6] и повишена продукция на антиинфламаторните IL-10 и IL-11.

Освен това, приеман преди раждането, лактоферинът води до намаляване на нивата на интерлевкин-6 в цервиковагиналната течност и на риска от преждевременно раждане.

Лактоферинът потиска кожно-алергичните и кожните възпалителни реакции, като този ефект е независим от желязо-свързващите му свойства. Подобен ефект има и в гастроинтестиналния тракт – потискане на възпалителните реакции, вероятно опосредстван от потискане на TNF $\alpha$ -медирания имунен отговор. Доказано е, че пероралното приложение на лактоферин намалява колонизацията с *Helicobacter felis* и свързаните с него гастритни промени. Доказано е, че екзогенно приложеният лактоферин (вкл. говежди) има бла-

гоприятен ефект при възпалителни промени на периодонциума, при тежки инфекции със системен възпалителен отговор, при анемия.

#### • Лактоферин и туморен растеж

В експериментални модели при мишки лактоферинът потиска туморния растеж и метастазиране. Доказано е, че потиска развитието на неопластичните клетки при карцином на млечната жлеза посредством инхибиране на преминаването на клетката от фаза G1 в S, вероятно поради промяната на експресията и активността на регулаторни белтъци.

Лактоферин-зависимата, цитокин-медирана стимулация на активността на NK клетките и CD4+ и CD8+ лимфоцитите представлява важен фактор за защита срещу развитие на тумори. След перорален прием на лактоферин броят на тези клетки се повишава както в периферната кръв, така и в лимфоидната тъкан.

Инхибирането на туморния растеж от лактоферина е свързано и с апоптоза вследствие индуциране на Fas-зависимата сигнална трансдукция.

#### • Лактоферин и клетъчна пролиферация и диференциация

В миналото се е смятало, че лактоферинът подпомага пролиферацията на клетките поради неговата способност да доставя желязо вътре в клетките. Покъсно се доказва, че лактоферинът действа като активатор на растежния фактор. Ефектът на лактоферина върху растежа на епителните клетки на гастроинтестиналния тракт е по-изразен в сравнение този на епидермалния растежен фактор. Лактоферинът *per se* е способен да стимулира пролиферацията на ендометриалните клетки. Освен това той е доказан транскрипта-

ционен фактор, може да проникне в клетките и да активира транскрипцията на специфични ДНК последователности.

#### • Лактоферин и костен обмен

Лактоферинът е потенциален анаболен фактор, повлияващ остеоцитите. Той стимулира остеобластната пролиферация, подобрява включването на тимидин в остеоцитите и намалява апоптозата на остеобластите с между 50 и 70%. Подобни ефекти се доказват и за хондроцитите. Лактоферинът потиска остеокластогенезата (доза-зависим ефект), но не повлиява костната резорбция от остеокластите. Освен преки ефекти, този гликопротеин може да повлияе индиректно костната тъкан посредством инхибиране на остеолитичните цитокини като TNF $\alpha$  и IL-1 $\beta$ , чиито нива се повишават по време на възпаление.

#### • Рибонуклеазна активност

Съществува голямо разнообразие при молекулите на лактоферина и рибонуклеаза А. Има данни, че лактоферинът може да хидролизира РНК, като тази активност зависи както от типа лактоферин, така и от самата РНК.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Лактоферинът е желязо-свързващ гликопротеин с широк спектър действия, вкл. повлияване на възпалителните процеси, клетъчната пролиферация и диференциация, имунния отговор, неопластичния растеж, индуцирането на цитокиновия синтез и свързаните с него инфламаторни промени, преждевременно раждане, септичен отговор и др. Поради уникалните си имуномодулиращи, антимикуробни и дори антинеопластични свойства той има изключителен потенциал в клиничната практика.

### Библиография

1. A b r i n k , M. et al. Expression of lactoferrin in the kidney: implications for innate immunity and iron metabolism. – *Kidney Int.*, **57**, 2000, 2004-2010.
2. A c t o r , J. K., S-A. Hwang et M. L. Kruzel. Lactoferrin as a natural immune modulator. – *Curr. Pharm. Des.*, **15**, 2009, № 17, 1956-1973.
3. A d l e r o v a , L., A. Bartoskova et M. Faldyna. Lactoferrin: a review. – *Veterinar. Med.*, **53**, 2008, 457-468.
4. G u i n t a , G. et al. Influence of lactoferrin in preventing preterm delivery: a pilot study. – *Mol. Med. Rep.*, **5**, 2012, 162-166.
5. H o e k , K. S. et al. Antibacterial activity in bovine lactoferrin-derived peptides. – *Antimicrob. Agents Chemother.*, **41**, 1997, 54-59.
6. H u s s o n , A-O. et al. Iron Acquisition by *Helicobacter pylori*: importance of human lactoferrin. – *Inf. Immun.*, **61**, 1993, 2694-2697.
7. J o h a n s s o n , B. Isolation of an iron containing red protein from human milk. – *Acta Chem. Scand.*, **14**, 1960, 510-512.
8. P a m m i , M. et S. A. Abrams. Oral lactoferrin for the treatment of sepsis and necrotizing enterocolitis in neonates. – *Cochrane Database Syst. Rev.*, **10**, 2011, CD007138.
9. S ø r e n s e n , M. et S. P. L. Sørensen. The proteins in whey. – *C. R. Trav. Lab. Carlsberg*, **23**, 1939, 55-99.
10. T o m i t a , M. et al. Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. – *J. Dairy Sci.*, **74**, 1991, № 12, 4137-4142.
11. T o m i t a , M. et al. A review: the active peptide of lactoferrin. – *Acta Pediatr. Jpn.*, **35**, 1994, 585-591 (abstract).
12. T o m i t a , M. et al. Twenty-five years of research on bovine lactoferrin application. – *Biochemie*, **91**, 2009, 52-57.
13. T a n a k a , K. et al. Lactoferrin inhibits hepatitis C virus viremia in patients with chronic hepatitis C: a pilot study. – *Jpn. J. Cancer Res.*, **90**, 1999, № 4, 367-371.
14. K i s l a y , R., K. Rupinder et K. Jagat. Targeting viral hepatitis using natural milk protein and traditional medicinal herbs. – *J. Clin. Cell Immunol.*, **3**, 4, 2012, 1-8.
15. K o n i s h i , M. et al. Lactoferrin inhibits lipid peroxidation in patients with chronic hepatitis C. – *Hepatol. Res.*, **36**, 2006, № 1, 27-32.
16. I s h i i , K. et al. Long-term follow-up of chronic hepatitis C patients treated with oral lactoferrin for 12 months. – *Hepatol. Res.*, **25**, 2003, № 3, 226-233.
17. K a i t o , M. et al. Effect of lactoferrin in patients with chronic hepatitis C: combination therapy with interferon and ribavirin. – *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **22**, 2007, № 11, 1894-1897.