

Received: 2005.04.12  
Accepted: 2005.06.08  
Published: 2005.06.30

## Właściwości terapeutyczne białek i peptydów z siary i mleka

### Therapeutic properties of proteins and peptides from colostrum and milk

Michał Zimecki, Jolanta Artym

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

#### Streszczenie

Siara i mleko są bogate w białka i peptydy odgrywające główną rolę w oporności wrodzonej oseska oraz przyspieszające rozwój jego systemu immunologicznego. Właściwości immunotropowe tych białek skłoniły badaczy do poszukiwania ich potencjalnych zastosowań w profilaktyce i terapii. Laktoferyna (LF) wykazuje właściwości antybakteryjne, przeciwwirusowe, przeciwgrzybicze, przeciw pasożytnicze oraz antynowotworowe. Działa ochronnie na komórki nabłonka jelita, promuje wzrost tkanki kostnej i przyspiesza odnowę funkcji systemu immunologicznego u zwierząt poddanych immunosupresji. W badaniach klinicznych LF okazała się efektywna w hamowaniu infekcji wirusem żółtaczkki typu C oraz jelitowej postaci choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi u dzieci. Polipeptyd bogaty w prolinę (PRP) wykazuje różnorodne funkcje, włączając w to promocję dojrzewania komórek T i hamowanie chorób autoimmunologicznych. Zastosowanie PRP, w postaci tabletek (Colostrinin®), okazało się korzystne w hamowaniu rozwoju choroby Alzheimera. Kazeina i peptydy pochodzące z kazeiny zapobiegają demineralizacji szkliwa zębów i rozwojowi próchnicy. Kazeina okazała się także protekcyjna w eksperymentalnej bakteriemii i endotoksemii. Hydrolizaty białka obniżały częstość pojawiania się cukrzycy u zwierząt ze skłonnością do rozwoju tej choroby, redukowały wzrost nowotworów oraz wykazywały aktywność obniżającą ciśnienie krwi. Znosiły objawy związanej z nietolerancją białka kolki jelitowej u niemowląt. Glikomakropeptyd (GMP), peptyd pochodzący z  $\kappa$ -kazeiny, wykazuje różne aktywności przeciwbakteryjne i przeciwzakrzepowe.  $\alpha$ -laktoalbumina (LA) przejawia właściwości przeciwwirusowe, przeciwnowotworowe i przeciwstresowe. Dieta wzbogacona w LA wykazywała właściwości przeciwstresowe, obniżała ciśnienie krwi u szczurów, zapobiegała bieguncce i prowadziła do szybszego przyrostu masy u niedożywionych dzieci. HAMLET®, kompleks LA i kwasu oleinowego, okazał się skuteczny w usuwaniu brodawczaków skórnych i hamowaniu wzrostu guzów nowotworowych. Lizozym znalazł zastosowanie w odżywkach dla niemowląt, leczeniu paradontozji i zapobieganiu próchnicy. Mleko wzbogacone w lizozym jest używane w karmieniu wcześniaków cierpiących na różnego rodzaju infekcje. Przeciwbakteryjne właściwości wykazuje też laktoperoksydaza. Zarówno lizozym jak i laktoperoksydaza wymagają współdziałania z laktoferyną w zwalczaniu infekcji. Przedstawione dane wskazują, że białka i peptydy pochodzące z mleka i siary są łatwo przyswajalnymi, efektywnymi i bezpiecznymi związkami, które znalazły zastosowanie w profilaktyce i terapii, głównie noworodków i dzieci, ale również osób dorosłych.

#### Słowa kluczowe:

mleko • siara • laktoferyna • peptyd bogaty w prolinę • glikomakropeptyd • kazeina • laktoalbumina • lizozym • laktoperoksydaza

## Summary

Colostrum and milk are rich in proteins and peptides which play a crucial role in innate immunity when transferred to the offspring and may accelerate maturation of the immune system in neonates. The immunotropic properties of these proteins prompted investigators research their potential application in prevention and therapy. Lactoferrin (LF) exhibits antibacterial, antifungal, antiviral, antiparasitic, and antitumoral activities. It is protective with regard to intestinal epithelium, promotes bone growth, and accelerates the recovery of immune system function in immunocompromised animals. LF was tried in the treatment of hepatitis C infection and the intestinal form of graft-versus-host disease (GvHD). A proline-rich polypeptide (PRP) demonstrated a variety of immunotropic functions, including the promotion of T-cell maturation and inhibition of autoimmune disorders. PRP, in the form of chewable tablets (Colostrinin®) was recently found to improve or stabilize the health status of Alzheimer's disease patients. Casein and casein-derived peptides showed protective activities in enamel demineralization and as caries-preventing agents. The protein hydrolyzates were also protective in diabetic animals, reduced tumor growth, had antihypertensive activity and diminished colicky symptoms in infants. Glycomacropeptide (GMP), a peptide derived from kappa-casein, exhibited various antibacterial and antithrombotic activities. Alpha-lactalbumin (LA) demonstrated antiviral, antitumoral and anti-stress properties. LA-enriched diets were anxiolytic, lowered blood pressure in rats, prevented diarrhea, and led to a better weight gain in malnourished children. HAMLET®, a complex of LA and oleic acid, was effective in patients with cutaneous papillomas. Lysozyme found application in infant formulas, the treatment of periodontitis, and the prevention of tooth decay. Milk enriched in lysozyme was used in feeding premature infants suffering from concomitant diseases. Interesting, antibacterial properties were exhibited by lactoperoxidase. Both lysozyme and lactoperoxidase required cooperative action with LF in combating bacteria. In conclusion, preparations derived from milk and colostrum are effective, easily bioaccessible, and safe, finding wide application in prevention and therapy for newborns and adults.

**Key words:** milk • colostrum • lactoferrin • proline-rich polypeptide • glycomacropeptide • casein • lactalbumin • lysozyme • lactoperoxidase

**Full-text PDF:** [http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol\\_59/7708.pdf](http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_59/7708.pdf)

**Word count:** 8106

**Tables:** –

**Figures:** –

**References:** 164

**Adres autora:** prof. dr hab. Michał Zimecki, Zakład Terapii Doświadczalnej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, ul. Weigla 12, 53-114 Wrocław; e-mail: zimecki@iitd.pan.wroc.pl

**Wykaz skrótów:** **LF** – laktoferyna; **PRP** – peptyd bogaty w prolinę (proline-rich polypeptide); **GMP** – glikomakropeptyd (glycomacropeptide); **LA** – laktoalbumina; **LY** – lizozym; **LCP** – laktoperozydaza

## WPROWADZENIE

Siara, a później mleko stanowią najbardziej kompletny i wartościowy pokarm dla noworodka. Zawierają liczne aktywne biologicznie składniki, do których możemy zaliczyć białka, węglowodany, tłuszcze, minerały i witaminy. Szczególne znaczenie mają białka, które są łatwo trawione i zaspokajają zapotrzebowanie dziecka na wszystkie główne aminokwasy. Niektóre z tych białek, wraz z immunoglobulinami matki, stanowią ponadto ważne nieswoiste czynniki ochronne, które nie tylko zapewniają odpowiedni stan oporności na patogeny, lecz także spełniają istotną rolę w promowaniu dojrzewania systemu immunologicznego noworodka. Właściwości immunotropowe tych białek były przedmiotem ekstensywnych badań, zarówno na modelach zwierzęcych, jak i prób klinicznych. Uzyskane

wyniki wskazują na ich przydatność w profilaktyce i terapii chorób autoimmunologicznych i neoplastycznych, niedoborów immunologicznych, odnowie funkcji układu immunologicznego po chemioterapii, w zakażeniach, sepsie i endotoksemii. Zachęcające wyniki badań doprowadziły w wielu przypadkach do zastosowania białek mleka w postaci dodatków do produktów przemysłu mleczarskiego i farmaceutycznego.

Celem artykułu jest przegląd właściwości, danych doświadczalnych i wyników prób klinicznych z użyciem kilku wybranych białek i peptydów mleka i siary, zastosowanych osobno lub w kombinacji z innymi, konwencjonalnymi metodami terapii. Szczególną uwagę poświęcono właściwościom i zastosowaniom laktoferyny.



## LAKTOFERRYNA

Laktoferryna (LF) należy do rodziny białek zaangażowanych w metabolizm żelaza i występuje w dużych ilościach w płynach wydzielniczych ssaków (mleku, łzach, ślinie, wydzielinie oskrzeli, wydzielinie dróg rodnych). Dla przykładu stężenia LF wynoszą 1–4 mg/ml w mleku ludzkim i 0,02–1 mg/ml w mleku krowim [69]. Zawartość LF w sianie jest dziesięciokrotnie wyższa niż w mleku [109]. Drugorzędowe ziarnistości krążących neutrofilów stanowią drugi rezerwuuar LF [43]. Białko to, o masie cząsteczkowej 80 kilodaltonów, jest podstawowym elementem systemu odporności wrodzonej, wykazując wiele różnorodnych właściwości ochronnych i immunotropowych [10].

### Właściwości przeciwbakteryjne

Antybakteryjne i bakteriostatyczne działanie LF może być bezpośrednie lub pośrednie. Bezpośrednie działanie LF jest związane z uszkodzeniem ściany komórkowej lub ze zmianą metabolizmu bakterii oraz interferencją z procesami kolonizacji tkanek przez komórki bakterii. Pośrednie przeciwbakteryjne działanie białka dotyczy stymulacji obronności ustroju, tak, by łatwiej mógł zwalczać infekcje.

Wiązanie LF do białek porynowych ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych jest jednym z przykładów bezpośredniego działania LF na bakterie. Wykazano korelację między wiązaniem LF do poryn a przeciwbakteryjnym działaniem białka [83]. Wiązanie ludzkiej LF do poryn OmpC i PhoE *Escherichia coli* zachodzi z udziałem reszt aminokwasowych 1-5, 28-34 i 39-42 białka i prowadzi do zaburzeń przepuszczalności bakteryjnej ściany komórkowej dla składników odżywczych i jonów oraz narusza stabilność tej struktury [108]. Porównując efekty działania LF na formy gładkie i szorstkie mutantów *Salmonella typhimurium* wykazano, że polisacharydowa część lipopolisacharydu (LPS) osłania porynę przed interakcją z LF [83]. W innej pracy wykazano, że bezpośredni efekt bakteriobójczy LF w stosunku do bakterii Gram-ujemnych był związany ze zdolnością uwalniania LPS ze ściany bakteryjnej, co powoduje destrukcję i śmierć komórki [35]. Bezpośrednie działanie przeciwbakteryjne wykazano też dla enzymatycznych hydrolizatów bydłęcej LF, zwłaszcza powstałych w wyniku jej inkubacji z wieprzową pepsyną [125]. Działanie to było co najmniej ośmiokrotnie większe niż w przypadku nietrawionej LF. Autorzy zidentyfikowali bakteriobójczą domenę LF, którą stanowi pętla utworzona z dodatnio naładowanych zasadowych reszt aminokwasowych 19-36, połączonych mostkiem dwusiarczkowym [11]. Peptyd ten, nazwany laktoferrycyną [12], wiązał się szybko do powierzchni *E. coli* i *Bacillus subtilis* (>10<sup>6</sup> cząstek peptydowych na komórkę) i hamował przyswajanie przez bakterie znakowanej proliny z efektywnością podobną do polimiksyny B, znanego czynnika niszczącego ściany komórkowe. Niedawno zidentyfikowano nowy, przeciwbakteryjny peptyd w domenie N1 laktoferryiny (w bezpośredniej bliskości laktoferrycyny) nazwany laktoferrampiną [130]. Peptyd ten wykazywał aktywność przeciwegrzybiczą (w stosunku do *Candida*) większą niż LF i był aktywny wobec *B. subtilis*, *E. coli* i *Pseudomonas aeruginosa*, ale nie przeciwko fermentującym bakteriom: *Actinomyces naeslundii*, *Porphyromas gingivalis*, *Streptococcus mutans* i *S. sanguis*.

Co interesujące, LF może działać w sposób synergistyczny z lizozymem w niszczeniu ścian bakteryjnych [34]. Oba białka znajdują się w dużych stężeniach zarówno w wydzielinach nabłonkowych jak i w ziarnistościach neutrofilów, przyczyniając się do większej odporności na infekcje. LF i lizozym osobno okazały się bakteriostatyczne w stosunku do *Vibrio cholerae*, *S. typhimurium* i *E. coli*, podczas gdy razem były bakteriobójcze [34]. Działanie bakteriobójcze wymagało bezpośredniego kontaktu LF i bakteryjnego LPS, a transmisyjna mikroskopia elektronowa wykazała, że bakterie eksponowane na LF i lizozym pęczniały i wykazywały rozrzedzenie struktury, co sugerowało ich zabijanie przez uszkodzenie osmotyczne.

Kolejnym przykładem bezpośredniego działania przeciwbakteryjnego białka jest zapobieganie wiązaniu się bakterii do komórek docelowych, a tym samym utrudnianie zasiedlania tkanek gospodarza. W jednym z badań bydłęca LF hamowała kolonizację enteropatogennej *E. coli* na ludzkich komórkach nabłonka oraz na nabłonku jelitowym myszy „germfree” *in vivo* [57]. Inni wykazali hamowanie adhezji enteropatogennych *E. coli* do enterocytów i komórek linii HeLa [23]. Podobną aktywność ma wolny komponent wydzielniczy IgA. Oba składniki utrudniają zatem zakażenia bakteriami jelitowymi. Wyjaśnienia mechanizmu tego zjawiska dostarczyły badania wpływu LF na adhezję Hap i proteazy IgA, czynniki wytwarzane przez *Haemophilus influenzae* i ułatwiające kolonizację tych bakterii [102]. Wyniki badań wykazały, że ludzka LF skutecznie usuwała prekursor proteazy IgA z zewnętrznej ściany bakteryjnej oraz degradowała adhezynę Hap, zapobiegając w ten sposób adhezji bakterii do komórek docelowych. Hamowanie efektów działania laktoferryiny przez inhibitory proteaz serynowych sugeruje, że określony fragment cząsteczki LF wykazuje aktywność proteazy serynowej.

Innym ważnym mechanizmem bezpośredniego przeciwbakteryjnego działania LF, proponowanym już w fazie wczesnych badań nad aktywnością białka, jest jego zdolność do mocnego wiązania wolnego żelaza i usuwania go tym samym ze środowiska wzrostu drobnoustrojów [139]. Zdolność LF do wiązania żelaza ma także ochronne znaczenie podczas uszkodzenia tkanek, gdy żelazo uwolnione z mioglobiny i hemoglobiny może indukować powstawanie toksycznych reaktywnych form tlenu. Podobne znaczenie może mieć białko podczas stanów zapalnych, gdy z udziałem żelaza powstają duże ilości wolnych rodników.

Pośrednie antimikrobiologiczne działanie LF jest związane z mobilizacją układu immunologicznego. LF chroniła zwierzęta przed śmiercią po podaniu letalnej dawki *E. coli* [150]. LF znacznie przyspieszała proces usuwania *E. coli* z krwi obwodowej, a także efektywność zabijania bakterii w układzie siateczkowo-śródbłonkowym (monocytno-makrofagowym) wątroby, płuc, śledziony i nerki [150]. LF zwiększała zatem aktywność bójczą komórek tego układu. U myszy z indukowaną alloksemem cukrzycą, LF nie była wprawdzie zdolna do ochrony zwierząt przed śmiercią po letalnej dawce *E. coli*, ale również u tych zwierząt znacznie podnosiła stopień zabijania bakterii w organach [149]. Aktywność ochronną LF wykazano też w systemowej infekcji myszy *S. aureus*, gdy białko zastosowano jako 2% dodatek do wody pitnej. W tym przypadku liczba bakterii w nerkach była obniżona 5–12-krotnie [15]. Co cieka-

we, w przypadku zakażeń dróg moczowych przez *E. coli* u myszy, LF i jej peptydy zostały znalezione w moczu po 2 godzinach od podania doustnego LF, co sugeruje, że LF może działać także w miejscu infekcji [44]. Na modelu mysim wykazano, że mechanizm ochronnego działania LF, podanej na 24 godziny przed infekcją *E. coli*, może polegać na przyspieszonej rekrutacji neutrofilów i obniżeniu indukowanego zakażeniem wytwarzania czynnika nekrozy nowotworów (TNF- $\alpha$ ) [151]. Przyspieszenie rekrutacji neutrofilów przez LF jest zgodne z wcześniejszymi danymi dotyczącymi zdolności do indukcji przez LF wytwarzania czynników stymulujących powstawanie kolonii komórek hemopoetycznych u myszy [111], a także z naszymi niepublikowanymi danymi, wskazującymi na indukcję wytwarzania czynnika stymulującego powstawanie kolonii granulocytów (G-CSF) po dożylnym podaniu myszom bydlęcej LF. Skuteczność LF w zwalczaniu zakażeń potwierdzono również w próbie klinicznej: jej podanie łagodziło przebieg infekcji u pacjentów z neutropenią spowodowaną chemioterapią w leczeniu ostrej białaczki szpikowej [126]. Ważnym aspektem przeciwmikrobiologicznej aktywności LF jest wybiórczość bójęczego działania na mikroflorę jelita: białko hamuje wzrost *E. coli* i innych patogennych bakterii jelitowych (głównie z rodziny *Enterobacteriaceae*), ale nie korzystnych bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* [40]. Ma to szczególne znaczenie u noworodków, u których dochodzi do stopniowej kolonizacji przewodu pokarmowego przez zróżnicowaną mikroflorę. Rozwój prawidłowej flory bakteryjnej zapewnia sprawne procesy trawienia, wytwarzanie niektórych witamin, chroni przed rozwojem bakterii patogennych i wzmacnia odporność. Doświadczenia na myszach „germfree”, karmionych dietą mleczną różniącą się stężeniem węglowodanów oraz uzupełnioną LF, wskazały, iż białko zawarte w diecie stymuluje absorpcję wykorzystywanych przez bakterie jelitowe węglowodanów, co prowadzi do efektu bakteriostatycznego w stosunku do *Enterobacteriaceae* [93]. Odkrycie tego aspektu selektywnego działania przeciwbakteryjnego białka skłoniło do jego zastosowania w odżywkach dla niemowląt.

Dodatkową zaletą LF w walce z zakażeniami bakteryjnymi jest to, że może ona zwiększać wrażliwość bakterii na niektóre antybiotyki, takie jak wankomycyna (antybiotyk polipeptydowy) [64], penicylina [28] i cefpodoksym (cefalosporyna) [81]. LF pozwoliła dwukrotnie obniżyć stężenie terapeutyczne wankomycyny wobec *Staphylococcus epidermidis* [64]. Kombinacja penicyliny i LF podniosła 2–4-krotnie aktywność hamującą antybiotyk wobec *S. aureus* [28]. Skojarzona z cefalosporyną zwiększyła przeżywalność myszy infekowanych letalną dawką *Klebsiella pneumoniae* oraz obniżyła efektywną dawkę antybiotyku [81].

Istnieją badania, wskazujące, iż ludzka LF może stanowić źródło żelaza dla niektórych bakterii, głównie *Helicobacter pylori* (czynnika etiologicznego choroby wrzodowej żołądka i dwunastnicy) [25], oraz bakterii z rodzaju *Neisseria* [80]. Pozyskiwanie żelaza odgrywa ważną rolę w wirulencji bakterii. Nie stwierdzono pobierania żelaza z bydlęcej LF [25]. W świetle powyższych badań, w schorzeniach wywołanych wymienionymi patogenami, białko (szczególnie ludzkie) powinno być aplikowane z dużą ostrożnością.

Niszczenie ścian bakteryjnych w czasie infekcji Gram-ujemnych może prowadzić do uwolnienia LPS i rozwoju endo-

toksemii, charakteryzującej się nadmiernym wytwarzaniem prozapalnych mediatorów prowadzącym do uogólnionego zapalenia, dysfunkcji głównych organów i w konsekwencji – do wstrząsu septycznego i śmierci. Laktoferyna ma działanie przeciwzapalne oraz ochronne w endotoksemii i wstrząsie septycznym. Na modelu indukowanego chemicznie zapalenia jelita grubego u szczurów białko łagodziło objawy stanu zapalnego, co znalazło odbicie w ocenie makroskopowej i histologicznej jelita. Mechanizm działania LF polegał na modulacji układu immunologicznego: redukcji poziomu cytokin prozapalnych (TNF- $\alpha$  i IL-1) oraz stymulacji wytwarzania cytokin przeciwzapalnych (IL-4 i IL-10) w tkankach jelita [124]. Podana na 24 godziny przed iniekcją subletalnej dawki LPS, obniżała poziom TNF- $\alpha$  w surowicy [72] i zwiększała wywarzanie cytokin przeciwzapalnych, takich jak IL-6 i IL-10 [72,155]. W podobnym schemacie doświadczalnym podanie LF zmniejszyło śmiertelność zwierząt z 83 do 17%, a badanie histologiczne ujawniło ochronne działanie LF w stosunku do integralności struktury nabłonka jelita [60]. Sprawna bariera jelita-krew ma niezwykle istotne znaczenie podczas zakażeń uogólnionych, gdyż uniemożliwia translokację bakterii zasiedlających fizjologicznie przewód pokarmowy do krążenia i rozwój bakteriemii. Białko podane ciężarnym myszom przed iniekcją LPS zapobiegało przedwczesnemu porodowi [110]. Zakażenia bakteryjne przez szyjkę macicy prowadzą do zapalenia błon płodowych, które jest częstą przyczyną poronień. Infekcjom towarzyszy zwiększenie wytwarzania cytokin prozapalnych. W cytowanych badaniach LF obniżała stężenia IL-6 w surowicy i przedłużała trwanie ciąży [110]. LF wykazywała właściwości protekcyjne, również wtedy, gdy podano ją jednocześnie lub po iniekcji LPS [61]. Ma to duże znaczenie, gdyż wskazuje na możliwość zastosowania białka nie tylko w protokołach profilaktycznych, ale również w leczeniu już istniejących zakażeń (z takimi sytuacjami mamy przeważnie do czynienia w klinice). W tych badaniach, oprócz regulacji poziomów TNF- $\alpha$ , IL-6 i IL-10, obserwowano także obniżenie wytwarzania tlenu azotu [61]. Protekcyjna aktywność LF w endotoksemii może być, w części, konsekwencją wiązania i neutralizacji LPS przez LF [5]. Uniemożliwia to wiązanie endotoksyny do LBP (LPS-binding protein) i „dostarczenie” jej do receptora CD14 na powierzchni komórki. Zdolność interakcji LF z LPS była sugerowana jako jeden z mechanizmów ochronnego działania LF w endotoksemii [32]. Innym mechanizmem ochronnego działania LF w endotoksemii może być wiązanie LF do rozpuszczalnego receptora CD14 (sCD14), a więc jego zablokowanie [9]. sCD14, w przeciwieństwie do większości wolnych receptorów, nie ma funkcji ochronnych, ale wiąże LPS i może go dostarczać do komórek, również tych, które same go nie ekspresjonują (np. śródbłonna i mięśni gładkich), co wiąże się z ich aktywacją. LF neutralizując LPS lub blokując CD14 chroni organizm przed nadmierną aktywacją układu immunologicznego przez endotoksynę i rozwojem wstrząsu.

### Właściwości przeciwgrzybicze

Wykazano, że LF wykazuje również właściwości przeciwgrzybicze. Wyniki badań dotyczących tej aktywności białka nie zawsze jednak prowadziły do jednoznacznych wniosków. Grzybobójczy efekt LF w stosunku do klinicznych izolatów *Candida albicans* i *C. krusei* był zależny od daw-



ki i obserwowany tylko dla LF wolnej od żelaza (apolaktoferyny) [88]. Badanie z użyciem mikroskopu elektronowego wykazało zmiany na powierzchni komórek, takie jak tworzenie się pęcherzyków i wyciek białek, co wskazuje na bezpośrednie działanie toksyczne na komórki grzybów. Zdolność do zabijania *C. albicans* przez apolaktoferynę była zależna od dawki, czasu działania, temperatury i odczynu środowiska (wyższa w pH 7,0 niż 5,5) [116]. Jednakże, ponieważ powszechnie w organizmie fosforany i jony dwuwęglanowe całkowicie blokowały efekt przeciwrzybiczy LF, wydaje się mało prawdopodobne, aby białko należało do głównych czynników ochronnych przeciwko drożdżycy [116]. Inne badania wykazały, że ludzkie mleko w modelu *in vitro* ma silne działanie przeciwrzybicze, za które odpowiedzialna jest LF [4]. Na podstawie testów żywotności komórek grzybów i mikroskopii elektronowej, autorzy badań wnioskują, że hamujący wpływ LF był raczej fungostatyczny niż przeciwrzybiczy. Związany był ze zdolnością chelatowania żelaza i usuwania tego pierwiastka ze środowiska wzrostu patogenów [4]. Działanie przeciwrzybicze wykazują również niektóre peptydy uzyskane z końca N-cząsteczki białka [128]. Składające się z 6–25 aminokwasów peptydy hamowały wzrost *C. albicans* z efektywnością zbliżoną do niektórych leków przeciwrzybiczych. Efekt przeciwrzybiczy wiązał się częściowo ze zdolnością chelatowania żelaza, ale w dużej mierze zależał od podniesionej aktywności bójczej granulocytów (stwierdzono zwiększenie tworzenia reaktywnych form tlenu oraz aktywację szlaków wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnałów z udziałem kinazy białkowej C oraz kinazy MAP p38) [128]. Aktywność przeciwrzybiczą białka potwierdzono *in vivo*. LF okazała się skuteczna w zwalczaniu zakażeń grzybiczych u zwierząt i ludzi. U świnek morskich, zainfekowanych na grzbiecie *Trichophyton mentagrophytes*, codzienne podawanie LF *per os* nie zapobiegało wprawdzie rozwojowi zakażenia, ale wyraźnie przyspieszało gojenie się zmian skórnych po okresie największego ich nasilenia [136]. W kolejnych badaniach dotyczących tego samego modelu zaproponowano mechanizm przeciwrzybiczego działania podanej doustnie LF [135]. Białko poza bezpośrednim wpływem na komórki patogenu, może oddziaływać w sposób pośredni zwiększając odpowiedź obronną organizmu przeciw grzybom. Autorzy badań wykazali, że LF stymuluje aktywność komórek jednojądrzastych w ustroju zainfekowanych zwierząt, ale nie wpływa na funkcje granulocytów (nie stwierdzono stymulacji aktywności fagocytarnej i wytwarzania reaktywnych form tlenu). LF zwiększała natomiast odpowiedź proliferacyjną splenocytów po stymulacji konkanawaliną A lub zabitymi zarodnikami *T. mentagrophytes* (w testach *in vitro*). Ponadto, supernatanty z hodowli splenocytów od zakażonych zwierząt otrzymujących LF indukowały większą aktywność przeciwrzybiczą makrofagów, w porównaniu z uzyskanymi od zwierząt kontrolnych [135]. Na podstawie cytowanych wyników można wnioskować o podobnym mechanizmie działania białka *in vivo*. Podane w podobny sposób białko hamowało rozwój drożdżycy jamy ustnej u myszy z upośledzoną odpornością [121]. Było skuteczne po podaniu zarówno w wodzie pitnej, jak i przez sondę żołądkową, wykluczając więc możliwość jego działania miejscowe. LF zapobiegała spadkowi liczby krążących leukocytów i limfocytów w węzłach chłonnych. Limfocyty wyizolowane z węzłów chłonnych myszy otrzymujących LF wytwarzały większe ilości IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  oraz IL-12 podczas stymulacji zabitymi komórka-

mi grzybów lub konkanawaliną A. Większa liczba leukocytów i limfocytów oraz aktywność tych komórek korelowała odwrotnie z nasileniem kandydozy w jamie ustnej [46]. Niedawno opracowano tabletki zawierające LF, mające zdolność przywierania do błon śluzowych, co pozwala utrzymać duże stężenia białka w miejscu infekcji [63]. Mogą one znaleźć zastosowanie w leczeniu zakażeń drożdżakowych jamy ustnej i gardła, jednakże na sprawdzenie skuteczności takiej terapii trzeba jeszcze poczekać.

Wstępne próby kliniczne wykazały skuteczność białka w leczeniu grzybicy u ludzi: doustne dawki LF (0,6 lub 2 g dziennie, przez 8 tygodni) łagodziły objawy grzybicy stóp wywołanej przez różne szczepy *Mentagrophytes* [144].

Ze względu na pojawiającą się oporność wielu szczepów grzybów na konwencjonalne metody leczenia, szczególnego znaczenia nabiera konieczność szukania nowych związków leczniczych, które zwiększyłyby skuteczność terapii. Takimi preparatami okazały się LF i pochodne peptydy, skuteczne zarówno w monoterapii, jak i w politerapii, gdzie podnoszą skuteczność leków przeciwrzybiczych. Obiecujące wyniki uzyskano w badaniach *in vitro*. Wskazują one, że peptydy pochodzące z LF mogą współdziałać ze wszystkimi stosowanymi w terapii azolowymi związkami przeciwrzybiczymi, obniżając wymagane dawki terapeutyczne leków o 6–25% [134]. Aktywność przeciwrzybicza jest inicjowana przez peptyd z LF, podczas gdy związki te uczestniczą w fazie efektorowej zabijania komórek różnych szczepów *Candida* [70]. Co ważne, terapia okazała się skuteczna również wobec grzybów opornych na działanie leków przeciwrzybiczych: peptydy z LF wpływają na procesy oddychania mitochondrialnego uwrażliwiały komórki patogenu na działanie leków [70].

### Właściwości przeciwpasożytnicze

Laktoferyna hamuje także namnażanie się pasożytniczych pierwotniaków. Myszy, którym podano doustnie 5 mg lub dootrzewnowo 0,1 mg laktoferyny były chronione przed letalnymi skutkami infekcji *Toxoplasma gondii*, a liczba cyst w mózgu była znamienne niższa w porównaniu z odpowiednią grupą kontrolną [53]. Mechanizm przeciwpasożytniczego działania białka nie jest do końca poznany. Badając zabijanie wewnątrzkomórkowych form *T. gondii* w makrofagach inkubowanych z LF, stwierdzono, że aktywność białka nie wiąże się ze stymulacją wytwarzania reaktywnych form tlenu [123], ale z promowaniem przez LF fosforylacji reszt tyrozynowych makrofagowych białek o masie cząsteczkowej około 30 kDa [122]. Ich rola w aktywności przeciwpasożytniczej makrofagów nie jest jednak wyjaśniona. LF hamowała także wzrost *Plasmodium falciparum* w hodowli erytrocytów [38]. Aktywność tę przejawiało zarówno białko wolne jak i wysyczone żelazem. Autorzy sugerują, że apo-LF może wiązać żelazo, a utworzony kompleks ma zdolność generowania wolnych rodników, które mogą powodować uszkodzenie błon komórkowych zarówno zainfekowanych erytrocytów jak i pasożytów. LF stymulowała również fagocytozę i wewnątrzkomórkowe zabijanie *Trypanosoma cruzi* przez ludzkie monocyty krwi oraz mysie makrofagi otrzewnowe [68]. W procesie tym zaangażowane były reaktywne formy tlenu, tworzone, jak twierdzą autorzy badań, z udziałem LF. Uzyskane wyniki dotyczą wprawdzie badań *in vitro*, ale mają bezpośrednie odniesie-

nie do sytuacji *in vivo*. LF uwalniana z neutrofilów w dużych ilościach podczas zakażenia, może się przyczyniać do zwiększenia bójczej aktywności fagocytów.

LF wykazuje synergizm z niektórymi lekami stosowanymi w zwalczaniu zakażeń pasożytniczych. W teście *in vitro* wykazano, że kombinacja LF i klarytromycyny (antybiotyku makrolidowego) hamowała wzrost *Pneumocystis carinii* (czynnika etiologicznego oportunistycznego zapalenia płuc) w znacznie większym stopniu niż każdy ze związków użyty osobno [21].

Rozważając antypasożytnicze działanie białka, pamiętać trzeba, że może ono służyć za źródło żelaza niektórym pasożytom, co jest zjawiskiem niekorzystnym, gdyż ułatwia wzrost patogenów. Zdolność pozyskiwania żelaza z LF wykazano dla *Trichomonas vaginalis* [98] i *Leishmania chagasi* [142]. Obserwacje uzyskano wprawdzie w testach *in vitro*, nie można jednak wykluczyć istnienia podobnych zjawisk w organizmie, dlatego rozważając możliwość zastosowania LF w terapii, należy preparat aplikować z dużą ostrożnością w przypadkach, gdy istnieje podejrzenie zakażenia tymi pasożytami.

### Właściwości przeciwwirusowe

Obiecujące wyniki uzyskano także odnośnie przeciwwirusowych aktywności LF. Na działanie białka okazały się wrażliwe m.in.: wirusy opryszczki (*Herpes*), cytomegalowirus, HIV, wirusy zapalenia wątroby typu C oraz B, syncytialny wirus oddechowy (RSV), hantawirus, rotawirus, poliowirus, adenowirus i enterowirus [131]. Choć aktywność przeciwwirusowa jest jednym z głównych aspektów działania białka, jej mechanizm nie został dotąd ostatecznie wyjaśniony. Wydaje się, że LF hamuje głównie początkowe etapy zakażenia wirusowego, tj. adsorpcję i wnikanie cząstek wirusowych do komórek. Mechanizm takiego działania polega na interakcji białka zarówno z cząstkami wirusów, jak i z ich receptorami na powierzchni komórek docelowych.

W serii badań na liniach komórkowych wykazano, że LF ma hamującą aktywność wobec infekcji wirusem zapalenia wątroby typu C (HCV) [50,51,90,91]. Dla wytłumaczenia takiego działania białka sugerowano jego wiązanie do cząstek wirusa, co hamuje penetrację do komórek [50,51]. Aktywność LF była swoista i niehamowana w obecności innych białek mleka [50]. Nie wykazywała jej laktoferycyna (N-końcowy fragment białka), co wskazuje na zaangażowanie innego regionu cząsteczki LF [50]. Dalsze badania wykazały, że karboksylowy region LF, mający częściową homologię sekwencji aminokwasowej z ludzkim antygenem CD81 (receptorem komórkowym dla HCV), wiąże swoiście białko E2 osłonki wirusa. Krytyczny dla tych interakcji okazał się 33-aminokwasowy fragment LF, z zasadniczą rolą cysteiny w pozycji 628 [90,91]. Cytowane wyniki stanowią pierwszy przypadek identyfikacji naturalnego peptydu, który swoiście wiąże białko E2 HCV i zapobiega infekcji tym wirusem. Dość liczne badania wskazują na aktywność hamującą LF wobec HIV-1, podtypu wirusa odpowiedzialnego za ponad 90% zakażeń [13,41,87,100,120]. W testach na linii limfocytów T wykazano, że LF ogranicza infekcję, gdy dodana przed lub podczas etapu adsorpcji wirusa, co wskazuje na hamowanie procesów wiązania lub penetracji

[100]. Bardziej wnikliwe badania wykazały, że LF blokuje te warianty wirusa HIV-1, które używają komórkowych koreceptorów chemokinowych CXCR4 lub CCR5, a mutacje w obrębie białek wirusowych wchodzących w interakcje z tymi koreceptorami powodują rozwój oporności na LF [13]. W testach na linii komórek dendrytycznych LF wiązała się do receptorów typu lektynowego (SIGN) na tych komórkach [41]. Receptory te umożliwiają wiązanie i internalizację HIV-1. Komórki dendrytyczne mogą przekazywać zakażenie limfocytom T CD4<sup>+</sup>. Cytowane wyniki wskazują, że jedną z dróg aktywności anty-HIV białka jest blokowanie koreceptorów komórkowych wirusa i tym samym uniemożliwienie interakcji wirus-komórka. LF może również wiązać się do białka powierzchniowego wirusa HIV (gp120), co hamuje interakcje tej cząsteczki z receptorem CD4 i koreceptorami komórkowymi [120]. Najnowsze badania wskazują ponadto, że LF poza hamowaniem wczesnych etapów inwazji HIV, może ograniczać procesy namnażania w komórkach. Białko silnie hamuje aktywność odwrotnej transkryptazy, a słabo proteazy i integrazy, enzymów HIV-1, istotnych dla późnych etapów cyklu replikacyjnego wirusa [87]. Innym przykładem przeciwwirusowego działania LF jest współzawodnictwo białka i ludzkiego wirusa *Papilloma* (przyczyny brodawek skóry i narządów rodnych oraz czynnika ryzyka raka szyjki macicy) o wspólny komórkowy receptor o charakterze glikozaminoglikanów (siarczan heparanu lub siarczan chondroityny) [29]. Jego istotą jest wiązanie LF do tego receptora, w którym ze strony białka uczestniczą dodatkowo naładowane zasadowe aminokwasy N-końcowego fragmentu cząsteczki. Podobny mechanizm hamowania przez LF stwierdzono dla wirusów: *Herpes simplex* [74], adenowirusów [26] i cytomegalowirusa (CMV) [3]. Co interesujące, komórki pozbawione enzymatycznie lub nieekspresjonujące receptorów glikozaminoglikanowych na swojej powierzchni były chronione przed infekcją *H. simplex* w znacznie mniejszym stopniu (wirus prawdopodobnie może korzystać z innych receptorów) [74]. Wniknięcie CMV do komórki było hamowane zarówno przez wolną od żelaza LF jak i heparynę (oba związki blokowały ten sam receptor komórkowy). Logiczne jest, że w mieszaninie oba składniki wzajemnie znosiły swoje przeciwwirusowe aktywności [3].

Na aktywność przeciwwirusową LF może mieć wpływ modyfikacja struktury cząsteczki, występująca m.in. podczas wiązania jonów metali (żelaza, manganu lub cynku) oraz obecność reszt cukru – kwasu sjałowego. Wyszycenie manganem lub cynkiem nieznacznie obniżało aktywność przeciwwirusową (skierowaną przeciw rotawirusom) w porównaniu z białkiem wysyconym żelazem lub wolnym od jonów. Usunięcie z cząsteczki kwasu sjałowego tę aktywność zwiększało [119]. Wszystkie postaci LF były aktywne wobec HIV-1, przy czym największą efektywnością odznaczała się postać wysycona żelazem, a najmniejszą apo-LF [100].

Ważnego wkładu do badań nad aktywnością przeciwwirusową LF dostarczają testy *in vivo*. Wskazują, że oprócz bezpośredniego działania białka, wynikającego np. z blokowania wiązania wirusa do komórki docelowej, duże znaczenie ma aktywacja układu odpornościowego ustroju, tak by skuteczniej walczył z zakażeniem. Wnioski takie nasunęły badania, w których podanie bydlęcej LF przed infekcją mysim CMV całkowicie chroniło myszy przed śmiercią



[113]. U zwierząt stwierdzono znaczny wzrost aktywności komórek NK, ale nie antygenowo swoistych cytotoxicznych limfocytów T. Podobnego działania nie wykazano u myszy bezgrasicznych, ale mógł być on przywrócony przez transfer limfocytów T ze śledziony dawców traktowanych LF. Wyniki te sugerują, że efekt przeciwwirusowy warunkują limfocyty T, które zwiększają aktywność przeciwwirusową komórek NK [113].

Podobnie jak w przypadku leków przeciwwirusowych i przeciwbakteryjnych, LF wykazuje synergizm działania z niektórymi związkami przeciwwirusowymi. Ma to duże znaczenie, gdyż pozwala obniżyć dawki używanych leków przeciwwirusowych, odznaczających się często dużą toksycznością dla organizmu. Działanie synergistyczne zaobserwowano, gdy LF lub laktoferryne podano razem z acyklowirem w infekcji *Herpes simplex-1* (HSV-1) i HSV-2. Pozwoliło to 2-7-krotnie zredukować efektywną dawkę leku [2]. Podobny synergizm w zwalczaniu infekcji CMV wykazano w testach *in vitro* dla LF i cidofoviru [132] oraz LF i IFN w zakażeniach HCV u ludzi [91]. Zdolność LF do swoistego wiązania się zarówno do wielu wirusów jak i do komórkowych receptorów wirusowych stwarza ponadto nową, ciekawą możliwość wykorzystania białka jako selektywnego nośnika leków przeciwwirusowych [131].

### Właściwości przeciwnowotworowe

Właściwości przeciwnowotworowe LF i pochodnych peptydów ustalono na kilku modelach badawczych *in vitro* i *in vivo*. Bydłęca laktoferryne wywierała bezpośrednie działanie przeciwnowotworowe na komórki linii nowotworowych: włókniakomięsaka MethA, czerniaka B16F10 i raka okrężnicy C26 oraz na wywodzące się z nich nowotwory *in vivo* [33]. Mikroskopia skaningowa wykazała działanie cytotoxiczne LF objawiające się uszkodzeniem błony komórkowej i lizą komórek *in vitro*, co prowadziło do rozległej krwotocznej nekrozy i ograniczenia wielkości guzów *in vivo*. Dalsze badania wskazały, że podobną aktywność przeciwnowotworową wykazują syntetyczne peptydy, będące analogami tych uzyskanych z końca N-cząsteczki BLF (reszty 14-31). Co ważne, uzyskane peptydy odznaczały się selektywnością działania: były znacznie bardziej toksyczne wobec komórek linii nowotworowych niż komórek prawidłowych. Najbardziej aktywne okazały się te, które zawierały wszystkie reszty kationowe zgrupowane w jednym sektorze struktury helikalnej [145]. Poza działaniem litycznym na komórki nowotworowe, inne mechanizmy bezpośredniego przeciwnowotworowego działania białka obejmują m.in. hamowanie angiogenezy w obrębie guzów oraz sekwestrację żelaza. Tworzenie nowych naczyń odgrywa istotną rolę w rozwoju guzów i tworzeniu przerzutów, bo pozwala zaopatrywać komórki nowotworowe w tlen i składniki odżywcze. Podskórne podanie LF i laktoferryne myszom z wszczepionym czerniakiem lub chłoniakiem, ograniczało wielkość guzów pierwotnych, liczbę naczyń krwionośnych oraz zdolność przerzutowania [146]. W innych badaniach LF hamowała związaną z guzem angiogenezę indukowaną podaniem myszom komórek 3LL (Lewis lung carcinoma) na modelu worka powietrznego na grzbiecie [112]. Autorzy sugerują, że takie działanie LF wynika z bezpośredniego wpływu hamującego na proliferację śródbłonna oraz wpływu pośredniego przez stymulację uwalniania IL-18 i IFN- $\gamma$  przez ko-

mórki nabłonka śluzówki przewodu pokarmowego. Obie cytokiny są uważane za hamujące neowaskularyzację. Zdolność sekwestracji żelaza, czynnika potrzebnego do wzrostu szybko dzielących się komórek nowotworowych, jest kolejnym aspektem przeciwnowotworowej aktywności LF [139]. Badania *in vivo* wskazały na jeszcze inny, poza bezpośrednim, mechanizm aktywności przeciwnowotworowej białka. LF i laktoferryne, podane doustnie myszom noszącym podskórne implanty raka jelita grubego 26 (Co26Lu), o dużej zdolności do przerzutowania, hamowały metastazę tego nowotworu do płuc [49]. Wiązało się to ze stymulacją układu odpornościowego zwierząt: wzrosła liczba komórek o fenotypie asjal- GM1<sup>+</sup> (komórki NK) i CD8<sup>+</sup> w krwi obwodowej, a w teście *in vitro* spadła żywotność komórek nowotworowych hodowanych w obecności leukocytów wyizolowanych od myszy traktowanych LF [49]. Na podobnym modelu badawczym stwierdzono znaczną stymulację przez LF odporności w obrębie śluzówki jelita: wzrost liczby limfocytów T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, komórek NK i limfocytów B IgA<sup>+</sup> i IgM<sup>+</sup> był skorelowany z wytwarzaniem IL-18 i IFN- $\gamma$  oraz kaspazy 1 (aktywator IL-18) [138]. Zwiększoną aktywność komórek NK zanotowano również po podaniu LF myszom z wszczepionym czerniakiem. Odpowiadało jej rzadsze tworzenie przerzutów do płuc [14]. W wielu nowotworach ulega obniżeniu ekspresja różnorodnych cząsteczek powierzchniowych na komórkach odpornościowych oraz innych (np. komórkach śródbłonna). Dotyczy to zarówno cząsteczek receptorowych, kostymulujących, jak i cząstek adhezji międzykomórkowej. Ułatwia to komórkom nowotworowym „ucieczkę” przed nadzorem układu immunologicznego. Znaczemu obniżeniu ulega m.in. ekspresja, będącego częścią kompleksu CD3, łańcucha  $\xi$  na powierzchni infiltrujących nowotwór i krążących limfocytów T i komórek NK, czemu towarzyszy obniżona odpowiedź proliferacyjna i zmniejszone wytwarzanie cytokin. W testach *in vitro* LF zwiększała liczbę cząstek tego łańcucha na obwodowych limfocytach T wyizolowanych od pacjentek z rakiem szyjki macicy. Uzyskany efekt był zbliżony do zastosowania przeciwciał anti-CD3 [39].

### Wpływ laktoferryne na układ immunologiczny i zaburzenia immunologiczne

Laktoferryne wykazuje interesujące, stymulujące działanie na dojrzewanie limfocytów i inicjację odpowiedzi immunologicznej. Wykazano, że LF działa wprost na prekursorowe komórki T w grasicy powodując nabycie przez nie fenotypu komórek pomocniczych (Th) CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> [158]. Stymulacja dojrzewania limfocytów Th znalazła odbicie w zwiększeniu humoralnej odpowiedzi immunologicznej na eryocyty owcy (SRBC). Uzyskana odpowiedź była porównywalna do indukowanej przez podanie IL-1 [158]. LF promowała też dojrzewanie limfocytów B izolowanych ze śledziony nowo narodzonych myszy [159]. Objawiało się ono wzrostem liczby powierzchniowych IgD oraz receptorów komplementu. LF czyniła także limfocyty B noworodków mysich o prawidłowym statusie immunologicznym oraz dorosłych myszy z niedoborem immunologicznym dojrzających komórek B (myszy CBA/N) zdolnymi do prezentacji antygenów liniom komórek Th [159]. LF wykazuje też właściwości adiuwantowe w indukcji nadwrażliwości typu późnego (DTH) u myszy [156]. Podana doustnie znacznie stymuluje zarówno lokalną (w jelicie), jak i systemową,

nieswoistą odpowiedź immunologiczną [24]. Jednak, LF podana razem z wyzwalającą dawką antygeny, hamuje reakcję DTH [157]. Podobnie, aktywność efektorowa antygenowo swoistej linii Th1 była hamowana przez LF [160]. Wyniki te wskazują na odmienne działanie LF w stosunku do fazy indukcyjnej (stymulacja) i efektorowej odpowiedzi immunologicznej (supresja).

LF badano również na kilku modelach doświadczalnych, odpowiadających różnym sytuacjom klinicznym. Białko, podawane przez okres kilku miesięcy myszom New Zealand Black (rozwijającym spontanicznie autoimmunologiczną chorobę hemolityczną), powodowało obniżenie odsetka dodatniej reakcji Coombsa, co wskazuje na zmniejszenie miana zaangażowanych w reakcje autoimmunologiczne przeciwciał IgG. Ponadto, preinkubacja limfocytów otrzewnowych tych myszy z LF spowodowała spadek liczby komórek rozpoznających antygen na erytrocytach [163].

Wykazano też, że LF przyspiesza odnowę funkcji immunologicznych myszy po podaniu subletalnej dawki cyklofosfamid (CP). Podawana doustnie przez 14 dni LF odnawiała odpowiedź komórkową typu DTH, czemu towarzyszył wzrost liczby komórek w śledzionach oraz makrofagów otrzewnowych i płucnych [6]. LF w sposób istotny odnawiała też liczbę komórek wytwarzających przeciwciała w śledzionach poddanych immunosupresji myszy. Zjawisko to było skorelowane z przywróceniem do poziomów bliskich kontrolnemu zdolności splenocytów do proliferacji indukowanej konkanawaliną A i mitogenem ze szkarłatki [7]. Okazało się, że białko ogranicza zakażenie grzybicze u myszy poddanych immunosupresji za pomocą prednizolonu [121]. LF chroniła przed spadkiem liczby leukocytów i limfocytów w węzłach chłonnych oraz podnosiła aktywność tych komórek, co odwrotnie korelowało z nasileniem objawów kandydozy w jamie ustnej. W próbie klinicznej białko podane pacjentom leczonym chemioterapią z powodu białaczki nie chroniło wprawdzie przed pojawianiem się infekcji bakteryjnych, ale skracało i łagodziło ich przebieg [126]. LF okazała się również efektywna w redukowaniu zmian histologicznych w wątrobie i regulacji wytwarzania cytokin u szczurów z indukowaną żółtaczką mechaniczną [152]. Co ciekawe, LF może sama wykazywać działanie przeciwbólowe oraz zwiększać przeciwbólowe działanie morfiny w teście formalinowym u szczurów [46]. Autorzy wykazali, że przeciwbólowa aktywność LF była mediowana przez tlenek azotu. Ten sam mediator był zaangażowany w hamowanie objawów stresu psychicznego u szczurów [56]. Odwrócenie działania LF przez nalokson (antagonistę receptora opioidowego) oraz inhibitor syntazy tlenu azotu wskazuje, że LF aktywuje endogenne system opioidergiczny ustroju z udziałem tlenu azotu. Przeciwbólowe i przeciwpirogenne działanie u szczurów wykazuje także tetrapeptyd odpowiadający resztom aminokwasowym 39-42 ludzkiej LF [85]. Niedawno wykazano, że LF może przyspieszać tworzenie się tkanki kostnej *in vivo* (na modelu mysim) [22], co otworzyło możliwość zastosowania białka w profilaktyce i leczeniu osteoporozy.

### Laktoferyna w próbach klinicznych

Zachęcające wyniki prób *in vitro* i badań na zwierzętach zachęciły do zastosowania białka u ludzi, zarówno zdrowych

ochotników, jak i osób cierpiących na różne schorzenia. W próbie na zdrowych ochotnikach LF, podawana doustnie przez 7 dni (dziennie dawki 50 mg), znamienne podnosiła odsetek krążących prekursorów neutrofilów oraz obniżała spontaniczne wytwarzanie IL-6 i TNF- $\alpha$  w hodowlach jednojądrzastych komórek krwi obwodowej. Opisane efekty działania LF były obserwowane do 14 dni od podania ostatniej dawki białka [162]. Wykazano również, że podawanie LF (50 mg dziennie, przez 5 dni przed operacją tarczycy) odwracało pooperacyjną supresję niektórych funkcji układu immunologicznego, takich jak zdolność do indukowanej fitohemaglutyniny proliferacji obwodowych limfocytów oraz wytwarzania TNF- $\alpha$  i IL-6 przez komórki krwi obwodowej. Co więcej, podawanie LF pacjentom przed zabiegiem operacyjnym zwiększało liczbę prekursorów neutrofilów w krążeniu [164]. W randomizowanej próbie klinicznej konwencjonalna terapia zakażeń *Helicobacter pylori* została uzupełniona o bydlęcą LF [27]. Wstępne wyniki wykazały lepszy efekt takiej strategii terapeutycznej w porównaniu z samą antybiotykoterapią. Inne próby kliniczne wykazały korzystne działanie LF w hamowaniu infekcji wirusem zapalenia wątroby typu C [95] oraz w leczeniu jelitowej postaci reakcji przeszczep przeciw gospodarzowi u dzieci [52]. Zawarte w odżywcze białko regulowało skład mikroflory jelita noworodków [106]. Wszystkie przeprowadzone próby potwierdziły bezpieczeństwo i brak działań niepożądanych LF, zastosowanej w różnym zakresie dawek.

### POLIPEPTYD BOGATY W PROLINE

Polipeptyd bogaty w prolinę (PRP) został początkowo zidentyfikowany jako zanieczyszczenie przy preparacji IgG2 z siary owiec. Jest to peptyd o masie cząsteczkowej 17 kDa i dużej zawartości reszt proliny (22%) [55]. Grupy reszt prolinowych mogą się przyczyniać do oporności peptydu na degradację proteolityczną. Do niedawna PRP uznawano za pojedynczy peptyd, obecnie raczej należy uznać go za grupę różnych peptydów, objętych wspólną nazwą, wytwarzanych przez gruczoł mlekowy w celu zapewnienia optymalnego rozwoju fizjologicznego oseska. Wskazują na to wyniki ostatnich badań z użyciem chromatografii wysokociśnieniowej, w których zidentyfikowano PRP jako mieszaninę 32 niskocząsteczkowych peptydów [62]. Wykazują one znaczną homologię do aneksyny i  $\beta$ -kazeiny. Wczesne badania nad aktywnością PRP wykazały, że stymulował on humoralną odpowiedź immunologiczną na SRBC oraz zwiększał przepuszczalność naczyń krwionośnych w skórze świnki morskiej [140]. Stymulował ponadto zdolność tymocytów wrażliwych na działanie kortyzonu do indukcji reakcji przeszczep przeciwko gospodarzowi (GvH) [154]. Dalsze badania wykazały, że produkty trawienia PRP chymotrypsyną regulowały humoralną odpowiedź immunologiczną, reakcję nadwrażliwości typu późnego i promowały dojrzewanie tymocytów [117]. PRP miał aktywność kostymulacyjną w teście proliferacji tymocytów w odpowiedzi na konkanawalinę A oraz w większych dawkach, sam indukował proliferację komórek węzłów chłonnych [161]. PRP promował dojrzewanie prekursorowych komórek T: działał na bardzo wczesne komórki prekursorowe o fenotypie: Thy<sup>-</sup> H2<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> indukując pojawienie się receptorów CD4, CD8, CD3 i  $\alpha\beta$ -TCR na ich powierzchni [141]. Przedstawiono także zdolność PRP i jego ak-





tywnych fragmentów do indukcji kilku cytokin, takich jak: IFN, TNF- $\alpha$ , IL-6 i IL-10 [148]. Na modelu wywołanej doświadczalnie odpowiedzi autoimmunologicznej u myszy z usuniętą grasicą, immunizowanych erytrocytami szczura, PRP obniżał wytwarzanie autoprzeciwciał [48]. Peptyd ten obniżał także odsetek dodatnich wyników reakcji Coombsa i przedłużał średnią długość życia myszy New Zealand Black [153]. Dane te sugerują możliwość zastosowania PRP w leczeniu chorób autoimmunologicznych u ludzi. Ostatnio, PRP (w postaci tabletek o nazwie Colostrinin<sup>®</sup>) został poddany próbom klinicznym u pacjentów z chorobą Alzheimera. Wyniki wykazały, że preparat poprawia funkcje poznawcze i codzienną aktywność chorych [17,66]. Sugeruje się, że korzystne działanie PRP/Colostrinin<sup>®</sup> obserwowane u pacjentów z chorobą Alzheimera, może być spowodowane m.in. hamowaniem nadmiernego wytwarzania tlenu azotu [147].

## KAZEINA

$\alpha$ - i  $\beta$ -kazeina, a także peptydy pochodzące z kazeiny, wykazują ciekawe, ochronne właściwości, potwierdzone zarówno w badaniach na modelach zwierzęcych jak i ludzkich. Wykazano, że kazeina i produkty jej trypsynowej degradacji, zapobiegały demineralizacji szkliwa zębów bydła na modelu próchnicy *in vitro*. Białka były wbudowywane do płytki nazębnej, co wiązało się ze zwiększeniem ilości fosforanu wapnia oraz buforowaniem kwaśnego odczynu (będącego skutkiem katabolizmu bakterii) w obrębie płytki nazębnej [104]. Zastosowanie płynu zawierającego skompleksowane z fosforanem wapnia pochodne kazeiny ograniczało rozwój próchnicy w próbie klinicznej obejmującej 63 osoby z syndromem suchej jamy ustnej. Okazało się nawet skuteczniejsze w porównaniu do zastosowanego płynu zawierającego 0,05% fluorek sodu [45]. Na modelu pomenopauzalnego ubytku tkanki kostnej u starych szczurów pozbawionych jajników, badano zawarte w diecie fosfopeptydy kazeiny skoniugowane z wapniem [127]. Grupy kontrolne obejmowały szczury karmione dietą suplementowaną w  $\text{CaCO}_3$  i  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . W ciągu 17 tygodni obserwacji stwierdzono jedynie niewielkie zmniejszenie gęstości mineralnej kości udowej u szczurów karmionych fosfopeptydami kazeiny, podczas gdy wystąpiły znaczne, nasilające się w czasie, zmiany w grupie kontrolnej. Autorzy badań wnioskują, że hamowanie ubytku tkanki kostnej przez fosfopeptydy kazeiny może wynikać z ich wpływu na metabolizm wapnia i fosforu, dostarczanych w diecie. Kazeina wykazywała także ochronne efekty w doświadczalnej bakteriemii i endotoksemii. Podskórne podanie białka myszom, 24 godziny przed iniekcją letalnej dawki bakterii Gram-dodatnich lub Gram-ujemnych, chroniło zwierzęta przed śmiercią [89]. Kazeina podana miejscowo, indukując u zwierząt lokalny „sterylny” odczyn zapalny związany z odpowiedzią ostrej fazy, może stymulować ogólnoustrojową odpowiedź na zakażenie. Jest to przypuszczalny mechanizm ochronnego działania białka. Łączyło się ono z przyspieszonym usuwaniem bakterii z organów, skuteczniejszą rekrutacją neutrofilów do tkanek oraz wyższą fagocytozą i nasileniem wybuchu tlenowego fagocytów. Stwierdzono ponadto podwyższone stężenia G-CSF (czynnika stymulującego powstawanie kolonii granulocytów) w surowicy, a efekt podskórnego podania kazeiny był podobny do uzyskanego przez iniekcję rekombinacyjnego G-CSF. W omawianych badaniach nie zaobserwo-

wano jednak zwiększonego wytwarzania innych cytokin: TNF- $\alpha$ , IL-1 i IL-6 po podaniu *E. coli*. U myszy, którym podano doustnie LPS z *Salmonella typhimurium* i karmiono handlowo dostępnym preparatem kazeiny, składającym się głównie z bydlęcej  $\alpha$ -s2-kazeiny (reszty 1-32) i  $\beta$ -kazeiny (reszty 1-28), autorzy wykazali, że poziom jelitowych i kałowych przeciwciał IgA anty-LPS oraz całkowity poziom IgA był wyższy niż u myszy karmionych dietą kontrolną. Stwierdzono również większe wytwarzanie IgA oraz IL-5 i IL-6 przez splenocyty [97]. Wydzielnicze IgA odgrywają niezwykle ważną rolę w ochronie tkanki jelita przed inwazją bakterii i wirusów. Wyniki te wskazują zatem, że fosfopeptydy kazeiny zawarte w diecie mogą chronić gospodarza przed zakażeniami spowodowanymi przez patogeny obecne w pożywieniu. W innych badaniach stwierdzono ochronny efekt diety zawierającej hydrolizat kazeiny w cukrzycy – chorobie autoimmunologicznej mediowanej przez limfocyty T. W jednym z badań hydrolizat kazeiny chronił non-obese diabetic (NOD) myszy ze skłonnością do cukrzycy przed rozwojem tej choroby [47]. Mechanizm tego działania nie jest do końca wyjaśniony, wiadomo jednak, że nie było ono związane z istotnym wpływem diety na limfocyty T. Hamowanie rozwoju cukrzycy przez dietę wzbogaconą w hydrolizat kazeiny stwierdzono również w badaniu na szczurach podatnych na rozwój choroby: występowanie cukrzycy było 2–3 razy rzadsze niż u zwierząt karmionych dietą opartą o produkty zbożowe. Takie działanie kazeiny może się wiązać z promowaniem neogenezy wysp trzustkowych (Langerhansa) [137]. Podawanie kazeiny okazało się także korzystne w ochronie zwierząt przed nowotworami. Na modelu indukowanych dwumetylohydrazyną nowotworów jelitowych u szczurów, testowano kilka rodzajów diet, włączając w to diety wzbogacone w: serwatkę, kazeinę, soję lub czerwone mięso [78]. Wyniki wykazały, że diety wzbogacone w serwatkę lub kazeinę lepiej chroniły przed rozwojem zmian nowotworowych niż inne diety (zmiany pojawiły się u mniejszej liczby zwierząt, a guzy, które powstały miały mniejszą masę). Ponadto, wewnątrzkomórkowe stężenie glutationu (tripeptydu o właściwościach przeciwnowotworowych i antyutleniających) w wątrobie było najwyższe w przypadku diet wzbogaconych w białka serwatki i kazeinę. Serwatka jest źródłem prekursorów syntezy glutationu (zawiera białka bogate w cysteinę), co może tłumaczyć jej ochronne działanie przeciwnowotworowe. W innych doświadczeniach badano wpływ białek mleka krowiego na procesy melanogenezy w komórkach czerniaka B16 [84]. Spośród badanych białek jedynie  $\kappa$ -kazeina wykazywała właściwości depigmentujące, ograniczała zatem wzrost nowotworu. Badano też wpływ diety z 50% zawartością kazeiny na rozwój nadczynnego wola tarczycowego, rozwijającego się u myszy pojonych wodą z nadmiarem jodu [101]. W tym przypadku dieta kazeinowa znacznie redukowała wielkość wola. Autorzy sugerują, że kazeina może ograniczać ilość jodu wnikażącego do komórek tarczycy i hamować tworzenie się koloidu (tyreoglobuliny, postaci magazynowej hormonów tarczycy) w świetle pęcherzyków gruczołu. W innego rodzaju badaniach, w wyniku enzymatycznej hydrolizy kazeinianu sodu otrzymano 14 peptydów o aktywności obniżającej ciśnienie krwi [105]. Peptydy te w teście *in vitro* hamowały aktywność enzymu konwertującego angiotensynę I do aktywnej angiotensyny II – silnego związku hipertensyjnego działającego kurcząco na naczynia krwionośne. W podobny sposób uzyskano również jeden peptyd o ak-

tywności opioidu (przeciwbólowej i uspokajającej) [105]. Dieta wzbogacona w kazeinę okazała się ponadto efektywna w łagodzeniu objawów kolki jelitowej u niemowląt, związanej z uczuleniem na białko [54].

### GLIKOMAKROPEPTYDY

Glikomakropeptyd (GMP), peptyd pochodzący z  $\kappa$ -kazeiny (reszty aminokwasowe 106-169), przyciągnął w ostatnich latach wyjątkowe zainteresowanie badaczy [19]. GMP charakteryzuje się dużą zawartością kwasu sjałowego, która jest jednak dość zmienna w zależności od gatunku przeżuwaczy [114]. Wydaje się, że liczba reszt kwasu sjałowego wpływa na aktywność białka. Efekty jego działania, takie jak stymulacja fagocytozy i proliferacji ludzkiej linii makrofagowej U937 są szczególnie zaznaczone w białku bogatym w kwas sjałowy [67]. Podobnie, hamujący wpływ GMP na wiązanie toksyny cholery do komórek jajnika chomika chińskiego (CHOK1) był związany z obecnością końcowego kwasu sjałowego [57]. Jednakże, w innym badaniu wykazano, że zarówno natywne jak i desjałowane postaci tego samego bydłowego GMP całkowicie zapobiegały adhezji bakterii kolonizujących jamę ustną: *Actinomyces viscosus* NY1, *Staphylococcus sanguis* OMZ9 i *Staphylococcus mutans* OMZ176 do erytrocytów i powierzchni polistyrenowych [86]. Powyższe wyniki sugerują, że GMP może prawdopodobnie oddziaływać z komórkami za pośrednictwem receptorów dwójakiego typu: rozpoznających kwas sjałowy lub sekwencje aminokwasowe w cząsteczce GMP. Oprócz GMP, podobną aktywność hamującą wykazywały także inne mucynopodobne glikoproteiny zawierające krótkie O-związane łańcuchy cukrowe (np. bydłęca surowicza albumina). Hamowanie adhezji bakterii jamy ustnej nie zależało od obecności kwasu sjałowego w cząsteczce GMP i może być porównane do nieswoistego hamowania przez różne polimery. Na modelu naczyniowej nadpłytkowości u świnek morskich, wywołanej laserowym uszkodzeniem ściany naczyń, GMP oraz pochodne peptydy zawierające reszty 106-116 i 112-116 wykazywały właściwości antyagregacyjne oraz przeciwzakrzepowe [8]. Co ciekawe, aktywność białka *in vivo* wymagała dużo mniejszych stężeń niż można byłoby oczekiwać na podstawie testów *in vitro*, co może wskazywać na współdziałanie dodatkowych czynników obecnych w organizmie. Najbardziej obiecujące wyniki dotyczące efektywności terapeutycznej GMP pochodzą z badań nad potomstwem małych rebusów. Odżywka uzupełniona o GMP, podawana małym od urodzenia do 5 miesiąca życia, redukowała nasilenie biegunki wywołanej podaniem enteropatogenicznego szczepu *E. coli* [20]. Dla porównania, biegunka w ogóle nie pojawiała się u noworodków karmionych mlekiem matki i odżywką wzbogaconą w  $\alpha$ -laktoalbuminę, a była silna u tych otrzymujących dietę kontrolną bez suplementacji. Na podobnym modelu mały były karmione piersią, dietą kontrolną, dietą wzbogaconą w  $\alpha$ -laktoalbuminę lub w GMP [59]. U osobników karmionych GMP stwierdzono lepsze przyswajanie pokarmu oraz wyższy hematokryt niż u zwierząt żywionych innymi odżywkami. W dodatku, zwierzęta z tej grupy wykazywały nawet wyższy poziom cynku w surowicy i stopień jego absorpcji w jelicie niż te karmione piersią. Nasze niepublikowane dane wskazują ponadto na ochronne właściwości GMP w doświadczalnej bakteriemii i endotoksemii, przewyższające efekty laktoferryny.

### LAKTOALBUMINA, LAKTOGLOBULINA I LIZOZYM

Laktoalbumina (LA) i lizozym (LY) najprawdopodobniej pochodzą ze wspólnego prekursora, o czym można sądzić na podstawie dużego podobieństwa sekwencji aminokwasowej, wysokiego konserwatywności rozmieszczenia mostków disiarczkowych i struktury przestrzennej ich cząsteczek oraz organizacji intronów i eksonów w kodującym je DNA [79]. W teście *in vitro* wykazano, że  $\alpha$ -laktoalbumina ( $\alpha$ -LA) i  $\beta$ -laktoglobulina mają aktywność przeciwwirusową skierowaną przeciwko wirusowi HIV-1. Działają przez hamowanie enzymów wirusowych: proteazy i integrazy (ale nie odwrotnej transkryptazy) [87]. Podobne właściwości wykazywała kazeina. Większość danych dotyczących ochronnych właściwości LA pochodzi jednak z badań *in vivo*, najbardziej cennych, bo wskazujących na możliwość zastosowania LA w profilaktyce i terapii. Na szczurzym modelu ostrej choroby wrzodowej na skutek uszkodzenia śluzówki żołądka przez etanol/HCL lub długotrwały stres zanurzenia w wodzie, LA, podana na 30 minut przed indukacją uszkodzenia żołądka, wykazała znaczny efekt protekcyjny o takiej samej sile jak typowy związek przeciwwrzodowy Selbex [77]. Wcześniej podanie szczurom indometacyny (inhibitor syntezy endogennych prostaglandyn) znacznie zredukowało ochronne działanie LA, sugerując zaangażowanie prostaglandyn (PG) w tym zjawisku. Prostaglandyny są związkami o znanym działaniu ochronnym na śluzówkę żołądka: stymulują wydzielanie śluzu i hamują wytwarzanie kwasu solnego, a leki przeciwzapalne hamujące ich syntezę powodują nadżerki błony śluzowej. Uzyskane obserwacje potwierdzono w innym badaniu prowadzonym na tym samym modelu. LA powodowała wzrost poziomu PGE<sub>2</sub> w tkance żołądka, zwiększenie zawartości mucyn żołądkowych, wzrost pH soku żołądkowego, zwiększenie jego objętości i opóźnienie opróżniania żołądka. Wywoływała zatem zjawiska o znaczeniu ochronnym wobec śluzówki żołądka [129]. Efekt diety wzbogaconej w LA, w porównaniu do diety wzbogaconej w kazeinian sodu, był testowany u osób podatnych i niepodatnych na stres [75]. Hipoteza badawcza zakładała, że LA, bogata w tryptofan, będący prekursorem serotoniny, może poprawiać zdolność do radzenia sobie ze stresem (duże stężenia serotoniny w mózgu poprawiają nastrój i ułatwiają pokonywanie sytuacji stresowych). Badanie wykazało, że u pacjentów podatnych na stres, dieta wzbogacona w LA prowadziła do wzrostu osoczonego stosunku tryptofanu do innych, neutralnych aminokwasów, co sprzyja przyswajaniu tryptofanu przez mózg. Obniżała ponadto poziom kortyzolu oraz zmniejszała częstość i nasilenie zachowań depresyjnych w silnym stresie. Autorzy badań sugerują, że takie działanie białka jest spowodowane wpływem na stężenie serotoniny w mózgu. Przypuszczenia te potwierdzono w badaniach na szczurach. Dieta bogata w LA zwiększała pobór tryptofanu i uwalnianie serotoniny w mózgu i w konsekwencji obniżała uczucie lęku u zwierząt [96]. Liczne badania dowiodły, że peptydy pochodzące z laktoalbuminy i laktoglobuliny mają właściwości hipotensyjne (obniżające ciśnienie krwi). Taką aktywność stwierdzono dla tetrapeptydów: Tyr-Gly-Leu-Phe ( $\alpha$ -laktorfiny) i Tyr-Leu-Leu-Phe ( $\beta$ -laktorfiny), pochodnych odpowiednio  $\alpha$ -laktoalbuminy i  $\beta$ -laktoglobuliny [92,115].  $\alpha$ -laktorfina podana podskórnie szczurom ze skłonnością do spontanicznego nadciśnienia obniżała ciśnienie krwi w sposób zależny od dawki, pozostając bez wpływu na rytm serca. Nalokson,



swoisty antagonistą receptorów opioidowych, znosił ten efekt, co dostarcza dowodu na zaangażowanie tych receptorów w mechanizm działania LA [92]. Na modelu *in vitro*  $\alpha$ - i  $\beta$ -laktorfiny ułatwiały indukowaną acetylocholiną relaksację naczyń tętniczych wyizolowanych z krezki wspomnianych szczurów [115]. Nie powodowały zmian w naczyniach zwierząt bez skłonności do nadciśnienia, co wskazuje na selektywne działanie peptydów. Korzystny wpływ laktorfin był skierowany na funkcje śródbłonna, a  $\beta$ -laktorfina wykazywała ponadto działanie niezależne od komórek endotelium. W hipotensyjnym działaniu laktorfin sugeruje się rolę tlenu azotu, gdyż zastosowanie inhibitora syntazy NO ten efekt znosiło [115]. Aktywność hipotensyjną mają również inne peptydy pochodzące z enzymatycznego trawienia  $\beta$ -laktoglobuliny: laktokinina [73] i  $\beta$ -laktozyna B [82]. Pierwszy z peptydów w teście *in vitro* hamował aktywność enzymu konwertującego angiotensynę I (podobnie jak wspomniana już kazeina) oraz redukował (o około 30%) uwalnianie zwięzającej światły naczyń endoteliny 1 [73]. Drugi z peptydów, podany doustnie szczurom spontanicznie rozwijającym nadciśnienie, obniżał skurczowe ciśnienie krwi o około 20 mm Hg, a mechanizm działania również dotyczył hamowania aktywności enzymu konwertującego angiotensynę [82]. Wszystkie dotąd badane antyhipertensyjne peptydy mleka były uzyskane w wyniku hydrolizy enzymatycznej białek mleka. Najnowsze badania otworzyły możliwość wytwarzania takich peptydów przez rekombinację DNA na skalę przemysłową. DNA kodujący jeden z takich peptydów został włączony w genom *E. coli*, co umożliwiło ekspresję peptydu z dużą wydajnością (500  $\mu$ g/L hodowli) [71]. Wykazano ochronne działanie LA na przewód pokarmowy w eksperymentalnie wywołanej bieguncie u małą [20] oraz bieguncie u dzieci [31]. Rezusy od urodzenia do 5 miesiąca życia karmione były piersią, odżywką z dodatkiem LA lub GMP oraz odżywką kontrolną. Jedynie u noworodków z dwu pierwszych grup nie wystąpiła biegunka po podaniu dużej ilości komórek enteropatogennych *E. coli*, podczas gdy u karmionych dietą z GMP biegunka była mniej nasiloną, a karmionych odżywką kontrolną miała ostry przebieg [20]. Dieta o dużej zawartości hydrolizatu LA, podawana dzieciom z niedożywieniem znacznego stopnia, prowadziła do większego przyrostu masy w porównaniu do innego rodzaju odżywek lub mleka krowiego. Dzieci karmione odżywką z LA wymagały również rzadszego nawadniania, co wskazuje na ułatwienie wchłaniania w jelicie wody i sodu [31]. Jednakże, inne badanie, dotyczące dzieci o dobrym stanie odżywienia cierpiących na ostrą biegunkę, nie potwierdziło wyższości takiej diety w porównaniu do trzech innych rodzajów odżywek [107]. LA wykazuje również właściwości przeciwnowotworowe. HAMLET® (kompleks  $\alpha$ -LA i kwasu oleinowego) na modelu ludzkiego glejaka implantowanego bezgrasiczym szczurom, redukował masę guza i opóźnił wystąpienie objawów ucisku guza wewnątrz mózgowia. Okazał się również o wiele bardziej skuteczny niż sama  $\alpha$ -LA. Mechanizm działania preparatu polegał na indukowaniu apoptozy komórek nowotworowych [36]. HAMLET® okazał się także skuteczny w leczeniu pacjentów z brodawkami skórnymi, opornymi na terapię konwencjonalną [42]. Preparat ten ma szansę stać się nowym naturalnym środkiem w terapii nowotworów.

Lizozym (LY) to inne białko mleka, które już znalazło lub ma szansę znaleźć zastosowanie jako dodatek do odżywek

dla niemowląt, w leczeniu chorób przyzębia i zapobieganiu próchnicy zębów, leczeniu zakażeń bakteryjnych, terapii wspomagającej w chorobie nowotworowej (jako środek przeciwbólowy) oraz konserwacji żywności [99]. Mleko ludzkie oraz odżywka wzbogacone w LY zostały użyte w żywieniu wcześniaków cierpiących na współistniejące choroby [18]. Dzieci w grupach kontrolnych karmiono sztuczną odżywką lub mlekiem bez dodatku LY. Wykazano korzystny wpływ podawania mleka wzbogaconego w LY: poprawił się ogólny stan dzieci, stwierdzono szybszy przybór masy ciała, szybsze gojenie się infekcyjnych ognisk zapalnych, normalizację wypróżnień i składu stolca, stabilizację poziomu LY w filtratach kałowych oraz tendencję do normalizacji podniesionego poziomu LY w surowicy krwi [18]. Na podstawie przeprowadzonych badań okazało się jednak, że sam lizozym ma raczej działanie bakteriostatyczne, a aktywność bakteriobójczą nabywa w skojarzeniu z laktoferryną. W teście *in vitro* LY nie zabijał komórek *E. coli*, ale w skojarzeniu z LF uzyskano efekt bakteriobójczy [30]. Synergistyczne działanie bakteriobójcze obu białek stwierdzono również w płynach wydzielniczych organizmu, m.in. w mleku [103] i łzach [65].

Niedawno wskazano również na działanie przeciwzapalne lizozymu, polegające na hamowaniu aktywności hemolitycznej komplementu surowicy. Efekt był zależny od dawki w zakresie stężeń występujących w mleku oraz innych wydzielinach ustroju [94]. Co ciekawe, LY może też wykazywać właściwości przeciwbólowe. Białko podane systemowo lub miejscowo hamowało odczuwanie bólu u szczurów z zapaleniem kończyny tylnej indukowanym podaniem różnych substancji, m.in. karageniny [16].

#### LAKTOPEROKSYDAZA

Laktoperoksydaza (LCP) jest obecna w mleku krowim, nie występuje natomiast w ludzkim. Znajduje się obecnie w fazie badań i może w niedługiej przyszłości znaleźć zastosowanie jako czynnik antymikrobiologiczny w hodowli ryb, gospodarstwie domowym, konserwacji żywności i higienie jamy ustnej [133]. U szczurów infekowanych *Streptococcus sobrinus* i karmionych dietą sprzyjającą rozwojowi próchnicy, zastosowany miejscowo roztwór zamkniętych w liposomach LCP i LF ograniczał występowanie próchnicy. Co ciekawe, roztwór zawierający te same białka, ale w postaci wolnej, nie miał działania ochronnego [160]. LCP była także badana u cieląt infekowanych *Salmonella typhimurium*, jednocześnie z grupą kontrolną cieląt karmionych gotowanym mlekiem (niezawierającym aktywnej laktoperoksydazy) [143]. Nie udało się jednak zaobserwować różnic w usuwaniu patogenu z organizmu w obu grupach. Jednakże, w badaniach *in vitro* dodatek do medium hodowlanego surowego zakwaszonego mleka, wzbogaconego w LCP i egzogenne  $H_2O_2$ , powodował szybką redukcję liczby tych bakterii [143]. W badaniach na cielętach infekowanych *E. coli* i traktowanych preparatem zawierającym LCP i LF, okazało się, że przypadki biegunki i śmierci z jej powodu były rzadsze niż u zwierząt kontrolnych [118]. Można zatem wnioskować, że podobnie jak w przypadku LY, przeciwbakteryjne działanie LCP wymaga połączenia z LF.

Należy podkreślić, że wartość terapeutyczna białek pochodzących z mleka może być znacznie obniżona po jego obróbce termicznej. Procedura pasteryzacji mleka (62,5°C

przez 30 min) oraz UHT (134°C przez kilka s) degraduje większość LF, pozbawiając ją właściwości antygenowych oraz zdolności do wiązania żelaza, pozostawiając jednakże nienaruszone właściwości przeciwbakteryjne [1]. Ogrzewanie mleka może znieść również inne ważne właściwości LF, na przykład aktywność adiuwantową (dane niepublikowane) i przeciwwirusową (po ogrzaniu do 65°C białko traciło działanie skierowane przeciwko wirusom HCV) [50]. Standardowa pasteryzacja nie degraduje lizozymu, aczkolwiek dalszy wzrost temperatury powodu-

je jego stopniowe niszczenie (do całkowitego przy 100°C) [37]. Pasteryzowane mleko nie zawiera wykrywalnych ilości laktoperoksydazy [37].

Przedstawione dane wskazują, że białka i peptydy izolowane z mleka i siary są efektywnymi, łatwo przyswajalnymi i bezpiecznymi w użyciu produktami, mogącymi znaleźć liczne zastosowania w profilaktyce i leczeniu różnych schorzeń oraz zaburzeń immunologicznych u noworodków, dzieci i osób dorosłych.

## PIŚMIENICTWO

- [1] Abe H., Saito H., Miyakawa H., Tamura Y., Shimamura S., Nagao E., Tomita M.: Heat stability of bovine lactoferrin at acidic pH. *J. Dairy Sci.*, 1991; 74: 65–71
- [2] Andersen J.H., Jenssen H., Gutteberg T.J.: Lactoferrin and lactoferricin inhibit Herpes simplex 1 and 2 infection and exhibit synergy when combined with acyclovir. *Antiviral Res.*, 2003; 58: 209–215
- [3] Andersen J.H., Osbakk S.A., Vorland L.H., Traavik T., Gutteberg T.J.: Lactoferrin and cyclic lactoferricin inhibit the entry of human cytomegalovirus into human fibroblasts. *Antiviral Res.*, 2001; 51: 141–149
- [4] Andersson Y., Lindquist S., Lagerqvist C., Hernell O.: Lactoferrin is responsible for the fungistatic effect of human milk. *Early Hum. Dev.*, 2000; 59: 95–105
- [5] Appelmek B.J., An Y.Q., Geerts M., Thijs B.G., de Boer H.A., MacLaren D.M., de Graaff J., Nuijens J.H.: Lactoferrin is a lipid A-binding protein. *Infect. Immun.*, 1994; 62: 2628–2632
- [6] Artym J., Zimecki M., Kruzel M.L.: Reconstitution of the cellular immune response by lactoferrin in cyclophosphamide-treated mice is correlated with renewal of T cell compartment. *Immunobiology*, 2003; 207: 197–205
- [7] Artym J., Zimecki M., Paprocka M., Kruzel M.L.: Orally administered lactoferrin restores humoral immune response in immunocompromised mice. *Immunol. Lett.*, 2003; 89: 9–15
- [8] Bal dit Sollier C., Drouet L., Pignaud G., Chevallier C., Caen J., Fiat A.M., Izquierdo C., Jolles P.: Effect of kappa-casein split peptides on platelet aggregation and on thrombus formation in the guinea-pig. *Thromb. Res.*, 1996; 81: 427–437
- [9] Baveye S., Ellass E., Fernig D.G., Blanquart C., Mazurier J., Legrand D.: Human lactoferrin interacts with soluble CD14 and inhibits expression of endothelial adhesion molecules, E-selectin and ICAM-1, induced by the CD14-lipopolysaccharide complex. *Infect. Immun.*, 2000; 68: 6519–6525
- [10] 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
- [11] Bellamy W., Takase M., Yamauchi K., Wakabayashi H., Kawase K., Tomita M.: Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochim. Biophys. Acta*, 1992; 1121: 130–136
- [12] Bellamy W.R., Wakabayashi H., Takase M., Kawase K., Shimamura S., Tomita M.: Role of cell-binding in the antibacterial mechanism of lactoferrin. *B. J. Appl. Bacteriol.*, 1993; 75: 478–484
- [13] Berkhout B., van Wamel J.L., Beljaars L., Meijer D.K., Visser S., Floris R.: Characterization of the anti-HIV effects of native lactoferrin and other milk proteins and protein-derived peptides. *Antiviral Res.*, 2002; 55: 341–355
- [14] Bezault J., Bhimani R., Wiprovnick J., Furmanski P.: Human lactoferrin inhibits growth of solid tumors and development of experimental metastases in mice. *Cancer Res.*, 1994; 54: 2310–2312
- [15] Bhimani R.S., Vendrov Y., Furmanski P.: Influence of lactoferrin feeding and injection against systemic staphylococcal infections in mice. *J. Appl. Microbiol.*, 1999; 86: 135–144
- [16] Bianchi C.: Is Fleming's lysozyme an analgesic agent? An experimental reappraisal of clinical data. *Eur. J. Pharmacol.*, 1981; 71: 211–221
- [17] Bilikiewicz A., Gaus W.: Colostrinin (a naturally occurring, proline-rich, polypeptide mixture) in the treatment of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.*, 2004; 6: 17–26
- [18] Bol'shakova A.M., Shcherbakova E.G., Ivanova S.D., Medvedeva M.M., Zhuravleva T.P.: Lysozyme in the feeding of premature infants with mixed pathology. *Antibiotiki*, 1984; 29: 784–790
- [19] Brody E.P.: Biological activities of bovine glycomacropeptide. *Br. J. Nutr.*, 2000; 84: S39–S46
- [20] Bruck W.M., Kelleher S.L., Gibson G.R., Nielsen K.E., Chatterton D.E., Lonnerdal B.: rRNA probes used to quantify the effects of glycomacropeptide and alpha-lactalbumin supplementation on the predominant groups of intestinal bacteria of infant rhesus monkeys challenged with enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 2003; 37: 273–280
- [21] Cirioni O., Giacometti A., Barchiesi F., Scalise G.: Inhibition of growth of *Pneumocystis carinii* by lactoferrins alone and in combination with pyrimethamine, clarithromycin and minocycline. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2000; 46: 577–582
- [22] Cornish J., Callon K.E., Naot D., Palmano K.P., Banovic T., Bava U., Watson M., Lin J.M., Tong P.C., Chen Q., Chan V.A., Reid H.E., Fazzalari N., Baker H.M., Baker E.N., Haggarty N.W., Grey A.B., Reid I.R.: Lactoferrin is a potent regulator of bone cell activity and increases bone formation *in vivo*. *Endocrinology*, 2004; 145: 4366–4374
- [23] de Araujo A.N., Giugliano L.G.: Lactoferrin and free secretory component of human milk inhibit the adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *BMC Microbiol.*, 2001; 1: 25
- [24] Debbabi H., Dubarry M., Rautureau M., Tome D.: Bovine lactoferrin induces both mucosal and systemic immune response in mice. *J. Dairy Res.*, 1998; 65: 283–293
- [25] Dhaenens L., Szczebara F., Husson M.O.: Identification, characterization, and immunogenicity of the lactoferrin-binding protein from *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.*, 1997; 65: 514–518
- [26] Di Biase A.M., Pietrantonio A., Tinari A., Siciliano R., Valenti P., Antonini G., Seganti L., Superti F.: Heparin-interacting sites of bovine lactoferrin are involved in anti-adenovirus activity. *J. Med. Virol.*, 2003; 69: 495–502
- [27] Di Mario F., Aragona G., Bo N.D., Ingegnoli A., Cavestro G.M., Moussa A.M., Iori V., Leandro G., Pilotto A., Franze A.: Use of lactoferrin for *Helicobacter pylori* eradication. Preliminary results. *J. Clin. Gastroenterol.*, 2003; 36: 396–398
- [28] Diarra M.S., Petitclerc D., Lacasse P.: Effect of lactoferrin in combination with penicillin on the morphology and the physiology of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *J. Dairy Sci.*, 2002; 85: 1141–1149
- [29] Drobni P., Naslund J., Evander M.: Lactoferrin inhibits human papillomavirus binding and uptake *in vitro*. *Antiviral Res.*, 2004; 64: 63–68
- [30] Edde L., Hipolito R.B., Hwang F.F., Headon D.R., Shalwitz R.A., Sherman M.P.: Lactoferrin protects neonatal rats from gut-related systemic infection. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2001; 281: G1140–G1150
- [31] Eichenberger J.R., Hadorn B., Schmidt B.J.: A semi-elemental diet with low osmolality and high content of hydrolyzed lactalbumin in the treatment of acute diarrhea in malnourished children. *Arq. Gastroenterol.*, 1984; 21: 130–135
- [32] Ellass-Rochard E., Legrand D., Salmon V., Roseanu A., Trif M., Tobias P.S., Mazurier J., Spik G.: Lactoferrin inhibits the endotoxin interaction with CD14 by competition with the lipopolysaccharide-binding protein. *Infect. Immun.*, 1998; 66: 486–491
- [33] Eliassen L.T., Berge G., Sveinbjornsson B., Svendsen J.S., Vorland L.H., Rekdal O.: Evidence for a direct antitumor mechanism of action of bovine lactoferrin. *Anticancer Res.*, 2002; 22: 2703–2710
- [34] Ellison R.T. III, Giehl T.J.: Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. *J. Clin. Invest.*, 1991; 88: 1080–1091
- [35] Ellison R.T. III, Giehl T.J., LaForce F.M.: Damage of the outer membrane of enteric gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin. *Infect. Immun.*, 1988; 56: 2774–2781



- [36] Fischer W., Gustafsson L., Mossberg A.K., Gronli J., Mork S., Bjerkvig R., Svanborg C.: Human alpha-lactalbumin made lethal to tumor cells (HAMLET) kills human glioblastoma cells in brain xenografts by an apoptosis-like mechanism and prolongs survival. *Cancer Res.*, 2004; 64: 2105–2112
- [37] Ford J.E., Law B.A., Marshall V.M., Reiter B.: Influence of the heat treatment of human milk on some of its protective constituents. *J. Pediatr.*, 1977; 90: 29–35
- [38] Fritsch G., Sawatzki G., Treumer J., Jung A., Spira D.T.: Plasmodium falciparum: inhibition *in vitro* with lactoferrin, desferri-ferrithiocin, and desferrirocinn. *Exp. Parasitol.*, 1987; 63: 1–9
- [39] Frydecka I., Zimecki M., Bocko D., Kosmaczewska A., Teodorowska R., Ciszak L., Kruzel M., Wlodarska-Polinska J., Kuliczowski K., Kornafel J.: Lactoferrin-induced up-regulation of zeta chain expression in peripheral blood T lymphocytes from cervical cancer patients. *Anticancer Res.*, 2002; 22: 1897–1901
- [40] Griffiths E.A., Duffy L.C., Schanbacher F.L., Dryja D., Leavens A., Neiswander R.L., Qiao H., DiRienzo D., Ogra P.: *In vitro* growth responses of bifidobacteria and enteropathogens to bovine and human lactoferrin. *Dig. Dis. Sci.*, 2003; 48: 1324–1332
- [41] Groot F., Geijtenbeek T.B., Sanders R.W., Baldwin C.E., Sanchez-Hernandez M., Floris R., van Kooyk Y., de Jong E.C., Berkhout B.: Lactoferrin prevents dendritic cell-mediated human immunodeficiency virus type 1 transmission by blocking the DC-SIGN-gp120 interaction. *J. Virol.*, 2005; 79: 3009–3015
- [42] Gustafsson L., Leijonhufvud I., Aronsson A., Mossberg A.K., Svanborg C.: Treatment of skin papillomas with topical alpha-lactalbumin-oleic acid. *N. Engl. J. Med.*, 2004; 350: 2663–2672
- [43] 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
- [44] Haversen L.A., Engberg I., Baltzer L., Dolphin G., Hanson L.A., Mattsby-Baltzer I.: Human lactoferrin and peptides derived from a surface-exposed helical region reduce experimental *Escherichia coli* urinary tract infection in mice. *Infect. Immun.*, 2000; 68: 5816–5823
- [45] Hay K.D., Thomson W.M.: A clinical trial of the anticaries efficacy of casein derivatives complexed with calcium phosphate in patients with salivary gland dysfunction. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, 2002; 93: 271–275
- [46] Hayashida K., Takeuchi T., Harada E.: Lactoferrin enhances peripheral opioid-mediated antinociception via nitric oxide in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 2004; 484: 175–181
- [47] Hermitte L., Atlan-Gepner C., Payan M.J., Mehelleb M., Vialettes B.: Dietary protection against diabetes in NOD mice: lack of a major change in the immune system. *Diabete Metab.*, 1995; 21: 261–268
- [48] Hrabá T., Wieczorek Z., Janusz M., Lisowski J., Zimecki M.: Effect of proline-rich polypeptide on experimental autoimmune response to erythrocytes. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1986; 34: 437–443
- [49] Iigo M., Kuhara T., Ushida Y., Sekine K., Moore M.A., Tsuda H.: Inhibitory effects of bovine lactoferrin on colon carcinoma 26 lung metastasis in mice. *Clin. Exp. Metastasis*, 1999; 17: 35–40
- [50] Ikeda M., Nozaki A., Sugiyama K., Tanaka T., Naganuma A., Tanaka K., Sekihara H., Shimotohno K., Saito M., Kato N.: Characterization of antiviral activity of lactoferrin against hepatitis C virus infection in human cultured cells. *Virus Res.*, 2000; 66: 51–63
- [51] Ikeda M., Sugiyama K., Tanaka T., Tanaka K., Sekihara H., Shimotohno K., Kato N.: Lactoferrin markedly inhibits hepatitis C virus infection in cultured human hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1998; 245: 549–553
- [52] Inoue M., Okamura T., Yasui M., Sakata N., Yagi K., Kawa K.: Lactoferrin for gut GVHD. *Bone Marrow Transplant.*, 2001; 28: 1091–1092
- [53] Isamida T., Tanaka T., Omata Y., Yamauchi K., Shimazaki K., Saito A.: Protective effect of lactoferrin against *Toxoplasma gondii* infection in mice. *J. Vet. Med. Sci.*, 1998; 60: 241–244
- [54] Jakobsson I., Lothe L., Ley D., Borschel M.W.: Effectiveness of casein hydrolysate feedings in infants with colic. *Acta Paediatr.*, 2000; 89: 18–21
- [55] Janusz M., Staroski K., Zimecki M., Wieczorek Z., Lisowski J.: Chemical and physical characterization of a proline-rich polypeptide from sheep colostrum. *Biochem. J.*, 1981; 199: 9–15
- [56] Kamemori N., Takeuchi T., Hayashida K., Harada E.: Suppressing effects of milk-derived lactoferrin on psychological stress in adult rats. *Brain Res.*, 2004; 1029: 34–40
- [57] Kawasaki Y., Isoda H., Tanimoto M., Dosako S., Idota T., Ahiko K.: Inhibition by lactoferrin and kappa-casein glycomacropeptide of binding of Cholera toxin to its receptor. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1992; 56: 195–198
- [58] Kawasaki Y., Tazume S., Shimizu K., Matsuzawa H., Dosako S., Isoda H., Tsukiji M., Fujimura R., Muranaka Y., Ishihida H.: Inhibitory effects of bovine lactoferrin on the adherence of enterotoxigenic *Escherichia coli* to host cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2000; 64: 348–354
- [59] Kelleher S.L., Chatterton D., Nielsen K., Lonnerdal B.: Glycomacropeptide and alpha-lactalbumin supplementation of infant formula affects growth and nutritional status in infant rhesus monkeys. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2003; 77: 1261–1268
- [60] Kruzel M.L., Harari Y., Chen C.Y., Castro G.A.: Lactoferrin protects gut mucosal integrity during endotoxemia induced by lipopolysaccharide in mice. *Inflammation*, 2000; 24: 33–44
- [61] Kruzel M.L., Harari Y., Mailman D., Actor J.K., Zimecki M.: Differential effects of prophylactic, concurrent and therapeutic lactoferrin treatment on LPS-induced inflammatory responses in mice. *Clin. Exp. Immunol.*, 2002; 130: 25–31
- [62] Kruzel M.L., Janusz M., Lisowski J., Fischleigh R.V., Georgiades J.A.: Towards an understanding of biological role of colostrin peptides. *J. Mol. Neurosci.*, 2001; 17: 379–389
- [63] Kuipers M.E., Heegsma J., Bakker H.I., Meijer D.K., Swart P.J., Frijlink E.W., Eissens A.C., de Vries-Hospers H.G., van den Berg J.J.: Design and fungicidal activity of mucoadhesive lactoferrin tablets for the treatment of oropharyngeal candidosis. *Drug Deliv.*, 2002; 9: 31–38
- [64] Leitch E.C., Willcox M.D.: Lactoferrin increases the susceptibility of *S. epidermidis* biofilms to lysozyme and vancomycin. *Curr. Eye Res.*, 1999; 19: 12–19
- [65] Leitch E.C., Willcox M.D.: Synergic anti-staphylococcal properties of lactoferrin and lysozyme. *J. Med. Microbiol.*, 1998; 47: 837–842
- [66] Leszek J., Ingol A.D., Janusz M., Byczkiewicz F., Kiejna A., Georgiades J., Lisowski J.: Colostrin proline-rich polypeptide complex from ovine colostrum – a long-term study of its efficacy in Alzheimer's disease. *Med. Sci. Monit.*, 2002; 8(10): P193–P196
- [67] Li E.W., Mine Y.: Immunoenhancing effects of bovine glycomacropeptide and its derivatives on the proliferative response and phagocytic activities of human macrophagelike cells, U937. *J. Agric. Food Chem.*, 2004; 52: 2704–2708
- [68] Lima M.F., Kierszenbaum F.: Lactoferrin effects on phagocytic cell function. I. Increased uptake and killing of an intracellular parasite by murine macrophages and human monocytes. *J. Immunol.*, 1985; 134: 4176–4183
- [69] Lonnerdal B., Iyer S.: Lactoferrin: molecular structure and biological function. *Annu. Rev. Nutr.*, 1995; 15: 93–110
- [70] Lupetti A., Paulusma-Annema A., Welling M.M., Dogterom-Balling H., Brouwer C.P., Senesi S., Van Dissel J.T., Nibbering P.H.: Synergistic activity of the N-terminal peptide of human lactoferrin and fluconazole against *Candida* species. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2003; 47: 262–267
- [71] Lv G.S., Huo G.C., Fu X.Y.: Expression of milk-derived antihypertensive peptide in *Escherichia coli*. *J. Dairy Sci.*, 2003; 86: 1927–1931
- [72] Machnicki M., Zimecki M., Zagulski T.: Lactoferrin regulates the release of tumour necrosis factor alpha and interleukin 6 *in vivo*. *Int. J. Exp. Pathol.*, 1993; 74: 433–439
- [73] Maes W., Van Camp J., Vermeirssen V., Hemeryck M., Ketelslegers J.M., Schrezenmeir J., Van Oostveldt P., Huyghebaert A.: Influence of the lactokinin Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg (ALPMHIR) on the release of endothelin-1 by endothelial cells. *Regul. Pept.*, 2004; 118: 105–109
- [74] Marchetti M., Trybala E., Superti F., Johansson M., Bergstrom T.: Inhibition of herpes simplex virus infection by lactoferrin is dependent on interference with the virus binding to glycosaminoglycans. *Virology*, 2004; 318: 405–413
- [75] Markus C.R., Olivier B., Panhuysen G.E., Van Der Gugten J., Alles M.S., Tuiten A., Westenberg H.G., Fekkes D., Koppeschaar H.F., de Haan E.E.: The bovine protein alpha-lactalbumin increases the plasma ratio of tryptophan to the other large neutral amino acids, and in vulnerable subjects raises brain serotonin activity, reduces cortisol concentration, and improves mood under stress. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2000; 71: 1536–1544
- [76] Martinez-Gomis J., Fernandez-Solanas A., Vinas M., Gonzalez P., Planas M.E., Sanchez S.: Effects of topical application of free and liposome-encapsulated lactoferrin and lactoperoxidase on oral microbiota and dental caries in rats. *Arch. Oral Biol.*, 1999; 44: 901–906
- [77] Matsumoto H., Shimokawa Y., Ushida Y., Toida T., Hayasawa H.: New biological function of bovine alpha-lactalbumin: protective effect against ethanol- and stress-induced gastric mucosal injury in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2001; 65: 1104–1111

- [78] McIntosh G.H., Register G.O., Le Leu R.K., Royle P.J., Smithers G.W.: Dairy proteins protect against dimethylhydrazine-induced intestinal cancers in rats. *J. Nutr.*, 1995; 125: 809–816
- [79] McKenzie H.A.: alpha-Lactalbumins and lysozymes. *EXS*, 1996; 75: 365–409
- [80] Mickelsen P.A., Blackman E., Sparling P.F.: Ability of *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, and commensal *Neisseria* species to obtain iron from lactoferrin. *Infect. Immun.*, 1982; 35: 915–920
- [81] Miyazaki S., Harada Y., Tsuji A., Goto S.: *In vivo* combined effects of lactoferrin and drugs on bacterial infections in mice. *Chemotherapy*, 1991; 39: 829–835
- [82] Murakami M., Tonouchi H., Takahashi R., Kitazawa H., Kawai Y., Negishi H., Saito T.: Structural analysis of a new anti-hypertensive peptide (beta-lactosin B) isolated from a commercial whey product. *J. Dairy Sci.*, 2004; 87: 1967–1974
- [83] Naidu S.S., Svensson U., Kishore A.R., Naidu A.S.: Relationship between antibacterial activity and porin binding of lactoferrin in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1993; 37: 240–245
- [84] Nakajima M., Shinoda I., Samejima Y., Miyauchi H., Fukuwatari Y., Hayasawa H.: Kappa-casein suppresses melanogenesis in cultured pigment cells. *Pigment Cell Res.*, 1996; 9: 235–239
- [85] Narayana Raju K.V., Ashok Kumar D., Arutselvan N., Thejomoorthy P., Puvanakrishnan R.: Antinociceptive and antipyretic effects of a derivatized tetrapeptide from lactoferrin in rats. *Peptides*, 2005; 26: 615–619
- [86] Neeser J.R., Chambaz A., Del Vedovo S., Prigent M.J., Guggenheim B.: Specific and nonspecific inhibition of adhesion of oral actinomyces and streptococci to erythrocytes and polystyrene by caseinoglycopeptide derivatives. *Infect. Immun.*, 1988; 56: 3201–3208
- [87] Ng T.B., Lam T.L., Au T.K., Ye X.Y., Wan C.C.: Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase, protease and integrase by bovine milk proteins. *Life Sci.*, 2001; 69: 2217–2223
- [88] Nikawa H., Samaranyake L.P., Tenovuo J., Pang K.M., Hamada T.: The fungicidal effect of human lactoferrin on *Candida albicans* and *Candida krusei*. *Arch. Oral. Biol.*, 1993; 38: 1057–1063
- [89] Noursadeghi M., Bickerstaff M.C., Herbert J., Moyes D., Cohen J., Peypys M.B.: Production of granulocyte colony-stimulating factor in the nonspecific acute phase response enhances host resistance to bacterial infection. *J. Immunol.*, 2002; 169: 913–919
- [90] Nozaki A., Ikeda M., Naganuma A., Nakamura T., Inudoh M., Tanaka K., Kato N.: Identification of a lactoferrin-derived peptide possessing binding activity to hepatitis C virus E2 envelope protein. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 10162–10173
- [91] Nozaki A., Tanaka K., Naganuma A., Kato N.: Recent advances of basic research and clinical application of lactoferrin as an antiviral reagent against chronic hepatitis C. *Nippon Rinsho*, 2002; 60: 819–829
- [92] Nurminen M.L., Sipola M., Kaarto H., Pihlanto-Leppala A., Piilola K., Korpela R., Tossavainen O., Korhonen H., Vapaatalo H.: Alpha-lactalbumin lowers blood pressure measured by radiotelemetry in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.*, 2000; 66: 1535–1543
- [93] Ogata T., Teraguchi S., Shin K., Kingaku M., Fukuwatari Y., Kawase K., Hayasawa H., Tomita M.: The mechanism of *in vivo* bacteriostasis of bovine lactoferrin. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1998; 443: 239–246
- [94] Ogundele M.O.: A novel anti-inflammatory activity of lysozyme: modulation of serum complement activation. *Mediators Inflamm.*, 1998; 7: 363–365
- [95] Okada S., Tanaka K., Sato T., Ueno H., Saito S., Okusaka T., Sato K., Yamamoto S., Kakizoe T.: Dose-response trial of lactoferrin in patients with chronic hepatitis C. *Jpn. J. Cancer Res.*, 2002; 93: 1063–1069
- [96] Orosco M., Rouch C., Beslot F., Feurte S., Regnault A., Dauge V.: Alpha-lactalbumin-enriched diets enhance serotonin release and induce anxiolytic and rewarding effects in the rat. *Behav. Brain Res.*, 2004; 148: 1–10
- [97] Otani H., Nakano K., Kawahara T.: Stimulatory effect of a dietary casein phosphopeptide preparation on the mucosal IgA response of mice to orally ingested lipopolysaccharide from *Salmonella typhimurium*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2003; 67: 729–735
- [98] Peterson K.M., Alderete J.F.: Iron uptake and increased intracellular enzyme activity follow host lactoferrin binding by *Trichomonas vaginalis* receptors. *J. Exp. Med.*, 1984; 160: 398–410
- [99] Proctor V.A., Cunningham F.E.: The chemistry of lysozyme and its use as a food preservative and a pharmaceutical. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1988; 26: 359–395
- [100] Puddu P., Borghi P., Gessani S., Valenti P., Belardelli F., Seganti L.: Antiviral effect of bovine lactoferrin saturated with metal ions on early steps of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Int. J. Biochem.*, 1998; 30: 1055–1062
- [101] Qin G.: An experimental study on casein in the prevention of excessive iodide induced goiter. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 1993; 73: 471–473
- [102] Qiu J., Hendrixson D.R., Baker E.N., Murphy T.F., St. Geme J.W. III, Plaut A.G.: Human milk lactoferrin inactivates two putative colonization factors expressed by *Haemophilus influenzae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998; 95: 12641–12646
- [103] Reiter B.: The biological significance of lactoferrin. *Int. J. Tissue React.*, 1983; 5: 87–96
- [104] Reynolds E.C.: The prevention of sub-surface demineralization of bovine enamel and change in plaque composition by casein in an intra-oral model. *J. Dent. Res.*, 1987; 66: 1120–1127
- [105] Robert M.C., Razaname A., Mutter M., Juillerat M.A.: Identification of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from sodium caseinate hydrolysates produced by *Lactobacillus helveticus* NCC 2765. *J. Agric. Food Chem.*, 2004; 52: 6923–6931
- [106] Roberts A.K., Chierici R., Sawatzki G., Hill M.J., Volpato S., Vigi V.: Supplementation of an adapted formula with bovine lactoferrin: 1. Effect on the infant faecal flora. *Acta Paediatr.*, 1992; 81: 119–124
- [107] Sack R.B., Castellon J., Della Sera E., Goepf J., Burns B., Croll J., Tseng P., Reid R., Carrizo H., Santosham M.: Hydrolyzed lactalbumin-based oral rehydration solution for acute diarrhoea in infants. *Acta Paediatr.*, 1994; 83: 819–824
- [108] Sallmann FR., Baveye-Descamps S., Pattus F., Salmon V., Branza N., Spik G., Legrand D.: Porins OmpC and PhoE of *Escherichia coli* as specific cell-surface targets of human lactoferrin. Binding characteristics and biological effects. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 16107–16114
- [109] Sanchez L., Calvo M., Brock J.H.: Biological role of lactoferrin. *Arch. Dis. Child.* 1992; 67: 657–661
- [110] Sasaki Y., Otsuki K., Hasegawa A., Sawada M., Chiba H., Negishi M., Nagatsuka M., Okai T.: Preventive effect of recombinant human lactoferrin on lipopolysaccharide-induced preterm delivery in mice. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, 2004; 83: 1035–1038
- [111] Sawatzki G., Rich I.N.: Lactoferrin stimulates colony stimulating factor production *in vitro* and *in vivo*. *Blood cells*, 1989; 15: 371–385
- [112] Shimamura M., Yamamoto Y., Ashino H., Oikawa T., Hazato T., Tsuda H., Iigo M.: Bovine lactoferrin inhibits tumor-induced angiogenesis. *Int. J. Cancer*, 2004; 111: 111–116
- [113] Shimizu K., Matsuzawa H., Okada K., Tazume S., Dosako S., Kawasaki Y., Hashimoto K., Koga Y.: Lactoferrin-mediated protection of the host from murine cytomegalovirus infection by a T-cell-dependent augmentation of natural killer cell activity. *Arch. Virol.*, 1996; 141: 1875–1889
- [114] Silva-Hernandez E.R., Nakano T., Ozimek L.: Isolation and analysis of kappa-casein glycomacropeptide from goat sweet whey. *J. Agric. Food Chem.*, 2002; 50: 2034–2038
- [115] Sipola M., Finckenberg P., Vapaatalo H., Pihlanto-Leppala A., Korhonen H., Korpela R., Nurminen M.L.: Alpha-lactalbumin and beta-lactalbumin improve arterial function in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.*, 2002; 71: 1245–1253
- [116] Soukka T., Tenovuo J., Lenander-Lumikari M.: Fungicidal effect of human lactoferrin against *Candida albicans*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1992; 69: 223–228
- [117] Staroscik K., Janusz M., Zimecki M., Wiecek Z., Lisowski J.: Immunologically active nonapeptide fragment of a proline-rich polypeptide from ovine colostrum: amino acid sequence and immunoregulatory properties. *Mol. Immunol.*, 1983; 20: 1277–1282
- [118] Still J., Delahaut P., Coppe P., Kaeckenbeeck A., Perraudin J.P.: Treatment of induced enterotoxigenic colibacillosis (scours) in calves by the lactoperoxidase system and lactoferrin. *Ann. Rech. Vet.*, 1990; 21: 143–152
- [119] Superti F., Siciliano R., Rega B., Giansanti F., Valenti P., Antonini G.: Involvement of bovine lactoferrin metal saturation, sialic acid and protein fragments in the inhibition of rotavirus infection. *Biochim. Biophys. Acta*, 2001; 1528: 107–115
- [120] Swart P.J., Kuipers M.E., Smit C., Pauwels R., deBethune M.P., de Clercq E., Meijer D.K., Huisman J.G.: Antiviral effects of milk proteins: acylation results in polyanionic compounds with potent activity against human immunodeficiency virus types 1 and 2 *in vitro*. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 1996; 12: 769–775
- [121] Takakura N., Wakabayashi H., Ishibashi H., Yamauchi K., Teraguchi S., Tamura Y., Yamaguchi H., Abe S.: Effect of orally administered bovine lactoferrin on the immune response in the oral candidiasis murine model. *J. Med. Microbiol.*, 2004; 53: 495–500



- [122] Tanaka T., Omata Y., Isamida T., Saito A., Shimazaki K., Yamauchi K., Suzuki N.: Growth inhibitory effect of bovine lactoferrin on *Toxoplasma gondii* tachyzoites in murine macrophages: tyrosine phosphorylation in murine macrophages induced by bovine lactoferrin. *J. Vet. Med. Sci.*, 1998; 60: 369–371
- [123] Tanaka T., Omata Y., Narisawa M., Saito A., Shimazaki K., Igarashi I., Hirumi H., Suzuki N.: Growth inhibitory effect of bovine lactoferrin on *Toxoplasma gondii* tachyzoites in murine macrophages: role of radical oxygen and inorganic nitrogen oxide in *Toxoplasma* growth-inhibitory activity. *Vet. Parasitol.*, 1997; 68: 27–33
- [124] Togawa J., Nagase H., Tanaka K., Inamori M., Nakajima A., Ueno N., Saito T., Sekihara H.: Oral administration of lactoferrin reduces colitis in rats via modulation of the immune system and correction of cytokine imbalance. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2002; 17: 1291–1298
- [125] Tomita M., Bellamy W., Takase M., Yamauchi K., Wakabayashi H., Kawase K.: Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. *J. Dairy Sci.*, 1991; 74: 4137–4142
- [126] Trumpler U., Straub P.W., Rosenmund A.: Antibacterial prophylaxis with lactoferrin in neutropenic patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 1989; 8: 310–313
- [127] Tsuchita H., Goto T., Shimizu T., Yonehara Y., Kuwata T.: Dietary casein phosphopeptides prevent bone loss in aged ovariectomized rats. *J. Nutr.*, 1996; 126: 86–93
- [128] Ueta E., Tanida T., Osaki T.: A novel bovine lactoferrin peptide, FKRRWQWRM, suppresses *Candida* cell growth and activates neutrophils. *J. Pept. Res.*, 2001; 57: 240–249
- [129] Ushida Y., Shimokawa Y., Matsumoto H., Toida T., Hayasawa H.: Effects of bovine alpha-lactalbumin on gastric defense mechanisms in naive rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2003; 67: 577–583
- [130] van der Kraan M.I., Groenink J., Nazmi K., Veerman E.C., Bolscher J.G., Nieuw Amerongen A.V.: Lactoferrin: a novel antimicrobial peptide in the N1-domain of bovine lactoferrin. *Peptides*, 2004; 25: 177–183
- [131] van der Strate B.W., Beljaars L., Molema G., Harmsen M.C., Meijer D.K.: Antiviral activities of lactoferrin. *Antiviral Res.*, 2001; 52: 225–239
- [132] van der Strate B.W., de Boer F.M., Bakker H.L., Meijer D.K., Molema G., Harmsen M.C.: Synergy of bovine lactoferrin with the anti-cytomegalovirus drug cidofovir *in vitro*. *Antiviral Res.*, 2003; 58: 159–165
- [133] van Hooijdonk A.C., Kussendrager K.D., Steijns J.M.: *In vivo* antimicrobial and antiviral activity of components in bovine milk and colostrum involved in non-specific defence. *Br. J. Nutr.*, 2000; 84: S127–S134
- [134] Wakabayashi H., Abe S., Okutomi T., Tansho S., Kawase K., Yamaguchi H.: Cooperative anti-*Candida* effects of lactoferrin or its peptides in combination with azole antifungal agents. *Microbiol. Immunol.*, 1996; 40: 821–825
- [135] Wakabayashi H., Takakura N., Yamauchi K., Teraguchi S., Uchida K., Yamaguchi H., Tamura Y.: Effect of lactoferrin feeding on the host antifungal response in guinea-pigs infected or immunised with *Trichophyton mentagrophytes*. *J. Med. Microbiol.*, 2002; 51: 844–850
- [136] Wakabayashi H., Uchida K., Yamauchi K., Teraguchi S., Hayasawa H., Yamaguchi H.: Lactoferrin given in food facilitates dermatophytosis cure in guinea pig models. *J. Antimicrob. Chemother.* 2000; 46: 595–602
- [137] Wang G.S., Gruber H., Smyth P., Pulido O., Rosenberg L., Duguid W., Scott F.W.: Hydrolysed casein diet protects BB rats from developing diabetes by promoting islet neogenesis. *J. Autoimmun.*, 2000; 15: 407–416
- [138] Wang W.P., Iigo M., Sato J., Sekine K., Adachi I., Tsuda H.: Activation of intestinal mucosal immunity in tumor-bearing mice by lactoferrin. *Jpn. J. Cancer Res.*, 2000; 91: 1022–1027
- [139] Weinberg E.D.: Iron, infection, and neoplasia. *Clin. Physiol. Biochem.*, 1986; 4: 50–60
- [140] Wieczorek Z., Zimecki M., Janusz M., Staroscik K., Lisowski J.: Proline-rich polypeptide from ovine colostrum: its effect on skin permeability and on the immune response. *Immunology*, 1979; 36: 875–881
- [141] Wieczorek Z., Zimecki M., Spiegel K., Lisowski J., Janusz M.: Differentiation of T cells into helper cells from immature precursors: identification of a target cell for a proline-rich polypeptide (PRP). *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1989; 37: 313–322
- [142] Wilson M.E., Vorhies R.W., Andersen K.A., Britigan B.E.: Acquisition of iron from transferrin and lactoferrin by the protozoan *Leishmania chagasi*. *Infect. Immun.*, 1994; 62: 3262–3269
- [143] Wray C., McLaren I.: A note on the effect of the lactoperoxidase systems on salmonellas *in vitro* and *in vivo*. *J. Appl. Bacteriol.*, 1987; 62: 115–118
- [144] Yamauchi K., Hiruma M., Yamazaki N., Wakabayashi H., Kuwata H., Teraguchi S., Hayasawa H., Suegara N., Yamaguchi H.: Oral administration of bovine lactoferrin for treatment of tinea pedis. A placebo-controlled, double-blind study. *Mycoses*, 2000; 43: 197–202
- [145] Yang N., Stensen W., Svendsen J.S., Rekdal O.: Enhanced antitumor activity and selectivity of lactoferrin-derived peptides. *J. Pept. Res.*, 2002; 60: 187–197
- [146] Yoo Y.C., Watanabe S., Watanabe R., Hata K., Shimazaki K., Azuma I.: Bovine lactoferrin and lactoferricin, a peptide derived from bovine lactoferrin, inhibit tumor metastasis in mice. *Jpn. J. Cancer Res.*, 1997; 88: 184–190
- [147] Zablocka A., Janusz M., Macala J., Lisowski J.: A proline-rich polypeptide complex and its nonapeptide fragment inhibit nitric oxide production induced in mice. *Regul. Pept.*, 2005; 125: 35–39
- [148] Zablocka A., Janusz M., Rybka K., Wirkus-Romanowska I., Kupryszewski G., Lisowski J.: Cytokine-inducing activity of a proline-rich polypeptide complex (PRP) from ovine colostrum and its active nonapeptide fragment analogs. *Eur. Cytokine Netw.*, 2001; 12: 462–467
- [149] Zagulski T., Jarzabek Z., Zagulska A., Jaszczak M., Kochanowska I.E., Zimecki M.: Lactoferrin stimulates killing and clearance of bacteria but does not prevent mortality of diabetic mice. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 2001; 49: 431–438
- [150] Zagulski T., Lipinski P., Zagulska A., Jarzabek Z.: Antibacterial system generated by lactoferrin in mice *in vivo* is primarily a killing system. *Int. J. Exp. Pathol.*, 1998; 79: 117–123
- [151] Zimecki M., Artym J., Chodaczek G., Kocieba M., Kruzel M.L.: Protective effects of lactoferrin in *Escherichia coli*-induced bacteremia in mice: relationship to reduced serum TNF alpha level and increased turnover of neutrophils. *Inflamm. Res.*, 2004; 53: 292–296
- [152] Zimecki M., Dawiskiba J., Zawirska B., Krawczyk Z., Kruzel M.: Bovine lactoferrin decreases histopathological changes in the liver and regulates cytokine production by splenocytes of obstructive jaundiced rats. *Inflamm. Res.*, 2003; 52: 305–310
- [153] Zimecki M., Hrabá T., Janusz M., Lisowski J., Wieczorek Z.: Effect of a proline-rich polypeptide (PRP) on the development of hemolytic anemia and survival of New Zealand black (NZB) mice. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1991; 39: 461–467
- [154] Zimecki M., Janusz M., Staroscik K., Lisowski J., Wieczorek Z.: Effect of proline-rich polypeptide on donor cells in graft-versus-host reaction. *Immunology*, 1982; 47: 141–147
- [155] Zimecki M., Kruzel M.: Protective effect of lactoferrin against LPS-induced endotoxemia is mediated by IL-10. *Proceedings of the 5<sup>th</sup> World Congress on Trauma, Shock, Inflammation and Sepsis*, 2000 Feb 29 – Mar 4; Munich, Germany. *Monduzzi Editore*; 2000
- [156] Zimecki M., Kruzel M.L.: Systemic or local co-administration of lactoferrin with sensitizing dose of antigen enhances delayed type hypersensitivity in mice. *Immunol. Lett.*, 2000; 74: 183–188
- [157] Zimecki M., Machnicki M.: Lactoferrin inhibits the effector phase of the delayed type hypersensitivity to sheep erythrocytes and inflammatory reactions to *M. bovis* (BCG). *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 1994; 42: 171–177
- [158] Zimecki M., Mazurier J., Machnicki M., Wieczorek Z., Montreuil J., Spik G.: Immunostimulatory activity of lactotransferrin and maturation of CD4–CD8– murine thymocytes. *Immunol. Lett.*, 1991; 30: 119–123
- [159] Zimecki M., Mazurier J., Spik G., Kapp J.A.: Human lactoferrin induces phenotypic and functional changes in murine splenic B cells. *Immunology*, 1995; 86: 122–127
- [160] Zimecki M., Mazurier J., Spik G., Kapp J.A.: Lactoferrin inhibits proliferative response and cytokine production of TH1 but not TH2 cell lines. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1996; 44: 51–56
- [161] Zimecki M., Pierce C.W., Janusz M., Wieczorek Z., Lisowski J.: Proliferative response of T lymphocytes to a proline-rich polypeptide (PRP): PRP mimics mitogenic activity of IL-1. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1987; 35: 339–349
- [162] Zimecki M., Spiegel K., Wlaszczyk A., Kubler A., Kruzel M.L.: Lactoferrin increases the output of neutrophil precursors and attenuates the spontaneous production of TNF-alpha and IL-6 by peripheral blood cells. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1999; 47: 113–118
- [163] Zimecki M., Wieczorek Z., Mazurier J., Spik G.: Lactoferrin lowers the incidence of positive Coombs' test in New Zealand black mice. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1995; 43: 207–209
- [164] Zimecki M., Wlaszczyk A., Wojciechowski R., Dawiskiba J., Kruzel M.: Lactoferrin regulates the immune responses in post-surgical patients. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 2001; 49: 325–333