

Received: 2006.05.15
Accepted: 2006.07.03
Published: 2006.07.24

Aktywność przeciwnowotworowa i chemioprewencyjna laktoferryry

Antitumor and chemopreventive activity of lactoferrin

Jolanta Artym

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

Streszczenie

Laktoferryryna (LF) to glikoproteina z rodziny transferyn o wielu unikalnych właściwościach. Należy do białek odporności wrodzonej ustroju, ale jej funkcje rozciągają się także na regulację odporności nabytej i wiele innych zjawisk. Działania białka, potwierdzone w licznych badaniach *in vitro* oraz *in vivo*, obejmują: udział w homeostazie żelaza, aktywność przeciwmikrobiologiczną, zdolność neutralizacji endotoksyny, właściwości immunoregulatorowe, regulację dojrzewania i różnicowania limfocytów, regulację mielopoetyzy, działanie przeciwzapalne, przeciwnowotworowe, przeciwbólowe, regulację metabolizmu kości, udział w rozwoju embrionalnym, funkcjach prokreacyjnych i in. Ważną funkcję odgrywa w prawidłowym rozwoju noworodka.

Właściwości przeciwnowotworowe LF odkryto w połowie lat 90. XX wieku, a potwierdzono w wielu badaniach laboratoryjnych, przedklinicznych i klinicznych. Jedną z głównych funkcji przeciwnowotworowych LF obejmuje jej właściwości immunomodulujące. Wiele badań wykazało obniżenie odporności komórkowej i humoralnej u pacjentów z chorobą nowotworową. Dodatkowym czynnikiem ułatwiającym wzrost nowotworów jest niemożność rozwinięcia skutecznej odpowiedzi przeciwko antygenom nowotworowych, co wynika m.in. z obniżenia ekspresji cząsteczek MHC i cząsteczek kostymulujących na komórkach nowotworowych, indukcji przez nowotwór komórek supresorowych i hamowania odpowiedzi odpornościowej gospodarza przez produkty wydzielane przez nowotwór. Wzmocnienie odpowiedzi immunologicznej może zatem zahamować lub ograniczyć rozwój nowotworu. LF zwiększa liczbę i stymuluje aktywność limfocytów T i B, komórek NK, stymuluje uwalnianie cytokin (IL-1, -6, -8, -18, IFN- γ , TNF- α), zwiększa aktywność fagocytarną i cytotoksyczność neutrofilów oraz monocytów/makrofagów, przyspiesza dojrzewanie limfocytów T i B. LF podnosi ekspresję cząsteczek receptorowych, kostymulujących i adhezji międzykomórkowej: CD4, łańcucha ζ kompleksu CD3, cząsteczek LFA-1, CD-11, ICAM-1, selektyny P.

Poza działaniem immunomodulującym, ważne są bezpośrednie właściwości przeciwnowotworowe LF obejmujące: bezpośrednie działanie lityczne na komórki nowotworowe, działanie proapoptotyczne, antyproliferacyjne, antyangiogenne, właściwości antyoksydacyjne i chelatowanie jonów żelaza.

LF ma także właściwości chemioprewencyjne: reguluje aktywność enzymów I i II fazy uczestniczących w aktywacji i detoksyfikacji karcynogenów oraz reguluje skład mikroflory przewodu pokarmowego. W ten sposób zapobiega powstawaniu nowotworów i ich rozwojowi na wczesnych etapach nowotworzenia.

Słowa kluczowe:

nowotwory • zaburzenia odporności w chorobach nowotworowych • laktoferryryna • aktywność przeciwnowotworowa • chemioprewencja nowotworów

Summary

Lactoferrin, an evolutionarily old protein of the transferrin family, is among the proteins constituting the system of innate immunity; its action, however, also extends to the regulation of acquired immunity and other immunological phenomena. The actions of LF, confirmed in numerous *in vitro* and *in vivo* models, include participation in iron homeostasis, immunoregulatory properties, anti-inflammatory, anti-tumor, and analgesic actions, regulation of bone metabolism, participation in embryonic development, reproductive functions, and others. LF plays an important role in the normal development of a newborn.

The anti-tumor properties of LF were discovered about a decade ago and have been confirmed in many laboratory, preclinical, and clinical studies. The immunomodulatory properties of LF play a major role in its anti-tumor actions. Such actions of LF appeared particularly effective in cancer patients with impaired immunity. The growth of tumors is facilitated by low expressions of MHC and co-stimulatory antigens on tumor cells and the induction of suppressor cells and other inhibitory products by tumors. Enhancement of an anti-tumor immunological response may, therefore, restrict tumor growth. Studies showed that LF elevates the number and increases the activity of T and B lymphocytes and NK cells, stimulates the release of a number of cytokines (IL-1, -6, -8, -18, IFN-gamma, TNF alpha), increases phagocytic activity and cytotoxicity of monocytes/macrophages, accelerates the maturation of T and B cells, and elevates the expression of several types of cellular receptors, such as CD4, zeta chain of the CD3 complex, LFA-1, CD11, ICAM-1, and selectin P.

Apart from its immunomodulatory properties, LF exhibits direct anti-tumor actions, such as lytic, pro-apoptotic, anti-proliferative, anti-angiogenic, anti-oxidant activity and the chelation of iron ions.

LF also possesses chemo-preventive properties, regulates the activity of phase I and II enzymes participating in the activation and detoxification of carcinogens, and regulates the composition of the intestinal microflora. In this way it prevents the generation of tumors and their development at early stages of carcinogenesis.

Key words: tumors • immunity disorders in tumor disease • lactoferrin • anti-tumor activity • tumor chemoprevention

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_60/9521.pdf

Word count: 8065

Tables: 1

Figures: 1

References: 155

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

Wykaz skrótów: **LF** – laktoferryina; **BLF** – laktoferryina bydlęca; **HLF** – laktoferryina ludzka; **holo-LF** – laktoferryina wysycona żelazem; **apo-LF** – laktoferryina wolna od żelaza; **RFT** – reaktywne formy tlenu; **s.c.** – podskórnice.

Laktoferryina jest glikoproteina o masie cząsteczkowej około 80 kDa, należąca do rodziny transferyn. Stanowi jeden z ważnych elementów układu odporności wrodzonej ssaków. Jest wytwarzana przez komórki nabłonka wydzielniczego różnych narządów i uwalniana do odpowiednich wydzielin [11,76,81]. W większych stężeniach występuje w: sianie, mleku, ślinie, łzach, wydzielinie śluzówki nosa, oskrzeli, pochwy i macicy, płynie nasiennym. W małych ilościach obecna jest w: żółci, płynie żołądkowo-jelitowym, maziówkowym, owodniowym, mózgowo-rdzeniowym, w pewnych ilościach również w moczu i kale. LF jest również wytwa-

rzana w granulocytach obojętnochłonnych i magazynowana w ziarnistościach wtórnych (drugorzędowych, swoistych) tych komórek [6,105]. Łączna ilość ustrojowej LF zawartej w neutrofilach jest duża. 10^6 neutrofilów zawiera około 3 μ g [11,56], a według innych źródeł nawet 10 μ g LF [18]. Po aktywacji i degranulacji neutrofilów LF jest uwalniany do osocza. Małe i dość stałe w stanie zdrowia, stężenia białka zwiększają się miejscowo w stanach zapalnych (nacieki i rozpad granulocytów) [11,80,150]. W przewlekłych chorobach zapalnych i nowotworowych zwiększa się również stężenie LF w surowicy [12,55,138].

Pomimo dużej homologii z innymi glikoproteinami rodziny transferryn, LF wykazuje unikalne właściwości, pełniąc różnorakie funkcje w organizmie. Należy do białek odporności wrodzonej ustroju, ale jej funkcje rozciągają się także na regulację odporności nabytej i wiele innych zjawisk. Działania białka, potwierdzone w licznych badaniach *in vitro* oraz *in vivo*, obejmują: udział w homeostazie żelaza, aktywność przeciwmikrobiologiczną, zdolność neutralizacji endotoksyny, właściwości immunoregulatorowe, regulację dojrzewania i różnicowania limfocytów, regulację mielopoetyzy, działanie przeciwzapalne, przeciwnowotworowe, przeciwbólowe, regulację metabolizmu kości, udział w rozwoju embrionalnym, funkcjach prokreacyjnych i inne [151]. Niezwykle ważną rolę odgrywa białko w prawidłowym rozwoju noworodka. Dostarczane z siałą i mlekiem reguluje m.in. przyswajanie różnych składników odżywczych, przyspiesza dojrzewanie nabłonka przewodu pokarmowego, odpowiada za ustalenie i utrzymanie prawidłowego składu mikroflory jelit, chroni przed zakażeniami, bakteriami i endotoksemią, promuje rozwój układu immunologicznego [5].

Do najwcześniej odkrytych [94] i dziś niepodważalnych należą właściwości przeciwmikrobiologiczne LF: białko wykazuje aktywność wobec wielu bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich, wirusów otoczkowych i bezotoczkowych oraz różnych rodzajów grzybów i pasożytów [97]. Działanie to wynika po części ze zdolności białka do chelatowania żelaza (jonów Fe^{3+}), a tym samym usuwania tego pierwiastka ze środowiska wzrostu drobnoustrojów [4,24]. LF zarówno w krwi jak i wydzielinach śluzówek występuje w postaci ubogiej w żelazo (postać apo-LF), może zatem sekwestrować duże ilości tego pierwiastka. Inne mechanizmy działania przeciwmikrobiologicznego LF obejmują m.in.: bezpośrednie niszczenie osłon i zaburzenia metabolizmu komórek bakteryjnych [36], hamowanie procesów adhezji bakterii do tkanek ustroju gospodarza [58,75], hamowanie tworzenia biofilmu przez niektóre bakterie [118], hamowanie początkowych etapów zakażenia wirusowego, tj. adsorpcję i wnikanie cząstek wirusowych do komórek [63,102] oraz stymulację układu odpornościowego gospodarza do walki z patogenami [51,59,120].

Działania analogiczne do endogennej LF wykazuje białko egzogenne podane do organizmu różnymi drogami. W profilaktyce i leczeniu najszersze zastosowanie znajduje białko podawane doustnie (ze względu na skuteczność i małą inwazyjność takiej procedury). Jak wskazują liczne badania, LF jest dość oporna na działanie enzymów trawiennych i po podaniu doustnym osobnikom dorosłym (odmiennie są „losy” LF u noworodków) nie wchłania się lub wchłania się w niewielkim stopniu do krążenia [57,61,71,134]. Działa jednak ogólnoustrojowo, co można najprawdopodobniej wiązać ze zjawiskiem aktywacji początkowo lokalnej odpowiedzi immunologicznej związanej z układem pokarmowym, a tą drogą również odporności ogólnoustrojowej [31,62,71,112,136]. Na podstawie dotychczas dostępnych wyników badań nie można ostatecznie wykluczyć, że białko jednak wchłania się (przynajmniej częściowo) z przewodu pokarmowego, dociera z krwią do tkanek docelowych i tu wywiera swoje działanie. Uwzględniając powyższe uwagi, należy przypuszczać, że nieco inne będą mechanizmy działania białka podanego miejscowo lub doustnie. Prawdopodobnie jednak

mogą się one uzupełniać. Dotyczy to również aktywności przeciwnowotworowej LF.

Właściwości przeciwnowotworowe laktoferryry zostały dostrzeżone niewiele ponad 10 lat temu w testach na zwierzętach [14] i do dziś nie budzą wątpliwości, potwierdzone w wielu badaniach.

Celem artykułu jest przegląd danych pochodzących z badań laboratoryjnych, przedklinicznych oraz klinicznych wskazujących na przeciwnowotworowe i chemioprewencyjne właściwości laktoferryry.

ROZWÓJ NOWOTWORU A UKŁAD IMMUNOLOGICZNY

Główna korzyść z zastosowania laktoferryry w zwalczaniu nowotworów wydaje się płynąć z jej szeroko rozumianych **właściwości immunomodulujących**. Zastosowanie naturalnych lub syntetycznych substancji zmieniających relacje między układem odpornościowym a komórkami nowotworowymi przez bezpośrednie usunięcie tych komórek lub przez przywrócenie układowi odpornościowemu zdolności do walki z nowotworem stanowi jedną z dziedzin immunoterapii nowotworów – immunoterapię czynną nieswoistą. Istotnym jej składnikiem może stać się LF.

Metody zmierzające do modyfikacji układu immunologicznego znalazły już stałą pozycję w terapii nowotworów. Przeważnie stosowane są łącznie z konwencjonalną chemio- lub radioterapią, znacznie zwiększając skuteczność leczenia. Historia leczenia nowotworów za pomocą nieswoistej aktywacji odporności liczy sobie już ponad 100 lat – amerykański chirurg Coley na przełomie XIX i XX w. zauważył regresję mięsaka u chorego, który jednocześnie zachorował na różę i postanowił te sposoby leczenia wykorzystać. Najpierw podawał chorym żywe bakterie, potem preparat z nadsączy bakteryjnych, za pomocą którego wyleczył (ponoć) sporą część pacjentów. Według obecnej wiedzy skuteczność preparatów Coleya przypisać należy prawdopodobnie uwalnianiu w organizmie chorych dużych ilości cytokin (głównie TNF, IL-1, IL-12 i innych).

Wzmocnienie odporności w walce z nowotworem jest istotne ze względu na to, iż układ immunologiczny ma w tej walce istotny udział, a niestety w wielu chorobach nowotworowych nie funkcjonuje na tyle sprawnie, by wyeliminować zmienione nowotworowo komórki. Odpowiedź przeciwnowotworowa angażuje wszystkie typy reakcji immunologicznej ustroju. Obejmuje mechanizmy odporności nieswoistej, takie jak: cytotoksyczność makrofagów i neutrofilów, aktywność eozynofików, mastocytów, komórek NK, aktywność cytokin (IFN, TNF), obecność białek chelatujących żelazo (laktoferryryna i transferryryna) czy aktywność składników układu dopełniacza. Swoiste komórkowe i humoralne mechanizmy odporności przeciwnowotworowej, zachodzące po prezentacji (w kontekście MHC klasy I i/lub II) komórkom odpornościowym antygenów związanych z nowotworem, obejmują: cytotoksyczność limfocytów Tc, aktywność cytokin wydzielanych przez limfocyty Th, cytotoksyczność komórkową zależną od przeciwciał oraz cytotoksyczność przeciwciał zależną od dopełniacza. Większość antygenów nowotworowych nie jest swoista dla nowotworów i występuje też na prawidłowych tkankach ustroju, z czym m.in. może się wiązać mała immunogen-

ność nowotworów. Ze względu na małą immunogenność nowotworów uważa się, że w odporności przeciwnowotworowej większą rolę odgrywają raczej naturalne, mało swoiste mechanizmy odporności niż mechanizmy swoiste [44]. Obecnie uważa się również, że rozwój nowotworu jest możliwy nie z powodu upośledzenia odporności chorego, ale raczej na skutek niemożności rozpoznania mało swoistych antygenów komórek nowotworowych przez sprawny układ immunologiczny [85]. Skutkuje to „dysproporcją” między dynamiką wzrostu nowotworu a mobilizacją mechanizmów kontrolnych organizmu. Mechanizmy ucieczki komórek zmienionych nowotworowo przed układem immunologicznym to m.in.: zmniejszona ekspresja lub brak cząsteczek MHC I, cząsteczek kostymulujących i adhezyjnych na komórkach nowotworowych, selekcja komórek o obniżonej antygenowości, indukcja czynników i komórek supresorowych gospodarza przez mikrośrodowisko guza i inne mechanizmy [85].

Mimo iż nowotwór rozwija się początkowo przeważnie w immunokompetentnym organizmie, w miarę rozwoju choroby dochodzi do upośledzenia funkcji immunologicznych, co dodatkowo wpływa na przebieg choroby i wzrost nowotworu. Zmniejszona odporność nieswoista oraz swoista komórkowa i humoralna towarzyszy wielu nowotworom (zarówno układowym jak i litym), szczególnie w zaawansowanych stadiach choroby. Osłabienie odporności nieswoistej obejmuje głównie zmniejszenie bezwzględnej liczby jedno- i wielojądrzastych komórek fagocytyzujących oraz osłabienie ich zdolności fagocytarnej i bójczej. Do najczęstszych zaburzeń odporności komórkowej należą: zmniejszenie bezwzględnej liczby limfocytów, zmniejszenie subpopulacji limfocytów T CD4⁺, mały lub odwrócony stosunek CD4⁺/CD8⁺, upośledzenie zdolności do proliferacji spontanicznej i stymulowanej mitogenami oraz alloantigenami, zmniejszenie aktywności cytotoksycznej komórek NK, zaburzona ekspresja MHC I i II, receptora TCR lub jego składowych (łańcuchów γ , ϵ , ζ kompleksu CD3) oraz łańcucha ζ CD16 (Fc γ RIII), cząsteczek CD4 i CD8, upośledzenie ekspresji cząsteczek adhezyjnych oraz innych cząsteczek na powierzchni limfocytów uczestniczących w przekazywaniu sygnału, co przyczynia się do zaburzenia funkcji tych komórek. Do zaburzeń odporności humoralnej dochodzi głównie w nowotworach układowych (białaczkach, szpiczaku, makroglobulinemii Waldenströma), a znacznie rzadziej w nowotworach narządowych. Objawiają się one zaburzeniami pierwotnej i wtórnej odpowiedzi humoralnej, zmniejszeniem stężenia immunoglobulin, wytwarzaniem immunoglobulin nieprawidłowych, zwiększeniem stężenia cytokin (m.in. TGF- β) hamujących większość etapów odpowiedzi humoralnej i komórkowej [44,45,66,68,83,85,141].

Upośledzenie układu immunologicznego podczas choroby nowotworowej jest też spowodowane rozwojem samego nowotworu, który, podobnie jak naciekające go niektóre rodzaje komórek gospodarza, może wytwarzać różnego rodzaju substancje toksyczne i przekazywać (np. reaktywne formy tlenu (RFT), TGF- β , IL-10) [7,69,89]. Niedobór składników układu odpornościowego może też być skutkiem bezpośredniego zniszczenia tkanek krwiotwórczej i limfoidalnej przez namnażające się komórki nowotworowe. Jakkolwiek w początkowych stadiach choroby nowotworowej upośledzenie układu immunologicznego nie

jest głębokie i dotyczy tylko poszczególnych składowych, to w miarę rozwoju choroby dochodzi do głębokich zaburzeń w obrębie wszystkich mechanizmów odpowiedzi immunologicznej [44]. Ponadto należy pamiętać, iż do dodatkowego obniżenia odporności sprzyjającego rozrostowi nowotworu, prowadzi też zastosowane leczenie przeciwnowotworowe radio- i chemioterapeutyczne.

ZWIĄZEK LAKTOFERRYNY Z CHOROBIAMI NOWOTWOROWYMI

Na związek między poziomem ekspresji laktoferryiny a procesami nowotworowymi zwrócono uwagę już w połowie lat 80. ub.w. Rado i wsp. zasugerowali, że obecność LF może odgrywać rolę w prawidłowej ekspresji genów komórek linii granulocytów, a wniosek taki oparli na spostrzeżeniu, że komórki promielocytowej linii białaczkowej HL-60 wykazujące niekompletne i defektywne różnicowanie nie nabywają mRNA LF nawet po indukcji różnicowania komórek [106]. Furmanki i wsp. zwrócili uwagę na większą podatność na raka piersi u spokrewnionych kobiet w Indiach, u których w mleku występowały niskie poziomy związanej z LF aktywności RNA-azowej [50]. LF jest często znajdowana w tkankach zmienionych nowotworowo (np. gruczole sutkowy, gruczole ślinowy, żołądka, endometrium) w ilościach nawet wyższych niż w ich prawidłowych odpowiednikach [25,88,126,135]. W innych nowotworach poziom LF jest prawidłowy lub obniżony [25,99]. Dla przykładu, LF jest nadmiernie ekspresjonowana w zmianach nowotworowych endometrium, a poziom białka koreluje negatywnie z występowaniem receptorów progesteronu [135]. Zmienną ekspresję białka stwierdzono w pierwotnych złośliwych nowotworach piersi, a jego obecność korelowała negatywnie z ekspresją receptora estrogenowego. Oznaczenie wysokich poziomów LF może zatem stanowić przeciwwskazanie do terapii hormonalnej raka piersi, wskazując pośrednio na raka hormononiezależnego [25]. Nie stwierdzono wytwarzania LF przez komórki linii raka piersi i raka żołądka [25], a zmienne poziomy lub brak LF w komórkach różnego typu nowotworów żołądka u pacjentów [126]. Co ciekawe, pierwotnie w żadnej z badanych linii komórek nowotworowych nie udało się znaleźć obecności tzw. alternatywnej postaci LF (Δ LF), którą zidentyfikowano we wszystkich badanych prawidłowych tkankach płodów i osobników dorosłych. Ta postać LF jest wynikiem alternatywnego składania genu LF i jest pozbawiona sekwencji sygnałowej, pozostaje więc w komórce (głównie w jądrze komórkowym), gdzie prawdopodobnie pełni rolę czynnika transkrypcyjnego, może zatem regulować procesy prawidłowego wzrostu i różnicowania komórek [117]. Wprawdzie w późniejszych badaniach wykryto ekspresję Δ LF w linii komórek raka piersi oraz biopsjach ze zmian nowotworowych gruczołu sutkowego, ale jej poziom był bardzo niski w porównaniu do tkanek prawidłowych. Δ LF okazała się parametrem prognostycznym – wysokie stężenia były związane z dłuższym ogólnym czasem przeżycia chorych [9]. Ta postać LF wykazuje aktywność antyproliferacyjną powodując zatrzymanie komórki w fazie S cyklu i wydaje się odgrywać istotną rolę w regulacji prawidłowego wzrostu komórek [21]. Ponadto w wielu nowotworach znaleziono zmieniony wzór metylacji DNA genu laktoferryiny [99,122]. Metylacja przy dwunukleotydach CpG ma istotny wpływ na ekspresję genów: obecność grup metylowych przy resztach cytozyny w obrębie CpG jest często związana z inaktywacją genów [77,108]. Stwierdzono istnienie odwrotnej korelacji

między stanem metylacji genu LF a poziomem ekspresji białka w różnych tkankach mysich [53]. Podobny związek odkryto w prawidłowych i nowotworowych tkankach ludzkich – zwiększona metylacja w obrębie promotora genu LF wiązała się z małą ekspresją białka i była cechą charakterystyczną komórek nowotworowych [122]. Dodatkowego znaczenia nabiera to, że gen ludzkiej LF i Δ LF jest umiejscowiony w tym samym 1,6cM tzw. wspólnie eliminowanym regionie chromosomu 3 (3p21), który również zawiera geny związane z hamowaniem nowotworów [147]. W wielu nowotworach (m.in. piersi, szyjki macicy, nerek, pęcherza moczowego, jąder, płuc, głowy i szyi, chłoniakach i innych) w obrębie krótkiego ramienia chromosomu 3 stwierdza się delecje i rearanżacje [86].

Konsekwencją znalezienia zależności między endogenną LF a rozwojem nowotworów stało się zwrócenie uwagi na potencjalne właściwości przeciwnowotworowe białka. Po raz pierwszy dostrzeżono je już w połowie lat 90. ub.w. Bezault i wsp. stwierdzili hamujący wpływ białka na rozwój nowotworów litych indukowanych doświadczalnie u myszy [14]. Ponadto LF na modelu mysiego czerniaka B16 zmniejszała liczbę przerzutów do płuc. Autorzy badań zwrócili uwagę na możliwy mechanizm działania białka – zniesienie aktywności komórek NK eliminowało działanie LF, co wskazuje na udział tych komórek w przeciwnowotworowej aktywności białka.

PRZECIWNOWOTWOROWA AKTYWNOŚĆ LAKTOFERRYNY – DZIAŁANIE IMMUNOMODULUJĄCE

Późniejsze badania potwierdziły wstępne wyniki Bezaulta oraz wskazały na wiele innych możliwych mechanizmów przeciwnowotworowego działania LF, wśród których do najważniejszych należy **efekt immunomodulujący** [2, 57,62,71,82,90,109,111,124,125,127,128,129,136,143,148, 149]. Taki mechanizm działania można przypisać białku podanemu różnymi drogami, również ogólnoustrojowo i miejscowo.

LF podawana doustnie jednocześnie z karcynogennym azoksymetanem hamowała tworzenie zmian nowotworowych w jelicie grubym u szczurów F344. Po podaniu roztworu LF liczba zwierząt z rozwiniętym gruczolakorakiem spadła z 57% wśród zwierząt kontrolnych do około 20% u zwierząt otrzymujących laktoferrynę. LF redukowała ponadto wielkość już istniejących zmian. Regresja nowotworu była skorelowana ze zwiększeniem aktywności cytotoksycznej komórek NK [111]. LF podawana doustnie hamowała również rozwój spontanicznych zmian polipowatych w jelicie cienkim u myszy ApcMin (zwierzęcy model rodzinnej polipowatości jelita). Stwierdzono ponadto korzystny wpływ LF na podniesienie masy ciała zwierząt obniżonej w wyniku współistniejącej anemii i/lub wgłobienia jelita, częstych konsekwencji zmian nowotworowych [128]. W podobnym schemacie podawania LF okazała się skuteczna w zapobieganiu procesom karcynogenezy chemicznej w przełyku i płucach u szczurów. Liczba i wielkość zmian nowotworowych w tkankach obu narządów była istotnie mniejsza u zwierząt otrzymujących w diecie laktoferrynę [127].

Bydłęca LF oraz laktoferrydyna (fragment cząsteczki LF) podane doustnie myszom znacznie hamowały tworzenie

przerzutów przez wszczepiony podskórnie (*s.c.*) złośliwy nowotwór okrężnicy (Co26Lu). Za hamujące działanie LF odpowiadały limfocyty T CD8⁺ oraz komórki NK, których liczba i aktywność znacznie wzrosły po doustnym podaniu białka (odpowiednio o 22 i 71%). W testach *in vitro* komórki te inkubowane z komórkami Co26Lu znacznie obniżały ich żywotność [61,125]. Podobne wyniki uzyskali również Kuhara i wsp. LF i jej hydrolizaty podane doustnie wyraźnie hamowały eksperymentalną metastazę Co26Lu u myszy (ograniczenie przerzutowania do płuc), co autorzy przypisują indukcji przez LF odpowiedzi komórkowej (wzrost liczby i aktywności komórek CD4⁺, CD8⁺ i NK w śledzionie i krwi obwodowej) prawdopodobnie mediuwanej przez IL-18, która była syntetyzowana przez komórki nabłonka jelita cienkiego po kontakcie z LF [71]. W kolejnych badaniach zanotowano dodatkowo wzrost liczby limfocytów B IgA⁺ oraz IgM⁺ w blaszce właściwej jelita cienkiego skorelowany z syntezą IL-18, IFN- γ oraz kaspazy 1 w jelicie cienkim [136].

Masuda i wsp. wykazali hamujący wpływ LF podawanej *p.o.* na procesy karcynogenezy w pęcherzu moczowym szczurów. Pochodna nitrozoaminy indukowała zmiany nowotworowe w pęcherzu, które pojawiały się rzadziej i miały mniejszy zasięg u zwierząt pijących roztwór białka. Autorzy sugerują, iż efekt ten może być związany z obecnością LF w pęcherzu moczowym (przeprowadzone analizy wykazały obecność tego białka w moczu) [82].

Z dotychczasowych badań, łącznie z najnowszymi wynikami zespołu Iigo, wyłania się prawdopodobny mechanizm leżący u podłoża immunomodulującego przeciwnowotworowego działania LF podanej doustnie [62,71,124,136]. LF oraz jej pepsynowe hydrolizaty wpływały wyraźnie stymulując zarówno na lokalną, jak i ogólnoustrojową odpowiedź immunologiczną. Istotą takiego działania LF wydaje się w pierwszym rzędzie stymulacja lokalnej odporności w obrębie błony śluzowej jelita. Podane doustnie białko może wchodzić w interakcje z komórkami nabłonka śluzówki jelita oraz z komórkami odpornościowymi zasiedlającymi blaszkę właściwą błony śluzowej (obydwa typy komórek mają receptory LF) [10,34,60,110]. Po kontakcie z LF znacznie zwiększał się poziom uwalnianej przez komórki nabłonkowe IL-18 oraz towarzyszącej jej kaspazy 1 (IL-18 jest syntetyzowana w nieaktywnej postaci i cięta do postaci aktywnej przez kaspazę 1). IL-18 jest konstytutywnie wytwarzana przez komórki nabłonka i odgrywa istotną rolę w odporności związanej ze śluzówkami, sprzyja proliferacji i aktywacji limfocytów T CD4⁺ oraz T CD8⁺, aktywuje komórki NK, zwiększa ekspresję genów wielu cytokin, w tym IFN- γ w komórkach T i NK, indukuje TNF- α , IL-1 β oraz inne cytokiny, stymuluje ponadto odpowiedź typu Th1 oraz zwiększa cytotoksyczność limfocytów T CD8⁺ i NK. Jest też jednym z czynników hamujących angiogenezę. Wzrostowi poziomu IL-18 w jelicie towarzyszył wzrost stężeń IFN- γ , cytokiny o znanym efekcie przeciwnowotworowym (poza bezpośrednim hamowaniem proliferacji i działaniem cytotoksycznym na komórki nowotworowe, IFN aktywuje cytotoksyczne mechanizmy komórkowe, wzmacnia wytwarzanie cytokin przeciwnowotworowych, np. TNF oraz działa antyangiogenicznie). Poza komórkami nabłonkowymi, potencjalnym celem stymulacji przez LF w śluzówce jelita mogą też być makrofagi kępek Peyera, które są zdolne do uwalniania znacznych ilości

IL-18 i IL-1 β . Faktycznie, wytwarzanie IL-18 przez makrofagi otrzewnowe znacznie wzrosło po dodaniu do hodowli LF [62]. Uwalnianiu cytokin towarzyszył wzrost liczby oraz aktywności limfocytów T CD4 $^{+}$, CD8 $^{+}$, komórek NK, limfocytów B IgA $^{+}$ oraz B IgM $^{+}$ w tkance limfatycznej jelita cienkiego oraz limfocytów T CD8 $^{+}$ w jelicie grubym. Co ważne, zwiększone ilości IL-18 oraz limfocytów T i NK znaleziono również we krwi obwodowej i śledzionach zwierząt pijących LF [62,71,136]. Wpływ białka na zwiększenie aktywności cytotoksycznej komórek NK oraz LAK stwierdzono już wcześniej [30,59,113].

Zatem LF podana doustnie, poza bezpośrednią stymulacją odporności lokalnej jelita, zwiększa także odporność ogólnoustrojową, dzięki temu hamujące działanie LF nie ogranicza się jedynie do nowotworów rozwijających się w jelicie, ale dotyczy zmian umiejscowionych w innych tkankach, a także przerzutujących komórek nowotworowych, które po oderwaniu się od pierwotnego ogniska z krwią i chłonną mogą przenosić się do odległych miejsc organizmu. Uzyskane wyniki badań tłumaczące przeciwnowotworowe właściwości LF nie są zaskakujące uwzględniając fakt, iż już wcześniej zwrócono uwagę na stymulujący wpływ białka na odporność lokalną związaną z jelitem i jej powiązania z odpornością ogólnoustrojową [31,116]. Co więcej, w prezentowanych badaniach pomimo wyraźnego efektu przeciwnowotworowego LF, nie udało się wykryć białka we krwi, co raczej przemawiałoby za bezpośrednim jego działaniem tylko w przewodzie pokarmowym, a dopiero pośrednim – na cały organizm.

Należy zwrócić uwagę, że poza wymienionymi aspektami działania LF w modulacji układu immunologicznego podczas choroby nowotworowej, istotne znaczenie może mieć stymulujący wpływ białka na aktywność fagocytującą i cytotoksyczność neutrofilów oraz monocytów/makrofagów [73,74,87,120]. Nie można zapomnieć również o innych oddziaływaniach LF zwiększających reaktywność układu immunologicznego, takich jak choćby stymulacja wytwarzania/uwalniania niektórych cytokin (TNF- α , IFN, IL-6, IL-8, IL-1) [1,64,119,142,152] oraz dojrzewania limfocytów B i T, co jest związane z pojawianiem się swoistych markerów na ich powierzchni oraz nabyciem określonych funkcji [153,154].

Jak już wspomniano, w wielu nowotworach ekspresja różnorodnych cząsteczek powierzchniowych na komórkach odpornościowych oraz innych (np. komórkach śródbłónka) jest znacznie obniżona. Dotyczy to zarówno cząsteczek receptorowych, kostymulujących jak i cząsteczek adhezji międzykomórkowej.

LF ma zdolność do podnoszenia ekspresji cząsteczek CD4 na powierzchni ludzkich komórek limfoblastycznych T linii Jurkat [32]. Działanie to odbywa się poprzez aktywację przez LF jednej z kinaz MAP: LF indukowała ponad 2-krotny wzrost fosforylacji Erk2, przyczyniając się w ten sposób do przekazywania do wnętrza komórki sygnałów aktywacyjnych. Kaskada kinaz białkowych aktywowanych przez mitogen (mitogen-activated protein kinases – MAPK) stanowi jeden z wewnątrzkomórkowych szlaków przekazywania sygnału do aktywacji limfocytu T. Ostatnim ogniwem tego szlaku jest właśnie kinaza MAP (np. Erk2), która po fosforylacji przez inne kinazy staje się aktywna,

przemieszcza się do jądra komórkowego, gdzie fosforyluje czynniki transkrypcyjne. LF zatem wydaje się przekształcać sygnały aktywujące limfocyty analogicznie do sygnałów indukowanych przez mitogeny [32,33].

W wielu nowotworach stwierdzono obniżoną ekspresję łańcucha ζ na powierzchni infiltrujących nowotwór i krążących limfocytów T i komórek NK, czemu towarzyszy obniżona odpowiedź proliferacyjna i zmniejszone wytwarzanie cytokin [46,68,83,141]. Łańcuch ζ stanowi składową kompleksu CD3 uczestniczącego w przekazywaniu sygnału aktywującego komórkę z receptora TCR, który związał antygen do wnętrza komórki. W przypadku niektórych nowotworów nieobecność lub niska ekspresja tej cząsteczki sygnałowej koreluje z większą częstością tworzenia przerzutów, krótszym okresem przeżycia pacjentów oraz gorszą odpowiedzią na terapie biologiczne [83,141]. Frydecka i wsp. wykazali niedawno w testach *in vitro*, że LF stymuluje ekspresję łańcucha ζ na powierzchni limfocytów T uzyskanych z krwi obwodowej pacjentek z rakiem szyjki macicy, jak również od osób zdrowych [47].

LF reguluje także zjawiska adhezji [98], a zatem aktywacji i migracji komórek, które wydają się jednym z najważniejszych procesów decydujących o prawidłowym funkcjonowaniu układu odpornościowego. Regulacja ta obejmuje wpływ białka na ekspresję różnych cząsteczek adhezyjnych. Stymulacja cząsteczek adhezji komórkowej to również jeden z elementów rozwoju stanu zapalnego, może być zatem zjawiskiem niekorzystnym. W przypadku osłabionych funkcji immunologicznych chorych na nowotwór wydaje się jednak odgrywać rolę pozytywną.

Zimecki i wsp. wykazali, że laktoferryina reguluje ekspresję cząsteczki LFA-1 na powierzchni ludzkich jednoczących komórek krwi [155]. LFA-1 (CD11a/CD18) należy do integrzyn i występuje na powierzchni limfocytów T, B, monocytów i neutrofilów. Uczestniczy w interakcjach między leukocytami oraz leukocytami i komórkami śródbłónka. Jej rolą jest adhezja limfocytów T do APC i komórek śródbłónka oraz przekazywanie limfocytowi sygnału wymagającego aktywację. LF wykazywała stymulujący wpływ na ekspresję LFA-1 w przypadku, gdy ekspresja ta wyjściowo była na niskim poziomie, obniżała natomiast początkowo wysoką ekspresję. Działanie regulacyjne białka było najwyraźniej regulowane przez TNF wytwarzany przez monocyty obecne w hodowli, który – według niektórych autorów – może podnosić ekspresję LFA-1 [70]. LF z kolei jest zdolna do indukcji tej cytokiny w monocytach i makrofagach [1,119,142]. Wzrost ekspresji innej cząsteczki z grupy integrzyn – CD11b stwierdzono u zdrowych osób przyjmujących doustnie LF [145]. CD11b razem z CD18 tworzy integrzynę Mac-1 na leukocytach, która uczestniczy w adhezji tych komórek do śródbłónka oraz wiązaniu dopełniacza.

Jak się wydaje, LF może również w pewnych sytuacjach stymulować ekspresję integrzyny ICAM-1 – jednego z ligandów LFA-1 na komórkach śródbłónka, nabłonka oraz monocytów. W badaniach własnych (dane niepublikowane) stwierdzono, iż LF podnosiła podstawową ekspresję ICAM-1 na monocytach ludzkiej krwi obwodowej, a w mniejszym stopniu, na komórkach linii HUVEC (human umbilical vein endothelial cells). Co ciekawe, LF

obniżała poziom białka podniesiony po stymulacji LPS, wykazywała więc wyraźny wpływ regulujący, zależny od stanu komórki.

Stwierdzono również stymulujący wpływ LF na ekspresję selektyny P obecnej na płytkach krwi i komórkach śródbłonna, innej cząsteczki uczestniczącej nie tylko w adhezji, ale również w przekazywaniu sygnałów aktywujących leukocyty [72].

Co ciekawe, laktoferryina podawana w innych, poza doustnym, schematach terapeutycznych również wykazuje działanie przeciwnowotworowe. Tutaj także, poza działaniem miejscowym, ważny wydaje się wpływ immunomodulujący białka. LF podana w bezpośredniej iniekcji doguzowej okazała się skuteczna w leczeniu raka płaskonabłonkowego dna jamy ustnej u myszy. W badaniach *in vitro* potwierdzono, że wpływ był spowodowany cytotoksycznym działaniem białka na komórki nowotworowe (ponad 50% hamowania wzrostu komórek w stosunku do kontroli). Co ważne, na modelu *in vivo* wyraźnie większe hamowanie guza zaobserwowano u myszy immunokompetentnych w porównaniu z myszami z niedoborami odporności (nie wykazano różnic *in vitro*). Wskazuje to na immunomodulację jako kolejny, bardzo ważny mechanizm działania białka podanego miejscowo [143]. Wyraźnie hamujący wpływ LF zarówno na wzrost guza *in situ*, jak i zdolność przerzutowania wykazano na modelu mysiego czerniaka B16 oraz chłoniaka L5178Y. Bydłęca apo-LF i laktoferryina podane *s.c.* dzień po inokulacji komórek nowotworowych ograniczały wielkość guzów i liczbę przerzutów do śledziony, wątroby oraz płuc. BLF wysyczona żelazem (co sugeruje, iż ten rodzaj aktywności białka może zależeć od wysycenia metalem) oraz apo-HLF miały wyraźnie słabsze działanie [149].

PRZECIWNOWOTWOROWA AKTYWNOŚĆ LAKTOFERRYNY – INNE MECHANIZMY DZIAŁANIA

W przypadku podania miejscowego i być może również enteralnego (zakładając, że białko choć częściowo wchłania się z przewodu pokarmowego) poza oczywistym wpływem immunostymulującym na lokalną odpowiedź immunologiczną, szczególne znaczenie mają **bezpośrednie przeciwnowotworowe właściwości** białka obejmujące:

- bezpośrednie działanie lityczne na komórki nowotworowe,
- działanie proapoptotyczne,
- działanie antyproliferacyjne,
- działanie antyangiogenne,
- właściwości antyoksydacyjne,
- chelatowanie jonów żelaza.

Działanie lityczne białka i jego peptydów potwierdzono w badaniach *in vitro* oraz *in vivo*. Bydłęca laktoferryina wywierała bezpośrednie działanie przeciwnowotworowe na komórki linii nowotworowych: włóknakiomiesaka MethA, czerniaka B16F10 i raka okrężnicy C26 oraz wydające się z nich nowotwory [35]. Mikroskopia skaningowa wykazała działanie cytotoksyczne LF objawiające się uszkodzeniem błony komórkowej i lizą komórek *in vitro*, co prowadziło do rozległej krwotocznej nekrozy i ograniczenia wielkości guzów *in vivo*. Taki mechanizm działania był swoisty dla bydłowej laktoferryiny, nie wystąpił

w przypadku użycia mysiej laktoferryiny oraz bydłowej laktoferryiny. Dalsze badania wykazały, że podobną aktywność przeciwnowotworową mają syntetyczne peptydy, będące analogami tych uzyskanych z końca N cząsteczki BLF (reszty 14-31) [146]. Co ważne, uzyskane peptydy odznaczały się selektywnością działania: były znacznie bardziej toksyczne wobec komórek linii nowotworowych niż wobec komórek prawidłowych. O tej wybiórczości działania mogą decydować pewne różnice w budowie błony komórkowej komórek transformowanych nowotworowo, np. większa ilość ujemnie naładowanej fosfatydylloseryny, inna zawartość lipoprotein i zmieniona płynność błony. Tłumaczy to zdolność peptydów litycznych do „rozróżniania” komórek nowotworowych od ich prawidłowych odpowiedników. Jak się okazało, pewne elementy struktury lipidów mogą decydować o ich aktywności bójczej oraz selektywności działania. Są to np. liczba i pozycja dodatnio naładowanych reszt aminokwasowych oraz liczba reszt aromatycznych. Największą toksyczność przejawiały te peptydy, które wszystkie reszty kationowe miały zgrupowane w jednym sektorze swojej struktury helikalnej, jednak jednocześnie cechowała je mniejsza wybiórczość działania. Synteza odpowiednich peptydów powinna umożliwić w przyszłości uzyskanie związków o jednoczesnej największej aktywności i selektywności działania wobec komórek nowotworowych.

Preinkubacja z LF zwiększała wyraźnie podatność komórek nowotworowych (linia komórek raka piersi i raka okrężnicy) na cytotoksyczne działanie komórek NK [30]. Co istotne, białko wykazywało selektywne działanie na komórki nowotworowe, nie modyfikowało podatności na lizę prawidłowych komórek hematopoetycznych linii Jurkat lub K-562. Autorzy tłumaczą to większą zdolnością wiązania się cząsteczek LF do powierzchni komórek nowotworowych poprzez glikozaminoglikany, których na komórkach nowotworowych jest znacznie więcej niż na komórkach prawidłowych [29].

Aktywność proapoptotyczną stwierdzono dla ludzkiej i bydłowej LF oraz jej pepsynowych hydrolizatów w stosunku do wielu komórek nowotworowych [48,84,92,109,148].

Bydłęca laktoferryina indukowała apoptozę w ludzkiej nowotworowej linii monocytowej THP-1, co wiązało się z aktywacją zależnych od $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ endonukleaz i wytwarzaniem RFT [148]. Zarówno LF jak i pochodne peptydy indukowała apoptozę w ludzkiej linii komórek białaczki mieloidalnej HL-60 [109], a bydłęca LF podana doustnie – w obrębie zmian nowotworowych tkanki płucnej u myszy [84]. W kolejnych badaniach udało się wyjaśnić mechanizm leżący u podstaw proapoptotycznego działania białka.

Dokładna replikacja i podział materiału genetycznego komórki decyduje o jej przeżyciu. „Błąd” w tych procesach (np. spowodowany zadziałaniem karcynogenu) powinien skierować komórkę na drogę śmierci apoptotycznej – dla dobra organizmu jako całości. Gdy tak się nie stanie, komórki przechodzą przez cykl komórkowy, proliferują, a powstałe uszkodzenie się utrzuca. W niektórych przypadkach prowadzi to do rozwoju nowotworu. Apoptoza reprezentuje zatem główny mechanizm obrony przed nowotworem. W komórce istnieje wiele mechanizmów kontrolujących

prawidłowość przebiegu cyklu komórkowego i w razie potrzeby powodujących jego czasowe zatrzymanie (to czas na naprawę uszkodzeń) lub śmierć apoptotyczną komórki (gdy ta naprawa nie jest możliwa).

Jednym z podstawowych mechanizmów regulujących apoptozę są geny/białka supresorowe nowotworów. Geny hamujące rozwój nowotworu (geny supresorowe) i białka, które kodują, działają jako negatywne regulatory wzrostu komórki. Kontrolując przebieg procesów życiowych komórki, takich jak: proliferacja, replikacja DNA, apoptoza chronią ją przed wyłamaniem się spod kontroli mechanizmów regulujących. Mutacje tych genów tę kontrolę znoszą – zaburzenia w ich ekspresji i czynności są często znaczne w wielu nowotworach. Istnieje kilkanaście zidentyfikowanych genów/białek supresorowych, a p53 jest tutaj szczególnie istotne. Utrata funkcji p53 jest powodem wrodzonego zespołu Li-Fraumeni, w którym już w młodym wieku mogą się ujawniać mnogie guzy tkanek miękkich, białaczki, chłoniaki, nowotwory mózgu i sutka. Poza związkiem z zespołem Li-Fraumeni, gen supresorowy *P53* jest zmutowany lub utracony w wielu różnych ludzkich nowotworach (w ponad 50% wszystkich rodzajów nowotworów dochodzi do jego inaktywacji) [79]. Wykazano, iż gen *P53* jest swego rodzaju „celem” mutacji w różnych nowotworach, np. w indukowanych promieniowaniem UV rakach skóry podstawno- i kolczystokomórkowych wykazano obecność mutacji charakterystycznych dla UV w różnych regionach tego genu i to aż w 60–100% guzów, a co więcej, na bardzo wczesnych etapach rozwoju raka. *P53* może być ponadto mutowany i inaktywowany przez karcynogeny chemiczne [133]. *P53* jest nazywany strażnikiem genomu – kontroluje cykl komórkowy, szczególnie w jego „punkcie kontrolnym” między fazą G1 i S, odpowiadając za przetrzymanie komórki w fazie G1 na czas potrzebny do dokonania napraw DNA. Jeśli stopień uszkodzenia przekracza pewien poziom, komórka zostaje skierowana na drogę apoptozy, za której indukcję odpowiada p53 (białko p53 przyłącza się do swoistych regionów DNA i inicjuje wiele zdarzeń, których konsekwencją jest apoptoza). Ekspresja zmutowanego p53 może mieć katastrofalne skutki dla organizmu – komórki z uszkodzonym materiałem genetycznym przechodzą przez cały cykl komórkowy, ich nieprawidłowości mogą się utrzymywać w kolejnych pokoleniach komórek, a to w konsekwencji może prowadzić do rozwoju nowotworu. Mutacja genu *P53* nie tylko umożliwia wczesne etapy rozwoju nowotworu (promocja), ale również jest związana z jego progresją, czyli przemianą złośliwą. Do inaktywacji tego genu (jako dodatkowej zmiany genetycznej) dochodzi np. w komórkach, które tworzą niezłośliwe brodawczaki, gdy stają się one złośliwymi rakami kolczystokomórkowymi [133]. Poza wpływem na rozwój nowotworów, mutacja genu *P53* jest także jednym z głównych czynników oporności komórek nowotworowych na stosowane cytostatyki (również terapię wielolekową) oraz promieniowanie. Wiele cytostatyków uszkadzających materiał genetyczny komórki działa przez indukcję apoptozy, inicjowaną przez białko p53. W związku z tym, mutacje prowadzące do inaktywacji genu/białka p53 sprawiają, że komórki stają się niewrażliwe na mutagenne działanie chemio- i radioterapii, unikają śmierci apoptotycznej i mogą nadal żyć i proliferować [79]. Niedawno wskazano również na rolę p53 w angiogenezie nowotworowej [19]. Mutacje w obrębie *P53* korelują ze zredukowaną ekspresją trombospodiny

(inhibitora angiogenezy), zwiększoną angiogenezą i progresją nowotworu w kierunku złośliwienia.

Ze względu na główną rolę genów supresji nowotworu (również *P53*) w rozwoju procesów nowotworzenia, „naprawa” uszkodzonych supresorów przywracająca równowagę między proliferacją a apoptozą mogłaby zahamować lub ograniczyć wzrost nowotworu. Obecnie podejmowane są próby kliniczne przywrócenia kontroli nad cyklem komórkowym poprzez transfekcje komórek guza genami supresorowymi (testy dotyczą m.in. terapii raka płuc, raka kolczystokomórkowego głowy i szyi, wątroby, jajnika, ostrej białaczki szpikowej). Część testów powiodła się doprowadzając do regresji nowotworu [16,23].

Najnowsze badania wskazują na możliwość działania proapoptotycznego LF przez wpływ na *P53*. Okazało się, że LF swoiście aktywuje supresorowy gen *P53* poprzez aktywację jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF-κB i konsekwentnie reguluje wytwarzanie białka supresorowego p53 [92]. W badaniach *in vitro* na komórkach ludzkiego raka szyjki macicy (HeLa) stwierdzono, że LF działa poprzez aktywację kinazy NIK, która fosforyluje następnie kinazę IKK, a ona z kolei fosforyluje IκB – inhibitor czynnika NF-κB. Fosforylacja IκB jest sygnałem do jej oderwania się od NF-κB, co powoduje uwolnienie aktywnego czynnika, który po translokacji do jądra komórkowego łączy się z sekwencjami promotora *P53*, prowadząc do ekspresji genu.

Inne badania wskazują również na odmienny (poza aktywacją *P53*) mechanizm działania proapoptotycznego LF na komórki nowotworowe. Fujita i wsp. wykazali na modelu indukowanych azoksymetanem nowotworów jelita grubego u szczurów F344, że podawana doustnie laktoferryryna zwiększała ekspresję Fas – receptora odpowiedzialnego za indukcję apoptozy należącego do rodziny receptorów TNF [48]. Wzrost ekspresji Fas (ponad 2,5-krotny) w komórkach jelita grubego obserwowano zarówno podczas wczesnej jak i późnej fazy rozwoju guzów, a komórki ekspresjonujące Fas i apoptotyczne występowały przede wszystkim w obszarze światła jelita, gdzie LF miała bezpośredni dostęp do komórek. Wzrostowi ekspresji białka Fas towarzyszył wzrost aktywności kaspazy 8 i 3, białek uczestniczących w przekazywaniu sygnałów prowadzących do apoptozy. Te zmiany wyraźnie korelowały z redukcją zmian nowotworowych w ścianie jelita (zarówno liczby jak i wielkości guzów) [111,125]. Uzyskane wyniki wskazują, iż apoptoza powodowana zwiększoną ekspresją Fas jest elementem chemioprewencyjnego działania LF.

Damiens i wsp. [28] stwierdzili, że LF powoduje zahamowanie proliferacji komórek raka sutka MDA-MB-231 *in vitro* przez zatrzymanie cyklu komórkowego na skutek zablokowania przejścia z fazy G1 do S. Zatrzymanie w fazie G1 było związane ze znacznym spadkiem poziomu kinazy CDK2 i cykliny E, co korelowało ze spadkiem aktywności CDK2. Ponadto stwierdzono znaczny spadek aktywności kinazy CDK4, czemu towarzyszyła zwiększona ekspresja inhibitora CDK4 – białka p21 (CIP1). LF zachowywała również białko retinoblastoma pRb w hipofosforylowanej postaci (tzn. zdolnej do blokowania czynników transkrypcyjnych). Białko retinoblastoma pRb to, obok p53, białko supresorowe guza. Hamuje aktywność czynników

transkrypcyjnych E2F (jest aktywne w stanie hipofosforylacji). Hiperfosforylacja pRb przez kinazy zależne od cyklin, inaktywuje to białko przy przejściu z fazy G1 do S, co pozwala komórkom wkroczyć do fazy S. Rodzina białek p21 to inhibitory kompleksów CDK (kinazy zależne od cyklin) -cykliny. Ekspresja p21 jest regulowana przez p53 (gen *P21* może być indukowany przez białko p53); te dwa białka zatem współdziałają w zatrzymaniu cyklu komórkowego. Kompleksy CDK-cykliny są niezbędne do uporządkowanego włączania i ekspresji genów, których produkty odgrywają istotną rolę w procesie replikacji. Kompleks CDK2-cyklina E pojawia się w fazie G1 i osiąga najwyższe stężenie na granicy G1/S, które następnie gwałtownie spada. Funkcją CDK2-E jest inicjacja syntezy DNA we wczesnej fazie S, a CDK-D – umożliwienie komórce przejścia punktu granicznego G1/S. Autorzy powyżej zaprezentowanych badań wskazują, iż LF może być aktywna w zahamowaniu wzrostu również innych zmienionych nowotworowo komórek nabłonkowych (m.in. HBL-10, MCF-7, HT-29) działając poprzez mechanizm częściowo niezależny od p53 [28].

Z działaniem proapoptotycznym na komórki nowotworowe wiąże się **działanie antyproliferacyjne** białka. Bydłęca LF podawana doustnie myszom hamowała rozwój guza płuc hamując proliferację komórek nowotworowych i zwiększając ich apoptozę [84]. Aktywacja enzymów detoksyfikujących oraz modyfikacja proliferacji komórek to mechanizm przeciwnowotworowego działania BLF u myszy z nowotworem języka indukowanym chemicznie [121]. Stwierdzono hamowanie proliferacji komórek ludzkiej białaczki promielocytowej linii HL-60 przez hydrolizaty BLF, co wiązało się z indukcją apoptozy przez badane peptydy [109].

Kolejnym elementem przeciwnowotworowego działania LF jest **działanie angiostatyczne**. Angiogeneza (neowaskularyzacja, tworzenie nowych naczyń krwionośnych) odgrywa istotną rolę w rozwoju nowotworów i tworzeniu przerzutów [107]. Uwagę na udział angiogenezy we wzroście nowotworów zwrócono już na początku lat 70. ub.w. [41], a sformułowane wtedy koncepcje angiogenezy nowotworowej zostały potwierdzone później w wielu badaniach [19,20,40,42,43]. Podstawowa z nich głosi, że wzrost nowotworu jest zależny od angiogenezy; każdy przyrost nowotworu wymaga jednoczesnego wzrostu naczyń krwionośnych, które będą zaopatrywały tkankę nowotworową w tlen i składniki odżywcze potrzebne do dalszego wzrostu (guzy lite nie mogą rosnąć ponad 2 mm³ bez dodatkowego zaopatrzenia w krew). Ostatnie wyniki wskazują, że angiogeneza uczestniczy w pozytywnej kontroli nie tylko nowotworów litych, ale również odgrywa rolę w rozwoju nowotworów układowych, a więc terapia angiostatyczna może ograniczać również wzrost białaczek i szpiczaków [8,15]. Angiogeneza jest procesem złożonym, obejmującym proliferację komórek śródbłonna naczyń włosowatych oraz zwiększenie ich ruchomości i uzyskanie zdolności do tworzenia nowych struktur naczyniowych. U osobników dorosłych, w normalnych warunkach, nowe naczynia nie powstają, ale mogą być tworzone w zdrowych tkankach w pewnych sytuacjach, np. po zranieniu, podczas menstruacji, w ciąży, podczas dojrzewania płodu [85]. Zdolność do stymulacji angiogenezy przez nowotwór jest związana z nabyciem cech złośliwości i jest niezbędna do efektyw-

negu powstawania zmian przerzutowych [20,131]. Ocena stopnia angiogenezy w niektórych nowotworach ma wartość diagnostyczno-prognostyczną (np. w raku gruczołu krokowego i raku piersi rokuje niekorzystnie). W punkcie krytycznym swojego wzrostu guz zaczyna wytwarzać różnego rodzaju czynniki stanowiące sygnał dla otaczających go komórek endotelium do rozpoczęcia angiogenezy. Znanych jest kilkadziesiąt czynników o właściwościach pobudzania neowaskularyzacji. Należą tutaj czynniki wzrostowe: m.in. angiogenina, angiotropina, czynnik wzrostu naskórka, czynniki wzrostu fibroblastów (FGF – fibroblast growth factors), czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF – vascular endothelial growth factor); cytokiny: TNF- α , IFN- γ , G-CSF, IL-1, IL-6, IL-8; endogenne modulatory: integryna $\alpha\beta_3$, angiopoetyna, endotelina, syntaza tlenu azotu, prostaglandyny oraz enzymy o aktywności proteaz (proces rozszerzania się sieci naczyń i nowotworu wymaga proteolitycznej degradacji substancji międzykomórkowej) [19,43]. FGF i VEGF odgrywają główną rolę w angiogenezie nowotworowej, a ich ekspresję wykazano dla większości nowotworów [37,85,90]. Zahamowanie aktywności tych czynników jest jednym z głównych celów terapii angiostatycznych (obecnie w klinice używany jest już Talidomid – lek hamujący działanie zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów). Na etapie badań znajduje się zastosowanie naturalnych inhibitorów angiogenezy (np. angiostatyny), inhibitorów proteinaz macierzy, inhibitorów integrzyn [107]. W końcu lat 90. XX wieku w fazie prób klinicznych znajdowało się w sumie ponad 30 różnych terapii mających na celu ograniczenie angiogenezy [13,19,38,104]. Wydaje się, że najskuteczniejszym sposobem postępowania byłoby połączenie terapii antyangiogennych z konwencjonalną terapią cytostatykami. Wynika to z faktu, że inhibitory angiogenezy niszczą dzielące się komórki naczyń, ale nie komórki nowotworowe. Za pomocą cytostatyków trzeba więc zredukować masę guza, a za pomocą inhibitorów angiogenezy nie dopuścić do odtworzenia krążenia w jego obrębie. Hamując angiogenezę można też pośrednio zahamować wzrost nowotworu, bo należy pamiętać o wzajemnych dwukierunkowych oddziaływaniach guz – naczyń: proliferujące pod wpływem komórek guza komórki endotelialne poprzez mechanizmy parakryne wytwarzają czynniki wzrostowe stymulujące proliferację komórek nowotworowych [19].

Antyangiogenny wpływ laktoferryiny i laktoferryiny wykazano po raz pierwszy w 1998 roku [149]. W teście skórnym u myszy badano wielkość guza i liczbę naczyń krwionośnych w jego obrębie oraz zdolność do tworzenia przerzutów (w badaniach użyto komórek mysiego czerniaka B16 i chłoniaka L5178Y o silnej zdolności przerzutowania). U myszy traktowanych s.c. BLF i laktoferryiną B wystąpiła istotna redukcja w wielkości guza pierwotnego, ilości związanych z guzem naczyń krwionośnych oraz mniejsza ilość przerzutów do śledziony, płuc i wątroby. Antyangiogenna aktywność laktoferryiny została potwierdzona w kolejnych badaniach [90,115]. Norrby i wsp. wykazali po raz pierwszy, że LF podana doustnie hamuje angiogenezę mediowaną VEGF w obrębie krezki (ograniczenie tworzenia sieci naczyń, skrócenie naczyń), co wskazuje, iż laktoferryina może być uznana za pierwsze endogenne białko wykazujące działanie antyangiogenne po podaniu doustnym [90]. Ze względu na enzymatyczną proteolizę białka w przewodzie pokarmowym [132], za działanie antyangiogenne LF

odpowiada nie tylko jej natywna postać, ale najprawdopodobniej również produkty jej enzymatycznego trawienia (m.in. laktoferryцина i inne peptydy). Podobne zjawisko nabycia funkcji antyangiogennych i przeciwnowotworowych po trawieniu enzymatycznym dotyczy także innych białek: angiostatyny, endostatyny i antytrombiny (natywne białka wykazują odmienną aktywność niezwiązaną z tworzeniem naczyń krwionośnych) [95,96]. Wpływ antyangiogenny LF jest związany z hamowaniem proliferacji komórek śródbłonna naczyń, co wykazano w teście *in vitro* z wykorzystaniem linii ludzkich komórek endotelialnych HUVEC [90]. LF wiąże się do specjalnych miejsc na powierzchni komórek śródbłonna (elementami wiążącymi o dużej wydajności i małym powinowactwie mogą być usiarczanowane cząsteczki powierzchniowe, takie jak heparynopodobne glikoaminoglikany lub proteoglikany), które mogą wylapywać biologicznie aktywne cząsteczki i przytrzymywać je przy powierzchni komórki do momentu związania przez właściwe receptory o dużej swoistości [39]. Receptorami LF tego drugiego typu na powierzchni komórek śródbłonna wydają się LRP (low-density-lipoprotein-receptor-related protein), które uczestniczą również w endocytozie i transcytozie LF w komórkach śródbłonna. LRP na komórkach endotelialnych wiąże również apoproteinę E silnie hamującą proliferację i ruchliwość tych komórek [130].

Shimamura i wsp. potwierdzili ostatnio, że przeciwnowotworowa aktywność LF może być mediowana przez hamowanie angiogenezy [115]. Białko działało, zależnie od dawki, hamując na angiogenezę *in vivo* (test błon omocznioowo-kosmówkowych zarodków kurzych) oraz w testach *in vitro* (hamując tworzenie struktur rurkowatych przez mysie komórki endotelialne oraz mediowaną FGF i VEGF proliferację tych komórek). Ponadto LF hamowała związaną z guzem angiogenezę, gdy została podana myszom dostunnie (model worka powietrznego na grzbiecie). Autorzy sugerują, że takie działanie LF wynika z bezpośredniego wpływu hamującego na proliferację endotelium oraz wpływu pośredniego przez stymulację uwalniania IL-18 i IFN- γ przez komórki nabłonka śluzówki przewodu pokarmowego. W teście *in vitro* również stwierdzono indukcję wytwarzania IL-18 przez makrofagi otrzewnowe. Przez IL-18 może być także indukowane pośrednio wytwarzanie IFN- γ [103]. Zarówno IL-18 jak i IFN- γ są cytokinami hamującymi neowaskularyzację [26,27].

W kontekście chemioprewencyjnych i przeciwnowotworowych działań LF, wspomnieć należy też o **właściwościach antyoksydacyjnych** białka [22]. Bowiern reaktywne formy tlenu (RFT) i formy im pokrewne (m.in. tlenek azotu, ditlenek azotu, H_2O_2 i wolne rodniki substancji organicznych) mogą uczestniczyć w procesie karcynogenezy i wzrostu nowotworu [54,93]. Wolne rodniki mogą być indukowane przez ekspozycję zwierząt i ludzi na różnego rodzaju ksenobiotyki i mikroorganizmy oraz powstają w czasie prawidłowych reakcji redoks w łańcuchu komórkowym w większości komórek tlenowych. Wolne rodniki są potencjalnie niezwykle reaktywne i chemicznie niestabilne, mogą reagować swoiście ze składnikami komórki, modyfikując je i uszkadzając. Doświadczenia *in vitro* wykazały, że RFT mogą stymulować ekspresję niektórych onkogenów (np. *c-fos*, *c-myc* i *c-jun*) [54]. RFT mogą uszkadzać składniki DNA i w ten sposób prowadzić do powstania

mutacji. Stwierdzono, że addukty RFT-DNA, takie jak 8-hydroksydeoksyguanina, 2-hydroksyadenina, 8-hydroksyadenina, 5-hydroksyuracyl, 8-nitroadenina są premutagenne i indukują swoiste typy mutacji genów [123]. To z kolei zmienia ekspresję genów i powoduje zaburzenia w regulacji cyklu komórkowego. Nadtlarki organiczne i H_2O_2 zostały zidentyfikowane jako promotory procesu karcynogenezy u myszy [52]. Stwierdzono, że wiele substancji promujących rozwój guza nie tylko wzmacnia wytwarzanie RFT w komórkach naskórka myszy, ale jednocześnie obniża aktywność enzymów odpowiedzialnych za usuwanie RFT z komórek (dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy i peroksydazy glutationowej) zwiększając w ten sposób stężenia RFT w komórce i nasilając uszkodzenia. Obniżenie aktywności enzymów chroniących przed RFT stwierdzono również w nowotworach u ludzi [78]. Wiadomo, że zranienia i stany zapalne (głównie chroniczne) mają działanie kokarcynogenne i nasilają ryzyko rozwoju nowotworu w miejscu uszkodzenia lub zapalenia. Zwiększone ryzyko nowotworzenia jest charakterystyczne m.in. dla wrzodziejącego zapalenia okrężnicy, choroby Crohna, zapalenia przełyku, wirusowego zapalenia wątroby, choroby wrzodowej żołądka powodowanej przez infekcję *Helicobacter pylori*. Wydaje się, że istotnymi pośrednikami kokarcynogennego działania zapalenia mogą być RFT intensywnie wytwarzane przez komórki zapalne (głównie granulocyty) infiltrujące ranę lub miejsce dotknięte zapaleniem. W doświadczeniach *in vitro* wykazano, że fibroblasty mysie znajdujące się w kontakcie z pobudzonymi granulocytami lub ekspozowane na działanie RFT ulegają transformacji nowotworowej [91], co pozwala zaliczać infekcje i zapalenie do czynników uczestniczących w nowotworzeniu u ludzi.

RFT uwalniane są intensywnie przez przynajmniej niektóre komórki nowotworowe; ich wytwarzanie stwierdzono m.in. przez komórki mięsakoraka Walkera. Uwalnianie RFT przez komórki nowotworowe jest prawdopodobnie elementem ataku na komórki śródbłonna, ułatwiającym przejście komórek nowotworowych przez ściany naczyń krwionośnych w procesie tworzenia przerzutów [114].

Możliwości antyoksydacyjne laktoferryiny można też wykorzystać w celu ochrony przed RFT zdrowych tkanek pacjentów leczonych cytostatykami. Należy podkreślić, że wiele substancji ksenobiotycznych (w tym oczywiście również leków cytostatycznych) ulega w komórkach cyklicznym reakcjom redoks (redukcji i utleniania), które *notabene* są napędzane przez metabolizm komórki. Ksenobiotyki są redukowane przez enzymy komórkowe (oksydoreduktazy FAD i NAD), a następujące potem utlenienie ich zredukowanych postaci wytwarza RFT (głównie $O_2^{\cdot-}$). Wytwarzanie RFT jest istotną komplikacją terapii wieloma lekami przeciwnowotworowymi ze względu na dalsze uszkodzenia tkanek i nasilenie objawów niepożądanych leczenia [17].

W świetle powyższych faktów, LF jako związek o właściwościach antyoksydacyjnych i przeciwzapalnych, może być wykorzystana w prewencji nowotworzenia oraz ograniczaniu już istniejących nowotworów.

Laktoferryina może ograniczać rozwój nowotworów **pozabawiając szybko rosnące komórki nowotworowe żela-**

za. Niebezpieczeństwo obecności tego pierwiastka wynika z promowania tworzenia RFT o właściwościach karcynogennych, supresji aktywności komórek odpornościowych gospodarza (głównie makrofagów i limfocytów) oraz zdolności do „faworyzowania” proliferacji komórek neoplastycznych. Zarówno u zwierząt jak i u ludzi pierwotne nowotwory rozwijają się w miejscach narażonych na depozycję nadmiernych ilości żelaza. Komórki nowotworowe tworzą systemy (często podobne do tych tworzonych przez drobnoustroje), które ułatwiają im nabywanie żelaza w środowisku, gdzie jest go mało. Są to niskocząsteczkowe siderofory oraz powierzchniowe glikoproteiny wiążące białka sekwestrujące żelazo [139]. Organizm w początkowych etapach nowotworzenia uruchamia mechanizmy ochronne: reaguje wzmoczoną syntezą białek sekwestrujących metal (np. ferrytyny i LF), a ilościowe oznaczenia żelaza oraz białek wiążących żelazo w organizmie mogą mieć wartość prognostyczną w przypadku niektórych nowotworów. Mechanizmy te często nie są jednak skuteczne wobec mechanizmów uruchamianych przez komórki nowotworowe [140]. W związku z tym metody terapii związane z obniżeniem dostępności żelaza dla nowotworu często towarzyszą chemio- i radioterapii. Elementem takiego leczenia może być również laktoferryina.

AKTYWNOŚĆ CHEMIOPREWENCYJNA LAKTOFERRYNY

Laktoferryina mogłaby znaleźć zastosowanie nie tylko w zwalczaniu nowotworów już istniejących i rozpoznanych, ale ze względu na swoje właściwości, mogłaby być stosowana również jako środek **chemioprewencyjny**.

Chemioprewencja polega na podawaniu (przeważnie doustnym) jednego lub kilku naturalnych bądź syntetycznych związków o właściwościach przeciwnowotworowych w celu profilaktyki nowotworów, które są wynikiem ekspozycji na środowiskowe karcynogeny chemiczne. Jest to więc swoista interwencja żywieniowa mająca na celu ograniczenie rozwoju niektórych nowotworów [123,133,137]. Ze względu na istnienie zależności między rozwojem wielu nowotworów a dietą, paleniem papierosów i innymi czynnikami środowiskowymi, koncepcja chemioprewencji wydaje się atrakcyjna. Jej zadaniem nie jest leczenie, ale hamowanie i odwracanie wczesnych zmian molekularnych i komórkowych powstających w procesie karcynogenezy i mogących prowadzić do rozwoju nowotworu. Uważa się, że karcynogeneza jest procesem długotrwałym i wielostopniowym (rozciągającym się od mutagennej inicjacji poprzez promocję do powstania raka inwazyjnego) i może być odwrócona lub zahamowana farmakologicznie [65,133,137]. Składniki odżywcze wydają się najbardziej pożądaną grupą środków chemioprewencyjnych, na co wskazują dane epidemiologiczne – osoby i społeczeństwa, które dietę opierają na dużej ilości warzyw i owoców wykazują mniejszą zapadalność i śmiertelność z powodu nowotworów jelita grubego, żołądka, piersi, prostaty, pęcherza moczowego i innych. Źródłem czynników chemioprewencyjnych są zarówno rośliny jak i substancje pochodzenia zwierzęcego. Znanych jest około 30 klas związków o właściwościach chemioprewencyjnych, które już znalazły, albo niedługo znajdą, zastosowanie w profilaktyce nowotworów. Należą do nich m.in.: retinoidy (wpływają na wzrost, różnicowanie i apoptozę komórek nabłonkowych, np. przez zmianę ekspresji genów, m.in. *P53* oraz inaktywują wolne rodni-

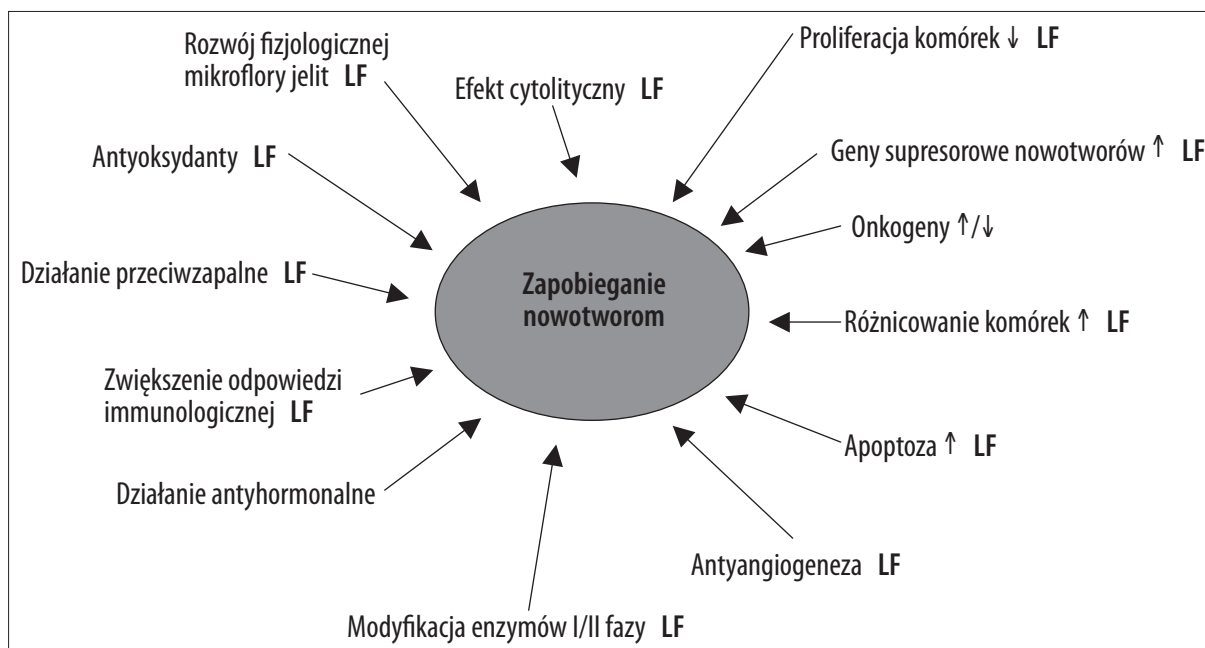
ki), wapń i inne mikroelementy (powodują wytrącanie niektórych związków promujących raka jelita grubego, m.in. kwasów tłuszczowych), selen (wykazuje silne właściwości antyoksydacyjne i antyproliferacyjne), aspiryna i niesteroidowe związki przeciwzapalne (zmniejszają zmiany zapalne i modulują proliferację komórek nowotworowych). Ze względu na to, iż karcynogeneza jest procesem kompleksowym, czynniki o różnorodnych mechanizmach działania są szczególnie obiecującymi kandydatami do chemioprewencji nowotworów. Najkorzystniejsze wydają się również środki działające na możliwie najwcześniejsze stadia nowotworzenia (procesy inicjacji oraz promocji). Potencjalne cele działania związków chemioprewencyjnych na tych etapach karcynogenezy to [65,123]:

- modyfikacja aktywacji karcynogenu przez hamowanie aktywności enzymów odpowiedzialnych za te procesy,
- wzmacnianie detoksyfikacji karcynogenów przez wpływanie na aktywność enzymów detoksyfikujących,
- usuwanie z komórek związków uszkadzających DNA, zwiększenie wydolności procesów naprawczych DNA,
- zmniejszenie ilości wolnych rodników powstających w wyniku ekspozycji na karcynogeny i dodatkowo uszkadzających DNA,
- zmiany w zakresie ekspresji genów związanych z wewnątrzkomórkowymi procesami sygnalizacyjnymi, proliferacją, apoptozą i różnicowaniem,
- zmniejszenie nasilenia procesów zapalnych oraz
- angiogenezy, które mogą tworzyć środowisko promujące wzrost nowotworu,
- regulacja składu mikroflory jelitowej.

Laktoferryina będąca białkiem o szerokim zakresie aktywności, może wpływać na różne etapy karcynogenezy, również te najwcześniejsze. Jej wartość jako potencjalnego czynnika chemioprewencyjnego stwierdzono w licznych badaniach.

Laktoferryina i jej peptydy podane doustnie jednocześnie z karcynogennymi heterocyklicznymi aminami mogą hamować karcynogenezę w jelicie grubym i wątrobie szczurów. Autorzy sugerują, że działanie to zachodzi dzięki supresji przez LF aktywności jednego z enzymów I fazy – P450 1A2 z konsekwentną redukcją aktywacji karcynogenu i tworzenia jego adduktów z DNA [49]. Enzymy I fazy (głównie grupa enzymów cytochromu P450 licząca razem około 100 enzymów) są obecne w retikulum endoplazmatycznym większości komórek i odgrywają główną rolę przede wszystkim w metabolicznej aktywacji, ale również detoksyfikacji wielu ksenobiotyków, w tym również leków, toksycznych związków chemicznych i karcynogenów. Enzymy te odpowiadają za oksydację, redukcję, oksygenację, desulfurację, dealkilację, hydroksylację i inne procesy, w czasie których dochodzi do przekształcenia niepolarnych lub hydrofobowych karcynogenów w związki pośrednie bardziej hydrofilowe lub polarne zdolne reagować z nukleofilowymi miejscami w DNA i tworzyć addukty karcynogen-DNA, pierwszy krok w procesie indukcji nowotworu [123,133].

Stwierdzono również chemioprotekcyjny wpływ LF będącej w rozwoju raka płaskonabłonkowego języka u szczurów po podaniu karcynogenu tlenku 4-nitrochinolonu [121].



Ryc. 1. Mechanizmy chemioprewencji i hamowania wzrostu nowotworów z uwzględnieniem tych, na które wpływa LF (zmodyfikowane według [123])

Wystąpiła znaczna redukcja zarówno w częstości pojawiania się zmian (20% w grupie BLF vs. 55% w grupie kontrolnej), jak i ich nasileniu (spadek o 64% w ilości zmian). Autorzy wiążą uzyskane wyniki z wpływem LF na wzrost aktywności enzymów II fazy: transferazy glutationu oraz reduktazy chinonu w komórkach wątroby oraz języka. Enzymy fazy II (S-transferazy glutationowe, transferazy metylowe, sulfotransferazy, glukuronylotransferazy) pełnią funkcje detoksyfikujące ksenobiotyki. Mają one zdolność łączenia hydrofilowych metabolitów otrzymanych w wyniku metabolizmu I fazy z szeroką gamą małych ligandów (najważniejsze znaczenie ma koniugacja z glutationem katalizowana przez S-transferazy glutationowe). Następnym metabolizmu II fazy jest powstanie mniej toksycznych i łatwiej usuwanych z komórek metabolitów [123,133].

Chemioprewencyjny wpływ LF wykazano również na zwierzęcych modelach nowotworów przełyku i płuc, okrężnicy, jelita cienkiego oraz pęcherza moczowego [48,82,84,125,127,128].

Chemioprewencyjna rola LF może także wynikać z korzystnego wpływu białka na rozwój fizjologicznej mikroflory jelita, głównie pałeczek kwasu mlekowego i bifidobakterii [67,100,101]. Rola tych bakterii polega przede wszystkim na obniżaniu pH treści jelitowej, hamowaniu procesów gnilnych, w wyniku których powstają m.in. indole, skatole, nitrozaminy, należące do silnych czynników karcynogennych. Pałeczki kwasu mlekowego obniżają aktywność enzymów (m.in. β -glukuronidazy, nitroreduktazy, hydrolazy kwasu glikocholowego), odpowiedzialnych za przemianę prokarcynogenów w karcynogeny. Bakterie te skracają także czas kontaktu karcynogenów z błoną śluzową jelita przez stymulację motoryki jelit.

Podsumowanie możliwych chemioprewencyjnych i przeciwnowotworowych działań LF przedstawiono na ryc. 1 oraz w tabeli 1.

WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWNOWOTWOROWE LAKTOFERRYNY W BADANIACH KLINICZNYCH

Warto w tym miejscu nadmienić, iż wnioski dotyczące przeciwnowotworowych właściwości laktoferryiny uzyskane w badaniach laboratoryjnych i przedklinicznych wprowadza się powoli do kliniki. Czynnikiem szczególnie zachęcającym, oprócz dużej skuteczności LF, jest naturalne pochodzenie białka i jego dobra tolerancja przy zupełnym braku działań toksycznych, nawet po podaniu dużych dawek, a wręcz przeciwnie – białko wpływa korzystnie np. na podniesienie masy ciała znacznie obniżonej u zwierząt ze zmianami nowotworowymi jelita [128]. Obecnie prowadzone są randomizowane badania kliniczne I/II fazy z wykorzystaniem ludzkiej rekombinacyjnej LF (rHLF) w leczeniu pacjentów z różnego rodzaju nowotworami. Prowadząca badania firma Agennix (wytwórca rHLF) poprzedziła je próbami przedklinicznymi na myszach, w których rHLF podawana doustnie hamowała bardzo wyraźnie rozwój raka drobnokomórkowego płuc (o 80%), raka sutka (podobna skuteczność) oraz raka głowy i szyi, gdzie zanotowano 60% hamowanie przez rHLF podawaną w monoterapii i 80%, gdy białko podawano z cisplatyną. Podobnie jak w przypadku badań z użyciem ludzkiej i bydłowej LF, efektywność działania rHLF na tym modelu wynikała z aktywacji odporności w jelicie oraz odporności systemowej (wzrost wytwarzania IL-18 w jelicie, wzrost liczby i aktywacja krążących limfocytów T i NK) [2,129].

Równie zachęcające są wyniki prób klinicznych. Część badań prowadzono u chorych z postępującymi, przerzutującymi i opornymi na konwencjonalną terapię guzami litymi różnych narządów (niedrobnokomórkowy rak płuc, rak nerki, prostaty, piersi, jajnika, czerniak) [2,57]. rHLF podawano doustnie w dawkach 1,5–9 g/dzień/osobę jako monoterapię drugiego lub trzeciego rzutu. U chorych z rakiem nerki stwierdzono trwałą odpowiedź, znaczną

Tabela 1. Mechanizmy przeciwnowotworowego i chemioprewencyjnego działania LF

Rodzaj nowotworu	Droga podania i mechanizm działania LF	Piśmiennictwo
Nowotwory lite, czerniak B16 u myszy	hamowanie rozwoju guzów pierwotnych i przerzutów; udział komórek K	[14]
Gruźlakorak jelita grubego u szczurów F344	hamowanie tworzenia zmian nowotworowych i redukcja wielkości już istniejących zmian; zwiększenie aktywności cytotoksycznej komórek NK; <i>p.o.</i>	[111]
Zmiany polipowate w jelicie cienkim u myszy ApcMin	hamowanie rozwoju spontanicznych zmian polipowatych jelita cienkiego; <i>p.o.</i>	[128]
Nowotwory przełyku i płuc u szczurów	zapobieganie procesom karcynogenezy chemicznej; <i>p.o.</i>	[127]
Złośliwy nowotwór okrężnicy (Co26Lu) u myszy	hamowanie tworzenia przerzutów; zwiększenie liczby i aktywności limfocytów T CD8 ⁺ i komórek NK; <i>p.o.</i>	[61,125]
Złośliwy nowotwór okrężnicy (Co26Lu) u myszy	hamowanie tworzenia przerzutów; indukcja odpowiedzi komórkowej (wzrost liczby i aktywności komórek CD4 ⁺ , CD8 ⁺ i NK w śledzionie i krwi obwodowej) mediowana przez IL-18; <i>p.o.</i>	[71]
Złośliwy nowotwór okrężnicy (Co26Lu) u myszy	j.w. oraz wzrost liczby limfocytów B IgA ⁺ oraz IgM ⁺ w blaszce właściwej jelita cienkiego skorelowany z wytwarzaniem IL-18, kaspazy 1 oraz IFN-γ w jelicie cienkim; <i>p.o.</i>	[136]
Rak pęcherza moczowego u szczurów	hamowanie indukowanych chemicznie zmian nowotworowych; sugerowane bezpośrednie działanie białka na tkanki pęcherza moczowego (obecność LF wykryto w moczu); <i>p.o.</i>	[82]
Myszy zdrowe	badania potwierdzające mechanizm przeciwnowotworowego działania LF: wytwarzanie IL-18, kaspazy 1 oraz IFN-γ w jelicie cienkim, wzrost liczby i aktywności komórek T CD4 ⁺ , CD8 ⁺ i NK oraz limfocytów B IgA ⁺ oraz IgM ⁺ w tkance limfatycznej jelita cienkiego oraz komórek T CD8 ⁺ w jelicie grubym, wzrost stężenia IL-18 oraz liczby limfocytów T i NK we krwi obwodowej; <i>p.o.</i>	[62]
Testy <i>in vitro</i> na limfocytach T z krwi obwodowej chorych z rakiem szyjki macicy oraz osób zdrowych	stymulacja ekspresji łańcucha ξ na powierzchni limfocytów T	[47]
Rak płaskonabłonkowy dna jamy ustnej u myszy	immunomodulacja oraz bezpośrednie cytotoksyczne działanie na komórki nowotworowe; iniekcja doguzowa	[143]
Mysi czerniak B16 i chłoniak L5178Y	hamowanie wzrostu guza <i>in situ</i> oraz hamowanie przerzutowania; <i>s.c.</i>	[149]
Linie komórek nowotworowych: włóknakiomięsaka MethA, czerniaka B16F10, raka okrężnicy C26 oraz wywodzące się z nich nowotwory u myszy	działanie cytotoksyczne objawiające się uszkodzeniem błony komórkowej i lizą komórek <i>in vitro</i> , rozległa krwotoczna nekroza i ograniczenie wielkości guzów <i>in vivo</i>	[35,146]
Linie komórek nowotworowych: raka piersi i raka okrężnicy	zwiększenie podatności komórek nowotworowych na cytotoksyczne działanie komórek NK	[29,30]
Ludzka nowotworowa linia monocytowa THP-1	indukcja apoptozy przez aktywację zależnych od Ca ²⁺ /Mg ²⁺ endonukleaz i wytwarzanie RFT	[148]
Ludzka linia komórek białaczki mieloidalnej HL-60	indukcja apoptozy	[109]
Nowotwór płuc u myszy	indukcja apoptozy; <i>p.o.</i>	[84]
Komórki ludzkiego raka szyjki macicy (HeLa)	indukcja apoptozy przez aktywację genu supresorowego P53 na drodze aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF-κB	[92]
Indukowane chemicznie nowotwory jelita grubego u szczurów	indukcja apoptozy przez ekspresję Fas i wzrost aktywności kaspazy 8 i 3; <i>p.o.</i>	[48,111,125]
Linia komórek raka sutka MDA-MB-231 i inne zmienione nowotworowo komórki nabłonkowe (HBL-10, MCF-7, HT-29)	zahamowanie proliferacji komórek nowotworowych przez zatrzymanie cyklu komórkowego na skutek zablokowania przejścia z fazy G1 do S, spadek poziomu kinaz CDK2, CDK4 i cykliny E, wzrost ekspresji inhibitora CDK4 – białka p21 (CIP1), utrzymywanie białka retinoblastoma pRb w hipofosforylowanej postaci	[28]

Tabela 1. (c.d.) Mechanizmy przeciwnowotworowego i chemioprewencyjnego działania LF

Rodzaj nowotworu	Droga podania i mechanizm działania LF	Piśmiennictwo
Chemicznie indukowany nowotwór płuc u myszy	Hamowanie proliferacji i indukcja apoptozy w komórkach nowotworowych; <i>p.o.</i>	[84]
Linia komórek ludzkiej białaczki promielocytowej HL-60	Hamowanie proliferacji i indukcja apoptozy w komórkach nowotworowych	[109]
Mysi czerniak B16 i chłoniak L5178Y	Redukcja wielkości guza pierwotnego, ilości związanych z guzem naczyń krwionośnych, zmniejszenie ilości przerzutów; hamowanie angiogenezy; <i>s.c.</i>	[149]
Szczury zdrowe i linia ludzkich komórek endotelialnych HUVEC	Testy potwierdzające angiostatyczne działanie LF: hamowanie proliferacji komórek śródbłonna naczyń, ograniczenie tworzenia sieci naczyń, skrócenie naczyń; <i>p.o.</i>	[90]
Myszy zdrowe i obarczone nowotworem (Lewis lung carcinoma) – model worka powietrznego na grzbiecie; test błon omocznioowo-kosmówkowych zarodków kurzych; testy <i>in vitro</i> na mysich komórkach endotelialnych	Hamowanie angiogenezy: hamowanie proliferacji komórek endotelium, stymulacja uwalniania IL-18 i IFN- γ ; <i>p.o.</i> , <i>i.p.</i>	[115]
Indukowane chemicznie nowotwory jelita grubego i wątroby szczurów	Hamowanie karcynogenezy na drodze supresji jednego z enzymów I fazy, redukcją aktywacji karcynogenu i tworzenia jego adduktów z DNA; <i>p.o.</i>	[49]
Indukowany chemicznie rak płaskonabłonkowy języka u szczurów	Hamowanie karcynogenezy przez zwiększenie aktywności enzymów II fazy; <i>p.o.</i>	[121]
Rak drobnokomórkowy płuc, rak sutka, rak głowy i szyi u myszy	Hamowanie rozwoju guzów; aktywacja odporności w jelicie i odporności systemowej (wzrost wytwarzania IL-18 w jelicie, wzrost liczby i aktywacja krążących limfocytów T i NK); <i>p.o.</i> w monoterapii i politerapii z cytostatykami	[2,129]
Przerzutujące i oporne na konwencjonalne leczenie guzy lite różnych narządów (niedrobnokomórkowy rak płuc, rak nerki, prostaty, piersi, jajnika, czerniak) u ludzi	Testy kliniczne I i II fazy; trwała odpowiedź, redukcja wzrostu guzów, wysoki odsetek stabilizacji choroby, wydłużenie czasu życia; wzrost stężeń IL-18 w osoczu; <i>p.o.</i> w monoterapii i politerapii z cytostatykami	[2,57]

redukcję wzrostu guza i wysoki odsetek stabilizacji choroby (ponad 80%). U pozostałych chorych zanotowano stabilizację choroby lub spadek współczynników wzrostu guza oraz wydłużenie czasu życia. Zaobserwowano wzrost stężeń IL-18 w osoczu (cytokiny uznawanej za farmakokinetyczny wskaźnik aktywności LF). Nie stwierdzono natomiast wykrywalnych ilości LF w osoczu [57]. Bardzo obiecujące wyniki pochodzą z badań przeprowadzonych u chorych z niedrobnokomórkowym rakiem płuc w IIIb i IV stadium zaawansowania choroby (nowotwory nieoperacyjne z powodu znacznego zaawansowania miejscowego lub obecności choroby uogólnionej). rHLF zastosowano doustnie w politerapii z karboplatiną i paklitakselem. Badania obejmujące 110 osób wykazały, że u większości chorych dodatek LF do terapii poprawił wszystkie badane wskaźniki choroby: współczynniki i czas odpowiedzi, trwanie odpowiedzi i czas wolny od progresji choroby [2].

PIŚMIENNICTWO

[1] Adamik B., Zimecki M., Wlaszczyk A., Berezowicz P., Kubler A.: Lactoferrin effects on the *in vitro* immune response in critically ill patients. Arch. Immunol. Ther. Exp., 1998; 46: 169–176

Badania obejmujące ponad 200 osób cierpiących na różne nowotwory wykazały bardzo dobrą tolerancję preparatu i brak jakichkolwiek działań niepożądanych [2,3,57,129].

Jak wskazują wyniki dotychczasowych badań, laktoferryryna jest skutecznym preparatem przeciwnowotworowym. Zarówno w monoterapii, jak i w połączeniu z lekami cytostatycznymi, może być skuteczna w profilaktyce i leczeniu chorób nowotworowych.

Ze względu na swoje właściwości, białko to może również znaleźć zastosowanie w leczeniu wspomagającym podczas chemio- i radioterapii, ograniczając ich ujemne skutki (m.in. skracając czas odnowy komórek hematopoetycznych po intensywnej chemioterapii i przeszczepie komórek hematopoetycznych, zmniejszając ryzyko i łagodząc przebieg infekcji, działając ochronnie na śluzówkę przewodu pokarmowego).

[2] Agennix. <http://www.agnix.com> (29.06.2006)

[3] Andersen J.H.: Technology evaluation: rh lactoferrin, Agennix. Curr. Opin. Mol. Ther., 2004; 6: 344–349

- [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] Artym J., Zimecki M.: The role of lactoferrin in the proper development of newborns. *Post. Hig. Med. Dosw.*, 2005; 59: 421–432
- [6] Baggolini M., De Duve C., Masson P.L., Heremans J.F.: Association of lactoferrin with specific granules in rabbit heterophil leukocytes. *J. Exp. Med.*, 1970; 131: 559–570
- [7] Becker J.C., Czerny C., Brocker E.B.: Maintenance of clonal anergy by endogenously produced IL-10. *Int. Immunol.*, 1994; 6: 1605–1612
- [8] Bellamy W.T., Richter L., Frutiger Y., Grogan T.M.: Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in hematopoietic malignancies. *Cancer Res.*, 1999; 59: 728–733
- [9] Benaissa M., Peyrat J.P., Hornez L., Mariller C., Mazurier J., Pierce A.: Expression and prognostic value of lactoferrin mRNA isoforms in human breast cancer. *Int. J. Cancer*, 2005; 114: 299–306
- [10] Bennett R.M., Davis J.: Lactoferrin binding to human peripheral blood cells: an interaction with a B-enriched population of lymphocytes and a subpopulation of adherent mononuclear cells. *J. Immunol.*, 1981; 127: 1211–1216
- [11] Bennett R.M., Eddie-Quarley A.C., Holt P.J.: Lactoferrin – an iron binding protein in synovial fluid. *Arthritis Rheum.*, 1973; 16: 186–190
- [12] Bennett R.M., Mohla C.: A solid-phase radioimmunoassay for the measurement of lactoferrin in human plasma: variations with age, sex, and disease. *J. Lab. Clin. Med.*, 1976; 88: 156–166
- [13] Bergers G., Javaherian K., Lo K.M., Folkman J., Hanahan D.: Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice. *Science*, 1999; 284: 808–812
- [14] Bezaul J., Bhimani R., Wiprovnick J., Furmansk P.: Human lactoferrin inhibits growth of solid tumors and development of experimental metastases in mice. *Cancer Res.*, 1994; 54: 2310–2312
- [15] Bikfalvi A., Han Z.C.: Angiogenic factors are hematopoietic growth factors and vice versa. *Leukemia*, 1994; 8: 523–529
- [16] Bingliang F., Roth J.A.: Gene therapy using direct *in vivo* gene injection. W: Principles and practice of the biologic therapy of cancer, red.: S.A. Rosenberg. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2000; 796
- [17] Bounias M., Kladny J., Kruk I., Michalska T., Lichszeld K.: Effects of catechols on free radical formation by chemotherapeutic agents (adriamycin, farmorubicin, and mitomycin). *Cancer Detect. Prev.*, 1997; 21: 553–562
- [18] Boxer L.A., Haak R.A., Yang H.H., Wolach J.B., Whitcomb J.A., Butterick C.J., Baehner R.L.: Membrane-bound lactoferrin alters the surface properties of polymorphonuclear leukocytes. *J. Clin. Invest.*, 1982; 70: 1049–1057
- [19] Brem S.: Angiogenesis and cancer control: from concept to therapeutic trial. *Cancer Control*, 1999; 6: 436–458
- [20] Brem S.S., Gullino P.M., Medina D.: Angiogenesis: a marker for neoplastic transformation of mammary papillary hyperplasia. *Science*, 1977; 195: 880–882
- [21] Breton M., Mariller C., Benaissa M., Caillaux K., Browaeys E., Masson M., Vilain J.P., Mazurier J., Pierce A.: Expression of delta-lactoferrin induces cell cycle arrest. *Biomaterials*, 2004; 17: 325–329
- [22] Britigan B.E., Serody J.S., Hayek M.B., Charniga L.M., Cohen M.S.: Uptake of lactoferrin by mononuclear phagocytes inhibits their ability to form hydroxyl radical and protects them from membrane auto-oxidation. *J. Immunol.*, 1991; 147: 4271–4277
- [23] Buler R.E.: A phase I study of gene therapy with recombinant intraperitoneal p53 i recurrent ovarian cancer. *Cancer Gene Ther.*, 1998; 5: S25
- [24] Byrd T.F., Horwitz M.A.: Lactoferrin inhibits or promotes Legionella pneumophila intracellular multiplication in nonactivated and interferon gamma-activated human monocytes depending upon its degree of iron saturation. Iron-lactoferrin and nonphysiologic iron chelates reverse monocyte activation against Legionella pneumophila. *J. Clin. Invest.*, 1991; 88: 1103–1112
- [25] Campbell T., Skilton R.A., Coombes R.C., Shousha S., Graham M.D., Luqmani Y.A.: Isolation of a lactoferrin cDNA clone and its expression in human breast cancer. *Br. J. Cancer*, 1992; 65: 19–26
- [26] Cao R., Farnebo J., Kurimoto M., Cao Y.: Interleukin-18 acts as an angiogenesis and tumor suppressor. *FASEB J.*, 1999; 13: 2195–2202
- [27] Coughlin C.M., Salhany K.E., Wysocka M., Aruga E., Kurazawa H., Chang A.E., Hunter C.A., Fox J.C., Trinchieri G., Lee W.M.: Interleukin-12 and interleukin-18 synergistically induce murine tumor regression which involves inhibition of angiogenesis. *J. Clin. Invest.*, 1998; 101: 1441–1452
- [28] Damiens E., El Yazidi I., Mazurier J., Duthille I., Spik G., Boilly-Marier Y.: Lactoferrin inhibits G1 cyclin-dependent kinases during growth arrest of human breast carcinoma cells. *J. Cell. Biochem.*, 1999; 74: 486–498.
- [29] Damiens E., El Yazidi I., Mazurier J., Ellass-Rochard E., Duthille I., Spik G., Boilly-Marier Y.: Role of heparan sulphate proteoglycans in the regulation of human lactoferrin binding and activity in the MDA-MB-231 breast cancer cell line. *Eur. J. Cell Biol.*, 1998; 77: 344–351
- [30] Damiens E., Mazurier J., el Yazidi I., Masson M., Duthille I., Spik G., Boilly-Marier Y.: Effects of human lactoferrin on NK cell cytotoxicity against haematopoietic and epithelial tumour cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1998; 1402: 277–287
- [31] 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
- [32] Dhennin-Duthille I., Masson M., Damiens E., Fillebeen C., Spik G., Mazurier J.: Lactoferrin upregulates the expression of CD4 antigen through the stimulation of the mitogen-activated protein kinase in the human lymphoblastic T Jurkat cell line. *J. Cell. Biochem.*, 2000; 79: 583–593
- [33] Duthille I., Masson M., Spik G., Mazurier J.: Lactoferrin stimulates the mitogen-activated protein kinase in the human lymphoblastic T Jurkat cell line. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1998; 443: 257–260
- [34] Eda S., Kikugawa K., Beppu M.: Characterization of lactoferrin-binding proteins of human macrophage membrane: multiple species of lactoferrin-binding proteins with polylactosamine-binding ability. *Biol. Pharm. Bull.*, 1997; 20: 127–133
- [35] 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 lactoferricin. *Anticancer Res.*, 2002; 22: 2703–2710
- [36] 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
- [37] Ferrara N.: Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 1999; 237: 1–30
- [38] Ferrara N., Alitalo K.: Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat. Med.*, 1999; 5: 1359–1364
- [39] Fillebeen C., Descamps L., Dehouck M.P., Fenart L., Benaissa M., Spik G., Cecchetti R., Pierce A.: Receptor-mediated transcytosis of lactoferrin through the blood-brain barrier. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 7011–7017
- [40] Folkman J.: Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.*, 1995; 1: 27–31
- [41] Folkman J.: Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.*, 1971; 285: 1182–1186
- [42] Folkman J.: What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J. Natl. Cancer Inst.*, 1990; 82: 4–6
- [43] Folkman J., Klagsbrun M.: Angiogenic factors. *Science*, 1987; 235: 442–447
- [44] Frydecka I., Cieślńska A.: Stan immunologiczny chorego na chorobę nowotworową. W: Chemioterapia nowotworów, red.: K. Orzechowska-Juzwenko. PZWL, Warszawa 1990, 86–94
- [45] Frydecka I., Kaczmarek P., Bocko D., Kosmaczewska A., Ciszak L.: Alterations in signal transducing molecule CD3 zeta in patients with neoplastic diseases. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1998; 46: 355–359
- [46] Frydecka I., Kaczmarek P., Bocko D., Kosmaczewska A., Morilla R., Catovsky D.: Expression of signal-transducing zeta chain in peripheral blood T cells and natural killer cells in patients with Hodgkin's disease in different phases of the disease. *Leuk. Lymphoma*, 1999; 35: 545–554
- [47] Frydecka I., Zimecki M., Bocko D., Kosmaczewska A., Teodorowska R., Ciszak L., Kruzel M., Włodarska-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
- [48] Fujita K., Matsuda E., Sekine K., Iigo M., Tsuda H.: Lactoferrin enhances Fas expression and apoptosis in the colon mucosa of azoxymethane-treated rats. *Carcinogenesis*, 2004; 25: 1961–1966
- [49] Fujita K., Ohnishi T., Sekine K., Iigo M., Tsuda H.: Down-regulation of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx)-induced CYP1A2 expression is associated with bovine lactoferrin inhibition of MeIQx-induced liver and colon carcinogenesis in rats. *Jpn. J. Cancer Res.*, 2002; 93: 616–625
- [50] Furmansk P., Li Z.P., Fortuna M.B., Swamy C.V., Das M.R.: Multiple molecular forms of human lactoferrin. Identification of a class of lactoferrins that possess ribonuclease activity and lack iron-binding capacity. *J. Exp. Med.*, 1989; 170: 415–429

- [51] Gahr M., Speer C.P., Damerou B., Sawatzki G.: Influence of lactoferrin on the function of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *J. Leukoc. Biol.*, 1991; 49: 427–433
- [52] Gomez D.E., Skilton G., Alonso D.F., Kazanietz M.G.: The role of protein kinase C and novel phorbol ester receptors in tumor cell invasion and metastasis. *Oncol. Rep.*, 1999; 6: 1363–1370
- [53] Grant D.J., Shi H., Teng C.T.: Tissue and site-specific methylation correlates with expression of the mouse lactoferrin gene. *J. Mol. Endocrinol.*, 1999; 23: 45–55
- [54] Gromadzińska J., Wąsowicz W.: The role of reactive oxygen species in the development of malignancies. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health*, 2000; 13: 233–245
- [55] Hansen N.E., Karle H., Andersen V., Malmquist J., Hoff G.E.: Neutrophilic granulocytes in acute bacterial infection. Sequential studies on lysozyme, myeloperoxidase and lactoferrin. *Clin. Exp. Immunol.*, 1976; 26: 46346–46348
- [56] Harmon R.J., Schanbacher F.L., Ferguson L.C., Smith K.L.: Changes in lactoferrin, immunoglobulin G, bovine serum albumin, and alpha-lactalbumin during acute experimental and natural coliform mastitis in cows. *Infect. Immun.*, 1976; 13: 533–542
- [57] Hayes T.G., Falchook G.F., Varadhachary G.R., Smith D.P., Davis L.D., Dhingra H.M., Hayes B.P., Varadhachary A.: Phase I trial of oral lactoferrin alfa in refractory solid tumors. *Invest. New Drugs*, 2006; 24: 233–240
- [58] Hendrixon D.R., Qiu J., Shewry S.C., Fink D.L., Petty S., Baker E.N., Plaut A.G., St Geme J.W. III: Human milk lactoferrin is a serine protease that cleaves Haemophilus surface proteins at arginine-rich sites. *Mol. Microbiol.*, 2003; 47: 607–617
- [59] Horwitz D.A., Bakke A.C., Abo W., Nishiya K.: Monocyte and NK cell cytotoxic activity in human adherent cell preparations: discriminating effects of interferon and lactoferrin. *J. Immunol.*, 1984; 132: 2370–2374
- [60] Hu W.L., Mazurier J., Sawatzki G., Montreuil J., Spik G.: Lactotransferrin receptor of mouse small-intestinal brush border. Binding characteristics of membrane-bound and triton X-100-solubilized forms. *Biochem. J.*, 1988; 249: 435–441
- [61] 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
- [62] Iigo M., Shimamura M., Matsuda E., Fujita K., Nomoto H., Satoh J., Kojima S., Alexander D.B., Moore M.A., Tsuda H.: Orally administered bovine lactoferrin induces caspase-1 and interleukin-18 in the mouse intestinal mucosa: a possible explanation for inhibition of carcinogenesis and metastasis. *Cytokine*, 2004; 25: 36–44
- [63] 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
- [64] Ishikado A., Imanaka H., Kotani M., Fujita A., Mitsuishi Y., Kanemitsu T., Tamura Y., Makino T.: Liposomal lactoferrin induced significant increase of the interferon-alpha (IFN-alpha) producibility in healthy volunteers. *Biofactors*, 2004; 21: 69–72
- [65] Khushi F.R., Sabichi A.L., Ki Hong W., Lippman S.M.: Chemioprewencja nowotworów. W: Podręcznik onkologii klinicznej, red.: J. Pawlega. Wydawnictwo Przegląd Lekarski, Kraków 2001, 163–176
- [66] Kiessling R., Wasserman K., Horiguchi S., Kono K., Sjöberg J., Pisa P., Petersson M.: Tumor-induced immune dysfunction. *Cancer Immunol. Immunother.*, 1999; 48: 353–362
- [67] Kim W.S., Ohashi M., Tanaka T., Kumura H., Kim G.Y., Kwon I.K., Goh J.S., Shimazaki K.: Growth-promoting effects of lactoferrin on *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Biomaterials*, 2004; 17: 279–283
- [68] Kono K., Rensing M.E., Brandt R.M., Melief C.J., Potkul R.K., Andersson B., Petersson M., Kast W.M., Kiessling R.: Decreased expression of signal-transducing zeta chain in peripheral T cells and natural killer cells in patients with cervical cancer. *Clin. Cancer Res.*, 1996; 2: 1825–1828
- [69] Kono K., Salazar-Onfray F., Petersson M., Hansson J., Masucci G., Wasserman K., Nakazawa T., Anderson P., Kiessling R.: Hydrogen peroxide secreted by tumor-derived macrophages down-modulates signal-transducing zeta molecules and inhibits tumor-specific T cell- and natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.*, 1996; 26: 1308–1313
- [70] Kroesen B.J., Janssen R.A., Buter J., Nieken J., Sleijfer D.T., Mulder N.H., De Leij L.: Bispecific monoclonal antibodies for intravenous treatment of carcinoma patients: immunobiologic aspects. *J. Hematother.*, 1995; 4: 409–414
- [71] Kuhara T., Iigo M., Itoh T., Ushida Y., Sekine K., Terada N., Okamura H., Tsuda H.: Orally administered lactoferrin exerts an antimetastatic effect and enhances production of IL-18 in the intestinal epithelium. *Nutr. Cancer*, 2000; 38: 192–199
- [72] Kurose I., Yamada T., Wolf R., Granger D.N.: P-selectin-dependent leukocyte recruitment and intestinal mucosal injury induced by lactoferrin. *J. Leukoc. Biol.*, 1994; 55: 771–777
- [73] Lima M.F., Kierszenbaum F.: Lactoferrin effects on phagocytic cell function. II. The presence of iron is required for the lactoferrin molecule to stimulate intracellular killing by macrophages but not to enhance the uptake of particles and microorganisms. *J. Immunol.*, 1987; 139: 1647–1651
- [74] 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
- [75] Longhi C., Conte M.P., Seganti L., Polidoro M., Alfsen A., Valenti P.: Influence of lactoferrin on the entry process of *Escherichia coli* HB101 (pRI203) in HeLa cells. *Med. Microbiol. Immunol.*, 1993; 182: 25–35
- [76] Lonnerdal B., Iyer S.: Lactoferrin: molecular structure and biological function. *Annu. Rev. Nutr.*, 1995; 15: 93–110
- [77] Lorincz M.C., Groudine M.: C(m)C(a)tGG methylation: a new epigenetic mark in mammalian DNA? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001; 98: 10034–10036
- [78] Macmillan-Crow L.A., Cruthirds D.L.: Invited review: manganese superoxide dismutase in disease. *Free Radic. Res.*, 2001; 34: 325–336
- [79] Madej G.: Podstawy chemioterapii nowotworów. W: Chemioterapia onkologiczna dorosłych i dzieci, red.: G. Madej. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1999; 13–38
- [80] Malmquist J., Thorell J.L., Wolheim F.A.: Lactoferrin and lysozyme in arthritic exudates. *Acta Med. Scand.*, 1977; 202: 313–318
- [81] Mason D.Y., Taylor C.R.: Distribution of transferrin, ferritin, and lactoferrin in human tissues. *J. Clin. Pathol.*, 1978; 31: 316–327
- [82] Masuda C., Wanibuchi H., Sekine K., Yano Y., Otani S., Kishimoto T., Tsuda H., Fukushima S.: Chemopreventive effects of bovine lactoferrin on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced rat bladder carcinogenesis. *Jpn. J. Cancer Res.*, 2000; 91: 582–588
- [83] Matsuda M., Petersson M., Lenkei R., Taupin J.L., Magnusson I., Mellstedt H., Anderson P., Kiessling R.: Alterations in the signal-transducing molecules of T cells and NK cells in colorectal tumor-infiltrating, gut mucosal and peripheral lymphocytes: correlation with the stage of the disease. *Int. J. Cancer*, 1995; 61: 765–772
- [84] Matsuda Y., Saoo K., Hosokawa K., Yamakawa K., Yokohira M., Zeng Y., Takeuchi H., Imada K.: Post-initiation chemopreventive effects of dietary bovine lactoferrin on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung tumorigenesis in female A/J mice. *Cancer Lett.*, 2006 (w druku)
- [85] Mazur G.: Immunologiczne aspekty chemioterapii nowotworów. W: Zarys chemioterapii nowotworów narządowych i układowych, red.: K. Orzechowska-Juzwenko. Volumed, Wrocław 2000; 111–135
- [86] Mitelman F., Mertens F., Johansson B.: A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. *Nat. Genet.*, 1997; 15: 417–474
- [87] Miyauchi H., Hashimoto S., Nakajima M., Shinoda I., Fukuwatari Y., Hayasawa H.: Bovine lactoferrin stimulates the phagocytic activity of human neutrophils: identification of its active domain. *Cell. Immunol.*, 1998; 187: 34–37
- [88] Mori M., Ninomiya T., Okada Y., Tsukitani K.: Myoepitheliomas and myoepithelial adenomas of salivary gland origin. Immunohistochemical evaluation of filament proteins, S-100 alpha and beta, glial fibrillary acidic proteins, neuron-specific enolase, and lactoferrin. *Pathol. Res. Pract.*, 1989; 184: 168–178
- [89] Mule J.J., Schwarz S.L., Roberts A.B., Sporn M.B., Rosenberg S.A.: Transforming growth factor-beta inhibits the *in vitro* generation of lymphokine-activated killer cells and cytotoxic T cells. *Cancer Immunol. Immunother.*, 1988; 26: 95–100
- [90] Norrby K., Mattsby-Baltzer I., Innocenti M., Tuneberg S.: Orally administered bovine lactoferrin systemically inhibits VEGF(165)-mediated angiogenesis in the rat. *Int. J. Cancer*, 2001; 91: 236–240
- [91] O'Byrne K.J., Dalglish A.G.: Chronic immune activation and inflammation as the cause of malignancy. *Br. J. Cancer*, 2001; 85: 473–483
- [92] Oh S.M., Pyo C.W., Kim Y., Choi S.Y.: Neutrophil lactoferrin upregulates the human p53 gene through induction of NF-kappaB activation cascade. *Oncogene*, 2004; 23: 8282–8291

- [93] Oliński R., Jurgowiak M.: The role of reactive oxygen species in mutagenesis and carcinogenesis processes. *Post. Biochem.*, 1999; 45: 50–58
- [94] Oram J.D., Reiter B.: Inhibition of bacteria by lactoferrin and other iron-chelating agents. *Biochim. Biophys. Acta*, 1968; 170: 351–365
- [95] O'Reilly M.S., Holmgren L., Shing Y., Chen C., Rosenthal R.A., Moses M., Lane W.S., Cao Y., Sage E.H., Folkman J.: Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell*, 1994; 79: 315–328
- [96] O'Reilly M.S., Pirie-Shepherd S., Lane W.S., Folkman J.: Antiangiogenic activity of the cleaved conformation of the serpin antithrombin. *Science*, 1999; 285: 1926–1928
- [97] Orsi N.: The antimicrobial activity of lactoferrin: current status and perspectives. *Biometals*, 2004; 17: 189–196
- [98] Oseas R., Yang H.H., Baehner R.L., Boxer L.A.: Lactoferrin: a promoter of polymorphonuclear leukocyte adhesiveness. *Blood*, 1981; 57: 939–945
- [99] Panella T.J., Liu Y.H., Huang A.T., Teng C.T.: Polymorphism and altered methylation of the lactoferrin gene in normal leukocytes, leukemic cells, and breast cancer. *Cancer Res.*, 1991; 51: 3037–3043
- [100] Petschow B.W., Talbott R.D.: Response of bifidobacterium species to growth promoters in human and cow milk. *Pediatr. Res.*, 1991; 29: 208–213
- [101] Petschow B.W., Talbott R.D., Batema R.P.: Ability of lactoferrin to promote the growth of *Bifidobacterium spp. in vitro* is independent of receptor binding capacity and iron saturation level. *J. Med. Microbiol.*, 1999; 48: 541–549
- [102] 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. Cell Biol.*, 1998; 30: 1055–1062
- [103] Puren A.J., Razeghi P., Fantuzzi G., Dinarello C.A.: Interleukin-18 enhances lipopolysaccharide-induced interferon-gamma production in human whole blood cultures. *J. Infect. Dis.*, 1998; 178: 1830–1834
- [104] Quilitz R.: Thalidomide in oncology: the peril and the promise. *Cancer Control*, 1999; 6: 483–495
- [105] Rado T.A., Bollekens J., St Laurent G., Parker L., Benz E.J. Jr.: Lactoferrin biosynthesis during granulocytopenia. *Blood*, 1984; 64: 1103–1109
- [106] Rado T.A., Wei X.P., Benz E.J. Jr.: Isolation of lactoferrin cDNA from a human myeloid library and expression of mRNA during normal and leukemic myelopoiesis. *Blood*, 1987; 70: 989–993
- [107] Radzikowski C., Opolski A., Wietrzyk J.: Znaczenie angiogenezy w dynamice wzrostu nowotworu. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 1998; 52: 553–576
- [108] Razin A., Cedar H.: DNA methylation and gene expression. *Microbiol. Rev.*, 1991; 55: 451–458
- [109] Roy M.K., Kuwabara Y., Hara K., Watanabe Y., Tamai Y.: Peptides from the N-terminal end of bovine lactoferrin induce apoptosis in human leukemic (HL-60) cells. *J. Dairy Sci.*, 2002; 85: 2065–2074
- [110] Sato K., Shimoto H., Tanimoto M., Dosako S., Nakajima I.: Uptake and re-secretion of human lactoferrin by B lymphocytes. *Agric. Biol. Chem.*, 1990; 54: 1275–1280
- [111] Sekine K., Ushida Y., Kuhara T., Iigo M., Baba-Toriya H., Moore M.A., Murakoshi M., Satomi Y., Nishino H., Kakizoe T., Tsuda H.: Inhibition of initiation and early stage development of aberrant crypt foci and enhanced natural killer activity in male rats administered bovine lactoferrin concomitantly with azoxymethane. *Cancer Lett.*, 1997; 121: 211–216
- [112] Sfeir R.M., Dubarry M., Boyaka P.N., Rautureau M., Tome D.: The mode of oral bovine lactoferrin administration influences mucosal and systemic immune responses in mice. *J. Nutr.*, 2004; 134: 403–439
- [113] Shau H., Kim A., Golub S.H.: Modulation of natural killer and lymphokine-activated killer cell cytotoxicity by lactoferrin. *J. Leukoc. Biol.*, 1992; 51: 343–349
- [114] Shaughnessy S.G., Buchanan M.R., Turple S., Richardson M., Orr F.W.: Walker carcinosarcoma cells damage endothelial cells by the generation of reactive oxygen species. *Am. J. Pathol.*, 1989; 134: 787–796
- [115] 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
- [116] Shimizu H.: Development of an enteric-coated lactoferrin tablet and its application. *Biometals*, 2004; 17: 343–347
- [117] Siebert P.D., Huang B.C.: Identification of an alternative form of human lactoferrin mRNA that is expressed differentially in normal tissues and tumor-derived cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997; 94: 2198–2203
- [118] Singh P.K., Parsek M.R., Greenberg E.P., Welsh M.J.: A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature*, 2002; 417: 552–555
- [119] Sorimachi K., Akimoto K., Hattori Y., Ieiri T., Niwa A.: Activation of macrophages by lactoferrin: secretion of TNF-alpha, IL-8 and NO. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 1997; 43: 79–87
- [120] Szuster-Ciesielska A., Kaminska T., Kandefer-Szerszen M.: Phagocytosis-enhancing effect of lactoferrin on bovine peripheral blood monocytes *in vitro* and *in vivo*. *Arch. Vet. Pol.*, 1995; 35: 63–71
- [121] Tanaka T., Kawabata K., Kohno H., Honjo S., Murakami M., Ota T., Tsuda H.: Chemopreventive effect of bovine lactoferrin on 4-nitroquinoline 1-oxide-induced tongue carcinogenesis in male F344 rats. *Jpn. J. Cancer Res.*, 2000; 91: 25–33
- [122] Teng C., Gladwell W., Raphiou I., Liu E.: Methylation and expression of the lactoferrin gene in human tissues and cancer cells. *Biometals*, 2004; 17: 317–323
- [123] Tsuda H., Ohshima Y., Nomoto H., Fujita K., Matsuda E., Iigo M., Takasuka N., Moore M.A.: Cancer prevention by natural compounds. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 2004; 19: 245–263
- [124] Tsuda H., Sekine K., Fujita K., Iigo M.: Cancer prevention by bovine lactoferrin and underlying mechanisms – a review of experimental and clinical studies. *Biochem. Cell Biol.*, 2002; 80: 131–136
- [125] Tsuda H., Sekine K., Ushida Y., Kuhara T., Takasuka N., Iigo M., Han B.S., Moore M.A.: Milk and dairy products in cancer prevention: focus on bovine lactoferrin. *Mutat. Res.*, 2000; 462: 227–233
- [126] Tuccari G., Barresi G., Arena F., Inferrera C.: Immunocytochemical detection of lactoferrin in human gastric carcinomas and adenomas. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 1989; 113: 912–915
- [127] Ushida Y., Sekine K., Kuhara T., Takasuka N., Iigo M., Maeda M., Tsuda H.: Possible chemopreventive effects of bovine lactoferrin on esophagus and lung carcinogenesis in the rat. *Jpn. J. Cancer Res.*, 1999; 90: 262–267
- [128] Ushida Y., Sekine K., Kuhara T., Takasuka N., Iigo M., Tsuda H.: Inhibitory effects of bovine lactoferrin on intestinal polyposis in the Apc(Min) mouse. *Cancer Lett.*, 1998; 134: 141–145
- [129] Varadhachary A., Wolf J.S., Petrak K., O'Malley B.W.Jr., Spadaro M., Curcio C., Forni G., Pericle F.: Oral lactoferrin inhibits growth of established tumors and potentiates conventional chemotherapy. *Int. J. Cancer*, 2004; 111: 398–403
- [130] Vogel T., Guo N.H., Guy R., Drezlich N., Krutzsch H.C., Blake D.A., Panet A., Roberts D.D.: Apolipoprotein E: a potent inhibitor of endothelial and tumor cell proliferation. *J. Cell. Biochem.*, 1994; 54: 299–308
- [131] Volpert O.V., Dameron K.M., Bouck N.: Sequential development of an angiogenic phenotype by human fibroblasts progressing to tumorigenicity. *Oncogene*, 1997; 14: 1495–1502
- [132] Vorland L.H.: Lactoferrin: a multifunctional glycoprotein. *APMIS*, 1999; 107: 971–981
- [133] Vulimiri S.V., Digiovanni J.: Karcynogeneza. W: Podręcznik onkologii klinicznej, red.: J. Pawłega. Wydawnictwo Przegląd Lekarski, Kraków 2001; 21–46
- [134] Wakabayashi H., Kuwata H., Yamauchi K., Teraguchi S., Tamura Y.: No detectable transfer of dietary lactoferrin or its functional fragments to portal blood in healthy adult rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2004; 68: 853–860
- [135] Walmer D.K., Padin C.J., Wrona M.A., Healy B.E., Bentley R.C., Tsao M.S., Kohler M.F., McLachlan J.A., Gray K.D.: Malignant transformation of the human endometrium is associated with overexpression of lactoferrin messenger RNA and protein. *Cancer Res.*, 1995; 55: 1168–1175
- [136] 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
- [137] Wattenberg L.W.: An overview of chemoprevention: current status and future prospects. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1997; 216: 133–141
- [138] Weinberg E.D.: Human lactoferrin: a novel therapeutic with broad spectrum potential. *J. Pharm. Pharmacol.*, 2001; 53: 1303–1310
- [139] Weinberg E.D.: Iron in neoplastic disease. *Nutr. Cancer*, 1983; 4: 223–233
- [140] Weinberg E.D.: The role of iron in cancer. *Eur. J. Cancer Prev.*, 1996; 5: 19–36

- [141] Whiteside T.L.: Signaling defects in T lymphocytes of patients with malignancy. *Cancer Immunol. Immunother.*, 1999; 48: 346–352
- [142] Właszczuk A., Zimecki M., Adamik B., Durek G., Kubler A.: Immunological status of patients subjected to cardiac surgery: effect of lactoferrin on proliferation and production of interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha by peripheral blood mononuclear cells *in vitro*. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1997; 45: 201–212
- [143] Wolf J.S., Li D., Taylor R.J., O'Malley B.W.Jr.: Lactoferrin inhibits growth of malignant tumors of the head and neck. *ORL J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec.*, 2003; 65: 245–249
- [144] Xia F., Wang X., Wang Y.H., Tsang N.M., Yandell D.W., Kelsey K.T., Liber H.L.: Altered p53 status correlates with differences in sensitivity to radiation-induced mutation and apoptosis in two closely related human lymphoblast lines. *Cancer Res.*, 1995; 55: 12–15
- [145] Yamauchi K., Wakabayashi H., Hashimoto S., Teraguchi S., Hayasawa H., Tomita M.: Effects of orally administered bovine lactoferrin on the immune system of healthy volunteers. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1998; 443: 261–265
- [146] 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
- [147] Yang Y., Kiss H., Kost-Alimova M., Kedra D., Fransson I., Seroussi E., Li J., Szeles A., Kholodnyuk I., Imreh M.P., Fodor K., Hadlaczky G., Klein G., Dumanski J.P., Imreh S.: A 1-Mb PAC contig spanning the common eliminated region 1 (CER1) in microcell hybrid-derived SCID tumors. *Genomics*, 1999; 62: 147–155
- [148] Yoo Y.C., Watanabe R., Koike Y., Mitobe M., Shimazaki K., Watanabe S., Azuma I.: Apoptosis in human leukemic cells induced by lactoferricin, a bovine milk protein-derived peptide: involvement of reactive oxygen species. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997; 237: 624–628
- [149] Yoo Y.C., Watanabe S., Watanabe R., Hata K., Shimazaki K., Azuma I.: Bovine lactoferrin and lactoferricin inhibit tumor metastasis in mice. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1998; 443: 285–291
- [150] Zebrak J., Herman T., Werys R., Pryjma J., Gawel J.: Proteins in bronchial secretion of children with chronic pulmonary diseases. II. Relation to bronchoscopic and bronchographic examination. *Scand. J. Respir. Dis.*, 1979; 60: 69–75
- [151] Zimecki M., Artym J.: Therapeutic properties of proteins and peptides from colostrum and milk. *Post. Hig. Med. Dosw.*, 2005; 59: 309–323
- [152] 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
- [153] 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
- [154] 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
- [155] Zimecki M., Miedzybrodzki R., Mazurier J., Spik G.: Regulatory effects of lactoferrin and lipopolysaccharide on LFA-1 expression on human peripheral blood mononuclear cells. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1999; 47: 257–264