

# Laktoferyna – białko multipotencjalne

JOANNA MAŁACZEWSKA, ZOFIA ROTKIEWICZ

Zespół Mikrobiologii i Immunologii Klinicznej Katedry Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych  
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM, ul. Oczapowskiego 13, 10-719 Olsztyn

Małaczewska J., Rotkiewicz Z.

## Lactoferrin – a multipotential protein

### Summary

Lactoferrin is an iron-binding protein from the transferrin family and was first isolated from milk. Lactoferrin is produced by polymorph nuclear leukocytes and epithelial cells of many mammalian species and is present in such mucosal secretions as tears, saliva, seminal and vaginal fluids as well as in several organs and blood. Many biological functions of lactoferrin have been identified: iron absorption, bacteriostatic, bactericidal, fungicidal, antiviral, antiparasitic and antitumour activities. It is also well known for its immunomodulatory and anti-inflammatory properties. Additionally, lactoferrin is thought to possess protease, ribonuclease, procoagulant and transcription factor activities. Nowadays bovine lactoferrin is isolated and purified on an industrial scale and used for food preservation and production of infant formulas, yogurt, skim milk, chewing gum, cosmetic formulas, nutritional supplements and therapeutic supplements for pets. The use of lactoferrin as an immunostimulator is a promising area especially in the case of patients with immunosuppression.

**Keywords:** lactoferrin

Laktoferyna (LF) jest glikoproteiną wiążącą żelazo, należąca, obok transferyny surowiczej i owotransferyny, do rodziny transferyn. Po raz pierwszy obecność LF stwierdzono w mleku, a do tej pory wykryto ją w wielu narządach (nerki, pęcherzyk żółciowy, płuca, trzustka, prostata, pęcherzyki nasienne, jelita, wątroba), w błonach surowiczych i ich wydzielinach (wytworzana przez komórki epitelialne), w siarce, ślinie, łzach, nasieniu, wydzielinie pochwy, płynie maziówkowym, a także w drugorzędowych ziarnistościach granulocytów obojętnochłonnych ssaków. W niskich stężeniach obecna jest także w osoczu krwi, dokąd dostaje się w wyniku spontanicznego uwolnienia z granulocytów. Poziom LF w osoczu ulega znacznemu wzrostowi w stanach zapalnych i schorzeniach tła zakaźnego (z 0,2 do 200  $\mu\text{g/ml}$ ), zaś drastycznie spada u chorych z objawami AIDS. W terminalnym stadium AIDS spadek ten skorelowany jest w czasie ze zwiększoną wrażliwością chorych na zakażenia oportunistyczne. Laktoferyna wydzielana jest również przez gruczoły błony śluzowej szyjki macicy. Jej stężenie w wydzielinie pochwy waha się znacznie (nawet 20-krotnie) w różnych fazach cyklu. Poziom LF nie ulega zmianom jedynie u kobiet stosujących hormonalną antykoncepcję, co sugeruje hormonalną kontrolę jej poziomu w drogach rodnych. Podobnie koncentracja LF w mleku ssaków jest zmienna i zależy od fazy laktacji. Poziom LF w dojrzalym mleku ulega w czasie trwania laktacji 7-krotnemu spadkowi w porównaniu z poziomem notowanym w siarce. Jak dotąd nie stwierdzono obecności tego białka w mleku psów i szczurów (1, 11, 12, 18, 19, 28, 29).

Laktoferyna jest monomerycznym, dodatnio naładowanym białkiem o masie cząsteczkowej 80 kDa, zbudowanym z 692 aminokwasów. Złożona jest z pojedynczego łańcucha polipeptydowego zwiniętego w dwa kuliste płaty (N- i C-), połączone regionem zawiasowym. Każdy płat laktoferyny jest zdolny do wiązania jednego atomu pierwiastka z grupy metali. Najczęściej przyłączanymi jonami są  $\text{Fe}^{2+}$  lub  $\text{Fe}^{3+}$ , ale opisywano również wiązanie jonów  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ . Laktoferyna może występować w dwóch formach: apo- (wolnej) i holo- (związanej z jonami pierwiastków z grupy metali), przy czym w stanie naturalnym w organizmie zwykle jest tylko częściowo wysycona żelazem (w 15-20%). Szczególnie ważnym fragmentem LF, ze względu na jego zdolność do wchodzenia w interakcje ze strukturami powierzchniowymi komórek organizmu, bakterii, grzybów, jak też cząsteczek wirusowych, jest jej dodatnio naładowany N-końcowy fragment. Laktoferyny izolowane od różnych gatunków ssaków wykazują wysoki stopień homologii budowy (6, 23, 28).

Nadmiar LF jest szybko usuwany z krążenia głównie przez makrofagi i monocyty. Komórki te posiadają receptory o wysokim powinowactwie, dzięki którym przekształcają związane z LF żelazo w ferrytynę. Zjawisku temu towarzyszy rozkład LF. Badania farmakokinetyczne przeprowadzone na myszach i szczurach wykazały szybki wychwyty laktoferyny z krwi przez wątrobę, za co odpowiedzialne są zarówno hepatocyty, jak i komórki Kupfera. Jednakże podawanie wysokich dawek tego białka skutkowało utrzymaniem się podwyższonego poziomu LF w płazmie krwi. Dodatkowo

obserwowano wiązanie laktoferyny z naczyniowym endothelium, a niskie stężenia tego białka wykrywano w układzie limfatycznym. Laktoferyna ma zdolność wiązania z kilkoma różnymi receptorami błon komórkowych: receptorem 105 kDa, glikozaminoglikanami (siarczan heparyny, siarczan chondroityny), receptorem dla reszt LDL (Low Density Lipoprotein) i podjednostką 45 kDa receptora asialoglikoproteinowego (9, 10, 17, 19, 21, 28).

Nie da się przecenić roli, jaką odgrywa w organizmie to multipotencjalne białko. Do tej pory nie zbadano jeszcze wszystkich mechanizmów jego działania. Entuzjaści przypisują laktoferynie tak różne funkcje, jak działanie immunomodulujące, przeciwbakteryjne, -grzybicze, -wirusowe, -pasożytnicze, -nowotworowe, -zapalne; aktywność prokoagulantu, czynnika wiążącego żelazo, rybonukleazy, proteazy, czynnika transkrypcyjnego, stymulatora granulopoezy i wiele innych (10, 12).

Pierwszą, dokładnie przebadaną, funkcją laktoferyny jest jej udział w transporcie żelaza, wynikający ze zdolności tego białka do wiązania atomów pierwiastków z grupy metali. LF obecna w mleku matki pełni ważną rolę w zaopatrywaniu noworodka w niezbędne pierwiastki. Późniejsze badania wykazały jednak, iż inne białka, np. transferyna, są bardziej wydajnymi transporterami pierwiastków z grupy metali. Dowiedziono istnienie normalnego, niezakłóconego metabolizmu żelaza u myszy całkowicie pozbawionych laktoferyny (18, 19, 28, 30).

Wytwarzana przez wyspecjalizowane komórki wielu narządów proteina ta jest ważnym komponentem narządowej odporności nieswoistej, np. LF wytwarzana przez trzustkę bierze udział w kontrolowaniu mikroflory dwunastnicy, zaś nerkowa redukuje poziom wolnego żelaza w moczu, chroniąc drogi moczowe przed zakażeniem bakteryjnym, a jednocześnie, jako antyoksydant, zabezpiecza je przed zapaleniem (1).

LF związana z błonami śluzowymi pełni istotną rolę w pierwszej linii obrony organizmu przed mikroorganizmami. Wykazuje zarówno działanie bakteriostatyczne, jak i bakteriobójcze przeciwko bakteriom Gram-dodatnim i Gram-ujemnym, a także działanie grzybobójcze, w szczególności w stosunku do *Candida spp.* (6, 18, 19, 28). Natywna LF działa głównie bakteriostatycznie, nawet użyta w wysokich dawkach. Takie działanie LF *in vitro* wykazano do tej pory w stosunku do *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* i *Streptococcus mutans* (7, 19). Ponieważ żelazo jest składnikiem niezbędnym do wzrostu niemal wszystkich bakterii, przez długi czas sądzono, że jedynym mechanizmem antybakteryjnego działania laktoferyny jest jej zdolność do wiązania i tym samym pozbawiania bakterii tego pierwiastka. W późniejszych badaniach wykryto jednak u bakterii mechanizmy pozwalające na pozyskanie żelaza w przypadku jego deficytu w środowisku (siderofory, hemoliza erytrocytów, wiązanie transferyny i laktoferyny). Co wię-

cej, działanie przeciwbakteryjne obserwowano również po dodaniu egzogenego żelaza do podłoża doświadczalnego (2, 12).

Dalsze badania wykazały również właściwości bakteriobójcze LF, związane z jej zdolnością do wchodzenia w bezpośrednie interakcje ze ścianą komórkową mikroorganizmów. Silnie kationowy N-końcowy fragment LF zwiększa przepuszczalność ściany komórkowej bakterii, co prowadzi do jej uszkodzenia i wycieku składników wewnątrzkomórkowych. Laktoferyna reaguje z lipopolisacharydami (LPS) ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych, powodując ich usuwanie ze ściany. Ponadto zdolna jest do wchodzenia w odwracalne interakcje z porynami *E. coli*. We wszystkich testowanych układach doświadczalnych kluczowym czynnikiem decydującym o przebiegu interakcji laktoferyny ze ścianą komórkową bakterii i jej ewentualnym bójczym efekcie było stężenie tego białka. Pozostałymi czynnikami wpływającymi na wrażliwość bakterii na laktoferynę są: faza wzrostu bakterii (bakterie najwrażliwsze we wczesnej fazie logarytmicznej), temperatura (brak wiązania poniżej 4°C) i pH (bakterie wrażliwsze w środowisku kwaśnym, poniżej pH 5) oraz obecność jonów Ca<sup>2+</sup> i Mg<sup>2+</sup> (kationy te obniżają zdolność LF do wchodzenia w interakcje z LPS) (6, 12, 18, 19, 28).

Silnie bakteriobójczo działają również produkty hydrolitycznego rozkładu laktoferyny. Najpełniej do tej pory przebadanym peptydem, powstającym w wyniku trawienia LF pepsyną, jest laktoferycyna – N-końcowy fragment płata N laktoferyny. Peptyd ten wykazuje znacznie wyższą aktywność przeciwbakteryjną niż natywna LF. Przeciwbakteryjne spektrum działania laktoferycyny jest szerokie, a stężenie peptydu niezbędne do hamowania drobnoustrojów, bardzo niskie (0,5-500 mg/ml). Laktoferycyna działa w szerokim zakresie pH i jest ciepłooporna (niewrażliwa na autoklawowanie w 121°C przez 15 minut). Wielokrotnie potwierdzono zdolność tego peptydu do wiązania z powierzchnią bakterii Gram-ujemnych, skutkującą uwalnianiem LPS ze ściany komórki bakteryjnej, uszkodzeniem ściany i innymi zmianami morfologicznymi. Shin i wsp. (22) wykazali dwustopniowe działanie laktoferycyny na komórki *E. coli* O157:H7. Wstępny etap polegał na interakcji peptydu z powierzchnią komórki, następnie uszkodzane były komponenty cytoplazmatyczne. Ponadto laktoferycyna wpływała na poziom zewnątrzkomórkowych werotoksyn *E. coli* (6, 8, 22).

Powyższe spostrzeżenia odnośnie do przeciwbakteryjnego działania LF poczyniono w warunkach *in vitro*, stosunkowo niewiele jest natomiast informacji o działaniu LF *in vivo*. Pierwsze doniesienie na temat bakteriostatycznego działania LF z mleka w jelicie cienkim świń w stosunku do *E. coli* pochodzi z 1972 r. Później donoszono również o bakteriostatycznym działaniu LF w stosunku do normalnej flory jelitowej (*Enterobacteriaceae*, *Clostridia*, *Bifidobacterium*). LF stosowana jako suplement diety zabezpieczała zwierzęta

przed przedostawaniem się bakterii z przewodu pokarmowego przez błony śluzowe do innych narządów, jak: węzły chłonne, wątroba, śledziona, a także do krwi obwodowej. Wykazano również ochronne działanie LF podawanej *per os* lub w iniekcji w gronkowcowym zakażeniu nerek u myszy (7, 25, 26).

Ponadto laktoferyna wykazuje zdolność modulacji działania znanych czynników przeciwbakteryjnych, jak lizozym i antybiotyki, w wielu przypadkach wykazując działanie synergistyczne. Efekt taki może wynikać z faktu, iż dodatkowo naładowana laktoferyna, wiążąc się z ujemnie naładowaną ścianą drobnoustrojów, zwiększa tym samym penetrację antybiotyku do komórki docelowej. Taki efekt działania LF zaobserwowano nawet w stosunku do *Helicobacter pylori*. Dla tego drobnoustroju LF służy jako źródło żelaza, stymulując wzrost bakterii i kolonizację żołądka, natomiast użyta jako uzupełnienie standardowo stosowanej trójlekowej terapii kombinowanej anty – *Helicobacter pylori* znacząco zwiększała efekt działania leków (12, 13). Białko to ma także zdolność wzmagania leczniczego działania chemioterapeutyków przeciwgrzybiczych, co może okazać się szczególnie przydatne w terapii lekoopornych kandydióz, np. u osób zakażonych HIV (12).

Z drugiej strony laktoferyna wykazuje również działanie korzystne dla tych mikroorganizmów, które mają zdolność wykorzystywania żelaza związanego z tym białkiem (*Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella pertussis*, *Helicobacter pylori*, *Trichomonas foetus*). U *Helicobacter pylori*-pozytywnych pacjentów z zapaleniem żołądka obserwowano znacząco podwyższone stężenie LF w soku żołądkowym, zaś po eradykacji bakterii poziom LF w błonie śluzowej żołądka spadał do wysokości notowanej u osób zdrowych (12, 13).

Prócz szerokiego spektrum działania przeciwbakteryjnego, laktoferynę cechuje również zdolność do hamowania replikacji licznych wirusów, zarówno RNA, jak i DNA. Większość przeprowadzonych do tej pory badań pozwala na wysnucie wniosku, że białko to raczej zabezpiecza komórki gospodarza przed zakażeniem wirusowym niż hamuje replikację wirusa po zakażeniu komórki docelowej. Opisywane są dwa mechanizmy przeciwwirusowego działania LF. Pierwszy, zaobserwowany w przypadku HCV, HGV, HIV, HSV, CHV, polio- i rotawirusów, polega na bezpośrednim wiązaniu laktoferyny z cząsteczkami wirusa, przy czym do ochrony komórek przed zakażeniem niezbędna jest preinkubacja wirusa z LF. Preinkubacja samych komórek z tym białkiem nie zabezpiecza ich przed infekcją (14, 16, 24, 28).

Drugi mechanizm przeciwwirusowego działania laktoferyny polega z kolei na jej wiązaniu z cząsteczkami powierzchniowymi błony komórkowej gospodarza, które wykorzystywane są przez wirus jako receptor lub koreceptor. W tym przypadku decydujące znaczenie ma powinowactwo laktoferyny do glikozaminoglikanów, które dla wielu różnych wirusów stanowią miejsce za-

kotwiczenia we wstępnej fazie zakażenia, przed połączeniem ze swoistymi dla danego wirusa receptorami i właściwą fuzją wirusa z błoną komórki gospodarza. Ta forma ochrony komórki przed zakażeniem przez laktoferynę opisywana jest dla HBV, HSV, HCMV, CHV, HPV, FCV, FHV, HIV, adeno- i hantawirusów (3, 11, 14, 20, 24).

W przypadku niektórych wirusów, apolaktoferyna wykazywała silniejsze działanie niż hololaktoferyna. Przyczyna tego zjawiska jest nieznana. Przypuszcza się jednak, że dla prawidłowego funkcjonowania licznych spośród wirusowych enzymów niezbędne są jony metali, jako kofaktory (12).

W ostatnim dziesięcioleciu pojawiły się również doniesienia o korzystnym działaniu laktoferyny w przebiegu pasożytoz, choć niedostatecznie do tej pory wyjaśniono mechanizm jej działania w schorzeniach inwazyjnych. Preinkubacja sporozoitów *Toxoplasma gondii* i *Eimeria stidae* z LF prowadziła do zmniejszenia ich zakaźności. Obserwowane zjawisko mogło wynikać zarówno z działania białka na peptydy błonowe pasożytów, jak i z interakcji z tkankami gospodarza. Podobnie inkubacja fibroblastów z LF obniżała zdolność *Plasmodium berghei* do wiązania z receptorami komórkowymi. Mechanizm działania laktoferyny w stosunku do *Pneumocystis carinii* związany był natomiast z jej zdolnością do przerywania pasożytniczego szlaku pozyskiwania żelaza, zaś w przypadku *Trypanosoma cruzi* wynikał ze wzmagania aktywności makrofagów (2, 10, 12).

Rola laktoferyny w procesach zapalnych i infekcjach nie ogranicza się jedynie do wyżej opisanych mechanizmów działania. Białko to oddziałuje również wielokierunkowo na układ immunologiczny, wpływając na odpowiedź zapalną organizmu. Moduluje m.in. aktywację układu dopełniacza, indukuje czynnik hamujący migrację leukocytów, katalizuje konwersję nieaktywnej formy lizozymu w jego formę aktywną, generuje powstawanie w makrofagach tlenku azotu, wzmacnia fagocytozę i cytotoksyczność monocytów, zwiększa aktywność komórek NK, kontroluje produkcję cytokin prozapalnych (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ), przyspiesza tworzenie się skrzepu i hamuje tworzenie się agregatów płytek krwi (2, 5, 9, 10, 13). Właściwości przeciwzapalne LF częściowo związane są także z jej zdolnością do wiązania z lipopolisacharydami. Lipopolisacharydy bakteryjne są silnymi mediatorami reakcji zapalnych. Aktywacja leukocytów przez LPS skutkuje wybuchem tlenowym, który z kolei ma istotne znaczenie w patogenezie szoku septycznego. Duże ilości LPS powodują nadprodukcję wolnych rodników tlenowych, a w następstwie uszkodzenie tkanek. Laktoferyna uwalniana w czasie infekcji z neutrofilów ma zdolność szybkiej inaktywacji LPS, ograniczając tym samym uszkodzenie tkanek (4, 5).

Przeciwzapalne właściwości LF wykazano także *in vivo* w eksperymentalnym zapaleniu okrężnicy u myszy. Doustne podawanie laktoferyny skutkowało opóźnieniem i mniejszym nasileniem objawów klinicz-

nych oraz zmniejszeniem histopatologicznych zmian okrężnicy. Taki efekt działania może częściowo wynikać z wcześniej potwierdzonej zdolności LF do stymulowania proliferacji komórek epitelialnych. LF dociera do okrężnicy drogą pokarmową lub z krwią, a receptory dla niej znajdują się w komórkach błony śluzowej jelit. Do tej pory obecność takich receptorów potwierdzono u myszy, małp i ludzkich niemowląt. LF jest białkiem stosunkowo opornym na działanie enzymów proteolitycznych, a ta jego część, która ulega degradacji, cięta jest przez pepsynę na mniejsze, również aktywne fragmenty, w tym laktoferynę. Dodatkowo przeciwzapalne działanie LF w jelitach związane jest z hamowaniem przez nią migracji komórek, wytwarzania IL-10, IL-1 $\beta$ , IL-6 i TNF- $\alpha$  oraz hamowaniem wiązania komórek bakteryjnych z powierzchnią komórek epitelialnych (13, 15).

Laktoferyna wykazuje również silne właściwości immunotropowe. Białko to wpływa na dojrzewanie komórek układu immunologicznego oraz reguluje humoralną i komórkową odpowiedź immunologiczną. Promuje przekształcanie się prekursorowych komórek T w limfocyty T pomocnicze i wpływa na dojrzewanie komórek B, które pod wpływem laktoferyny nabywają zdolności prezentacji antygenów limfocytom T (2, 9).

Sukces wielokierunkowych badań nad LF stał się bodźcem do działania dla producentów żywności i farmaceutyków. Obecnie LF jest izolowana na skalę przemysłową z serwatki i odtłuszczonego mleka. Roczna światowa produkcja oczyszczonej LF wynosi 20-30 ton. W 2001 r. LF była już stosowana w produkcji immunostymulatorów, mieszanek dla niemowląt, suplementów żelaza dla ludzi, fermentowanych produktów mlecznych, napojów, gum do żucia, kosmetyków oraz gotowych pasz i ich suplementów dla zwierząt domowych. W weterynarii szczególnie obiecująca jest perspektywa zastosowania laktoferyny w akwakulturze, jako środka bezpiecznego dla środowiska i zdrowia ludzi. Dodatkowymi zaletami laktoferyny są: jej oporność na wysoką temperaturę, względna oporność na proteolizę oraz bardzo niska toksyczność. Dowiedziono oporności LF na denaturację w temperaturze 90-100°C przez 5-10 minut, a także przy zastosowaniu metody UHT, pod warunkiem zachowania kwaśnego środowiska (pH  $\approx$  4). Ta cecha LF sprawia, że może ona przetrwać warunki produkcji żywności oraz działanie kwaśnych soków żołądkowych i proteolizę w jelitach. Bezpieczeństwa stosowania LF, jako suplementu żywności, dowodzi doświadczenie, w którym oczyszczone białko, podawane szczurom *per os* w dawce 2000 mg/kg/dzień przez okres 13 dni nie spowodowało wystąpienia żadnych niekorzystnych objawów (16, 23, 27, 31).

Reasumując, laktoferyna – endogenne, multipotencjalne białko – ma szansę znaleźć szerokie zastosowanie zarówno w leczeniu i prewencji schorzeń zakaźnych, jak i produkcji żywności dla ludzi i zwierząt, zwłaszcza w dobie narastającej oporności drobnoustrojów i zwiększonej liczby pacjentów z obniżoną reaktywnością układu immunologicznego.

## Piśmiennictwo

1. *Abbrink M., Larsson E., Gobl A., Hellman L.*: Expression of lactoferrin in the kidney: Implications for innate immunity and iron metabolism. *Kidney Int.* 2000, 57, 4-10.
2. *Adamik B., Własczyk A.*: Laktoferyna – rola w obronie ustroju przed infekcją i właściwości immunotropowe. *Post. Hig. Med. Dośw.* 1996, 50, 33-41.
3. *Arnold D., Di Biase A. M., Marchetti M., Pietrantonio A., Valenti P., Seganti L., Superti F.*: Antiadenovirus activity of milk proteins: lactoferrin prevents viral infection. *Antivir. Res.* 2002, 53, 153-158.
4. *Baveye S., Elaiss E., Mazurier J., Legrand D.*: Lactoferrin inhibits the binding of lipopolysaccharides to L-selectin and subsequent production of reactive oxygen species by neutrophils. *FEBS Lett.* 2000, 469, 5-8.
5. *Baveye S., Elaiss E., Mazurier J., Spik G., Legrand D.*: Lactoferrin: A multifunctional glycoprotein involved in the modulation of the inflammatory process. *Clin. Chem. Lab. Med.* 1999, 37, 3, 281-286.
6. *Bellamy W., Takase M., Yamauchi K., Wakabayashi H., Kawase K., Tomita M.*: Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochimica Biophysica Acta* 1992, 1121, 130-136.
7. *Bhimani R. S., Vendrov Y., Furmanski P.*: Influence of lactoferrin feeding and injection against systemic staphylococcal infections in mice. *J. Appl. Microbiol.* 1999, 86, 135-144.
8. *Branen J., Davidson P. M.*: Activity of hydrolysed lactoferrin against foodborne pathogenic bacteria in growth media: the effect of EDTA. *Lett. Appl. Microbiol.* 2000, 30, 233-237.
9. *Brock J.*: Lactoferrin: a multifunctional immunoregulatory protein? *Immunology Today* 1995, 16, 9, 417-419.
10. *Brock J. H.*: The physiology of lactoferrin. *Biochem. Cell. Biol.* 2002, 80, 1-6.
11. *Drobni P., Näslund J., Evander M.*: Lactoferrin inhibits human papillomavirus binding and uptake in vitro. *Antivir. Res.* 2004, 64, 63-68.
12. *Farnaud S., Evans R. W.*: Lactoferrin – a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Mol. Immunol.* 2003, 40, 395-405.
13. *Guttner Y., Windsor H. M., Viiala C. H., Marshall B. J.*: Human recombinant lactoferrin is ineffective in the treatment of human *Helicobacter pylori* infection. *Aliment. Pharm. Therap.* 2003, 17, 125-129.
14. *Hara K., Ikeda M., Saito S., Matsumoto S., Numata K., Kato N., Tanaka K., Sekihara H.*: Lactoferrin inhibits hepatitis B virus infection in cultured human hepatocytes. *Hepatol. Res.* 2002, 24, 228-235.
15. *Havervens L. A., Baltzer L., Dolphin G., Hanson L. A., Mattsby-Baltzer I.*: Anti-inflammatory activities of human lactoferrin in acute dextran sulphate-induced colitis in mice. *Scand. J. Immunol.* 2003, 57, 2-10.
16. *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.
17. *Iyer S., Lonnerdal B.*: Lactoferrin, lactoferrin receptors and iron metabolism. *Eur. J. Clin. Nutr.* 1993, 47, 232-241.
18. *Levy P. F., Viljoen M.*: Lactoferrin: a general review. *Haematologica* 1995, 80, 3, 252-267.
19. *Lonnerdal B., Iyer S.*: Lactoferrin: molecular structure and biological function. *Annual Review of Nutrition* 1995, 15, 93-110.
20. *Marchetti M., Trybala E., Superti F., Johansson M., Bergström T.*: Inhibition of herpes simplex virus infection by lactoferrin is dependent on interference with the virus binding to glycosaminoglycans. *Virology* 2004, 318, 405-413.
21. *Peen E., Johansson A., Engquist M., Skogh T.*: Hepatic and extrahepatic clearance of circulating human lactoferrin: an experimental study in rat. *Eur. J. Haematol.* 1998, 61, 3, 151-159.
22. *Shin K., Yamauchi K., Teraguchi S., Hayasawa H., Tomita M., Otsuka Y., Yamazaki S.*: Antibacterial activity of bovine lactoferrin and its peptides against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Lett. Appl. Microbiol.* 1998, 26, 407-411.
23. *Steijns J. M.*: Milk ingredients as nutraceuticals. *Society of Dairy Technology* 2001, 54, 3, 81-88.
24. *Tanaka T., Nakatani S., Xuan X., Kumura H., Igarashi I., Shimazaki K.*: Antiviral activity of lactoferrin against canine herpesvirus. *Antivir. Res.* 2003, 60, 193-199.
25. *Teraguchi S., Ozawa K., Yasuda S., Shin K., Fukuwatari Y., Shimamura S.*: The bacteriostatic effects of orally administered bovine lactoferrin of intestinal Enterobacteriaceae of SPF mice fed bovine milk. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1994, 58, 482-487.
26. *Teraguchi S., Shin K., Ozawa K.*: Bacteriostatic effect of orally administered bovine lactoferrin on proliferation of *Clostridium* species in the gut of mice fed bovine milk. *Appl. Environ. Microb.* 1995, 61, 501-506.
27. *Tomita M., Wakabayashi H., Yamauchi K., Teraguchi S., Hayasawa H.*: Bovine lactoferrin and lactoferricin derived from milk: production and applications. *Biochem. Cell Biol.* 2002, 80, 109-112.
28. *van der Strate B. W. A., Beljaars L., Molema G., Harmsen M. C., Meijer D. K. F.*: Antiviral activities of lactoferrin. *Antivir. Res.* 2001, 52, 225-239.
29. *van der Strate B. W. A., Harmsen M. C., The T. H., Sprenger H. G., De Vries H., Eikelboom M. C., Kuipers M. E., Meijer D. K. F., Swart P. J.*: Plasma Lactoferrin levels are decreased in end-stage AIDS-patients. *Viral Immunol.* 2000, 12, 3, 197-203.
30. *Ward P. P., Uribe-Luna S., Conneely O. M.*: Lactoferrin and host defense. *Biochem. Cell Biol.* 2002, 80, 95-102.
31. *Yamauchi K., Toida T., Nishimura S., Nagano E., Kusuoka O., Teraguchi S., Hayasawa H., Shimamura S., Tomita M.*: 13-week oral repeated administration toxicity study of bovine lactoferrin in rats. *Food Chem. Toxicol.* 2000, 38, 503-512.