

## LAKTOFERRİN: GENEL DERLEME

**ÖZET:** laktoferrin süten izole edilen 703 aminoasitlik bir glikoproteindir. Plazma laktoferrini esas olarak nötrofil kaynaklıdır fakat diğer hücreler tarafından da üretilebilirler. Vücut sıvılarındaki laktoferrin demir-serbest form, monoferrik form ve diferrik formdur. Laktoferrinin üç izoformu izole edilmiştir, ikisi RNAaz aktivitesi (laktoferrin $\beta$  ve laktoferrin- $\gamma$ ) ve bir tanesi RNAaz aktivitesizdir (laktoferrin  $\alpha$ ). Laktoferrin için reseptörler intestinal dokuda, monosit/makrofajlarda, nötrofillerde, lenfositlerde, plateletlerde ve belirli bakterilerde bulunur. Laktoferrinin geniş spektrumda fonksiyonları tanımlanmıştır. Bunlar demir avilavilitiesinin kontrolü ile immun modülasyon arasında rol oynarlar. Laktoferrinin net mekanizmaları ile ilişkili daha fazla çalışmalara gerek vardır.

Laktoferrin ismi, sütte majör demir bağlayan protein olması nedeni ile eski sınıflamasından kaynaklanmaktadır. Laktoferrin aynı zamanda laktotransferrin olarak da bilinir ve ilk olarak 1939 da sığır sütünde (1) saptanmıştır ve 1960 da Johansson (2) tarafından insan sütünde izole edilmiştir. Ardından safra, pankreatik sıvı ve ince barsak sekresyonları gibi diğer ekzokrin sekresyonlarda majör demir bağlayıcı protein olarak gösterilmişlerdir. Hem insanlarda hem de diğer memelilerde diğer dokularda da saptanmıştır (3). Laktoferrinin boyutu ve yapısı diğer demir bağlayan protein grubu olan transferrinler ile yakından ilişkilidir ve bu nedenle laktoferrin transferrin ailesinin bir üyesi olarak düşünülmektedir (4). Plazma laktoferrini esas olarak nötrofil kaynaklıdır fakat endikasyon olduğunda diğer hücreler tarafından da üretilebilir. Geçmişte sütte katkısız demir transpote eden bir protein olarak düşünülmektedir fakat bu görüş yeni araştırma bulguları ile değişmiştir.

### Yapı ve Özellikler

Laktoferrin ile ilişkili karmaşalar belki de yapısı ile ilgili yanlış anlaşılmalardan ve bilgisizlikten kaynaklanmaktadır. İnsan laktoferrininin komplet amino asit sekansı saptanmıştır ve 803 amino asit rezidüsünü içerir (4). Hololaktoferrin iki globuler loba jatlanan tek bir polipeptid zincirini içerir, her birinin demir bağlayan bir bölümü vardır (5). Laktoferrine demir bağlanması iki bikarbonat anyonunun yapışması ile olur, bu süreç demirin laktoferrine ligasyonu için zorunludur (6). İki lob arasında dikkate alınacak kadar internal homoloji mevcuttur ( rezidü 1-338 ve 339-703 sırasıyla), bunlar karşı gelen porsiyonlarda 125 identikal aminmo asit rezidüsü (%37) içerir (4). Bu gen duplikasyonu için teoriye yol açar, 500 milyon yıl önce ortaya çıkan ve 40 kDa lık molekülün duplike olduğu, iki domaine ulaştırılan ve bu nedenle 80kDa lık aralıkta moleküler kitleler için protein ailesini öne sürer ( Tablo 1) (7). Laktoferrinin en genç transferrinlerden biri olduğu öne sürülmektedir.

Laktoferrin 8.7 izoelektrik noktası ile basit bir glikoproteindir (8,9). İnsan süt laktoferrini iki poli N-asetil-laktozaminik glikan içerir; bunlar N-asetilnöraminik asit (sialik asit), fukoz ve galaktozu içerir (4,7). Bu şekerlerin asparagin rezidüleri 137 ve 478 e bağlandıkları saptanmıştır, bir tanesi C bir tanesi de N terminalinde bulunur (4,9). İnsan polimorfonükleer nötrofil (PMN) laktoferin glikanlarının primer yapısı insan süt laktoferrininin majör glikanları ile aynıdır. Laktoferrine N-glikozid linkage ler ile bağlanan iki glikan, yine de yapısal olarak heterojendir ve diğer transferrin formlarından farklılık gösterirler (4,9). Bu glikanların kesin rolü değerlendirilmemlir ve uzaklaştırılmalarının kaotiferrin fonksiyonları ve özelliklerinde herhangi bir görünen etkisi olmayacağı söylenmektedir (6, 10). Fakat bu ilişkiye reseptör bağlanmasındaki rolü ile ilgili izole çalışmalarda itiraz edilmiştir (11).

Laktoferrin proteolitik degradasyona belirgin olarak tripsin ve tripsin benzeri enzimler ile dirençlidir, barsakta parsiyel olarak sindirime dirençlidir (6). Glikan bağımlı olan bu özellik, laktoferrinin maternal süttten absorpsiyonunu fasilite eder. Demir-doymuş formun (hololaktoferrin) proteolize apofomdan daha dirençli olduğu bilinmektedir (12). Laktoferrin sadece demire değil bakır, çinko, manganez, galyum ve olasılıkla vanadiuma da bağlanır (13,15,16). Laktoferrinin plazmadaki demir saturasyon derecesi bilinmemektedir (17).

Laktoferrin ve diğer transferrinler arasındaki benzerlikler barizdir. Tranferrin ailesinin tüm üyelerinde aynı polipeptid katlanma paterni bulunur (7,9). Laktoferrin transferrin gibi bir demir rnaspoteridir ve bu durum hem hololaktoferrin ( demir-sature) hem de apolaktoferrin (demir-bağımsız) formda aynıdır. Transferrinin moleküler kitlesi (apo-form: 75-76.6 kDa; holo-form: 73.8-86 kDa) laktoferrin ile bildirilenle benzerlik gösterir (apo-form: 75-76.4 kDa; holo-form 82.6 kDa) (5). Laktoferrin ve transferrinin aminoasit bileşenleri yakın olarak ilişkilidir (5,19); Her iki molekül için sırayla karşılık gelen domainler %59 ve %49 oranında homoloji gösterir (4). Disülfid bağlantılarını içeren sekonder ve tersiyer yapılar da belirgin olarak benzerdir (7, 18). Bu bulgular iki molekülün aynı filogenik orjini paylaşabileceğine dair spekülasyona yol açmıştır (5, 19). Fakat laktoferrin transferrinden immünolojik ve antijenik özellikleri, karbohidrat kompozisyonu, suda çözülebilirliği, izolelektrik noktası ve demir bağlayan ve glikozilasyon bölgelerinin lokalizasyonu ile farklılık gösterir (3,4,7,20). Laktoferrin ve transferrin  $\beta$  tabakalar ve  $\alpha$  heliksler içeren benzer C terminal ve N terminal demir bağlayan domainlere sahiptir (9). İnterlob bağlayan peptid laktoferrinde helikal iken transferrinde düzensizdir. Her bir lob için bağlayıcı bölge,  $Fe^{3+}$  ve  $CO_3^{2-}$  iyonları için yuva görevi görür, interdomain yarığın içerisinde yer alır. N ve C loblarındaki demir bağlayan bölgeler benzerdir: üç anyonik ligand, metal iyonundaki  $4^-$  yükü eşleşen dördüncü nötral histidin amino asidi ile 2 tirozin ve 1 aspartik amino asit, hidrojen bağlayan bir network oluştururlar (9). Karbonat anyonunun rolünün iki katlı olduğu öne sürülmüştür: (a) aksi halde katyonu iteleyebilecek pozitif yükleri etkisiz hale getirir ve (b) iki daha potansiyel ligand ekleyerek apo proteinde metal bağlayan bölgeyi parsiyel olarak hazırlar (9).

Kristallografik çalışmalar hem laktoferrin hem de transferrin ile konformasyonel değişiklikler göstermişlerdir (9). Bireysel lobların demir bağlayan afiniteler i ve özellikleri transferrin için iyi olarak değerlendirilmiştir (21), fakat laktoferrin için bu özellikler hakkında daha az şey bilinmektedir. Transferrin dört moleküler formda ortaya çıkabilir (9, 22, 23): apotransferrin, monoferrik transferrin (A veya B formunda) ve diferrik transferrin. Demir saturasyonu arttığında transferrinin görünen moleküler kitlesi azalır, bu da demirin transferrine bağlanarak bağlanma alanlarında konformasyonel değişikliklere yol açabilmesini indükler. Üç laktoferrin formunun seperasyonu yüksek performanslı likid kromatografi kullanılarak başarılı olarak uygulanmıştır, fakat dört demir bağlayan formun varlığı için net kesnlik henüz başarılmamıştır, monoferrik laktoferrinin olası A ve B formları elektroforezle henüz gerçekleşmemiştir (24).

Apoferrin ve diğer demir sature transferrinlerin immuno elektroforezde spesifik bir antiserada aktivite gösterdikleri uzun süredir bilinmektedir (25). Bu bulgular transferrinlerin formlarımdan hangisi için kullanılan antikoların saptanmasında zor uygulamalara sahiptir. Laktoferrindeki konformosyanal değişiklik demire bağlandığında gerçekleşir ve bu durum laktoferrin düzei saptanmasında uygulanması aynı zamanda hololaktoferrinin apofomu ile karşılaştırıldığında bozulmuş bitki lektin bağlama kapasitesine sahip olduğu bulguları ile de desteklenir (26). Laktoferrinin belirli formlarının laktoferrin reseptörü için diğerlerine göre daha fazla afşnitiye sahip olduğu bilinmektedir (13). Laktoferrinin ve transferinin spesifik reseptör afinitesi belki de laktoferrin ile transferrin inter domain etkileşimler arasındaki farklılıktan kaynaklanabilir

(9). Molekül hem in vivo hem in vitro olarak  $10^{-10}$  M konsantrasyonlarda bile polimerize olma eğilimindedir (27-28). Bu da bildirilen serum laktoferrin düzeylerinin geniş aralığına katkıda bulunabilme olasılığına sahiptir.

Laktoferrinin çeşitli izoformlarda olduğu bilinmektedir (8). İki RNAaz aktivitesi (laktoferrin $\beta$  ve laktoferrin $\gamma$ ) ve bir tanesi RNAaz aktivitesizdir (laktoferrin  $\alpha$ ); üçü de insan anne sütü ve granülositlerinde mevcuttur (8-29). Bu izoformlar aynı fiziksel, kimyasal ve antijenik özellikleri paylaşırlar fakat fonksiyonel özellikleri bakımından farklılık gösterirler. RNAz aktiviteli demir bağımsız izoformlar fonksiyonel demir bağlanması göstermezken, demir bağlayan formun da RNAz aktivitesi yoktur (8). Bu bulgular laktoferrin ile ilişkilendirilmiş fonksiyonlardaki farklılıkları kısmen açıklayabilir.

### **Plazmada laktoferrin düzeyleri**

Laktoferrin plazmada göreceli düşük konsantrasyonlarda bulunur; kolostrum, insan sütü ve seminal plazmada önemli oranda daha yüksek düzeylerde saptanır. Kordon kanı, gözyaşı ve vajinal mukusta da belirgin yüksek düzeyler bulunur ( Tablo 2-4). Bildirilen farklılıklar (a) analitik metodlar, (b) kullanılan antikoagülanın tipi, (c) laktoferrin demir saturasyonunda varyasyonlar, (d) in vitro polimerizasyon gibi bildirilen in vivo polimerizasyon (27, 28) ve (e) venipunktur ve analiz veya depo arasındaki zaman intervali.

Plazma laktoferrini esas olarak nötrofil derivedir (6). Spesifik granüllerdeki varlığı sıklıkla bu granülleri saptamak için kullanılır. Fakat son zamanlardaki bulgular laktoferrinin aynı zamanda diğer granüllerde belki de tersiyer granüllerde daha düşük konsantrasyonlarda bulunduğunu göstermiştir (30). Plazma laktoferrin konsantrasyonları nötrofil sayısı ile korele olabilir veya olmayabilir (31-33); degranülasyonun büyüklüğüne bağlı olarak ve belki de kemik iliği, endometrium ve plasenta gibidiğer organların ve laktoferrin içeren plazma kontentinin katkısı da olabilir (34-36). Diğer laktoferrin içeren dokuların özeti başka yerde bildirilmiştir (19).

Çoğu yazı erkeklerde kadınlardan daha yüksek laktoferrin düzeyleri bildirmiştir (17, 37-39); birinde benzer düzeyler bildirilmiştir fakat kadınlar için daha büyük standart deviasyon saptanmıştır (17). Bir yazıda ise kadınlarda daha yüksek düzey bildirilmiştir (40). Freeman ve arkadaşları tarafından bildirilen bir çalışmada erkeklerde daha yüksek granülosit laktoferrin içeriği bulunmuştur (41); çalışanların çoğunluğu tarafından bildirilen erkeklerde daha yüksek plazma seviyelerini sadece bir degranülasyon farkı olarak göremezler.

Laktoferrin plazma düzeyleri gebelik boyunca değişir. Maternal plazma laktoferrin düzeylerindeki değişiklikler konsantrasyonda progresif bir yükselme olarak başlar, gebeliğin 29. haftasında stabilize olur (38). Birçok faktör buna katkıda bulunabilir: (a) gebelikilişkili lökositozis (42); (b) myeloperoksidaz seviyesi aynı kalırken nötrofillerin granüler laktoferrin içeriğinde bildirilen selektif artış (43) ; (c) desidua-derive laktoferrinin plazma seviyelerine katkısı (36) ve belki de (d) endometrium veya desidua dışındaki meme asinisi gibi diğer dokulardan laktoferrin üretimindeki hormonal akım (44). Böyle bir laktoferrin-hormonal bağlantısı (a) kadın serumunda görülen daha büyük standart deviasyon (1), (b) menstrual sıklusun sekretuar fazında üretildiği öne sürülen endometrial laktoferrin (35) , (c) gebelik boyunca plazma seviyelerindeki artış (38), (d) indirek yolla nötrofil sayısı ve üriner estradol seviyeleri arasındaki korelasyon, (e) vajinal mukusta premenstrual düzeylerden daha yüksek postmenstrual düzeyler (46), (f) oral kontraseptif kullanan kadınlarda maksimal vajinal laktoferrin düzeylerinde azalma (46), (g) menstrual sıklusta plazma laktoferrin düzeylerinde

bildirilen eğilim (47), (h) erkek ve kadın düzeylerindeki farklılıklar, (i) prostat laktoferin konsantrasyonunda hormonal bağımlılık (48), ve (j) daha yüksek postmanpozal plazma düzeyleri (17, 39) ile ilişkili olabilir. Bu bulgular doğada epifenomenal de olabilir.

### **Sütte, amniyotik sıvıda ve yeni doğanlarda laktoferrin düzeyleri**

Laktoferrin köpek ve sıçanlar hariç şimdiye kadar değerlendirilen tüm memeli türlerinde sütte bulunmaktadır (67). Sığır sütündeki düzeyler insan sütüne göre anlamlı derecede daha düşüktür. Masson ve arkadaşları (67) insan anne sütündeki düzeylerin değerlendirilen on tür arasında en yüksek seviyeye sahip olduğunu göstermişlerdir. İnsan sütündeki demirin yaklaşık %30 u laktoferrine bağlanır (68). Süt laktoferrinin sadece %6-8 inin demir satüre olduğu tahmin edilmektedir; bu bulgular Makino ve Nishimura'nın (24) süt laktoferrininin %95 inin monoferrik ve/veya apolaktoferrin formunda olduğu bulgularını destekler. İnsan sütündeki laktoferrin düzeylerinin vücut demir durumuna bağımlı olmadığı gözlenmiştir fakat genel maternal beslenmenin genel durumunu ilgilendirebilir. Laktoferinin genellikle malnutre annelerde daha düşük olduğu söylenmektedir (69).

Çeşitli yazarlar laktoferrin kolostrum düzeyinin bu periyoddan sonra ortaya çıkan süte göre önemli derecede daha yüksek olduğunu saptamışlardır. Anca sütteki seviyeler zamanla uzamış laktasyonda azalma göstermemektedir (70). Gestasyonel yaş ve laktoferrin düzeyleri arasında herhangi bir korelasyon gösterilmemesin rağmen preterm doğumlarda full term doğumlara göre kolostrumda daha yüksek düzeylerde laktoferrin konsantrasyonları olduğu gözlenmektedir (71, 72). Bu preterm kolostrumdaki daha yüksek nötrofil sayısı ve daha küçük hacim ile ilişkilendirilemez, çünkü preterm ve full term kolostrum arasında protein düzeyleri açısından farklılık yoktur ve nötrofil sayısındaki farklılık sorumlu olabilecek kadar yüksek değildir (72, 73). Preterm kolostrumda başlangıçtaki artmış laktoferrin kolostrum üretim periyodu boyunca azalır (73). Kolostrumdaki seruma göre daha düşük sayıda nötrofil sayısı bulunmasına rağmen kolostrumda belirgin düzeyde daha yüksek laktoferrin düzeyi saptanması laktoferrin üretiminin meme dokusundan üretimini veya konsantrasyon gradiyentine karşı laktoferrinin aktif transportunu destekleyebilir.

Amniyotik sıvıdaki laktoferrin düzeyleri gebeliğin 20. Haftasından önce saptanamaz (36). 30 hafta civarı önemli bir artış olur ve term e kadar yüksek kalır. Desidua, amniyon ve koryon membranlardaki, trofoblast ve umbilikal korddaki laktoferrin düzeyleri Tablo 4 de gösterilmektedir. Amniyotik sıvı laktoferrininin maternal desidüel kaynaklı olabileceği belirtilmiştir (36). Maternal plazma laktoferrin düzeylerinin başlangıç artışı ve 29 hafta gebelikte stabilize olması ilginçtir (38). Bu nedenle plazma laktoferrininin gebelik boyunca artışı desidüel orjinli olabileceği desteklemektedir. Amniyotik laktoferrin konsantrasyonları şaşırtıcı olarak kolostrum, süt, gözyaşı ve seminal plazmadan sonra en yüksek bildirilen düzeylerdedir.

Fetustaki laktoferrin üretimi gestasyonel yaşa bağımlıdır ve 13 haftadan itibaren immunohistokimyasal saptama ile bulunabilir (79). Sitodiferansiyasyonun belirli bir düzeyinde laktoferrinin fetal tükrük bezlerinde varlığı ve tükrük bezli laktoferrinde oğumdan hemen sonra

bildirilen azalma fetal laktoferrin düzeylerine kan hücrelerindense organların daha fazla katılığını desteklemektedir (80). Fetal laktoferrinin bir kısmının amniyotik sıvıdan kaynaklanması da olasıdır, çünkü hem fetal hem de maternal alanda daha yüksek laktoferrin seviyeleri saptanır. Şu anda laktoferrinin plasentadan geçmiyor gözükmektedir (81). Bu görüş maternal ve neonatal laktoferrin konsantrasyonları arasındaki korelasyonun eksikliğinin demostre edilmesi desteklenmektedir (81).

Yenidoğanlardaki plazma laktoferrin düzeyleri halen karmaşıktır. Kord kanında bildirilen ilk düzeyler 25.8 ve 28.0 µg/mL (n=2) dir; bu düzeyler aynı çalışmada erişkinlerde bulunana göre en az on kat daha yüksektir (17). Bazı yazarlar full term infantlar (0.385± 0.113 µg/mL) ile erişkinler (0.122±0.040 µg/mL), arasında daha az önemli bir fark bildirirken diğerleri neonatal ve erişkin düzeyler arasında fark gözlemlememiştir (51,81). Bazı raporlarda kord kanında laktoferrinin saptanamayacağı da bildirilmiştir (36).

Yenidoğanlarda ve infantlarda plazma laktoferrin düzeylerinden bağımsız olarak, bu düzeyler 15 haftada erişkin seviyelerine gelir (34). Neonatal plazma laktoferrin düzeyleri nötrofil sayısı, nötrofil laktoferrin içeriği, degranülasyon özelliği, laktoferrin yarı ömrü gibi fetal plazma laktoferrin havuzuna maternal katkılarla da ilişkilidir. Doğumdan bir hafta sonra kaybolan neonatal lökositöz iyi bilinmektedir (69); fakat granüler laktoferrin içeriği ile ilişkili karmaşık devam etmektedir (41,65,66). Bir grup çalışmacı komperatif olarak normal olduğunu saptamıştır (82).

Fetal laktoferrin salınımı ile ilişkili genel özellikler degranülasyonun hafif baskılanması ile ortaya çıkacaktır, olasılıkla subnormal lig ve reseptör interaksyonunu ile sonuçlanacaktır (66, 82). Bu bulgular yenidoğanda suboptimal lökosit aktivitesi ile ilgili diğer raporlarla korelidir (83). Aynı şekilde normalden daha az RES aktivitesi laktoferrin yarı ömrünü uzatabilir. Göreceli olarak yüksek neonatal laktoferrin seviyeleri erişkin değerlerini yansıtmayacaktır fakat immatür RES ile açıklanabilir.

### **Farklı insan kaynaklarından Laktoferrinin immunojenitesi**

Laktoferinin çeşitli kaynaklardan eldesinin ( süt veya nötrofiller gibi) herhangi bir farklılığı olup olmadığı etrafındaki sorular sürmektedir. İnsan anne sütü, kollostrum, apolaktoferrin ve nötrofil laktoferrinde çift immundifüzyon analizi ile ilgili bir çalışmada herhangi bir farklılık gözlemlenmemiştir (64). İnsan memeli laktoferrininde komplet DNA sekansı nötrofil cDNA sınıfının parsiyel sekansı ile %99.7 oranında benzerlik göstermektedir, insan süt laktoferrininin sekansı ile %97 oranında benzerlik gösterir (4). Diğer bir yandan belirli değerlendiriciler, nötrofil ve insan sütü kaynaklı laktoferrin arasında glikan zincirlerinin terminal fukoz rezidülerinde ( laktoferrinin makrofajlara bağlanması için gerekli olan) farklılık saptamışlarken (11); diğerleri bireysel antikorların süt ve nötrofil laktoferrini arasında farklılık gösterebileceğini saptamışlardır (84). Bu gözlemin laktoferrinin çeşitli demir sature formlarını için antikor spesifitesinin bir sonucu olabileceği gözlemlenmiştir. Var olan çalışmaların çoğu laktoferrin demir saturasyonunun derecesinin çeşitli izoformlarının varlığı düşünülmeden yapılmıştır.

### **Optimal laktoferrin düzeyleri için örnek toplama prosedürü**

Laktoferrin analizi için doğru spesmen toplanmasının önemi büyüktür. EDTA yerine heparinli tüp kullanılması gibi toplama tekniklerindeki varyasyonlar güvensiz sonuçlarda artışa neden olur (38). Güvenilir sonuçlar için (a) antikoagülan olarak EDTA kullanılması, (b) kan alınması esnasında minimum staz, (c) örnek alındıktan sonra en kısa zamanda seperasyon ve konfigürasyon yapılması veya kan alındıktan sonra en az 5 saat içinde bu işlemlerin yapılması, (d) eğer seperasyon geçilmişse kan 4 sanigrat derecede bekletilebilir ve (e) santrifüj 4 santigrad derecede yapılmalıdır (34,50,54,85)

### **Laktoferrin Metabolizması**

Laktoferrin demir bağımlı durumda nötrofillerde üretir ve spesifik granüllerde ve olasılıkla etrsiyer granüllerde depolanır (6,86). Steroid tiroid reseptör süperalesinin laktoferrin gen ekspresyonunu modüle etmede çalıştığı düşünülmektedir. Bu laktoferrin düzeylerinin hormon bağımlı olduğu hipotezini destekler. Daha detaylı bir tartışma belki bu yazının ötesindedir. Laktoferrin, myeloperoksidazın ve bazı diğer granüler ürünlerin aksine geniş bir prekürsör olarak sentez edilmez ve unfosforile olduğu saptanmıştır (87). Laktoferrin depo granüllerini asidifikasyon mekanizmalarına bağlı olarak transfer eder ve Golgi aparatının medial ve trans sisternalrında bu durum oluşur (87). Bu nedenle sekresyon için proteinler gibi işlendiği görülmektedir. Bu granüllerin içindeki nötrofil laktoferrininin iki hedefi vardır: çevre dokularda veya kanda ekrede edilebilir. Polimorfonükleer hücrelerden dolaşıma sekresyon, degranülasyon faktörlerine bağlıdır, guanilat siklazın, cGMP ve proteinkinaz ( kalsiyum bapımlı) gibi faktörlerin aktivasyonuna bağlı olduğu düşünülmektedir. Bu durum hem aerobik hem de anaerobik durumlarda ortaya çıkar ve hidrojen sülfidin varlığından etkienmez; IL-8 ve yüzey bağlı IgG tarafından sitmüle edilir (88, 89). Plazma laktoferrin düzeyleri genellikle demir yükünde, inflamasyonda, enfeksiyöz hastalıklarda, tümör gelişimi esnasında yükselir; nötrofillerden laktoferrin salınımı için multifaktöriyel stimulatör bir mekanizma olduğunu göstermektedir (90). Laktoferrinin salınımı metal iyonlarına bağlı olduğundan, demir en geniş çalışılan iyondur. Serum apo ve hololaktoferrinin ilişkisi henüz saptanmamıştır, çünkü bu saptamalar belirli deneysel zorluklar içermektedir. Laktoferrinin dolaşımdan uzaklaştırılması iki yoldan birisi ile olur. Birincisi laktoferrin sirkülasyondan, interstisiyel alanlardan uzaklaştırılabilir; makrofajlar, monositler ve RES deki diğer hücreler gibi fagositik hücrelerden reseptör aracılı endositoz ile ardından da demirin ferritine transferi ile olabilir (53,86,91). Sıçanalrda yapılan deneylerde hololaktoferrinin enjeksiyon sonrası yarı ömrü RES i bloke ettikten sonra üç kat uzamıştır (86). Bu manada laktoferrinin uzaklaştırılmasında hücrelerle ilgili karmaşalar devam etmektedir (92). Diğer alternatif yol ise karaciğerden endositozun demir saturasyonu, klattrin, kalsiyum bağımlı süreçleri ile direk alınımıdır (93). Kupfer ve karaciğer endotelyal hücreleri gibi hepatositlerin de tutulduğu gözlemlenmiştir (93). Bağlanma bölgeleri belki de transferrin bağlanan yerler ile aynı olabilir bu nedenle laktoferrinin sıçan hepatositleri ile transferrin alınımını inhibe ettiği görülmüştür (93).

Bennet ve Kokocinski laktoferrinin enjeksiyon sonrası tamamının karaciğer ve dalaktan hızlıca temizlendiğini göstermişlerdir (55). Laktoferinin transferrin gibi geri dönüşüme uğrayış uğramadığı bilinmemektedir (94). Erişkin insanlarda laktoferrin metabolizmasını anlamak için ileri açılışmalar gerekmektedir.

Böbreğin dolaşımında laktoferrin klirensinde rol oynadığı hem laktoferrin hem de laktoferrin fragmanlarının infantların idrarında bulunması nedeniyle düşünülmektedir (95). Meme ile beslenen infantlarda laktoferrinin maternal orjinin baskın olduğunu belirtmek gerekmektedir

(95). Laktoferrinin düşük moleküler fragmanları aynı zamanda dışkıda da saptanmıştır (96). Laktoferrinin hem fekal hem de üriner eliminasyonun halen karmaşalar devam etmesi nedeniyle daha ileri olarak araştırılması gerekmektedir.

### **Laktoferrin Reseptörleri**

Laktoferrin yüksek izoelektrik noktası olan temel bir proteindir (8.7); çoğu hedef hücreye veya proteine non spesifik olarak bağlanabilir (9). Laktoferrin fragmanları ile ilgili bazı çalışmalar N-lobunun ( rezidü 1-90) bir bölümünün laktoferrin reseptör bağlanmasında yer aldığını belirtmişlerdir (96). Fakat diğer çalışmalar insan laktoferrininin hem C hem de N loblarının bakteriyel laktoferrin reseptörlerine bağlandığını saptamışlardır (98). Laktoferrin reseptörleri gastrointestinal sistem, lökosit, makrofajlar, plateletlerde ve bakterilerde saptanmıştır. Bu reseptörlerin bir özeti tablo 5 de gösterilmektedir.

### **Laktoferrinin biyolojik rolü**

Laktoferrinin kesin rolü ve mekanizması ile ilgili halen bazı karmaşalar mevcuttur. Laktoferrinin aslında konak savunmasında sadece demir metabolizmasının olduğu gibi rol oynamadığı gösterilmektedir. Konak defans mekanizmasındaki rolü bakteriyostatik bir ajandan daha fazlasıdır. Laktoferrin, bakteriyostatik fonksiyonuna ek olarak bakteriyosidal etki de gösterebilir ve mantar ve virüsler gibi diğer mikropların bakterisidal etkisini bozabilir. Ayrıca immun modülatör etkileri ile beraber vücut defans mekanizmalarında da geniş rol oynar. Laktoferrinin demir metabolizmasındaki majör rolü demir kullanılabilirliği ile ilgili gözükmetedir. Laktoferrinin normal hücrelerde büyüme regülatör fonksiyonları, koagülasyon ve belki de selüler adhezyon modülasyondaki rolü de mevcuttur. Laktoferrinin bazı diğer moleküllere veya sessiz reseptörlere bağlandığı da bilinmektedir. Fonksiyonel önemi net değildir fakat bu etkileşimler ile ilgili net gerçekler yavaş yavaş ortaya çıkmaktadır.

### **Demir Metabolizmasındaki Rolü**

Anne sütünden laktoferrinin infantlarda barsağın intakt formundan emildiği bilinmektedir (5). İnsan sütünde sığır sütüne göre daha yüksek laktoferrin konsantrasyonunun ve daha yüksek demir kullanılabilirliğin gözlemlenmesi meme ile beslenen infantlarda laktoferrinin demir emilimini uyarabildiği hipotezini kuvvetlebdirmektedir. Bu anne sütü ile beslenen infantlarda sığır sütü bazlı mama ile beslenen infantlarda göre demir emililiminin daha iyi olması ile desteklenir (110). Laktoferrin demir emilimini artırıp artırmadığı halen karmaşıktır (34) ancak birçok yazıda bu olasılık şu nedenlerle desteklenmektedir:

- i) İnsan enterositlerinin laktoferinden demir ekstrakte edebilme yeteneği
- ii) Enterositler tarafından Yüksek laktoferrin uptake i (3)
- iii) Anne sütü alımı ve süt laktoferini ile neonatal üriner demir ekskresyonunun korelasyonu (67)
- iv) İntestinal fırça tabakasından demirin laktoferrin ile transportu(13)
- v) Fırça kenar membran veziküllerinde laktoferrinden demir akümüülasyonu (13)

### **Konak defansı**

Laktoferrinin vücut defansında mikroorganizmalara karşı rolü klinik olarak spesifik granüllerin yokluğu olan hastalarda rekürren enfeksiyonların ortaya çıkışı ve laktoferrin eksikliği ile ilişkili bozulmuş granülosit fonksitonu ile manifeeste olmuştur (112, 113). Deneysel E.coli

septisemisinde laktoferrinin protektif etkisinin gösterildiği deneysel çalışmalar ile de bu etkiler gösterilmiştir (114).

Laktoferinin konak defans mekanizmasındaki en iyi bilinen rolü demir sekestre eden özellikleri ile bakterinin proliferasyonunu inhibe defans mekanizması ile bilinmektedir. Weinberg tarafından enfeksiyonlar ve neoplazilere karşı demir kısıtlanması iyi tanımlanmıştır (7,115).

Laktoferrinin geniş spektrumda mikrobiyostatik aktiviteleri olduğu bilinmektedir. Fakat laktoferrin veya transferrinden demir alan bakterilere karşı inefektiflerdir (116). Laktoferrinin bakteriyostatik etkisine ek olarak aynı zamanda bakterisidal de olabileceği bilinmektedir. Laktoferrinin N terminal bölgesinden elde edilen bir peptid olan laktoferrisin B nin bakterisidal etkisinin laktoferrinden birkaç kat daha büyük olduğu söylenmektedir. Laktoferrisin B nin geniş spekturunda mikroorganizmaya karşı letal etkili olduğu ve hızlıca test edilen birçok türün koloni oluşturma kapasitesini inhibe ettiği gösterilmiştir (117). Laktoferrinin bakterisidal etkisi yıkımla örneğin dış bakteriyel membranın hasarı ve permeabilitesinde bozulma ile oluşur. Bakterisidal membran hasarı laktoferrinin membrana ve ardından lipopolisakkaritlerin modüle bir süreçte bir katyona bağlanmasına ( $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$  veya  $Fe^{++}$ ) neden olur (118). Bakteriyel membranın laktoferrin/laktoferrisin reaktif komponentinin porin adı verilen 38 kDa lık bir protein olduğu söylenmektedir (119). Porin normalde LPS in polisakkarit parçası tarafından korunur, bu laktoferrinin anti mikrobiyal etkisini azaltır.

Laktoferrinin aynı zamanda fungisidal ve belki de anti viral etkiler olduğu da gözlemlenmektedir. Kesin antifungal etki açık değildir fakat *Candida albicans* in monoprotein fraksiyonlarının fungi fagositik polimorfonükleer hücrelerin sayısını artırdığı ve laktoferrinin polimorfonükleer lökositlerin yokluğunda bu büyümeyi inhibe edemediği bilinmektedir (120). N terminal laktoferrin fragmanı olan laktoferrisin B nin *Candida albicans*ı direk öldürme ve koloni oluşturma kapasitesini suprese etme yeteneği de gösterilmiştir. Laktoferrinin bakteriyi öldürmesi ile ilgili mekanizma ve  $Ca^{++}$  ve  $Mg^{++}$  varlığında baskılanması gösterilmiştir (121). Nötrofillerin viral enfeksiyonlar esnasında laktoferrin içeriğini azalttığı gösterilmiştir. Kazanılmış nötrofil laktoferrin defisitinin superimpoze postviral bakteriyel enfeksiyonlarda enstrumental olduğu öne sürülmektedir (122). Laktoferrinin viral proliferasyondaki etkisi bu nedenle halen karmaşıktır.

Laktoferrin daha önce de tartışıldığı gibi konak defans mekanizmasında diğer immun süreçleri de modüle ederek geniş bir rol oynamaktadır. İmmunomodülatör rolünü destekleyen gözlemler Tablo 6 da gösterilmiştir.

### **Laktoferrin ve selüler proliferasyon**

Çok sayıda çalışma laktoferrinin selüler proliferasyondaki rolünü destekler. Bu çalışmalar anne sütü ile beslenen yeni doğan hayvanlarda kommersiyel Formüllerle beslenen yeni doğan hayvanlara göre daha iyi gastrointestinal gelişimi içerir (104, 140); süt Formüllerinin timidin incorporasyonunda artış (141) ve timidin inkorporasyonunun sıçan kript hücresi DNA sına laktoferrin ile in vivo augmentasyonu ile ilişkilidir (142). Laktoferrinin büyüme stimulator aktivitesinin yenidoğan saturasyonundaki bağımlılığı demir saturasyonunda bir fare embriyo hücresinde dört kat daha yüksek DNA sentezinde hololaktoferrin ve aynı çizgide apolaktoferrin etkisinde gösterilmiştir (143). Laktoferrinin embriyolar ve yenidoğanlarda büyüme stimule edici faktör olarak rolü sıçan neonatal hepatositlerinde demur sature laktoferrinde daha ileri



olarak desteklenmiştir. Laktoferrinin bu mitojenik özelliklerinin erişkin sıçan hepatositlerine uygulanmadığı gözlemlenmektedir (144). Laktoferrinin kanseröz hücrelerdeki etkisinin stimulator olmaktan ziyade inhibitör olacağı gözlemlenmektedir (14). Fakat halen bazı karmaşa mevcuttur.

Laktoferrinin miyelopezdeki etkisi halen karmaşıktır. Laktoferrin karmaşası ile ilgili bu konu daha önce işlenmiştir (28). Okuyucu hangi noktaların tartışıldığını görmek istiyorsa kaynağa bakabilir (28). Araştırmacıların çoğu laktoferrinin miyelopoezde negatif bir feedback regülatör olarak rol oynadığı görüşündedir (128,133,146,147). Aksiyon mekanizmasının interlökin-1, tümör nekroz faktör ve interlökin2 gibi sitokinlerin salınımı ile olduğu düşünülmektedir (133, 147). Laktoferrinin (a) hemapoietik hücrelerde spesifik reseptörlere bağlandığı (b) bu hücrelerde internalize olduğu ve (c) nükleus içinde DNA ile ilişki halinde bulunduğu gösterilmiştir (146). Ökromatinin laktoferrin inhibitör etkisi için olası fonksiyonel bölge olduğu öne sürülmüştür (148). Laktoferrinin direk olarak hemapoietik hücre proliferasyonunu etkileyebileceği veya direk sitokin regülasyonunda etkisi olup olmadığı halen konfirme edilmelidir.

### **Diğer olası fonksiyon**

Akut faz proteinleri enfeksiyon veya inflamasyonu takiben plazma konsantrasyonu %25 veya daha fazla artan proteinler olarak tanımlanırlar (149). Birçok yazar laktoferrinin bir akut faz proteinine sınıflanabileceğini öne sürmüşlerdir.

Laktoferrin ile antitrombotik bir fonksiyonda ilişkilendirilmiştir. Laktoferrin veya laktoferrin derive maddelerin platelet fonksiyonundaki olası etkileri şu gözlemlerle olmuştur: (a) platelet membranında lakeotferrin reseptörlerinin varlığı (101) (b) ADP -terated platelet agregasyonunu inhibisyonu (c) ADP-terated plateletlerde fibronojen bağlanmasının inhibisyonu ve (d) platelet agregasyonunun, tromboksan jenerasyonunun, serotonin salınımının ve alfa granül membran protein ekspresyonunun inhibisyonu (151).

Konak cevabındaki suçlanan rolüne ek olarak laktoferrin aynı zamanda immunotoleransla da tutulabilir. Kompleman sistemi ile aktivasyonun önlediği gözlemlenmiştir ( hemolitik değerlendirme ile konfirme edilmiş) (152). Klasik kompleman yolağını da aktive edebileceğine dair veriler mevcuttur (139). Belirli oto immun hastalıklarda anti laktoferrin antikörlerin barlığı da immuntolerans için rol oynayabilir ( Tablo 7).

### **Olası klinik uygulamalar**

Laktoferrin inflamasyona cevap olarak non spesifik bir yol ile salındığından herhangi bir olay düzeylerini nötrofil aktivasyonu ve degranülasyonu ile artıracaktır. Bu seviyelerin diagnostik uygulamaları immün stimülasyonun farklı indikatörlerine benzerdir, bunlar neopterin ve elastaz alfa 1 proteinaz inhibitör kompleksi ve diğerleridir,; laktoferrin düzeyleri göreceli olarak nonspesifiktir.çok sayıda klinik uygulamalr yine de literatürde tanımlanmıştır. Bunlar çoğunlukla diagnostik veya prognositik prediktif değere sahiptirler ve plazma laktoferrin determinasyonunu total kan nötrofil havuzu veya nötrofil kinetiğinin indeksi olarak saptarlar (31,53); bu kronik miyeloid lösemi (54), granülositik ösemi(53), kronik aklisifiye pankreatit (108,157), kistik fobrizis (38,158), septisemi (50,159), vasa deferentianın ve seminal veziküllerin konjenital aplazisi (77), şizofreni (160), eklem inflamasyonu ve kartilaj degradasyonu (161), psöriazis (89) ve romatoid artrit (162) tanısında diagnostik bir araçtır.Laktoferrin antikörleri Felty sendromu olan hastalarda da gösterilmiştir ve bu

antikorların saptanması tanıyı kolaylaştırmada yardımcı olabilir (156,163).  $\beta$ -laktoferrin/RNaz ve  $\gamma$  laktoferrin/RNaz ın meme kanseri saptanmasında değeri olabileceği öne sürölmüştür (164). Total plazma laktoferrin konsantrasyonundaki zayıf diskrominatif güç prognositik veya diognositik olarak kullanılmasının olasılığını azaltmıştır.

## **TARTIŞMA**

Laktoferrin ile ilgili geniş spektrumda fonksiyonlar ilişkilendirilmiştir. Bu yüksek spesiyal bir rolden ziyade göreceli non spesifiteyi gösterebilir. Laktoferrinin çoğu fonksiyonları demir kullanılabilirlik özelliği üzerinden göstermesinden dolayı bu fonksiyonları ortaya çıkarabilir fakat bizim şimdiye kadarki bilgi birikimimiz ışığında laktoferrin demir afinitesi hakkında açıklama yapmak güçtür. Laktoferrin fragmanları arasındaki ilişkiler ve interaksyonlar ile ilgili daha fazla bilgi ve farklı demir sature yapılar laktoferrin mekanizmasını anlamak için uzun süre daha araştırılmalıdır.