

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ ВЛИЯНИЯ ЛАКТОФЕРРИНА НА КОСТЕОБРАЗОВАНИЕ. КРИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР.

П.Е.САДЧИКОВ^{4,1}, И.Л.ГОЛЬДМАН¹, С.В.РАЗИН¹,
А.Д. ЧЕРНОУСОВ², Л.И.АЛЕКСЕЕВА³, Е.Р.САДЧИКОВА¹

¹ФБГНУ Институт биологии гена РАН

²ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России

³ФБГНУ Научно-исследовательский институт ревматологии им. В.А. Насоновой

⁴ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

В критическом обзоре систематизированы материалы по прорывным достижениям последнего десятилетия – обнаружению влияния белка ЛФ на костеобразование. Установлено, что ЛФ увеличивает число остеобластов, способных синтезировать костную ткань посредством стимуляции пролиферации и дифференциации этих клеток, что препятствует их гибели. Действие ЛФ превышает таковое для многих других, ранее установленных, костеобразующих факторов. При этом ЛФ повышает способность остеобластов синтезировать и минерализовывать костный матрикс. По-видимому, влияние ЛФ на костный анаболизм обеспечивается наличием в остеобластах специфических рецепторов к ЛФ. Обнаружено, что ЛФ тормозит формирование остеокластов.

Экспериментальные исследования продемонстрировали, что ЛФ предупреждает разрушение костной ткани у овариоэктомированных животных, развивающееся по типу постменопаузального остеопороза у женщин. Получены первые клинические наблюдения, демонстрирующие увеличение срока заживления костных травм при снижении уровня эндогенного ЛФ.

Поскольку молекулярными исследованиями достоверно установлено, что экспрессия гена ЛФ регулируется эстрогенами, уровень которых снижается параллельно развитию постменопаузального остеопороза (ПМО) у женщин, возникает необходимость дальнейшего изучения взаимосвязи этих процессов, что поможет создать реальную основу для управления костеобразованием.



ВВЕДЕНИЕ

Костеобразование – физиологический процесс, который обеспечивает функционирование костной ткани, помогает устранить микроповреждения в костном матриксе, возникающие в течение жизни, сохраняет костную микроархитектуру и поддерживает прочность костей. При этом количество резорбированной кости замещается таким же количеством вновь образованной костной ткани. Резорбция кости осуществляется остеокластами, а в образовании костной ткани участвуют остеобласты. Процессы резорбции и образования костной ткани тесно взаимосвязаны и являются результатом взаимодействия этих клеток. Остеобласты играют ведущую роль в обеспечении ремоделирования костей и регуляции метаболической активности других клеток и веществ, которые контролируют костеобразование на молекулярном уровне. Дисбаланс в процессах резорбции и формирования кости приводит к нарушениям костного обмена и, как следствие этого, к уменьшению костной массы – остеопорозу.

По данным ВОЗ, среди неинфекционных заболеваний остеопороз занимает четвертое место после болезней сердечно-сосудистой системы, онкологической патологии и сахарного диабета. Этим заболеванием страдают около 200 млн. человек в мире. В России около 10 млн. больных остеопорозом. В группу риска по заболеваемости остеопорозом входят 40% людей старше 50 лет. С возрастом плотность костей уменьшается и возникает повышенный риск развития остеопороза, когда кости становятся настолько хрупкими, что даже незначительные нагрузки и травмы приводят к переломам. Особенность остеопороза – его скрытое течение, что дало основание назвать остеопороз «безмолвной эпидемией». Это ставит остеопороз в число актуальных глобальных медико-социальных задач оздоровления населения и требует создания широкой программы профилактических мероприятий, направленных на снижение риска возникновения остеопороза.

Вопреки традиционным представлениям, американские эксперты (U.S.Preventative Services Task Force – USPSTF) утверждают, что широко используемые для профилактики остеопороза пищевые добавки, содержащие витамин D и кальций, малоэффективны, поскольку не было найдено убедительных доказательств того, что они укрепляют костную ткань здоровых мужчин и женщин. Возникающее при этом превышение необходимого физиологического уровня содержания кальция в крови, приводит к нарушениям функции почек, развитию гипертонической болезни, увеличению риска появления сердечно сосудистых заболеваний. Речь при этом идет о здоровых людях, не страдающих остеопорозом и без дефицита витамина D, а также о тех, чей возраст не превышает 65 лет. Более того, эксперты USPSTF считают, что у женщин, у которых в постменопаузе повышен риск развития остеопороза, при приеме таких пищевых добавок в дозах, превышающих 400 МЕ витамина D и 1000 мг кальция ежедневно, ни в более низких дозировках, существенного положительного влияния на состояние их костной ткани не обнаруживается. Напротив, было установлено, что еженедельный прием пищевых добавок с кальцием и витамином D **увеличивает у них риск образования камней в почках**. Вместе с тем, эксперты USPSTF подчеркивают, что их рекомендации, касающиеся людей старше 65 лет, пока остаются прежними – для них прием пищевых добавок с витамином D, в качестве средства профилактики переломов, по-видимому, может быть полезен [1].

Полагают, что дефицит кальция при остеопорозе связан с нарушением механизма удержания этого элемента в организме человека. Специалисты одного из крупнейших частных медицинских центров мира Mayo Clinic (Штат Миннесота США) считают, что для профилактики развития остеопороза достаточно систематическое употребление пищевых продуктов, которые богаты содержани-

clumbar@ya.ru

ем кальция [2]. Тем не менее, исследователи из университета Макгилла в Канаде (McGill University, Montreal), все же рекомендуют профилактическую дозу кальция для мужчин и женщин в возрасте до 55 лет в 1000 мг в день. Они проследили за здоровьем 9033 мужчин и женщин в период между 1999 и 2007 годом. Было показано, что женщины, которые используют кальций в дозировке до 1000 мг/сутки, живут дольше, чем женщины, которые не принимают этой добавки. Для женщин старше 51 года, а также для мужчин, которым за 70 лет, суточную дозу кальция рекомендуют увеличить до 1200 мг в день [3].

Низкая концентрация в организме человека витамина D, как известно, вызывает вторичный гиперпаратиреоз, что может быть одной из причин нарушения костного метаболизма. При повышенном уровне паратиреоидного гормона (ПТГ) из костей начинает вымываться кальций, а также увеличивается риск снижения плотности костной ткани, что может привести к таким нарушениям скелета, как рахит у детей и остеопороз у взрослых, а также к повышению риска возникновения переломов. Исследования показали, что дефицит витамина D может повысить риск возникновения некоторых видов рака, сердечно-сосудистых заболеваний, аутоиммунных расстройств и инфекционных заболеваний. Бесконтрольный прием витамина D, без выявленных показаний, если уровень витамина D не ниже 50 нмоль/л, или «достаточных» 75 нмоль/л, может вызвать гипервитаминоз витамина D, с серьезными последствиями для здоровья человека [4].

Вместе с тем, новозеландские ученые Оклендского университета (University of Auckland), продолжают утверждать, что витамин D, который обычно назначают для профилактической защиты от остеопороза людям в возрасте 50 и более лет, в большинстве случаев бесполезен. Они считают, что после приема добавок с витамином D минеральная плотность костной ткани (МПК) существенно не улучшается. Этот вывод основан на результатах 23 проведенных исследований, где изучалась взаимосвязь между использованием добавок с витамином D и состоянием МПК. В экспериментах приняли участие 4082 здоровых добровольца, средний возраст которых составлял 59 лет. В итоге выяснилось, что у испытуемых, которые принимали такие добавки в течение двух лет, отмечалось незначительное увеличение (на 0,8%) МПК в бедренных костях, а в позвоночнике и предплечье положительных изменений не было. Авторы заключили, что ограничение приема препаратов с витамином D взрослым здоровым людям, которые в нем не нуждаются, позволило бы сэкономить для здравоохранения их страны около 80 млн. фунтов в год бюджетных средств [5]. Необходимую суточную дозу этого витамина D они могут получить благодаря солнечному свету и с некоторыми продуктами питания: рыбий жир, сардины, сельдь, лосось, тунец, молоко и молочные продукты. Эти данные показывают, что низкие дозы витамина D (200-400 МЕ) лучше назначать людям, имеющим его дефицит в организме, а что касается профилактики остеопороза, то они бесполезны [6]. Ранее, сотрудники Бристольского университета (University of Bristol) Великобритании, установили, что уровень витамина D в организме беременных женщин не влияет на состояние костей малыша [7].

Современные физиологи утверждают, что потребность человека в витамине D не ограничивается исключительным участием его в процессах костеобразования. Витамин D рассматривается и как энергетический фактор. Как известно, недостаток витамина D обычно сопровождается мышечной слабостью, причиной которой

может быть нарушение «энергетических станций» клеток – митохондрий. Из глюкозы и кислорода эти органеллы синтезируют богатые энергией молекулы АТФ, активно потребляемые мышечными клетками. Помимо этого энергия АТФ при переизбытке используется для синтеза фосфокреатина, энергия которого затем обратно используется для синтеза АТФ. После мышечного сокращения митохондрии восстанавливают фосфоркреатиновое энергетическое депо. Ученые из Университета Ньюкаста (Newcastle University) Великобритании исследовали скорость восстановления фосфокреатина у пациентов с недостаточностью витамина D [8]. В результате выяснилось, что скорость восстановления фосфокреатина значительно увеличивалась после того, как испытуемые принимали добавки с витамином D в течение 10-12 недель. Таким образом, впервые было показано, что от уровня содержания витамина D в организме человека зависит нервно-мышечная эффективность, обусловленная улучшением мышечного аэробного метаболизма при взаимодействии витамина D с митохондриями. Снижение мышечной активности наблюдается при старении. Введение в рацион пожилых людей добавок с витамином D, за счет увеличения двигательных возможностей, может предотвратить уменьшение физических нагрузок на кости и мышцы, что также может быть одной из причин, способствующих развитию остеопороза. Риск остеопороза в этих случаях предсказуем, как и риск ожирения. В специально проведенных исследованиях при сравнении групп женщин с ПМО было показано, что физически активные женщины имеют более высокие показатели МПК, чем ведущие не активный образ жизни. Общеукрепляющие или силовые упражнения снижали у них ежегодную потерю мышечной массы как в поясничном отделе позвоночника (на который у этой категории женщин приходится до 50% всех переломов), так и в шейке бедренной кости [9]. Кроме того, физические упражнения способствуют предупреждению переломов костей и непрямым путем, поскольку они могут снизить риск падений человека за счет укрепления общего мышечного тонуса.

Хорошо известно, что минеральная плотность костей космонавтов, находящихся на орбите, ежемесячно сокращается на 0,4-1,8%, поэтому длительное нахождение в состоянии невесомости приводит к увеличению риска переломов. Причем этот риск не уменьшается даже спустя десятилетия, у космонавтов наблюдаются частые переломы костей, почти всегда требующие госпитализации и оперативных вмешательств, повышается риск инвалидизации [10]. В Калифорнийском университете (University of California, США) при обследовании первых космонавтов, находившихся на борту Международной космической станции в течение 4 – 6 месяцев, обнаружили, что плотность их костей сократилась на 14%. Три космонавта потеряли от 20 до 30 процентов костной массы – идентичные показатели имеют некоторые пожилые женщины, страдающие от остеопороза. Сегодня на околоземной орбите космонавты регулярно занимаются физическими упражнениями для ограничения вреда, который причиняет отсутствие гравитации [12].

Эволюция знает примеры того, что наземные млекопитающие, перейдя в водную среду и избавившись от силы тяжести, постепенно утратили не только опорные кости, но и конечности. У китов, моржей, морских львов, тюленей и дельфинов остались лишь рудименты конечностей и тазовых костей.

Дискуссия о механизмах костеобразования и профилактической значимости приема препаратов, содержа-

щих кальция и витамин D для предупреждения остеопороза, продолжается. Российская медицинская школа придерживается общепринятых принципов лечения и профилактики остеопороза, включая применение в разных вариантах препаратов кальция и витамина D, диетотерапии и популяризации активного образа жизни. Таких же позиций в настоящее время придерживается Национальное Общество по остеопорозу США и Евросоюза.

В последние годы внимание исследователей привлекают различные уникальные биологически активные белки человека, для которых предполагается возможность их влияния на процессы костеобразования. Новозеландские исследователи впервые обнаружили, и это было подтверждено учеными многих стран, что белок лактоферрин (ЛФ) является активным регулятором роста костной ткани [13-15].

В этой связи возникла необходимость рассмотрения возможных механизмов взаимодействия ЛФ в цепи уже известных механизмов костеобразования.

Лактоферрин как фактор костеобразования и профилактики остеопороза.

Физиологические функции ЛФ многообразны и определяются его биологическими активностями, рис.1.

Для новорожденного ребенка бактерицидный белок материнского молока ЛФ является ключевым белком, оберегающим его от патогенной микрофлоры (бактерии, вирусы, грибки, простейшие), до момента становления у него собственного механизма иммунологической защиты [16-18]. Известно, что у детей, находящихся на искусственном вскармливании, повышен риск возникновения инфекционной патологии и появления различных изменений костной системы.

Наши представления о физиологической роли ЛФ постоянно расширяются. В настоящее время его рассматривают не только как бактерицидный белок, но и как многофункциональный фактор естественного иммунитета, тканевой дифференцировки и активации клеток [19]. При этом ЛФ выступает как новый анаболический фактор, способствующий наращиванию костной массы, в том числе, для обеспечения сращения костей после травм, и ингибированию резорбции костей при остеопорозе. Эти свойства ЛФ могут реализоваться, по крайней мере, за счет трех механизмов. Во-первых, при непосредственном проникновении ЛФ в клетки-предшественники за счет протеиновой части рецептора к липидам низкой плотности (LPR1)[20], во-вторых, при воздействии ЛФ на активационные киназы (МАРК) и активации МАРК-обусловленного сигнального пути [21] и, наконец, активация клеток происходит при взаимодействии ЛФ с Toll-

рецепторами или их функциональными аналогами – рецепторами «молекул опасности» [22,23], рис. 2.

Эти же механизмы могут иметь место и при стимуляции ЛФ процессов костеобразования. При этом были получены убедительные доказательства того, что в физиологических концентрациях ЛФ потенцирует стимуляцию пролиферации и дифференцировку остеобластов. В специальных экспериментах, проведенных с помощью конфокального микроскопа, было установлено, что ЛФ может активировать остеобласты при проникновении в эти клетки посредством LRP1. В этом случае активация остеобластов происходит за счет фосфорилирования МАР-киназ p42/44. Помимо этого, активация остеобластов ЛФ происходит и при его взаимодействии LRP1 на поверхности клеток. В обоих случаях ЛФ действует как фактор, ингибирующий апоптоз остеобластов и подавляющий формирование остеокластов [14,24]. Впоследствии, с помощью гистохимических методов было установлено, что ЛФ в основном накапливается в периостеоцитах, хондробластах и, что особенно важно, в остеоцитах, что может способствовать стимуляции пролиферации плюрипотентных стволовых клеток, способных усилить костеобразование [25].

В совокупности, полученные данные позволяют считать, что ЛФ как фактор костеобразования, может обеспечить профилактику развития остеопороза [14 ,24, 26].

Согласно нашим представлениям, при различных травмах или хирургических воздействиях, связанных с костями, участие ЛФ в регенеративных процессах костеобразования, по-видимому, реализуется следующим образом: в результате повреждения различных тканей выделяются молекулы опасности – алармины (high-mobility group protein B1 (HMGB1), S100белок, IL-α, IL-33), необходимые для восстановления поврежденных тканей, в том числе и костной [27], которые взаимодействуют с аларминовыми рецепторами на поверхности лейкоцитов, при этом происходит выделение провоспалительных цитокинов (TNFα, IL-6, IL-1β, IL-8, INFγ) (рис. 3. 1). Далее, под воздействием IL-8, который является хемотаксическим фактором для нейтрофилов, в зону повреждения кости мигрируют сегментоядерные лейкоциты, из гранул которых выделяется ЛФ (рис. 3.2). Далее, на III-стадии ЛФ погружается соответственно в остеобласты (ОБ), активируя их, и в остеокласты (ОК), ингибируя их активность. Согласно данной модели ЛФ одновременно является и фактором, реализующим перенос кальция. Способность ЛФ связывать кальций хорошо известна. По-видимому, перенос кальция в костную ткань обусловлен комплексом Ca⁺⁺-калмодулин-ЛФ (на рисунке LF- Calmodulin-Ca⁺⁺) [28].

Подобные процессы могут иметь место и при пероральном использовании ЛФ для профилактики развития остеопороза, что было экспериментально подтверждено на овариоэктомированных животных по снижению у них частоты проявления остеопороза при пероральном использовании ЛФ.

Это обстоятельство позволяет рассматривать ЛФ как основу для создания комплексных лекарственных препаратов, вклю-



Энхансер иммунного ответа

Рисунок 1

Биологические активности лактоферрина.

Таблица 1

Объект	Регламент и методы исследования	Результаты	Ссылка
Крысы, самки (Sprague-Dawley)	Самкам крыс в возрасте 6 месяцев (n=60), подвергшимся OVX и контрольным (n = 10), перорально вводили bLF в дозах 10, 100, 1000 и 2000 мг/ кг. Спустя 6 месяцев было проведено контрольное изучение костной массы животных и ее микроструктуры, с использованием микро компьютерного томографа и определения в крови факторов остеокластогенеза (OPG ; RANKL; BALP; OC; CTX и NTX).	У мышей, получавших bLF, установлено значительное повышение объема костей (с увеличением количества и толщины трабекул, при уменьшении трабекулярного разобщения). Большие дозы bLF (1000 и 2000 мг/ кг) значительно увеличивали минеральную плотность кости, по сравнению с необработанными крысами. В сыворотке крови подопытных животных наблюдалось значительное увеличение BALP, OC и снижение уровня CTX и NTX . Показано, что bLF значительно увеличивал уровни OPG , и подавлял RANKL уровни и RANKL / OPG соотношение.	[29]
Крысы (Sprague-Dawley)	Самки крыс после OVX (n=48) и контрольные крысы (n=12), подвергшиеся имитации этой операции, были случайным образом разделены на четыре подопытные группы. Животных кормили коровьим молозивом (BCAP) через желудочный зонд один раз в день, в течение 12 недель. Определялось содержание минералов в костной ткани, минеральная плотность, микроархитектура кости и ее биомеханические свойства	Обнаружено, что белки BCAP:LF; IGF-2; EGF и OPN увеличивали содержание минеральных веществ и минеральную плотность кости, что было показано на примере бедренной кости животных. Этот положительный эффект увеличивался при повышении дозы BCAP.	[30]
Крысы (Sprague-Dawley)	3-х месячные крысы после OVX (n=70) перорально получали bLF в дозах: 0,85, 8,5 и 85 мг/кг. Контрольные животные (n=10) получали (85 мг/кг bLF), или заместительную терапию эстрогенами. Продолжительность эксперимента составляла 3 месяца. Исследовались маркеры костной резорбции, плотность и микроструктура костей животных.	Установлено, что bLF, в сравнении с BSA, лучше нивелировал потерю костной массы, при уменьшении уровня биохимических маркеров костной резорбции в сыворотке крови животных, повышал минеральную плотность кости и улучшал микроструктуру кости. Показан дозозависимый эффект положительного действия bLF на костную ткань животных.	[31]
Мыши (СЗН)	Самки мышей (n=110) в возрасте 3 месяцев, после OVX, были разделены на несколько групп. Одна группа животных перорально получала диету (AIN-93M), вторая группа животных получала это же питание, но с добавлением bLF в количестве 10г/кг корма. Эксперимент проводился 1, 2 и 4 месяца. Минеральная плотность кости животных и иммунные параметры измерялись методом проточной денситометрии. Для количественного определения цитокинов плазмы крови использовали метод полимеразной цепной реакции в реальном времени.	В группе животных, получавших bLF, по сравнению с контролем, незначительно снизилась костная резорбция. В костной микро-среде была предотвращена активация Т-клеток, восстановились дендритные связи и популяция В-клеток.	[32]
Мыши (линия не указана)	Половозрелым самцам мышей, при помощи LIF была усилена костная резорбция, после чего они были поделены на пять групп. Три группы (по n=15) ежедневно получали (подкожно) одну из трех доз bLF (0,04, 0,4 или 4 мг/кг), и еще две группы (по n=9) получали BSA, в дозе 4 мг/кг. Животные были забиты через 10 дней после последней инъекции LIF. Оценка результатов проводилась при помощи флюорохромной гистоморфометрии фрагментов костей.	Показано, что у мышей, получавших bLF в дозе 4 мг/кг, образование костной ткани было ускорено почти в 4 раза по сравнению с контрольными животными.	[13]

Таблица 2

Влияние лактоферрина на культуры клеток костной ткани животных.

Объект	Регламент и Методы исследования	Результаты	Ссылка на статью
Остеобласто-подобные клетки крыс.	Культуру первичных остеобласто-подобных клеток крыс обрабатывали лактоферрином (bLF и hLF) с повышением концентрации 10, 100 и 1000 мкг/мл. Остеогенные узелки окрашивали методом VonKossa.	Исследования показали, что лактоферрин человека и коров, в концентрациях более 100 мкг/мл существенно увеличивали остеогенную дифференцировку и пролиферацию остеобласто-подобных клеток, и их выживаемость <i>in vitro</i> .	[13]
Культуры клеток костного мозга мышей	Для оценки влияния bLF на остеокластогенез в культурах мышечных костномозговых клеток и на зрелые остеокласты, производилась обработка bLF в концентрациях 1, 10 и 100 мкг/мл. Оценка результатов производилась при помощи окраски TRAP и исследования зон костных дефектов остеокластов.	Установлено, что, bLF замедляет остеокластогенез вплоть до полной остановки пролиферации остеокластов. Показан дозозависимый эффект bLF. Прямого влияния на зрелые остеокласты не показано.	[13]
Культура костных клеток кроликов	Культуру клеток, состоящую из остеобластов, остеокластов, и стромальных клеток, обрабатывали bLF в дозе 10 мкг/мл. Оценка полученных данных производилась при помощи окрашивания зрелых клеток, и исследования OPG/RANKL/RANK структур.	Показано значительное снижение остеокластогенеза и увеличение скорости пролиферации остеобластов.	[33]

Сокращения к таблице

bLF (bovine lactoferrin) – коровий лактоферрин; OPG (osteoprogenin) остеопрогерин; RANKL – Ligand of receptor activator of nuclear factor kappa B (рецептор – активатор ядерного фактора каппа-бета) – член суперсемейства факторов некроза опухоли; RANK – активатор рецептора фактора лиганда каппа – Б; BALP (bone isoenzyme of alkaline phosphatase) костный изофермент щелочной фосфатазы; OC (osteocalcin) остеокальцин; CTX (C-Telopeptide Of Type I Collagen) C-мелонептид коллагена первого типа; NTX (N-Telopeptide Of Type I Collagen) N-мелонептид коллагена первого типа; TNF (Tumor necrosis factor) фактор некроза опухоли; IGF-2 (Insulin-like growth factor 2) Инсулиноподобный фактор роста 2; EGF (Epidermal growth factor) Эпидермальный фактор роста; LIF (Leukemia inhibitory factor) – лейкемия-ингибирующий фактор. OPN – (Osteopontin) остеопонтин. TRAP – tartrate-resistant acid phosphatase – устойчивая к тарtrateму кислая фосфатаза.

OVX – овариоэктомия.

чающих все элементы, необходимые для нормального костеобразования.

Экспериментальные исследования влияния лактоферрина на костеобразование

У овариоэктомизированных (OVX) лабораторных животных регулярно развиваются симптомы остеопороза, аналогично проявлению ПМО у женщин. По этой причине данная модель была выбрана для изучения возможности купирования нарушений костеобразования при пероральном введении ЛФ. Основные исследования были выполнены в Новой Зеландии, Китае и Франции, табл. 1.

Результаты исследований крыс и мышей после OVX, представленные в табл.1, однозначно свидетельствуют об определенном защитном влиянии бычьего ЛФ и коровьего молозива на костеобразование у подопытных животных.

Стимулирующее действие ЛФ было обнаружено и на культурах клеток костной ткани животных, табл.2

Клинические исследования влияния лактоферрина на костеобразование

В нескольких американских центрах (N-terminus Research Laboratory, Pomona, CA, USA; Western University of Health Sciences, Pomona, CA, USA; University of Southern California, Los Angeles, CA, USA) были проведены клинические наблюдения по изучению профилактической эффективности перорального использования РНКаз-обогащенного коровьего лактоферрина (R-ELF) у женщин в постменопаузальном периоде.

В исследовании, длительностью 6 месяцев, участвовало 38 женщин в возрасте 45 – 60 лет. Экспери-

ментальная группа из 20 женщин перорально принимала (R-ELF), в дозировке 125 мг 2 раза в сутки, вместе с препаратом кальция (1200 мг в сутки). Контролем была группа из 15 женщин, которая получала плацебо и в тех же дозировках принимала аналогичную суточную дозу кальция. Были изучены различные общепринятые показатели синтеза и резорбции костей.

По результатам проведенного наблюдения было показано снижение маркеров костной резорбции: уровень сыровоточного N-телопептида (NTx) на 24% и уровня дезоксипиридолина в моче (uDpd) на 14%. Вместе с тем, произошло увеличение показателей остеосинтеза: костной фракции щелочной фосфатазы (BALP) на 45 % и остеокальцина (OC) в сыворотке крови на 16 % – костной фракции щелочной фосфатазы (BAP) и остеокальцина (OC), которые повышались от 14 до 45% [34]. Положительный эффект использования (R-ELF) дополнялся снижением провоспалительных цитокинов интерлейкина-6 (IL-6) на 44% и ФНО-альфа (TNF-α) на 10%, увеличением концентрации противовоспалительных цитокинов – интерлейкина -10 (IL-10) на 140%, по сравнению с контрольной группой. По сравнению с группой плацебо наблюдалось снижение (-50%) RANKL и C-реактивного белка (CRP) [35].

Известно, что у взрослых людей ЛФ при воздействии ферментов желудка может разрушаться. В этой связи апробировалась возможность его применения в капсулах. К сожалению, желаемого эффекта сохранения ЛФ достигнуто не было. Позднее группа японских исследо-

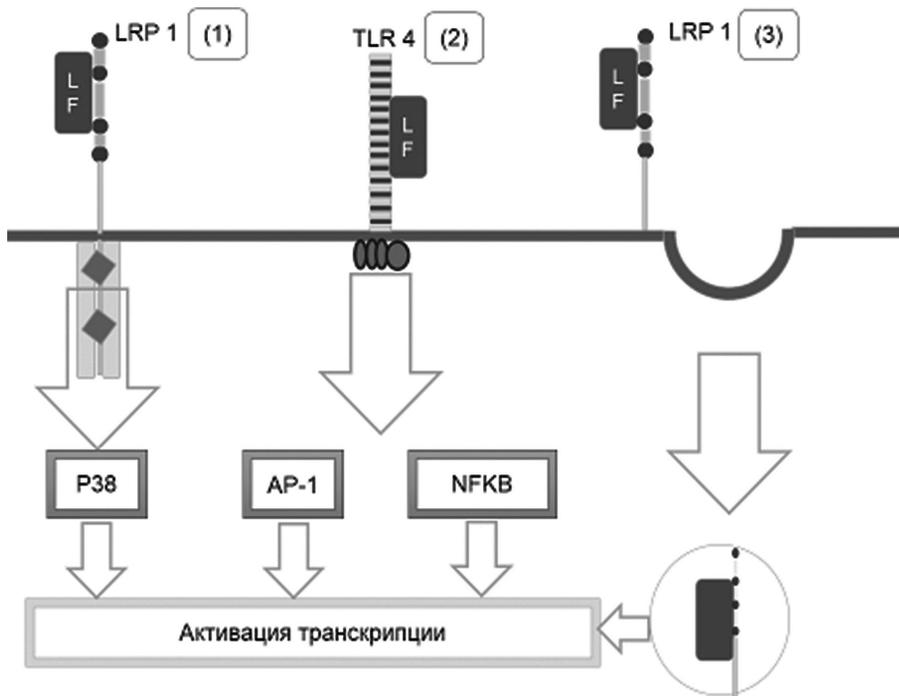


Рисунок 3

Механизм активации лактоферрином пролиферации и дифференцировки соматических клеток различного происхождения. 1– LRP1 – зависимая активация MAPK – сигнального пути; 2– TLR4– TLR-зависимый сигнальный путь; 3– LRP1– зависимое проникновение лактоферрина в клетку и непосредственная активация – факторов транскрипции: P38, AP-1 и NFκB.

вателей успешно применила пероральное введение ЛФ с использованием липосом на мышах, крысах и свиньях. Сравнивались 2 варианта липосомализации коровьего ЛФ: с использованием яичного желтка, фосфатидилхолина и фитоосерина. Было показано, что способ липосомализации не влияет на эффективность проявления биологической активности ЛФ [64].

Липосомы, обогащенные лактоферрином, получаемые с питьем, снижали у животных проявления воспаления, вызванного липополисахаридами и улучшали процесс костеобразования. Затем исследования были выполнены на добровольцах [64]. Липосомальный лактоферрин увеличивал концентрацию интерферона альфа в крови у здоровых волонтеров. Параллельно выполнялись два исследования: в первом здоровые волонтеры ежедневно получали по 300 мг лактоферрина в сутки в течение 4-х недель. Контроль состояния обследуемых проводился в четыре срока: исходно, в первую, четвертую неделю и через 3 недели после окончания приема. Второе исследование – двойное слепое сравнительное, где были сформированы 2 группы из добровольцев, первым из которых внутрь перорально давали липосомальный лактоферрин, а вторым – плацебо [65].

Ни одного побочного эффекта в обоих исследованиях зарегистрировано не было.

У всех добровольцев, принимающих липосомальный лактоферрин, в сыворотке крови в течение всего эксперимента увеличивалась концентрация интерферона-альфа 1 (в среднем, с $8,408 \pm 3,108$ IU/ml до $14,966 \pm 3,442$ IU/ml). После трех недельной отмены приема липосомального лактоферрина уровень интерферона альфа возвращался к исходному. По мнению авторов – липосомы с лактоферрином могут быть использованы в пищевых добавках или препаратах для лечения воспалительных и инфекционных заболеваний человека, в том числе, осте-

опороза, ЛФ угнетает разрушение костей, связанное с инфекционным воспалением, вследствие снижения остеокластогенеза, а при помощи LRP1, LRP2, МАП-киназы – активизируется рост остеобластов [65].

Регуляция гена лактоферрина человека при ПМО

Пусковым механизмом ПМО, который является причиной спонтанных переломов костей у каждой 3 – 4-й женщины в возрасте 50 – 55 лет и старше, связан с возрастной гормональной перестройкой, проявляющейся снижением уровня эстрогенов. При этом одновременно регистрируется снижение активности остеобластов, сочетаемое с ослаблением их тормозящего эффекта на функцию остеокластов. Это предопределяет сдвиг в ремоделировании костей в сторону преобладания процессов резорбции.

Механизмы воздействия половых гормонов на костную ткань до конца не выяснены. В качестве одной из причин ПМО в последние годы активно ис-

следуется роль ЛФ. Известно, что развитие эстрогендефицитных состояний и торможение процесса регуляции экспрессии гена ЛФ – это два параллельно происходящих события, возникающие на фоне гормонального сдвига у стареющих женщин. Если принять во внимание, что ЛФ является одним из факторов остеогенеза, тогда может стать понятным, что ослабление его экспрессии может быть одной из причин нарушения стабилизации костной системы при ПМО.

Установлено, что ген ЛФ, обеспечивающий экспрессию этого белка не только в клетках молочной железы, но и клетках слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта, половых органов женщин и др., миелоидных клетках (особенно в гранулоцитах) и клетках головного мозга, четко регулируется в определенной связи с лактацией и менструальными циклами в зависимости от уровня женских половых гормонов. Это предполагает наличие ряда регуляторных модулей, взаимодействие которых обеспечивает специфичный характер экспрессии гена ЛФ в различных тканях. Можно было ожидать, что система регуляции экспрессии этого гена окажется достаточно сложной. В этой связи весьма неожиданным является то, что до сих пор не обнаружено никаких удаленных регуляторных элементов (энхансеров, области контроля локуса, дифференциально метилированных участков), контролирующей работу гена ЛФ. Основной ансамбль известных на настоящий момент регуляторных элементов, контролирующей экспрессию гена ЛФ, расположен в промоторной области этого гена. Они представляют собой единый промоторно-энхансерный блок. У человека размер этого регуляторного блока составляет всего 400 п.н. (ген ЛФ человека имеет протяженность 24,5 т.п.н и включает 17 экзонов, зрелая мРНК ЛФ человека имеет длину 2390 п.н. (NM_002343), длина кодиру-

ющей последовательности ЛФ у разных видов млекопитающих варьирует от 2055 до 2190 п.н. [36].

Активация промотора гена ЛФ в клетках различного происхождения осуществляется разными транскрипционными факторами, сайты связывания которых, находятся в границах этого энхансер-промоторного блока.

Установлено, что в составе энхансер-промоторного блока гена ЛФ человека (рис. 4) присутствует элемент, ответственный за связывание рецептора эстрогена (estrogen responsive element, ERE) и так называемый элемент связывания стероидогенного фактора SFRE (steroidogenic factor binding element).

Некоторые авторы называют этот элемент участком связывания стероидного (родственного рецептору эстрогена) фактора 1, ERRα1 [37]. ERE и SFRE находятся на расстояниях 339-365 п.н. и 376-398 п.н. соответственно от места начала транскрипции. В экспериментах по кратковременной трансфекции конструкторов с репортерным геном ERE сам по себе обеспечивает существенное повышение уровня экспрессии ЛФ в ответ на эстроген [38]. Механизм активации эстрогеном промотора гена ЛФ человека во многом похож на имеющий место у других млекопитающих. В то же время имеются и определенные различия. Так в промоторе ЛФ мыши отсутствует SFRE элемент. Стимуляция эстрогеном транскрипции репортерного гена увеличивается приблизительно в два раза, когда в промоторной области присутствует SFRE элемент [39]. Участки связывания рецептора эстрогена (ERE) и фактора, родственного рецептору эстрогена (SFRE), перекрываются с участками связывания COUP-TF (chicken ovalbumin promoter transcription factor) (рис. 4) [40,41]. Первоначально COUP-TF был открыт как фактор, связывающийся с промотором гена овальбумина курицы. Впоследствии было продемонстрировано, что этот

фактор, имеющий сходство со стероидным рецептором, широко распространен и играет важную роль в нейрогенезе, органогенезе и эмбриогенезе [42,43]. При этом связывание COOP-TF со своими участками узнавания в границах энхансер-промоторного блока гена ЛФ (рис. 4) является даже более стабильным, чем связывание рецептора эстрогена. При наличии COOP-TF в достаточном количестве, активация промотора ЛФ эстрогеном подавляется.

Первое появление ЛФ в клетках можно обнаружить в раннем эмбриональном развитии на стадии 2 – 4 клеток до стадии формирования бластоциста. Потом он появляется в нейтрофильных лейкоцитах на поздней стадии формирования плода и эпителиальных клетках пищеварительного и дыхательного трактов. Таким образом, новорожденный ребенок рождается со сформировавшейся системой продукции этого биологически активного белка. Иммунологические механизмы, которым обычно приписывают контроль над костеобразованием, у грудных детей в этот период находятся еще в процессе становления. В процессе раннего развития ребенка у него формируется иммунологический аппарат. Параллельно происходит интенсивный рост и развитие его внутренних органов, мышечной ткани и костной системы. В связи с этим, понятна необходимость дополнительного количества ЛФ, получаемого ребенком с молоком матери в период грудного вскармливания, не только для защиты от патогенной микрофлоры, но и для обеспечения нормального развития костной системы ребенка. Во время физиологически протекающей беременности, на фоне усиления гормональной активности, повышение экспрессии гена ЛФ обнаруживается не только в клетках молочных желез (пик концентрации ЛФ приходится на молозиво – 5 – 7 г/л), но и в сыворотке крови (среднее содержа-

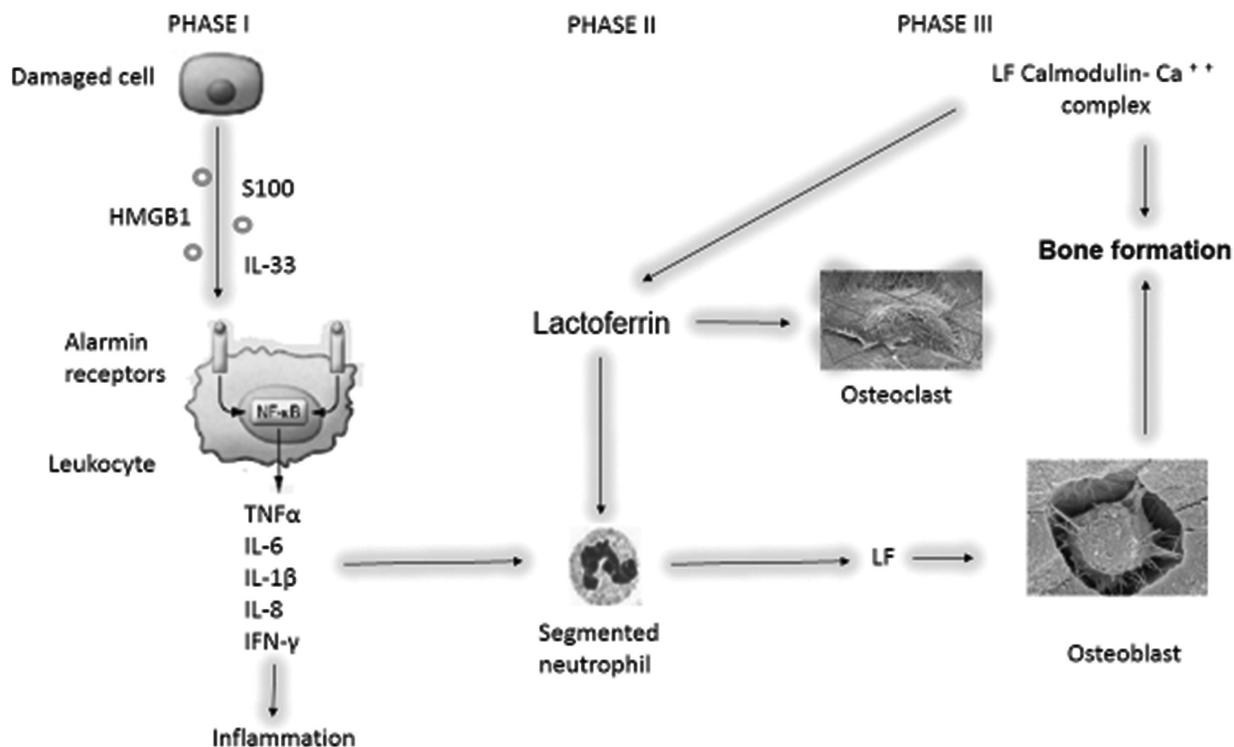


Рисунок 3

Модель формирования костной ткани под воздействием лактоферрина (Объяснение в тексте)
 Алармины (high-mobilitygroupprotein B1 (HMGB1), S100 белок, IL-α, IL-33), провоспалительные цитокины (TNFα, IL-6, IL-1β, IL-8, INFγ) (рис. 3. 1 комплекс Ca⁺⁺-калмодулин-ЛФ (на рисунке LF- Calmodulin-Ca⁺⁺))

ние ЛФ в сыворотке крови здоровых небеременных женщин 958 нг/мл, на протяжении нормально протекающей беременности – 1646 нг/мл и резко повышается при беременности, осложненной инфекционной патологией – 4430 нг/мл, особенно, вирусной этиологии, при гепатитах В и С – 3540-4977 нг/мл и ВИЧ-инфекции 5120 нг/мл). Было бы интересным исследовать уровень экспрессии гена ЛФ в случае назначения заместительной гормональной терапии (ЗГТ) женщинам при ПМО. Клинически в этих случаях использование эстрогенов может на четверть снизить риск переломов позвоночника, шейки бедра, предплечья и других переломов, связанных с ПМО, однако это было бы слишком простым решением данной проблемы. Эпидемиологические исследования свидетельствуют, что при ЗГТ часто наблюдаются нежелательные побочные эффекты: прибавка веса пациенток, повышение артериального давления. У пожилых женщин увеличивается риск тромбоза глубоких вен и холелитиаза, возрастает риск развития рака молочной железы. Начатое плацебо – контролируемое исследование WHI (Women's Health Initiative) 16600 постменопаузных женщин в возрасте 50 – 79 лет, получавших ежедневно эстрогены, либо эстроген-гестагенную терапию более 5 лет, в котором дизайн исследования был рассчитан на 8,5 лет, было преждевременно остановлено, вследствие отрицательного воздействия ЗГТ на различные системы организма: на 29% увеличился риск коронарной болезни сердца, на 41% риск инсульта, на 26% риск рака молочной железы [44].

Многофункциональность ЛФ вызывает необходимость его присутствия на протяжении всей жизни человека. Это, в свою очередь, требует наличия альтернативных возможностей активации работы гена ЛФ в условиях естественного возрастного снижения уровня эстрогенов в постменопаузальном периоде у женщин. Действительно, энхансер-промоторный блок гена ЛФ устроен таким образом, что позволяет обеспечить возможность дифференциальной активации этого гена в разных типах клеток в ответ на разные стимулы. Такая пластичность регуляторных систем связана с тем, что физиологические функции ЛФ весьма многообразны. Хотя само название “лактоферрин” указывает на то, что этот белок экспрессируется в клетках эпителия молочной железы, где активность промотора ЛФ стимулируется эстрогеном. Однако он экспрессируется и в целом ряде других клеток: найден в секретах практически всех эндокринных желез, включая слезы, слюну, назальные и бронхиальные секреты, желчь, панкреатический сок, семенную жидкость и пот. При этом промотор гена ЛФ может активироваться различными транскрипционными факторами.

Транскрипция гена ЛФ под действием альтернативных промоторов –SP1 и P2 – ведет к образованию двух продуктов мРНК ЛФ и дельта-ЛФ, который не содержит N-концевой сигнальной последовательности и потому не обладает рядом свойственных ЛФ функций.

Сайты связывания транскрипционных факторов, регулирующих экспрессию гена ЛФ в миелоидных клетках, находятся в непосредственной близости от точки начала транскрипции гена ЛФ. В пределах 89 п.н. находится кластер участков связыва-

ния различных транскрипционных факторов (рис. 5), в том числе универсального активатора транскрипции SP1 и факторов, связывающихся с ССААТ энхансерным элементом (enhancer binding protein, C/EBP) [45].

В модельных экспериментах было показано, что данный фрагмент промотора гена ЛФ (89 п.н.) обеспечивает избирательную транскрипцию репортерного гена в миелоидных клетках, но не клетках другого происхождения [45]. С помощью мутационного анализа и ряда других экспериментальных подходов было установлено, что ключевую роль в активации транскрипции играют факторы C/EBP и SP1, причем эффект действия этих факторов оказался кооперативным. Это позволило предположить, что C/EBP и SP1 взаимодействуют друг с другом. Данное предположение представлялось достаточно убедительным и в силу того, что участки связывания SP1 фланкируют участок связывания C/EBP. В связи с этими результатами следует обратить внимание на то, что в клетках существует целое семейство C/EBP факторов (и SHOR10/GADD153) [46,47].

Последующие исследования подтвердили, что ключевую роль в активации транскрипции гена ЛФ по ходу дифференцировки миелоидных клеток человека играет C/EBP. Связывающийся с тем же участком узнавания фактор C/EBP, напротив, подавляет активность промотора. Существует и другой негативный регулятор активности промотора гена ЛФ в миелоидных клетках человека. Это CDP/cut (CCAAT displacement protein). CDP/cut, который препятствует связыванию различных транскрипционных факторов с ССААТ энхансером и координированно подавляет экспрессию гена ЛФ и всех других генов группы SGP (secondary granule protein) [48,49].

Обнаружен целый ряд агентов, которые, по крайней мере, в экспериментах на культурах клеток, могут стимулировать экспрессию гена ЛФ. К их числу относятся ретиноевая кислота, факторы роста и бактериальные липополисахариды. Ретиноевая кислота активирует ген ЛФ через посредство соответствующего рецептора, который связывается с мотивом AGGTCA (retinoic acid response element, RARE). В промоторе гена ЛФ человека этот элемент перекрывается с ERE (участком узнавания рецептора эстрогена) [50]. Представляется очевидным, что

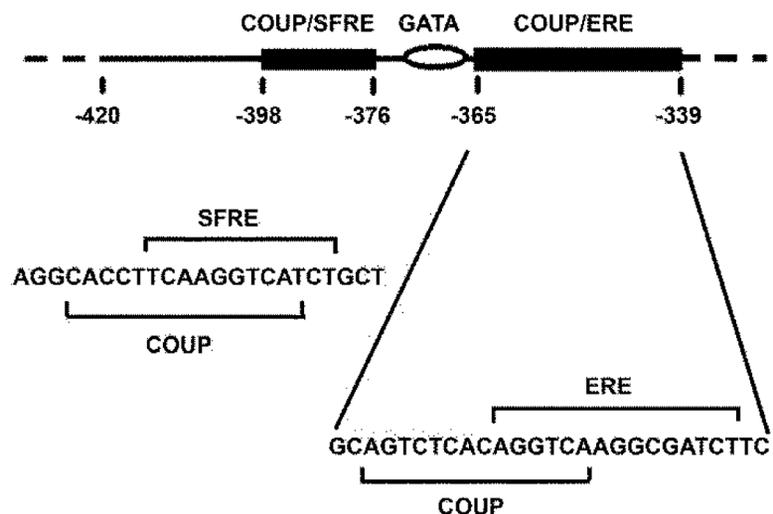


Схема части энхансер-промоторного блока гена лактоферрина человека, включающей регуляторные элементы, ответственные за активацию промотора эстрогеном. Расстояния указаны в п.н. от старта транскрипции. Объяснение в тексте.

эстроген и ретиноевая кислота не могут аддитивно активировать транскрипцию гена ЛФ. Действительно, в экспериментах на культурах клеток было продемонстрировано, что, в противоположность эстрогену, ретиноиды не могут активировать транскрипцию ЛФ в клетках опухолей молочной железы и, более того, подавляют активирующий эффект эстрогена. В то же время ретиноиды являются мощными активаторами транскрипции ЛФ в ряде линий эритроидных клеток человека [50].

В энхансер-промоторном блоке гена ЛФ мыши обнаружен особый модуль (**mitogen-response unit**), ответственный за активацию экспрессии эпидермальным фактором роста (EGF) и другими митогенами [51-53]. Этот модуль включает активаторные элементы, отвечающие на действие цАМФ и EGF. О присутствии аналогичного модуля в энхансер-промоторном блоке гена ЛФ человека пока не сообщалось.

Особого внимания заслуживают сообщения о том, что экспрессия гена ЛФ человека может стимулироваться бактериальными липополисахаридами (LPS) [54]. Это служит очередным подтверждением роли ЛФ в работе системы врожденного иммунитета [55]. В энхансер-промоторном блоке гена ЛФ коровы обнаружены функциональные модули, ответственные за стимуляцию экспрессии гена бактериальными липополисахаридами. Эти блоки включают сайты связывания транскрипционных факторов NF-карраВ и AP1 [56]. Данные результаты хорошо согласуются с наблюдениями, демонстрирующими, что в активации бактериальными липополисахаридами промотора ЛФ человека участвует NF-карраВ [54].

Инактивация гена ЛФ посредством эпигенетических механизмов является одним из этапов возникновения опухолевых клеток. Конкретные механизмы этой инактивации еще только начинают изучаться. Однако уже имеются достаточно убедительные свидетельства того, что важную роль здесь играет метилирование ДНК. При этом нельзя исключить и влияния других эпигенетических механизмов, работающих, в частности, на уровне модификаций нуклеосомных гистонов.

Подводя итог, можно сказать, что активация гена ЛФ транскрипционными факторами имеет комплексный характер, и конечный эффект зависит от соотношения концентраций стимулирующих и репрессирующих факторов. Организация энхансер-промоторной области гена ЛФ обеспечивает возможность дифференциальной активации экспрессии этого гена через посредство различных регуляторных каскадов в различных типах клеток. Последнее представляется особенно интересным в силу того, что прямо указывает на участие ЛФ в работе системы врожденного иммунитета (innate immunity).

Обнаруженная во многих типах клеток укороченная по сравнению с полноразмерным ЛФ форма – ЛФ-дельта не является продуктом пост-трансляционной деградации полноразмерного ЛФ. В клетках существует особая м-РНК, которая кодирует ЛФ-дельта. Синтез этой РНК начинается с альтернативного промотора (P2), расположенного в первом интроне гена ЛФ [57,58]. Хотя первоначальные наблюдения указывали на то, что ЛФ-дельта присутствует только в нормальных клетках [58], в последующих работах было продемонстрировано, что обе

формы ЛФ экспрессируются как в нормальных, так и в опухолевых клетках [59]. Промотор P2 чрезвычайно активен в культивируемых лимфоидных клетках (Jurkat, U937). Работа этого промотора регулируется транскрипционным фактором Ets [60]. Функции ЛФ-дельта на настоящий момент остаются не вполне ясными. ЛФ-дельта присутствует не только в цитоплазме, но и в клеточном ядре [59]. Согласно некоторым данным, ЛФ-дельта является транскрипционным фактором, активирующим определенную группу генов [61,62]. Однако результаты цитированных выше авторов не получили пока независимого подтверждения. То же можно сказать и о результатах, демонстрирующих, что сверхэкспрессия ЛФ-дельта приводит к остановке клеточной пролиферации [63].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пока неясно, каким должен быть уровень ЛФ для предупреждения развития остеопороза, а тем более для купирования уже наступивших по этой причине патологических изменений в костной системе организма женщин. Предстоит также выяснить значение бактерицидного белка ЛФ в терапии костных травм, осложненных остеомиелитом. Пока мы находимся на эмпирической стадии исследований в этом направлении. Окончательное представление о профилактическом и лечебном воздействии ЛФ на костеобразование можно будет получить лишь на пути изучения тонких механизмов этого взаимодействия. Тогда станет понятным, достаточным ли будет использование экзогенного ЛФ в качестве лекарственного средства, или возникнет необходимость стимуляции его экспрессии в организме для защиты костной системы человека, что станет еще одним показанием для гормональной терапии патологических изменений в системе костеобразования человека.

SUMMARY

In present critical review of systematized materials on the breakthrough achievements of the last decade – the discovery of the effect of protein lactoferrin (LF) on bone formation. It is shown that LF increases the number of osteoblasts, stimulate their proliferation and differentiation, and prevents their destruction. Action of LF exceeds that of many other previously established bone-forming factors. LF increases the ability of osteoblasts to synthesize and mineralize bone matrix. Apparently, the effect of LF on bone anabolism ensured by the presence of specific receptors on osteoblasts. It was found that LF also inhibits the formation of osteoclasts.

Experimental studies have demonstrated that LF prevents the destruction of bone tissue in ovariectomized animals and, thus, developing the type of postmenstrual osteoporosis in women. We get the first clinical studies demonstrating



Расположение сайтов связывания различных транскрипционных факторов в непосредственной близости от старта транскрипции гена лактоферрина человека. Объяснения в тексте.

an increase in the period of healing of bone injuries while reducing the level of endogenous LF.

Since molecular research establishes that the expression of the LF gene is regulated by estrogen, which reduces the development of postmenopausal osteoporosis (PMO) in women, there is a need to further investigate the relationship of these processes, which will help to create a basis for the management of bone formation.

ЛИТЕРАТУРА

1. Moyer VA; US Preventive Services Task Force. Vitamin D and calcium supplementation to prevent fractures in adults: US Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann Intern Med.* 2013;158:691-696.
2. Osteoporosis prevention. <http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/osteoporosis/basics/prevention/con-20019924>
3. L. Langsetmo, C Berger, N Kreiger, C. S. Kovacs, D. A. Hanley DA, Jamal SA, Whiting SJ, Genest J, Morin SN, Hodsman A. Calcium and vitamin D intake and mortality: results from the Canadian Multicentre Osteoporosis Study (CaMos) *Clin Endocrinol Metab.* 2013 Jul;98(7):3010-8. doi: 10.1210/jc.2013-1516. Epub 2013 May 23.
4. Martínez Díaz-Guerra G1, Jódar Gimeno E, Reyes García R, Gómez Sáez JM, Muñoz-Torres M; [Normocalcemic primary hyperparathyroidism: recommendations for management and follow-up]. *Endocrinol Nutr.* 2013 Oct;60(8):456.e1-6. doi: 10.1016/j.endonu.2013.01.015. Epub 2013 May 7.
5. Borland S. £16 vitamin D treatment that cost the NHS £2400 due to 'supply problems' <http://www.dailymail.co.uk/health/article-2104048/16-vitamin-D-treatment-cost-NHS-2400-supply-problems.html>
6. I. R. Reid MD, M. J. Bolland PhD, A. Grey MD Effects of vitamin D supplements on bone mineral density: a systematic review and meta-analysis // *The Lancet* – 11 January 2014 (Vol. 383, Issue 9912, Pages 146-155).
7. Lawlor DA1, Wills AK, Fraser A, Sayers A, Fraser WD, Tobias JH. Association of maternal vitamin D status during pregnancy with bone-mineral content in offspring: a prospective cohort study. *Lancet.* 2013 Jun 22;381(9884):2176-83. doi: 10.1016/S0140-6736(12)62203-X. Epub 2013 Mar 19.
8. Hill TR, Granic A, Davies K, Collerton J, Martin-Ruiz C, Siervo M, Mathers JC, Adamson AJ, Francis RM, Pearce SH, Razvi S, Kirkwood TB, Jagger C. Serum 25-hydroxyvitamin D concentration and its determinants in the very old: the Newcastle 85+ Study. *Osteoporos Int.* 2016 Mar;27(3):1199-208. doi: 10.1007/s00198-015-3366-9. Epub 2015 Oct 14.
9. Wolff I., van Croonenborg J., Kemper H.C.G. et al. The effect of exercise training programs on bone mass: control trials in pre and postmenopausal women. *Osteoporosis Int.*, 1999, 9: 1-12.
10. S Iwase, N Nishimura and T Mano "Topics in Osteoporosis", book edited by Margarita Valdes Flores, ISBN 978-953-51-1066-8, Published: May 15, 2013 under CC BY 3.0 license
11. http://archive.today.uci.edu/news/release_detail.asp?key=1864
<http://www.dailymail.co.uk/sciencetech/article-1129089/Astronauts-risk-hip-fractures-later-life-space-damages-bone-strength.html>
<http://www.space.com/6354-space-station-astronauts-lose-bone-strength-fast.html>
12. Cornish J, Callon KE, Naot D, Palmano KP, Banovic T, Bava U, Watson M, Lin JM, Tong PC, Chen Q, Chan VA, Reid HE, Fazzalari N, Baker HM, Baker EN, Haggarty NW, Grey AB, Reid IR. Lactoferrin is a potent regulator of bone cell activity and increases bone formation in vivo. *Endocrinology.* 2004 Sep;145(9):4366-74. Epub 2004 May 27.
13. Naot D, Grey A, Reid IR, Cornish J. Lactoferrin--a novel bone growth factor. *Clin Med Res.* 2005 May;3(2):93-101.
14. Cornish J, Palmano K, Callon KE, Watson M, Lin JM, Valenti P, Naot D, Grey AB, Reid IR. Lactoferrin and bone; structure-activity relationships. *Biochem Cell Biol.* 2006 Jun;84(3):297-302.
15. H.J. Vogel. Biochemistry Research Group, 233. *Biochem. Cell Biol.* 90: 233-244 (2012) doi:10.1139/O2012-01
16. Jan M. Steijns and A. C. M. van Hooijdonk. Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin. *British Journal of Nutrition* 2000, 84, Suppl. 1, S11±S17.
17. Naidu AS Lactoferrin : Natural . Multifunctional. *Antimicrobial.* 2000, Boca Raton: CRC Press LLC.
18. Legrand D., Pierce A., Ellass E. et al. J. Lactoferrin structure and functions. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2008; v. 606:p.163-94.
19. Lillis A., Van Duyn L., Murphy-Ullrich J., and Strickland D. The low density lipoprotein receptor-related protein 1: Unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies *Physiol Rev.* 2008 July; 88(3): 887-918.
20. Siao SC., Li KJ, Hsieh SC, et.al Tamm-Horsfall glycoprotein enhances PMN phagocytosis by binding to cell surface-expressed lactoferrin and cathepsin G that activates MAP kinase pathway *Molecules.* 2011 Mar 3;16(3):2119-34.
21. Curran CS, Demick KP, Mansfield JM. Lactoferrin activates macrophages via TLR4-dependent and -independent signaling pathways. *Cell Immunol.* 2006; 242(1):23-30
22. Oh SM, Pyo CW, Kim Y, Choi SY. Neutrophil lactoferrin upregulates the human p53 gene through induction of NF-kappaB activation cascade. *Oncogene.* 2004; 23(50):8282-9.
23. Włodarski K. Lactoferrin--a promising bone-growth promoting milk-derived glycoprotein. *Chir Narzadow Ruchu Ortop Pol.* 2009 Sep-Oct;74(5):257-9,322-3.
24. Ieni A, Barresi V, Grosso M and Tuccari G. Immunohistochemical evidence of lactoferrin in human embryo-fetal bone and cartilage tissues *Cell Biol Int.* 2010 Aug;34(8):845-9. doi: 10.1042/CBI20090358].
25. Cornish J, Naot D. Lactoferrin as an effector molecule in the skeleton *Biometals.* 2010 Jun;23(3):425-30. doi: 10.1007/s10534-010-9320-6. Epub 2010 Mar.
26. Chan J.K., Roth J., Oppenheim J.J, Alarmins: awaiting a clinical response *J Clin Invest.* 2012 August 1; 122(8): 2711-2719.
27. Gifford JL, Ishida H, Vogel HJ. Structural characterization of the interaction of human lactoferrin with calmodulin. *PLoS One.* 2012;7(12):e51026 .
28. Hou JM1, Xue Y, Lin QM. Bovine lactoferrin improves bone mass and microstructure in ovariectomized rats via OPG/RANKL/RANK pathway. *Acta Pharmacol Sin.* 2012 Oct;33(10):1277-84. doi: 10.1038/aps.2012.83. Epub 2012 Aug 20.
29. Du M1, Xu W, Yi H, Han X, Wang C, Zhang L. Protective effects of bovine colostrum acid proteins on bone loss of ovariectomized rats and the ingredients identification. *Mol Nutr Food Res.* 2011 Feb;55(2):220-8. doi: 10.1002/mnfr.200900593.
30. Guo HY1, Jiang L, Ibrahim SA, Zhang L, Zhang H, Zhang M, Ren FZ. Orally administered lactoferrin preserves bone mass and microarchitecture in ovariectomized rats. *J Nutr.* 2009 May;139(5):958-64. doi: 10.3945/jn.108.100586. Epub 2009 Mar 25.
31. Malet A1, Bournaud E, Lan A, Mikogami T, Tomé D, Blais A. Bovine lactoferrin improves bone status of ovariectomized mice via immune function modulation. *Bone.* 2011 May 1;48(5):1028-35. doi: 10.1016/j.bone.2011.02.002. Epub 2011 Feb 16.

32. Cornish J, Callon K, King A, Edgar S, Reid IR. The effect of leukemia inhibitory factor on bone in vivo. *Endocrinology* 1993, 132:1359–1366.
33. Bharadwaj S, Naidu AG, Betageri GV, Prasadarao NV, Naidu AS. Milk ribonuclease-enriched lactoferrin induces positive effects on bone turnover markers in postmenopausal women. *Osteoporos Int.* 2009 Sep;20(9):1603-11.
34. Bharadwaj S, Naidu TA, Betageri GV, Prasadarao NV, Naidu AS. Inflammatory responses improve with milk ribonuclease-enriched lactoferrin supplementation in postmenopausal women. *Inflamm. Res. Inflamm Res.* 2010 Nov; 59(11):971-8.
35. Kang, J. F., Li, X. L., Zhou, R. Y., Li, L. H., Feng, F. J., and Guo, X. L. Bioinformatics analysis of lactoferrin gene for several species. *Biochem Genet* 2008, 46, 312-322.
36. Shi, H., Shigeta, H., Yang, N., Fu, K., O'Brian, G., and Teng, C. T. Human estrogen receptor-like 1 (ESRL1) gene: genomic organization, chromosomal localization, and promoter characterization. *Genomics* 1997, 44, 52-60.
37. Teng, C. T., Liu, Y., Yang, N., Walmer, D., and Panella, T. Differential molecular mechanism of the estrogen action that regulates lactoferrin gene in human and mouse. *Mol Endocrinol* 1992, 6, 1969-1981.
38. Yang, N., Shigeta, H., Shi, H., and Teng, C. T. Estrogen-related receptor, hERR1, modulates estrogen receptor-mediated response of human lactoferrin gene promoter. *J Biol Chem*, 1996: 271, 5795-5804.
39. Wang, L. H., Tsai, S. Y., Cook, R. G., Beattie, W. G., Tsai, M. J., and O'Malley, B. W. COUP transcription factor is a member of the steroid receptor superfamily. *Nature*; 1989, 340, 163-166.
40. Teng, C. T., Gladwell, W., Beard, C., Walmer, D., Teng, C. S., and Brenner, R. Lactoferrin gene expression is estrogen responsive in human and rhesus monkey endometrium. *Mol Hum Reprod*; 2002, 8, 58-67 6.
41. Cooney, A. J., Lee, C. T., Lin, S. C., Tsai, S. Y., and Tsai, M. J. Physiological function of the orphans GCNF and COUP-TF. *Trends Endocrinol Metab*, 2001 12, 247-251.
42. Sugiyama, T., Wang, J. C., Scott, D. K., and Granner, D. K. Transcription activation by the orphan nuclear receptor, chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor I (COUP-TFI). Definition of the domain involved in the glucocorticoid response of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *J Biol Chem*; 2000 275, 3446-3454.
43. Rossouw JE1, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J. Risks and benefits of estrogen + progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*, 2002, 288:321-333.
44. Khanna-Gupta, A., Zibello, T., Simkevich, C., Rosmarin, A. G., and Berliner, N. Sp1 and C/EBP are necessary to activate the lactoferrin gene promoter during myeloid differentiation. *Blood*; 2000 95, 3734-3741. 10.
45. Darlington, G. J., Ross, S. E., and MacDougald, O. A. The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. *J Biol Chem*; 1998 273, 30057-30060.
46. Nerlov, C. C/EBPs: recipients of extracellular signals through proteome modulation. *Curr Opin Cell Biol* 20, 180-185; Takiguchi, M. (1998). The C/EBP family of transcription factors in the liver and other organs. *Int J Exp Pathol*; 2008 79, 369-391.
47. Khanna-Gupta, A., Zibello, T., Sun, H., Gaines, P., and Berliner, N. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) studies indicate a role for CCAAT enhancer binding proteins alpha and epsilon (C/EBP alpha and C/EBP epsilon) and CDP/cut in myeloid maturation-induced lactoferrin gene expression. *Blood* 2003, 101, 3460-3468.
48. Khanna-Gupta, A., Zibello, T., Sun, H., Lekstrom-Himes, J., and Berliner, N. C/EBP epsilon mediates myeloid differentia-
- tion and is regulated by the CCAAT displacement protein (CDP/cut). *Proc Natl Acad Sci*; 2001 USA 98, 8000-8005.
49. Lee, M. O., Liu, Y., and Zhang, X. K. A retinoic acid response element that overlaps an estrogen response element mediates multihormonal sensitivity in transcriptional activation of the lactoferrin gene. *Mol Cell Biol*; 1995 15, 4194-4207.
50. Shi, H., and Teng, C. Promoter-specific activation of mouse lactoferrin gene by epidermal growth factor involves two adjacent regulatory elements. *Mol Endocrinol*; 1996 10, 732-741; 16.
51. Shi, H., and Teng, C. T. Characterization of a mitogen-response unit in the mouse lactoferrin gene promoter. *J Biol Chem* ; 1994, 269, 12973-12980.
52. Teng, C., Shi, H., Yang, N., and Shigeta, H. Mouse lactoferrin gene. Promoter-specific regulation by EGF and cDNA cloning of the EGF-response-element binding protein. *Adv Exp Med Biol*; 1998 443, 65-78.
53. Li, Y., Limmon, G. V., Imani, F., and Teng, C. Induction of lactoferrin gene expression by innate immune stimuli in mouse mammary epithelial HC-11 cells. *Biochimie.* 2009 Jan;91(1):58-67.
54. Firth, M. A., Shewen, P. E., and Hodgins, D. C. Passive and active components of neonatal innate immune defenses. *Anim Health Res Rev*; 2005, 6, 143-158. 20.
55. Zheng, J., Ather, J. L., Sonstegard, T. S., and Kerr, D. E. Characterization of the infection-responsive bovine lactoferrin promoter. *Gene*; 2005 353, 107-117.
56. Liu, D., Wang, X., Zhang, Z., and Teng, C. T. An intronic alternative promoter of the human lactoferrin gene is activated by Ets. *Biochem Biophys Res Commun*; 2003, 301, 472-479.
57. Siebert, P. D., and Huang, B. C. (1997). 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.
58. Goldberg, G. S., Kumimoto, T., Alexander, D. B., Suenaga, K., Ishidate, F., Miyamoto, K., Ushijima, T., Teng, C. T., Yokota, J., Ohta, T., and Tsuda, H. Full length and delta lactoferrin display differential cell localization dynamics, but do not act as tumor markers or significantly affect the expression of other genes. *Med Chem*; 2005, 1, 57-64. 24.
59. Liu, D., Wang, X., Zhang, Z., and Teng, C. T. An intronic alternative promoter of the human lactoferrin gene is activated by Ets. *Biochem Biophys Res Commun*; 2003, 301, 472-479.
60. Mariller, C., Benaissa, M., Hardiville, S., Breton, M., Pradelle, G., Mazurier, J., and Pierce, A. (2007). Human delta-lactoferrin is a transcription factor that enhances Skp1 (S-phase kinase-associated protein) gene expression. *FEBS J*; 2007, 274, 2038-2053.
61. Mariller, C., Hardiville, S., Hoedt, E., Benaissa, M., Mazurier, J., and Pierce, A. Proteomic approach to the identification of novel delta-lactoferrin target genes: Characterization of DcpS, an mRNA scavenger decapping enzyme. *Biochimie*, 2009 Jan; 91(1):109-22.
62. Breton, M., Mariller, C., Benaissa, M., Caillaux, K., Browaeys, E., Masson, M., Vilain, J. P., Mazurier, J., and Pierce, A. Expression of delta-lactoferrin induces cell cycle arrest. *Bio-metals*; 2004, 17, 325-329. 28.
63. Ishikado A¹, Imanaka H, Takeuchi T, Harada E, Makino T. Liposomalization of lactoferrin enhanced its antiinflammatory effects via oral administration. *Biol Pharm Bull.* 2005 Sep; 28(9):1717-21.
64. Inubushi T, Kawazoe A, Miyauchi M, Kudo Y, Ao M, Ishikado A, Makino T, Takata T. Molecular mechanisms of the inhibitory effects of bovine lactoferrin on lipopolysaccharide-mediated osteoclastogenesis. *J Biol Chem.* 2012 Jul 6;287(28):23527-36. doi: 10.1074/jbc.M111.324673. Epub 2012 May 16.