

## LAKTADHERYNA MAŁE BIAŁKO O WIELKICH MOŻLIWOŚCIACH\*

LACTADHERIN – SMALL PROTEIN WITH BIG POTENTIAL

Tomasz MISZTAL, Marian TOMASIAK

Zakład Chemii Fizycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

*Streszczenie:* Laktadheryna (znana także jako *milk fat globule factor 8 – MFG-F8*) jest glikoproteina o masie 47 kDa, po raz pierwszy wykrytą w błonie kuleczek tłuszczowych mleka. Laktadheryna jest wydzielana przez komórki nabłonka gruczołu piersiowego u ludzi, krów i myszy. Obecność tego białka w mleku kobiecym odgrywa ważną rolę w ochronie dzieci przed zakażeniami rotawirusowymi. Laktadheryna jest produkowana także przez komórki mięśni gładkich naczyń krwionośnych, komórki śródbłonka i makrofagi. Białko w części N-końcowej ma domenę analogiczną do nabłonkowego czynnika wzrostu – EGF (*epidermal growth factor*), umożliwiającą jego wiązanie do integrzyn  $\alpha V\beta 5$  i  $\alpha V\beta 3$ . W części C-końcowej obecna jest domena C2, która odpowiada za stereospecyficzne przyłączanie do fosfatydylo-L-seryny (PS). Struktura ta determinuje różnorodne funkcje fizjologiczne tej glikoproteiny. Laktadheryna wydzielana przez makrofagi stymuluje fagocytozę cząstek apoptotycznych przez tworzenie mostków pomiędzy PS na powierzchni komórek apoptotycznych oraz integrzynami  $\alpha V\beta 3$  na powierzchni fagocytów. Nieobecność lub obniżone stężenie laktadheryny prowadzą do akumulacji resztek komórek apoptotycznych w warstwie podśródbłonkowej naczyń krwionośnych, co prowadzi do przyspieszonego wytwarzania płytek miażdżycowych. Laktadheryna odgrywa także rolę w oczyszczaniu krwioobiegu z eksponujących PS mikropęcherzyków zrzucanych przez płytki krwi, zapobiegając stanom nadkrzepliwości. Domena C2 laktadheryny, wiążąca PS, wykazuje homologię z domenami C2 obecnymi w czynnikach krzepnięcia krwi VIII i V. Ze względu na stosunkowo niską masę cząsteczkową i odporność na trawienie, laktadheryna może służyć jako łatwo przyswajalny związek o aktywności antykoagulacyjnej, gdyż może blokować wiązanie do PS (inhibicja kompetycyjna) czynników krzepnięcia VIII i V, a co za tym idzie hamować tworzenie aktywnych kompleksów tenazy i protrombinazy na powierzchni eksponujących PS płytek krwi, mikropęcherzyków i erytrocytów. Laktadheryna wykazuje duże podobieństwo do aneksyny V. Jednakże w przeciwieństwie do niej, laktadheryna wiąże się do błon przy znacznie niższym stężeniu PS i nieobecności jonów wapnia. W niniejszym opracowaniu szczegółowo przedstawiono aktualne spojrzenie na funkcje laktadheryny.

*Słowa kluczowe:* laktadheryna, aneksyna V, aktywność prokoagulacyjna, czynniki krzepnięcia krwi, fagocytoza, miażdżyca, anemia sierpowata.

*Summary:* Lactadherin (also known as milk fat globule factor 8, MFG-F8) is a 47 kDa glycoprotein that was found in milk fat globule membranes. Lactadherin is secreted into milk by mammary epithelial cells of

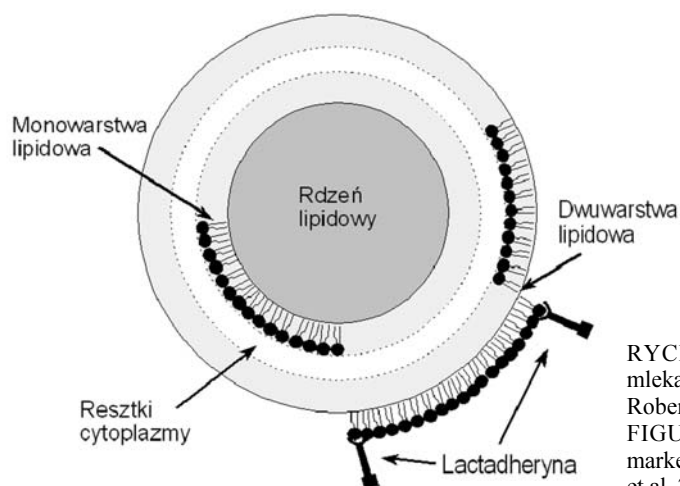
\*Dofinansowanie: środki własne.

humans, cows and mice. Its presence in milk is associated with protecting a breast-fed children against rotavirus infections. The protein is also produced by vascular smooth muscle cells, endothelial cells and macrophages. Lactadherin at the N-terminal part has an EGF-like domain (epidermal growth factor-like domain) enabling its binding to  $\alpha V\beta 5$  and  $\alpha V\beta 3$  integrins and at the C-terminus has a C2 domain responsible for a stereospecific binding to phosphatidyl-L-serine (PS). The presence of such structures determines multiple physiological functions of this protein. Lactadherin secreted by macrophages promotes the phagocytosis of apoptotic particles by forming a bridges between PS on apoptotic cells and  $\alpha V\beta 3$  integrins on phagocytes. Lactadherin deficiency leads to accumulation of apoptotic cell debris in subendothelium and thus alters the protective immunologic response which leads to an acceleration of atherosclerotic plaque development. Lactadherin may also play a role in the clearance of PS-expressing platelet derived microparticles from the circulation thus reducing hypercoagulable state. PS binding C2 domain of lactadherin shares homology with the C2 domains of blood coagulation factor VIII and factor V. Due to its relatively low molecular weight and resistance to digest lactadherin may serve as an easy bioavailable molecule with high potency to inhibit (competitively) factors VIII and V binding with PS-expressing platelets, platelet derived microparticles or erythrocytes and thus reduce formation of procoagulant tenase and prothrombinase complexes. Lactadherin exhibits a great similarity to annexin V. However, in contrast to annexin V, lactadherin binds to the membranes at much lower PS concentration and in the absence of calcium. This review presents evidence supporting these novel roles of lactadherin.

*Key words:* lactadherin, annexin V, procoagulant activity, blood coagulation factors, phagocytosis, atherosclerosis, sickle cell disease.

## WSTĘP

Laktadheryna (ang. *lactadherin*, inne nazwy: *bovine-associated mucoprotein*, PAS6/7, BA-46, P47, MFG-E8 [34]) jest glikoproteiną po raz pierwszy wyizolowaną z kuleczek tłuszczowych mleka krowiego [34, 36]. Jest w nich umiejscowiona po zewnętrznej stronie zewnętrznej dwuwarstwy lipidowej i stanowi jedną z dominujących frakcji białkowych (patrz rycina 1) [52]. W kolejnych latach odkryto jej obecność także w innych tkankach i narządach: męskim układzie moczowo-płciowym [35], nabłonku gruczołu piersiowego, przewodach żółciowych, gruczołach potowych,



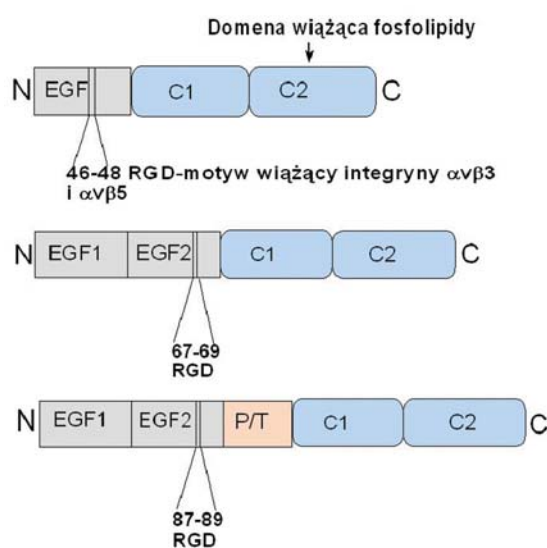
RYCINA 1. Kuliczka tłuszczowa mleka z zaznaczoną laktadheryną [wg Robenek i wsp. 2006]  
FIGURE 1. Milk fat globule with marked lactadherin [acc. to Robenek et al. 2006]

akrosomie plemnikach [34], nowotworach gruczołu piersiowego [10], mięśniach gładkich tętnic [17], keratynocytach [50]. Jest też produkowana i wydzielana przez stymulowane makrofagi [11] oraz niedojrzałe komórki dendrytyczne i pochodzące od nich egzosomy [53].

Badania strukturalne nad laktadheryną wykazały, że ma ona domeny wykazujące homologię do domen czynników krzepnięcia V i VIII oraz domeny łączące się z receptorami integrynowymi obecnymi m.in. na powierzchni fagocytów. Wysłunięto więc przypuszczenie, że białko to może modulować kinetykę krzepnięcia i wpływać na proces fagocytozy. Był to początek drogi odkrywania funkcji i roli laktadheryny. Od tej pory dokonano wielu odkryć, które stawiają tę glikoproteinę w świetle zainteresowania naukowców, także ze względu na możliwość praktycznego jej zastosowania w medycynie.

## STRUKTURA LAKTADHERYNY

Laktadheryna wołowa jest białkiem zbudowanym z 427 aminokwasów (wliczając 18-aminokwasową sekwencję sygnałową). Występuje w dwóch izoformach o masach 47 i 50 kDa. Różnice w masie wynikają z różnego stopnia glikozylacji; jedna z form jest O-glikozylowana przy Ser9 i N-glikozylowana przy Asn41 i Asn209 (określana jako PAS6), druga O-glikozylowana przy Thr16 i N-glikozylowana przy Asn41 (określana jako PAS7) [34]. Laktadheryna ludzka jest zbudowana z 387, a szczurza z 427 aminokwasów. U myszy wykazano istnienie tzw. długiej (463 aminokwasów) i krótkiej (426 aminokwasów) formy laktadheryny. Forma długa w odróżnieniu od formy krótkiej ma dodatkowy 37-aminokwasowy region bogaty w



RYCINA 2. Porównanie budowy domennej laktadheryny (od góry): ludzkiej, wołowej i mysiej. Szczegółowy opis domen znajduje się w tekście [wg Shao i wsp. 2008]

FIGURE 2. Comparison of domain structure of human (from above), bovine and mice lactadherin. Details in text [acc. to Shao et al. 2008]

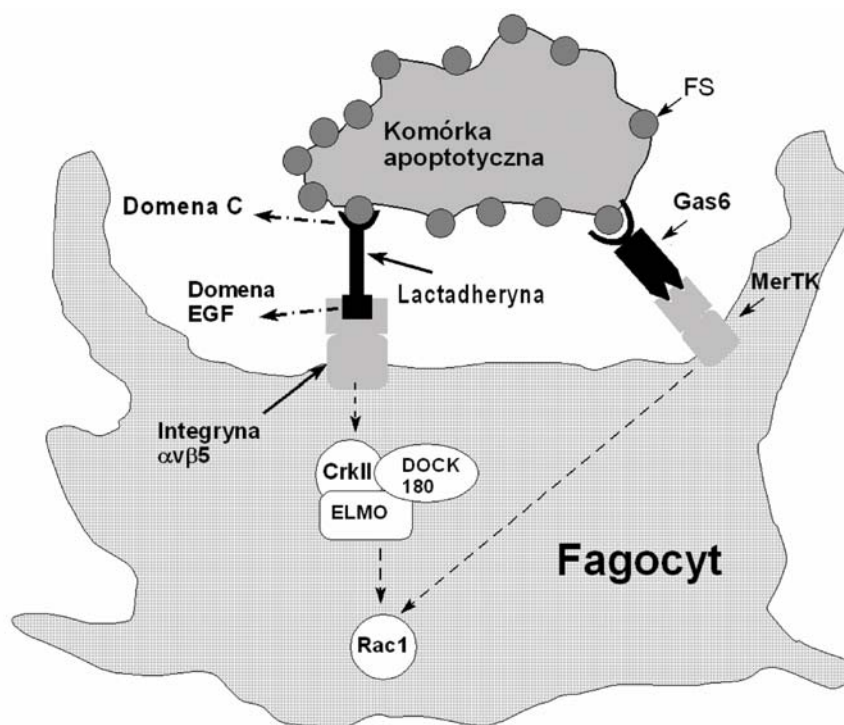
prolinę i treoninę (*P/T rich region*) (ryc. 2). Forma długa wydaje się mieć związek z apikalną sekrecją białka, natomiast obecność formy krótkiej wykazano w wielu tkankach niepełniących funkcji wydzielniczej [50]. Do powstania formy długiej i krótkiej dochodzi na etapie posttranskrypcyjnej modyfikacji pre-mRNA podczas alternatywnego splicingu [19]. Laktadheryna wołowa ma w części N-końcowej dwie domeny EGF (nazwa od homologii do nabłonkowego czynnika wzrostu – *epidermal growth factor*) i dwie domeny C (C1 i C2) w części C-końcowej (ryc. 2) [38]. Ludzka laktadheryna ma jedną domenę EGF, sekwencja pozostałych trzech domen jest w 67% homologiczna z laktadheryną wołową [10]. Domeny EGF odpowiadają za przyłączanie do receptorów integrynowych typu  $\alpha V\beta 5$  i  $\alpha V\beta 3$  [45]. Obecny na drugiej z domen EGF (licząc od N-końca) motyw RGD (arginina-glicyna-kwas asparaginowy w sekwencji) jest rozpoznawany i wiązany przez receptory integrynowe [38]. Domeny C wykazują dużą homologię do dyskoidyn (*discoïdin domains*) [19]. Domeny typu C występują także w cząsteczkach czynników krzepnięcia V i VIII. Pełnią rolę w wiązaniu tych czynników z obszarami błon plazmatycznych bogatymi w aminofosfolipidy [38]. Z tego też powodu funkcjonuje również nazwa „domeny C typu F5/8” [35]. Zgodność sekwencji domeny C2 ludzkiej laktadheryny, głównej domeny odpowiedzialnej za wiązanie do błony, wynosi odpowiednio 43% i 38% w porównaniu z sekwencją analogicznej domeny czynnika krzepnięcia V i VIII [19]. Szczególnie dobrze poznana została struktura trzeciorzędowa domeny C2. Można przedstawić ją jako beczułkę, której ściany buduje 8 struktur beta, otoczonych przez 11 struktur beta połączonych nieregularnymi pętlami. W obrębie pętli znajdują się 4 aminokwasy hydrofobowe (Trp26, Leu28, Phe31 i Phe81 domeny C2), które skierowane są w stronę fazy wodnej i odpowiadają za dokowanie laktadheryny do błony fosfolipidowej [38]. Struktura domeny C2 determinuje mechanizm wiązania do błony, który jest podobny do mechanizmu wiązania do błon czynników V i VIII krzepnięcia [56]. Głównym fosfolipidem, do którego wiąże się laktadheryna, jest fosfatydyloseryna (PS) oraz w mniejszym stopniu fosfatydyloetanolamina (PE) [49]. Laktadheryna może więc tworzyć mostki pomiędzy komórką eksponującą PS a komórką mającą odpowiedni receptor integrynowy np. makrofagiem [51]. Mechanizm wiązania jest stereoselektywny i polega podobnie jak w przypadku czynników krzepnięcia V i VIII na rozpoznaniu motywu fosfo-L-seryny w cząsteczce fosfatydyloseryny [19, 40]. Badania wykazały brak wiązania laktadheryny do fosfatydylo-D-seryny [18, 40] oraz wiązanie do fosfatydylo-L-seryny na syntetycznych błonach fosfolipidowych [41] (ryc. 2).

## ROLA LAKTADHERYNY W MECHANIZMIE FAGOCYTOZY

Proces apoptozy związany jest z utratą asymetrycznego rozmieszczenia fosfolipidów w błonie plazmatycznej. Utrata asymetrii błon spowodowana jest przechodzeniem PS z wewnętrznej monowarstwy fosfolipidowej do zewnętrznej. Pojawiająca się na powierzchni błony komórkowej PS stanowi sygnał do fagocytozy [24]. Rolą

fizjologiczną fagocytozy jest nie tylko likwidowanie patogenów, ale przede wszystkim usuwanie cząstek apoptotycznych. Jeżeli ten mechanizm jest zakłócony, dochodzi do nagromadzenia martwych komórek i ich fragmentów, co może powodować wystąpienie szkodliwego stanu zapalnego.

Spośród wielu receptorów powierzchniowych komórek biorących udział w fagocytozie możemy wyróżnić takie, dla których ligandem jest bezpośrednio PS oraz takie, które przyłączają ligandy pośredniczące między komórką apoptotyczną a fagocytem. Do pierwszej kategorii receptorów należą np. białko CD14 czy tzw. „receptory zmiatające” (ang. *scavenger receptors*), takie jak: SRA, CD68, CD36 czy LOX. Do drugiej kategorii receptorów zaliczamy receptory przyłączające takie ligandy, jak np: trombospondyna, laktadheryna,  $\beta 2$  glikoproteina I czy tzw. „defensywne kolageny” [22]. Receptory przyłączające laktadherynę należą do receptorów integrynowych typu  $\alpha V\beta 3$  i  $\alpha V\beta 5$  znajdujących się na powierzchni makrofagów oraz niedojrzałych komórek dendrytycznych, w których odpowiadają za prezentowanie antygenów [55]. Laktadheryna może stanowić pomost pomiędzy komórką/cząstką eksponującą PS a receptorem integrynowym obecnym na powierzchni komórki fagocytującej. Laktadheryna poprzez domenę C2 wiąże się jednym końcem do PS, a drugim poprzez motyw RGD na domenie EGF do receptora integrynowego



RYCINA 3. Udział laktadheryny we wzmacnianiu sygnału do fagocytozy komórki apoptotycznej eksponującej fosfatydyloserynę (FS). Dalsze objaśnienia w tekście [wg Wu i wsp. 2006]  
 FIGURE 3. Lactadherin participate in amplification of signalling between phosphatidylserine-exposure apoptotic cell and phagocyte [acc. to Wu et al. 2006]

znajdującego się na powierzchni fagocyta. Sygnał przekazywany poprzez receptory wiążące laktadherynę umożliwia rozpoznawanie i wiązanie komórki/cząstki. Jednak aby zaszła internalizacja związanej komórki/cząstki, wymagana jest aktywacja receptora innego typu. Może nim być receptorowa kinaza tyrozynowa Mer-TK wymagająca do swojej aktywacji ligandu łączącego ją z komórką przeznaczoną do pochłonięcia przez fagocyt. Ligandem tym może być np. białko Gas6 (ang. *growth arrest-specific 6*) [21, 51]. Indukcja fagocytozy poprzez wiązanie laktadheryny do receptora integrynowego zachodzi przez aktywację modułu CrkII-ELMO-DOCK180, który aktywuje GTPazę Rac1. Białko to jest plejotropowym (wielofunkcyjnym) regulatorem komórkowym, odpowiedzialnym m.in. za procesy związane z fagocytozą, w tym reorganizację cytoszkieletu (ryc. 3) [11]. Można przypuszczać więc, że laktadheryna pełni funkcję wzmacniania sygnału do fagocytozy pochodzącego od receptorów innego typu. Takie przypuszczenia potwierdziły liczne badania, w których wykazano, że brak lub deficyt laktadheryny w znacznym stopniu osłabia proces fagocytozy, co może prowadzić do nagromadzenia martwych komórek i ich fragmentów, a w rezultacie do licznych stanów patologicznych. Badania w modelach mysich wykazały daleko idącą korelację pomiędzy deficytem laktadheryny a rozwojem miażdżycy, nagromadzeniem się martwych komórek w różnych narządach czy zwiększonym stężeniem mikropecherzyków w osoczu [1, 6, 12]. Wykazano ponadto, że wiązanie laktadheryny do błon eksponujących PS wzrasta proporcjonalnie do obniżania potencjału transmembranowego podczas apoptozy [46].

## **ROLA LAKTADHERYNY W FAGOCYTOZIE MIKROPECHERZYKÓW PŁYTKOWYCH**

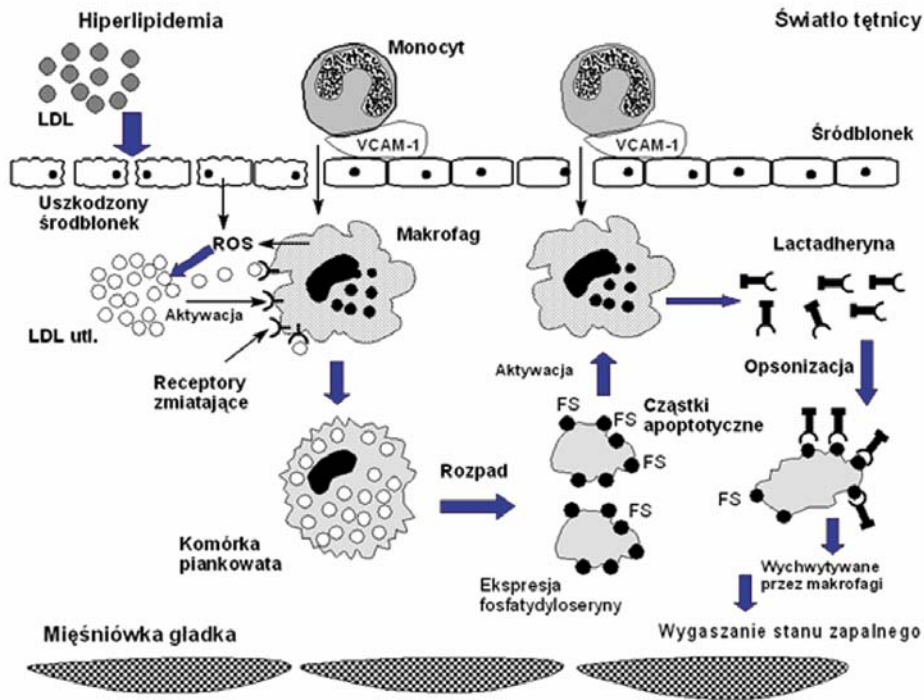
Laktadheryna okazała się również czynnikiem ułatwiającym fagocytozę mikropecherzyków zrzucanych z powierzchni płytek krwi – PMP (ang. *platelet microparticles*). Są to niewielkie ( $<1 \mu\text{m}$ ) pecherzyki mające duże ilości PS w zewnętrznej monowarstwie lipidowej. Mogą one być zrzucane (ang. *shedding*) z powierzchni aktywowanej płytki stanowiąc źródło dodatkowej powierzchni katalitycznej dla czynników krzepnięcia krwi. Z uwagi na swoje niewielkie rozmiary mogą pełnić one funkcję prokoagulacyjną nawet w oddalonych od miejsca powstania rejonach układu krwionośnego [28]. Ich podwyższone stężenie stwierdzono we krwi chorych m.in. po incydentach naczyniowo-mózgowych, w przebiegu dusznicy bolesnej i po zawale mięśnia sercowego [20, 25]. Mikropecherzyki te mogą też stymulować komórki hematopoetyczne i przenosić receptory specyficzne dla płytek na inne komórki [25, 33]. Dasgupta i współpracownicy wykazali, że w osoczu myszy pozbawionych genu kodującego laktadherynę stwierdzono kilkukrotnie wyższe stężenie mikropecherzyków płytkowych i dwukrotnie zwiększoną produkcję trombiny [6]. Wyniki te wskazują na istotną rolę laktadheryny w zapobieganiu tworzeniu się przypadkowych zakrzepów spowodowanych obecnością mikropecherzyków.

## ROLA LAKTADHERYNY W PATOGENEZIE MIAŻDŻYCY

Aktualnie akceptowany model powstawania zmian miażdżycowych związany jest ze stanem hiperlipidemii. Towarzyszący jej wzrost ilości utlenionych form lipoprotein o niskiej gęstości – LDL (ang. *low density lipoproteins*) może prowadzić do uszkodzeń komórek śródbłónka i wzrostu jego przepuszczalności. Uszkodzone komórki śródbłónka produkują reaktywne formy tlenu, które dodatkowo utleniają cząsteczki LDL. Tak utlenione cząsteczki LDL przenikają pod warstwę komórek śródbłónka naczyń krwionośnych, gdzie są wychwytywane i pochłaniane w drodze endocytozy przez migrujące makrofagi. Makrofagi wypełnione utlenionymi LDL przekształcają się w komórki piankowate, które nie są w stanie metabolizować toksycznych, utlenionych LDL. Po nagromadzeniu dużej ilości LDL komórki piankowate ulegają rozpadowi na mniejsze od nich cząstki apoptotyczne, które stanowią źródło czynników prozapalnych, w tym cytokin [1, 31]. Krytycznym momentem w rozwoju blaszki miażdżycowej jest zaburzenie równowagi pomiędzy powstawaniem komórek piankowatych a ich fagocytozą przez napływające makrofagi [19, 32]. Przesunięcie tej równowagi w stronę nagromadzenia się komórek piankowatych prowadzi do rozrostu rdzenia nekrotycznego i przyspieszenia procesu powstawania płytki miażdżycowej [47, 48]. W tym krytycznym momencie niezwykle istotną rolę odgrywa laktadheryna, która poprzez opsonizację cząstek apoptotycznych, powstających z komórek piankowatych, ułatwia ich wydajną fagocytozę wygaszając stan zapalny i zmniejszając przez to ryzyko progresji zmian miażdżycowych (ryc. 4). Badania wykazały, że zahamowanie ekspresji laktadheryny w leukocytach powoduje redukcję sekrecji interleukiny-10 oraz zwiększenie wydzielania interferonu  $\gamma$  w miażdżycowych tętnicach, a także zmniejszenie aktywności supresorowej regulatorowych limfocytów T. Wszystkie te efekty były związane z nasileniem zmian miażdżycowych tętnic [1]. Obserwacje te mogą częściowo tłumaczyć zwiększone ryzyko rozwoju miażdżycy u młodych pacjentów cierpiących na toczeń rumieniowaty układowy. Choroba ta charakteryzuje się m.in. defektywną fagocytozą i zwiększoną akumulacją komórek apoptotycznych [26].

## ROLA LAKTADHERYNY W ANEMII SIERPOWATEJ

Anemia sierpowata jest chorobą, w przebiegu której niewielki procent krwinek czerwonych charakteryzuje się redystrybucją PS do zewnętrznej monowarstwy błony komórkowej [24]. Dasgupta i Thiagarajan wykazali, że laktadheryna wiąże się z krwinkami czerwonymi zdrowych ludzi na poziomie 0,5%, natomiast wiązanie do krwinek pobranych od chorych na anemię sierpowatą było 2 do 10 razy większe. Udowodniono też stymulację fagocytozy związanych z laktadheryną krwinek, co sugeruje jej rolę w oczyszczaniu krwi z patologicznie zmienionych komórek. Fagocytoza eksponujących PS krwinek sierpowatych była hamowana przez abciximab – przeciwciało blokujące receptor integrynowy  $\alpha V\beta 3$ , co potwierdza,



RYCINA 4. Rola laktadheryny w fagocytozie komórek piankowych i hamowaniu rozwoju miażdżycy: LDL – lipoproteiny o niskiej gęstości (*low density lipoproteins*), ROS – reaktywne formy tlenu (*reactive oxygen species*), VCAM-1 – białko pośredniczące w adhezji monocytów do komórek śródbłonka (*vascular cell adhesion molecule-1*), FS – fosfatydylseryna [wg Packard i Libby 2008]

FIGURE 4. Role of lactadherin in phagocytosis of foam cells and inhibition of arteriosclerosis development: LDL – low density lipoproteins, ROS – reactive oxygen species, VCAM-1 – vascular cell adhesion molecule-1, FS – phosphatidylserine

że jest on receptorem wiążącym laktadherynę [9]. Z kolei Guchhait i współpracownicy zaobserwowali, że laktadheryna w anemii sierpowatej pośredniczy w adhezji erytrocytów do śródbłonka naczyń krwionośnych podczas przepływu krwi. Podanie przeciwciała przeciwko laktadherynie znosiło tę adhezję [14]. Wykazano także zależną od laktadheryny fagocytozę prawidłowo wykształconych, starzejących się erytrocytów przez komórki śródbłonka naczyń krwionośnych. Dowodzi to istotnej roli tej glikoproteiny w oczyszczaniu organizmu z komórek, których funkcja może być zaburzona w konsekwencji starzenia się lub choroby [13].

## ROLA LAKTADHERYNY W MORFOGENEZIE I INWOLUCJI GRUCZOŁU PIERSIOWEGO

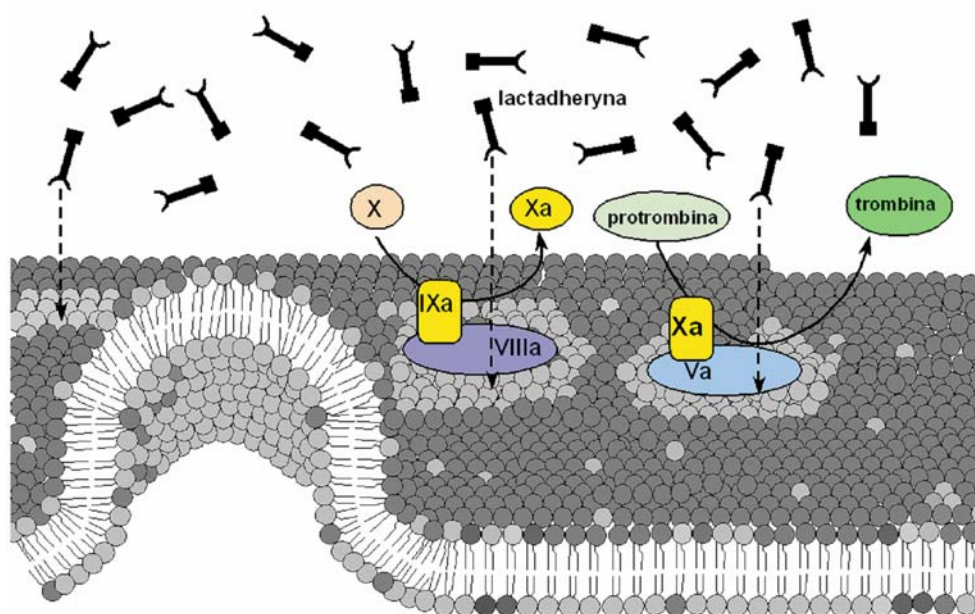
Apoptoza jest procesem niezbędnym w różnicowaniu tkanek, utrzymywaniu ich w stanie funkcjonalnym, a zakłócenia w jej przebiegu często są przyczyną stanów



patologicznych. Badania przeprowadzone przez Atabai i współpracowników wykazały, że brak ekspresji laktadheryny u myszy uniemożliwia inwolucję (zmniejszanie się) gruczołu piersiowego po okresie laktacji, skutkując nagromadzeniem nieusuniętych, martwych komórek, uszkodzeniami tkanki i stanami zapalnymi [2]. Stwierdzono też, że u myszy pozbawionych genu kodującego laktadherynę nie dochodzi do prawidłowego wykształcenia gruczołu piersiowego [12].

## WPŁYW LAKTADHERYNY NA KRZEPNIĘCIE KRWI

Laktadheryna konkuruje z białkami osocza mającymi domeny C, wiążące PS. Do najważniejszych białek tego rodzaju należą czynniki krzepnięcia V i VIII. Laktadheryna działa hamująco na te czynniki krzepnięcia na zasadzie konkurencji o miejsca wiązania do bogatych w PS domen błon fosfolipidowych, a nie na zasadzie tworzenia kompleksu białko-białko. Konkurencja o wiązanie PS, pojawiającej się w zewnętrznej monowarstwie błony plazmatycznej podczas procesu aktywacji płytek krwi, decyduje o właściwościach antykoagulacyjnych laktadheryny. Uniemożliwia ona bowiem powstanie aktywności prokoagulacyjnej, która jest zależna od tworzenia aktywnych kompleksów tenazy i protrombinazy, wymagających przyłączenia do błon mających domeny bogate w PS odpowiednio aktywnego czynnika VIII i aktywnego czynnika V (ryc. 5).



RYCINA 5. Blokowanie fosfatydylseryny na błonie płytki krwi przez laktadherynę hamuje w 98% aktywność kompleksów tenazy i protrombinazy (inhibicja kompetycyjna) [wg Shi i wsp. 2008]  
 FIGURE 5. Phosphatidylserine blocking on the surface of platelets by lactadherin inhibits tenase and prothrombinase activity in 98% (acc. to Shi et al. 2008)

Powstanie tych kompleksów na powierzchni błony plazmatycznej umożliwia 300000 razy szybszą produkcję trombiny niż gdy są one obecne w fazie płynnej osocza. Wyniki badań przeprowadzonych przez Shi i Gilberta z wykorzystaniem cytometrii przepływową z użyciem znakowanych fluorescencyjnie czynników krzepnięcia wykazały, że laktadheryna może być skutecznym inhibitorem czynników V i VIII w stężeniu co najmniej kilkunastokrotnie mniejszym niż aneksyna V – jedyne obecnie stosowane białko o podobnym mechanizmie działania na proces krzepnięcia. Laktadheryna hamuje także wiązanie do błon czynnika krzepnięcia VII. Doświadczenia z inhibicją kompleksów tenazy i protrombinazy *in vitro* dowiodły, że wiązanie laktadheryny do błon plazmatycznych zachodzi przy zawartości PS w ilości ułamka procenta, podczas gdy aneksyna V wiąże się do błon przy zawartości PS powyżej 2,5%. Badania tego samego zespołu nad ekspresją PS w procesie aktywacji płytek krwi *in vivo* pozwoliły na udowodnienie, że powstawanie aktywności prokoagulacyjnej na powierzchni płytek krwi ma związek nie tylko z ekspresją PS, ale także ze wzrostem stopnia krzywizny błony [39, 41]. W odróżnieniu od aneksyny V, laktadheryna może wiązać się z regionami błon plazmatycznych o znacznej krzywiznie, np. w rejonach pseudopodiów wytwarzanych w procesie aktywacji płytek krwi.

Wykorzystanie laktadheryny jako sondy wykrywającej obecność PS na zewnętrznej warstwie błony plazmatycznej pozwoliło udowodnić, że stymulacja płytek krwi trombiną wywołuje przejściową eksternalizację PS w ilości, która jest niewystarczająca do związania aneksyny V do powierzchni zaktywowanych tym sposobem płytek. Próbę tę można przeprowadzać na rozcieńczonym osoczu bogatym w płytki, co ułatwia jej wykorzystanie w praktyce [42]. Wyżej wymienieni badacze wykazali także, że czas krzepnięcia pełnej krwi przy stężeniu 100 nM laktadheryny jest wydłużony 3-krotnie. Dla porównania aneksyna V w identycznym stężeniu wydłuża czas krzepnięcia 1,5-krotnie. Również czas protrombinowy jest wydłużony w porównaniu z efektem działania aneksyny V i wynosi odpowiednio 150% w obecności 60 nM laktadheryny i 20% przy identycznym stężeniu aneksyny V [39]. Wyniki badań przeprowadzonych przez Zhou i współpracowników dowodzą, że laktadheryna wydłuża czas krzepnięcia 2,4-krotnie oraz hamuje produkcję trombiny o 85% przy stężeniu 32 nM [56]. Wykazano także, że laktadheryna może być skutecznym środkiem antykoagulacyjnym w stanach nadkrzepliwości wywołanych cyklosporyną A, cisplatyną i daunorubicyną [20, 54, 57].

## **ROLA LAKTADHERYNY W ZALEŻNEJ OD NOWOTWORZENIA ANGIOGENEZIE**

Laktadheryna jest obecna w kobiecym mleku i ulega wzmożonej ekspresji w nowotworach piersi, zatem może służyć za białko markerowe przy diagnostyce tego rodzaju nowotworów [40]. Ekspresję laktadheryny wykazano również w komórkach czerniaka złośliwego, których progresja jest promowana przez tę glikoproteinę [32],

w liniach komórkowych nowotworów myszy i w komórkach nowotworowych trzustki, nie wykryto jej natomiast w zdrowej trzustce myszy [29]. Udokumentowano rolę laktadheryny jako promotora zależnych od nowotworzenia procesów angiogenezy i wzrostu guza. Zjawisko to najprawdopodobniej wiąże się z rolą integryn  $\alpha V\beta 3$  i  $\alpha V\beta 5$  w angiogenezie i histogenezie [37, 45]. Neutzner i współpracownicy posługując się modelem transgenicznym myszy pozbawionych genu kodującego laktadherynę wykazywali sięgające 25% zmniejszenie proliferacji komórek w wyspach angiogenezy. Korelowało to ze zwiększeniem liczby komórek apoptotycznych. Wykorzystując technikę immunohydryzacji *in situ* wykazano, że laktadheryna nie akumuluje się w komórkach ją produkujących, lecz w tkankach narządów mających stosowne receptory [29]. Monoklonalne, humanizowane przeciwciała przeciwko laktadherynie pod nazwą angioliX, wiążące się do domeny EGF laktadheryny zawierającej motyw RGD, interferuje z wiązaniem laktadheryny do integryn. Powoduje to odizolowanie komórek nowotworowych od podłoża i ich przejście w stan apoptozy, co hamuje wzrost nowotworu [10]. Podobny efekt osiągnięto stosując abciximab – przeciwciała skierowane przeciwko receptorom integrynowym  $\alpha V\beta 3$ , dla których laktadheryna stanowi ligand [8]. Laktadheryna, będąc czynnikiem promującym niektóre typy nowotworów, stanowi zatem potencjalny cel ukierunkowanej terapii.

## **ROLA LAKTADHERYNY W OCHRONIE PRZED INFEKCJAMI ROTAWIRUSOWYMI**

Bojsen i wsp. zaproponowali, że obecność laktadheryny w mleku kobiecym wiąże się z jego aktywnością przeciwko infekcjom rotawirusowym [5, 23]. Infekcje te wywołują u dzieci ciężkie biegunki, które bardzo często prowadzą do niebezpiecznego dla życia odwodnienia organizmu. Badania na liniach komórkowych wykazały 50% zahamowanie infekcji rotawirusowych przy stężeniu ludzkiej laktadheryny 0,02 mg/ml, podczas gdy fizjologiczne stężenie tego białka w mleku osiąga poziom 0,139 mg/ml w okresie poporodowym i spada do poziomu 0,066 mg/ml po 6 tygodniach od porodu [5]. Warto zwrócić uwagę na wyniki badań poziomu laktadheryny w osoczu nowo narodzonych cieląt. Rośnie on od 0,07  $\mu\text{g/ml}$  przed karmieniem do 1,2  $\mu\text{g/ml}$  po okresie karmienia, co wskazuje na możliwą fizjologiczną rolę tego białka jako czynnika przeciwwirusowego [39]. Mechanizm hamowania infekcji rotawirusowych nie został dokładnie poznany. Sugeruje się, że hamowanie infekcji zachodzi na etapie wiązania wirusów do powierzchni komórek, prawdopodobnie za pośrednictwem łańcuchów cukrowych laktadheryny [5]. Laktadheryna wykazuje odporność na trawienie w przewodzie pokarmowym. Obserwacja ta w połączeniu z faktem, że poziom tej glikoproteiny w osoczu cieląt ulega znacznemu podwyższeniu w wyniku karmienia, sugeruje funkcję laktadheryny jako części odporności nieswoistej przekazywanej z mlekiem matki [23].

## ROLA LAKTADHERYNY W MĘSKIM UKŁADZIE ROZRODCZYM I ZAPŁODNIENIU

Laktadheryna jest obecna w męskim układzie rozrodczym. W najbardziej proksymalnym regionie najądrza produkowane i wydzielane są czynniki mające kluczowe znaczenie w dojrzewaniu i przechowywaniu plemników. Wśród nich jest laktadheryna, zwana wcześniej białkiem SED-1 [34]. Shur i współpracownicy wykazali, że jest ona wydzielana apikalnie do światła najądrzy, gdzie opłaszcza plemniki i umożliwia ich interakcję z osłonką przejrzystą (*zona pellucida*) komórki jajowej. Proces ten ułatwia wniknięcie plemnika do wnętrza komórki jajowej i jej zapłodnienie [44]. Laktadheryna jest także wydzielana bazalnie, co sugeruje jej rolę jako czynnika warunkującego prawidłową adhezję komórek najądrzy. Samce myszy, będące recesywnymi homozygotami w genie kodującym SED-1, były dotknięte patologiami związanymi z adhezją tkanek najądrzy, takimi jak oderwanie nabłonka czy rozwój ziarniaka nasiennego [35]. Podsumowując, męski układ rozrodczy jest miejscem, w którym laktadheryna pełni różne funkcje. Z jednej strony warunkuje prawidłową strukturę tkanki najądrzy, z drugiej zaś stanowi czynnik umożliwiający męskim komórkom rozrodczym zapłodnienie komórki jajowej.

## ROLA LAKTADHERYNY W AMYLOIDOZIE

Haggqvist i współpracownicy wykazali ekspresję laktadheryny w komórkach mięśni gładkich aorty oraz możliwość powstawania włókien amyloidopodobnych z produktu proteolizy laktadheryny – medyny, odpowiadającej fragmentowi laktadheryny w obrębie aminokwasów 245–294 [16]. Mechanizm powstawania amyloidu tego pochodzenia w aorcie pozostaje niejasny; sugeruje się, że przy dużym stężeniu cząstek medyny mogą one łączyć się ze sobą strukturami  $\beta$  i tworzyć fibrylarne agregaty [17]. W chorobie Alzheimera dochodzi do akumulacji amyloidu  $\beta$  na skutek nieprawidłowego przekształcenia białka prekursorowego  $\beta$  amyloidu – APP (ang. *amyloid precursor protein*) przez sekretazy  $\beta$  i  $\gamma$  [16]. Amyloid  $\beta$  może wywoływać aktywację oraz apoptozę komórek powodując eksternalizację PS. Amyloid wykazuje powinowactwo do PS i może gromadzić się na bogatych w PS błonach komórkowych [17]. Badania wykazały, że amyloid  $\beta$  gromadzi się w miejscach, gdzie ekspresja laktadheryny jest obniżona bądź zahamowana. Dodatkowo w tych miejscach dochodzi do nagromadzenia komórek apoptotycznych [4].

## PERSPEKTYWY

Laktadheryna jest dogodnym i skutecznym narzędziem molekularnym do wykrywania ekspresji PS, np. podczas aktywacji płytek krwi czy apoptozy różnych

typów komórek, w tym nowotworowych poddanych działaniu substancji cytotoksycznych [43, 49]. Z drugiej strony można traktować to białko jako bardzo skuteczny czynnik antykoagulacyjny, a także, mając na względzie jego funkcję promującą angiogenezę, jako cel terapii przeciwnowotworowej. W porównaniu z powszechnie stosowanym białkowym markerem ekspresji PS – aneksyną V, laktadheryna wykazuje niezależne od jonów wapnia wiązanie do PS przy stężeniach tego fosfolipidu na zewnętrznej stronie błony plazmatycznej już od ułamka procenta, podczas gdy aneksyna V do istotnego ilościowo wiązania potrzebuje 2,5% i więcej [39]. Wyniki badań przeprowadzonych z wykorzystaniem cytometrii przepływowej wskazują na wyższą fluorescencję zastosowaniu znakowanej fluorescencyjnie laktadheryny w porównaniu do analogicznie oznakowanej aneksyny V. Czyni to laktadherynę skuteczniejszym narzędziem w badaniach naukowych oraz we wczesnym wykrywaniu apoptozy np. przy diagnostyce rozsianego wykrzepiania wewnątrznaczyniowego [7] czy jako markera zmian krzywizny błon plazmatycznych komórek, np. w procesie aktywacji płytek krwi [39]. Wykorzystanie wiedzy o roli laktadheryny w procesie angiogenezy nowotworów daje szansę na zwiększenie skuteczności obecnie stosowanych terapii. Wyniki badań uzyskiwane na preparatach bazujących na unieczynnianiu laktadheryny poprzez wiązanie się z nią, jak angioliX [10], bądź blokujących specyficzne dla laktadheryny receptory, np. abciximab [8] sugerują potrzebę dalszych badań nad wykorzystaniem tego białka jako celu w terapii nowotworów.

Laktadheryna wykazuje ponadto powinowactwo do receptorów integrynowych typu  $\alpha V\beta 3$  i  $\alpha V\beta 5$ , których ekspresja na powierzchni komórek nowotworowych jest wysoka [3]. Laktadheryna podana lokalnie w formie radiofarmaceutyku mogłaby w sposób godny zainteresowania podnieść skuteczność terapii przeciwnowotworowej. Warto zwrócić uwagę na fakt, że laktadheryna jest obecna w podstawowym pokarmie wszystkich ssaków – mleku. Wyniki badań nad poziomem laktadheryny w osoczu cieląt po okresie karmienia mlekiem wskazują, że przechodzi ona z pokarmu do krwioobiegu, gdzie wykazuje działanie przeciwzakrzepowe i immunologiczne [15, 24]. Idąc tym tropem możemy rozważać możliwość użycia laktadheryny jako aplikowanego doustnie środka profilaktycznego, chroniącego organizm człowieka przed szkodliwymi skutkami deficytu tego białka, np. w procesie rozwoju blaszki miażdżycowej. Właściwość laktadheryny polegająca na indukcji fagocytozy w stosunku do komórek bądź ich fragmentów, oznakowanych tym białkiem stwarza w perspektywie możliwość selektywnego usuwania niepożądanych „śmieci komórkowych” z organizmu. Z całą pewnością laktadheryna jest białkiem wykazującym duży potencjał do zastosowań medycznych. Jej biodostępność przy podawaniu doustnym czyni z niej obiecujący środek profilaktyczny, a liczba procesów, w które jest zaangażowana w organizmie, powoduje, że dalsze badania nad tą glikoproteiną, jak i w perspektywie zastosowanie jej jako leku, należy z pełnym przekonaniem ocenić jako wysoce pożądane.

## PIŚMIENICTWO

- [1] AIT-OUFELLA H, KINUGAWA K, ZOLL J, SIMON T, BODDAERT J, HEENEMAN S, BLANC-BRUDE O, BARATEAU V, POTTEAUX S, MERVAL R, ESPOSITO B, TEISSIER E, DAEMEN MJ, LESECHE G, BOULANGER CH, TEDQUIA, MALLAT Z. Lactadherin deficiency leads to apoptotic cell accumulation and accelerated atherosclerosis in mice. *Circulation* 2007; **115**: 2168–2177.
- [2] ATABAI K, FERNANDEZ R, HUANG X, UEKI I, KLINE A, LI Y, SADATMANSOORI S, SMITH-STEINHART CH, ZHU W, PYTELA R, WERB Z, SHEPPARD D. Mfge8 is critical for mammary gland remodeling during involution. *Mol Biol Cell* 2005; **16**: 5528–5537.
- [3] BELVISI L, RICCIONI T, MARCELLINI M, VESCI L, CHIARUCCI I, EFRATI D, POTENZA D, SCOLASTICO C, MANZONI L, LOMBARDO K, STASI MA, ORLANDI A, CIUCCI A, NICO B, RIBATTI D, GIANNINI G, PRESTA M, CARMINATI P, PISANO C. Biological and molecular properties of a new  $\alpha V\beta 3/\alpha V\beta 5$  integrin antagonist. *Mol Cancer Ther* 2005; **4**(11): 1670–1680.
- [4] BODDAERT J, KINUGAWA K, LAMBERT J-CH, BOUKHTOUCHE F, ZOLL J, MERVAL R, BLANC-BRUDE O, MANN D, BERR C, VILAR J, GARABEDIAN B, JOURNIAC N, CHARUE D, SILVESTRE J-S, DUYCKAERTS CH, AMOUYEL PH, MARIANI J, TEDGUI A, MALLAT Z. Evidence of a role for lactadherin in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 2007; **170**: 921–929.
- [5] BOJSENA, BUESAJ, MONTAVA R, KVISTGAARD AS, KONGSBK MB, PETERSEN TE, HEEGAARD CW, RASMUSSEN JT. Inhibitory activities of bovine macromolecular whey proteins on rotavirus infections *in vitro* and *in vivo*. *J Dairy Sci* 2007; **90**: 66–74.
- [6] DASGUPTA SK, ABDEL-MOENM H, NIRAVATH P, LE A, BELLERA RV, LANGLOIS K, NAGATA SH, RUMBAUT RE, THIAGARAJAN P. Lactadherin and clearance of platelet-derived microvesicles. *Blood* 2009; **113**: 1332–1339.
- [7] DASGUPTA SK, GUCHHAIT P, THIAGARAJAN P. Lactadherin binding and phosphatidylserine expression on cell surface-comparison with annexin A5. *Transl Res* 2006; **148**: 19–25.
- [8] DASGUPTA SK, GUCHHAIT P, LE A, YELLAPRAGADA S, LOPEZ J, THIAGARAJAN PA monoclonal antibody to lactadherin inhibits sickle red blood cell adhesion to vascular endothelial cells in a plasma milieu. *Blood* 2006; **108**: 1236.
- [9] DASGUPTA SK, THIAGARAJAN P. The role of lactadherin in the phagocytosis of phosphatidylserine-expressing sickle red blood cells by macrophages. *Haematologica* 2005; **90**: 1267–1268.
- [10] DEONARAIN PM, KOUSPAROU CA, EPENETOS A A. Antibodies targeting cancer stem cells. A new paradigm in immunotherapy? *MAbs* 2009; **1**(1): 12–25.
- [11] ELLIOTT MR, RAVICHANDRAN KS. Clearance of apoptotic cells: implications in health and disease. *J Biol Chem* 2010; **189**(7): 1059–1070.
- [12] ENSSLIN MA, SHUR BD. The EGF repeat and discoidin domain protein, SED1/MFG-E8, is required for mammary gland branching morphogenesis. *PNAS* 2007; **104**: 2715–2720.
- [13] FENS MHAM, MASTROBATTISTA E, DE GRAAFF AM, FLESCH FM, ULTEE A, RASMUSSEN JT, MOLEMA G, STORM G, SCHIFFELERS RM. Angiogenic endothelium shows lactadherin-dependent phagocytosis of aged erythrocytes and apoptotic cells. *Blood* 2008; **111**: 4542–4550.
- [14] GUCHHAIT P, DASGUPTA SK, LE A, YELLAPRAGADA S, LOPEZ JA, THIAGARAJAN P. Lactadherin mediates sickle cell adhesion to vascular endothelial cells in flowing blood. *Haematologica* 2007; **92**: 1266–1267.
- [15] GUO M, HENDRICKS GM. Chemistry and biological properties of human milk. *Curr Nutr Food Sci* 2008; **4**: 305–320.
- [16] LARSSON A, PENG S, PERSSON H, ROSENBLUM J, ABRAMS WR, WASSBERG E, THELIN S, SLETTEN K, GERWINS P, WESTERMARK P. Lactadherin binds to elastin – a starting point for medin amyloid formation? *Amyloid* 2006; **13**(2): 78–85.
- [17] LARSSONA, SÖDERBERGL, WESTERMARK GT, ENGSTRÖM KS, U, TJERNBERG LO, NÄSLUND J, WESTERMARK P. Unwinding fibril formation of medin, the peptide of the most common form of human amyloid. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; **361**(4): 822–828.
- [18] LEVENTIS PA, GRINSTEIN S. The Distribution and Function of Phosphatidylserine in Cellular Membranes. *Ann Rev Biophys* 2010; **39**: 407–427.
- [19] LIN L, HUAI Q, HUANG M, FURIE B, FURIE BC. Crystal structure of the bovine lactadherin C2 domain, a membrane binding motif, shows similarity to the C2 domains of factor V and factor VIII. *J Mol Biol* 2007; **371**: 717–724.

- [20] LU CF, YU HJ, HOU JX, ZHOU J. Increased procoagulant activity of red blood cells in the presence of cisplatin. *Chin Med J* 2008; **121**: 1775–1780.
- [21] MAREE AO, JNEID H, PALACIOS IF, ROSENFELD K, MACRAE CA, FITZGERALD DJ. Growth Arrest Specific Gene (GAS) 6 Modulates Platelet Thrombus Formation and Vascular Wall Homeostasis and Represents an Attractive Drug Target. *Curr Pharma Des* 2007; **13**(26): 2656–2661.
- [22] MARTIN SJ. Clearance of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ* 2008; **15**: 243–250.
- [23] MASAHISA J, NAKAZAKI Y, CARRASCO DR, DRAGANOM D, SOUDERS N, JOHNSON M, MIM MC, DRANOFF G. Milk Fat Globule EGF-8 Promotes Melanoma Progression through Coordinated Akt and Twist Signaling in the Tumor Microenvironment. *Cancer Res* 2008; **68**: 8889–8898.
- [24] MIRNIKJOO B, BALASUBRAMANIAN K, SCHROIT AJ. Suicidal Membrane Repair Regulates Phosphatidylserine Externalization during Apoptosis. *J Biol Chem* 2009; **284**: 22512–22516.
- [25] MOREL O, TOTI F, HUGEL B, BAKOUBOULA B, CAMOIN-JAU L, DIGNAT-GEORGE F, FREYSSINET J-M. Procoagulant Microparticles Disrupting the Vascular Homeostasis Equation? *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2006; **26**: 2594–2604.
- [26] MUNOZ LE, VAN BAVEL C, FRANZ J, BERDEN J, HERRMANN M, VAN DER VLAG J. Apoptosis in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2008; **17**(5): 371–375.
- [27] NAKAYA M, TANAKA M, OKABE Y, HANAYAMA R, NAGATA S. Opposite Effects of Rho Family GTPases on Engulfment of Apoptotic Cells by Macrophages. *J Biol Chem* 2006; **281**: 8836–8842.
- [28] NAMBA M, TANAKAA, SHIMADA K, OZEKI Y, UEHATA S, SAKAMOTO T, NISHIDA Y, NOMURA S, YOSHIKAWA J. Circulating Platelet-Derived Microparticles Are Associated With Atherothrombotic Events. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2007; **27**: 255–256.
- [29] NEUTZNER M, LOPEZ T, FENG X, BERGMANN-LEITNER ES, LEITNER WW, UDEY MC. MFG-E8/Lactadherin promotes tumor growth in an angiogenesis-dependent transgenic mouse model of multi-stage carcinogenesis. *Cancer Res* 2007; **67**: 6777–6785.
- [30] NEWBURG DS. Neonatal protection by an innate immune system of human milk consisting of oligosaccharides and glycans. *J Anim Sci* 2009; **87**: 26–34.
- [31] OHAYON J, FINET G, GHARIB AM, HERZKA DA, TRACQUI P, HEROUX J, RIOUFOL G, KOTYS MS, ELAGHA A, PETTIGREW RI. Necrotic core thickness and positive arterial remodeling index: emergent biomechanical factors for evaluating the risk of plaque rupture. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; **295**: 717–727.
- [32] PACKARD RRS, LIBBY P. Inflammation in Atherosclerosis: From Vascular Biology to Biomarker Discovery and Risk Prediction. *Clin Chem* 2008; **54**: 24–38.
- [33] PERIARD D, BOULANGER CHM, EYER S, AMABILE N, PUGIN P, GERSCHHEIMER CH, HAYOZ D. Are Circulating Endothelial-Derived and Platelet-Derived Microparticles a Pathogenic Factor in the Cisplatin-Induced Stroke? *Stroke* 2007; **38**: 1636–1638.
- [34] RAYMOND A, ENSSLIN MA, SHUR BD. SEDI1/MFG-E8: a bi-motif protein that orchestrates diverse cellular interactions. *J Cell Biochem* 2009; **15**: 106(6): 957–966.
- [35] RAYMOND AS, SHUR BD. A novel role for SEDI1 (MFG-E8) in maintaining the integrity of the epididymal epithelium. *J Cell Sci* 2009; **122**: 849–858.
- [36] ROBENEK H, HOFNAGEL O, BUERS I, LORKOWSKI S, SCHNOOR M, ROBENEK MJ, HEID H, TROYER D, SEVERS NJ. Butyrophilin controls milk fat globule secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 10385–10390.
- [37] SERINI G, NAPIONE L, ARESE M, BUSSOLINO F. Besides adhesion: new perspectives of integrin functions in angiogenesis. *Cardiovasc Res* 2008; **78**: 213–222.
- [38] SHAO CH, NOVAKOVIC VA, HEAD JF, SEATON BA, GILBERT GE. Crystal structure of lactadherin C2 domain at 1.7 Å resolution with mutational and computational analyses of its membrane-binding motif. *J Biol Chem* 2008; **283**: 7230–7241.
- [39] SHI J, GILBERT GE. Lactadherin inhibits enzyme complexes of blood coagulation by competing for phospholipid-binding sites. *Blood* 2003; **101**: 2628–2636.
- [40] SHI J, HEEGAARD CHW, RASMUSSEN JT, GILBERT GE. Lactadherin binds selectively to membranes containing phosphatidyl-L-serine and increased curvature. *Biochim Biophys Acta* 2004; **1667**: 82–90.
- [41] SHI J, PIPE SW, RASMUSSEN JT, HEEGAARD CW, GILBERT GE. Lactadherin blocks thrombosis and hemostasis *in vivo*: correlation with platelet phosphatidylserine exposure. *J Thromb Haemost* 2008; **6**(7): 1167–1174.
- [42] SHI J, RASMUSSEN JT, HEEGAARD CW, GILBERT GE. Reversible exposure of phosphatidylserine on thrombin-stimulated platelets detected by binding of lactadherin. *Blood* 2004; **104**(11): 963a.

- [43] SHI J, SHI Y, WAEHRENS LN, RASMUSSEN JT, HEEGAARD CW, GILBERT GE. Lactadherin detects early phosphatidylserine exposure on immortalized leukemia cells undergoing programmed cell death. *Cytometry A* 2006; **69**: 1193–1201.
- [44] SHUR BD, RODEHEFFER C, ENSSLIN MA, LYNNG R, RAYMOND A. Identification of novel gamete receptors that mediate sperm adhesion to the egg coat. *Mol Cell Endocrinol* 2006; **250**: 137–148.
- [45] SILVESTRE JS, THERY C, HAMARD G, BODDAERT J, AGUILAR B, DELCAYRE A, HOUBRON C, TAMARAT R, BLANC-BRUDE O, HEENEMAN S, CLERUGE M, DURIEZ M, MERVAL R, LEVY B, TEDGUIA, AMIGORENA S, MALLAT Z. Lactadherin promotes VEGF-dependent neovascularization. *Nat Med* 2005; **11**: 499–506.
- [46] SMITH C, GIBSON DF, TAIT JF. Transmembrane voltage regulates binding of annexin V and lactadherin to cells with exposed phosphatidylserine. *BCM Biochem* 2009; **10**: 5.
- [47] TABAS I. Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis: the importance of lesion stage and phagocytic efficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; **25**: 2255–2264.
- [48] THORP E, TABAS I. Mechanisms and consequences of efferocytosis in advanced atherosclerosis. *J Leukoc Biol* 2009; **86**: 1–7.
- [49] WAEHRENS LN, HEEGAARD CW, GILBERT GE, RASMUSSEN JT. Bovine lactadherin as a calcium-independent imaging agent of phosphatidylserine expressed on the surface of apoptotic HeLa cells. *JHC* 2009; **57**: 907–914.
- [50] WATANABE T, TOTSUKA R, MIYATANI S, KURATA SH, SATO SH, KATOH I, KOBAYASHI SH, IKAWA Y. Production of the long and short forms of MFG-E8 by epidermal keratinocytes. *Cell Tissue Res* 2005; **321**: 185–193.
- [51] WU Y, TIBREWAL N, BIRGE RB. Phosphatidylserine recognition by phagocytes: a view to a kill. *Trends Cell Biol* 2006; **16**: 189–197.
- [52] VANDERGHEN C, BLECKER CH, DANTHINE S, DEROANNE C, HAUBRUGE E, GUILLONNEAU F, DE PAUW E, FRANCIS F. Proteome analysis of the bovine milk fat globule: Enhancement of membrane purification. *Int Dairy J* 2008; **18**: 885–893.
- [53] VÉRON P, SEGURA E, SUGANO G, AMIGORENA S, THÉRY C. Accumulation of MFG-E8/lactadherin on exosomes from immature dendritic cells. *Blood Cells Mol Dis* 2007; **35**(2): 81–88.
- [54] ZHENG Y-N, YU H-J, HOU J-X, LU CH-F, ZHOU J. Lactadherin and procoagulant activities of red blood cells on cyclosporine induced thrombosis. *Chin Med J* 2009; **122**: 1674–1680.
- [55] ZHOU YJ, GAO J, YANG HM, YUAN XL, CHEN TX, HE ZJ. The role of the lactadherin in promoting intestinal DCs development *in vivo* and *in vitro*. *Clin Dev Immunol* 2010; **2010**: 357541.
- [56] ZHOU J, HOU J, LI W, ZHANG X, FU Y, LI H, XIE R, ZHANG Z, GILBERT GE, SHI J. Lactadherin as a probe for phosphatidylserine exposure and as an anticoagulant for the procoagulant activity in the study of stored platelets. *Vox Sang* 2010 (przyjęte do druku)
- [57] ZHOU J, ZHENG Y, SHI J, LU C, HOU J, YU H, QIAO X, QI S, GILBERT GE. Daunorubicin induces procoagulant response through phosphatidylserine exposure in red blood cells. *Thromb Res* 2010; **125**(2): 178–183.

*Redaktor prowadzący – Bożena Kamińska-Kaczmarek*

*Otrzymano: 17.09. 2010 r.*

*Przyjęto: 10.12. 2010 r.*

*Tomasz Misztal, Zakład Chemii Fizycznej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku,*

*ul. Mickiewicza 2B, 15-089 Białystok,*

*e-mail: chemfiz@umwb.edu.pl*