

Modyfikujący wpływ dużych dawek preparatu oleju z wątroby rekina na polaryzację limfocytów T i funkcję neutrofilii krwi

¹Zakład Immunologii Klinicznej Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi, kierownik: prof. dr hab. n. med. Henryk Tchórzewski; ²Zakład Periodontologii i Chorób Błony Śluzowej Jamy Ustnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, kierownik: dr hab. n. med. Anna Kurnatowska

Przemysław Lewkowicz, Małgorzata Banasik, Ewa Głowacka, Natalia Lewkowicz, Henryk Tchórzewski

Modyfikujący wpływ dużych dawek preparatu oleju z wątroby rekina na polaryzację limfocytów T i funkcję neutrofilii krwi

Oleje rybne znajdują coraz szersze zastosowanie w profilaktyce i leczeniu chorób. Ich właściwości stały się przedmiotem badań immunologicznych.

W niniejszej pracy oceniono wpływ oleju z wątroby rekina, przyjmowanego w dużych dawkach przez 13 zdrowych ochotników, na podstawowe parametry immunologiczne: morfologię krwi, gospodarkę lipidową i stan czynnościowy oraz integralność komórek wątroby. Osoby biorące udział w eksperymencie przyjmowały 3,6 g skwalenu, 3,6 g alkilogliceroli i 750 mg wielonienasyconych kwasów (n-3 na dobę przez okres 4 tygodni). Stwierdzono wpływ preparatu na zwiększenie reaktywności neutrofilii krwi obwodowej w stosunku do patogenów bakteryjnych, wzrost poziomu składowej C4 układu dopełniacza, wzrost całkowitej pojemności antyoksydacyjnej surowicy, a także przewagę produkcji cytokin typu 1 IFN- γ , TNF- α i IL-2 przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej. Olej z wątroby rekina, przyjmowany w dużych dawkach wpłynął na gospodarkę lipidową osób badanych. Stwierdzono wzrost poziomu cholesterolu całkowitego do wartości 224,46 \pm 62,198 mg/dl w stosunku do wartości 182,92 \pm 29,290 mg/dl przed rozpoczęciem eksperymentu. Zaobserwowano również spadek poziomu frakcji HDL i wzrost LDL. Gospodarka cholesteroliem uległa samoistnej normalizacji u wszystkich badanych w 4 tygodnie po zakończeniu przyjmowania preparatu. Badania wskazują, że działanie preparatu wynika przede wszystkim z właściwości biologicznych skwalenu i 1-O-alkilogliceroli – głównych składników oleju z wątroby rekina. Antagonistyczne, przeciwzapalne działanie WKT n-3 pozostało bez wpływu na badane parametry. Jak wynika z obserwacji, stosowanie oleju z wątroby rekina w bardzo dużych dawkach, może mieć korzystne oddziaływanie u chorych z nawracającymi zakażeniami bakteryjnymi, wirusowymi i grzybiczymi, natomiast względny przeciwwskazaniem do stosowania preparatu w takich ilościach są choroby układu sercowo-naczyniowego z zaburzoną gospodarką lipidową oraz choroby o podłożu autoimmunizacyjnym.

Słowa kluczowe: olej z wątroby rekina, odporność wrodzona, polaryzacja limfocytów Th

Pol. Merk. Lek., 2005, XVIII, 108, 686

Przemysław Lewkowicz, Małgorzata Banasik, Ewa Głowacka, Natalia Lewkowicz, Henryk Tchórzewski

Effect of high doses of shark liver oil supplementation on T cell polarization and peripheral blood polymorphonuclear cell function

Fish oils supplementation has been recently widely used in prevention and treatment of the diseases in humans. Fish oil beneficial effects have been investigated in a number of animal disease models as well as human studies.

Here, we examined clinical, immunological and biochemical effects of shark liver oil supplementation in high doses in 13 volunteers. The experiment was based on the consumption of 3,6 g of squalene, 3,6 g of alkylglycerols and 750 mg of n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) per day for 4 weeks. We have shown the increased response of neutrophils towards bacteria, the increased level of C4 component of complement in blood, the rise of total antioxidant status of serum, and the predominance of Type 1 cytokine IFN- γ , TNF- α and IL-2 production by peripheral blood mononuclear cells after shark liver oil intake. Moreover, shark liver oil supplementation markedly affect lipid metabolism and cholesterol balance. The increase of total cholesterol level from 182,92 \pm 29,290 mg/dl before oil consumption to 224,46 \pm 62,198 mg/dl after diet rich in oil, and the decrease of HDL fraction were noted. However, metabolism of lipids normalised spontaneously after the end of the experiment in all the individuals. The results of the present study have shown, that the main effects of shark liver oil are the result of the biological activity of squalene and 1-O-alkylglycerols, which dominate in the composition of the oil quantitatively. On the contrary, anti-inflammatory effects of n-3 PUFA do not manifest, when taking together with high doses of squalene and alkylglycerols. On the bases of these observations, we propose that shark liver oil supplementation in high doses is beneficial in bacterial, viral and fungal infections, whereas patients with atherosclerosis or autoimmune diseases should avoid the consumption of high amounts of shark liver oil.

Key words: shark liver oil, innate immunity, polarization of Th lymphocytes

Pol. Merk. Lek., 2005, XVIII, 108, 686

Preparaty uzyskiwane z tłuszczu rybiego znane są od wielu lat jako środki mające zastosowanie w profilaktyce i leczeniu wielu chorób. Nowoczesne techniki diagnostyki immunologicznej umożliwiły wykazanie wpływu związków zawartych w olejach ryb na układ immunologiczny oraz powiązanie działania leczniczego tych substancji ze zmianami niektórych parametrów odporności. Terapia oparta o oleje z ryb uruchamia naturalne mechanizmy regulujące odpowiedź

immunologiczną organizmu i nie wywołuje działań niepożądanych; przeciwwskazania są nieliczne [23]. W składzie lipidów, pozyskiwanych z wątroby rekinów *Centroscymnus crepitater*, *Etmopterus granulosus*, *Deania colcea* i *Centrophorus scalpratus* w procesie tłoczenia, dominują etery acylgliceroli: diacyloglycerole (ang. diacylglycerol ethers – DAGE) (1-0-Alkyl-2,3-diacyloglycerol ethers), triacyloglycerole (ang. triacylglycerols – TAG), związki skwalenu oraz

wielonienasycone kwasy tłuszczowe (WKT) szeregu n-3, bogate w kwas dekozaheksaenowy (DHA) oraz kwas eikozapentaenowy (EPA) [13].

Wcześniejsze badania kliniczne wykazały, iż składniki oleju rybiego wykazują aktywność biologiczną zarówno w stosunku do elementów odporności wrodzonej, jak i nabytej [7, 15, 22, 23, 31]. Działanie WKT szeregu n-3 stało się przedmiotem licznych badań; niewiele natomiast wiadomo o mechanizmach działania 1-0-alkilogliceroli czy związków skwalenu. Ustalono, że EPA i DHA wykazują działanie przeciwzapalne, hamując syntezę pochodnych kwasu arachidonowego i cytokin prozapalnych [8]. Stosowanie WKT n-3 przyczynia się do redukcji poziomu trójglicerydów i cholesterolu całkowitego we krwi osób badanych [21]. Ponadto w badaniach *in vitro* wykazano działanie supresyjne WKT n-3 w stosunku do komórek nowotworowych [2, 11]. 1-0-alkiloglicerole – główny składnik oleju – również wykazują działanie przeciwnowotworowe. Związki te działają bezpośrednio cytotoksycznie na komórki nowotworowe *in vivo* i hamują proliferację komórek [5, 6, 10, 12, 14, 17, 24]. Działanie hamujące wzrost komórek nowotworowych wynika prawdopodobnie z wbudowywania się pochodnych alkilogliceroli w błonę komórkową, co doprowadza do upośledzonego transportu transbłonowego substancji niezbędnych do wzrostu komórek nowotworowych [19]. Wykazano, iż działanie nasilające odpowiedź immunologiczną przez 1-0-alkiloglicerole wynika prawdopodobnie z indukcji syntezy i zwiększonego uwalniania aktywnych pochodnych czynnika aktywującego płytki (ang. platelet activating factor; PAF) przez komórki immunokompetentne, eksponowane na tego typu związki [18, 27, 34]. Konsekwencją zwiększonego uwalniania PAF jest aktywacja odporności nieswoistej poprzez indukcję agregacji płytek krwi, zwiększenie przepuszczalność naczyń, aktywację neutrofilii i makrofagów [32]. Skwalen, w środowisku naturalnym, w największych ilościach występuje w wątrobach ryb morskich, a w mniejszej ilości w olejach roślinnych. Jest prekursorem syntezy cholesterolu i witaminy D. Związki skwalenu stanowią główny składnik tłuszczów wydzielanych przez gruczoły łojowe skóry. Uważa się, iż skwalen, zawarty w wydzielinie gruczołów stanowi naturalny komponent nieswoistej bariery ochronnej organizmu przed patogenami [25]. Działanie immunomodulujące skwalenu prawdopodobnie wynika z jego silnych właściwości adherentnych w stosunku do elementów błon komórkowych oraz osłonek lipidowych patogenów [1]. Główny efekt biologiczny oparty jest o jego bezpośrednie działanie poprzez opsonizację patogenów i tym samym ułatwienie ich prezentacji komórkom immunokompetentnym. W badaniach na zwierzętach wykazano, iż skwalen podawany wraz z pożywieniem w dawkach 25-100 mg/kg m.c. dziennie powoduje zwiększoną aktywność komórek NK, wzrost i aktywność limfocytów o fenotypie CD3⁺ oraz zwiększoną aktywność fagocytarną neutrofilii krwi obwodowej [1]. Ponadto, dzięki swoim właściwościom fizykochemicznym skwalen znalazł zastosowanie w produkcji szczepionek jako adiuwant ułatwiający prezentację antygenów komórkom immunokompetentnym [3, 5].

Wcześniejsze badania naszego zespołu wykazały korzystny wpływ stosowania oleju z wątroby rekina u chorych z reumatoidalnym zapaleniem stawów [31], nawracającymi infekcjami górnych dróg oddechowych [22], nawracającymi aftami jamy ustnej [15]. Dawki preparatu w tych badaniach wynosiły 1080 mg/dobę skwalenu i alkilogliceroli oraz 225 mg/dobę WKT n-3. W wyniku stosowania preparatu obserwowano obniżenie aktywności układu dopełniacza i poszczególnych jego składowych. Produkcja reaktywnych form tlenu (RFT) przez neutrofile zwiększała się u chorych z nawracającymi zakażeniami górnych dróg oddechowych i chorych z nawracającymi aftami, natomiast w grupie chorych z reumatoidalnym zapaleniem stawów produkcja RFT spadała po leczeniu olejem [15, 22, 31]. Stosowanie preparatu miało ponadto wpływ na liczebność (odsetek komórek jednojądrzastych) niektórych subpopulacji limfocytów krwi obwodowej: obserwowano wzrost odsetka komórek CD8⁺ i CD19⁺ [15,

22]. Jednakże ze względu na to, że pacjenci biorący udział w tych badaniach przyjmowali równocześnie inne leki, w pełni wiarygodna ocena wpływu oleju z wątroby rekina na układ immunologiczny nie była możliwa.

W piśmiennictwie brak jest danych umożliwiających określenie optymalnego dawkowania oleju z wątroby rekina, który jest preparatem złożonym. Ponadto przeciwstawne działanie 1-0-alkilogliceroli i skwalenu w stosunku do WKT n-3 na układ immunologiczny i gospodarkę lipidową utrudnia uściślenie wskazań do stosowania w dużych dawkach naturalnych złożonych preparatów pochodzących z wątroby ryb. Precyzyjne ilości przyjmowania kwasów tłuszczowych opracowano jedynie dla WKT n-3. W celach terapeutycznych poziom dobowego spożycia EPA + DHA nie powinien przekraczać 7 g [13].

W obecnych badaniach oceniono wpływ oleju z wątroby rekina – stosowanego w dużych dawkach – (związki skwalenu 3,6 g/dobę, alkiloglicerole 3,6 g/dobę, WKT n-3 750 mg/dobę) na wybrane procesy metaboliczne i immunologiczne ludzkiego organizmu, ze szczególnym uwzględnieniem przemiany lipidowej i niektórych funkcji limfocytów i granulocytów obojętnochłonnych.

Próbowano odpowiedzieć na pytania, czy stosowanie preparatu w bardzo dużych dawkach przyczyni się do pobudzenia immunocytów oraz czy taka terapia wywoła skutki uboczne, które zmniejszą płynące z niej korzyści.

MATERIAŁ I METODY

Do grupy badanych osób zakwalifikowano 13 zdrowych ochotników (5 mężczyzn i 8 kobiet) w wieku 26-45 lat. Badani przez okres 4 tygodni przyjmowali preparat BioMarine 570 pięć razy dziennie po sześć kapsułek. W skład jednej kapsułki wchodzi skwalen 120 mg, alkiloglicerole 120 mg, wielonienasycone kwasy tłuszczowe szeregu n-3 25 mg, witamina A 50 j.m. i witamina D 5 j.m. Przed rozpoczęciem oraz po zakończeniu przyjmowania preparatu od każdej z osób pobrano 2 ml krwi na heparynę litową, 2 ml na EDTA i 3 ml krwi na skrzep w celu wykonania badań immunologicznych, oceny wybranych parametrów gospodarki lipidowej i morfologii krwi. Przed rozpoczęciem przyjmowania preparatu, a następnie co tydzień przez okres badania i 1 miesiąc po zakończeniu eksperymentu, pacjenci zgłaszali się na kontrolne badanie lekarskie. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Etyki Badań Naukowych I-CZMP w Łodzi. Ocenę parametrów gospodarki lipidowej, próby wątrobowe oraz morfologię krwi obwodowej wykonano w Zakładzie Diagnostyki Laboratoryjnej I-CZMP w Łodzi.

Stężenie składowych układu dopełniacza C3 i C4 oraz stężenie immunoglobulin klasy IgG, IgA, IgM oceniono metodą nefelometryczną z użyciem odczynników firmy The Binding Site, UK. Badania przeprowadzono na aparacie Minineph (The Binding Site, UK).

Wybuch tlenowy neutrofilów oceniano metodą cytometrii przepływowej, komercyjnym zestawem Bursttest (BD Bioscience, Pharmingen). Komórki poddano stymulacji bakteriami *E. coli* (10⁸ bakterii/ml) lub PMA – ester forbolu (phorbol 12 -myristate 13-acetate) 16 μM.

Całkowitą pojemność antyoksydacyjną surowicy (ang. Total Antioxidant Status – TAS) oceniono metodą kolorymetryczną opartą na redukcji powstawania kationo-rodnika ABTS^{•+} [kation 2, 2'-azydo-bis (3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowy)], która zachodzi pod wpływem antyutleniaczy zawartych w przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Badanie przeprowadzono przy użyciu zestawu firmy Randox Lab., UK w 96-celkowych przezroczystych płytkach. Odczyt absorbancji badanych próbek i standardów przeprowadzono metodą jednopunktowego pomiaru przy długości fali 630 nm. Mierzono absorbancję początkową (po dodaniu chromogenu) oraz absorbancję po 3 minutach od momentu dodania substratu (nadtlenek wodoru). Stężenia antyutleniaczy wyliczono na pod-

stawie wzorca i różnicy pomiędzy absorbancją po dodaniu substratu a absorbancją początkową. Wyniki wyrażono w mmol/l.

Badanie profilu cytokin typu Th1/Th2 (INF- γ , TNF- α , IL-10, IL-2, IL-4, IL-5) generowanych przez komórki jednojądrzaste (ang. peripheral blood mononuclear cells – PBMC) przeprowadzono metodą cytometrii przepływowej z wykorzystaniem zestawu CBA Th1/Th2 Human Kit, firmy BD Bioscience (FACS-Calibur, BD Bioscience). Komórki jednojądrzaste krwi obwodowej zostały wyizolowane poprzez wirowanie na gradientie gęstości (Lymphoprep; Nycomed Pharma AS, Norway). Do hodowli PBMC użyto płynu RPMI 1640 medium (Biomed, Lublin, Poland) z dodatkiem 10% v/v płodowej surowicy cielęcej (FCS, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) i 1% v/v penicyliny i streptomycyny (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA). Gęstość PBMC wynosiła 1×10^6 komórek/ml. Poziom wytwarzanych cytokin oceniano w supernatantach 21-godzinnej hodowli PBMC w atmosferze CO₂ (5 %) w temp. 37°C z dodatkiem jako stymulatora PHA (5 μ g/ml).

Skład odsetkowy subpopulacji limfocytów T i limfocytów B oceniono metodą cytometrii przepływowej przy użyciu testu IMK Plus firmy BD Bioscience, stosując standardowe metody ich oceny z wykorzystaniem krwi pełnej. Poziom czynnika reumatoidalnego (ang. reumatoid factor – RF) oznaczono jakościowo testem lateksowym (Arthri-Slindex) i ilościowo testem Waalera-Rose'a (czułość testu 0,4 IU/ml) firmy Bio-Merieux, Lyon, France.

U wszystkich badanych oceniono ponadto obraz morfologiczny krwi obwodowej (WBC, odsetek oraz liczbę bezwzględną limfocytów i granulocytów, liczbę płytek, liczbę erytrocytów i wskaźniki czerwonych, hemoglobinę), podstawowe parametry gospodarki lipidowej (cholesterol całkowity, HDL-Ch, LDL-Ch, TG) a także wykonano oznaczenie aminotransferaz AlAT i AspAT, oraz bilirubinę całkowitą. Wymienione parametry oceniono dwukrotnie: przed i po zakończeniu przyjmowania preparatu. W przypadkach nieprawidłowego lipidogramu po zakończeniu eksperymentu, badania gospodarki lipidowej powtarzano co tydzień, aż do stwierdzenia normalizacji wyników.

Dla wszystkich ocenianych parametrów w obrębie grup badanych obliczono wartość średnią, odchylenie standardowe (SD), a także standardowy błąd średniej – S.E.M. Do weryfikacji statystycznej zastosowano test t - Studenta dla zmiennych powiązanych w celu uchwycenia różnic w wartościach uzyskanych przed i po zakończeniu przyjmowania preparatu.

WYNIKI

Obserwacje kliniczne

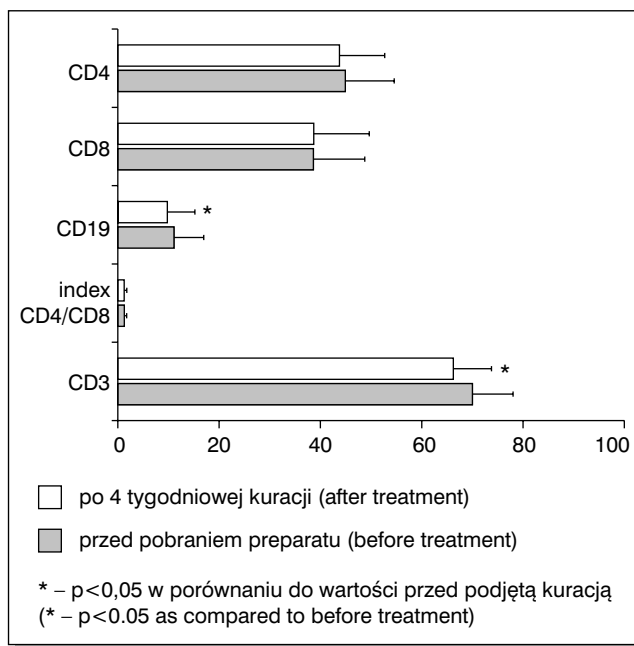
W trakcie trwania eksperymentu 12 ochotników nie zgłaszało poważnych dolegliwości. Podczas cotygodniowych kontrolnych badań lekarskich nie zaobserwowano objawów nakazujących odstawienie lub zmniejszenie dawki preparatu. U 4 badanych wystąpiły przemijające bóle stawów, u wszystkich osób niewielki przyrost masy ciała. U jednej z 13 osób w pierwszym tygodniu brania preparatu odnotowano zapalenie górnych dróg oddechowych, które ustąpiło samoistnie po okresie siedmiu dni.

Morfologia krwi

W ocenie morfologii krwi nie odnotowano istotnych przesunięć zarówno w składzie odsetkowym i bezwzględnej liczbie układu białokrwinkowego, jak i szeregu parametrów opisujących układ czerwokrwinkowy (RBC, HGB, wskaźniki czerwonych, hemoglobinę). Na uwagę zasługuje niewielki spadek płytek krwi (z $233,7 \pm 40,37 \times 10^3/\mu\text{l}$ do $217,5 \pm 44,46 \times 10^3/\mu\text{l}$, $p=0,01$) oraz niewielkie zmniejszenie odsetka granulocytów (przed $58,4 \pm 8,28\%$, po $55,1 \pm 6,76\%$; $p=0,07$).

Skład odsetkowy limfocytów krwi

Odnotowano obniżenie odsetka limfocytów o fenotypie CD3+ (limfocyty T) oraz CD19+ (limfocyty B) (ryc. 1). Pozostałe subpopulacje limfocytów (CD4+, CD8+) nie uległy zmianie.



Ryc. 1. Rozkład procentowy podstawowych subpopulacji limfocytów T, limfocytów B we krwi, przed i po kuracji. Dane przedstawiono jako wartość średnią \pm SD

Fig. 1. T and B lymphocytes distribution in peripheral blood of healthy volunteers before and after treatment. Data are presented as mean \pm SD

Ocena metabolizmu tlenowego neutrofilii krwi obwodowej (PMN)

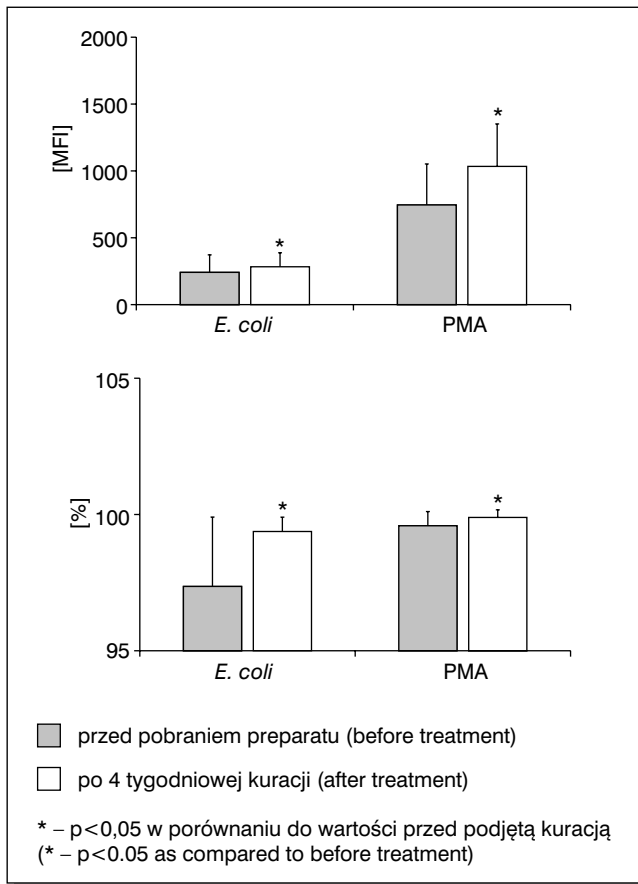
Badania wykazały, iż preparat przyjmowany w dużych dawkach powoduje zdecydowane zwiększenie odpowiedzi PMN ocenianej wzrostem produkcji reaktywnych form tlenu zarówno w kontakcie z patogenem bakteryjnym (bakterie *E. coli*) jak i podczas bezpośredniej stymulacji oksydazy NADPH estrem forbolu (PMA). Odsetek komórek odpowiadających, jak i ich aktywność bójcza (zdolności do generacji RFT) uległy zwiększeniu (ryc. 2).

Całkowita pojemność antyoksydacyjna surowicy

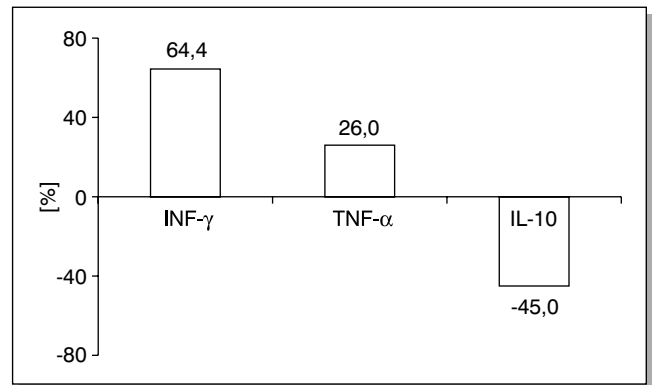
Obecne badania potwierdziły wcześniejsze obserwacje wskazujące na właściwości antyoksydacyjne olejów rybich. Odnotowano średni wzrost wartości TAS z $1,65 \pm 0,190$ ml/L przed do $1,98 \pm 0,185$ ml/L po zakończeniu eksperymentu ($p < 0,05$).

Generacja cytokin przez komórki jednojądrzaste krwi po stymulacji PHA

Przyjmowanie preparatu w dużych dawkach spowodowało znaczny wzrost uwalniania INF- γ oraz TNF- α . U 10 z 13 badanych osób odnotowano wzrost INF- γ powyżej 5000 pg/ml u 3 osób brak zmian ($p < 0,05$). Średni wzrost uwalniania INF- γ wyniósł 64% w porównaniu do wartości przed rozpoczęciem eksperymentu (ryc. 3). U 7 z 13 badanych odnotowano wzrost poziomu TNF- α , u 2 osób nie zaobserwowano zmian, natomiast u jednej z osób stwierdzono obniżenie uwalniania TNF- α ($p < 0,05$). Średni wzrost uwalniania TNF- α wyniósł 26% w porównaniu do wartości przed rozpoczęciem doświadczenia (ryc. 3). Odnotowano również istotny wzrost produkcji IL-2 ($23,8 \pm 17,65$ pg/ml vs $74,4 \pm 64,97$ pg/ml; $p=0,0038$) (ryc. 4). U wszystkich badanych wykazano obniżenie produkcji IL-10 (przed podaniem $1883,5 \pm 1140,28$ pg/ml vs $629,0 \pm 565,13$ pg/ml po odstawieniu; $p=0,001$) (ryc. 4). Średnio obniżenie uwalniania IL-10 po



Ryc. 2. Produkcja reaktywnych form tlenu (RFT) przez neutrofile krwi, stymulowane *E. coli* i PMA oceniana metoda cytometrii przepływowej. Dane przedstawiono jako średnią wartość Mean Fluorescent Intensity (MFI), oraz procent komórek wytwarzających RFT (średnie \pm SD)
Fig. 2. Reactive Oxygen Intermediates (ROI) production by peripheral blood neutrophils stimulated with *E. coli* and PMA. Data are presented as Mean Fluorescent Intensity (MFI) and percent of neutrophils which produce ROI (mean \pm SD)

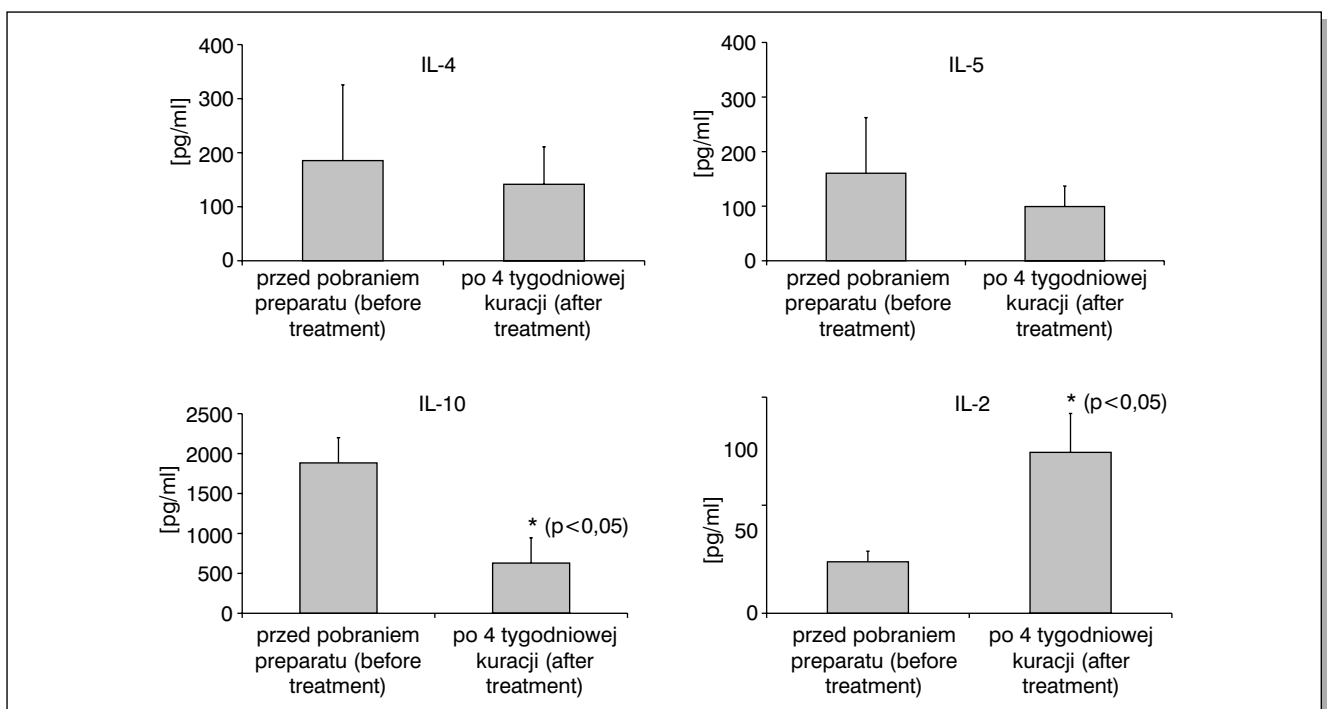


Ryc. 3. Średnie zmiany w produkcji cytokin IFN- γ , TNF- α oraz IL-10, podczas czterotygodniowej kuracji, przez komórki jednojądrzaste krwi w 21 godzinnych hodowlach po stymulacji PHA (5 mg/ml, 37°C, 5% CO₂). Wielkość zmian wyrażono jako procent wartości uzyskanych przed rozpoczęciem kuracji
Fig. 3. The average change in production of IFN- γ , TNF- α and IL-10, by PBMC stimulated with PHA (5 mg/ml, 37°C, 5% CO₂) after consumption of fish liver oil in high dose for four weeks. The data are presented as percent of levels before treatment

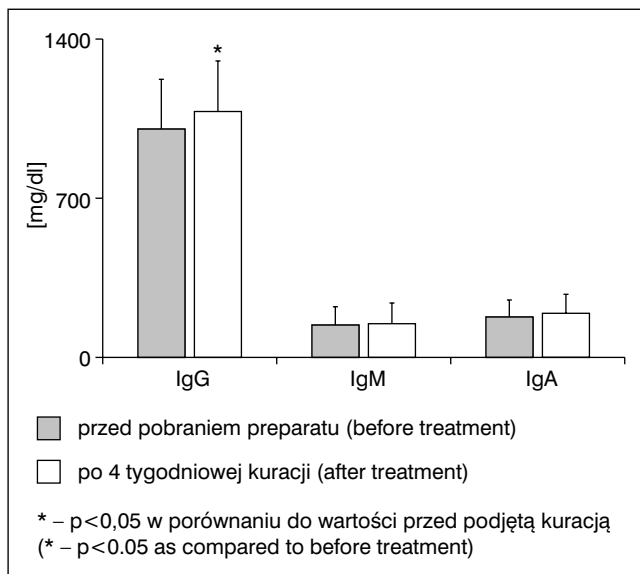
stymulacji PHA wyniosło 45% (ryc. 3). Stężenie IL-4 i IL-5 pozostały na niezmiennym poziomie (ryc. 4).

Poziom składowych układu dopełniacza i immunoglobulin w surowicy

Oceniono wpływ przyjmowanego preparatu na poziom niektórych składowych układu dopełniacza oraz poziom immunoglobulin poszczególnych klas. W badaniach wykazano, iż przyjmowanie preparatu w wysokich dawkach powoduje niewielki wzrost poziomu immunoglobuliny klasy IgG (z 1004,1 \pm 218,76 mg/dl do 1081,26 \pm 22,455 mg/dl; p=0,01), nie wpływa natomiast na poziom immunoglobulin klasy IgM i IgA (ryc. 5). Odnotowano również istotny wzrost składowej C4 układu dopełniacza (17,05 \pm 4,316 mg/dl vs 21,92 \pm 4,739 mg/dl; p=0,008) przy jednoczesnym braku uchwytnej zmian w poziomie składowej C3 (ryc. 6).

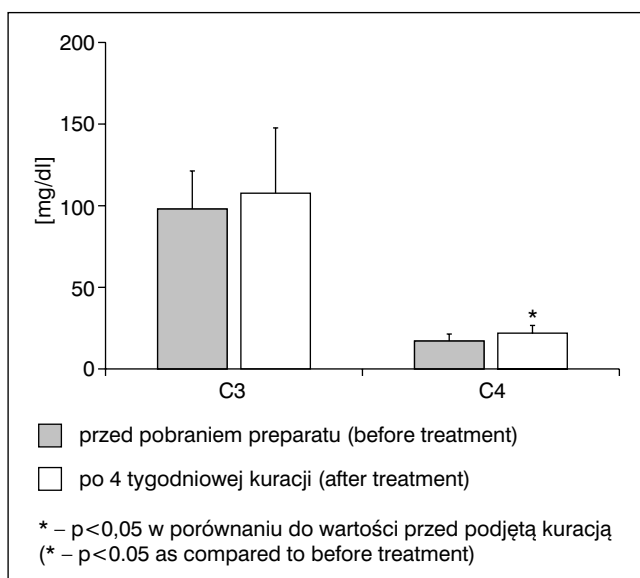


Ryc. 4. Poziom produkcji cytokin typu Th2 (IL-4, IL-5, IL-10) i Th1 (IL-2) przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej w 21 godzinnych hodowlach po stymulacji PHA (5 mg/ml, 37°C, 5% CO₂) (wartości średnie \pm SD)
Fig. 4. The Th2 type (IL-4, IL-5, IL-10) and Th1 type (IL-2) cytokine production by PBMC cultured for 21 hours and stimulated with PHA (5 mg/ml, 37°C, 5% CO₂) (mean \pm SD)



Ryc. 5. Analiza poziomów poszczególnych klas immunoglobulin (IgG, IgM oraz IgA) przed i po 4 tygodniowej kuracji. Dane przedstawiono w postaci wartości średnich \pm SD

Fig. 5. The levels of immunoglobulins (IgG, IgM and IgA), before and after treatment. The data are presented as mean \pm SD



Ryc. 6. Analiza poziomów składowych układu dopełniacza C3 oraz C4 przed i po 4 tygodniowej kuracji. Dane przedstawiono w postaci wartości średnich \pm SD

Fig. 6. The complement C3 and C4 level before and after treatment. The data are presented as mean \pm SD

Badanie obecności czynnika reumatoidalnego

Badania na obecność czynnika RF, przeprowadzone przed rozpoczęciem przyjmowania preparatu, oceniane zarówno testem lateksowym, jak i testem Waalera-Rose były ujemne u wszystkich ochotników. U dwóch osób testem Waalera-Rose odnotowano miano 1:20 (8 IU/ml), podczas gdy stężenie graniczne wynosi 30 IU/ml. Po czterotygodniowym przyjmowaniu oleju z wątroby rekina u żadnego z badanych nie odnotowano dodatniego wyniku tych testów. U osób z dodatnim mianem, 1:20 przed rozpoczęciem eksperymentu, nie zaobserwowano zmiany miana po zakończeniu kuracji.

Parametry gospodarki lipidowej

Przyjmowanie dużych dawek preparatu (30 kapsułek dziennie) wywołało niemal u wszystkich osób (10 z 13) zdecydowany wzrost cholesterolu całkowitego (przed badaniami

182,92 \pm 29,290 mg/dl, po odstawieniu preparatu 224,46 \pm 62,198 mg/dl). U czterech osób podwyższony poziom cholesterolu całkowitego utrzymywał się przez kolejne trzy tygodnie przy wartościach przekraczających 200 mg/dl. Całkowity powrót do wartości wyjściowych u tych osób nastąpił w czwartym tygodniu po zaprzestaniu przyjmowania preparatu. Odnotowano wyraźne obniżenie frakcji HDL-Ch (przed 64,2 \pm 20,90 mg/dl, po 58,7 \pm 16,97 mg/dl) oraz wzrost frakcji LDL-Ch (przed 89,3 \pm 30,08 mg/dl, po 136,54 \pm 61,87 mg/dl). U dwóch osób zmienione poziomy HDL-Ch i LDL-Ch utrzymywały się przez kolejne trzy tygodnie. Wskaźnik HDL-Ch/cholesterol całkowity uległ zmniejszeniu z 0,35 \pm 0,105 do 0,27 \pm 0,088 ($p=0,0022$). Wartości poziomów trójglicerydów pozostały na niezmiennym poziomie (przed 147,3 \pm 87,99 mg/dl, po 146,1 \pm 82,64 mg/dl; $p=0,4812$) (tab. 1).

Tabela 1. Zestawienie średnich wartości \pm SD niektórych wskaźników funkcji komórek wątrobowych (AspAT, AlAT, bilirubina całkowita) oraz wybranych parametrów gospodarki lipidowej (cholesterol całkowity, HDL-Ch, LDL-Ch, TG oraz wskaźnik HDL-Ch/cholesterol całkowity) u osób badanych przed i po cztero tygodniowej kuracji

Table 1. Liver function tests and some parameters of lipid metabolism and cholesterol balance before and after treatment with high doses of shark liver oil (mean \pm SD)

	Przed kuracją (before treatment)	Po kuracji (after treatment)	Zakres wartości prawidłowych (reference valve)
AspAT [I/U]	17,5 \pm 5,09	20,2 \pm 4,71*	K <31, M <37
AlAT [I/U]	18,1 \pm 5,38	21,5 \pm 6,09*	K <31, M <41
Bilirubina całkowita [mg/dl] (Bilirubin)	0,56 \pm 0,204	0,65 \pm 0,206*	<1,2 Wartości pożądane
Cholesterol całkowity [mg/dl] (total cholesterol)	182,9 \pm 29,29	224,5 \pm 62,20*	<200
Trójglicerydy [mg/dl] (Triglyceride)	147,9 \pm 87,99	146,1 \pm 82,64	<200
HDL-Ch [mg/dl]	64,2 \pm 20,90	58,7 \pm 16,97*	K 40-80, M 35-66
LDL-Ch [mg/dl]	89,3 \pm 30,08	136,5 \pm 61,87*	<135
Wskaźnik (Index): HDL-Ch/cholesterol całkowity [mg/dl]	0,35 \pm 0,105	0,27 \pm 0,088*	>0,20

* - $p \leq 0,05$ różnica istotna statystycznie w porównaniu do wartości przed kuracją

* - $p \leq 0,05$ compared to before treatment levels

Parametry stanu czynnościowego i integralność komórek wątroby

U wszystkich badanych przed przyjmowaniem preparatu poziom bilirubiny nie przekraczał zakresu wartości prawidłowych. Po zakończeniu eksperymentu poziom bilirubiny całkowitej nieznacznie uległ zwiększeniu (przed eksperymentem 0,56 \pm 0,204 mg/dl, po 0,65 \pm 0,206 mg/dl; zakres wartości prawidłowych 0,2-1,0 mg/dl) ($p=0,0096$). Średnie wartości aktywności enzymów AlAT oraz AspAT również uległy wzrostowi i różnice okazały się istotne statystycznie. Podobnie jednak, jak w przypadku bilirubiny, wartości te nie przekroczyły górnego zakresu wartości referencyjnych, zarówno dla wartości średnich, jak i jednostkowych dla poszczególnych osób (tab. 1).

OMÓWIENIE

Olej z wątroby rekina jest naturalnym preparatem złożonym, w którego skład wchodzi skwalen, alkilglicerole, WKT n-3 oraz niewielkie ilości witamin A i D. Wpływ wysokich dawek tych

związków – podawanych jednocześnie – nie był dotychczas badany.

W obecnych badaniach wykazano, że stosowanie oleju z wątroby rekina w wysokich dawkach przez okres 4 tygodni znacząco wpłynęło na układ immunologiczny i gospodarkę lipidową osób biorących udział w eksperymencie.

Stwierdzono zwiększoną odpowiedź neutrofilii na stymulację *E. coli* i PMA w teście Bursstest przeprowadzonym we krwi pełnej. Aktywacja neutrofilii może być związana z działaniem alkilogliceroli, które zwiększają uwalnianie biologicznie czynnego PAFu, a także z działaniem skwalenu, który „opsonizuje” i ułatwia prezentację antygenów [5, 28]. Zwiększona i bardziej wydajna opsonizacja patogenów przez związki skwalenu ma swoje przełożenie na zwiększenie liczby komórek odpowiadających na stymulację bakteriami *E. coli* (ryc. 2). Również wzmoczone wydzielanie cytokin prozapalnych takich jak TNF- α , IL-2 (ryc. 2, 3) przy jednoczesnym zahamowaniu produkcji IL-10 przez limfocyty jest dodatkowym czynnikiem zwiększającym bardziej efektywne zabijanie bakterii na drodze tlenowozależnej, które ma miejsce podczas zjawiska uzbrajania neutrofilii (preaktywacji) [23, 32]. Obserwacje te mają odzwierciedlenie w zmianach obserwowanych w morfologii krwi, w której na skutek zwiększenia produkcji RFT organizm fizjologicznie zareagował obniżeniem bezwzględnej liczby oraz odsetkiem neutrofilii. Najprawdopodobniej jest to jeden z mechanizmów obronnych ludzkiego organizmu przed konsekwencjami stresu oksydacyjnego.

Zwiększeniu potencjału oksydacyjnego neutrofilii również towarzyszył wzrost całkowitej pojemności antyoksydacyjnej surowicy. Jednym z możliwych mechanizmów wzrostu TAS jest działanie skwalenu, który jak wcześniejsze badania wykazały posiada właściwości przeciwutleniaacza [13, 23]. Działanie takie zabezpiecza organizm przed niekorzystnymi konsekwencjami stresu oksydacyjnego, wynikającego ze zwiększonej produkcji RFT przez komórki fagocytyczne podczas reakcji zapalnej.

Stosowanie oleju z wątroby rekina w dużych dawkach miało wpływ zarówno na parametry odporności nabytej, jak i wrodzonej. Zaobserwowano polaryzację limfocytów T w kierunku Th1, co manifestowało się nasileniem uwalniania przez PBMC IFN- γ , TNF- α i IL-2, przy jednoczesnym obniżeniu produkcji IL-10, charakterystycznej dla limfocytów Th2. Stwierdzono ponadto zwiększenie stężenia IgG w osoczu, co jest charakterystyczne dla aktywacji odpowiedzi immunologicznej przy udziale limfocytów Th1. Trudno jest wyjaśnić bezpośredni mechanizm polaryzacji limfocytów i ich zdolności do syntezy cytokin prozapalnych. Kluczowymi mediatorami wpływającymi na polaryzację naiwnych limfocytów Th w kierunku Th1 poprzez aktywację czynników transkrypcyjnych STAT 4 i T-bet są IL-12, IL-18 i INF- α [26, 28]. Prawdopodobnie alkiloglicerole i skwalen, które ilościowo przeważają w oleju z wątroby rekina, aktywują do produkcji cytokin prozapalnych komórki odporności nieswoistej takie jak monocyty, komórki dendrytyczne i neutrofile. Ułatwiają prezentację antygenów limfocytom T, co w konsekwencji doprowadza do aktywacji limfocytów Th1. Z drugiej zaś strony, zwiększone wytwarzanie cytokin typu 1 przez PBMC może być przyczyną obserwowanej aktywacji neutrofilii i zwiększonej generacji RFT po stymulacji bakteriami lub PMA. Ponadto cytokiny prozapalne są silnymi stymulatorami wytwarzania składowych układu dopełniacza, co może tłumaczyć zwiększenie poziomu składowej C4 układu dopełniacza w niniejszych badaniach. Pewnym wytłumaczeniem zaobserwowanego wzrostu TNF- α wraz ze składową C4 dopełniacza może być to, iż geny kodujące oba te czynniki leżą w bliskiej od siebie odległości na tym samym chromosomie 6, co w przypadku pobudzenia komórek immunokompetentnych powoduje, iż czynniki transkrypcyjne aktywują syntezę obu mediatorów jednocześnie i synergiicznie [33].

Pośrednią odpowiedzią organizmu na zwiększoną syntezę czynników prozapalnych jest ograniczenie liczby komórek wytwarzających te czynniki, co wykazaliśmy oceniając

odsetek subpopulacji komórek jednojądrzastych (obniżenie odsetka limfocytów o fenotypie CD3 i CD19).

Analiza badań biochemicznych, pozwalających ocenić stan czynnościowy i integralność komórek wątroby wykazała, że preparat podawany w dużych dawkach nie jest hepatotoksyczny. Niewielki wzrost poziomu bilirubiny oraz enzymów wskaźnikowych jest prawdopodobnie konsekwencją zwiększenia metabolizmu komórek wątroby (m.in. produkcji lipoprotein, kwasów żółciowych) i świadczy raczej o funkcji hepatocytów, niż zaburzeniu integralności komórek.

W trakcie obecnych badań zaobserwowano negatywne skutki przyjmowania oleju z wątroby rekina w dużych dawkach na gospodarkę lipidową. Stwierdzono podwyższenie zawartości cholesterolu całkowitego we krwi z jednoczesnym spadkiem frakcji HDL i wzrostem LDL u większości osób biorących udział w badaniu. Jednakże, w ciągu 3 tygodni od zakończenia przyjmowania preparatu parametry gospodarki lipidowej uległy samoistnie stopniowej normalizacji u wszystkich badanych osób. Wyniki wcześniejszych badań sugerowały brak negatywnego wpływu skwalenu, będącego prekursorem cholesterolu, na gospodarkę lipidową. Wykazano wówczas, że syntetyczne pochodne skwalenu, dostarczone do organizmu powodują zahamowanie biosyntezy cholesterolu, co najprawdopodobniej jest wynikiem hamowania enzymów mikrosomalnej monoooksygenazy skwalenu i mikrosomalnej cykazy 2,3-oksydoskwalenu w komórkach hepatoblastomy [29]. W innym eksperymencie stwierdzono, że skwalen podawany doustnie był wchłaniany w około 60%, a podczas przyjmowania skwalenu przez ludzi w dawce 900 mg/dobę przez 7-30 dni, jego stężenie w surowicy wzrastało 17 razy, przy czym poziom trójglicerydów pozostał bez zmian, a poziom cholesterolu nieznacznie obniżył się [30]. Na podstawie powyższych wyników można stwierdzić, że stosowanie oleju z wątroby rekina w dużych dawkach (30 kapsulek dziennie) nie jest wskazane u osób z wcześniej stwierdzonymi zaburzeniami gospodarki lipidowej, gdyż długotrwałe podwyższenie poziomu frakcji LDL-cholesterolu z jednoczesnym obniżeniem frakcji HDL-Ch jest jednym z czynników sprzyjających rozwojowi miażdżycy naczyń.

W badaniach na zwierzętach wykazano, iż skwalen po podaniu dootrzewnowym może indukować produkcję auto-przeciwciał anty-nRNP/Sm i Su [20]. Ponadto w obecnych badaniach wykazano nasilenie wytwarzania cytokin typu 1 i zmniejszenie wytwarzania IL-10 – cytokiny o działaniu przeciwzapalnym i antagonistycznym w stosunku do cytokin typu 1 u osób przyjmujących olej z wątroby rekina, co również może promować rozwój procesów zapalnych. Zachodziła więc uzasadniona obawa, że przyjmowanie dużych dawek preparatu może nasilać istniejące u pacjentów choroby autoimmunizacyjne albo wręcz je wywołać [20]. W niniejszych badaniach oceniono obecność czynnika reumatoidalnego testem lateksowym i Waalera-Rose'a. Oznaczenia przed rozpoczęciem badań, jak i po ich zakończeniu u wszystkich ochotników wypadły ujemne. Badania te mogą wskazywać, iż przyjmowanie preparatu w tak dużych dawkach przez okres czterech tygodni nie ma istotnego wpływu na indukcję lub nasilenie dolegliwości reumatycznych. Niemniej jednak należy podkreślić, iż badanie na obecność czynnika reumatoidalnego jest parametrem nieswoistym i brak tego czynnika nie wyklucza całkowicie istnienia choroby o podłożu autoimmunizacyjnym.

Wyniki obecnych badań są pomocne w ustaleniu wskazań i przeciwwskazań do stosowania oleju z wątroby rekina. Za uzasadnione wydaje się być stosowanie preparatu w leczeniu skojarzonym infekcji wirusowych, bakteryjnych, a także alergii czy nowotworów. W leczeniu tych jednostek chorobowych pożądana jest polaryzacja limfocytów T w kierunku Th1 i supresja limfocytów Th2. Dalsze badania, polegające na stosowaniu preparatu wraz z konwencjonalnym leczeniem w eliminacji zakażeń wirusowych m.in. HBV, HCV, nawracających objawowych zakażeń HSV i HPV, jak również wirusa grypy, mogłyby wykazać skuteczność stosowania preparatu

w wysokich dawkach jako naturalnego immunostymulatora. Ponadto dzięki wzmocnieniu odporności nieswoistej, olej z wątroby rekina może okazać się pomocny w leczeniu nawracających zakażeń bakteryjnych i grzybiczych.

Przeciwwskazaniem do stosowania oleju z wątroby rekina w dużych dawkach są wszelkie choroby o podłożu autoimmunizacyjnym oraz choroby układu sercowo-naczyniowego ze stwierdzonym zaburzeniem gospodarki lipidowej. Pożądane jest ustalenie takiego dawkowania preparatu, które pozwoli ograniczyć negatywny wpływ na gospodarkę lipidową przy jednoczesnym zachowaniu właściwości immunostymulujących preparatu.

Autorzy pracy składają podziękowanie firmie Marinex International, Pani Jolancie Filipiak, Bożenie Lewandowskiej, Anecie Skomial oraz pracownikom Zakładu Diagnostyki Laboratoryjnej I-CZMP w Łodzi za pomoc przy realizacji badań.

PIŚMIENNICTWO

- Ahn Y.K., Kin J.H.: *Effects of squalene on the immune response in mice (II), Cellular and non-specific immune response and antitumor activity of squalene*. Arch. Pharmacol. Res., 1992, 15, 20-6.
- Aktas H., Haiperin J.A.: *Translational regulation of gene expression by omega-3 fatty acids*. J. Nutr., 2004, 134, 2487-91.
- Allison A.: *Squalene and squalene emulsions as adjuvants*. Methods A Comp. Methods in Enzymol., 1999, 19, 87-93.
- Andreesen R., Modellell M.L., Weltzien H.U. i wsp.: *Selective destruction of human leukemic cells by alkylsophospholipids*. Cancer Res., 1978, 38, 3984-9.
- Banzhoff A., Nacci P., Podda A.: *A new MF59-adjuvanted influenza vaccine enhances the immune response in the elderly with chronic diseases: results from an immunogenicity meta-analysis*. Gerontology., 2003, 49, 177-84.
- Brohult A.: *Reduced mortality in cancer patients after administration of alkoxyglycerols*. Acta Obst. Gynecol. Scand., 1988, 65, 779-85.
- Calder P.C.: *More good news about fish oil*. Nutrition., 2001, 17, 158-60.
- Calder P.C.: *Immunoregulatory and anti-inflammatory effects of n-3 polyunsaturated fatty acids*. Braz. J. Med. Biol. Res., 1998, 31, 467-90.
- Calder P.C.: *Fat chnce in immunomodulation*. Immunol. Today, 1998, 19, 244-7.
- Carroll K.: *Fat and cancer*. Cancer, 1986, 58, 1818-25.
- Chi T.Y., Chen G.G., Lai P.B.: *Eicosapentaenoic acid induces Fas-mediated apoptosis through a p53-dependent pathway in hepatoma cells*. Cancer J., 2004, 10, 190-200.
- Daniel L.W., Small G.W., Schitt J.D.: *Alkyl-linked diglycerides inhibit protein kinase C activation by diacylglycerols*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1988, 151, 291-7.
- FAO/WHO. *Fats and oils in human nutrition*. Food and nutrition paper FAO/WHO, 1994, no. 57.
- Gonzales M., Schemel R.: *Dietary fish oils inhibit human breast carcinoma growth*. Lipids., 1993, 9, 827-32.
- Gurańska N., Lewkowicz P., Urbaniak B. i wsp.: *Ocena skuteczności leczenia aft nawrotowych olejem z wątroby rekina w aspekcie badań klinicznych i immunologicznych*. Pol. Merk. Lek., 2001, 63, 233-8.
- Hallgren B., Stallberg G., Boeryd B.: *Prog Chem Fats Other Lipids*. 1978, 16, 45-58.
- Heymans F., da Silva C., Marrec N. i wsp.: *Alkyl analogs of diacylglycerols as activators of protein kinase C*. FEBS, 1987, 218, 35-40.
- Hichami A., Duroudier V., Leblais V. i wsp.: *Modulation of platelet-activating factor production by incorporation of natural occurring 1-o-alkylglycerols in phospholipids of human leukemic monocyte-like THP-1 cells*. Eur. J. Biochem., 1997, 250, 242-8.
- Hoffman D.R., Thomas V.L., Snyder F.: *Inhibition of cellular transport systems by alkyl phospholipids analogs in HL-60 human leukemia cells*. Biochem. Biophys. Acta., 1992, 1127, 74-80.
- Kuroda Y., Nacionales D.C., Akaogi J. i wsp.: *Autoimmunity induced by adjuvant hydrocarbon oil components of vaccine*. Biomed. Pharmacother., 2004, 58, 325-37.
- Lewis A., Lookinland S., Beckstrand R.L. i wsp.: *Treatment of hypertriglyceridemia with omega-3 fatty acids: a systematic review*. J. Am. Acad. Nurse Pract., 2004, 16, 384-95.
- Lewkowicz P., Lewkowicz N., Głowacka E. i wsp.: *Rola alkilogliceroli, skwalenu i wielonienasyconych kwasów omega 3 w zwalczaniu infekcji bakteryjnych - modyfikacja naturalnych (wrodzonych) mechanizmów odporności*. Problemy Ter. Mon., 2002, 13, 163-9.
- Lewkowicz P., Lewkowicz N., Tchórzewski H.: *Immunomodulujące właściwości preparatu z wątroby rekina*. Problemy Ter. Mon., 2001, 12, 189-95.
- Marigny K., Pedrono F., Martin-Chouilly C.A.E. i wsp.: *Modulation of endothelial permeability by 1-o-alkylglycerols*. Acta. Physiol. Scand., 2002, 196, 263-8.
- Ohsava K., Watanabe T., Matsukava R. i wsp.: *The possible role of squalene and it's peroxide of the sebum in the occurrence of sunburn and protection from the damage cause by UV irradiation*. J. Toxicol. Sciences, 1984, 9, 151-9.
- Perussia B., Loza M.J.: *Linear '2-0-1' lymphocyte development: hypotheses on cellular bases for immunity*. Trends Immunol., 2003, 24, 235-4.
- Pugliese P.T., Jordan K., Cederberg H. i wsp.: *Some biological action of alkylglycerols from shark liver oil*. J. Altern. Complement. Medicine, 1998, 4, 87-99.
- Rengarajan J., Szabo S.J., Glimcher L.H.: *Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarozation*. Immunol. Today, 200, 21, 479-83.
- Sickle V., Algenastro M.R., Wilson P. i wsp.: *Inhibition of cholesterol synthesis by cyklopropylaminoderiwates of squalene in human hepatoblastoma cells in culture*. Lipids, 1992, 27, 157-61.
- Stranberg T.E., Tilvis R.S., Miettinen T.A.: *Metabolic variables of cholesterol during squalene feeding in humans: comparison with cholestyramine treatment*. J. Lipid Res., 1990, 31, 1637-2.
- Tchórzewski H., Banasik M., Głowacka E., Lewkowicz P.: *Modyfikujący wpływ niektórych składowych oleju z wątroby rekina na odporność naturalną u ludzi*. Pol. Merk. Lek., 2002, 76, 329-32.
- Tchórzewski H.: *Regulacja odczynu zapalnego, Zapalenie. Patofizjologia i klinika*. Tchórzewski H. i wsp.: Medpress, Warszawa 1998, 13.
- Tchórzewski H.: *Regulacja odczynu zapalnego, Zapalenie. Patofizjologia i klinika*. Tchórzewski H i wsp.: Medpress, Warszawa 1998, 30.
- Triggiani M., Schleimer R.P., Warner J.A. i wsp.: *Differential synthesis of 1-acyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine and platelet-activating factor by human inflammatory cells*. J. Immunol., 1991, 147, 660-6.

Otrzymano: 30 grudnia 2004 r.

Adres: Przemysław Lewkowicz, Zakład Immunologii Klinicznej I-CZMP w Łodzi, ul. Rzgowska 281/289, 93-338 Łódź, tel. (0 42) 271 13 28, e-mial: natalewk@wp.pl