

Badania wstępne

Rola alkilogliceroli, skwalenu i wielonienasyconych kwasów omega 3 w zwalczaniu infekcji bakteryjnych – modyfikacja naturalnych (wrodzonych) mechanizmów odporności

P. Lewkowicz, N. Lewkowicz, M. Banasik, H. Tchórzewski

Zakład Immunologii Klinicznej Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi;

kierownik: prof. dr hab. med. H. Tchórzewski. Adres: ul. Rzgowska 281/289, 93-338 Łódź.

WPROWADZENIE

Zapalenie stanowi zespół reakcji wywołanych obcymi substancjami (np.: czynnikami zakaźnymi), uszkodzeniem mechanicznym tkanek lub też powstałych w wyniku reakcji immunologicznych. W wyniku działania mediatorów zapalenia następuje aktywacja komórek wczesnej fazy zapalenia – neutrofilii. Komórki te, przechodząc w miejsce objęte procesem zapalnym, uwalniają szereg czynników o działaniu prozapalnym, a także enzymy proteolityczne (kolagenazy, elastazy, proteazy), odpowiedzialne za aktywację układu kalikreina - kininogen - kininy (1). Rozwój wiedzy na temat funkcji układu immunologicznego i jego udziału w patogenezie wielu chorób doprowadził do wzrostu zainteresowania możliwościami wykorzystania w leczeniu immunomodulujących właściwości substancji naturalnych. Niewątpliwą zaletą takiej terapii jest to, iż nie wywołując objawów niepożądanych, pozwala organizmowi na uruchomienie własnych mechanizmów regulujących reakcje odporności, a w szczególności mechanizmów naturalnej (wrodzonej) odpowiedzi immunologicznej (2, 3). Korzystne właściwości tych preparatów zostały potwierdzone nie tylko na podstawie obserwacji epidemiologicznych, ale także w badaniach klinicznych, prowadzonych na zwierzętach jak i w układach badawczych w warunkach *in vitro* (3, 4, 5, 6). Coraz większą uwagę przywiązuje się zastosowaniu preparatów zawierających wielonienasycone kwasy szeregu omega-3, również w żywieniu pozajelitowym (7, 8, 9, 10, 11, 12). Badania prowadzone na zwierzętach wykazały korzystny wpływ wlewów dożylnych WKT omega-3 i alkilogliceroli w eliminacji posocznicy wywołanej *E. coli* w porównaniu z terapią prowadzoną WKT omega-6, oraz lepszy stan ogólny zwierząt (11, 12). Związki WKT omega-3 i alkiloglicerole powodowały lepszą eliminację bakterii *E. coli* poprzez zwiększenie właściwości fagocytarnych neutrofilii, makrofagów płuc (komórek Kupfera) przy jednoczesnym ograniczeniu intensywności procesu zapalnego w porównaniu z preparatami oleju sojowego (WKT omega-6). Badania te jednoznacznie sugerują możliwość wykorzystania olejów otrzymanywanych z wątroby ryb morskich w zwalczaniu infekcji bakteryjnych.

Jednym z możliwych mechanizmów bezpośredniego przeciwzapalnego działania jest hamowanie przez WKT omega-3 na drodze kompetycyjnej enzymów cyklooksygenazy i lipooksygenazy, co prowadzi do spadku syntezy pochodnych kwasu arachidonowego: prostaglandyny (PGE_2), tromboksanu (TXA_2), leukotrienów (LT_4), lipoksyny przy jednoczesnym wzroście uwalniania prostaglandyn ograniczających proces zapalny prostaglandyny - PGE_3 i leukotrienu - LT_5 (13, 14, 15). Inni autorzy sugerują iż efekt ten dodatkowo jest potęgowany przez ograniczenie syntezy cytokin prozapalnych (IL-2, IL-6, IL-

8, IL-12, TNF- α) przy nieznacznym wpływie na cytokiny ograniczające proces zapalny (IL-10) (14, 15, 16, 17, 18, 19, 20).

Obserwacje przeprowadzone na różnych poziomach technik badawczych (począwszy od obserwacji epidemiologicznych poprzez badania kliniczne i doświadczenia wykonywanych na komórkach w warunkach *in vitro*) usankcjonowały rolę olejów uzyskanych z ryb morskich w modulowaniu mechanizmów naturalnej odpowiedzi immunologicznej (2).

W niniejszej pracy oceniamy wpływ preparatu BioMarine 570 zawierającego olej z wątroby rekina o składzie: 120 mg skwalenu, 120 mg alkoksyglicerolii, 25 mg kwasów tłuszczowych omega-3, 50 j. m. witaminy A i 5 j. m. witaminy D na aktywność ludzkich neutrofilii osób z nawracającymi infekcjami górnych dróg oddechowych. Dodatkowo wykonano ocenę wpływu preparatu na zmianę składu odsetkowego subpopulacji limfocytów T (CD3, CD4, CD8), limfocytów B (CD19) oraz komórek NK (CD16/CD56).

MATERIAŁ I METODY

W badaniu wzięło udział 19 osób: 11 kobiet i 8 mężczyzn w wieku 19-55 lat (średnia wieku $38,4 \pm 11,76$ lat). Do grupy badanej na podstawie wywiadu i badania klinicznego zakwalifikowano osoby z nawracającymi infekcjami górnych dróg oddechowych, bez chorób ogólnoustrojowych i nie przyjmujące żadnych leków w momencie trwania kuracji. Osoby badane byli pacjentami przyjmowani Poradni Zaburzeń Odporności Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki. Preparat był przyjmowany w dawce 3 kapsułki 3 razy dziennie przez okres dwóch miesięcy.

Przed rozpoczęciem przyjmowania leku oraz po zakończonym leczeniu od każdej z osób pobrano 2 ml krwi na heparynę litową w celu wykonania badań immunologicznych i oceny morfologii krwi obwodowej.

Oceniono następujące parametry immunologiczne:

- czynność neutrofilów poprzez badanie produkcji reaktywnych form tlenu (RFT) w układzie: bez pobudzenia oraz po stymulacji receptorowo zależnymi stymulatorami (formylo-metionylo-leucylo-feniloalanina – fMLP i opsonizowany zymosan - OZ) i receptorowo niezależnym stymulatorem (ester forbolu - PMA) metodą chemiluminescencji krwi pełnej (21). Pomiar przeprowadzono aparatem MLX Microtiter[®] Plate Luminometr; wartości chemiluminescencji krwi pełnej skorygowano o liczbę bezwzględną neutrofilów oraz stężenie hemoglobiny i wyrażono w umownych jednostkach luminescencji RLU_{max} (Relative Light Units Max) wg. wzoru:

$$CL \text{ wyliczona} = CL \text{ zmierzona [RLU max]} \times \frac{Hb [\%]}{WBC [tys/\mu L] \times PMN [\%]}$$

WBC – bezwzględna liczba białych krwinek [$10^3/\mu\text{l}$] (white blood cell)

CL – chemiluminescencja [RLUmax]

Hb – hemoglobina (haemoglobin) [%]

PMN – neutrofile krwi obwodowej (polymorphonuclear leukocytes) [%]

- skład odsetkowy subpopulacji limfocytów T (CD3, CD4, CD8), odsetek limfocytów B (CD19), komórek NK (CD16/CD56) krwi obwodowej, znakowanych przeciwciałami monoklonalnymi firmy Becton-Dickinson, oceniony przy użyciu cytometru przepływowego FACS Calibur firmy Becton-Dickinson.

Dla wszystkich parametrów obliczono wartość średnią, odchylenie standardowe (SD). Do weryfikacji statystycznej danych zastosowano następujące testy: Kołmogorowa-Smirnowa z poprawką Lillieforsa celem sprawdzenia zgodności otrzymanych danych z rozkładem normalnym; Fishera-Snedecora, t-Studenta, Cohrana-Coxa oraz t-Studenta dla zmiennych powiązanych celem analizy wartości oczekiwanych w pomiędzy badanymi grupami. Za wynik istotny statystycznie przyjęto $p \leq 0,05$. W celu sprawdzenia czy stosownie preparatu prowadzi do normalizacji badanych parametrów wykorzystano opracowane, z podziałem na grupy wiekowe, wartości referencyjne dla każdej z metod.

WYNIKI BADAŃ

Ocena kliniczna.

W momencie zakończenia leczenia stwierdzono obniżenie średniej liczby nawrotów i zmniejszenie częstotliwości występowania infekcji górnych dróg oddechowych w porównaniu do stanu przed leczeniem, średnio z 1,32/miesiąc przed leczeniem do 0,91/miesiąc w drugim miesiącu po leczeniu. Podczas stosowania preparatu BioMarine 570 nie zaobserwowano niekorzystnych działań ubocznych.

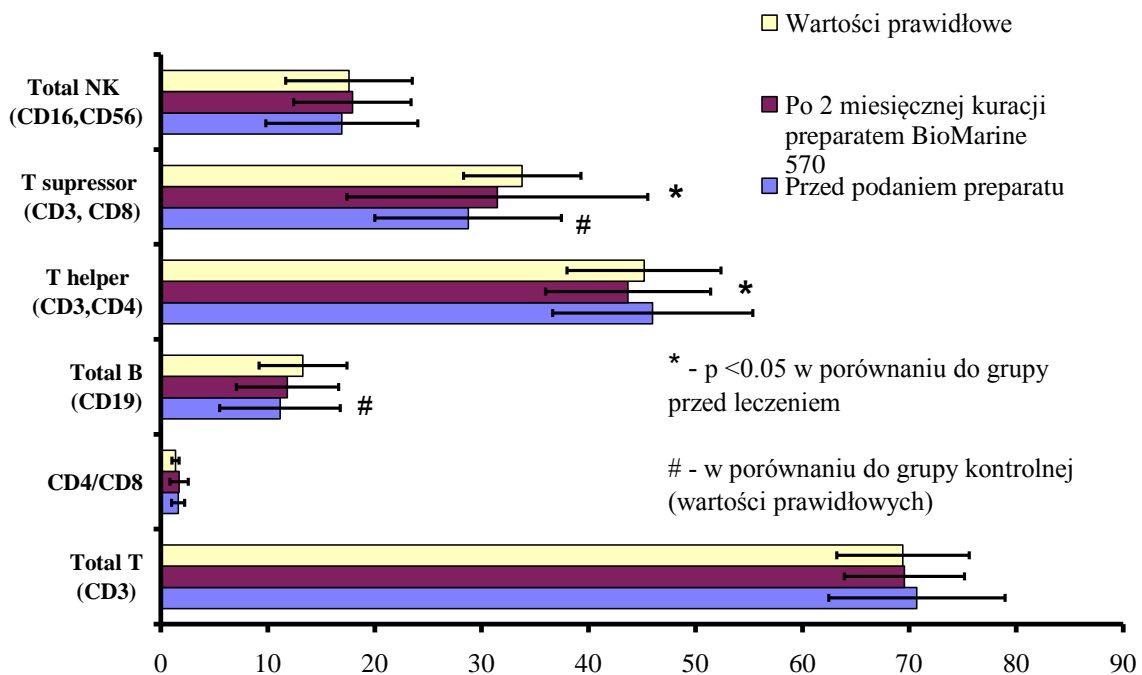
Badania immunologiczne.

Badania składu odsetkowego subpopulacji limfocytów krwi obwodowej u osób chorych wykazały obniżony odsetek limfocytów B (CD19+) i limfocytów T CD8+ w porównaniu do osób zdrowych. Po leczeniu stwierdzono wzrost odsetka limfocytów T CD8+ i B (CD19+) do wartości obserwowanych u ludzi zdrowych. Odsetek poszczególnych

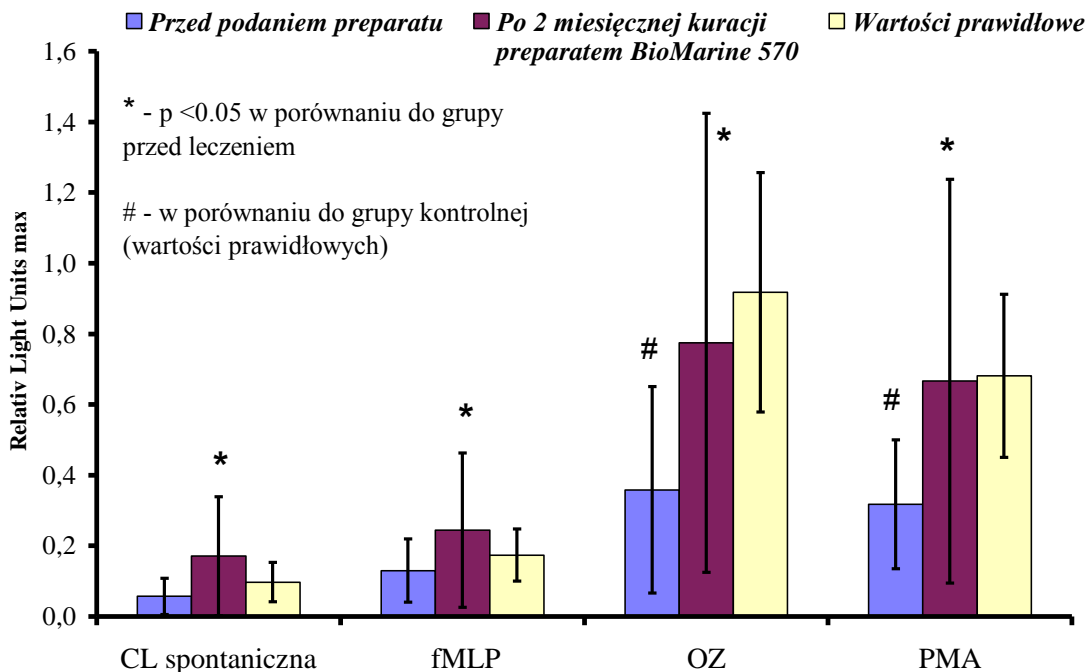
subpopulacji limfocytów T, limfocytów B, komórek NK oraz wartości wskaźnika CD4/CD8 zestawiono na rycinie 1.

U pacjentów przed rozpoczęciem leczenia zaobserwowano zmniejszoną produkcję RFT przez neutrofile stymulowane opsonizowanym zymosanem (OZ) oraz PMA (ester forbolu – stymulacja neutrofilii drogą pozareceptorową oksydazy NADPH). Po leczeniu istotnie wzrosła produkcja RFT przez neutrofile stymulowane OZ i PMA - wartości chemiluminescencji nie odbiegały od zakresu wartości prawidłowych. Chemiluminescencja spoczynkowa i stymulowana fMLP wzrosła istotnie w porównaniu do wartości obserwowanych przed rozpoczęciem kuracji. Analizę średnich wartości produkcji reaktywnych form tlenu przez neutrofile spoczynkowe i stymulowane fMLP, OZ i PMA u pacjentów w fazie aktywnej (przed rozpoczęciem leczenia) i w okresie remisji choroby (po dwumiesięcznej kuracji) oraz osób zdrowych zestawiono na rycinie 2.

Rycina 1. Ocena subpopulacji limfocytów metodą cytometrii przepływowej przed i po leczeniu preparatem BIOMARINE 570



Rycina 2. Ocena produkcji reaktywnych form tlenu przez neutrofile przed i po leczeniu preparatem BioMarine 570, mierzona metodą chemiluminescencji wzmacnianej luminolem.



DYSKUSJA

Preparaty uzyskane na bazie wyciągu z wątroby rekina zawierają takie związki jak: skwalen, alkiloglicerole, wielonienasycone kwasy tłuszczowe (WKT) omega-3, witaminy A i D. Wielonienasycone kwasy tłuszczowe szeregu omega-3 nie są syntetyzowane *de novo* w organizmie ludzkim. Prekursorem WKT szeregu omega-3 jest kwas α -linolenowy, który w toku dalszych przemian enzymatycznych ulega konwersji do kwasu eikozapentaenowego (EPA) i dokozaheksaenowego (DHA). Dieta bogata w kwasy omega-3 powoduje spadek poziomu kwasu arachidonowego oraz wzrost poziomu kwasów eikozapentaenowego i dokozaheksaenowego. Obniża to z kolei produkcję eikonozaidów prozapalnych (PGE_2 i LT_4) i zwiększa ilość produktów przemiany kwasu eikozapentaenowego (PGE_3 i LTA_5), które mają kilkakrotnie mniejszą aktywność biologiczną niż ich analogi, syntetyzowane z kwasu arachidonowego. Ponadto EPA i DHA na drodze kompetycyjnej hamują konwersję kwasu arachidonowego do prostaglandyn (13, 14). Dzięki tym właściwościom dieta bogata w kwasy szeregu omega-3 wpływa na drodze naturalnej na ograniczenie przewlekłych procesów zapalnych (14).

Nasze badania wykazały korzystny wpływ stosowania preparatu w normalizacji badanych parametrów immunologicznych. Badania oceny aktywności neutrofilii poprzez pomiar zdolności neutrofilii do produkcji i uwalniania reaktywnych form tlenu po stymulacji wykazały, iż komórki te zdecydowanie lepiej odpowiadają po kuracji preparatem BioMarine 570 na stymulację OZ i PMA. Nasze obserwacje mają potwierdzenie w badaniach wykonanych na modelu zwierzęcym sepsy wywołanej E. Coli (11). Lepsza odpowiedź neutrofilii po stymulacji OZ może być skutkiem lepszej i bardziej efektywnej opsonizacji bakterii jak i zwiększeniem wydolności i efektywności oksydazy NADPH (enzymu odpowiedzialnego za produkcję RFT w aktywowanych neutrofilach), co ma potwierdzenie w zwiększonej produkcji RFT pod wpływem stymulacji PMA (22, 23). Oczywiście podwyższony poziom uwalniania RFT obserwowany u pacjentów przyjmujących preparat może powodować wątpliwości czy nie zakłóca to naturalnych mechanizmów bariery antyoksydacyjnej. Obecność w przestrzeniach zewnątrz jak i wewnątrzkomórkowej WKT, skwalenu stanowi naturalną obronę antyoksydacyjną. WKT i skwalen z jednej strony stanowią źródło (substrat) do odnowy potencjalnie uszkodzonych już elementów błonowych, z drugiej strony są tarczą dla RFT obecnych w przestrzeni zewnątrzkomórkowej, co w konsekwencji nie dopuszcza do peroksydacji lipidów błonowych (2). Związki będące elementami błony komórkowej, dzięki możliwości wbudowania do jej wnętrza, poprawiają jej płynność i szczelność, co stanowi dodatkowy element chroniący komórkę przed wolnymi rodnikami. Znaczenie tych związków jako antyoksydantów podnosi fakt, iż są one wbudowywane w podwójną błonę lipidową mitochondriów, a więc są w bezpośredniej bliskości źródła powstawania RFT (łańcuch oddechowy) (2). Potwierdzeniem właściwości antyoksydacyjnych oleju uzyskanego z wątroby rekina są nasze wcześniejsze badania które wykazały istotny wzrost całkowitej pojemności antyoksydacyjnej surowicy u pacjentów z aftami nawrotowymi jamy ustnej leczonych preparatem BioMarine 570 (24). Badania te również potwierdziły, iż związki te posiadają właściwości ograniczające proces zapalny. Wykazano m.in.: obniżenie poziomu składowych układu dopełniacza C3, C4, aktywności hemolitycznej CH50 (składowe układu dopełniacza C3c i C4 są czułymi wskaźnikami toczącego się procesu zapalnego - składowa C4 bierze udział w aktywacji drogi klasycznej układu dopełniacza, zaś składowa C3c zarówno drogi klasycznej jak i alternatywnej; spadek poziomu składowej C4 oraz wartości CH50 może świadczyć o ograniczeniu aktywnego procesu zapalnego), odsetka limfocytów T o fenotypie HLA-DR (obniżenie odsetka limfocytów aktywowanych T CD3/HLA-DR+ wskazuje również na remisję choroby). Zaobserwowano również zwiększoną odpowiedź neutrofilii na fMLP po uprzedniej

preaktywacji TNF- α , co pośrednio wskazuje na remisję czynników prozapalnych powodujących preaktywację neutrofilii *in vivo*, a więc potwierdza przeciwzapalny charakter preparatu (2, 24).

Analiza podstawowych subpopulacji limfocytów wykazała, iż stosowanie preparatu powoduje powrót do wartości prawidłowych limfocytów T CD8⁺ oraz limfocytów B CD19⁺ u pacjentów z nawracającymi infekcjami górnych dróg oddechowych.

Podsumowując, odpowiednia dieta bogata w kwasy tłuszczowe szeregu omega 3, skwalen, alkiloglicerole może służyć jako narzędzie silnie wspomagające obronę organizmu przed zakażeniem bakteryjnym, ograniczeniu przewlekłych procesów zapalnych.

PIŚMIENNICTWO

1. Tchórzewski H.: Regulacja odczynu zapalnego, *Zapalenie. Patofizjologia i klinika*. Tchórzewski H i wsp. Medpress. Warszawa 1998, 13.
2. Lewkowicz P, Lewkowicz N, Tchórzewski H.: Immunomodulujące właściwości preparatu z wątroby rekina. *Problemy Ter Mon.*2001, 12, 189
3. Bang H, Dyerberg J: Fish consumption and mortality from coronary heart disease. *N. Engl. J. Med.* 1985, 313, 822.
4. Dyerberg J, Bang HO: Haemostatic function and platelet polyunsaturated fatty acids in Eskimos. *Lancet* 1979, 11, 433.
5. Hirayama R: Life-style and mortality. A lgescale census-based cohort study in Japan. Karger Publishers, Basel, 1990.
6. Fizjologiczna rola kwasów tłuszczowych n-6 i n-3 w ustroju człowieka, ze szczególnym uwzględnieniem profilaktyki cywilizacyjnych chorób metabolicznych (Ziemlański Ś red.). Zbiór prac III sympozjum Sulejów 1998.
7. Georgieff M, Tugtekin IF.: Positive role of immune nutrition on metabolism in sepsis and multi-organ failure. *Kidney. Int. Suppl.* 1998, 64, 80.
8. Tashiro T, Yamamori H, Takagi i wsp.: n-3 versus n-6 polyunsaturated fatty acids in critical illness. *Nutrition.* 1998, 14, 551.
9. Heine J, Scheinichen D, Jaeger i wsp.: In vitro influence of parenteral lipid emulsions on the respiratory burst of neutrophils. *Nutrition.* 1999, 15, 540.
10. Pscheidl E, Schywalsky M, Tschaikowsky K.: Fish oil-supplemented parenteral diets normalize splanchnic blood flow and improve killing of translocated bacteria in a low-dose endotoxin rat mode. *Crit. Care. Med.* 2000. 28, 1489.

11. Lanza-Jacoby S, Flynn JT, Miller S.: Parenteral supplementation with a fish-oil emulsion prolongs survival and improves rat lymphocyte function during sepsis. *Nutrition*. 2001, 17, 112.
12. Mayer K, Grimm H, Grimminger F i wsp.: Parenteral nutrition with n-3 lipids in sepsis. *Br. J. Nutr.* 2002, 87, 69.
13. Calder P: Fat chance of immunomodulation. *Immunol. Today*, 1998, 19, 244.
14. Calder PC: Immunoregulatory and anti-inflammatory effects of n-3 polyunsaturated fatty acids *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1998, 31, 467
15. Zaloga GP, Marik P: Lipid modulation and systemic inflammation. *Crit. Care. Clin.* 2001, 17, 201-17
16. Kankaanpaa P, Sutas Y, Salminen S i wsp.: Dietary fatty acids and allergy. *Ann. Med.* 1999, 31, 282.
17. Maes M, Christophe A, Bosmans E i wsp.: In humans, serum polyunsaturated fatty acid levels predict the response of proinflammatory cytokines to psychologic stress. *Biol. Psychiatry*. 2000, 15, 910.
18. Wallace FA, Miles EA, Evans C i wsp.: Dietary fatty acids influence the production of Th1- but not Th2-type cytokines. *J. Leukoc. Biol.* 2001, 69, 449.
19. Hayashi N, Tashiro T, Yamamori H I wsp.: Effects of intravenous omega-3 and omega-6 fat emulsion on cytokine production and delayed type hypersensitivity in burned rats receiving total parenteral nutrition. *J. Parenter. Enteral. Nutr.* 1998, 22, 363..
20. Khalfoun B, Thibault F, Watier H i wsp.: Docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids inhibit in vitro human endothelial cell production of interleukin-6. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1997, 400, 589.
21. Lewkowicz P, Gurańska N and Tchórzewski H: The assessment of TNF- α induced priming of neutrophils using a whole blood chemiluminescence in some diseases with different pathogenesis. *Chemiluminescence at the Turn of the Millenium*. 2001 Part 2, 118.
22. Robinson M., Burdine R., Warne TR.: Inhibition of phorbol ester- stimulated arachidonic acid release by alkylglycerols. *Biochim. Biophys. Acta* 1995 Feb 9; 1254 (3) 361-7.
23. Ferrante,-A; Carman,-K; Nandoskar,-M; McPhee,-A; Poulos,-A Cord blood neutrophil responses to polyunsaturated fatty acids: effects on degranulation and oxidative respiratory burst. *Biol-Neonate*. 1996; 69(6): 368-75

24. 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, 38.