

Modyfikujący wpływ niektórych składowych oleju z wątroby rekina na odporność naturalną u ludzi

Zakład Immunologii Klinicznej ICZMP w Łodzi, kierownik: prof. zw. dr hab. med. H. Tchórzewski; Centrum Mikrobiologii i Wirusologii PAN w Łodzi, kierownik: prof. dr hab. med. A. Jaworski

Henryk Tchórzewski, Małgorzata Banasik, Ewa Głowacka, Przemysław Lewkowicz

Modyfikujący wpływ niektórych składowych oleju z wątroby rekina na odporność naturalną u ludzi

Oleje z ryb morskich modyfikują wiele reakcji metabolicznych ustroju, w tym także niektóre reakcje z zakresu odporności naturalnej. Odporność naturalna warunkuje przeżycie organizmu po pierwszym kontakcie z patogenem i stwarza warunki do powstawania odporności nabytej, dlatego jest niezwykle ważna dla zachowania zdrowia.

Wykazano, że preparat zawierający alkiloglicerole, skwalen i kwasy tłuszczowe omega-3 w istotny sposób wpływa normalizująco na stężenie składowych układu dopełniacza, aktywność komórek NK oraz generowanie wytwarzania reaktywnych form tlenu przez neutrofile krwi obwodowej u chorych cierpiących na przewlekłą postać reumatycznego zapalenia stawów (rzs). Preparat podawano łącznie z typowymi lekami stosowanymi w tej postaci rzs.

Słowa kluczowe: odporność naturalna; reaktywne formy tlenu

Pol. Merk. Lek., 2002, XIII, 76, 329

Henryk Tchórzewski, Małgorzata Banasik, Ewa Głowacka, Przemysław Lewkowicz

Modification of innate immunity in humans by active components of shark liver oil

See fish oils affect different systemic reactions innate immunity including. Innate immunity is responsible for immediate pathogen recognition and inactivation. Innate immunity decides also on the type of required immunity development. In the presented paper we have proved that supportive treatment with shark oil components normalize complement level, natural killer cells activity and reactive oxygen intermediates production by peripheral blood leukocytes of peopoles suffering from active form rheumatoid arthritis.

Key words: innate immunity; reactive oxygen intermediates

Pol. Merk. Lek., 2002, XIII, 76, 329

Epidemiolodzy od dawno obserwują zróżnicowanie podatności ludzi na niektóre choroby w zależności od miejsca zamieszkania czy rodzaju wykonywanej pracy. Szczególną uwagę zwraca się również na sposoby odżywiania się. Zauważono, że u mieszkańców z regionów polarnych rzadziej występują choroby naczyń i związane z nimi zawały mięśnia sercowego, zwrócono też uwagę na rzadkie występowanie chorób infekcyjnych [1, 2]. Okazało się, że obserwacje te dotyczą ludzi odżywiających się rybami morskimi i spożywającymi znaczne ilości rybich tłuszczów.

Obserwacje kliniczne zweryfikowano badaniami na zwierzętach doświadczalnych (myszach i szczurach). Wykazano, że u szczurów żywionych olejami zawierającymi zwiększone ilości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych następuje zmniejszenie aktywności komórek NK (natural killer) w śledzionie, natomiast egzogenny interferon gamma (IFN- γ) normalizuje aktywność NK [3]. Także u myszy żywionych olejem rybnym stwierdzono zmniejszenie aktywności komórek NK [4]. Obserwacje te potwierdzono w badaniach ludzi zdrowych, u których wykazano, że 3- i 6-wielonienasycone kwasy tłuszczowe zmniejszają aktywność komórek NK [5].

Oleje rybnie zawierające kwasy tłuszczowe omega-3 z dobrymi skutkami stosowano u ludzi w dawkach 1 g/dzień. Użytkiwano redukcję wielu funkcji neutrofilów, monocytów i limfocytów, a w rezultacie – zahamowanie reakcji immunologicznych i zmniejszenie wytwarzania niektórych mediatorów zapalenia [6]. Tego typu właściwości, stwierdzone przez wielu autorów, tłumaczą szereg obserwacji klinicznych, w których wykazywano korzystny wpływ oleju z ryb w leczeniu chorób zapalnych i autoimmunizacyjnych [6], polegający na działaniu przeciwzapalnym i zmniejszaniu zawartości limfocytów T autoreaktywnych drogą apoptozy [7]. Ta ostatnia obserwacja uzasadnia zalecenia przyjmowania z pożywieniem wielonienasyconych olejów z ryb przez ludzi zdrowych.

W analizowanym piśmiennictwie nie znaleziono obserwacji dotyczących wpływu oleju z ryb lub jego składowych na wskaźniki odporności naturalnej u ludzi z przewlekłymi procesami autoimmunizacyjnymi i zapalnymi. Autorzy podjęli więc badania nad wpływem wyciągu z wątroby rekina tasmańskiego (preparat BioMarine 570[®] na odporność naturalną ludzi cierpiących na przewlekły gościec stawowy (rzs). Oceniano następujące parametry odporności naturalnej: stężenie składowych dopełniacza, wytwarzanie reaktywnych form tlenu (RFT) i aktywność komórek NK.

MATERIAŁ I METODY

Badania wykonano u 10 osób z rozpoznaniem (w oparciu o kryteria ARA [8]) reumatoidalnym zapaleniem stawów (rzs). Wszyscy badani cechowali się zaawansowanym procesem chorobowym, nie poddającym się leczeniu preparatami przeciwzapalnymi. Stosowano u nich leczenie immunosupresyjne metotreksatem (10 mg tygodniowo), a także doraźnie leki przeciwzapalne lub przeciwbólowe. Obserwowani pacjenci przez 3 miesiące, 3 razy dziennie otrzymywali po 3 kapsułki preparatu BioMarine 570[®] o następującym składzie: alkiloglicerole (120 mg), skwalen (120 mg), omega-3 (25 mg).

Przed przystąpieniem do leczenia u wszystkich pacjentów wykonano oznaczenia: składowych dopełniacza C1q, C3c, C4, CH50, wytwarzania reaktywnych form tlenu (RFT), aktywności komórek NK. Stężenie składowych dopełniacza C3c i C4 oznaczano metodą nefelometrii kinetycznej przy użyciu nefelometru firmy Behring (Behring Nephelometr 100) oraz odpowiednich odczynników (N antiserum to Human C3c i N antiserum to human C4). Stężenie składowej C1q oceniano metodą immunodifuzyji radialnej, stosując płytki L C Partigen firmy Dade Behring. Aktywność hemolityczną układu dopełniacza drogi

klasycznej CH50 oceniano według zmodyfikowanej metody Mayera. Badania skompletowano u 6 osób.

Badania oceny zdolności neutrofilów do wytwarzania reaktywnych form tlenu przeprowadzono metodą chemiluminescencji zależnej od luminolu we krwi pełnej przy użyciu aparatu MLX (Microtiter Plate Luminometr) (Dyrex, USA). Oceniano chemiluminescencję spontaniczną oraz stymulowaną fMLP (Sigma), opsonizowanym zymosanem (OZ) i estrami forbolu (PMA Sigma). W celu wywołania efektu preaktywacji neutrofilów *in vitro* zastosowano dodatkowy układ, w którym próbki były inkubowane z TNF- α w stężeniu 10 ng/ml przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Wartości chemiluminescencji krwi pełnej skorygowano o bezwzględną liczbę neutrofilów oraz o stężenie hemoglobiny i wyrażono w umownych jednostkach luminescencji RLU (Relative Light Units total) wg wzoru:

$$CL \text{ wyliczona} = CL \text{ zmierzona (RLUtotal)} \times \frac{Hb (\%)}{WBC (\text{tys}/\mu\text{l}) \times PMN (\%)}$$

WBC (white blood cell) – bezwzględna liczba białych krwinek ($10^3/\mu\text{l}$)
 CL – chemiluminescencja (RLUtotal)
 Hb – hemoglobina (%)
 PMN (polymorphonuclear leukocytes) – neutrofile krwi obwodowej (%).

Ocena aktywności komórek NK w stosunku do linii K562

Aktywność cytotoksyczną komórek NK oceniano, wykorzystując komercyjnie dostępny NKTest (Orpegen, Pharma). Pozwala on na ilościowe określenie aktywności cytotoksycznej ludzkich komórek NK w stosunku do komórek docelowych K562. Limfocyty krwi obwodowej izolowano, stosując wirowanie w gradiencie Gradiolu L (Aqua-Medica) o gęstości 1,077 g/l, w oparciu o powszechnie akceptowane szczegóły techniczne [9]. Po odrzuceniu osocza, zbierano warstwę komórek jednojądrowych, 2-krotnie je przemywano w PBS, a następnie przygotowano zawiesinę komórek o gęstości 5×10^6 kom./ml.

Po rozmrożeniu komórek docelowych K562 i 2-krotnym odplukaniu w PBS oceniano ich gęstość i żywotność, przygotowując zawiesinę o gęstości 1×10^5 kom./ml. Komórki NK (E) badanych pacjentów były mieszane z komórkami docelowymi K562 (T) w następujących proporcjach E:T: 50:1; 25:1; 12,5:1 [10]. Następnie inkubowano je w końcowej objętości 200 μl (mieszanka komórek efektorowo-docelowych). Zawiesinę komórek efektorowych i docelowych rozlewano do próbek typu Falcon (BD), zgodnie z zalecanym schematem. Przygotowano kontrolę komórek docelowych do obserwacji śmierci komórki (próbka kontrolna). Ten sam układ powtarzano w obecności stymulatora: IL-2 (200 U/ml) [11], dołączając próbkę „wysokiej kontroli” z IL-2. Zawiesinę mieszało, wirowano z szybkością 1200 obrotów/min przez 2-3 mi-

nuty, a następnie inkubowano przez 240 minut w temperaturze 37°C i wilgotnej atmosferze CO₂. Na zakończenie inkubacji próbki umieszczano na łaźni lodowej, w celu zahamowania reakcji (do czasu analizy cytometrycznej). Dodawano dołączonego do zestawu barwnika DNA (50 μl na próbkę), mieszano, inkubowano 5 minut w ciemności, w łaźni lodowej. Pomiaru cytometrycznego zawiesiny komórek dokonywano w czasie 30 minut od dodania barwnika DNA. Do oceny stosowano cytometr przepływowy FACSCalibur z argonowym laserem 488 nm (BD). Do analizy wyników wykorzystano program CellQuest. Zebrano 2500 komórek docelowych na próbkę. Oceniano procent martwych komórek docelowych K562. Badania ukończono u 6 osób.

WYNIKI

U chorych na rzs stwierdzono zmniejszenie wytwarzania RFT przez neutrofile w porównaniu do wyników uzyskanych u zdrowych. Preaktywacja TNF- α nie wpływała istotnie na kierunku zmian w generacji RFT. Wyniki zestawiono w tabeli 1.

Przykłady histogramów cytometrycznej oceny aktywności komórek NK przedstawiono na rycinach 1 i 2. Po okresie leczenia preparatem BioMarine 570 stwierdzono istotne zmniejszenie C1q, C3 i CH50. Stężenia składowych układu dopełniacza były większe u chorych na rzs w porównaniu do grupy kontrolnej, co wskazuje na istotny udział tego układu w patogenezie rzs (ryc. 3) Zmniejszyła się również aktywność komórek NK, ocenianych w proporcjach E:T 25/1 i 12,5/1. Wyniki przedstawiono na rycinie 4.

OMÓWIENIE

Odporność naturalna w procesie rozwoju ewolucyjnego powstała wcześniej od nabytej i tworzy ją wiele układów, które nie wymagają do wytworzenia efektywnych swoistych reakcji niszczenia uprzedniego kontaktu z patogenem. Głównymi komórkami tworzącymi ten typ odporności są: komórki NK, fagocyty, jak neutrofile i makrofagi, komórki dendrytyczne, pełniące kluczową funkcję w procesie indukcji odporności nabytej. Rozpoznanie patogenu odbywa się za pomocą wyspecjalizowanych receptorów, które są lektynami i które nazwano oboczno PRR (ang. pathogen recognizing receptors). Receptory łączą się z cukrami prostymi, które na odpowiednich nośnikach białkowych wchodzi w skład ściany patogenu lub toksyny bakteryjnej. Połączenie takie powoduje uczynienie układu dopełniacza na drodze lektynowej, generację mediatorów zapalenia i czynników chemotaktycznych, pobudzenie komórek fagocytujących. Komórki fagocytujące albo ogólnie komórki prezentujące antygeny (APC) rozpoczynają reakcje odporności nabytej z wytwarzaniem przeciwciał i powstawaniem komórek swoście reaktywnych. Aby w części zbadać układ odporności naturalnej, przepro-

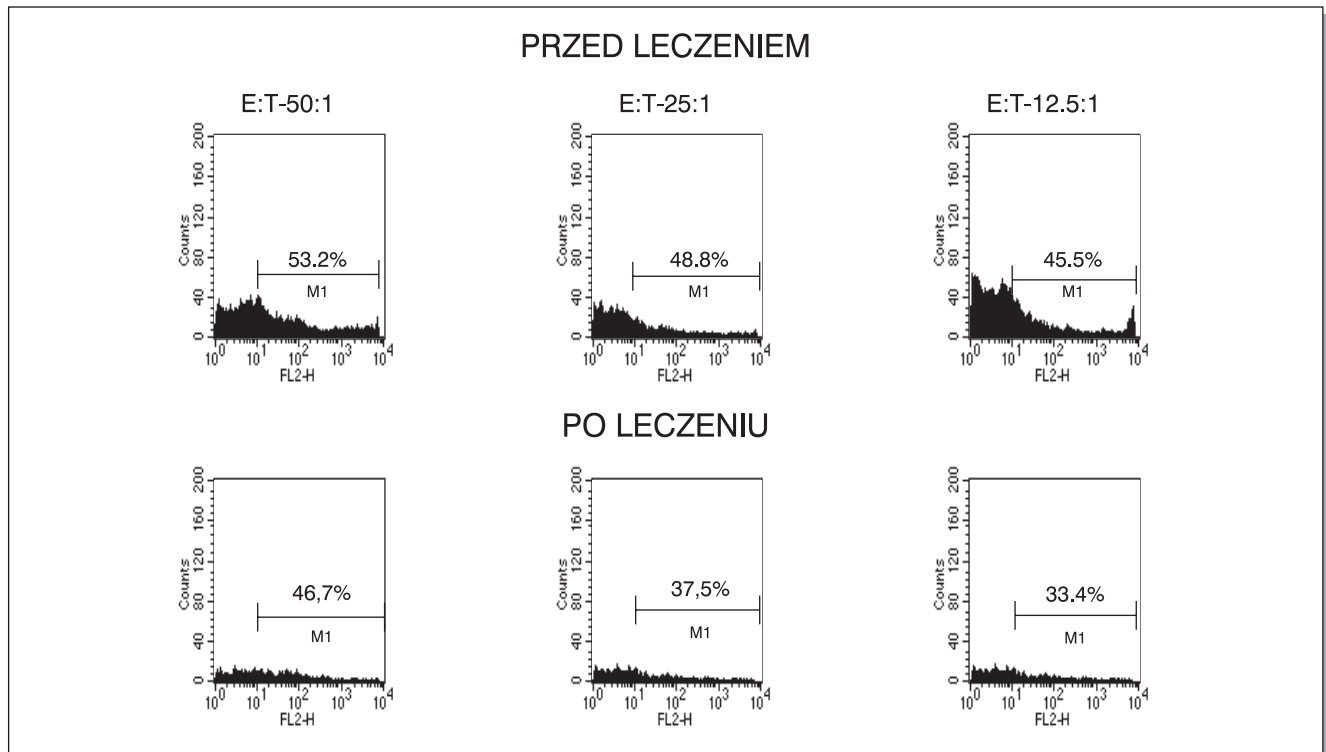
Tabela 1. Analiza wartości reaktywnych form tlenu wytwarzanych przez neutrofile spoczynkowe i stymulowane przez fMLP, OZ i PMA u chorych przed i po leczeniu preparatem BioMarine 570 oraz u zdrowych

Table 1. Reactive oxygen intermediates production by resting and fMLP, OZ and PMA stimulated neutrophils in patients treated with Bio-Marine 570 as compared to control group. The results (mean \pm SEM) are presented in relative light units total (RLU); * – $p < 0,05$; significant difference as compared to control. The significant differences in RLU generation before and after Bio-Marine 570R treatment were not observed

| Grupa | Bez inkubacji TNF- α Inkubacja TNF- α | Neutrofile niestymulowane | fMLP | OZ | PMA |
|------------------------|--|------------------------------|-------------------|--------------------|--------------------|
| Zdrowi | – | 2,66 \pm 0,381 | 4,80 \pm 0,449 | 25,30 \pm 2,216 | 20,47 \pm 1,572 |
| | + | 4,39 \pm 0,458 | 7,93 \pm 0,691 | 23,19 \pm 1,940 | 19,95 \pm 1,287 |
| Chorzy przed leczeniem | – | 1,95 \pm 0,983 | *3,08 \pm 1,007 | *15,30 \pm 3,727 | 16,22 \pm 4,003 |
| | + | 4,40 \pm 1,474 | 7,74 \pm 1,795 | *14,54 \pm 3,701 | *13,36 \pm 1,964 |
| Chorzy po leczeniu | – | 2,48 \pm 0,993 | 4,03 \pm 1,125 | 17,55 \pm 3,674 | 15,05 \pm 4,526 |
| | + | 4,22 \pm 1,519 | 6,96 \pm 2,113 | 16,62 \pm 3,961 | *11,80 \pm 2,424 |

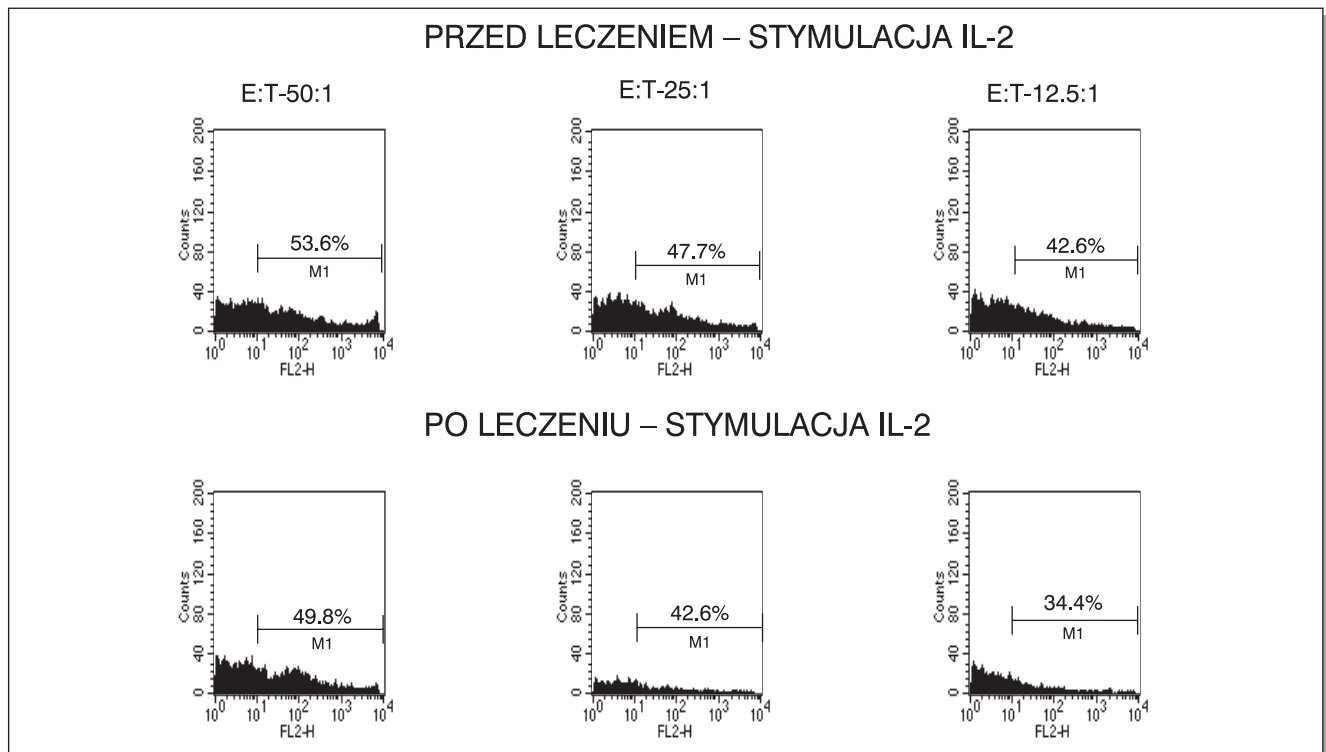
Wartości (średnie \pm SEM) przedstawiono w jednostkach umownych RLU (Relative Light Units total).

* – $p < 0,05$; różnica istotna statystycznie w porównaniu do grupy zdrowych. Brak różnic istotnych statystycznie między badanymi przed i po leczeniu preparatem Biomarine.



Ryc. 1. Analiza cytometryczna aktywności komórek NK u chorych przed i po leczeniu preparatem Bio Marine 570 (inkubacja 4 godz. 37°C; mieszanka komórek efektorowo (E)-docelowych (T): 50:1; 25:1; 12:1; 5:1. FACSCalibur, BD)

Fig. 1. NK cells activity analysed cytometrically in patients before and after treatment with Bio-Marine 570R (incubation 4 h in 37oC); effector (E0: Targed (T) cells ratio 50:1; 25:1; 12:1; 5:1; FACSCalibur Becton Dickinson (BD); the typical experiment presented

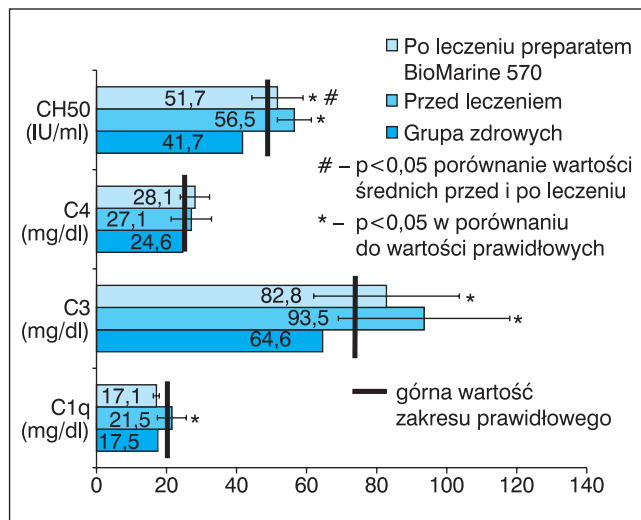


Ryc. 2. Analiza cytometryczna aktywności komórek NK u chorych przed i po leczeniu preparatem Bio Marine 570 (inkubacja 4 godz. 37°C, w obecności IL-2 (200 U/ml); mieszanka komórek efektorowo (E)-docelowych (T): 50:1; 25:1; 12:1; 5:1. FACSCalibur, BD). Przykładowy histogram

Fig. 2. NK cells activity analysed cytometrically in patients before and after treatment with Bio-Marine 570R (incubation 4 h in 37oC) in the presence of IL-2 200 U/ml; effector (E0: Targed (T) cells ratio 50:1; 25:1; 12:1; 5:1; FACSCalibur Becton Dickinson (BD)

wadzone badania komórek żernych, stężenia układu dopełniacza, aktywności komórek NK [13]. Okazało się, że przyjmowany preparat w sposób istotny modyfikował takie czynniki odporności naturalnej, jak zdolność do wytwarzania RFT, aktywność układu dopełniacza, oraz zmniejszał aktywność komórek NK.

Wiele zjawisk wymaga wyjaśnienia. Szczególnie wiele nierozwiązanych problemów dotyczy patogenezy chorób autoimmunizacyjnych. W sferze hipotez pozostaje pytanie, jaki jest udział tych zjawisk w patogenezie chorób autoimmunizacyjnych (takich jak rzs) i dlaczego następuje spontaniczne złagodzenie objawów tej choroby u kobiet w przebiegu ciąży [14].



Ryc. 3. Porównanie średnich wartości stężenia składowych układu dopełniacza C3c, C4, C1q i aktywności hemolitycznej CH50 przed i po leczeniu preparatem BioMarine 570 u chorych na RZS oraz u zdrowych

Fig. 3. The complement fraction concentrations and complement hemolytic activity CH50 +/- SEM before and after Bio-Marine 570R treatment in patients suffering from RA as compared to healthy control (closed rectangle)

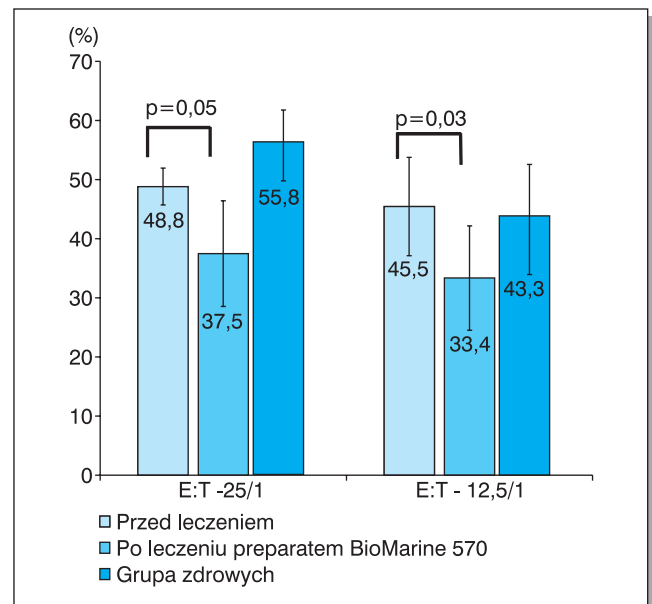
Mechanizm immunomodulacji indukowany przez kwasy tłuszczowe polega prawdopodobnie na zmianie w obrębie błon komórkowych, która prowadzi do powstawania nadtlenków lipidów, pobudzenia fagocytozy i syntezy cytokin [15]. Niedobory odporności mogą prowadzić do infekcji, posocznicy i zjawisk "autokatabolizacyjnych" [16]. Z tych względów analiza piśmiennictwa z lat 1990-2000 pozwoliła autorom uzasadnić twierdzenie, że wzbogacenie diety w kwasy tłuszczowe omega-3 i niektóre aminokwasy istotnie zmniejsza częstotliwość infekcji i umieralność u krytycznie chorych, leczonych chirurgicznie z różnych powodów [16].

Badania u ludzi i na mysich modelach choroby wykazały, że dieta zawierająca oleje rybne wykazuje właściwości przeciwzapalne, zależne głównie od wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, które polegają na bezpośrednim hamowaniu komórek Th₁ zależnych od IL-2 i pobudzeniu komórek Th₂, CD4, wydzielających cytokiny o działaniu przeciwzapalnym, takich jak np. IL-10. Zmniejszenie aktywności komórek NK może też pośrednio nasilać właściwości przeciwzapalne, ale mechanizm zmian ich aktywności pozostaje niewyjaśniony.

Uzyskane wyniki uzupełniają naszą wiedzę o właściwościach immunomodulacyjnych kwasów tłuszczowych omega-3 wskazując, że główny mechanizm ich działania polega na modyfikacji parametrów odporności naturalnej w postaci: zmniejszenia aktywności NK, zmniejszenia stężenia składowej CH50 dopełniacza, a także modyfikacji generowania RFT. Uzyskane wyniki wskazują na jedną z możliwości korzystnego oddziaływania tych preparatów na niektóre elementy odporności naturalnej.

PIŚMIENNICTWO

1. Albert C.M. i wsp.: *Fish consumption and risk of sudden cardiac death*. J. Am. Med. Assoc., 1998, 279(1), 3-28.
2. Calder P.: *Dietary fatty acids and the immune system*. Nutr. Rev., 1998, 56(1), (II) S70-S83.



Ryc. 4. Porównanie średnich wartości aktywności komórek NK przed i po leczeniu preparatem BioMarine 570 u chorych na RZS i u zdrowych

Fig. 4. NK cells activity before and after Bio-Marine 570R treatment of RA suffering patients as compared to healthy control (closed rectangle)

3. Yaqoob P. i wsp.: *Inhibition of natural killer cell activity by dietary lipids*. Immunol. Lett., 1994, 41(2-3), 241-7.
4. Angeles Puertollano M. i wsp.: *Loss of natural killer cell activity after murine tumor transplantation appears as a consequence of dietary lipid administration*. Anticancer Res., 2001, 21(4A), 2697-702.
5. Thies F. i wsp.: *Dietary supplementation with eicosapentaenoic acid, but not with other long-chain n-3 or n-6 polyunsaturated fatty acids, decreases natural killer cell activity in healthy subjects aged >55 y*. Am. J. Clin. Nutr., 2001, 73(3), 539-48.
6. Kelley D.S.: *Modulation of human immune and inflammatory responses by dietary fatty acids*. Nutrition, 2001, 17(7-8), 669-73.
7. Ergas D. i wsp.: *n-3 fatty acids and the immune system in autoimmunity*. Isr. Med. Assoc., 2002, 4(1), 34-8.
8. Arnett F.C. i wsp.: *The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum., 1988, 31, 315-21.
9. Banasik M. i wsp.: *Wykorzystanie jednostopniowej metody izolacji wysocze oczyszczonych limfocytów i granulocytów z minimalnej ilości krwi obwodowej*. Diagn. Labor., 1990, 26, 194-197.
10. Trinchierini G.: *Biology of natural killer cells*. Adv. Immunol., 1989, 47, 187-376.
11. Henney C.S. i wsp.: *Interleukin-2 augments natural killer cell activity*. Nature, 1981, 291, 335.
12. Medhvitov R., Janeway Jr C.: *Innate immunity recognition: mechanisms and pathways*. Immunol. Rev., 2000, 173, 89-97.
13. Feizi T.: *Carbohydrate-mediated recognition systems in innate immunity*. Immunol. Rev., 2000, 173, 79-88.
14. Tchórzewski H. i wsp.: *IL-12, IL-6 and IFN-g production by lymphocytes of pregnant women with rheumatoid arthritis remission during pregnancy*. Mediators of Inflammation, 2000, 9, 289-293.
15. de Pablo M.A., Alvarez de Cienfuegos G.: *Modulatory effects of dietary lipids on immune system functions*. Immunol. Cell. Biol., 2000, 78(1), 31-9.
16. Heyland D.K. i wsp.: *Should immunonutrition become routine in critically ill patients? A systematic review of the evidence*. JAMA, 2001, 286(8), 944-53.
17. Arrington J.L. i wsp.: *Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids modulate purified murine T-cell subset activation*. Clin. Exp. Immunol., 2001, 125(3), 499-507.
18. Grimm H., Kraus A.: *Immunonutrition – supplementary amino acids and fatty acids ameliorate immune deficiency in critically ill patients*. Langenbecks Arch. Surg., 2001, 386(5), 369-76.

Otrzymano 9 kwietnia 2002 r.

Adres: prof. Henryk Tchórzewski, Zakład Immunologii Klinicznej ICZMP, 93-338 Łódź, ul. Rzgowska 281/289