

# Der Modifizierende Einfluss von großen Dosen des Haifischleberöls auf die Polarisation der Lymphozyten- T und die Funktion der neutrophilen Granulozyten

PRZEMYSŁAW LEWKOWICZ<sup>1</sup>, MAŁGORZATA BANASIK<sup>1</sup>, EWA GŁOWACKA<sup>1</sup>, NATALIA LEWKOWICZ<sup>2</sup>, HENRYK TRCHÓRZEWSKI

<sup>1</sup>Institut für Klinische Immunologie des Krankenhauses: Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki in Łódź, Leiter: Herr Prof. habil. Dr. Med. H. Tchórzewski, <sup>2</sup>Institut für Parodontologie und Krankheiten der Schleimhaut in der Mund der Medizinischen Universität, Leiter: Frau Prof. habil. Dr. Med. A. Kurnatowska

---

## **DER MODIFIZIERENDE EINFLUSS VON GROSSEN DOSEN DES HAIFISCHLEBERÖLS AUF DIE POLARISATION DER LYMPHOZYTEN- T UND DIE FUNKTION DER NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN**

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

Haifischleberöle werden immer häufiger bei der Prophylaxe und Krankheitsbehandlung eingesetzt. Sie wurden zum Untersuchungsobjekt der Immunologie.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von großen Dosen des Haifischleberöls bei 13 gesunden freiwilligen Personen auf die immunologischen Parameter, des Blutbildes, der Lipiden Wirtschaft, Funktionen und Integrität der Leberzellen analysiert. Die Versuchspersonen haben durch 4 Wochen 3,5g Squalen, 3,6g Alkyloglycerolen und 750mg der mehrfach ungesättigten Fettsäuren n-3 täglich eingenommen. Dabei wurde der Einfluss des Präparats auf die Reaktivitätsvergrößerung der neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut im Verhältnis zu bakteriellen Krankheitserreger, den Anstieg des Komplementfaktors C4 des Komplementsystems, den Anstieg der antioxidativen Kapazität des Blutserums, sowie Übergewicht der Zytokinenproduktion INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-2 durch die Zellen des peripheren Blutes. Das in großen Dosen eingenommene Haifischleberöl hat die Lipidenwirtschaft der Versuchspersonen beeinflusst. Es wurde auch der Anstieg des Gesamtcholesterin bis zum Wert  $224,46 \pm 62,198$  mg/dl im Verhältnis zum Wert vor des Experiment  $182,92 \pm 29,290$  mg/dl festgestellt. Es wurde auch die Senkung der HDL- Fraktion und der Anstieg der LDL- Fraktion beobachtet. Die Cholesterinwirtschaft wurde innerhalb von 4 Wochen der Therapie mit dem Präparat bei allen Kranken normalisiert. Die Studien zeigen, dass solche Wirkung des Präparats aus seiner Zusammensetzung resultiert und zwar: Squalen und 1-0- Alkyloglycerolen- den Hauptbestandteilen des Haifischleberöls. Gegensätzliche Wirkung der mehrfach ungesättigten Fettsäuren n-3 hatte keinen Einfluss auf die untersuchten Parameter. Wie die Studien ergeben haben, kann das Präparat mit dem Haifischleberöl bei den Kranken mit chronischen Bakterien-, Viren- und Mykoseinfektionen. Das Präparat soll eher nicht im Falle der Herz- und Kreislaufsystemkrankheiten, der Lipidenwirtschaftstörungen und der Autoimmunerkrankungen eingesetzt werden.

**Stichwörter:** Haifischleberöl, angeborene Immunität, die Polarisation der Lymphozyten Th

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

---

Die Präparate mit Fischfett sind seit vielen Jahren bekannt und haben die Anwendung in der Prophylaxe und Krankheitsbehandlung gefunden. Die neusten Techniken der immunologischen Diagnose ermöglichen den Einfluss der im Fischleberöl enthaltenen Verbindungen auf das Immunsystem zu analysieren und die Wirkungen der Präparate mit den Änderungen mancher Parameter zu verbinden. Die Therapie mit Fischölen betätigt natürliche Mechanismen, die die Immunantwort aktivieren und sie ruft keinen Nebenwirkungen hervor [23]. In der

Zusammensetzung der Lipide, die aus Leber folgender Haifische: *Centroscymnus crepitater*, *Etmopterus granulosus*, *Deania colcea*, *Centrophorus scalpratus* gewonnen sind, dominieren vor allem Alkyglycerolethers: Diacylglycerole (ang. diacylglyceryl ethers-DAGE) (1-0- Alkyl- 2,3 diacylglyceryl ethers) und Triacylglycerole (ang. triacylglycerols- TAG), Squalen- Verbindungen, mehrfach ungesättigte Fettsäuren der n-3- Reihe, Docosahexaensäure (DHA) und Eicosapentaensäure (EPA) [13]

Frühere klinische Studien haben ergeben, dass die Bestandteile des Fischleberöls biologisch aktiv sowohl in Bezug auf die Elemente der angeborenen als auch der natürlichen Immunität sind [7, 15, 23, 31]. Die Wirkung der mehrfach ungesättigten Fettsäuren n-3 wurde zum Untersuchungsobjekt vieler Studien. Man weiß aber nicht so viel von der Wirkung der 1-O- Alkylglycerol- und Squalenverbindungen. Es wurde festgestellt, dass DHA und EPA die entzündungshemmende Wirkung haben, indem sie die Synthese der Arachidonsäurederivaten und der proentzündlichen Zytokinen hemmen [8]. Die Einnahme von der mehrfach ungesättigten Fettsäuren n-3 führt zur Senkung des Triglyzeriden- und des Cholesterinspiegels bei den Versuchspersonen [21]. In in vitro- Untersuchungen wurde die Antitumorwirkung der mehrfach ungesättigten Fettsäuren n-3 nachgewiesen [2, 11]. Auch 1-O- Alkylglycerole- Hauptbestandteil des Öls, haben die Antitumorwirkung. Diese Verbindungen wirken zytotoxisch direkt auf die Tumorzellen in vivo und hemmen die Proliferation der Zellen [5, 6, 10, 12, 14, 17, 24]. Diese Wirkung resultiert wahrscheinlich aus dem Einbau der Derivate der Alkylglycerole in die Zellhäute, was den Transport zwischen den Zellhäuten stört, der zur Entwicklung der Tumorzellen notwendig ist [19]. Die die Immunität stärkende Wirkung der 1-O- Alkylglycerole resultiert wahrscheinlich aus der Syntheseinduktion und der erhöhten Freisetzung der aktiven Derivate des plättchenaktivierenden Faktors (ang. platelet activating factor) durch die immunkompetente Zellen [18, 27, 34]. Die Folge der erhöhten PAF- Freisetzung ist die Aktivierung der angeborenen Immunität durch die Aggregationsinduktion der Blutplättchen, Durchlässigkeitserhöhung der Blutgefäße und Aktivierung der neutrophilen Granulozyten und Makrophagen [32]. Squalen kommt in der natürlichen Umgebung in den größten Mengen in Leber der Meeresfische und in den kleinsten Mengen in den pflanzlichen Ölen. Es ist ein Synthesevorläufer des Cholesterins und der Vitamin D. Squalenverbindungen kommen auch in Fette, die durch Talgdrüse produziert werden. Es wird angenommen, dass im Sekret der Talgdrüse enthaltenes Squalen eine natürliche Barriere des Organismus vor Pathogenen ist [25]. Die Wirkung von Squalen resultiert aus der starken Adhärenzwirkung in Bezug auf Elemente der Zellhäute oder Lipidgehäuse der Pathogene [1]. Es wirkt durch die Opsonisierung der Pathogene und es erleichtert ihnen die Präsentation der immunkompetenten Zellen. In den an Tieren durchgeführten Untersuchungen wurde bewiesen, dass das in der täglichen Dosis 25-100mg/ kg des Körpergewichts eingenommene Squalen die Aktivität der NK- Zellen, die Aktivität der Lymphozyten mit dem Phänotyp CD3+ und die vergrößerte Phagozytenaktivität der neutrophilen Granulozyten des peripheren Blutes verursacht [1]. Dank seiner Eigenschaften hat Squalen die Anwendung in den Impfungenproduktion gefunden, weil es die Präsentation des Antikörpers der immunkompetenten Zellen ermöglicht [3,5].

Unsere früheren Studien haben einen positiven Einfluss des Präparats aus dem Haifischleberöl auf die an der rheumatoiden Arthritis kranken Menschen ergeben [31], chronischen Infektionen der oberen Atemwege [22] und chronischen Aphten in der Mund [15]. Die eingesetzten täglichen Dosen betragen 1080 mg/ Tag Squalen und Alkylglycerole und 225mg/Tag der mehrfach ungesättigten Fettsäuren n-3. Infolge der Präparateinnahme wurde die Aktivitätssenkung des Komplementsystems und seiner einzelnen Komplementfaktoren beobachtet. Die Produktion der reaktiven Formen des Sauerstoffs (RTF) durch neutrophile Granulozyten hat sich bei den Kranken an chronische Infektionen der oberen Atemwege und Aphten vergrößert und bei den Kranken an rheumatoider Arthritis ist die RTF- Produktion gesunken [15, 22, 31]. Ein Einnahme des Präparats hatte auch einen Einfluss auf die Anzahl mancher Subpopulation der Lymphozyten des peripheren Blutes: es wurde der Anzahlenanstieg der Zellen CD8+ und CD19+ beobachtet [15, 22]. Da die Patienten in derselben Zeit auch andere Medikamente eingenommen haben, war es unmöglich die Wirkung des Präparats objektiv zu bewerten.

Auch die optimale Dosis des Präparats aus dem Haifischleberöl wurde bisher noch nicht bestimmt, weil das Präparat zusammengesetzt ist. Die gegensätzliche Einwirkung der 1-O- Alkylglycerole und Squalen im Verhältnis zu mehrfach ungesättigten Fettsäuren n-3 auf das Immunsystem und Lipidenwirtschaft erschwert die Bestimmung, wann die Präparate mit dem Haifischleberöl in großen Dosen eingesetzt werden können. Die genaue Dosen wurden für mehrfach ungesättigte Fettsäuren bestimmt und zwar: die tägliche Dosis von DHA und EPA soll nicht größer als 7g sein [13].

In den bisherigen Untersuchungen wurde der Einfluss der großen Dosen des Präparats aus Haifischleberöl (3,6g Squalen täglich, 3,6g Alkylglycerol und 750 mehrfach ungesättigte Fettsäuren n-3) auf bestimmte Stoffwechsel- und Immunitätsprozesse, insbesondere auf Lipidenwirtschaft, Funktion mancher Lymphozyten und neutrophiler Granulozyten untersucht.

Man hat versucht, die Frage zu beantworten, ob die Präparateinnahme in großen Dosen zur Aktivierung der Zellen des Immunsystems beiträgt und ob die Therapie Nebenwirkungen hervorruft.

## **MATERIAL UND METHODEN.**

Die Versuchsgruppe hat 13 gesunden Personen (5 Männer und 8 Frauen) im Alter von 26-45 umfasst. Sie haben durch 4 Wochen das Präparat BioMarine 570 fünfmal täglich sechs Kapseln eingenommen. Eine Kapsel besteht aus 120mg Squalen, 120mg Alkylglycerole, mehrfach ungesättigten Fettsäuren der Reihe n-3 25mg, Vitamin A 50 Masseneinheiten und Vitamin D 5 Masseneinheiten. Vor und nach der Präparateinnahme wurde den Personen 2ml des Blutes für Heparin abgenommen, 2ml für EDTA und 3ml für Blutgerinnsel zwecks immunologischen Untersuchungen, Messung der ausgewählten Parameter der Lipidenwirtschaft und des Blutbildes. Vor, während und ein Monat nach der Präparateinnahme haben sich die Patienten wegen Tests gemeldet. Für die Tests haben wir Erlaubnis von Komisja Etyki Badań Naukowych des Krankenhauses Centrum Zdrowia Matki Polki erhalten. Die Messung der Parameter der Lipidenwirtschaft, Leberwerte und des Blutbildes wurde in Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej im Krankenhaus Centrum Zdrowia Matki Polki durchgeführt.

Die Konzentrationserhöhung der einzelnen Komplementfaktoren C3 und C4 des Komplementsystems und der Immunglobulin der Klasse IgG, IgA und IgM wurde mit der Nephelometriemethode mit den Reagenzien der Firma The Binding Site, UK gemessen. Die Untersuchung wurde am Minineph- Apparat (The Binding Site, UK) durchgeführt. Die Sauerstoffexplosion der neutrophilen Granulozyten wurde mit der Durchflusszytometriemethode mit dem kommerziellen Apparat Bursttest (BD Bioscience, Pharmingen) gemessen. Die Zellen wurden mit den E.coli- Bakterien (10<sup>8</sup> Bakterien/ml) und PMA- Phorboläther (phorbol 12- myristate 13- acetate) 16 µM stimuliert.

Antioxidative Gesamtkapazität des Bluteserums (ang Total Antioxidant Status) wurde mit der kolorimetrischen Methode, die auf der Entstehungsreduktion des Kation- Radikals ABTS<sup>•+</sup> (kation 2, 2'-azydo-bis ethylbenzotiazolin- 6- sulfone) unter dem Einfluss der Antioxidans erfolgt. Die Untersuchung wurde mit der Apparat der Randox Lab durchgeführt. Die Absorption der Proben wurde mit der BET- Methode abgelesen. Es wurde die Anfangsabsorption und die Absorption nach 3 Minuten, von der Substratzugabe (Wasserstoffperoxid) abgelesen. Die Antioxidanskonzentration wurde nach der Formel angerechnet; von der Absorption mit dem Substrat wurde Anfangsabsorption subtrahiert.

Die Profiluntersuchung der Zytokine Th1/Th2 (INF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-10, IL-2, IL-4, IL-5) die durch PMBC generiert werden (ang. peripheral blood mononuclear cell- PMBC), die mit der Durchflusszytometriemethode mit der Anwendung von CBA Th1/ Th2 Human Kit, der Firma BD Bioscience, FAC SCalibur, BD Bioscience) kontrolliert werden, PMBC der peripheren Blutes wurde mit Hilfe von Konzentrationgradienten isoliert (Lymphoprep, Nycomed Pharma SA, Norway). Zur Produktion von PMBC wurde die Flüssigkeit PR MI Medium (Biomed Lublin, Poland) mit dem 10%-igen fetalen Kälberserum (FCS, Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) gebraucht. Die PMBC- Konzentration betrug  $1 \times 10^8$  Zellen/ ml. Die Zytokine wurden nach der 21- stündigen Zucht in CO<sub>2</sub>, in der Temperatur von 37°C mit dem PHA- Stimulator (5 $\mu$ g/ml) beobachtet.

Der prozentuelle Anteil der Subpopulationen der Lymphozyten B wurde mit der Durchflusszytometriemethode mit dem Test IMK Plus der Firma BD Bioscience, mit den Standardmethoden ihrer Bewertung gemessen. Der Wert des Rheumafaktors wurde qualitativ mit dem Latextest von Waaler- Rose (Testempfindlichkeit 0,4 IU/ml) der Firma BioMerieux, Lyon, France) gemessen.

Bei allen Versuchspersonen wurde Bild des peripheren Blutes (WBC, Lymphozyten-, Granulozyten-, Erythrozytenzahl und Hämoglobin), Parameter der Lipidenwirtschaft (HDL-ch, LDL-ch, TG) gemessen und Aminotransferasen AlAT, AspAT und Bilirubin wurden bestimmt. Alle Parameter wurden zweimal gemessen, vor und nach der Präparatseinnahme. Im Falle der flachen Werten des Lipidograms wurden die Tests jede Woche wiederholt, bis sich die Parameter normalisiert haben. Für jeden Parameter wurde auch die Standardabweichung und Standardfehler bestimmt. Es wurde T-Test eingesetzt, damit die Werten vor und nach der Präparatseinnahme verglichen werden können.

## ERGEBNISSE

### Klinische beobachtungen

Während des Experiments hat keiner der Teilnehmer Nebenwirkungen gemeldet. Jede Woche wurden Kontrollen durchgeführt, bei denen keine Symptome gab, nach denen die Dosis geändert oder das Präparat abgesetzt werden soll. Bei 4 Personen gab es leichte schnell nachlassende Gelenkschmerzen. Bei allen Patienten wurde Gewichtszunahme beobachtet. Bei einer der Personen ist in der ersten Woche eine Infektion der oberen Atemwege aufgetreten, die aber innerhalb von sieben Tagen einzeln verschwunden ist.

### Blutbild

Es wurden keine Änderungen in dem prozentuellen Anteil sowie in Betragsfunktionen der weißen und roten Blutkörperchen (RBC, HGB) bemerkt. Die Aufmerksamkeit verdient eine kleine Senkung der Blutplättchen (von  $233,7 \pm 40,37$   $10^3/\mu$ l bis  $217,5 \pm 44,46$   $10^3/\mu$ l  $p=0,01$ ) und kleine Senkung der neutropilen Granulozyten (vor  $58,4 \pm 8,28\%$ , nach  $55,1 \pm 6,76\%$   $p=0,07$ ).

### Zusammensetzung von Lymphozyten im Blut

Berichtet war ein Rückgang des Anteils der Lymphozyten Phänotyp CD3 + (T-Lymphozyten) und CD19 + (B-Lymphozyten) (Abbildung 1). Andere Subpopulation der Lymphozyten (CD4 +, CD8 +) haben sich nicht geändert.

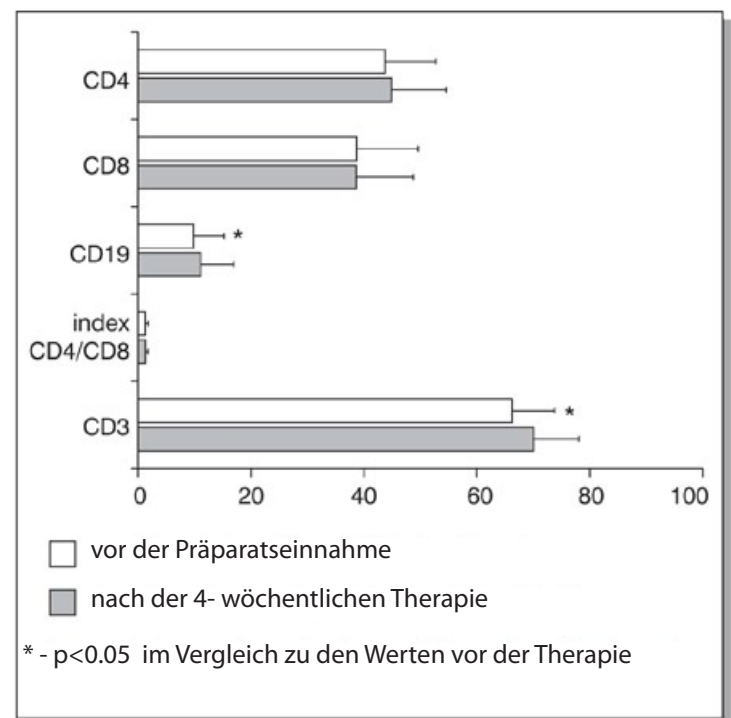


Abb. 1. Die prozentuelle Verteilung der Grundsubpopulationen der Lymphozyten T, Lymphozyten B im Blut vor und nach der Therapie. Die Angaben sind als durchschnittliche Werte angezeigt  $\pm$  Standardabweichung

### Sauerstoffwechsel der neutrophilen Granulozyten des peripheren Blutes

Das in großen Dosen eingenommene Präparat hat die Antwort von PMN vergrößert, was in dem Anstieg der reaktiven Formen des Sauerstoffes im Kontakt mit dem bakteriellen Krankheitserreger (E.coli) sowie auch bei der direkten Oxidase NADPH mit dem Phorboläther (PMA) verursacht hat. Die Anzahl der antwortenden Zellen sowie die tödende Kraft haben sich erhöht (Abb. 2).

### Antioxidative Gesamtkapazität des Bluteserums

Aktuelle Untersuchungen haben die Ergebnisse früherer Studien bestätigt, dass Fischleberöl antioxidative Wirkung hat. Es wurden folgende Werten aufgezeichnet: TAS von  $1,65 \pm 0,190$  ml/L vor der Präparatseinnahme auf  $1,98 \pm 0,185$  ml/L nach dem Experiment ( $p < 0,05$ ).

### Zytokinengeneration durch PBMC nach der PHA- Stimulation

Die Einnahme des Präparats in großen Dosen hat die erhöhte Freisetzung von INF- $\alpha$  und INF- $\gamma$  verursacht. Bei 10 von 13 untersuchten Personen wurde der Anstieg von INF- $\gamma$  durchschnittlich um 5000pg/ml beobachtet, bei 3 Personen hat sich der Wert nicht geändert ( $p < 0,05$ ). Die durchschnittliche INF- $\gamma$ - Freisetzung beträgt 64% im Vergleich zu dem Wert vor dem Experiment (Abb. 3). Bei 7 aus 13 Personen wurde erhöhte INF- $\alpha$ - Freisetzung beobachtet, bei einer Person wurden keine Änderungen bemerkt und bei 2 hat sich die INF- $\alpha$ - Freisetzung gesenkt ( $p < 0,05$ ). Die durchschnittliche INF- $\alpha$ - Freisetzung beträgt 26% im Vergleich zum Wert vor dem Experiment (Abb. 3). Es wurde auch die erhöhte IL-2 - Produktion ( $23,8 \pm 17,65$  pg/ml vs.  $74,4 \pm 64,97$  pg/ml,  $p=0,0038$ ) beobachtet (Abb. 4). Bei allen Personen wurde die IL-10- Produktionssenkung vor der Präparatseinnahme ( $1883,5 \pm 1140,29$  pg/ml vs.  $629,0 \pm 565,13$  pg/ml nach dem Experiment;  $p=0,001$ ) bemerkt. Die gesenkte IL-10- Freisetzung nach der PHA- Stimulation betrug 45% (Abb. 3). Die Konzentration von IL-4 und IL-5 waren auf dem konstanten Niveau (Abb. 4).

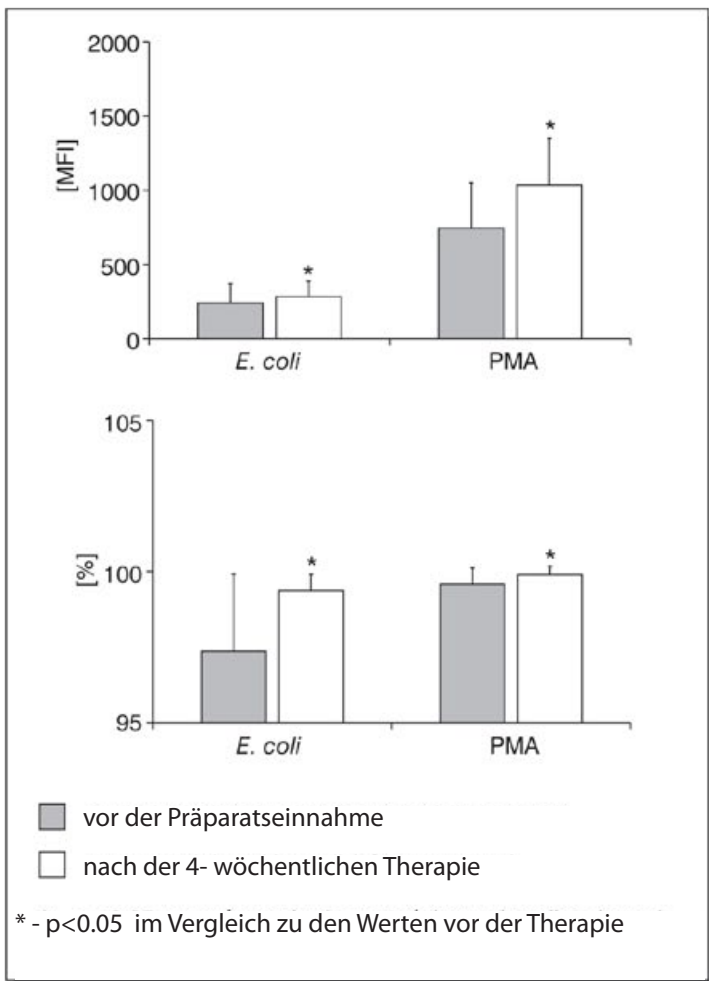


Abb. 2. Die Produktion der reaktiven Formen des Sauerstoffs durch neutrophile Granulozyten des Blutes, die mit Escherichia Cola und PMA stimuliert werden; mit Durchflusszytometrie gemessen. Die Angaben als der durchschnittliche Wert Mean Fluorescent Intensity (MFI) ausgedrückt und der Prozentanteil der Zellen, die RFT produzieren. (der durchschnittliche Wert  $\pm$  SD).

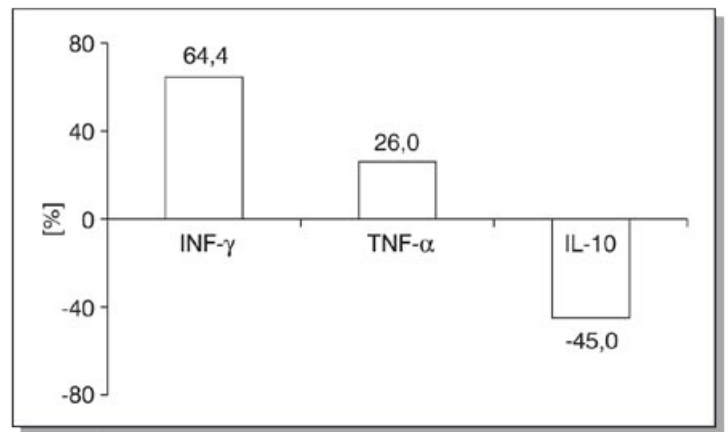


Abb. 3. Durchschnittliche Änderungen des Zytokinenspiegels INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-10, während der Therapie durch die mononukleären Zellen in der 21-stündigen Zucht nach der PHA-Stimulation (5 mg/ml, 370 C, 5% CO<sub>2</sub>). Die Änderungen sind als Durchschnittswerte im Vergleich zu den Werten vor der Therapie ausgedrückt

### Der Spiegel der Komplementfaktoren des Komplementsystem und der Immunglobulin in Blutserum

Es wurde der Einfluss des Präparats auf die Komplementfaktoren des Komplementsystem und des Immunglobulin untersucht. In der Untersuchung wurde ergeben, dass die Einnahme des Präparats in großen Dosen einen kleinen Anstieg des Immunglobulin der Klasse IgG (von 1004,1  $\pm$  281,78 mg/dl bis 1081,26  $\pm$  22,455 mg/dl;  $p=0,001$ ) verursacht, es beeinflusst aber nicht die Immunglobulin IgM und IgA (Abb. 5). Es wurde auch der Anstieg des Komplementfaktors des Komplementsystem C4 (17,05  $\pm$  4,316 mg/dl vs. 21,92  $\pm$  4,739 mg/dl;  $p=0,008$ ) beobachtet. Der Wert des Komplementfaktors des Komplementsystem C3 hat sich nicht bedeutend verändert (Abb. 6).

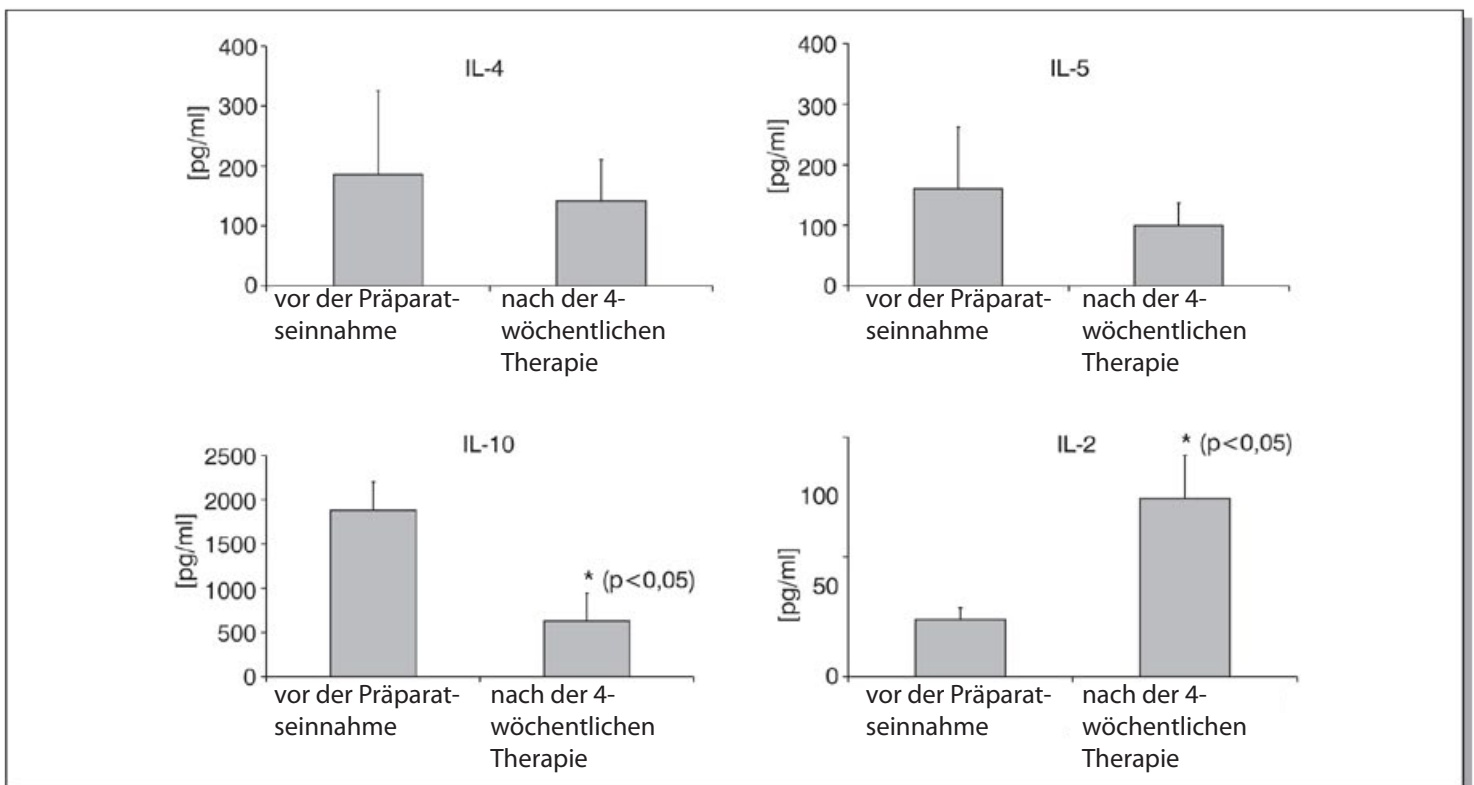


Abb. 4. Der Produktionsspiegel der Zytokinen Th2 (IL-4, IL-5, IL-10) und Th1 (IL-2) durch die mononukleären Zellen in der 21-stündigen Zucht nach der PHA-Stimulation (5 mg/ml, 370 C, 5% CO<sub>2</sub>). (Durchschnittswert  $\pm$  SD).



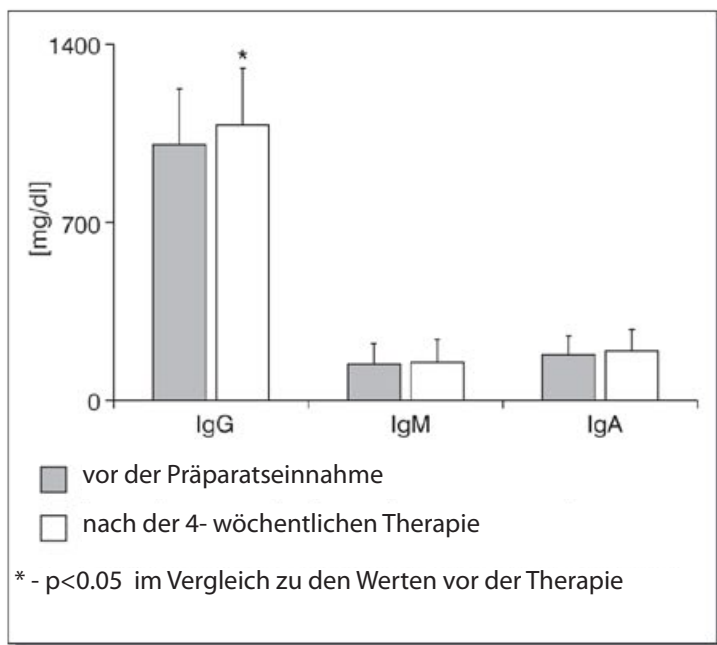


Abb. 5. Die Analyse der einzelnen Klassen der Immunglobulin (IgG, IgM oraz IgA) vor und nach der 4- wöchentlichen Therapie. Die Angaben sind als durchschnittliche Werte angezeigt  $\pm$  SD

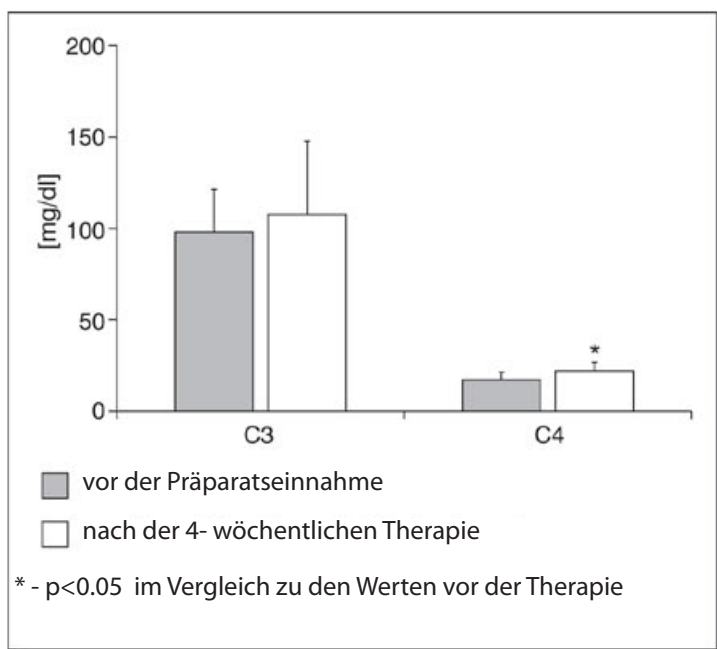


Abb. 6. Die Analyse der Komplementfaktoren C3 und C4 des Komplementsystems vor und nach der 4- wöchentlichen Therapie. Die Angaben sind als durchschnittliche Werte angezeigt  $\pm$  SD.

### Untersuchung des Rheumafaktors

Die Untersuchung der Anwesenheit des Rheumafaktors wurde vor der Einnahme des Präparats durchgeführt. Das war sowohl die Waaler- Rose- Test als auch Latextest. Alle Teilnehmer hatten den negativen Ergebnis. Bei 2 Personen, die mit Waaler- Rose – Test untersucht wurden, wurde der Wert 1:20 aufgezeichnet (8IU/ml), wobei der Höchstwert 30 IU/ml beträgt. Nach der 4- wöchentlichen Therapie hat sich das Ergebnis nicht geändert, es war nach wie vor negativ. Bei den Personen mit dem positiven Ergebnis vor dem Experiment (1:20) hat sich der Zustand nach der Therapie nicht geändert.

### Parameter der Lipidenwirtschaft

Die Einnahme von großen Dosen (30 Kapseln täglich) hat bei fast allen Personen (10 von 13 Personen) den Anstieg des Gesamtcholesterins verursacht (vor dem Experiment  $182,92 \pm 29,290$  mg/dl und nach der Absetzung des Präparats  $224,46$  mg/dl  $62,198$  mg/

dl). Bei vier Personen war der Gesamtcholesterinspiegel durch weitere 3 Wochen erhöht und es hat den Wert über 200mg/dl. Die Ausgangswerte sind bei diesen Patienten in der vierten Woche gekommen, nachdem sie das Präparat abgesetzt haben. Die Fraktion HDL-Ch hat sich bedeutend gesenkt (vor der Präparatseinnahme  $64,2 \pm 20,90$  mg/dl und nach der Therapie  $58,7 \pm 16,97$  mg/dl) und die LDL-ch- Fraktion hat sich gesteigert (vor der Präparatseinnahme  $89,3 \pm 30,08$  md/dl und nach der Absetzung  $136,54 \pm 61,87$  mg/dl). Bei 2 Personen waren die geänderten Werte der HDL- Ch und LDL-Ch- Fraktionen durch 2 Wochen auf dem konstanten Niveau. Der Wert HDL- Gesamtcholesterin wurde von  $0,35 \pm 0,105$  auf  $0,27 \pm 0,088$  mg/dl gesenkt. Die Triglyzeridenwerte blieben auch auf demselben Niveau (vor der Präparatseinnahme  $147,3 \pm 87,99$  mg/dl, nach der Präparatseinnahme  $146,1 \pm 82,64$  mg/dl;  $p=0,4812$ ) (Tab. 1).

Tab. 1. Zusammenstellung der durchschnittlichen Werte  $\pm$  SD ausgewählten Werte der Leberzellen (AspAT, AIAT, Bilirubin) und ausgewählten Parameter der Lipidenwirtschaft (Gesamtcholesterin, HDL- Ch, LDL- Ch, TG und Parameter HDL- Ch/Gesamtcholesterin) bei den untersuchten Personen vor und nach der 4- wöchentlichen Therapie.

	vor der Therapie	nach der Therapie	richtige Werte
AspAT (I/I)	$17.5 \pm 5/09$	$20/2 \pm 4/71^*$	K<31, M<37
AIAT (I/I)	$18.1 \pm 5.38$	$21.5 \pm 6.09^*$	K<31, M<41
Bilirubin (mg/dl)	$0.56 \pm 0.204$	$0.65 \pm 0.206^*$	<1.2 gewünschte Werte
Gesamtcholesterin (mg/dl)	$182.9 \pm 29.29$	$224.5 \pm 62.20^*$	<200
Triglyzeriden (mg/dl)	$147.9 \pm 87.99$	$146.1 \pm 82.64^*$	<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)	$89.3 \pm 30.08$	$136.5.1 \pm 61.87^*$	<135
Parameter HDL- Ch/ Gesamtcholesterin (mg/dl)	$0.35 \pm 0.105$	$0.27 \pm 0.088^*$	>0.20

\*  $p \leq 0.05$  statistisch bedeutender Unterschied im Vergleich zu den Werten vor der Therapie

### Parameter der Funktionen und der Integrität der Leberzellen

Der Bilirubinspiegel war bei allen Personen in der Norm. Nach dem Experiment hat sich der Spiegel nicht bedeutend vergrößert (vor dem Experiment  $0,56 \pm 0,204$  md/dl, nach dem Experiment  $0,65 \pm 0,206$  mg/dl; Normwerte  $0,2-1,0$  mg/dl) ( $p = 0,0096$ ). Die durchschnittlichen Werte der Aktivität der Enzyme AIAT und AspAT sind auch angestiegen und die Unterschiede waren von Bedeutung. Wie im Falle der Bilirubin haben sie aber den Höchstwert nicht überschritten.

### ZUSAMMENFASSUNG

Haifischleberöl aus Tasmanien das ist ein natürliches Produkt, deren Zusammensetzung Alkyglycerole, Squalen, mehrfach ungesättigte Fettsäuren und Vitamin A und Vitamin D bilden. Der Einfluss der großen Dosen des Präparats wurde noch nicht untersucht.

Diese Untersuchung hat bestätigt, dass die Einnahme des Präparats in großen Dosen durch 4 Wochen das Immunitätssystem und die Lipidenwirtschaft der Versuchspersonen beeinflusst.

Die erhöhte Antwort der neutrophilen Granulozyten wurde unter dem Einfluss der E.coli- und PMA- Stimulation im Bursttest beobachtet. Die Aktivierung der neutrophilen Granulozyten kann mit der Wirkung der Alkylglycerole verbunden sein, die die biologische Freisetzung von PAF erhöhen, sowie auch mit der Squalen- Wirkung, die die Präsentation der Antigene „opsoniert“ und erleichtert [5, 28]. Die erhöhte und effiziente Opsonierung der Krankheitserreger durch Squalen- Verbindungen hat einen Einfluss auf die Anzahl der Zellen, die auf die Stimulation der E.coli- Bakterien antworten (Abb. 2). Auch die erhöhte Produktion der proentzündlichen Zytokinen TNF-  $\alpha$  und IL- 2 (Abb. 2, 3) bei der gleichzeitigen Produktionshemmung von IL- 10 durch Lymphozyten ist auch die Ursache, der effektiven Tötung der Bakterien, was bei der Reaktivierung der neutrophilen Granulozyten passiert [23, 32]. Diese Beobachtungen finden Widerspiegelung im Blutbild, indem der Organismus auf die Produktionserhöhung von RTF mit der Anzahlsenkung der neutrophilen Granulozyten reagiert hat. Wahrscheinlich ist das eins der Mechanismen des Organismus vor dem oxidativen Stress.

Bei der Potenzialverbesserung der neutrophilen Granulozyten ist auch die antioxidative Gesamtkapazität des Blutserums angestiegen. Eins der möglichen Mechanismen der TAS- Erhöhung ist die Squalenwirkung, die, wie die früheren Studien ergeben haben, Antioxidantwirkung hat [13, 23]. Diese Wirkung schützt den Organismus vor den negativen Folgen des oxidativen Stresses, der aus der erhöhten RTF- Produktion resultiert durch die Phagozytenzellen im Falle der Entzündung.

Die Einnahme des Präparats mit dem Haifischleberöl hat auch einen Einfluss auf die Parameter der angeborenen und der natürlichen Immunität. Es wurde die Polarisation der Lymphozyten in die Richtung Th 1 beobachtet, was verursacht dass, PBMC mehr IFN-  $\gamma$ , TNF-  $\alpha$  und IL- 2 bei der gleichzeitigen Senkung der IL- 10- Produktion freisetzen, was für Lymphozyten Th 2 charakteristisch ist. Es wurde auch die größere Konzentration der IgG im Blutplasma bemerkt, was für die Aktivierung der Immunantwort bei der Teilnahme der Lymphozyten Th charakteristisch ist. Es ist schwierig, dem Mechanismus der Lymphozyten Th – Polarisation und die Fähigkeiten zur Synthese der proentzündlichen Zytokinen zu erklären. Die Hauptvermittler, die einen Einfluss auf die Polarisation der Lymphozyten Th in die Richtung Th1 durch die Aktivierung der Faktoren STAT 4 und T- Bet sind IL- 12, IL- 18 und IFN-  $\alpha$  [26, 28]. Wahrscheinlich aktivieren Alkylglycerole und Squalen, die die Hauptbestandteile des Haifischleberöls sind, zur Zytokinenproduktion die proentzündlichen Zellen der angeborenen Immunität wie Monozyten, dendritische Zelle und neutrophile Granulozyten. Die erleichtern die Präsentation der Antigene den Lymphozyten T, was zur Aktivierung der Lymphozyten Th1 führt. Andererseits kann die erhöhte Zytokinenproduktion Typ 1 durch PBMC kann die Ursache der beobachteten Aktivierung der neutrophilen Granulozyten und erhöhten RTF- Generation nach der Stimulation mit den Bakterien oder PMA sein. Die proentzündlichen Zytokinen sind starke Stimulatoren des Komplementfaktors C4 des Komplementsystems. Eine Erklärung der beobachteten Erhöhung von TNF-  $\alpha$  und des Komplementfaktors C4 des Komplementsystems kann die Tatsache sein, dass die Gene, die beide Faktoren kodieren, liegen nicht weit entfernt, auf dem gleichen Chromosom 6, was im Falle der immunkompetenten Zellen verursacht, dass die Synthese beider Vermittler aktiviert wird [33].

Indirekte Antwort des Organismus auf die erhöhte Synthese beider proentzündlichen Faktoren ist die Anzahlbeschränkung der Zellen, die diese Faktoren synthetisieren, was in der Anzahlbestimmung der PBMC bewiesen wurde (die Senkung der Lymphozyten mit dem Phänotyp CD3 und CD19).

Die Analyse der biochemischen Studien erlaubt die Funktionen und die Integrität der Leberzellen zu bestimmen. Das in großen Dosen

eingenommene Präparat ist nicht hepatotoxisch. Der kleine Anstieg von Bilirubin und Enzymen ist wahrscheinlich die Folge des erhöhten Stoffwechsels der Leber (darunter der Produktion der Lipoproteinen und Gallensäuren) zeugt eher von der Funktion der Hepatozyten und nicht von den Störungen der Leberzellen.

In der Untersuchung wurde der negative Einfluss des Präparats auf die Lipidenwirtschaft beobachtet. Es wurde der Anstieg der Gesamtcholesterins mit der Senkung der HDL- Fraktion und mit dem Anstieg der LDL- Fraktion bei der Mehrheit der Versuchspersonen bemerkt. Aber in 3 Wochen nach dem Therapieabschluss wurden die Parameter bei allen Personen normalisiert. Die Ergebnisse früheren Studien zeigten, dass Squalen, das Cholesterinvorläufer ist, keinen negativen Einfluss auf Lipidenwirtschaft hat. Es wurde auch nachgewiesen, dass die Derivate von Squalen und Alkylglycerole die Hemmung der Cholesterin- Biosynthese verursachen, was wahrscheinlich die Ursache der Hemmung der Enzyme der microsomalen Squalen- Monoxygenase und der macrosomalen Cyclase 2,3- Oxidosqualene in den Hepatoblastom- Zellen ist [29]. In einem anderen Experiment wurde nachgewiesen, dass das oral eingenommene Squalen in 60% aufgenommen wird und während der Squalen- Einnahme in der Dosis 900 mg/ Tag durch 7-30 Tage und seine Konzentration im Blut ist 17 Mal so groß als vorher, wobei der Triglyzeridenspiegel auf demselben Niveau geblieben ist und der Cholesterinspiegel sich nicht bedeutend verkleinert hat [30]. Diese Ergebnisse beweisen, dass die Einnahme des Präparats in den großen Dosen (30 Kapseln täglich) durch Personen mit diagnostizierten Störungen der Lipidenwirtschaft nicht empfohlen werden soll, weil es langfristig die LDL- Fraktion erhöht und HDL- Ch- Fraktion senkt, was zur Sklerose der Blutgefäße führen kann.

In den an Tieren durchgeführten Untersuchungen, wurde nachgewiesen, dass Squalen nach der intraperitonealen Verabreichung die Produktion der Antikörper anti- nRNP/ Sm und Su induzieren kann [20]. In den bereits durchgeführten Studien wurde ergeben, dass die Produktionserhöhung der Zytokinen Typ 1 und Produktionsverringern von IL- 10- Zytokinen mit dem entzündungshemmenden und antagonistischen Verhältnis zu Zytokinen Typ 1 bei den Personen, die das Präparat mit dem Haifischleberöl einnehmen, die Entwicklung der entzündlichen Zuständen hervorrufen kann. Daraus resultierte die Angst, dass das in großen Dosen eingenommene Präparat mit dem Haifischleberöl die Autoimmunerkrankungen verstärken oder hervorrufen kann [20]. In diesen Untersuchungen wurde auch das Rheumafaktor mit Hilfe von Latex- und Waaler- Rose- Tests analysiert. Die Ergebnisse waren bei allen Teilnehmer sowohl vor als auch nach dem Experiment negativ. Man kann schlussfolgern, dass die Einnahme des Präparats durch 4 Wochen in den großen Dosen keinen bedeutenden Einfluss auf den Rheumafaktor hat. Das ist aber kein typischer Parameter und der negative Wert des Parameters schließt die Immunerkrankung nicht aus.

Die Ergebnisse der Untersuchungen ermöglichen festzustellen, was das Präparat eingesetzt werden kann und wann nicht. Die Anwendung des Präparats bei der Behandlung der viralen und bakteriellen Infektionen, Allergien und Tumoren scheint begründet zu sein. In der Behandlung dieser Krankheiten ist die Polarisation der Lymphozyten T in die Richtung Th 1 und die Aktivitätshemmung der Lymphozyten Th 2 erforderlich. Weitere Studien, die auf der Anwendung des Präparats gemeinsam mit der Standardtherapie bei der Behandlung der viralen Ansteckungen HBV, HCV, HPV und HSV und der Grippe basieren, können die Wirksamkeit des Präparats als natürlicher Stimulator der Immunität nachweisen.

Außerdem kann das Präparat dank der Stärkung der angeborenen Immunität bei der Behandlung der Bakterien- und Mykoseansteckungen helfen.

Das Präparat mit Haifischleberöl kann in großen Dosen nicht im Falle der Autoimmunerkrankungen, Herz- und Kreislaufsystemkrankheiten und diagnostizierten Störungen der Lipidenwirtschaft eingesetzt werden. Jetzt soll die Dosis bestimmt werden, die keinen negativen Einfluss auf Lipidenwirtschaft hat, wobei die die Immunität stimulierende Wirkung des Präparats behalten wird.

Die Autoren dieser Arbeit bedanken sich der Firma Marinex International, Frau Jolanta Filipiak, Frau Bożena Lewandowska, Frau Aneta Skomial und den Mitarbeitern von Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej des Krankenhauses Centrum Zdrowia Matki Polki in Łódź für die Hilfe bei Durchführung der Untersuchungen.

## LITERATUR:

1. 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.
2. Aktas H., Haiperin J.A.: *Translational regulation of gene expression by omega-3 fatty acids.* J. Nutr., 2004, 134, 2487-91.
3. Allison A.: *Squalene and squalene emulsions as adjuvants.* Methods A Comp. Methods in Enzymol., 1999, 19, 87-93.
4. Andreesen R., Modellell M.L., Weltzien H.U. i wsp.: *Selective destruction of human leukemic cells by alkylsophospholipids.* Cancer Res., 1978, 38, 3984-9.
5. 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.
6. Brohult A.: *Reduced mortality in cancer patients after administration of alkoxyglycerols.* Acta Obst. Gynecol. Scand., 1988, 65, 779-85.
7. Calder P.C.: *More good news about fish oil.* Nutrition., 2001, 17, 158-60.
8. Calder P.C.: *Immunoregulatory and anti-inflammatory effects of n-3 polyunsaturated fatty acids.* Braz. J. Med. Biol. Res., 1998, 31, 467-90.
9. Calder P.C.: *Fat chnce in immunomodulation.* Immunol. Today, 1998, 19, 244-7.
10. Carroll K.: *Fat and cancer.* Cancer, 1986, 58, 1818-25.
11. 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.
12. 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.
13. FAO/WHO. *Fats and oils in human nutrition.* Food and nutrition paper FAO/WHO, 1994, no. 57.
14. Gonzales M., Schemel R.: *Dietary fish oils inhibit human breast carcinoma growth.* Lipids., 1993, 9, 827-32.
15. 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.
16. Hallgren B., Stallberg G., Boeryd B.: *Prog Chem Fats Other Lipids.* 1978, 16, 45-58.
17. Heymans F., da Silva C., Marrec N. i wsp.: *Alkyl analogs of diacylglycerols as activators of protein kinase C.* FEBS, 1987, 218, 35-40.
18. 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.
19. 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.
20. Kuroda Y., Nacionales D.C., Akaogi J. i wsp.: *Autoimmunity induced by adjuvant hydrocarbon oil components of vaccine.* Biomed. Pharmacother., 2004, 58, 325-37.
21. 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.
22. 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.
23. Lewkowicz P., Lewkowicz N., Tchórzewski H.: *Immunomodulujące właściwości preparatu z wątroby rekina.* Problemy Ter. Mon., 2001, 12, 189-95.
24. 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.
25. 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.
26. Perussia B., Loza M.J.: *Linear '2-0-1' lymphocyte development: hypotheses on cellular bases for immunity.* Trends Immunol., 2003, 24, 235-4.
27. 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.
28. Rengarajan J., Szabo S.J., Glimcher L.H.: *Transcriptional regulation og Th1/Th2 polarization.* Immunol. Today, 200, 21, 479-83.
29. Sickie V., Algenastro M.R., Wilson P. i wsp.: *Inhibition of cholesterol synthesis by cyklopropylaminoderivatives of squalene in human hepatoblastoma cells in culture.* Lipids, 1992, 27, 157-61.
30. Stranberg T.E., Tilvis R.S., Mietinen T.A.: *Metabolic variables of cholesterol during squalene feeding in humans: comparison with cholestyramine treatment.* J. Lipid Res., 1990, 31, 1637-2.
31. 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.
32. Tchórzewski H.: *Regulacja odczynu zapalnego, Zapalenie. Patofizjologia i klinika.* Tchórzewski H. i wsp.: Medpress, Warszawa 1998, 13.
33. Tchórzewski H.: *Regulacja odczynu zapalnego, Zapalenie. Patofizjologia i klinika.* Tchórzewski H. i wsp.: Medpress, Warszawa 1998, 30.
34. 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.

30 Dezember 2004

Adresse: Przemysław Lewkowicz, Zakład Immunologii Klinicznej I-CZMP in Łódź, Rzgowska-Straße 281/289, 93-338 Łódź, Tel. (042) 271 13 28

E-Mail: natalewk@wp.pl