

Der modifizierende Einfluss ausgewählter Eigenschaften des Haifischleberöls auf die natürliche Immunität der Menschen.

HENRYK TCHÓRZEWSKI, MAŁGORZATA BANASIK, EWA GŁOWACKA, PRZEMYSŁAW LEWKOWICZ
Institut für Klinische Immunologie des Krankenhauses ICZMP in Łódź, Leiter: Prof. Dr. med. habil. H. Tchórzewski; Zentrum für Mikrobiologie und Virologie von PAN in Łódź, Leiter: Prof. Dr. med. habil. A. Jaworski

DER MODIFIZIERENDE EINFLUSS AUSGEWÄHLTER EIGENSCHAFTEN DES HAIFISCHLEBERÖLS AUF DIE NATÜRLICHE IMMUNITÄT DER MENSCHEN

Henryk Tchórzewski, Małgorzata Banasik, Ewa Głowacka, Przemysław Lewkowicz

Die Öle aus der Meerfische modifizieren viele metabolische Reaktionen des Organismus, darunter manche Reaktionen der natürlichen Immunität. Die natürliche Immunität bedingt das Überleben des Organismus nach dem ersten Kontakt mit dem Pathogen und schafft die Bedingungen für die Entwicklung der erworbenen Immunität, deswegen ist es sehr wichtig für die Gesundheit. Es wurde ergeben, dass das Alkyloglycerole, Squalen und Fettsäuren Omega-3 enthaltende Präparat bedeutend die Konzentration der Komplementfaktoren, die Aktivität der NK-Zellen sowie Generierung der reaktiven Formen des Sauerstoffes des peripheren Blutes bei den chronisch an rheumatoider Arthritis (RZS) Kranken normalisiert. Das Präparat wurde gemeinsam mit den typischen Medikamenten den Patienten gegeben, die im Falle von rzs eingesetzt werden.

Stichwörter: natürliche Immunität, reaktive Formen des Sauerstoffes

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

Die Epidemiologen beobachten seit langen Jahren die unterschiedliche Anfälligkeit der Menschen gegen bestimmte Krankheiten, die mit der Wohnort oder mit Art der Arbeit und des ausgeübten Berufes verbunden sind. Besondere Aufmerksamkeit wird auch auf die Ernährung gelenkt. Es wurde beobachtet, dass die Einwohner der Polargebieten seltener an die Krankheiten der Blutgefäße und an dem Myokardinfarkt und den Infektionskrankheiten erkranken [1, 2]. Es hat sich ergeben, dass diese Beobachtungen diejenigen Menschen betreffen, die große Menge der Meerfische und Fischfette essen.

Klinische Beobachtungen wurden mit den Untersuchungen an den Versuchstieren verifiziert (Mäusen und Ratten). Es wurde nachgewiesen, dass bei den Ratten, die mit den vergrößerten Mengen der mehrfach ungesättigten Fettsäuren enthaltenden Ölen gefüttert werden, die Aktivitätsbeschränkung der NK-Zellen (natural killer) in der Milz erfolgt und das exogene Interferon Gamma (IFN-g) die Aktivität der NK-Zellen normalisiert [3]. Auch bei den Mäusen, die mit Fischfett gefüttert werden, wurde die beschränkte Aktivität der NK-Zellen beobachtet [4]. Diese Beobachtungen wurden in den Untersuchungen bei den gesunden Menschen bestätigt, bei denen nachgewiesen wurde, dass 3- und 6-mehrfach ungesättigte Fettsäuren die Aktivität der NK-Zellen beschränken [5].

Die Fischfette enthalten Fettsäuren Omega-3. Sie wurden auch mit guten Ergebnissen bei den Menschen eingesetzt und zwar in der Dosis 1 g/Tag. Es wurde die Reduktion vieler Funktionen der Neutrophile, Monozyten und Lymphozyten erreicht, infolgedessen die immunologische Reaktionen gehemmt werden und die Produktion mancher Entzündungsvermittler beschränkt wird [6]. Die Eigenschaften dieser Art sind von vielen Autoren bestätigt. Dies wurde auch in der Reihe der klinischen Beobachtungen nachgewiesen, in denen der vorteilhafte Einfluss vom Haifischleberöl auf die Entzündungskrankheiten und Autoimmunerkrankungen bewiesen wurde [6]. Das Haifischleberöl hat entzündungshemmende Wirkung und es verkleinert die Anzahl der autoreaktiven Lymphozyten T durch die Apoptose [7]. Diese letzte Beobachtung erklärt, warum die Fischfette durch gesunde Personen eingenommen werden sollen. In der analysierten Literatur wurden keine Beobachtungen gefunden, die den Einfluss des

Haifischleberöls oder der Komplementfaktoren auf die Parameter der natürlichen Immunität bei den Menschen mit chronischen Autoimmunerkrankungen und Entzündungen betreffen. Die Autoren haben sich also entschieden, den Einfluss des Haifischleberöls aus Tasmanien (das Präparat BioMarine 570®) auf die natürliche Immunität der chronisch an rheumatoider Arthritis (rzs) kranken Menschen zu untersuchen. Es wurden folgende Immunitätsparameter beobachtet: die Konzentration der Komplementfaktoren, die Produktion der reaktiven Formen des Sauerstoffes (RFT) und die Aktivität der NK-Zellen.

MATERIAL UND METHODEN

Die Untersuchung wurde bei 10 Personen mit der diagnostizierten (nach den ARA-Kriterien [8]) rheumatoiden Arthritis (rzs) durchgeführt. Alle untersuchten Personen haben sich durch den fortgeschrittenen Krankheitszustand ausgezeichnet, die mit der entzündungsemenden Medikamenten nicht geheilt werden konnte. Es wurde bei den Kranken die immunosuppressive Therapie mit Methotrexat (10 mg wöchentlich), sowie mit den entzündungshemmenden Notmedikamenten und Schmerzmittel therapiert. Die beobachteten Patienten haben durch 3 Monate das Präparat BioMarine 570® in der Dosis 3 Kapseln 3 mal täglich eingenommen. Zur Zusammensetzung des Präparats gehören: Alkyloglycerole (120 mg), Squalen (120 mg), Omega-3 (25 mg). Vor der Therapie wurden bei allen Patienten folgende Parameter bestimmt: die Komplementfaktoren C1q, C3c, C4, CH50, die Produktion der reaktiven Formen des Sauerstoffes (RFT), die Aktivierung der NK-Zellen. Die Konzentration der Komplementfaktoren C3c und C4 wurden mit der Methode der kinetischen Nephelometrie mit dem Nephelometer der Firma Behring (Behring Nephelometr 100) bestimmt sowie mit den entsprechenden Reagens (N antiserum to Human C3c i N antiserum to human C4). Die Konzentration des Komplementfaktors C1q wurde mit der Methode der radialen Immundiffusion untersucht, in der die Plättchen L C Partigen der Firma Dade Behring gebraucht werden. Die hämolytische Aktivität des Komplementsystems des klassischen Wegs CH50 wurde mit der modifizierten Mayera-Methode gemessen. Die Untersuchungen wurden bei 6 Personen durchgeführt.

Die Fähigkeit der Neutrophile zur Produktion der reaktiven Formen des Sauerstoffes wurde mit der Luminol-abhängigen Chemilumineszenzmethode im Vollblut mit dem Apparat MLX (Microtiter Plate Luminometr) (Dynex, USA) gemessen. Es wurde auch die sponntane Chemilumineszenz und die stimulierte fMLP (Sigma) mit den opsonierten Zymosan (OZ) und den Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA Sigma) bewertet. Zwecks der Hervorrufung der Preaktivierung der Neutrophile in vitro wurde ein zusätzliches System eingesetzt, in dem die Proben mit TNF- α in der Konzentration 10 ng/ml durch 15 in der Zimmertemperatur inkubiert wurden. In den Chemilumineszenzwerten im Vollblut wird die absolute Anzahl der Neutrophile und die Hämoglobinkonzentration berücksichtigt und in den allgemein angenommenen Lumineszenzeinheiten RLU (Relative Light Units total) nach der Formel ausgedrückt:

$$CL_{\text{abgerechnet}} = CL_{\text{gemessen}} [\text{RLU}_{\text{total}}] \times \frac{\text{Hb}[\%]}{\text{WBC}[\text{tys}/\mu\text{L}] \times \text{PMN}[\%]}$$

WBC (white blood cell) - die absolute Anzahl der weißen Blutkörperchen ($10^3/\mu\text{l}$)

CL - Chemilumineszenz (RLUtotal)

Hb - Hämoglobin (%)

PMN (polymorphonuclear leukocytes) - Neutrophile es peripheren Blutes (%)

Die Aktivitätsbewertung der NK- Zellen im Vergleich zur Linie K562

Die zytotoxische Aktivität der NK- Zellen wurde bewertet, indem der allgemein zugängliche Test NKTest (Orpegen, Pharma) gebraucht wird. Er erlaubt die zytotoxischen Aktivität der menschlichen NK-Zellen im Vergleich zu den Zielzellen K562 quantitativ zu bestimmen. Die Lymphozyten des peripheren Blutes wurden isoliert, indem man sie in dem Gradient Gradisol L (Aqua-Medica) mit der Konzentration 1,077 g/l in Einklang mit den allgemein angenommenen technischen Angaben schleudert [9]. Nach der Isolation des Blutserums, wurden die Schichten der mononukleären Zellen gesammelt, indem sie zweimal in PBS gewaschen und dann in der Suspension der Zellen mit der Konzentration 5×10^6 Zellen/ml gehalten wurden. Nach der Vermehrung der Zielzellen K562 und nach der zweimaligen Spülung in PBS wurde ihre Konzentration und Lebensdauer bewertet. Die NK- Zellen (E) der untersuchten Patienten wurden mit den Zielzellen K562 (T) gemischt und zwar in den Proportionen E:T: 50:1; 25:1; 12,5:1 [10]. Danach wurden die in der Endkapazität 200 ml (Mischung von Effektor-Zielzellen) inkubiert. Die Suspension der Effektor- und Zielzellen wurde in die einzelnen Proben Typ Falcon (BD) in Einklang mit dem empfohlenen Schema gegossen. Es wurde die Kontrolle der Zielzellen zur Beobachtung des Tods einer Zelle vorbereitet (Kontrollproben). Dasselbe System wurde mit dem Stimulator: IL-2 (200 U/ml) [11] mit einer Probe „der strengen Kontrolle“ aus IL-2 geschaffen. Die Suspension wurde mit der Geschwindigkeit von 1200

Umdrehungen/Min. durch 2-3 Minuten und dann durch 240 Minuten in der Zimmertemperatur 37°C gemischt und geschleudert und in der feuchten Atmosphäre CO₂ inkubiert. Zum Abschluss sind die Proben in einem Steam-Labor zwecks der Hemmung der Reaktionen (bis zur zytometischen Analyse) gehalten. Es wurde auch der zum Satz beigefühten DNA- Farbstoff (50 ml pro Probe) zugegeben, das wurde gemischt und inkubiert durch 5 Minuten in der Dunkelheit im Steam-Labor. Die zytometische Messung der Suspension wurde in 30 Minuten nach der DNA- Zugabe geführt. Zur Bewertung wurde Durchflusszytometrie FACSCalibur mit dem Argonlaser 488 nm (BD) eingesetzt. Zur Analyse der Ergebnisse wurde das Programm CellQuest genutzt. Es wurden 2500 Zielzellen pro eine Probe gesammelt. Es wurde der prozentuelle Anteil der toten Zielzellen K562 gemessen. Die Untersuchung wurde bei 6 Personen abgeschlossen.

ERGEBNISSE

Bei den Kranken an rheumatoider Arthritis wurde die gesenkte RFT-Produktion durch Neutrophile im Vergleich zu den Ergebnissen bei den gesunden Menschen beobachtet. Die Preaktivierung von TNF- α hat keinen bedeutenden Einfluss auf die Richtungsänderung der in der RFT- Generation. Die Ergebnisse wurden in der Tabelle 1 zusammengestellt. Beispielshistogramme der zytometischen Analyse der Aktivität der NK- Zellen wurden an den Abbildungen 1 und 2 dargestellt. Nach der Therapie mit dem Präparat BioMarine 570 wurde die bedeutende Beschränkung von C1q, C3 i CH50 beobachtet. Die Konzentration der einzelnen Komplementfaktoren war bei den Kranken an rheumatoider Arthritis als bei der Kontrollgruppe höher, was auf den bedeutenden Anteil des Systems in der Pathogenese von rheumatoider Arthritis hinweist (Abb. 3). Es hat sich auch die Aktivität der NK- Zellen in den Proportionen: T 25/1 i 12,5/1 vergrößert. Die Ergebnisse wurden an der Abbildung 2 dargestellt.

ZUSAMMENFASSUNG

Natürliche Immunität hat sich im Verlauf der Evolution vor der erworbenen Immunität herausgebildet und sie bildet viele Systeme, die zur Herausbildung ihrer eigenen Abwehrreaktionen keines Kontakts mit dem Pathogen erfordern. Zu den Hauptzellen, die diese Immunität bilden gehören: NK- Zellen, Fresszellen wie Neutrophile oder Makrophagen, dendritische Zellen, die die grundlegende Rolle in der Inkubation der erworbenen Immunität spielen. Die Erkennung des Pathogens kann dank den spezialisierten Rezeptoren erfolgen, die Lektinen sind; sie wurden vorläufig PRR genannt (ang. pathogen recognizing receptors). Die Rezeptoren verbinden sich mit den Einfachzuckern, die dank den entsprechenden Proteinträgern in die Zellhäute der Pathogene oder der bakteriellen Toxine eingebaut werden. Diese Verbindung verursacht die Versorgung in Blutgefäßen des Komplementsystems auf dem Lektinenweg, die Generation der Entzündungsvermittler und der chemotaktischen Faktoren sowie die Anregung der Fresszellen. Die Fresszellen oder die Gene präsentierenden Zellen (APC), die die erworbene Immunität mit der Produktion der Antikörper sowie die Produktion der reaktiven Zellen verursachen.

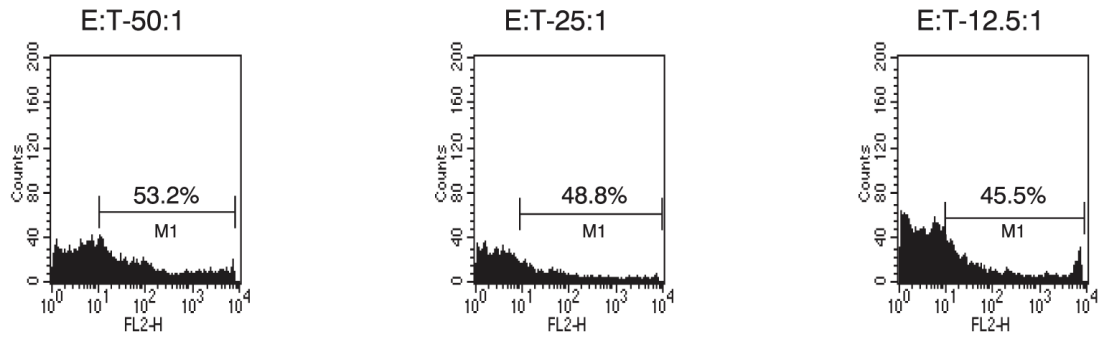
Tabela 1. Die Analyse der Werte der reaktiven Formen des Sauerstoffes, die durch ruhende und stimulierte Neutrophile fMLP, OZ und PMA produziert werden, bei den kranken vor und nach der Therapie mit dem Präparat BioMrine 570 sowie bei gesunden Menschen.

Die Gruppe	ohne Inkubation der TNF- α Inkubation der TNF- α	Nich stimulierte Neutrophile	FMLP	OZ	PMA
Gesunde	-	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
Vor der Therapie	-	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
Nach der Therapie	-	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	11,8 \pm 2,424

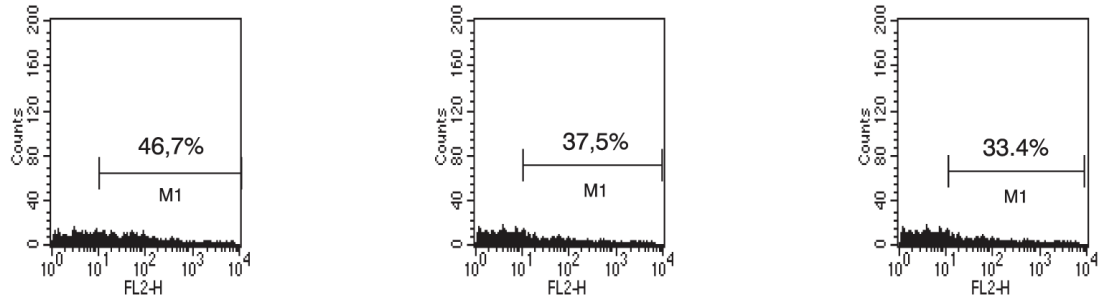
Durchschnittswerte (\pm SEM) wurden in den konventionellen Einheiten RLU (Relative Light Units total).

* - p < 0,05; der statistisch bedeutende Unterschied im Vergleich zu den Gruppen der Gesunden. Keine statistisch bedeutenden Unterschiede vor und nach der Therapie mit dem Präparat BioMarine.

VOR DER THERAPIE

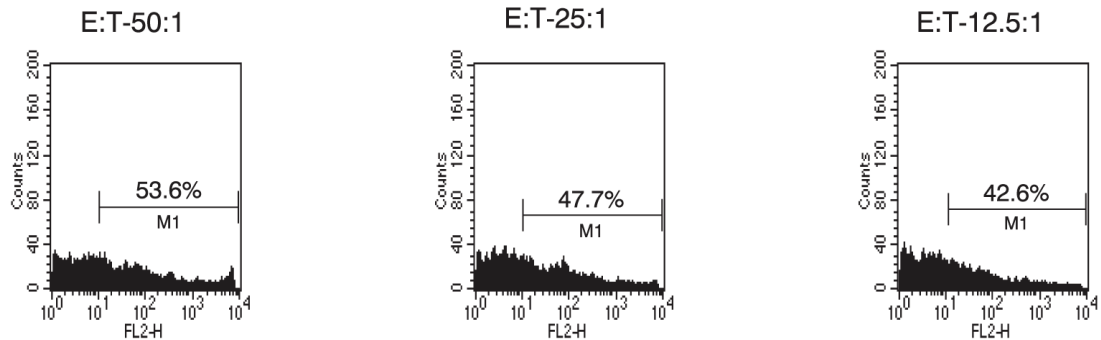


NACH DER THERAPIE

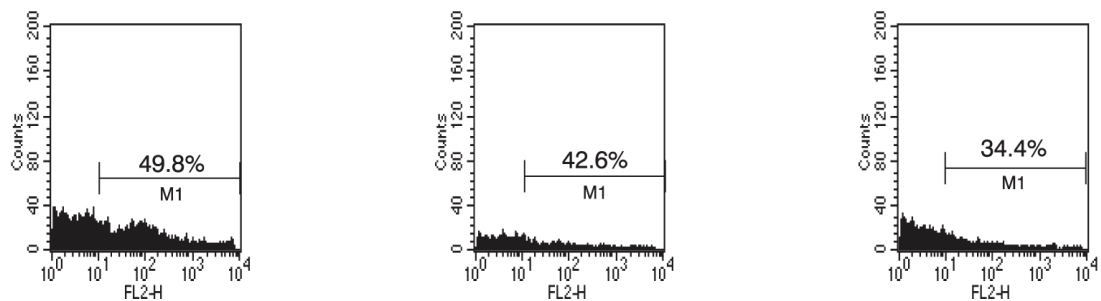


Ryc. 1. Zytometrische Analyse der Aktivität der NK- Zellen bei den Krabken vor und nach der Therapie mit den Präparat Bio Marine 570 (4- stündige Inkubation, 37°C; die Mischung der Effektorzellen (E)-Target (T): 50:1; 25:1; 12:1; 5:1. FACSCalibur, BD)

VOR DER THERAPIE - STIMULATION IL-2



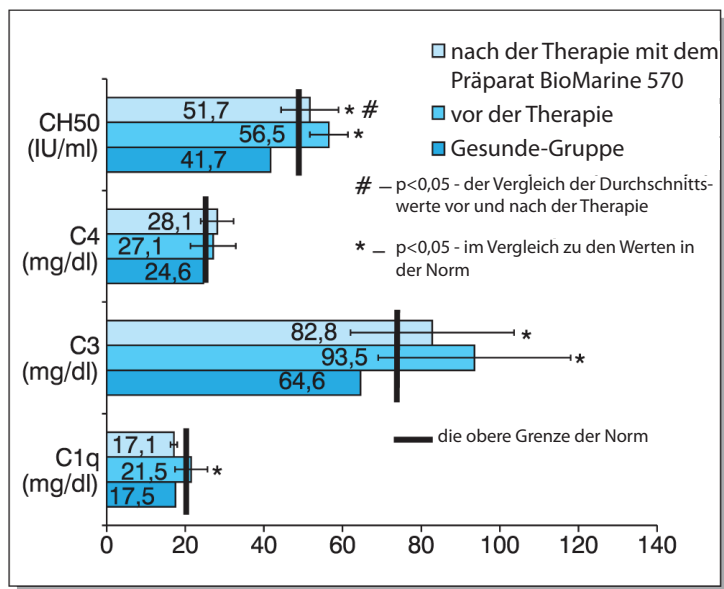
NACH DER THERAPIE - STIMULATION IL-2



Ryc. 2. Zytometrische Analyse der Aktivität der NK- Zellen bei den Krabken vor und nach der Therapie mit den Präparat Bio Marine 570 (4- stündige Inkubation, 37°C, mit IL-2 (200 U/ml); die Mischung der Effektorzellen (E)-Target (T): 50:1; 25:1; 12:1; 5:1. FACSCalibur, BD). Beispielhistogramm.

Um das System der natürlichen Immunität zum Teil zu untersuchen, wurden die Untersuchungen der Fresszellen, die Konzentration des Komplementsystems und der Aktivität der NK- Zellen durchgeführt [13]. Es hat sie ergeben, dass das eingenommene Präparat bedeutend die Funktionen der natürlichen Immunität beeinflusst, sowie die RTF- Produktion, die Aktivität des Komplementsystems und die beschränkte Aktivität den NK- Zellen. Viele Erscheinungen müssen

aber erklärt werden. Viele der nicht gelösten Probleme betreffen die Pathogenese der Autoimmunerkrankungen. Es ist noch nicht klar, welchen Einfluss diese Erscheinungen in der Pathogenese der Autoimmunerkrankungen (wie rzs) haben und warum die Symptome der Krankheit spontan bei den Frauen in der Schwangerschaft gemildert werden [14].



Ryc. 3. Der Vergleich der Konzentrationen der Komplementfaktoren C3c, C4, C1q sowie der hämolytischen Aktivität CH50 vor und nach der Therapie mit dem Präparat BioMarine 570 bei den Kranken an RZS sowie bei den gesunden.

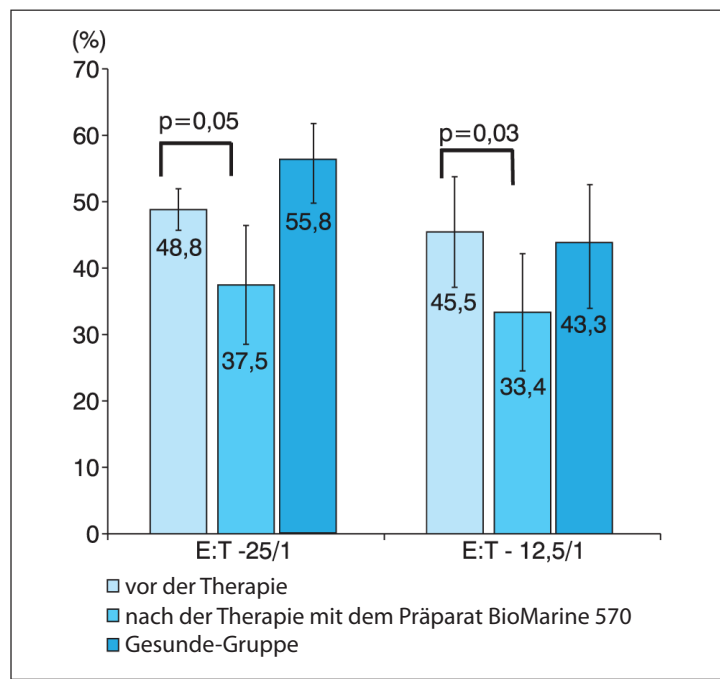
Der die Immunität regulierende Mechanismus, der durch die Fettsäuren induziert wird, beruht wahrscheinlich auf der Änderung innerhalb der Zellhäute, die zur Entstehung der Lipidenperoxide, Anregung der Fagocytose und Synthese der Zytokinen führt [15]. Immunitätsdefekt führt zu einer Infektion, zur Sepsis oder der „autokatabolischen“ Erscheinungen [16]. Deswegen erlaubt die Analyse der Literatur aus den Jahren 1990-2000 zu bestätigen, dass die Fettsäuren Omega-3 und manche Aminosäure bedeutend die Auftrenshäufigkeit der Infektionen und Sterblichkeit der ernsthaft Kranken, die aus unterschiedlichen Gründen chirurgisch behandelt werden mussten, gesunken ist [16].

Die Untersuchungen der Krankheit bei den Menschen und Mäusen haben ergeben, dass die Fischfette enthaltende Diät entzündungshemmende Eigenschaften hat, insbesondere dank den mehrfach ungesättigten Fettsäuren, die direkt die Th1- Zellen hemmen, die von IL-2 abhängen und die Zellen Th2, CD4 anregen, die die Zytokinen mit der entzündungshemmenden Eigenschaften aussondern wie IL-10. Die Aktivitätsverringern der NK- Zellen kann auch indirekt die entzündungshemmende Wirkung stärken, aber der Mechanismus der Aktivitätsänderung der NK- Zellen ist noch nicht klar.

Die Ergebnisse ergänzen unser Wissen über die die Immunität regulierenden Eigenschaften der Fettsäuren Omega- 3, der Hauptmechanismus ihrer Wirkung beruht auf der Modifikation der Parameter der natürlichen Immunität in der Form: der Aktivität der NK- Zellen, der Konzentrationsverringern der Komplementfaktoren CH50 sowie der Generationsmodifizierung der reaktiven Formen des Sauerstoffes- RFT. Die Ergebnisse weisen auf eine der Möglichkeiten der vorteilhaften Auswirkung des Präparats auf ausgewählte Parameter der natürlichen Immunität.

LITERATUR:

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



Ryc. 4. Der Vergleich der durchschnittswerte der Aktivität der NK-Zellen vor und nach der Therapie mit dem Präparat BioMarine 570 bei den Kranken an RZS und Gesunden Menschen.

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. Trinchieri 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. Medhitov 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