

Verndandi áhrif lýsisríks fæðis eftir sýkingar eru óháð íkomustað bakteríanna

Ágrip

Valtýr Stefánsson
Thors¹,
Auður Þórisdóttir¹,
Helga Erlendsdóttir²,
Ingibjörg
Harðardóttir¹,
Ingólfur Einarsson³,
Jón Reynir
Sigurðsson³,
Sigurður
Guðmundsson⁴,
Eggert Gunnarsson⁵,
Ásgeir Haraldsson^{1,3}

Markmið: Lýsissríkt fæði hefur verndandi áhrif á tilraunadýr sem sýkt eru í vöðva með *Klebsiella pneumoniae* og hefur einnig áhrif í ýmsum sjúkdómum, þar á meðal sjálfnæmissjúkdómum. Ekki er ljóst á hvern hátt lýsið virkar þó líklegt sé að virkinn tengist áhrifum lýsis á ónæmissvar dýranna við sýkingunum og öðru áreiti.

Rannsóknarhópurinn hefur áður birt niðurstöður sem sýna verndandi áhrif lýsisneyslu í sýkingum með *Klebsiella pneumoniae* þegar bakteríunni er sprautað í vöðva. Ef verndandi áhrif lýsis í sýkingum tengjast almennt ónæmissvari líkamans ættu þau að koma fram óháð íkomustað sýkingarinnar. Í tilraunum okkar nú var því kannað hvort lýsið hefði sömu verndandi áhrif á tilraunadýr sem sýkt voru í lungu í stað vöðva eins og það gerði í fyrri tilraunum.

Efniviður og aðferðir: Sextíu NMRI mús voru aldar í sex vikur á fæði bættu með lýsi (30 mús) eða fæði bættu með kornolíu (30 mús). Eftir það voru músar sýktar í lungu með *Klebsiella pneumoniae* og fylgst með lifun. Tilraunin var síðan endurtekin á nákvæmlega sama hátt. Niðurstöðurnar voru bornar saman við fyrri tilraunir hópsins þar sem sýkt var í læri.

Niðurstöður: Lifun músa sem fengið höfðu lýsibætt fæði var marktækt betri í báðum tilraununum samanborið við mús sem aldar voru á kornolíubættu fæði ($p=0,0001$ og $p=0,0013$). Niðurstöðurnar eru sambærilegar fyrri niðurstöðum þegar sýkt var í vöðva.

Ályktanir: Niðurstöðurnar benda til að jákvæð áhrif lýsisneyslu komi fram óháð íkomustað bakteríanna. Niðurstöðurnar eru því í samræmi við þá kenningu að lýsisneyslan hafi áhrif á ónæmissvar líkamans fremur en afmarkaða staðbundna þætti.

Inngangur

Lýsissríkt fæði hefur verndandi áhrif á tilraunadýr sem sýkt eru í vöðva með *Klebsiella pneumoniae* (1-3). Lýsissríkt fæði hefur einnig áhrif í mörgum sjúkdómum, þar á meðal sjálfnæmissjúkdómum (4-8). Ekki er að fullu ljóst á hvern hátt lýsið virkar í þessum tilvikum. Líklegt er þó talið að virkinn tengist áhrifum lýsis á ónæmissvar dýranna við sýkingunum og öðru áreiti.

Rannsóknarhópurinn hefur birt niðurstöður sem sýna að lýsi hefur verndandi áhrif í sýkingum með *Klebsiella pneumoniae* þegar bakteríunni er sprautað

ENGLISH SUMMARY

Thors VS, Þórisdóttir A, Erlendsdóttir H, Harðardóttir I, Einarsson I, Sigurðsson JR, Guðmundsson S, Gunnarsson E, Haraldsson Á

Beneficial effect of dietary fish-oil is independent of the infection site

Læknaðlaðið 2002; 88: 117-9

Objective: Fish-oil enriched diet has a protective effect on experimental animals infected intramuscularly with *Klebsiella pneumoniae*. It also has beneficial effect in several other diseases, including autoimmune disorders. The pathophysiological effects of dietary fish-oil have still not been revealed although it is expected to influence the immune response.

We have previously shown that dietary fish-oil has beneficial effect in mice infected intramuscularly with *Klebsiella pneumoniae*. If the beneficial effect of dietary fish-oil is due to influence on the immune response it should be independent of the infection site. We therefore investigated whether dietary fish-oil has beneficial effect in intrapulmonary infection with *Klebsiella pneumoniae* as it has on intramuscular infection with the same bacteria.

Materials and methods: Sixty NMRI mice were fed diets enriched with fish-oil (30 mice) or corn-oil (30 mice) for six weeks. The mice were then infected in the lungs with *Klebsiella pneumoniae* and the survival was monitored. The experiment was performed twice. The results were compared to our earlier results with intramuscular infections.

Results: The survival of the mice fed the fish-oil enriched diet and infected in the lungs with *Klebsiella pneumoniae* was significantly better compared to the survival of mice fed the corn-oil enriched diet in both experiments ($p=0,0001$ and $p=0,0013$). These results are similar to our earlier findings when the mice were infected intramuscularly.

Conclusions: These results indicate that the beneficial effect of dietary fish-oil on infection is independent of the site of infection. These results are in accordance with the hypothesis that dietary fish-oil influences the immune response.

Key words: fish-oil, omega-3 fatty acids, experimental pneumonia, animal study, *Klebsiella pneumoniae*.

Correspondence: Ásgeir Haraldsson. E-mail: asgeir@landspitali.is

í vöðva (1). Sambærilegum niðurstöðum hefur verið lýst af öðrum (2, 9-11) þó ekki séu niðurstöður allra slíkra rannsókna á einn veg (12, 13). Við höfum fært rök fyrir þeirri hugmynd að lýsissríkt fæði virki vægt

¹Háskóli Íslands, læknaeild,
²Sýklafræðideild Landspítala,
³Barnspítali Hringins,
Landspítala Hringbraut,
⁴Landlækniseimbættið,
⁵Rannsóknarstöð Háskóla
Íslands í meinafræði að
Keldum. Fyrirspurnir: Ásgeir
Haraldsson prófessor
Barnspítala Hringins,
Landspítala Hringbraut, 101
Reykjavík. Sími: 5601050;
netfang: asgeir@landspitali.is

Lykilord: lýsi, ω -3 fitusýrur,
lungnabólga, tilraunadýr,
Klebsiella pneumoniae

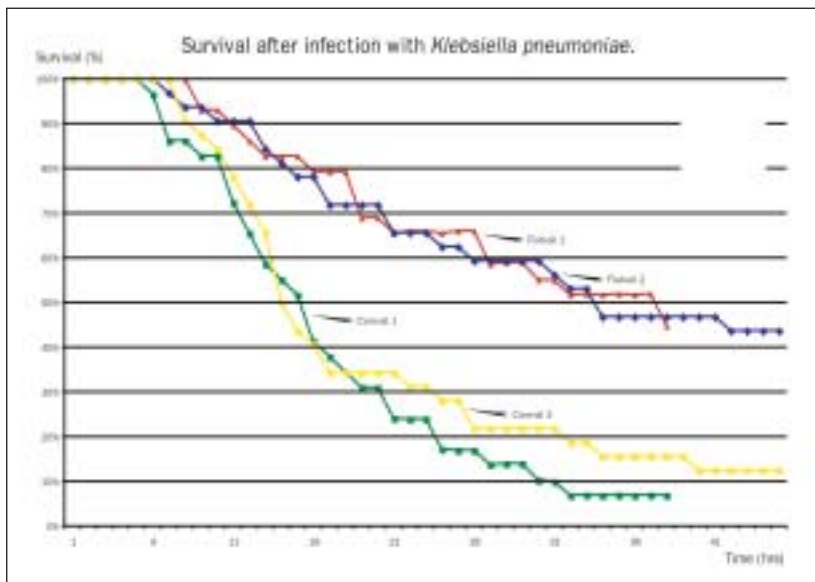


Fig. 1. The effect of fish-oil on survival after experimental pneumonia with *Klebsiella pneumoniae*. The mice were fed experimental diet for six weeks containing fish-oil (10% w/w) or corn-oil (10% w/w) in two separate experiments ($n=60$ in each experiment).

ónæmisbælandi og dragi því úr yfirþyrmandi ónæmissvari og komi þannig í veg fyrir lost og dauða. Rannsóknir *in vitro* hafa einnig sýnt fram á breytta framleiðslu boðefna og breytt ónæmissvar eftir neyslu lýsisríks fæðis (14-18).

Ef verndandi áhrif lýsis í sýkingum tengjast almennt ónæmissvari líkamans ættu þau að koma fram óháð íkomustað sýkingarinnar. Í tilraunum okkar nú var því kannað hvort lýsið hefði verndandi áhrif á tilraunadýr sem sýkt voru í lungu eins og það gerði í fyrri tilraunum rannsóknarhópsins þegar dýrin voru sýkt í vöðva.

Aðferðir

Sextíu NMRI músar voru aldar á Tilraunastöð Háskólans í meinafræði að Keldum. Mýsnar voru fóðraðar á hefðbundinn hátt á nagdýrafóðri frá Special Diets Services (Witham, Essex, England) og höfðu frjálstan aðgang að vatni og fæðu. Annar helmingur músanna, 30 mýs, fengu fæði bætt með lýsi (Lýsi ehf, Grandavegi, Reykjavík, Ísland) en hinn helmingurinn, 30 mýs, fengu fæði bætt með kornolíu (Wesson, Hunt og Wesson inc., Fullerton, USA) í sex vikur. Magn lýsis eða kornolíu í fæðinu nam 10% af þyngd fæðunnar.

Að sex vikum liðnum voru mýsnar sýktar með *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 43816) í lungu. Sýkingin var framkvæmd í svæfingu (natrium pentobarbital, 50 mg/kg í kviðarhol). Þegar mýsnar höfðu verið svæfðar voru þær láttnar hanga á framtönnum og $3-4 \times 10^2$ bakteríum af *Klebsiella pneumoniae* í lausn dreypt í nasir þeirra eins og lýst hefur verið áður (19). Að 10 mínútum liðnum var músunum komið fyrir í sitjandi stöðu þar til þær vöknudu eftir svæfinguna. Fylgst var með lifun músanna.

Tilraunin var framkvæmd tvisvar á sama hátt.

Kaplan-Meier log rank próf var notað við tölfræðiútreikninga.

Niðurstöður

Þyngdaraukning músanna meðan á fóðrun stóð var sú sama í báðum hópum. Við upphaf tilraunar voru mýsnar að meðaltali 28,8 g að þyngd en eftir að hafa verið aldar á fæðublöndunni í sex vikur vógu þær að meðaltali 31,9 g.

Í báðum tilraununum var lifun músa sem fengið höfðu lýsisríkt fæði marktækt betri samanborið við mýs sem aldar voru á kornoliubættu fæði ($p=0,0001$ í tilraun 1 og $p=0,0013$ í tilraun 2) (mynd 1).

Umræða

Ýmsar rannsóknir hafa bent til að lýsi hafi áhrif á ónæmissvar líkamans. Niðurstöður fjölda rannsókna sýna að lýsisneysla dregur úr einkennum ýmissa sjálf-næmissjúkdóma (4-8). Einnig hafa margar rannsóknir leitt í ljós aukna lifun tilraunadýra sem alin eru á lýsisbættu fæði og sýkt með *Klebsiella pneumoniae* (1, 2), berklum (20), malaríu (11), *Pseudomonas aeruginosa* (9) eða eftir innspýtingu endótoxína (10). Einnig virðist lýsi hafa hamlandi áhrif á vöxt *Helicobacter pylori* bæði *in vitro* og *in vivo* (21, 22). Þá hafa rannsóknir *in vivo* einnig bent til vaxtarhamlandi áhrifa lýsis á veirur (23) þó rannsóknir á veirusýkingum í tilraunadýrum sýni fram á hægari hreinsun veiranna (24). Enn er þó óljóst hvernig lýsið virkar.

Því hefur verið haldið fram að lýsi sé vægt ónæmisbælandi og dragi þannig úr ónæmissvari dýranna (1, 13, 15). Þessi hugmynd er í samræmi við þær niðurstöður að lýsi dragi úr einkennum sjálf-næmissjúkdóma (4-8). Einnig kann þessi kenning að falla vel að þeim niðurstöðum sem sýna fram á aukna lifun tilraunadýra sem alin hafa verið á lýsisríku fæði og sýkt í kjölfarið. Með vægri ónæmisbælingu dragi lýsið úr yfirþyrmandi ónæmissvari og minnki þannig hættu á losti og dauða. Nokkrar rannsóknir benda til ákveðinnar ónæmisbælingar af völdum lýsisneyslunnar. Þannig hefur verið sýnt fram á minni fjölda eitilfrumna þó niðurstöður séu ekki allar á einn veg (15). Ýmsar breytingar hafa komið fram á starfsemi mónósýta tilraunadýra *in vitro* (16) og manna eftir lýsisneyslu (17, 18), þar með talið breyting á sýnd mótefnavaka (25). Bælingin verður þó að sjálfsögðu að vera væg þannig að dýrið ráði að lokum niðurlögum sýkingarinnar.

Lýsi inniheldur mikið af $\omega-3$ fitusýrum samanborið við kornolíu sem er rík af $\omega-6$ fitusýrum (3). Ýmsar rannsóknir benda til þess að áhrif lýsisins megi fyrst og fremst rekja til $\omega-3$ fitusýrunnar og niðurstöður hafa sýnt fram á áhrif $\omega-3$ fitusýra á ónæmissvar (26).

Flestar rannsóknir á áhrifum lýsis á lifun tilraunadýra eftir sýkingu hafa beinst að sýkingum með *Klebsiella pneumoniae* í vöðva (1, 2). Niðurstöður okkar nú sýna fram á aukna lifun músa sem aldar hafa verið á lýsisbættu fæði og sýktar eru í lungu. Þetta eru sambærilegar niðurstöður og rannsóknarhópurinn hafði fengið eftir sýkingar í vöðva (1). Ef

áhrifum lýsins er miðlað um ónæmiskerfið, eins og við gerum ráð fyrir, ætti íkomustaður sýkingarinnar að skipta litlu máli. Rannsókn okkar nú þar sem mýsnar voru sýktar í lungu renna frekari stoðum undir þá kenningu að lýsisáhrifunum sé miðlað um ónæmiskerfið og endurspegli ekki staðbundin viðbrögð í ákveðnum vefjum. Hafa verður í huga að fyrsta ónæmissvarið er nokkuð mismunandi í lungum eða í vöðva. Við innspýtingu í vöðva er farið fram hjá yfirborðsvörnum líkamans en við sýkingu í lungu eru fyrstu varnir líkamans virkar. Yfirborðsvarnir í lungum eru þó ekki afgerandi í viðbrögðum við stórum sýkingaskammti af Gram neikvæðum bakteríum.

Niðurstöðurnar benda til að jákvæð áhrif fái fram, óháð íkomustað sýkinganna. Þessar niðurstöður renna stoðum undir þá kenningu að lýsi virki á almennt ónæmissvar líkamans.

Þakkir

Sonja Vilhjálmisdóttir annaðist dýrahald á Keldum. Örn Ólafsson annaðist tölfræðiútreikninga. Styrkir til rannsóknarinnar fengust frá RANNÍS, Nýsköpunarsjóði námsmanna, Lýsi ehf, Aðstoðarmannasjóði Háskóla Íslands og Vísindasjóði Landspítala. Sýklafræðideild Landspítala lagði til bakteríurnar.

Heimildir

- Björnsson S, Hardardóttir I, Gunnarsson E, Haraldsson A. Dietary fish oil supplementation increases survival in mice following *Klebsiella pneumoniae* infection. *Scand J Infect Dis* 1997; 29: 491-3.
- Blok WL, Vogels MTE, Curfs JHAJ, Eling WMC, Buurman WA, van der Meer JWM. Dietary fish-oil supplementation in experimental gram-negative infection and in cerebral malaria in mice. *J Infect Dis* 1992; 165: 898-903.
- Björnsson S, Hardardóttir I, Gunnarsson E, Haraldsson A. Lýsisneysla eykur lifun mýsa eftir sýkingu með *Klebsiella pneumoniae*. *Læknablaðið* 1997; 83: 289-93.
- Bittner SB, Tucker WB, Cartwright I, Bleehen SS. A double blind, randomised, placebo-controlled trial of fish oil in psoriasis. *Lancet* 1988; 1: 378-80.
- Kremer JM, Lawrence DA, Petrillo GF, Litts LL, Mullaly PM, Rynes RI, et al. Effects of high-dose fish oil on rheumatoid arthritis after stopping nonsteroidal antiinflammatory drugs. Clinical and immune correlates. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 1107-14.
- Miura S, Tsuzuki Y, Hokari R, Ishii H. Modulation of intestinal immune system by dietary fat intake: relevance to Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol* 1998; 13: 1183-90.
- Harbige LS. Dietary n-6 and n-3 fatty acids in immunity and autoimmune disease. *Proc Nutr Soc* 1998; 57: 555-62.
- Cheng IK, Chan PC, Chan MK. The effect of fish-oil dietary supplement on the progression of mesangial IgA glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 1990; 5: 241-6.
- Peck MD, Alexander JW, Ogle CK, Babcock GF. The effect of dietary fatty acids on response to *Pseudomonas* infection in burned mice. *J Trauma* 1990; 30: 445-52.
- Rosa DM, Spillert CR, Flanagan JJ, Lazaro EJ. Beneficial effect of cod liver oil in murine endotoxemia. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology* 1990; 70: 125-7.
- Fevang P, Sääv H, Høstmark AT. Dietary Fish Oils and Long-Term Malaria Protection in Mice. *Lipids* 1995; 30: 437-41.
- Fritsche KL, Shahbazian LM, Feng C, Berg JN. Dietary fish oil reduces survival and impairs bacterial clearance in C3H/He mice challenged with *Listeria monocytogenes*. *Clin Sci (Colch)* 1997; 92: 95-101.
- Chang HR, Dulloo AG, Vladioanu IR, Piguet PF, Arsenijevic D, Girardier L, et al. Fish oil decreases natural resistance of mice to infection with *Salmonella typhimurium*. *Metabolism* 1992; 41: 1-2.
- Hardardóttir I, Kinsella JE. Tumor necrosis factor production by murine resident peritoneal macrophages is enhanced by dietary n-3 polyunsaturated fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta* 1991; 1095: 187-95.
- Yaqoob P, Newsholme EA, Calder PC. The effect of dietary lipid manipulation on rat lymphocyte subsets and proliferation. *Immunology* 1994; 82: 603-10.
- Khair-el-Din TA, Sicher SC, Vazquez MA, Wright WJ, Lu CY. Docosahexaenoic acid, a major constituent of fetal serum and fish oil diets, inhibits IFN gamma-induced Ia-expression by murine macrophages in vitro. *J Immunol* 1995; 154: 1296-306.
- Hughes DA, Pinder AC, Piper Z, Johnson IT, Lund EK. Fish oil supplementation inhibits the expression of major histocompatibility complex class II molecules and adhesion molecules on human monocytes. *Am J Clin Nutr* 1996; 63: 267-72.
- Hughes DA, Pinder AC. N-3 polyunsaturated fatty acids modulate the expression of functionally associated molecules on human monocytes and inhibit antigen-presentation *in vitro*. *Clin Exp Immunol* 1997; 110: 516-23.
- Magnusson V, Erlendsdóttir H, Kristinsson KG, Guðmundsson S. Comparative efficacy of penicillin and ceftriaxone against penicillin resistant pneumococci in a mouse pneumonia model. In: ICAAC; 1995.
- Paul KP, Leichsenring M, Pfisterer M, Mayatepek E, Wagner D, Domann M, et al. Influence of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids on the resistance to experimental tuberculosis. *Metabolism* 1997; 46: 619-24.
- Thompson L, Cockayne A, Spiller RC. Inhibitory effect of polyunsaturated fatty acids on the growth of *Helicobacter pylori*: a possible explanation of the effect of diet on peptic ulceration. *Gut* 1994; 35: 1557-61.
- Wang X, Sjunnesson H, Sturegard E, Wadstrom T, Willen R, Aleljung P. Dietary factors influence the recovery rates of *Helicobacter pylori* in a BALB/cA mouse model. *Zentralblatt für Bakteriologie* 1998; 288: 195-205.
- Thormar H, Isaacs CE, Brown HR, Barshatzky MR, Pessano T. Inactivation of enveloped viruses and killing of cells by fatty acids and monoglycerides. *Antimicrob agents chemother* 1987; 31: 27-31.
- Byleveld PM, Pang GT, Clancy RL, Roberts DC. Fish oil feeding delays influenza virus clearance and impairs production of interferon-gamma and virus-specific immunoglobulin A in the lungs of mice. *J Nutr* 1999; 129: 328-35.
- Hughes DA, Pinder AC. n-3 polyunsaturated fatty acids inhibit the antigen-presenting function of human monocytes. *Am J Clin Nutr* 2000; 71(1 Suppl): 357S-60S.
- Calder PC. Can n-3 polyunsaturated fatty acids be used as immunomodulatory agents? *Biochem Soc Trans* 1996; 24: 211-20.