

Aktywność immunostymulująca frakcji polisacharydowych uzyskanych z produktu leczniczego Biostymina® (*Aloe arborescens folii recentis extractum fluidum*)

Zakład Biochemii i Biofarmaceutyków, Narodowy Instytut Leków w Warszawie
Kierownik Zakładu: prof. dr hab. n. farm. Elżbieta Anuszewska

IMMUNOMODULATORY ACTIVITY OF TWO POLYSACCHARIDE FRACTIONS ISOLATED FROM BIOSTYMINA® (ALOE ARBORESCENS FOLII RECENTIS EXTRACTUM FLUIDUM)

SUMMARY

Aloe arborescens Mill. is one of the most wide-ranging species in the genus *Aloe* L. and has been reported to have several medicinal uses, including anti-bacterial, anti-viral, anti-fungal and anti-inflammatory activity.

Fresh leaves of *Aloe arborescens* contain various groups of chemical compounds which show multidirectional therapeutic action: glycoproteins, polysaccharides, anthraquinones, amino acids, vitamins and minerals. Polysaccharide substances are characterized as the modulating the human immune system by stimulating the production of macrophages and improving the activity of T-lymphocytes. Therapeutic qualities of fresh leaves are used in Poland by Phytopharm Kleka S.A. in the manufacture of medicinal product – Biostymina® (*Aloe arborescens folii recentis extractum fluidum*).

The present work was undertaken to evaluate the immunomodulatory activity of two polysaccharide fractions isolated from Biostymina® which differ in molecular weight. The influence of polysaccharide fraction on the mouse immune system were estimated by testing of the survival rate of mouse thymocytes cultured with hydrocortisone in cytotoxicity test and the increase of the ability of splenocytes to attach to sheep erythrocytes in E-rosette test.

The obtained results show that polysaccharide fractions increase the survival rate of mouse thymocytes and the count of splenocytes forming spontaneous rosettes. Comparison of the results for polysaccharide fractions with those obtained for Biostymina® shows the differences between the immunomodulatory activity of both. Biostymina® exerts the higher stimulatory effect on mouse immune system than polysaccharide fractions.

KEY WORDS: BIOSTYMINA® – POLYSACCHARIDE FRACTIONS – IMMUNOSTIMULATION

Wstęp

Spośród przeszło 300 gatunków aloesu, z których tylko 20 uważa się za lecznicze, powszechne zastosowanie znalazły dwa: aloes zwyczajny (*Aloe barbadensis* Mill., znany także pod nazwą *Aloe vera* L.) i aloes drzewiasty (*Aloe arborescens* Mill.).

Aloes drzewiasty jest jednym z najbardziej rozpowszechnionych gatunków z rodzaju *Aloe* L., a z uwagi na szerokie zastosowanie w przemyśle żywnościowym, kosmetycznym i farmaceutycznym, poza stanem naturalnym, uprawiany jest także na plantacjach, głównie w Chinach, Japonii, obu Amerykach, a także w Polsce (1) (ryc. 1).

Preparaty uzyskiwane z tej rośliny od dziesiątków lat stosowane są w profilaktyce i terapii ludzi i zwierząt, w wielu chorobach, takich jak zakażenia bakteryjne, wirusowe i grzybicze, rany i owrzodzenia oraz choroby układu pokarmowego (2). Właściwości przeciwutleniające i stymulujące układ odpornościowy wykorzystywane są także w zapobieganiu chorobom cywilizacyjnym i ich terapii (3-6).



Ryc. 1. Kwitnący aloes drzewiasty (*Aloe arborescens* Mill.).

W procesie wytwarzania różnych produktów stosuje się sok, miąższ lub świeże liście aloesu. Skład substancji aktywnych w gotowym produkcie jest zmienny, w zależności od gatunku, wieku rośliny, warunków uprawy i klimatu, a także od sposobu przygotowania, czyli rodzaju ekstrahenta i warunków przeprowadzenia ekstrakcji (7-10). Jednakże wszystkie produkty w mniejszej lub większej ilości zawierają (2, 11):

- glikozydy antranoidowe,
- cukry proste i złożone – polisacharydy,
- glikoproteiny,
- sole licznych pierwiastków,
- witaminy,
- aminokwasy i enzymy.

Produkty pochodzenia naturalnego, a zwłaszcza pochodzenia roślinnego, cechuje złożony skład chemiczny i zazwyczaj cały zespół substancji znajdujących się w surowcu decyduje o jego działaniu biologicznym. Jednakże szereg badaczy podejmuje próby izolacji substancji czynnych z surowców roślinnych, mając nadzieję na uzyskanie produktu o lepszym indeksie terapeutycznym. Uważa się, że za aktywność biologiczną preparatów aloesowych odpowiedzialne są głównie substancje o budowie wielocukrów i glikoprotein, i te dwie grupy związków najbardziej interesują badaczy (11-13).

Hodowlę aloesu drzewiastego na terenie Polski prowadzi na skalę przemysłową Phytopharm Kłęka S.A., w Kłęce pod Poznaniem. Uprawy szklarniowe zapobiegają bardzo łatwemu krzyżowaniu aloesu drzewiastego z innymi gatunkami, przez co rośliny tam hodowane zachowują stabilny skład substancji czynnych. Z liści trzyletniego aloesu drzewiastego produkowany jest wodny wyciąg, który pod nazwą handlową Biostymina® stosowany jest w lecznictwie od kilkudziesięciu lat. Wytwórca Biostyminy® podjął próbę identyfikacji związków odpowiedzialnych za działanie wyciągu stymulującego układ immunologiczny.

Podjęte badania miały na celu ocenę aktywności immunostymulującej dwóch wyizolowanych frakcji polisacharydowych różniących się masą cząsteczkową i porównanie ich z produktem macierzystym – Biostymina®, i syntetycznym immunostymulatorem – izoprynozyna.

Materiały i metody

Zwierzęta

W badaniach użyto myszy szczepu wsobnego Balb/c, samic w wieku 4 tyg., o masie ciała ok. 16 g (test cytotoksyczności), oraz w wieku 6-8 tyg., o masie

ciała ok. 20 g (test hemaglutynacji i test tworzenia rozet). Zwierzęta pozyskiwano z hodowli Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny.

Doświadczenia z udziałem zwierząt wykonano za zgodą IV Lokalnej Komisji Etycznej (zezwolenie nr 47/2013; 06/NIL/2010).

Płyny hodowlane

Stosowano następujące płyny hodowlane:

- podłoże RPMI-1640, z glutaminą i NaHCO_3 (Sigma),
- zbuforowany roztwór soli fizjologicznej PBS (IITD Wrocław),
- płyn Hanksa (z 0,5% dodatkiem hydrolizatu laktoalbuminy) (IITD Wrocław).

Odczynniki

Używano następujące odczynniki chemiczne:

- hydrokortyzon (Corhydron), 25 mg, proszek i rozpuszczalnik (Jelfa S.A.),
- krwinki czerwone owcy (SRBC), stabilizowane w płynie Alsewera (GRASO Biotech),
- płyn Alsewera (glukoza, cytrynian sodu, chlorek sodu, kwas cytrynowy) (POCH),
- izofluran (Aerrane), płyn (Baxter),
- surowica cielęca płodowa (Bioprodukt),
- błękit trypanu substancja i fiolet krystaliczny substancja (Merck),
- Gradisol L 1,077 g/ml (Aqua Medica).

Immunostymulatory

W badaniach wykorzystano wymienione poniżej immunostymulatory:

- Biostymina®, płyn doustny (Phytopharm Kłęka S.A.),
- frakcja I (FI) – polisacharyd o masie 8 kDa (Phytopharm Kłęka S.A.),
- frakcja II (FII) – polisacharyd o masie 0,8 kDa (Phytopharm Kłęka S.A.),
- izoprynozyna substancja (AKSci).

Biostyminę® w teście cytotoksyczności stosowano w dawkach 2, 4, 6 i 8 $\mu\text{l/ml}$ hodowli oraz w teście hemaglutynacji i tworzenia rozet w dawkach 2, 4, 6 i 8 $\mu\text{l/mysz}$ – podanie doustne (14, 15).

Izoprynozynę po rozpuszczeniu w PBS stosowano w dawkach: 0,1, 1,0, 1,5 i 2,0 mg/ml hodowli/mysz (podanie doustne) (15).

Frakcje FI i FII po rozpuszczeniu w PBS stosowano w ilościach odpowiadających ich zawartości w Biostyminie®. Zgodnie z deklaracją wytwórcy 1,0 ml Biostyminy® zawiera 1,7 mg FI i 0,83 mg FII (tab. 1).

Tabela 1. Dawki immunostymulatorów stosowane w badaniach na zwierzętach.

Biostymina® ($\mu\text{l}/1 \text{ ml}$ hodowli)	Frakcja FI ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Frakcja FII ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
2	3,4/2	1,67/2
4	6,9/4	3,34/4
6	10,2/6	5,01/6
8	13,8/8	6,68/8

Test cytotoxyczności

Test wykonano w warunkach jałowych. Czterotygodniowe myszy usypiano izofluranem, pobierano grasice, a następnie przecierano je przez metalowe sito (średnica oczek ok. $300 \mu\text{m}$). Tymocyty otrzymane z rozdrobnionych grasic przepłukiwano trzykrotnie RPMI-1640 i wirowano (1800 obr./min przez 7-8 min). Po ostatnim wirowaniu tymocyty w liczbie 4×10^6 komórek w 1 ml zawieszano w RPMI-1640 z dodatkiem 10% płodowej surowicy cielęcej. Zawiesinę tymocytów rozlewano po 1 ml do jałowych probówek i dodawano odpowiednie ilości: Biostyminy®, frakcji FI i FII lub izoprinozyny. Po upływie 1 godz. do hodowli tymocytów dodawano hydrokortyzon w stężeniu $50 \mu\text{g}/\text{ml}$. Tak przygotowane próby inkubowano przez 18-20 godz. w temperaturze 37°C i w atmosferze 5% CO_2 . Po tym czasie w każdej hodowli zliczano po zabarwieniu 0,04% roztworem błękitu trypanu 100 komórek, osobno liczbę żywych i martwych.

W hodowlach kontrolnych bez hydrokortyzonu liczba żywych komórek powinna wynosić powyżej 80% pierwotnej liczby komórek (tab. 2). Względna przeżywalność komórek (stosunek procentu komórek żywych w hodowlach z hydrokortyzonem do procentu żywych komórek w hodowli kontrolnej) powinna mieścić się w granicach 50-65%. Względna przeżywalność komórek poniżej 50% lub powyżej 65% dyskwalifikuje doświadczenie (tab. 2).

Wyniki obliczano jako procentowy wzrost lub spadek liczby żywych tymocytów poddanych działaniu zastosowanych immunostymulatorów, w stosunku do kontroli, którą stanowiły hodowle z hydrokortyzonem.

Tabela 2. Odsetek żywych tymocytów w hodowlach kontrolnych.

Kontrola	Kontrola + HC	Względna przeżywalność tymocytów
$89,0 \pm 1,81$ n = 16	$50,7 \pm 1,82$ n = 16	$57,0 \pm 2,04$ n = 16

Test hemaglutynacji według Adlera (16) w modyfikacji własnej (17)

Myszom 6-8-tygodniowym w celu immunizacji podawano dootrzewnowo 4×10^8 erytrocytów owcy. Zwierzęta kontrolne otrzymywały odpowiednią objętość PBS. Biostyminę® oraz frakcje polisacharydowe FI i FII podawano doustnie w dawkach 2, 4 i $6 \mu\text{l}$ /mysz, które w teście cytotoxyczności zwiększały liczbę żywych tymocytów. Izoprinozynę również podawano doustnie, w dawkach 1,0, 1,5 i $2,0 \text{ mg}/\text{mysz}$. Po 5 dniach myszy usypiano i pobierano krew oraz śledzionę do testu tworzenia rozet. Pobraną krew wstawiano do ciepłarki na 15 min, następnie umieszczano w temperaturze 4°C i po 30 min odcinano skrzep. Próbki wirowano 10 min przy szybkości 2500 obr./min i zbierano surowice. W celu inaktywacji dopełniacza, surowice inkubowano w łaźni wodnej o temperaturze 56°C w czasie 30 min. Do przygotowanych mikropłytek rozlewano kolejne rozcieńczenia surowic, dodawano 1% zawiesinę SRBC i inkubowano 2 godz. w 37°C , a następnie umieszczano w temperaturze 4°C na 18-20 godz. Kontrole stanowiły surowice myszy, którym podawano PBS.

Za miano aglutynacji surowicy (szacunkowa ilość przeciwciał w surowicy) uważano najwyższe jej rozcieńczenie, przy którym następowała jeszcze aglutynacja (ocena mikroskopowa – co najmniej 3 zlepy w polu widzenia pod powiększeniem 200 x).

Test tworzenia rozet E

Wszystkie czynności wykonywano utrzymując próby i podłoża w lodzie oraz stosowano wirówkę z chłodzeniem.

Pobrane od zwierząt śledziony rozdrabniano i zawieszano w płynie Hanksa. W celu oddzielenia splenocytów od erytrocytów i innych komórek, otrzymaną zawiesinę nawarstwiano na Gradisol L o gęstości $1,077 \text{ g}/\text{ml}$ i wirowano 15 min przy szybkości 3000 obr./min. Uzyskane na granicy warstw splenocyty dwukrotnie płukano w płynie Hanksa, ponownie wirowano i zawieszano w podłożu, uzyskując liczbę komórek 2×10^6 w 1 ml hodowli. Dla każdej próby określano procent martwych splenocytów, który nie powinien wynosić więcej niż 10%. W aktualnych badaniach odsetek martwych splenocytów nie przekraczał 5%. Następnie do hodowli dodawano 1% zawiesinę SRBC w płynie Hanksa. Po 15 min inkubacji w temperaturze 37°C hodowle przetrzymywano przez 20 godz. w temperaturze 4°C , a następnie barwiono je 0,1% roztworem fioletu krystalicznego. Mikroskopowo oceniano liczbę splenocytów, wokół których utworzyły się rozety i obliczano ich odsetek w odniesieniu do hodowli kontro-

lnej. Za rozetę E uważano splenocyt ściśle otoczony co najmniej trzema erytrocytami owcy.

Wszystkie uzyskane w testach wyniki poddano ocenie statystycznej z wykorzystaniem programu Medstat, obliczając SE – standardowy błąd średniej oraz statystyczną istotność różnic dla dwóch prób powiązanych. Wyniki podano jako wartość średnią \pm SE.

Wyniki

W celu oceny działania immunostymulującego frakcji polisacharydowych wyodrębnionych z Biostyminy® zastosowano trzy testy: cytotoksyczności z hydrokortyzonem, tworzenia rozet E i hemaglutynacji (w celu potwierdzenia właściwej immunizacji zwierząt doświadczalnych).

W teście cytotoksyczności oceniany jest wpływ danego czynnika na przeżywalność tymocytów myszy (dojrzewających limfocytów T) w hodowlach z hydrokortyzonem (18). Tymocyty mają na swojej powierzchni receptory dla sterydów, przez co są wrażliwe na lityczne działanie hydrokortyzonu, który indukuje aktywny proces autodestrukcji, wywołując apoptozę (19). Substancje przyspieszające dojrzewanie i nabywanie przez tymocyty kompetencji immunologicznych powodują, że tracą one te receptory i stają się sterydooporne, co uwidacznia się wzrostem liczby żywych komórek w hodowlach z immunostymulatorem.

W tabeli 3 zestawiono wyniki uzyskane w teście cytotoksyczności z hydrokortyzonem. Stymulacja procesu dojrzewania tymocytów wyrażająca się wzrostem liczby żywych komórek w hodowli najwyraźniej jest widoczna przy dawce 4 μ l – zarówno Biostyminy®, jak i obu frakcji: FI i FII. Efekt ten utrzymuje się jeszcze w przypadku Biostyminy® i frakcji FII przy dawce 6 μ l, natomiast frakcja FI działa wyraźnie stymulująco także przy dawce 2 μ l. Najwyższa zastosowana dawka

badanych substancji (8 μ l) nie działa już stymulująco, co jest zgodne z wcześniejszymi wynikami badań aktywności immunostymulującej Biostyminy® (15). Działanie stymulujące immunomodulatorów tylko w pewnym zakresie dawek daje wprost proporcjonalną zależność dawka–efekt (20). Zależność ta jest widoczna także w przypadku izoprynozyiny, dla której maksymalną stymulację tymocytów uzyskano przy stężeniu 1,5 mg/ml, a przy stężeniu 2,0 mg/ml efekt ten jest widocznie słabszy. Działanie stymulujące dojrzewanie tymocytów w przypadku Biostyminy® oraz frakcji FI i FII zastosowanych w dawce 4 μ l jest porównywalne z działaniem izoprynozyiny w stężeniu 1,5 mg/ml. Wydaje się, że obie frakcje polisacharydowe dodawane do hodowli tymocytów w ilościach, w jakich znajdują się w zastosowanej dawce Biostyminy®, działają słabiej stymulująco niż produkt, z którego je wyizolowano.

W żywych organizmach wyróżnia się dwa rodzaje odpowiedzi immunologicznej: typu komórkowego i typu humoralnego. W pierwszym przypadku z antygenem reagują bezpośrednio komórki immunologicznie kompetentne tj. limfocyty T, natomiast w odpowiedzi humoralnej biorą udział przeciwciała wytworzone przez limfocyty B. Antygen zazwyczaj wywołuje jednocześnie obie odpowiedzi. W teście hemaglutynacji wykorzystuje się reakcję swoistego łączenia przeciwciał z antygenem w postaci erytrocytów owcy. Komórki łącząc się ze swoistymi przeciwciałami, tworzą kompleksy i wypadają z zawiesiny reakcyjnej w postaci zlepow. Wykonanie testu hemaglutynacji przed testem tworzenia rozet E pozwala na wyeliminowanie od zwierząt materiałów, które nie uległy właściwej immunizacji (brak zlepow w mieszaninie reakcyjnej), co spowodowałoby, że uzyskane wyniki mogłyby być fałszywie ujemne.

Tabela 3. Test cytotoksyczności badanych immunostymulatorów.

Badane immunostymulatory	Dawki: Biostymina®, FI, FII (μ l/1 ml hodowli)/izoprynozyina (mg/1 ml hodowli)			
	2 μ l/0,1 mg	4 μ l/1,0 mg	6 μ l/1,5 mg	8 μ l/2,0 mg
Biostymina®	112,0 \pm 2,70 n = 15 p < 0,0007	120,8 \pm 3,75 n = 12 p < 0,0003	121,1 \pm 3,11 n = 12 p < 0,0001	109,0 \pm 2,60 n = 10 p < 0,0095
FI	118,4 \pm 3,04 n = 14 p < 0,0001	118,4 \pm 3,20 n = 14 p < 0,0001	109,0 \pm 2,93 n = 14	103,9 \pm 2,06 n = 14
FII	104,9 \pm 1,77 n = 14	117,8 \pm 2,39 n = 14 p < 0,0001	114,9 \pm 3,52 n = 10 p < 0,003	99,8 \pm 2,30 n = 15
Izoprynozyina	106,9 \pm 4,55 n = 7	109,7 \pm 2,22 n = 20	122,6 \pm 1,52 n = 13 p < 0,0001	111,2 \pm 2,40 n = 14 p < 0,0006

Podstawą testu tworzenia rozet jest fakt, że wszystkie splenocyty mają na powierzchni receptory dla krwinek czerwonych owcy (21). Zdolność limfocytów do łączenia się z krwinkami owcy i spontanicznego tworzenia z nimi rozet zależy od wiązania się struktur glikolipidowych na powierzchni błony komórkowej limfocytów z lipidami powierzchniowymi erytrocytów owcy. Jak wynika z tabeli 4, zarówno Biostymina®, jak i obie frakcje polisacharydowe FI i FII istotnie statystycznie zwiększają liczbę splenocytów zdolnych do przyłączania erytrocytów owcy, we wszystkich zastosowanych dawkach. Izoprynozyina tylko w stężeniu 1,0 i 1,5 mg/ml zwiększała liczbę splenocytów zdolnych do tworzenia rozet E.

Dyskusja

Produkt leczniczy Biostymina® – *Aloe arborescens folii recentis extractum fluidum*, płyn doustny – jest stosowany w leczeniu jako immunostymulator od lat 50. ubiegłego wieku. Zgodnie z treścią ulotki informacyjnej dla pacjenta, wskazaniem do stosowania są:

- zakażenia górnych dróg oddechowych o podłożu bakteryjnym i wirusowym,
- pomocniczo w nawracających zakażeniach górnych dróg oddechowych i innych, rozpoznanych przez lekarza, stanach obniżonej odporności.

Stymulacja układu odpornościowego przez Biostyminę® została potwierdzona w licznych pracach i sprawdza się w terapii zakażeń górnych dróg oddechowych (2, 11, 14, 15). Główną przyczyną zakażeń górnych dróg oddechowych są najczęściej wirusy: rinowirusy, adenowirusy, koronawirusy, wirusy grypy i paragrypy. Szereg prac z ostatnich lat potwierdza przeciwwirusowe działanie produktów zawierających wodny wyciąg z liści aloesu drzewiastego, w tym produktów obecnych na naszym rynku: Biostyminy® i Bioaronu C (2, 11, 22-24).

Sugeruje się, że substancjami odpowiedzialnymi za działanie przeciwwirusowe są między innymi związki

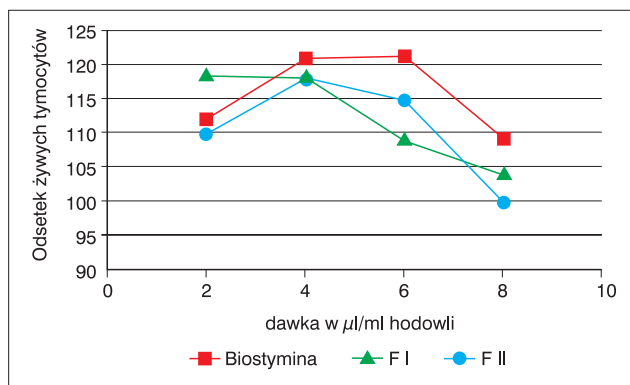
z grupy nieśluzowych polisacharydów: acemannan, β -mannan, glukomannan, arabinogalaktan i inne. Yagi i wsp. (25) w latach 70. wyizolowali z miazgi liści aloesu drzewiastego częściowo zacetylowany beta-D-mannan o masie cząsteczkowej około 15 kDa i uznali, że jest to główny związek odpowiedzialny za działanie immunostymulujące. Ta sama grupa badaczy kilka lat później wyizolowała z aloesu drzewiastego 3 polisacharydy: A, B i C i określiła ich strukturę (13). Po hydrolizie, z polisacharydów A i C uzyskano D-glukozę i D-mannozę, a po hydrolizie polisacharydu B – arabinozę i galaktozę w stosunku 1,5:1.

Qiu i wsp. (26) wyizolowali z aloesu polisacharyd o masie cząsteczkowej około 80 kDa, który składał się głównie ze zacetylowanej mannozy, galaktozy i glukozy w stosunku 40:1,4:1,0. Im i wsp. (27) oceniając działanie immunostymulujące polisacharydów uzyskanych z gatunku *Aloe*, na podstawie produkcji cytokin, uwalniania NO, aktywacji makrofagów i aktywności fagocytarnej doszli do wniosku, że najsilniej działają polisacharydy o masie cząsteczkowej pomiędzy 400 i 5 kDa. Wymienione prace potwierdzają różnorodność składu substancji czynnych w aloesach, w tym frakcji polisacharydowych, w zależności od gatunku i miejsca uprawy.

Frakcje polisacharydowe wyizolowane z produktu leczniczego Biostymina® cechuje stosunkowo niska masa cząsteczkowa: 8 i 0,8 kDa. Obie frakcje przyspieszają jednak dojrzewanie tymocytów i zwiększają zdolność splenocytów do tworzenia rozet E, co świadczy o ich aktywności immunostymulującej, chociaż każda z frakcji działa optymalnie w trochę innym zakresie dawek. Na rycinie 2 wyraźnie widać, że obie frakcje FI i FII słabiej przyspieszają dojrzewanie tymocytów i nabywanie przez nie kompetencji immunologicznych niż produkt, z którego zostały wyizolowane. Wydaje się, że działanie immunostymulujące Biostyminy® nie zależy wyłącznie od tych dwóch frakcji polisacharydowych, ale także od całego kompleksu związków zawartych w wyciągu wodnym.

Tabela 4. Test tworzenia rozet w obecności badanych immunostymulatorów.

Badane immunostymulatory	Dawki: Biostymina®, FI, FII (μ l/1 ml hodowli)/izoprynozyina (mg/1 ml hodowli)		
	2 μ l/1,0 mg	4 μ l/1,5 mg	6 μ l/2,0 mg
Biostymina	173,4 \pm 14,49 n = 9	124,5 \pm 13,65 n = 6	155,0 \pm 11,21 n = 9
FI	156,3 \pm 37,00 n = 9	170,8 \pm 26,45 n = 9	118,1 \pm 13,06 n = 10
FII	146,9 \pm 13,99 n = 10	144,4 \pm 10,79 n = 9	159,0 \pm 13,01 n = 10
Izoprynozyina	140,4 \pm 9,67 n = 10	133,9 \pm 10,65 n = 9	95,1 \pm 5,97 n = 11



Ryc. 2. Wpływ Biostyminy® oraz frakcji polisacharydowych FI i FII na przeżywalność tymocytów.

Wnioski

1. Na podstawie uzyskanych wyników można sądzić, że nie jest celowa izolacja frakcji polisacharydowych na skalę przemysłową z produktu leczniczego Biostymina®, zwłaszcza w niskim zakresie mas cząsteczkowych.
2. Nie stwierdzono silniejszej aktywności immunostymulującej frakcji polisacharydowych FI i FII w porównaniu z produktem macierzystym, tj. Biostymina®.

Piśmiennictwo

1. Anuszewska E. Aloes drzewiasty (*Aloe arborescens* Miller) – ponadczasowa roślina lecznicza. *Czas Apt* 2014; 21(244):43-51. 2. Bastian P, Fal AM, Jambor J i wsp. Candelabra Aloe (*Aloe arborescens*) in the therapy and prophylaxis of upper respiratory tract infections: traditional use and recent research results. *Wien Med Wochenschr* 2013; 163(3-4):73-9. 3. Basta P, Pilaczyńska-Szczęśniak Ł, Woitas-Ślubowska D i wsp. Influence of *Aloe arborescens* Mill. extract on selected parameters of pro-oxidant-antioxidant equilibrium and cytokine synthesis in rowers. *Int J Sport Nutr Metab* 2013; 23(4):388-98. 4. Beppu H, Shimpo K, Chihara T i wsp. Antidiabetic effects of dietary administration of *Aloe arborescens* Miller components on multiple low-dose streptozocin-induced diabetes in mice investigation on hypoglycemic action and systemic absorption dynamics aloe components. *J Ethnopharmacol* 2006; 103(3):468-77. 5. Furukawa F, Nishikawa A, Chihara T i wsp. Chemopreventive effects of *Aloe arborescens* on N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine-induced pancreatic carcinogenesis in hamsters. *Cancer Lett* 2002; 178(2):117-22. 6. Lissoni P, Rovelli F, Brivio F i wsp. A randomized study of chemotherapy versus biochemotherapy with chemotherapy plus *Aloe arborescens* in patients with metastatic cancer. *In Vivo* 2009; 23(1):171-5. 7. Gutterman Y, Chauser-Volfson E. The distribution of the phe-

nolic metabolites barbaloin, aloeresin and aloenin as a peripheral defense strategy in the succulent leaf parts of *Aloe arborescens*. *Biochem Syst Ecol* 2000; 28(9):825-38. 8. Cooposamy RM, Naidoo KK. A comparative study of three *Aloe* species used to treat skin diseases in South African rural communities. *J Altern Complement Med* 2013; 19(5):425-8. 9. Shimpo K, Ida C, Chihara T i wsp. *Aloe arborescens* extract inhibits TPA-induced ear oedema, putrescine increase and tumour promotion in mouse skin. *Phytother Res* 2002; 16(5):491-3. 10. Gutterman Y, Chauser-Volfson E. The content of secondary phenol metabolites in pruned leaves of *Aloe arborescens*, a comparison between two methods: leaf exudants and leaf water extract. *J Nat Med* 2008; 62(4):430-5. 11. Roge A, Kość A, Warwas M. Przydatność w leczeniu i mechanizmy działania aloesu – współczesne poglądy. *Farm Pol* 2000; 56(8):381-5. 12. Jia Y, Zhao G, Jia J. Preliminary evaluation: The effects of *Aloe ferox* Miller and *Aloe arborescens* Miller on wound healing. *J Ethnopharmacol* 2008; 120(2):181-9. 13. Yagi A, Nishimura H, Shid T i wsp. Structure determination of polysaccharides in *Aloe arborescens* var. *natalensis*. *Planta Med* 1986; 52(3):213-8. 14. Białas-Chromiec B, Skopińska-Różewska E, Strzelecka H i wsp. Immunomodulujące właściwości Biostyminy – wodnego wyciągu z liści roślin trzyletnich *Aloe arborescens* Mill. *Onkol Pol* 2000; 3(2):85-9. 15. Drozd J, Anuszewska E. Działanie immunostymulujące wodnego wyciągu z liści aloesu drzewiastego (*Aloe arborescens* Mill.). *Post Fitoter* 2014; 1:16-20. 16. Adler FL. Studies on mouse antibodies. I. The response to sheep red cells. *J Immunol* 1965; 95:26-38. 17. Sawicka T, Prosińska J, Drozd J. Wpływ wybranych kwasów porostowych na odpowiedź komórkową i humoralną układu immunologicznego myszy. *Biul Inst Lek* 1997; 41(1):17-24. 18. Trainin N, Levo Y, Rotter V. Resistance to hydrocortisone conferred upon thymocytes by a thymic humoral factor. *J Immunol* 1974; 4:634-7. 19. Ahmed SA, Sriranga N. Differential effects of dexamethasone on the thymus and spleen: alteration programmed cell death, lymphocyte subsets and activation of T cells. *Immunopharmacol* 1994; 28:55-66. 20. Kucharska E. Wpływ Biostyminy na niektóre procesy immunologiczne. *Ann Acad Med Stetin* 1996; 26:369-86. 21. Bach JG, Dardenne M. Antigen recognition by T lymphocytes. *Cell Immunol* 1972; 3(1):1-21. 22. Glatthaar-Saalmüller B, Michalak A, Bastian P i wsp. Ocena aktywności przeciwwirusowej *in vitro* preparatów Biostymina i Bioaron C względem ludzkiego rinowirusa (HRV14). *Post Fitoter* 2012; 3:156-61. 23. Schönknecht K, Conrad F, Sievers H i wsp. Anti-viral activity of Biostymina (*Aloe arborescens folii recentis extractum fluidum*) against viruses causing upper respiratory tract infection tested *in vitro*. *Post Fitoter* 2014; 3:127-35. 24. Leung MY, Liu C, Koon JC i wsp. Polysaccharide biological response modifiers. *Immunol Lett* 2006; 105(2):101-14. 25. Yagi A, Makino K, Nishioka I i wsp. *Aloe* mannan, a polysaccharide from *Aloe arborescens* var. *natalensis*. *Planta Med* 1977; 31:17-20. 26. Qiu Z, Jones K, Wylie M i wsp. Modified *Aloe barbadensis* polysaccharide with immunoregulatory activity. *Planta Med* 2000; 66(2):152-6. 27. Im SA, Oh ST, Song S i wsp. Identification of optimal molecular size of modified *Aloe* polysaccharides with maximum immunomodulatory activity. *Int Immunopharmacol* 2005; 5(2):271-9.

otrzymano/received: 10.04.2015
zaakceptowano/accepted: 28.04.2015

Adres/address:
*prof. dr hab. n. farm. Elżbieta Anuszewska
Zakład Biochemii i Biofarmaceutyków
Narodowy Instytut Leków
ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa
tel./fax +48 (22) 841-54-31
e-mail: e.anuszewska@nil.gov.pl