



Maria Vadalà^{1,2}, Carmen Laurino^{1,2}, Beniamino Palmieri^{1,2}

Il possibile ruolo nutraceutico degli alchilgliceroli, squalene e cartilagine di squalo in Oncologia

Riassunto

La capacità degli squali di resistere alle infezioni e la bassa incidenza dei tumori riscontrata in queste specie marine suggerisce la presenza di specifici composti anti-tumoralmente estratti dai loro tessuti, quali alchilgliceroli, estratti dal fegato, squalene, estratto dal mesenchima e dalla cute, e cartilagine, estratta dallo scheletro. Gli alchilgliceroli, altamente concentrati nell'olio di fegato di squalo, hanno un'azione anti-tumorale, stimolano l'ematopoiesi e l'immuno-modulazione. Lo squalene è anch'esso un agente antitumorale, nonché antiossidante, detossificante, con azione emolliente, lenitiva, seboestitutiva e protettiva della cute. La cartilagine, con azione anti-infiammatoria, è comunemente utilizzata nella medicina tradizionale per il trattamento di artrite, osteoartrite, retinopatia diabetica e psoriasi.

Abstract

The possible nutraceutical role of alkylglycerols, squalene and shark cartilage in Oncology. The capability of sharks to resist infections and the low incidence of tumours found in various species of these fish (e.g., spiny dogfish shark, tiger shark etc.) suggests the presence of active compounds within their tissues, possessing anticancer properties, such as alkylglycerols (from the shark liver), squalene (from the shark mesenchyme and skin), and cartilage (from the shark skeleton). The alkylglycerols, which are highly concentrated in shark liver oil, have several biological activities: stimulation of haematopoiesis, immune-modulation and anti-tumour effects. Squalene is an anticancer, antioxidant, detoxifier, skin hydrating, drug carrier and emollient agent. The cartilage has anti-inflammatory properties, commonly used in folk medicine for the treatment of arthritis, osteoarthritis, diabetic retinopathy and psoriasis.

Parole chiave: Alchilgliceroli, olio di fegato di squalo, squalene, cartilagine di squalo, oncologia.

Key words: Alkylglycerols, shark liver oil, squalene, shark cartilage, oncology.

¹ Dipartimento Chirurgico, Medico, Odontoiatrico e di Scienze Morfologiche con Interesse Trapiantologico, Oncologico e di Medicina Rigenerativa, Università di Modena e Reggio Emilia, Via del Pozzo 71, 41124 Modena; e-mail: mary.vadala@gmail.com.

² Network del Secondo Parere, Modena.

1. Introduzione

I condritti o condroitti (*Chondrichthyes*), noti anche come pesci cartilaginei, rappresentano ad oggi una classe di oltre 1100 specie diverse tra cui gli squali, le razze (inclusi nella sottoclasse degli Elasmobranchi) e le chimere (sottoclasse degli Holocephali). La loro principale caratteristica è un endoscheletro cartilagineo privo di osteoblasti, deputati alla produzione di matrice ossea.

Bartfai *et al.* (2000) hanno esaminato gli effetti genotossici degli oli di tre specie di squali mediterranei: due squali bentonici, il centroforo (*Centrophorus granulosus*) e il boccanera (*Galeus melastomus*), e una specie pelagica, la verdesca (*Prionace glauca*), attraverso il test *in vitro* del micronucleo. Un test di mutagenesi che determina simultaneamente l'induzione di micronuclei da parte di agenti clastogeni (quali la mitomicina C e la bleomicina) che inducono un incremento della frequenza dei micronuclei rispetto alla frequenza considerata normale per la specie utilizzata e da parte di agenti aneuploidizzanti (quali colchicina, dietilstilbestrolo, etoposide, griseofulvina) che aumentano il numero delle cellule multinucleate (Bartfai *et al.*, 2000). Il test del micronucleo è pertanto un indicatore del danno genomico nelle cellule: l'accumulo di mutazioni genetiche causa instabilità genomica che può portare allo sviluppo del cancro. Le frequenze dei micronuclei, oltre alle frequenze di aberrazioni cromosomiche come *endpoints* citogenetici, evidenziano il legame tra i cambiamenti cromosomici e il rischio di cancro (Rosen & Woodhead, 1980; Mounetou *et al.*, 2001).

L'incubazione di cellule umane con olio di fegato di *Centrophorus granulosus* incrementa il tasso di produzione di cellule micronucleate/binucleate in modo dose-dipendente. Risultati simili sono stati ottenuti con altri estratti di olio di fegato di squalo con rischio genotossico e cancerogeno.

L'effetto antiproliferativo degli alchilgliceroli (AKGs) è stato approfondito in linee cellulari del carcinoma umano ovarico (OVP-10), carcinoma mammario (MCF-7) e del cancro prostatico (DU-145, PC-3 e PCa-2b) (Ladreyt, 1922). Tali cellule sono state esposte a Ecomer® (*American Nutraceuticals Corp.*, Florida, USA), un olio di fegato di squalo disponibile in commercio contenente il 20% di alchilgliceroli e il 3% di metossiderivati in una dose pari a 0,1 mg/ml, a una concentrazione corrispondente a LD-50.

I risultati hanno mostrato un aumento in percentuale delle cellule apoptotiche di carcinoma ovarico (24,9±12,2) e prostatico DU-145 (18,0±1,4), mentre le cellule MCF-7 mostravano una predominanza di cellule necrotiche (20,8±6,4) dopo l'esposizione a Ecomer®. Le cellule OVP-10 hanno mostrato una minima sensibilità, le cellule MCF-7 una sensibilità moderata, mentre le linee cellulari del cancro prostatico hanno mostrato un'elevata sensibilità a Ecomer®. Gli effetti antiproliferativi di Ecomer® potrebbero essere sia cito-

statici sia citotossici. Le cellule OVP-10 sviluppano infatti piccole colonie e mostrano un'elevata percentuale di cellule apoptotiche, supportando l'ipotesi citostatica e apoptotica allo stesso tempo. Le restanti linee cellulari mostrano principalmente un effetto citotossico. È stato osservato un effetto di apoptosi/necrosi indotto da Ecomer® nelle linee cellulari di cancro alla prostata e in quelle di carcinoma mammario. Tuttavia non è stato osservato alcun effetto per le cellule di cancro ovarico. Tale effetto potrebbe essere causato dalla diversa affinità di legame degli AKGs alla membrana cellulare delle diverse cellule neoplastiche (Martin & Palumbi, 1993).

Diversi studi hanno mostrato che gli acidi grassi polinsaturi, definiti anche acidi grassi polienoici, con più di un doppio legame C-C all'interno della molecola e conformazione *cis* o *trans* a seconda della geometria conformazionale della molecola, tra cui gli Omega-3 e gli Omega-6, svolgono un'azione anti-tumorale, anti-infiammatoria e anti-proliferativa (Cantrill *et al.*, 1986; Girao *et al.*, 1986; Van der Merwe *et al.*, 1987; Davidson *et al.*, 1991; Giangregorio, 1992).

Gli integratori a base di acidi grassi Omega-3 inibiscono infatti la progressione degli stadi di carcinogenesi, aumentando l'efficacia di vari farmaci anti-tumorali, chemioterapici e radioterapici.

Gli Omega-6, invece, hanno un ruolo negativo in oncologia, in quanto hanno sia effetti anti- che pro-infiammatori, stimolano la proliferazione di alcuni tipi cellulari e aumentano l'incidenza di alcuni tipi di cancro, in particolare mammario (Larsson *et al.*, 2004).

La maggior parte dell'olio di fegato di squalo (*shark liver oil*, SLO) contiene una serie di classi di lipidi che includono AKGs, triacilgliceroli, squalene e acidi grassi principalmente acidi grassi polinsaturi Omega-3, ma anche acidi grassi saturi, monoinsaturi e polinsaturi Omega-6, la cui composizione dipende da una serie di fattori quali la specie di squalo, le relative dimensioni, il sesso, il tipo di alimentazione, la capacità di nuoto, il livello riproduttivo, nonché le condizioni climatiche (Solomon *et al.*, 1997; Wetherbee & Nichols, 2000; Navarro-Garcia *et al.*, 2000).

Gli effetti antiproliferativi dello SLO di diverse specie di squali dell'Oceano Indiano (*Carcharhinus obscurus*, *Carcharhinus brevipinna*, *Carcharias taurus*, *Carcharodon carcharias*) sono stati esaminati *in vitro* su fibroblasti murini NIH3T3, fibroblasti diploidi di polmone umano derivati da feto (MRC5), cellule di adenocarcinoma del colon umano (Caco2), di mieloma murino (P3X63.Ag8.653), nonché linee cellulari normali utilizzate come controllo (Davidson *et al.*, 2007). I risultati non sono stati significativi, considerato che diverse concentrazioni di SLO (0, 40, 80, 120, 160 e 200 mg di olio/litro di terreno di coltura) non hanno arrestato la crescita della maggior parte delle linee cellulari tumorali né delle linee cellulari normali. Sono tuttavia necessari ulteriori studi

per confermare quest'ipotesi, considerato il profilo lipidico altamente complesso dell'olio di squalo.

Lo scopo di questa rassegna è quello di descrivere gli studi sperimentali (*in vitro* e *in vivo*) e clinici, pubblicati tra il 1962 ed il 2014, sull'utilizzo di AKGs e dei loro derivati per il trattamento del cancro.

La ricerca bibliografica è stata condotta su Pubmed/Medline, Embase Web of Science e Scopus, digitando le seguenti parole chiave "AKGs", "cancro", "squalene", "cartilagine di squalo", "anticorpi anti-squalene", "cancro al seno", "HCC carcinoma", "chemioterapia", "radioterapia".

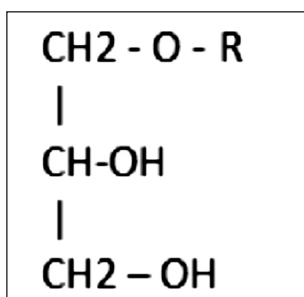


Fig. 1 – Struttura chimica degli AKGs. Gli AKGs sono lipidi glicerolo-etero, composti da una catena di glicerolo attaccata con un legame etero a un gruppo alchilico. I principali AKGs sono: chimile (esadecile), batile (ottadecile) e selachile (ottadecenile) alcool (Hallgren, 1962). Gli AKGs si trovano, anche se in piccole quantità, nelle cellule degli organi emopoietici (es. midollo osseo, milza, fegato), nei tessuti linfatici e nel sangue, nonché nel colostro bovino e nel latte materno e, in elevate quantità, nell'olio di fegato dello squalo della Groenlandia, del pescecane grigio e del pesce ratto (Sasaki et al., 1998). Uno studio sperimentale ha mostrato che il latte umano contiene AKGs in quantità 10 volte superiore al latte di mucca (Hallgren et al., 1974).

2. Effetti antitumorali degli AKGs

Il primo studio sugli effetti anti-tumorali degli AKGs è stato effettuato da Pedrono *et al.*, (2004), i quali hanno innestato, per via intramuscolare, un modello di carcinoma polmonare di Lewis (3LL), in 10 topi C57B176, suddivisi in due gruppi e trattati rispettivamente per via orale, con olio di oliva (controllo) e con AKGs (100 mg/die per topo per 10 gg). Alla fine del trattamento, sono stati identificati 3 tipi di AKGs (18:1, 14:0 e 16:1, con un evidente assenza di 16:0), dimostrando quindi l'efficacia del trattamento nel ridurre significativamente la crescita del cancro e il numero delle metastasi polmonari. Il possibile meccanismo d'azione di tale effetto potrebbe essere la riduzione della neovascolarizzazione del tumore, nonché un'attività anti-neoangiogenetica, con conseguente riduzione degli stimolatori di angiogenesi, del fattore di crescita dei fibroblasti (FGF), nella proliferazione delle cellule endoteliali (Skopinska-Rozewska *et al.*, 1999; Presta *et al.*, 2005).

Ipotesi confermata anche da un ulteriore studio sperimentale, in cui sono stati sintetizzati 6 costituenti naturali degli AKGs (AKG 12:0=1-*O*-Dodecil-*sn*-glicerolo, AKG 14:0=1-*O*-Tetradecil-*sn*-glicerolo, AKG 16:0=1-*O*-Esadecil-*sn*-glicerolo, AKG 18:0=1-*O*-Ottadecil-*sn*-glicerolo, AKG 16:1=1-*O*-(*Z*)-90-Esadecenil-*sn*-glicerolo, AKG 18:1=1-*O*-(*Z*)-90-Ottadecenil-*sn*-glicerolo) e successivamente comparati con i risultati descritti nello studio precedente (Deniau *et al.*, 2011). È stata evidenziata un'efficacia dei composti AKG 16:1 e 18:1 sulla riduzione della crescita del cancro e del numero di metastasi polmonari, al contrario del composto AKG 18:0 che non ha mostrato alcun effetto anti-tumorale. Per comprendere al meglio i vari meccanismi d'azione coinvolti nell'arresto della crescita tumorale, Iagher *et al.* (2013) hanno somministrato a 27 ratti bianchi di ceppo Wistar, suddivisi in 3 gruppi (9 ratti/cadauno), SLO (1 g/kg peso corporeo), olio di pesce (FO) (1 g/kg peso corporeo), SLO + FO (1g/kg peso corporeo), rispettivamente per 8 settimane. Dopo tale trattamento, cellule tumorali Walker (3×10^7) sono state inoculate per via sottocutanea nei suddetti ratti, alimentati con gli stessi composti per altre due settimane. I saggi biochimici e molecolari (glucosio sierico, test del lattato e del triacilglicerolo, HPLC, annessina V-FITC) hanno mostrato che solo l'integrazione di SLO riduceva la crescita tumorale (40%), un effetto correlato all'aumento della perossidazione lipidica, dell'apoptosi, e della riduzione della capacità proliferativa delle cellule cancerogene (35%). È ipotizzabile quindi che l'esposizione prolungata allo SLO aumenti la produzione di nitrito da parte dei macrofagi peritoneali; quest'ultima determina la produzione di monossido di azoto (NO), che potrebbe contribuire alla riduzione della crescita tumorale dei ratti trattati con SLO. Non è stata osservata una significativa variazione ($p > 0,05$) dei valori di glicemia, triacilglicerolemia, acido lattico e glicogeno epatico nei gruppi non affetti dal cancro, al contrario dei ratti affetti da tumore che hanno mostrato una riduzione di tali valori che caratterizzano lo stato di cachessia neoplastica (anoressia, astenia, infiammazione cronica, anemia, perdita di peso, alterazione del metabolismo proteico, lipidico e glucidico). Gli effetti riscontrati nei topi nutriti con FO-SLO e in quelli nutriti solo con FO erano molto simili, probabilmente dovuto a una competizione nella membrana cellulare tra acidi grassi polinsaturi Omega-3 (PUFA n-3) e AKGs.

Gli indicatori metabolici in grado di ridurre la crescita tumorale sono stati approfonditi in uno studio sperimentale in cui è stato somministrato olio di cocco, principalmente composto da acidi grassi saturi, o FO (1 g/kg di peso corporeo/die), a ratti Wistar prima dell'inoculazione sottocutanea di cellule tumorali Walker 256 (2×10^7) (Tisdale, 1999). Nel gruppo trattato con FO, la crescita tumorale è diminuita del 60% con conseguente riduzione a livelli normali del lattato sierico, glucosio sierico e glicogeno epatico. Anche in questo caso, la riduzione della crescita tumorale potrebbe essere dovuta ad

un'alterazione nella perossidazione lipidica e/o alla produzione di eicosanoidi (prostaglandine).

Possiamo dunque dedurre che la somministrazione di FO potrebbe ridurre la cachessia alterando la produzione di mediatori dell'infiammazione che ne causano la patologia (Tisdale, 1999), nonché i livelli di acido arachidonico nei fosfolipidi di membrana (Caldere *et al.*, 1998), con conseguente riduzione della produzione di prostaglandine E2 (PGE2) e relativi eicosanoidi (Connolly *et al.*, 1997; Tapiero *et al.*, 2002).

Saranno tuttavia necessari ulteriori studi per analizzare gli effetti anti-tumorali ed anti-cachessia degli integratori a base di olio di pesce.

3. Effetti antitumorali degli AKGs, mediati dalla risposta immunitaria

Un primo studio *in vivo/vitro* sul ruolo degli AKGs e delle cellule non aderenti B e T nell'attivazione dei macrofagi per ingestione è stato effettuato da Yamamoto *et al.* (1988). La somministrazione, per via intraperitoneale, di AKGs (10-100 ng), quali dodeciliglicerolo (DDG) e *sn*-3-ottadeciliglicerolo (alcol batile o BTA), ai topi BALB/c stimola l'attivazione dei macrofagi per attività di ingestione Fc-mediata al 5° dopo il trattamento. Bassi dosaggi di DDG (5ng/topo) e BTA hanno mostrato la maggiore efficacia nell'attivazione dei macrofagi (Yamamoto *et al.*, 1987). Non sono stati osservati effetti collaterali negli animali alimentati con diverse dosi di DDG e BTA (Weber, 1985; Mangold, 1972).

Nello studio *in vitro*, inoltre cellule peritoneali coltivate *in vitro* con basse concentrazioni (50 ng/ml) di DDG, hanno attivato i macrofagi in 2-3 ore, suggerendo che un trattamento dei linfociti B con DDG aumenti la capacità di ingestione dei macrofagi (Yamamoto *et al.*, 1988).

Globuli rossi di pecora [(sRBCs) 1×10^8] sono stati iniettati per via sottocutanea in 35 topi BALB/c, suddivisi in 6 gruppi: 5 dei quali alimentati, per via intraperitoneale, con concentrazioni progressive (50, 10, 5, 2,5 e 0,1 mg/kg/die) di SLO per 5 giorni, ed il gruppo di controllo trattato con soluzione fisiologica (Tyrode) e olio di girasole nello stesso volume e allo stesso tempo dei gruppi SLO (Yamamoto *et al.*, 1987). Sono stati rilevati significativi cambiamenti nella risposta immunitaria e nella crescita tumorale dei gruppi trattati con SLO, con conseguente aumento dei linfociti T-CD8 e riduzione dei linfociti T-CD4.

Il possibile beneficio di elevati dosi di prodotti contenenti olio di pesce per la profilassi e il trattamento delle malattie in pazienti immuno-depressi richiede tuttavia ulteriori indagini.

4. Effetto protettivo degli AKGs in pazienti sottoposti a radioterapia

Gli AKGs, localizzati nella mucosa intestinale e nei principali organi dei ratti (fegato, reni, polmoni), sono classificati dal punto di vista strutturale anche come 1-alchil-2-acil-fosfolipidi: 1-*O*-alchil-2-acil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina e 1-*O*-esadecil-2-acetil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (Mangold, 1972; Weber, 1985).

Quest'ultimo è un precursore per la biosintesi del fattore attivante le piastrine (PAF, *Platelet-Activating Factor*), un mediatore coinvolto nella fisiologia umana (es. *shock* settico, asma e allergia) e in attività biologiche (funzioni neuronali, circolazione, infiammazione, riproduzione e sviluppo fetale) (Braquet *et al.*, 1987; Venable *et al.*, 1993; Hajimoradi *et al.*, 2009).

Il PAF, derivato dal plasmalogeno (un fosfolipide etere con la colina come testa polare) lega in posizione C-1 del glicerolo una lunga catena idrocarburica mediante un legame etere.

Si forma un composto intermedio, il precursore del PAF, il Liso-PAF, utilizzato come substrato da un'acetiltransferasi che trasferisce un gruppo acetilico in posizione 2 formando il PAF, presente nel plasma dei conigli sottoposti a shock anafilattico (Ito *et al.*, 1984), nei ratti (Caramelo *et al.*, 1984; Croft *et al.*, 1986) e nel sangue umano (Caramelo *et al.*, 1984; Grandel *et al.*, 1985). Oltre ad attivare le piastrine, il PAF è un potente agonista per l'attivazione dei leucociti polimorfonucleati (O'Flaherty *et al.*, 1981) e dei monociti (Yasaka *et al.*, 1982). I

PAF stimola la secrezione di vasocostrittori (serotonina) (Kenzora *et al.*, 1984) e la glicogenolisi (Buxton *et al.*, 1986). Il PAF è sintetizzato da diverse cellule (piastrine, cellule endoteliali, neutrofili, monociti e macrofagi) secondo due percorsi diversi: de novo percorso e il rimodellamento: questo ultimo è il percorso più comune in varie risposte infiammatorie ed allergiche: la fosfolipasi A2 (PLA2) specifica per l'acido arachidonico, idrolizza l'arachidonato dal 1-*O*-alchil-2-arachidonoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina, producendo Liso-PAF e acido arachidonico libero. Liso-PAF è acetilato dall'Acetil Coenzima A (acetiltransferasi) per produrre PAF. Nel percorso de novo, 1-*O*-alchil-*sn*-glicero-3-fosfato è acetilato dal 1-*O*-alchil-*sn*-glicero-3 fosfato (acetiltransferasi).

Successivamente l'1-*O*-Alchil-2-acetil-*sn*-glicero-3-fosfoidrolasi, produce 1-*O*-alchil-2-acetil-*sn*-glicerolo che viene convertito in PAF dalla didioitolo-colina fosfotransferasi (Fig. 2).

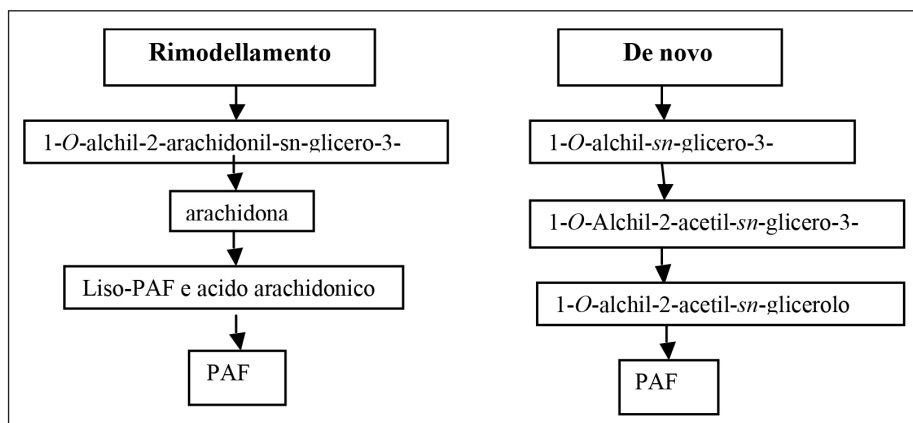


Fig. 2 – Biosintesi di PAF (Platelet-Activating Factor).

La degradazione del PAF, invece, avviene attraverso l'idrolisi del residuo acetilico in posizione *sn*-2 (Venable *et al.*, 1993). Reazione catalizzata da una specifica fosfolipasi, PAF-acetilidrolasi (PAF-AH). Questo enzima, associato alle lipoproteine a bassa densità (LDL), conosciuto anche come LDL-PLA₂, propaga l'infiammazione attraverso la liberazione di prodotti pro-infiammatori agendo sui fosfolipidi di membrana ed è pertanto del tutto plausibile che esso possa svolgere un ruolo nella genesi e nella progressione dell'aterosclerosi (Stafforini *et al.*, 1987; Heery *et al.*, 1995; Tselepis *et al.*, 2001).

In uno studio *cross-sectional* (od osservazionale trasversale), è stata analizzata la correlazione tra l'attività della PAF-AH plasmatica e i differenti marcatori dell'infiammazione (es. reattanti della fase acuta o citochine pro-infiammatorie) in 496 pazienti con malattia arteriosa-coronarica [276 pazienti affetti da angina pectoris e 220 pazienti affetti da Sindrome Coronarica Acuta (SCA)] e 477 pazienti sani come controllo (Blankenberg *et al.*, 2003). I risultati hanno evidenziato un incremento graduale ($p < 0,0001$) della PAF-AH sia nei pazienti affetti da angina pectoris sia in quelli SCA rispetto ai controlli sani. I pazienti con patologia arteriosa-coronarica, in generale, manifestano bassi valori di HDL, LDL e colesterolo totale, nonché di apolipoproteina A1 (Apo A1), trigliceridi, ed elevati livelli di marcatori dell'infiammazione, inclusa la proteina C reattiva (PCR), interleuchina-6 (IL-6), e fibrinogeno. I pazienti con tale patologia e conseguente ipertensione esibiscono anche bassi livelli di PAF-AH, un risultato ad oggi inspiegabile, probabilmente dovuto al tipo di trattamento (quali l'utilizzo di antipertensivi: ACE- inibitori) o alla riduzione del livello LDL.

La PAF-AH può essere associata a diverse sottoclassi di LDL; tuttavia, è presente in valori normali nelle lipoproteine HDL, ma è molto abbondante nelle LDL, condizione che potrebbe essere determinante per l'ipercolesterolemia

(Heery *et al.*, 1995; Tsimihodimos *et al.*, 2002; Blankenberg *et al.*, 2003). L'associazione PAF-AH e HDL, invece, è dovuta ad una glicosilazione che esclude un'alterazione dell'attività enzimatica dipendente dalla secrezione cellulare o resistenza dell'enzima alla proteasi (Tselepis *et al.*, 2001).

Ad oggi, diversi studi sia sperimentali che clinici (Caslake *et al.*, 2000; Packard *et al.*, 2000; Blake *et al.*, 2001) confermano che la PAF-AH è un marcatore di rischio o promuove direttamente l'aterosclerosi; non sono documentate invece evidenze scientifiche sul ruolo della PAF-AH associata alle HDL.

È stato ipotizzato che l'azione dell'enzima paraoxonasi (PON1) contro la perossidazione lipidica sia coadiuvata dalla PAF-AH che insieme alla PON1 agiscono a livello dei fosfolipidi ossidati idrolizzando l'acido grasso perossidato in posizione C2. Nello specifico, la PON1 idrolizza acidi grassi perossidati a catena lunga, mentre la PAF-AH sarebbe responsabile dell'idrolisi di acidi grassi a catena corta, svolgendo così un'azione protettiva contro l'aterosclerosi.

Ulteriori *trial* hanno riportato effetti benefici nel trattamento del cancro, come l'azione degli AKGs sugli effetti collaterali della radioterapia, quali leucopenia e trombocitopenia (Brohult, 1963; Brohult *et al.*, 1978; Brohult *et al.*, 1986).

Hichami *et al.* (1997) hanno analizzato gli effetti degli AKGs incorporati nei monociti umani THP-1, derivati da leucemia umana acuta, e la loro influenza sulla sintesi della PAF. Tali cellule (5×10^5 cellule/ml) sono state incubate rispettivamente per 48 h con diverse concentrazioni molari di AKGs contenenti catene idrocarburiche C18:1 (10 μ M, 24,82 mCi/mmol per 48 h e 10 μ M, 92,13 mCi/mmol per 24 h); stimulate con lo ionoforo del calcio (calcimicina) A23187 (5 Mm, 10 min) e trattate con metanolo C18:0 [14C] PAF (10 000 dpm, 55 mCi/mmol), con conseguente aggiunta di 50 μ g di PAF come *standard* interno e *carrier* per bloccare la stimolazione. Dopo 24 h di incubazione e incorporazione nei fosfolipidi, le cellule THP-1 hanno prodotto $1,85 \pm 0,54$ pmol [3H]PAF/ 2×10^6 cellule in condizioni di riposo e dopo 10 min dalla stimolazione con lo ionoforo del calcio, si osserva un aumento significativo ($p < 0,001$) del livello di PAF. I risultati hanno evidenziato, dunque, dopo 48 h una riduzione (32%) del livello di 1-O-alchil-2-acil-*sn*-glicerolo-3-fosfocolina e un aumento (15%) del 1-O-alchil-2-acil-*sn*-glicerolo-3-fosfoetanolamina associato alla radioterapia, con incremento del PAF C18:1 che rappresenta il 9,07% del PAF totale, e riduzione del PAF C16:0 all'88,3%. È ipotizzabile una conversione del 1-O-alchil-2-acil-*sn*-glicerolo-3-fosfocolina in 1-O-alchil-2-acil-*sn*-glicerolo-3-fosfoetanolamina, confermando che gli AKGs aumentano la biosintesi del PAF prodotto dalle cellule THP-1 sia in condizioni di riposo che in condizioni di stimolazione. Un ulteriore studio *in vitro/vivo* sugli effetti anti-tumorali degli AKGs in caso di radioterapia è stato approfondito da Erd-

lenbruch *et al.* (1998) i quali hanno iniettato agenti antineoplastici: 4 mg/kg di cisplatino (CDDP), 5 mg/kg di metotrexato (MTX) e di antibiotici (10 mg/kg di vancomicina e 3 mg/kg di gentamicina) nella carotide interna destra di 138 ratti Wistar maschi con tumore cerebrale, in assenza e in presenza di 1-*O*-pentilglicerolo (0,3 M). I ratti normali, hanno mostrato, in assenza di AKGs, una bassa concentrazione di ciascun farmaco nel tessuto cerebrale, senza differenze regionali tra emisfero destro, sinistro e cervelletto, e un aumento della concentrazione tissutale nell'emisfero ipsilaterale: 230 volte (MTX), 125 volte (CDDP), 15 volte (vancomicina) e 12 volte (gentamicina), rispettivamente dopo somministrazione di AKGs. Nelle cellule C6, derivate dal glioma dei ratti, l'1-*O*-pentilglicerolo aumenta la concentrazione di MTX ($p < 0,05$): 18 volte nel tumore e nella parte controlaterale del cervello, 28 volte nel cervello circostante, e 19 volte nel cervelletto, comparate con i controlli MTX in assenza di AKGs (Erdlenbruch *et al.*, 2000). Gli esami ematologici e sierologici effettuati nei ratti (misurazione del valore di sodio, potassio, calcio, glucosio, proteine totali, aminotransferasi, lattato deidrogenasi, bilirubina e creatinina) hanno confermato l'assenza di effetti collaterali degli analoghi del monoglicerolo fino a 0,3 M, suggerendo dunque la somministrazione intracarotidea di AKGs come innovativo e promettente approccio per incrementare la permeabilità cerebro-vascolare nei tessuti tumorali che in quelli normali.

5. Diverso assorbimento degli AKGs nelle cellule tumorali

Un incremento di AKGs ed una differente composizione di glicosfingolipidi costituiscono ad oggi uno dei principali fattori determinanti la composizione lipidica delle cellule cancerogene (Snyder *et al.*, 1971; Steele *et al.*, 1973).

La questione, rimasta ancora inspiegabile, è quanto differisce tale composizione nelle cellule non cancerogene, le cellule sane (Snyder, 1972). Lin *et al.* (1978) hanno comparato la concentrazione degli AKGs nelle linee cellulari HCC con la corrispondente composizione di cellule non cancerogene derivate da tessuti epatici, analizzando, mediante autopsia ed epatectomia parziale, 30 tessuti provenienti da 18 soggetti (9 casi di angioma epatico e 9 casi di epatocarcinoma). Gli esami istologici hanno mostrato una maggiore concentrazione di AKGs nei casi di epatocarcinoma rispetto ai tessuti sani, con un rapporto tra esadecil glicerolo (16:0), ottadecil glicerolo (18:0), e ottadecenil glicerolo (18:1) di 1:2:2 nel primo gruppo e di 2:1:1 nel gruppo HCC. L'elevata concentrazione degli AKGs potrebbe essere dovuta a una riduzione dell'attività di α -glicerolo fosfato deidrogenasi (NAD) nelle linee cellulari HCC (Snyder *et al.*, 1969; Soodsma *et al.*, 1970; Howard *et al.*, 1972), anche se questo non spiegherebbe la variazione della composizione lipidica osservata.

6. Effetti citotossici e citostatici degli AKGs

La citotossicità e la citostaticità degli AKGs è stata analizzata *in vitro* in linee cellulari OVP-10, MCF-7, DU-145, PC3 e Pca-2b [terreno di coltura *Minimal Essential Medium* (MEM), integrato con il 7% di siero fetale bovino (FCS) e antibiotici] (Krotkiewski *et al.*, 2003). Dopo 24 h le cellule sono state esposte all'Ecomer® (*Natumin Pharma AB*, Sandefjord, Norway): un olio di fegato di squalo (SLO) con una concentrazione standardizzata (20%) di AKGs e metossi-derivati (3%) per ulteriori 24 h e successivamente idrolizzate con tripsina per ottenere una sospensione cellulare, e sottoposte a citometria (*FACS VANTAGE Device*, Becton-Dickinson, USA). I risultati hanno evidenziato una riduzione del numero di colonie in tutte le cellule prostatiche con il minore dosaggio di Ecomer® (0,5 e 0,1 mg). Per quanto riguarda la sensibilità all'attività citotossica, questa è stata minima nelle cellule OVP-10, moderata nelle cellule MCF-7, ed elevata in tutte le linee cellulari di carcinoma prostatico. Tuttavia, le cellule OVP-10 trattate con Ecomer® hanno mostrato effetti citostatici e apoptotici con formazione di colonie ed elevata percentuale di cellule apoptotiche; a differenza delle altre linee cellulari che hanno mostrato un effetto citotossico, con conseguente morte cellulare di tipo necrotico nelle cellule MCF-7 e morte cellulare di tipo apoptotico nelle cellule prostatiche DU-145.

Il primo studio sperimentale sulla tossicità degli AKGs presenti nell'olio di fegato di squalo (11,9% esteri etilici di acidi grassi, 53,6% glicerolo alcossi non esterificato, 18,8% glicerolo alcossi monoesterificato, 6,7% triacilgliceroli, e 9,0% acidi grassi liberi) è stato invece eseguito da Anadon *et al.* (2010): 40 ratti (20 maschi e 20 femmine) sono stati divisi in 2 gruppi (20 ratti/cadauno): trattati con acqua distillata per via orale (controllo), con 100 mg/kg peso corporeo/die di AKG per via orale, rispettivamente per 28 giorni. I ratti del secondo gruppo sono stati tenuti in osservazione per altri 14 giorni per eventuali reazioni tossiche. In ciascun gruppo non è stata osservata nessuna variazione comportamentale correlata al trattamento, né cambiamenti nel peso degli organi, né manifestazioni cliniche macroscopiche, e variazioni nei parametri clinici ed ematologici.

Sono tuttavia necessari ulteriori studi sulla sicurezza degli AKGs in modelli sperimentali *in vivo* (tra cui i ratti) al fine di definire il dosaggio di AKG raccomandabile nell'uomo.

7. Squalene

Lo squalene [2,6,10,15,19,23-esametil-2,6,10,14,18,20-tetracosesaene (SQ)] è un idrocarburo triterpenico a 30 atomi di carbonio contenente 6 unità di isoprene (C₃₀H₅₀), strutturalmente simile al β-carotene. Particolarmente abbondante nell'olio di fegato di squalo, da cui prende il nome, è presente anche nell'olio d'oliva, olio di palma, olio di germe di grano, olio di crusca di riso (Kelly, 1999).

Lo squalene, e gli acidi grassi in generale presentano diversi benefici farmacologici (Bordier *et al.*, 1996), tra cui azione chemioprotettiva contro le specie reattive dell'ossigeno (ROS), proprietà anti-infiammatorie, antibatteriche, antifungine, e attività anti-tumorali (Iannitti & Palmieri, 2010).

Lo squalene ha anche un effetto adiuvante, ottenuto con un'emulsione MF59, costituita da squalene e agenti surfactanti, sviluppata da Chiron (Ott *et al.*, 2000) e nota per accelerare significativamente la risposta immunitaria a vari tipi di antigeni virali. Secondo uno studio, l'adiuvante MF59 contenente squalene, non induce la produzione di anticorpi anti-squalene (ASA) e molti adulti, hanno anticorpi circolanti contro lo squalene, indipendentemente dalla loro precedente storia di vaccinazione (Podda & Del Giudice, 2003).

Attualmente alcuni vaccini sono tuttavia privati dello squalene, in quanto ritenuto un composto "fortemente sospetto" di avere provocato la "Sindrome del Golfo". I soldati della Guerra del Golfo Persico (1990-1991), che hanno contratto la sindrome che porta questo nome, ricevettero infatti dei vaccini all'antrace che contenevano SQ, un componente non approvato dai vaccini sperimentali all'antrace e da allora collegato alle patologie croniche e autoimmuni di cui soffrono molti veterani della Guerra del Golfo.

Precedenti studi istituzionali condotti sui veterani della stessa guerra hanno confermato uno stretto legame tra il servizio prestato in guerra e l'insorgenza della sindrome (Hom *et al.*, 1997; Unwin *et al.*, 1999; Kang, 2002; Wolfe *et al.*, 2002; Dyer, 2004).

La sindrome della Guerra del Golfo, le cui origini sono sconosciute, ha colpito approssimativamente 100.000 dei 700.000 veterani americani e britannici schierati nella Guerra del Golfo, sottoposti a un vasto programma di vaccinazione, tenuto segreto dalle forze armate americane in quanto sperimentale. Una patologia caratterizzata da sintomi non specifici e variabili, che includono stanchezza, disturbi emotivi, dolori muscolari e articolari, cefalea, perdita di memoria, stress post-traumatico, febbre ricorrente, allergia (Haley *et al.*, 1997; Fukuda *et al.*, 1998). Tutti i militari con questa patologia hanno mostrato un elevato livello di anticorpi anti-squalene nel sangue, utilizzati successivamente come *marker* per le persone iniettate con questo adiuvante.

Asa *et al.* (2000) hanno approfondito il possibile ruolo degli anticorpi anti-squalene nella Sindrome della Guerra del Golfo, reclutando 152 pazienti affetti dalla patologia che lavoravano nelle forze armate statunitensi o britanniche (48 donatori sani, 40 pazienti affetti da lupus eritematoso sistemico, 34 donne con protesi mammarie al silicone, 30 pazienti affetti da sindrome da stanchezza cronica). Questi pazienti presentavano sintomi neurologici e artrite (94%), fibromialgia (94%), linfadenopatia (94%), esantema (94%), stanchezza cronica (86%), affaticamento (81%), emicrania cronica (78%) e amnesia (72%). I campioni di siero sono stati trattati con il saggio ASA, che misura il

legame dell'immunoglobulina sierica (IgG) allo squalene immobilizzato alla nitrocellulosa. I risultati hanno mostrato che i pazienti avevano risposte ASA nel *range* di intensità 1-4. Il 95% dei pazienti sintomatici è risultato positivo al test per la ricerca degli ASA nel siero.

Gli autori hanno esaminato 2 volontari per un vaccino che include lo squalene come adiuvante e hanno osservato che anche i due pazienti sviluppavano una simile malattia multisistemica. In particolare, uno dei due pazienti dopo una singola iniezione si è ammalato nel giro di qualche settimana, e ha mostrato artrite, fibromialgia, linfadenopatia, *rash*, stanchezza, cefalea ed è risultato positivo al test ASA. L'altro paziente ha mostrato segni simili e positività agli ASA (3+).

Questi dati hanno confermato che la reattività agli ASA costituisce un marcatore della patologia. Il ruolo patogenetico degli ASA è ancora poco chiaro. Il sospetto legame con questa sindrome è ipotizzabile, considerato che lo squalene, iniettato in modelli sperimentali, provoca infiammazioni e malattie autoimmuni quali lupus, sclerosi multipla, artrite (Whitehouse *et al.*, 1974; Beck *et al.*, 1976; Kohashi *et al.*, 1977; Garrett *et al.*, 1985; Yoshino & Yoshino, 1994; Lorentzen *et al.*, 1999), aumentando i livelli di interleuchina-5 (IL-5), IL-6, e interferone- γ (Valensi *et al.*, 1994).

Phillips *et al.* (2009) hanno escluso qualsiasi legame statistico significativo tra la presenza di ASA e i sintomi cronici riportati dal personale *Seabees* (genieri della *United States Navy*), militari impegnati nella costruzione e manutenzione di opere infrastrutturali della Marina in tempo di pace e di guerra e che rappresentano la maggior parte dei veterani sintomatici della Guerra del Golfo.

Statisticamente, non c'è alcuna significativa associazione ($p=0,465$) tra lo squalene e la patologia multi-sintomatica.

Lo squalene (circa il 60%) è introdotto attraverso l'olio di oliva e assorbito naturalmente dall'organismo (Strandberg *et al.*, 1990). Viene sintetizzato come precursore del colesterolo, mielina, ormoni negli epatociti e viene trasformato in colesterolo a livello del reticolo endoplasmatico (Stamellos *et al.*, 1993).

Il problema insorge quando lo squalene viene iniettato direttamente nel corpo, come avviene nel caso di vaccinazione, in questo caso il sistema immunitario non lo riconosce più come composto naturale e tende a rimuoverlo. Sono necessari dunque ulteriori studi per chiarire il ruolo degli anticorpi anti-squalene.

L'azione antiproliferativa e antiossidante dello squalene è stata evidenziata mediante uno studio *in vitro* su linee cellulari umane di carcinoma mammario MCF7 (altamente invasive, positività al recettore degli estrogeni e progesterone) e MDA-MB 231 (minimamente invasive, negatività al recettore degli estrogeni e progesterone) e in linee cellulari epiteliali mammarie normali

MCF10A (Warleta *et al.*, 2010). Queste linee cellulari sono state trattate con diverse dosi di SQ (0, 3, 6, 12, 25, 50, 100, 200, 400 μM) per 24 h. I saggi per la misura del potere antiossidante (DPPH, ABTS e ORAC) non hanno mostrato nessuna attività antiradicalica dello squalene senza nessun effetto determinante sul turnover cellulare di MCF10A, MCF7 e MDA-MB-231, fatta eccezione per un leggero ma non significativo aumento della proliferazione delle cellule MDA-MB-231. L'incubazione di queste cellule per 24 h con SQ, dunque, non ha alterato i parametri del ciclo cellulare, né ha indotto apoptosi cellulare, confermando un'azione antiossidante dello squalene soltanto sulle cellule epiteliali mammarie. La sua sensibilità antiossidante può essere dovuta a un aumento della concentrazione di glutatione (GSH) nelle cellule normali ma non in quelle di carcinoma mammarico (Das *et al.*, 2008), oppure a variazioni nell'assorbimento e nell'accumulo cellulare di SQ (Das *et al.*, 2008), o a una variazione nella regolazione della proliferazione nelle cellule normali (Klaunig *et al.*, 2004). È ipotizzabile che lo squalene riduca lo stress ossidativo nelle cellule epiteliali mammarie riducendo i livelli di ROS e proteggendo il DNA dal danno ossidativo. Potrebbe pertanto essere utile nella prevenzione del cancro al seno umano. Lo squalene potenzia l'attività citotossica e antitumorale di agenti anti-cancro, quali l'adriamicina (ADM), il 5-fluorouracile (5-FU), la bleomicina (BLM) e il cis-diclorodiamminoplatino (cDDP). Le combinazioni di questi agenti antitumorali e squalene mostrano effetti antitumorali sinergici anche nelle cellule tumorali del sarcoma 180 (S180) (Nakagawa *et al.*, 1985).

8. Cartilagine di squalo

La cartilagine di squalo (SC) è un composto con azione anti-infiammatoria utilizzato nella medicina tradizionale principalmente per il trattamento dell'artrite, osteoartrite (Solly *et al.*, 2008; Pearson *et al.*, 2007), retinopatia diabetica e psoriasi (Dupont *et al.*, 1998).

In un *trial* clinico 49 pazienti psoriasici, trattati con un'elevata dose (240-mL/die) di cartilagine di squalo, hanno mostrato una riduzione delle placche psoriasiche con effetti dose-dipendenti e una riduzione (26%) dell'indice PASI (*Psoriasis Area Severity Index*) (Goldman, 1998).

La cartilagine di squalo strutturalmente comprende proteine (quali la troponina-I), tetranectina, collagenasi, inibitori derivati dalla cartilagine (CDI), inibitori tissutali delle metalloproteinasi (TIMP), glicoproteine (sinastatina-1 e 2, galattosamina, glucosamina) e glicosaminoglicani (condroitin solfato, condroitin solfato-6, keratan solfato). Una volta estratta, viene essiccata, polverizzata e può essere miscelata con acqua o succo di frutta e successivamente somministrata per via orale o per via rettale. Alcune compagnie produttrici, per ridurre i costi, uniscono il supplemento con cartilagine bovina, nota anch'essa per la sua azione antitumorale (Seno *et al.*, 1975).

Brem & Folkman (1975), due pionieri nel campo dell'angiogenesi, hanno dimostrato che la cartilagine contiene una sostanza che, diffusa nella cornea, con precedente innesto di cellule tumorali, previene la formazione di vasi sanguigni. Un frammento di cartilagine e una piccola massa di carcinoma V2, l'uno e l'altro attigui in una cornea, sono stati impiantati in 53 ratti Wistar con dolore e infiammazione indotto da iniezione intramuscolare e sottocutanea di acido acetico e formalina. I risultati hanno evidenziato una debole attività anti-infiammatoria e una significativa attività analgesica, ipotizzando che la formazione di vasi sanguigni, che il tessuto tumorale avrebbe promosso, è stata impedito dalla presenza dell'innesto di cartilagine.

In vitro la cartilagine di squalo protegge le cellule pre-trattate con perossido d'idrogeno e agenti cancerogeni (quali sodio azide e 2-amminofluorene) dallo stress ossidativo e dalla mutagenesi (Gomes *et al.*, 1996).

La cartilagine inibisce inoltre la migrazione cellulare, produce una riduzione dose-dipendente dell'incorporazione della timidina, inibisce l'angiogenesi e blocca la collagenolisi indotta dalla collagenasi in colture di cellule endoteliali del cordone ombelicale umano (McGuire *et al.*, 1996; Sheu *et al.*, 1998).

La cartilagine ha anche un effetto anti-angiogenetico e inibisce la crescita tumorale, come nel caso del carcinoma, del sarcoma e del melanoma (Lee *et al.*, 1983; Oikawa *et al.*, 1990; Davis *et al.*, 1997).

Nel *follow-up* di 21 pazienti con tumore avanzato trattati con SC, 17 pazienti hanno ottenuto miglioramenti nella qualità di vita, nello specifico 6 hanno mostrato una riduzione del tumore e 7 pazienti con cancro alla prostata hanno riportato una riduzione del livello di antigene prostatico specifico (PSA) (Milner, 1996).

In un altro *trial* clinico condotto da Lane & Contreras (1992), 8 pazienti con tumore avanzato (stadio III e IV) resistenti ai trattamenti precedenti, e con aspettativa di vita inferiore ai 6 mesi, sono stati trattati con SC (*Cartilage Technologies Inc.* Port Chester, NY: 30 g/die) suddivisi in 2 o 3 dosi, per via orale o rettale, per 7 settimane. I risultati hanno mostrato una riduzione dell'80% del tumore dopo 11 settimane di trattamento senza tossicità significativa in 6 pazienti.

9. Potenziale tossicità della cartilagine di squalo

Alcuni studi suggeriscono che la cartilagine di squalo sia una potenziale causa di asma occupazionale (Ortega *et al.*, 2002; San-Juan *et al.*, 2004). Ortega e i suoi collaboratori hanno riportato il caso di un lavoratore di 38 anni morto di asma dopo 10 mesi di esposizione a polveri respirabili presenti nell'ambiente di lavoro. I dipendenti della ditta, durante il processo di trasformazione della cartilagine, sono stati esposti a elevate concentrazioni di polveri respirabili (0,92-5,14 mg/m³) ma non tossiche (limite: 5 mg/m³) (Ortega *et al.*,

2002). I sintomi dei lavoratori sono stati: tosse, ed episodi di dispnea durante uno sforzo fisico. Dagli esami ematologici, non è stato rilevato squilibrio immunitario o altri sintomi tossici. Nel 2004, è stato riportato il primo caso di asma occupazionale IgE-mediato indotto dalla cartilagine di squalo (San-Juan *et al.*, 2004). Un uomo di 29 anni, senza episodi di asma o disturbi respiratori, ha lavorato in un'industria produttrice di prodotti dietetici a base di composti di squalo per 7 anni. Dopo 2 anni, il paziente ha sviluppato asma, con senso di costrizione toracica, tosse e dispnea, confermando che la polvere di cartilagine è un potenziale agente in grado di indurre asma (Ortega *et al.*, 2002).

10. Conclusioni

Negli ultimi 10 anni, è stato osservato il consumo, a livello mondiale, di erbe, lievito di birra, alghe, polline e pappa reale, olio di pesce, Omega-3, integratori di acidi grassi essenziali, colostro bovino, semi di pisello, germe di grano e funghi, tra i quali shiitake (*Lentinula edodes*) e reishi (*Ganoderma lucidum*).

Nello scenario oncologico, il 56-73% dei pazienti colpiti da tumore utilizza regolarmente prodotti multivitaminici e multiminerali, e integratori a base di erbe (Burststein *et al.*, 1999; Rock, 2007; Grainger *et al.*, 2008).

Il più comune reclamo di questi estratti di erbe e prodotti botanici (quali *Echinacea*, mirtillo, ginseng, cardo mariano, *Astragalus*, tè kombucha, *Acmella oleracea*, estratto di aglio e funghi medicinali) è la stimolazione del sistema immunitario (Willems *et al.*, 1993; Swisher *et al.*, 2002; Dipti *et al.*, 2003; Clement-Kruzel *et al.*, 2008; Nantz *et al.*, 2012; Ren *et al.*, 2013).

Alcuni studi clinici confermano l'attività anti-tumorale dei prodotti naturali, tra cui il licopene, i carotenoidi, il tè verde, il resveratrolo, l'aglio (Heber 2000; Kotake-Nara *et al.*, 2001; Sueoka *et al.*, 2001; Savouret & Quesne, 2002; Thomson *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2005).

L'olio di fegato di squalo, un integratore alimentare ben noto, e gli AKGs sono nutraceutici potenzialmente utili, ampiamente prescritti e auto-prescritti nei paesi del Nord Europa, con numerosi benefici clinici in dermatologia, immunologia e oncologia. Questi composti sono generalmente molto sicuri e, anche se l'*evidence-based medicine* è piuttosto scarsa, le ricerche sperimentali biochimiche e pre-cliniche sono incoraggianti: il *follow-up* dei pazienti che si auto-prescrivono questi composti naturali, alchilgliceroli, squalene e cartilagine di squalo, potrebbe essere un possibile *step* per verificare l'efficacia del trattamento.

Bibliografia

- ANADON A., MARTINEZ M.A., ARES I., RAMOS E., SENORANS F.J., REGLERO G., TORRES C., 2010 – *Acute and repeated dose (28 days) oral safety studies of an alkoxyglycerol extract from shark liver oil in rats*. J Agric Food Chem, **58**(3), pp. 2040-2046.
- ASA P.B., WILSON R.B., GARRY R.F., 1999 – *Antibodies to squalene in Gulf War syndrome*. Exp Mol Pathol, **68**(1), pp. 55-64.
- BARTFAI E., ORSIÈRE T., DUFFAUD F., VILLANI P., POMPILI J., BOTTA A., 2000 – *Studies on the genotoxic effects of crude liver oils from 3 species of Mediterranean sharks by means of in vitro micronucleus test using human lymphocytes*. Ann Biol Clin (Paris), **58**(5), pp. 595-600.
- BECK F.W., WHITEHOUSE M.W., 1976 – *Modifications in the establishment of allergic encephalomyelitis (EAE) in rats; an improved assay for immunosuppressant drugs*. Agents Actions, **6**(4), pp. 460-467.
- BLAKE G.J., DADA N., FOX J.C., MANSON J.E., RIDKER P.M., 2001 – *A prospective evaluation of lipoprotein-associated phospholipase A(2) levels and the risk of future cardiovascular events in women*. J Am Coll Cardiol, **38**(5), pp. 1302-1306.
- BLANKENBERG S., STENGL D., RUPPRECHT H.J., BICKEL C., MEYER J., CAMBIEN F., TIRET L., NINIO E., 2003 – *Plasma PAF-acetylhydrolase in patients with coronary artery disease: results of a cross-sectional analysis*. J Lipid Res, **44**(7), pp. 1381-1386.
- BORDIER C.G., SELLIER N., FOUCAULT A.P., LE GOFFIC F., 1996 – *Purification and characterization of deep sea shark Centrophorus squamosus liver oil 1-O-alkylglycerol ether lipids*. Lipids, **31**(5), pp. 521-528.
- BRAQUET P., TOUGUI L., SHEN T.Y., VARGAFTIG B.B., 1987 – *Perspectives in platelet-activating factor research*. Pharmacol Rev, **39**(2), pp. 97-145.
- BREM H., FOLKMAN J., 1975 – *Inhibition of tumor angiogenesis mediated by cartilage*. J Exp Med, **141**(2), pp. 427-439.
- BROHULT A., 1963 – *Alkoxyglycerols and their Use in Radiation Treatment. An Experimental and Clinical Study*. Acta Radiol Ther Phys Biol, **223**, Suppl., pp. 1-99.
- BROHULT A., BROHULT J., BROHULT S., 1978 – *Regression of tumour growth after administration of alkoxyglycerols*. Acta Obstet Gynecol Scand, **57**(1), pp. 79-83.
- BROHULT A., BROHULT J., BROHULT S., JOELSSON I., 1986 – *Reduced mortality in cancer patients after administration of alkoxyglycerols*. Acta Obstet Gynecol Scand, **65**(7), pp. 779-785.
- BURSTEIN H.J., GELBER S., GUADAGNOLI E., WEEKS J.C., 1999 – *Use of alternative medicine by women with early-stage breast cancer*. N Engl J Med, **340**(22), pp. 1733-1739.
- BUXTON D.B., FISHER R.A., HANAHAN D.J., OLSON M.S., 1986 – *Platelet-activating factor-mediated vasoconstriction and glycogenolysis in the perfused rat liver*. J Biol Chem, **261**(2), pp. 644-649.
- CALDER P.C., DAVIS J., YAGOOB P., PALA H., THIES F., NEWSHOME E.A., 1998 – *Dietary fish oil suppresses human colon tumour growth in athymic mice*. Clin Sci (Lond), **94**(3), pp. 303-311.
- CANTRILL R.C., DAVIDSON B.C., KATZEFF I., BOOYENS J., 1986 – *The effects of essential fatty acid supplementation on the fatty acid composition of cancer cells in culture*. Prog Lipid Res, **25**, pp. 547-550.
- CARAMELO C., FERNÁNDEZ-GALLARDO S., MARÍN-CAO D., INARREA P., SANTOS J.C., LÓPEZ-NOVOA J.M., SANCHEZ CRESPO M., 1984 – *Presence of platelet-activating factor in blood from humans and experimental animals. Its absence in anephric individuals*. Biochem Biophys Res Commun, **120**(3), pp. 789-796.
- CASLAKE M.J., PACKARD C.J., SUCKLING K.E., HOLMES S.D., CHAMBERLAIN P., MACPHEE C.H., 2000 – *Lipoprotein-associated phospholipase A(2), platelet-activating factor acetylhydrolase: a potential new risk factor for coronary artery disease*. Atherosclerosis, **150**(2), pp. 413-419.
- CLEMENT-KRUZEL S., HWANG S.A., KRUZEL M.C., DASGUPTA A., ACTOR J.K., 2008 – *Immune modulation of macrophage pro-inflammatory response by goldenseal and Astragalus extracts*. J Med Food, **11**(3), pp. 493-498.
- CONNOLLY J.M., LIU X.H., ROSE D.P., 1997 – *Effects of dietary menhaden oil, soy, and a cyclooxygenase inhibitor on human breast cancer cell growth and metastasis in nude mice*. Nutr Cancer, **29**(1), pp. 48-54.
- CROFT K.D., STURM M.J., CODDE J.P., VANDONGEN R., BEILIN L.J., 1986 – *Dietary fish oils reduce plasma levels of platelet activating factor precursor (lyso-PAF) in rats*. Life Sci, **38**(20), pp. 1875-1882.
- DAS B., YEGER H., BARUCHEL H., FREEDMAN M.H., KOREN G., BARUCHEL S., 2003 – *In vitro cytoprotective activity of squalene on a bone marrow versus neuroblastoma model of cisplatin-induced toxicity. Implications in cancer chemotherapy*. Eur J Cancer, **39**(17), pp. 2556-2565.
- DAS B., ANTOON R., TSUCHIDA R., LOTFI S., MOROZOVA O., FARHAT W., MALKIN D., KOREN G., YEGER H.,

- BARUCHEL S., 2008 – *Squalene selectively protects mouse bone marrow progenitors against cisplatin and carboplatin-induced cytotoxicity in vivo without protecting tumor growth*. *Neoplasia*, **10**(10), pp. 1105-1119.
- DAVIDSON B.C., GIRAO L.A.F., GIANGREGORIO A., MURPHY J., 1991 – *Polyunsaturated fatty acids modulate fibroblast growth in culture*. *Anticancer Res*, **11**(1), pp. 267-272.
- DAVIDSON B.C., ROTTANBURG D., PRINZ W., CLIFF G., 2007 – *The influence of shark liver oils on normal and transformed mammalian cells in culture*. *In Vivo*, **21**(2), pp. 333-337.
- DAVIS P.F., HE Y.I., FURNEAUX R.H., JOHNSTON P.S., RUGER B.M., SLIM G.C., 1997 – *Inhibition of angiogenesis by oral ingestion of powdered shark cartilage in a rat model*. *Microvasc Res*, **54**(2), pp. 178-182.
- DENIAU A.L., MOSSET P., LE BOT D., LEGRAND A.B., 2011 – *Which alkylglycerols from shark liver oil have anti-tumour activities?* *Biochimie*, **93**(1), pp. 1-3.
- DIPTI P., YOGESH B., KAIN A.K., PAOLINE T., ANJU B., SAIRAM M., SINGH B., MONGIA S.S., KUMAR G.I., SELVAMURTHY W., 2003 – *Lead induced oxidative stress: beneficial effects of Kombucha tea*. *Biomed Environ Sci*, **16**(3), pp. 276-282.
- DUPONT E., SAVARD PE., JOURDAIN C., JUNEAU C., THIBODEAU A., ROSS N., 1998 – *Antiangiogenic properties of a novel shark cartilage extract: potential role in the treatment of psoriasis*. *J Cutan Med Surg*, **2**(3), pp. 146-152.
- DYER O., 2004 – *Inquiry finds that Gulf war veterans face extra burden of disease*. *BMJ*, **329**(7477), p. 1257.
- ERDLNBRUCH B., JENDROSSEK V., MARX M., HUNOLD A., EIBL H., LAKOMEK M., 1998 – *Antitumor effects of erucylphosphocholine on brain tumor cells in vitro and in vivo*. *Anticancer Res*, **18**(4A), pp. 2551-2557.
- ERDLNBRUCH B., JENDROSSEK V., EIBL H., LAKOMEK M., 2000 – *Transient and controllable opening of the blood-brain barrier to cytostatic and antibiotic agents by alkylglycerols in rats*. *Exp Brain Res*, **135**(3), pp. 417-422.
- FUKUDA K., NISEMBAUM R., STEWART G., THOMPSON W.W., ROBIN L., WASHKO R.M., NOAH D.L., BARRETT D.H., RANDALL B., HERWALDT B.L., MAWLE A.C., REEVES W.C., 1998 – *Chronic multisymptom illness affecting Air Force veterans of the Gulf War*. *JAMA*, **280**(11), pp. 981-988.
- GARRETT I.R., WHITEHOUSE M.W., VERNON-ROBERTS B., BROOKS P.M., 1985 – *Ambivalent properties of gold drugs in adjuvant induced polyarthritis in rats*. *J Rheumatol*, **12**(6), pp. 1079-1082.
- GIANGREGORIO A., 1992 – *The influence of fatty acids in vitro on mammalian cells from species differing in the fatty acyl desaturase capabilities*. Thesis, University of the Witwatersrand, Johannesburg, South Africa, unpublished.
- GIRAO L.A., RUCK A.C., CANTRILL R.C., DAVIDSON B.C., 1991 – *The effect of C18 fatty acids on cancer cells in culture*. *Anticancer Res*, **6**(2), pp. 241-244.
- GOLDMAN E., 1998 – *Shark cartilage extract tried as novel psoriasis treatment*. *Skin & Allergy News*, **29**, p. 14.
- GOMES E.M., SOUTO P.R., FELZENSZWAIB I., 1996 – *Shark-cartilage containing preparation protects cells against hydrogen peroxide induced damage and mutagenesis*. *Mutat Res*, **367**(4), pp. 204-208.
- GRAINGER E.M., KIM H.S., MONK J.P., LEMESHOW S.A., GONG M., BAHNSON R.R., CLINTON S.K., 2008 – *Consumption of dietary supplements and over-the-counter and prescription medications in men participating in the Prostate Cancer Prevention Trial at an academic center*. *Urol Oncol*, **26**(2), pp. 125-132.
- GRANDEL K.E., FARR R.S., WANDERER A.A., EISENSTADT T.C., WASSERMAN S.I., 1985 – *Association of platelet-activating factor with primary acquired cold urticaria*. *N Engl J Med*, **313**(7), pp. 405-409.
- HAJIMORADI M., HASSAN Z.M., POURFATHOLLAH A.A., DANESHMANDI S., PAKRAVAN N., 2009 – *The effect of shark liver oil on the tumor infiltrating lymphocytes and cytokine pattern in mice*. *J Ethnopharmacol*, **126**(3), pp. 565-570.
- HALEY R.W., KURT T.L., HOM J., 1997 – *Is there a Gulf War Syndrome? Searching for syndromes by factor analysis of symptoms*. *JAMA*, **277**(3), pp. 215-222.
- HALLGREN B., LARSSON S., 1962 – *The glycerol ethers in the liver oils of elasmobranch fish*. *Lipid Res*, **3**(1), pp. 31-38.
- HALLGREN B., NIKLASSON A., STALBERG G., THORIN H., 1974 – *On the occurrence of 1-O-alkylglycerols and 1-O-(2-methoxyalkyl)glycerols in human colostrum, human milk, cow's milk, sheep's milk, human red bone marrow, red cells, blood plasma and a uterine carcinoma*. *Acta Chem Scand B*, **28**(9), pp. 1029-1034.
- HEBER D., 2000 – *Colorful cancer prevention: alpha-carotene, lycopene, and lung cancer*. *Am J Clin Nutr*, **72**(4), pp. 901-902.

- HEERY J.M., KOZAK M., STAFFORINI D.M., JONES D.A., ZIMMERMAN G.A., MCINTYRE T.M., PRESCOTT S.M., 1995 – *Oxidatively modified LDL contains phospholipids with platelet-activating factor-like activity and stimulates the growth of smooth muscle cells*. J Clin Invest, **96**(5), pp. 2322-2330.
- HICHAMI A., DUROUDIER V., LEBRAIS V., VERNHET L., LE GOFFIC F., NINIO E., LEGRAND A., 1997 – *Modulation of platelet-activating-factor production by incorporation of naturally occurring 1-O-alkylglycerols in phospholipids of human leukemic monocyte-like THP-1 cells*. Eur J Biochem, **250**(2), pp. 242-248.
- HOM J., HALEY R.W., KURT T.L., 1997 – *Neuropsychological correlates of Gulf War syndrome*. Arch Clin Neuropsychol, **12**(6), pp. 531-544.
- HOWARD B.V., HOWARD J., 1972 – *Ether-lipids, -glycerol phosphate dehydrogenase, and growth rate in tumors and cultured cells*. Cancer Res, **32**(7), pp. 1533-1538.
- IAGHER F., DE BRITO BELO S.R., SOUZA W.M., NUNES J.R., NALIWAIKO K., 2013 – *Antitumor and anti-cachectic effects of shark liver oil and fish oil: comparison between independent or associative chronic supplementation in Walker 256 tumor-bearing rats*. Lipids Health Dis, **12**, 146 pp.
- IANNITTI T., PALMIERI B., 2010 – *An update on the therapeutic role of alkylglycerols*. Mar Drugs, **8**(8), pp. 2267-3000.
- ITO S., CAMUSSI G., TETTA C., MILGROM F., ANDRES G., 1984 – *Hyperacute renal allograft rejection in the rabbit. The role of platelet-activating factor and of cationic proteins derived from polymorphonuclear leukocytes and from platelets*. Lab Invest, **51**(2), pp. 148-161.
- KANG H.K., 2002 – *Evidence for a deployment-related Gulf War syndrome by factor analysis*. Arch Environ Health, **57**(1), pp. 61-68.
- KELLY G.S., 1999 – *Squalene and its potential clinical uses*. Altern Med Rev, **4**(1), pp. 29-36.
- KENZORA J.L., PÉREZ J.E., BERGMANN S.R., LANGE L.G., 1984 – *Effects of acetyl glyceryl ether of phosphorylcholine (platelet activating factor) on ventricular preload, afterload, and contractility in dogs*. J Clin Invest, **74**(4), pp. 1193-1203.
- KLAUNIG J.E., KAMENDULIS L.M., 2004 – *The role of oxidative stress in carcinogenesis*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, **44**, pp. 239-267.
- KOHASHI O., PEARSON M., BECK F.J., ALEXANDER M., 1977 – *Effect of oil composition on both adjuvant-induced arthritis and delayed hypersensitivity to purified protein derivative and peptidoglycans in various rat strains*. Infect Immun, **17**(2), pp. 244-249.
- KOTAKE-NARA E., KUSHIRO M., ZHANG H., SUGAWARA T., MIYASHITA K., NAGAO A., 2001 – *Carotenoids affect proliferation of human prostate cancer cells*. J Nutr, **131**(12), pp. 3303-3306.
- KROTKIEWSKI M., PRZYBYSZEWSKA M., JANIK P., 2003 – *Cytostatic and cytotoxic effects of alkylglycerols (Ecomer)*. Med Sci Monit, **9**(11), pp. 131-135.
- LADREYT F., 1922 – *Unicité évolutive et pluralité étiologique des tumeurs cancéreuses chez quelques animaux marins (Roussettes, Raies, Tortues, Siponcles). Faits et théories*. Bull Inst Oceanogr (Monaco), **414**, pp. 1-16.
- LANE I., CONTRERAS E., 1992 – *High rate of bioactivity (reduction in gross tumor size) observed in advanced cancer patients treated with shark cartilage material*. J. Naturopath. Med, **3**, pp. 86-88.
- LARSSON S.C., 2004 – *Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms*. Am J Clin Nutr, **79**(6), pp. 935-945.
- LEE A., LANGER R., 1983 – *Shark cartilage contains inhibitors of tumor angiogenesis*. Science, **221**(4616), pp. 1185-1187.
- LIN H.J., HO F.C., LEE C.L., 1978 – *Abnormal distribution of O-alkyl groups in the neutral glycerolipids from human hepatocellular carcinomas*. Cancer Res, **38**(4), pp. 946-949.
- LORENTZEN J.C., 1999 – *Identification of arthritogenic adjuvants of self and foreign origin*. Scand J Immunol, **49**(1), pp. 45-50.
- MANGOLD H.K., 1972 – *Biological effects and biomedical applications of alkoxy lipids*. Ether Lipids, pp. 158-176.
- MARTIN A.P., PALUMBI S.R., 1993 – *Protein evolution in different cellular environments: cytochrome b in sharks and mammals*. Mol Biol Evol, **10**(4), pp. 873-891.
- MC GUIRE T.R., KAZAKOFF P.W., HOIE E.B., FIENHOLD M.A., 1996 – *Antiproliferative activity of shark cartilage with and without tumor necrosis factor-alpha in human umbilical vein endothelium*. Pharmacotherapy, **16**(2), pp. 237-244.
- MILNER M., 1996 – *Follow-up of cancer patients using shark cartilage*. Alternative & Complementary Therapies, pp. 99-109.

- MOUNETOU E., LEGAULT J., LACROIX J., GAUDREAU R.C., 2001 – *Antimitotic antitumor agents: synthesis, structure-activity relationships, and biological characterization of N-aryl-N'-(2-chloroethyl) ureas as new selective alkylating agents*. J Med Chem, **44**(5), pp. 694-702.
- NAKAGAWA M., YAMAGUCHI T., FUKAWA H., OGATA J., KOMIYAMA S., AKIYAMA S., KUWANO M., 1985 – *Potential by squalene of the cytotoxicity of anticancer agents against cultured mammalian cells and murine tumor*. Jpn J Cancer Res, **76**(4), pp. 315-320.
- NANTZ M.P., ROWE C.A., MULLER C.E., CREASY R.A., STANILKA J.M., PERCIVAL S.S., 2012 – *Supplementation with aged garlic extract improves both NK and gammadelta-T cell function and reduces the severity of cold and flu symptoms: a randomized, double-blind, placebo-controlled nutrition intervention*. Clin Nutr, **31**(3), pp. 337-344.
- NAVARRO-GARCIA G., PACHECO-AGUILAR R., VALLEJO-CORDOVA B., BOLANOS A., 2000 – *Lipid composition of the liver oil of shark species from the Caribbean and Gulf of California waters*. J Food Compos Anal, **13**, pp. 791-798.
- O'FLAHERTY J.T., COUSART S., LINEBERGER A.S., BOND E., BASS D.A., 1981 – *1-O-Alkyl-sn-glyceryl-3-phosphorylcholines: a novel class of neutrophil stimulants*. Am J Pathol, **103**(1), pp. 70-78.
- OIKAWA T., OIKAWA T., ASHINO-FUSE H., SHIMAMURA M., 1990 – *A novel angiogenic inhibitor derived from Japanese shark cartilage (I). Extraction and estimation of inhibitory activities toward tumor and embryonic angiogenesis*. Cancer Lett, **51**(3), pp. 181-186.
- ORTEGA H.G., KREISS K., SCHILL D.P., WEISSMAN D.N., 2002 – *Fatal asthma from powdering shark cartilage and review of fatal occupational asthma literature*. Am J Ind Med, **42**(1), pp. 50-54.
- OTT G., RADHAKRISHNAN R., FANG J.H., HORA M., 2000 – *The adjuvant MF59: a perspective*. In: D.T. O'Hagan (ed.) "Methods in molecular medicine", vol. **42**, Vaccine adjuvants: preparation methods and research protocols, pp. 211-228.
- PACKARD C.J., O'REILLY D.S., CASLAKE M.J., 2000 – *Lipoprotein-associated phospholipase A2 as an independent predictor of coronary heart disease*. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. N Engl J Med, **343**(16), pp. 1148-1155.
- PEARSON W., ORTH M.W., KARROW N.A., 2007 – *Anti-inflammatory and chondroprotective effects of nutraceuticals from Sasha's Blend in a cartilage explant model of inflammation*. Mol Nutr Food Res, **51**(8), pp. 1020-1030.
- PEDRONO F., MARTIN B., LEDUC C., LE LAN J., SAÏAG B., LEGRAND P., MOULINOX JP., LEGRAND AB., 2004 – *Natural alkylglycerols restrain growth and metastasis of grafted tumors in mice*. Nutr Cancer, **48**(1), pp. 64-69.
- PHILLIPS C.J., MATYAS G.R., HANSEN C.J., ALVING C.R., SMITH T.C., RYAN M.A., 2009 – *Antibodies to squalene in US Navy Persian Gulf War veterans with chronic multisymptom illness*. Vaccine, **27**(29), pp. 3921-3926.
- PODDA A., DEL GIUDICE G., 2003 – *MF59-adjuvanted vaccines: increased immunogenicity with an optimal safety profile*. Expert Rev Vaccines, **2**(2), pp. 197-203.
- PRESTA M., DELL'ERA P., MITOLA S., MORONI E., RONCA R., RUSNATI M., 2005 – *Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis*. Cytokine Growth Factor Rev, **16**(2), pp. 159-178.
- REN S., TIAN X.Z., DONG C., ZHAO S., WANG J., YAN M., QI X., LIU G., 2013 – *Pharmacological effects of Astragaloside IV: a literature review*. J Tradit Chin Med, **33**(3), pp. 413-416.
- ROCK C.L., 2007 – *Multivitamin-multimineral supplements: who uses them?* Am J Clin Nutr, **85**(1), pp. 277S-279S.
- ROSEN P., WOODHEAD A.D., 1980 – *High ionic strength: its significance in immunosurveillance against tumor cells in sharks and rays (elasmobranchs)*. Med Hypotheses, **6**(4), pp. 441-446.
- SAN-JUAN S., GARCÉS M., CABALLERO M.L., MONZÓN S., MONEO I., 2004 – *Occupational asthma caused by shark cartilage dust*. J Allergy Clin Immunol, **114**(5), pp. 1227-1228.
- SASAKI T., KOBAYASHI Y., SHIMIZU J., WADA M., IN'NAMI S., KANKE Y., 1998 – *Effects of dietary n-3-to-n-6 polyunsaturated fatty acid ratio on mammary carcinogenesis in rats*. Nutr Cancer, **30**(2), pp. 137-143.
- SAVOURET J.F., QUESNE M., 2002 – *Resveratrol and cancer: a review*. Biomed Pharmacother, **56**(2), pp. 84-87.
- SENO N., ANNO Y., OKUYAMA Y.T., 1975 – *Microheterogeneity of chondroitin sulfates from various cartilages*. Connect Tissue Res, **3**(1), pp. 87-96.
- SHEU J.R., FU C.C., TSAI M.L., CHUNG W.J., 1998 – *Effect of U-995, a potent shark cartilage-derived angiogenesis inhibitor, on anti-angiogenesis and anti-tumor activities*. Anticancer Res, **18**(6A), pp. 4435-4441.

- SKOPINSKA-ROZEWSKA E., KROTKIEWSKI M., SOMMER E., ROGALA E., FILEWSKA M., BIALAS-CHROMIEC B., PASTEWKA K., SKURZAK H. 1999 – *Inhibitory effect of shark liver oil on cutaneous angiogenesis induced in Balb/c mice by syngeneic sarcoma L-1, human urinary bladder and human kidney tumour cells.* *Oncol Rep*, **6**(6), pp. 1341-1344.
- SNYDER F., WYKLE R.L., MALONE B., 1969 – *A new metabolic pathway: biosynthesis of alkyl ether bonds from glyceraldehyde-3-phosphate and fatty alcohols by microsomal enzymes.* *Biochem Biophys Res Commun*, **34**(3), pp. 315-321.
- SNYDER F., 1971 – *Glycerolipids in the Neoplastic Cell: Methodology, Metabolism and Composition.* *Methods Cancer Res*, **6**, pp. 399-436.
- SNYDER F. (ed.), 1972 – *Ether-linked Lipids and Fatty Alcohol Precursors in Neoplasms.* Ether Lipids, New York, Academic, pp. 273-295.
- SOPLY F., FISH R., SIMARD B., BOLLE N., KRUTHOF E., POLACK B., PERNOD G., 2008 – *Tissue-type plasminogen activator has antiangiogenic properties without effect on tumor growth in a rat C6 glioma model.* *Cancer Gene Ther*, **15**(10), pp. 685-692.
- SOLOMON N., PASSWATER R., JOELSSON I., HAIMES L., 1997 – *Shark liver oil and cancer.* “Shark Liver Oil, Nature’s Amazing Healer”, New York, Kensington Company, pp. 49-54.
- SOODSMA J.F., PIANTADOSI C., SNYDER F., 1970 – *The biocleavage of alkyl glyceryl ethers in Morris hepatomas and other transplantable neoplasms.* *Cancer Res*, **30**(2), pp. 309-311.
- STAFFORINI D.M., MCINTYRE T.M., CARTER M.E., PRESCOTT S.M., 1987 – *Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase. Association with lipoprotein particles and role in the degradation of platelet-activating factor.* *J Biol Chem*, **262**(9), pp. 4215-4222.
- STAMELLOS K.D., SHACKELFORD J.E., TANAKA R.D., 1993 – *Subcellular localization of squalene synthase in rat hepatic cells. Biochemical and immunochemical evidence.* *J Biol Chem*, **268**(17), pp. 12825-12836.
- STEELE W., JENKIN H.M., 1973 – *Lipids and Lipid Metabolism of Novikoff Rat Hepatoma Cells.* In: R. Wood (ed.) “Tumor Lipids: Biochemistry and Metabolism”, Campaign, III: American Oil Chemists’ Society, pp. 215-224.
- STRANDBERG T.E., TILVIS R.S., MIETTINEN T.A., 1990 – *Metabolic variables of cholesterol during squalene feeding in humans: comparison with cholestyramine treatment.* *J Lipid Res*, **31**(9), pp. 1637-1643.
- SUEOKA N., SUGANUMA M., SUEOKA E., OKABE S., MATSUYAMA S., IMAI K., NAKASHI K., FUJIKI H., 2001 – *A new function of green tea: prevention of lifestyle-related diseases.* *Ann N.Y. Acad Sci*, **928**, pp. 274-280.
- SWISHER E.M., COHN DE., GOFF B.A., PARHAM J., HERZOG T.J., RADER J.S., MUTCH D.G., 2002 – *Use of complementary and alternative medicine among women with gynecologic cancers.* *Gynecol Oncol*, **84**(3), pp. 363-367.
- TANG L., JIN T., ZENG X., WANG J.S., 2005 – *Lycopene inhibits the growth of human androgen-independent prostate cancer cells in vitro and in BALB/c nude mice.* *J Nutr*, **135**(2), pp. 287-290.
- TAPIERO H., BA G.N., COUVREUR P., TEW K.D., 2002 – *Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies.* *Biomed Pharmacother*, **56**(5), pp. 215-222.
- THOMSON M., ALI M., 2003 – *Garlic (Allium sativum): a review of its potential use as an anti-cancer agent.* *Curr Cancer Drug Targets*, **3**(1), pp. 67-81.
- TISDALE M.J., 1999 – *Wasting in cancer.* *J Nutr*, **129**(1S Suppl), pp. 243S-246S.
- TSELEPIS A.D., KARABINA S.A., STENGEL D., PIÉDAGNEL R., CHAPMAN M.J., NINIO E., 2001 – *N-linked glycosylation of macrophage-derived PAF-AH is a major determinant of enzyme association with plasma HDL.* *J Lipid Res*, **42**(10), pp. 1645-1654.
- TSIMIHODIMOS V., KARABINA S.A., TAMBARI A.P., 2002 – *Altered distribution of platelet-activating factor-acetylhydrolase activity between LDL and HDL as a function of the severity of hypercholesterolemia.* *J Lipid Res*, **43**(2), pp. 256-263.
- UNWIN C., BLATCHLEY N., COKER W., FERRY S., HOTOPF M., HULL L., 1999 – *Health of UK servicemen who served in the Persian Gulf War.* *Lancet*, **353**(9148), pp. 169-178.
- VALENSI J.P., 1994 – *Systemic cytokine profiles in BALB/c mice immunized with trivalent influenza vaccine containing MF59 oil emulsion and other advanced adjuvants.* *J Immunol*, **153**(9), pp. 4029-4039.
- VAN DER MERWE C.F., BOOYENS J., KATZOFF I.E., 1987 – *Oral gamma-linolenic acid in 21 patients with untreatable malignancy. An ongoing pilot open clinical trial.* *Br J Clin Pract*, **41**(9), pp. 907-915.
- VENABLE M.E., ZIMMERMAN G.A., MCINTYRE T.M., 1993 – *Platelet-activating factor: a phospholipid autacoid with diverse actions.* *J Lipid Res*, **34**(5), pp. 691-702.
- WARLETA F., QUESADA C.S., CAMPOS M., ALLOUCHE Y., BELTRAN G., 2010 – *Squalene protects against oxida-*

- tive DNA damage in MCF10A human mammary epithelial cells but not in MCF7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells.* Food Chem Toxicol, **48**(4), pp. 1092-100.
- WEBER N., 1985 – *Metabolism of orally administered rac-1-O-[1'-14C]dodecylglycerol and nutritional effects of dietary rac-1-O-dodecylglycerol in mice.* J Lipid Res, **26**(12), pp. 1412-1420.
- WETHERBEE B.M., NICHOLS P.D., 2000 – *Lipid composition of the liver oil of deep-sea sharks from the Chatham Rise, New Zealand.* Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, **125**(4), pp. 511-521.
- WHITEHOUSE M.W., ORR K.J., BECK F.W., PEARSON C.M., 1974 – *Freund's adjuvants: relationship of arthritogenicity and adjuvanticity in rats to vehicle composition.* Immunology, **27**(2), pp. 311-330.
- WILLEMS P.M., KUYPERS A.W., MEIJERINK J.P., HOLDRINET R.S., MENSINK E.J., 1993 – *Sporadic mutations of the p53 gene in multiple myeloma and no evidence for germline mutations in three familial multiple myeloma pedigrees.* Leukemia, **7**(7), pp. 986-991.
- WOLFE J., 2002 – *Risk factors for multisymptom illness in US Army veterans of the Gulf War.* J Occup Environ Med, **44**(3), pp. 271-281.
- YAMAMOTO N., NGWENYA B.Z., 1987 – *Activation of mouse peritoneal macrophages by lysophospholipids and ether derivatives of neutral lipids and phospholipids.* Cancer Res, **47**(8), pp. 2008-2013.
- YAMAMOTO N., CLAIRE D.A., HOMMA S., NGWENYA B.Z., 1988 – *Activation of mouse macrophages by alkyl-glycerols, inflammation products of cancerous tissues.* Cancer Res, **48**(21), pp. 6044-6049.
- YASAKA T., BOXER L.A., BAEHNER R.L., 1982 – *Monocyte aggregation and superoxide anion release in response to formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP) and platelet-activating factor (PAF).* J Immunol, **128**(5), pp. 1939-1944.
- YOSHINO S., YOSHINO J., 1994 – *Recruitment of pathogenic T cells to synovial tissues of rats injected intrarticularly with nonspecific agents.* Cell Immunol, **158**(2), pp. 305-313.