

Połączenie bromelainy i acetylocysteiny (BromAc) synergistyycznie inaktywuje SARS-CoV-2 ?

Uwaga: Nie jestem medykiem - w poniższym tekście wyrażam swoje własne opinie i informacje, które uważam za wiarygodne w tej dżungli systemowej dezinformacji, w jakiej żyjemy. Cokolwiek Czytelnik zrobi, bądź nie, w kontekście podanych tu informacji i opinii, czyni to na wyłącznie własną odpowiedzialność. Nie sprzedaję żadnego z wymienionych tutaj suplementów i nie zarabiam żadnych pieniędzy za przekazywanie tych informacji.

Z informacjami tymi zapoznałem się wczoraj (jest 21 01 2023), ale, co ciekawe, z bromeliną / bromelainą jak również NAC mam do czynienia już od ponad roku.

Wiosną roku 2021 ukazały się ciekawe, sporo wnoszące informacje dotyczące radzenia sobie z plandemią C-19, a konkretnie z pomocą jednoczesnego przyjmowania Bromeliny i NAC (czyli acetylocysteiny) – nazwijmy tę kombinację: BromNac. Zorganizowany i szczelny system masowej inorm... ups, dezinformacji - długo nie pozwalał na ujawnienie tej wiedzy widzom matrixowego teatrzyku zwanego życiem na Ziemi. Obecnie (styczeń 2023) informacja ta wypływa jednak do ludzi.

W skrócie: zrecenzowane badanie medyczne wskazuje, że dwa popularne, łatwo dostępne suplementy, bromelina i NAC, przyjmowane jednocześnie, neutralizują „białko kolca” „rozpuszczając to w nicłość”, jak ujmuje to opracowanie, z którego korzystałem opracowując niniejszy tekst, który jest w dużym stopniu tłumaczeniem fragmentów tego opracowania.

Chętni do szerszego zapoznania się z podaną powyżej informacją mogą zechcieć poznać szczegóły, zamieszczam je poniżej. Tekst zawiera trochę medycznego „bełkotu” i jest dość trudny w odbiorze, ale nie powinno to przeszkodzić zdeterminowanym.

[...]koronawirus / zespół ostrej niewydolności oddechowej 2 (SARS-CoV-2) jest czynnikiem sprawczym choroby koronawirusowej 2019 (COVID-19), która może wahać się od postaci bezobjawowych do ciężkich i śmiertelnych z zespołem ogólnoustrojowej odpowiedzi zapalnej. Na dzień 21 lutego 2021 r. zgłoszono ponad 111 milionów potwierdzonych przypadków, przy szacowanej ogólnej śmiertelności na poziomie 2,2% [1].

Obecnie istnieje niewiele środków terapeutycznych, które okazały się korzystne w zmniejszeniu wczesnej i późnej fazy progresji choroby [2]. Choć istnieje na szczęście wielu kandydatów na szczepionki, ich powszechna dostępność do szczepienia może nie być natychmiastowa, długość ochrony immunologicznej może być ograniczona [3, 4], a skuteczność szczepionek może zostać zmniejszona przez nowe warianty SARS-CoV-2. Dlatego nadal potrzebne są dalsze poszukiwania skutecznych metod leczenia.

Strukturalnie SARS-CoV-2 zawiera powierzchniowe białka szczytowe, białka błonowe i białka otoczki, a także wewnętrzne nukleoproteiny, które pakują RNA. Białko kolciste jest kompleksem

homotrimeru glikoproteiny o różnych rolach realizowanych poprzez dynamiczne modyfikacje konformacyjne, oparte częściowo na wiązaniach dwusiarczkowych [5]. Umożliwia infekcję komórek docelowych, między innymi poprzez wiązanie się z ludzkimi receptorami enzymu konwertującego angiotensynę (ACE2), co wyzwała proteolizę przez transbłonową proteazę seryny 2 (TMPRSS2), furynę i być może inne proteazy, prowadząc do wirionu i błony komórkowej gospodarza fuzja [6, 7].

Wejście wirusów do komórek ssaków lub „internalizacja wirusa” jest kluczowym mechanizmem infekcji wirusem otoczkowym i opiera się na dynamicznych zmianach konformacyjnych ich glikoprotein powierzchniowych, a mianowicie, w których pośredniczy redukcja wiązań dwusiarczkowych i jest regulowana przez oksydoreduktazy i proteazy powierzchniowe komórki [5, 8, 9, 10, 11]. Wykazano, że wejście SARS-CoV-2 do komórek gospodarza rozpoczyna się od destabilizacji białka wypustki poprzez allosteryczne przejście mechaniczne, które indukuje zmianę konformacyjną ze stanu zamkniętego „w dół” do stanu „w górę” domeny wiążącej receptor (RBD) białka spike [12, 13]. Zmiany konformacyjne RBD i wiązania wirusa są indukowane przez TMPRSS2 lub katepsynę L, które wyzwalają przejście ze stanu przed fuzją do stanu po fuzji [5, 12, 13]. Energia uwolniona przez redukcję wiązań dwusiarczkowych zwiększa elastyczność białka, która jest maksymalna, gdy stan zredukowany jest całkowity [8], umożliwiając w ten sposób fuzję błon gospodarz-wirus, co w innym przypadku jest niemożliwe ze względu na odpychające siły hydratacji obecne przed redukcją [5].

Bromelaina jest pozyskiwana głównie z łodygi ananasa (*Ananas comosus*) i zawiera szereg enzymów, które nadają jej zdolność do hydrolizy wiązań glikozydowych w węglowodanach złożonych [14]. Wcześniejsze badania wykazały, że bromelaina usuwa kolce i białka hemaglutyniny wirusa Semliki Forest, wirusa Sindbis, mysiego koronawirusa żołądkowo-jelitowego, wirusa hemaglutynującego zapalenia mózgu i rdzenia oraz wirusów grypy H1N1 [15, 16]. Jako cząsteczka terapeutyczna jest stosowana do oczyszczania oparzeń. Acetylocysteina jest silnym przeciwutleniaczem, który jest powszechnie rozpylany do dróg oddechowych w celu gromadzenia śluzu i jest również stosowany jako środek hepatoprotekcyjny w przypadku przedawkowania paracetamolu. Co najważniejsze w obecnym kontekście, acetylocysteina redukuje wiązania dwusiarczkowe [17]. Co więcej, powiązanie białek kolca i otoczki przez ich odpowiednie motywy potrójnej cysteiny uzasadnia hipotezę wpływu acetylocysteiny na stabilność wirionu po rozerwaniu mostka dwusiarczkowego [18]. Połączenie bromelainy i acetylocysteiny (BromAc) wykazuje synergistyczne działanie mukolityczne, które jest stosowane w leczeniu guzów śluzowych [19, 20] oraz jako chemosensybilizator kilku leków przeciwnowotworowych [21]. Te różne działania wynikają ze zdolności BromAc do rozkładania struktur molekularnych złożonych glikoprotein, umożliwiając w ten sposób wiązanie z powodu wysokiego powinowactwa między RBD i ACE2.

Dlatego w obecnym badaniu postanowiliśmy ustalić, czy BromAc może zakłócić integralność białek kolczastych i otoczkowych SARS-CoV-2, a następnie zbadać jego potencjał inaktywacji przeciwko replikacji *in vitro* dwóch szczepów wirusowych, w tym jednego ze zmianą mutanta kolczastego nowe miejsce cięcia S1/S2.

2. Materiały i metody

2.1. Materiały

Bromelain API został wyprodukowany przez Mucpharm Pty Ltd (Kogarah, Australia) jako sterylny proszek. Acetylocysteinę zakupiono od Link Pharma (nr kat. AUST R 170803; Warriewood, Australia). Rekombinowane białko szczytowe SARS-COV-2 otrzymano z SinoBiological (nr kat. 40589-V08B1; Pekin, Chiny). Rekombinowane białko otoczki otrzymano z MyBioSource (nr kat. MBS8309649; San Diego, CA, USA). Wszystkie inne odczynniki pochodziły z firmy Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.2. Rekombinowana elektroforeza w żelu kolczastym i otoczkowym

Białka kolców lub otoczki rekonstruowano w sterylnej wodzie destylowanej zgodnie z instrukcjami producenta, a porcje zamrożono w temperaturze -20°C . Dwa i pół mikrograma kolca lub białka otoczki inkubowano z 50 lub 100 $\mu\text{g/ml}$ bromelainy, 20 mg/ml acetylocysteiny lub ich kombinacją w wodzie Milli-Q. Kontrola nie zawierała narkotyków. Całkowita objętość reakcji wynosiła 15 μl każda. Po 30 minutach inkubacji w temperaturze 37°C do każdej reakcji dodano 5 μl buforu do próbek. W sumie 20 μl każdej reakcji poddano elektroforezie na SDS-PAGE (nr kat. 456-1095; Bio-Rad Hercules, CA, USA). Żele barwiono błękitem Coomassie.

2.3. Widmowe wykrywanie UV wiązań dwusiarczkowych w białkach kolców i otoczek

Metodę Iyera i Klee do pomiaru szybkości redukcji wiązań dwusiarczkowych zastosowano do wykrywania wiązań dwusiarczkowych w białkach wypustek i otoczki [22]. Rekombinowane białko kolczaste SARS-CoV-2 w stężeniu 3,0 $\mu\text{g/ml}$ w soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (PBS) (pH 7,0) zawierającej 1 mM kwasu etylenodiaminotetraoctowego (EDTA) inkubowano z 0, 10, 20, 40 i 50 μl acetylocysteiny (0,5 M), mieszano w 37°C przez 30 min, a następnie dodano równoważną ilość ditiotretolu (DTT) (0,5 M) i mieszano przez kolejne 30 min w 37°C . Białko kolczaste inkubowano równolegle tylko z DTT (0,5 M) jak poprzednio bez jakiegokolwiek acetylocysteiny i mieszano w 37°C przez 30 min. Następnie odczytano absorbancję przy 310 nm. Widmową detekcję UV wiązań disiarczkowych w białku otoczki przeprowadzono w podobny sposób.

2.4. Inaktywacja całego wirusa SARS-CoV-2 za pomocą BromAc

W pełni przestrzegając tymczasowych wytycznych Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) dotyczących bezpieczeństwa biologicznego związanych z chorobą koronawirusową, testy inaktywacji całego wirusa SARS-CoV-2 przeprowadzono na szczepie typu dzikiego (WT) reprezentującym wczesne krążące wirusy europejskie (numer dostępu GISAID EPI_ISL_578176). Drugi szczep SARS-CoV-2 (oznaczony jako ΔS), zgłoszony w ramach rutynowego nadzoru genomowego w regionie Auvergne-Rhône-Alpes we Francji, został dodany do testów inaktywacji z powodu rzadkiej mutacji w miejscu cięcia kolca S1/S2 oraz dostępność kultury w laboratorium (numer dostępu GISAID EPI_ISL_578177).

Testy te przeprowadzono z rosnącymi stężeniami samej bromelainy (0, 25, 50, 100 i 250 $\mu\text{g/ml}$), samej acetylocysteiny (20 mg/ml) oraz reakcji krzyżowej różnych stężeń bromelainy w połączeniu ze stałą 20 mg/ml preparatu acetylocysteiny, wobec dwóch rozcieńczeń hodowli wirusa przy $10^{5,5}$ i $10^{4,5}$ TCID₅₀/ml. Po 1 godzinie ekspozycji na lek w 37°C , wszystkie warunki, w tym kontrolę, rozcieńczono 100-krotnie, aby uniknąć cytotoksyczności, zaszczepiono w czterech powtórzeniach konfluentnych komórek Vero (CCL-81; ATCC ©, Manassas, VA, USA) i $\% \text{CO}_2$ inkubowano przez 5 dni w 36°C z 5%. Komórki utrzymywano w minimalnym podstawowym podłożu Eagle'a (EMEM) z 2%

penicyliną-streptomycyną, 1% L-glutaminą i 2% inaktywowanej płodowej surowicy bydlęcej. Wyniki uzyskano poprzez codzienne obserwacje mikroskopii optycznej, test barwienia lizy komórek w punkcie końcowym i reakcję łańcuchową polimerazy z odwrotną transkryptazą (RT-PCR) ekstraktów supernatantu RNA. W skrócie, test barwienia lizy komórek w punkcie końcowym polegał na dodaniu barwnika Neutral Red (Merck KGaA, Darmstadt, Niemcy) do pojedynczych warstw komórek, inkubacji w 37 ° C przez 45 minut, przemyciu PBS i dodaniu etanolu cytrynianowego przed gęstością optyczną (OD) mierzono przy 540 nm (Labsystems Multiskan Ascent Reader, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). OD była wprost proporcjonalna do żywych komórek, więc niska OD oznaczałaby ważną lizę komórek spowodowaną replikacją wirusa. Ponadto RNA z supernatantów studzienek ekstrahowano za pomocą półautomatycznego eMAG[®] (bioMérieux, Lyon, FR) i SARS-CoV-2 RdRp IP2 RdRp Institute Pasteur RT-PCR przeprowadzono na systemie QuantStudio™ 5 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA, USA). Wartości redukcji $\log_{10} 3,3$ (LRV) replikacji wirusa obliczono jako różnicę między studzienkami traktowanymi i kontrolnymi na warunek podzieloną przez 3,3 (jako $1 \log_{10} \approx$ progi cyklu PCR (Ct)).

2.5. Kinetyka replikacji za pomocą analizy komórek w czasie rzeczywistym

Aby porównać zdolność replikacji *in vitro* zarówno szczepów WT, jak i ΔS SARS-CoV-2, kinetykę replikacji określono, mierząc impedancję elektrody mikroelektronicznych czujników komórkowych na urządzeniu xCELLigence Real-Time Cell Analyzer (RTCA) DP Instrument (ACEA Biosciences, Inc., San Diego, Kalifornia, USA). Komórki Vero wysiano w ilości 20 000 komórek na studzienkę na płycie E 16 (ACEA Biosciences, Inc., San Diego, CA, USA) i inkubowano w tych samych warunkach pożywki, jak opisano wcześniej, w temperaturze 36°C z 5% CO₂. Po 24 godzinach izolaty hodowlane SARS-CoV-2 zaszczepiono w trzech powtórzeniach przy wielokrotności infekcji 10-2. Pozorowane infekcje przeprowadzono w czterech powtórzeniach. Dane dotyczące impedancji elektronicznej (wskaźnik komórki) były zbierane w sposób ciągły w odstępach 15-minutowych przez 6 dni. Powierzchnia pod krzywą analizy znormalizowanego wskaźnika komórek, ustalona w czasie inokulacji, została następnie obliczona w odstępach 12-godzinnych. W każdym przedziale żywotność komórek określano przez normalizację względem odpowiedniej kontroli komórek. Do porównania każdego warunku na GraphPad Prism (oprogramowanie w wersji 9.0; San Diego, Kalifornia, USA) zastosowano testy wielokrotnego porównania Tukeya.

Wyniki

Zmiana białek szczytowych i otoczkowych SARS-CoV-2

Traktowanie białka szczytowego samą acetylocysteiną nie wykazało żadnych zmian w białku, podczas gdy stężenia bromelainy przy 50 i 100 µg/ml oraz BromAc przy 50 i 100 µg/20 mg/ml spowodowały zmianę białka ([ryc. 1 A](#)). Traktowanie acetylocysteiny na białku otoczki nie zmieniło białka, podczas gdy traktowanie bromelainą w stężeniu 50 i 100 µg/ml oraz BromAc w stężeniu 50 i 100 µg/20 mg/ml również **skutkowało odpowiednio prawie całkowitą i całkowitą fragmentacją** ([ryc. 1 A](#)).

Więcej / Źródło: <https://haltunnerradioshow.com/index.php/en/news-page/world/tonight-how-to-unfold-the-spike-protein-of-covid-19-and-the-vax-making-it-go-away>