

BioMarine® Medical Immuno & Neuro Lipids kompozycja 3 rodzajów olejów rybich jako żywność specjalnego przeznaczenia medycznego wzmacniająca przeciwwirusowe działanie układu odpornościowego *

*-Badania przeprowadzone w ramach umowy UM w Łodzi z firmą Marinex International (umowa nr CRU:0041-CSTT-2022)
Konsultacja naukowa prof. dr hab. n. med. Przemysław Lewkowicz

Wstęp

Wieloletnie badania prowadzone przez firmę Marinex International we współpracy z wieloma ośrodkami naukowymi (m.in.: Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki, UM w Łodzi, Politechniką Łódzką, Politechniką Gdańską, UM w Gdańsku) doprowadził do opracowania preparatu będącego kompozycją olejów rybich jako źródło wyższych kwasów tłuszczowych niezbędnych dla prawidłowego funkcjonowania układu odpornościowego u człowieka. Nasze pionierskie badania sprzed ponad 20 lat nieoczekiwanie wykazały, iż osoby zdrowe przyjmujące olej rybi będący mieszaniną oleju uzyskanego z określonych gatunków ryb morskich (BioMarie®570) poprawia znacznie funkcje komórek układu odpornościowego zarówno podczas odpowiedzi wrodzonej, jak i nabytej, odpowiednio humoralnej (układ dopełniacza; synteza immunoglobulin) jak i komórkowej (zależnej od limfocytów B i T) ^(1, 2). Jednym z parametrów jaki w tym czasie został oceniony była zdolność limfocytów do syntezy Interferonu γ (INF- γ), kluczowego czynnika, odpowiedzialnego za inicjowanie reakcji przeciwko komórkom zakażonych wirusem ^(1, 2). INF- γ syntetyzowany przez komórki układu odpornościowego i uwalniany do przestrzeni zewnątrzkomórkowej mobilizuje inne komórki do syntezy czynników przeciwwirusowych hamujących replikację wirusa. Wyniki badań wykazały znacznie wyższe stężenie INF- γ po okresie 3 miesięcy przyjmowania preparatu i skłoniły nas do postawienia tezy, iż regularne i w odpowiedniej ilości przyjmowanie badanej kompozycji olejów rybich poprawia właściwości przeciwwirusowe układu odpornościowego. Aby wykazać czy uzasadnionym jest przyjmowanie preparatu w zakażeniach wirusowych jako suplementu zwiększającego skuteczność eliminacji patogenu jak i zapobiegającego ewentualnym zakażeniom, konieczne było przebadanie najważniejszych pozostałych komponentów odpowiedzi immunologicznej przeciwwirusowej.

Podsumowanie

W naszych badaniach wykazaliśmy, iż przyjmowanie regularne preparatu BioMarine® Medical Immuno & Neuro Lipids (żywność specjalnego przeznaczenia medycznego) przez okres 3 miesięcy poprawia znacząco właściwości przeciwwirusowe układu odpornościowego człowieka. W szczególności dotyczy to zdolności komórek NK do inicjowania śmierci komórek niebezpiecznych dla organizmu w tym zakażonych wirusem i/lub komórek nowotworowych, oraz syntezy INF- γ przez leukocyty.

1. Przyjmowania preparatu podnosi znacząco zdolność komórek NK do neutralizacji komórek zakażonych wirusem na zasadzie indukcji ich apoptozy w mechanizmie zależnym od perforyn/granzymu B jak i w mechanizmie cytotoksyczności zależnym od przeciwciał (badania aktywności komórek NK w teście czynnościowym oraz na poziomie ekspresji genów granzymu B oraz perforyny).
2. Przyjmowanie BioMarine® Medical Immuno & Neuro Lipids poprawia zdolność komórek NK do rozpoznania komórki zainfekowanej wirusem oraz migracji do narządów docelowych objętych infekcją. Wykazaliśmy, iż komórki układu odporności osób przyjmujących preparat charakteryzują się wzrostem transkrypcji genów dla NKG2C oraz CXCR3. W badaniach ekspresji mRNA dla receptora NKG2C odnotowaliśmy wzrost wartości względnej transkrypcji na średnim poziomie $3,1 \pm 5,74$ w układzie komórek niestymulowanych i $205,3 \pm 903,79$ w układzie po stymulacji PHA. Z kolei analiza ekspresji mRNA dla receptora CXCR3 wykazała, iż leukocyty osoby przyjmujące preparat charakteryzują się zwiększoną średnią ekspresją mRNA o $15,5 \pm 54,88$ w układzie po stymulacji PHA (nie odnotowaliśmy różnic w układzie leukocytów niestymulowanych).

3. Przyjmowanie BioMarine®Medical Immuno & Neuro Lipids wzmacnia potencjał komórek układu odpornościowego do syntezy i uwalniania interferonu gamma (INF- γ) (badania na poziomie uwalniania do przestrzeni zewnątrzkomórkowej jak i ekspresji genu). Wykazaliśmy, iż komórki układu odporności osób przyjmujących preparatu charakteryzują się wzrostem syntezy INF- γ na średnim poziomie 60,1 \pm 138,67 pg/mL w układzie komórek nie poddanych stymulacji i 86,1 \pm 235,10 pg/mL w układzie po stymulacji PHA. Wzrost syntezy INF- γ jest efektem wzmożonej transkrypcji genów dla tego czynnika. W badaniach odnotowaliśmy wzrost wartości względnej transkrypcji na średnim poziomie 35,8 \pm 70,78 w układzie komórek niestymulowanych i 13,7 \pm 42,00 w układzie po stymulacji PHA. Efekt przeciwwirusowy jest wynikiem wysokiego poziomu syntetazy oligoizoadenylowej oraz kinazy białkowej R – dwóch najważniejszych enzymów odpowiedzialnych za hamowanie replikacji wirusów. Z punktu widzenia ludzkiego organizmu właściwości INF- γ są bardzo istotne, gdyż zapewniają szersze spektrum działania a po jednorazowej ekspozycji komórki na INF- γ efekt jego działania utrzymuje się przez kilka dni w komórkach narażonych na zakażenie wirusem.
4. Godnym odnotowania jest, iż przyjmowanie BioMarine®Medical Immuno & Neuro Lipids uruchamia różne procesy, nie tylko tych związanych bezpośrednio z gospodarką lipidową, ale także z syntezą białek. W naszych poprzednich badaniach wykazaliśmy, iż dualizm jest to wynikiem oddziaływania WKT drogą receptorową *via* FFR-1,-2,-3 i -4 na różne szlaki metaboliczne komórki⁽⁷⁾.
5. Obecnie, brak jest danych literaturowych na temat zwiększenia aktywności komórek NK oraz specjalistycznych badań, iż odżywianie lipidami ma wpływ na właściwości przeciwwirusowe układu odpornościowego (PubMed z dn.05.09.24).

Szczegółowy opis badania wraz z opisem i interpretacją wyników

Przyjmowanie BioMarine®Medical Immuno & Neuro Lipids podnosi zdolność komórek NK do inicjowania śmierci komórek niebezpiecznych dla organizmu (zakażonych wirusem oraz komórek nowotworowych)

Jednym z podstawowych elementów odporności przeciwwirusowej są komórki NK (*ang. natural killers*). Rozpoznają komórki zakażone wirusem w przypadku obniżenia ekspresji molekuł prezentujących antygen MHC I, co stanowi naturalny element unikania odpowiedzi immunologicznej przez wirusy⁽³⁾. W naszych badaniach wykazaliśmy, iż aktywność komórek NK i ich zdolność do zabijania komórek linii nowotworowej K562 wzrosła o około 5-8% po 3 miesiącach przyjmowania preparatu. Wydaje się uzasadnione stwierdzenie, iż osiągnęliśmy wartość zbliżaną do maksymalnej ich aktywności, ponieważ dodatkowa stymulacja przez IL-2 w niewielkim stopniu zmniejszyła ich zdolność do zabijania komórek linii K562 (Ryc. 1A). Celem sprawdzenia możliwego mechanizmu związanego ze wzrostem potencjału cytotoksycznego komórek NK przebadaliśmy na poziomie ekspresji genów czynniki związane z aktywnością komórek NK. Bezpośrednie właściwości cytotoksyczne komórek NK związane są z obecnością w ziarnistościach azurofilnych związków perforyny i granzymu B, które wydzielane do przestrzeni zewnątrzkomórkowej niszczą komórki zakażone wirusem/komórki nowotworowe na zasadzie kontrolowanej, nie wywołującej reakcji zapalnej lizy komórki. Wykazaliśmy, iż podniesienie sprawności cytotoksycznej komórek NK jest związane ze wzrostem transkrypcji genów dla granzymu B u osób regularnie przyjmujących preparat (Ryc. 1B). Nie odnotowaliśmy wzrostu mRNA dla perforyny co można tłumaczyć albo brakiem wpływu na transkrypcję, albo równowagą pomiędzy transkrypcją a translacją (analiza poziomu mRNA bez poziomu białka nie pozwala na ocenę tego procesu).

Przyjmowanie BioMarine®Medical Immuno & Neuro Lipids wzmacnia potencjał komórek układu odpornościowego do syntezy i uwalniania INF- γ

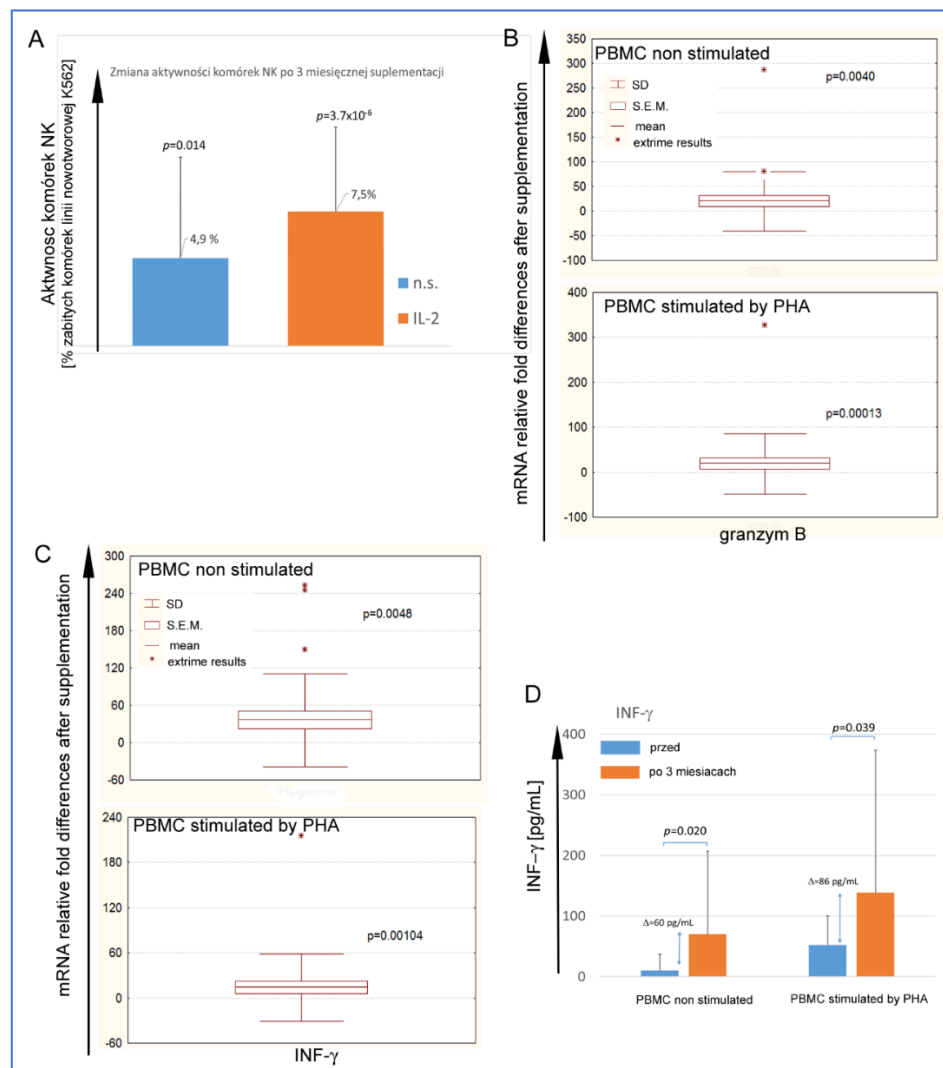
Komórki NK oprócz bezpośredniego niszczenia komórek zakażonych wirusem mogą angażować inne mechanizmy obrony przeciwwirusowej poprzez wydzielanie INF- γ oraz w mechanizmie cytotoksyczności zależnej od przeciwciał (ADCC). Właściwości INF- γ są bardzo istotne, gdyż zapewniają

szersze spektrum działania, a po jednorazowej ekspozycji komórki na INF- γ efekt jego działania utrzymuje się przez kilka dni. Efekt przeciwwirusowy jest wynikiem wysokiego poziomu syntetazy oligoizoadenylowej oraz kinazy białkowej R – dwóch najważniejszych enzymów odpowiedzialnych za hamowanie replikacji wirusów. Enzymy te, indukowane ekspozycją komórki na INF- γ , neutralizują wirus zanim wbuduje się w genom gospodarza.

W naszych badaniach wykazaliśmy znaczący statystycznie wzrost syntezy INF- γ (zarówno mRNA jak i stężenie białka w supernatantach pochodzących) w hodowli limfocytów osób po 3 miesięcznej suplementacji olejem (Ryc. 1C, D).

Analiza wpływu przyjmowania preparatu na mechanizm cytotoksyczności zależnej od przeciwciał (ADCC) została częściowo przez nas przeprowadzona w poprzedniej pracy w której wykazaliśmy znaczący statystycznie wzrost syntezy immunoglobuliny klasy IgG oraz składowej C4 układu dopełniacza u osób zdrowych przyjmujących BioMarine[®]570 o podobnym składzie i przyjmowany w podobnych dawkach ⁽¹⁾.

Rycina 1. **BioMarine[®]Medical Immuno & Neuro Lipids podnosi zdolność komórek NK do inicjowania śmierci komórek niebezpiecznych dla organizmu.** (A) Procentowa zmiana aktywności komórek NK po trzymiesięcznej kuracji. Badania przeprowadzono na izolowanych komórkach krwi obwodowej w układzie bez i po restymulacji IL-2. (B) Analiza aktywności transkrypcji genu dla granzymu B – głównego czynnika litycznego komórek NK. Wartość względna, oraz istotność statystyczną odnosi się do wartości przed kuracją. Wartość istotną statystycznie obserwowano zarówno w układzie PBMC nie stymulowanych jak i po stymulacji PHA. (C, D) **BioMarine[®]Medical Immuno & Neuro Lipids zwiększa transkrypcję oraz uwalnianie do przestrzeni zewnątrzkomórkowej INF- γ przez komórki układu odpornościowego.** Analiza aktywności transkrypcji genu dla INF- γ (C), oraz białka wydzielanego do przestrzeni zewnątrzkomórkowej (D).



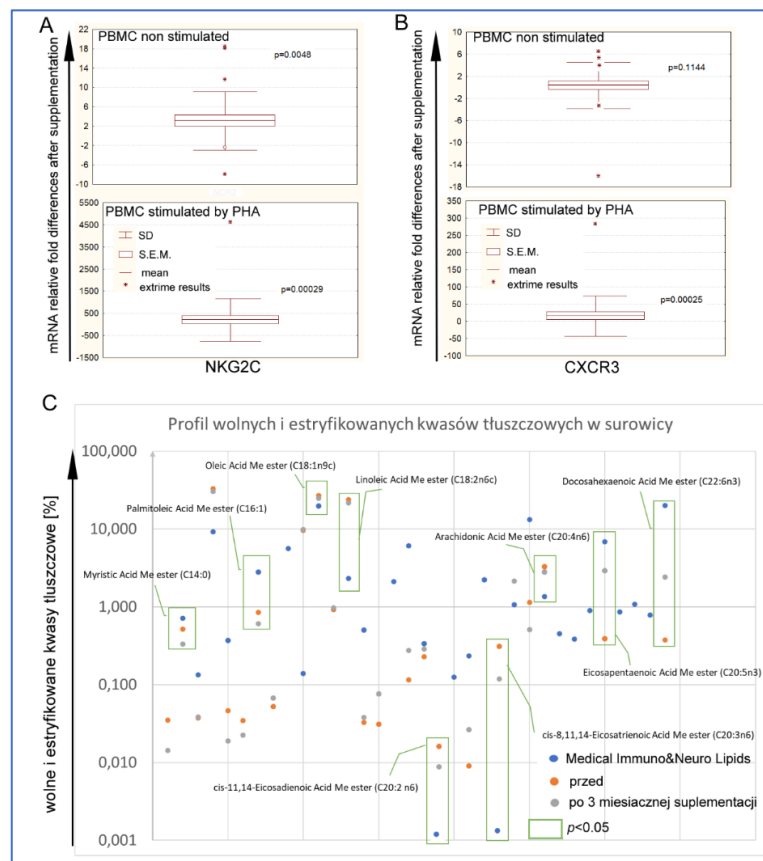
Suplementacja BioMarine® Medical Immuno & Neuro Lipids wzmacnia potencjał komórek NK do rozpoznania komórek zainfekowanych wirusem oraz migracji do narządów docelowych

Dwoma kluczowymi elementami związanymi z prawidłowym funkcjonowaniem komórek NK jest ich zdolność do rozpoznania komórki zainfekowanej wirusem oraz migracja do narządów docelowych objętych infekcją. W naszych badaniach odnotowaliśmy kilkukrotny wzrost ekspresji mRNA dla receptora NKG2C rozpoznającego nieklasyczne cząsteczki MHC klasy I (HLA-E) skutkujący aktywacją komórek NK (dimer CD94/NKG2C) (Ryc. 2A).

Proces ukierunkowanej migracji do narządów docelowych w tym do płuc jest mediowany gradientem sygnału z tkanki oraz ekspresją receptorów na powierzchni komórki NK. W procesie tym główne znaczenie odgrywa receptor CXCR3 (*ang. CXC-chemokine receptor 3*) ligand trzech chemokin: CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP-10), oraz CXCL11 (I-TAC). Również w tym przypadku odnotowaliśmy znaczny wzrost ekspresji genu dla CXCR3 u osób przyjmujących preparat. Oba procesy mają szczególne znaczenie w przypadku infekcji wirusami z rodziny *Orthomyxoviridae* (wirusy grypy) oraz *Coronaviridae* (m.in.: SARS Cov2) ⁽³⁾ (Ryc. 2B).

Wielokierunkowe działanie, potencjalnie niezależnych procesów związanych z aktywnością komórek NK prawdopodobnie jest wynikiem dostarczenia odpowiednich składników na etapie różnicowania komórek NK z pierwotnej macierzystej komórki krwiotwórczej w szpiku kostnym (*ang. hematopoietic stem cell – HSC*). W naszych badaniach wykazaliśmy, iż przyjmowanie preparatu skutkuje zmianą profilu wolnych kwasów tłuszczowych w surowicy co z pewnością ma wpływ na dostępność tych związków w szpiku i komórkach różnicujących (Fig 2C) ^(4,5).

Rycina 2. BioMarine® Medical Immuno&Neuro Lipids wzmacnia potencjał komórek NK do rozpoznania komórek zainfekowanych wirusem oraz migracji do narządów docelowych. (A) Analiza aktywności transkrypcji genu dla receptora NKG2C – głównego receptora odpowiedzialnego za rozpoznanie komórek targetowych przez komórki NK. (B) Analiza aktywności transkrypcji genu dla CXCR3 – strategicznego receptora chemokin odpowiadającego za ukierunkowaną migrację komórek NK z obwodowych naczyń krwionośnych do narządów docelowych (m.in. płuc, wątroby). (C) Analiza profilu lipidowego wolnych i estryfikowanych kwasów tłuszczowych surowicy osób przyjmujący preparat. W zielonych ramkach oznaczono związki, których procent zmienił się istotnie statycznie w porównaniu do okresu przed kuracją.



Material i metody

Grupę badawczą stanowiło 26 zdrowych ochotników (14 kobiet i 12 mężczyzn) rekrutowanych w Zakładzie Chorób Błony Śluzowej Jamy Ustnej i Przyzębia UM w Łodzi spośród studentów Wydziału Lekarskiego.

Kryteria kwalifikujące do badania:

- kobiety i mężczyźni w wieku 20-50 lat;
- brak chorób ogólnoustrojowych;
- brak przyjmowanych na stałe leków;
- prawidłowa masa ciała w stosunku do wzrostu – $18,5 \leq \text{BMI} \leq 24,9$.

Kryteria wykluczające z badania:

- kobiety w ciąży i karmiące;
- osoby palące lub niepalące krócej niż 5 lat;
- brak deklaracji o zmniejszeniu ilości tłuszczów w diecie i unikania tłuszczów wysokoprzetworzonych oraz produktów smażonych.

Osoby zakwalifikowane do badania przyjmowały BioMarine®Medical Immuno & Neuro Lipids (żywność specjalnego przeznaczenia medycznego) w dawce 0,5 mL/kg m.c./dzień, co w praktyce dla osoby o wadze 60 kg oznaczało dzienne spożycie 30 mL oleju (w tym 1.6 g EPA, 9.1 g DHA, 2.5 g alkilogliceroli i 2.6 g skwalenu) przez okres 90 dni.

Od każdej osoby przed rozpoczęciem i po zakończeniu przyjmowania produktu została pobrana krew z żyły łokciowej. Zostały zbadane następujące parametry immunologiczne:

1. Bezwzględna liczba i odsetek komórek NK ($\text{CD16}^+\text{CD56}^+$), limfocytów cytotoksycznych (CD8^+), pomocniczych (CD4^+), limfocytów B (CD19^+) we krwi obwodowej ^(1,2).
2. Zdolność izolowanych jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC) do syntezy $\text{INF-}\gamma$, TNF, IL-2, 4, 5, 6, 10, 17 bez i po stymulacji poliklonalnej (PHA) w hodowli 21 h na podstawie oznaczenia poziomu uwalnianego białka do płynu hodowlanego ⁽¹⁾.
3. Aktywność komórek NK. Zdolność komórek NK do neutralizacji komórek linii nowotworowej K562 (target cells) pozbawionej ekspresji molekuł MHC klasy I oraz II. Do badań użyto testu dostępnego komercyjnie firmy GlycoTape Biotechnology GmbH (Heidelberg Germany). W badaniach zastosowano proporcje 12,5:1 (Target cells: Effector cells). Inkubację Target cells: Effector cells prowadzono przez okres 3h w temperaturze 37°C w atmosferze wilgotnej. Estymacje odsetka komórek efektorowych K562 uśmierconych przez komórki NK przeprowadzono przy użyciu cytometru przepływowego LSR II BD.
4. Analiza ekspresji genów $\text{INF-}\gamma$, granzymu B, perforyny oraz receptorów NKG2C oraz CXCR3 została przeprowadzona w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMC) hodowanych przez okres 21h w układzie bez i po stymulacji PHA. Szczegółowy opis metod zawarty jest w naszych poprzednich pracach ^(6,7,8).
5. Celem weryfikacji przyjmowania preparatu oraz wykazania korelacji pomiędzy przyjmowaniem preparatu a parametrami oceniającymi stan układu odporności dodatkowo wykonano analizę profilu lipidowego (wolnych i estryfikowanych kwasów tłuszczowych) surowicy osób przyjmujących preparat metodą chromatografii gazowej (*ang. Gas Chromatography-Mass Spectrometry*). Szczegółowy opis metod zawarty jest w naszych poprzednich pracach ^(6,7,8).

Piśmiennictwo

1. Lewkowicz P, Banasik M, Głowacka E, Lewkowicz N, Tchórzewski H. Effect of high doses of shark liver oil supplementation on T cell polarisation and peripheral blood polymorphonuclear cell function. *Pol Merkur Lekarski*. 2005 Jun;18(108):686-92. PMID: 16124384.
2. Tchórzewski H, Banasik M, Głowacka E, Lewkowicz P. Modyfikujący wpływ niektórych składowych oleju z watroby rekina na odporność naturalna u ludzi [Modification of innate immunity in humans by active components of shark liver oil]. *Pol Merkur Lekarski*. 2002 Oct;13(76):329-32. Polish. PMID: 12557443.
3. Björkström NK, Strunz B, Ljunggren HG. Natural killer cells in antiviral immunity. *Nat Rev Immunol*. 2022 Feb;22(2):112-123. doi: 10.1038/s41577-021-00558-3.
4. Steiner-Bogdaszewska Ż, Tajchman K, Domaradzki P, Florek M. Composition and Fatty Acid Profile of Bone Marrow in Farmed Fallow Deer (*Dama dama*) Depending on Diet. *Animals (Basel)*. 2022 Apr 7;12(8):941. doi: 10.3390/ani12080941.
5. Kim YS, Sayers TJ, Colburn NH, Milner JA, Young HA. Impact of dietary components on NK and Treg cell function for cancer prevention. *Mol Carcinog*. 2015 Sep;54(9):669-78. doi: 10.1002/mc.22301.
6. Lewkowicz N, Piątek P, Namiecińska M, Domowicz M, Bonikowski R, Szemraj J, Przygodzka P, Stasiotek M, Lewkowicz P. Naturally Occurring Nervonic Acid Ester Improves Myelin Synthesis by Human Oligodendrocytes. *Cells*. 2019 Jul 29;8(8):786. doi: 10.3390/cells8080786.

7. Piatek P, Lewkowicz N, Michlewska S, Wieczorek M, Bonikowski R, Parchem K, Lewkowicz P, Namiecinska M. Natural fish oil improves the differentiation and maturation of oligodendrocyte precursor cells to oligodendrocytes in vitro after interaction with the blood-brain barrier. *Front Immunol.* 2022 Jul 22;13:932383. doi: 10.3389/fimmu.2022.932383.
8. Stańdo M, Piatek P, Namiecinska M, Lewkowicz P, Lewkowicz N. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids EPA and DHA as an Adjunct to Non-Surgical Treatment of Periodontitis: A Randomized Clinical Trial. *Nutrients.* 2020 Aug 27;12(9):2614. doi: 10.3390/nu12092614.

Zgłaszane przez uczestników objawy niepożądane:

- sporadycznie mdłości po spożyciu preparatu , u niektórych osób tylko na początku przyjmowania, a u części w połowie czasu trwania badania (6 os.)
- większość osób odbijanie się preparatu, nieprzyjemny smak
- trudności w przyjmowaniu preparatu wieczorem (3 os.)

Pozytywne objawy zaobserwowane przez uczestników:

- ogólna poprawa jakości zdrowia,
- poprawa jakości skóry (2 os.)
- zmniejszenie apetytu (3 os.)
- brak przeziębienia w okresie zimowym (1os.)