



Кашель? Бронхіт? Бронхипрет®



- ефективний з перших днів терапії^{1,2}
- продуктивно виводить мокроту^{2,3}
- дбайливо ставиться до бронхів^{2,3}
- оптимальний за терміном лікування^{2,4}

Розкриваючи силу рослин

Бронхипрет®. Показання для застосування: лікування запальних захворювань верхніх та нижніх дихальних шляхів, зокрема гострого та хронічного бронхіту, що супроводжується утворенням мокротиння та кашлем. **Дозування:** Бронхипрет® сироп 50мл., 100 мл. Діти від 1 року до 5 років – 3,2 мл. 3 рази на день. Діти від 6 до 11 років – 4,3 мл. 3 рази на день. Діти від 12 років та дорослі 5,4 мл 3 рази на день. Бронхипрет® табл. № 20, № 50. Діти від 12 років та дорослі приймають по 1 таблетці на 3 рази на день. **Протипоказання:** Підвищена індивідуальна чутливість до компонентів препарату. **Особливості застосування:** не рекомендується застосовувати під час вагітності та годування груддю. Побічні ефекти: у поодиноких випадках підвищена чутливість шкіри, шлункові розлади та алергічні реакції.

1. Schindler et al., Phytomedicine 7 suppl 2, 2000

2. Новітні дослідження підтверджують терапевтичну ефективність препарату «Бронхипрет» Medical Nature, №7/2011 стор 23-26 (оригінальне джерело - Kemmerich et al., Arzneim.Forschung, 56, Nr.9, 2006)

3. Ismail et al., Bronchipret® in cases of acute bronchitis. Schw. Zschr. GanzheitsMedizin 15, 2003, 171-175; Нові можливості застосування секретолітиків в комплексній терапії гострого обструктивного бронхіту дітей раннього віку (В. Дуднік), «Сучасна педіатрія» 2(42)/2012

4. Можливості профілактики гострого бронхіту як ускладнення ГРВІ шляхом застосування рослинного препарату Бронхипрет. Л.І. Вакуленко, к.м.н., І.І. Самохіна. Medical Nature, 2012, №4(12)

Бронхипрет® таблетки: Р.П. № UA/8674/01/01 від 18.07.2013 р. **Бронхипрет® сироп:** Р.П. № UA/8673/02/01 від 18.07.2013 р. ТОВ «Біонорика», 02095, м. Київ, вул. Княжий Затон, 9, тел.: (044) 521-86-00, факс: (044) 521-86-01, e-mail: info@bionorica.ua.

Для розміщення у спеціалізованих виданнях, призначених для медичних установ та лікарів, а також для розповсюдження на семінарах, конференціях, симпозиумах з медичної тематики. Матеріал призначений виключно для спеціалістів у галузі охорони здоров'я.

Я. Зайбель, М. Воннеманн, О. Верц, М.Д. Леннер

Багаторівневий підхід до дослідження механізму протизапальної активності комбінованого рослинного лікарського засобу, що містить екстракти трави чебрецю та коренів первоцвіту

Бронхипрет® ТП, таблетки, вкриті плівковою оболонкою, – рослинний лікарський препарат, що містить комбінацію сухих екстрактів трави чебрецю та коренів первоцвіту. Понад 20 років Бронхипрет® ТП використовується як засіб від кашлю, що супроводжується утворенням мокротиння, при інфекціях/запаленні нижніх дихальних шляхів. Наразі рекомендованою добовою дозою для дорослих пацієнтів є 660 мг/день [1]. У клінічних випробуваннях за участю хворих на гострий бронхіт, що супроводжувався кашлем, Бронхипрет® ТП у зазначеній добовій дозі продемонстрував терапевтичну ефективність щодо полегшення симптомів і прискорення одужання [2]. Клінічні дані стосовно ефективності стали підставою для внесення фітопрепарату Бронхипрет® ТП до рекомендацій S3 Німецького товариства з лікування респіраторних захворювань (діагностика та лікування кашлю в дорослих) [3].

Гострий бронхіт – це респіраторне захворювання, в більшості випадків зумовлене респіраторними вірусами, які індукують запальні реакції в дихальних шляхах, що призводить до підвищення продукції мокротиння і, як наслідок, до виникнення кашлю. Ці симптоми найбільш обтяжливі для пацієнта [4], тому ключовою метою фармакологічного втручання є симптоматична терапія запальних процесів.

Нещодавно була підтверджена протизапальна активність сиропу Бронхипрет® ТП, що містить комбінацію рідких екстрактів трави чебрецю та листя плюща; можливим механізмом протизапальної дії було вказано пригнічення утворення та/або вивільнення ейкозаноїдів як медіаторів запалення [5].

Ейкозаноїди – ліпідні медіатори, що утворюються внаслідок метаболізму арахідонової кислоти (АК). Їх можна розділити на різні групи, з-поміж яких простаноїди та лейкотрієни є основними речовинами, що беруть участь у регуляції запалення. Ключові етапи їх утворення каталізуються циклооксигеназами (ЦОГ-1 і ЦОГ-2) або 5-ліпоксигеназою (5-ЛО). Простагландин (ПГ) ПГЕ₂ відіграє важливу роль у запальних процесах (збільшує проникність кровоносних судин), натомість лейкотрієни (ЛТ), наприклад ЛТВ₄, чинять безпосередньо протизапальну дію. ЛТВ₄ діє на лейкоцити як хемоатрактант і полегшує їх адгезію в кровоносних судинах запаленої тканини. Цистеїнові лейкотрієни (цисЛТ), потужні індуктори бронхоспазму, сприяють запаленню за рахунок підвищення проникності судин і стимуляції активації та міграції лейкоцитів, зокрема в дихальних шляхах [6, 7].

Для рослинних екстрактів було описано кілька механізмів втручання в утворення або активність ейкозаноїдів включно з регуляцією експресії ферментів [8-10] та ферментативної активності [11], а також впливом на експресію рецепторів ейкозаноїдів [8, 12]. Було показано, що декілька окремих хімічних сполук рослинного походження, такі як флавоноїди, хінони, сесквитерпени та ін., зменшують продукцію ейкозаноїдів [13, 14]. Екстракти чебрецю містять декілька компонентів, що діють на широке коло біологічних мішеней [15, 16]. Зокрема, було описано протизапальну дію тимолу, карвакролу і тимохінону, зумовлену інгібуванням біосинтезу ПГ та ЛТ через вплив на активність ЦОГ-2 [11, 17] та 5-ЛО [18].

Беручи до уваги продемонстровану клінічну ефективність, ми застосували багаторівневий підхід до вивчення протизапальної активності суміші сухих екстрактів трави чебрецю і коренів первоцвіту, що міститься в лікарському засобі Бронхипрет® ТП, спочатку *in vivo* – на тваринній моделі запалення легень, а в подальших експериментах *in vitro* – в метаболічному шляху ейкозаноїдів у лейкоцитах та в безклітинній системі. Метою такого підходу було визначити механізми, що лежать в основі дії препарату, та виявити можливі активні інгредієнти, які сприяють фармакодинамічній активності продукту.

Методи

Матеріали дослідження

Для експериментів *in vivo* та *in vitro* використовували BRO – суміш натуральних сухих екстрактів трави чебрецю та коренів первоцвіту, що містяться в препараті Бронхипрет® ТП, без допоміжних речовин, із сумарним

співвідношенням сухого екстракту чебрецю/первоцвіту 2,67:1 або окремі екстракти. При цьому екстракти були стандартизовані за вмістом специфічних маркерних сполук. Суміш трав'яних екстрактів та окремі екстракти подавалися компанією «Біонорика СЕ» (Німеччина).

Для досліджень *in vivo* суміш сухих екстрактів суспендували в 0,9% фізіологічному розчині. Для експериментів *in vitro* суміш розчиняли у 50% етанолі до концентрації 100 мг/мл та гомогенізували протягом 5 хв на вортексі з подальшою 30-хвилинною інкубацією в ультразвуковій ванні при кімнатній температурі (КТ). Отриману суспензію центрифугували (3000 g) протягом 10 хв при КТ, після чого супернатант фільтрували через одноразовий шприц-фільтр (PVDF; розмір пор 0,22-0,45 мкм; наприклад, Millipore, США) і відразу ж використовували для аналізу.

Для досліджень на активність 5-ЛО використовували й окремі сполуки: тимол (Carl Roth/Lactan, Австрія), сульфат тимолу (Witega Laboratorien, Німеччина), а також карвакрол, тимохінон і розмаринову кислоту (всі сполуки – Sigma-Aldrich, США). Ці сполуки розчиняли в етанолі до концентрації 30 мг/мл і відразу ж використовували для аналізу. Для всіх досліджень з кров'ю щурів або клітинами крові людини використовували кінцеву концентрацію в етанолі 0,5% або 0,025% відповідно. Для аналізу ізольованого ферменту 5-ЛО кінцева концентрація в етанолі становила 0,1% або 0,25%. Відповідні концентрації також слугували контрольними розчинниками.

Оцінка протизапальної активності *in vivo*

Умови утримання тварин. Дослідження на тваринах проводилися на основі керівних принципів ARRIVE [19]. Щури лінії Вістар чоловічої статі масою 160-260 г були отримані з розплідника в Раполово (РФ). Протягом усього експерименту вони утримувалися в полікарбонатних клітках (тип T4A, площа 2194 см²) з кришкою зі сталевого дроту (6 тварин у клітці) при температурі повітря 21±1 °С і відносній вологості 61-75% з 12-годинним циклом чергування світла/темряви. Було забезпечено *ad libitum* доступ до води та повноцінного харчування гранульованим кормом (19% білка; Aller Petfood, РФ). Експерименти проводилися відповідно до рекомендацій і правил національного стандарту РФ ГОСТ Р-53434-2009, згідно з протоколом, який раніше був затверджений Комітетом з питань етики АТ «Санкт-Петербурзький фармацевтичний інститут» (РФ). Усі болісні маніпуляції з тваринами виконували відповідно до нормативних вимог (Директива 2010/63/ЄС Європейського Парламенту та Європейської Ради від 22 вересня 2010 р. про захист тварин, які використовуються для наукових цілей).

Індукція бронхоальвеоліту та лікування тварин. Бронхоальвеоліт був індукований, як описано в попередньому дослідженні [5]. Тварини (n=66) за допомогою модифікованого методу блокової рандомізації були довільно розділені та розподілені на 5 груп (по 10-16 на групу) лікування (з індукованим ліпополісахаридами (ЛПС) запаленням) та додаткову групу, що не отримувала лікування (здоровий контроль) [20]. До початку експерименту тварини були акліматизовані протягом 14 днів.

Маніпуляції виконували в попередньо знеболених тварин (Золетил® (тилетамін/золазепам; Virbac, Франція)

внутрішньовенно 0,4 мг/кг) шляхом інтратрахеального введення 100 мкг ЛПС *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich, США) на тварину за 1 год до першого перорального застосування досліджуваних сполук. Потім тваринам вводили 1 р/добу через шлунковий зонд або розчинник (0,9% фізіологічного розчину) дексаметазон (DEX, 5 мг/кг) або BRO (13,6; 68 або 339 мг/кг) у загальному об'ємі 10 мл/кг. Дози відповідають 0,2-; 1- та 5-кратній рекомендованій добовій дозі для людини після алометричного перерахунку в еквівалентні дози для людини [21].

Збір та аналіз рідини бронхоальвеолярного лаважу. Тварин умертвляли внутрішньовенною термінальною анестезією препаратом Золетил® 0,7 мг/кг через 48 год після ЛПС-індукції для відбору проб рідини бронхоальвеолярного лаважу (РБАЛ), як описано в попередньому дослідженні [5]. РБАЛ була отримана після лігування правого головного бронха, катетер був вставлений з трахеї в ліву легень. Теплий фізіологічний розчин (37 °С) циркулював через катетер декілька разів; отриману РБАЛ (приблизно 200 мкл) пропускали через сітку (200 мкм, «Вользка мануфактура», РФ) для видалення слизу, після чого центрифугували (1500 g) при 4 °С протягом 15 хв (центрифуга Z216 МК, Hermle Labortechnik GmbH, Німеччина).

Гранули ресуспендували й вимірювали загальний обсяг клітин на ветеринарному гематологічному аналізаторі (Abacus Junior Vet, Diatron, Угорщина). Супернатанти видалляли та зберігали замороженими при температурі -20 °С до аналізу рівня ейкозаноїдів. Рівень ПГЕ₂, ЛТВ₄ та цисЛТ у зразках РБАЛ оцінювали за допомогою імуноферментного аналізу (Cayman Chemical, США) відповідно до інструкцій виробника.

Аналіз утворення простагландину та лейкотрієну в цільній крові щурів

Збір крові, лікування, стимуляція та кількісне визначення ейкозаноїдів. Цільну кров ретроорбітально відібрали з 4 щурів чоловічої статі лінії Вістар Хан IGS (Charles River Laboratories, Франція). Кров, яку попередньо знезаражували ізофлураном, поміщали в пробірки з гепарином, розмішували, розбавляли середовищем RPMI (1:1), а потім крапельно розподіляли у 24-лунковий планшет (470 мкл на лунку). У повтор додавали BRO для досягнення кінцевої концентрації 1, 3, 10, 30, 100 і 300 мкг/мл і через 5 хв додавали A23187 в концентрації 15 мкг/мл. Планшети інкубували при температурі 37 °С протягом 120 хв. Щоб зупинити реакцію, планшети поміщали на лід на 5 хв, а потім центрифугували (300 g) протягом 10 хв при температурі 4 °С. Супернатанти збирали, аліквотували та зберігали при температурі -80 °С до визначення рівня ейкозаноїдів. Рівні ЛТВ₄, цисЛТ та ПГЕ₂ визначали кількісно з використанням комплектів ОВНС (Cayman Chemical, США) відповідно до інструкцій виробника.

Аналіз утворення лейкотрієну в клітинах крові людини

Клітини крові людини та виділення клітин. Нейтрофіли та моноцити були виділені з лейкоцитарної плівки здорових дорослих добровольців в Інституті трансфузійної медицини університетської лікарні Єни (Німеччина). Нейтрофіли відразу були виділені шляхом осадження в декстрані та центрифугування на подушках Нусоргер (PAA Laboratories, Австрія) з подальшим гіпотонічним лізисом еритроцитів, як описано раніше [22]. Моноцити відділили від мононуклеарних клітин периферичної крові шляхом їх прилипання до стінок колби, як описано раніше [23]. Насамкінець клітини ресуспендували в PBS з pH 7,4 що містить 1 мг/мл глюкози та 1 мМ CaCl₂ (буфер PGC).

Аналіз на цитотоксичність в інтактних нейтрофілах та моноцитах людини. Життєздатність нейтрофілів і моноцитів проаналізовано МТТ-методом (відновлення 3-(4,5-диметил-2-тіазоліл)-2,5-дифеніл-2Н-тетразол броміду (МТТ) до формазану), як описано раніше [24]. До клітин, що були

Продовження на стор. 28.

Багаторівневий підхід до дослідження механізму протизапальної активності комбінованого рослинного лікарського засобу, що містить екстракти трави чебрецю та коренів первоцвіту

Продовження. Початок на стор. 27.

внесені в 96-лункові планшети, додавали тестові сполуки або розчинник (з кінцевою концентрацією 0,375% етанолу). Зразки інкубували протягом 30 хв при температурі 37 °С. Позитивний контроль для лізису клітин – 1% тритон або 16,6% етанол.

Утворення ЛТВ₄ в інтактних нейтрофілах людини. Нейтрофіли (5×10⁶ клітин/мл PGC-буфера) попередньо інкубували з досліджуваними сполуками чи розчинником (0,025% етанол) протягом 10 хв при температурі 37 °С, а потім стимулювали 10 хв з іонофором A23187 (2,5 мкМ). Реакцію зупиняли додаванням 1 мл метанолу та 30 мкл 1N HCl. Після цього додавали 500 мл PBS і 200 нг ПГВ₁ (внутрішній стандарт). Зразки піддавали твердофазній екстракції за допомогою VERX на колонках C18 (100 мг, UCT, США) та аналізували методом зворотно-фазової високоефективної рідинної хроматографії (RP-HPLC), як описано раніше [25]. Рівень ЛТВ₄ був розрахований на основі ПГВ₁. Рівні цисЛТ: C₄, D₄ та E₄ (визначені за допомогою комплексу імуноферментного аналізу; зазначено в наступному параграфі) – були нижчими за межу виявлення.

Утворення цисЛТ в інтактних моноцитах людини. Моноцити (1×10⁶ клітин/мл у буфері PGC) інкубували з досліджуваними сполуками чи розчинником (0,025% етанолу) протягом 10 хв при температурі 37 °С, а потім стимулювали 10 хв з іонофором A23187 (2,5 мкМ). Щоб зупинити реакцію, планшети поміщали на лід на 5 хв, а потім центрифугували (500 g) протягом 10 хв при температурі 4 °С. Супернатанти аналізували на рівень цисЛТ, використовуючи набори імуноферментного аналізу для виявлення ЛТС₄, D₄ та E₄ відповідно до інструкції виробника (Sapphire Biosciences, Австралія).

Активність очищеної 5-ЛО. Рекombінантна 5-ЛО людини була експресована в клітинах *E. coli* BL21 (DE3), які трансформували за допомогою рТ3-5LO й очистили, використовуючи колонку із сорбентом АТФ-агарозою [26]. 5-ЛО (0,5 мкг/мл PBS; pH 7,4; 1 мМ ЕДТА, 1 мМ АТФ) попередньо інкубували протягом 10 хв при температурі 4 °С із досліджуваними сполуками чи розчинником (0,025% етанол), попередньо нагрітим протягом 30 с до температури 37 °С, та 2 мМ CaCl₂ і 20 мМ АК. Реакцію зупиняли через 10 хв при температурі 37 °С додаванням льодового метанолу та ПГВ₁. Сформовані метаболіти (всі транс-ізомери ЛТВ₄ та 5-N(P)ETE) піддавали твердофазній екстракції та аналізували за допомогою VERX на C18-колонках, як описано вище. Інгібування активності 5-ЛО за допомогою досліджуваних сполук розраховували як відсоток від утворення основного продукту 5-ЛО.

Статистика. Дані дослідження *in vivo* представлені як окремі величини та їхні середні значення у вигляді діаграм розсіювання. Оцінка статистичних даних у порівнянні з контролем ЛПС/розчинник здійснювалась одноособовим аналізом дисперсії (ANOVA) за допомогою одностороннього дисперсійного аналізу з подальшим апостеріорним множинним порівнянням Даннета з логарифмічним перетворенням даних.

Для експериментів *in vitro* результати виражалися як середнє арифметичне ± середнє квадратичне відхилення повторів в одному експерименті (цільна кров щура) або як середнє арифметичне ± стандартна похибка середнього, отриманих на підставі як мінімум двох незалежних експериментів для кожної окремо взятої одиниці даних (клітини крові людини та ізолювана 5-ЛО). Значення IC₅₀ були розраховані методом нелінійної регресії. Статистичний аналіз та наближення проводилися за допомогою програми GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., США). Значення p<0,05 вважалося статистично значущим.

Результати

Вплив BRO на маркери запалення у тваринній моделі запалення легень

Протизапальний потенціал BRO досліджувався в моделі щурів із ЛПС-індукованим запаленням легень після перорального введення BRO в трьох дозах (14, 68 та 339 мг/кг), що відповідають 0,2-, 1- та 5-кратному еквіваленту рекомендованої добової дози для людини.

Інтра трахеальне введення ЛПС (100 мкг на одного щура) призвело до розвитку сильної запальної реакції в легенях, що характеризується збільшенням загальної кількості клітин (рис. 1а), які складаються переважно

з гранулоцитів (77±8% у групі з ЛПС проти 12±3% у здорових тварин), та вивільненням ейкозаноїдів ПГЕ₂ (рис. 1б), ЛТВ₄ (рис. 1в) та цисЛТ (рис. 1г), рівень яких вимірювали в РБАЛ через 48 год після стимуляції.

Лікування з BRO мало наслідком дозозалежне ослаблення запалення, що змінювалося на таку ж величину, що й референтний контроль з DEX (5 мг/кг). Зокрема, після введення BRO в середній та високій дозах (68 і 339 мг/кг) загальна кількість клітин і вміст ЛТВ₄ у РБАЛ повернулися до початкових рівнів.

Ефекти BRO на ЛТВ₄ і ПГЕ₂, виділених із цільної крові щурів

Щоб оцінити, чи має BRO безпосередній вплив на вивільнення ейкозаноїдів із лейкоцитів, ми досліджували його ефекти на утворення ейкозаноїдів у цільній крові щурів, стимульованої Ca²⁺-іонофором A23187, що зазвичай використовується як агент для індукування утворення 5-ЛО. Стимуляція крові підвищила вивільнення ЛТВ₄ та ПГЕ₂ з 0,178±0,026 до 9,8±3,0 нг/мл та з 1,8±0,3 до 7,5±0,5 нг/мл відповідно.

BRO виявив залежну від концентрації інгібуючу дію на вивільнення ЛТВ₄ і ПГЕ₂ в діапазоні концентрацій з 0,3 до 300 мкг/мл при значеннях IC₅₀ 8,6 та 70,0 мкг/мл для ЛТВ₄ та ПГЕ₂ відповідно (рис. 2).

Через досить слабку інгібуючу дію BRO на ПГЕ₂ та результати досліджень *in vitro*, які свідчать про відсутність інгібування овечої ЦОГ-1 та людської рекombінантної ЦОГ-2 при концентраціях до 300 мкг/мл (неопубліковані дані), ми зосередили наші дослідження на впливі BRO на лейкоцитарну гілку метаболічного шляху арахідонової кислоти.

Вплив BRO на вивільнення цисЛТ та ЛТВ₄ з клітин крові людини

Щоб з'ясувати, чи можна результати, отримані на щурах, екстраполювати на людину, ми оцінили вивільнення ЛТВ₄ і цисЛТ з A23187-стимульованих нейтрофілів і моноцитів людини відповідно. Щоб точніше визначити активні речовини в BRO, ми також включили в аналіз екстракти трави чебрецю та кореня первоцвіту. Аналіз на цитотоксичність проводився для діапазону концентрацій з 0,4 до 100 мкг/мл для всіх тестових елементів, які використовувалися в аналізі (дані не показані).

Так само, як і в цільній крові щурів, BRO виявляв залежну від концентрації інгібуючу дію на утворення ЛТВ₄ у нейтрофілах людини (рис. 3а). Повне інгібування досягалося при 100 мкг/мл зі значенням IC₅₀ 40,6 мкг/мл. Екстракт чебрецю та первоцвіту проявляли аналогічну активність зі значеннями IC₅₀ 27,8 та 34,3 мкг/мл відповідно. Крім того, екстракт чебрецю та BRO також значно інгібували вивільнення цисЛТ із моноцитів людини (рис. 3б) зі значеннями IC₅₀ 10,6 та 12,2 мкг/мл відповідно, тоді як екстракт первоцвіту демонстрував слабший вплив на вивільнення цисЛТ (IC₅₀ 30,4 мкг/мл). Тому подальші експерименти були зосереджені на такому компоненті BRO, як трава чебрецю.

Інгібування ферментативної активності 5-ЛО за допомогою BRO, екстракту чебрецю та окремих хімічних сполук

5-ЛО є ферментом, який каталізує перші основні етапи біосинтезу ЛТ. Щоб оцінити, чи має місце ефект BRO та екстракту чебрецю в клітині через безпосереднє пригнічення активності 5-ЛО, ми досліджували вплив BRO та екстракту чебрецю на очищену рекombінантну 5-ЛО людини в безклітинній системі. Дійсно, BRO та екстракт чебрецю інгібують активність 5-ЛО зі значеннями IC₅₀ 3,4 та 18,7 мкг/мл відповідно (рис. 4а).

Ми також намагалися визначити окремі хімічні сполуки, що потенційно зумовлюють активність екстракту чебрецю. Тимохінон, розмаринова кислота, тимол, карвакрол та метаболіт фази II сульфат тимоли інгібують активність 5-ЛО зі значеннями IC₅₀ 1,1; 7,7; 16,0; 24,5 та 89,4 мкг/мл відповідно (рис. 4б). Середній базальний рівень синтезу 5-ЛО (контроль – 100%) в усіх проведених експериментах був 643±325 мкг/мкл (середнє значення ± середнє квадратичне відхилення).

Обговорення

Беручи до уваги клінічно підтверджену ефективність препарату Бронхипрет® ТП у пацієнтів з гострим

бронхітом [2], наша мета полягала в тому, щоб з'ясувати механізми дії препарату та виявити окремі інгредієнти, що сприяють його фармакодинамічній активності.

На жаль, реплікація стану індукованого вірусом гострого самолімітованого бронхіту в тваринних моделях є доволі складною через відмінність чутливості до вірусних патогенів; тому ми досліджували ефекти перорального введення BRO на більш механістичній тваринній моделі запалення легень, спричиненого інтра трахеальним введенням ЛПС. Як повідомлялося раніше, ця модель є придатною системою для вивчення самолімітованого запалення бронхів у тварин через подібність до гострого бронхіту, хоча в ній відсутня вірусна етіологія, характерна для гострого бронхіту у людей [27]. ЛПС зумовлює сильні неспецифічні імунні реакції в легенях, що призводять до інфільтрації лейкоцитів та набряку легень. Ця реакція

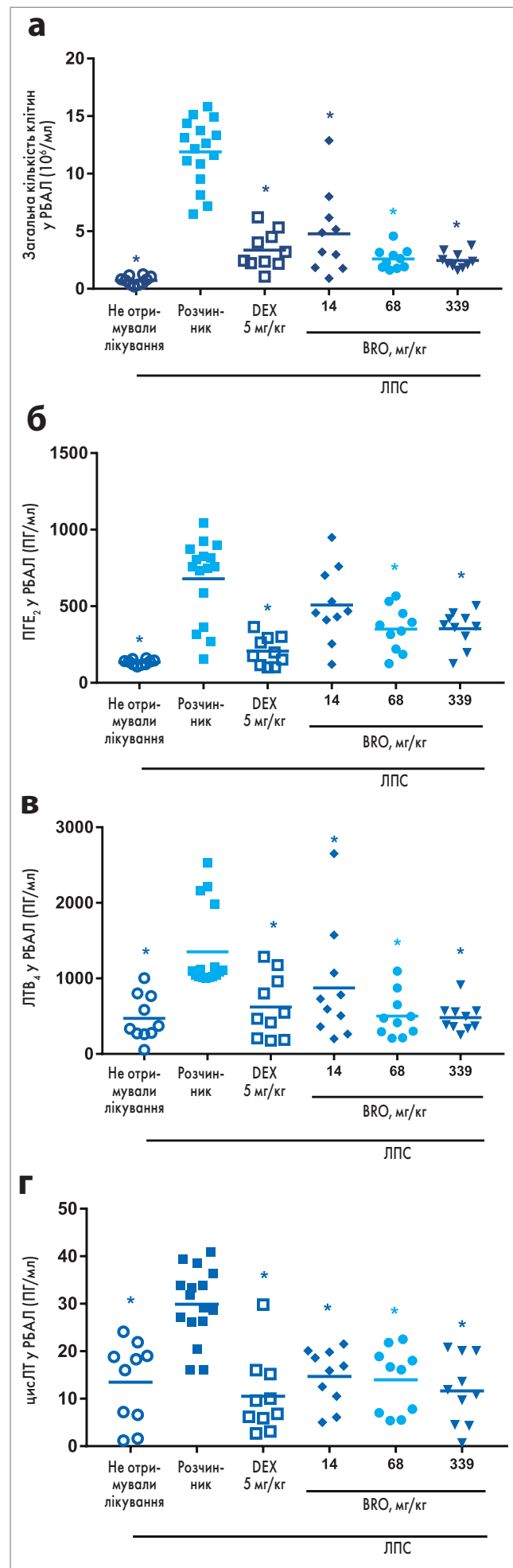


Рис. 1. Аналіз впливу BRO на маркери запалення в РБАЛ. Пероральне лікування BRO значно знижує загальну кількість клітин (а), ПГЕ₂ (б), ЛТВ₄ (в) і рівень цисЛТ (г) у РБАЛ щурів з інтра трахеально ЛПС-індукованим запаленням. Дані виражені як окремі величини та їхні середні значення
Примітки: *статистично значимі в порівнянні ЛПС/розчинник; p<0,05; ANOVA з логарифмічним перетворенням даних + тест Даннета.

опосередкована різними лейкоцитами (включно з нейтрофільними гранулоцитами та моноцитами). На підставі результатів попереднього дослідження з використанням сиропу Бронхипрет® ТП [5] ми проаналізували окремі запальні показники через 48 год після введення ЛПС після двох процедур із BRO в дозах, що відповідають 0,2-; 1- та 5-кратному еквіваленту рекомендованої добової дози для людини. Лікування тварин з використанням BRO демонструвало яскраво виражений позитивний вплив на ступінь запалення, що виражався значним зменшенням міграції лейкоцитів у легені (рис. 1а).

Такі результати чітко вказують на протизапальну ефективність перорального BRO в клінічно значимих еквівалентах дози *in vivo*. Крім того, терапія BRO мала наслідком ослаблення збільшення кількості прозапальних ейкозаноїдів ПГЕ₂, ЛТВ₄ та цисЛТ (рис. 1б-г). З цього можна зробити висновок, що потенційним механізмом дії BRO є прямий чи непрямий вплив на метаболічний шлях АК. Для подальшої характеристики інгібуючого ефекту BRO на метаболічний шлях АК кислоти ми вивчали вплив цієї комбінації на утворення ейкозаноїдів *in vitro* моделі стимульованої крові щурів. Вивільнення ЛТВ₄, індуковане іонофором, суттєво інгібуюється при додаванні BRO (IC₅₀ 8,6 мкг/мл), натомість вплив на вивільнення ПГЕ₂ був менш значним (IC₅₀ 70,0 мкг/мл). Цей висновок демонструє, що BRO безпосередньо впливає на вивільнення ейкозаноїдів з лейкоцитів в умовах *in vitro*. Оскільки вплив на вивільнення ЛТВ₄ був значно сильнішим, ніж пригнічення синтезу ПГЕ₂, і тести *in vitro* виявили, що BRO не впливає на активність ферменту ЦОГ-2 (неопубліковані дані), ми зосередили наші зусилля на дослідженні ефектів BRO на лейкотриєнову гілку метаболічного шляху АК. Наші дослідження на лейкоцитах людини підтвердили, що інгібуюча активність BRO на вивільнення ЛТ, виявлена на щурах, спостерігається і в клітинах людського походження (рис. 3).

Провівши тестування BRO та його окремих компонентів – екстрактів трави чебрецю та коренів первоцвіту, ми очікували отримати інформацію про те, які саме компоненти BRO зумовлюють цю фармакодинамічну активність. Найсильніший інгібуючий ефект (найнижчі значення IC₅₀) на вивільнення ЛТ спостерігався для BRO та екстракту чебрецю (рис. 3), що спонукало нас зосередити увагу в подальших аналізах саме на останньому. Крім того, цисЛТ (рис. 3б) був більш сприйнятливий до інгібівання, ніж ЛТВ₄ (рис. 3а).

Той факт, що BRO порушував вивільнення як цисЛТ, так і ЛТВ₄, свідчить про те, що цей процес зумовлює його інтерференція з 5-ЛО – ключовим ферментом біосинтезу ЛТ. Дійсно, як BRO, так і екстракт чебрецю сприяли значному інгібіванню активності 5-ЛО (рис. 4а); це підтверджує гіпотезу про те, що активність 5-ЛО є фармакологічною мішенню BRO. Ці результати також підтверджують раніше опубліковані дані для сиропу Бронхипрет® ТП [5].

Раніше були описані різні протизапальні властивості кількох окремих хімічних компонентів екстракту чебрецю. Серед цих сполук протизапальну активність найкраще було досліджено в монотерпенового фенолу тимолу й карвакролу [28-30]. Крім того, встановлено, що таніни, які містяться в розмариновій кислоті, мають протизапальну активність і також перешкоджають утворенню ейкозаноїдів [31]. Щоб ідентифікувати основні активні компоненти екстракту трави чебрецю, ми оцінили інгібуючу дію тимолу, карвакролу та розмаринової кислоти в аналізі з 5-ЛО. Щоб збільшити релевантність наших результатів в експериментах *in vivo*, у яких було

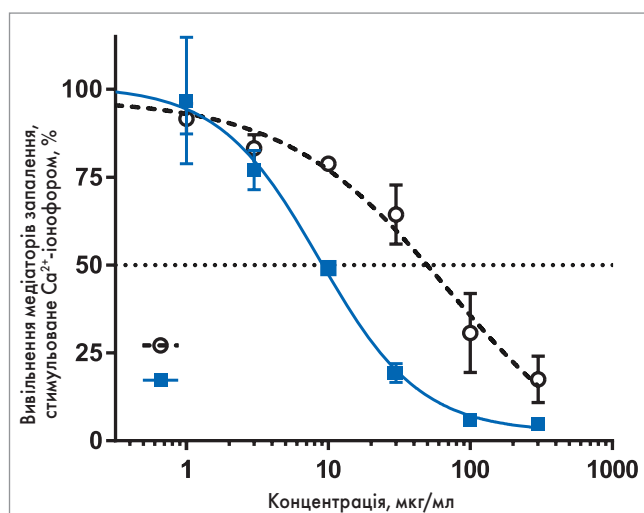


Рис. 2. Вивільнення ейкозаноїдів ПГЕ₂ і ЛТВ₄, стимульоване Ca²⁺-іонофором, у цільній крові, отриманій у щурів лінії Вістар, у присутності зростаючої концентрації BRO

Примітки: дані виражені як середні значення ± середнє квадратичне відхилення; n=2 (повтори в одному експерименті).

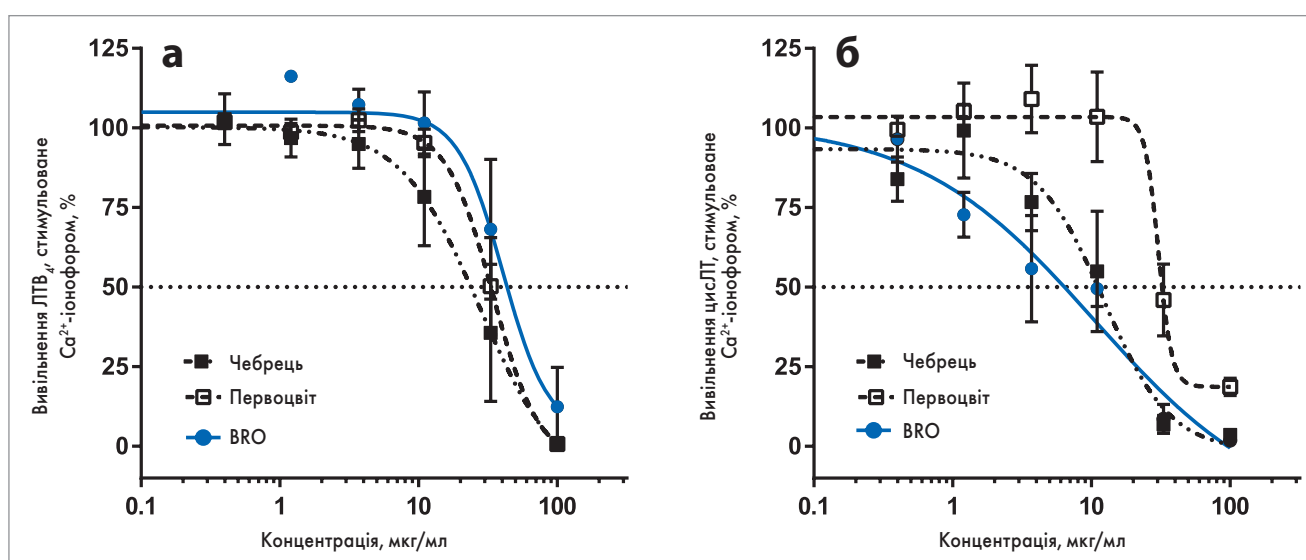


Рис. 3. Вивільнення ейкозаноїдів ЛТВ₄ з нейтрофілів людини (а) і цисЛТ (б) з моноцитів людини, стимульоване Ca²⁺-іонофором, у присутності зростаючої концентрації BRO або окремо екстрактів чебрецю й первоцвіту

Примітки: дані виражені як середні значення ± стандартна похибка середнього; n=3 (окремі експерименти).

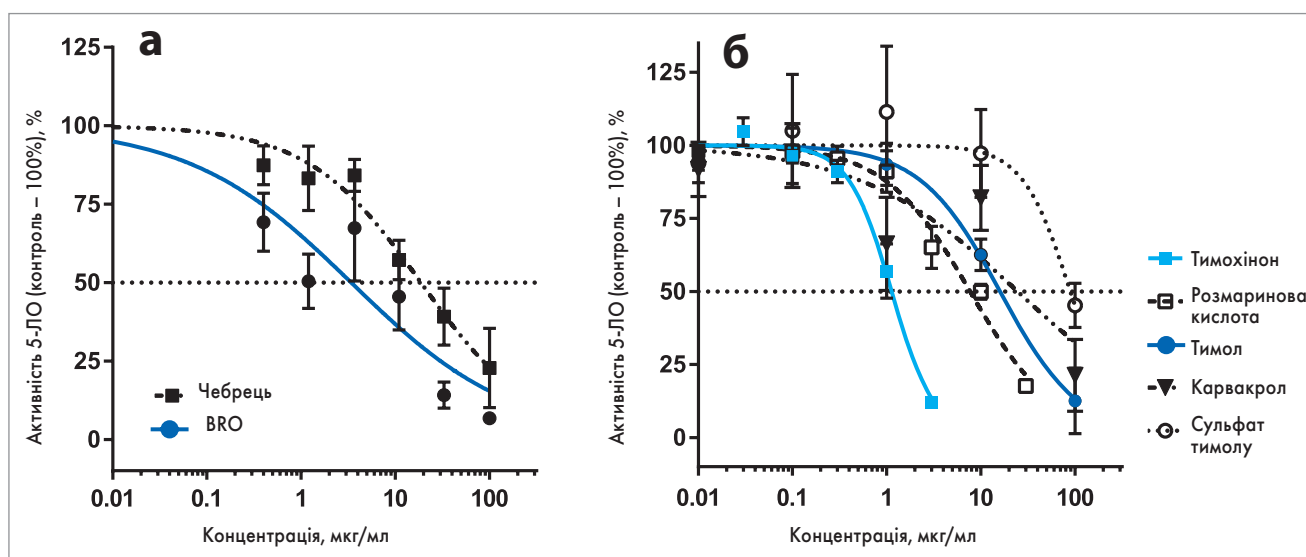


Рис. 4. Інгібування ферментативної активності очищеної рекомбінантної 5-ЛО за допомогою BRO та екстракту чебрецю (а) й окремих сполук тимолу, сульфату тимолу, карвакролу, тимохінону і розмаринової кислоти (б)

Примітки: дані виражені як середні значення ± стандартна похибка середнього; n=3-4 (окремі експерименти). Базальний рівень синтезу 5-ЛО (контроль – 100%) становив 643±325,3 мкг/мкл (середнє значення ± середнє квадратичне відхилення).

продемонстровано швидкий метаболізм тимолу [32], ми також включили в дослідження метаболіти тимолу фази I та фази II – тимохінон і сульфат тимолу. Як повідомлялося, метаболіт фази I тимохінон [33], який також входить до складу чебрецю, є потужним інгібатором активності 5-ЛО, а отже, біосинтезу ЛТ [18]. Хоча всі окремі компоненти демонстрували певну інгібуючу активність на 5-ЛО, значення IC₅₀ перебувало в аналогічному діапазоні, що й для екстракту трави чебрецю. Зважаючи на низький відносний уміст (<2%; дані не наведені) окремих компонентів екстракту чебрецю, ймовірно, жоден з них не міг би самостійно зумовлювати активність екстракту чебрецю. Схоже, що інгібівання 5-ЛО екстрактом чебрецю та BRO відбувається шляхом реалізації сукупності індивідуальних пригнічувальних властивостей кількох активних інгредієнтів. Стосовно метаболітів тимолу не передбачається, що концентрація сульфату тимолу, необхідна для відповідного інгібівання 5-ЛО, буде досягнута після перорального введення клінічної дози (Kohlert та ін. описали C_{max} 93мг/мл для сульфату тимолу в плазмі людини після прийому 1 таблетки препарату Бронхипрет® ТП [32]). Отже, суттєвий внесок сульфату тимолу у зниження рівня ЛТ у нашій моделі щурів теж, вочевидь, є малоімовірним. Тимохінон показав найвищу ефективність у нашому аналізі. На жаль, відсутність біоаналітичних даних після перорального введення BRO не дозволяє проводити будь-яку суттєву оцінку *in vivo* релевантності тимохінону в складі BRO на інгібівання ЛТ. Результати цих експериментів вказують на те, що, хоча переважно компонент чебрецю зумовлює протизапальну активність BRO, необхідна комбінація з первоцвітом, щоб забезпечити повний діапазон фармакодинамічної активності згаданої комбінації екстрактів. Наприклад, на моделі індукованого лимонною кислотою кашлю в морської свинки ми змогли показати, що BRO має заспокійливу дію на кашель [34] і що це переважно пов'язано з вмістом у ньому екстракту первоцвіту.

Наші дані доповнюють попередні результати, отримані Fachini-Queriroz і співавт. [35], які вивчали позитивний вплив ефірної олії *Thymus vulgaris* та її терпенових компонентів – тимолу й карвакролу – з використанням *in vivo* (плеврит у щурів, індукований карагінаном) та *in vitro* (хемотаксис лейкоцитів, виділених з плевральної порожнини щурів) моделей запального набряку.

Отже, інгібівання 5-ЛО може розглядатися як один з механізмів, що зумовлює протизапальний ефект BRO, який спостерігався *in vivo*. Проте остаточне підтвердження інгібівання 5-ЛО *in vivo* наразі відсутнє; зниження рівня ЛТ, яке ми спостерігали на моделі щурів, може мати вторинну природу для зменшення міграції запальних клітин і бути зумовленим іншими непов'язаними механізмами.

Подальші дослідження мають надати більш детальну інформацію про фармакокінетику компонентів BRO для виявлення біодоступних речовин, які співвідносяться з фармакодинамічним ефектом в організмі людини. Крім того, дослідження, що оцінюють вплив на інший тип медіаторів запалення та метаболічні шляхи цитокінів без участі ейкозаноїдів, мають повністю охарактеризувати профіль фармакологічної активності BRO.

Висновки

Бронхипрет® ТП – рослинний лікарський засіб, який успішно застосовується для лікування гострого бронхіту, – демонструє значну протизапальну активність у тваринній моделі ЛПС-індукованого запалення легень та інгібівання утворення ейкозаноїдів. Дослідження *in vitro*, проведені зі стимульованими клітинами крові щурів і людини, показали, що суміш екстрактів чебрецю/первоцвіту інгібує переважно вивільнення ЛТ і що 5-ЛО може стати прийнятною фармакологічною мішенню. Інгібуюча активність встановлена передусім у компоненті екстракту чебрецю, де були виявлені декілька активних індивідуальних хімічних компонентів, які, можливо, сприяють його 5-ЛО-інгібуючій активності. Наші висновки є базою для подальшого з'ясування зв'язків фармакокінетики/фармакодинаміки, які доповнюють наше розуміння фармакологічних механізмів суміші екстрактів чебрецю/первоцвіту в препараті Бронхипрет® ТП.

Стаття друкується в скороченні.

Список літератури знаходиться в редакції.

Seibel J., Wonnemann M., Werz O., Lehner M.D. A tiered approach to investigate the mechanism of anti-inflammatory activity of an herbal medicinal product containing a fixed combination of thyme herb and primula root extracts. *Clinical Phytoscience International Journal of Phytomedicine and Phytotherapy* 2018; 4: 4. DOI 10.1186 / s40816-018-0062-2.