

Antonietta Rossi, Friederike Dehm, Christoph Kiesselbach та співавт.

Інноваційна формула сухого екстракту Синупрет® проявляє виражену протизапальну ефективність *in vivo*

Синупрет® часто використовується в якості лікарського засобу рослинного походження для лікування синуситу. Ймовірно, переваги препарату Синупрет® зумовлені його протизапальним ефектом. У цьому дослідженні вивчався вплив лікарської комбінації Синупрет® (SIN), а також вперше отриманого сухого екстракту Синупрет® (SIN DE), який містить більш високі концентрації активних компонентів, а також більш виразну протизапальну дію, що продемонстровано на моделі гострого запалення *in vivo*: плеврит, спричинений каррагінаном, у щурів. І SIN, і SIN DE щурам вводили перорально в дозах 100 мг/кг (низька доза) та 500 мг/кг (висока доза) за 1 год до внутрішньоплевральної ін'єкції каррагінану. Хоча і SIN, і SIN DE через 4 год після ін'єкції каррагінану достовірно зменшували об'єм ексудату та кількість лейкоцитів у ньому, при введенні як високих, так і низьких доз SIN DE був більш дієвим, ніж SIN у низькій дозі, що вказує на його більшу ефективність. Крім того, новий сухий екстракт SIN DE, на відміну від SIN, у дозі 500 мг/кг значуще знижував рівні простагландину (ПГ) E₂ в ексудаті та циклооксигенази-2 (ЦОГ-2) у легенях. SIN та SIN DE виявили виражений протизапальний ефект при пероральному прийомі, що робить доцільним їх терапевтичне використання в лікуванні синуситу та інших вірусних/мікробних інфекцій носа, асоційованих із запаленням. До того ж, з огляду на вищу ефективність та супутнє зниження експресії ЦОГ-2 та ПГ E₂, новий сухий екстракт SIN DE може мати переваги над стандартною формулою SIN.

Введення

Запальні захворювання супроводжуються нейтрофільною інфільтрацією, вивільненням цитокінів (наприклад, фактору некрозу пухлин (ФНП)-α та інтерлейкіну (ІЛ)-1β) та утворенням прозапальних медіаторів (наприклад, лейкотриєнів (ЛТ) та ПГ. Результати кількох експериментальних досліджень показали, що ці медіатори сприяють пошкодженню тканин, характерному для запального процесу *in vivo*. Крім того, активовані нейтрофіли виділяють низку протеаз (наприклад, лейкоцитарну еластазу або катепсин G) і генерують реактивні форми кисню, які руйнують збудника, але водночас пошкоджують клітини й тканини господаря. Вплив на продукцію або ефекти цих прозапальних медіаторів проявляє переваги в різних моделях запалення, включаючи модель плевриту, індуковану каррагінаном.

Синупрет® — лікарський засіб рослинного походження, який часто використовується в терапії гострого або хронічного риносинуситу в Німеччині та інших європейських країнах. До складу Синупрет® входить корінь тирличу жовтого (*Gentianae radix*), квітки первоцвіту з чашечкою (*Primulae flos cum calycibus*), квітки бузини (*Sambuci flos*), трава шавлію (*Rumicis herba*) і трава вербени (*Verbenae herba*). Протизапальний ефект Синупрет® та одного з його рослинних компонентів був продемонстрований у лікуванні каррагінан-індукованого запалення лапи щура. У дослідженні за участю пацієнтів із гострим отитом Синупрет® призначався по 2 таблетки 3 р./день протягом 10 днів. У результаті через 10 днів значно покращився стан хворих, що супроводжувалося помірним зниженням рівнів прозапальних цитокінів ФНП-α та ІЛ-6 у крові. На основі високостандартизованого сухого екстракту добре вивченої комбінації п'яти рослинних препаратів був розроблений новий лікарський засіб рослинного походження Синупрет®, який містить більш високі концентрації діючих речовин. У цьому дослідженні оцінювалася здатність препарату Синупрет® (SIN) і нещодавно розробленого сухого екстракту SIN DE (активна субстанція препарату Синупрет® Екстракт) пригнічувати запальні процеси в стандартній моделі гострого запалення (каррагінан-індукований плеврит у щурів), яка широко застосовується для оцінки протизапальної активності сполук *in vivo*. Отримані результати показують, що і SIN, і SIN DE є ефективними протизапальними засобами, однак нова формула SIN DE має вищу ефективність проти такої SIN, а також значуще пригнічує синтез ПГ E₂ та експресію ЦОГ-2. Таким чином, нещодавно розроблений сухий екстракт SIN DE має перспективний фармакологічний профіль, який обґрунтовує потенціал його терапевтичного використання.

Дослідження

Матеріали

SIN (номер партії D_100) надавався виробником. Суміш представляла собою порошкоподібну субстанцію кореня тирличу жовтого, квіток первоцвіту з чашечкою, квіток бузини, трави шавлію і трави вербени у фіксованому співвідношенні 1:3:3:3:3. SIN DE, сухий екстракт (спеціальний екстракт, номер партії 1011) також надавав виробник. Склад сухого екстракту SIN DE був ідентичним такому SIN, однак SIN DE містив більш високі концентрації активних інгредієнтів. Якість лікарських засобів рослинного походження (вихідний матеріал) була специфікована відповідно до чинної настанови ЕМА для лікарських засобів рослинного походження. Виробничий процес виготовлення SIN і SIN DE валідований згідно з вимогами GMP.

Для аналізу SIN та SIN DE в моделі плевриту субстанції — не довше ніж за 4 год до використання — були знову перерозчинені у воді кімнатної температури за допомогою магнітного змішувального пристрою. Отримані гомогенні суспензії використовувалися для подальшого аналізу.

Λ-Каррагінан IV типу, виділений із *Gigartina aciculaire* та *Gigartina pistillata*, було придбано в Sigma-Aldrich (м. Мілан, Італія). 3Н-ПГ E₂ був отриманий від PerkinElmer Life Sciences (м. Мілан, Італія), антитіла до ПГ E₂, а також інші реагенти та сполуки — теж від Sigma-Aldrich.

Тварини

Самці щурів лінії Wistar Han (220–230 г, м. Сан-П'єтро аль-Натісон, Італія) перебували в контрольованому середовищі, стандартний корм для гризунів та вода надавалися за потреби. Догляд за тваринами здійснювався відповідно до італійських регуляторних норм захисту тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях, а також згідно з нормативними вимогами Європейського Союзу.

Каррагінан-індукований плеврит

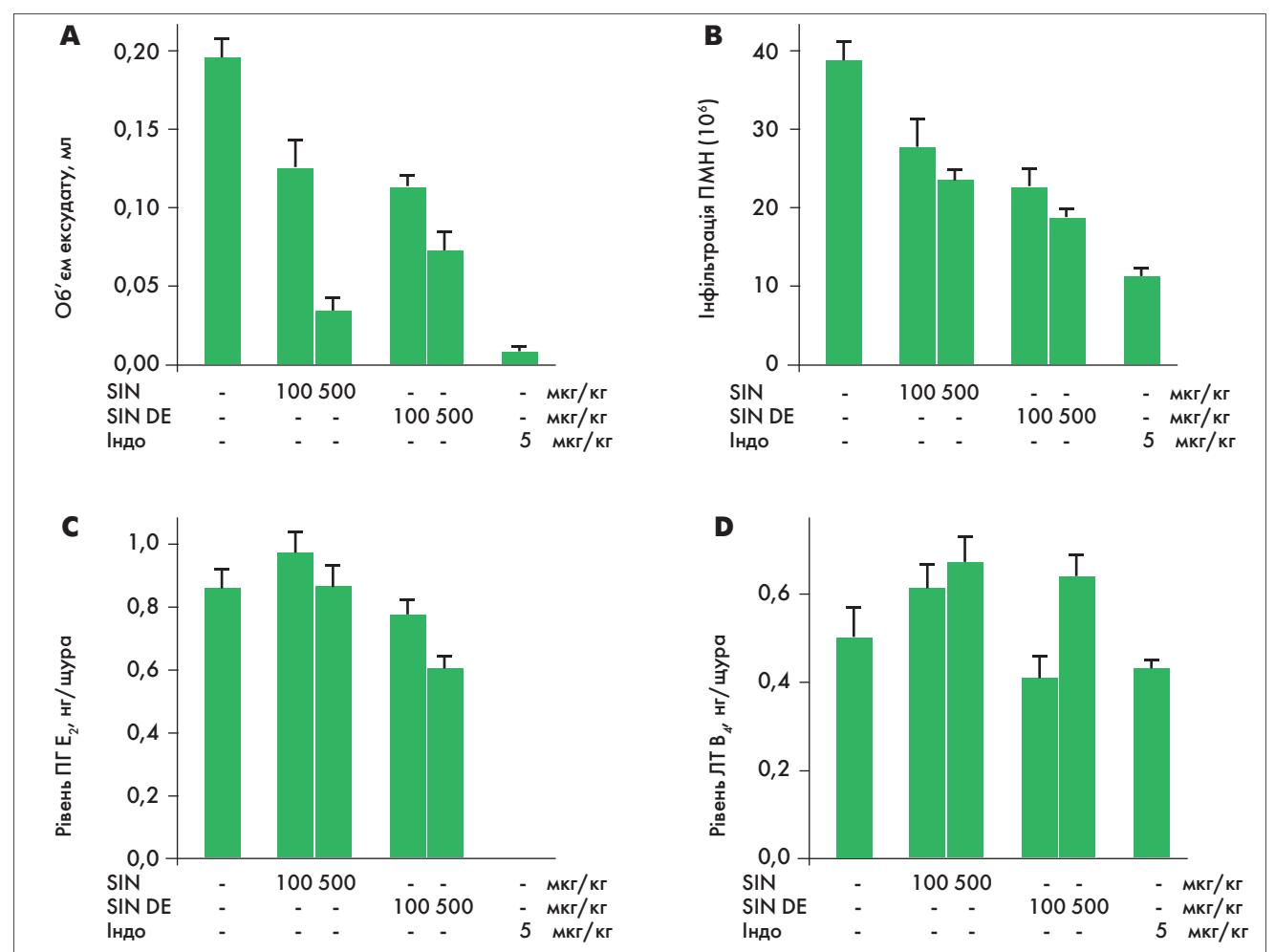
Щурів розділили на 6 груп (n=10 у кожній групі). SIN або інноваційний SIN DE (100 і 500 мг/кг відповідно), або індометацин (5 мг/кг), або плацебо (1 мл води) вводили перорально кожній із груп за 1 год до введення каррагінану. Щури отримували анестезію ефіром (4%), змішаним з O₂ (0,5 л/хв), N₂O (0,5 л/хв), після чого їм розрізали шкіру та м'язи на рівні лівого шостого міжреб'я і в плевральну порожнину вводили фізіологічний розчин (0,2 мл) або 1% λ-каррагінан IV типу (0,2 мл). Рану зашивали. Чотири години потому після ін'єкції каррагінану тварин усипляли за допомогою CO₂. Грудну клітку обережно відкривали, а плевральну порожнину промивали 2 мл сольового розчину, що містив гепарин (5 ОД/мл). Ексудат і промивні води аспірували і вимірювали загальний об'єм. Якщо ексудат був забруднений кров'ю, зразок не оцінювався. Поліморфно-ядерні нейтрофіли (ПМН) в ексудаті були перерозчинені

у фосфат-буферному сольовому розчині і підраховані за допомогою оптичного світлового мікроскопа в камері Беркера після прижиттєвого фарбування трипановим синім. Ексудати центрифугували з відносною відцентровою силою 800 g протягом 10 хвилин. Кількість ЛТ B₄ та ПГ E₂ у надосадовій рідині аналізували за допомогою імуоферментного та радіоімунного аналізу (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) відповідно до протоколу виробника. Рівні ФНП-α та ІЛ-1β у надосадовій рідині оцінювали за допомогою наборів ELISA (R&D Systems, Minneapolis, USA). Результати виражалися в нанограмах на щура.

Аналіз експресії ЦОГ-2 в легенях щурів

Через 4 год після введення каррагінану легені гомогенізували в буфері, що містив 20 ммоль (4- (2-гідроксietил) -1-піперазин етансульфонові кислоти рН 7,6, 1,5 ммоль магнію хлориду (MgCl₂), 400 ммоль натрію хлориду (NaCl), 1 ммоль етилендіамінтетраоцтової (ЕДТА) кислоти, 1 ммоль етиленгліколь-тетра оцтової кислоти, 1 ммоль дитіотреїтолу, 0,5 ммоль фенілметилсульфонілфториду, 15 мг/мл інгібітору трипсину, 3 мг/мл пепстатину, 2 мг/мл лей-пептину, 40 мкмоль бензамідину, 1% нонідету P-40, 20% гліцерину та 50 ммоль натрію фториду (NaF). Гомогенати центрифугували з відносною відцентровою силою 10000 g протягом 15 хв при температурі 4 °C, збирали надосадову рідину і визначали концентрацію білка за допомогою білкового спектру Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories S.r.l., м. Мілан, Італія). Однакову кількість білка (30 мкг) змішували з гелевим завантажувальним буфером (50 ммоль трометамолу, 10% додецилсульфату натрію, 10% гліцеролу, 10% 2-меркаптоетанолу та 2 мг/мл бромфенолу) у співвідношенні 1:1, кип'ятили протягом 3 хв і центрифугували з відносною відцентровою силою 10000 g протягом 10 хвилин. Кожен зразок завантажували та електрофорезували на 10% додецилсульфат натрію-поліакриламідному гелі. Білки перемішувалися на мембрани з нітроцелюлози. Мембрани блокували 0,1% натрій-фосфатним буфером із Tween (PBS-Tween), що містив 5% знежирене сухе молоко. Після блокування мембрани інкубували з первинними антитілами протягом 2 год при кімнатній температурі. Моноклональні антитіла кролика anti-COX-2 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) розводились у співвідношенні 1:500 у 0,1% PBS-Tween із 5% знежиреним сухим молоком. Після інкубації мембрани 6 раз промивали 0,1% PBS-Tween та інкубували протягом години при кімнатній температурі з вторинними антитілами, кон'югованими пероксидазою хрому

Продовження на стор. 22.

Рис. 1. Зміни об'єму ексудату, інфільтрації ПМН та рівнів ПГ E₂, ЛТ B₄ на тлі застосування SIN або SIN DE

Antonietta Rossi, Friederike Dehm, Christoph Kiesselbach та співавт.

Інноваційна формула сухого екстракту Синупрет® проявляє виражену протизапальну ефективність *in vivo*

Продовження. Початок на стор. 21.

(Dako Cytomation, м. Глострап, Данія) у розведенні 1:1000 в 0,1% PBS-Tween із 5% знежиреним сухим молоком. Мембрани промивали й смуги білка виявляли за допомогою покращеної системи хемолюмінесценції (GE Healthcare, м. Фрайбург, Німеччина). Денситометричний аналіз проводили за допомогою кількісної системи візуалізації Fluor S (Bio-Rad Laboratories S.r.l., м. Мілан, Італія).

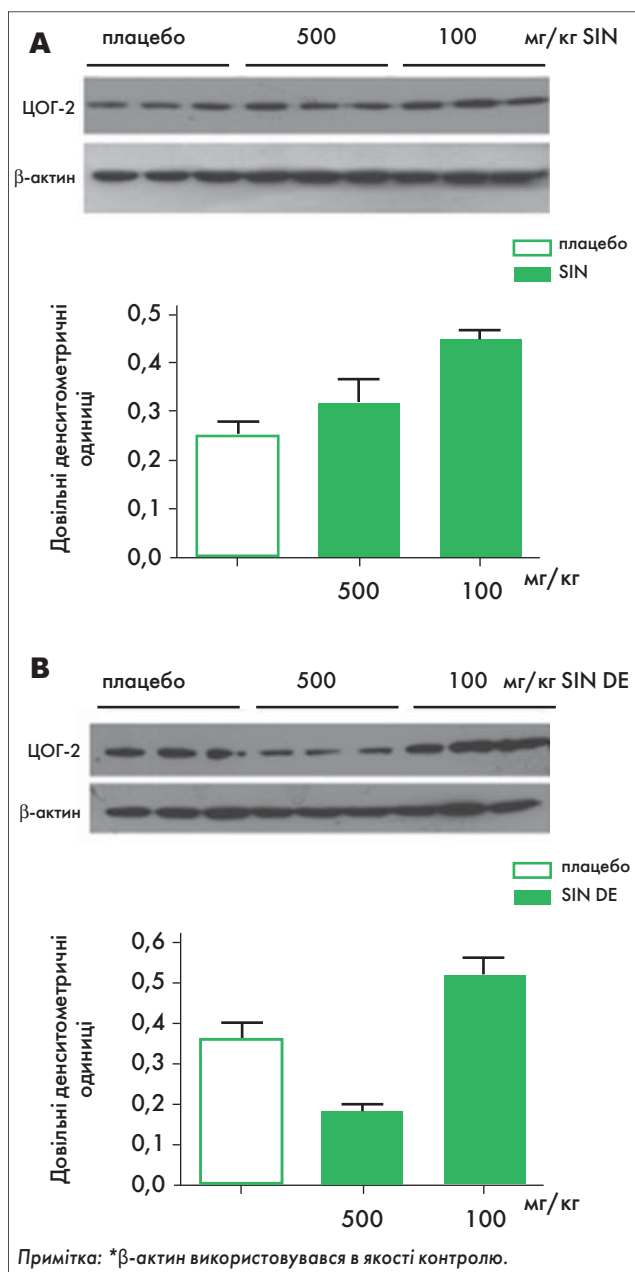
Статистичний метод

Усі значення на малюнках і в тексті представлені як середнє значення $\pm$ стандартне середнє квадратичне відхилення (SEM) з п спостережень, де п відповідає кількості досліджуваних тварин. Результати аналізували за допомогою одностороннього ANOVA, а потім, ретроспективно, за допомогою тесту Тьюкі. Значення $p < 0,05$ вважалося статистично значущим.

Результати

Пригнічення утворення ексудату та інфільтрації ПМН при каррагінан-індукованому плевриті

Для оцінки ефективності SIN та SIN DE в якості протизапальних агентів *in vivo* використовували модель каррагінан-індукованого плевриту в щурів. Ін'єкція каррагінану в плевральну порожнину протягом 4 год спричиняла гостру запальну реакцію, яка супроводжувалася накопиченням рідини з високим вмістом ПМН (рис. 1, А/В). Попередній пероральний прийом (за 1 год) 100 або 500 мг/кг SIN або SIN DE пригнічував запальну відповідь, індуковану внутрішньоплевральним введенням каррагінану, про що свідчить значне зниження продукції ексудату та числа ПМН у рідині, аспірованій із плевральної порожнини (рис. 1, А/В). SIN DE, у низькій дозі, виявився більш ефективним, ніж SIN. Як і очікувалося, індометацин (5 мг/кг, перорально), використаний як препарат порівняння, значуще пригнічував запальну відповідь (рис. 1, А/В).



Аналіз рівня ейкозаноїдів у плевральних ексудатах щурів із каррагінан-індукованим плевритом

Ейкозаноїди, тобто лейкотрієни та простагландини, які утворюються 5-ліпоксигеназним та циклооксигеназним шляхом, є головними низькомолекулярними сполуками, що опосередковують численні прозапальні реакції. При каррагінан-індукованому плевриті в щурів в ексудаті виявляються підвищені рівні ЛТ B_4 і ПГ E_2 . SIN ніяк не впливав на рівні ПГ E_2 та ЛТ B_4 . При введенні SIN DE в дозі 100 мг/кг спостерігалася помірна зниження рівня ПГ E_2 (10%), а в більш високій дозі (500 мг/кг) SIN DE призвів до статистично значущого пригнічення утворення ПГ E_2 (30%, $p < 0,01$; рис. 1, С). SIN DE не впливав на рівень ЛТ B_4 (рис. 1, D). Як і очікувалося, інгібітор ЦОГ, індометацин, блокував синтез ПГ E_2 , але не впливав на рівень ЛТ B_4 .

Аналіз експресії ЦОГ-2 в легенях щурів, які отримали каррагінан

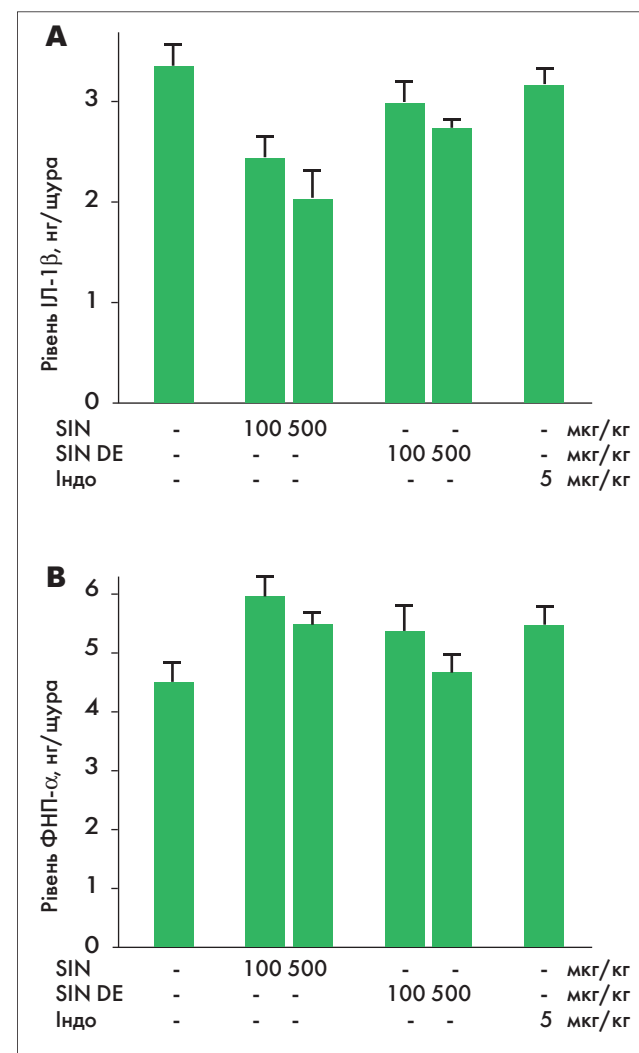
Вестерн-блоттинг виявив значне зростання рівня ЦОГ-2 в щурів із групи плацебо (рис. 2). У легенях щурів, які отримували високу дозу SIN DE (500 мг/кг), рівень ЦОГ-2 знизився приблизно на 42% (рис. 2, В). У щурів, які отримували SIN, рівень ЦОГ-2 був порівняним із таким у групі плацебо (рис. 2, А).

Аналіз рівнів цитокінів у плевральних ексудатах щурів, які отримали каррагінан

Вивільнення активованими ПМН запальних цитокінів, таких як ФНП- α та ІЛ-1 β , є основним біохімічним процесом, що ініціює, підтримує та забезпечує поширення запальної реакції в пошкоджених тканинах. Попередній прийом SIN або SIN DE в дозі 100 мг/кг знизив рівень ІЛ-1 β на 27 і 11% ($p > 0,05$) відповідно. Вища доза (500 мг/кг) знижувала рівень ІЛ-1 β на 40% ($p < 0,01$) і 19% відповідно (рис. 3, А). Ні SIN, ні SIN DE не впливали на рівень ФНП- α (рис. 3, В).

Обговорення

І SIN, і SIN DE достовірно пригнічували запальну реакцію, при цьому сухий екстракт SIN DE виявився більш ефективним, ніж SIN у дозі 100 мг/кг. Біохімічні механізми, які лежать в основі протизапальної активності SIN DE, включають зниження експресії ЦОГ-2 і супутнє зниження продукції прозапального ПГ E_2 , у той час як активність SIN переважно зумовлена порушенням



виділення ІЛ-1 β . Отже, можна зробити висновок, що SIN і SIN DE за умов перорального прийому виявляють протизапальну активність, причому інноваційний сухий екстракт SIN DE має певні переваги на д SIN, що вказує на позитивний терапевтичний профіль препарату в терапії синуситу.

Синупрет® широко використовується в якості фітотерапії при лікуванні риносинуситу завдяки своїм секретолітичним, протівірусним та антибактеріальним властивостям. Препарат розріджує слиз, зменшує закладеність носа, відчуття тиску в обличчі та головний біль і проявляє ефект як при вірусних, так і при бактеріальних інфекціях. У літературі повідомлялося й про протизапальну активність цього препарату. Результати поточного дослідження однозначно підтверджують протизапальні властивості Синупрет® *in vivo*. Пероральний прийом препарату достовірно та дозозалежно зменшував утворення ексудату в плевральній порожнині та його інфільтрацію прозапальними ПМН у щурів із каррагінан-індукованим плевритом.

Отримані результати дають уявлення про механізми, що лежать в основі протизапальної дії Синупрет®. Плеврит супроводжувався утворенням ейкозаноїдів та вивільненням цитокінів, необхідних для індукції запальної відповіді. Протягом 4 год після введення каррагінану значуще зростала експресія ЦОГ-2, що супроводжувалося збільшенням утворення ПГ E_2 . Останній є ключовим медіатором запальної відповіді, а протизапальна активність нестероїдних протизапальних засобів корелює зі зниженням виділення згаданого ПГ [19]. Індометацин, який використовувався як препарат порівняння і який діє шляхом інгібування ЦОГ-1/2, знизив рівень ПГ E_2 нижче порогового рівня, що супроводжувалося майже повною відсутністю ексудату та інфільтрації ПМН. Важливо, що індометацин практично не впливав на рівні ЛТ B_4 , ФНП- α та ІЛ-1 β . Це підтверджувало положення про критичну роль простаноїдів у розвитку та підтримці запального процесу. Висока доза SIN DE блокувала експресію ЦОГ-2 і водночас суттєво знижувала рівень ПГ E_2 . SIN DE, як і індометацин, не впливав на рівні ЛТ B_4 і ФНП- α , але помірно знижував кількість ІЛ-1 β . Це дає підстави припустити, що в основі протизапального впливу SIN DE лежить саме пригнічення ПГ E_2 . З іншого боку, SIN також значуще зменшував утворення ексудату та інфільтрацію ПМН, але не знижував рівень експресії ЦОГ-2 та ПГ E_2 . Ймовірно, це пов'язано з тим, що деякі біоактивні компоненти препаратів досягають необхідної для впливу на ЦОГ-2 та ПГ E_2 концентрації лише в групі високих доз SIN DE. Однак SIN істотно знизив рівень ІЛ-1 β , що може бути альтернативним механізмом протизапальної активності. Результати попередніх доклінічних досліджень виявили, що введення поліклональних до ІЛ-1 β антитіл зменшувало інфільтрацію ПМН на моделях гострого запалення в щурів (плеврити, спричинені зимосаном і каррагінаном).

Сьогодні ми можемо лише міркувати про біохімічні механізми, завдяки яким SIN знижує рівень ІЛ-1 β , а SIN DE інгібує ЦОГ-2. З одного боку, SIN може впливати на експресію ІЛ-1 β подібно глюкокортикоїдам, які блокують транскрипцію гену ІЛ-1 β , впливаючи на ядерний фактор-каппа В (NF κ B). З іншого — SIN здатен впливати на посттрансляційні механізми та секрецію ІЛ-1 β . Пригнічення ЦОГ-2 і пов'язане з ним зниження синтезу ПГ E_2 під впливом SIN DE також може бути зумовлено декількома можливими механізмами, зокрема перешкодою сигнальним молекулам, індукованим каррагінаном (включаючи NF κ B), або деградацією мРНК ЦОГ-2. Також слід зазначити, що можливі механізми протизапальної дії SIN та SIN DE можуть стосуватися прозапальних процесів і молекул, які не були предметом цього дослідження, наприклад пригнічення інших цитокінів (ІЛ-2, -6, -8, -12, -23), секреції протеаз, утворення реактивних форм кисню, експресії синтази оксиду азоту (NO), а також генерування NO та пригнічення вивільнення гістаміну.

Таким чином, SIN і SIN DE мають достовірну протизапальну активність при каррагінан-індукованому плевриті в щурів. Це підтверджує доцільність терапевтичного використання Синупрет® при синуситі — захворюванні, у патогенезі якого запалення відіграє одну з ключових ролей. Отримані результати свідчать про необхідність подальшого аналізу *in vitro* деталей біохімічних і молекулярних механізмів, які лежать в основі протизапальних ефектів SIN та SIN DE.

A. Rossi et al. The novel Sinupret® dry extract exhibits anti-inflammatory effectiveness *in vivo* // Fitoterapia 83 (2012) 715-720.

Переклад з англ. Ганни Кирпач



Bionorica®

Нежить? Синусит?

Синупрет® екстракт

4 - кратна концентрація*



усуває нежить¹



полегшує носове дихання²



запобігає ускладненням³

Лікування гострого риносинуситу⁴



ПАНАЦЕЯ
ПРЕПАРАТ
РОКУ 2017

Синупрет® екстракт. Показання для застосування: Гострі неускладнені запальні захворювання придаткових пазух носа (гострі неускладнені риносинусити). Спосіб застосування та дози: Дорослі та діти віком від 12 років по 1 таблетці 3 рази на день. Протипоказання: Підвищена індивідуальна чутливість до компонентів препарату. Побічні ефекти: інколи спостерігаються шлунково-кишкові розлади, реакції підвищеної чутливості шкіри та алергії.

1-2. Сучасна фармакотерапія простудних захворювань і їх найбільш частих ускладнень (Ю.Мітін, Л.Криничко) «Здоров'я України» № 8 (141) 2006.

3. Препарат Синупрет в лікуванні і профілактиці ускладнень гострої респіраторної інфекції у дітей (Е. Шахова) РМЗ, 2011, № 5, Medical Nature № 4 (12) 2012 стр. 19-23; Доцільність застосування фітопрепарату Синупрет при лікуванні гострих респіраторних вірусних інфекцій у дітей (С.Ключніков), Medical Nature № 4 (12) 2012 стр 24-26.

4. Рекомендації МОЗУ з лікування ГРС від 11.02.2016 №85.

* Ø 720 мг застосованої рослинної сировини у Синупрет® екстракт відповідає 160 мг сухого екстракту у порівнянні з 156 мг рослинної сировини у Синупрет® форте

** За даними аналітичних досліджень компаній "Бізнес-Кредит" та "SMD" за період III та IV квартал 2016 р. та I та II квартал 2017 р.

Синупрет® екстракт. Р.П. № UA/15267/01/01 від 15.08.16.

Виробник: Біонорика (Німеччина).

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, симпозіумах з медичної тематики. Матеріал призначений виключно для спеціалістів у галузі охорони здоров'я.



корінь
генціани



квітки
бузини



квітки
первоцвіту
з чашечкою



трава
вербени



трава
щавлю