

## Standartizuoto mirtolio ir kitų medžiagų poveikis kvėpavimo takams, remiantis cilijų virpėjimo dažnio ir mukocilijinio klirenso parametrais

Frank Begrow • Corinna Bockenholt • Martina Ehmen • Thomas Wittig • Eugen J. Verspohl

Išplėstinį straipsnį žr. [www.advancesintherapy.com](http://www.advancesintherapy.com)

Gauta: 2012 m. vasario 7 d., internete paskelbta: 2012 m. balandžio 2 d.

© „Springer Healthcare“ 2012

### SANTRAUKA

**Įžanga.** Standartizuotas mirtolis – tai distiliavimo būdu gautas fitoterapinis vaistas, kurį sudaro keli komponentai. Pagrindiniai preparate esantys monoterpenui (d-limonenas, 1,8-cineolis ir alfa pinenas) *in vitro* ir *in vivo* naudojami kaip biologiniai žymekliai. Standartizuotas mirtolis skystina gleives, gerina gleivių šalinimą ir jų išsiskyrimą bei veikia kaip uždegimą slopinanti medžiaga ir antioksidantas. Tyrimo tikslas buvo iširti įvairios koncentracijos standartizuoto mirtolio poveikį pelių mukocilijiniam klirensui *in vivo* ir cilijų (virpamųjų blakstienėlių) virpėjimo dažniui (angl. *Ciliary Beat Frequency*, CBF), naudojant žiurkių trachėjos žiedus. Metodai. Palyginti 1,8-cineolio ir N-acetilcisteino (NAC) poveikio duomenys. Kaip teigiama kontrolės medžiaga naudotas salbutamolis. CBF matuotas naudojant žiurkių trachėjos eksplantus ir greitai veigiamą vaizdo kamerą, sujungtą su mikroskopu su specialia programine įranga. Mukocilijinis klirensas nustatytas mikrodializės metodu, matuojant greitėjimą fluorescuojančiame trachėjos mėginyje *in vivo*. Rezultatai. Standartizuotas mirtolis pagreitino ir CBF, ir mukocilijinį transportą, o poveikis buvo tiesiogiai proporcingas koncentracijai. Reikšmingas poveikis CBF nustatytas, kai mirtolio koncentracija 0,01 % ( $P < 0,01$ ), o atliekant mukocilijinio klirenso eksperimentus – kai dozė 17,1 mg/kg kūno masės ( $P < 0,05$ ), atsižvelgiant į žmonėms tinkamas dozes. Nuo 1,8-cineolio dozės, santykiškai tinkamos žmonėms, *in vivo* padidėjo tik mukocilijinis klirensas, poveikio CBF nenustatyta. Nuo kraštutiniai aukštų mirtolio dozių poveikis CBF, palyginti su salbutamoliu, papildomai nepadidėjo. Palyginti su NAC, taip pat skirtu santykiškai žmogui tinkamomis dozėmis, nustatyta, kad standartizuotas mirtolis turi tendenciją būti veiksmingesnis.

F. Begrow • C. Bockenholt

Department of Pharmacology, Institute of Medicinal Chemistry, Westfälische Wilhelms-University of Münster, Hittorfstr, 58-62, D-48149 Münster, Vokietija

M. Ehmen • T. Wittig

Pohl-Boskamp GmbH & Co. KG, Hohenlockstedt, Vokietija

E. J. Verspohl (✉)

Department of Pharmacology, Institute of Medicinal Chemistry, Westfälische Wilhelms-University of Münster, Hittorfstr, 58-62, D-48149 Münster, Vokietija; el. paštas: [verspoh@uni-muenster.de](mailto:verspoh@uni-muenster.de)



Išplėstinis straipsnis, skirtas „Advances in Therapy“, pateikiamas žurnalo tinklalapyje: [www.advancesintherapy.com](http://www.advancesintherapy.com)

**Išvada.** Susumavus, šie duomenys rodo, kad standartizuotas mirtolis yra farmakologiškai svarbus vaistas, kuris, skiriant santykiškai žmonėms tinkamomis dozėmis, turi teigiamą poveikį abiem matuotiems parametrams: CBF ir mukocilijiniam klirensui *in vivo*.

**Raktažodžiai:** 1,8-cineolis, cilijų virpėjimo dažnis, mukocilijinis klirensas, standartizuotas mirtolis, N-acetilcisteinas, trachėja

## ĮŽANGA

Kvėpavimo takų ligos, kaip antai ūminis arba lėtinis bronchitas ir astma, dažnai pasireiškia ir kvėpavimo takų obstrukcija bei gleivių šalinimo virpant blakstienėlėms (cilijoms) – trachėjos mukocilijinio klirenso – suprastėjimu [1, 2]. Dėl šios priežasties gali susidaryti gleivių sankaupos ir padidėja plaučių infekcijų rizika. Siekiant išvengti šių pasekmių, reikia pagerinti mukocilijinio transporto sistemą. Veiksmingas mukocilijinis klirensas priklauso nuo abiejų veiksnių: tinkamos gleivių gamybos (klampos) ir cilijų aktyvumo (klirenso) [3, 4]. Nustatyta, kad cilijų virpėjimo dažnį (angl. CBF) ir su juo susijusį gleivių šalinimą pagerina eteriniai aliejai, saponinai ir beta 2 simpatomimetikai, pvz., salbutamolis [5]. Mukolitikai, kaip antai N-acetilcisteinas (NAC), depolimerizuoja gleivių muciną, todėl sumažėja jų klampa. Sekretolitikai gali paskatinti mucino išsiskyrimą iš taurinių ląstelių, todėl sumažėja gleivių klampa ir jų šalinimas (transportas) gali vykti veiksmingiau. Tokį poveikį turi saponinai arba eteriniai aliejai.

Standartizuotas mirtolis – tai distiliavimo būdu gautas fitoterapinis vaistas, kurį sudaro keli komponentai. Pagrindiniai preparate esantys monoterpenai (d-limonenas, 1,8-cineolis ir alfa pinenas) *in vitro* ir *in vivo* naudojami kaip biologiniai žymekliai. Žinoma, kad standartizuotas mirtolis teigiamai veikia gleivių sluoksnio gamybą ir transportą, nes turi sekretomotorinį [6-9], sekretolitinį [10] ir mukolitinį [11-13] poveikį. Taip pat nustatyta, kad standartizuotas mirtolis veikia kaip uždegimą slopinanti medžiaga ir antioksidantas [14-16]. Be to, anksčiau teigiamas jo poveikis CBF išmatuotas nosies ančiuose [6–9, 17]. Šio tyrimo tikslas buvo šiuolaikiškais metodais įvertinti standartizuoto mirtolio poveikį CBF ir mukocilijiniam klirensui *in vivo* ir palyginti su kitomis veikliosiomis ir neveikliosiomis medžiagomis.

## MEDŽIAGOS IR METODAI

### Gyvūnai

Trachėjos mukocilijinio transporto funkcijos tyrimams naudotos C57BL/6 pelės („Charles River Laboratories“, 97633 Sulzfeld, Vokietija). CBF eksperimentams naudotos vietinio kamieno Wistar žiurkių patelės, sveriančios 200–320 („Charles River Laboratories“, 97633 Sulzfeld, Germany). Pelės ir žiurkės buvo šeriamos neribojant ėdesio ir vandens (*ad libitum*). Tyrimus aprobavo Vokietijos gyvūnų apsaugos organizacija (vok. *Deutscher Tierschutzbund*).

### Cheminės medžiagos ir vaistai

Salbutamolį, 1,8-cineolį, NAC ir etanolį tiekė bendrovė „Sigma-Aldrich“ (Steinheim, Vokietija). Standartizuotą mirtolį ir vidutinės grandinės trigliceridus (VGT) tiekė bendrovė „Pohl-Boskamp GmbH“ (25551 Hohenlockstedt, Vokietija). Fluorescencinį dažiklį „Rhodamine 123“ tiekė bendrovė „Sigma-Aldrich“ (Steinheim, Vokietija).

### CBF

CBF išmatuotas naudojant žiurkių trachėjos eksplantus. Gyvūnai nužudyti taikant dietileterio nejautrą; naudoti trachėjos eksplantai nuo gerklų iki išsišakojimo. Trachėja išpjauta pašildytame buferyje (LHC-9, „Invitrogen“, Carlsbad, CA, JAV) ir nuo jos atsargiai pašalinti šalia esantys riebalai ir jungiamasis audinys. Tada trachėja supjaustyta 0,5–1 mm kremzliniais žiedais. Stabilizuotos būklės kremzliniai žiedai laikyti pašildytoje terpėje ne trumpiau nei 1 parą 37 °C temperatūroje, atmosferoje esant 5 % CO<sub>2</sub>. Terpė keista kas 3 paras. Trachėjos žiedų cilijų normalus bazinės linijos CBF per iki 7 parų laikotarpį buvo 10–20 Hz.

### Duomenų registravimas

Eksperto dieną, po 15 minučių eksplanto stabilizavimo inkubacijos kameroje, užregistruotas bazinis

tam tikros trachėjos srities CBF, kuris eksperimento metu naudotas kaip atskaitos vertė. Paskui CBF registruotas kiekvieną minutę per 10 minučių laikotarpį (stabiliąją fazę) ir apskaičiuotas šių 10-ties matavimų vidurkis. Pridėjus atskirų medžiagų, kitas 20 minučių vėl kas minutę matuotas CBF ir apskaičiuotas matavimų vidurkis. Kaskart prieš pridėdant kitos koncentracijos medžiagos arba kitos medžiagos, inkubacijos kamera su trachėjos žiedu kruopščiai išskalauta. Kadangi gerai žinoma, kad CBF parametras jautriai reaguoja į infliukso ir eflukso perfuzijos kameroje kitimą, pastovi judėjimo trachėjos paviršiumi sparta buvo palaikoma naudojant sudėtingą peristaltinių siurblių sistemą. Trachėjos žiedas kameroje buvo pritvirtintas pjūvių tvirtikliu ir prieš pasirenkant kitą medžiagą pakeičiamas nauju. Kadangi CBF labai priklauso nuo temperatūros [18], naudojant specialių šildymo įrenginį buvo palaikoma pastovi per mikroskopo platformą tekančios terpės temperatūra. Virpančių cilijų vaizdai (100/sek.) užfiksuoti greitaeigė vaizdo kamera („Basler® A602f-2“, „BaslerVision Technologies“, Ahrensburg, Vokietija), prijungta prie inversinio mikroskopo („Eclipse® Ti-U“, „Nikon GmbH“, Diuseldorfas, Vokietija). Vaizdų sekos analizuotos naudojant programinę įrangą „LabView® Vision Acquisition 8.5“ („National Instruments GmbH“, Miunchenas, Vokietija) ir „SAVA® 2.02“ („Ammons Engineering“, „Mt. Morris“, JAV).

Visi eksperimentai atlikti naudojant „Roswell Park Memorial Institute“ (RPMI) terpę (PAA, „Colbe“, Vokietija). Atsižvelgiant į RPMI poveikį duomenys sunorminti pagal 100 % skalę be pridėtų medžiagų registravimo pradžioje. CBF eksperimentų metu atlikta 10 matavimų stabilioju periodu, paskui 20 atskirų matavimų (veikiant medžiagai). Eksperimentai kartoti po šešis kartus su kiekviena atitinkamos koncentracijos medžiaga.

Skaičiuojant taikytiną visų medžiagų, naudotų CBF eksperimentams, koncentraciją, kaip pagrindiniais parametrais remtasi jų biologiniu prieinamumu ir pasiskirstymo tūriu. Siekiant ištirti nuo dozės priklausomą poveikį, iš esmės buvo naudojamas keturių skirtingų koncentracijų (0,001; 0,010; 0,050 ir 0,100 %) standartizuotas mirtolis. Naudoto 1,8-cineolio koncentracija buvo 0,05 %. Standartizuotas mirtolis ir 1,8 cineolis iki atitinkamos koncentracijos ištirpinti 0,45 % etanolyje. Naudoto NAC koncentracija buvo 2,4 µg/ml ir 24 µg/ml, o salbutamolio – 0,3 µg/ml. Šios medžiagos ištirpintos vandenyje. Kaip teigiama kontrolės medžiaga naudotas salbutamolius.

Ruošiantis nustatyti metodą, anestetiko dietileterio poveikis CBF buvo pašalintas kaip pakaitalą naudojant barbitalį, kuris irgi neturėjo poveikio CBF.

### **Mukocilijinis klirensas**

Mukocilijinis klirensas nustatytas panašiu metodu, kaip aprašyta anksčiau [19]. Anestezuotos peles (0,4 g/kg tribrometanolio ir 0,4 ml/kg amilalkoholio) padėtos ant šildomojo pagrindo, kad būtų palaikoma pastovi 37 °C kūno temperatūra. Temperatūra kontroliuota kontrolės prietaisu ir matuota rektalinės temperatūros zonda („CMA Microdialysis“, 17118 Solna, Švedija). Mukocilijinio transporto spartai išmatuoti, pelės preparuotos atidengiant nedidelę trachėjos sritį aplink gerklas. Kaniule tiesiog po gerklų kremzle pradurta maža angelė. Ši angelė turėjo būti labai maža, nes ją turėjo įsandarinti paskui įsodinti instrumentai. Jeigu taip nebūtų, oras galėtų praeiti per kvėpuojančio gyvūno punkcijos vietą, todėl kvėpavimo takai džiūtų ir būtų gauti neteisingi rezultatai. Autoriai naudojo 80 µm mikrokapiliarinį vamzdelį ir specialiai pritaikytą jungtį prie mikrošvirkšto, užpildyto fluorescenciniu dažikliu „Rhodamine 123“ (15 nl/g kūno masės). Šis vamzdelis buvo tiksliai 16 mm įsodintas į trachėją. Nedideliu kiekiu dažiklio gleivinės paviršius buvo paprastai sutepamas šiek tiek paspaudus mikrošvirkštą. Siekiant išvengti kapiliarinio poveikio vamzdelio paviršiuje, dėl kurio dažiklis staigiai sklįstų aukštyn, ties vamzdelio kraštu buvo sumontuotas mažas, maždaug 100 µm skersmens, silikoninis rutuliukas. Įstačius mikrovamzdelį, mikrodializės zondo membrana („CMA/20/04 PC®“, „CMA Microdialysis“, 17118 Solna, Švedija) 4 mm įvesta per tą pačią punkciją ir pritvirtinta specialiai pritaikyta atrama (kaip aprašyta anksčiau [20]). Suleistas dažiklis sklido pirmyn link gerklų dėl fiziologinio gleivių poveikio. Gleivių perdavos sparta apskaičiuota išmatavus laiką, per kurį dažiklis pasklinda lygiai 12 mm atstumą nuo mikrokapiliarinio vamzdelio krašto iki dializės membranos.

### ***In vivo* mikro dializė ir duomenų registravimas**

Visą šiuose eksperimentuose naudotą mikro dializės įrangą, kaip antai mikro dializės zondus „CMA/20/04PC“ ir mikro dializės siurbį „CMA/102“, tiekė bendrovė „CMA Microdialysis“ (17118 Solna, Švedija). Eksperimentų metu mikro dializės sistemos perfuzijai naudotas fosfatu buferintas fiziologinis tirpalas. Mikro dializės siurblio pastovusis srautas buvo 4  $\mu$ l/min. Eksperimentai pradėti suleidus dažiklio į trachėją ir tuo pat metu paleidus siurbį ir laikmatį. Dializatas surinktas į specialias 96 šulinėlių plokšteles („Nalge Nunc International“, 60583 Naperville, IL, JAV); dėl mažo mėginių tūrio (1  $\mu$ L) pasirinkti šulinėliai kūginiais dugnais. Mėginiai imti kas 15 sekundžių, kol visi 96 šulinėliai buvo užpildyti mėginiais. Po 24 minučių eksperimentas buvo baigtas ir plokštelė staigiai įstatyta į mikroplokštelių skaitytuvą „Floustar® Galaxy“ („BMG Lab Tech“, 07743 Jena, Vokietija), kur išmatuota kiekvieno atskiro šulinėlio fluorescencija. Skaitytuvo fotodaugintuvo sistema nustatė dažiklio „Rhodamine 123“ fluorescenciją 485 nm ilgio sužadavimo bangose, o fotonai buvo skaičiuojami 520 nm ilgio spinduliuotės bangose. Dažiklio koncentracija kiekviename šulinėlyje buvo tiesiogiai proporcinga išmatuoto fluorescencinio švytėjimo intensyvumui [20]. Pirmiausia fluorescencinio dažiklio „Rhodamine 123“ mukocilijinio transporto matavimuose aptikta suvidurkinus vidutinę foninę fluorescenciją ir naudojant pirmojo matavimo taško rezultatus; šis rodmuo buvo trimis standartinio nuokrypio (SN) vienetais didesnis nei vidutinis fono rezultatas. Ankstesniuose eksperimentiniuose bandymuose dažiklio aptikimas nuo dažiklio koncentracijos nepriklausė ir sudarė maždaug 10–11 % (duomenys neparodyti). Mikro dializės mėginių neveikis tūris jų vamzdeliais buvo išgaunamas įdedant mėginį tiesiogiai į talpyklę su dažikliu „Rhodamine 123“ ir nedelsiant pradėdant perfuziją. Kiekviename atliktame eksperimente dažiklio aptikta penktajame šulinėlyje (15 sekundžių laiko intervalas), tad neveikis tūris buvo pašalintas per 60 sekundžių. Šis 60 sekundžių laikotarpis buvo atimtas iš kiekvieno dažiklio sklidimo laiko skaičiavimo.

Visuose mukocilijinio transporto tyrimuose vaistų arba fiziologinio tirpalo ir VGT (kontrolinės medžiagos) bendroji dozė buvo padalyta iš trijų ir prieš pradėdant eksperimentus skiriama į skrandį tris kartus (prieš 24, 12 ir 3 valandas).

Mukocilijinio klirenso eksperimentuose gyvūnams skirtinos dozės apskaičiuotos remiantis standartinė rekomenduojama tiriamųjų medžiagų dozė 70 kg kūno masės žmogui. Siekiant ištirti nuo dozės priklausomą poveikį, naudotos ir mažesnės bei didesnės standartizuoto mirtolio dozės. Naudotas 25 mg koncentracijos salbutamolis ir 8,6 mg koncentracijos NAC bei 1,8-cineolis. Kaip kontrolės medžiaga naudotas 0,9 % natrio chloridas (NaCl).

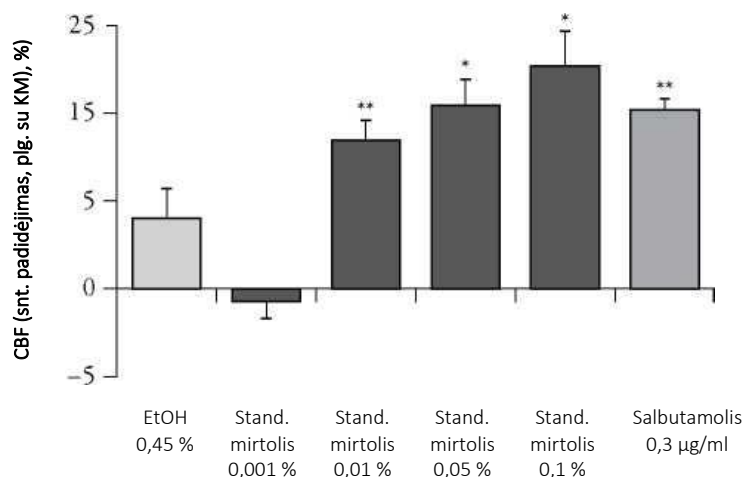
### **Statistinė analizė**

Rezultatai išreikšti kaip tam tikro nepriklausomų eksperimentų skaičių vidurkis  $\pm$  vidutinė standartinė paklaida (VSP). Statistinis vertinimas atliktas išanalizavus duomenis vieno faktoriaus dispersinės analizės (angl. ANOVA) būdu ir paskui atlikus aposteriorinį (*post-hoc*) porinių imčių testą (Studento (*Student*) statistinio t kriterijaus testą). Laikyta, kad tikimybės vertė reikšminga, kai  $P < 0,05$ .

## **REZULTATAI**

### **CBF**

1 pav. pateiktas įvairių koncentracijų standartizuoto mirtolio poveikis CBF, matuojamam žiurkių trachėjos eksplantuose. 0,001–0,100 % diapazone standartizuoto mirtolio poveikis priklausė nuo koncentracijos, santykiškai kontrolės medžiagos poveikiui (0,01 %:  $P < 0,01$ ; 0,1 %:  $P < 0,05$ ). Didelės koncentracijos salbutamolio (teigiamos kontrolės medžiagos) poveikis buvo panašus į standartizuoto mirtolio (0,05 %) poveikį.

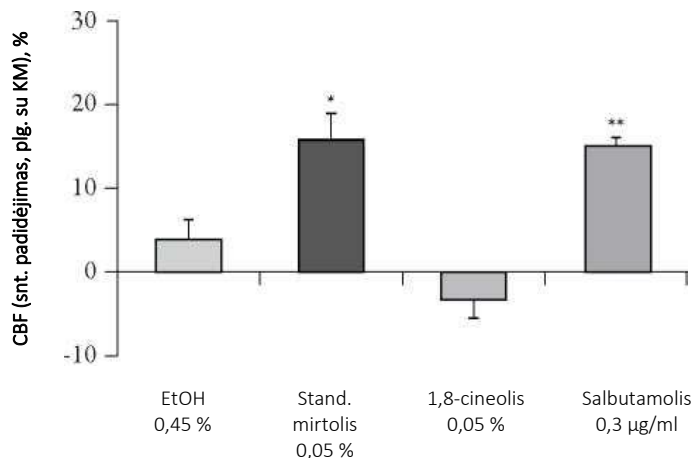


**1 pav.** Įvairių koncentracijų standartizuoto mirtolio poveikis CBF, atsižvelgiant į santykinį padidėjimą ir palyginti su kontrolės medžiaga, matavimus atliekant žiurkių trachėjos eksplantuose.

\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$

CBF – cilijų virpėjimo dažnis, EtOH – etanolis, snt. – santykinis, plg. – palyginti, stand. – standartizuotas

2 pav. pateiktas standartizuoto mirtolio ( $P < 0,05$ ) ir 1,8-cineolio (abiejų koncentracija 0,05 %) CBF, santykiškai kontrolės medžiagos poveikiui, matavimus atliekant žiurkių trachėjos eksplantuose. Standartizuoto mirtolio duomenys paimti iš 1 pav., o 1,8-cineolis (0,05 %) buvo neveiksmingas.

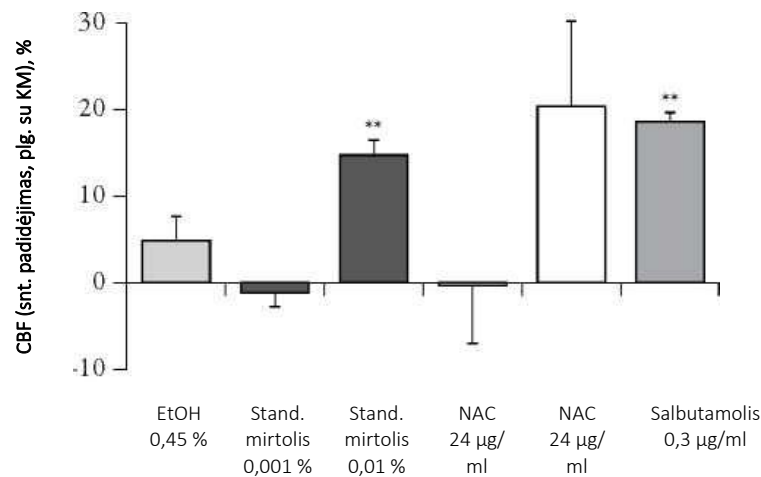


**2 pav.** Standartizuoto mirtolio ir 1,8-cineolio poveikis CBF, atsižvelgiant į santykinį padidėjimą ir palyginti su kontrolės medžiaga, matavimus atliekant žiurkių trachėjos eksplantuose.

\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$

CBF – cilijų virpėjimo dažnis, EtOH – etanolis, snt. – santykinis, plg. – palyginti, stand. – standartizuotas

3 pav. pateiktas standartizuoto mirtolio ( $P < 0,01$ ) ir NAC poveikis CBF, santykiškai kontrolės medžiagos poveikiui, matavimus atliekant žiurkių trachėjos eksplantuose. Abi medžiagos naudotos tinkamos žmonėms koncentracijos ir 10 kartų didesnės koncentracijos. 2,4 µg/ml (0,00024 %) NAC dozės poveikio nenustatyta. Naudotos ir didesnės koncentracijos, 24 µg/ml (0,0024 %), medžiagos, kurių poveikis CBF didėjimui buvo mažas ( $P < 0,05$ ).



**3 pav.** Standartizuoto mirtolio ir NAC poveikis CBF, atsižvelgiant į santykinį padidėjimą ir palyginti su kontrolės medžiaga, matavimus atliekant žiurkių trachėjos eksplantuose.

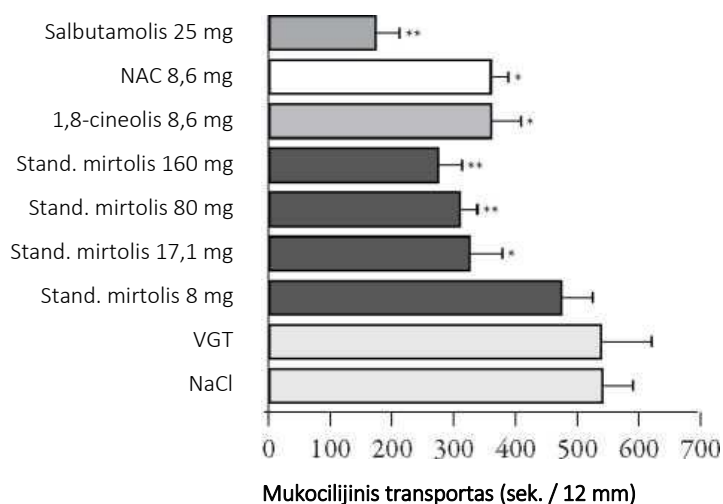
\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$

CBF – cilijų virpėjimo dažnis, EtOH – etanolis, snt. – santykinis, plg. – palyginti, stand. – standartizuotas

### Mukocilijinis klirensas

4 pav. pateikiamas standartizuoto mirtolio, 1,8-cineolio, NAC ir salbutamolio poveikis mukocilijiniam klirensui pelių trachėjoje *in vivo*. Gyvūnams iš anksto buvo sušerta 8,0; 17,1; 80,0 arba 160,0 mg/kg kūno masės bendroji standartizuoto mirtolio bendroji dienos dozė; 8,6 mg/kg kūno masės 1,8-cineolio bendroji dienos dozė; 8,6 mg/kg kūno masės NAC bendroji dienos dozė arba 25,0 mg/kg kūno masės salbutamolio kaip teigiamos kontrolės medžiagos bendroji dienos dozė (visos dozės padalytos iš trijų, nes medžiagos buvo skiriamos tris kartus per parą). Nuo 17,1; 80,0 ir 160,0 mg/kg standartizuoto mirtolio dozių mukocilijinis transportas paspartėjo.

Paspartėjus mukocilijiniam transportui 12 mm atstumas trachėjoje įveikiamas per trumpesnę laiką. Tai – mukocilijinio transporto (cilijų aktyvumo) pagerėjimo rodiklis. Visos trys medžiagos (standartizuotasis mirtolis, 1,8-cineolis ir NAC) buvo veiksmingos, atsižvelgiant į santykinę žmonėms rekomenduojamą dozę. Pastebėta tendencija, kad standartizuotas mirtolis veiksmingesnis. Atitinkamas kiekis tirpiklio (0,1 ml MTC) standartizuotam mirtoliui ir 1,8-cineoliui ištirpyti poveikio neturėjo, todėl standartizuoto mirtolio ir 1,8-cineolio poveikio nepaveikė. Atrodo, kad jis greičiau slopino cilijinį transportą. 25 mg/kg salbutamolio, naudoto kaip teigiama kontrolės medžiaga, cilijinį klirensą, kaip ir tikėtasi, padidino.



**4 pav.** Įvairių standartizuoto mirtolio, 1,8-cineolio, NAC ir salbutamolio dozių poveikis mukocilijiniam klirensui pelių trachėjoje *in vivo*. Stulpeliai rodo laiką, per kurį dažiklis pasklido 12 mm bazinėmis sąlygomis (NaCl), esant medžiagai arba esant tirpiklio VGT.

\* $P < 0,05$ ; palyginti su NaCl. \*\* $P < 0,01$ ; palyginti su NaCl.

VGT – vidutinės grandinės trigliceridai, NaCl – natrio chloridas, NAC – N-acetilcisteinas, stand. standartizuotas

## DISKUSIJA

Standartizuoto mirtolio CBF greitinamasis poveikis priklauso nuo koncentracijos 0,001–0,100 % diapazone. Šiame tyrime naudotas didesnės koncentracijos (0,500 ir 1,000 %) standartizuotas mirtolis, tačiau rezultatų interpretuoti nepavyko, nes medžiagą buvo sunku ištirpyti ir reikėjo naudoti didesnės koncentracijos etanolį (>0,45 %), kuris savaime turėjo poveikį CBF.

Kitame tyrime, kur buvo naudojamos pirminės žmogaus nosies epitelio ląstelės [21], 300 ng/ml standartizuoto mirtolio dozė (kas atitinka 0,00003 %) nebuvo veiksminga CBF didinimo atžvilgiu, tačiau tas tyrimas turėjo daug apribojimų: pirma, mėginys ištirpytas tirpiklyje „Cremophor® EL“ („BASF SE“, Ludwigshafen, Vokietija), kuris buvo naudojamas kaip kontrolės medžiaga, tačiau papildomos kontrolės medžiagos, skirtos įvertinti „Cremophor EL“ poveikį (be jokių priedų) nebuvo. Antra, nenaudota teigiama kontrolės medžiaga; trečia, bazinis CBF (12,5–13,7 Hz) buvo gana didelis, palyginti su literatūros duomenimis: 9,2 [22]; 11,4 [23]; 11,5 [24] ir 6,7–8,1 Hz [25]. Sergant lėtiniu sinusitu paprastai CBF vertės būna mažesnės (8,0 Hz) [26].

Tolesni tyrimai su atitinkamų koncentracijų standartizuotu mirtoliu gali būti naudingesni. Kituose tyrimuose savanoriams žmonėms suvartojus 300 mg standartizuoto mirtolio, 1,8-cineolio (kaip žymeklio) koncentracija plazmoje [27] ir seilėse [28] siekė maždaug 200 ng/ml. Šiame eksperimente naudojant 0,010 % standartizuoto mirtolio tirpalą (etanolyje), atitinkantį 100 µg/ml standartizuoto mirtolio ir 25 µg/ml 1,8-cineolio, o tai 125 kartų daugiau nei ši koncentracija. Iš esmės, šio tyrimo rezultatai vertintini atsižvelgiant į tokius aspektus: pirma, vaisto koncentracija plazmoje ir seilės nėra tiesiogiai proporcinga koncentracijai cilijų srityje; ir antra, graužikų medžiagų apykaita spartesnė, palyginti su žmonių, todėl daugeliu atvejų reikės didesnių koncentracijų vaisto. 0,010 % koncentracijos standartizuotas mirtolis, kaip ir didesnių koncentracijų (0,050 ir 0,100 %), buvo veiksmingas. Kitas tyrimas parodė panašius teigiamus rezultatus [29].

Dar kitame tyrime nustatyta, kad per burną suvartojus 292 mg 1,8-cineolio, kraujyje susidaro 600 ng/ml šios medžiagos koncentracija [30]. Inhaliacijos tyrimuose su žmonėmis, 67 kg sveriantis asmuo ilgalaikiai inhaliacijai vartojo 4 g 1,8-cineolio [31]. Maksimali koncentracija plazmoje (po maždaug 15 minučių) buvo 750 ng/ml diapazone. Inhaliacijai gali būti naudojama daug silpnesnės koncentracijos medžiaga, palyginti

su per burna vartojamų vaistų, naudotų šiuose *in vivo* eksperimentuose. Įdomu tai, kad 1,8-cineolio koncentracija kraujyje būna daug mažesnė, kai pacientas tą patį kiekį medžiagos suvartoja inhaliacijos būdu, palyginti su vartojimu per burną [30]. Galima daryti prielaidą, kad gan didelis medžiagos kiekis lieka kvėpavimo takuose ir ne absorbuojamas į kraujotakos sistemą.

Šiame eksperimente 0,050 % tirpalo (etanolyje) atitinka 500 000 ng/ml 1,8-cineolio, o ši koncentracija 833 kartus didesnė nei minėtoji koncentracija kraujyje ir 666 kartus didesnė nei plazmoje. Visgi 1,8-cineolio koncentracija, taikyta šiame eksperimente, atitinka standartizuoto mirtolio koncentraciją (kaip minėta anksčiau). Be to, nustatyta, kad 0,010 % standartizuoto mirtolio tirpalas žymiai daugiau padidino CBF nei 0,050 % 1,8-cineolio tirpalas.

Šio tyrimo rezultatai rodo, kad standartizuotas mirtolis turi akivaizdžiai nuo dozės priklausomą poveikį mukocilijiniam klirensui (mukocilijiniam transportui) pelių trachėjoje. 17,1 mg/kg dozės veiksmingumas šios rūšies graužikams atitinka žmonėms skiriamą dozę („GeloMyrtol® forte“, „G. Pohl-Boskamp GmbH“, 25551 Hohenlockstedt, Vokietija). Siekiant įvertinti galimą maksimalų poveikį ir palyginti su taip pat maksimalios dozės teigiama kontrolės medžiaga salbutamoliu, naudotos dar didesnės dozės. Šio tyrimo duomenys taip pat rodo, kad 1,8-cineolio ir NAC dozės, atitinkančios esančias žmonėms skirtuose terapiniuose preparatuose, turi poveikį mukocilijiniam transportui.

Šiuos duomenis galima interpretuoti kaip įrodymą, kad standartizuoto mirtolio poveikis cilijų klirensui yra geresnis nei NAC ir 1,8-cineolio. Klinikinei paskirčiai naudojamas standartizuotas mirtolis gali būti naudinga nekomplikuoto rinosinusito ir bronchito gydymo priemonė, lengvinanti simptomus ir gerinanti kvėpavimą. Be to, remiantis šio eksperimento duomenimis galima teigti, kad 17,1 mg/kg kūno masės dozė yra optimali, nes didesnės dozės (80,0 ir 160,0 mg/kg kūno masės) turėjo tik nežymų poveikį mukocilijiniam klirensui.

Šio tyrimo duomenys taip pat rodo, kad 1,8-cineolis (skiriant dozę, santykinai atitinkančią skiriamą žmonėms) nėra veiksmingesnis nei standartizuotas mirtolis. Kadangi į standartizuoto mirtolio sudėtį įeina maždaug 25 % 1,8-cineolio, ši medžiaga greičiausiai sustiprina standartizuoto mirtolio poveikį mukocilijiniam klirensui, tačiau pagrindinis standartizuoto mirtolio poveikis priklauso ne nuo 1,8-cineolio, nes didesnė (8,6 mg/kg) 1,8-cineolio dozė, įeinanti į 17,1 mg/kg standartizuoto mirtolio dozę, mažiau veiksminga nei 17,1 mg/kg standartizuoto mirtolio dozė.

Galima daryti išvadą, kad šie duomenys rodo, jog standartizuotas mirtolis yra farmakologiškai svarbus vaistas, kuris, skiriant santykiškai žmonėms skiriamomis dozėmis, turi teigiamą poveikį abiem matuotiems parametrams: CBF ir mukocilijiniam klirensui *in vivo*, todėl jis gali duoti naudos gydant nekomplikuotą rinosinusitą ir bronchitą, lengvindamas simptomus ir gerindamas kvėpavimą. Nors reikia atsižvelgti į rezultatų apribojimus, nes šis eksperimentas buvo atliekamas su sveika, o ne uždegimo paveikta kvėpavimo takų gleivine, autorių išvados patvirtina tyrimų, kurių metu buvo nustatytas sekretolitinis, sekretomotorinis ir mukolitinis standartizuoto mirtolio poveikis sergant kvėpavimo takų ligomis, rezultatus.

## PADĖKA

Labai vertiname paskutiniojo kurso studentės Kerstin Ehrlich pagalbą atliekant cilijinio transporto eksperimentus. Šio straipsnio laiduotojas yra E.J.V., atsakantis už viso šio darbo integralumą.

**Interesų konfliktas.** Šioje publikacijoje skelbiamos išvados, gautos atlikus mokslinius tyrimus, užsakytus bendrovės „G. Pohl-Boskamp“. Autorius (-iai) pareiškia, kad šis darbas atitinka visus taikomus teisinius ir etinius įsipareigojimus, susijusius su interesų konfliktų atskleidimu, finansavimu, autoryste ir bendradarbiavimu bei atitinka etinius reikalavimus, keliamus elgesiui su tiriamaisiais žmonėmis ir gyvūnais. Autorius (-iai) patvirtino, kad paskelbtas straipsnis unikalus ir jo neketina paskelbti ir nepaskelbė kiti šaltiniai.



---

**LITERATŪRA**

1. Bateman JRM, Pavia D, Sheahan NF, Agnew JE, Clarke SW. Impaired tracheobronchial clearance in patients with mild stable asthma. *Thorax*. 1983;38:463-7.
2. Ericsson CH, Juhasz J, Mossberg B, Philipson K, Svartengren M, Camner P. Influence of ambroxol on tracheobronchial clearance in simple chronic bronchitis. *Eur J Respir Dis*. 1987;70:163-70.
3. Eliezer N, Sade J, Silberberg A. The role of mucus in transport by cilia. *Am Rev Respir Dis*. 1970;102:48-52.
4. Sleigh MA, Blake JR, Liron N. The propulsion of mucus by cilia. *Am Rev Respir Dis*. 1988;137:726-41.
5. Devalia JL, Sapsford RJ, Rusznak C, Toumbis MJ, Davies RJ. The effects of salmeterol and salbutamol on ciliary beat frequency of cultured human bronchial epithelial cells, in vitro. *Pulmonary pharmacology*. 1992;5:257-63.
6. Lenders H, Waitzinger J, Zimmerman TH, et al. Suitability of various methods as pharmacodynamic models for the investigation of the efficacy of mucolytic agents on the maxillary sinus, Naunyn-Schmiedberg's Arch Pharmacol. 1996;353(suppl.):R151.
7. Lenders H. [Pharmakodynamische Nachweismethoden zur Wirkung von atherischen Olen am oberen Respirationstrakt. In Mees K, ed. *Die unspezifische Rhino-Sinusitis*. 1<sup>st</sup> edition. Berlin: SpringerVerlag. 1996;40-51.
8. Deitmer T. Physiology and pathology of the mucociliary system, In: Pfaltz CR, ed. *Advances in Oto-Rhino-Laryngology*. Volume 45. Basel: Karger; 1989:4-18.
9. Jones N. The nose and paranasal sinuses physiology and anatomy. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001;51:5-19.
10. Engler H, Szelenyi I. Tracheal phenol red secretion, a new method for screening mucosecretolytic compounds. *J Pharmacol Methods*. 1984;11:151-7.
11. App EM. Sekretanalyse und Clearance. *Atemw- Lungenkrkh*. 1994;20:363-71.
12. King M. Magnetic Microrheometer. In: Braga PC, Allegra L, eds. *Methods in Bronchial Mucology*. New York: Raven Press. 1988;73-83.
13. App EM. Stellenwert der Mukusclearance fur das Bronchialsystem - Pathophysiologie und therapeutische Ansätze, In: Meister R. *Entzündliche Erkrankungen des Bronchialsystems*. 1st edition. Berlin: Springer Verlag; 2000:27-53.
14. Grafimann J, Hippeli S, Dornisch K, Rohnert U, Beuscher N, Elstner EF. Antioxidant properties of essential oils. *Arzneim-Forsch/Drug Res*. 2000;50:135-9.
15. Hippeli S, Grafimann J, Dornisch K, et al. Freie Radikale in Pathogenese und Therapie von entzündlichen Erkrankungen des Bronchialsystems, In: Meister R. *Entzündliche Erkrankungen des Bronchialsystems*. 1st edition. Berlin: Springer Verlag; 2000:1-25.
16. Brigham KL. Oxidant stress and adult respiratory distress syndrome. *Eur Respir J*. 1990;3:482s-4s.
17. Behrbohm H, Kaschke O, Sydow K. The influence of a secretolytic drug on mucociliary clearance of the maxillary sinus. *J Rol*. 1997;4:29-33.
18. Mercke U, Hakansson CH, Toremalm NG. The influence of temperature on mucociliary activity. Temperature range 20 degrees C-40 degrees C. *Acta Otolaryngol*. 1974;78:444-50.
19. Grubb BR, Jones JH, Boucher RC. Mucociliary transport determined by in vivo microdialysis in the airways of normal and CF mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004;286:L588-95.
20. Wienkotter N, Begrow F, Kinzinger U, Schierstedt D, Verspohl EJ. The effects of thyme extract on fi2- receptors and mucociliary clearance. *Planta Med*. 2007;73:629-35.
21. Han D, Wang N, Zhang L. The effect of myrtol standardized on human nasal ciliary beat frequency and mucociliary transport time. *Am J Rhinol Allergy*. 2009;23:610-4.
22. Shi L, Han D, Zhang L. Effect of ATP on human nasal ciliary beat frequency. *Shoudu Yike Daxue Xuebao*.

---

2009;30:57-61.

23. Albery J, Stoll W. The effect of antiallergic intranasal formulations on ciliary beat frequency of human nasal epithelium in vitro. *Allergy*. 1998;53:986-7.
24. Agius AM, Smallman LA, Pahor AL. Age, smoking and nasal ciliary beat frequency, *Clin Otolaryngology Allied Sci*. 1998;23:227-30.
25. Jorissen M, Willems T, Van der Schueren B. Nasal ciliary beat frequency is age independent. *Laryngoscope*. 1998;108:1042-7.
26. Hafner B, Davris S, Riechelmann H, Mann WJ, Amedee RG. Endonasal sinus surgery improves mucociliary transport in severe chronic sinusitis. *Am J Rhinol*. 1997;11:271-274.
27. Zimmermann T, Seiberling M, Thomann P. The relative bioavailability and pharmacokinetics of standardized myrtol. *Arzneimittelforschung*. 1995;45:1198-201. In German.
28. App EM. Analytischer Abschlussbericht, Bestimmung von Cineol, Limonen und alpha- Pinen in Sputumproben, Myrtol standardisiert Dokumentation. 1997.
29. Kwok R, Leung R, Tsang KW, et al. The effects of Gelomyrtol forte on human ciliary beat frequency in vitro. *Respirology*. 2004;9(suppl.):A16.
30. Langeneckert A. Untersuchungen zur Pharmakokinetik und relativen Bioverfugbarkeit von a-Pinen, 1,8-cineol und Menthol nach dermalen, inhalativen und peroralen Applikationen atherischer Ole. Shaker Verlag GmbH. 1999.
31. Jager W, Nasel B, Nasel C, et al. Pharmacokinetic studies of the fragrance compound 1,8-cineole in humans during inhalation. *Chem Senses*. 1996;21:477-80.