



VITEX AGNUS-CASTUS СУХОЙ ЭКСТРАКТ ВНО 1095 (ЦИКЛОДИНОН®) ПОДАВЛЯЕТ ГИПЕРСОКРАЩЕНИЯ И ВОСПАЛЕНИЕ МАТКИ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МОДЕЛЯХ ПЕРВИЧНОЙ ДИСМНОРЕИ*

JOHANN RÖHRL

отделение доклинических исследований и разработок компании Bionorica SE, Ноймаркт, Германия

OLIVER WERZ

отделение фармацевтической/медицинской химии, Институт фармации университета им. Фридриха Шиллера, Йена, Германия

ALDO AMMENDOLA

отделение доклинических исследований и разработок компании Bionorica SE, Ноймаркт, Германия

GERALD KÜNSTLE

отделение доклинических исследований и разработок компании Bionorica SE, Ноймаркт, Германия

Контакты:

Gerald Künstle

Department of Preclinical Research

and Development, Bionorica SE

Kerscheneinsteierstraße 11

92318 Neumarkt in der

Oberpfalz, Germany

e-mail: gerald.kuenstle@bionorica.de

ПРЕДПОСЫЛКИ

Первичная дисменорея – это сильные боли во время менструации в отсутствие тазовых патологий [1], и она тесно связана с большой группой медицинских состояний, которые в совокупности называют предменструальным синдромом (ПМС) [2]. Первичная дисменорея является стандартной жалобой гинекологических пациенток, в частности молодых женщин, причем преобладание последних оценивают в 40–50% [1]. Интенсивность боли, связанной с первичной дисменореей у женщин, может варьироваться от умеренной до тяжелой, и часто сопровождается болью в спине, тошнотой, рвотой и диареей. В некоторых случаях уровень дискомфорта у женщин не дает им выполнять работу, посещать различные организации и вести нормальную повседневную деятельность.

С психологической точки зрения боль наиболее интенсивна в дни непосредственно перед менструацией и предположительно обусловлена как минимум тремя связанными по времени биологическими процессами. Во-первых, спазматические маточные сокращения у подверженных заболеванию женщин нередко более интенсивные, более частые и продолжают-ся дольше, чем у женщин без дисменореи, и в некоторых случаях эти сокращения описывают даже как «похожие на роды» [1]. Во-вторых, такие маточные сокращения могут ограничивать подачу обогащенной кислородом крови путем сужения сосудов в эндометрии, что приводит к повышенной гибели клеток, ишемии [3] и выработке активных форм кислорода (АФК). И наконец, даже в отсутствие инфекции про-

исходит сопутствующая миграция (подобная процессам, запущенным иммунной системой) воспалительных клеток/амебоцитов, включая лаброциты, эозинофилы, нейтрофилы и макрофаги, непосредственно перед менструацией, которые с большой вероятностью участвуют в отслоении эндометрия путем выделения протеазы и провоспалительных простагландинов (PG), лейкотриенов (LT), цитокинов и хемокинов [3, 4, 5, 6]. Хотя эти три процесса достоверно взаимодействуют при усилении боли во время менструальных спазмов, молекулярные подробности их протекания сложны и плохо изучены [1].

Известно, что среди различных провоспалительных медиаторов $\text{PGF}_{2\alpha}$ и PGE_2 играют главную роль в модуляции маточных сокращений и сужения сосудов у небеременных и беременных женщин. Внутриматочный прием $\text{PGF}_{2\alpha}$ (но не PGE_2) в течение секреторной фазы менструального цикла (МЦ) увеличил интенсивность маточных сокращений, а это означает, что PG является основным фактором первичной дисменореи и боли [3, 7]. Также существует очень сложная взаимосвязь между гормонами и медиаторами, базальной температурой тела, режимами сна и центральной нервной системой, которые до конца не изучены [8, 9].

Согласно одной из возможных молекулярных схем первичной дисменореи, выработка эстрогена и прогестерона образует провоспалительные и проспазматические каскады, а также приводит к снижению уровней фермента супероксиддисмутазы (СОД) [10], что обычно поддерживает низкий уровень АФК и защищает клетки от вызванных ими повреждений [4].

* Адаптированный перевод статьи из журнала *Clinical Phytoscience* 2.20 (2016),

DOI: 10.1186/s40816-016-0034-3. Материал предоставлен ООО «Бионорика».

Обусловленное МЦ увеличение выработки АФК активизирует фактор транскрипции NF- κ B (ядерный фактор каппа-В), в результате чего повышается выработка PG (в частности, PGF_{2 α}), хемокинов и провоспалительных цитокинов [4, 11]. В конечном счете, вызванные PGF_{2 α} маточные сокращения и сужение сосудов приводят к гипоксии и боли в миометрии. Все это, вместе с действием провоспалительных медиаторов, используемых для (и посредством) набора и активации лейкоцитов, приводит к воспалению, отслоению ткани и, в конце концов, к характерному менструальному кровотечению [4, 6, 12], после которого боль имеет тенденцию утихать.

Для лечения ПМС и первичной дисменореи широко используют нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП, такие как напроксен натрий или ибупрофен), снижающие выработку PG посредством подавления циклооксигеназы (ЦОГ-1 и ЦОГ-2). Однако большинство безрецептурных НПВП имеют побочное влияние на желудочно-кишечный тракт и мочевыделительную систему, такие как тошнота и образование язв желудка, а также почечная дисфункция [2]. Кроме того, 10–30% женщин, страдающих дисменореей, не реагируют на ингибиторы ЦОГ [13], что заставляет предполагать действие других медиаторов в этом состоянии. Например, рост уровня LT, который наблюдали у женщин с первичной дисменореей, сочли вызывающими гиперсокращения матки у людей [14], как показано в экспериментальной модели с использованием морских свинок [15]. Тем не менее, на данный момент ни одно лекарственное средство, воздействующее на путь 5-липоксигеназы (5-LO), не утвердили для лечения ПМС.

С точки зрения женщин предпочтительными средствами для лечения симптомов, связанных с ПМС, являются эффективные альтернативы, в частности, галеновые препараты с меньшим числом побочных эффектов [16]. Плоды *Vitex agnus-castus*, также известного как витекс священный, традиционно использовали [17] для лечения незначительных симптомов, связанных с периодическими болями, отеками и переменаами настроения, которые в комплексе известны как ПМС [2]. Стандартные растительные экстракты плодов *Vitex agnus-castus* (сухие экстракты VAC) признаны и продаются в Европе как галеновые препараты с «хорошо изученным применением», эффективно облегчающие симптомы ПМС и имеющие меньше побочных эффектов, чем НПВП. Эффективность и безопасность сухих экстрактов VAC при лечении симптомов ПМС, таких как нерегулярная менструация и боли в молочных железах (мастодиния), были подтверждены в ходе нескольких контролируемых клинических исследований [18, 19, 20, 21].

Механизм действия растительных экстрактов VAC при лечении менструальных симптомов не до конца изучен. Вероятно, они эффективны благодаря большому числу потенциально активных ингредиентов экстракта, включая иридоиды, флавоноиды и дитерпены [22, 23, 24, 25, 26]. Например, большая доказательная база предполагает, что экстракты VAC воздействуют в мозге на рецепторы допамина D2 в цепочке гипоталамус/гипофиз с целью подавления системного выделения пролактина из гипофиза, что приводит к облегчению симптомов ПМС [27, 28, 29, 30, 31]. Тем не

менее, потенциал локализованного противоспазматического и противовоспалительного действия экстрактов VAC при лечении первичной дисменореи до сих пор не исследован.

Поэтому в рамках настоящей работы мы исследовали способность стандартного экстракта VAC BNO 1095 модулировать число потенциальных механизмов, ответственных за дисменорею, используя анализы *in vivo*, *in vitro* и ферментный анализ, с особым упором на маточные сокращения, боль, а также выработку и выделение провоспалительных молекул PG, LT, цитокинов и АФК.

МЕТОДИКА

Материалы и реактивы

Сухой экстракт VAC BNO 1095 (DER 7–11:1) доступен в продаже под названием Циклодинон® и производится компанией Bionorica SE (Ноймаркт, Германия). Для проведения испытаний *in vitro* раствор исследуемого препарата получили путем ресуспендирования в этаноле 50% (об./об.) в концентрации 40 мг/мл и гомогенизирования в вихревой мешалке в течение 5 мин, с последующим инкубированием в течение 30 мин при комнатной температуре на ультразвуковой бане. Суспензию центрифугировали на 3000 г в течение 10 мин при комнатной температуре, и надосадочную жидкость сразу же использовали для экспериментов. Все реактивы были получены в компании Sigma-Aldrich (Тауфкирхен, Германия), если не указано иначе.

Измерения *in vivo* маточных сокращений, боли и седации опорно-двигательного аппарата в модели дисменореи у крыс

Нерожавших небеременных женских особей крыс Спрег-Доули приобрели в возрасте 12–14 недель в компании Charles River (Зульцфельд, Германия) и поместили в особые стерильные условия, где они получали стерильную воду и пищу в неограниченном количестве. За 12 дней до начала эксперимента животных рандомизированно распределили по группам в количестве 12–14 особей в каждой: в группу приближенно-равного контроля (соляной раствор), группу лечения (BNO 1095) и группу сравнения (карпрофен), и дали им приспособиться к новым клеткам в группах по 4. С 1 по 12 день всем животным вводили интраперитонеально 1 раз в день эстрадиолбензоат в объеме 10 мг/кг массы тела. С 6 по 12 день животным из группы лечения 1 раз в день вводили пероральную суспензию (на стерильной воде) BNO 1095 через желудочный зонд в одной из трех доз: 2,1 мг/кг массы тела (сравнима с пятикратной предназначенной для человека дозой [human equivalent dose, HED], 5×HED), 10,3 мг/кг массы тела (25×HED) или 20,7 мг/кг массы тела (50×HED) в объеме 10 мл/кг, а животные контрольной группы получали эквивалентное количество воды. На 12 день животные из группы контроля, лечения и сравнения получили соответственно следующие вещества в одинаковых объемах: воду перорально и подкожную инъекцию соляного раствора; экстракт BNO 1095 перорально спустя 3 часа после последнего ввода эстрадиолбензоата и подкожную инъекцию соляного раствора или воду перорально и подкожную инъекцию НПВП карпрофена (Pfizer, Берлин, Германия) из расчета 5 мг/кг массы тела.

На 12 день, спустя 1 ч после подкожной инъекции носителя или карпрофена, животным всех групп ввели перорально окситоцин (10 МЕ/мл, Hexal AG, Хольцкирхен, Германия) в дозировке 2000 мМЕ/кг (3,33 мкг/кг) массы тела, чтобы вызвать маточные сокращения. Для определения степени стимуляции миометрия наблюдали за латентным периодом и числом спазмов в животе, на которые указывали корчи животных. Дополнительно выразили количественно болевую реакцию в соответствии с мимической шкалой, описанной S.G. Sotocinal и соавторами [32]; этот метод выбрали из-за простоты автоматизации и возможности различать спонтанную и спровоцированную боль (например, в ответ на нажатия на брюшную полость). Вкратце, по шкале 0 (нормально), 1 (умеренно) и 2 (очевидно) подсчитали количество зажмуривания глаз, сплющивания носа/щек, изменения положения ушей и вибрисс. Кроме измерения маточных сокращений и интенсивности боли, выполнили тест «прогулка по приподнятой перекладине» (см. описание L.B. Goldstein с соавторами [33] с изменениями согласно M.A. Flierl с соавторами [34]), чтобы проанализировать походку и задержку при прохождении деревянной перекладины с целью измерения любого возможного влияния приема BNO 1095 или карпрофена на координацию опорно-двигательного аппарата (субъективная шкала от 0 до 16, где 7 = норма и 3 = расстройство двигательной функции) или седацию (измеряют на основании количества времени между размещением животного на перекладине и его движением вперед для ее пересечения).

Эксперименты на крысах проводились в соответствии с законодательными положениями о содержании и использовании лабораторных животных и были утверждены Комитетом по формированию этики в отношении животных: а) ЕС: Директива 2010/63/ЕС Европейского Парламента и Совета от 22 сентября 2010 г. по защите животных, используемых в научных целях; б) Директива CETS № 123 (ETS 123): Европейская Конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей, Совет Европы (1986), приложение А (2006).

Эксперименты *in vitro* на сокращение с использованием иссеченной маточной ткани крыс

Для анализа противосудорожного воздействия с использованием изолированных маточных полосок крыс в лаборатории Charles River (Сен-Жермен-сюр-л'Арбрель, Франция) получили нерожавших женских особей крыс Спрег-Доули с массой тела в диапазоне 250–275 г на момент доставки. Для синхронизации гормональных состояний за 18 ч до эксперимента крысам ввели диэтилstilбестрол (0,25 мг/кг интраперитонеально), растворив его в концентрации 0,5 мг/мл в кукурузном масле (серия MKBH4894V, Sigma-Aldrich) и введя объем 0,5 мл/кг. В день эксперимента крыс умертвили путем удушения CO₂. Матку иссекли, очистили от соединительных тканей, из каждого рога немедленно отсекали по 2 продольные полоски, поместили в инкубаторы органов 5 мл, содержащие обогащенный кислородом раствор Кребса следующего состава (в мМ): NaCl 114, KCl 4,7, CaCl₂ 2,5, MgSO₄ 1,2, KH₂PO₄ 1,2, NaHCO₃ 25, глюкоза 11,7 (рН 7,4, аэрированная 95% O₂ и 5% CO₂ при 37 °С).

Маточным тканям дали прийти в равновесие при давлении покоя 1,0 г в течение минимум 60 мин; в ходе этого времени раствор Кребса заменяли каждые 15 мин и при необходимости регулировали давление. По окончании периода равновесия вызвали сокращения миометрия, добавив в инкубаторы 0,5 нМ (0,5 нг/мл) окситоцина, 1 мкМ (354,5 нг/мл) PGF_{2α} или 50 нМ (54,2 нг/мл) вазопрессина. После того как стабилизировались амплитуда и частота сокращений, записали кумулятивные кривые концентрация-эффект для 10–1000 мкг/мл BNO 1095 (сухой экстракт растворен, как описано выше), положительного контроля ритодрина (Sigma-Aldrich, Сен-Кантен-Фаллавыё, Франция) и контроля носителем (водный раствор этанола). Концентрация этанола в инкубаторах органов в основном составила 0,5% для максимальной испытанной концентрации препарата (или экстракта). Данные представлены в виде процентного числа от контроля (релаксация перед добавлением исследуемого препарата или носителя).

Все эксперименты с использованием маточной ткани крыс провели согласно законодательным положениям Франции о защите лабораторных животных и в соответствии с текущей действующей лицензией на проведение экспериментов с использованием позвоночных животных, выданной Министерством сельского хозяйства и рыболовства Франции.

Эксперименты *in vitro* на сокращение с использованием иссеченной маточной ткани человека

Образцы матки человека, полученные по информированному согласию, взяли у небеременных доноров предклимактерического возраста. Все маточные полоски (длиной примерно 15 мм) погрузили в 25 мл инкубаторы органов, содержащие физиологический раствор (PSS, 119,0 мМ NaCl, 4,7 мМ KCl, 1,2 мМ MgSO₄, 24,9 мМ NaHCO₃, 1,2 мМ KH₂PO₄, 2,5 мМ CaCl₂ и 11,1 мМ глюкозы), аэрированный 95% O₂ и 5% CO₂ при температуре примерно 37 °С. Одну часть полоски ткани прикрепили к изометрическому передатчику, фиксирующему изменение давления. Маточным полоскам дали прийти в равновесие в течение минимум 30 мин, после чего их привели к стандартному пассивному давлению (20 мН, примерно 2 г), чтобы сократить варибельность сигнала до фармакологического вмешательства. Затем полоскам дали прийти в равновесие как минимум в течение 1 ч, при этом их промывали PSS каждые 15 мин, чтобы способствовать образованию спонтанных сокращений. Все маточные полоски, в которых не образовывались спонтанные сокращения после воздействия давления в инкубаторе органов, отбраковали.

Добавили 0,2 мкМ (0,2 мкг/мл) окситоцина, чтобы увеличить размер и частоту спонтанных сокращений. После того как стабилизировались амплитуда и частота сокращений, записали кумулятивные кривые концентрация-эффект для 10–1000 мкг/мл BNO 1095, блокатора кальциевых каналов – производной дигидропиридина исрадипина (положительный контроль) и контроля носителем (водный раствор этанола). Концентрация этанола в инкубаторах органов составила от 0,013 до 0,5% для максимальной испытанной концентрации. Данные представлены в виде процентного

числа от контроля (релаксация перед добавлением исследуемого препарата или носителя).

Подавление очищенной 5-LO и клеточного биосинтеза LT в изолированных моноцитах человека

В рамках бесклеточного (с очищенными ферментами) количественного анализа рекомбинантную 5-LO человека выразили в клетках *E. coli* BL21(DE3), которые трансформировали посредством рТ3–5LO и очистили в колонке с сорбентом аденозинтрифосфат-агароза [35]. Для определения ферментативной активности добавили очищенный фермент в 1 мл смеси 5-LO для количественного анализа (PBS, pH 7,4, 1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты, 1 мМ аденозинтрифосфорной кислоты). После инкубации в течение 10 мин при температуре 4 °С посредством носителя (0,5% этанола) или BNO 1095 образцы подогрели в течение 30 с при температуре 37 °С в присутствии 2 мМ CaCl₂, а затем добавили 20 мкМ (6,1 мкг/мл) арахидоновой кислоты. Реакцию остановили спустя 10 мин при 37 °С путем добавления 1 мл ледяного метанола и 200 нг PGB₁. Полученные метаболиты экстрагировали и проанализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), как описано ранее [36]. Продукты 5-LO включают в себя полностью-транс-изомеры LTB₄ и 5-Н(р)ЕТЕ. Результаты представлены в виде процентного числа от контроля носителем.

Анализ подавления 5-LO в клеточном анализе выполнили с использованием моноцитов человека, изолированных из свежезятых образцов периферической крови от согласившихся здоровых доноров (Институт трансфузионной медицины, Университетская клиника Йены, Германия), которые заявили, что не принимали никаких противовоспалительных препаратов в течение 10 дней от даты взятия образца. Венозную кровь центрифугировали при 4000 г в течение 20 минут, температура 20 °С; моноклеарные клетки периферической крови (МКПК) изолировали путем осаждения декстраном и центрифугирования на подушках Nuscorper, и моноциты собрали путем прилипания, как описано выше. В конце концов, моноциты ресуспендировали в буфере PGC с плотностью 2×10⁶ клеток/мл и инкубировали в течение 15 мин при температуре 37 °С с BNO 1095, носителем или зилеутоном (3 мкМ или 0,71 мкг/мл). Затем клетки стимулировали при температуре 37 °С Ca²⁺-ионофором A23187 (5 мкМ или 2,6 мкг/мл). Спустя 10 мин реакцию остановили, поместив на лед, и образцы центрифугировали при 500 г в течение 10 мин, температура 4 °С. Собрали супернатанты, и полученный LTC₄ проанализировали методом иммуноферментного анализа (Enzo Life Sciences GmbH, Лёррах, Германия) в соответствии с инструкциями производителя. Для анализа LTB₄, полностью-транс-изомеров LTB₄ и 5-Н(р)ЕТЕ с помощью ВЭЖХ 750 мкл супернатанта смешали с 750 мкл метанола и добавили 22,5 мкл 1 N HCl, 150 нг PGB₁ и 375 мкл PBS. Образовавшиеся продукты 5-LO экстрагировали, проанализировали методом ВЭЖХ, как описано во внешнем источнике [36], и представили в виде суммы всех продуктов 5-LO (т. е. LTB₄, его полностью-транс-изомеров и 5-Н(р)ЕТЕ). Результаты представлены в виде нормализованного процентного отношения к контролю носителем (= 100%). Данные отображают

три независимых эксперимента, в каждом из которых собраны отдельные точки ввода данных.

Анализ выделения цитокинов из культивированных МКПК человека

Криоконсервированные МКПК (Eurofins Panlabs Inc., Боулдер, штат Вашингтон, США) разморозили и посеяли на 96-луночные планшеты в культуральной среде (среда RPMI 1640, 10% фетальной бычьей сыворотки, 1% пенициллин/стрептомицин, 2 мМ L-аланил-L-глутамин) при плотности 5 × 10⁴ клеток/луночка. После инкубирования в течение 1 ч при температуре 37 °С добавили 10–300 мкг/мл BNO 1095, контроль носителем (0,3% конечной концентрации этанола) или положительный контроль 100 нМ (39,25 нг/мл) дексаметазона и снова инкубировали в течение 1 ч при температуре 37 °С. После добавления 50 нг/мл провоспалительного средства ЛПС (липополисахарида) МКПК инкубировали в течение 24 ч при температуре 37 °С. Собранные супернатанты проанализировали на наличие цитокинов, используя микросферы для мультиплексного анализа ProcartaPlex для человека IL-1β, IL-6, IL-8, MIP-1α и TNFα (Affymetrix, Санта-Клара, штат Калифорния, США). Данные отображают два независимых эксперимента с двойными измерениями.

Количественный анализ выработки АФК из изолированных макрофагов человека

Моноциты человека изолировали, как описано выше. Для получения макрофагов свежееизолированные моноциты инкубировали в течение 6 дней в присутствии макрофагального колониестимулирующего фактора в концентрации 20 нг/мл при температуре 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Для анализа формирования АФК клетки (макрофаги или нейтрофилы человека) предварительно инкубировали в чувствительном к пероксиду флуоресцентном красителе 2',7'-дихлорфлуоресцеин-диацетате (1 мкг/мл) в течение 10 мин при температуре 37 °С. Затем добавили 5–75 мкг/мл (макрофаги) или 1–100 мкг/мл (нейтрофилы) исследуемого соединения или носителя (содержащего 0,5% этанола) и спустя 10 мин клетки стимулировали 100 нМ (61,7 нг/мл) (макрофаги) или 1,62 мкМ (1 мкг/мл) (нейтрофилы) форбол-12-миристан-13-ацетата (ФМА). Измерили флуоресценцию на длине волны 530 нм после возбуждения при 485 нм в 96- или 24-луночном планшете в спектрофлуориметре. В качестве контрольного ингибитора использовали дифенилен-иодоний (DPI, 5 мкМ или 1,4 мкг/мл). Данные отображают три независимых эксперимента, в каждом из которых собраны отдельные точки ввода данных.

Колориметрический анализ на захват свободных радикалов (восстановление АФК) ДФПГ

В результате реакции ДФПГ (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил) с антиоксидантом или восстанавливающим соединением образуется соответствующий гидразин ДФПГ₂, который оценивают по наблюдению за фотометрической сменой цвета с фиолетового на желтый. Вкратце, 0,1–300 мкг/мл BNO 1095 добавили к 100 мкл этанола (пустой контроль) или к 100 мкл раствора стабильного свободно-го радикала в этаноле, буферизированного ацетатом до

pH 5,5 (50 мкМ, что соответствует 19,7 мкг/мл) в 96-луночном планшете. В качестве эталонного соединения использовали аскорбиновую кислоту (100 мкл 50 мкМ (8,8 мкг/мл) раствора аскорбиновой кислоты в этаноле, т. е. 5 нмоль аскорбиновой кислоты). Поглощение считали при длине волны 520 нм после 30 мин инкубации с легким встряхиванием в темноте. Захват свободных радикалов выражается как процент поглощения отнятого пустого контроля $[A_{520 \text{ нм}} (\text{ДФПГ, 50 мкМ} + \text{экстракт}) - A_{520 \text{ нм}} (\text{пустой})]$ в сравнении с $[A_{520 \text{ нм}} (\text{ДФПГ, 50 мкМ} + \text{носитель}) - A_{520 \text{ нм}} (\text{пустой})]$. Данные отображают три независимых эксперимента, в каждом из которых собраны отдельные точки ввода данных.

Статистический анализ

Если не указано иначе, все значения представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего (ст. ош.), полученное на основании как минимум двух независимых экспериментов, в рамках которых измерения выполняли трижды. Статистическую значимость оценили посредством одностроннего дисперсионного анализа с последующим апостериорным множественным сравнением Даннета, используя для ее оценки значение $p \leq 0,05$. Для экспериментов *in vitro* рассчитали значения IC_{50} методом нелинейной регрессии с помощью уравнения ($Y = 100 / (1 + 10^{((\text{LogEC50}-X) \cdot \text{наклон}))}$), где X = логарифм дозы или концентрации, Y = нормализованный отклик (0–100%). Вычерчивание эмпирической кривой, расчет значения IC_{50} и статистические анализы выполнили в программе GraphPad Prism версии 5.04 (GraphPad Software Inc., Сан-Диего, штат Калифорния, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

BNO 1095 в зависимости от дозы уменьшил число вызванных окситоцином маточных сокращений и боль от них без эффекта седации или локомоторного дефицита

Первичную дисменорею характеризует сильная боль во время интенсивных маточных сокращений. Нерожавшим крысам в течение 1 недели ежедневно зондовым путем (перорально) вводили сухой экстракт BNO 1095 2,1–20,7 мг/кг (что превышает рекомендованную дозу, эквивалентную предназначенной человеку, в 5–50 раз соответственно, т. е. от 5xHED до 50xHED) до провоцирования маточных спазмов посредством интраперитонеальной инъекции окситоцина 2000 мМЕ/кг (3,33 мкг/кг) массы тела. Сразу же после инъекции окситоцина наблюдали и записали признаки маточных сокращений и боли. В частности, задержку времени до проявления сокращений, общее число сокращений (спазмы в животе, корчи) и испытанную боль (количество определили по «мимической шкале», где максимальная оценка 2 обозначает очевидную боль) сравнили между группами носителя, исследуемого препарата (BNO 1095) и препарата сравнения (карпрофен, НПВП анальгетик).

Лечение BNO 1095 в дозировке до 20,7 мг/кг не оказало значительного влияния на задержку по времени до начала спазмов в сравнении с группой контроля носителем или группой компаратора – инъекции карпрофена 5 мг/кг подкожно (данные не представлены). Тем не менее, прогрессивное увеличение дозы BNO 1095 (от 2,1 до 20,7 мг/кг мас-

сы тела) (рис. 1А) привело к максимальному сокращению спазмов примерно на 67% по сравнению с группой контроля носителем (среднее число спазмов \pm ст. ош.: носитель – $9,72 \pm 1,61$; 20,7 мг/кг BNO 1095 – $3,23 \pm 1,16$; карпрофен – $1,77 \pm 0,99$). Этот результат значительно отличался от результата в группе контроля носителем ($p < 0,05$), и его можно было грубо сравнить с подавляющим эффектом, наблюдаемым в группе карпрофена при дозе BNO 1095 20,7 мг/кг.

Что касается измерения испытанной боли (рис. 1В), ни одно значение из группы BNO 1095 или компаратора не достигло уровня статистической значимости по сравнению с контрольной группой, однако доза 20,7 мг/кг BNO 1095 продемонстрировала численное сокращение средних значений по мимической шкале для зажмуривания глаз, сплющивания носа/щек и изменения положения вибрисс, достигнув уровней, аналогичных показанным в группе карпрофена. Среднее значение для изменения положения ушей не сократилось явно посредством BNO 1095 по сравнению с карпрофеном.

В ходе теста «прогулка по приподнятой перекладине» (рис. 1С) животные из всех испытуемых групп проходили по перекладине нормальной походкой, продемонстрировав менее двух соскальзываний лап за каждое прохождение. При сравнении оценок прогулки по перекладине для крыс из группы контроля носителем, группы 20,7 мг/кг BNO 1095 и группы 5 мг/кг карпрофена констатировали, что крысы из группы BNO 1095 ($8,75 \text{ с} \pm 1,05$) начали проходить по перекладине в 2 раза быстрее, чем крысы из группы карпрофена ($16,62 \text{ с} \pm 3,32$), на основании чего предположили, что крысы из последней группы испытали больший седативный эффект, чем крысы в контрольной группе ($p < 0,05$) и группе BNO 1095. В свою очередь, оценка прогулки по перекладине для крыс из групп контроля носителем, 20,7 мг/кг BNO 1095 и 5 мг/кг карпрофена (не изображено) показала, что походка животных во всех трех группах была нормальной и практически идентичной ($7,0 \pm 0$; $7,0 \pm 0$; $6,92 \pm 0,08$ соответственно). Полученные результаты все вместе указывают на то, что хотя у крыс, получивших 20,7 мг/кг BNO 1095, наблюдали снижение числа сокращений и уменьшение боли, что можно было грубо сравнить с воздействием 5 мг/кг карпрофена, BNO 1095 в этой дозировке не вызвал заметной седации или других нарушений координации движений.

BNO 1095 подавлял вызванные лекарственным препаратом сокращения иссеченной маточной ткани крысы и человека

Для изучения непосредственного воздействия BNO 1095 на маточные сокращения изолированные маточные полоски, взятые у нерожавших крыс, поместили в инкубаторы органов и спровоцировали сокращения гладкой мускулатуры введением 0,5 нМ (0,5 нг/мл) окситоцина (рис. 2А), 1 мкМ (354,5 нг/мл) $PGF_{2\alpha}$ (рис. 2В) или 50 нМ (54,2 нг/мл) вазопрессина (рис. 2С). В каждом случае при добавлении 10–400 мкг/мл BNO 1095 наблюдали зависимое от концентрации подавление сокращений маточных полосок с максимальным эффектом (ок. 100% подавления контроля), который значительно превзошел максимальный эффект подавления (ок. 20% подавления, рис. 2В), наблюдаемый в

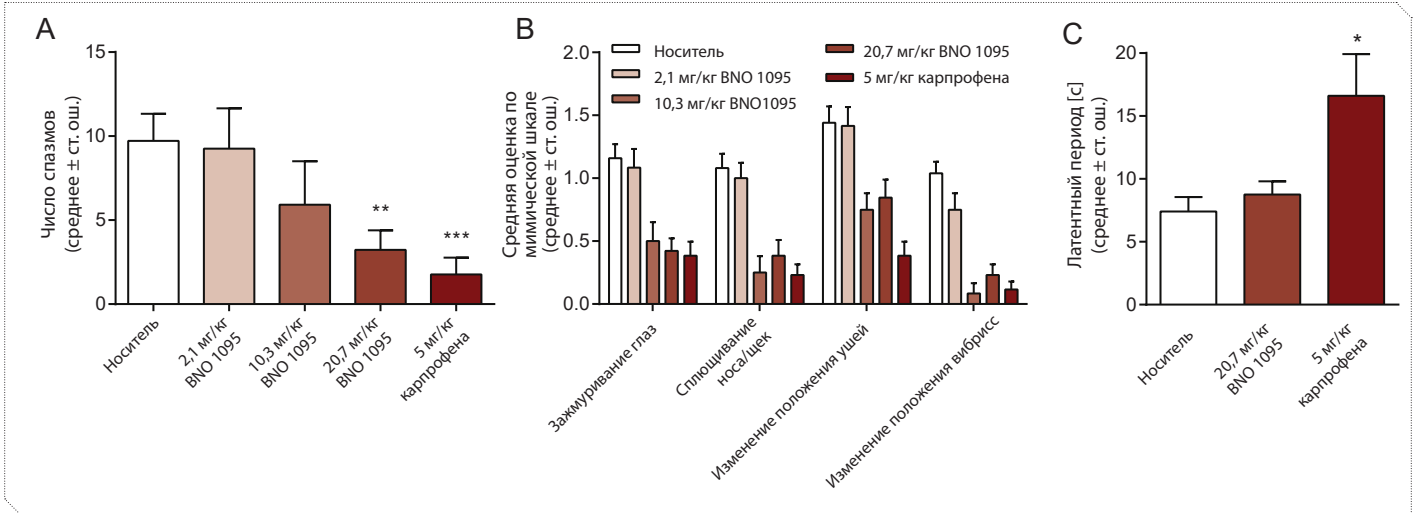


Рисунок 1. Подавление сокращений посредством BNO 1095 in vivo у крыс модели дисменореи

Воздействие сухого экстракта *Vitex agnus castus* BNO 1095 на число спазмов в животе (А) и мимическую шкалу (В) после интраперитонеальной инъекции окситоцина. Латентный период до начала теста «прогулка по приподнятой перекладине» (С). Данные приведены как средние значения ± ст. ош., n = 12–14; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

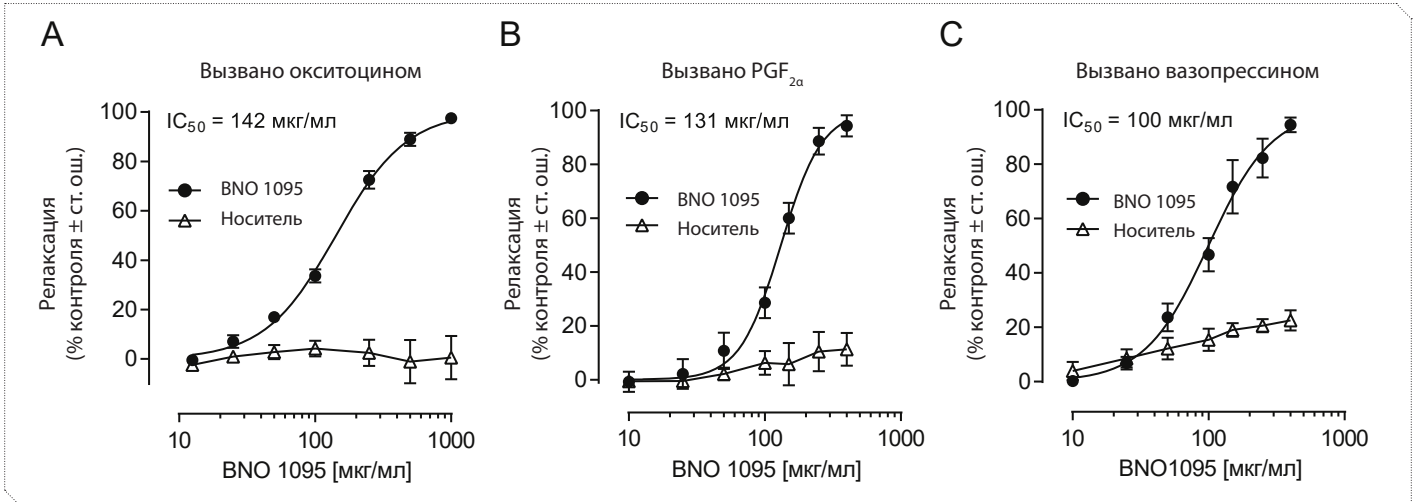


Рисунок 2. Зависимое от концентрации подавление вызванного лекарственным препаратом сокращения маточных полосок крыс посредством BNO 1095

Релаксация сокращений изолированных образцов матки крысы, вызванных 0,5 нМ (0,5 нг/мл) окситоцином (А), 1 мкМ (354,5 нг/мл) PGF_{2α} (В) или 50 нМ (54,2 нг/мл) вазопрессина (С). В контроле носителем присутствовало до 0,5% этанола. Данные приведены как средние значения ± ст. ош., n = 3.

группе контроля носителем (макс. 0,5% этанола). После вычерчивания каждой соответствующей эмпирической кривой концентрация-эффект определили значения IC₅₀ для способности BNO 1095 подавлять сокращения, вызванные окситоцином, PGF_{2α} и вазопрессином, в концентрации 142 мкг/мл, 131 мкг/мл и 100 мкг/мл соответственно.

Кроме того, проанализировали воздействие BNO 1095 на изолированные полоски миомерия человека, полученные у женщин, подвергшихся операции по резекции матки. Аналогично вышеописанным экспериментам кумулятивное добавление 10–400 мкг/мл BNO 1095 оказало подавляющее воздействие на периодические сокращения гладкой мускулатуры, вызванные 200 нМ (0,2 мкг/мл) окситоцина, продемонстрировав зависимость от дозы и подобранное на кривой значение IC₅₀ равное 82 мкг/мл (рис. 3).

Необходимо учесть: несмотря на то, что полоски миомерия получили из практически здоровых участков матки, длительное время подготовки и транспортировки в лабораторию образцов, как и для ткани крыс, могло стать причиной увеличения базального отклика у контроля носителем (до 40%) по сравнению с контрольными откликами, наблюдаемыми в экспериментах с тканью крыс. Как и в экспериментах с тканью крыс, максимальная концентрация этанола в контроле носителем составила 0,5%.

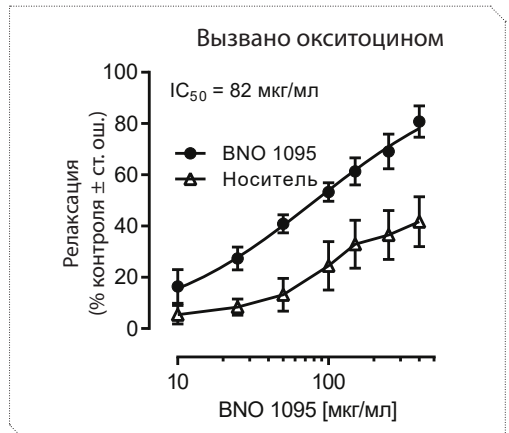


Рисунок 3. Зависимое от концентрации противосудорожное воздействие BNO 1095 на маточные полоски человека

Релаксация спазмов изолированных образцов матки человека, вызванных 200 нМ (0,2 мкг/мл) окситоцина, посредством BNO 1095. В контроле носителем присутствовало до 0,5% этанола. Данные приведены как средние значения ± ст. ош., n = 5.

BNO 1095 не смог значительно подавить активность очищенного фермента ФДЭ

После подтверждения потенциала BNO 1095 на *in vivo* модели с использованием крыс и в ходе *in vitro* экспериментов с иссеченной тканью мы продолжили исследовать возможные механизмы его действия. В целом ряде литературных источников высказаны предположения, что ферменты фосфодиэстеразы (ФДЭ, англ. phosphodiesterase, PDE), ответственные за преобразование циклических АМФ (цАМФ) в аденозинтрифосфат, могут усилить свойства внутренних молекул релаксантов, особенно у беременных. В частности, стромальные клетки эндометрия человека выделяют изоформы ФДЭ: ФДЭ4 и ФДЭ8 [37], и ФДЭ4-селективные ингибиторы, такие как ролипрам, продемонстрировали спазмолитическое воздействие на миометрий [38, 39, 40].

Поэтому мы проанализировали экстракт BNO 1095 касательно его ингибирующего воздействия на подтипы ФДЭ: PDE4B2, PDE4D1 и PDE8A1. Однако для каждого из испытуемых подтипов ферментов BNO 1095 подавлял активность ФДЭ только в достаточно высокой концентрации, то есть 100 и 300 мкг/мл (данные не представлены), по сравнению с заявленной способностью BNO 1095 эффективно подавлять выработку ЛТ, цитокинов и АФК (см. ниже). Следовательно, кажется маловероятным тот факт, что BNO 1095 подавляет маточные сокращения путем снижения активности ФДЭ в миометрии небеременной женщины.

BNO 1095 эффективно подавляет синтез ЛТ в моноцитах человека и ингибирует активность очищенной 5-LO в бесклеточном количественном анализе

ЛТ синтезируются из арахидоновой кислоты, содержащей 5-LO, и представляют собой важные липидные медиаторы в воспалительном иммунном отклике, который сопровождает менструацию [13, 15, 41]. Поэтому мы исследовали воздействие экстракта на биосинтез продукта 5-LO в бесклеточной (очищенные ферменты) и клеточной (в моноцитах человека) моделях.

В ходе бесклеточного анализа подавления 5-LO BNO 1095 оказал зависимое от концентрации ингибирующее воздействие на активность очищенной 5-LO при значении IC_{50} , равном 28,9 мкг/мл (рис. 4А). Эти результаты подтвердили и расширили в ходе клеточного анализа, где 10–400 мкг/мл BNO 1095 подавили формирование образования продуктов 5-LO (LTB₄, транс-LTB₄, эпи-LTB₄ и 5-H(p)ETE) при значении IC_{50} , равном 22,2 мкг/мл, и блокировал образование LTC₄ при значении IC_{50} , равном 63,5 мкг/мл (рис. 4В).

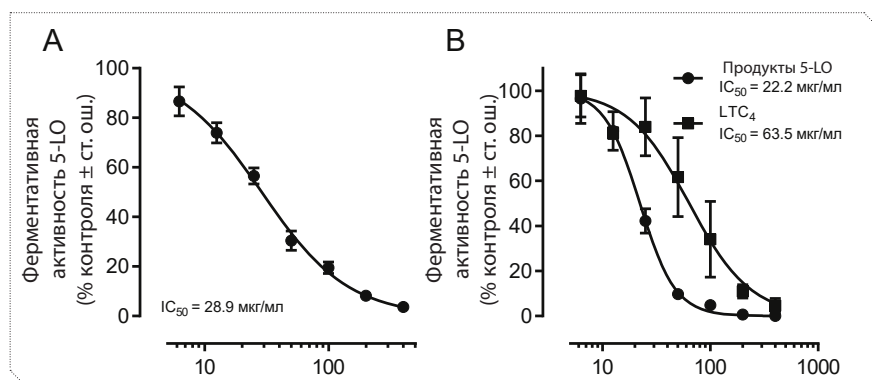


Рисунок 4. Зависимое от концентрации подавление активности 5-LO (очищенного фермента) и формирования продукта 5-LO в моноцитах человека посредством BNO 1095
 А – бесклеточное подавление фермента 5-LO посредством BNO 1095 с использованием очищенной рекомбинантной 5-LO человека; В – подавление образования продукта 5-LO (объединения LTB₄, транс-LTB₄, эпи-LTB₄ и 5-H(p)ETE) и выработки LTC₄ посредством BNO 1095 в исследовании *in vitro* на клетках (моноцитах человека). В качестве контроля носителем использовали 0,5% этанол. Данные приведены как средние значения ± ст. ош., n = 3.

BNO 1095 не смог значительно сократить опосредованный ЦОГ синтез PG в изолированных моноцитах и макрофагах человека

Мы исследовали воздействие BNO 1095 на биосинтез PGE₂ и TXB₂ в моноцитарных макрофагах человека после стимулирования ЛПС (1 мкг/мл). Добавление до 300 мкг/мл BNO 1095 к макрофагам после активации посредством ЛПС не вызвало видимого ингибирующего воздействия на формирование опосредованного ЦОГ биосинтеза PGE₂ (ЛПС + BNO 1095: 70,0% ± 30,3 сравн. только ЛПС на 100%) и TXB₂ (ЛПС + BNO 1095: 108,4% ± 20,3 сравн. только ЛПС на 100%) (данные не представлены). Экстракт BNO 1095 (до 300 мкг/мл) также не смог в значительной степени повлиять на высвобождение PGF_{2α} из стимулированных ЛПС моноцитов человека (ЛПС + BNO 1095: 73,2% ± 5,4 сравн. только ЛПС: 108,0% ± 7,4) (данные не представлены). Эти результаты указывают на то, что BNO не нацелен на путь ЦОГ в каскаде арахидоновой кислоты в целых клетках.

Анализ выделения цитокинов из культивированных МКПК человека

Цитокины являются мощными регуляторами воспаления. Анализ МКПК человека выявил эффективное подавление выработки цитокинов после введения 10–300 мкг/мл BNO 1095 за 1 ч до стимуляции 50 нг/мл ЛПС. Как показано на рис. 5, BNO 1095 оказал зависимое от доз ингибирующее воздействие на выработку IL-1β, IL-6, IL-8, TNFα и хемокина MIP-1α (макрофагального белка воспаления-1α, или CCL3) при значениях IC_{50} , равных 20,1, 60,7, 98,4, 51,6 и 75,7 мкг/мл соответственно. Выработка основного воспалительного цитокина IL-1β была подавлена при низких концентрациях в сравнении с остальными четырьмя молекулами, что представляет интерес, так как известно, что IL-1β стимулирует биосинтез PG и ЛТ [13, 42]. Более высокие концентрации BNO 1095 должны были подавить секрецию IL-8 – хемокина, отвечающего за миграцию нейтрофилов и предположительно играющего важную роль в ремоделировании эндометрия во время менструации [43].

BNO 1095 сократил выработку АФК из изолированных макрофагов человека и продемонстрировал антиоксидантные свойства в ходе бесклеточного анализа

Доказано, что некоторые фитопрепараты обладают антиоксидантным действием и таким образом могут защищать клетки от

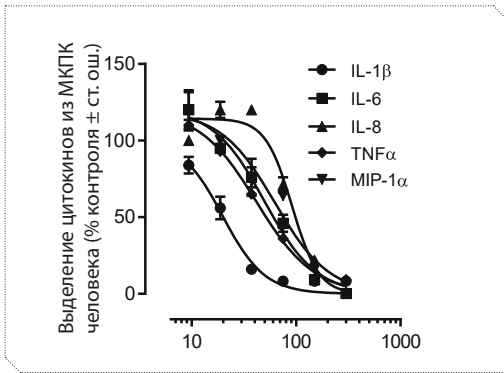


Рисунок 5. Зависимое от концентрации подавление выделения воспалительных цитокинов из МКПК человека посредством BNO 1095

BNO 1095 подавляет вызванное ЛПС выделение воспалительных цитокинов из МКПК человека. Клетки предварительно обработали BNO 1095 в течение 1 ч и затем стимулировали 50 нг/мл ЛПС в течение 24 ч. В качестве контроля носителем использовали 0,5% этанол. Данные приведены как средние значения ± ст. ош., n = 2.

повреждений, вызванных АФК. Чтобы проверить, способен ли BNO 1095 препятствовать выработке АФК, проанализировали способность макрофагов (рис. 6А) или нейтрофилов (рис. 6В) высвобождать АФК. В результате наблюдали значительное сокращение формирования АФК в клетках обоих типов после предварительной обработки BNO 1095 за 1 ч до стимуляции ФМА (форбол-12-миристат-13-ацетат). Анализ на захват свободных радикалов ДФПГ показал антиоксидантное действие экстракта BNO 1095 при значении IC₅₀, равном 92,3 мкг/мл (рис. 6С).

ДИСКУССИЯ

Уменьшение сокращений матки и уменьшение испытываемой боли посредством BNO 1095

Как в модели человека, так и в модели крысы маточные сокращения могут быть вызваны окситоцином, вазопрессином или PGF_{2α} [44, 45], хотя физиологическая

релевантность каждого лиганда в большой мере зависит от состояния имплантации (например, беременна женщина или нет) и периодического положения в цикле беременности или менструальном/эстральном цикле. Другие молекулы также важны в процессе модуляции и начала менструации, прежде всего, прогестерон и эстроген [4, 6], а также PGE₂ [3]. Так как единая модель в основе первичной дисменореи отсутствует, клиническое использование НПВП и оральных контрацептивов при лечении менструальных болей [46, 47] и ПМС [2] подразумевает применение этих молекул в указанных состояниях.

В нашей модели дисменореи *in vivo* с использованием животных крысам вводили эстрадиолбензоат 1 раз в день по 10 мг/кг массы тела, чтобы спровоцировать эндометриальную гиперплазию как предпосылку к вызванным окситоцином дисменорейным маточным сокращениям. Важно отметить, что эстрадиол доказанно вызывает выделение пролактина [48]. M. Bigazzi с соавторами [49] указывают, что пролактин человека увеличил частоту и амплитуду спонтанных сокращений матки у крыс. Это противоречит отчету J.B. Lessing и соавторов [50], демонстрирующему, что пролактин крыс не оказывает значительного влияния на миометрий этих животных, указывая на видовую специфичность пролактина. Таким образом, потенциальным эффектом эндогенного пролактина в этой модели можно пренебречь.

В нашей модели дисменореи BNO 1095 уменьшил число вызванных окситоцином маточных сокращений и оценку боли, измеренной по мимической шкале крыс. Дополнительные доказательства спазмолитического действия BNO 1095 получили в ходе экспериментов *in vitro* с использованием полосок маточной ткани человека или крыс, где BNO 1095 оказал зависимое от доз ингибирующее воздействие на сокращения, вызванные окситоцином, вазопрессином или PGF_{2α}. Эти данные подкрепляются результатами исследования, проведенного F.U. Afifi и соавторами, которые показали, что изоориентин (флавоноид, обнаруженный в экстракте целых плодов VAC (BNO 1095)) [26], оказывает зависимое от доз ингибирующее воздействие на сокращения матки крыс и морских свинок *in vitro* [22]. Противосудорожное воздействие можно отнести к благоприятному эффекту BNO 1095 при облегчении боли, вызванной менструальными спазмами. Наши результаты также дополняются данными различных исследований *in vitro*, указывающими на нейроэндокринный механизм действия экстрактов BNO 1095. В частности, препараты из экстракта BNO 1095 продемонстрировали специфическое связывание с дофаминовым рецептором D2 [27, 28], который таким образом подавляет выделение пролактина из гипофиза и системный гормональный каскад, единственно ответственный за широкий спектр менструальных симптомов у женщин во время ПМС. Следовательно, BNO 1095 оказывает не только системное, но и локальное воздействие на

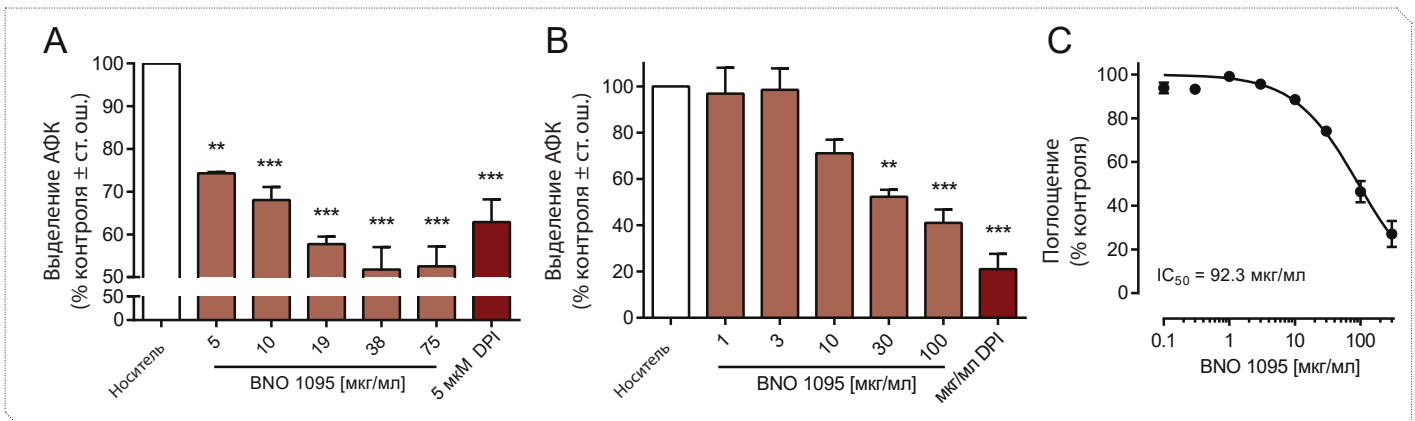


Рисунок 6. Анализ воздействия BNO 1095 на формирование клеточного АФК и поглощающую способность АФК

Влияние BNO 1095 на клеточное формирование АФК в 100 нМ (1 мкг/мл) ФМА-активированных макрофагов (А) и нейтрофилов человека (В). Антиоксидантное действие BNO 1095 в бесклеточном колориметрическом анализе (С). DPI (эталонное соединение), 5 мкМ (1,4 мкг/мл). В контроле носителем присутствовало 0,5% этанола. Данные приведены как средние значения ± ст. ош., n = 3, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

матку при контроле биологических процессов, активных в период менструации.

Снижение числа провоспалительных сигнальных молекул посредством BNO 1095

В настоящее время трудно определить, какие молекулы и процессы относятся к первичной дисменорее, а какие – к нормальному МЦ, так как дисменорея, скорее, является «усилением» обычных естественных менструальных процессов в организме. Однако наряду с увеличением интенсивности маточных сокращений стало ясно, что провоспалительные молекулы и воспалительные клетки также играют роль в отслоении эндометрия и участвуют в удалении эндометриального слоя при отсутствии беременности. И хотя это состояние далеко от «состояния заболевания», подобный воспалительный процесс при участии лейкоцитов в поздней секреторной фазе [5] может, к сожалению, повысить болевую чувствительность и/или интенсивность маточных сокращений посредством взаимосвязанных механизмов обратной связи у пациенток с первичной дисменореей.

В настоящем исследовании мы использовали сочетание *in vitro* клеточного (в основном, состоящего из моноцитов, нейтрофилов и макрофагов человека) и бесклеточного (ферментного, колориметрического) анализов, чтобы продемонстрировать ингибиторное воздействие BNO 1095 на провоспалительные и усиливающие боль LT, цитокины/хемокины и АФК. В свете роста доказательной базы о роли медиаторов воспаления в воздействии на иммунный отклик, вызывающий отслоение эндометрия во время менструации [3, 4, 6, 13, 43, 51], способность BNO 1095 эффективно подавлять выделение таких медиаторов воспаления может объяснить благоприятный эффект данного растительного экстракта при лечении первичной дисменореей.

Предполагается, что LT повышают болевую чувствительность в матке [1, 4, 13, 14, 41] и вызывают маточные сокращения [15]. К тому же, у женщин с первичной дисменореей в крови обнаружили повышенные уровни циркулирующих LTC₄ и LTD₄ [13, 14], и, следовательно, подавление маточных сокращений посредством снижения числа этих цистеинил-лейкотриенов представляет собой достоверный молекулярный механизм действия BNO 1095, что наблюдали в ходе экспериментов на крысах *in vivo*. Интересно заметить, что наше исследование ЦОГ-1/2-опосредованной ветви арахидоновой кислоты подтверждает гипотезу о том, что BNO 1095 не оказывает значительного ингибирующего воздействия на выделение PGE₂, PGF_{2α} или TXB₂ в клетках, ассоциированных с повышенным мигрирующим/воспалительным маточным откликом во время менструации [3, 4, 5, 6].

В конце концов, наши результаты предполагают, что антиоксидантные компоненты BNO 1095 могут уменьшать боль, поглощая АФК, которые увеличивают выработку PGF_{2α}, хемокинов и провоспалительных цитокинов во время менструации. В частности, АФК в сочетании с медь-цинк-супероксиддисмутазой (Cu/Zn-SOD) [4, 10] и NF-κB предположительно служат важными средствами передачи сигналов между выделением эстрогена и прогестерона и отслоением эндометрия посредством стимуляции выражения ЦОГ-2 и выделения PGF_{2α} [11].

О противовоспалительных и антиоксидантных свойствах экстрактов VAC и ряда отдельных ингредиентов VAC сообщали и ранее [25, 52, 53]. Например, M.I. Choudary и соавторы продемонстрировали способность кастицина подавлять фермент LO *in vitro* [54], а флавоноид витексин подавлял выработку провоспалительных цитокинов и вызванную воспалением боль [23] во всех экспериментальных моделях воспаления *in vivo*. Таким образом, столь широкое противовоспалительное и антиоксидантное воздействие, описанное для экстрактов VAC и его ингредиентов, может способствовать благоприятному воздействию экстрактов VAC при устранении ПМС и болезненных менструальных симптомов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наши данные *in vivo*, полученные в экспериментальной модели дисменореей, и результаты исследований *in vitro* с использованием изолированных образцов матки крысы и человека раскрыли значительную спазмолитическую способность BNO 1095 посредством локального воздействия, которая дополняет его ранее известную способность к нейроэндокринному подавлению выработки пролактина. Кроме того, BNO 1095 показал эффективное противовоспалительное действие *in vitro*, подавив биосинтез LT (но не PG), выделение цитокинов и выработку АФК из изолированных лейкоцитов человека. Способность BNO 1095 подавлять выделение этих провоспалительных молекул из амебоцитов/воспалительных клеток дополняет спазмолитический эффект экстракта и подтверждает описанное для BNO 1095 благоприятное воздействие при лечении нарушений МЦ.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Dawood, M.Y. "Primary dysmenorrhea: advances in pathogenesis and management." *Obstet Gynecol* 108.2 (2006):428–41.
- Dickerson, L.M., Mazyck, P.J., Hunter, M.H. "Premenstrual syndrome." *Am Fam Physician* 67.8 (2003): 1743–52.
- Maybin, J.A., Critchley, H.O., Jabbour, H.N. "Inflammatory pathways in endometrial disorders." *Mol Cell Endocrinol* 335.1 (2011): 42–51.
- Evans, J., Salamonsen, L.A. "Inflammation, leukocytes and menstruation." *Rev Endocr Metab Disord* 13.4 (2012): 277–88.
- Finn, C.A. "Implantation, menstruation and inflammation." *Biol Rev Camb Philos Soc* 61.4 (1986):313–28.
- Salamonsen, L.A., Woolley, D.E. "Menstruation: induction by matrix metalloproteinases and inflammatory cells." *J Reprod Immunol* 44.1–2 (1999): 1–27.
- Lundstrom, V. "The myometrial response to intra-uterine administration of PGF_{2α} and PGE₂ in dysmenorrheic women." *Acta Obstet Gynecol Scand* 56.3 (1977): 167–72.
- Ben-Jonathan, N., Hnasko, R. "Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor." *Endocr Rev* 2.6 (2001): 724–63.
- Durain, D. "Primary dysmenorrhea: assessment and management update." *J Midwifery Womens Health* 49.6 (2004): 520–8.
- Sugino, N., Karube-Harada, A., Kashida, S., et al. "Differential regulation of copper-zinc superoxide dismutase and manganese superoxide dismutase by progesterone withdrawal in human endometrial stromal cells." *Mol Hum Reprod* 8.1 (2002): 68–74.
- Sugino, N., Karube-Harada, A., Taketani, T., et al. "Withdrawal of ovarian steroids stimulates prostaglandin F_{2α} production through nuclear factor-kappa B activation via oxygen radicals in human endometrial stromal cells: potential relevance to menstruation." *J Reprod Dev* 50.2 (2004): 215–25.

12. King, A.E., Critchley, H.O. "Oestrogen and progesterone regulation of inflammatory processes in the human endometrium." *J Steroid Biochem Mol Biol* 120.2–3 (2010): 116–26.
13. Abu, J.I., Konje, J.C. "Leukotrienes in gynaecology: the hypothetical value of anti-leukotriene therapy in dysmenorrhoea and endometriosis." *Hum Reprod Update* 6.2 (2000): 200–5.
14. Nigam, S., Benedetto, C., Zonca, M., et al. "Increased concentrations of eicosanoids and platelet-activating factor in menstrual blood from women with primary dysmenorrhea." *Eicosanoids* 4.3 (1991): 137–41.
15. Carraher, R., Hahn, D.W., Ritchie, D.M., McGuire, J.L. "Involvement of lipoxygenase products in myometrial contractions." *Prostaglandins* 26.1 (1983): 23–32.
16. Institut für Demoskopie Allensbach. *Naturheilmittel 2010. Ergebnisse einer bevölkerungsrepräsentativen Befragung*. Available from: [http://www.ifd-allensbach.de/uploads/tx_studies/7528_Naturheilmittel_2010.pdf], last accessed Oct 2 2017.
17. European Medicines Agency, Committee on Herbal Medicinal Products. *Community herbal monograph on Vitex agnus castus L., fructus* (2010). EMA/HMPC/144006/2009, Google Scholar.
18. Berger, D., Schaffner, W., Schrader, E., et al. "Efficacy of Vitex agnus castus L. extract Ze 440 in patients with pre-menstrual syndrome (PMS)." *Arch Gynecol Obstet* 264.3 (2000): 150–3.
19. Carmichael, A.R. "Can Vitex Agnus Castus be Used for the Treatment of Mastalgia? What is the Current Evidence?" *Evid Based Complement Alternat Med* 5.3 (2008): 247–50.
20. Schellenberg, R. "Treatment for the premenstrual syndrome with agnus castus fruit extract: prospective, randomised, placebo controlled study." *BMJ* 322.7279 (2001): 134–7.
21. Halaska, M., Beles, P., Gorkow, C., Sieder, C. "Treatment of cyclical mastalgia with a solution containing a Vitex agnus castus extract: results of a placebo-controlled double-blind study." *Breast* 8.4 (1999): 175–81.
22. Afifi, F.U., Khalil, E., Abdalla, S. "Effect of isoorientin isolated from *Arum palaestinum* on uterine smooth muscle of rats and guinea pigs." *J Ethnopharmacol* 65.2 (1999): 173–7.
23. Borghi, S.M., Carvalho, T.T., Staurengo-Ferrari, L., et al. "Vitexin inhibits inflammatory pain in mice by targeting TRPV1, oxidative stress, and cytokines." *J Nat Prod* 76.6 (2013): 1141–9.
24. European Medicines Agency, Committee on Herbal Medicinal Products. *Assessment report on Vitex agnus-castus L., fructus* (2010). EMA/HMPC/144003/2009, Google Scholar.
25. Hajdu, Z., Hohmann, J., Forgo, P., et al. "Diterpenoids and flavonoids from the fruits of Vitex agnus-castus and antioxidant activity of the fruit extracts and their constituents." *Phytother Res* 21.4 (2007): 391–4.
26. Hogner, C., Sturm, S., Seger, C., Stuppner, H. "Development and validation of a rapid ultra-high performance liquid chromatography diode array detector method for Vitex agnus-castus." *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 927 (2013): 181–90.
27. Jarry, H., Leonhardt, S., Gorkow, C., Wuttke, W. "In vitro prolactin but not LH and FSH release is inhibited by compounds in extracts of Agnus castus: direct evidence for a dopaminergic principle by the dopamine receptor assay." *Exp Clin Endocrinol* 102.6 (1994): 448–54.
28. Meier, B., Berger, D., Hoberg, E., et al. "Pharmacological activities of Vitex agnus-castus extracts in vitro." *Phytomedicine* 7.5 (2000): 373–81.
29. Sliutz, G., Speiser, P., Schultz, A.M., et al. "Agnus castus extracts inhibit prolactin secretion of rat pituitary cells." *Horm Metab Res* 25.5 (1993): 253–5.
30. Wuttke, W., Jarry, H., Christoffel, V., et al. "Chaste tree (*Vitex agnus-castus*) – pharmacology and clinical indications." *Phytomedicine* 10.4 (2003): 348–57.
31. Winterhoff, H. "Die Hemmung der Laktation bei Ratten als indirekter Beweis für die Senkung von Prolaktin durch *Agnus castus*." *Zeitschrift für Phytotherapie (Sonderdruck)* 12.6 (1991): 175–9.
32. Sotocinal, S.G., Sorge, R.E., Zaloum, A., et al. "The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions." *Mol Pain* 7.55 (2011).
33. Goldstein, L.B., Davis, J.N. "Beam-walking in rats: studies towards developing an animal model of functional recovery after brain injury." *J Neurosci Methods* 31.2 (1990): 101–7.
34. Flierl, M.A., Stahel, P.F., Beauchamp, K.M., et al. "Mouse closed head injury model induced by a weight-drop device." *Nat Protoc* 4.9 (2009): 1328–37.
35. Fischer, L., Szellas, D., Radmark, O., et al. "Phosphorylation and stimulus-dependent inhibition of cellular 5-lipoxygenase activity by nonredox-type inhibitors." *FASEB J* 17.8 (2003): 949–51.
36. Werz, O., Burkert, E., Samuelsson, B., et al. "Activation of 5-lipoxygenase by cell stress is calcium independent in human polymorphonuclear leukocytes." *Blood* 99.3 (2002): 1044–52.
37. Bartsch, O., Bartlick, B., Ivell, R. "Phosphodiesterase 4 inhibition synergizes with relaxin signaling to promote decidualization of human endometrial stromal cells." *J Clin Endocrinol Metab* 89.1 (2004): 324–34.
38. Franova, S., Janicek, F., Visnovsky, J., et al. "Uterorelaxant effect of PDE4-selective inhibitor alone and in simultaneous administration with beta2-mimetic on oxytocin-induced contractions in pregnant myometrium." *J Obstet Gynaecol Res* 35.1 (2009): 20–5.
39. Mehats, C., Tanguy, G., Dallot, E., et al. "Is up-regulation of phosphodiesterase 4 activity by PGE2 involved in the desensitization of beta-mimetics in late pregnancy human myometrium?" *J Clin Endocrinol Metab* 86.11 (2001): 5358–65.
40. Oger, S., Mehats, C., Barnette, M.S., et al. "Anti-inflammatory and utero-relaxant effects in human myometrium of new generation phosphodiesterase 4 inhibitors." *Biol Reprod* 70.2 (2004): 458–64.
41. Bieglmayer, C., Hofer, G., Kainz, C., et al. "Concentrations of various arachidonic acid metabolites in menstrual fluid are associated with menstrual pain and are influenced by hormonal contraceptives." *Gynecol Endocrinol* 9.4 (1995): 307–12.
42. Clark, K., Myatt, L. "Prostaglandins and the Reproductive Cycle." *Glob libr women's med* (2008). DOI: 10.3843/GLOWM.10314
43. Kelly, R.W., Illingworth, P., Baldie, G., et al. "Progesterone control of interleukin-8 production in endometrium and chorio-decidual cells underlines the role of the neutrophil in menstruation and parturition." *Hum Reprod* 9.2 (1994): 253–8.
44. Akerlund, M. "Vasopressin and oxytocin in normal reproduction and in the pathophysiology of preterm labour and primary dysmenorrhoea. Development of receptor antagonists for therapeutic use in these conditions." *Rocz Akad Med Bialymst* 49 (2004): 18–21.
45. Chan, W.Y. "Relationship between the uterotonic action of oxytocin and prostaglandins: oxytocin action and release of PG-activity in isolated nonpregnant and pregnant rat uteri." *Biol Reprod* 17.4 (1977): 541–8.
46. Calis, K., Eroglu, M., Popat, V., et al. "Dysmenorrhoea." *Medscape* (2015). Available from: [http://emedicine.medscape.com/article/253812-overview], last accessed Oct 2 2017.
47. Stöppler, M., Shiel, W. "Menstrual Cramps (Dysmenorrhoea)." *MedicineNetcom* (2015). Available from: [http://www.medicinenet.com/menstrual_cramps/article.htm], last accessed Oct 2 2017.
48. Ignacak, A., Kasztelnik, M., Sliwa, T., et al. "Prolactin – not only lactotrophin. A "new" view of the "old" hormone." *J Physiol Pharmacol* 63.5 (2012): 435–43.
49. Bigazzi, M., Nardi, E. "Prolactin and relaxin: antagonism on the spontaneous motility of the uterus." *J Clin Endocrinol Metab* 53.3 (1981): 665–7.
50. Lessing, J.B., Brenner, S.H., Weiss, G. "Effect of prolactin and relaxin on in vitro rat uterine contractions and prolactin interaction with relaxin." *Obstet Gynecol* 64.1 (1984): 97–100.
51. Critchley, H.O., Jones, R.L., Lea, R.G., et al. "Role of inflammatory mediators in human endometrium during progesterone withdrawal and early pregnancy." *J Clin Endocrinol Metab* 84.1 (1999): 240–8.
52. Saglam, H., Pabuccuoglu, A., Kivcak, B. "Antioxidant activity of Vitex agnus castus L. extracts." *Phytother Res* 21.11 (2007).
53. Sarikurkcü, C., Ariso, K., Tepe, B., et al. "Studies on the antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of Vitex agnus castus L. fruits from Turkey." *Food Chem Toxicol* 47.10 (2009): 2479–83.
54. Choudhary, M.I., Azizuddin, C., Jalil, S., et al. "Anti-inflammatory and lipoxygenase inhibitory compounds from Vitex agnus-castus." *Phytother Res* 23.9 (2009): 1336–9. □



VITEX AGNUS-CASTUS СУХОЙ ЕКСТРАКТ ВНО 1095 (ЦИКЛОДИНОН®) ПОДАВЛЯЄ ГІПЕРСОКРАЩЕННЯ І ВОСПАЛЕННЯ МАТКИ В ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ МОДЕЛЯХ ПЕРВИЧНОЇ ДИСМЕНОРЕЇ

J. Röhrl, відділення доклінічних досліджень і розробок компанії «Біонорика СЕ», Ноймаркт, Німеччина
O. Werz, відділення фармацевтичної/медичинської хімії, Інститут фармації університету ім. Фрідріха Шиллера, Йена, Німеччина
A. Ammendola, відділення доклінічних досліджень і розробок компанії «Біонорика СЕ», Ноймаркт, Німеччина
G. Künstle, відділення доклінічних досліджень і розробок компанії «Біонорика СЕ», Ноймаркт, Німеччина

Предпосылки. Для многих женщин ежемесячный дискомфорт, вызванный менструальными болями внизу живота, является достаточно серьезным состоянием, которое отрицательно влияет на качество жизни. В случае первичной дисменореи – состояния, связанного с предменструальным синдромом (ПМС), – интенсивные сокращения матки считают причиной сильной боли, которая возникает, несмотря на отсутствие скрытой инфекции или других идентифицируемых с медицинской точки зрения болезненных состояний. Сопутствующие гиперсокращения матки напоминают роды, а связанная с ними боль, как правило, опосредуется выделением простагландинов, лейкотриенов и инфильтрацией лейкоцитов, которые обычно сопровождают отслоение эндометриального слоя.

Стандартизированные экстракты плодов *Vitex agnus-castus* (экстракты VAC прутняка обыкновенного или витекса священного) клинически эффективны при лечении симптомов ПМС, хотя механизмы действия химически сложной смеси природных компонентов, входящих в экстракт, в основном неизвестны.

Методика. Используя модель дисменореи *in vivo*, крысам вводили 10 мг/кг эстрадиолбензоата интраперитонеально один раз в день в течение 12 дней и 2,1/10,3/20,7 мг/кг сухого экстракта VAC перорально один раз в день в течение 7 дней до провоцирования спазмов. Маточные сокращения провоцировали путем ввода 2 МЕ/кг окситоцина интраперитонеально, после этого наблюдали за спазмами в животе и болевыми симптомами в последний день эксперимента. Более того, применяли методы *in vitro*, описанные в разделе «Методы».

Результаты. Мы показали, что растительный сухой экстракт VAC BNO 1095 (доступный в продаже под названием Циклодинон®) действует на миоэлектрические и сигнальные молекулы воспаленных амебоцитов/воспалительных клеток. В частности, BNO 1095 оказал зависимое от дозы ингибиторное воздействие на маточные сокращения, вызванные окситоцином, у крыс модели дисменореи *in vivo* и вызванные лекарственным препаратом сокращения изолированного миоэлектрика человека и крысы *in vitro*. Более того, BNO 1095 продемонстрировал многообещающий противовоспалительный потенциал, эффективно подавив активность 5-липоксигеназы и выработку лейкотриенов, а также сократив выработку активных форм кислорода и воспалительных цитокинов *in vitro*.

Вывод. Эти результаты доказывают, что BNO 1095 эффективно способствует устранению патологических симптомов, связанных с менструацией, включая первичную дисменорею.

Ключевые слова: цитокины, дисменорея, лейкотриены, липоксигеназа, менструальный дискомфорт, предменструальный синдром, спазмолитик, *Vitex agnus-castus*, Циклодинон.

VITEX AGNUS-CASTUS СУХИЙ ЕКСТРАКТ ВНО 1095 (ЦИКЛОДИНОН®) ПРИГНІЧУЄ ГІПЕРСОКОРОЧЕННЯ І ЗАПАЛЕННЯ МАТКИ В ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ МОДЕЛЯХ ПЕРВИЧНОЇ ДИСМЕНОРЕЇ

J. Röhrl, відділення доклінічних досліджень і розробок компанії «Біонорика СЕ», Ноймаркт, Німеччина
O. Werz, відділення фармацевтичної/медичинської хімії, Інститут фармації університету ім. Фрідріха Шиллера, Йена, Німеччина
A. Ammendola, відділення доклінічних досліджень і розробок компанії «Біонорика СЕ», Ноймаркт, Німеччина
G. Künstle, відділення доклінічних досліджень і розробок компанії «Біонорика СЕ», Ноймаркт, Німеччина

Передумови. Для багатьох жінок щомісячний дискомфорт, викликаний менструальними болями внизу живота, є досить серйозним станом, який негативно впливає на якість життя. В разі первинної дисменорей – стану, пов'язаного з передменструальним синдромом (ПМС), – інтенсивні скорочення матки вважають причиною сильного болю, який виникає, незважаючи на відсутність прихованої інфекції або інших ідентифікованих з медичного погляду хворобливих станів. Супутні гіперскорочення матки нагадують пологи, а пов'язаний із ними біль, як правило, опосередковується виділенням простагландинів, лейкотрієнів та інфільтрацією лейкоцитів, які зазвичай супроводжують відшарування ендометріального шару.

Стандартизовані екстракти плодів *Vitex agnus-castus* (екстракти VAC прутняка звичайного або витекса священного) клінічно ефективні при лікуванні симптомів ПМС, хоча механізми дії хімічно складної суміші природних компонентів, що входять до екстракту, переважно невідомі.

Методика. Використовуючи модель дисменорей *in vivo*, щурам вводили 10 мг/кг естрадіолбензоату інтраперитонеально один раз на день протягом 12 днів і 2,1/10,3/20,7 мг/кг сухого екстракту VAC перорально один раз на день протягом 7 днів до провокування спазмів. Маткові скорочення провокували шляхом введення 2 МЕ/кг окситоцину інтраперитонеально, після цього спостерігали за спазмами в животі та божевими симптомами в останній день експерименту. Більше того, застосовували методи *in vitro*, описані в розділі «Методи».

Результати. Ми показали, що рослинний сухий екстракт VAC BNO 1095 (доступний у продажу під назвою Циклодинон®) діє на міоетрії і сигнальні молекули запалення пов'язаних амебоцитів/запальних клітин. Зокрема, BNO 1095 справив залежний від дози інгібуючий вплив на маткові скорочення, викликані окситоцином, у щурів моделі дисменорей *in vivo* і викликані лікарським препаратом скорочення ізольованого міоетрія людини і щура *in vitro*. Більше того, BNO 1095 продемонстрував багатообіцяючий протизапальний потенціал, ефективно подавивши активність 5-ліпоксигенази і вироблення лейкотрієнів, а також скоротивши вироблення активних форм кисню і запальних цитокинів *in vitro*.

Висновок. Ці результати доводять, що BNO 1095 ефективно сприяє усуненню патологічних симптомів, пов'язаних із менструацією, в тому числі первинної дисменорей.

Ключові слова: цитокини, дисменорея, лейкотрієни, ліпоксигеназа, менструальний дискомфорт, передменструальний синдром, спазмолітик, *Vitex agnus-castus*, Циклодинон.

VITEX AGNUS-CASTUS DRY EXTRACT BNO 1095 (CYCLODYNON®) INHIBITS UTERINE HYPER-CONTRACTIONS AND INFLAMMATION IN EXPERIMENTAL MODELS FOR PRIMARY DYSMENORRHEA

J. Röhrl, Department of Preclinical Research and Development, Bionorica SE, Neumarkt, Germany
O. Werz, Department of Pharmaceutical/Medicinal Chemistry, Institute of Pharmacy, Friedrich-Schiller-University, Jena, Germany
A. Ammendola, Department of Preclinical Research and Development, Bionorica SE, Neumarkt, Germany
G. Künstle, Department of Preclinical Research and Development, Bionorica SE, Neumarkt, Germany

Background. For many women, the monthly suffering induced by menstrual “cramps” is severe enough to profoundly disrupt their quality of life. In the case of primary dysmenorrhea, a condition related to premenstrual syndrome (PMS), intense uterine contractions are thought to trigger moderate to intense pain despite the absence of an underlying infection or other medically-identifiable disease states. The associated uterine hyper-contraction is reminiscent of labor, and associated pain is likely to be mediated by the release of prostaglandins, leukotrienes and the infiltration of leukocytes that normally accompany the breakdown of the endometrial lining.

Standardized extracts of *Vitex agnus-castus* berries (VAC extracts of chaste tree, or chaste berries) are clinically effective in treating the symptoms of PMS, yet the mechanisms of how the chemically complex mixture acts are largely unknown.

Methods. Using an *in vivo* dysmenorrhea model rats were treated with 10 mg/kg estradiol-benzoate i.p. once daily for 12 days and with 2.1, 10.3 or 20.7 mg/kg VAC dry extract p.o. once daily for 7 days prior to inductions of convulsions. Uterine contractions were induced with 2 IU/kg oxytocin i.p., followed by monitoring of abdominal convulsions and signs of pain on the last day of the experiment. Moreover, *in vitro* methods were applied that are described in the methods section.

Results. Here, we show that the VAC herbal dry extract BNO 1095 (commercially available as CycloDYNON®) targets the uterine myometrial tissue and inflammatory signaling molecules of associated migratory/inflammatory cells. Specifically, BNO 1095 dose-dependently inhibited oxytocin-induced uterine contractions in a rat dysmenorrhea model *in vivo* and drug-induced contractions in isolated human and rat uterine tissue *in vitro*. Furthermore, BNO 1095 showed a promising anti-inflammatory capacity by potently inhibiting 5-lipoxygenase activity and leukotriene production and by reducing the production of reactive oxygen species and inflammatory cytokines *in vitro*.

Conclusion. These results provide evidence that BNO 1095 effectively treats menstruation-related complaints including primary dysmenorrhea.

Keywords: cytokines, dysmenorrhea, leukotriene, lipoxygenase, menstrual complaints, premenstrual syndrome, spasmolytic, *Vitex agnus-castus*, CycloDYNON.