



(11) **LT 7047 B**

(51) Int. Cl. (2024.01): **A61K 36/18**
A61K 127/00
A61K 131/00

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(21) Paraiškos numeris: **2022 510**
(22) Paraiškos padavimo data: **2022-03-29**
(41) Paraiškos paskelbimo data: **2023-10-10**
(45) Patento paskelbimo data: **2024-02-12**

(73) Patento savininkas:
UAB „BIOKOSMETIKOS MANUFAKTŪRA“,
Mokslininkų g. 6A, 08412 Vilnius, LT
(72) Išradėjas:
Birutė Drungilienė, LT
(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:
Jurga PETNIŪNAITĖ, 51, AAA Law, A. Goštauto g.
40B, Verslo centras „Dvyniai“, LT-03163 Vilnius, LT

LT 7047 B

(54) Pavadinimas:
Augalinių aliejų kompozicija skirta prevencinei apsaugai nuo SARS-CoV-2 infekcijos

(57) Referatas:
Išradimas apima naują aliejinę kompoziciją, skirtą organizmo apsaugai nuo SARS-CoV-2 infekcijos. Visos sudėtinės produkto žaliavos, remiantis moksliniais tyrimais, pasižymi veiksmingu antivirusiniu poveikiu. Atrinktų komponentų priešvirusinis aktyvumas pasireiškia viruso spyglio baltymo galimybės prisijungti prie šeimininko ląstelės receptoriaus blokavimu, taip pat viruso neutralizavimu. Kompoziciją sudaro sėjamosios juodgrūdės, arbatmedžio, vaistinio čiobrelio, lauro lapų ir saulėgrąžų aliejai bei marginių fitosomos.

TECHNIKOS SRITIS

Išradimas yra susijęs su nauja aliejine kompozicija skirta organizmo apsaugai nuo SARS-CoV-2 infekcijos.

TECHNIKOS LYGIS

Sunkus ūmus respiracinis sindromas (SŪRS, angl. SARS) yra neseniai pripažinta sunki kvėpavimo takų liga, atsirandanti dėl naujos koronaviruso sukeltos infekcijos (SARS CoV) [1]. Manoma, jog pirmieji susirgimai fiksuoti tarp žmonių gali būti jau 2002 m. lapkričio mėn. Kinijoje [2]. Sindromas išaiškintas 2003 m. vasarį.

Šiandien jau pilnai išaiškinta viruso sandara ir mechanizmas kaip virusas prisijungia prie šeimininko ląstelės. Kaip ir kiti koronavirusai SARS-CoV-2 virusas yra sudarytas iš RNR genomo, kuriame užkoduoti viruso replikaciniai baltymai ir struktūriniai baltymai, įskaitant viruso spyglį (S), membranos baltymus (M), viruso apvalkalo baltymus (E) ir kitus necharakterizuotus viruso baltymus [3]. Infekcija nustatoma, kai virusas prisijungia prie šeimininko ląstelių receptoriaus per spyglio baltymą (S). Ši jungtis yra viena svarbiausių, kuriant vaistinius, prevencinius preparatus ir vakcinas prieš šią infekciją.

Šiuo metu vakcinacija tebėra vienas iš pagrindinių naudojamų būdų ligos plitimo prevencijai. 2021 m. liepos 20 d. duomenimis rinkoje prieinamos yra šešios vakcinos: AstraZeneca - Vaxzevria, Janssen Ad26.COV 2.5, Moderna - mRNA-1273, Pfizer BioNTech - Comirnaty, COVID-19 vaccine BIBP ir Sinovac-CoronaVac.

Dėl galimų šalutinių poveikių ir prieštaringo nusistatymo, ne visiems asmenims vakcinacija yra priimtinas būdas prevencinei apsaugai nuo SARS-CoV-2 virusinės infekcijos. Todėl pradėta ieškoti alternatyvių ir saugių metodų kaip būtų galima apsisaugoti nuo koronaviruso infekcijos.

Pradėta paieška aktyvių medžiagų, kurios būtų tinkamos ir saugios naudoti žmonėms ir pasižymėtų antivirusinėmis savybėmis prieš SARS-CoV-2 virusą.

Dauguma literatūroje aprašytų junginių yra sintetinės kilmės. Norint sukurti natūralios kilmės produktą, išanalizuoti augalinės kilmės produktai, kurie turi reikiamų savybių SARS-CoV-2 virusinės infekcijos profilaktikai ir gydymui. Iš mokslinėje literatūroje aprašytų *in vitro* tyrimų yra daug įrodymų, kad eteriniai aliejai gali būti

naudojami kaip antivirusiniai vaistai žmogaus virusinėms infekcijoms, įskaitant SARS koronavirusus, gydyti. Šie antivirusiniai eteriniai aliejai dažniausiai buvo tiriami nuo virusų, tokių kaip 1 tipo *Herpes simplex* virusas, Junin virusas, gripo virusas, 2 tipo dengės karštligės virusas ir SARS koronavirusai, taip pat nuo apvalkalo neturinčių virusų, tokių kaip Koksakio virusas B1, poliovirusas ir 3 tipo adenovirusas. Dauguma šių kliniškai naudingų antivirusinių agentų yra medžiagos, veikiančios tam tikrus viruso biosintezės etapus, ypač slopinančias viruso replikaciją. Kita vertus, antivirusiniai agentai gali denatūruoti viruso struktūrą ar glikoproteinus, taip sumažindami arba visiškai užblokuodami viruso dalelių užkrečiamumą. Nustatyta, kad angiotenziną konvertuojančio fermento 2 (ACE2) receptorių, šeimininko ląstelėse, atlieka esminį vaidmenį viruso patekimui į ląsteles; todėl ACE2 blokatoriai gali būti galimas taikinytis antivirusinei intervencijai.

Senthil Kumar su kolegomis atliktame tyrime buvo patikrintas 10 eterinių aliejų ACE2 slopinamasis poveikis. Iš jų 8 eteriniai aliejai pasižymėjo reikšmingu ACE2 slopinimu. Įdomu tai, kai kurie eteriniai aliejai stipriai slopino ACE2 aktyvumą, neparodydami citotoksiškumo. Pagrindiniai eterinių aliejų komponentai - citranelolis, geraniolis, limonenas, linalolis ir nerylacetatas inaktyvuoja ACE2 receptorių aktyvumą šeimininko epitelio ląstelėse [4].

Daugelis iš aukščiau aprašytų komponentų gali būti randami ir *Nigella sativa* (sėjamoji juodgrūdė) aliejuje. Tradicinėje medicinoje sėjamoji juodgrūdė šimtmečius buvo naudojama įvairioms ligoms gydyti, įskaitant astmą, peršalimą, galvos skausmą, nosies užgulimą, reumatines ligas, karpas ir daugelį kitų. Mokslinės literatūros apžvalgoje aptikti mažiausiai 8 *in silico* tyrimai, kurie ištyrė *Nigella sativa* aliejuje esančių junginių poveikį SARS-CoV-2 virusui. Buvo atliktas molekulinis junginių iš *Nigella sativa* ir kai kurių antivirusinių vaistų (chlorokvino, hidroksichlorokvino, favipiraviras ir sakvinaiviro) prijungimas prie SARS-CoV-2 viruso molekulinio taikinio, tokių kaip pagrindinės proteazės (6LU7 ir 6Y2E), pagrindinės peptidazės (2GTB), angiotenziną konvertuojančio fermento 2 (ACE2)) ir karščio šoko baltymo A5. Junginių prisijungimas prie viruso molekulinio taikinio gali užkirsti kelią koronaviruso prisijungimui prie šeimininko ląstelių. *Nigella sativa* aktyvūs komponentai, prijungti prie viruso aktyvių vietų, kai kuriais atvejais sudarė kompleksus su didesniais energetiniais balais nei antivirusinių vaistų.

Mokslinėje literatūroje aprašytas arbatmedžio (*Melaleuca alternifolia*) eterinio

aliejaus antimikrobinis aktyvumas prieš gramteigiamas ir gramneigiamas bakterijas, aerobines ir anaerobines bakterijas, mieles ir pelėsius. Taip pat mokslinėje literatūroje aprašytas arbatmedžio aliejus antivirusinis aktyvumas prieš DNR ir RNR virusus, tokius kaip influenza A/PR8 virusą H1N1, Herpes simplex virusus (HSV-1) ir (HSV-2), Echo virusą 9, Poliovirusą 1, Cocksackievirusą B1 ir Adenovirusą 2, taip pat gali padėti atsikratyti virusų, sukeliančių peršalimą ir gripą [5]. Monoterpenų derinys arbatmedžio aliejuje rodo sinergetinį antivirusinį poveikį. Visos šios savybės parodė arbatmedžio aliejaus veiksmingumo prieš SARs-CoV-2 tikimybę [6].

Mokslinėje literatūroje aprašytas vaistinio čiobrelio (*Thymus vulgaris*) eterinio aliejaus pagrindinio ingrediento - tymolio antibakterinis aktyvumas prieš *L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. enterica*, *S. aureus*, *C. botulinum*, *C. perfringens*, *S. sonnei*, *S. lutea*, *M. flavus*, *B. hermosphacta*, *L. innocua*, *L. monocytogenes*, *P. putida* ir *S. putrefaciens* bakterijas *in vitro* tyrimuose. Taip pat aprašytas čiobrelio antivirusinis aktyvumas prieš H1N1 A tipo, HSV-1 ir HSV-2 virusus [7]. *T. vulgaris* eteriniame aliejuje aptinkami monoterpenų angliavandeniliai pasižymi antivirusinėmis savybėmis, o α -terpineolis, α -pinenas, terpinen-4-olis, 1, 8-cineolis rodo stiprų slopinamojo poveikio prieš COVID-19 virusą tikimybę [6], [8].

Mokslinėje literatūroje aprašytas lauro lapų (*Laurus nobilis*) eterinio aliejaus antibakterinis ir antivirusinis aktyvumas. Eterinio aliejaus antibakterinis aktyvumas pasireiškė prieš *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *B. cereus* (Gramteigiamas) ir *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (Gramneigiamas) bakterijas. Manoma, kad *L. nobilis* eterinio aliejaus komponentai β -okimenas, α - ir β -pinenai ir 1,8-cineolis yra galimi komponentai kuriant priemones nuo COVID-19, slopinant pagrindinę viruso proteazę (Mpro) [9].

Vitaminas E, stiprus riebaluose tirpus antioksidantas, kurio koncentracija imuninėse ląstelėse yra didesnė, palyginti su kitomis kraujo ląstelėmis. Įrodyta, kad vitamino E trūkumas kenkia normaliai gyvūnų ir žmonių imuninės sistemos funkcijai, kurią galima ištaisyti mitybą papildant vitaminu E. Nors vitamino E trūkumas yra retas, įrodyta, kad vitamino E papildų vartojimas pagerina imuninės sistemos funkciją ir sumažina infekcijos riziką, ypač vyresnio amžiaus žmonėms [10], [11]. Mechanizmai, atsakingi už vitamino E poveikį imuninei sistemai ir uždegimui buvo ištirti atliekant ląstelių ikiklinikinius ir klinikinius intervencijos tyrimus. Vitaminas E moduliuoja T ląstelių funkciją tiesiogiai paveikdamas T ląstelių membranos

vientisumą, signalo perdavimą ir ląstelių dalijimąsi, taip pat netiesiogiai paveikdamas uždegiminius procesus [12]. Imuninės funkcijos moduliavimas vitaminu E turi klinikinę reikšmę, nes jis veikia šeimininko jautrumą infekcinėms ligoms, tokioms kaip kvėpavimo takų infekcijos ar alerginėms ligoms, tokioms kaip astma [13]. Tyrimai, kuriuose nagrinėjamas vitamino E vaidmuo imuninėje sistemoje, dažniausiai buvo skirti α -tokoferoliui, tačiau nauji įrodymai rodo, kad kitos vitamino E formos, įskaitant kitus tokoferolius ir tokotrienolius, taip pat gali turėti stiprių imunomoduliacinių funkcijų [14].

Fitosomos - tai nauja patentuota technologija, kurios būdu standartizuoti augaliniai ekstraktai yra prijungiami prie fosfolipidų, taip gaunami aliejuje tirpūs molekuliniai kompleksai. Dauguma biologiškai aktyvių augalų sudedamųjų dalių yra polinės arba vandenyje tirpios molekulės. Tačiau vandenyje tirpios fito sudedamosios dalys, tokios kaip flavonoidai, taninai, glikozidiniai aglikonai ir kt., yra prastai absorbuojamos organizme. Dėl didelio molekulinio dydžio molekulės negali absorbuoti pasyvios difuzijos būdu arba dėl tirpumo lipiduose. Šios savybės smarkiai riboja jų gebėjimą prasiskverbti pro daug lipidų turinčias biologines membranas [15]. Padidėjęs fitosomų biologinis prieinamumas, palyginti su paprastesniais, nesudėtingais augalų ekstraktais, buvo įrodytas farmakokinetikos ir aktyvumo tyrimais [16]. Silimarinas yra flavonoidų kompleksas, išgautas iš *Silybum marianum* augalo. Jis veikia kaip stiprus antioksidantas įvairiais mechanizmais. Tačiau, be antioksidacinio poveikio, silimarinas/silibinas turi imunomoduliacinį poveikį. Nustatyta, kad silimarinas turi prieš uždegiminį poveikį taip pat turi skirtingą imunomoduliacinę veiklą, priklausomai nuo dozės ir laiko. Silimarinas, būdamas imunomodulatorius, mažomis dozėmis slopina T-limfocitų funkciją, o didelėmis dozėmis stimuliuoja uždegiminius procesus. Tyrimų metu nustatyta, kad silimarinas susilpnino autoimunines, alergines, preeklampsijos, vėžio ir imuninės sistemos sukeltas kepenų ligas, taip pat slopino oksidacinį ir nitrozinį imunitetą [17].

Nuo SARS-CoV-2 viruso infekcijos pradžios jau yra patentų paraiškose aprašytų ingredientų, kovai su šia infekcija. Dauguma aprašytų junginių yra sintetinės kilmės, todėl vartotojų grupei, kurie pirmenybę teikia natūralios kilmės produktams, nebus tinkami. Paminėtos paraiškos taip pat neturi biomedicininiais ir klinikiniais tyrimais pagrįsto veiksmingumo ir saugumo vartoti šiuos junginius SARS-CoV-2 viruso infekcijos profilaktikai ir simptomų gydymui.

Patento paraiškoje WO2020080682A1 aprašytas chinolinono junginys, kuris pasižymi puikiu slopinamuoju poveikiu koronaviruso infekcijai. Jis gali būti naudojamas farmacinėse kompozicijose, skirtose užkirsti kelią arba gydyti ligas, kurias sukelia koronaviruso infekcija.

Patente CN109111405B aprašytas aromatinio tioeterio junginio galimas panaudojimas gaminant vaistą nuo SARS-CoV-2 viruso infekcijos, nes aprašytas junginys veikia kaip SARS koronaviruso pagrindinės proteazės inhibitorius.

Patente CN111184707B aprašytas antikoronavirusinis terapinis agentas tolfenamo druska, kuri tinkama SARS koronaviruso infekcijos profilaktikai ir gydymui, veikianti kaip koronaviruso 3CL hidrolazės (Mpro) inhibitorius.

Buvo nagrinėjama FDA patvirtinta vaistų biblioteka. Atrinkti ir ištirti trisdešimt vienas junginys, įvertintas jų efektyvumas. Nustatyti dvidešimt devyni junginiai, pasižymintys antivirusinėmis savybėmis ir gali būti naudojami kuriant preparatus SARS CoV virusinės infekcijos profilaktikai ir gydymui. Iš atrinktų junginių patento paraiškoje KR102185947B1 aprašytas junginys vinpocetinas, KR102185946B1 aprašytas junginys meklizinas ir KR102185945B1 aprašytas junginys flunarizinas. Visi išskirti trys junginiai pasižymėjo stipriomis antivirusinėmis savybėmis.

Artimiausias sukurtai kompozicijai produktas aprašytas patento dokumente CN111184805B. Čia aprašoma tradicinėje kinų medicinoje naudojamos augalinių komponentų kompozicijos, kurios yra tinkamos SARS koronaviruso infekcijos profilaktikai ir gydymui, tačiau nėra tai įrodančių biomedicininų ir klinikinių tyrimų.

Patento dokumente CN111184805B aprašytos kelios kompozicijos. Kompozicijoje naudojami augaliniai komponentai ir mineralai: taivaninis trisparnis (*Tripterygium wilfordii*), hidratuotas kalcio sulfatas, batatinė dioskorėja (*Dioscorea polystachya*), tradicinis vaistinis preparatas iš rusvojo beridžio (*Scrophularia ningpoensis*), forsitijos (*Forsythia suspensa*) vaisiai, cikadų (*Periostracum cicadae*) ekstraktas, švelnūs skambalėlis (*Codonopsis pilosula*), mėtos, varnalėšos, geležies(III) oksidas, Chai Hu šaknis (*Radix bupleuri*), pinelijos (*Pinellia ternata*), baikalinė kalpokė (*Scutellaria baicalensis*), paprastoji nendrė (*Phragmites australis*), mandarininio citrinmedžio (*Citrus reticulata*) vaisių egzokarpas, stačiasis varpelis (*Adenophora stricta*), šlaitinio saliuvo šaknys (*Peucedanum praeruptorum*), stambiažiedis plačiavarpis (*Platycodon grandiflorus*), migdolai (*Prunus amygdalus*),

meduje keptos saldymedžio šakinys (*Glycyrrhiza glabra*), ilgavaisė kutuotė (*Trichosanthes cucumerina*), laukinis svogūnas (*Allium macrostemon*), poria cocos grybas (*Wolfiporia extensa*), tradicinis vaistinis preparatas iš uodegotosios pinelijos (*Pinellia ternata*), džiovintos apelsino žievelės, karčiavaisis citrinmedis (*Citrus aurantium*), bambuko drožlės, siauralapis ajeras (*Acorus gramineus*).

Panašių produktų veiksmingumas ir saugumas yra pagrįstas tik jau atliktais moksliniais atskirų komponentų tyrimais. Norint užtikrinti, kad sukurtas produktas yra veiksmingas ir saugus vartoti atliekami formuliacijos ikiklinikiniai ir klinikiniai tyrimai. Mūsų tikslas - sukurti išgrynintą efektyvią kompoziciją, kuri pasižymėtų mokliškai patvirtintu aktyvumu prieš SARS-CoV-2 viruso infekciją. Todėl atlikus mokslinės literatūros analizę, atrinkti naujausiuose straipsniuose aprašyti augaliniai ingredientai, kurie labiau žinomi Europos vartotojui ir turi mokslinį pagrindimą kovai su SARS-CoV-2 viruso infekcija.

IŠRADIMO ESMĖ

Atsižvelgiant į SARS-CoV-2 viruso infekcijos plitimą ir šiuo metu naudojamus būdus apsisaugoti nuo šios infekcijos, buvo kuriamas produktas, skirtas kasdienei prevencinei apsaugai nuo viruso patekimo per išorinius kvėpavimo takus (nosį ir burną). Norint sukurti efektyvų produktą buvo išnagrinėtos skirtingų augalų antrinių metabolitų savybės, galinčios slopinti/stabdyti viruso prisijungimą prie šeimininko ląstelės ir atrinkti augaliniai produktai, kurie, remiantis moksliniais tyrimais, pasižymėjo efektyviausiomis apsauginėmis savybėmis.

Kompozicija veikianti SARS-CoV-2 virusą sudaryta iš 68-99 % sėjamosios juodgrūdės (*Nigella sativa*) sėklų aliejaus, 0,1-5,0 % arbatmedžio (*Melaleuca alternifolia*) lapų eterinio aliejaus, 0,5-5,0 % vaistinio čiobrelio (*Thymus vulgaris*) lapų/žiedų eterinio aliejaus, 0,1-5,0 % lauro lapų (*Laurus nobilis*) eterinio aliejaus, 0,4-10,0 % vitamino E tirpinto saulėgrąžų (*Helianthus annuus*) sėklų aliejuje ir 0,1-7,0 % margainių (*Silybum marianum*) fitosomų.

TRUMPAS BRĖŽINIŲ APRAŠYMAS

Tinkamiausi išradimo variantai yra aprašyti žemiau su nuorodomis į

brėžinius.

1 pav. Neskiesto tiriamojo 1 preparato poveikis A549-hACE2-TMPRSS2 linijos ląstelių gyvybingumui. Ląstelių gyvybingumas vertintas kristalvioleto testu ir normalizuotas pagal kontrolę t. y. ląsteles, kurios buvo auginamos terpėje be jokio poveikio. K – neveiktos ląstelės.

2 pav. Neskiesto tiriamojo preparato poveikis A549-hACE2-TMPRSS2 linijos ląstelių gyvybingumui. Ląstelių gyvybingumas vertintas MTT testu ir normalizuotas pagal kontrolę t. y. ląsteles, kurios buvo auginamos terpėje be jokio poveikio. K – neveiktos ląstelės, TK – teigiama kontrolė, paveikus 1 mg/ml SDS.

3 pav. Neskiesto tiriamojo preparato poveikis A549-hACE2-TMPRSS2 linijos ląstelių SARS-CoV-2 Delta viruso izoliato užkrečiamumui. Vertikali ašis atvaizduoja viruso kopijų skaičių vieno mikrolitro terpėje.

4 pav. Neskiesto tiriamojo preparato poveikis A549-hACE2-TMPRSS2 linijos ląstelių SARS-CoV-2 Omikron viruso izoliato užkrečiamumui. Vertikali ašis atvaizduoja viruso kopijų skaičių vieno mikrolitro terpėje.

5 pav. Citotoksiškumo tyrimo tiesioginio kontakto ir skvarbos per agarą metodais mėginiai po inkubacijos su MTT tirpalu.

6 pav. *In vitro* santykinis citotoksinis poveikis L929 ląstelėms, po 24 val. tiesioginio kontakto. Tiriamoji medžiaga 1 – YOU&OIL burnos ir nosies purškalas.

7 pav. *In vitro* santykinis citotoksinis poveikis L929 ląstelėms, po 4 val. ir 24 val. skvarbos per agarą metodu. Tiriamoji medžiaga 1 – YOU&OIL burnos ir nosies purškalas.

IŠSAMUS IŠRADIMO APRAŠYMAS

Sukurtas produktas skirtas kasdienei prevencinei apsaugai nuo viruso patekimo per išorinius kvėpavimo takus (nosį ir burną). Visos sudėtinės produkto žaliavos, remiantis moksliniais tyrimais, pasižymėjo veiksmingu antivirusiniu poveikiu. Atrinktų komponentų priešvirusinis aktyvumas pasireiškia viruso spyglio baltymo galimybės prisijungti prie šeimininko ląstelės receptoriaus blokavimu, taip pat viruso neutralizavimu.

Kuriant produktą buvo nuspręsta koncentruotis tik į galimus natūralios kilmės augalinius komponentus. Visi produktui atrinkti ingredientai yra augalinės kilmės, išskirti iš skirtingų augalo dalių. Augalinis aliejus išskirtas iš augalo sėklų, eteriniai aliejai išskirti iš antžeminių augalo dalių, į sudėtį pridėtos augalinių komponentų fitosomos.

Sukurto produkto sudėtinės dalys atrinktos remiantis mokslinėje literatūroje pateikta informacija. Atskiri ingredientai atrinkti pagal jų savybes tinkamas SARS koronaviruso infekcijos profilaktikai ir gydymui: sėjamosios juodgrūdės (*Nigella sativa*) sėklų aliejus, arbatmedžio (*Melaleuca alternifolia*) lapų eterinis aliejus, vaistinio čiobrelio (*Thymus vulgaris*) lapų/žiedų eterinis aliejus, lauro lapų (*Laurus nobilis*) eterinis aliejus, vitaminas E (α -tokoferolis), fitosomos (modifikuotas sojų lecitinas su margainių (*Silybum marianum*) ekstraktu).

Kuriant efektyvią kompoziciją, buvo nuspręsta koncentruotis į mokslinėje literatūroje aprašytą juodgrūdės (*Nigella sativa*) poveikį prieš SARS-CoV-2 virusą. Augaliniame juodgrūdės sėklų aliejuje yra junginių, kurie prisijungdami prie pagrindinių molekulinį viruso prisijungimo taikinių, gali padėti užkirsti kelią virusui prisijungti prie žmogaus organizmo ląstelių. Dėl šių savybių juodgrūdės sėklų aliejus atrinktas, kaip pagrindinis produkto komponentas.

Poveikiui sustiprinti produktas papildytas augaliniais eteriniais aliejais, kurie pasižymi antivirusinėmis ir antioksidacinėmis savybėmis, taip sustiprina produkto antivirusinį poveikį. Eterinių aliejų bioaktyvūs junginiai dėl savo lipofilinės prigimties gali prasiskverbti į viruso ląsteles ir taip sustabdyti viruso replikaciją. Taip pat eteriniai aliejai produktą papildo savybėmis, mažinančiomis kvėpavimo takų uždegimo simptomus. Kompozicija papildyta arbatmedžio, vaistinio čiobrelio, lauro lapų eteriniais aliejais. Arbatmedžio (*Melaleuca alternifolia*) eterinis aliejus produktą papildo antivirusiniu ir priešuždegiminiu poveikiais. Jo sudėtyje esantys junginiai parodė didelį aktyvumą prieš peršalimo ir gripo virusus, šios savybės labai svarbios kuriant efektyvų produktą.

Produktas papildytas lauro lapų (*Laurus nobilis*) eteriniu aliejumi, dėl jo sudėtyje esančių komponentų β -okimenas, α - ir β -pinenai. Šie junginiai pasižymi stipriu slopinamuoju poveikiu prieš COVID-19 virusą.

Vaistinio čiobrelio (*Thymus vulgaris*) eterinis aliejus į produkto sudėtį

įtrauktas dėl savo savybių malšinti kvėpavimo takų infekcijų sukeltus simptomus, eterinio aliejaus aktyvieji junginiai mažina kvėpavimo takų infekcijų sukeltus gleivinės uždegimus. Taip pat vaistinio čiobrelio eteriniame aliejuje yra stipriu antivirusiniu poveikiu pasižyminčių junginių, kurie sustiprina produkto veikimą.

Vitaminas E į produkto sudėtį atrinktas dėl kelių naudingų savybių. Pirmoji jo savybė, jis veikia kaip stiprus antioksidantas. Jo poveikis žmogaus organizmui įrodytas klinikiniais tyrimais. Vitaminas E vartojamas kaip maisto papildas turi patvirtintą sveikatingumo teiginį: „Padeda apsaugoti ląsteles nuo oksidacinės pažaidos“. Taip pat vitaminas E yra svarbus imuninės sistemos gerinimui, taip mažina virusinės infekcijos riziką. Šios savybės itin svarbios kuriant aliejinę kompoziciją apsaugai nuo COVID19.

Produktas taip pat papildytas margainio (*Silybum marianum*) ekstraktu. Jo sudėtyje esantis flavonoidų kompleksas silimarinas/silibinas turi daug naudingų produktui savybių: imunomoduliacinis ir antioksidacinis poveikiai. Šios savybės labai svarbios kuriant produktą nuo virusinės infekcijos. Šie junginiai yra hidrofiliniai, todėl buvo atrinkta ekstrakto patentuota forma – fitosomos. Ši technologija leidžia hidrofilinius aktyvuosius ingredientus panaudoji aliejinėse kompozicijose.

Sukurto produkto pagrindinis ingredientas parinktas juodgrūdės sėklų aliejus, jo koncentracija produkte siekia daugiau nei 50 %. Eteriniai aliejai - tai labai koncentruoti augalinių lapiųjų komponentų ekstraktai, todėl jų koncentracijos galutiniame produkte yra palyginti mažos, be to eteriniai aliejai turi nustatytas ribas vidiniam ir išoriniam vartojimui. Atsižvelgiant į saugias vartoti eterinių aliejų ir kitų produkto sudėtinųjų dalių ribas, sukurtą kompoziciją sudaro: 68-99 % sėjamosios juodgrūdės (*Nigella sativa*) sėklų aliejus, 0,1-5,0 % arbatmedžio (*Melaleuca alternifolia*) lapų eterinis aliejus, 0,5-5,0 % vaistinio čiobrelio (*Thymus vulgaris*) lapų/žiedų eterinis aliejus, 0,1-5,0 % lauro lapų (*Laurus nobilis*) eterinis aliejus, 0,4-10,0 % vitaminas E (α -tokoferolis) tirpintas saulėgrąžų (*Helianthus annuus*) sėklų aliejuje, 0,1-7,0 % margainio fitosomos (modifikuotas sojų lecitinas su margainių (*Silybum marianum*) ekstraktu).

Produktą sudaro du atskiri to paties produkto buteliukai: purškalas nosiai ir purškalas burnai. Produktą pateikti dviem skirtingais buteliukais nutarta dėl patogumo vartotojui. Turint produktą skirtinguose buteliukuose su specialiais atskirais dozatoriais nosiai ir burnai išvengiama vartotojui nepatogaus dozatorių

valymo/keitimo. Purškalas nosiai vartojamas į kiekvieną nosies landą įpurškiant po 1-2 papurškimus, esant poreikiui. Pakartotinai purkšti rekomenduojama kas 2-3 val. Per parą į kiekvieną nosies landą daugiau kaip 5 dozių purkšti nerekomenduojama. Purškalas burnai vartojamas įpurškiant 1-2 papurškimus į burnos ertmę, esant poreikiui. Įsipurškus mažiausiai 15 min. nerekomenduojama valgyti arba gerti. Pakartotinai purkšti rekomenduojama po 2-3 val., jei yra poreikis. Per parą daugiau kaip 5 dozių purkšti nerekomenduojama.

Produkto saugumas vartojimui ištirtas ir pagrįstas farmakologinio poveikio (citotoksiškumo) ir fiziologinio poveikio (jautrinimo) tyrimais. Produkto veiksmingumas pagrįstas antivirusinio veiksmingumo *in vitro* tyrimais naudojant produkto sudėtinių dalių kompozicijas prieš SARS-CoV-2 virusą. Produkto veiksmingumui įvertinti atlikta klinikinių tyrimų stadija.

ANTIVIRUSINĖS APSAUGOS TYRIMAS

Norint ištirti produkto veiksmingumą ir efektyvias komponentų koncentracijas, atliekamas produkto tyrimas ląstelių kultūrų SARS-CoV-2 virusu užkrečiamumui ir gyvybingumui įvertinti. Tyrimo metu tirama komponentų skirtingų koncentracijų poveikis žmogaus plaučių epitelio ir viruso ląstelių gyvybingumui. Iškelta tyrimo hipotezė: ląstelių kultūrų SARS-CoV-2 virusu užkrečiamumas sumažėja ir gyvybingumas padidėja paveikus produktu. Tyrimui atlikti gautas VRBTEK leidimas Nr. 2021/6-1361-835 atlikti biomedicininį tyrimą su SARS-CoV-2 virusu. Tyrimas atliekamas su gyvybingu SARS-CoV-2 virusu gautu iš Vilniaus Santaros Klinikų Biobanke saugomų nosiaryklės mėginių ir žmogaus plaučių epitelio HTB-55 ląstelių kultūromis. Tyrimas atliktas su SARS-CoV-2 viruso delta atmaina.

Tyrimui parinktos produkto komponentų koncentracijos: 68-99 % sėjamosios juodgrūdės (*Nigella sativa*) sėklų aliejus, 0,1-5,0 % arbatmedžio (*Melaleuca alternifolia*) lapų eterinis aliejus, 0,5-5,0 % vaistinio čiobrelio (*Thymus vulgaris*) lapų/žiedų eterinis aliejus, 0,1-5,0 % lauro lapų (*Laurus nobilis*) eterinis aliejus, 0,4-10,0 % vitaminas E (α -tokoferolis) tirpintas saulėgrąžų (*Helianthus annuus*) sėklų aliejuje, 0,1-7,0 % margainio fitosomos (modifikuotas sojų lecitinas su margainių (*Silybum marianum*) ekstraktu).

Tyrimas buvo atliekamas ne tiesiogiai su žmogaus éminiais, bet su juos

užkrėtusiais virusais. Tyrimo atlikimui iš Vilniaus Santaros Klinikų Biobanko buvo prašoma iki 10 nosiaryklės mėginių. Tyrimui reikalingas toks skaičius mėginių dėl atidirbimo sąlygų ir skirtingų viruso atmainų. Tyrimui buvo svarbu išsigryninti aktualiausias viruso atmainas. 1-oje lentelėje pateikiami tyrimui gauti mėginiai.

Lentelė 1. Mėginiai gyvybingo viruso tyrimui.

EIL. NR.	KODAVIMAS	CT VERTĖS	ATMAINA
1	NP03-IN0004371	ORF1ab Ct(21,92); N Ct(23,27); S Ct(22,80)	delta
2	NP03-IN0004376	ORF1ab Ct(16,80); N Ct(19,05); S Ct(19,17)	delta
3	NP03-IN0004385	ORF1ab Ct(17,81); N Ct(18,30); S Ct(17,34)	delta
4	NP03-IN0004451	ORF1ab Ct(14,18); N Ct(14,24); S Ct(14,36)	delta
5	NP03-IN0004464	ORF1ab Ct(14,10); N Ct(15,33); S Ct(15,09)	delta
6	NP03-IN0004582	ORF1ab Ct(22,23); N Ct(22,45)	omikron
7	NP03-IN0004573	ORF1ab Ct(18,94); N Ct(18,65)	omikron
8	NP03-IN0004586	ORF1ab Ct(16,53); N Ct(15,96)	omikron
9	NP03-IN0004594	ORF1ab Ct(15,61); N Ct(15,98)	omikron
10	NP03-IN0004569	ORF1ab Ct(17,95); N Ct(19,19)	omikron

Vertinimo kriterijai: žmogaus epitelio ląstelių gyvybingumas turi būti ne mažesnis nei 80 % po tiesioginio poveikio, viruso gyvybingumas turi būti ne didesnis nei 50 % po tiesioginio poveikio.

Atlikus tyrimą optimalus žmogaus epitelio ląstelių ir viruso gyvybingumas pasiektas esant komponentų koncentracijoms: 98,4 % sėjamosios juodgrūdės (*Nigella sativa*) sėklų aliejus, 0,2 % arbatmedžio (*Melaleuca alternifolia*) lapų eterinis aliejus, 0,6 % vaistinio čiobrelio (*Thymus vulgaris*) lapų/žiedų eterinis aliejus, 0,1 % lauro lapų (*Laurus nobilis*) eterinis aliejus, 0,5 % vitaminas E (α-tokoferolis) tirpintas saulėgrąžų (*Helianthus annuus*) sėklų aliejuje, 0,2 % margainio fitosomos (modifikuotas sojų lecitinas su margainių (*Silybum marianum*) ekstraktu).

Tyrimui naudotos šios preparato koncentracijos:

Neskiestas preparatas, naudotas poveikio įvertinimui jiems tiesioginiai

kontaktuojant su ląstelėmis.

Neskiestas preparatas, dėtas į ląstelių auginimo terpę iki galutinės koncentracijos: 10%, 5%, 1%.

5 % preparato tirpalas DMSO, kuris buvo skiedžiamas terpe iki galutinės koncentracijos: 0,05%, 0,025%, 0,0125% ir 0,00625%.

Tyrimui naudoti kontroliniai mėginiai, kurie tirti kartu su preparato poveikiu:

Kontrolė (K) – ląstelių auginimo terpė.

Neigiama kontrolė (NK) – fostatinis buferis (PBS), pH 7,4 (Gibco).

Teigiama kontrolė (TK) - natrio dodecilsulfatas (SDS, Sigma-Aldrich), buvo ištirpintas steriliame dejonizuotame vandenyje, pagaminant 0,05 g/ml tirpalą. Prieš tyrimą skiestas auginimo terpe iki 0,1 mg/ml koncentracijos.

Tirpiklio kontrolė (TiK) – ląstelių auginimo terpė, į kurią pridėta 0,01 % arba 0,0005 % DMSO.

Kontroliniai mėginiai tirti lygiagrečiai vertinant tiriamojo preparato citotoksiškumą, siekiant patvirtinti taikomos sistemos tinkamumą atlikti šį tyrimą. Tiriamosios medžiagos, koncentracijų ir ekspozicijos laiko poveikis A549-hACE2-TMPRSS2 linijos ląstelių gyvybingumui vertintas MTT ir kristalvioleto testais.

Pradiniame tyrimo etape buvo įvertintas neskiesto 1 preparato ir 5 % 1 preparato tirpalas DMSO įvairių koncentracijų poveikis A549-hACE2-TMPRSS2 gyvybingumui MTT testu. Poveikio trukmė buvo nuo 2 iki 24 val. Viso buvo vertinti 5 poveikio laikai – 2, 4, 6, 16 ir 24 val. (1 pav.).

Pateikiami duomenys rodo, kad naudojant neskiestą preparatą, kai jo galutinė koncentracija terpėje yra 0,5 % ir mažesnė, po 24 valandų poveikio ląstelių gyvybingumas reikšmingai nesiskiria nuo kontrolės.

Tiriamasis preparatas pagal planuojamą paskirtį, būtų naudojamas neskiestas. Todėl kitame tyrimų etape vertinama, kaip A549-hACE2-TMPRSS2 linijos ląstelių gyvybingumą veikia preparatas, kai jis yra tiesiogiai užpilamas ant ląstelių monosluoksnio. Naudotas medžiagos tūris - 156,25 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ląstelių monosluoksnio. Poveikio trukmė pasirinkta nuo 5 min. iki 30 min. Gyvybingumas vertinamas kas 5 min (2 pav.).

Gauti rezultatai parodė, kad po poveikio tiriamuoju preparatu (neskiestu) ląstelių gyvybingumas lyginant su kontrole sumažėja vidutiniškai 27 %. Preparato poveikis nėra priklausomas nuo poveikio laiko.

Infekcijos eksperimentai buvo atlikti su SARS-CoV-2 NP03-IN0004464 izoliatu (Delta) ir NP03-IN0004594 izoliatu (Omikron) trečios biologinės saugos lygio sąlygomis su tinkamomis kvėpavimo takų apsaugos priemonėmis. A549-hACE2-TMPRSS2 ląstelės buvo išsėtos 100 000 ląstelių/ml tankiu 96 šulinėlių plokštelėse (TPP Techno Plastic Produktai AG). Praėjus 24 valandoms po išsėjimo ląstelės 5, 15 ir 20 min. buvo veikiamos neskiestu preparatu (6 kartojimai), po nustatyto poveikio laiko plaunamos ląstelių augimo terpe 3 kartus, užpilamos 200 µl ląstelių augimo terpe ir užkrečiamos 1×10^4 viruso kopijomis iki 50 kopijų / µl koncentracijos. Po 24 val. inkubacijos iš kiekvieno šulinėlio buvo paimtas 1 µl terpės realaus laiko atvirkštinės transkripcijos PGR vertinimui. Paveiktų ląstelių kiekybiniai rezultatai lyginami su 20 kartojimų nepaveiktų ląstelių ir 6 kartojimais kiekvieno viruso izoliato įdėto į šulinėlį su terpe be ląstelių.

Duomenys, pateikti 3 pav. ir 4 pav. parodo, kad tiriamasis preparatas stipriai apriboja A549-hACE2-TMPRSS2 ląstelių kultūros užkrečiamumą SARS-CoV-2 Delta ir Omikron viruso atmainomis. Gauti paveiktų ir nepaveiktų A549-hACE2-TMPRSS2 kultūros ląstelių rezultatai rodo užtikrintą apsaugą nuo užkrėtimo SARS-CoV-2 Delta ir Omikron viruso variantais.

Remiantis gautais rezultatais, nustatyta produkto sudėtinių dalių koncentracijos pasižyminčios didžiausiu antivirusiniu efektyvumu, taip pat nustatyta kompozicija tolimesniems saugumo ir veiksmingumo tyrimams.

CITOTOKSIŠKUMO TYRIMAS

Citotoksiškumo tyrimo tikslas įvertinti tiriamų medžiagų galimą toksiškumą ląstelių linijai. Tyrimas atliktas *in vitro* žinduolių ląstelių kultūroje (L929 pelių fibroblastų linijoje). Tyrimas atliktas, remiantis ISO 10993-5: 2009 gairių “*Test for in vitro cytotoxicity*” reikalavimais.

Tyrimai atlikti su kompozicija, kurią sudaro: 98,4 % sėjamosios juodgrūdės (*Nigella sativa*) sėklų aliejus, 0,2 % arbatmedžio (*Melaleuca alternifolia*) lapų eterinis aliejus, 0,6 % vaistinio čiobrelio (*Thymus vulgaris*) lapų/žiedų eterinis aliejus, 0,1 %

lauro lapų (*Laurus nobilis*) eterinis aliejus, 0,5 % vitaminas E (α -tokoferolis) tirpintas saulėgrąžų (*Helianthus annuus*) sėklų aliejuje, 0,2 % margainio fitosomos (modifikuotas sojų lecitinas su margainių (*Silybum marianum*) ekstraktu).

Tirtas neskiestas produktas dviem metodais: tiesioginio kontakto bei skvarbos per agarą metodu. Kaip neigiama kontrolė buvo naudojamas izotoninis (0,9%) natrio chlorido tirpalas, kaip teigiama kontrolė – 5% natrio dodecilsulfato (SDS) tirpalas steriliame dejonizuotame vandenyje. Kontroliniai mėginiai tirti lygiagrečiai vertinant tiriamosios medžiagos citotoksiškumą, siekiant patvirtinti taikomos sistemos tinkamumą atlikti šį tyrimą.

Tiesioginio kontakto metodu sterilūs 1,2 cm skersmens filtro popieriaus gabaliukai (1,13 cm² paviršiaus ploto) aseptinėmis sąlygomis padengiami tiriamuoju mėginiu ir pincetu patalpinami kiekvieno šulinėlio centre. Tokiu būdu filtras padengia apie 10% šulinėlio ploto, kaip reglamentuojama gairėse ISO 10993-5:2009(E). Atitinkamai kontroliniai filtro gabaliukai paveikiami neigiamos ir teigiamos kontrolės tirpalais. Plokštelė su L929 ląstelėmis inkubuota 37 ± 1 °C 5,0 % CO₂ atmosferoje 20-24 val.

Skvarbos per agarą metodu sterilūs 2 cm skersmens filtro popieriaus gabaliukai (3,14 cm² paviršiaus ploto) aseptinėmis sąlygomis padengiami tiriamuoju mėginiu ir pincetu patalpinami ant standžios agarozės kiekvieno šulinėlio centre. Atitinkamai kontroliniai filtro gabaliukai paveikiami neigiamos ir teigiamos kontrolės tirpalais. Ląstelės plokštelėje inkubuojamos su mėginiais 4 val. ir 24 ± 1 val. 37 ± 1 °C temperatūroje, 5,0 % CO₂/95 % atmosferoje.

Ląstelės inkubuotos su mėginiais po inkubacijos terpė pakeista šviežia ląstelių mitybine terpe ir pritaikytas MTT redukcijos testas, matuojant tirpalų absorbcijos vertes 570 nm ir 630 nm bangos ilgiuose mikroplokštelių skaitytuvu (5 pav.). Taip pat į atskirus šulinėlius įpilama po 200 µl izopropanolio (palyginamasis tirpalas). Atlikta po tris kiekvieno mėginio techninius pakartojimus, padaryti trys nepriklausomi eksperimentai, vertinamas gautų rezultatų vidurkis.

Lentelė 2. Apskaičiuotas mėginių santykinis gyvybingumas tiesioginio kontakto metodu (24 val. trukmės poveikis):

Santykinis gyvybingumas (%)			
	YOU&OIL purškalas	Neigiama kontrolė (NaCl)	Teigiama kontrolė (SDS)
	64,14	100	0,64
	93,63	100	1,12
	86,81	100	0,68
Vidurkis	81,53	100	0,82
SD	15,44	0	0,27

Lentelė 3. Apskaičiuotas mėginių santykinis gyvybingumas skvarbos per agarą metodu (4 val. trukmės poveikis):

Santykinis gyvybingumas (%)			
	YOU&OIL purškalas	Neigiama kontrolė (NaCl)	Teigiama kontrolė (SDS)
	78,33	100	15,53
	94,02	100	15,00
	92,94	100	12,30
Vidurkis	88,43	100	14,28
SD	8,76	0	1,73

Lentelė 4. Apskaičiuotas mėginių santykinis gyvybingumas skvarbos per agarą metodu (24 val. trukmės poveikis):

Santykinis gyvybingumas (%)			
	YOU&OIL purškalas	Neigiama kontrolė (NaCl)	Teigiama kontrolė (SDS)
	78,40	100	1,70
	70,96	100	0,12
	57,52	100	3,38
Vidurkis	68,96	100	1,73
SD	10,58	0	1,63

Kontrolinių mėginių absorbcijos vertės ir absorbcijos nuokrypiai parodė tinkamą testo pritaikymą ir pakankamą jo jautrumą. Atlikus tyrimą L929 ląstelių kultūrai po 24 val. tiesioginio kontakto produkto poveikyje ląstelių gyvybingumas sumažėjo iki $81,53 \pm 15,44$ % (2 lentelė, 6 pav.). Atlikus tyrimą skvarbos per agarą metodu, produkto poveikyje ląstelių gyvybingumas po 4 valandų sumažėjo iki $88,43 \pm 8,76$ % (3 lentelė, 7 pav.), o po 24 valandų gyvybingumas sumažėjo iki $81,51 \pm 9,86$ % (4 lentelė, 7 pav.). Remiantis gautais rezultatais, galima daryti išvadą, kad produkto poveikis L929 ląstelių kultūrai, atliekant tyrimą skvarbos per agarą ir tiesioginio kontakto metodais, buvo nereikšmingas, t.y. produktas necitotoksiškas ir saugus naudoti.

JAUTRINIMO TYRIMAS

Jautrinimo tyrimo tikslas įvertinti ar produktas saugus vartoti tiesiogiai ant odos. Tyrimas atliekamas su trumpaplaukėmis *Caviidae* šeimos jūrų kiaulytėmis, jūrų kiaulyčių maksimizacijos metodu (GPMT). Tyrimui atlikti reikalingas Lietuvos bandomųjų gyvūnų naudojimo etikos komisijos prie Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos leidimas atlikti bandymo su gyvūnais projektą.

Tyrimai atlikti su kompozicija, kurią sudaro: 98,4 % sėjamosios juodgrūdės

(*Nigella sativa*) sėklų aliejus, 0,2 % arbatmedžio (*Melaleuca alternifolia*) lapų eterinis aliejus, 0,6 % vaistinio čiobrelio (*Thymus vulgaris*) lapų/žiedų eterinis aliejus, 0,1 % lauro lapų (*Laurus nobilis*) eterinis aliejus, 0,5 % vitaminas E (α-tokoferolis) tirpintas saulėgrąžų (*Helianthus annuus*) sėklų aliejuje, 0,2 % margainio fitosomos (modifikuotas sojų lecitinas su margainių (*Silybum marianum*) ekstraktu).

Tyrimo metu sveikos jaunos jūrų kiaulytės yra randomizuojamos ir paskiriamos į poveikio ir kontrolines grupes. Prieš paskiriant dozę mentės srityje pašalinami plaukai juos kerpančiais arba skutant, stengiantis nepažeisti odos. Poveikio grupėje naudojama 10 gyvūnų ir ne mažiau kaip 5 gyvūnai kontrolinėje grupėje. Tyrimo metu jūrų kiaulyčių odos paviršius yra paveikiamas tiriamuoju produktu ir stebimos visos galimos odos jautrumo reakcijos.

Įvertinus gautus rezultatus, tiriamasis produktas nesukėlė nepageidaujamų odos dirginimo reakcijų, lyginant su kontroline tiriamųjų jūsių kiaulyčių grupe. Remiantis gautais rezultatais, galima daryti išvadą, kad produkto poveikis jūrų kiaulytėms, atliekant jautrinimo tyrimą GPMT metodu, buvo nereikšmingas, t.y. produktas nesukelia odos dirginamųjų reakcijų ir yra saugus naudoti.

BURNOS GLEIVINĖS DIRGINIMO TESTAS

Ūmaus burnos gleivinės dirginimo tyrimo tikslas įvertinti ar produktas saugus vartoti tiesiogiai ant burnos gleivinės, įsitikinti, jog produktas saugus naudoti. Tyrimas atliekamas su specialiai paruoštu žmogaus burnos gleivinės epitelio ląstelių SkinEthic™ HOE modeliu. SkinEthic™ HOE modelis sudarytas iš TR146 ląstelių (gautų iš žando gleivinės plokščialąstelinės karcinomos), auginamų ant inertinio polikarbonato filtro oro skysčio sąsajoje chemiškai apibrėžtoje terpėje. Šis modelis sudaro epitelio audinį, kuriame nėra raginio sluoksnio, histologiškai primenantį burnos ertmės gleivinę.

Tyrimai atlikti su kompozicija, kurią sudaro: 98,4 % sėjamosios juodgrūdės (*Nigella sativa*) sėklų aliejus, 0,2 % arbatmedžio (*Melaleuca alternifolia*) lapų eterinis aliejus, 0,6 % vaistinio čiobrelio (*Thymus vulgaris*) lapų/žiedų eterinis aliejus, 0,1 % lauro lapų (*Laurus nobilis*) eterinis aliejus, 0,5 % vitaminas E (α-tokoferolis) tirpintas saulėgrąžų (*Helianthus annuus*) sėklų aliejuje, 0,2 % margainio fitosomos (modifikuotas sojų lecitinas su margainių (*Silybum marianum*) ekstraktu).

Tyrimo tikslas įvertinti tiriamos medžiagos galimą dirginantį poveikį burnos gleivinei. Tyrimo metodika buvo pritaikyta, remiantis galiojančiomis gairėmis ir metodikomis, skirtomis įvertinti medžiagų dirginantį poveikį odai, kadangi specifinių gairių įvertinti dirginantį poveikį burnos gleivinei nėra. YOU&OIL nosies ir burnos purškalo iširtas *in vitro* rekonstruoto burnos gleivinės epitelio ląstelių kultūroje, remiantis modifikuotu CellSystems Biotechnologie Vertrieb GmbH, Vokietija protokolu bei 2021 m. birželio mėn. gairėmis Nr. 439 „*In Vitro Skin irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Methods*“. Naudotas testas atitinka OECD gairių „*OECD guideline for the testing of chemicals in vitro skin irritation: Reconstructed human epidermis test method*“ (2010) reikalavimus.

Tirtas neskiestas produktas (nosies ir burnos purškalo). Kaip neigiama kontrolė (NK) buvo naudojamas fosfatinis buferis, pH 7,4 (Gibco). Kaip teigiama kontrolė (TK) naudotas 5% natrio dodecilsulfato (SDS) tirpalas steriliame dejonizuotame vandenyje. Atlikta po tris kiekvieno mėginio (tiriamosios medžiagos, TK ir NK) pakartojimus. Burnos gleivinės *in vitro* kultūra su tiriamąja medžiaga buvo inkubuojama 30 min. ir 2 val. Audinio gyvybingumo įvertinimui pritaikytas MTT redukcijos testas, matuojant tirpalų absorbcijos vertes 570 nm bangos ilgyje. Poveikio plotas 0,5 cm².

Lentelė 5. Apskaičiuotas mėginių santykinis gyvybingumas burnos gleivinės dirginimo testo metu (10 min, 1 val. ir 3 val. trukmės poveikis):

Santykinis gyvybingumas (%)				
	YOU&OIL purškalo 30 min	YOU&OIL purškalo 120 val.	Neigiama kontrolė (NaCl)	Teigiama kontrolė (SDS)
	53,67	33,03	100,91	2,15
	49,95	34,87	100,13	2,24
	51,39	34,90	98,96	2,08
Vidurkis	51,67	34,27	100,00	2,16

Kontrolių absorbcijos vertės ir visų mėginių absorbcijos nuokrypiai atitiko gairių gairėmis Nr. 439 „*In Vitro Skin irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Methods*“ ir CellSystems INVITTOX protokole nurodytus reikalavimus, naudota tyrimo sistema atitiko reikalavimus jos jautrumui bei teisingam rezultatų vertinimui.

Tiriamosios medžiagos poveikis žmogaus burnos gleivinės epitelio kultūros gyvybingumui buvo nedidelis po 30 min. kontakto (gyvybingumas sumažėjo iki $51,67 \pm 1,88\%$).

Tiriamoji medžiaga po 120 min. tiesioginio kontakto su žmogaus burnos gleivinės epitelio kultūromis sumažino ląstelių gyvybingumą iki $34,27 \pm 1,07\%$.

Remiantis gautais rezultatais, galima daryti išvadą, YOU&OIL burnos ir nosies purškalas turi nedidelį dirginamąjį poveikį po 30 min. tiesioginio kontakto su žmogaus burnos gleivinės kultūromis *in vitro*.

BIOMEDICININIS TYRIMAS

Atlikus ikiklinikinių tyrimų stadiją toliau produktui atliktas priemonės biomedicininis tyrimas. Šio tyrimo pagrindinis tikslas – iš mokslinės literatūros žinomą poveikį (t.y. tam tikrą savybę) transformuoti į sveikatingumo teiginį (t. y. į naudą). Atsižvelgiant į konkrečius teiginio aspektus – t.y. pagal tai, kokį sąryšį antivirusinį poveikį turinčio produkto ir sveikatos/rizikos susirgti mažinimo bus norima patvirtinti – suformuluota tyrimų hipotezė ir parengtas biomedicininis tyrimų protokolai, kuris pateikiamas Lietuvos bioetikos komitetui.

Remiantis LR biomedicininis tyrimų etikos įstatymo ir Reglamento nuostatomis biomedicininis tyrimas atliekamas su sveikais savanoriais arba „pacientais esančiais ties rizikos riba“ (t.y., turintiems riziką susirgti tam tikra liga, tačiau dar nesant patvirtintos diagnozės). Tyrimui atrinkti 120 savanoriškai tyrime sutikusių dalyvauti tiriamųjų, kurie suskirstyti į dvi grupes: kontrolinė ir poveikio grupės. Kontrolinei grupei produktas nėra skiriamas, o poveikio grupei skirtas tiriamasis produktas, su vartojimo rekomendacijomis. Rezultatų analizei ir produkto veiksmingumo įvertinimui, kas 7 dienas atliekamas antigeno testas. Tyrimas atliekamas tris mėnesius, nuo pirmojo vizito dienos.

Tyrimai atlikti su kompozicija, kurią sudaro: 98,4 % sėjamosios juodgrūdės

(*Nigella sativa*) sėklų aliejus, 0,2 % arbatmedžio (*Melaleuca alternifolia*) lapų eterinis aliejus, 0,6 % vaistinio čiobrelio (*Thymus vulgaris*) lapų/žiedų eterinis aliejus, 0,1 % lauro lapų (*Laurus nobilis*) eterinis aliejus, 0,5 % vitaminas E (α-tokoferolis) tirpintas saulėgrąžų (*Helianthus annuus*) sėklų aliejuje, 0,2 % margainio fitosomos (modifikuotas sojų lecitinas su margainių (*Silybum marianum*) ekstraktu).

Remiantis gautais rezultatais, galima daryti išvadą, kad produktas, kontrolinę grupę lyginant su tiriamąja poveikio grupe, yra veiksmingas. Poveikio grupės tiriamieji turėjo daugiau nei 50 % mažesnė tikimybę užsikrėsti SARS-CoV-2 virusine infekcija.

IŠRADIMO ĮGYVENDINIMO PAVYZDYS

Kompozicija purškimui į nosį ir burną, kurią sudaro 68-99 % sėjamosios juodgrūdės (*Nigella sativa*) sėklų aliejus, 0,1-5,0 % arbatmedžio (*Melaleuca alternifolia*) lapų eterinis aliejus, 0,5-5,0 % vaistinio čiobrelio (*Thymus vulgaris*) lapų/žiedų eterinis aliejus, 0,1-5,0 % lauro lapų (*Laurus nobilis*) eterinis aliejus, 0,4-10,0 % vitaminas E (α-tokoferolis) tirpintas saulėgrąžų (*Helianthus annuus*) sėklų aliejuje, 0,1-7,0 % margainio fitosomos (modifikuotas sojų lecitinas su margainių (*Silybum marianum*) ekstraktu).

LITERATŪROS ŠALTINIAI:

- [1] J.S.M. Peiris, Y. Guan, K.Y. Yuen, Severe acute respiratory syndrome, *Nat. Med.* 10 (2004). <https://doi.org/10.1038/nm1143>.
- [2] M.D. Christian, S.M. Poutanen, M.R. Loutfy, M.P. Muller, D.E. Low, Severe Acute Respiratory Syndrome, *Clin. Infect. Dis.* 38 (2004). <https://doi.org/10.1086/420743>.
- [3] P.A. Rota, Characterization of a Novel Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome, *Science* (80-.). 300 (2003). <https://doi.org/10.1126/science.1085952>.
- [4] K.J. Senthil Kumar, M. Gokila Vani, C.-S. Wang, C.-C. Chen, Y.-C. Chen, L.-P. Lu, C.-H. Huang, C.-S. Lai, S.-Y. Wang, Geranium and Lemon Essential Oils and Their Active Compounds Downregulate Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2), a SARS-CoV-2 Spike Receptor-Binding Domain, in Epithelial Cells, *Plants*. 9 (2020). <https://doi.org/10.3390/plants9060770>.
- [5] A. Garozzo, R. Timpanaro, B. Bisignano, P.M. Furneri, G. Bisignano, A. Castro, In vitro antiviral activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil, *Lett. Appl. Microbiol.* 49 (2009). <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02740.x>.
- [6] Patne T., Mahore J., Tokmurke P., Inhalation of essential oils: could be adjuvant therapeutic strategy for COVID-19, *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 11 (2020) 4095–4103.
- [7] E. Spisni, G. Petrocelli, V. Imbesi, R. Spigarelli, D. Azzinnari, M.D. Sarti, M. Campieri, M.C. Valerii, Antioxidant, anti-inflammatory, and microbial-modulating activities of essential oils: Implications in colonic pathophysiology, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 1–27. <https://doi.org/10.3390/ijms21114152>.
- [8] M.R. Loizzo, A.M. Saab, R. Tundis, G.A. Statti, F. Menichini, I. Lampronti, R. Gambari, J. Cinatl, H.W. Doerr, Phytochemical Analysis and in vitro Antiviral Activities of the Essential Oils of Seven Lebanon Species, *Chem. Biodivers.* 5 (2008). <https://doi.org/10.1002/cbdv.200890045>.
- [9] D.S.T. Tshibangu, A. Matondo, E.M. Lengbiye, C.L. Inkoto, E.M. Ngoyi, C.N. Kabengele, G.N. Bongo, B.Z. Gbolo, J.T. Kilembe, D.T. Mwanangombo, C.M. Mbadiko, S.O. Mihigo, D.D. Tshilanda, K.-T.-N. Ngbolua, P.T. Mpiana, Possible

Effect of Aromatic Plants and Essential Oils against COVID-19: Review of Their Antiviral Activity, J. Complement. Altern. Med. Res. (2020). <https://doi.org/10.9734/jocamr/2020/v11i130175>.

[10] S.N. Meydani, E.D. Lewis, D. Wu, Perspective: Should Vitamin E Recommendations for Older Adults Be Increased?, Adv. Nutr. 9 (2018). <https://doi.org/10.1093/advances/nmy035>.

[11] M. Pae, D. Wu, Nutritional modulation of age-related changes in the immune system and risk of infection, Nutr. Res. 41 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2017.02.001>.

[12] A.K. Radhakrishnan, D. Mahalingam, K.R. Selvaduray, K. Nesaretnam, Supplementation with Natural Forms of Vitamin E Augments Antigen-Specific TH1-Type Immune Response to Tetanus Toxoid, Biomed Res. Int. 2013 (2013). <https://doi.org/10.1155/2013/782067>.

[13] J.-M. Zingg, A. Azzi, Non-Antioxidant Activities of Vitamin E, Curr. Med. Chem. 11 (2004). <https://doi.org/10.2174/0929867043365332>.

[14] A. Azzi, Many tocopherols, one vitamin E, Mol. Aspects Med. 61 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.06.004>.

[15] K. Vishal Saurabh, A. Kesari, Herbosome - -a novel carrier for herbal drug delivery, Int. J. Curr. Pharm. Res. 3 (2011) 37–41.

[16] Pandey Shivanand, Kinjal Patel, Phytosomes: Technical Revolution in Phytomedicine , Int. J. PharmTech Res. . 2 (2010) 627–631.

[17] N. Esmaeil, S.B. Anaraki, M. Gharagozloo, B. Moayed, Silymarin impacts on immune system as an immunomodulator: One key for many locks, Int. Immunopharmacol. 50 (2017) 194–201. <https://doi.org/10.1016/J.INTIMP.2017.06.030>.

[18] M. Maher Ali Ahmed, A. Saeed Mohammed, A. Ebtesam Hasan, Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of Thymus vulgaris from Yemen, Turkish J. Biochem. 36 (2011) 342–349.

[19] A.M. Saab, M. Tacchini, G. Sacchetti, C. Contini, H. Schulz, I. Lampronti, R. Gambari, H. Makhoulouf, M. Tannoury, A. Venditti, A. Bianco, G. Racagni, Phytochemical analysis and potential natural compounds against SARS-CoV-

2/COVID-19 in essential oils derived from medicinal plants originating from Lebanon.
An information note, Plant Biosyst. - An Int. J. Deal. with All Asp. Plant Biol. (2021).
<https://doi.org/10.1080/11263504.2021.1932629>.

[20] WO2020080682A1

[21] CN109111405B

[22] CN111184707B

[23] KR102185947B1

[24] KR102185946B1

[25] KR102185945B1

[26] CN111184805B

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Aliejinė kompozicija, skirta kasdienei virusinės ligos, patenkančios per išorinius kvėpavimo takus, prevencijai, apimanti daugiau nei vieną augalinį komponentą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad apima 68-99 % *Nigella sativa* sėklų aliejaus, 0,1-5,0 % *Melaleuca alternifolia* lapų eterinio aliejaus, 0,5-5,0 % *Thymus vulgaris* lapų/žiedų eterinio aliejaus, 0,1-5,0 % *Laurus nobilis* eterinio aliejaus, 0,4-10,0 % vitamino E tirpinto *Helianthus annuus* sėklų aliejuje ir 0,1-7,0 % *Silybum marianum* fitosomų.

2. Aliejinė kompozicija pagal 1 punktą, kur virusinė infekcija yra SARS-CoV-2 sukeliama infekcija.

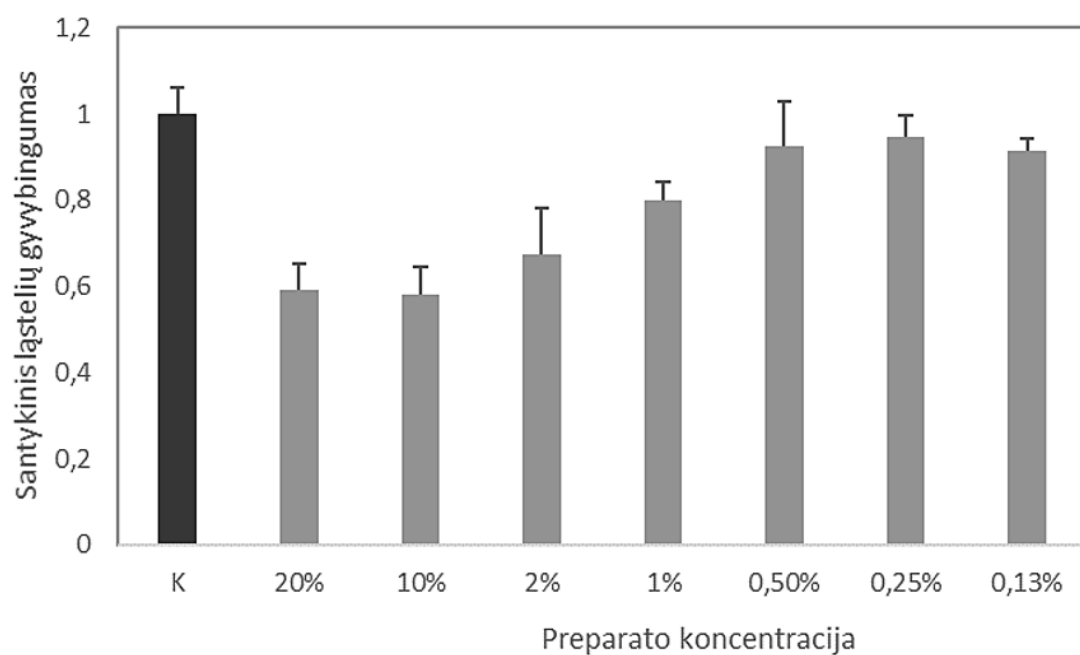
3. Aliejinė kompozicija pagal 1 punktą, kur kompozicija vartojama purškiant į nosį.

4. Aliejinė kompozicija pagal 1 punktą, kur kompozicija vartojama purškiant į burną.

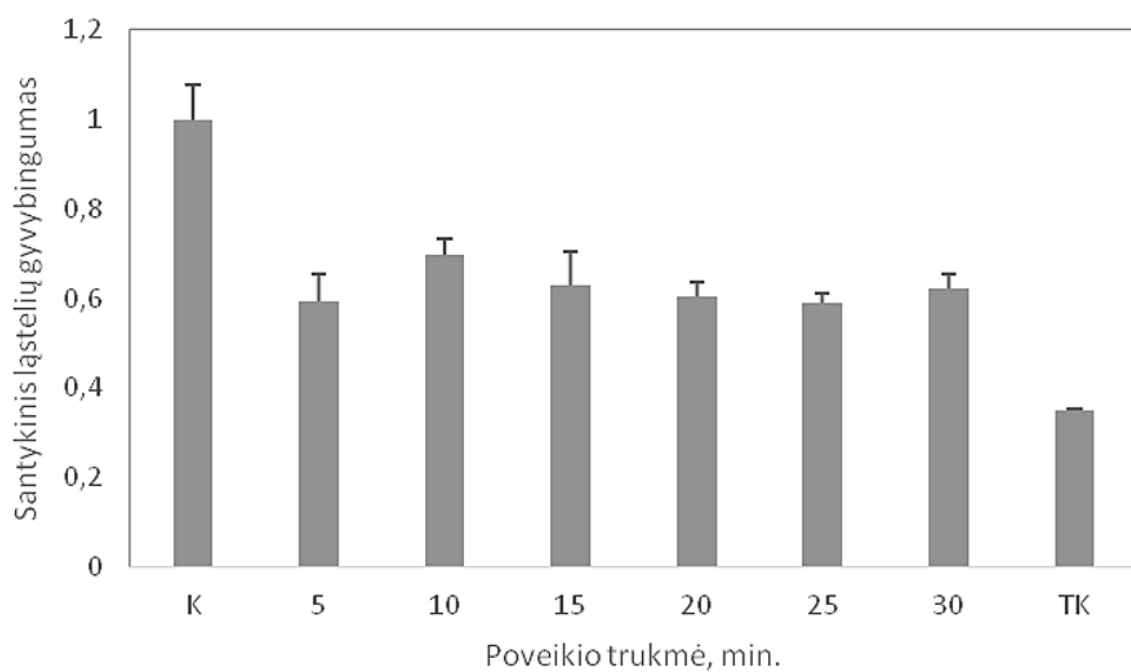
5. Aliejinė kompozicija pagal 1-4 punktus, kur kompozicija vartojama kas 2-3 valandas.

6. Aliejinė kompozicija pagal 1-5 punktus, kur kompozicija vartojama ne daugiau kaip 5 kartus per parą.

..

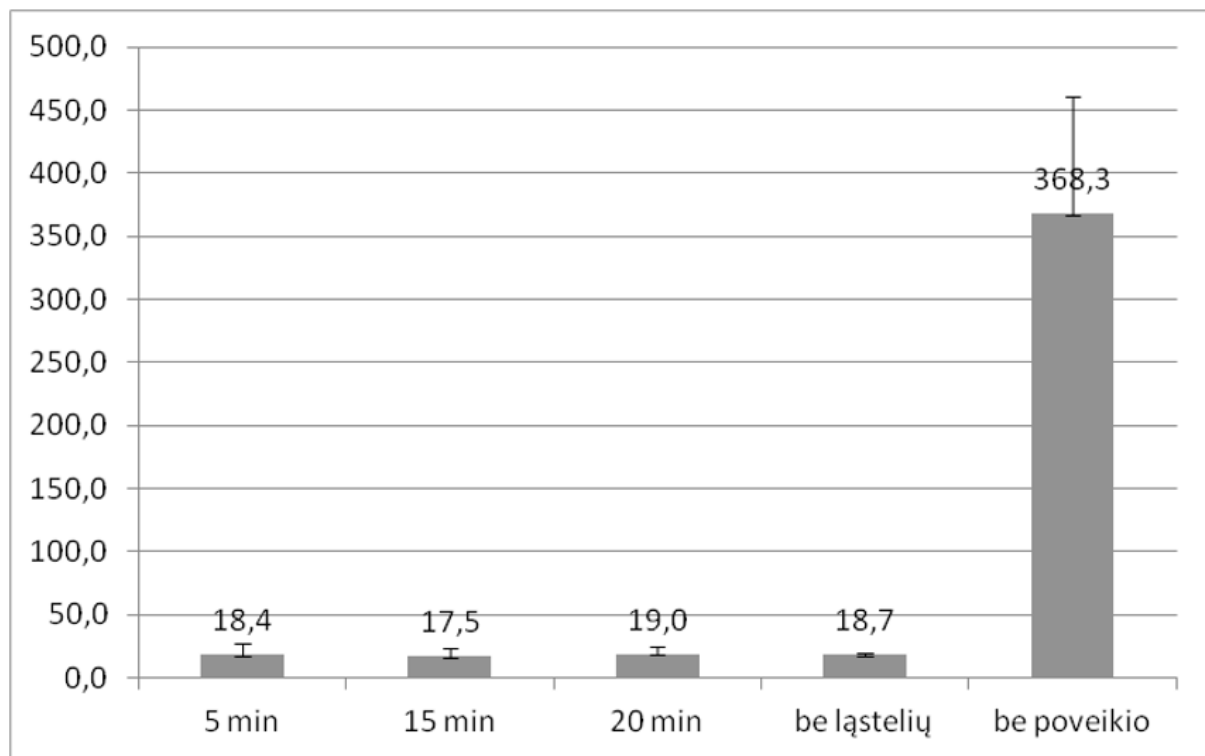


1 pav.

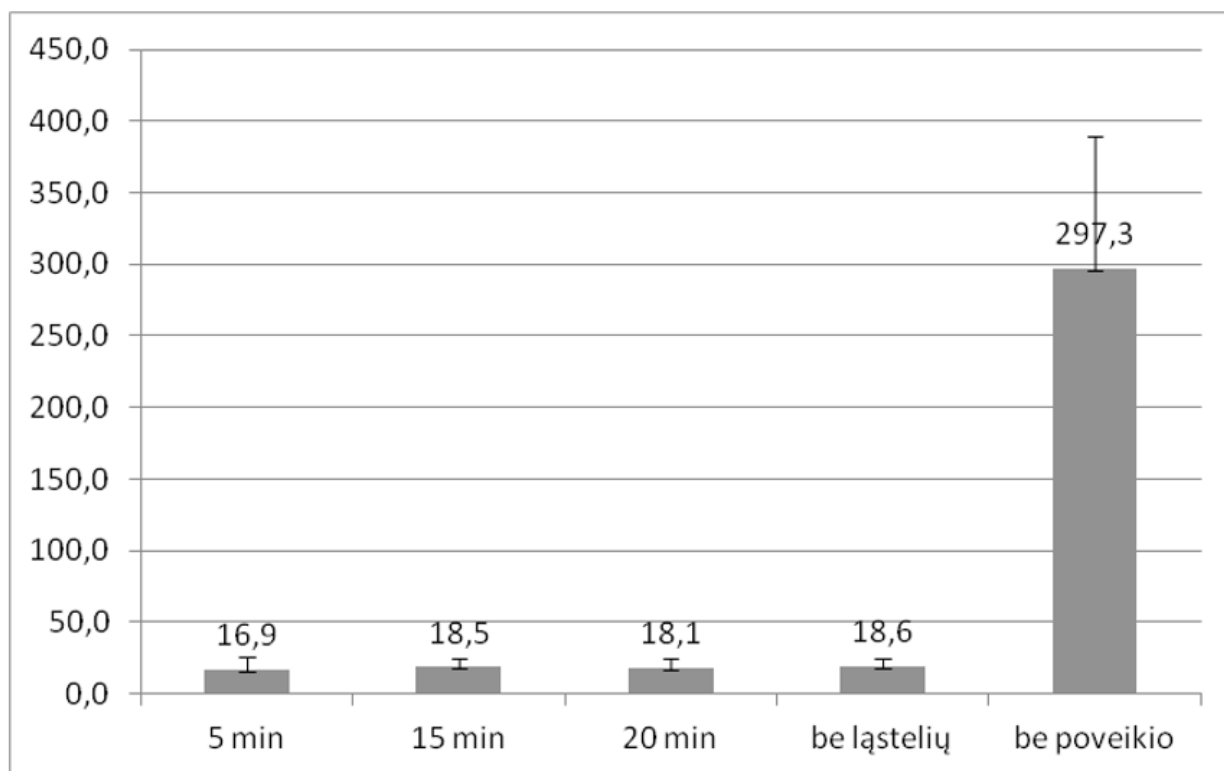


2 pav.

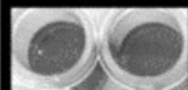
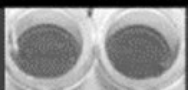
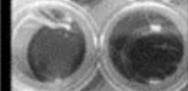
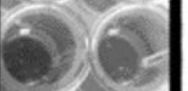
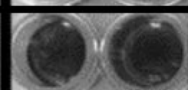
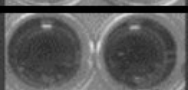
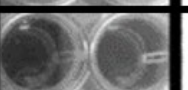
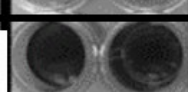
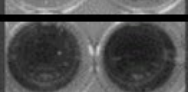
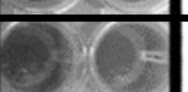
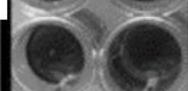
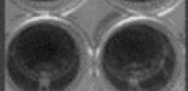
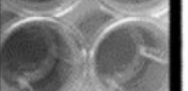
LT 7047 B



3 pav.



4 pav.

	Tiesioginio kontakto metodas	Skvarbos per agarą metodas	
		4 val.	24 val.
Nepaveiktos ląstelės			
0,9% NaCl (neigiama kontrolė)			
YOU&OIL purškalas			
5% SDS (teigiama kontrolė)			
2-propanolis			

5 pav.