

Ocena aktywności przeciwwirusowej *in vitro* preparatów Biostymina i Bioaron C względem ludzkiego rinowirusa (HRV14)

¹Instytut Immunologii Uniwersytetu Medycyny Weterynaryjnej w Wiedniu, Austria

Kierownik Instytutu: prof. dr Armin Saalmüller

²Dział Informacji Naukowej, Phytopharm Kłęka SA, Nowe Miasto nad Wartą

Kierownik Działu: mgr Natalia Walas-Marcinek

³Dział Medyczny, PhytoLab GmbH & Co. KG, Vestenbergsgreuth, Niemcy

Kierownik Działu: dr Petra Bastian

⁴Katedra Zdrowia Publicznego Akademii Medycznej we Wrocławiu

Kierownik Katedry: prof. dr hab. n. med. Andrzej M. Fal

IN VITRO EVALUATION OF ANTIVIRAL ACTIVITY OF BIOSTYMINA AND BIOARON C AGAINST HUMAN PATHOGENIC VIRUS: RHINOVIRUS TYPE 14 (HRV14)

SUMMARY

Bioaron C and Biostymina are herbal medicinal products available on the Polish pharmaceutical market, intended for use in children and adults for the treatment of upper respiratory tract infections, in repeating bacterial and viral infections, convalescence, after illnesses and antibiotic therapy.

*Active pharmaceutical ingredient of Bioaron C and Biostymina is a liquid aqueous extract of fresh candelabra aloe leaf (*Aloe arborescens* Mill.). This species of aloe is particularly valued for its immunomodulatory properties. Until now, there were no results confirming the antiviral activity of these preparations. The presented results are the first supporting this type of activity of Biostymina and Bioaron C *in vitro* against human rhinovirus (HRV14), belonging to the group of viruses responsible for the majority of acute respiratory infections in both children and adults. Biostymina and Bioaron C showed a clear dose-dependent antiviral activity against HRV14 when added to virus-infected HeLa cells. These results seem to be very promising and provide an interesting starting point for a broader study on the antiviral activity of Biostymina and Bioaron C towards other pathogenic viruses and on the mechanism of antiviral action of these medicinal products.*

KEY WORDS: RHINOVIRUS – ALOE ARBORESCENS MILL. – ANTIVIRAL ACTIVITY – RESPIRATORY TRACT INFECTIONS

Wstęp

Zakażenia układu oddechowego należą do najczęstszych chorób infekcyjnych i są jedną z głównych przyczyn wizyt w gabinetach lekarskich (1). Ocenia się, że przeciętnie człowiek w ciągu swojego życia prawie 2 lata zmaga się z objawami przeziębienia (2). Grupą najbardziej narażoną na infekcje dróg oddechowych są dzieci, ze względu na fizjologiczną niedojrzałość układu odpornościowego, a także środowiskowe czynniki

ryzyka (np. uczęszczanie do żłobków, przedszkoli czy szkół) oraz coraz powszechniej występujące alergię.

Główną przyczyną ostrych infekcji układu oddechowego są wirusy. Najczęściej są to rinowirusy, adenowirusy, koronawirusy, wirusy grypy i paragrypy, wirus RS oraz enterowirusy (3). Rinowirusy mogą być odpowiedzialne nawet za 80% wszystkich wirusowych infekcji dróg oddechowych (4, 5). Powodują nieżyt nosa, zatok i gardła, są jednym z głównych czynników zapalenia migdałków, ucha środkowego, oskrzeli są także główną przyczyną zaostrzeń astmy w dzieciństwie oraz odpowiadają za dużą część zaostrzeń POChP (5-7).

Rinowirus może być obecny w drogach oddechowych przez okres 3 tygodni, a do zakażenia dochodzi u ok. 2/3 osób pozostających w kontakcie domowym z osobą chorą (9), dodatkowo u 40-90% zainfekowanych pacjentów stwierdzano obecność wirusów na dłoniach, co obrazuje niezwykłą łatwość rozprzestrzeniania się tych patogenów (10). Wg Rotbart i Hayde to właśnie infekcje HRV są głównym powodem błędnego, nieuzasadnionego przepisywania antybiotyków (11). Reasumując, infekcje wywołane wirusami HRV stanowią ważny społecznie i ekonomicznie problem w krajach rozwiniętych i rozwijających się (12, 13).

Warto podkreślić, że w przeciwieństwie do wielu innych znanych wirusów odpowiedzialnych za infekcje układu oddechowego, takich jak wirusy grypy czy adenowirusy (1), kliniczne objawy infekcji HRV są spowodowane przede wszystkim uruchomieniem kaskady reakcji zapalnych, co skutkuje powszechnymi objawami przeziębienia, nie dochodzi natomiast do zmian cytotycznych komórek nabłonka oddechowego (6).

Około 90% infekcji rinowirusowych rozpoczyna się od przyłączenia wirusów do receptora błonowego ICAM-1 (międzykomórkowej cząstki adhezyjnej 1,

CD54), co powoduje inicjację odpowiedzi gospodarza na infekcję poprzez zwiększenie napływu efektorowych komórek odpornościowych (14-17). W badaniach *in vitro* wykazano, że infekcja HRV powoduje wzrost ekspresji ICAM-1, co sprzyja rozprzestrzenianiu się infekcji poprzez ułatwione przyłączenie się wirusów i następnie wnikanie ich do komórek. Z drugiej strony wzrost ekspresji ICAM-1 osiągany jest w przypadku infekcji HRV również pośrednio, poprzez indukcję produkcji cytokin prozapalnych (18-21). Badania na kulturach tkankowych ludzkich komórek nabłonkowych dróg oddechowych zainfekowanych HRV wykazały indukcję ekspresji wielu plejotropowych cytokin: IL-1 β , IL-6 i IL-11; czynników wzrostu: G-CSF i GM-CSF oraz chemokin, m.in. CXCL8 (IL-8), CXCL5 (ENA-78), CXCL10 (IP-10) i CCL5 (RANTES) (22). Przebieg tych procesów skutkuje rozszerzeniem naczyń i ich zwiększoną przepuszczalnością, infiltracją komórek, zwiększonym wytwarzaniem śluzu – czyli w klinice typowymi objawami przeziębienia. Jednym z elementów reakcji organizmu jest produkcja przeciwciał neutralizujących, w efekcie jeszcze po dwóch, trzech tygodniach od infekcji w wydzielinie nosa i surowicy krwi można wykryć przeciwciała neutralizujące (1).

W zakresie farmakoterapii lekarze mają do dyspozycji produkty lecznicze zawierające substancje czynne o działaniu przeciwwirusowym: chlorowoderek amantadyny, inhibitory neuraminidazy czy analogi nukleozydów. Są to jednak preparaty o ograniczonej skuteczności względem niektórych wirusów, a efekty uboczne ich stosowania i wykazana toksyczność ograniczają ich stosowanie szczególnie w pediatrii oraz geriatrii (23). Ponadto w ostatnich latach bardzo mocno podkreśla się znaczenie właściwej diagnostyki różnicowej etiologii infekcji, co może wpłynąć na ograniczenie nadużywania antybiotyków (3) i pozwoli unikać niepotrzebnej antybiotykoterapii, która z jednej strony może być wręcz szkodliwa, z drugiej – doprowadza do szybkiego powstawania oporności drobnoustrojów na antybiotyki. Poza intensywnymi badaniami nad nowymi syntetycznymi substancjami o właściwościach przeciwwirusowych, duże zainteresowanie wzbudza poszukiwanie aktywności przeciwwirusowej znanych, bezpiecznych i dobrze tolerowanych preparatów (m.in. pochodzenia roślinnego), wykorzystywanych od lat w leczeniu infekcji dróg oddechowych.

Informacje na temat przeciwwirusowego działania preparatów aloesowych pojawiały się od lat w literaturze naukowej (24-26). Dotychczas brak było doniesień o takim działaniu w odniesieniu do gatunku *Aloe arborescens*. Ten gatunek aloesu jest szczególnie ceniony ze względu na swoje wyraźne immunomodulujące

właściwości, stąd jego preparaty, najczęściej w postaci wyciągów wodnych, stosowane są w okresach nasilonej zachorowalności, szczególnie w przypadku dzieci przedszkolnych i szkolnych. W wyniku ich działania dochodzi do przywrócenia prawidłowej odpowiedzi układu immunologicznego (działanie immunomodulujące). W licznych badaniach pobudzenie osłabionej odporności organizmu ułatwiało zwalczanie infekcji bakteryjnych i wirusowych oraz przyczyniało się do redukcji zachorowań u dzieci (27-29). Za działanie immunologiczne wyciągów z *Aloe arborescens* odpowiedzialne są w dużej mierze glikoproteidy – lektyny – S-1 i P-2 (m.in. pobudzające układ dopełniacza i inicjujące aglutynację). Lektyna P-2 reaguje z α_2 -makroglobulinami, aktywuje komponent C-3 i proaktywator C-3 dopełniacza surowicy ludzkiej. Aktywowany komponent C-3 pobudza limfocyty B do produkcji przeciwciał oraz stymuluje przebieg mitozy limfocytów. W wielu badaniach wykazano immunomodulujące właściwości Bioaronu C i Biostyminy, zawierających wodny wyciąg z aloesu drzewiastego. Stwierdzono, że preparaty, w zależności od pierwotnego stanu immunologicznego organizmu, działają pozytywnie szczególnie na odporność typu komórkowego (limfocyty T) oraz aktywność fagocytową neutrofilów, a także w mniejszym stopniu na limfocyty B (30-32). Bioaron C, wykazuje również potwierdzone *in vitro* działanie przeciwzapalne i antyoksydacyjne (33, 34).

Wieloletnie obserwacje skłoniły producenta do rozpoczęcia badań nad przeciwwirusową aktywnością produktów Bioaron C i Biostymina. Autorzy opracowali protokół badania, w którym oceniano bezpośredni wpływ preparatów Biostymina i Bioaron C na replikację ludzkiego rinowirusa typu 14 (HRV14) w zainfekowanych wcześniej komórkach HeLa. Badanie przeprowadziła Dr Bernadette Glatthaar-Saalmüller w Instytucie Immunologii Uniwersytetu Medycyny Weterynaryjnej w Wiedniu.

Materiały i metody

Substancje badane

Do badania wykorzystano dostępne na rynku preparaty: Bioaron C (syrop) i Biostymina (płyn doustny w ampułkach).

100 ml Bioaronu C zawiera jako substancje czynne: wyciąg z aloesu drzewiastego (38,4 g) i witaminę C (1,02 g). Substancje pomocnicze to sacharoza, sok z aronii zagęszczony, benzoesan sodu, woda oczyszczona.

Biostymina to wyciąg z aloesu drzewiastego. Substancją pomocniczą jest woda oczyszczona (*Aqua purificata*).

Jako kontroli użyto w przypadku Bioaronu C – sacharozę, benzoesan sodu i wodę oczyszczoną, a w przypadku Biostyminy – wodę oczyszczoną.

Natomiast jako kontroli dodatnich użyto preparatów o znanej aktywności przeciwwirusowej: rybawiryne (Virazole, ICN Pharmaceuticals, Frankfurt, Niemcy, 4 $\mu\text{g/ml}$) – analog nukleozydu guanozyny, która wykazuje *in vitro* przeciwwirusową aktywność względem wielu wirusów RNA oraz chlorowoderek oksymetazolin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Niemcy, 20 $\mu\text{g/ml}$) związek aktywny *in vitro* względem rinowirusów (HRV14).

Komórki i wirusy

Linia komórek HeLa (ludzkie komórki nabłonkowe pochodzących z raka szyjki macicy) wrażliwych na HRV14 oraz szczep ludzkiego rinowirusa B, typ 14 (HRV14), pochodziły z Wydziału Wirusologii Medycznej i Epidemiologii Chorób Wirusowych Instytutu Higieny Uniwersytetu w Tübingen, Niemcy i z Friedrich-Schiller-University, Jena, Niemcy.

Ocena cytotoksyczności preparatów

Aby wykluczyć cytotoksyczne działanie preparatów na komórki HeLa w trakcie właściwych badań przeciwwirusowych oraz określić nietoksyczne stężenia Bioaronu C i Biostyminy w medium tkankowym, wykorzystano metodę enzymatyczną MTT. W badaniu tym komórki HeLa inkubowano z różnymi rozcieńczeniami (10^{-2}) Bioaronu C i Biostyminy oraz bez badanych substancji (kontrola). W teście MTT wykorzystuje się aktywność mitochondrialnej dehydrogenazy bursztynianowej, enzymu, który przekształca sól tetrazoliową, bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenyloctetrazoliowy, w formę zredukowaną – formazan. W komórkach uszkodzonych, upośledzonych metabolicznie lub martwych, formazan tworzy się w mniejszych ilościach lub nie powstaje, co pozwala na szybkie i dokładne określenie wpływu preparatów na żywotność linii komórkowej. Test ten przeprowadzono po 1 i 3 dni od podania preparatów. Równolegle prowadzono mikroskopową obserwację komórek (po 3 dniach) celem weryfikacji efektów cytotoksycznych, tj. zmienionej morfologii komórek, tworzenia wewnątrzkomórkowych wakuol i zniszczenia monowarstwy komórek.

Ocena aktywności przeciwwirusowej

Aktywność przeciwwirusowa preparatów została określona z zastosowaniem testu redukcji łysinek wirusowych (ang. *plaque-reduction assay*) wyrażonej w PFU (ang. *plaque-forming units*). Wrażliwe na HRV14 komórki HeLa zostały zainfekowane zawiesiną wirusa

HRV14 o wartości MOI (ang. *multiplicity of infection*) 0,0004 i inkubowane przez 1 h w temp. 34°C.

Po 1 h od zainfekowania linii komórkowej usuwano medium infekcyjne i monowarstwy komórek nakładano na półstały agar zawierający różne, nietoksyczne stężenia badanych substancji (Bioaron C od 0,006 do 1%, Biostymina od 0,56 do 90%) i hodowano przez 3 dni. Po tym czasie hodowle komórkowe zostały utrwalone 3% formaliną, wybarwione roztworem fioletu krystalicznego i analizowane.

Obliczanie aktywności przeciwwirusowej

W badaniu zliczano, z zastosowaniem komputerowego systemu przetwarzania obrazu ELISpot reader (AIDsystems), łysinki wirusowe widoczne jako niewybarwione plamki na tle wybarwionej monowarstwy komórek HeLa.

Określenie aktywności przeciwwirusowej przeprowadzono, szacując stopień redukcji liczby łysinek wirusowych w PFU w kolejnych rozcieńczeniach preparatów. Przeciwwirusowe działanie przedstawiono jako procentową redukcję ilości łysinek (PFU/ml) dla konkretnych stężeń badanych substancji, względem „kontroli wirusowej” (zainfekowanych komórek) hodowanych w pożywce niezawierającej badanych substancji. Liczba łysinek w „kontroli wirusowej” była wyznacznikiem 100% infekcji (0% inhibicji). Wyniki stanowią średnią z 4 powtórzeń i pochodzą z 2 niezależnych eksperymentów (AV1 i AV2).

Wyniki

Właściwości cytotoksyczne preparatów *in vitro*

Wyniki badania cytotoksyczności preparatów Bioaron C i Biostymina przedstawione są w tabeli 1. W teście MMT wykazano dla Bioaronu C i jego kontroli cytotoksyczność przy najwyższych badanych stężeniach (od 50 do 3,1%). Biorąc pod uwagę zakres cytotoksyczności w ciągu wszystkich analizowanych dni (dzień 1 i dzień 3), wartość IC_{50} Bioaronu C względem komórek HeLa ustalona została na 2,54%. Próba stanowiąca kontrolę względem Bioaronu C wykazała IC_{50} o wartości 8,57%. Ostatecznie w badaniu użyto Bioaron C w stężeniu 1% i dodatkowo w rozcieńczeniach 10^{-2} i 10^{-10} .

Biostymina nie wykazywała cytotoksyczności w najwyższym badanym stężeniu (90%) zarówno w teście MMT, jak i w ocenie mikroskopowej komórek.

Właściwości przeciwwirusowe preparatów *in vitro*

Wyniki działania przeciwwirusowego preparatów Bioaron C i Biostymina przedstawione są na rycinie 1

Tabela 1. Podsumowanie wyników badania cytotoksyczności, stężeń EC_{50} i IC_{50} oraz wyników działania przeciwwirusowego substancji referencyjnych (OMZ, Riba).

Produkt	Badanie	Najwyższe użyte stężenie (% V/V)	% inhibicji	Stężenie [%] (V/V)		% inhibicji – substancje referencyjne	
				EC_{50}	IC_{50} /dzień 3	OMZ (20 μ g/ml)	Riba (4 μ g/ml)
Biostymina (MOI 0,0004)	AV1	90	66,5	36	< 90	56,5	64,3
	AV2	90	57,4	36	< 90	44	56,8
	AV1+AV2	90	61,9	36	< 90	50,2	60,6
Bioaron C (MOI 0,0004)	AV1	1	93,8	0,29	2,54	45,2	59,4
	AV2	1	88,9	0,33	2,54	44,9	50,4
	AV1+AV2	1	91,3	0,31	2,54	45	54,9

MOI – (ang. *multiplicity of infection*) wielokrotność infekcji
 AV – (ang. *antiviral test*) badanie przeciwwirusowe
 EC_{50} – (ang. *effective concentration*) minimalne efektywne stężenie badanych substancji prowadzące do 50% redukcji łysinek wirusowych
 IC_{50} – (ang. *inhibitory concentration*) miara aktywności cytotoksycznej preparatów – minimalne stężenie hamujące badanych substancji, dla którego wzrost i proliferacja komórek w hodowli zostają zahamowane w 50% w stosunku do wzrostu komórek kontrolnych
 OMZ – chlorowoderek oksymetazoliny
 Riba – rybawiryna (Virazole)

i podsumowane w tabeli 1, prezentującej m.in. skuteczne stężenie powodujące 50% redukcję replikacji wirusa (EC_{50} (% V/V)).

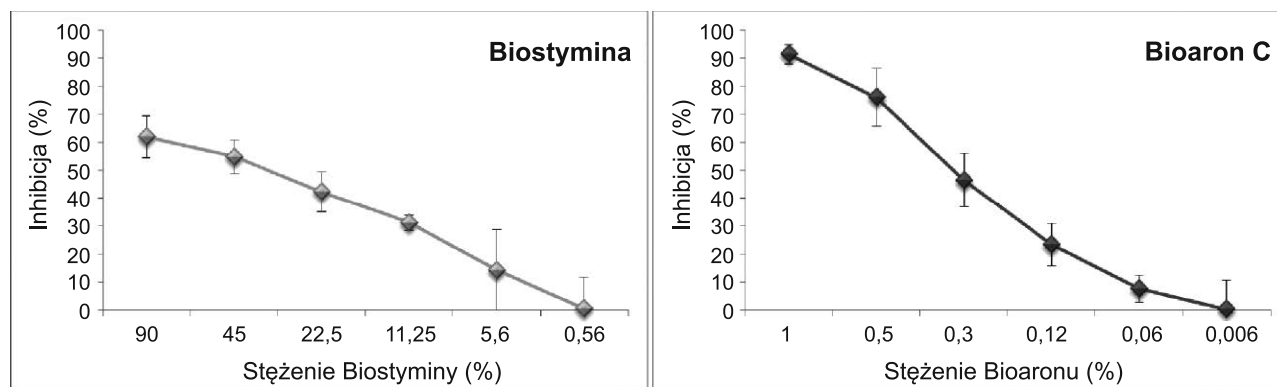
W wyniku dodania różnych stężeń Bioaronu C i Biostyminy do hodowli komórek HeLa zainfekowanych ludzkim wirusem HRV14 doszło do wyraźnej, zależnej od stężenia, redukcji liczby łysinek wirusowych, tj. do zahamowania replikacji wirusów *in vitro*.

Bioaron C w najwyższym zastosowanym stężeniu (1%), powodował ponad 90% redukcję liczby łysinek wirusowych. Biostymina w stężeniu 90% powodowała ponad 60% redukcję liczby łysinek wirusowych (ryc. 1). W badaniu prowadzono równolegle ocenę aktywności przeciwwirusowej prób kontrolnych (wody oczyszczonej w przypadku Biostyminy oraz wody oczyszczonej z sacharozą i benzoianem sodu w przypadku Bioaronu C). Nie stwierdzono żadnego działania przeciwwirusowego dla tych preparatów kontrolnych. Dla porównania rybawiryna Virazole (Riba) wykazała w stężeniu 4 μ g/ml aktywność przeciwwirusową względem HRV14 na poziomie 55-60%, natomiast chlorowoderek oksymetazoliny (OMZ) w stężeniu 20 μ g/ml wykazał odpowiednio 45-50% aktywność przeciwwirusową (tab. 1).

Dyskusja

W badaniu tym wykazano po raz pierwszy, zależną od dawki, przeciwwirusową aktywność znanych na rynku preparatów Bioaron C i Biostymina względem ludzkiego rinowirusa (HRV14), należącego do wirusów odpowiedzialnych za większość ostrych infekcji dróg oddechowych zarówno u dzieci, jak i u dorosłych.

Bioaron C wykazywał silniejsze przeciwwirusowe działanie aniżeli Biostymina. Bioaron C, oprócz



Ryc. 1. Aktywność przeciwwirusowa Biostyminy i Bioaronu C względem wirusa HRV14. Wyniki przedstawiają % inhibicji liczby łysinek wirusowych w kolejnych rozcieńczeniach preparatów w porównaniu z kontrolą, dla której przyjęto 0% inhibicji, tj. 100% infekcji. Dane stanowią średnią z dwóch niezależnych eksperymentów (n = 4).

wodnego wyciągu z aloesu drzewiastego, zawiera w swoim składzie witaminę C, a także, jako jedną z substancji pomocniczych, zagęszczony sok z aronii czarnoowocowej. Zarówno dla witaminy C (35), jak i aronii czarnoowocowej (36, 37) dostępne są badania wskazujące na ich własną aktywność przeciwwirusową. Do tej pory nie było jednak prac jasno wskazujących na takie działanie wyciągu wodnego z aloesu drzewiastego (Biostymina), bądź kombinacji tych składników (Bioaron C).

Badania Pampura (27) wykazały, że w wyniku terapii Bioaronem C dochodzi do przywrócenia prawidłowej odpowiedzi układu immunologicznego, tj. działania immunomodulującego preparatu. Inne zespoły badaczy potwierdziły, że w wyniku stosowania Bioaronu C dochodziło do pobudzenia osłabionej odporności organizmu, co pośrednio ułatwiało zwalczanie infekcji bakteryjnych i wirusowych oraz przyczyniało się do redukcji zachorowań u dzieci (28, 29, 32, 38, 39). Doniesienia o przeciwwzapalnych właściwościach Bioaronu C (33, 34) poszerzyły wiedzę na temat spektrum działania tego leku i skłoniły do dalszych badań nad kierunkiem działania preparatu, w tym nad jego bezpośrednią aktywnością przeciwwirusową.

Jak wykazano w wielu pracach, w wyniku połączenia rinowirusa z receptorami błony komórek nabłonka dróg oddechowych i rozpoczęcia replikacji, dochodzi do uruchomienia reakcji zapalnej i odpowiedzi immunologicznej w organizmie gospodarza. Być może jednym z mechanizmów, które warunkują przeciwwirusowe działanie badanych preparatów, jest obniżanie poziomu cytokin prozapalnych (33, 34) poprzez skuteczne hamowanie reakcji zapalnych, m.in. skutkujące obniżeniem ekspresji ICAM-1, osłabieniem przyłączania się kolejnych wirusów i w efekcie spowolnieniem lub zatrzymaniem rozwoju infekcji (18-21).

Wiele laboratoriów na całym świecie zaangażowanych jest w poszukiwanie nowych preparatów pochodzenia roślinnego wykazujących działanie przeciwwirusowe. Ponieważ jednak od pojedynczych prac *in vitro*, dotyczących aktywności jakiegoś preparatu, do jego zarejestrowania i finalnego zastosowania w danym wskazaniu (np. w leczeniu infekcji) droga jest długa, każde nowe doniesienie o działaniu preparatu dostępnego na rynku, w przypadku dwóch badanych – o działaniu przeciwwirusowym, jest niezwykle istotne.

Wnioski

W badaniu tym wykazano po raz pierwszy, zależną od dawki, przeciwwirusową aktywność preparatów Bioaron C i Biostymina względem ludzkiego rinowirusa (HRV14), należącego do wirusów odpowiedzial-

nych za przeważającą większość ostrych infekcji dróg oddechowych zarówno u dzieci, jak i u dorosłych. Niniejszy eksperyment ma charakter pilotażowy w badaniu nad przeciwwirusową aktywnością produktów leczniczych zawierających wodne wyciągi z aloesu drzewiastego. Jego obiecujące wyniki stanowią punkt wyjścia do dalszych badań aktywności tych produktów względem innych patogennych wirusów powodujących infekcje dróg oddechowych oraz do badań nad mechanizmem działania przeciwwirusowego.

Piśmiennictwo

1. Van Kempen M, Bachert C, Van Cauwenberge P. An update on the pathophysiology of rhinovirus upper respiratory tract infections. *Rhinology* 1999; 37:97-103.
2. Rowlands DJ. Rhinoviruses and cells: molecular aspects. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152:31-5.
3. Hryniewicz W, Ozorowski T, Radzikowski A i wsp. Rekomendacje postępowania w pozaszpitalnych zakażeniach układu oddechowego 2010. Narodowy Program Ochrony Antybiotyków. <http://www.antybiotyki.edu.pl/pdf/RekomendacjeA42009.pdf>.
4. Rossman MG, Palmenberg AC. Conservation of the putative receptor attachment site in picornaviruses. *Virology* 1988; 164:373-82.
5. Rösel S, Holtappels G, Wagenmann M i wsp. Elevated levels of interleukins IL-1beta, IL-6, IL-8 in naturally acquired viral rhinitis. *Eur Arch Oto-Rhinolaryngol* 1995; 252:61-6.
6. Arden KE, Mackay IM. Minireview human rhinoviruses: coming in from the cold. *Genome Med* 2009; 1:44.
7. Gavala M, Bertics PJ, Gern JE. Rhinoviruses, allergic inflammation, and asthma. *Immunol Rev* 2011; 242:69-90.
8. Johnston NW, Johnston SL, Norman GR i wsp. The September epidemic of asthma hospitalization: school children as disease vectors. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:557-62.
9. Hendley J, Gwaltney J, Jordan W. Rhinovirus infections in an industrial population IV. Infections within families of employees during two fall peaks of respiratory illness. *Am J Epidemiol* 1969; 89:184-96.
10. Gwaltney Jr JM, Hendley JO. Transmission of experimental rhinovirus infection by contaminated surfaces. *Am J Epidemiol* 1982; 116:828-33.
11. Rotbart HA, Hayden FG. Picornavirus infections: a primer for the practitioner. *Arch Fam Med* 2000; 9:913-20.
12. Fendrick AM, Monto AS, Nightengale B. The economic burden of non-influenza-related viral respiratory tract infection in the United States. *Arch Intern Med* 2003; 163:487-94.
13. Bertino JS. Cost burden of viral respiratory infections: issues for formulary decision makers. *Am J Med* 2002; 112:42-9.
14. Winther B, Brofeldt S, Gronborg H i wsp. Pathology of naturally occurring colds. *Eur J Respir Dis Suppl* 1983; 128:345-7.
15. Dreschers S, Dumitru CA, Adams C i wsp. The cold case: are rhinoviruses perfectly adapted pathogens? *Cell Mol Life Sci* 2007; 64:181-91.
16. Hendley JO. The host response, not the virus, causes the symptoms of the common cold. *Clin Infect Dis* 1998; 26:847-8.
17. Turner RB, Weingand KW, Yeh CH i wsp. Association between interleukin-8 concentration in nasal secretions and severity of experimental rhinovirus colds. *Clin Infect Dis* 1998; 26:840-6.
18. Terajima M, Yamaya M, Sekizawa K i wsp. Rhinovirus infection of primary cultures of human tracheal epithelium: role of ICAM-1 and IL-1. *Am J Physiol* 1997; 273:749-59.
19. Bianco A, Sethi SK, Allen JT i wsp. Th2 cytokines exert a dominant influence on epithelial cell expression of the major group human rhinovirus receptor, ICAM-1. *Eur Respir J* 1998; 12:619-26.
20. Paolieri F, Battifora M, Riccio AM i wsp. Intercellular adhesion molecule-1 on cultured human epithelial cell lines: influence of proinflammatory cytokines. *Allergy* 1997; 52:521-31.
21. Bloemen PGM, van den Tweel MC, Hendricks PAJ i wsp. Expression and modulation of adhesion molecules on hu-

- man bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993; 9:586-93. **22.** Leigh R, Proud D. Modulation of epithelial biology by rhinovirus infection: role in inflammatory airway diseases. *Future Virol* 2011; 6:375-86. **23.** Bacon TH, Levin MJ, Leary JJ i wsp. Herpes simplex virus resistance to acyclovir and penciclovir after two decades of antiviral therapy. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16:114-28. **24.** Olatunya OS, Olatunya AM, Anyabolu HC i wsp. Preliminary trial of *Aloe vera* gruel on HIV infection. *Altern Complement Med* 2012; 8 (Epub ahead of print). **25.** Lin CW, Wu CF, Hsiao NW i wsp. Aloe-emodin is an interferon-inducing agent with antiviral activity against Japanese encephalitis virus and enterovirus 71. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 32:355-9. **26.** Sydskis RJ, Owen DG, Lohr JL i wsp. Inactivation of enveloped viruses by anthraquinones extracted from plants. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35:2463-6. **27.** Pampura AH. Kliniczna skuteczność, bezpieczeństwo, osobliwości odpornościowego działania przy profilaktycznym zastosowaniu preparatu Bioaron C u często chorujących dzieci. Instytut Badawczy Pediatrii i Chirurgii Dziecięcej (Wydział Alergologii i Immunologii Klinicznej), Roszdraz, Rosja, 2006. **28.** Tsodikova OA, Harbar KB, Barchan HS. Kliniko-immunolohichni osoblyvosti homeostazu u ditey z retsydyvnymy respiratornymy infektsiyamy ta ikh dynamika pry vykorystanni fitopreparatu «Bioaron C». *Sov Pedyatryya* 2011; 5:117-21. **29.** Prokhorov EV, Ostrovskiy IM, Belskaya EA i wsp. Effektivnost ispolzovaniya „Bioarona C” v lechenii ostrogo i retsidiviruyushchego bronhita u detey. *Sov Pedyatryya* 2011; 3:81-4. **30.** Demkow U, Skopińska-Różewska E. Wpływ preparatu Bioaron C na odporność. *Medyk* 2003; 51-6. **31.** Alkiewicz J. Biostymina, Bioaron i Bioaron C – roślinne biostymulatory w praktyce lekarskiej. *Post Fitoter* 2000; 4:18-20. **32.** Horoszkiewicz-Hassan M, Beuscher N, Lehnfeld R i wsp. Tolerability and efficacy of Bioaron C syrup in the treatment of upper respiratory tract infection in children. Results of a post-marketing surveillance study in Poland. *Herba Pol* 2005; 51:45-53. **33.** Lehnfeld R, Appel K, Sievers H. Anti-inflammatory activity of the herbal product Bioaron C, 51st Annual Congress of the Society for Medical Plant Research, 2003, Kiel, Niemcy. **34.** Cichocki M, Michalak A, Appel K. Anti-inflammatory properties of *Aloe arborescens* and *Aronia melanocarpa* preparation Bioaron C, 1st Polish-German Biochemical Societies Joint Meeting, 2012, Poznań. *Acta Bioch Pol* 2012; 3:196. **35.** Douglas RM, Hemila H, D'Souza R i wsp. Vitamin C for preventing and treating the common cold. *Cochrane database of systematic reviews* 2004; 18, Art. No.: CD000980. **36.** Valcheva-Kuzmanova SV, Belcheva A. Current knowledge of *Aronia melanocarpa* as a medicinal plant. *Folia Med (Plovdiv)* 2006; 48:11-7. **37.** Kokotkiewicz A, Jaremicz Z, Luczkiewicz M. *Aronia* plants: a review of traditional use, biological activities, and perspectives for modern medicine. *J Med Food* 2010; 13:255-69. **38.** Snegotskaya MN, Konopelko OJ. Ob effektivnosti ispolzovaniya preparata Bioaron C dlya profilaktiki i lecheniya ORZ. *Praktika Pediatra* 2009; 22-6. **39.** Aryayev NL, Starikova AA, Pivak OE. Otsenka klinicheskoy effektivnosti ispolzovaniya preparata Bioaron C v ambulatornom lechenii i profilaktike retsidiviruyushchikh – respiratornykh infektsiy u detey. *Sov Pedyatryya* 2010; 5:34.

otrzymano/received: 20.08.2012
zaakceptowano/accepted: 11.09.2012

Adres/address:

*dr Anna Michalak

Dział Informacji Naukowej, Phytopharm Kłęka SA
Kłęka 1, 63-040 Nowe Miasto nad Wartą
tel.: +48 (61) 286-82-91, +48 697-741-811
e-mail: anna.michalak@eurolant-group.pl