



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **52561** (13) **U**
(51) **МПК (2009)**
A61K 35/66
A61P 1/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) ЗАСТОСУВАННЯ ПРОБІОТИКІВ ЯК ЕЗОФАГОПРОТЕТОРНИХ ТА ВИРАЗКОЗАГОЮВАЛЬНИХ ЗАСОБІВ ПРИ НЕЕРОЗИВНИХ УРАЖЕННЯХ СТРАВОХОДУ

1

(21) u201003819
(22) 02.04.2010
(24) 25.08.2010
(46) 25.08.2010, Бюл.№ 16, 2010 р.
(72) САВИЦЬКА МАР'ЯНА ЯРОСЛАВІВНА, ЗАЯЧ-
КІВСЬКА ОКСАНА СТАНІСЛАВІВНА, ГЖЕГОЦЬ-
КИЙ МЕЧИСЛАВ РОМАНОВИЧ

2

(73) ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ДАНИЛА ГАЛИЦЬКОГО
(57) Застосування пробіотиків як езофагопротек-
торних та виразкозагоювальних засобів при нее-
розивних ураженнях стравоходу.

Корисна модель відноситься до медицини, а власне, до засобів, які сприяють посиленню цитопротекторних та регенераторних властивостей слизової оболонки стравоходу (СОС), і може бути використана для профілактики і лікування езофагальних захворювань.

На сьогоднішній день функціональні та органічні порушення слизової оболонки стравоходу посідають провідне місце серед кислотоасоційованої гастроентерологічної патології, що зустрічається у всіх вікових категоріях і відноситься до поширених захворювань у світі. Відомо, що стрес є одним із пускових механізмів, які ініціюють низку патогенетичних факторів і впливають на порушення цілісності, проникності та зміну резистентності епітеліального бар'єру органів травлення [1]. Наукові дослідження вказують на провідну роль стресу в ініціації неерозивних порушень СОС, змін у моторно-евакуаторних та секреторних функціях у проксимальному відділі травної системи, що стають підґрунтям для появи неерозивної рефлюксної хвороби (НЕРХ) [2]. НЕРХ - широко розповсюджена гастроентерологічна патологія, клінічна картина якої характеризується маломаніфестною об'єктивною картиною, латентним перебігом, що створює труднощі для своєчасної діагностики і відтерміновує початок адекватної терапії [3]. В сучасних умовах новітні заходи адекватної профілактики і терапії гастроентерологічних хвороб скеровані на комплексний вплив щодо етіологічних та патогенетичних чинників, зниження проявів агресії та посилення факторів захисту. Відомо, що пропонувані стандарти лікування у 25 % випадків є неефективними з огляду на розвиток

рефрактерного неерозивного езофагіту. Крім того, пропонувані терапевтичні заходи не завжди є успішними, збільшується кількість проявів гастро-езофагальної хвороби (ГЕРХ), а також простежується тенденція до хронізації ГЕРХ, ускладненнями якої, згідно з рекомендаціями ВО-ОЗ, вважають стравохід Барретта і аденокарциному стравоходу.

Стандартне медикаментозне лікування хворих з ГЕРХ включає антисекреторні засоби (інгібітори протонної помпи, ІПП, H_2 -гістамінових блокаторів (H_2 -ГБ), антациди тощо), які спрямовані на потужне гальмування кислотоутворення в шлунку, зменшення частоти та інтенсивності шлунково-стравохідного рефлексу і вважаються ефективними у разі застосування ранітідину, фамотидину, нізатидину (H_2 -ГБ), омепразолу (омезу, лосеку, тімопразолу), що блокують $H^+ K^+$ -АТФ-азу (ІПП). Проте наукові дані Pohl D., et al., 2008 вказують, що тривала ахлоргідрія, індукована ІПП і H_2 -ГБ, небезпечна, часто зумовлює порушення моторики у проксимальному відділі травної системи, нейроендокринного регулювання (гіпергастринемію), процесів травлення та регенерації, мікробіологічного балансу. Зміна природної мікрофлори і мікробного метаболізму у проксимальному відділі травної системи створює передумови для структурно-функціональної реорганізації СОС, модифікації процесів міжклітинної комунікації, регенерації та репарації. Тому пошук більш ефективних засобів підвищення резистентності епітеліального бар'єру СОС за умов цитолітичного впливу та засобів впливу на виразкозагоєння є актуальним завданням сучасної медицини.

(19) **UA** (11) **52561** (13) **U**

Пробіотики - живі мікроорганізми, які поліпшують мікробний баланс. В сучасній медицині одним з перших термін "пробіотики" використав R.B. Fuller в 1991 році для опису "живих добавок з мікроорганізмів, які приносять допомогу організму, поліпшуючи його мікробний баланс". З 1995 року під пробіотиками розуміють біотерапевтичні агенти, тобто мікроорганізми зі специфічними властивостями, які інгібують ріст патогенних бактерій на слизовій оболонці травної системи. Використання даних біопрепаратів впливає на функціонування різних систем органів, а саме: протизапальна дія, корекція кишкового дисбіозу і деяких метаболічних порушень, наприклад, при гіперліпідемії тощо. По стосунку до лікування і попередження atopічних реакцій, імуномодуючих ефектів і деяких інших станів є вагомі докази їхньої ефективності.

В основу корисної моделі поставлене завдання розширення галузі застосування пробіотиків як нового, безпечного у застосуванні засобу езофагопротекції для профілактики і терапії захворювань стравоходу, конкурентноспроможного за ефективністю, що відновлює механізми захисту СОС, діє на інші етіопатогенетичні ланки ульцерогенезу та репаративні властивості.

Поставлене завдання вирішується застосуванням пробіотиків як езофагопротекторного та виразкозагоювального засобу при неерозивних ураженнях стравоходу.

Вживання пробіотиків сприяє інтенсифікації виразкозагоювання СОС у порівнянні зі спонтанним загоюванням, що дозволяє використовувати їх для профілактики та лікування неерозивно-виразкових захворювань стравоходу.

Для підтвердження ефективності заявленої корисної моделі було вивчено вплив пробіотиків на процеси загоювання неерозивних уражень СОС шляхом оцінки структурно-функціональної реорганізації вуглеводних компонентів глікопротеїнових рецепторів стравоходу в умовах експериментального моделювання гострого стресу та в різні терміни загоювання.

Запропонований засіб езофагопротекції та виразкозагоєння неерозивних уражень СОС досліджено у модельних серійних дослідженнях, що проведені відповідно до положень універсального комітету з біоетики та Міжнародних принципів "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують для експериментів та в інших наукових цілях" на нелінійних щурах самцях (n=67), масою 200±20г, що були розділені на групи: 1-а - контрольна, 2-а і 3-а - тварини, що зазнали евтаназії відразу після індукції стресу, 4-а і 5-а - через 24год після стресу, 6-а і 7-а - через 48год після стресу (модель водно-імобілізаційного стресу за Takagi et al., 1964), при цьому щурам 3-ї, 5-ї і 7-ї груп вводили per os пробіотик "Симбітер" (виробник "О.Д. Пролісок", Україна), об'ємом 0,5мл (140мг/кг), решті - плацебо (фізрозчин 0,5мл). Для візуалізації функціональної реорганізації мікроскопічних уражень СОС гістологічний матеріал нижньої третини стравоходу фіксували у 4% формаліні і заливали у парафін за загальноприйнятою методикою з фарбуванням гематоксиліном та еозином. Оцінювання вуглеводних компонентів глі-

копротеїнових рецепторів СОС проводили за аналізом хімічного складу гістохімічної реакції, за наявністю коричневого, осаду у місцях зв'язування лектину, за напівкількісним методом з використанням лектинів різної вуглеводної специфічності, мічених пероксидазою [3, 5]. Підбір панелі лектинів був здійснений з урахуванням їхніх відмінностей у вуглеводній специфічності з метою більш точної та повної ідентифікації вуглеводних компонентів глікопротеїнових рецепторів СОС: лектину зародків пшениці (WGA), специфічного до NAcDGlc→NAcNeu; лектину насіння арахісу (PNA), специфічного до βDGal-H→3DGalNAcDGal; лектину кори бузини чорної (SNA), специфічного до Neu5Ac/2→6Gal; лектину виноградного слимака (HPA), специфічного до αNAcDGal (НДЛ "Летинотест", м. Львів). Перегляд препаратів та фотографування здійснювали за допомогою мікроскопа Carl Zeiss. Відеоаналіз здійснювали із застосуванням ліцензованої системи відеозапису зображення AVerMedia. Інтенсивність лектин-рецепторної реакції оцінювали напівкількісним методом ("-" - слабка реакція, "+" - помірна реакція, "++" - сильна реакція, "+++" - дуже сильна реакція) за забарвленням препаратів.

Результати досліджень представлені на ілюстраціях описів мікро фото зафарбування ГЕ (зб.х600): на Фіг.1 зображено слизову оболонку стравоходу щурів контрольної групи: поверхневий шар (а), остистий шар (б), базальний шар (в) епітеліальної пластинки, власна пластинка (г), м'язова пластинка (д); на Фіг.2 - слизова оболонка стравоходу у тварин після індукції стресу: десквамація поверхневого шару (а) звуження просвіту судин підслизової основи, набряк сполучної тканини (в).

Слизова оболонка стравоходу щурів контрольної групи (інтактні тварини) включала епітеліальну пластинку, що утворювала багатошаровий плоский епітелій, який лежав на базальній мембрані; власну пластинку, представлену пухкою сполучною тканиною з судинами та типовими клітинними елементами і волокнистими структурами, що характерні для сполучної тканини; м'язову пластинку - один шар гладких міоцитів; підслизову основу з пухкою сполучною тканиною, що разом із слизовою утворили поздовжні складки, що на поперечних зрізах дало характерний рисунок (Фіг.1).

У тварин, яким індукували стрес, спостерігались зміни товщини епітелію, локальне витончення, десквамація поверхневого шару. Просвіт судин власної пластинки та підслизової основи був подекуди звужений, місцями простежувався набряк сполучної тканини, що створювало враження звуження просвіту стравоходу та заповнення його десквамованими елементами поверхневого шару СОС (Фіг.2).

Зафарбування зрізів лектинами WGA, PNA, SNA, HPA показало виразне структурування епітеліальної пластинки СОС на базальний, остистий та поверхневий шари, що було використано для інтерпретації просторової орієнтації та експресії лігандів лектинів. Вуглеводні детермінанти у вигляді βDGal та нейрамінової кислоти виявлені як у цитоплазмі епітеліоцитів базального шару, так і на їхній апікальній поверхні, у місцях формування

міжклітинних контактів, у складі базальної мембрани, де започатковуються процеси синтезу компонентів слизового бар'єру. У напрямку від базального шару до поверхні епітелію вищезазначені детермінанти виявлялися на поверхні епітеліоцитів остистого шару СОС, відбувалася незначна редукція NAcDGlc та нейрамінової кислоти у напрямку до люменального простору. Натомість у поверхневому шарі з'явилися вуглеводні детермі-

нанти NAcDGlc. У власній пластинці та підслизовій основі рецептори WGA були спостережені у волокнистих структурах (колагенові волокна). Окрім того, рецептори лектину PNA виявлені у внутрішній оболонці судин, клітинних елементах сполучної тканини, тканинних базофілах.

Напівкількісний аналіз інтенсивності експресії високоспецифічних глікопротеїнових рецепторів СОС щурів контрольної групи подано у Табл. 1.

Таблиця 1

Рецептори лектинів у структурних компонентах слизової оболонки стравоходу щурів контрольної групи (інтактні тварини)

Назва лектину та його вуглеводнева специфічність	Структурні компоненти слизової оболонки стравоходу			
	Епітеліальна пластинка	Власна пластинка	М'язова пластинка	Підслизова основа
Лектин зародків пшениці (WGA), специфічний до NAcDGlc→NAcNeu	+++ епш; включно з компонентами ебш	++ кв	+ гз	+ кв
Лектин насіння арахісу (PNA), специфічний до β DGal	+++ пш; включно з слизовим бар'єром; +++ ебш	++ кв	+ гз	
Лектин кори бузини чорної (SNA), специфічний до Neu5Ac/2→6Gal	+++ еш ++ еош +++ ебш	++ кв	+ гз	++ кв
Лектин виноградногo слимака (HPA), специфічний до α NAcDGal	+++ апікальна поверхня; епш + еош, ++ ебш	+++ кв	+ гз	+++ кв

Примітка: епш - епітеліоцити поверхневого шару, еош - епітеліоцити остистого шару, ебш - епітеліоцити базального шару, кв - колагенові волокна, гз - гомогенне забарвлення.

Індукція стресу зумовила модифікацію вуглеводних детермінант: зниження експресії N-ацетил-D-глюкозаміну, N-ацетил-нейрамінової кислоти і Neu 5Ac/2→6Gal у епітеліальній пластинці, у меншій мірі - β -D-галактози, особливо у власній пластинці, через зміну хімічного складу передепітеліального бар'єру СОС, міжклітинних контактів, десквамацію епітелію, що змінило проникність СОС і зумовило процеси запального характеру.

Порівняльний аналіз нейро-трофічних уражень СОС та дані про специфічність експресії глікополімерів NAcDGlc→NAcNeu, β DGal-H→3DGalNAcDGal, Neu5Ac/2→6Gal, α NAcDGal, індукованих стресом у щурів без та зі застосуванням пробіотиків, представлено у Табл. 2. Застосу-

вання пробіотиків спричинило інтенсивну сіалізацію апікальних мембран, міжклітинних контактів, особливо у поверхневому шарі, а також клітинноматриксних з'єднань СОС, що було зумовлено кількісно-якісними змінами синтезу компонентів слизово-епітеліального бар'єру, а саме: збільшення експресії вуглеводних компонентів β DGal, α NAcDGal виявлено у епітеліальній пластинці СОС (Табл. 2). Отримані результати зумовлені змінами вмісту локальних вазодилататорних факторів: простагландинів, оксиду азоту (NO) та кальцитонін ген спорідненого пептиду (CGRP), що є наслідком природних захисних реакцій [3].

Таблиця 2

Динаміка вуглеводних компонентів глікопротеїнових рецепторів СОС за умов стрес-індукованих уражень у щурів без та із введенням пробіотиків (тварини 2-ї і 3-ї експериментальних груп)				
Назва лектину та його вуглеводна специфічність	Структурні компоненти слизової оболонки стравоходу			
	Епітеліальна пластинка	Власна пластинка	Підслизова основа	М'язова пластинка
Для тварин 2-ї групи				
Лектин зародків пшениці (WGA), специфічний до NAcDGlc→NAcNeu	++ епш ++ еош	+ кв	+ кв	- гз
Лектин насіння арахісу (PNA), специфічний до βDGal	+++ епш	+ ++ кв	+++ кв	+ гз
Лектин кори бузини чорної (SNA), специфічний до Neu 5Ac/2→6Gal	++++ епш +++ всі шари	+ кв	+ кв	+ гз
Лектин виноградногo слимака (HPA), специфічний до αNAcDGal	+++ епш ++ еош, місцями витончення шарів	+++ кв	+ кв	+ гз
Для тварин 3-ї групи				
Лектин зародків пшениці (WGA), специфічний до NAcDGlc→NAcNeu	+++ епш ++ еош	+ кв	+ кв	+ гз
Лектин насіння арахісу (PNA), специфічний до βDGal	+++ епш	++кв; + ке	+ кв	++ гз
Лектин кори бузини чорної (SNA), специфічний до Neu 5Ac/2→6Gal	++++ епш +++ всі шари	+ кв	++ кв	++ гз
Лектин виноградногo слимака (HPA), специфічний до αNAcDGal	++++ епш ++ еош ++ ебш	+ кв	+ кв	+гз

Примітка: епш - епітеліоцити поверхневого шару, еош - епітеліоцити остистого шару, ебш - епітеліоцити базального шару, кв - колагенові волокна, гз - гомогенне забарвлення, ке - клітини епітелію.

Порівняльний лектингістохімічний аналіз процесу загоєння через 1 та 2 доби нетопічних стрес-асоційованих уражень СОС щурів без і з введенням пробіотика представлений у Табл. 3. Встановлено, що найбільш виражені зміни вуглеводного компоненту у складі глікопротеїнових рецепторів відбулись за рахунок збільшення, перш за все, β-D-галактози, N-ацетил-D-глюкозаміну і N-ацетил-нейрамінової кислоти, відбулися у щурів 7-ї групи, що отримували пробіотик симбітер (Табл. 3), і виявлялись зменшенням ступеня пошкодження, а саме, зменшенням експресії лектинових рецепто-

рів PNA в поверхневому шарі (з ознаками кератинізації) та базальній мембрані епітеліальної пластинки. У той же час у середньому остистому шарі епітелію простежувалось збільшення вмісту глюкоспецифічних рецепторів до лектинів WGA і маскування сіалоспецифічних рецепторів SNA, що свідчило про посилення продукції муцинів і, відповідно, захисної функції СОС. Отримані дані опосередковано свідчили про пришвидшення відновлювальних регенеративних процесів, що співпадає з нашими попередніми дослідженнями [4] і є фізіологічною характерною ознакою загоєння.

Таблиця 3

Порівняльна динаміка вуглеводних компонентів глікопротеїнових рецепторів СОС за умов загоєння неерозивних уражень через 24 та 48 год. у щурів без та із введенням пробіотиків (тварини 4 і 5 та 6 і 7 експериментальних груп)

Назва лектину та його вуглеводна специфічність	Структурні компоненти слизової оболонки стравоходу			
	Епітеліальна пластинка	Власна пластинка	М'язова пластинка	Підслизова основа
Для тварин 4-ї групи				
Лектин зародків пшениці (WGA), специфічний до NAcDGlc→AcNeu	++ епш ++ еош	+ кв	- гз	+ кв
Лектин насіння арахісу (PNA), специфічний до βDGal	+++ епш	+++ кв	+ гз	+++кв
Лектин кори бузини чорної (SNA), специфічний до Neu 5Ac/2→6Gal	++++ епш +++ всі шари	+ кв	+ гз	+ кв
Лектин виноградного слимака (HPA), специфічний до αNAcDGal	+++ епш ++ еош, місцями витончення шарів	+++ кв	+ гз	+ кв
Для тварин 5-ї групи				
Лектин зародків пшениці (WGA), специфічний до NAcDGlc→AcNeu	+++епш ++ еош	+ кв	+гз	+ кв
Лектин насіння арахісу (PNA), специфічний до βDGal	+++ епш	++кв; +ке	+++гз	+ кв
Лектин кори бузини чорної (SNA), специфічний до Neu 5Ac/2→6Gal	++++ епш +++ всі шари	+ кв	++ гз	++ кв
Лектин виноградного слимака (HPA), специфічний до αNAcDGal	++++ епш ++ еош ++ ебш	+ кв	+ гз	+ кв
Для тварин 6-ї групи				
Лектин зародків пшениці (WGA), специфічний до NAcDGlc →AcNeu	++++ епш - еош ++ ядра ++ бм	+++ кв	+ гз	+++ кв
Лектин насіння арахісу (PNA), специфічний до βDGal	++++ епш ++ еош +++ ебш +++ бм	++ кв	+ гз	+++ кв
Лектин кори бузини чорної (SNA), специфічний до Neu 5Ac/2→6Gal	++ епш ++ еош +++ бм	+++ кв	+ гз	+++ кв
Лектин виноградного слимака (HPA), специфічний до αNAcDGal	++ епш - еош - ебш + бм	+ кв + клітини	+ гз	- кв
для тварин 7-ї групи				
Лектин зародків пшениці (WGA), специфічний до NAcDGlc →AcNeu	+++ епш + еош - ебш	++ кв	+ гз	++ кв

Продовження таблиці 3

Порівняльна динаміка вуглеводних компонентів глікопротеїнових рецепторів СОС за умов загоєння неерозивних уражень через 24 та 48 год. у щурів без та із введенням пробіотиків (тварини 4 і 5 та 6 і 7 експериментальних груп)

Назва лектину та його вуглеводна специфічність	Структурні компоненти слизової оболонки стравоходу			
	Епітеліальна пластинка	Власна пластинка	М'язова пластинка	Підслизова основа
Лектин насіння арахісу (PNA), специфічний до β DGal	+++ епш +++ ебш ++ еош	+ кв	+ гз	+ кв
Лектин кори бузини чорної (SNA), специфічний до Neu 5Ac/2→6Gal	++ епш	+++ кв	++ гз	+ кв
Лектин виноградногo слимака (HPA), специфічний до α NAcDGal	+++ епш + еош + ебш +++ бм	+++ кв	+ гз	+++ кв

Примітка: епш - епітеліоцити поверхневого шару, еош - епітеліоцити остистого шару, ебш - епітеліоцити базального шару, кв - колагенові волокна, гз - гомогенне забарвлення, бм - базальна мембрана.

Корекція пробіотиком цитоагресивного впливу візуалізувалась у модифікації експресії лектинорецепторів, що вказувало на індуковану ним функціональну реорганізацію епітеліального бар'єру та більш виражені ознаки загоєння, активування регенерації, елімінації уражених клітин, порівняно з результатами, отриманими за умов спонтанного загоювання у групі 6.

Проведені дослідження показують, що процес загоювання у СОС обумовлений як зростанням біосинтезу глікопротеїнів, так і/або зменшенням їхньої деградації внаслідок активності NOS та простагландинів. Динаміка мозаїки експресії лектинових рецепторів підтвердила участь глікокон'югатів у процесах цитолізу та загоювання, що може бути використано як критерій регенерації СОС.

Результати проведених досліджень свідчать, що застосування пробіотиків має виразну цитопротекторну, регенераційну і захисну дію, що реалізується у структурно-функціональній реорганізації епітеліального бар'єру СОС та пришвидшенні виразкозагоєння деструктивних стрес-індукованих уражень СОС.

Таким чином, пробіотики - це новий засіб езофагопротекції та виразкозагоювання неерозивних

уражень стравоходу, що є підставою для їх клінічного застосування (впровадження).

Джерела інформації:

1. Майкова Т.В. Стрес як чинник розвитку поєднаної патології органів травлення. - Сучасна гастроентерологія. - 2004. - 4(18). - С.49-52.

2. Бабак О.Я. Гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь / О.Я. Бабак, Г.Д. Фадеенко. - К.: Интерфарма, 2000. - 175с.

3. Заячківська О.С., Гжегоцький М.Р., Слівоський З. та ін. Модельні дослідження участі оксиду азоту, простаноїдів та глікокон'югатів епітеліального бар'єру стравоходу в езофагопротекції // Лікарська справа. - 2006. - №7. - С.35-41.

4. Заячківська О.С., Джура О.Р., Ященко А.М. Вивчення вазодилаторних ефектів мелатоніну на експресію лектинових рецепторів за умов експериментального езофагіту in vivo // Буковинський медичний вісник. - 2006. - ТЛО, №4. - С.47-49.

5. Савицька М.Я., Заячківська О.С., Гжегоцький М.Р., Ященко А.М. Особливості складу вуглеводного компоненту глікопротеїнових рецепторів епітеліального бар'єру стравоходу за умов гоєння стрес-індукованих уражень (експериментальні дослідження) // Практична медицина. - 2009. - 2 (Т. XV). - С.69-80.

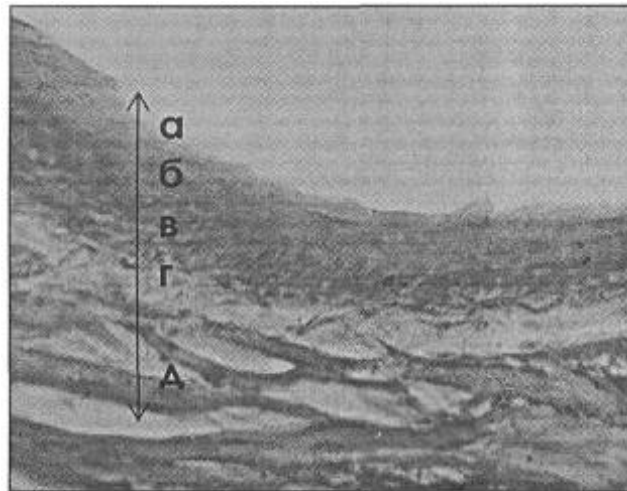


Fig. 1

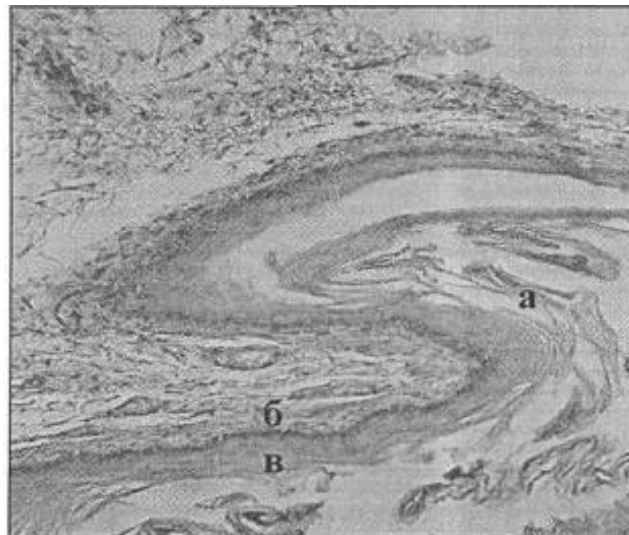


Fig. 2