

Полученные данные расширяют представление о синтезе каротиноидов у хвойных видов и возможностях использования хвои как дополнительного источника витаминов, пищевых добавок и красителей.

#### Литература

1. Бриттон Г. Биохимия природных пигментов. М.: Мир, 1986. 442 с.
2. Гудвин Т. Сравнительная биохимия каротиноидов. М.: Иностранная литература, 1954. 395 с.
3. Душейко А.А. Витамин А. Киев: Наукова Думка, 1988. 512 с.
4. Конь И.Я. Биохимические механизмы действия витамина А. М.: Институт питания АМН СССР, 1987. 216 с.
5. Коростелев С.А. Фармакология и механизм антиканцерогенного действия каротиноидов: автореферат дис. д-ра мед. наук. М., 2002. 37 с.
6. Титова М.С. Пигментный состав хвои у аборигенных и интродуцированных видов *Picea* A. Dietr. // Научное обозрение. 2013. № 9. С. 50–54.
7. Шлык А.А. Определение хлорофиллов и каротиноидов в экс-

трактах зеленых листьев // Биохимические методы в физиологии растений. М.: Наука, 1971. С. 154–170.

8. Johnson E.J. The role of carotenoids in human health // Nutr. Clin. Care. 2002. Vol. 5. P. 56–65.

Поступила в редакцию 07.01.2014.

#### Сравнительный анализ накопления каротиноидов в хвое

М.С. Титова

Горнотаежная станция им. В.Л. Комарова ДВО РАН (692533, Приморский край, с. Горно-Тажное, ул. Солнечная, 26)

**Резюме.** Изучено содержание каротиноидов в хвое 5 аборигенных и 12 интродуцированных на юг Приморья видов из родов ель, сосна, пихта. Установлено, что по суммарному содержанию каротиноидов интродуценты уступают местным видам. Наибольшее их количество содержит хвоя сосны густоцветной. Полученные данные расширяют представление о синтезе каротиноидов у хвойных и возможностях использования хвои как источника витаминов, пищевых добавок и красителей.

**Ключевые слова:** хвойные виды, пигменты, спектрофотометрия, интродуценты.

УДК 615.281:615.243:547.458

## ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИХЕЛИКОБАКТЕРНОГО ДЕЙСТВИЯ НЕКРАХМАЛЬНОГО ПОЛИСАХАРИДА ПЕКТАТА КАЛЬЦИЯ *IN VITRO*

Л.А. Ефимова<sup>1</sup>, С.Г. Крылова<sup>1</sup>, Е.П. Зуева<sup>1</sup>, Е.П. Красноженов<sup>2</sup>, Ю.С. Хотимченко<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup> НИИ фармакологии имени Е.Д. Гольдберга СО РАМН (634028, г. Томск, пр-т Ленина, 3), <sup>2</sup> Сибирский государственный медицинский университет (634050, г. Томск, Московский тракт, 2), <sup>3</sup> Школа биомедицины Дальневосточного федерального университета (690950, г. Владивосток, ул. Суханова, 8), <sup>4</sup> Тихоокеанский государственный медицинский университет (690950, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

**Ключевые слова:** *Helicobacter pylori*, эрадикация, антихеликобактерные средства.

### THE STUDY OF ANTI-*HELICOBACTER PYLORI* EFFECT OF CALCIUM PECTATE NON-AMYLOID POLYSACCHARIDE *IN VITRO*

L.A. Efimova<sup>1</sup>, S.G. Krylova<sup>1</sup>, E.P. Zueva<sup>1</sup>, E.P. Krasnozhenov<sup>2</sup>, Yu.S. Khotimchenko<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup> Research Institute of Pharmacology named after E.D. Goldberg SB RAMS (3 Lenina Ave. Tomsk 634028 Russian Federation), <sup>2</sup> Siberian State Medical University (2 Moscow highway, Tomsk 634050 Russian Federation), <sup>3</sup> School of Biomedicine of the Far Eastern Federal University (8 Sukhanova St. Vladivostok 690950 Russian Federation), <sup>4</sup> Pacific State Medical University (2 Ostryakova Ave. Vladivostok 690950 Russian Federation)

**Background.** *Helicobacter pylori* is the cause of chronic gastritis, one of the most important factors in the pathogenesis of gastric ulcer and duodenal ulcer, MALT- lymphoma and gastric cancer.

**Methods.** The research covers the effect of calcium pectate with the content of anhydrogalacturonic acid of 67.3% and calcium – 38 mg/g of the sample with a degree of etherification of – 1.2%, molecular weight – 39.3 kDa on *H. pylori* culture growth.

**Results.** The paper reveals the decrease of amount of the grown colonies using calcium pectate in concentrations of 2 and 4% in 48 and 72 hours, being more pronounced when using a polysaccharide in a concentration of 2%.

**Conclusions.** The data suggest the practical application of calcium pectate as anti-*Helicobacter pylori* effect in combined therapy of acid-related diseases associated with *H. pylori*.

**Key words:** *Helicobacter pylori*, eradication, anti-*Helicobacter* drugs.

Pacific Medical Journal, 2014, No. 2, p. 50–52.

Крылова Светлана Геннадьевна – д-р биол. наук, в.н.с. лаборатории онкофармакологии НИИ фармакологии имени Е.Д. Гольдберга СО РАМН; e-mail: krylova5935@gmail.com

В настоящее время установлено, что бактерия *Helicobacter pylori* является причиной развития хронического гастрита, одним из важнейших факторов патогенеза язвенной болезни двенадцатиперстной кишки и желудка, лимфомы желудка низкой степени злокачественности, а также рака желудка [7, 10]. В нашей стране инфицированность взрослого населения *H. pylori* составляет 80%, вследствие чего риск развития язвенной болезни составляет 10–20%, а онкологических заболеваний желудка (аденокарциномы и MALT-лимфомы) – 1–2% [9, 10]. Лечение ряда заболеваний гастродуоденальной зоны включает в себя в качестве обязательного компонента эрадикационную терапию при обнаружении в слизистой оболочке желудка *H. pylori*. Однако существующие схемы стандартного антихеликобактерного лечения язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки сопровождаются различными побочными эффектами, в том числе, дисбиозами, атрофическими явлениями в слизистой оболочке. Несомненной проблемой является генетическая и приобретенная устойчивость *H. pylori* к целому ряду антибактериальных препаратов [9, 10, 12]. Наличие у больного устойчивого штамма делает данную терапию абсолютно бесперспективной, и даже 100% эрадикация *H. pylori* еще не гарантирует от рецидива язвенной болезни [9, 10]. Оптимальная терапия «второй линии» здесь не разработана. Современная фармакотерапия язвенной болезни не учитывает разнообразные

сочетания факторов патогенеза заболевания у конкретного больного, недостаточно эффективна, небезопасна, не имеет в своем арсенале патогенетически обоснованных универсальных средств, обладающих цитопротекторным действием. Все вышесказанное обуславливает целесообразность поиска и разработки эффективных лекарственных препаратов, повышающих резистентность гастродуоденальной слизистой, обладающих антихеликобактерным действием и минимальным количеством побочных эффектов.

Перспективным объектом для такого рода исследования представляется низкоэтерифицированный некрахмальный полисахарид с идентифицированной физико-химической структурой – пектат кальция. Показано, что он повышает резистентность слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки животных к различным агрессивным факторам язвенной болезни при лечебно-профилактическом внутрижелудочном применении [3, 4]. Выявлено, что в реализации антиязвенного эффекта пектата кальция существенную роль играют его антацидное и цитопротекторное (увеличение количества желудочной и кишечной слизи, синтез фукозы) действие, репаративный эффект (повышение концентрации нуклеиновых кислот слизи, стимуляция синтеза гликозаминогликанов) [5, 6, 11]. Полисахарид обладает выраженным противовоспалительным (антиэкссудативным, антипролиферативным, репаративным) и обезболивающим эффектами [1].

Приоритетность проводимых исследований подтверждается наличием патентов: «Средство, обладающее пребиотической активностью» (патент РФ на изобретение № 2366429), «Способ профилактики язвенных поражений желудка, вызванных приемом нестероидных противовоспалительных средств» (патент РФ на изобретение № 2330671).

Целью настоящего исследования явилось экспериментальное подтверждение антихеликобактерного действия пектата кальция в системе *in vitro*.

**Материал и методы.** Исследовался пектат кальция с содержанием ангидрогалактуроновой кислоты 67,3% и кальция – 38 мг/г образца, со степенью этерификации – 1,2% и молекулярной массой – 39,3 кДа, полученный из коммерческого цитрусового высокоэтерифицированного пектина (Copenhagen Pectin A/S, Lille Scensved, Дания) путем его щелочной деэтерификации с последующим проведением реакции ионного обмена в неводной среде. Экспериментальная партия полисахарида была представлена лабораторией фармакологии Института биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН.

В качестве тест-объекта использован музейный штамм *H. pylori*, полученный из коллекции культур кафедры микробиологии СибГМУ, обладающий всеми типичными свойствами для данного вида микроорганизмов. Штамм бактерий восстановлен из высушенной методом лиофильной сушки культуры путем разведения и трехкратного пересева с последующей окраской по Граму и идентификацией под микроскопом [8].

Культура выращивалась на стандартизованных питательных средах: полужидком мясо-пептонно-печеночном агаре и шоколадном агаре, приготовленном на основе Колумбийского агара (HiMedia Laboratories. Pvt. Ltd. Mumbai, India).

Для посева использовались суточные культуры микроорганизмов в разведении 500 микробных тел (по стандарту мутности), которые контролировали микроскопически. К взвеси микроорганизмов был добавлен стерильный физиологический раствор (контрольные пробирки) или растворы пектата кальция (на физ. растворе) в концентрациях 2 и 4%. Для достоверности результатов пробирки дублировались. Через 24 часа проводили посев культур из пробирок на чашки Петри в количестве 0,05 мл, стеклянным стерильным шпателем, равномерно распределяя по поверхности питательной среды. Посевы помещали в анаэрозитат (BBI GasPak Anaerobic Systems, Becton Dickinson, USA), для создания микроаэрофильных условий были использованы газогенераторные пакеты (BBI CampyPak Plus, Becton Dickinson, USA). Анаэрозитат был помещен в термостат с температурой 37°C на 48–72 часа. По истечении суток подсчитывали количество выросших колоний на чашке, которые представляли собой мелкие, круглые, гладкие, прозрачные, росинчатые бляшки диаметром 1–3 мм, имевшие характерное золотисто-желтое окрашивание. Для повышения достоверности результатов чашки Петри дублировались. Чистоту культур контролировали под микроскопом. В качестве дополнительных методов идентификации культуры были использованы хеликобактер-тест (пр-ва НИИ ЭКФ, Санкт-Петербург) и каталазный тест [8].

**Результаты исследования.** Выявлено снижение количества выросших колоний *H. pylori* в чашке Петри при использовании пектата кальция в концентрациях 2 и 4% через 48 часов. Продемонстрирована существенная ингибция численности колоний – в 11 и 2,2 раза, соответственно, относительно контрольных значений. Следует отметить подавление роста микроорганизмов в отдельных чашках Петри с добавлением полисахарида. Максимальный антихеликобактерный эффект в данный временной период отмечался при использовании пектата кальция 2% концентрации. Определения антибактериального действия пектата кальция в концентрациях через 72 часа экспозиции с культурой *H. pylori* позволило выявить аналогичные изменения (табл.). В этот срок отмечалось существенное снижение

**Таблица**  
Влияние пектата кальция на рост и колонизацию *H. pylori*

| Группа             | Кол-во колоний в чашке Петри, абс. |    |               |    |
|--------------------|------------------------------------|----|---------------|----|
|                    | через 48 часов                     |    | через 72 часа |    |
| Контроль           | 60                                 | 50 | 70            | 50 |
| Пектат кальция, 2% | 10                                 | 0  | 10            | 0  |
| Пектат кальция, 4% | 20                                 | 30 | 20            | 30 |

Примечание. Подсчитывалось общее количество колоний в двух образцах в соответствующие сроки наблюдения.

числа колоний культуры *H. pylori* в 12 (2%) и 2,4 (4%) раза по сравнению с таковыми значениями чистой культуры в чашках Петри.

Таким образом, в результате экспериментов в системе *in vitro* выявлено подавление роста культуры *H. pylori* через 48 и 72 часа экспозиции, более выраженное при использовании пектата кальция в концентрации 2%.

**Обсуждение полученных данных.** Ранее в наших исследованиях было показано, что *in vitro* пектат кальция обладает пребиотическим действием в отношении бифидо-, лактобактерий, непатогенной *Escherichia coli*, при этом оказывая выраженный бактериостатический эффект в отношении патогенной микрофлоры (культура *Candida albicans*) [2]. Логичным этапом продолжения этих экспериментов явилось изучение влияния пектата кальция на рост и колонизацию культуры *H. pylori in vitro*.

При обсуждении возможного механизма антибактериального и, соответственно, антихеликобактерного действия пектата кальция следует предположить, что полисахарид в силу своего гелеобразующего свойства способен обволакивать бактерии, тем самым препятствуя их адгезии к субстрату и нарушая процессы микробной колонизации. Кроме того, введение полисахарида может способствовать закислению питательной среды за счет образования в ходе расщепления жирных кислот. Это приводит к повреждению органелл и белков бактериальной клетки, нарушая процессы деления. Не исключено, что в результате реакции омыления этерифицированных карбоксильных групп пектинового вещества образуются кальциевые соли и микроколичества метилового спирта, повреждающие микроорганизмы. Если в случае применения пребиотиков полисахарид создает благоприятные условия (подходящий субстрат и слабкокислая среда) для собственно пробиотиков, улучшая выживаемость, размножение и адгезию облигатных бактерий, то в отношении патогенных микроорганизмов проявляет антибактериальное действие.

Таким образом, в эксперименте *in vitro* выявлен выраженный антихеликобактерный эффект низкоэтерифицированного некрахмального полисахарида пектата кальция со степенью этерификации 1,2%, молекулярной массой 39,3 кДа. Показано подавление роста культуры *H. pylori* через 48 и 72 часа экспозиции, более выраженное при использовании пектата кальция в концентрации 2%.

Резюмируя сказанное, можно сделать вывод, что полученные данные позволяют предполагать практическое применение пектата кальция в качестве антихеликобактерного средства в комплексной терапии кислото-зависимых заболеваний, ассоциированных с *H. pylori*.

#### Литература.

1. Ефимова Л.А., Крылова С.Г., Зуева Е.П. [и др.] Экспериментальное исследование противовоспалительного и анальгезирующего действия некрахмального полисахарида пектата кальция // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2010. Т.73, № 4. С. 23–26.

2. Ефимова Л.А., Крылова С.Г., Красноженов Е.П. [и др.] Изучение влияния некрахмального полисахарида пектата кальция на рост и колонизацию нормальной и патогенной микрофлоры *in vitro* // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2011. Т. 151, № 6. С. 630–633.
3. Крылова С.Г., Ефимова Л.А., Зуева Е.П. и др. Гастропротекторное действие некрахмального полисахарида пектата кальция в эксперименте // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2008. Т. 145, № 6. С. 678–681.
4. Крылова С.Г., Ефимова Л.А., Зуева Е.П. [и др.] Противоязвенное действие некрахмальных полисахаридов // Вестник РАМН. 2009. № 11. С. 35–39.
5. Крылова С.Г., Ефимова Л.А., Хотимченко М.Ю. [и др.] Влияние пектата кальция и маалокса на секреторную и защитную функцию желудка крыс с лигированным привратником по методу Н. Shay // Тихоокеанский медицинский журнал. 2009. № 4. С. 65–67.
6. Крылова С.Г., Фомина Т.И., Ефимова Л.А. [и др.] Противоязвенное действие пектата кальция на модели хронического язвенного процесса слизистой желудка у крыс // Эксперимент. и клин. фармакология. 2009. Т. 72, № 2. С. 35–38.
7. Маев И. В., Самсонов А. А., Андреев Д. Н., Кочетов С. А. Эволюция представлений о диагностике и лечении инфекции *Helicobacter pylori*: по материалам консенсуса Маастрихт IV, Флоренция, 2010 // Вестник практического врача. 2012. Спецвыпуск № 1.
8. Сарсенбаева А.С., Игнатова Г.Л., Воротникова С.В. Методы диагностики инфекции *Helicobacter pylori*: учебное пособие. Челябинск, 2005. 50 с.
9. Современные аспекты фармакотерапии гастроэнтерологических заболеваний: сборник избранных научно-медицинских статей журнала «Фарматека» / под ред. И. В. Маева. М.: Бионика, 2012. 264 с.
10. Циммерман Я.С. Гастроэнтерология: руководство. М.: ГЕОТАР-Медия, 2012. 800 с.
11. Khotimchenko M., Zueva E., Krylova S. [et al.] Gastroprotective activity of pectins against acute indomethacine-induced gastric mucosal injury in rats // Acta Pharmacologica Sinica. Proceedings of the XV World Congress of Pharmacology. China, 2006. P. 242.
12. Tulassay Z., Stolte M., Engstrand L. [et al.] Twelve-month endoscopic and histological analysis following proton-pump inhibitor-based triple therapy in *Helicobacter pylori* positive patients with gastric ulcers // Scand. J. Gastroenterol. 2010. Vol. 45. P. 1048–1058.

Поступила в редакцию 27.01.2014.

#### Исследование антихеликобактерного действия некрахмального полисахарида пектата кальция *in vitro*

Л.А. Ефимова<sup>1</sup>, С.Г. Крылова<sup>1</sup>, Е.П. Зуева<sup>1</sup>, Е.П. Красноженов<sup>2</sup>, Ю.С. Хотимченко<sup>3</sup>

<sup>1</sup> НИИ фармакологии имени Е.Д. Гольдберга СО РАМН (634028, г. Томск, пр-т Ленина, 3), <sup>2</sup> Сибирский государственный медицинский университет (634050, г. Томск, Московский тракт, 2), <sup>3</sup> Школа биомедицины Дальневосточного федерального университета (690950, г. Владивосток, ул. Суханова, 8), Тихоокеанский государственный медицинский университет (690950, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

**Резюме.** В эксперименте *in vitro* выявлен выраженный антихеликобактерный эффект низкоэтерифицированного некрахмального полисахарида пектата кальция (степень этерификации 1,2%, молекулярная масса – 39,3 кДа). Показано подавление роста и колонизации культуры *Helicobacter pylori* через 48 и 72 часа экспозиции, более выраженное при использовании пектата кальция в концентрации 2%.

**Ключевые слова:** *Helicobacter pylori*, эрадикация, антихеликобактерные средства.