

V. Strugala, J. Avis, I.G. Jolliffe, L.M. Johnstone, P.W. Dettmar

(перевод с английского — О.А. Федорова, редакция журнала «Український медичний часопис»)

Воздействие альгинатсодержащей суспензии на пепсин и желчные кислоты — ключевые факторы агрессии желудочного рефлюксата

Цель. При рефлюксе пищевод подвергается воздействию гетерогенной смеси компонентов желудочного сока. Роль некислотных компонентов рефлюксата в развитии повреждений слизистой оболочки пищевода в настоящее время хорошо изучена, вместе с тем в клинической практике терапевтические подходы к решению данной проблемы не отработаны. **Объект и методы исследования.** Роль препарата Гавискон Адванс, альгинатно-рафтовой суспензии, в обеспечении защиты слизистой оболочки пищевода от повреждающего действия пепсина и желчных кислот (факторов агрессии) исследовали в серии моделей *in vitro*. **Результаты и их обсуждение.** В исследованиях выявлена способность препарата Гавискон Адванс дозозависимо подавлять активность пепсина в дополнение к его нейтрализующим эффектам. Данные свойства установлены как в отношении белковых, так и коллагеновых субстратов в двух отдельных колориметрических пробах. Выявлена способность препарата тормозить диффузию пепсина и весь спектр желчных кислот, подтвержденная в эксперименте с использованием диффузионной камеры Франца. Рафтовый механизм действия обеспечивал адсорбцию пепсина и желчных кислот из содержимого стимулированного рефлюксата. Рафтовая основа препарата Гавискон Адванс обеспечивала также адсорбцию факторов агрессии при повторных рефлюксных событиях. **Выводы.** Подтверждена способность препарата Гавискон Адванс избирательно адсорбировать пепсин и желчные кислоты из рефлюксата, ограничивать их диффузию и воздействовать на ферментативную активность пепсина. Указанные эффекты снижают повреждающий потенциал рефлюксата и обеспечивают защиту слизистой оболочки пищевода.

Ключевые слова: альгинатсодержащая суспензия, рафт, компоненты желудочного сока, гастроэзофагеальный рефлюкс, повреждение слизистой оболочки, рефлюксат, адсорбция факторов агрессии, подавление активности пепсина, желчные кислоты.

Введение

Рафтовый (по принципу плавающего плота) принцип действия, используемый в препаратах Гавискон и Гавискон Адванс* («Реккитт Бенклизер», Великобритания), обеспечивает быстрое купирование симптомов заболевания (Dettmar P.W. et al., 2006). Его успешно применяют в лечении гастроэзофагеальной рефлюксной болезни (ГЭРБ) в течение последних десятилетий (Chatfield S., 1999; Dettmar P.W. et al., 2007). Принцип действия препарата заключается в образовании плавучего, насыщенного углекислым газом альгинатно-геля (рафта — плота) при контакте препарата с содержимым желудка (Naranson F.C. et al., 2005). Рафт физически предупреждает заброс содержимого желудка в пищевод, в связи с чем альгинаты часто называют супрессантами рефлюкса.

Рефлюксат, поступающий в пищевод, состоит из желудочного сока (Gotley D.C. et al., 1991), а также содержимого двенадцатиперстной кишки, забрасываемого

в желудок (Gotley D.C. et al., 1991; Koek G.H. et al., 2005). Эта гетерогенная смесь включает такие компоненты желудочного сока, как соляная кислота, пепсины, слизь, бикарбонаты, внутренний фактор Кастла, простагландины, гормоны, остатки жидкой и твердой пищи. Содержимое заброса двенадцатиперстной кишки состоит из желчных кислот и ферментов поджелудочной железы (трипсина, химотрипсина и панкреатина).

Пепсин — основной фермент желудочного сока, его концентрация в желудке может достигать 1 мг/мл (Ten Kate R.W. et al., 1988). Существует несколько изоформ пепсина: 1, 3а, 3б, 3с и 5. Пепсин часто определяют в пищеводных аспиратах (Gotley D.C. et al., 1991), он (в противоположность распространенному мнению) в значительно большей степени, чем кислота, является основным повреждающим компонентом желудочного рефлюксата. В моделях *ex vivo* установлено, что изолированное воздействие кислоты (рН>1,3) не является фактором, способствующим развитию экспериментального повреждения слизистой оболочки пищевода. Вместе с тем добавление к раствору кислоты пепсина провоцировало развитие существенного повреждения, эквивалентного эзофагиту (Goldberg H.I. et al., 1969; Johnson L.F., Harmon J.W., 1986; Salmo J.A. et al., 1990; Tobey N.A. et al., 2001). В настоящее

время отсутствует терапия при ГЭРБ, воздействующая на повреждающий потенциал пепсина. Поскольку активность пепсина сохраняется при значениях рН 5,5 и не подвергается необратимой инактивации при значениях рН 8,0, одной лишь кислотной супрессии недостаточно для противодействия протеолитическому повреждению пищевода (Johnston N. et al., 2007).

Заброс желчных кислот в пищевод является достаточно распространенным явлением (Gotley D.C. et al., 1991; Koek G.H. et al., 2005). По всей видимости, степень рефлюкса желчи повышается у больных ГЭРБ, а также по мере прогрессирования заболевания (Kauer W.K. et al., 1997; Nehra D. et al., 1999).

Полагают, что заброс желчных кислот — основной этиологический фактор, ассоциирующийся с развитием осложненной ГЭРБ, в частности пищевода Барретта и эзофагеальной аденокарциномы. Проведен ряд исследований с целью изучения повреждающего потенциала желчных кислот при различных уровнях рН. Предполагаемый механизм повреждения включает нарушение мембранной проницаемости (Johnson L.F., Harmon J.W., 1986), изменение клеточной пролиферации и дифференциации (Ropap S. et al., 2007; Zhang T. et al., 2007), запуск процесса образования свободных радикалов (Boni L. et al., 2006; Dvorak K. et al., 2007), индукцию

*В Украине зарегистрирован в следующих формах: Гавискон® мятная суспензия, Гавискон® мятные таблетки, Гавискон® Двойного действия (таблетки жевательные), Гавискон® Двойного действия (суспензия оральная) и Гавискон® Форте мятная суспензия. Препарат Гавискон Адванс в форме суспензии, рассмотренный в оригинальной статье, по составу действующих веществ аналогичен препарату Гавискон® Форте мятная суспензия — Прим. ред.

ДНК-повреждений (Dvorak K. et al., 2007; Jenkins G.J. et al., 2008) и активацию экспрессии онкогенов (Tselepis C. et al., 2003; Jenkins G.J. et al., 2008).

Появление парадигмы «слабокислого рефлюкса» в этиопатогенезе ГЭРБ пролило свет на клиническую значимость не-кислотных компонентов рефлюксата. Использование технологий с применением 24-часового многоканального внутрипросветного импеданса в комбинации с рН-метрией продемонстрировало, что терапия с применением ингибиторов протонной помпы не препятствует развитию рефлюкса, воздействуя лишь на уровень рН (Vela M.F. et al., 2001; Hemmink G.J. et al., 2008). Оптимальным лечением при ГЭРБ является предупреждение рефлюкса как такового, обеспечивающее защиту пищевода от множества повреждающих компонентов рефлюксата.

В данной работе с использованием серии методов *in vitro* исследована роль препарата Гавискон Адванс в протекции пищевода от воздействия гастроэзофагеального рефлюкса и в частности от факторов агрессии — желчных кислот и пепсина.

Объект и методы исследования

Суспензия Гавискон Адванс содержит 500 мг натрия альгината и 100 мг калия бикарбоната в 5 мл дозы (100 мг/мл альгината).

Ингредиенты получены от фирмы производителя «Sigma Aldrich» (Пул, Великобритания) или «Fisher Thermo Scientific» (Лафборо, Великобритания). Свиной пепсин получен от «Sigma Aldrich», человеческий желудочный сок — в качестве аспирата у пациентов при проведении гастроскопии с активностью пепсина, эквивалентной 1 мг/мл свиного пепсина. Сукцинил альбумин получен в ходе сукцинирования альбумина бычьей сыворотки (фракция V) с сукциновым ангидридом при уровне рН 7,5. Азо-меченый коллаген I типа, азоколл (>100 меш), получен от фирмы-производителя «Calbiochem» (Сан-Диего, США), желчные кислоты — от «Sigma Aldrich», в составе которых желевая кислота, гидрат таурохолевой кислоты натриевой соли, гликохолевая кислота и дезоксихолевая кислота.

Определение активности пепсина

Активность пепсина определяли под воздействием препарата Гавискон Адванс с использованием двух колориметрических проб.

N-терминальная проба

N-терминальная проба — количественная колориметрическая проба протеолитической активности, является чувствительным, достоверным методом выявления единичных разрывов пептидных связей (Hutton D.A. et al., 1986). Гидролиз пептидных связей и соответствующее образование новых N-терминальных групп определяются в ходе реакции тринитрофенилирования аминогрупп. Применение данного метода для подтверждения подавления

пепсина путем воздействия альгината ранее подробно описано в работе V. Strugala и соавторов (2005).

Тесты и приготовление реагентов проводили в соответствии с утвержденными методиками.

Проба с азоколлом

Спиртовая проба пищеварения является количественной колориметрической пробой активности пепсина (Will P.C. et al., 1984). Азоколл — коммерчески доступный азо-меченый денатурированный коллаген (тип I, кожный). Азоколл нерастворим в воде, однако под воздействием протеазы в процессе пищеварения азо-краситель трансформируется в растворимую форму пропорционально степени протеолиза. Степень высвобождения измеряют спектрофотометрическим методом.

Тесты и приготовление реагентов проводили в соответствии с утвержденными методиками.

Позитивный и негативный контроль

Пепстатин А, специфический ингибитор пепсина, использовали в качестве позитивного контроля в обеих пробах. В качестве негативного контроля применяли деионизированную воду.

Расчеты

После проведения повторных тестов рассчитано среднее значение абсорбции (A). Данные нормализованы из расчета, что абсорбция 0 мг/мл пепсина соответствует значению 0,000. В процентном выражении подавление активности пепсина рассчитывали при 6,25; 12,5; 25 и 50 мг/мл по формуле:

$$\frac{A_{\text{пепсин стандартной кривой}} - A_{\text{теста}}}{A_{\text{пепсин стандартной кривой}}} \cdot 100$$

Каждое разведение препарата Гавискон Адванс повторяли по меньшей мере в 5 отдельных случаях, оценивали среднее значение подавления активности пепсина в процентном выражении.

Определение диффузии

Метод с использованием горизонтальной диффузионной камеры (Франца) является стандартизированной методикой оценки диффузии и доставки лекарственных препаратов. Секции камеры Франца соответствуют следующим *in vivo* компонентам модели гастроэзофагеального рефлюкса:

- 1 — камера-донор: просвет пищевода, содержащий рефлюксат;
- 2 — мембрана: мембрана плоскоклеточного эпителия пищевода;
- 3 — камера-приемник: цитоплазма клеток пищевода.

Диффузия пепсина

Камеру-приемник заполняли 0,01 моль раствора соляной кислоты, 500 мкл свиного пепсина в концентрации 3 мг/мл в 0,01 моль соляной кислоты вводили в камеру-донор. Появление пепсина в камере-приемнике определяли с помощью абсорбции при длине волны 280 нм (A 280) в течение 30 мин. Влияние препарата Гавискон Адванс на диффузию пепсина оценивали путем воздействия препарата (0,05; 0,1 или 0,2 мл, или 0,1 мл в разведе-

нии 1:5 или 1:10) на мембрану до воздействия пепсиновых доз.

Диффузия желчных кислот

Камеру-рецептор заполняли раствором соляной кислоты со значением рН, выявленным при тестировании желчных кислот, в камеру-донор вводили 500 мкл раствора 0,5 ммоль желчных кислот. Появление желчных кислот в камере-рецепторе определяли каждые 5 мин в течение 30 мин. Влияние препарата Гавискон Адванс на диффузию желчных кислот оценивали путем воздействия 0,1 мл препарата на мембрану до воздействия доз желчных кислот. Желчные кислоты определяли с помощью набора колориметрических проб («Dyazime», Сан-Диего, США), в котором фермент 3 α -гидроксистероид дегидрогеназа способствует превращению желчных кислот в 3-кетостероиды и НАДН. НАДН вступает в реакцию с нитро-синим тетразолом (nitro-blue tetrazolium — NTB) и диафоразой с образованием формазана, определяемого при 540 нм. Степень образования пропорциональна концентрации желчных кислот и сохраняет линейную зависимость в диапазоне значений желчных кислот 0–0,2 ммоль. Калибрационную кривую определяли с использованием специфических тестируемых желчных кислот и рН с целью калькуляции диффундировавших миллимолярных желчных кислот. Данная методика исключала фактор воздействия препарата Гавискон Адванс при определении желчных кислот.

В качестве позитивного контроля вместо препарата Гавискон Адванс применяли 0,1 мл суспензии холестирамин резин в концентрации 20 мг/мл — стандартного биндера желчных кислот.

Расчеты

Условия проведения тестов воспроизводили по меньшей мере в 4 отдельных случаях с последующим расчетом среднего показателя диффузии в процентном выражении. Площадь под кривой (area under the curve — AUC) рассчитывали в качестве количественного показателя диффузии в рамках 30-минутного временного промежутка.

Моделирование рефлюксного события *in vitro*

In vitro модель образования рафта при применении препарата Гавискон Адванс хорошо отработана (Hampson F.C. et al., 2005). Модель заключается в помещении 10 мл препарата (максимальная доза) в стеклянную колбу объемом 250 мл, содержащую 150 мл 0,1 моль раствора соляной кислоты, предварительно нагретой до 37 °С. Препарат вступает в реакцию с кислотой с образованием геля альгиновой кислоты и высвобождением углекислого газа, проникающего в его матрикс, способствуя формированию плавучести геля. После 30-минутного процесса формирования рафт может быть взят для дальнейшего тестирования.

Разработана модель с целью оценки способности рафта препарата адсорбировать из рефлюксата факторы агрессии

in vitro. Рафт помещали поверх диска из фильтровальной бумаги в фарфоровой воронке Бюхнера, вставленной в колбу, в которой формировали вакуум с помощью диафрагмального вакуумного насоса. На рафт воздействовали стимулированным желудочным рефлюксатом, содержащим либо пепсин в концентрации 1 мг/мл, либо 1 ммоль желчной кислоты в растворе соляной кислоты. Жидкость, образовавшаяся в результате воздействия, собирали в колбу, отфильтровывали через шприц (0,2 мкг) и оценивали на предмет содержания пепсина или желчных кислот с помощью ультрафиолетовой спектрометрии (A 280 нм — для пепсина и A 203 нм — для желчных кислот). Исходные данные получены при изолированном воздействии раствора соляной кислоты.

Расчеты

При помощи калибровочной кривой определяли количество пепсина или желчных кислот в стимулированном желудочном рефлюксате, а также количество веществ, удаленных при помощи рафта, выраженное в процентном показателе удаленных факторов агрессии.

Вискозиметрия

Вязкость раствора измеряли с помощью стресс-реометра с регулируемым напряжением сдвига 0,1–10 Па при температуре 25 °С.

Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили с использованием дисперсионного анализа с последующим применением t-критерия Стьюдента в случае необходимости. Данные рассматривали как статистически достоверные при $p < 0,05$.

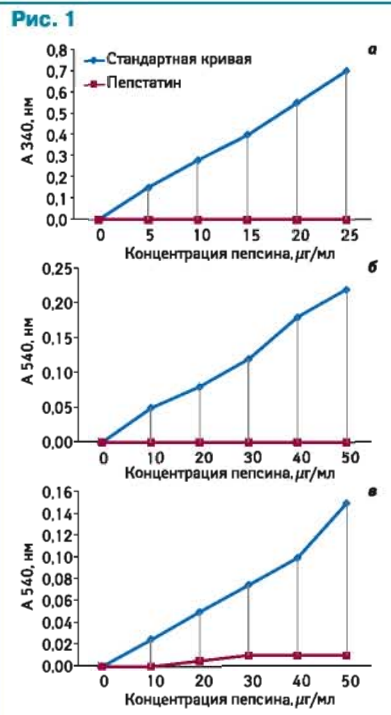
Результаты

Подавление пепсина

Активность пепсина определяли с помощью N-терминальной пробы и азоколл-пробы. Активность свиного пепсина и человеческого желудочного сока в системах указанных двух проб и ферментингибирующие свойства пепстатина А представлены на рис. 1.

Гавискон Адванс в водном разведении 1:5–1:100 тестировали относительно способности подавлять активность пепсина. Препарат проявлял способность к подавлению активности пепсина в дополнение к рН-нейтрализующему эффекту. Данные двух методик определения активности пепсина — N-терминальной пробы с использованием растворимого белкового субстрата и азоколл-пробы с использованием нерастворимого коллагенового субстрата — представлены на рис. 2.

Полное подавление активности пепсина по лизису коллагена констатировали при разведении, превышающем уровень, эквивалентный альгинату 15 мг/мл. При дальнейшем разведении отмечали линейное снижение ингибирующих свойств до полного исчезновения эффекта при уровне 3,3 мг/мл альгината.

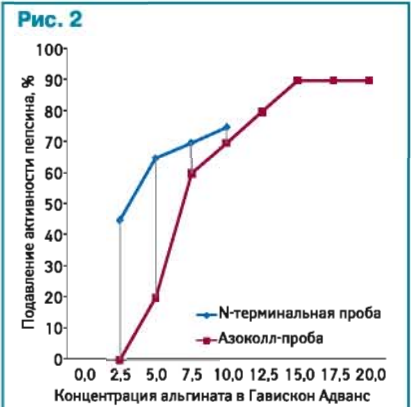


Ферментативная активность пепсина: а — N-терминальная проба со свиным пепсином в концентрации 0–25 мкг/мл (0–71 ЕД); б — азоколл-проба со свиным пепсином в концентрации 0–50 мкг/мл (0–142 ЕД); в — азоколл-проба с человеческим желудочным соком, эквивалентным свиному пепсину в концентрации 0–50 мкг/мл (0–142 ЕД). Представлено подавление ферментативной активности под воздействием пепстатина А в концентрации 2,5 мкг/мл (данные усредненные)

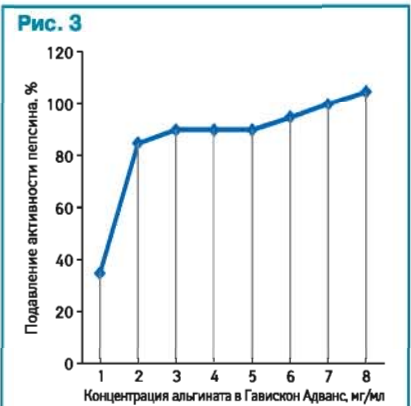
При использовании белкового субстрата максимальная степень подавления составила 78% (при 10 мг/мл), поскольку оценить более концентрированный продукт было невозможно. Отмечали сходное снижение ингибирующей активности по мере разведения, однако некоторое подавление пепсина (28%) регистрировали даже при концентрации 1 мг/мл. Это свидетельствует о незначительных преимуществах субстратной защиты препарата Гавискон Адванс для низкомолекулярных белков в сравнении с частицами коллагеновых белков больших размеров. Альтернативной версией различий в результатах двух методик может быть следствие различий значений рН субстрата (2,2 и 2,0).

В ходе всех экспериментов применяли позитивный контроль. Пепстатин, часто используемый ингибитор пепсина, включен в постоянную концентрацию 2,5 мкг/мл (1,7 ммоль), что, по меньшей мере, вдвое превышало количество пепсина в молярном выражении. Среднее значение показателя подавления активности пепсина при воздействии пепстатина составило 97,4 (6,2)% в N-терминальной пробе (n=126) и 94,8 (4,2)% — в азоколл-пробе (n=26).

Гавискон Адванс в разведениях 1:5–1:20 подавлял активность пепсина в чело-



Подавление активности пепсина под воздействием препарата Гавискон Адванс. Представлено в виде функции активной концентрации альгината. Данные усредненные, n=5–10



Подавление активности пепсина человеческого желудочного сока под воздействием препарата Гавискон Адванс. Процентный показатель подавления активности представлен в виде функции активной концентрации альгината. Данные усредненные, n=10

веческом желудочном соке по результатам азоколл-пробы (рис. 3).

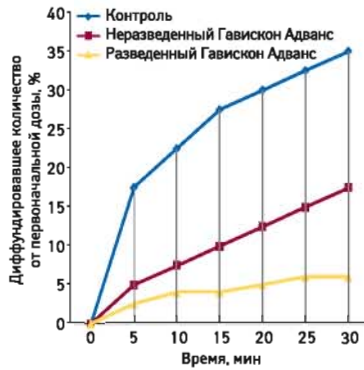
Выявлено дозозависимое снижение эффекта подавления активности пепсина человеческого желудочного сока от максимальной (полной) при концентрации альгината 20 мг/мл до 85% — при концентрации альгината 5 мг/мл. Особо отмечено, что уклон дозозависимой кривой существенно менее выражен для человеческого желудочного сока в сравнении со свиным пепсином. Это может быть обусловлено более сложным составом смеси изоэнзимов пепсина, содержащихся в желудочном соке.

Диффузия пепсина

38% ожидаемого количества пепсиновой дозы выявлено в фазе получения по истечении 30 мин. Количество пепсина, достигающего фазы получения, уменьшалось при воздействии препарата Гавискон Адванс (рис. 4).

В неразбавленной версии препарат проявил способность замедлять диффузию пепсина в среднем на 53 (8,0)% (n=16) после 30-минутного воздействия, независимо

Рис. 4



Появление диффузировавшего пепсина в камере-приемнике в виде функции времени под воздействием препарата Гавискон Адванс. Данные усредненные, $n=8-16$

от применяемой дозы (0,05 мл — 57%; 0,1 мл — 49%; 0,2 мл — 54%). Анализ AUC диффузии после 30-минутного воздействия подтверждает статистическую достоверность эффекта препарата ($p < 0,001$; 759,5 против 320,1). Препарат в разведении (1:5–1:10) также продемонстрировал способность к замедлению диффузии пепсина в сравнении с контролем со средним значением 82 (2,6)% ($n=8$). Анализ AUC диффузии после 30-минутного периода воздействия подтвердил статистическую достоверность результатов в сравнении с контролем ($p < 0,001$; 759,5 против 138,3) и неожиданно в сравнении с неразведенной версией препарата ($p < 0,01$; 320,1 против 138,3). Препарат в разведении 1:12 и выше не проявлял какого-либо существенного воздействия на диффузию пепсина.

Предполагают, что Гавискон Адванс воздействует на диффузию пепсина посредством двух механизмов. Во-первых, препарат обеспечивает образование физического барьера, препятствующего диффузии через искусственную мембрану, и чем выше вязкость этого барьера, тем выше его эффективность. Во-вторых, препарат при умеренном разведении способен воздействовать на вязкость небольшого объема раствора пепсина в камере-доноре и таким образом замедлять доступ пепсина к мембране. В разведении 1:5–1:10 эффективно действуют оба фактора, в то время как при использовании неразведенной версии препарата проявлялись лишь физические барьерные функции. В разведении 1:12 и выше прекращали действовать оба фактора, что может служить объяснением неспособности препарата замедлять диффузию в указанной версии.

Диффузия желчных кислот

Гавискон Адванс проявил существенную способность ($p < 0,05$) замедлять диффузию 4 желчных кислот после 30-минутного тестирования (рис. 5).

Анализ AUC диффузии гидрат таурохолевой кислоты натриевой соли при уровне pH 2 свидетельствует, что препарат существенно снижает ее диффузию ($p < 0,001$; 2074 против 333,3), в том числе и в случае

разведения желчной кислоты в растворе соляной кислоты с pH 5 ($p = 0,002$; 1124 против 742,3). Другие две формы желчных кислот оценивали при pH 5, анализ AUC свидетельствует, что Гавискон Адванс существенно снижает диффузию гидроксихолевой ($p < 0,001$; 496,6 против 120,5) и холевой кислоты ($p < 0,001$; 826,7 против 478,4).

Позитивный контроль с применением холестирамина резина (20 мг/мл) — часто применяемого биндера желчных кислот — подтвердил статистически достоверное снижение ($p < 0,05$) скорости диффузии при всех вариантах тестирования трех видов желчных кислот.

Адсорбция пепсина и желчных кислот из рефлюксата

При исследовании 5 мл стимулированного желудочного рефлюксата, содержащего 1 ммоль желчной кислоты или 1 мг/мл пепсина, Гавискон Адванс продемонстрировал способность удалять практически все факторы агрессии (табл. 1).

Более высокие показатели отмечены для конъюгированных желчных кислот (гидрат таурохолевой кислоты натриевой соли и гидроксихолевой кислоты) и пепсина, для неконоjugированных желчных кислот отмечали более выраженный разброс данных (холевой кислоты и дезоксихолевой кислоты).

Количество факторов агрессии, адсорбированных при помощи рафта, обратно пропорционально объему стимулированного желудочного рефлюксата. При увеличении объема рефлюксата отмечали снижение удельного веса адсорбированного пепсина — при объеме рефлюксата 50 мл адсорбировалось 40% пепсина.

Холестирамина резин (20 мг/мл) применяют в качестве позитивного контроля связывания желчных кислот, экспериментальные данные свидетельствуют о полной адсорбции всех типов желчных кислот из 5 мл стимулированного желудочного рефлюксата.

Без воздействия рафта (при наличии лишь фильтровальной бумаги) в процессе

Таблица 1 Средние процентные показатели факторов агрессии в 5 мл стимулированного желудочного рефлюксата, адсорбированных препаратом Гавискон Адванс

Условия эксперимента	Средний процентный показатель рафтовой адсорбции	Среднее значение, %
ТХК pH 2	100	1
ТХК pH 5	90	5
ДХК pH 6	100	10
ГХК pH 5	92	4
ХК pH 5	76	52
Пепсин pH 2	100	6

ТХК — таурохолевая кислота; ДХК — дезоксихолевая кислота; ГХК — гликохолевая кислота; ХК — холевая кислота.

фильтрации в составе стимулированного желудочного рефлюкса сохранялось 100% исходного количества пепсина. Контрольные опыты свидетельствуют, что наличие рафта не влияет на объем фильтрующегося рефлюксата.

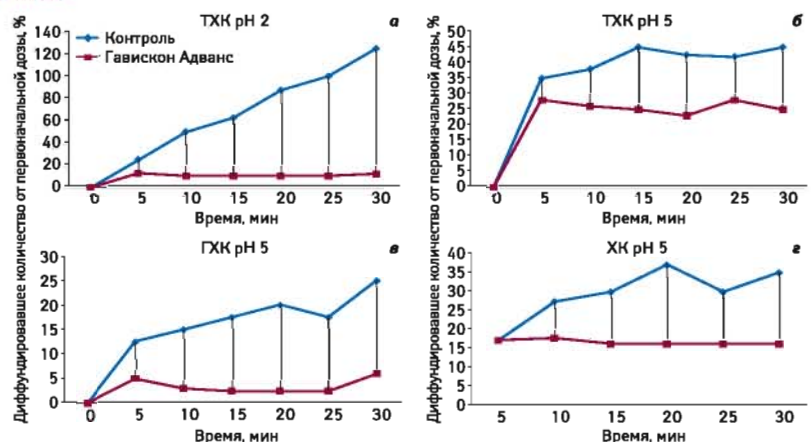
Множественные рефлюксные события

Гавискон Адванс применяют у пациентов с ГЭРБ и множественными рефлюксами в течение эффективного действия рафта (до 4 ч). Исследовали 10 образцов стимулированных желудочных рефлюксатов объемом 5 мл, содержащих либо пепсин, либо желчные кислоты, с определением количества факторов агрессии, адсорбированных рафтом.

Абсолютно все количество пепсина в образце первого рефлюксного события было адсорбировано рафтом, в то же время каждое последующее рефлюксное событие сопровождалось некоторым снижением адсорбирующей способности рафта (табл. 2).

Похожую картину наблюдали в опытах с желчными кислотами, в ходе которых все конъюгированные желчные кислоты (гидрат таурохолевой кислоты натриевой соли и гидроксихолевая кислота) были

Рис. 5



Появление диффузировавших желчных кислот в камере-приемнике в виде функции времени под воздействием препарата Гавискон Адванс. Исследуемые желчные кислоты: (а, б) ТХК — таурохолевая кислота — при pH 2 и pH 5; (в) ГХК — гликохолевая кислота — при pH 5 и (г) ХК — холевая кислота — при pH 5. Данные усредненные, $n=6$

адсорбированы из первого рефлюкса с небольшим снижением степени адсорбции с каждым последующим рефлюксным эпизодом. Приблизительно половина желчных кислот адсорбирована из рефлюксного содержимого десятого эпизода (см. табл. 2).

В то же время холестирамин резин продемонстрировал более продолжительную способность к адсорбции желчных кислот (рис. 6).

Не выявлено различий между профилями какой-либо из желчных кислот или пепсина, что свидетельствует о широком спектре свойств препарата Гавискон Адванс в препятствии проникновения факторов агрессии в порцию рефлюксата, поступающую в пищевод (см. рис. 6).

Обсуждение

Существующие фармакотерапевтические подходы к лечению пациентов с ГЭРБ преимущественно направлены на подавление кислотности желудочного содержимого. Вместе с тем в настоящее время хорошо изучена роль не-солянокислых

компонентов, в частности пепсина и желчных кислот, в развитии повреждений слизистой оболочки пищевода.

Эффект препарата Гавискон Адванс обусловлен местным действием, направленным на подавление рефлюкса в целом, однако в ходе данного исследования изучены более специфические свойства препарата в отношении пепсина и желчных кислот.

Результаты исследования с использованием двух различных колориметрических проб четко продемонстрировали, что препарат способствует подавлению активности пепсина *in vitro*. Указанные две методики различаются по используемым субстратам и обе имеют клиническую релевантность. В N-терминальной пробе утилизируется белковый субстрат — сукцинил альбумин. Альбумин — распространенный компонент клеток и плазмы крови, кроме того белок в целом обеспечивает работу клеточной мембраны (например ионных каналов, рецепторов). В азоколл-пробе утилизируется коллагеновый субстрат, который имеет особое отношение к пищеводной модели. Коллаген — основной компонент базальной мембраны слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта, который подвергается разрушению при ulcerации. Лизис коллагена под воздействием пепсина, таким образом, способствует тяжелым повреждениям слизистой оболочки пищевода.

В ходе работы продемонстрирована способность разведенного раствора препарата Гавискон Адванс обеспечивать полное подавление активности пепсина в азоколл-пробе и приблизительно на 75% — в N-терминальной пробе. Тест с наименьшей степенью разведения (1:5) эквивалентен 10 мл дозы в 50 мл желудочного объема, наибольшая степень разведения (1:100) соответствует 10 мл дозы в 1 л желудочного объема, что ниже реальных терапевтических уровней. В ходе исследования продемонстрирован выраженный дозозависимый эффект, не имеющий отношения к колебаниям pH под воздействием препарата, однако специфично коррелирующий с подавлением активности ферментов и/или с защитой субстрата.

Ранее представлены данные о способности альгината, активного ингредиента препарата Гавискон Адванс, подавлять активность пепсина (Strugala V. et al., 2005), равно как и карбопола (Foster S.N. et al., 1994) — неактивного компонента. Видимо, выраженные пепсинингибирующие свойства препарата Гавискон Адванс могут быть обусловлены двойным эффектом вследствие синергетического взаимодействия.

Любопытно, что способность препарата подавлять активность пепсина продемонстрирована при исследовании человеческого желудочного сока. В действительности способность подавлять активность желудочного сока была значительно более выражена в сравнении с таковой по отношению к свиному пепсину в ходе проведения азоколл-пробы. Человеческий желудочный сок — сложная смесь нескольких типов различных изоферментов пепсина

(пепсин 1, 3а, 3б, 3с и 5), для каждого из которых есть свой субстрат и оптимальный уровень pH, в частности изофермент пепсина 1 расщепляет преимущественно коллаген (Allen A. et al., 1990). С учетом данных особенностей пепсина *in vivo* можно предположить, что Гавискон Адванс имеет более выраженное воздействие на компонент смеси пепсин 1, по сравнению с пепсином 3б.

Даже небольшой слой рафта препарата Гавискон Адванс существенно замедляет диффузию пепсина и желчных кислот. В исследовании с использованием диффузионной камеры Франца отмечено уменьшение содержания пепсина в рефлюксате, достигающего плоскостного эпителия пищевода, приблизительно в половину. Препарат также эффективно снижает степень диффузии желчных кислот, в том числе таурохолевой, гликохолевой и холевой кислот.

Использование механизма действия «плавающего плота» у препарата Гавискон Адванс позволило продемонстрировать возможность адсорбции из рефлюксата пепсина и желчных кислот. И хотя объем рефлюксата в каждом рефлюксном эпизоде неизвестен, предположительно он относительно небольшой — около 5 мл (Rhee P.L. et al., 2002; Sifrim D., 2005). Показано, что в 5 мл рефлюксата с помощью рафта препарата Гавискон Адванс может быть полностью нейтрализовано все количество пепсина и желчных кислот, что предупреждает поступление факторов агрессии в пищевод. Даже после повторных рефлюксных эпизодов один и тот же рафт демонстрировал способность адсорбировать значительное количество факторов агрессии из рефлюксата.

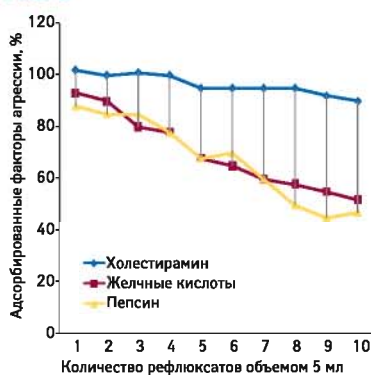
Поскольку степень повреждения пищевода вследствие воздействия пепсина является дозозависимой (Johnson L.F., Harmon J.W., 1986; Tobey N.A. et al., 2001), а также существует вероятность порогового уровня повреждения вследствие воздействия желчных кислот, любое уменьшение количества факторов агрессии, достигающих слизистой оболочки пищевода, будет иметь значительный терапевтический эффект в отношении патогенеза заболевания, клинического течения и самочувствия пациента.

Отметим, что Гавискон Адванс не воздействует на нормальные физиологические процессы. Пепсин и желчные кислоты — жизненно важные компоненты пищеварительного процесса, имеющие ключевое значение для инициальной фазы расщепления пищи, кроме того указанные факторы обладают бактерицидными свойствами. Действие препарата направлено лишь на патологические эффекты пепсина и желчных кислот (и соляной кислоты) в отношении слизистой оболочки пищевода, тем самым принципиально отличаясь от других фармакотерапевтических подходов при лечении пациентов с ГЭРБ, воздействующих сууго на факторы желудочной среды, в частности, с применением ингибиторов протонной помпы и блокаторов H₂-рецепторов.

Таблица 2 Средние процентные показатели желчных кислот и пепсина в стимулированных желудочных рефлюксатах объемом 10 · 5 мл, адсорбированных под воздействием препарата Гавискон Адванс

	ТЖК pH 2	ТЖК pH 5	ГЖК pH 5	Пепсин pH 2
Рефлюкс 1	95(3)	91(1)	93(3)	87(35)
Рефлюкс 2	90(3)	87(1)	89(2)	83(26)
Рефлюкс 3	81(2)	78(2)	80(1)	83(23)
Рефлюкс 4	74(3)	70(2)	74(1)	76(23)
Рефлюкс 5	69(3)	64(3)	69(2)	65(29)
Рефлюкс 6	66(3)	61(3)	66(1)	71(25)
Рефлюкс 7	61(3)	56(3)	63(2)	58(31)
Рефлюкс 8	58(3)	53(3)	61(2)	52(36)
Рефлюкс 9	55(3)	50(3)	58(2)	43(36)
Рефлюкс 10	51(3)	46(3)	56(2)	44(35)

Рис. 6



Снижение содержания желчных кислот и пепсина в стимулированных рефлюксах под воздействием препарата Гавискон Адванс. Представлены данные процентного содержания желчных кислот и пепсина в каждых последующих 5 мл рефлюксата, адсорбированных под воздействием препарата Гавискон Адванс в сравнении с позитивным контролем (холестирамин). Данные усредненные, n=6

Выводы

Представленные в работе экспериментальные данные свидетельствуют о способности препарата Гавискон Адванс целенаправленно адсорбировать из рефлюксата пепсин и желчные кислоты, а также ограничивать диффузию указанных повреждающих агентов. Это позволяет рассматривать Гавискон Адванс в качестве препарата, снижающего агрессивность рефлюксата и эффективно защищающего слизистую оболочку пищевода. Кроме того, препарат обладает выраженным воздействием на ферментативную активность пепсина, демонстрируя, таким образом, наличие дополнительного эффекта в предупреждении повреждения пищевода при ГЭРБ.

Фармакологический эффект альгинат-содержащего антирефлюксного препарата Гавискон Адванс проявляется в подавлении рефлюкса в целом и нейтрализации не только действия соляной кислоты в желудке, но также пепсина и желчных кислот — основных факторов агрессии и повреждения слизистой оболочки пищевода при ГЭРБ.

Список использованной литературы

- Allen A., Hutton D.A., Leonard A.J. et al. (1990) Pepsins. In: Wallace J.L. Endogenous mediators of gastrointestinal diseases. CRC Press: 53–69.
- Boni L., Benevento A., Shimi S.M., Cuschieri A. (2006) Free radical production in the esophago-gastro-duodenal mucosa in response to acid and bile. *Dis. Esophagus*, 19(2): 99–104.
- Chatfield S. (1999) A comparison of the efficacy of the alginate preparation, Gaviscon Advance, with placebo in the treatment of gastro-duodenal reflux disease. *Curr. Med. Res. Opin.*, 15(3): 152–159.
- Detmar P.W., Hampson F.C., Taubel J. et al. (2007) The suppression of gastro-oesophageal reflux by alginates. *Int. J. Clin. Pract.*, 61(10): 1654–1662.
- Detmar P.W., Sykes J., Little S.L., Bryan J. (2006) Rapid onset of effect of sodium alginate on gastro-oesophageal reflux compared with ranitidine and omeprazole, and relationship between symptoms and reflux episodes. *Int. J. Clin. Pract.*, 60(3): 275–283.
- Dvorak K., Payne C.M., Chavarria M. et al. (2007) Bile acids in combination with low pH induce oxidative stress and oxidative DNA damage: relevance

to the pathogenesis of Barrett's oesophagus. *Gut*, 56(6): 763–771.

Fein M., Peters J.H., DeMeester T.R. (2007) Carcinogenesis in reflux disease — in search for bile-specific effects. *Microsurgery*, 27(8): 647–650.

Foster S.N., Pearson J.P., Hutton D.A. et al. (1994) Interaction of polyacrylates with porcine pepsin and the gastric mucus barrier: a mechanism for mucosal protection. *Clin. Sci. (Lond.)*, 87(6): 719–726.

Goldberg H.I., Dodds W.J., Gee S. et al. (1969) Role of acid and pepsin in acute experimental esophagitis. *Gastroenterology*, 56(2): 223–230.

Gotley D.C., Morgan A.P., Ball D. et al. (1991) Composition of gastro-oesophageal refluxate. *Gut*, 32(10): 1093–1099.

Hampson F.C., Farndale A., Strugala V. et al. (2005) Alginate rafts and their characterisation. *Int. J. Pharm.*, 294(1–2): 137–147.

Hemmink G.J., Bredenoord A.J., Weusten B.L. et al. (2008) Esophageal pH-impedance monitoring in patients with therapy-resistant reflux symptoms: 'on' or 'off' proton pump inhibitor? *Am. J. Gastroenterol.*, 103(10): 2446–2453.

Hutton D.A., Allen A., Pearson J.P. et al. (1986) Separation of pepsin in human gastric juice: analysis of proteolytic and mucolytic activity. *Biochem. Soc. Trans.*, 14: 735.

Jenkins G.J., Cronin J., Alhamedani A. et al. (2008) The bile acid deoxycholic acid has a non-linear dose response for DNA damage and possibly NF-kappaB activation in oesophageal cells, with a mechanism of action involving ROS. *Mutagenesis*, 23(5): 399–405.

Johnson L.F., Harmon J.W. (1986) Experimental esophagitis in a rabbit model. Clinical relevance. *J. Clin. Gastroenterol.*, 8 Suppl. 1: 26–44.

Johnston N., Detmar P.W., Bishwokarma B. et al. (2007) Activity/stability of human pepsin: implications for reflux attributed laryngeal disease. *Laryngoscope*, 117(6): 1036–1039.

Kauer W.K., Peters J.H., DeMeester T.R. et al. (1997) Composition and concentration of bile acid reflux into the esophagus of patients with gastroesophageal reflux disease. *Surgery*, 122(5): 874–881.

Koek G.H., Vos R., Sifrim D. et al. (2005) Mechanisms underlying duodeno-gastric reflux in man. *Neurogastroenterol. Motil.*, 17(2): 191–199.

Nehra D., Howell P., Williams C.P. et al. (1999) Toxic bile acids in gastro-oesophageal reflux disease: influence of gastric acidity. *Gut*, 44(5): 598–602.

Rhee P.L., Liu J., Puckett J.L., Mittal R.K. (2002) Measuring esophageal distension by high-frequency intraluminal ultrasound probe. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 283(4): G886–G892.

Roman S., Pétré A., Thépot A. et al. (2007) Downregulation of p63 upon exposure to bile salts and acid in normal and cancer esophageal cells in culture. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 293(1): G45–G53.

Salmo J.A., Lehto V.P., Myllärniemi H.S., Kivilaakso E.O. (1990) Morphological alterations in tryptic esophagitis: an experimental light microscopic and scanning and transmission electron microscopic study in rabbits. *J. Surg. Res.*, 49(1): 14–17.

Sifrim D. (2005) Relevance of volume and proximal extent of reflux in gastro-oesophageal reflux disease. *Gut*, 54(2): 175–178.

Strugala V., Kennington E.J., Campbell R.J. et al. (2005) Inhibition of pepsin activity by alginates in vitro and the effect of epimerization. *Int. J. Pharm.*, 304(1–2): 40–50.

Ten Kate R.W., Tuynman H.A., Festen H.P. et al. (1988) Effect of high dose omeprazole on gastric pepsin secretion and serum pepsinogen levels in man. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 35(2): 173–176.

Tamhankar A.P., Peters J.H., Portale G. et al. (2004) Omeprazole does not reduce gastro-oesophageal reflux: new insights using multichannel intraluminal impedance technology. *Gastrointest. Surg.*, 8(7): 890–897, discussion 897–898.

Tobey N.A., Hosseini S.S., Caymaz-Bor C. et al. (2001) The role of pepsin in acid injury to esophageal epithelium. *Am. J. Gastroenterol.*, 96(11): 3062–3070.

Tselepis C., Morris C.D., Wakelin D. et al. (2003) Upregulation of the oncogene c-myc in Barrett's adenocarcinoma: induction of c-myc by acidified bile acid *in vitro*. *Gut*, 52(2): 174–180.

Vela M.F., Camacho-Lobato L., Srinivasan R. et al. (2001) Simultaneous intraesophageal impedance and pH measurement of acid and nonacid gastroesophageal reflux: effect of omeprazole. *Gastroenterology*, 120(7): 1599–606.

Will P.C., Allbee W.E., Witt C.G. et al. (1984) Quantification of pepsin A activity in canine and rat gastric juice with the chromogenic substrate azocol. *Clin. Chem.*, 130(5): 707–711.

Zhang T., Zhang F., Han Y. et al. (2007) A rat surgical model of esophageal metaplasia and adenocarcinoma-induced by mixed reflux of gastric acid and duodenal contents. *Dig. Dis. Sci.*, 52(11): 3202–3208.

Оригинальная статья

«The role of an alginate suspension on pepsin and bile acids — key aggressors in the gastric refluxate.

Does this have implications for the treatment of gastro-oesophageal reflux disease?», опубликованная в «Journal of Pharmacy and Pharmacology», 61: 1021–1028, предоставлена фармацевтической компанией «Рекхитт Бенкисер».

Реферативна інформація

Ацетилсалициловая кислота повышает фертильность у женщин

Ежедневный прием невысоких доз ацетилсалициловой кислоты (АСК) не снижает риск самопроизвольного прерывания беременности — к такому выводу пришли ученые из Национального института здравоохранения (National Institutes for Health — NIH), США. Многие специалисты назначают пациенткам из группы высокого риска АСК в низких дозах, однако эффективность этого метода не доказана.

В исследовании приняли участие 1000 женщин (возраст — 18–40 лет) с привычным невынашиванием. Они, начиная с момента планирования беременности, ежедневно принимали фолиевую кислоту и АСК (81 мг) или плацебо. По результатам исследования, различий в частоте самопроизвольных абортов между этими группами не выявлено (3 и 12% соответственно). Однако в ходе дополнительного исследования стало очевидно,

что у женщин, принимавших АСК, чаще наступала беременность (78 против 66%) и, как следствие, в их группе было больше случаев рождения живых детей (62 против 53%). Возможно, прием АСК повышал фертильность путем увеличения притока крови к органам малого таза. В таком случае следует провести исследования по изучению влияния препарата на вероятность наступления беременности у пациенток других групп, например, с нарушением имплантации эмбриона. Ученые обращают внимание на то, что назначение АСК беременным может показаться нелогичным, учитывая то, что ранее данный препарат считался опасным из-за повышения риска кровотечений.

Bushak L. (2014) Aspirin doesn't prevent pregnancy loss, but may improve fertility by boosting blood flow. *Medicaldaily*, Apr. 2 (www.medicaldaily.com/aspirin-doesnt-prevent-pregnancy-loss-may-improve-fertility-boosting-blood-flow-274118).

Юлия Котикович