

(19)



(10) **LT 2010 023 A**

(12) **PARAIŠKOS APRAŠYMAS**

(21) Paraiškos numeris: **2010 023**

(51) Int. Cl. (2011.01): **A23L 1/00**

(22) Paraiškos padavimo data: **2010 03 18**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2011 02 25**

(62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —

(85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —

(30) Prioritetas: **P-09-142, 2009 08 12, LV**

(71) Pareiškėjas:

INOVATIVO BIOMEDICINAS TECHNOLOGIJU INSTITŪTS, SIA, Zala 3-14a, LV-1010 Riga, LV

(72) Išradėjas:

**Dmitrijs BABARIKINS, LV
Anna BABARIKINA, LV
Vizma NIKOLAJEVA, LV
Edgars BODNIEKS, LV**

(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:

Gediminas PRANEVIČIUS, Varul Vilgerts Smaliukas, Konstitucijos pr. 7, LT-09308 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Maistinis vaisių-uogų produktas, pasižymintis priešmikrobinu poveikiu prieš *Helicobacter pylori*

(57) Referatas:

Išradimas skirtas funkcionalaus maisto produkto gamybos technologijai, konkrečiai - produktui su priešmikrobinu poveikiu prieš *Helicobacter pylori*. Pasiūlytasis maisto produktas - desertas susideda iš medžiagų kompozicijos, kuri slopina žarnyno patogeninę mikroflorą, saugo virškinimo organų gleivinę nuo agresyvių faktorių poveikio, neišnešant iš fiziologinių procesų reguliavimo rėmų. Minėtąją medžiagų kompoziciją ruošia iš cidonijų sulčių, aronijų sulčių koncentrato (geriausiai - 5x stiprumo) ir spanguolių sulčių, į kurias prideda žaliosios arbatos ekstrakto ir vitamino C, natrio benzoato ir cukraus. Toliau minėtą mišinį šildo, pridedant į jį kukurūzų krakmolo obuolių išspaudų vandens ekstrakto ir ajero šaknies vandens ekstrakto, produktą maišo iki želės pavidalo konsistencijos ir atšaldo. Taip gauna funkcionalų maistinį produktą (desertą), pasižymintį priešmikrobinu poveikiu prieš *Helicobacter pylori*. Pagal kitą išradimo realizavimo variantą vaisių ir uogų sulčių mišinio ruošimo etape į pašildytą aronijų sulčių koncentratą prideda kukurūzų krakmolo suspensijos obuolių išspaudų vandens ekstrakto ir, susiformavus želei, į mišinį prideda cidonijų sulčių, spanguolių sulčių, žaliosios arbatos ekstrakto, ajero šaknies vandens ekstrakto, vitamino C, natrio benzoato ir cukraus.

MAISTINIS VAISIŲ-UOGŲ PRODUKTAS, PASIŽYMINTIS PRIEŠMIKROBINIU POVEIKIU PRIEŠ *HELICOBACTER PYLORI*

Išradimo sritis

- 5 Išradimas skirtas funkcionalių maisto produktų gamybai, o būtent - produktui su priešmikrobiniu poveikiu prieš *Helicobacter pylori*.

Išradimo lygis

- 10 *H. pylori* iššaukia įvairius skrandžio ir dvylikapirštės žarnos zonų pažeidimus. Tai sukelia chroniškus uždegiminius gleivinės procesus, kurie sukelia dvylikapirštės žarnos ir skrandžio opaligę, o taip pat padidina susirgimo skrandžio vėžiu riziką (Schreiber S., Konrad M., Groll C., Scheid P., Hanauer G., Werling H-O., Josenhans C., Suerbaum S. The spatial orientation of *Helicobacter pylori* in the gastric mucus. PNAS. 2004; 101(14): 5024-5029). *H. pylori* - tai vienintelis žinomas mikroorganizmas, kuris kolonizuoja tokią
- 15 agresyvią aplinką kaip skrandžio sekretas. Kad apsisaugotų nuo druskos rūgšties, *H. pylori* dideliais kiekiais sintetina ureazę, kuri suskaido šlapalą į anglies oksidą ir amoniaką, kurie, savo ruožtu, sudaro šarminį amonio hidroksidą ir neutralizuoja druskos rūgštį. Su *H. pylori* infekcija susiduria maždaug 50% planetos gyventojų (Perry S. et al. Gastroenteritis and transmission of *Helicobacter pylori* infection in households. Emerg. Infect. Dis. 2006;
- 20 12(11): 1701-1708). Paprastai infekcija pasireiškia jau ankstyvoje vaikystėje (Sabbi T. et al. *Helicobacter pylori* infection in children: management and pharmacotherapy. Expert Opin. Pharmacother. 2008; 9(4): 577-585) ir išlieka visą gyvenimą.

- H. pylori* sukeltos paprastos pepsinės opos gydymą pradeda nuo kombinuotos trikomponentės terapijos: protoninių siurblių inhibitoriais ir kombinuotu antibakteriniu
- 25 gydymu amoksicilinu ir klaritromicinu. Išsivysčius atsparumui antibiotikams, naudoja bismuto preparatus (Fischbach L., Evans E.L. Meta-analysis: the effect of antibiotic resistance status on the efficacy of triple and quadruple first-line therapies for *Helicobacter pylori*. Aliment. Pharmacol. Ther. 2007; 26(3): 343-357). Pastaraisiais metais labai padidėjo *H. pylori* atsparumas minėtiems dažniausiai terapijoje naudojamiems
- 30 antibakteriniams preparatams (Qasim A., O'Morain C.A. Review article: treatment of *Helicobacter pylori* infection and factors influencing eradication. Aliment. Pharmacol. Ther. 2002; 16(1): 24-30).

Plati *H. pylori* išplitimo geografija, visaapimantis pacientų amžiaus diapazonas, dažnai pasireiškiantis atsparumas antibiotikams, jų netoleravimas, didelė rizika užsikrėsti

buityje, patologijos recidyvai labai apsunkina minėtos infekcijos farmakoterapiją. Gydymas yra ilgas ir varginantis, ypač - vaikams, ir pasižymi ne visišku pasiryžimu pildyti visas gydymo rekomendacijas. Aukščiau išvardinta patvirtina nuomonę, kad būtina ieškoti naujų alternatyvių antibiotikams terapijos galimybių (Carson C.F., Riley T.V. Non-antibiotic therapies for infectious diseases. Commun. Dis. Intell. 2003; 27(1): 143-146) daliniam arba pilnam jų pakeitimui arba efektyvumo padidinimui. Pats faktas, kad *H. pylori* kolonizuoja virškinamąjį traktą, perša mintį apie galimą ryšį tarp atitinkamos ligos vystymosi ir gydymo bei maisto. Per pastaruosius 10 metų įrodyta, kad *H. pylori* infekcijos farmakoterapijos efektyvumo padidinimui didelį vaidmenį vaidina funkciniai maisto produktai.

Funkcinių priešmikrobinio poveikio maisto produktų gamybai naudoja įvairias biologiškai aktyvias medžiagas ir kompozicijas: probiotines bakterijas, augalų ekstraktus ir pan.

Yra gerai žinoma rūgpienio bakterijų geba efektyviai veikti prieš *Helicobacter pylori*. *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus acidophilus* pasižymi aukštu priešmikrobinu aktyvumu prieš *H. pylori* (patentinė paraiška KR20040044300, publ. 2004.05.28; patentas RU2253672, publ. 2005.06.10).

Žinomi augalai, turintys eterinių aliejų, pasižymintys priešmikrobinu poveikiu prieš *H. pylori*: Bulgarijos rožė (patentas BG62354, publ. 1999.09.30), *Alpinæ Katsumadai Semer* (patentinė paraiška JP11001429, publ. 1999.01.06), o taip pat imbieras (patentinė paraiška KS2009104293, publ. 2009.04.23).

Kinų medicinos augalų kompozicijose (patentinė paraiška CN101284069, publ. 2008.10.15; patentinė paraiška KR20040003200, publ. 2004.01.13) kaip vieną iš populiariausių komponentų naudoja žaliąją arbatą, kurią dažnai naudoja ir atskirai, grynu pavidalu. Arbatos poveikis pasireiškia antioksidantinėmis savybėmis, gebėjimu inhibuoti patogeninių mikrobų ląstelių proliferaciją ir adheziją prie šeimininko organizmo gleivinės. Tokį aktyvumą sukelia katechinai, polifenoliai. Priimta manyti, kad reguliarius žaliosios arbatos vartojimas pusryčiams efektyviai naikina *H. pylori*, pagrinde - dėl polifenolių, kurie veikia kaip protoninio siurblio inhibitorius (patentinė paraiška JP2002068992, publ. 2002.03.08). Žaliosios arbatos ekstraktas gali inhibuoti ureazės aktyvumą (patentinė paraiška KR20060122439, publ. 2006.11.30).

Paskiriant sergantiems *H. pylori* infekcija priešmikrobinio poveikio funkcinį maisto produktų, būtina atsižvelgti į maitinimosi tradicijas, paruošto produkto išvaizdą ir

formą, organoleptines savybes. Priešingu atveju yra sunku užtikrinti pacientų, ypač - vaikų, pasiryzimą vykdyti visus gydymo nurodymus. Yra pagrindas manyti, kad specifinis maisto produktų aktyvumas priklauso nuo farmakogenetinių faktorių. Genetiško variabilumo požiūriu *H. pylori* skirstomas į septynias populiacijas ir subpopuliacijas su aiškiai išreiškiamu geografiniu pasiskirstymu. Mikroorganizmo paplitimo pasauliniu mastu keliai 5 pastaruosius dešimt tūkstančių metų sutampa su žmogaus migravimo keliais (Falush D. et al. Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* infections. Science, 2003; 299(5612): 1582-1585).

Yra logiška antibakterinių preparatų gamybai naudoti vietinės floros augalus. 10 Remiantis aukščiau minėtais faktais galima manyti, kad vaisiai ir uogos galėtų būti geriausi komponentai, kuriuos būtų galima panaudoti funkcinio maisto produktų su priešmikrobinio poveikiu prieš *H. Pylori* gamybai. Mokslinės literatūros ir patentinių dokumentų duomenys patvirtina galimybę pagaminti tokius produktus. Kalbant apie Europos šiaurės ir vakarų regionų augalus, daugiausia informacijos yra apie spanguoles, mėlynės, braškes, 15 juoduosius serbentus, bruknes. Yra gerai žinoma produktų, pagamintų iš abrikosų (*Prunus mume* Sieb et Zucc.), geba mažinti skrandžio vėžio riziką, kuri paaiškinama aktyvumu prieš *H. pylori* (Otsuka T. et al. Suppressive effects of fruit-juice concentrate of *Prunus Mume* sieb. Et Zucc. (Japanese apricot, Ume) on *Helicobacter pylori*-induced glandular stomach lesions in mongolian gerbils. Asian Pacific J. Cancer Prevent., 2005; 6: 337-341).

Šiuo atžvilgiu kaip auksinis standartas laikoma spanguolė, kurią galima naudoti įvairiais pavidalais (Shmuely H. et al. Effect of cranberry juice on eradication of *Helicobacter pylori* in patients treated with antibiotics and a proton pump inhibitor. J. Nutr. Food Res., 2007; 51(6): 746-751). Tyrimai, atlikti Kinijoje, parodė, kad, reguliariai vartojant spanguolių sultis, tris kartus sumažėjo *H. pylori* infekcijos lygis (Zhang L. et al. Efficacy 25 of cranberry juice on *Helicobacter pylori* infection: randomised placebo-controlled trial. *Helicobacter*., 2005; 10(2): 139-145).

Yra žinoma, kad priešmikrobinis vaisių ir uogų poveikis susijęs su keliais jų komponentais, pirmiausia - su organinėmis rūgštimis. Organinės rūgštys, užtikrinančios žemą maisto pH, panašiai kaip ir skrandžio išskiriama druskos rūgštis, slopina *H. pylori*. *H. pylori* infekcijos profilaktikai ir gydymui taip pat galima naudoti kai kuriuos citratus (tarptautinė patentinė paraiška WO9809652, publ. 1998.03.12). Vienok, yra pagrindas manyti, kad nors ir jonų H⁺ koncentracija savaime yra svarbi, ji nėra svarbiausias 30 faktorius. Nežiūrint į tai, kad spanguolėse yra daug benzoinės rūgšties, baktericidinis šių

uogų poveikis siejamas su stambiamolekuline sulčių frakcija, į kurią rūgštys neįeina (Burger O. et al. Inhibition of *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric mucus by a high-molecular-weight constituent of cranberry juice. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 2002; 42(3): 279-284). Iš to galima daryti išvadą, kad spanguolių organinės rūgštis negalima priskirti prie pagrindinių komponentų, kurie apsprendžia šių uogų poveikį prieš *H. pylori*.

Askorbo rūgštis - daugelio maistui naudojamų augalų sudėtinė dalis - teoriškai galėtų pretenduoti į svarbaus agento, slopinančio *H. pylori*, vaidmenį. Gali būti, kad adekvatus vitamino C, esančių vaisiuose ir daržovėse, vartojimas paaiškina santykinai žemą negatyvių *H. pylori* infekcijos pasekmių lygį pietinėse Europos šalyse (Koletzko S. et al. Prospective multicentre study on antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains obtained from children living in Europe. Gut, 2006; 55(12): 1711-1716). Zhang H.M. ir bendraautorių tyrimuose (Zhang H.M. et al. Vitamin C inhibits the growth of a bacterial risk factor for gastric carcinoma: *Helicobacter pylori*. Cancer, 1997; 80(10): 1897-1903) buvo pademonstruota, kad didelės 128-2048 mg/ml koncentracijos askorbo rūgštis inhibuoja 90% iš 64 žinomų *H. pylori* štamų augimą ant agarų, nepriklausomai nuo maistinės terpės pH, ir kad jos didelė dozė (10 mg gyvūnui į dieną) slopina *H. pylori* kolonizaciją *H. pylori* infekciją turinčiam bandyminiam graužikui *Meriones unguiculatus*.

Vienok, mūsų laikais išaugintose uogose ir vaisiuose negalima identifikuoti kažkokio vieno komponento, kuris būtų „atsakingas“ už stebimą priešmikrobinį poveikį. Greičiausiai reiktų galvoti apie kompleksinį junginių poveikį.

Uogos turi daug įvairių fenolinių junginių, kurie klasifikuojami į 4 grupes: flavonoidai, fenolinės rūgštys, lignanai ir taninai (Nohynek L.J. et al. Berry phenolic: antimicrobial properties and mechanisms of action against severe human pathogens. Nutr. Cancer, 2006; 54(1): 18-32). Visos šios medžiagos pasižymi teigiamu poveikiu sveikatai. Ypač aktyvaus flavonoido antocianino yra mėlynėse, raudonuose serbentuose, aronijoje, braškėse, avietėse.

Su polifenoliais siejamas obuolių sulčių frakcijos priešmikrobinis poveikis (patentinė paraiška JP11180888, publ. 1999.07.06), o taip pat *Granny Smith* rūšies obuolių žievelės vandens ekstrakto geba inhibuoti ureazės sintezę *H. pylori* ląstelėse *in vitro* (Pastene E. et al. Association between polymerisation degree of apple peel polyphenols and inhibition of *Helicobacter pylori* urease. J. Agric. Food Chem., 2009; 57: 416-424). Įdomų tyrimą atliko Italijos kolegos. Buvo pastebėta, kad priešmikrobinis poveikis prieš *H. pylori* pasižymi vaisių *Cydonia oblonga* Miller išspaudų ir žievelės ekstraktai. Fenolinių

junginių koncentracija išspaudose ir žievelėje skiriasi ne tik kiekybiškai (37-47 ir 105-157 mg/100 g šviežios masės), bet ir kokybiškai; buvo pastebėtas šių medžiagų sinergizmas priešmikrobinio aktyvumo atžvilgiu (Fattouch S. et al. Antimicrobial activity of Tunisian quince (*Cydonia olonga* Miller) pulp and peel polyphenolic extracts. J. Agric. Food Chem., 2007; 55(3): 963-969).

Žinomas spanguolių, tekšės, aviečių, žemuogių ir mėlynių priešmikrobinis poveikis prieš salmoneles ir stafilokoką dėl didelio fenolinių junginių kiekio uogose (Puupponen-Pumia R. et al. Bioactive berry compounds – novel tools against human pathogens (mini-review). Appl. Microbiol. Biotechnol., 2005; 67: 8-18).

Ne visuomet priešmikrobinio poveikio gavimui galima vartoti šviežias neapdorotas uogas ir vaisius. Pavyzdžiui, ilgalaikis spanguolių vartojimas šlapimtakių infekcijos gydymui didina riziką susirgti akmenlige (Terris M.K. et al. Dietary supplementation with cranberry concentrate tablets may increase the risk of nephrolithiasis. Urology, 2001; 54(1): 26-29).

Kadangi polifenoliai laikomi pagrindiniais junginiais, nulemiančiais vaisių ir uogų priešmikrobinį poveikį, didelis dėmesys atitinkamų produktų gamyboje skiriamas šių medžiagų išskyrimui (patentinė paraiška JP11180888, publ. 1999.07.06). Atsižvelgiant į tai, kad polifenolių turinčių produktų (pavyzdžiui, žaliosios arbatos) įtraukimas į racioną neužtikrina būtino priešmikrobinio poveikio, autoriai siūlo išskirti polifenolių junginius iš *Rosaceae* rūšies augalų vaisių ir jų sulčių. Aktyvių medžiagų kompozicijos gavimui naudoja ekstrahavimą organiniais tirpikliais ir paskesnę džiovinimą. Polifenolių mišinį, išskirtą iš obuolių, kriaušių ir persikų, naudoja tiek vaistų, tiek įvairių maisto produktų gamybai.

Tais pačiais teoriniais principais paremta patentinė paraiška US2003/0161897, publ. 2003.08.28, kurioje kaip priešmikrobinės priemonės pasiūlyti spanguolių, mėlynių/vaivorų, vynuogių ir aronijos polifenolinių pigmentų (antocianų) koncentratai. Pagal šį išradimą biologiškai aktyvių medžiagų kompleksą ekstrahuoja iš ryškiai pigmentuotų (geltonų-mėlynų-raudonų) augalų ir uogų, naudojant polivinilpirolidoną (PVP) arba vandenyje ištirpintą polivinilo spiratą. Į vaisių sultis ar išspaudas prideda polimero ir, adsorbavus pigmentą, atskiria kompleksą nuo mišinio. Manipuliuojant valgomosios druskos vandens tirpalais ir PVP gauna pigmento/PVP koncentratą, kuriam būdingas priešvirusinis ir priešmikrobinis poveikis.

Du paskutinius išradimus vienija bendra koncepcija, susijusi su polifenolių, kaip pagrindinių priešmikrobinio poveikio komponentų, aktyvumu. Vienok, mechanizmai, užtikrinantys vaisių ir uogų komponentų gebą sunaikinti *H. pylori*, vis dar nežinomi. Tai liečia tiek aktyvius prieš *H. pylori* augalus - spanguoles (Burger O. et al. Inhibition of

5 *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric mucus by a high-molecular-weight constituent of cranberry juice. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 2002; 42(3): 279-284), tiek ir kitus augalus. Tarp faktorių, nulemiančių vaisių ir uogų priešmikrobinį poveikį, ne tik fenolio junginiai. Pavyzdžiui, tam tikrą vaidmenį vaidina organinės rūgštys, nulemiančios atitinkamų sulčių pH.

10 Mūsų tyrime *in vitro* pademonstruota, kad baktericidinis aronijų, spanguolių ir cidonijų sulčių poveikis prieš *H. pylori* mažėja, didėjant pH, kur didėjimas pasiekiamas, pridedant šarminių druskų (Babarikina A. et al. *Helicobacter pylori*: food compounds antimicrobial activity in vitro. Baltic conference on food science and technology. Kaunas, 2009; 27).

15 Uogos turi daug kitų biologiškai aktyvių medžiagų, padedančių gerinti kraują. Spanguolės, braškės turi lignanų - pagrindinio fitoestrogenų augalų klasės junginio (Mazur W.M. et al. Phyto-oestrogen content of berries, and plasma concentrations and urinary excretion of enterolactone after a single strawberry-meal in human subjects. Br. J. Nutr., 2000; 83: 381-387). Mėlynės vartojamos, esant gastrointestinaliniams pažeidimams,

20 spanguolės - gerai žinoma priemonė šlapimtakių infekcijų gydymui.

Uogų ir vaisių sudėtis įvairi, identifikuoti visas specifinį priešmikrobinį poveikį turinčias medžiagas yra sudėtinga ir brangu. Todėl sveikatinimo tikslais atrodo logiška bandyti ruošti įvairių uogų ir vaisių komponentų kombinacijas. Toks žinomas biologiškai aktyvus maisto papildas kaip OptiBerry (laukinių bruknių, braškių, spanguolių, laukinių

25 mėlynių, šeivamedžio uogų, aviečių ekstraktas) parodė *in vitro* didesnę aktyvumą prieš *H. Pylori*, nei atskirų uogų ekstraktai, o taip pat padidino mikroorganizmų jautrumą klaritromicinui (Chatterjee A. et al. Inhibition of *Helicobacter pylori* in vitro by various berry extracts, with enhanced susceptibility to clarithromycin. Mol. Cell Biochem., 2004; 265(1-2): 19-26).

30 Naudojamų botaninių rūšių spektras ir jų geografinė kilmė, veikimo sinergizmas, geba veikti virškinamojo trakto funkcijas, padedanti atsikratyti *H. pylori* infekcijos, o taip pat pacientų pasiryzimas vykdyti gydymo rekomendacijas užtikrina platų maisto produktų priešmikrobinio poveikio faktorių spektrą.

Išradimo esmės atskleidimas

Išradimo tikslas yra funkcionalaus maisto produkto (deserto) su priešmikrobiniu poveikiu prieš *H. pylori* sukūrimas iš augalų ir uogų, augančių Baltijos jūros regione.

5 Šį tikslą pasiekia, paruošiant medžiagų kompoziciją, kuri slopina žarnyno patogeninę mikroflorą, apsaugo virškinamojo trakto gleivinę nuo agresyvių faktorių poveikio, neišeinant iš fiziologinių procesų reguliavimo ribų. Medžiagų kompoziciją, gautą pagal šį išradimą, naudoja maisto produkto (deserto) gamybai. Minėtą medžiagų kompoziciją ruošia iš cidonijų sulčių, aronijų sulčių koncentrato (pageidautina - 5x
10 stiprumo) ir spanguolių sulčių, į kurias prideda žaliosios arbatos koncentrato ir vitamino C, natrio benzoato ir cukraus. Toliau gautą mišinį kaitina, pridedant kukurūzų krakmolo suspensijos obuolių išspaudų vandens ekstrakto ir ajero šaknies vandens ekstrakto. Produktą maišo, kol pasiekia želatinos pavidalo konsistenciją, ir atšaldo. Taip gauna funkcionalų maisto produktą (desertą) su priešmikrobiniu poveikiu prieš *H. pylori*.

15 Pagal kitą išradimo įgyvendinimo variantą vaisių ir uogų sulčių mišinio ruošimo etape į pašildytą aronijų sulčių koncentratą prideda kukurūzų krakmolo suspensijos obuolių išspaudų vandens ekstrakto ir, susiformavus želei, į mišinį prideda cidonijų sulčių, spanguolių sulčių, žaliosios arbatos ekstrakto, ajero šaknies vandens ekstrakto, vitamino C, natrio benzoato ir cukraus.

20 Prieš ruošiant naują produktą, buvo atlikti eksperimentai tokia tvarka: gamtinių medžiagų patikrinimas *in vitro*, keturių paruošto produkto variantų specifinio aktyvumo įvertinimas *in vitro*, dviejų paruošto produkto variantų specifinio aktyvumo patikrinimas pelėms *in vitro*.

25 Per kelis eksperimentus buvo atlikti testai su 99 medžiagomis: vaisių ir uogų sultimis, organinėmis rūgštimis, vaistinių augalų ekstraktais, pieno produktais, bičių produktais. Tyrimų eigoje buvo pasirinkti šie komponentai: spanguolių, cidonijų, aronijų sultys, žaliosios arbatos, obuolių išspaudų ir ajero šaknies vandens ekstraktai, askorbo rūgštis, natrio benzoatas, o taip pat cukrus ir kukurūzų krakmolas. Augaliniai ekstraktai, išskyrus žaliosios arbatos, buvo pagaminti iš augalų, augančių Latvijoje (Kurzemės
30 regione). Jų charakteristikos pateiktos 1 lentelėje.

Eksperimentuose buvo panaudotas standartinis *H. pylori* štamai - ATCC 43504, kuris išskirtas iš žmogaus skrandžio gleivinės izoliato. Bakterijų suspensiją uždėjo ant substrato iš Kolumbijos kraujinio agaro (*Columbia blood agar base*) ir augino 3 dienas

37⁰C temperatūroje anaerobinėmis sąlygomis. Naujojo produkto pirminių komponentų atranką vykdė pagal difuzijos agarė metodo rezultatus. Difuzijos agarė metodo principą sudaro tiriamos medžiagos geba difunduoti į agarą ir slopinti mikroorganizmų augimą, sudarant inhibavimo zonas, kurių skersmuo yra matuojamas. Medžiagų testavimo difuzijos agarė metodu rezultatai pateikti 1 lentelėje.

1 lentelė. Kai kurių medžiagų ir jų derinių priešmikrobinis poveikis prieš *H. pylori in vitro* (difuzijos agarė metodas).

Testuojama medžiaga ar kompozicija ir jos charakteristika		Koncentracija	pH	Inhibavimo zonos skersmuo cm*
Cidonijų sultys (<i>Cydonia oblonga</i>)	100%	neskiestos	2,81	1,9
Cidonijų sultys (<i>Cydonia oblonga</i>)	100%	2x praskiestos	2,82	1,2
Spanguolių (kultivuotų) sultys	100%	neskiestos	2,51	1,9
Spanguolių (laukinių) sultys	100%	neskiestos	2,85	1,9
Aronijų sultys	100%	neskiestos	3,83	1,0
Aronijų sultys	100%	5x praskiestos	3,90	-
Aronijų sulčių koncentratas	100%	5x stiprumo koncentratas	3,75	1,2
Cidonijų sultys + spanguolių sultys	100%/100%	1 : 1	2,53	1,85
Cidonijų sultys + ajero šaknies vandens ekstraktas	100%/8%	1 : 1	2,70	1,55
Cidonijų sultys + aronijų sultys	100%/100%	1 : 1	2,94	1,6
Cidonijų sultys + obuolių išspaudos vandens ekstraktas (10%)	100%/10%	1 : 1	2,65	1,2

* vidutinis trijų matavimų rezultatas

10

Kitiems tyrimams buvo paruošti keturi gatavo produkto variantai (2 lentelė).

2 lentelė. Gatavo maistinio vaisių-uogų produkto variantai.

Produkto kodas	Komponentai	Komponentų kiekis (masės dalys %)
Variantas A	Spanguolių sultys	83,2 %
	Cukrus	16,8%
Variantas B	Cidonijų sultys	51,5%
	Aronijų sultys	12,1%

	Spanguolių sultys	20,2%
	Cukrus	16,2%
Variantas C	Cidonijų sultys	25,4%
	Aronijų sultys	9,5%
	Spanguolių sultys	14,9%
	10% obuolių išspaudų ekstraktas	25,4%
	Cukrus	24,8%
	Askorbo rūgštis	4 mg/100 g
	Natrio benzoatas	150 mg/100 g
Variantas D	Cidonijų sultys	33,3%
	Aronijos sulčių koncentratas (x5)	7,5%
	Spanguolių sultys	12,9%
	10% obuolių išspaudų vandens ekstraktas	19,9%
	Cukrus	19,5%
	8% ajero šaknies vandens ekstraktas	6,3%
	Žaliosios arbatos ekstraktas	0,6%
	Askorbo rūgštis	4 mg/100 g
	Natrio benzoatas	150 mg/100 g

Aukščiau išvardinti gatavo produkto variantai buvo išanalizuoti minimalios inhibuojančios koncentracijos nustatymo būdu. Į maistinę terpę (maistinis buljonas su defibrinuotu krauju) pridėda trijų skirtingų koncentracijų testuojamos medžiagos ir *H. pylori* suspensijos, inkubuoja 24 val. 37°C temperatūroje. Gautus po inkubacijos pavyzdžius pasėja Kolumbijos kraujinio agar maistinėje terpėje, dar kartą inkubuoja 24-48 val., skaičiuoja kolonijas ir apskaičiuoja vienetų, sudarančių kolonijas (KSV), skaičių.

Pagal priešmikrobinį aktyvumą analizuojamus pavyzdžius galima išrikiuoti šia tvarka (mažėjimo kryptimi):

- 10 B ($0,1 \times 10^7$ KSV/ml) > D ($0,4 \times 10^7$ KSV/ml) > C ($0,8 \times 10^7$ KSV/ml) > A ($0,9 \times 10^7$ KSV/ml). Tokiu būdu, spanguolių sulčių specifinis aktyvumas buvo mažesnis, nei kitų komponentų kombinacijoje.

Prieš pradėdant kitą tyrimo etapą buvo būtina nuspręsti dėl kuriamo produkto konsistencijos, kur klausimas buvo suformuluotas taip: kokius komponentus būtina įtraukti į receptūrą, kad būtų pailgintas produkto buvimo skrandyje laikas ir padidinta deserto adhezija prie gleivinės. Kaip žinia, maisto energinės vertės padidinimas slopina skrandžio evakuacinę funkciją (Murray R. The effects on consuming carbohydrate – electrolyte beverages on gastric emptying and fluid absorption during and following exercise. Sports Med., 1987,4,5,322-51). Šiam tikslui, turint omenyje produkto specifiką (desertas), buvo pasirinktas cukrus.

Adhezijai pagerinti naudoja kelias želatinizuojančias medžiagas: chitozano išvestines, pektiną, gialurono rūgštį, tiomerus ir kitas. Tradiciškai uogų ir (arba) vaisių desertų gamyboje krakmolai yra vienas iš populiariausių želatinizavimo komponentų, konkrečiai - kukurūzų krakmolai, kuris pigesnis nei bulvių. Į naujo produkto sudėtį

5 įtrauktas modifikuotas kukurūzų krakmolai, kurį naudoja uogienių tirštinimui.

Siekiant įvertinti priešmikrobinį aktyvumą *in vivo*, buvo pasirinkti produkto, turinčio didžiausią aktyvumą *in vitro*, variantai (3 lentelė).

3 lentelė. Gatavo maisto produkto (deserto) variantai, turintys didžiausią priešmikrobinį

10 aktyvumą *in vitro*.

Produkto kodas	Receptūra	Komponentų kiekis (masės dalys %)
Variantas B	Cidonijų sultys Aronijų sultys Spanguolių sultys Kukurūzų krakmolo suspensija (Resistamyl 347, NL) obuolių išspaudų vandens ekstrakto (1:3) Cukrus Natrio benzoatas Askorbo rūgštis	33,7% 7,5% 12,9% 26,1% 19,8% 150 mg/100 g 100 mg/100 g
Variantas D	Cidonijų sultys Aronijų sulčių koncentratas (x5) Spanguolių sultys Kukurūzų krakmolo suspensija (Resistamyl 347, NL) obuolių išspaudų vandens ekstrakto (1:3) Cukrus 8% ajero šaknies vandens ekstraktas Žaliosios arbatos ekstraktas Natrio benzoatas Askorbo rūgštis	33,7% 7,5% 12,7% 25,0% 19,5% 1,0% 0,6% 150 mg/100 g 100 mg/100 g

Naujojo produkto variantai B ir D buvo išbandyti *in vivo*. ICR - nelinijinės pelės buvo randomizuotos į keturias grupes po 10 gyvūnų kiekvienoje:

- 1 grupė - kontrolinė (sveikos),
- 15 2 grupė - infekuotos *H. pylori*, negdytos, vietoje vandens gavusios 1% gliukozės tirpalo 7 dienas iki inokuliacijos *H. pylori*, o taip pat 14 dienų po inokuliacijos,

3 grupė - infekuotos, gydytos produkto B variantu; inokuliuotos *H. pylori*, po to, praėjus 7 dienoms, 14 dienų gaudavo *per os* kartą į dieną po 0,5 ml deserto; 1% gliukozės tirpalu girdytos 21 dieną,

4 grupė - infekuotos, gydytos produkto D variantu; kitkas - kaip ir 3 grupėi.

5 Gyvūnus girdė gliukozės tirpalu tam, kad pailgintų maisto buvimą skrandyje. Pelių inokuliacijai buvo panaudota *H. pylori* ląstelių kultūra (174×10^7 KSV/1 ml), kurią po 0,5 ml *per os* įvesdavo per zondą kiekvienam 2, 3, 4 grupės graužikui. Po 21 dienos pelės buvo eutanizuotos dietilo eteriu. Skrandis ir dvylikapirštė žarna buvo išimti ureazinio testo („*HelPil* test“) ir morfologinių tyrimų atlikimui.

10 Trečiąją eksperimento savaitę 3 pelės pastipo: po vieną iš 2, 3 ir 4 grupės. Jei gyvūnams buvo leidžiama laisvai prieiti prie tiriamo maistinio produkto, praktiškai visos 4 grupės pelės jį noriai suėsdavo (variantas D), tačiau deserto variantu B (3 grupė) „domėjosi“ maždaug tik pusė graužikų.

15 4 lentelėje pateikti ureazinio testo rezultatai. Visų infekuotų gyvūnų skrandžio ureazinis testas buvo teigiamas, o dvylikapirštės žarnos - maždaug tik pas 70%. *H. pylori* kolonizacija vienu metu skrandyje ir dvylikapirštėje žarnoje būdinga tik ypač sunkiais atvejais. Infekuotų gyvūnų gydymo rezultatai buvo tokie: vartojant variantą B, sergančių pelių skaičius sumažėjo iki 55%, o vartojant variantą D - 40%. Pas 3 ir 4 grupių gyvūnus *H. pylori* dvylikapirštėje žarnoje aptikta nebuvo.

20

4 lentelė. Pelių su eksperimentine *H. pylori* infekcija skrandžio ir dvylikapirštės žarnos gleivinės pavyzdžių ureazinio testo rezultatai.

Grupė	Skrandis	Dvylikapirštė žarna
1 kontrolinė (sveikos)	0 teigiamų iš 10	0 teigiamų iš 9*
2 infekuotos	9 teigiami iš 9 **	6 teigiami iš 9**
3 infekuotos, gydytos produkto variantu B	5 teigiami iš 9**	0 teigiamų iš 9**
4 infekuotos, gydytos produkto variantu D	4 teigiami iš 10	0 teigiamų iš 10

* Vieno tyrimo rezultatas neaiškus.

** Vienas grupės gyvūnas pastipo dar nepasibaigus eksperimentui.

25

Audinių histologiniam tyrimui pavyzdžiai buvo fiksuoti 10% formaline, dehidratuoti ir impregnuoti parafinu. Iš blokų paruošė 4 mkm storio nuopjovas, nudažė

hematoksilinu ir eozinu, o taip pat Giemsa metodu. Morfologinių tyrimų rezultatai parodė, kad gyvūnų, infekuotų *H. pylori* (2 grupė), skrandžio gleivinei būdingi gastrito požymiai. O būtent, pagrindinėse skrandžio liaukose aptiktas infiltratas, atsiradęs dėl uždegimo, o taip pat abscesai. Be to, pastebėta paviršinių mukocitų destrukcija ir atsisluoksniavimas.

5 Tarp pažeistų ląstelių matomos rutulinės bakterijos su spiralinių priemaiša. Po putliosiomis gleivinės ląstelėmis konstatuoti degranuliacijos požymiai.

Morfologinis trečiosios gyvūnų grupės skrandžio gleivinės vaizdas nesiskiria nuo antrosios grupės.

10 Ketvirtosios gyvūnų grupės skrandžio gleivinės uždegimo požymiai buvo minimalūs (fokaliniai uždegiminiai infiltratai buvo reti ir nebuvo ryškūs). *H. pylori* mikroorganizmai vizualizavosi skrandyje ir dvylikapirštėje žarnoje gyvūnų su teigiamu ureaziniu testu pagal duomenis, pateiktus 4 lentelėje.

Remiantis eksperimentų, atliktų *in vitro* ir *in vivo*, rezultatais, buvo prieita prie išvados, kad optimali vaisių-uogų deserto su priešmikrobiniu poveikiu prieš *H. pylori*

15 sudėtis yra tokia:

	- cidonijų sultys –	32,0-35,0%
	(geriausiai - 33,7%)	
	- 5x stiprumo aronijų sulčių koncentratas –	7,0-8,4%
	(geriausiai - 7,5%)	
20	- spanguolių sultys –	14,9-10,5%
	(geriausiai - 12,7%)	
	- obuolių išspaudų vandens ekstraktas –	18,5-19,5%
	(geriausiai - 19,0%)	
	- modifikuotas kukurūzų krakmolas –	6,5-5,5%
25	(geriausiai - 6,0%)	
	- ajero šaknies vandens ekstraktas –	0,8-1,2%
	(geriausiai - 1,0 %)	
	- žaliosios arbatos ekstraktas –	0,8-0,4%
	(geriausiai - 0,6 %)	
30	- cukrus –	19,5%
	- natrio benzoatas –	150 mg/100 g
	- askorbo rūgštis –	100 mg/100 g

Maistinio produkto su priešmikrobinu poveikiu prieš *H. pylori* paruošimui į indą supila aukščiau išvardintas sultis, prideda žaliosios arbatos ir ajero šaknies ekstraktų, vitamino C, natrio benzoato, cukraus. Gautą mišinį pakaitina iki 80°C, palaipsniui prideda kukurūzų krakmolo suspensijos obuolių išspaudų vandens ekstrakto. Produktą maišo, kol jis įgauna želės pavidalo konsistenciją. Atšaldo. Paruoštą produktą saugo kambario temperatūroje.

Siekiant adsorbuoti aronijų pigmentą krakmolo geliu, vaisių-uogų sulčių mišinio ruošimo stadijoje į pašildytą iki 80°C aronijų sulčių koncentratą (5x stiprumo) prideda kukurūzų krakmolo suspensijos obuolių išspaudų vandens ekstrakto ir, susiformavus želei, į mišinį prideda cidonijų sulčių, spanguolių sulčių, žaliosios arbatos ekstrakto, ajero šaknies vandens ekstrakto, vitamino C, natrio benzoato, cukraus, po to atšaldo.

Remiantis tyrimo rezultatais galima tikėtis, kad pasiūlytasis naujasis funkcionalus produktas slopins patogeninę žarnyno mikroflorą, saugos virškinamojo trakto organų gleivinę nuo agresyvių faktorių poveikio (laisvieji radikalai-proooksidantai, uždegimo mediatoriai ir t.t.), neišeinant už fiziologinių procesų reguliavimo rėmų, kas būdinga maisto komponentams.

Priimant dėmesin tą faktą, kad į vaisių-uogų deserto sudėtį įeina tik komponentai, naudojami maisto produktams ir kurių saugumas jau įrodytas, naująjį produktą galima rekomenduoti ne tik sergantiems *H. pylori* infekcija, bet ir profilaktiškai sveikiems įvairaus amžiaus žmonėms. Produktas gali būti vartojamas ir kaip papildas *H. pylori* infekcijos farmakoterapijai, ir atskirai.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Maistinio vaisių-uogų produkto, pasižyminčio priešmikrobiniu poveikiu prieš *Helicobacter pylori*, gamybos būdas, apimantis vaisių ir uogų sulčių mišinio paruošimą, natrio benzoato ir cukraus pridėjimą į vaisių ir uogų sulčių mišinį, gautojo mišinio pašildymą, kukurūzų krakmolo suspensijos obuolių išspaudų vandens ekstrakto pridėjimą į jį, produkto maišymą iki želės pavidalo konsistencijos ir paskesnę jo atšaldymą, besiskiriantis tuo, kad vaisių ir uogų sulčių mišinio paruošimo etape naudoja cidonijų sultis, aronijų sulčių koncentratą, spanguolių sultis, į jas prideda žaliosios arbatos koncentrato ir vitamino C, o kukurūzų krakmolo suspensijos obuolių išspaudų vandens ekstrakto pridėjimo etape į mišinį prideda ajero šaknies vandens ekstrakto.
2. Būdas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad vaisių ir uogų sulčių mišinio ruošimo etape į pašildytą aronijų sulčių koncentratą prideda kukurūzų krakmolo suspensijos obuolių išspaudų vandens ekstrakto ir, susiformavus želei, kuri adsorbuoja aronijos pigmentus, neatšaldant į mišinį prideda cidonijų sulčių, spanguolių sulčių, žaliosios arbatos ekstrakto, ajero šaknies vandens ekstrakto, vitamino C, natrio benzoato ir cukraus, produktą maišo, tęsiant gautojo mišinio šildymą, iki želės pavidalo konsistencijos gavimo, po to atšaldo.
3. Būdas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad aronijų sulčių koncentratas - tai 5x stiprumo koncentratas.
4. Maistinis vaisių-uogų produktas, pasižymintis priešmikrobiniu poveikiu prieš *Helicobacter pylori*, gautas pagal bet kurį 1-3 punktą, besiskiriantis tuo, kad produktą sudaro šie komponentai (masės dalys, %):
 - cidonijų sultys – 32,0-35,0% (geriausiai - 33,7%),
 - 5x stiprumo aronijų sulčių koncentratas – 7,0-8,4% (geriausiai - 7,5%),
 - spanguolių sultys – 14,9-10,5% (geriausiai - 12,7%),
 - obuolių išspaudų vandens ekstraktas – 18,5-19,5% (geriausiai - 19,0%),
 - modifikuotas kukurūzų krakmolos – 6,5-5,5% (geriausiai - 6,0%),
 - ajero šaknies vandens ekstraktas – 0,8-1,2% (geriausiai - 1,0 %),

žaliosios arbatos ekstraktas – 0,8-0,4% (geriausiai - 0,6 %),

cukrus – 19,5%,

natrio benzoatas – 150 mg/100 g,

askorbo rūgštis – 100 mg/100 g.