

Polifenole w terapii chorób wywołanych przez *Helicobacter pylori*

Polyphenols in the treatment of diseases caused by *Helicobacter pylori*

Katedra i Zakład Mikrobiologii, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
Kierownik Zakładu: prof. dr hab. n. med. Grażyna Gościńskiak

SUMMARY

The selective pressure caused by excessive use of antibiotics has contributed to the significant growth of microorganisms resistant to many currently available biocides. One of these microorganisms is *H. pylori*, a major etiological factor of gastritis, gastric and duodenal ulcers, gastric cancer and lymphoma of lymphatic system MALT. Alternative or auxiliary therapies could base on use of polyphenols – secondary plant metabolites with numerous health promoting properties. They involve reduction of inflammation in the gastric mucosa, lowering the overresponse of the immune system and strengthening the body's natural barriers by increasing the mucus production in the stomach. Polyphenols are also capable of inhibiting synthesis of *H. pylori* virulence factors such as vacuolating toxin *VacA*, cytotoxin *CagA*, urease and the specific adhesion mediated by outer membrane proteins. Moreover, polyphenol compounds show high bactericidal activity against this bacteria, either as an individual therapeutic agent or in combination with antibiotics. This article describes the polyphenols effective in fighting with *H. pylori* infections.

Keywords: *H. pylori*, polyphenols, phytotherapy, diseases of stomach

STRESZCZENIE

Presja selekcyjna spowodowana nadmiernym użyciem środków bakteriobójczych przyczyniła się do znacznego wzrostu drobnoustrojów opornych na wiele dostępnych obecnie biocydów. Jednym z takich drobnoustrojów jest *H. pylori*, będący czynnikiem etiologicznym zapaleń błony śluzowej żołądka, choroby wrzodowej żołądka i dwunastnicy, a także nowotworów żołądka i chłoniaków typu MALT. Terapią alternatywną lub pomocniczą mogłoby być użycie polifenoli, wtórnych metabolitów roślinnych o licznych właściwościach prozdrowotnych. Działanie to polega między innymi na redukcji stanów zapalnych błony śluzowej żołądka, obniżaniu nadmiernej odpowiedzi układu odpornościowego i wzmacnianiu naturalnych barier organizmu przez wzrost produkcji śluzu w żołądku. Polifenole wykazują także zdolność hamowania czynników wirulencji wytwarzanych przez *H. pylori*, takich jak toksyna wakuolizująca *VacA*, białko *CagA* i ureaza, a także hamują swoistą adhezję białek błony zewnętrznej. Co więcej, związki polifenolowe wykazują wysoką aktywność bakteriobójczą względem tego drobnoustroju, zarówno jako samodzielny czynnik terapeutyczny, jak i w połączeniu z antybiotykami. W tym artykule przedstawiono możliwości zastosowania polifenoli w walce z zakażeniami *H. pylori*.

Słowa kluczowe: *H. pylori*, polifenole, fitoterapia, choroby żołądka

Wstęp

Helicobacter pylori jest Gram-ujemną, zakrzywioną pałeczką, którą zakażonych jest ponad połowa ludzi na świecie, z częstością od 20% w krajach rozwiniętych do ponad 80% w krajach rozwijających się (1). Bakteria ta jest ważnym czynnikiem etiologicznym zapaleń błony śluzowej żołądka, choroby wrzodowej żołądka i dwunastnicy, a także nowotworów żołądka i chłoniaków układu chłonnego MALT (ang. *mucosa associated lymphoid tissue lymphoma*) (2). Do rozwoju choroby przyczyniają się czynniki wirulencji charakterystyczne dla danego szczepu *H. pylori* oraz odpowiedź

układu immunologicznego i genetyczne predyspozycje organizmu gospodarza (3).

Do najistotniejszych czynników chorobotwórczości tego drobnoustroju zaliczamy: zdolność produkcji toksyny wakuolizującej (*VacA*) i białka *CagA* związanego z cytotoksycznością, wydzielanie ureazy, obecność białek błony zewnętrznej OMP (ang. *outer membrane proteins*) oraz wydzielanie enzymów mucynazy i proteazy, ułatwiających penetrację śluzu (2). Toksyna *VacA* jest głównym czynnikiem wirulencji *H. pylori* i powoduje uszkodzenie tkanek. Jest ono warunkowane formowaniem aniono-selektywnych porów w błonach komórek, tworzeniem wakuol w wyniku osmotycznego

poboru wody oraz wpływem cytochromu c z mitochondriów (2, 4). Cytotoksyna CagA zdolna jest do wywoływania zwiększonej ruchliwości i wydłużonego kształtu komórek eukariotycznych, tzw. fenotypu kolibra (ang. *hummingbird phenotype*), transformacji nowotworowej i podwyższonej sekrecji cytokin prozapalnych IL-8 (2). Interleukina ta z kolei jest chemotatraktantem dla neutrofilów, których lokalne skupiska warunkują stres oksydacyjny, połączony z masowym uwolnieniem wolnych rodników tlenowych, uszkodzeniami DNA i zmianami w proliferacji komórek epitelium (5, 6). Ureaza jest enzymem umożliwiającym *H. pylori* przeżycie w kwasowym środowisku żołądka za pośrednictwem alkalizacji kwasu solnego pod wpływem wytwarzanego amoniaku (7, 8). *Helicobacter pylori* wytwarza ponad 30 białek powierzchniowych, wśród których wyróżnia się adhezynę BabA, determinującą swoistą adhezję bakterii do komórek epitelium żołądka (2, 9).

Z drugiej strony wzrost zakażeń *H. pylori* związany jest z odpowiedzią układu immunologicznego na obecność drobnoustrojów w organizmie. Rozpoznanie bakteryjnych fragmentów przez komórki prezentujące (ang. *antigen presenting cells* – APC), monocyty, makrofagi i komórki dendrytyczne powoduje uwolnienie cytokin prozapalnych (IL-1 β , IL-8, TNF- α). To z kolei przyczynia się do zależnej od tych czynników chemotaksji granulocytów i uszkodzenia lokalnych tkanek. Przewlekłe zapalenie błony śluzowej żołądka wpływa na nadmierne namnażanie limfocytów CD4+ (limfocytów pomocniczych), w szczególności Th1. Frakcja tych komórek zwiększa syntezę cytokin związanych z reakcją zapalną, tj. IL-12, IL-18, TNF- α i IFN- γ , a co za tym idzie, wpływa na uszkodzenia połączeń ścisłych między komórkami epitelium i wzrost prezentacji antygenów (10).

Związki polifenolowe

Presja selekcyjna spowodowana nadmiernym użyciem antybiotyków i chemioterapeutyków przyczyniła się do znacznego wzrostu drobnoustrojów opornych na wiele dostępnych obecnie środków leczniczych. Z tego też powodu istnieje potrzeba zastąpienia powszechnie stosowanych środków przeciwdrobnoustrojowych substancjami znajdującymi się w roślinach (11). Związkami bardzo licznie występującymi w roślinach są polifenole. Są to wtórne metabolity roślin wyższych, które pełnią wiele ważnych funkcji, w tym chronią przed atakami szkodników i roślinożerców, a także determinują odpowiedź roślin na stres środowiskowy (7, 11-13).

Polifenole są bardzo liczną grupą, zawierającą ponad 8000 związków (13). W jej skład wchodzi:

flawony, flawonole, flawanole, flawanony, izoflawony oraz antocyjanidyny i inne. Drugą grupę stanowią: kwasy fenolowe (pochodne kwasu benzoowego i kwasu cynamonowego), stilbeny i lignany (11). Polifenole obecne są w wielu owocach i warzywach. I tak np. w 100 g winogron, jabłek, gruszek, czereśni lub jagód znajduje się 200-300 mg tych substancji (13). W tkankach roślin polifenole występują głównie jako glikozydy lub cząsteczki związane z kwasami organicznymi, a także kompleksy polimerów o wysokiej masie cząsteczkowej (11). To sprawia, że związki te wymagają obróbki metabolicznej warunkowanej przez naturalną mikroflorę przewodu pokarmowego (14). Z tego też powodu liczebność i bioróżnorodność gatunków drobnoustrojów zasiedlających organizm człowieka decyduje w znacznej mierze o biodostępności tych związków (15).

W przeciągu ostatnich 10 lat polifenole zwróciły uwagę naukowców z powodu licznych korzystnych właściwości prozdrowotnych, w tym aktywności przeciwnowotworowej, kardioochronnej, hamującej osteoporozę i nadciśnienie, przeciwalergiczną oraz neuroochronną (4, 7, 11-13). Co więcej, pełnią one także funkcję przeciwzapalną, przeciwutleniającą i przeciwdrobnoustrojową (11-14, 16). Aktywność skierowana przeciw drobnoustrojom polega na bezpośrednim efekcie bójczym lub obniżeniu stopnia ich zjadliwości, hamowaniu tworzenia biofilmu, redukcji adhezji i internalizacji z komórkami gospodarza oraz neutralizacji toksyn (11). Dlatego też związki te rozpatrywane są jako narzędzie hamujące stany zapalne błony śluzowej żołądka, progresji choroby wrzodowej oraz eradykacji *H. pylori*.

Polifenole w leczeniu zakażeń pałeczką *H. pylori*

Działanie objawowe i zmniejszenie stopnia dolegliwości chorobowych jest ważnym etapem terapii leczniczych przy użyciu związków roślinnych. Efekt ten może być wynikiem zmniejszenia nadmiernej odpowiedzi immunologicznej na toczące się obecnie zakażenie, wzmożenia działania przeciwutleniającego czy podwyższenia naturalnych osłon ochronnych organizmu, np. przez wzmożone wydzielanie śluzu przez błonę śluzową żołądka (9, 12, 13, 16). Miejscem docelowego oddziaływania fitoterapeutyków mogą być także drobnoustroje, które poddane działaniu substancji roślinnych obniżają swoją zjadliwość (9, 11, 17). W przypadku *H. pylori* ważnym miejscem docelowym jest zmniejszenie syntezy toksyny VacA, CagA, ureazy lub interferencja ze specyficzną adhezją, warunkowaną białkami OMP (2).

Jedną z takich substancji, o dobrze udokumentowanych właściwościach, jest resweratrol. Związek ten należy do grupy fitoaleksyn związanych z ochroną przeciwdrobnoustrojową i zmniejszeniem uszkodzeń roślin wystawionych na promieniowanie UV (16). Dla resweratrolu wykazano właściwości przeciwproliferacyjne, przeciwingiogenne, kardioochronne i neuroochronne (5, 16). Co więcej, Zaidi i wsp. (5) udowodnili także aktywność przeciwutleniającą i przeciwzapalną poprzez hamowanie stresu oksydacyjnego wywołanego wolnymi rodnikami tlenowymi (ang. *reactive oxygen species* – ROS), wytwarzania IL-8 i zmian morfologicznych komórek MKN-45. Po zakażeniu tych komórek przez *H. pylori* 193C (CagA+) poziom IL-8 osiągnął wartość 2250 pg/ml. Użycie resweratrolu zmniejszyło stężenie cytokin prozapalnych w sposób zależy od dawki, tj. przy 50 μmol – 1900 pg/ml, przy 75 μmol – 1500 pg/ml, a przy 100 μmol – 600 pg/ml. Analiza wewnątrzkomórkowej superoksydazy (O_2^-), związanej ze stresem tlenowym, wykazała podobną tendencję. Poziom frakcji komórek o wysokiej aktywności superoksydazy w przypadku zakażenia *H. pylori* kształtował się na poziomie 14,2% i malał wraz z wyższymi dawkami suplementowanego resweratrolu (1 μmol – 12,7%, 10 μmol – 9,8%, 50 μmol – 6,8%, 100 μmol – 5,1%).

Podobne właściwości ochronne dla organizmu człowieka udowodniono w przypadku polifenoli zielonej herbaty (ang. *green tea polyphenols* – GTP). Akai i wsp. (18) testowali wpływ tych związków na apoptozę i proliferację komórek żołądka myszy BALB/c zakażonych *H. pylori* NCTC 11637. Integralność błony śluzowej żołądka warunkowana jest przez równowagę między procesem apoptozy i namnażania komórek. Nadmierna proliferacja może przyczynić się do rozwoju karcynogenezy, zaś zbyt intensywna apoptoza skutkuje powstaniem stanu zapalnego oraz wrzodów żołądka. Polifenole zielonej herbaty umożliwiły przywrócenie homeostazy między tymi procesami. Jak oceniono, po suplementacji GTP zredukowano nadmierną proliferację i apoptozę komórek uwarunkowaną zakażeniem *H. pylori* zarówno w *ant rum*, jak i w trzonie żołądka (18). Z kolei Jeong i wsp. (19) przeprowadzali badanie na myszach C57BL/6 zakażonych *H. pylori* ATCC 43504 (CagA+, VacA+), którym przez 36 tygodni podawano ekstrakt z zielonej herbaty (*Camellia sinensis*) lub ekstrakt z bylicy (*Artemisia*). Zaobserwowano, że podawanie myszom ekstraktów z tych roślin spowodowało zmniejszenie zaniku błony śluzowej żołądka i zmian nowotworowych. Połączone ekstrakty odznaczały się wyższą aktywnością ochronną, co uwarunkowane było synergistycznym działaniem przeciwzapalnym,

przeciwutleniającym i przeciwmutagennym badanych ekstraktów (19).

Nadziemne części bylicy wykazują wiele właściwości leczniczych, zwłaszcza w przypadku chorób układu krwionośnego. Aktywność ta polega na tonizowaniu i rozszerzeniu naczyń krwionośnych oraz obniżeniu stężenia glukozy i lipidów we krwi. Notuje się możliwość zastosowania tej rośliny jako środka pomocniczego w chorobach wrzodowych, co determinowane jest właściwościami przeciwwrzdowymi, przeciwzapalnymi oraz antyseptycznymi. Frakcja flawonoidów ekstraktu z nadziemnych części bylicy miotłowej (*Artemisia scoparia*) w stężeniu 10 mg/ml hamowała aktywność ureazy u *H. pylori* o 86,17% (8).

Wśród innych roślin o działaniu pomocniczym i zmniejszającym nadmierne działanie układu immunologicznego można wymienić wilczomlecz (*Euphorbia*). W medycynie ludowej południowej Brazylii używany jest on przy leczeniu choroby wrzodowej, a także jako środek przeciwbólowy i przeciwzapalny. Efekt ten jest wynikiem obecności pochodnych kwasu galusowego i elagowego, które modulują syntezę prostaglandyn oraz gazowego mediatora angiogenezy – NO. Związki te potęgują także wytwarzanie glutationu, silnego przeciwutleniacza o właściwościach przeciwwrzdowych (6).

Przy leczeniu zakażeń *H. pylori* przydatną okazała się roślina *Byrsonima intermedia* (20). Wśród jej polifenoli zidentyfikowano kwasy fenolowe, flawon-3-ole, flawonoidy oraz oligomeryczne proantocyjandyny. Działanie tych substancji polegało na wzmocnieniu bariery żołądka przez wzrost syntezy związków sulfhydrylowych i glutationu, aktywacji receptorów waniolidowych, a także obniżeniu poziomu mieloperooksydazy (MPO). Ekstrakt metanolowy tej rośliny, w dawce 500 mg/kg/dzień, zredukował u zwierząt doświadczalnych poziom przewlekłego zapalenia śluzówki żołądka o 49% (w 14. dniu) i dwunastnicy o 45% (w 7. i 14. dniu).

Rośliną tradycyjnie stosowaną w przypadku dolegliwości żołądkowo-jelitowych jest pigwa. Używana jest w terapii przeciwbiegunkowej, oczyszczającej żołądek, przeciwwrzdowej, przeciwwymiotnej i jako środek o właściwościach ściągających. Co więcej, wykazuje także aktywność przeciwzapalną i hamuje nadmierne reakcje wywołane przez przeciwciała IgE (21). Badania Babarikiny i wsp. (22) ujawniły również bardzo silny przeciwbakteryjny efekt soku z pigwy przeciw *H. pylori*.

Polifenolowy ekstrakt ze skórek z jabłek (ang. *apple peel polyphenol extract* – APPE) także odznacza się silną aktywnością gastroochronną. Ekstrakt ten był zdolny do hamowania namnażania *H. pylori*

ATCC 43504 i TX 136 z MIC o wartości 112,5 $\mu\text{g/ml}$ GAE (ekwiwalentu kwasu galusowego). Dodatkowo, APPE wykazywał silną aktywność przeciwutleniającą, poprzez hamowanie zależnego od *H. pylori* wybuchu tlenowego powodowanego przez neutrofile (23). Pastene i wsp. (24) stwierdzili ponadto, że APPE hamował *in vitro* wakuolizację komórek HeLa w sposób zależy od dawki polifenolowego ekstraktu przy IC_{50} równym 390 $\mu\text{g/ml}$ GAE. Co więcej, APPE warunkował także hamowanie swoistej adhezji *H. pylori* do komórek HeLa przy IC_{50} równym 5,3 mg/ml GAE. Efekt hamowania adhezji potwierdzono również w badaniach *in vivo* na myszach C55BL6/J, którym podawano dziennie przez 20 dni 150 lub 300 mg/kg APPE (24).

Dla żurawiny wykazano silny efekt hamowania swoistej adhezji drobnoustrojów do tkanek gospodarza. W standardowej terapii owoców żurawiny używa się w zapobieganiu i leczeniu chorób układu moczowego, ponieważ tam substancje aktywne osiągają maksymalne stężenie. Większość badań skupia się na uropatogennych *E. coli* (UPEC), natomiast ekstrakt z żurawiny hamuje także przyleganie innych bakterii, tj. *Proteus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *K. pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* oraz *Enterococcus faecalis* (25). Badania wykazały, że sok z żurawiny może zabezpieczać także przed zakażeniem *H. pylori* na drodze hamowania adhezji uwarunkowanej adhezyną BabA. Dodatkowo, sok z tych owoców zaburza także tworzenie się biofilmu (17). W doświadczeniu *in vivo* na myszach C57BL/6 zakażonych szczepami *H. pylori* określano wpływ codziennego podawania 0,5 ml soku z żurawiny przez okres miesiąca. W pierwszej dobie po zakończeniu terapii wykazano 80% zmniejszenie stopnia zakażenia (26).

Owoce cytrusowe, tj. cytryna, pomarańcza czy grejpfrut, są bogatym źródłem glikozylowanych flawonoidów. Najliczniej występują w nich hesperydyna i naryngina, których stężenie w soku z pomarańczy kształtuje się na poziomie odpowiednio 200-590 mg/l i 16-84 mg/l (27). Oprócz właściwości kardioochronnych i przeciwzapalnych, ekstrakty z tych owoców wykazują także zdolność do hamowania komunikacji międzydrobnoustrojowej, tzw. *quorum sensing* (QS) (27, 28). W badaniach dotyczących dwóch pałeczek chorobotwórczych układu pokarmowego, a mianowicie *E. coli* EHEC (enterokrwotoczny szczep *E. coli*) i *Yersinia enterocolitica*, wykazano, że flawonoidy tych owoców wyciszają QS oraz zmniejszają tworzenie biofilmu i rozpełzliwy ruch zależny drobnoustrojów (ang. *swarming motility*). Te właściwości mogłyby być również wykorzystane w walce z *H. pylori* (27, 29).

W przypadku działania różnych ekstraktów roślinnych, do osiągnięcia pożądaných efektów wymagane jest synergistyczne działanie wielu związków polifenolowych. Jednak dla niektórych związków wykazano bardzo silny efekt przeciwdrobnoustrojowy wobec *H. pylori* nawet przy użyciu pojedynczej substancji aktywnej.

W badaniu przesiewowym 20 różnych polifenoli wyłoniono dwa efektywne inhibitory ureazy 4-p-hydroksyfenyloetylo pirogalol z $\text{IC}_{50} = 0,03$ mmol oraz 7,8,4'-trihydroksyizoflawon z $\text{IC}_{50} = 0,14$ mmol (7). Innym silnym inhibitorem ureazy była 1,2,3,4,6-penta-O- β -glukopiranoza, pochodząca z korzeni piwonii chińskiej (*Paeonia lactiflora*) (30). Doświadczenie Ruggiero i wsp. (3) na myszach CD1 zakażonych *H. pylori* SPM326 typu I (VacA+) miało na celu określenie, czy suplementacja 1,5 mg/ml kwasu taninowego i galusanu propylu obniża liczbę drobnoustrojów oraz zmniejsza stopień dolegliwości chorobowych. Badanie gastroskopowe wykazało nieistotny statystycznie spadek liczby *H. pylori* w żołądkach myszy, natomiast zaobserwowano znaczne obniżenie mysich przeciwciał anti-VacA. Zaawansowanie zapalenia śluzówki żołądka również zmalało. W teście potwierdzającym u myszy BALB/c, którym podawano 50 μg naturalnej formy toksyny VacA, suplementacja tymi polifenolami wywołała efekt ochronny względem śluzówki żołądka. Wykazano, że kwas taninowy i galusan propylu są inhibitorami zjadliwości *H. pylori* poprzez zmniejszenie zmian zapalnych indukowanych toksyną wakuolizującą (3).

Działanie przeciwdrobnoustrojowe polifenoli roślinnych

Niektóre ekstrakty zawierające związki polifenolowe wywierają efekt terapeutyczny przez działanie bakteriostatyczne lub bakteriobójcze. Istnieje również możliwość zastosowania ich jako substancji wzmacniających działanie antybiotyków i chemioterapeutyków.

Abu-Qatouseh i wsp. (31) przebadali właściwości przeciwdrobnoustrojowe sześciu ekstraktów metanolowych z liści: mięty okrągłolistnej (*Mentha rotundifolia*), eukaliptusa gałkowego (*Eucalyptus globulus*), krwawnika wonnego (*Achillea odorata*), ślazu dzikiego (*Malva sylvestris*), omanu lepkiego (*Inula viscosa*) oraz pokrzywy zwyczajnej (*Urtica dioica*). Ekstrakty testowano wobec *H. pylori* NCTC11916 opornego na metronidazol. Stwierdzono, że frakcje polifenolowe badanych ekstraktów działały na pałeczki *H. pylori*, jednak najwyższą aktywnością odznaczały się ekstrakty z eukaliptusa ($\text{MIC} = 94$ $\mu\text{g/ml}$), omanu ($\text{MIC} = 375$ $\mu\text{g/ml}$) i ślazu ($\text{MIC} = 750$ $\mu\text{g/ml}$).

Ponadto, wszystkie ekstrakty hamowały aktywność ureazy wytwarzanej przez ten drobnoustrój, przy czym ekstrakt z eukaliptusa wykazywał najwyższy stopień inhibicji (70-90% w granicach stężeń 16-125 mg/ml), a krwawnik najniższy (0-10% w granicach stężeń 125-250 mg/ml) (31).

Oliwa z oliwek jest kolejną substancją o silnej aktywności względem pałeczek *H. pylori*, włącznie ze szczepami opornymi na klarytromycynę (makrolid) oraz metronidazol (pochodna nitroimidazolu) (9). Zawiera ona liczne polifenole z grup: lignanów, flawonów, pochodnych tyrozolu i hydroksytyrozolu. W teście wrażliwości *H. pylori* LMG19499 na oliwę z oliwek stwierdzono spadek liczebności drobnoustrojów o 3 log przy st. 1% oraz powyżej 4 log przy st. 5% po 1 godz. działania. Wśród badanych substancji najaktywniejszy był ligustrozyd dekarboksymetylowy w postaci aglikonu dialdehydowego, strukturalny homolog oleuropeiny, który wykazywał silny efekt bakteriobójczy już w dawce 1,3 $\mu\text{g/ml}$ (32).

Nasiona migdałowca (*Prunus dulcis*) są bogatym źródłem substancji odżywczych oraz polifenoli, takich jak katechiny, epikatechiny, kemferol i izoramnetyna, o właściwościach przeciwnowotworowych, przeciwmutagennych, przeciwzapalnych i przeciwdrobnoustrojowych (1). Bisignano i wsp. (1) określali wrażliwość 34 szczepów *H. pylori*, w tym dwóch wzorcowych *H. pylori* ATCC 43504 i ATCC 49503, na ekstrakt ze skórek migdałów. Wartość MIC ekstraktu z tego surowca wynosiła 64-128 $\mu\text{g/ml}$, natomiast wśród oczyszczonych związków migdałów najaktywniejszy okazał się kwas protokatechinowy z $\text{MIC}_{50} = 128 \mu\text{g/ml}$, a najmniej aktywna epikatechyna z $\text{MIC}_{50} = 512 \mu\text{g/ml}$ (1).

Escandón i wsp. (33) przebadali wpływ dwóch polifenoli, tj. epikatechiny i kemferolu, na szczepy *H. pylori*. Oceniono, że po 48 godz. ekspozycji na te substancje całkowity efekt bakteriobójczy epikatechiny wobec *H. pylori* ATCC 43504 uzyskano przy stężeniu 0,8 mg/ml, a wobec *H. pylori* ATCC 26695 przy stężeniu 1,0 mg/ml. W przypadku kemferolu działanie bakteriobójcze dla obu szczepów uzyskano przy dawce 1 mg/ml. Udowodniono także synergistyczne działanie obu polifenoli względem *H. pylori*, ponieważ takie same, niższe dawki tych związków, wywierały silniejszy efekt na ten drobnoustrój niż sama epikatechyna lub kemferol w odpowiednio wyższej dawce. I tak np. 50 $\mu\text{l/ml}$ jednej i drugiej substancji, użytych łącznie, spowodowało obniżenie liczby *H. pylori* o 3 log, natomiast 100 $\mu\text{l/ml}$ samej epikatechiny lub kemferolu jedynie o 2 log (33).

Kurkuma (*Curcuma longa*) wykazuje szereg cennych właściwości leczniczych, w tym przeciwzapalne, przeciwutleniające, przeciwmutagenne oraz antyseptyczne.

Jednym z najbardziej aktywnych polifenoli kurkumy jest kurkumina, która hamuje wzrost *H. pylori* poprzez hamowanie ścieżki biosyntezy kwasu szikimowego. Dehydrogenaza kwasu szikimowego jest niezbędna dla pałeczek *H. pylori* ze względu na syntezę aromatycznych aminokwasów i jest swoista dla metabolizmu tych bakterii. Dlatego też stanowi ważne miejsce w walce z zakażeniami wywoływanymi przez ten drobnoustrój chorobotwórczy (17).

Brown i Jiang (34) badali wpływ kwercetyny i resweratrolu na namnażanie dwóch szczepów *H. pylori*: ATCC 26695 i *H. pylori* D 5178. Dla kwercetyny MIC i MBC osiągały wartość kolejno 32-64 i 256 $\mu\text{g/ml}$, dla resweratrolu oba parametry były dwukrotnie niższe. Ustalono również, że MBC kwercetyny można czterokrotnie zredukować przez dodatek resweratrolu do podłoża. Na szczepie *H. pylori* ATCC 26695 testowano także wpływ czasu ekspozycji na żywotność drobnoustrojów przy różnych stężeniach tych polifenoli. Stwierdzono liniową korelację między podwyższonym stężeniem substancji aktywnych w podłożach hodowlanych a spadkiem liczebności *H. pylori* (34).

Owoce jagodowe są cennym źródłem polifenoli należących do czterech grup: flawonoidów, kwasów fenolowych, lignanów i polimerycznych tanin (35). Dla wielu z nich wykazano silną aktywność przeciwdrobnoustrojową względem różnych gatunków bakterii, w tym *H. pylori* (14, 35, 36). Płynna hodowla *H. pylori* NCTC 11637 wykazywała silną wrażliwość na ekstrakty maliny moroszki (*Rubus chamaemorus*), maliny właściwej (*Rubus idaeus*), borówki czarnej (*Vaccinium myrtillus*), czarnej porzeczki (*Ribes nigrum*) i truskawki (*Fragaria ananasa*). Stężenie 1 mg/ml tych ekstraktów w podłożu hodowlanym spowodowało spadek liczby *H. pylori* poniżej progu wykrywalności (< 100 komórek/ml). Silna aktywność względem tego drobnoustroju determinowana jest najprawdopodobniej wysoką zawartością elagotanin w tych owocach. Określono, że ekstrakty z maliny właściwej i maliny moroszki mają zdolność zaburzania struktury błony komórkowej poprzez chelatowanie jonów dwuwartościowych (Ca^{2+} i Mg^{2+}). To przyczynia się do destabilizacji struktur lipopolisacharydu (LPS) bakterii Gram-ujemnych i uszkodzenia osłon komórkowych (35).

Związki aktywne zielonej herbaty należą do rodziny katechin, do których zaliczamy: katechiny, epikatechiny, galokatechiny, galusan epikatechiny (ECG) i galusan epigalokatechiny (EGCG) (37). Yanagawa i wsp. (37) przetestowali wrażliwość 56 szczepów *H. pylori*, w tym 19 wysoce opornych na metronidazol i klarytromycynę ($\text{MIC} > 100 \mu\text{g/ml}$), na związki

aktywne zielonej herbaty. Wartość MIC₉₀ EGCG i ECG wynosiła 100 µg/ml i była niezależna od oporności badanych szczepów *H. pylori*. Pozostałe związki zielonej herbaty nie wpływały na namnażanie tego drobnoustroju. Co więcej, synergistyczne zastosowanie polifenoli tej rośliny z antybiotykami spowodowało obniżenie wartości MIC antybiotyków. Stężenia sub-MIC amoksyliny nie wpływały w żaden sposób na wzrost *H. pylori*. Natomiast w połączeniu z 12 µg/ml EGCG spowodowały po 24 godz. inkubacji obniżenie liczby tych drobnoustrojów o 2 log, zaś przy 25 µg/ml o 4 log.

Dla innych antybiotyków zaobserwowano podobną korelację. Suplementacja podłoża hodowlanego 50 µg/ml EGCG obniżyła wartość MIC dla wysoce opornego szczepu klinicznego nr 18 *H. pylori* z wartości wyższej od 100 do 6,25 µg/ml dla metronidazolu i z wartości wyższej od 100 do 12,5 µg/ml dla klarytromycyny (37).

Przykładem innej rośliny, której ekstrakt działa synergistycznie z antybiotykami, jest pomarańcza bergamota (*Citrus bergamia*). Polifenolowe frakcje otrzymane z tego owocu działają pomocniczo przy chorobach układu krwionośnego i łagodzą u pacjentów z syndromem metabolicznym. Głównymi zidentyfikowanymi flawonoidami były: eriocytryna,

neeriocytryna, naryngina oraz neohesperydyna. W doświadczeniu na szczepach CagA+ i CagA- *H. pylori* stwierdzono, że stężenia MIC użytych antybiotyków w połączeniu z ekstraktem z owoców pomarańczy bergamota (2,5-5 mg/ml) wykazywały efekt bakterioobójczy, a nie bakterioostatyczny jak przy zastosowaniu samych antybiotyków. Obniżenie namnażania tej bakterii wynosiło 2-4 log po 24 godz. ekspozycji (38).

Podsumowanie

Nadmierne stosowanie substancji przeciwdrobnoustrojowych przyczyniło się do znacznego wzrostu drobnoustrojów opornych na wiele dostępnych obecnie środków biobójczych. Terapia z użyciem polifenoli może być rozpatrywana jako skuteczny sposób na zmniejszenie dolegliwości żołądkowo-jelitowych związanych z zakażeniem *H. pylori*. Co więcej, związki polifenolowe wykazują wysoką aktywność bakterioobójczą wobec tego drobnoustroju chorobotwórczego zarówno w charakterze samodzielnego czynnika terapeutycznego, jak i w połączeniu z antybiotykami. Przyszłe badania nad polifenolami powinny skupić się w większej mierze nad testami w warunkach *in vivo* oraz na określeniu biodostępności tych związków przez organizm człowieka.

Piśmiennictwo

1. Bisignano C, Filocamo A, La Camera E i wsp. Antibacterial activities of almond skins on cagA-positive and -negative clinical isolates of *Helicobacter pylori*. BMC Microbiol 2013; 13:103.
2. Roesler BM, Rabelo-Gonçalves EMA, Zeitune JMR. Virulence factors of *Helicobacter pylori*. A review. Clin Med Insights Gastroenterol 2014; 7:9-17.
3. Ruggiero P, Tombola F, Rossi G i wsp. Polyphenols reduce gastritis induced by *Helicobacter pylori* infection or VacA toxin administration in mice. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50:2550-2.
4. Tombola F, Campello S, De Luca L i wsp. Plant polyphenols inhibit VacA, a toxin secreted by the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. FEBS Lett 2003; 543:184-9.
5. Zaidi SF, Ahmed K, Yamamoto T i wsp. Effect of resveratrol on *Helicobacter pylori* – induced interleukin-8 secretion, reactive oxygen species generation and morphological changes in human gastric epithelial cells. Biol Pharm Bull 2009; 32:1931-5.
6. Minozzo BR, Lemes BM, Justo Ada S i wsp. Anti-ulcer mechanisms of polyphenols extract of *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns (*Euphorbiaceae*). J Ethnopharmacol 2016; 191:29-40.
7. Xiao ZP, Shi DH, Li HQ i wsp. Polyphenols based on isoflavones as inhibitors of *Helicobacter pylori* urease. Bioorg Med Chem 2007; 15:3703-10.
8. Khan MA, Khan H, Tariq SA i wsp. Urease inhibitory activity of aerial parts of *Artemisia scoparia*: Exploration in an *in vitro* study. Ulcers 2014; 2014:184736.
9. Parreira P, Fátima Duarte M, Reis CA i wsp. *Helicobacter pylori* infection: A brief overview on alternative natural treatments to conventional therapy. Crit Rev Microbiol 2016; 42:94-105.
10. Portal-Celhay C, Perez-Perez GI. Immune responses to *Helicobacter pylori* colonization: mechanisms and clinical outcomes. Clin Sci (Lond) 2006; 110:305-14.
11. Daglia M. Polyphenols as antimicrobial agents. Curr Opin Biotechnol 2012; 23:174-81.
12. Manach C, Scalbert A, Morand C i wsp. Polyphenols: food sources and bioavailability. Am J Clin Nutr 2004; 79:727-47.
13. Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. Oxid Med Cell Longev 2009; 2:270-8.
14. Denev P, Kratchanova M, Ciz M i wsp. Biological activities of selected polyphenol-rich fruits related to immunity and gastrointestinal health. Food Chem 2014; 157:37-44.
15. Marín L, Miguélez EM, Villar CJ i wsp. Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: antimicrobial properties. Biomed Res Int 2015; 2015:905215.
16. Zulueta A, Caretti A, Signorelli P i wsp. Resveratrol: A potential challenger against gastric cancer. World J Gastroenterol 2015; 21:10636-43.

17. Shmueli H, Domniz N, Yahav J. Non-pharmacological treatment of *Helicobacter pylori*. *World J Gastrointest Pharmacol Ther* 2016; 7:171-8.
18. Akai Y, Nakajima N, Ito Y i wsp. Green tea polyphenols reduce gastric epithelial cell proliferation and apoptosis stimulated by *Helicobacter pylori* infection. *J Clin Biochem Nutr* 2007; 40:108-15.
19. Jeong M, Park JM, Han YM i wsp. Dietary intervention of *Artemisia* and green tea extracts to rejuvenate *Helicobacter pylori* – associated chronic atrophic gastritis and to prevent tumorigenesis. *Helicobacter* 2016; 21:40-59.
20. Santos RC, Kushima H, Rodrigues CM i wsp. *Byrsonima intermedia* A. Juss.: gastric and duodenal anti-ulcer, antimicrobial and antidiarrheal effects in experimental rodent models. *J Ethnopharmacol* 2012; 140:203-12.
21. Aslam M, Sial AA. Effect of hydroalcoholic extract of *Cydonia oblonga* Miller (Quince) on sexual behaviour of Wistar rats. *Adv Pharmacol Sci* 2014; 2014:282698.
22. Babarikina A, Nikolajeva V, Babarykin D. Anti-*Helicobacter* activity of certain food plant extracts and juices and their composition *in vitro*. *FNS* 2011; 2:868-77.
23. Pastene E, Speisky H, Troncoso M i wsp. *In vitro* inhibitory effect of apple peel extract on the growth of *Helicobacter pylori* and respiratory burst induced on human neutrophils. *J Agric Food Chem* 2009; 57:7743-9.
24. Pastene E, Speisky H, García A i wsp. *In vitro* and *in vivo* effects of apple peel polyphenols against *Helicobacter pylori*. *J Agric Food Chem* 2010; 58:7172-9.
25. Hisano M, Bruschini H, Nicodemo AC i wsp. Cranberries and lower urinary tract infection prevention. *Clinics* 2012; 67:661-7.
26. Xiao SD, Shi T. Is cranberry juice effective in the treatment and prevention of *Helicobacter pylori* infection of mice? *Chin J Dig Dis* 2003; 4:133-9.
27. Truchado P, Giménez-Bastida JA, Larrosa M i wsp. Inhibition of quorum sensing (QS) in *Yersinia enterocolitica* by an orange extract rich in glycosylated flavanones. *J Agric Food Chem* 2012; 60:8885-94.
28. Assini JM, Mulvihill EE, Huff MW. Citrus flavonoids and lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol* 2013; 24:34-40.
29. Vikram A, Jesudhasan PR, Jayaprakasha GK i wsp. Grapefruit bioactive limonoids modulate *E. coli* O157:H7 TTSS and biofilm. *Int J Food Microbiol* 2010; 140:109-16.
30. Wang YC. Medicinal plant activity on *Helicobacter pylori* related diseases. *World J Gastroenterol* 2014; 20:10368-82.
31. Abu-Qatouseh L, Hanane B, Boussouf L i wsp. *In vitro* susceptibility of *Helicobacter pylori* to urease inhibitory effects of polyphenolic extracts of local herbs from Algeria. *IAJAA* 2013; 4:4.
32. Romero C, Medina E, Vargas J i wsp. *In vitro* activity of olive oil polyphenols against *Helicobacter pylori*. *J Agric Food Chem* 2007; 55:680-6.
33. Escandón RA, del Campo M, López-Solis R i wsp. Antibacterial effect of kaempferol and (–)-epicatechin on *Helicobacter pylori*. *Eur Food Res Technol* 2016; 242:1495-502.
34. Brown JC, Jiang X. Activities of muscadine grape skin and polyphenolic constituents against *Helicobacter pylori*. *J Appl Microbiol* 2013; 114:982-91.
35. Nohynek LJ, Alakomi HL, Kähkönen MP i wsp. Berry phenolics: antimicrobial properties and mechanisms of action against severe human pathogens. *Nutr Cancer* 2006; 54:18-32.
36. Liepina I, Nikolajeva V, Jākobsone I. Antimicrobial activity of extracts from fruits of *Aronia melanocarpa* and *Sorbus aucuparia*. *EEB* 2013; 11:195-9.
37. Yanagawa Y, Yamamoto Y, Hara Y i wsp. A combination effect of epigallocatechin gallate, a major compound of green tea catechins, with antibiotics on *Helicobacter pylori* growth *in vitro*. *Curr Microbiol* 2003; 47:244-9.
38. Filocamo A, Bisignano C, Ferlazzo N i wsp. *In vitro* effect of bergamot (*Citrus bergamia*) juice against cagA-positive and -negative clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *BMC Complement Altern Med* 2015; 15:256.

Konflikt interesów**Conflict of interest**

Brak konfliktu interesów

None

otrzymano/received: 14.10.2016

zaakceptowano/accepted: 23.11.2016

Adres/address:

*mgr Paweł Krzyżek

Katedra i Zakład Mikrobiologii

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

ul. Chałubińskiego 4, 50-368 Wrocław

tel. +48 508-688-128

e-mail: pawel.krzyzek@student.umed.wroc.pl