

## БАКТЕРИЦИДНА АКТИВНОСТ IN VITRO НА ТРИ РАСТИТЕЛНИ ИНФУЗА ВЪРХУ 44 КЛИНИЧНИ ЩАМА *HELICOBACTER PYLORI*, ВКЛЮЧВАЩИ ТАКИВА С ДВОЙНА ИЛИ ТРОЙНА РЕЗИСТЕНТНОСТ КЪМ АНТИБИОТИЦИ

Л. Боянова, Г. Гергова и И. Митов

Катедра „Медицинска микробиология“, Медицински университет – София

## IN VITRO STUDY OF THE BACTERICIDAL ACTIVITY OF THREE HERBAL INFUSIONS AGAINST 44 CLINICAL STRAINS OF *HELICOBACTER PYLORI*, INCLUDING DOUBLE AND TRIPLE ANTIBIOTIC RESISTANT STRAINS

L. Boyanova, G. Gergova and I. Mitov

Department Medical Microbiology, Medical University – Sofia

**Резюме:** Целта на проучването бе да се оцени бактерицидното действие на инфузи от мента, лайка и липов цвят върху щамове *Helicobacter pylori* – агенти, които не са проучвани или са фокус на единични съобщения. Бактерицидното действие на инфузите беше проучено в концентрации, които се използват за билкови чайове, върху 44 клинични щама *H. pylori*. Най-силна бактерицидна активност след 2 h беше намерена при ментата (56.8%), следвана от лайката (40.9%) и липовия цвят (20.4%). Ментата, лайката и липата бяха бактерицидни за 25.8, 12.9 и 3.2% от 31 щама *H. pylori*, устойчиви към един или повече антибиотици, след 1 h и съответно 54.8, 45.2 и 16.1% след 2 h. В заключение, това проучване предоставя, доколкото ни е известно за първи път, данни за бактерицидните активности на лайката и липовия цвят срещу *H. Pylori*, като водни екстракти в концентрации, които се използват за билкови чайове. Само ментата показва бактерицидна активност върху > 1/2 от щамовете след 2 h, макар с незначителни различия спрямо активността на лайката. Липовият цвят не беше активен върху бактериите.

**Ключови думи:** *Helicobacter pylori*, бактерициден, лайка, мента, липов цвят, антибиотична резистентност, полирезистентност

**Адрес за кореспонденция:** Проф. д-р Людмила Боянова, дмн, Катедра „Медицинска микробиология“, Медицински университет, ул. „Здраве“ № 2, 1431 София, тел.: 02 91 72 730, e-mail: l.boyanova@hotmail.com, l.boyanova@lycos.com

**Summary:** The aim of the study was to assess the killing of *Helicobacter pylori* strains by peppermint, chamomile and lime flower, which have not been studied or have been a topic of single reports. Bactericidal activities of 3 herbal infusions at concentrations used for herbal teas/tisanes were evaluated against 44 clinical *H. pylori* strains. The strongest bactericidal activity within 2 h was found by peppermint (56.8%), followed by chamomile (40.9%) and lime flower (20.4%). Peppermint, chamomile and lime flower killed 25.8%, 12.9% and 3.2% of 31 *H. pylori* strains resistant to one or more antibiotics within 1h, and 54.8%, 45.2% and 16.1% within 2h, respectively. To our knowledge, this is the first study which provides data about bactericidal effects of the chamomile and lime flowers as aqueous extracts at concentrations used for herbal teas/tisanes against *H. pylori*. Only the peppermint exhibited bactericidal activity against >1/2 of the strains, although with non-significant differences vs. the activity of the chamomile. Lime flower was not active against the bacteria.

**Key words:** *Helicobacter pylori*, bactericidal, chamomile, peppermint, lime flower, antibiotic resistance, multidrug resistance

**Address for correspondence:** Prof. Lyudmila Boyanova, MD, PhD, Department of Medical Microbiology, Medical University, 2 „Zdrave“ st., 1431 Sofia, tel: 003592 91 72 730, e-mail: l.boyanova@hotmail.com, l.boyanova@lycos.com

## УВОД

Първичната резистентност на *H. pylori* към Metronidazole и Clarithromycin е откривана при 20-40% и съответно от 1 до над 20% от европейските щамове [3]. Тя се увеличава в някои страни [7], затова има нужда от нови агенти като неантибиотични агенти (НАА) за профилактика или като част от лечението на инфекцията. Въпреки че *in vitro* активността на НАА срещу *H. pylori* невинаги предсказва *in vivo* ефектите, оценката на бактерицидното действие на агентите е важна преди извършването на клинични изпитвания. Проучванията на анти-*H. pylori* активността на някои често използвани билкови чайове обаче са ограничени, например за лайка и мента [10, 12], или липсват, например за липовия чай.

Целта на проучването бе да се оцени бактерицидното действие на три билкови инфуза в концентрации, използвани в билкови чайове, срещу клинични щамове *H. pylori*, вкл. тези, които са устойчиви на един или няколко антибиотика.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

*H. pylori* щамове от 44 нелекувани пациенти с гастродуоденални заболявания бяха включени в проучването. Пациентите бяха 17 мъже и 27 жени, на средна възраст 48.8 г. (6-80 г.). Болните имаха дуоденална язва (8 случая), стомашна язва (4), две язви (2), хроничен гастрит (17) и гастроэзофагеална рефлуксна болест (13).

Тестуването за чувствителност на щамовете към антибиотици беше направено, както е описано в предишна публикация [3]. Накратко, *H. pylori* суспензии бяха инокулирани на кръвен Mueller-Hinton агар, съдържащ 8, 16 и 32 µg/ml Metronidazole, 0.25, 0.5, 1 и 2 µg/ml Clarithromycin, 0.5, 1 и 2 µg/ml Amoxicillin, 2 и 4 µg/ml Tetracycline и 1 и 10 µg/ml Ciprofloxacin. Петритата бяха инкубирани микроаерофилно на 37°C за 2-3 дни. Граничните стойности за резистентност бяха: > 8 µg/ml Metronidazole, ≥ 1 µg/ml Clarithromycin, > 0.5 µg/ml Amoxicillin, > 4 µg/ml Tetracycline и > 1 µg/ml Ciprofloxacin [3, 7].

За бактерицидния тест, суспензии на щамовете (100 µl, 2-3 MacFarland, около 6 x 10<sup>8</sup> колонии-образуващи единици – КОЕ/ml) бяха инокулирани в 0.9 ml водни инфузи от лайка (*Matricaria recutita* сушени цветни глави, 5 mg/ml), липа (*Tilia* spp., цветове, 7.5 mg/ml) и мента (*Mentha piperita* листа, 7.5 mg/ml). Пликчетата с растителните агенти бяха търговски закупени: Чай Мента, пликчета по 1.5 g, Чай Лайка, пликчета по 1.0 g, и Чай Липов цвят, пликчета по 1.5 g, всички, произведени от Биопрограма ЕАД.

Концентрациите бяха избрани да имитират тези в рутинно употребяваните билкови чайове съгласно препоръките на производителите, като за целта пакетчето с мента 1.5 g беше добавено към 200 ml вода за концентрация 7.5 mg/ml, пакетчето с лайка 1.0 g беше добавено към 200 ml вода за концентрация 5 mg/ml и пакетчето с липов цвят 1.5 g беше добавено към 200 ml вода за концентрация 7.5 mg/ml. Разтворите бяха поставяни в съд от огнеупорно стъкло и загрявани до кипване.

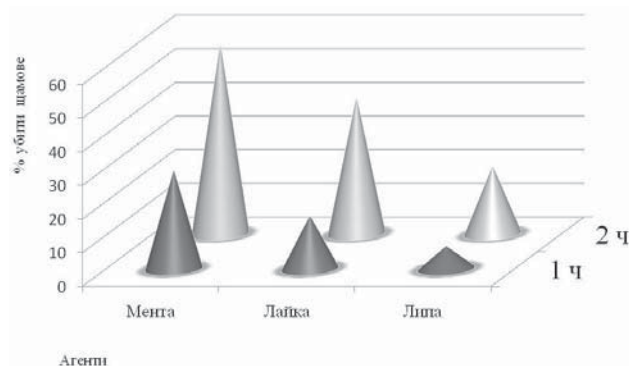
Контролите бяха с *H. pylori* суспензии във физиологичен разтвор. Културите бяха инкубирани на 37°C в микроаерофилна атмосфера за 1 и 2 h.

Проби (60 µl, с около 3.6 x 10<sup>6</sup> КОЕ) бяха вземани след 60 и 120 min от инкубацията и техни разреждания бяха посявани върху кръвен Mueller-Hinton агар. Бактериалният растеж беше отчитан след 3 дни инкубация на 37°C в микроаерофилна атмосфера. Бактерицидната активност беше отчитана като ≥ 3<sup>-log</sup><sub>10</sub> намаление на жизнеспособните клетки *H. pylori*.

**Статистически анализ.** Различията между групите бяха отчитани с χ<sup>2</sup>-тест и точен тест на Фишер, когато е подходящо.

## РЕЗУЛТАТИ

Бактерицидната активност на билковите инфузи беше зависима и от агента, и от щам *H. pylori* (фиг. 1). След 1 h инкубация разликата между активностите на лайката и ментата беше несигнификантна (p = 0.127), обаче ментата беше по-активна в сравнение с липовия цвят (p = 0.0057). Най-силното убиване на бактериалните клетки след 2 h беше наблюдавано с ментата (56.8%), следвано от лайката (40.9%) и липовия цвят (20.4%). Лайката беше по-активна от липовия цвят (p = 0.038).



Фиг. 1. Бактерицидно действие на трите билкови инфуза върху 44 клинични щам *H. pylori*

В произволно избраните *H. pylori* щамове резистентността към Metronidazole, Clarithromycin,

Ciprofloxacin и Amoxicillin беше 59.1%, 22.7%, 15.9% и 2.3%. Не беше намерена резистентност към Tetracycline. Броят на резистентните към антибиотици щамове, убити от билкови инфузи, е представен в табл. 1. Инфузите бяха активни срещу някои резистентни щамове, както и срещу някои щамове с двойна или тройна резистентност.

Ментата, лайката и липата бяха бактерицидни за 25.8% (8 щам), 12.9% (4) и 3.2% (1) от 31 *H. pylori* щамове, резистентни към  $\geq 1$  антибиотик след 1 h и съотв. 54.8% (17), 45.2% (14) и 16.1% (5) след 2 h. Ментата показва дейност, подобна на тази от лайката, след 1 и 2 h, а лайката беше по-активна от липовия цвят след 2 h ( $p = 0.026$ ).

**Таблица 1. Брой на щамовете, резистентни към антибиотици, убити от билковите инфузи**

Инфуза от:	Брой на убитите щамове, резистентни към:							
	Metronidazole (№ = 26)		Clarithromycin (№ = 10)		Ciprofloxacin (№ = 7)		Two or three antibiotics* (№ = 9)	
	1 h	2 h	1 h	2 h	1 h	2 h	1 h	2 h
Мента	8	13	3	6	2	2	3	4
Лайка	4	11	2	7	1	2	2	5
Липов цвят	1	4	0	3	0	2	0	3

\*Двойна резистентност при 4 щам, тройна резистентност при 5 щам

## ОБСЪЖДАНЕ

Ментата често се използва при стомашно-чревни заболявания, възпаление на устната кухина и други заболявания [1]. Един компонент на ментата, ментолът, показва антибактериални и антивирусни активности [9]. Този агент проявява противотуморни ефекти върху клетки от рак на дебелото черво [13]. Въпреки това ментата може да инхибира изпразването на стомаха и перисталтиката [8]. Освен това агентът може да окаже хепатотоксичен ефект във високи дози и ментовото масло вероятно инхибира лекарства-метаболизиращите цитохром Р450 ензими като CYP2C19, който е включен в метаболизма на инхибиторите на протонната помпа (ИПП) [2]. Екстракти от листа на мента са били бактериостатични (минимална потискаща концентрация – МПК, 100 до < 250  $\mu\text{g/ml}$ ) срещу щамове *H. pylori* в две проучвания [4, 6]. Imai et al. [5] съобщават за бактериостатично и бактерицидно действие на етерични масла от мента върху *H. pylori* in vitro, вкл. върху резистентни към антибиотици щамове.

В настоящото проучване инфузът от мента показва бактерицидно действие срещу > 54% от общо изследваните щамове *H. pylori*, както и срещу тези, които са устойчиви на един или повече антибиотици, след 2 h.

Лайката (*Matricaria/Chamomilla recutita*), която показва спазмолитични и антибактериални свойства, се използва в билкови чайове за лечение на диспепсия, колит, гастрит и други заболявания [1]. Цветовете от лайка съдържат флавоноидите апигенин (едно от най-активните съединения), лутео-

лин и кверцетин, кумарини и етерични масла [11]. Някои съединения са нестабилни. Съобщава се за алергични реакции към агента, както и за инхибирането на цитохром Р450 ензими (CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6 и CYP3A4) с етерично масло от лайка [9]. Ефектът само на МПК на масло от лайка, но не воден екстракт, е проучен с противоречиви резултати срещу *H. pylori*. Маслен екстракт от цветовете на лайка е показал МПК<sub>50</sub> 62.5  $\text{mg/ml}$  срещу *H. pylori* и е потиснал произвеждането на бактериалната уреаза [10]. От друга страна, според Weseler et al. [12] МПК на маслото от лайка срещу *H. pylori* е била 65  $\mu\text{g/ml}$ .

В представеното проучване инфузът от лайка показва ниска (12.9%) бактерицидна активност срещу щамовете *H. pylori*, които са устойчиви към  $\geq 1$  антибиотици, след 2 h.

В България често срещаните липови дървета са *Tilia platyphyllos* Scop., *Tilia cordata* Mill. и *Tilia argentea*. В допълнение към клей и танин, цветовете съдържат терпеноид, р-кумарова киселина, камферол, кверцетин съединения и летливи масла [9]. Случайно са наблюдавани алергични реакции към липов цвят [9]. Доколкото ни е известно, няма проучвания на активността на липовия цвят върху *H. pylori* досега.

В нашето проучване липовият инфуз показва най-ниската бактерицидна активност от проучваните агенти и не следва да се препоръчва за инфекция с *H. pylori*. Агентът уби само < 4% от щамовете, резистентни към един или повече антибиотици, дори след 2 h.



Фиг. 2. Мента (*Mentha piperita*)

В заключение, това проучване предоставя за първи път, доколкото ни е известно, данни за бактерицидните активности на лайка и липа като водни екстракти в концентрации, които се използват за билкови чайове, срещу *H. pylori*. Само ментата показва бактерицидна активност върху > 1/2 от щамовете след 2 h, макар с несигнификантни различия спрямо активността на лайката. Липовият цвят не беше активен върху бактериите. Бактерицидната анти-*H. pylori* активност *in vitro* на растителните екстракти трябва да се има предвид за последващи клинични проучвания. Ментата (фиг. 2) би могла да бъде полезна за профилактика или като добавка в терапията на *H. pylori* инфекцията.

**Благодарност:** Проучването е направено с Грант № 34/2012 на Медицински университет – София.

#### БИБЛИОГРАФИЯ

- Петков, В. Съвременна фитотерапия. С., Мед. и физк., 1982, 517.
- Akdogan, M. et al. Investigation of biochemical and histopathological effects of *Mentha piperita* Labiatae and *Mentha spicata* Labiatae on liver tissue in rats. – *Hum. Exp. Toxicol.*, **23**, 2004, № 1, 21-28.
- Boyanova, L. et al. Prevalence and evolution of *Helicobacter pylori* resistance to 6 antibacterial agents over 12 years and correlation between susceptibility testing methods. – *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **60**, 2008, № 4, 409-415.
- Castillo-Juárez, I. et al. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. – *J. Ethnopharmacol.*, **122**, 2009, № 2, 402-405.
- Imai, H. et al. Inhibition by the essential oils of peppermint and spearmint of the growth of pathogenic bacteria. – *Microbios.*, **106**, 2001, Suppl 1, 31-39.
- Mahady, G. B. et al. In vitro susceptibility of *Helicobacter pylori* to botanical extracts used traditionally for the treatment of gastrointestinal disorders. – *Phytother. Res.*, **19**, 2005, № 11, 988-991.
- Megraud, F. et P. Lehours. *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. – *Clin. Microbiol. Rev.*, **20**, 2007, № 2, 280-322.
- Mizuno, S. et al. Oral peppermint oil is a useful antispasmodic for double-contrast barium meal examination. – *Gastroenterol. Hepatol.*, **21**, 2006, № 8, 1297-1301.
- Rodriguez-Fragoso, L. et al. Risks and benefits of commonly used herbal medicines in Mexico. – *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **227**, 2008, № 1, 125-135.
- Shikov, A. N. et al. Antibacterial activity of *Chamomilla recutita* oil extract against *Helicobacter pylori*. – *Phytother. Res.*, **22**, 2008, № 2, 252-253.
- Szoke, E. et al. New terpenoids in cultivated and wild chamomile (in vivo and in vitro). – *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **800**, 2004, № 1-2, 231-238.
- Weseler, A. et al. A novel colorimetric broth microdilution method to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of antibiotics and essential oils against *Helicobacter pylori*. – *Pharmazie*, **60**, 2005, № 7, 498-502.
- Yi, W. et H.Y. Wetzstein. Anti-tumorigenic activity of five culinary and medicinal herbs grown under greenhouse conditions and their combination effects. – *J. Sci. Food Agric.*, **91**, 2011, № 10, 1849-1854.