



פעילות אנטימיקרוביאלית של צמחי מרפא נגד הליקובקטר פילורי

ד"ר ג'ריס ג'דעון

מכון אגודת הגליל למחקר יישומי

בחסות האוניברסיטה של חיפה

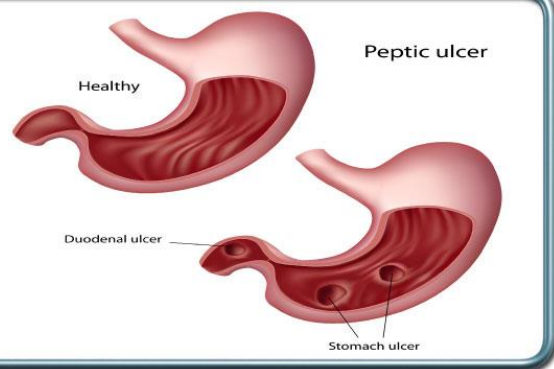
שפרעם 20200

ת.ד. 437

www.gal-soc.org



ה. פילורי- עובדות

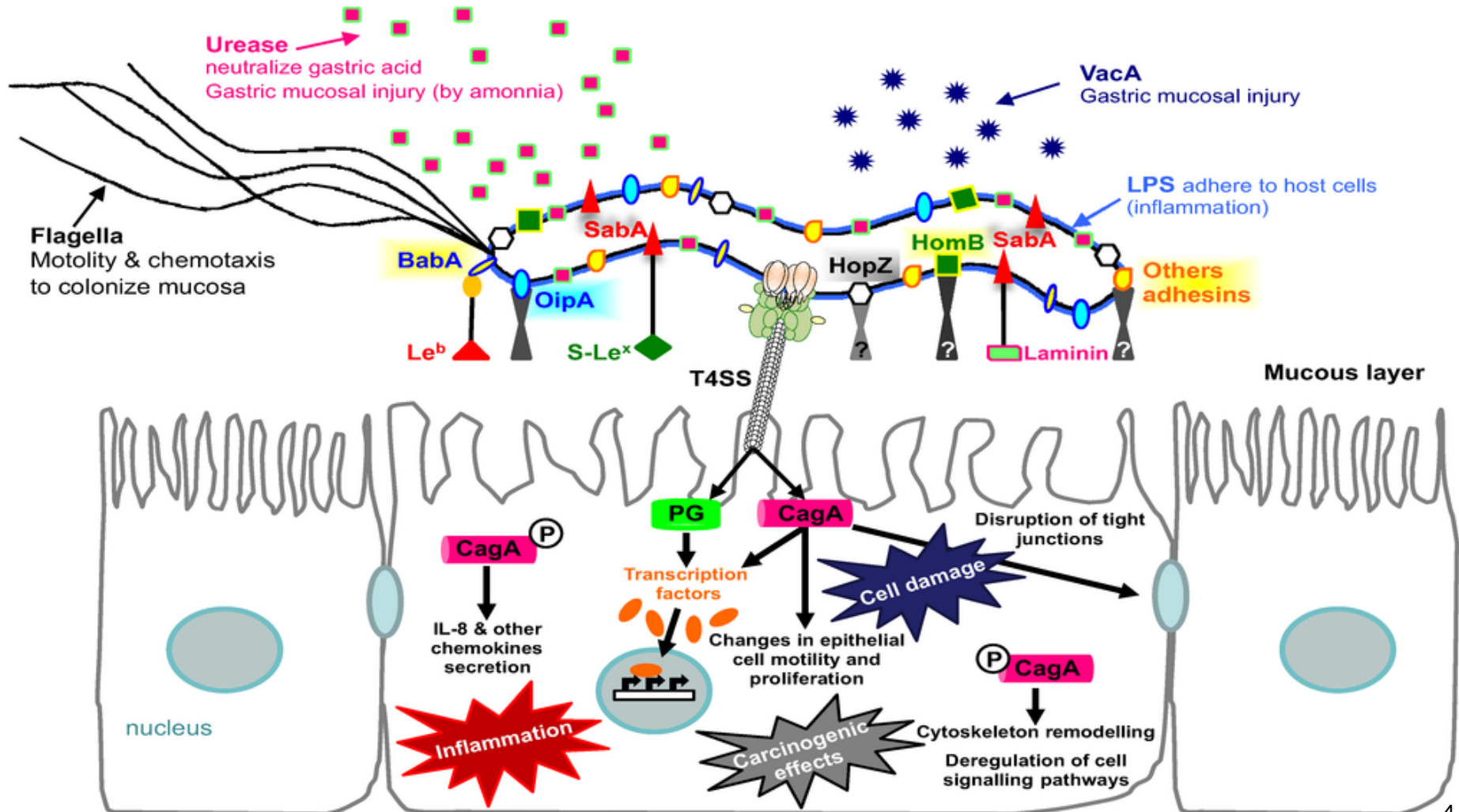


- ▶ שיעור ההימצאות במדינות מתפתחות ומפותחות הוא 70-90% ו-25-50%, בהתאמה
- ▶ ההידבקות אסימפטומטית ב- 85-90% מהמקרים, כ- 10-15% מפתחים דלקת פעילה
- ▶ 1-10% מהחולים מפתחים כיב קיבה או כיב בתריסריון
- ▶ כ- 1-3% מפתחים סרטן קיבה, וכ- 0.01% מפתחים לימפומה מסוג MALT
- ▶ יותר מ- 70% של כיבי הקיבה ו- 95% מכיבי התריסריון קשורים להדבקה בה. פילורי
- ▶ 63% מהתמותה מסרטן קיבה הם תוצאה של הידבקות ב- ה. פילורי (WHO 2009)

ה. פילורי- ממצאים בארץ

- ▶ 60-65% מהמבוגרים ו- 53% מהילדים נגועים
- ▶ שכיחות ההדבקה בילדים בישראל הוא 25.2% במגזר היהודי ו- 45.6% במגזר הערבי, לעומת 10% במדינות אירופה וצפון אמריקה
- ▶ מוערך כי 30% מהתינוקות בישראל עלולים להידבק בו בשנה הראשונה לחייהם

גורמי אלימות של ה. פילורי



תיאור הבעיה

▶ טיפול תרופתי משולש-

- חומר המעכב פעילות משאבת פרוטונים, כמו omeprazole, lansoprazole

- קלריתרומיצין

- אמוקסיצילין או מיטרונידאזול באנשים רגישים לפיניצילין

▶ ב- 20%~ מהחולים הטיפול הקונבנציונלי נכשל לחסל את החיידק

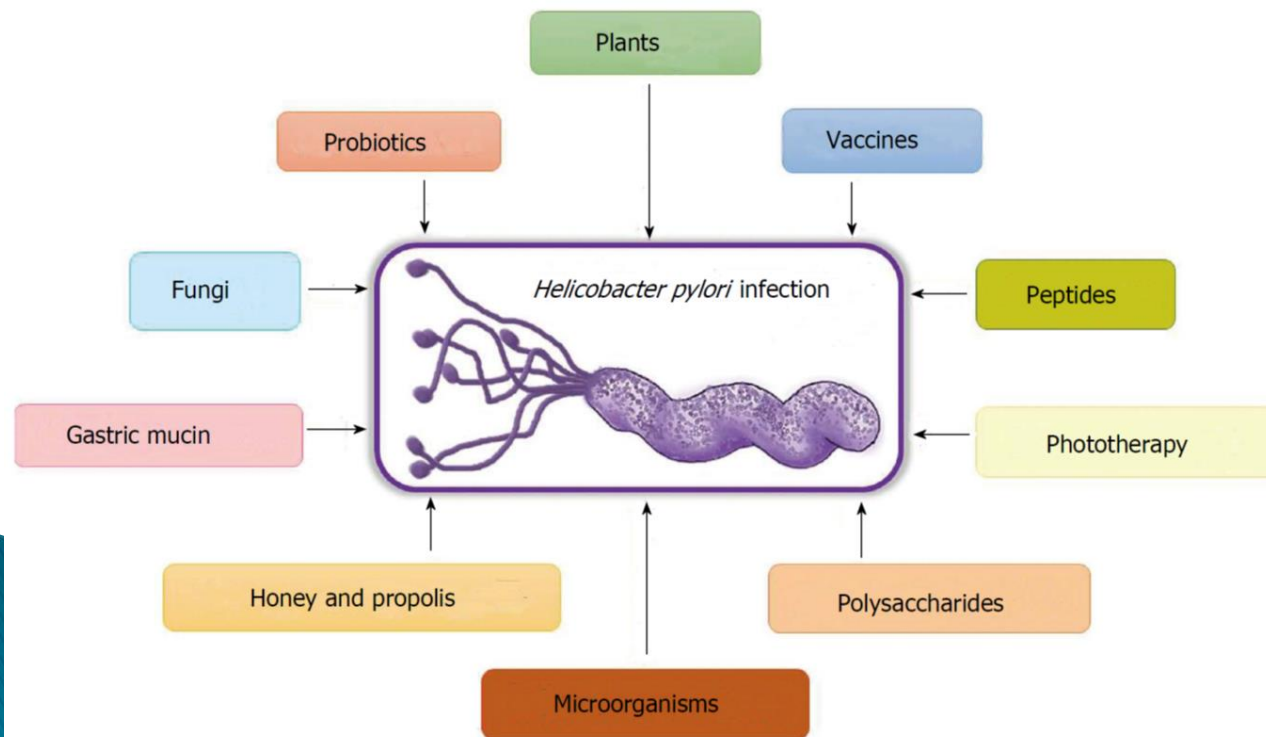
- סיבות :

- עמידות החיידק לאנטיביוטיקה ההולכת וגוברת
- אי התמדה בטיפול התרופתי
- תופעות לוואי בחלק מהחולים

אסטרטגיות לטיפול נגד חיידקים עמידים לאנטיביוטיקה

- ▶ פיתוח תרופות בעלי פעילות אנטימיקרוביאלית (קלאסית)
- ▶ פיתוח תרופות בעלי פעילות אנטיורולנטית (אנטיפתוגנית)

Ayala G *et al.* Alternative treatments for *H. pylori* infection



▶ מקורות:

- סינתזה כימית
- חומרים טבעיים

דוגמאות לצמחים שהפעילות שלהם נגד ה. פילורי נחקרה גם *in vivo*

plant	Compound	MIC	Effect/Mechanism of activity
Broccoli sprouts	Isothiocyanate sulphoraphane (SF)	2 µg/mL	Eradication in infected HEP-2 and from human gastric xenografts in nude mice
	SF		Temporary reduction of urease= Reduced colonization in humans
Green tea	Extract		H. reduction of inflammatory response in mice, and Gastritis prevention in Mongolian gerbils
	Catechins (Epigallocatechin gallate) (antioxidants)	8 µg/mL, IC50=13 µg/mL	Growth inhibition, Urease inhibition
	polyphenols		Inhibition of VacA toxin
Red wine	Resveratrol	6.25–25 µg/mL]	Growth inhibition, Urease inhibition
	polyphenols		Inhibition of ion and urea conduction in vitro, as well as cell vacuolisation induced by VacA in mice

Table 1 Suggested anti-*Helicobacter pylori* mechanisms of the foods and plant extracts

Agent administered	Major mechanisms
Cranberry	Bacteriostatic properties of proanthocyanidins Inhibition of adhesion to the human gastric mucosa <i>in vitro</i> Inhibition of adhesion and biofilm formation blocking Anti-oxidative and anti-carcinogen activity Proliferation suppression Urease inhibition Cytotoxic effect
Garlic	Antibacterial activity by thiosulphinates
Curcumin	Suppression of Matrix Metalloproteinase-3 and -9 expression in <i>H. pylori</i> infected human gastric epithelial cells Inhibition of the shikimate pathway, necessary for synthesis of aromatic amino acids Effect upon the production of IL-8, IL-1β, tumor necrosis factor-α and cyclooxygenase-2 in gastric mucosa
Ginger	Anti-oxidant and anti-ulcer activity Anti-inflammatory and anti-tumor activity Blocking H⁺, K⁺-ATPase action, inhibitory effects on the growth of <i>H. pylori</i>, DNA protection and inhibition of lipid peroxidation 6-gingerol enhances the tumor necrosis factor-related apoptosis by inhibiting nuclear factor kappa B
Pistacia Gum	Directly inhibiting the growth of <i>H. pylori</i>, particularly the CagA⁺ strains Induction of protrusions, morphological abnormalities, and cellular fragmentation in <i>H. pylori</i> cells Inhibition of neutrophil activation Triterpenic acids present in the acid extract

הפוטנציאל רפואי של צמחי מרפא

- ▶ צמחים עשויים לשמש כמקור לתכשירים אנטימיקרוביאליים (Phytotherapy) או כמקור לתרופות כ- Drug leads
- שימוש ניפרד בחומרים פעילים
- בשילוב עם אנטיביוטיקה (supportive treatment or) (Resistance-modifying agents –RMAs) (סינרגיזם)

מידת פעילות התמציות/החומרים המופקים מצמחים נגד ה. פילורי נמדדת לפי MIC

MIC= Minimal Inhibitory Concentration

מידת הפעילות	ערך ה- MIC	
חזקה	$< 10 \mu\text{g/mL}$	1
חזקה-בינונית	$10-100 \mu\text{g/mL}$	2
בינונית-חלשה	$100-1000 \mu\text{g/mL}$	3
חלשה	$> 1000 \mu\text{g/mL}$	4

Wang YC. Medicinal plant activity on Helicobacter pylori related diseases. 2013

מטרת המחקר

- לסרוק צמחים נבחרים הגדלים באופן טבעי בארץ בכדי לבודד ולזהות פרקציות וחומרים טבעיים הפעילים נגד ה. פילורי

הכנת ספריה של תמציות גולמיות ושמנים אתרים מצמחים

▶ הוכנו כ- 140 תמציות גולמיות ושמנים אתרים ממינים
וכימוטיפים שונים

▶ תמציות גולמיות:

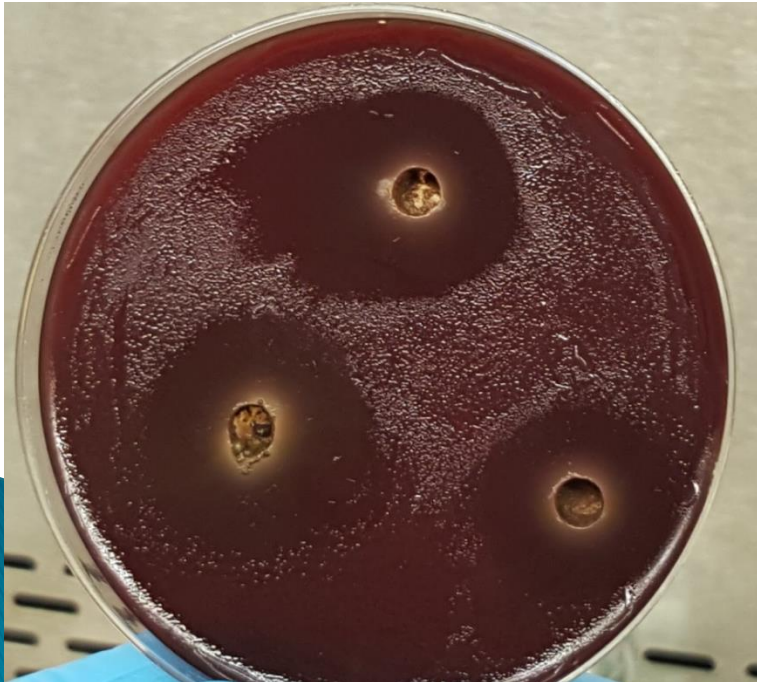
- מיצוי מעלים (5 גר') מיובשים באתנול (80%)
- ריכוז החומר ע"י אידוי
- ניצולת 10%–2 (ריכוז חומרים מומסים בין 100-500 מ"ג/ ליטר)

▶ שמנים אתרים:

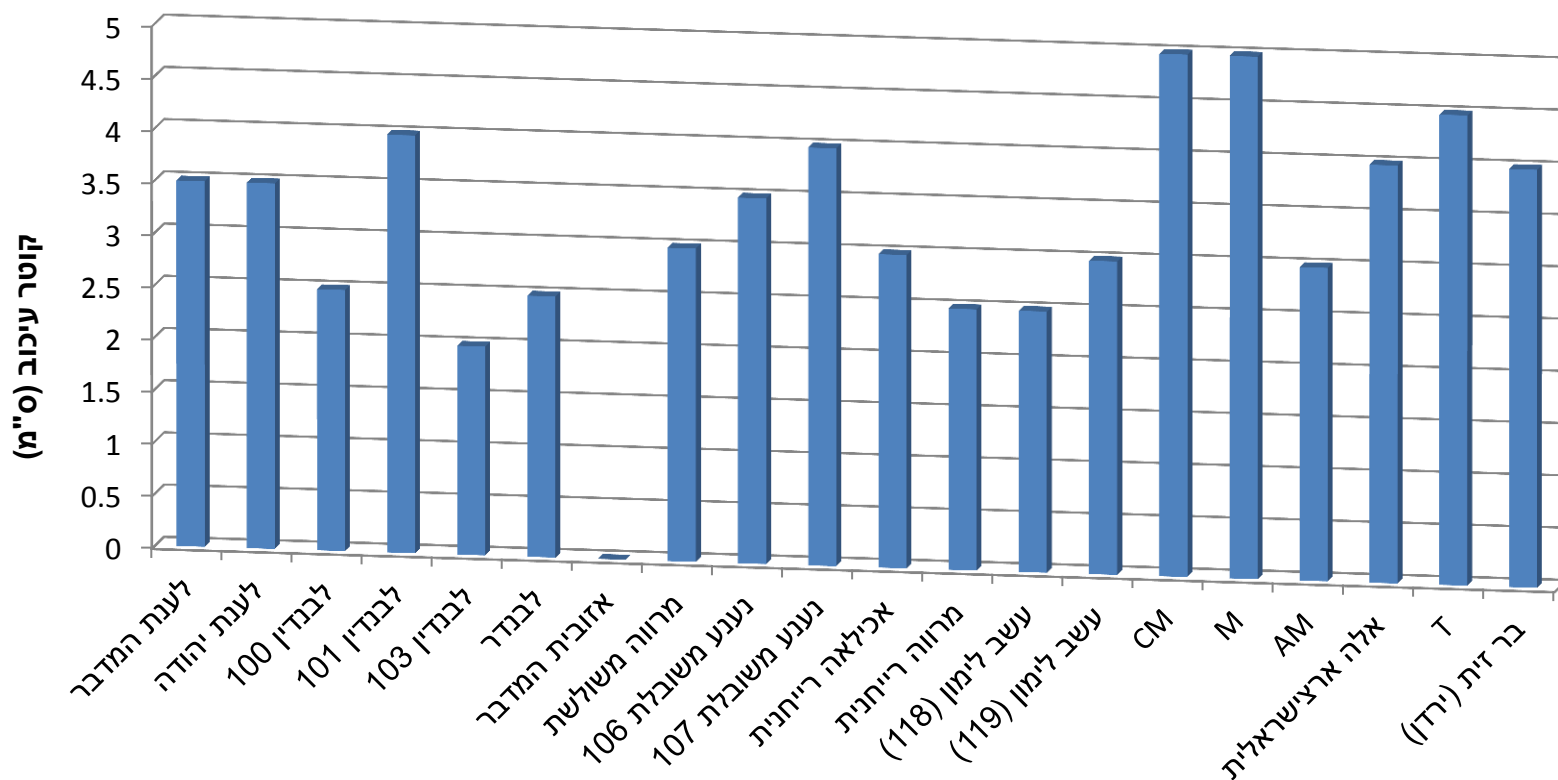
- מיצוי ע"י זיקוק

בדיקת הפעילות האנטיביוטית של התמציות הגולמיות/השמנים נגד ה. פילורי

- Agar well diffusion assay
- זן J99 ($cagA^+$ $vacA^+$)
- 10 מ"ג תמצית /באר, μ 3 (2 מ"ג) שמן/ באר
- Colombia agar supplemented with horse blood + *H. Pylori* Selective Supplement (Dent)
- Muller Hinton Agar supplemented with serum + Dent
- הדגרה ב- 37°C בתנאים מיקרואירופילים:
- CampyGen™; 5–8% O_2 , 12–15% CO_2

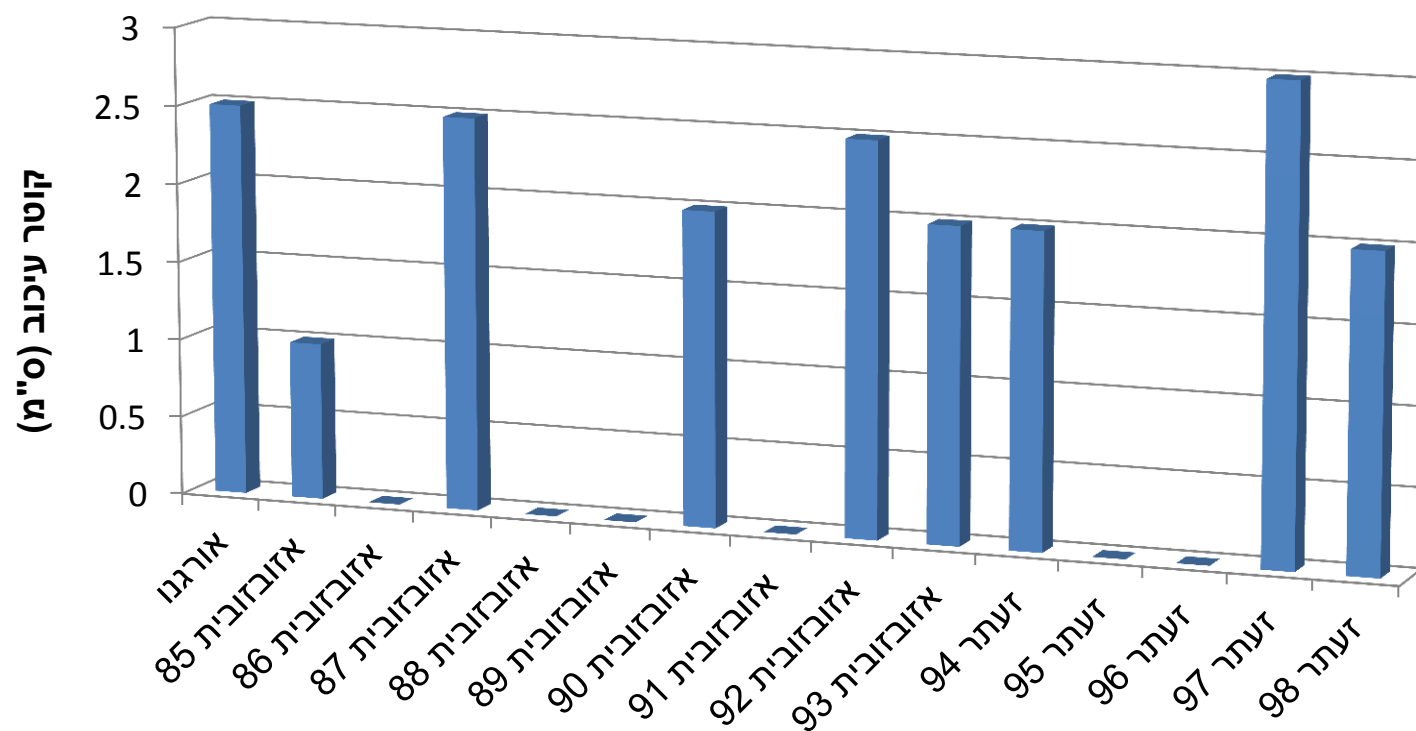


פעילות אנטיבקטרילית של תמציות אתנול גולמיות של מיני צמחים שונים



תמציות אתנול גולמיות (10 מ"ג/באר)

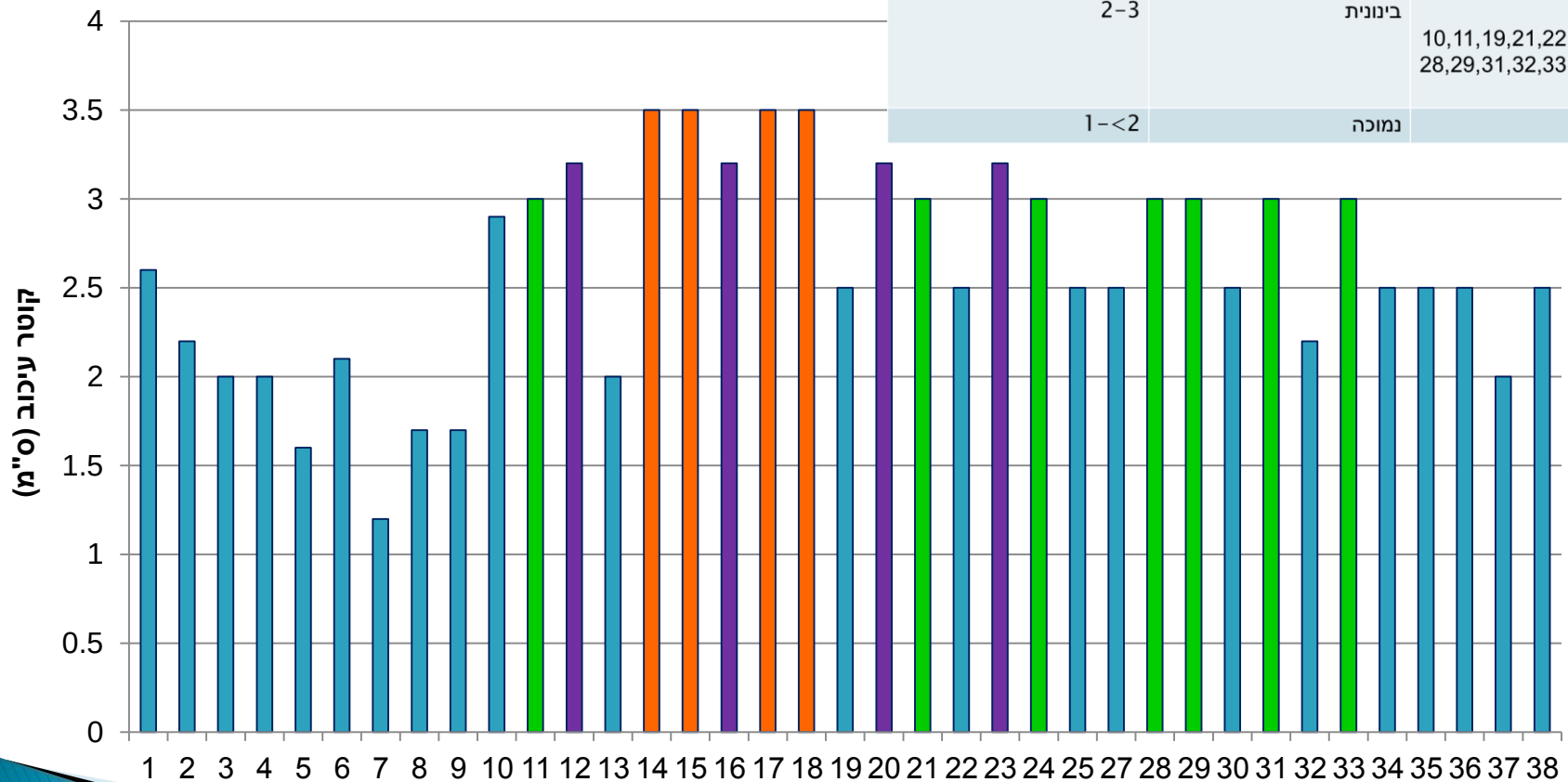
פעילות אנטיבקטריאלית של תמציות אתנול גולמיות של זעתר, אורגנו ואזובזובית



תמציות אתנול גולמיות (10 מ"ג/באר)

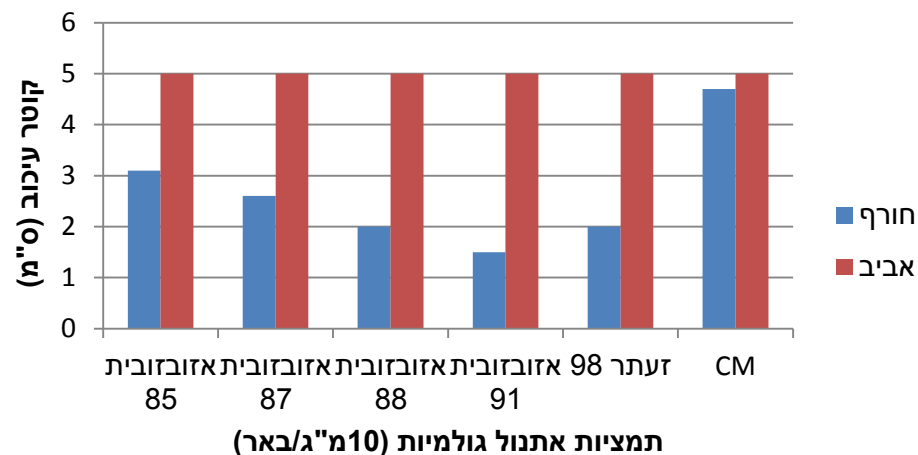
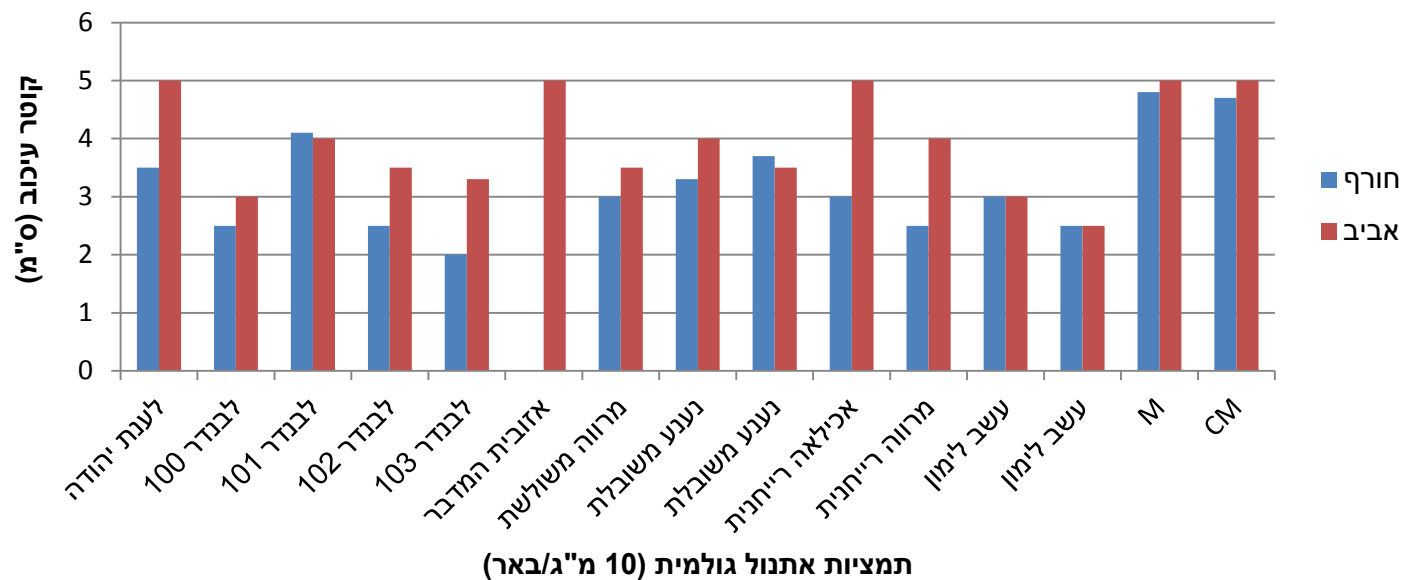
פעילות אנטיבקטרילית של תמציות גולמיות של כימוטיפים שונים של רוזמרין

כימוטיפ	רמת הפעילות האנטימקרוביאלית	קוטר עיכוב (ס"מ)
12, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 23	גבוה	$>3-3.5$
1, 2, 3, 4, 6, 10, 11, 19, 21, 22, 24, 25, 27, 28, 29, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38	בינונית	2-3
5, 7, 8, 9	נמוכה	$1-<2$

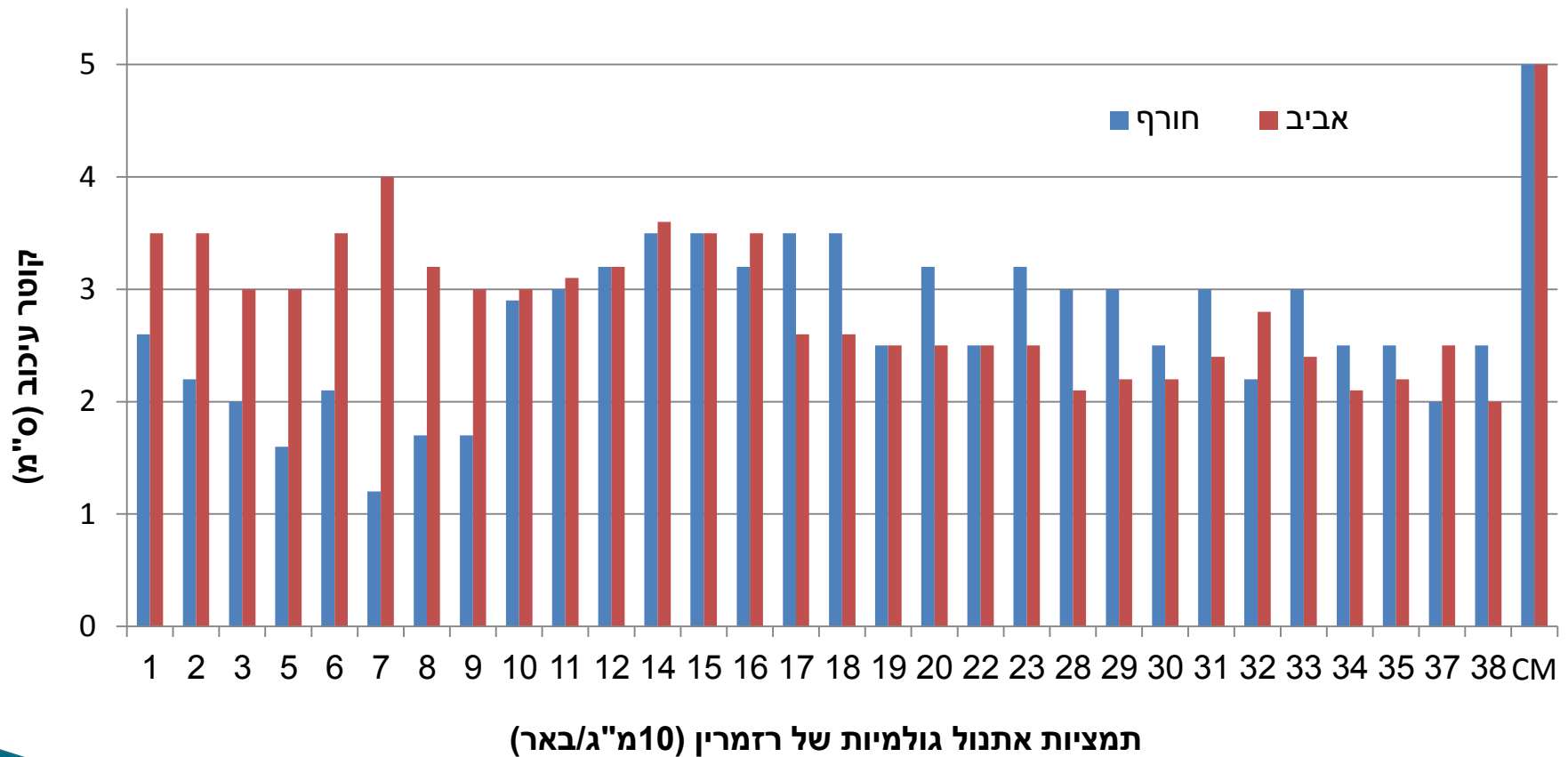


תמציות אתנול גולמיות (10 מ"ג/באר) של כימוטיפים שונים של רוזמרין

השפעת העונתיות על הפעילות האנטיבקטיראלית של תמציות הצמחים



השפעת העונתיות על הפעילות האנטיבקטיראלית של תמציות רוזמרין



חומרים ידועים ברוזמרין בעלי פעילות פרמצבטית

▶ חומרים נדיפים

▶ תרכובות פינול-

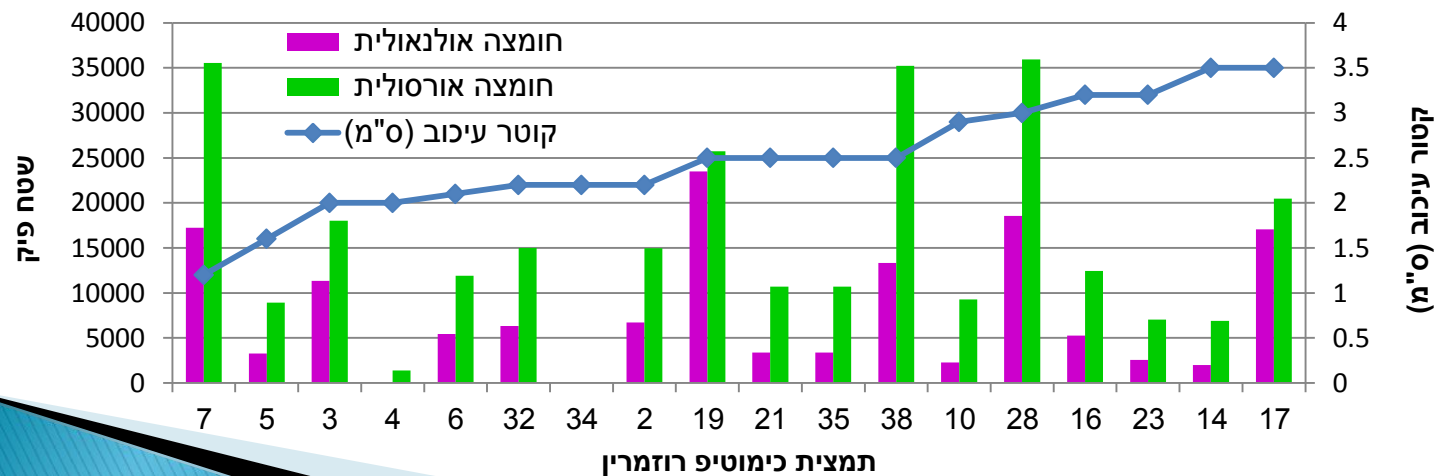
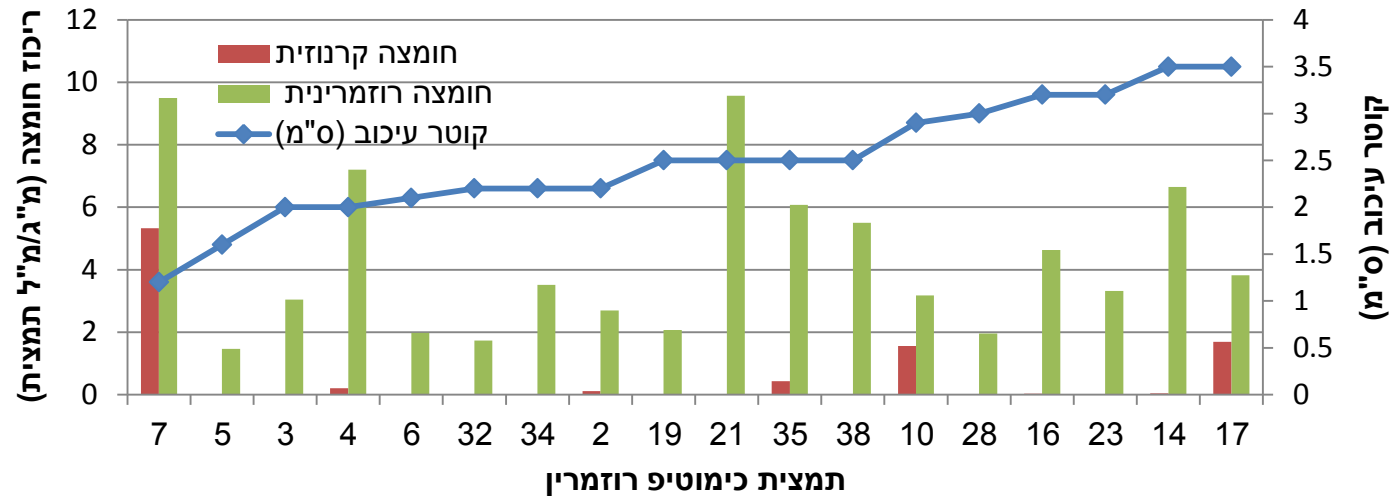
◦ חומצה רוזמרינית (פעילות אנטיאוקסידנטית ואנטידלקתית)

▶ פלבוניאידים ודיטרפנים שהם נגזרות של חומצה קרנוזית
(פעילות אנטיאוקסידנטית ואנטימיקרוביאלית)

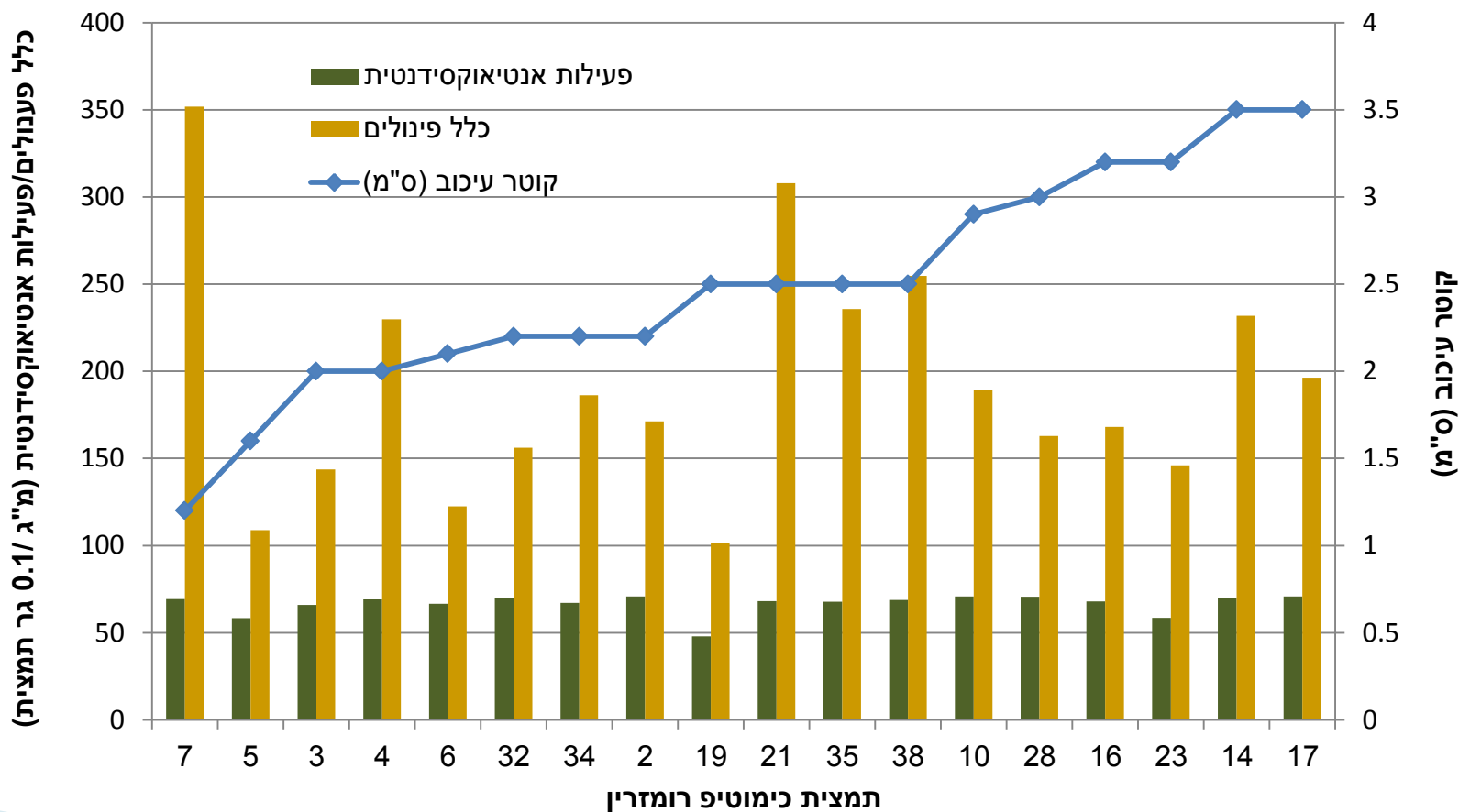
▶ טריטרפינואידים-

◦ חומצה אורסולית (פעילות אנטיסרטנית) ואולינאולית (פעילות
אנטיסרטנית ואנטיוראלית)

הקשר בין חומצות ברוזמרין לבין פעילות אנטיבקטריאלית

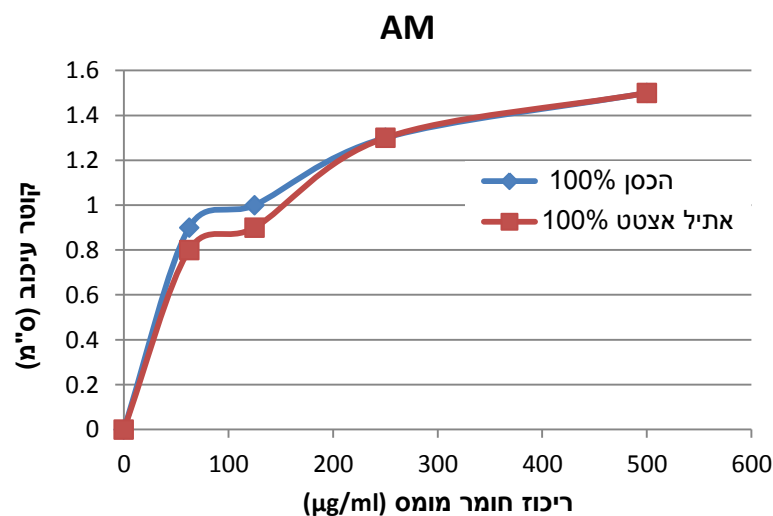
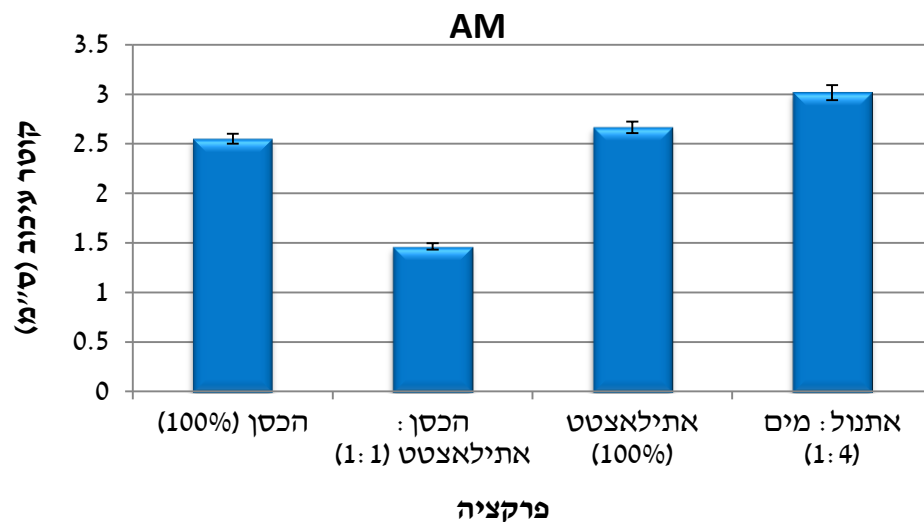
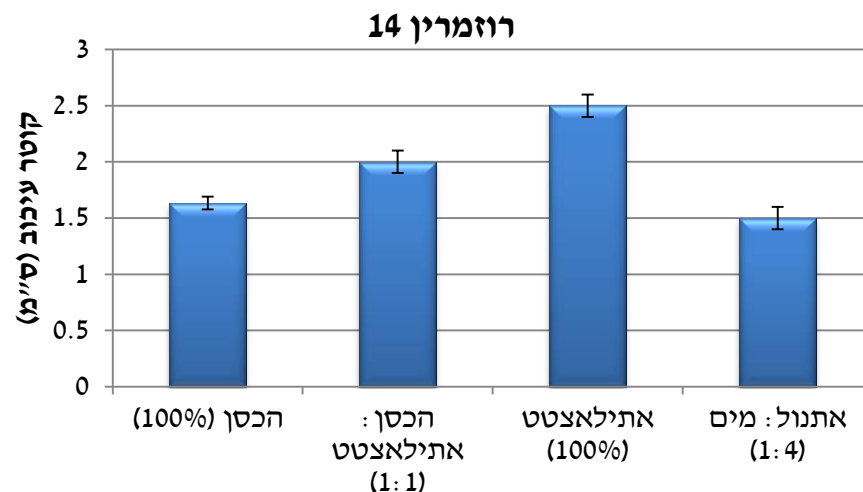
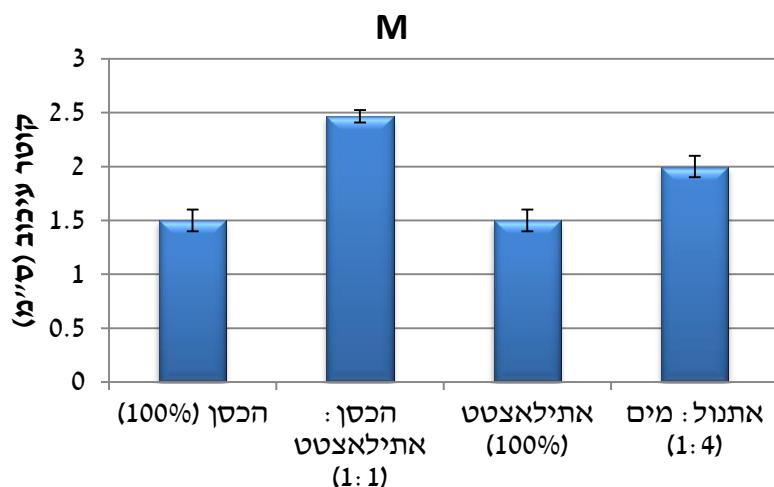


הקשר בין כלל פנולים ופעילות אנטיאוקסידנטית ברוזמרין לבין פעילות אנטיבקטריאלית

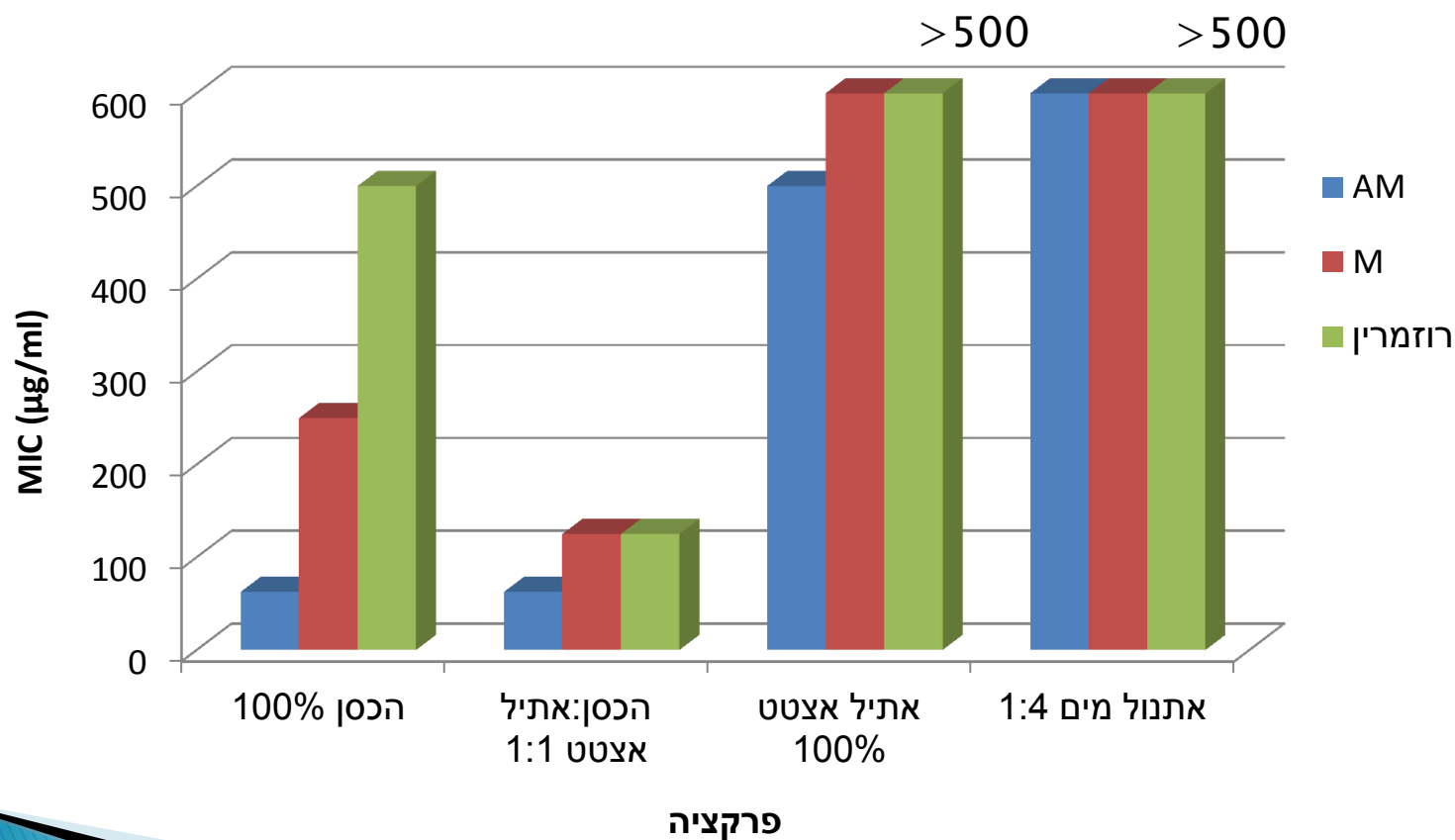


הפרדה תלוית בדיקת פעילות ביולוגית (Bioassay guided fractionation) ובידוד פרקציות/חומרים פעילים מהצמחים

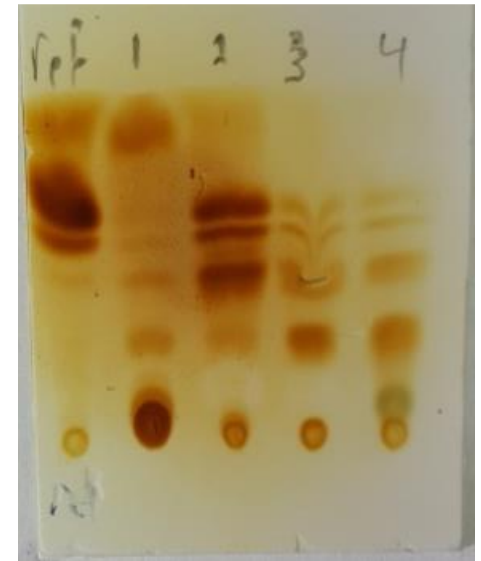
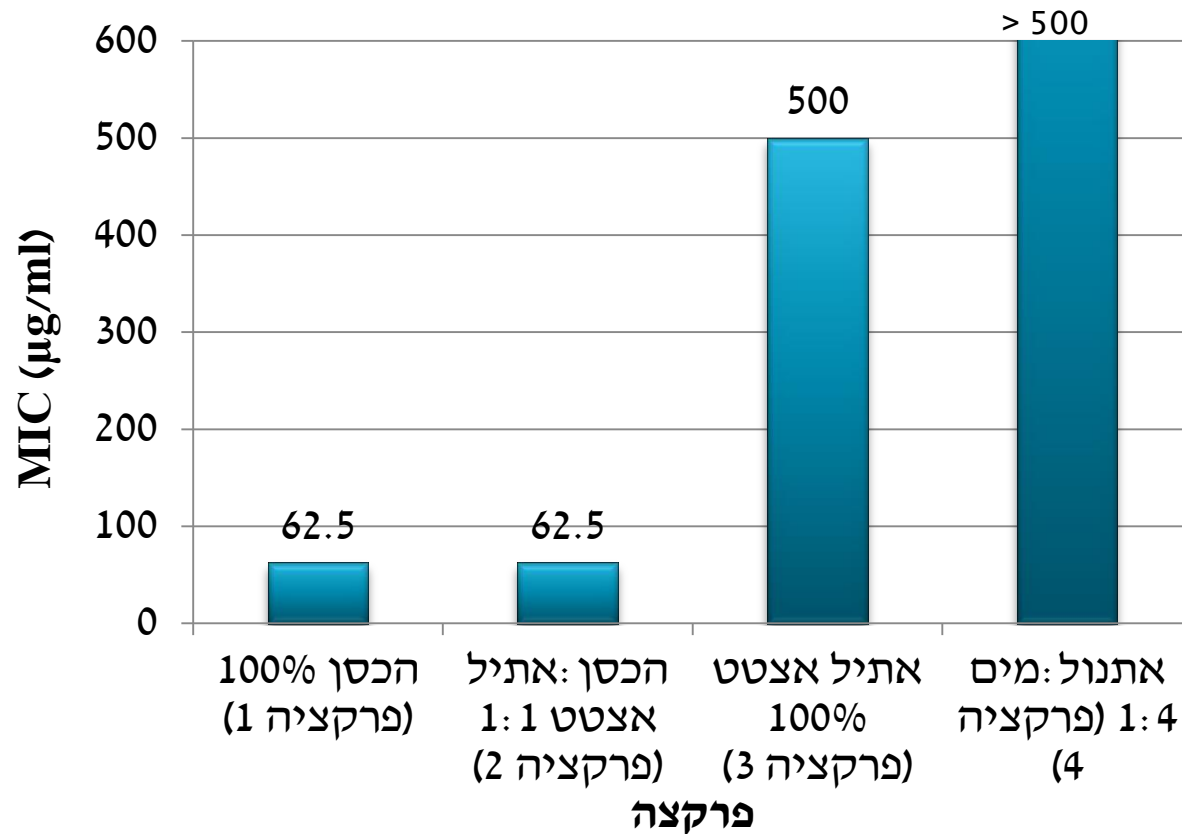
הפעילות האנטיבקטריאלית של פרקציות מצמחים נבחרים שנתקבלו בהפרדה תלוית מיצוי



MIC של פרקציות הצמחים הנבחרים



אנליזת TLC של פרקציות הצמח AM

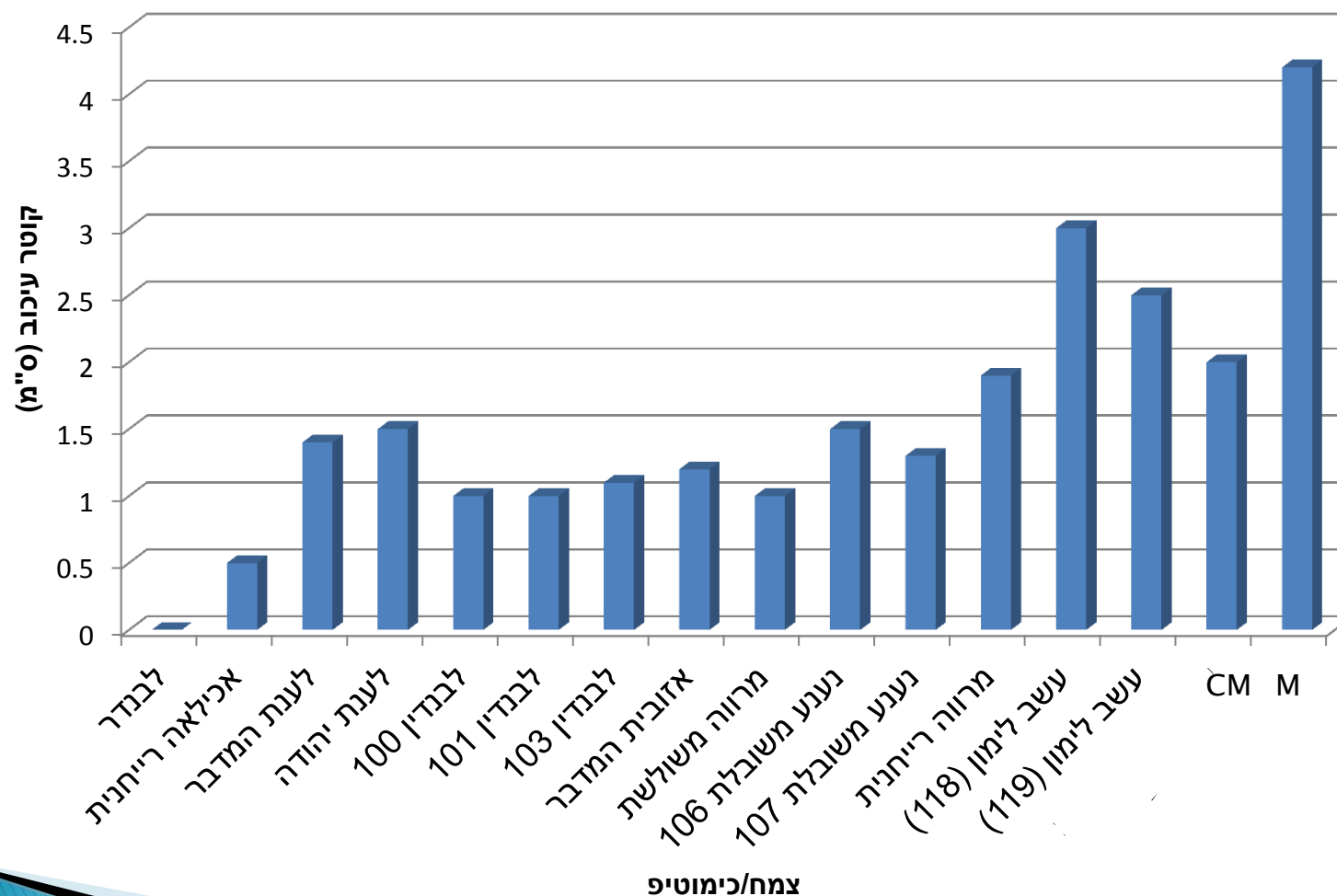


בדיקת TLC של
הפרקציות השונות

פעילות אנטיבקטרילית של השמנים אתרים שהופקו



פעילות אנטיבקטריאלית של שמנים אתרים בצמחים שונים



הקשר בין אחוז חומרים נדיפים לבין פעילות אנטימקרוביאלית בצמחים שונים

אחוז חומרים נדיפים

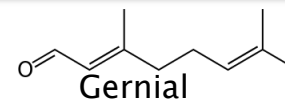
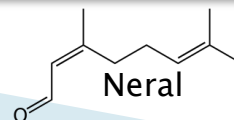
Artemisly acetate	Thujone-Z	Artemisia alcohol	Santolina alcohol	Yomogi alcohol	Camphen e	Caryophyllene oxide	α -Santalene	Borneol	Camphor	קוטר עיכוב (ס"מ)	צמח/כימוטיפ
					3.5	18.3	7.5	27	10.2	0	לבנדר (NE-10445)
9.6	4.9	12.8	23.1	7.4						0.5	אכילאה רייחנית (NE-10452))

אחוז חומרים נדיפים

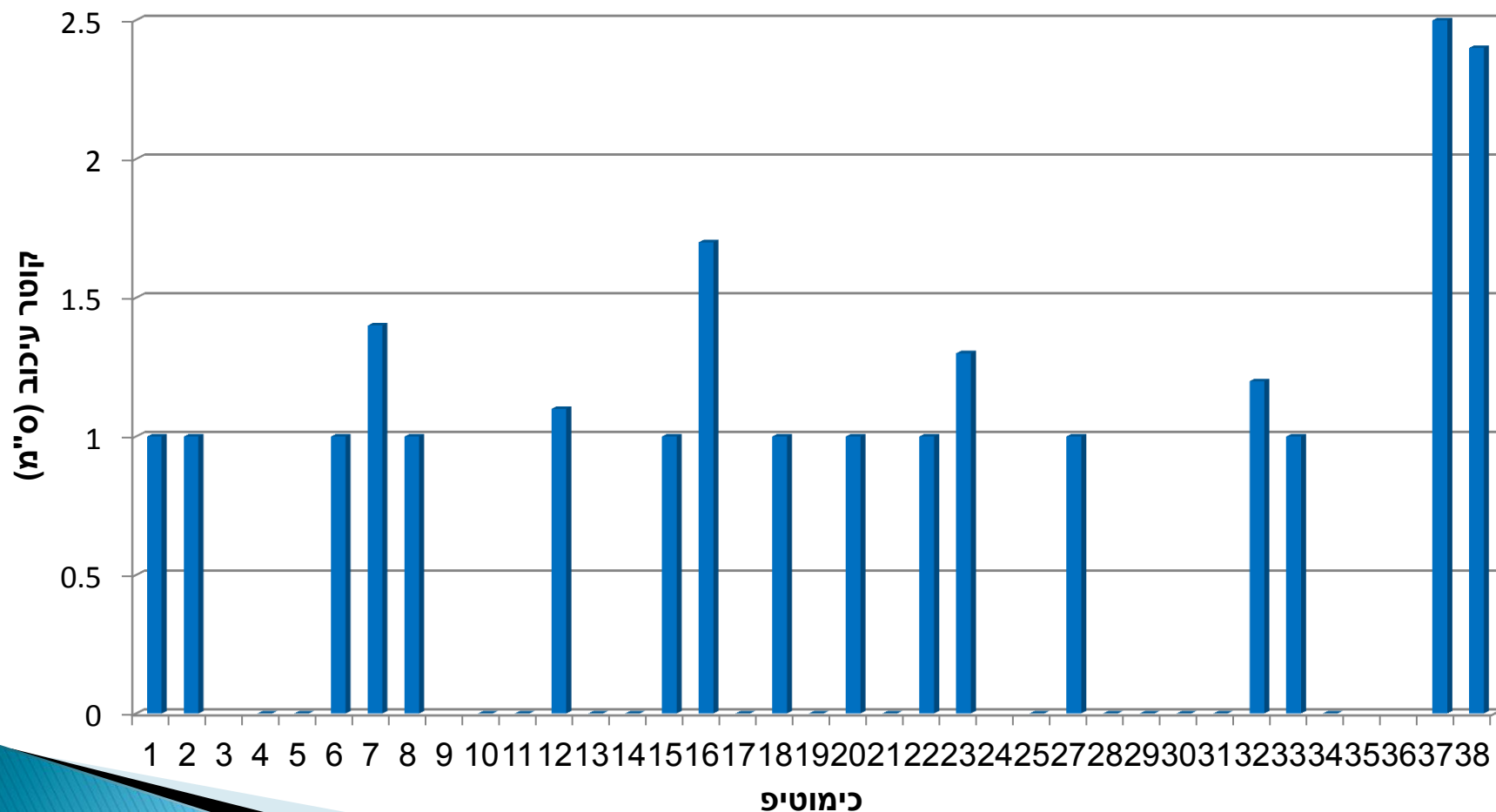
Caryophyllen E	Carvacrol	γ -Terpinene	p-Cymene	α -Terpinene	Myrcene	קוטר עיכוב (ס"מ)	צמח/כימוטיפ
4	46.62	11.6	11.38	4.31	4.2	2	CM

אחוז חומרים נדיפים

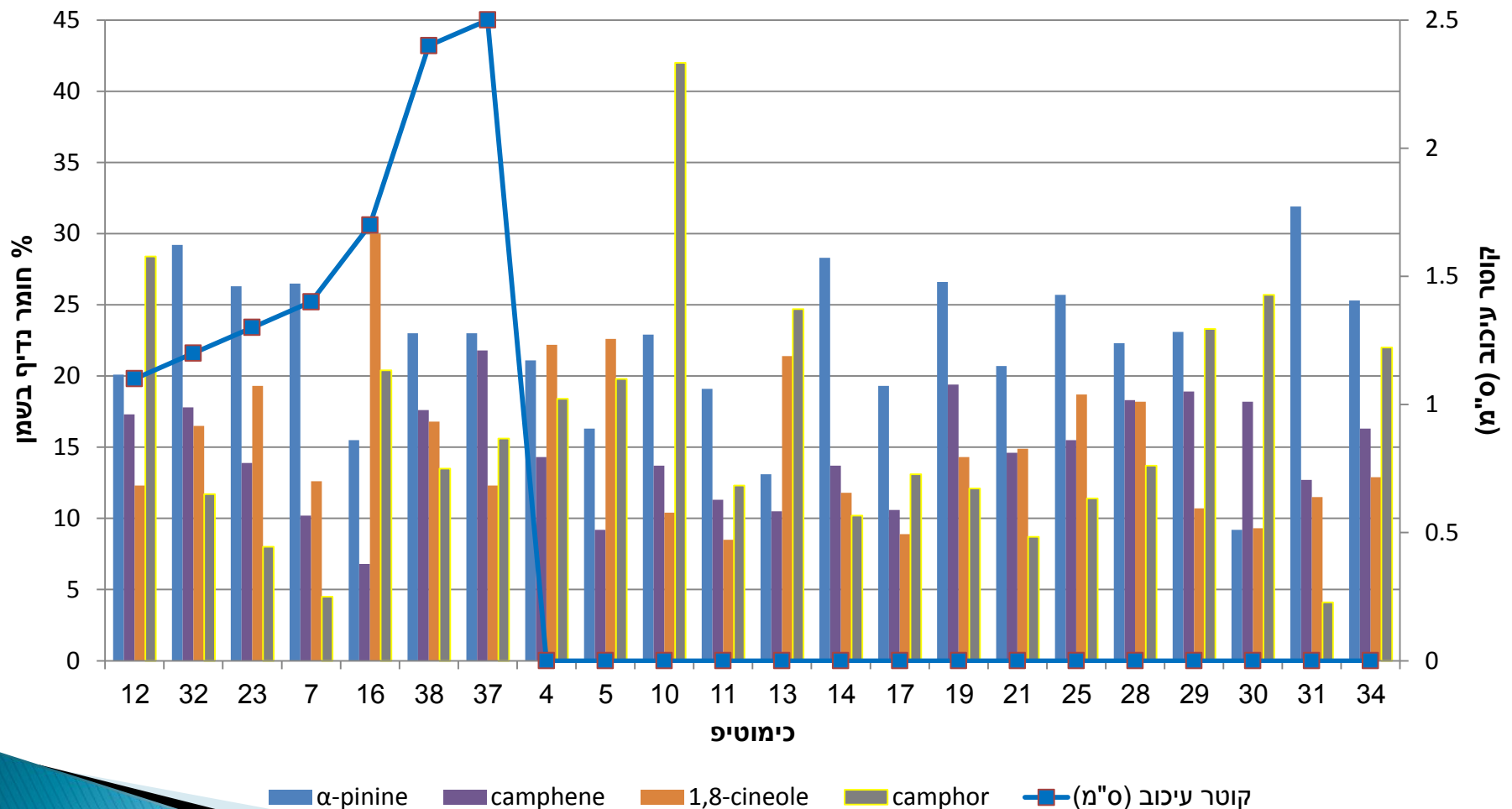
Caryophyllen E	Benzophenone	Thymol	Carvacrol	Geranial	Neral	קוטר עיכוב (ס"מ)	
	6.6	11.2	54.2	8.4	4	2.5	עשב לימון (NE-10462))
	7.6	8.7	23.7	28.8	13.6	3	עשב לימון (NE-10461))
9.92		2.52	23.73	26.73	16.3	4.2	M



פעילות אנטיבקטריאלית של שמנים אתרים ברוזמרין



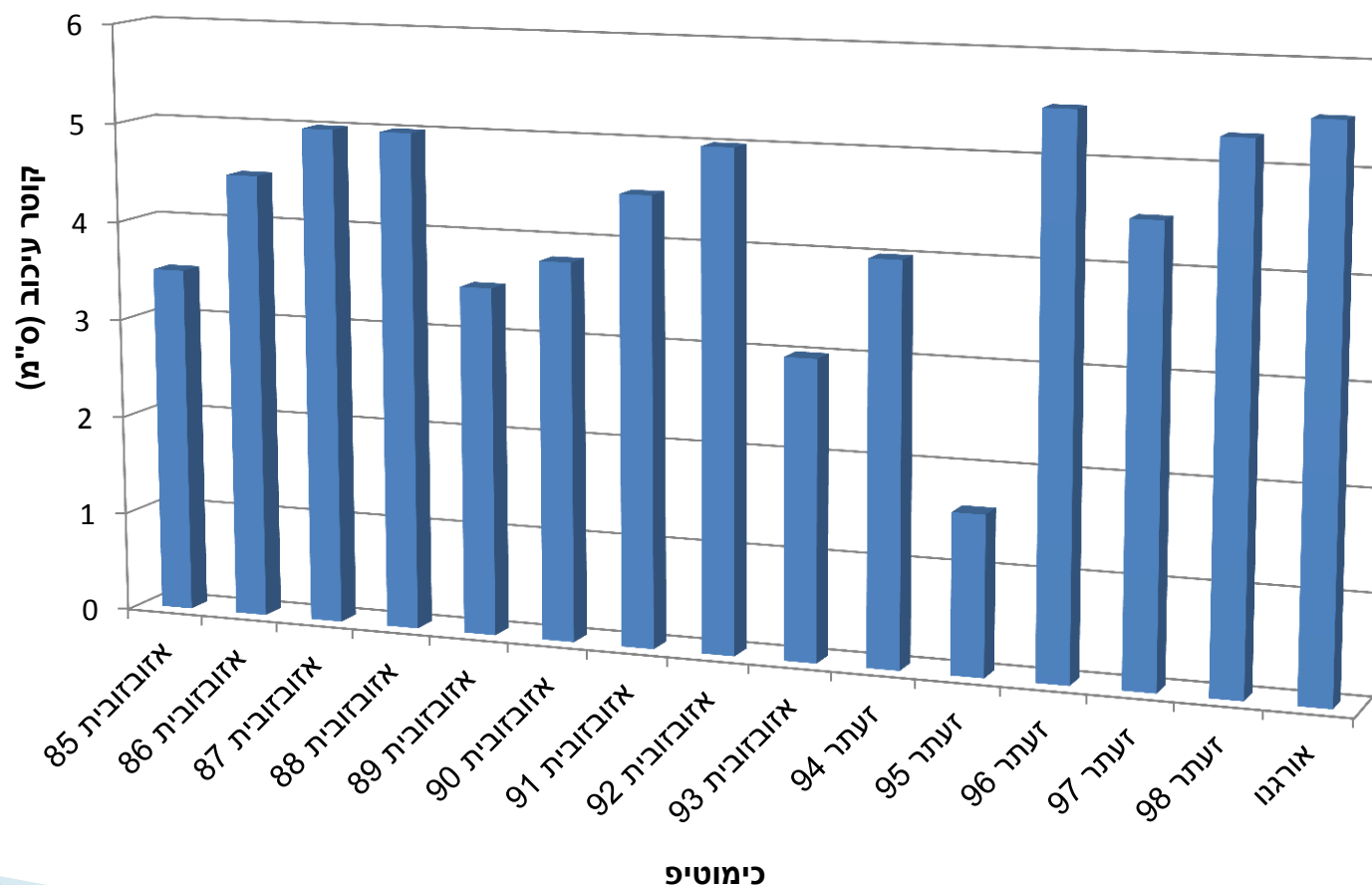
הקשר בין אחוז חומרים נדיפים ברוזמרין לבין פעילות אנטימקרוביאלית



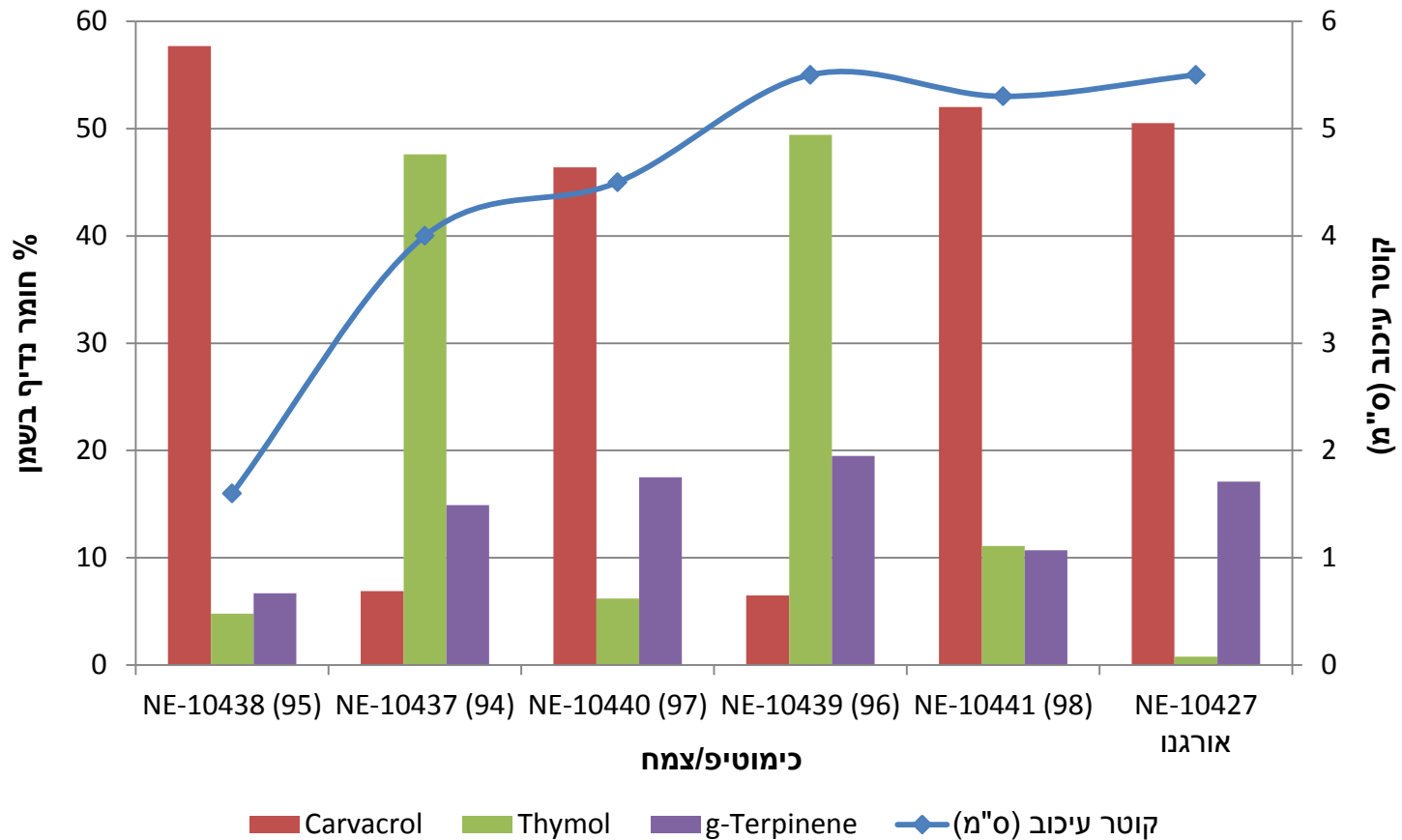
הרכב השמן ברוזמרין 37,38,14,17

	Chemotype			
Name	37	38	14	17
α -Pinene	23.0	23.0	28.3	19.3
Camphene	21.8	17.6	13.7	10.6
β -Pinene	1.0	0.9	1.1	0.4
Myrcene	0.8`	1.0	0.6	0.8
α -Terpinene	0.4	0.4	0.4	0.4
p-Cymene	1.3	2.4	1.4	2.2
Limonene	1.6	1.8	1.6	1.0
1,8-Cineole	12.3	16.8	11.8	8.9
γ -Terpinene	0.5	0.8	0.3	0.3
Camphor	15.6	13.5	10.2	13.1
trans-Pinocamphone	0.1	0.1	0.8	0.6
Borneol	5.1	4.1	9.9	5.0
Terpinen-4-ol	0.9	1.2	1.0	1.2
α -Terpineol	1.2	2.9	1.8	2.4
Verbenone	3.3	4.1	8.8	19.7
Bornyl acetate	2.5	1.8	3.1	12.1
Carvacrol	2.5	2.6	0.4	0.8
Eugenol			0.1	
Methyl eugenol			0.1	
Caryophyllene E	4.1	2.3	4.4	1.0
α -Humulene	2.3	2.6	0.3	0.2
γ -Muurolene		0.0		
Total			100	100

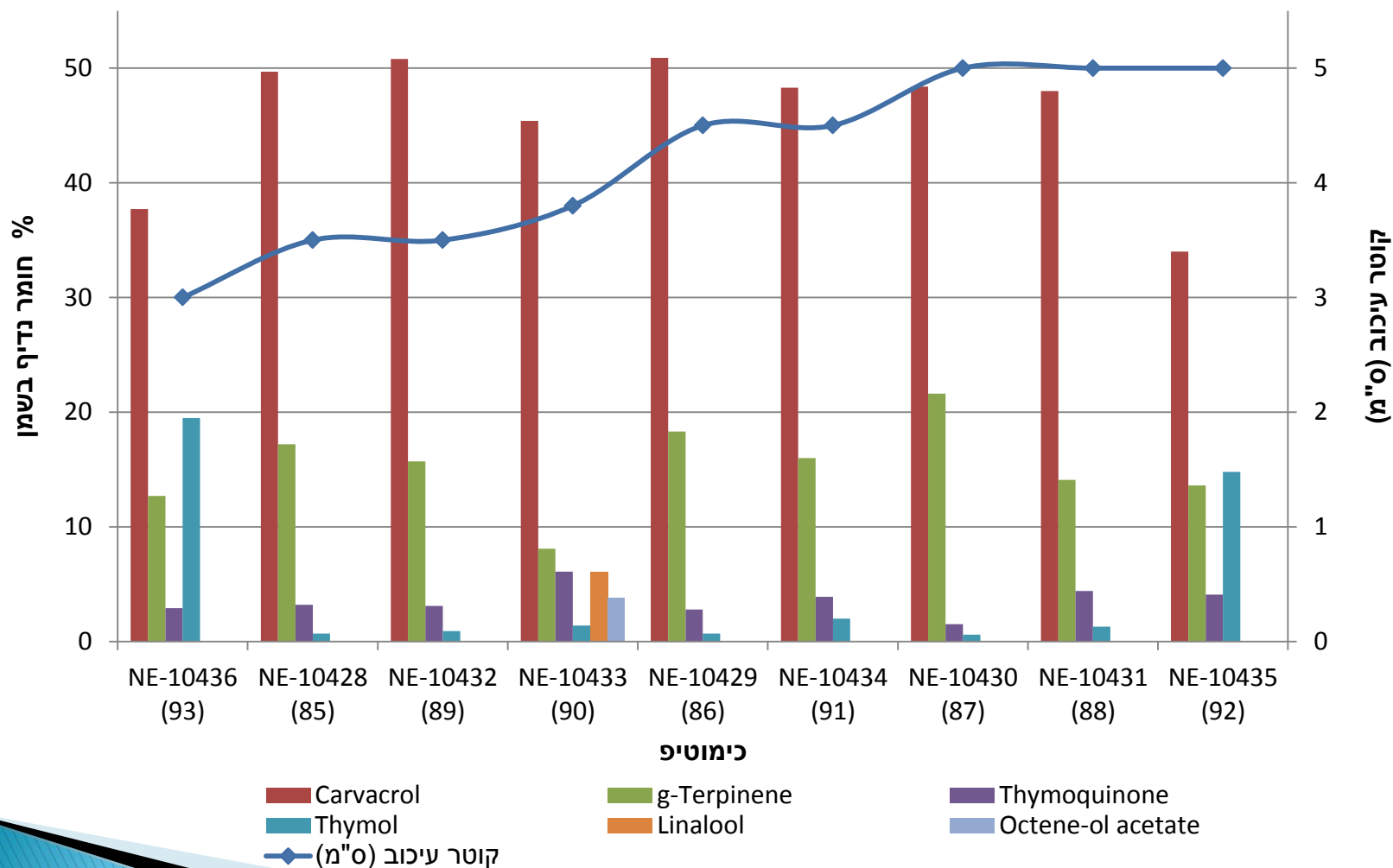
פעילות אנטיבקטריאלית של שמנים אתרים בזעתר, אורגנו ואזובזובית



הקשר בין אחוז חומרים נדיפים באורגנו וכימוטיפים של זעתר לבין פעילות אנטיבקטריאלית



הקשר בין אחוז חומרים נדיפים באזובזובית לבין פעילות אנטיבקטריאלית



סיכום

- ▶ ה. פילורי רגיש למגוון גדול של תמציות/שמנים אתרים של צמחים
- ▶ הפעילות האנטיבקטריאלית של תמציות הצמחים תלויה בכימוטיפ ומושפעת מעונות הקציר
- ▶ הפעילות האנטיבקטריאלית של התמציות והחומרים הנדיפים היא סינרגסטית
- ▶ קרבקרוול וטימול בשמנים אתרים הם חומרים פעילים עיקריים נגד ה. פילורי, אך לא היחידים
- ▶ לחלק מהצמחים שנחקרו קיים פוטנציאל תרפויטי משמעותי והם עשויים לשמש כתוספי מזון או כבסיס לגילוי תרופות נגד החיידק
- ▶ הצמח AM נראה צמח מבטיח כמקור לחומר פעיל שזהותו טרם ידועה
- ▶ קיים צורך בהוכחת הפעילות in vivo

שותפים למחקר

▶ המכון למחקר יישומי אגודת הגליל

- פרופ' חסן עזאיזה

- ד"ר אחמד יזבק

- ד"ר סארי עאסלה

- רנדא עזאזמה

▶ מכון וולקני

- פרופ' ניתב דודאי- היחידה לתירבות וטיפולוח ופיסיוולוגיה של צמחי תבלין, נווה יער.

- ד"ר יאן לנדאו- היחידה למדעי הצמח ומשאבי טבע.

▶ האוניברסיטה העברית

- פרופ. רם רייפן- הפקולטה לחקלאות, מזון וסביבה.

- ד"ר שמרית בר-אל- הפקולטה לחקלאות, מזון וסביבה.

תודה