

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

**CORSO DI LAUREA IN SCIENZE FARMACEUTICHE
APPLICATE**

Tesi di laurea

**Uso delle droghe vegetali e principi attivi per il
trattamento delle infezioni da *Helicobacter pylori*.**

Una revisione della letteratura.

RELATORE: PROF.SSA PAOLA BRUN

LAUREANDO: LISA SANTOMASO

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

INDICE

SOMMARIO.....	5
CAPITOLO I: Caratteristiche del batterio e dell'infezione da <i>Helicobacter pylori</i>	
1.1. Struttura di <i>Helicobacter pylori</i>	8
1.2. Meccanismo d'azione di <i>Helicobacter pylori</i>	9
1.3. Sintomi, trasmissione e metodi diagnostici per l'infezione da <i>Helicobacter pylori</i>	12
1.4. Prevalenza dell'infezione da <i>Helicobacter pylori</i> nel mondo.....	16
1.5. Storia degli antibiotici	20
1.6. Trattamento per l'eradicazione e antibiotico-resistenza.....	22
CAPITOLO II	
2.1. Scopo della tesi.....	28
CAPITOLO III	
3.1. Metodo di ricerca.....	29
CAPITOLO IV. Risultati: Uso delle droghe vegetali per il trattamento dell'infezione da <i>Helicobacter pylori</i>	

4.1. Metaboliti secondari delle piante.....	30
4.2. Polifenoli.....	31
4.3. Terpeni.....	38
4.4. Combinazione di composti di diversa classe fitochimica.....	50
CONCLUSIONI.....	60
BIBLIOGRAFIA.....	64

SOMMARIO

Il batterio *Helicobacter pylori* fa parte della grande famiglia dei batteri Gram negativi ed è un batterio microaerofilo. Questo batterio, si insedia nello stomaco, in particolare nella mucosa gastrica, a livello della quale si trova il tipico ambiente fortemente acido che caratterizza lo stomaco. Per poter sopravvivere in un ambiente con un pH così acido, *H. pylori* ha adottato delle strategie di sopravvivenza, come per esempio la produzione dell'enzima ureasi, il quale neutralizza l'acido creato nello stomaco. A causa dell'insospitale ambiente tipico dello stomaco, si è dubitato fortemente, per moltissimo tempo, che un batterio potesse insediarsi e continuare la sua crescita batterica. Tuttavia grazie a due medici australiani, Robin Warren e Barry Marshall, nel 1982 ne fu scoperta l'esistenza. Purtroppo questa infezione non è rara, infatti grazie a uno studio condotto nel 2015, si è scoperto che circa 4,4 miliardi di persone sono positive agli antigeni per *H. pylori*. Il continente più colpito dal batterio è l'Africa con il 79,1%, invece altri paesi hanno registrato una percentuale minore di prevalenza, come ad esempio in Nord America con il 37,1%. La prevalenza di infezione dipende da molti fattori come la differenza di urbanizzazione e lo stato socio economico. L'eradicazione è effettuata attraverso l'uso di antibiotici, però la strada verso la guarigione è molto tortuosa. Infatti a causa dell'antibiotico resistenza negli ultimi tempi la triplice terapia è stata abbandonata in favore della terapia con uso di quattro diversi antimicrobici. La crescente resistenza agli antibiotici ha portato tuttavia ad una progressiva riduzione dell'efficacia nell'eradicazione di *H. pylori*, perciò si stanno ricercando nuove strategie terapeutiche. Molti studi ad esempio propongono l'uso di droghe vegetali e dei rispettivi principi attivi per il trattamento dell'infezione. In questa tesi è stata condotta una analisi della letteratura per individuare studi di base riportanti l'uso di estratti vegetali per il

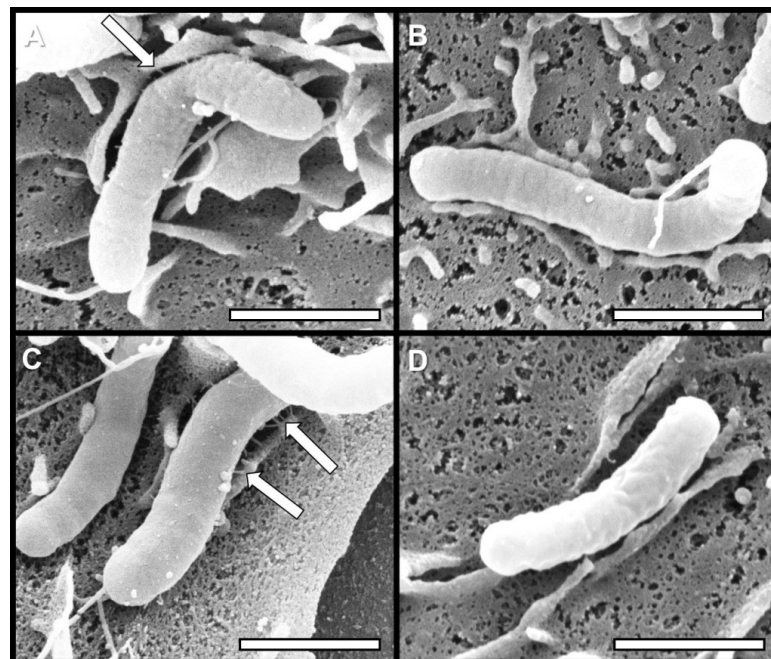
trattamento di infezioni da *H. pylori*. Gli studi scientifici sono stati ricercati nel motore di ricerca PubMed inserendo le parole chiave "*Helicobacter pylori* phytochemicals". PubMed ha restituito 106 articoli, dei quali ho letto in modo approfondito gli abstracts e successivamente ho diviso gli articoli scientifici in 4 sottogruppi. Il primo gruppo era composto da 16 articoli che trattavano del batterio e della specifica classe fitochimica in esame. Il secondo gruppo trattava del batterio, ma non si specificava la classe fitochimica delle sostanze. Il terzo raggruppamento affrontava più temi, tra cui quello del batterio *H. pylori*. Infine il quarto gruppo esponeva i danni causati da *H. pylori*. Dopo questa analisi iniziale si è deciso di utilizzare gli articoli del primo gruppo poiché erano gli unici studi che valutavano, nella quasi totalità, le proprietà dei principi attivi delle droghe vegetali in base alla classe fitochimica di appartenenza. I 16 articoli sono quindi stati analizzati in dettaglio, in particolare la sezione "Materials and methods", al fine di individuare il valore di MIC (Minimal inhibitory concentration) per ogni sostanza presa in considerazione. Inoltre per ogni articolo ho identificato se gli studi fossero stati eseguiti *in vivo* o *in vitro*. Infine ho ricercato i nomi specifici dei principi attivi e le classi fitochimiche di appartenenza. Ho potuto notare che la maggior parte degli articoli non erano revisioni e che i metodi di studio dominanti erano quelli *in vitro*. Le classi fitochimiche dominanti sono state quella dei polifenoli e quella dei terpeni. Ogni studio conduceva dei test diversi, tuttavia tali esperimenti hanno permesso di ottenere una panoramica migliore su questo argomento, che può aiutare a comprendere meglio le possibili attività contro *H. pylori*. Infatti i diversi composti ed estratti vegetali hanno dimostrato, con valori differenti: l'attività antibatterica delle molecole; l'inibizione di enzimi utili per la crescita batterica (ureasi, shikimato chinasi, prolina deidrogenasi etc.); valori di concentrazione minima bassi o simili agli antibiotici; gli efficaci meccanismi d'azione dei composti fitochimici per la distruzione del

batterio; una tossicità non rilevante delle molecole, nei confronti dell'uomo; l'ottima inibizione del biofilm prodotto da *H. pylori* e la creazione di interazioni additive tra composti fitochimici e antibiotici. Tuttavia, una limitazione di questo lavoro di tesi è la scarsa presenza di studi *in vivo*, negli articoli scientifici presi in considerazione. Perciò non si è potuto comprendere appieno l'attività dei composti bioattivi sull'organismo umano. Ciò nonostante tutti gli studi hanno dato i risultati sperati, confermando una azione antibatterica. Quindi grazie ai risultati raccolti dai diversi articoli, in questo studio di tesi è possibile affermare che, dopo ulteriori approfondimenti, con studi *in vitro* e soprattutto *in vivo*, non solo le terapie antibiotiche tradizionali ma anche i principi attivi di origine vegetale, potranno essere utili nel trattamento delle infezioni da *H. pylori*.

CAPITOLO I: Caratteristiche del batterio e dell'infezione da *Helicobacter pylori*

1.1. Struttura di *Helicobacter pylori*

Il batterio *Helicobacter pylori* fa parte della grande famiglia dei batteri Gram negativi ed è un batterio flagellato, microaerofilo, a forma di spirale (Figura1). Il batterio in questione può mutare la sua forma da elica a coccoide, poiché tale cambiamento è necessario per aumentare le possibilità di sopravvivenza di *Helicobacter pylori* nel microambiente gastrico dell'uomo. Le diverse forme che può acquisire il batterio hanno una differente funzione. Infatti la forma ad elica permette il movimento di *H. pylori* nello stomaco, invece la forma coccoide migliora la capacità di insediamento del batterio nello strato di muco dell'epitelio gastrico. Perciò queste mutazioni di forma, oltre ad essere una buona strategia di sopravvivenza, sono anche utili per incrementare l'invasività del batterio.



GIUSEPPE CHINDEMI. *HELICOBACTER PYLORI: ANTICO OSPITE DELL'UOMO NON SEMPRE DA ERADICARE*. MICROBIOLOGIA ITALIA, 2019

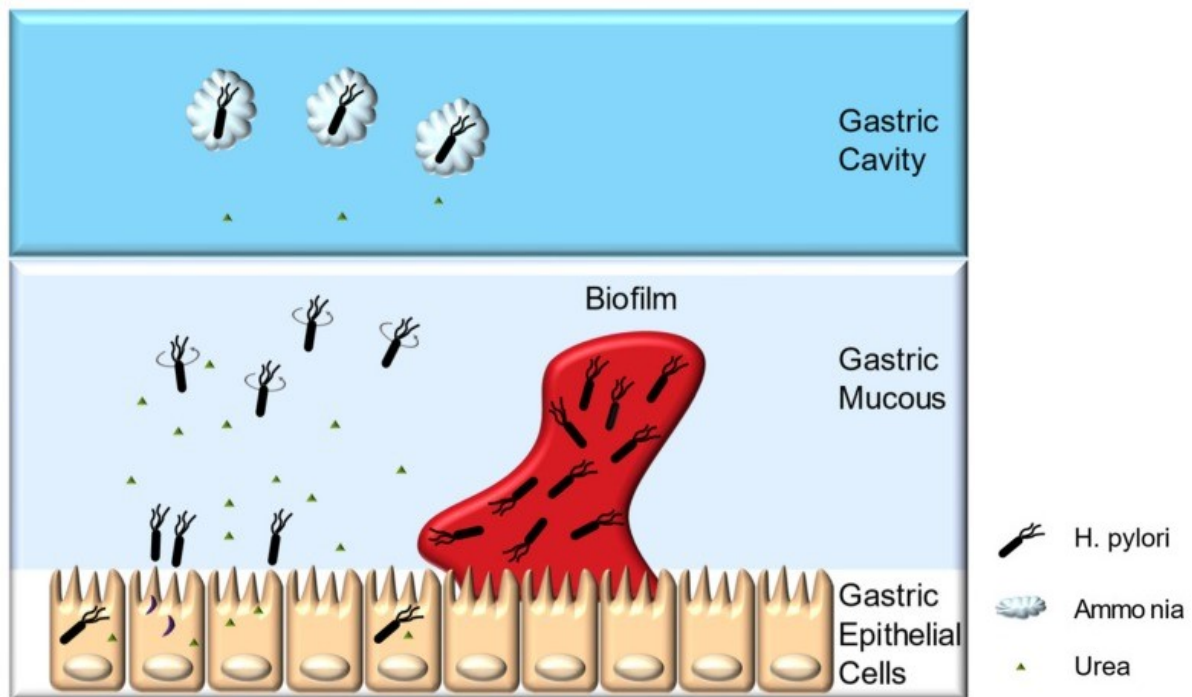
FIGURA 1. VISIONE DI *HELICOBACTER PYLORI* TRAMITE MICROSCOPIO ELETTRONICI.

Una caratteristica che differenzia i Gram-negativi da quelli positivi è la membrana esterna che, oltre ad essere composta da proteine, è costituita anche da un glicolide complesso grande e variabile, ovvero il lipopolisaccaride (LPS). Tra le funzioni di LPS ci sono la funzione barriera e la funzione di intermediario tra batterio e ambiente circostante. La struttura di *H. pylori* è uguale a qualsiasi altro Gram-negativo, perciò è composta da tre domini. Il primo dominio è un dominio idrofobico, o anche comunemente chiamato lipide A. Il secondo è un oligosaccaride centrale non ripetitivo, relativamente conservato e il terzo è un polisaccaride esterno variabile, ovvero l'antigene O. Ogni dominio ha una funzione diversa, infatti il lipide A influenza i recettori immunitari, che dona alla molecola LPS proprietà immunologiche e potenziali endotossiche. L'oligosaccaride centrale modula la permeabilità della membrana esterna e l'antigene O conferisce alla molecola l'antigenicità e la sierospecificità.

1.2. Meccanismo d'azione di *Helicobacter pylori*

Il batterio *Helicobacter pylori*, quando entra nell'organismo umano si insedia nello stomaco, in particolare nella mucosa gastrica, a livello della quale si trova il tipico ambiente fortemente acido che caratterizza lo stomaco (Figura 2). Come tutti i batteri anche *H. pylori* può provocare malattia solo se colonizza la sede di infezione con successo, e per fare ciò necessita di un pH che si aggira intorno a 8,5, al fine di raggiungere un'ottima crescita batterica. Quindi davvero molto basico, rispetto al pH che si ritrova nella cavità gastrica. Per poter sopravvivere in un ambiente con un pH così acido, *H. pylori* ha adottato delle strategie di sopravvivenza. I fattori di virulenza utili per facilitare la tolleranza batterica nel microambiente acido sono: l'Ureasi,

L'arginasi, l'adesina legante l'acido sialico, il gene promotore dell'ulcera duodenale A, la proteina Q della membrana esterna e la proteina Z della membrana esterna.



JI J, YANG H. USING PROBIOTICS AS SUPPLEMENTATION FOR HELICOBACTER PYLORI ANTIBIOTIC THERAPY. INT J MOL SCI. 2020.

FIGURA 2. COLONIZZAZIONE DI *HELICOBACTER PYLORI*.

Tuttavia le principali proprietà di *H. pylori*, che gli permettono di colonizzare lo stomaco sono: l'enzima ureasi, il sistema chemiotattico e la mutabilità nella forma. Grazie a queste caratteristiche *Helicobacter pylori* può resistere al breve passaggio nell'acido gastrico, penetrare lo strato mucoso ed infine insediarsi nell'ambiente con un pH neutro. Inoltre per poter avere un prolungamento della permanenza nel sito anatomico prestabilito, il batterio si avvale della capacità di potersi aderire alle cellule epiteliali gastriche, del sistema enzimatico, a scopo antiossidante e della possibilità di secernere biofilm. Le precedenti proprietà oltre ad essere molto importanti nell'azione della colonizzazione, rappresentano il 10% della sua massa proteica totale. L'enzima ureasi, svolge il compito di idrolizzare l'urea per ottenere anidride carbonica e ammoniaca. Quest'ultima, conosciuta per la sua basicità, è efficiente nel tamponare gli acidi gastrici che circondano il batterio, in modo tale da conservarne la vitalità. Oltre a

ciò, la morfologia della mucosa gastrica ha un impatto significativo sul valore del pH. Come già detto, l'ureasi è utile per aumentare il pH, tuttavia comporta seri danni alla mucosa gastrica, la quale si scoglie in presenza di pH non più acido e permettendo perciò maggior libertà di movimento al batterio.

Parlando ora del sistema di chemiotassi, dei flagelli e della morfologia a spirale di *H. pylori*, tali elementi sono indispensabili ad una maggiore facilità di attraversamento dello strato mucoso. L'urea oltre ad essere il substrato dell'ureasi, ha anche la funzione di molecola segnale in questo sistema di chemiotassi. Infatti *H. pylori* utilizza tale sistema per individuare il gradiente di pH, l'urea e gli amminoacidi secreti dalle cellule ospiti, per potersi poi collocarsi. In tutto ciò, il sistema di chemiotassi è in condizione di recapitare segnali di avversità, permettendo così a *H. pylori* di allontanarsi dall'ambiente sfavorevole alla sua crescita batterica. L'interezza del sistema di chemiotassi è essenziale per la patogenesi di *H. pylori*. Infatti uno studio condotto da McGee *et. al.* (2005) ha dimostrato che, la carenza nel batterio *H. pylori* di certi regolatori del sistema chemiotassico, comportano una minor capacità di colonizzazione e una diminuzione nella risposta infiammatoria. Infine i flagelli e la morfologia a spirale di *H. pylori*, aumentano la possibilità di passare in modo veloce lo strato mucoso. Tale affermazione è dimostrata da alcuni esperimenti condotti con flagelli incompleti, i quali avevano minor mobilità e questo portava quindi ad una minor capacità infettiva. Per quanto riguarda la morfologia a spirale è utilissima per perforare lo strato mucoso gastrico, poiché i mutanti perdono circa dal 7% al 21% di velocità di intrusione.

Dopo aver effettuato l'attraversata dello strato mucoso, *Helicobacter pylori* si può concentrare sull'invasione dello spazio che si trova tra lo strato mucoso e le cellule epiteliali gastriche, avvalendosi delle sue proprietà di creare biofilm, del suo sistema enzimatico antiossidante, di adesione e di occupazione delle cellule epiteliali gastriche. Esperimenti condotti da Bugli *et. al.* (2016) evidenziano che la formazione di biofilm sulla mucosa gastrica, porta inesorabilmente ad una maggiore resistenza ai farmaci e al sistema immunitario, ma soprattutto agli antibiotici. Tale fenomeno di antibiotico-

resistenza è causato dalla costante generazione di mutazioni di resistenza ai farmaci. Altro meccanismo essenziale per la sopravvivenza del batterio è il suo sistema enzimatico antiossidante, utile per resistere all'attacco ossidativo, delle diverse sostanze appartenenti alla risposta immunitaria del malato.

1.3. Sintomi, trasmissione e metodi diagnostici per l'infezione da *Helicobacter pylori*

A causa dell'insospitale ambiente tipico dello stomaco, si è dubitato fortemente, per moltissimo tempo, che un batterio potesse insediarsi e continuare la sua crescita batterica. Tuttavia grazie a due medici australiani, Robin Warren e Barry Marshall, nel 1982 ci fu un'incredibile e inaspettata svolta nel mondo della batteriologia. Come le più grandi scoperte, anche questa fu accidentale, infatti i due ricercatori avevano scordato nel proprio laboratorio delle piastre contenenti del succo gastrico. Diverso tempo dopo le ritrovarono e, con loro grande stupore, notarono la formazione di alcune piccole colonie batteriche; in seguito con l'analisi della piastra si confermò la presenza di *Campylobacter pyloridis*, che cambiò poi in *Helicobacter pylori*. Il nome attuale è decisamente più adatto al precedente, poiché "Helicobacter" indica la forma del batterio, ovvero a spirale, invece "pylori" vuole ricordare il sito di insediamento del microorganismo, cioè il piloro (orifizio con cui lo stomaco comunica con l'intestino). L'infezione da *H.pylori* è difficile da individuare poiché non esistono sintomi specifici (nausea, reflusso gastroesofageo, dolori di stomaco ecc.), inoltre bisogna ricordare che molte persone non manifestano alcun sintomo. Tuttavia i danni causati dal batterio in questione possono essere veramente importati, infatti può provocare: ulcera peptica e duodenale, linfoma MALT e carcinoma gastrico. *Helicobacter pylori* a causa delle conseguenze che riporta all'organismo umano, è stato molto studiato anche dall'AIRC (Agenzia internazionale per la Ricerca sul Cancro), il quale lo ha inserito, nel 1994, nel gruppo 1 della tabella delle sostanze cancerogene. Le sostanze che si trovano nel gruppo 1 sono quelle che non dimostrano evidenze di cancerogenicità negli esseri

umani, ma sufficienti evidenze negli animali di laboratorio. Inoltre, negli ultimi anni sono stati eseguiti degli studi che hanno ricercato una correlazione tra la presenza di *H. pylori* e l'insorgenza di manifestazioni cliniche extragastriche. Le possibili malattie associate all'infezione da *H. pylori* riguardano l'ambito neurologico, dermatologico, ematologico, oculare, cardiovascolare, metabolico e allergico. Per quanto riguarda le modalità esatte e le vie di trasmissione dell'infezione da *Helicobacter pylori*, non ci sono attualmente informazioni chiare e dimostrate. A parte la trasmissione iatrogena, che è stata confermata con l'endoscopia, le altre modalità di trasmissione si possono solo supporre. Attraverso gli studi si è ipotizzato, che la via di trasmissione più probabile sembra essere quella interpersonale, ovvero per via orale (ad esempio attraverso vomito e soprattutto saliva) e per via oro-fecale. Questa teoria è rafforzata dall'aumento dell'incidenza dell'infezione in spazi familiari sovraffollati e da una scarsa conoscenza delle adeguate norme igieniche. Per di più altri studi hanno rilevato DNA di *Helicobacter pylori* nel vomito, nelle feci e nella saliva, di soggetti positivi all'infezione. Inoltre anche l'acqua può essere un fattore di rischio, poiché può essere contaminata ad esempio dalle feci. Infine si è supposto che la mosca comune potesse essere un serbatoio per *Helicobacter pylori*, poiché la mosca è portatrice di diverse malattie. Tuttavia non ci sono ancora state conferme riguardo a questa ipotesi.

Esistono diversi metodi diagnostici per poter confermare la presenza di *H. pylori* come ad esempio attraverso l'istologia. Questa tecnica consiste nell'osservare i vari tipi di batteri, che possono essere riconosciuti su specifici vetrini tissutali, durante una risposta infiammatoria del tessuto. Questa analisi è resa possibile grazie all'aiuto di colorazioni, come quella di Giemsa, oppure attraverso l'immunocolorezione per la ricerca di patogeni.

Un altro test diagnostico molto utilizzato per il rilevamento di *H. pylori* è il test rapido dell'ureasi, conosciuto anche con l'acronimo RUT. Il test consiste nell'uso di un campione biotico, nel quale è presente *H. pylori*, e di un reagente. L'esperimento valuta e calcola l'aumento di pH che si genera quanto il reagente viene a contatto con

il campione biotico. L'aumento di pH è causato dalla conversione del reagente del test da urea ad ammoniaca.

Il test rapido dell'ureasi, come si può intendere dal nome, è un test diagnostico rapido, decisamente poco costoso, specifico, semplice da eseguire e ampiamente diffuso. Per il rilevamento dell'infezione da *H. pylori* ci si può avvalere della reazione a catena della polimerasi (PCR). Recenti studi condotti da Al-Moayad *et al.* hanno dimostrato che la PCR standardizzata possiede una specificità maggiore rispetto alla RUT, ma soprattutto può vantare una superiore sensibilità poiché rileva, in campioni presi in analisi, cariche batteriche molto esigue rispetto a RUT. Unico lato negativo dei tre metodi sopra descritti è che per poterli eseguire è necessario sottoporre il paziente ad un'endoscopia. Tuttavia il progresso scientifico raggiunto nei test diagnostici non invasivi, ha reso possibile preferire e dare maggiore priorità a metodi diagnostici alternativi, dove l'endoscopia non è indispensabile.

Quindi, dopo aver appurato l'efficacia dei metodi diagnostici non invasivi, al giorno d'oggi il test maggiormente utilizzato è l'urea breath test (UBT). Questo perché l'UBT è riproducibile, non radioattivo e sicuro, infatti all'esame vengono sottoposti anche bambini e donne in gravidanza. Inoltre molti studi e meta-analisi hanno confermato che la sensibilità e la specificità dell'urea breath test sono superiori al 95% rispetto ai risultati di altri metodi diagnostici e della sierologia, perciò tale test, per le diverse caratteristiche descritte precedentemente, viene preferito al RUT che sta gradualmente andando in disuso.

Il breath test si basa sull'attività ureasica del batterio ed è relativamente semplice da eseguire. L'esame si basa sulla somministrazione, per via orale, di urea marcata con un isotopo del carbonio (^{13}C o ^{14}C); dopo l'ingestione, il batterio provoca un'idrolisi, causata dall'enzima ureasi che converte l'urea in ammoniaca e anidride carbonica. Successivamente l'anidride carbonica viene assorbita dalle pareti gastriche, per poi passare nel circolo sanguigno ed essere infine escreta nell'aria espirata.

In presenza di un'infezione da *Helicobacter pylori*, si riscontrerà, quasi immediatamente, una quantità importante di anidride carbonica radiomarcata nell'aria espirata dal soggetto in esame. Durante l'analisi, per poter misurare la precisa quantità di anidride carbonica marcata ci si avvale di appositi strumenti, come lo spettrometro di massa o a infrarossi. Tali strumentazioni sono utili per ottenere il rapporto tra l'isotopo del carbonio scelto per marcare l'urea ed il ^{12}C , il più frequente in natura. Attualmente l'isotopo del carbonio ^{13}C , viene preferito come marcatore dell'urea, poiché stabile, non radioattivo, presente in natura e innocuo. Invece l'uso dell'isotopo del carbonio ^{14}C come marcatore, sta gradualmente decadendo per la sua lieve ma comunque presente, proprietà radioattiva. Infatti è controindicato sottoporre il paziente a più di un UBT (con ^{14}C), con una frequenza troppo elevata. Purtroppo però in diversi paesi, come ad esempio il Brasile, il test può essere eseguito solo da pochi centri universitari, limitando così la possibilità di diagnosi nella società. Questa situazione è causata dalla difficoltà che si riscontra nella produzione dell'isotopo etichettato, poiché le nuove tecnologie per la separazione del carbonio non sono state rese pubbliche dai paesi ideatori, per motivi di interesse strategico ed economico. Perciò le Nazioni, che importano nel proprio territorio l'isotopo etichettato, devono sostenere costi d'acquisto molto elevati. Di conseguenza molti studiosi hanno cercato una soluzione per ottenere un isotopo efficiente ma allo stesso tempo economico, come ad esempio nello studio condotto in Brasile da Coelho *et. al.* (2018). In questa ricerca si ha voluto valutare l'efficacia delle prestazioni dell'urea breath test, utilizzando l'urea marcata con l'isotopo del carbonio ^{13}C acquistata all'estero, con l'urea marcata con l'isotopo del carbonio ^{13}C sintetizzata in Brasile. I risultati ottenuti hanno dimostrato che pur avendo utilizzato un substrato meno costoso come quello prodotto in Brasile, la specificità e sensibilità del test sono rimaste simili a quelle del test eseguito con urea marcata importata dall'estero. In conclusione si è potuto prevedere, in un futuro, la maggiore possibilità e disponibilità nella diffusione dell'UBT, grazie all'abbattimento dei costi.

Un'alternativa più economica rispetto all'urea breath test, sono i test per l'antigene fecale (SAT), che sono comunque un'ottima opzione come metodo diagnostico non invasivo. I SAT hanno due vie di svolgimento, ovvero attraverso test immunoenzimatico o immunocromatografico. Inoltre parlando sempre di test non invasivi e poco costosi non si può dimenticare, il test delle urine per la diagnosi dell'infezione *H. pylori*. Questo esame clinico è stato molto studiato negli anni infatti, nel 2017 fu pubblicata una meta-analisi, che includeva 23 studi. Questa meta-analisi ha dimostrato che l'esame degli anticorpi nei campioni di urina, potrebbe essere una nuova e buona alternativa diagnostica. Tuttavia per poter confermare l'accuratezza di questo metodo, sono indispensabili ulteriori studi e documentazioni.

Infine l'ultimo metodo diagnostico nella ricerca dell'infezione da *H. pylori* è il test sierologico. Inoltre le nuove ricerche e scoperte riguardo a questo ambito hanno dato alla luce marcatori sierologici specifici, essenziali per la diagnosi. Infatti proprio in uno di questi studi, è stata valutata l'accuratezza "dell'omologo della proteina 2 associata all'uncino"(Flid) come marker dell'infezione. Tale marker ha fornito una specificità del 99% e una sensibilità del 97%. Inoltre questo test ha una tecnica semplice e un basso costo, ma allo stesso tempo non dà la possibilità di distinguere tra infezione passata e in corso.

1.4. Prevalenza dell'infezione da *Helicobacter pylori* nel mondo

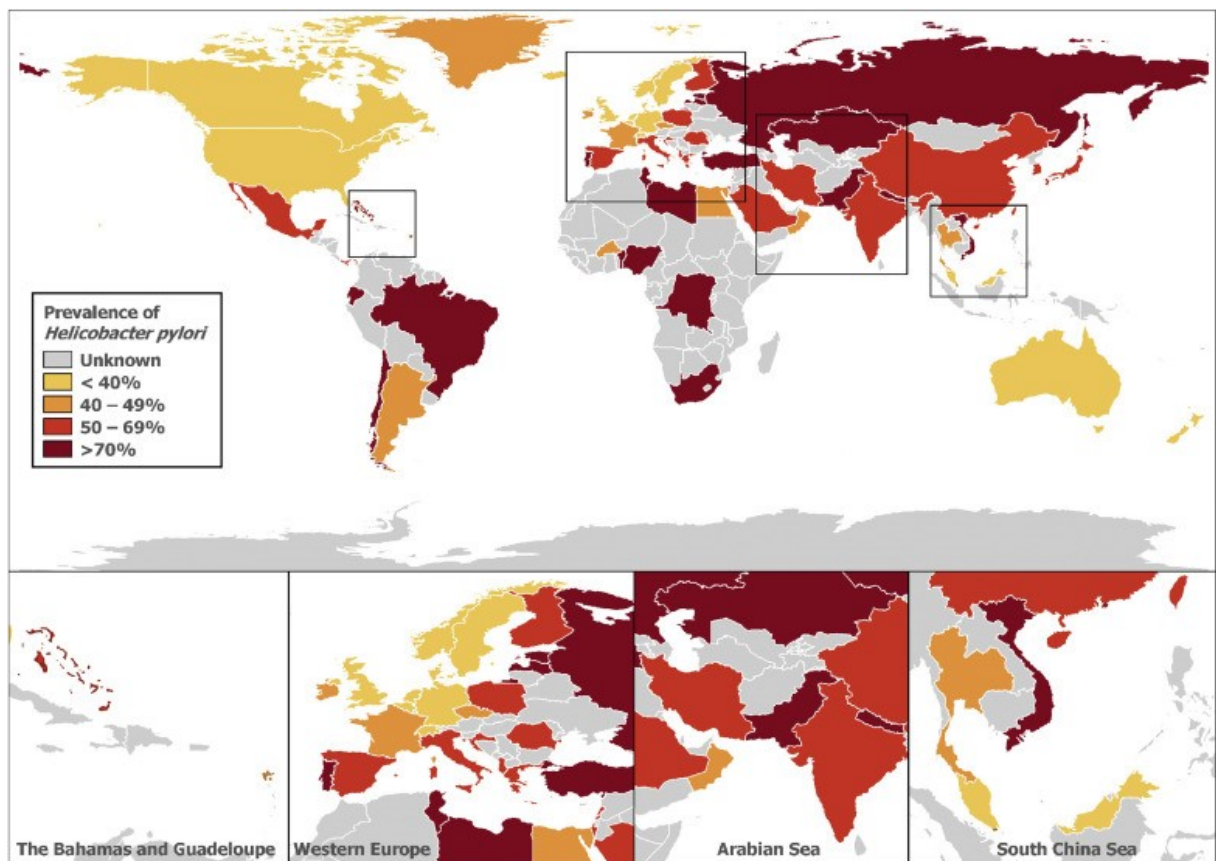
L'infezione da *Helicobacter Pylori* non è assolutamente rara, lo testimoniano i diversi studi per calcolarne l'incidenza nei diversi stati e continenti (Figura 3). Infatti in uno studio condotto da Muhsen *et. al.* (2012) si è cercato di ottenere i valori dell'incidenza, dell'età di acquisizione e dei fattori di rischio, dell'infezione da *H. pylori* nella popolazione araba israeliana. Lo studio non si concentrava sui dati ottenuti da tutta la popolazione, di qualsiasi età, ma si rivolgevano solo a bambini fino a 18 mesi di età. I soggetti sottoposti allo studio erano in totale 231 bambini, che provenivano da 2 diversi villaggi, con una popolazione di 10.000 residenti l'uno. I villaggi distano tra di loro 10 Km e si trovano nella regione settentrionale di Israele. La maggior parte della

popolazione araba israeliana vive attualmente nelle zone rurali e sta subendo uno sviluppo più che positivo in ambiti come l'istruzione e l'ambiente sanitario. Infatti anche gli arabi come i residenti israeliani sono in possesso di un'assicurazione sanitaria obbligatoria e la copertura vaccinale nel paese è di circa il 95%. Tuttavia ci sono ancora molte zone che posseggono uno stato socioeconomico (SES) basso, come ad esempio i villaggi in esame, i quali hanno come valore di SES 2 e 3. Gli studi sono iniziati con l'acquisizione dei campioni di feci, raccolti a 2, 4, 6, 8, 12 e 18 mesi di età. Il metodo diagnostico, utilizzato era quello di un test immunologico dell'antigene fecale monoclonale. Successivamente per avere una visione più ampia della situazione si sono fatte ulteriori ricerche riguardanti informazioni demografiche, socioeconomiche, istruzione dei genitori, reddito familiare, numero di sorelle/fratelli, ordine di nascita, numero totale di individui nel nucleo familiare e numero di stanze dell'abitazione, usate nella vita quotidiana. Inoltre furono organizzati dei colloqui con le madri per ottenere ulteriori informazioni sull'allattamento al seno, sulle abitudini, come l'uso dello stesso cucchiaio e dello stesso biberon tra più bambini, la pre-masticazione del cibo, l'uso del biberon previa bollitura, l'affluenza negli asili nido ecc.

Dopo aver raccolto tutti i dati e aver ricevuto i risultati delle analisi delle feci di 928 campioni, si è scoperto che l'incidenza cumulativa era del 33,3%, ovvero 77 bambini. In particolare l'incidenza nei bambini residenti nel villaggio con un SES di grado 2 era di 43,9%, molto di più dell'altro villaggio con un SES pari a 3, che rivela un'incidenza del 19,8%. Infatti non fu un caso che questo studio di coorte prospettico fosse stato svolto in questa comunità, poiché l'infezione da *H. pylori* è ormai un'infezione altamente endemica. Successivamente si riscontrò che l'età media di acquisizione dell'infezione era di 14 mesi, e come per l'incidenza, il villaggio con un SES minore acquisiva il batterio a 12,7 mesi rispetto all'altro villaggio che lo acquisiva a 15,5 mesi. Dopo un'ulteriore analisi dei dati si è potuto riscontrare un'altra differenza tra i due villaggi, poiché fino ai 6 mesi tutti i bambini erano soggetti allo stesso rischio di contagio. Invece con il passare del tempo si creava un divario tra le due popolazioni, per quanto riguarda il rischio di incidenza. A 18 mesi, nei bambini del villaggio con

SES 2, la prevalenza delle infezioni era del 51,9%, invece nel villaggio con SES uguale 3, la prevalenza era di 9,6%. Quindi si è dimostrato che l'incidenza dell'infezione era direttamente correlata allo stato socio economico di quella particolare area geografica. In effetti la scarsa istruzione genitoriale, ma soprattutto l'inadeguata igiene, come la bassa frequenza di bollitura dei biberon, aumenta moltissimo la probabilità di venire a contatto con il batterio.

In conclusione, l'infezione non è già presente dalla nascita ma viene acquisita nei primi mesi di vita, e l'incidenza aumenta con l'età. Ovviamente tale incidenza aumenta con il diminuire dello stato socioeconomico dell'area studiata, confermando l'idea che seguendo delle buone norme di igiene si abbiano meno possibilità di contrarre l'infezione.



HOOI JKY, LAI WY, NG WK, SUEN MMY, UNDERWOOD FE, TANYINGOH D, MALFERTHEINER P, GRAHAM DY, WONG VWS, WU JCY, CHAN FKL, SUNG JJY, KAPLAN GG, NG SC. *GLOBAL PREVALENCE OF HELICOBACTER PYLORI INFECTION: SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS*. *GASTROENTEROLOGY*, 2017.

FIGURA 3. PREVALENZA DELL'INFEZIONE DA *HELICOBACTER PYLORI* NEI DIVERSI PAESI DEL MONDO.

Questa relazione tra le norme igieniche di un paese e la prevalenza dell'infezione da *Helicobacter Pylori* è stata presa in considerazione anche nell'articolo "*Global Prevalence of Helicobacter pylori Infection: Systematic Review and Meta-Analysis*". Lo studio comprende una revisione sistematica e una meta-analisi, formulate da Hooi *et. al.* (2017) per poter valutare le variazioni nella prevalenza mondiale, dell'infezione da *Helicobacter pylori*. I dati che hanno potuto fornire le percentuali di prevalenza nei diversi paesi, sono stati forniti dalle banche dati MEDLINE ed EMBASE. Tali dati provengono da tutti gli articoli pubblicati dal 1970 al 2016, che trattavano della prevalenza dell'infezione da *Helicobacter pylori*. Successivamente i dati furono raggruppati in base alla zona geografica, in modo da avere delle percentuali abbastanza precise. Il numero totale di articoli utilizzati furono 263 e i paesi trattati furono 62. La prevalenza più alta dell'infezione è stata riscontrata in Africa con una percentuale del 70,1%. Invece il valore più basso di prevalenza d'infezione fu associato all'Oceania. Tuttavia parlando dei singoli paesi i valori oscillano tra il 18,9% della Svizzera e l'87,7% della Nigeria. Parlando della totalità dei paesi si riscontrano 257.768 casi, ovvero il 48,5% dei partecipanti risultati positivi all'*H. pylori*, su un totale di 531.880 partecipanti. Perciò dopo questi risultati si è stimato che circa 4,4 miliardi della popolazione globale era soggetta all'infezione. Questo grande divario tra i paesi dipende dal livello di urbanizzazione, dai servizi igienico-sanitari, dall'accesso all'acqua pulita e dallo stato socio economico. Infatti la prevalenza rimane sempre elevata in paesi in via di sviluppo con delle scarse norme di igiene. Tuttavia anche con lo sviluppo industriale di alcune zone della terra e con il miglioramento della prevalenza, l'infezione rimane onnipresente in tutte le parti del mondo. Fanno eccezione alcune popolazioni, come ad esempio i Malesi i quali sono meno soggetti all'infezione. Questo studio però ha anche delle limitazioni poiché i dati sono stati raccolti in periodi diversi e non rappresentano tutti i paesi del mondo.

In sintesi attraverso lo studio non si è potuto supporre se i valori della prevalenza diminuiranno o rimarranno statici. Inoltre l'infezione da *Helicobacter pylori* è ancora molto presente in tutto il mondo, soprattutto nei paesi con un basso livello di

urbanizzazione. Tuttavia anche se con l'aumento dello stato socioeconomico e il miglioramento delle norme igieniche, non si è eliminata del tutto la minaccia di *H. pylori*, si ha comunque ottenuto un netto miglioramento.

1.5. Storia degli antibiotici

Con il termine antibiotico si indica quell'insieme di sostanze prodotte da diverse specie di microrganismi, oppure di sintesi, in possesso di attività batteriostatica o battericida nei confronti di microrganismi patogeni, cioè capaci di creare malattia. Gli antibiotici sono attualmente uno degli argomenti più dibattuti, a causa dell'antibiotico-resistenza, che provoca ai pazienti, con sempre più allarmante frequenza il fallimento delle terapie.

Questa costante e frenetica ricerca di nuove alternative terapeutiche per combattere malattie infettive, è iniziata ben prima del XX secolo. Dai documenti a nostra disposizione, si è potuto scoprire che già dal 1550 a.C. veniva usato pane ammuffito e terriccio medicinale, per prevenire l'insorgenza di malattie, causate da infezione di ferite aperte. Queste informazioni furono scritte nel papiro di Ebers, a Tebe in Egitto. In più non molto tempo fa alcuni studi hanno svelato una ricetta di origine anglosassone, usata più di 1000 anni fa per sconfiggere, l'attuale *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina. Tuttavia si dovrà aspettare fino alla fine dell'800, inizio '900, per ottenere dei veri e propri farmaci anti-infettivi, ideati dall'immunologo e microbiologo tedesco Paul Ehrlich. Questo ricercatore ha formulato i pro-farmaci sintetici a base di arsenico, Salvarsan e Neosalvarsan utile per trattare, *Treponema pallidum*, l'agente eziologico della sifilide, e questo studio gli fece vincere il premio Nobel per la medicina nel 1908. Successivamente, grazie al batteriologo Gerhard Domagk, fu introdotto un nuovo farmaco che soppiantò il Salvarsan, ovvero il profarmaco sulfamidico Prontosil, il quale salvò, dall'amputazione, il braccio della figlia. I sulfamidici sono stati e sono ancora usati, poiché furono i primi veri e propri antimicrobici ad ampio spettro, utilizzati in ambito medico. Eppure anche loro furono soppiantati da altre sostanze, cioè dalla Penicillina scoperta nel 1928 da Alexander

Fleming. Ciò nonostante Fleming non fu il primo a notare l'antibiosi, ovvero l'influenza nociva di un determinato microrganismo nei confronti di un altro, provocandone l'inibizione della crescita e della riproduzione. Infatti il ricercatore, Vincenzo Tiberio, notò già nel 1895 la proprietà di alcuni Ifomiceti (muffe) nel produrre sostanze chimiche a scopo battericida. La Penicillina tuttavia fu trasformata in un vero e proprio farmaco da Norman Heatley, Howard Florey, Ernst Chain e altri colleghi di Oxford. Il 1890 fu un anno importante per la storia della medicina, poichè ci fu il primo uso clinico dell'antibiotico. Gli artefici di tutto ciò furono Emmerich e Löw, i quali riuscirono a curare centinaia di malati, grazie all'uso di un estratto di *Pseudomonas aeruginosa* (allora noto come *Bacillus pycyanus*). Questo antibiotico, era conosciuto con il nome di piocianasi, e fu preso in considerazione dai medici fino al 1910. Tale fatto accadde precedentemente alla scoperta della Penicillina perciò si credeva che questo estratto fosse un enzima attivo, verso molti microrganismi patogeni. Un nome importante nella microbiologia moderna è quello di Selman Waksman, il quale negli anni '30, dopo le numerose scoperte che riguardavano i microrganismi e i numerosi successi raggiunti in ambito medico, ha avviato uno studio sistemico sull'antibiosi. Queste ricerche portarono a loro volta a dei successi, infatti gli permisero di identificare gli Actinomycetales filamentosi del suolo ("actinomycetes"), come produttori di sostanze antimicrobiche, che portarono allo sviluppo di molti antibiotici. Tra gli antibiotici scoperti ci sono ad esempio la neomicina e la streptomicina, il primo principio attivo contro l'agente eziologico della tubercolosi. Tuttavia per conoscere l'apice del successo nella scoperta degli antibiotici, bisognerà aspettare fino agli anni '40. Questo periodo glorioso nel campo della ricerca di nuove sostanze antimicrobiche, durò fino agli anni '60 e diede vita a moltissimi antibiotici usati ancora oggi. Intanto che si gioiva per le scoperte acquisite riguardo agli antibiotici, molti studiosi hanno cercato di capire che scopo avessero le sostanze antibiotiche prodotte dai microrganismi. Si sono ipotizzate varie teorie, ma la più quotata sembra essere quella che le sostanze antimicrobiche abbiano più funzioni. Infatti agiscono come armi chimiche per annientare eventuali nemici, sia nel caso di

un'offensiva che nel caso di una difensiva. Inoltre sono state identificate come molecole di segnale nei confronti di parenti stretti, ma soprattutto sono mediatori di interazioni con ospiti eucarioti. Con la scoperta di moltissime classi in un tempo così breve e in una modalità relativamente facile, portò la popolazione a farne un uso eccessivo e sconsiderato, senza sapere di aver appena creato le basi ideali per il fenomeno dell'antibiotico-resistenza. Di questo sbagliato comportamento se ne subiscono ancora oggi le conseguenze, infatti una problematica attuale è la poca disponibilità di nuovi antibiotici. Questo perché sembra che la maggior parte delle sostanze antimicrobiche, prodotte da microorganismi, siano già state individuate e perciò la ricerca di altre sembra essere molto più difficile e dispendiosa rispetto agli anni '40. Questo fatto può essere confermato dalle molte case farmaceutiche che se, non hanno già chiuso la propria aria di ricerca, si basano principalmente sullo studio di antibiotici che derivano da sostanze antimicrobiche già conosciute oppure sugli antibiotici sintetici. Tuttavia sembra esserci ancora un barlume di speranza dato dal fatto che negli ultimi anni sono stati scoperti nuovi ceppi in ambienti inesplorati, insieme al miglioramento della strumentazione per l'estrazione del genoma. Difatti è stato ispezionato solo una limitata parte dei suoli, poiché poco accessibili in passato e sconosciuti fino ai giorni d'oggi. Ne è una prova lampante l'ambiente marino, dove è stato trovato il genere *Salinispora* di Actinobacteria, il quale ha provato di essere una fonte di più sostanze antimicrobiche strutturalmente nuove come la salinosporamide A (Marizomib), che ha anche attività antitumorali.

1.6. Trattamento per l'eradicazione e antibiotico-resistenza

La terapia di eradicazione per *H. pylori* dovrebbe essere breve, facile nella somministrazione, ben tollerata e poco costosa. Anche se le precedenti considerazioni sono molto importanti, lo scopo principale di una terapia antibiotica è il successo nell'eradicazione del batterio. Negli ultimi anni le strategie per il trattamento dell'infezione da *H. pylori*, hanno subito notevoli modifiche. Agli albori dell'infezione

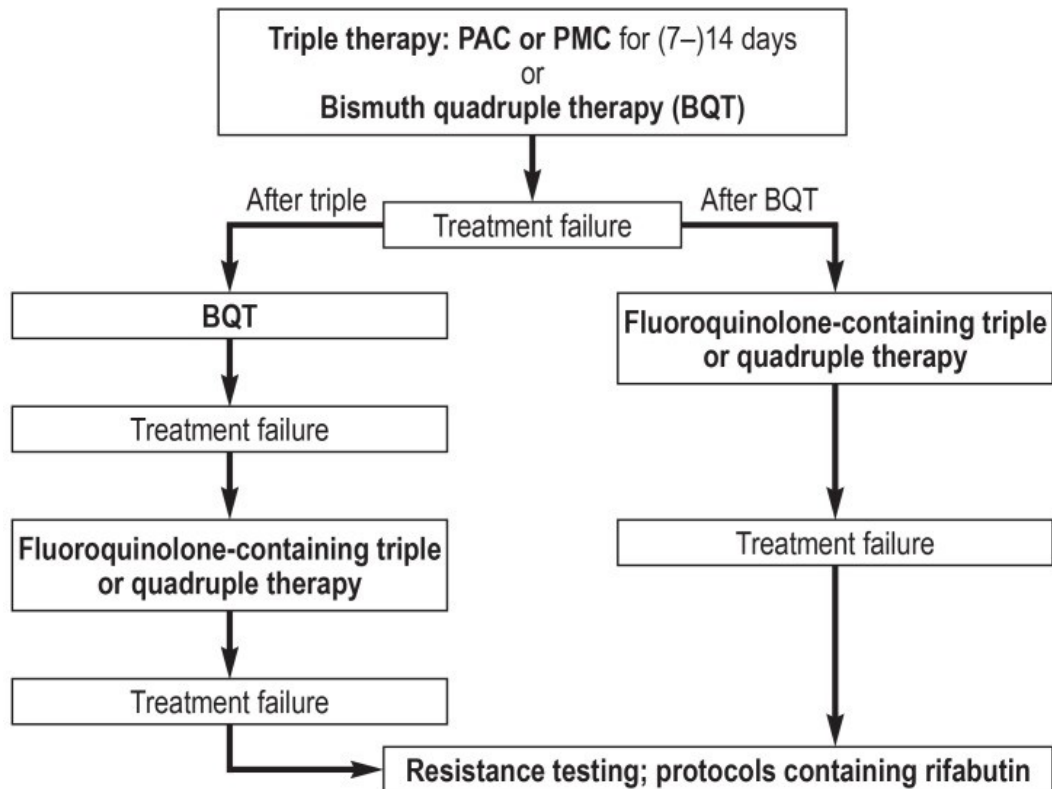
si prediligevano monoterapie e doppie terapie (un antibiotico e un inibitore di pompa protonica). Tuttavia da questo tipo di terapie non si sono ottenuti gli effetti sperati. Proprio da questi fallimenti nascono la triplice e quadruplice terapia, le quali sono ancora oggi molto affermate. La triplice terapia utilizza 2 antibiotici, e un inibitore di pompa protonica (IPP), invece la quadruplice terapia si differenzia dalla precedente per l'aggiunta del bismuto subcitrato potassio, il quale ha lo scopo di rafforzare la funzione dell'antibiotico. La scelta di combinare agenti antimicrobici e agenti antisecretori, per il trattamento dell'infezione, sono dovuti al fatto che per ottenere un'attività antimicrobica, data dagli antibiotici, è necessario innalzare il pH gastrico. L'aumento del pH gastrico è necessario poiché solo con quest'ultimo si può: creare un ambiente sfavorevole per il batterio; aumentare l'efficacia degli antimicrobici (poiché alcuni pH dipendenti); rendere maggiormente vulnerabile, ad un attacco battericida, l'*Helicobacter pylori*. Perciò l'unione di agenti antimicrobici e agenti antisecretori, svolgono insieme una funzione sinergica per combattere l'infezione. Inoltre i IPP, oltre ad avere la funzione di inibire la secrezione gastrica hanno anche proprietà antibatteriche intrinseche ideali e necessarie per questo tipo di trattamento.

Per il trattamento dell'eradicazione è stato creato una sorta di schema da seguire se la terapia non dovesse funzionare. Tutto ciò è stato ideato nella terza edizione del Maastricht Consensus Report. La tabella divide i trattamenti in: terapia di prima linea, terapia di seconda linea e terapia di recupero. La terapia di prima linea comprende tre tipi di combinazione antibiotico e IPP. La prima combinazione è composta da IPP, claritromicina e metronidazolo (da preferire, se resistenza a metronidazolo < 40%). La seconda terapia è costituita da IPP, claritromicina e amoxicillina (nel caso che la resistenza a metronidazolo sia > 40%). Infine se la resistenza alla claritromicina è > 15-20% è preferibile la quadruplice terapia. Se con i precedenti trattamenti l'infezione continua a essere presente, si decide di proseguire con la terapia di seconda linea. La terapia di seconda linea, utilizza la quadruplice terapia o la triplice supportata da un antibiogramma. L'antibiogramma è indispensabile per poter calcolare la sensibilità di un microrganismo ad un determinato antibiotico. Tale test viene eseguito *in vitro* ed è

utile per capire che terapia antibiotica prescrivere al paziente, poiché il *Helicobacter pylori* potrebbe essere resistente ad un determinato antibiotico. Tuttavia se non si può eseguire l'antibiogramma è prescritta una terapia formulata con IPP, amoxicillina (o tetraciclina) e metronidazolo. Se dopo anche questi trattamenti di seconda linea non si sono ottenuti i risultati desiderati si intraprende la terapia di recupero. Poiché l'infezione permane dopo diversi trattamenti, se non già eseguito, sarebbe opportuno effettuare un antibiogramma e basandosi su questo, formulare una triplice terapia. Anche in assenza di un esame colturale, si possono comunque ottenere ottimi risultati, poiché la ricerca scientifica ha portato alla luce nuovi antibiotici. Attualmente tra gli antibiotici prodotti ci sono i fluorochinolonici di seconda generazione e il più studiato di tutti, e quindi quello con maggiori dati disponibili, è la levofloxacina, la quale ha mostrato una buona attività contro l'*H. pylori*, sia *in vitro* che *in vivo*. Perciò un'altra terapia di recupero, è costituita da una triplice terapia basata su levofloxacina. Per potere ottenere dei tassi di eradicazione buoni è consigliato prediligere un dosaggio di 500 mg al giorno, per 10 giorni. Come tempi di somministrazione la terapia di prima linea dura solitamente 7 giorni, anche se si è notato che proseguendo per altri 7 giorni, il successo nella terapia aumenterebbe del 12%. I medicinali per la terapia di seconda linea devono essere assunti per un tempo minimo di 7 giorni, ma non devono superare i 10 giorni. Questo perché incrementerebbe la possibilità del metronidazolo, di essere meno tollerato.

Tuttavia nella quinta edizione del Maastricht Consensus Report, quindi più recente rispetto alla terza edizione, le modalità di trattamento sono state leggermente modificate in base ai mutamenti dell'antibiotico-resistenza. Infatti uno studio condotto ha rilevato che attraverso le triple terapie standard con claritromicina e amoxicillina o metronidazolo, non si può più raggiungere un'efficacia minima dell'80% come richiesto, ma il successo dell'eradicazione è solo del 73%. Questo perché la durata del trattamento di soli 7 giorni non è più sufficiente, perciò si consiglia di prolungare la somministrazione della tripla terapia standard fino a raggiungere i 14 giorni, oppure di iniziare subito con la quadruplica terapia (10 giorni). Se si è iniziato il trattamento

con la triplice terapia standard e non si sono ottenuti i risultati sperati si prosegue con la quadruplica terapia, e se non bastasse ancora si effettua una ulteriore quadruplica terapia o una triplice terapia con fluorochinoloni. Invece se si inizia con la quadruplica terapia con bismuto, e non si ottengono miglioramenti, si predilige una quadruplica terapia o una triplice terapia con fluorochinoloni. Infine con un ulteriore fallimento del trattamento, in entrambi i casi, si decide di eseguire come ultimo tentativo, un antibiogramma e seguire un protocollo contenente Rifabutina, ovvero un farmaco antibatterico, il quale possiede un'efficacia ad ampio spettro. Tali step vengono seguiti se il paziente ha una bassa resistenza alla claritromicina (Figura 4), infatti se il paziente ha un'alta resistenza si segue un diverso percorso verso la guarigione (Figura 5).

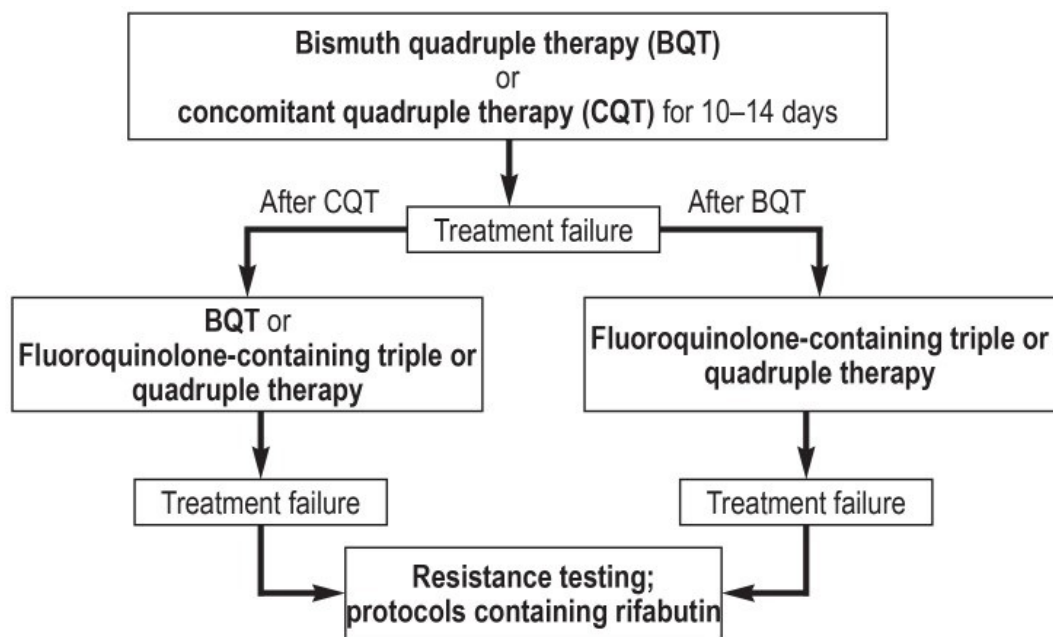


FISCHBACH W, MALFERTHEINER P. *HELICOBACTER PYLORI INFECTION*. DTSCH ARZTEBL INT. 2018.

FIGURA 4. TRATTAMENTO PER L'ERADICAZIONE DI *HELICOBACTER PYLORI* IN PAZIENTI CON UNA BASSA RESISTENZA ALLA CLARITROMICINA, TRATTAMENTO PER L'ERADICAZIONE DI *HELICOBACTER PYLORI* IN PAZIENTI CON UNA BASSA RESISTENZA ALLA CLARITROMICINA.

Il primo step è la somministrazione di una quadruplice terapia con bismunto o di una quadruplice terapia concomitante per 10-14 giorni.

Nel caso che la quadruplice terapia concomitante, non fosse stata d'aiuto si continua il trattamento con una quadruplice terapia o con una triplice terapia con fluorochinolon o anche con una quadruplice terapia con bismunto. I passaggi successivi in caso di fallimento del trattamento sono gli stessi che vengono seguiti dalle persone che sono poco resistenti alla claritromicina.



FISCHBACH W, MALFERTHEINER P. *HELICOBACTER PYLORI INFECTION*. DTSCH ARZTEBL INT. 2018.

FIGURA 5. TRATTAMENTO PER L'ERADICAZIONE DI *HELICOBACTER PYLORI* IN PAZIENTI CON UN'ALTA RESISTENZA ALLA CLARITROMICINA.

Una delle cause che hanno portato alla creazione della tabella per la terapia eradicante per *Helicobacter pylori* è la scarsa compliance del paziente, che è dovuta soprattutto al dosaggio complesso. Tuttavia la principale causa della creazione di molti tipi di terapie con diversi tipi di antibiotici, è data dall'aumento dell'antibiotico-resistenza. Il fenomeno dell'antibiotico-resistenza sta creando molto scompiglio nel mondo scientifico, poiché molte persone colpite dall'infezione da *Helicobacter pylori* non riescono a far fronte al batterio. Quindi è impossibile non parlare di antibiotico-

resistenza se si parla di *Helicobacter pylori* perchè attualmente l'unica modalità di eradicazione è effettuata attraverso l'uso di antibiotici. Perciò è essenziale studiare bene la situazione per comprenderla a pieno, in modo tale da poter concentrare gli studi nella direzione giusta e successivamente trovare una soluzione. Infatti molti ricercatori hanno voluto approfondire questo fenomeno, come ad esempio Savoldi *et. al.* (2018) i quali hanno realizzato una revisione sistematica e una meta-analisi, per poter comprendere meglio le zone del mondo colpite maggiormente dal fenomeno dell'antibiotico-resistenza, ma anche per capire il collegamento tra resistenza agli antibiotici e l'insuccesso delle terapie. Per questo studio sono stati presi in considerazione i tassi di resistenza di *Helicobacter pylori*, ai 4 più comuni antibiotici usati per trattare l'infezione, ovvero claritromicina, metronidazolo, levofloxacina, amoxicillina o tetraciclina. Gli studi valutati sono stati in totale 178 e riportavano dati di circa 65 paesi. I risultati dell'analisi hanno evidenziato che i tassi di resistenza primaria e secondaria a levofloxacina, metronidazolo e claritromicina erano $\geq 15\%$ in tutte le regioni dell'OMS, ad eccezione della resistenza primaria alla claritromicina nelle Americhe e nella regione del sud-est asiatico e resistenza primaria alla levofloxacina nelle regioni europee. Si è notata inoltre una crescente resistenza agli antibiotici, nella maggior parte delle regioni dell'OMS, e come ci si poteva aspettare l'aumento della resistenza alla claritromicina è stata la causa dal diminuire del successo nelle terapie antibiotiche che contenevano questo antibiotico. Un'altra conferma che rende valida questa teoria è data dal discorso pronunciato nel 2017 dall'OMS, il quale afferma di aver inserito il batterio *H. pylori* nell'elenco dei "patogeni prioritari" resistenti agli antibiotici. Quindi è più che mai importante trovare trattamenti terapeutici diversi da quelli di oggi per poter aumentare il tasso di eradicazione, annientare al massimo la resistenza antimicrobica ed eliminare gli effetti collaterali sul normale microbiota intestinale. Perciò dopo molti studi come questi, che confermano l'inesorabile aumento di tale fenomeno, altri ricercatori stanno conducendo ricerche per nuove e alternative strategie terapeutiche, onde limitare l'uso

di antibiotici. I risultati propongono ad esempio l'uso di droghe vegetali e dei rispettivi principi attivi per il trattamento dell'infezione.

CAPITOLO II

2.1. Scopo della tesi

Quando è stata effettivamente dimostrata l'esistenza del batterio *Helicobacter pylori*, era già il 1982, perciò temporalmente vicino ai giorni nostri. Fin dall'inizio si è deciso di trattarlo come tutti gli altri batteri, ovvero con gli antibiotici, tuttavia si capì presto che non era un batterio comune. Infatti con l'infezione da *Helicobacter pylori* nacquero le diverse e molteplici terapie conosciute tutt'oggi. La terapia più conosciuta è la triplice terapia, la quale è composta da due antibiotici combinati (amoxicillina, claritromicina, metronidazolo...) e da un inibitore di pompa protonica, utile per inibire la secrezione di acido gastrico e per rafforzare l'azione degli antibiotici. Tuttavia negli ultimi anni a causa della resistenza agli antibiotici, il successo delle terapie sta progressivamente diminuendo; inoltre tali trattamenti hanno effetti collaterali non indifferenti. Infatti le persone sottoposte a queste terapie, sono spesso soggette ad un disequilibrio del microbiota intestinale, che espone ad un rischio più elevato di albergare nel tratto gastro intestinale microrganismi patogeni capaci di causare malattia. Inoltre con l'aiuto dell'inibitore di pompa protonica lo spostamento lungo il tratto gastrointestinale di questi microrganismi patogeni è reso più semplice. Perciò per poter avere una migliore tollerabilità delle terapie e una migliore resa di eradicazione, la comunità scientifica si sta prodigando nel proporre nuove terapie alternative. Questo lavoro di tesi si vuole focalizzare proprio su questa problematica, cercando così una scelta migliore alle attuali terapie di eradicazione dell'infezione da *Helicobacter pylori*. In particolare la tesi ricerca una possibile attività antibatterica dei composti di diversa classe fitochimica presenti nelle droghe vegetali. Questa revisione della letteratura ha voluto dimostrare l'efficacia dei principi attivi vegetali per poter comprendere meglio se sarà possibile una futura terapia di eradicazione con estratti vegetali utili a potenziare l'effetto degli antibiotici.

CAPITOLO III

3.1. Metodo di ricerca

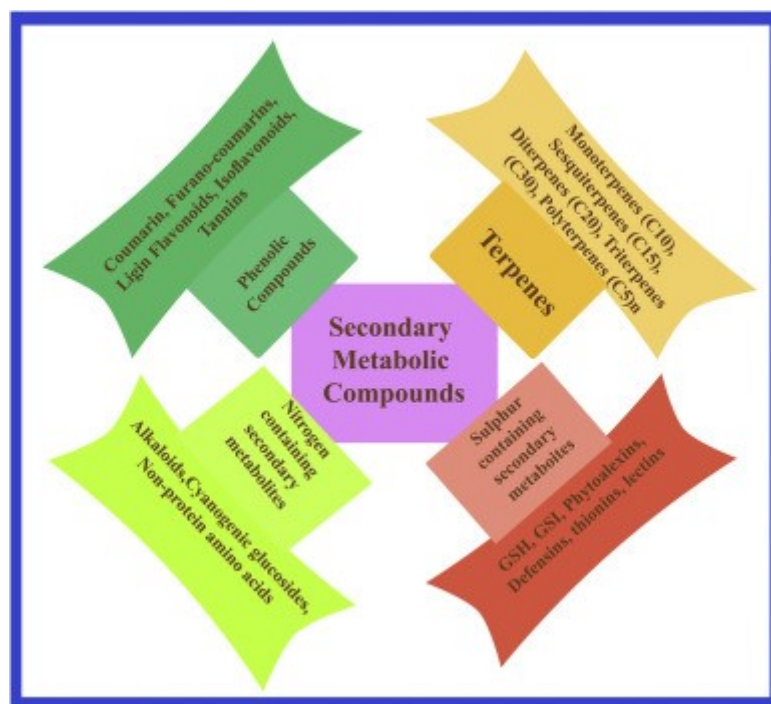
In questa tesi è stata condotta una analisi della letteratura per individuare studi di base riportanti l'uso di estratti vegetali per il trattamento di infezioni da *H. pylori*. Gli studi scientifici sono stati ricercati nel motore di ricerca PubMed inserendo le parole chiave "*Helicobacter pylori* phytochemicals". PubMed ha restituito 106 articoli, dei quali ho letto in modo approfondito gli abstracts e successivamente ho diviso gli articoli scientifici in 4 sottogruppi. Il primo gruppo era composto da 16 articoli che trattavano del batterio e della specifica classe fitochimica in esame. Il secondo gruppo era costituito da 13 articoli i quali trattavano del batterio, ma dove non si specificava la classe fitochimica delle sostanze. Il terzo raggruppamento era composto da 26 articoli i quali affrontavano più temi, tra cui quello del batterio *H. pylori*. Infine il quarto gruppo era costituito da 25 articoli, che esponevano i danni causati da *H. pylori*. Dopo questa analisi iniziale si è deciso di utilizzare gli articoli del primo gruppo poiché erano gli unici studi che valutavano, nella quasi totalità, le proprietà dei principi attivi delle droghe vegetali, in base alla classe fitochimica di appartenenza. I 16 articoli sono quindi stati analizzati in dettaglio, in particolare la sezione "Materials and methods", al fine di individuare il valore di MIC per ogni sostanza presa in considerazione. La MIC è la concentrazione minima inibitoria che indica la concentrazione antimicrobica più bassa di una sostanza. Inoltre per ogni articolo ho identificato se gli studi fossero stati eseguiti *in vivo* o *in vitro*. Infine ho ricercato le droghe vegetali e le classi fitochimiche. Ho notato che la maggior parte degli articoli non erano revisioni e che i metodi di studio dominanti erano quelli *in vitro*. Solo un articolo trattava di test *in vivo*, grazie all'uso di ratti e nessun test è stato applicato ad essere umani. Tutti gli studi hanno dato i risultati sperati, confermando una azione antibatterica. Le classi fitochimiche dominanti sono state quelle dei polifenoli e dei terpeni.

CAPITOLO IV

Risultati: Uso delle droghe vegetali per il trattamento dell'infezione da *Helicobacter pylori*

4.1. Metaboliti secondari delle piante

Le piante durante il loro ciclo vitale producono numerosi composti organici, a basso peso molecolare, aventi ovviamente delle funzioni ben precise. Infatti, in base anche a queste precise funzioni, la comunità scientifica ha deciso di dividere in più classi questo gruppo eterogeneo. Il primo gruppo è composto da metaboliti primari, composti utili per la crescita vegetale e per tutte le attività primarie. La seconda classe è composta dagli ormoni, che sono indispensabili per la regolarizzazione dei processi e dei metaboliti, appartenenti agli organismi vegetali. Infine c'è la categoria dei metaboliti secondari o specializzanti, sui quali ho redatto la mia tesi. I metaboliti secondari hanno moltissimi scopi, ma per poter raggruppare tutte queste funzioni in un'unica descrizione, si può dire che sono i composti che mediano tutte le interazioni tra le piante e l'ambiente. Gli organismi vegetali devono far fronte a molti stress biotici e abiotici, e per potersi difendere secernano metaboliti secondari, i quali possono essere prodotti solo dopo uno stimolo esterno (fitoalessine) oppure sempre, a prescindere che ci sia un attacco microbico o no (fitoanticipine). Infatti i metaboliti secondari proteggono e difendono le piante dai virus, dagli organismi patogeni e dagli insetti. Hanno proprietà antimicotiche, antibatteriche, sono fotoprotettori e hanno una funzione vessillare. Inoltre questa categoria di composti possono mettere in contatto le piante con altri organismi viventi. Infine, entrando nel particolare, i metaboliti secondari sono rappresentati da 3 gruppi principali: i terpeni, i composti fenolici e i composti azotati/solforati (Figura 6).



ZAYNAB M, FATIMA M, ABBAS S, SHARIF Y, UMAIR M, ZAFAR MH, BAHADAR K. ROLE OF SECONDARY METABOLITES IN PLANT DEFENSE AGAINST PATHOGENS. MICROB PATHOG. 2018.

FIGURA 6. DIVISIONE DEI PRINCIPALI METABOLITI SECONDARI

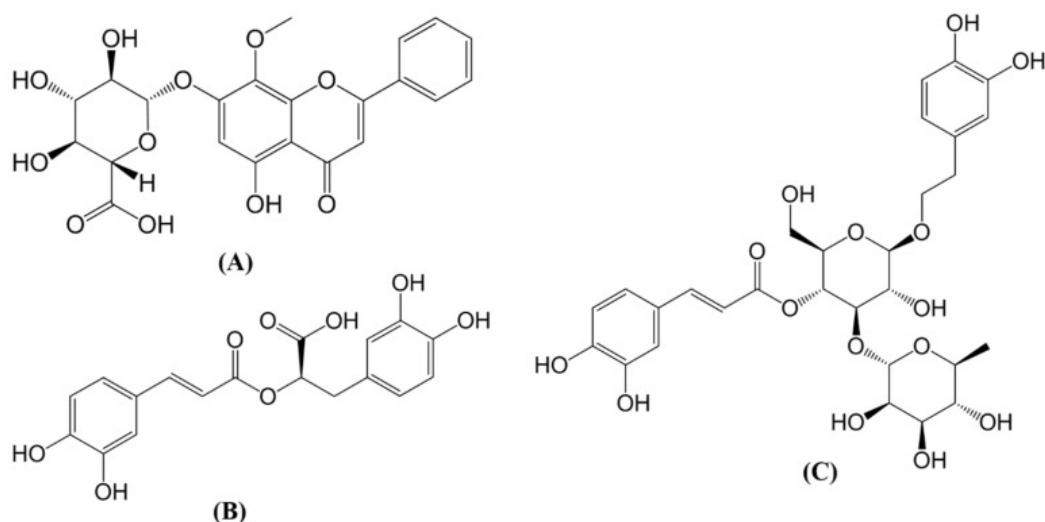
4.2. Polifenoli

Le piante producono, come metaboliti secondari, molte classi di composti fitochimici tra cui i polifenoli. Queste molecole vengono raggruppate in un immenso gruppo, composto da migliaia di molecole. Questi particolari composti sono identificati grazie a molteplici gruppi fenolici, che comprendono un gruppo ossidrilico legato ad un anello aromatico. Tali composti possono avere una struttura semplice, come quella degli acidi fenolici, oppure più complessa come quella dei tannini. In questa mia tesi, nei 16 articoli da me selezionati, si citano spesso i polifenoli, come i flavonoidi e i fenoli. Tali articoli riportano solo esperimenti e studi condotti *in vitro*, e nessun studio *in vivo*. Lo scopo principale degli studi, è quello di confermare o meno, l'attività antimicrobica nei confronti di *H. pylori* dei polifenoli, per poter rendere possibile in un futuro, formulare una terapia che li comprenda. Alcuni studi valutano i composti fitochimici che si trovano in determinate piante (Lin *et. al.* 2005, Yan *et. al.* 2022 e Widelski *et. al.*

2022) e altri studi che valutano le singole molecole, senza prendere in considerazione il fitocomplesso di una precisa pianta (Fong *et. al.* 2019). Pur dividendosi in questi due grandi gruppi, tutti gli studi cercavano delle conferme sull'azione anti-*H. pylori*, dei diversi polifenoli. Una delle principali azioni effettuate dagli studiosi, quando prendono in considerazione una specifica pianta, è quella di scoprire quali siano le molecole responsabili delle attività della pianta. Ne è la conferma lo studio condotto da Yan *et. al.* (2022), i quali cercarono di determinare il contenuto totale di fenoli e flavonoidi nei frutti di *Canario album* Raeusch. Grazie al metodo FoLin-CiocaLteu e al metodo colorimetrico del cloruro di alluminio, è stato possibile fare ciò. Infatti è stata stabilita la quantità e il tipo di composti, riscontrati negli estratti dei frutti di *C. album*, formulati con diversi solventi. Tutti gli estratti contenevano elevate quantità di composti fenolici, in particolare la maggior parte di composti erano fenoli e una piccola parte era costituita da flavonoidi. Il contenuto totale di fenoli è stato misurato come, milligrammi di equivalenti di acido gallico per grammi di estratti (mgGAE/g). Perciò dopo le analisi effettuate, la quantità di polifenoli, aveva un range di concentrazione che andava da $114,17 \pm 6,33$ a $435,96 \pm 7,29$ mgGAE/g. Inoltre i principali composti fenolici ritrovati sono stati l'acido gallico e l'acido ellagico. L'attività antibatterica contro *Helicobacter pylori* dei composti, è stata dimostrata dal fatto che l'estratto di acetato di etile, il quale era il più ricco di fenoli, flavonoidi e acido gallico, aveva riportato il valore numerico più basso di concentrazione minima inibitoria, pari a 39–625 µg/ml. Inoltre sempre lo stesso estratto, aveva come valori di concentrazione minima battericida, 78–1250 µg/ml. Infine lo studio ha ricercato le modalità d'azione degli estratti contro *Helicobacter pylori* e anche la possibile sinergia tra estratti e antibiotici già in uso nelle terapie contro l'infezione, come amoxicillina, claritromicina, metronidazolo e levofloxacina. I risultati del test sono stati molto significativi, poiché sono state confermate delle interazioni additive o indifferenti, che hanno portato a concludere che la combinazione tra estratto e antibiotico, potesse diminuire la MIC di entrambe. Infatti la MIC degli antibiotici è diminuita di 16 volte. Per cui questa combinazione di composti, sarebbe un'ottima alternativa alle terapie attuali, poiché si

potrebbe cambiare la posologia degli antibiotici, predisponendo un minor dosaggio e di conseguenza minori effetti collaterali. Questa ricerca di una sinergia tra composti naturali e antibiotici è un argomento molto interessante, per la possibilità in un futuro di creare nuove terapie contro l'infezione da *Helicobacter pylori* e per eliminare il fenomeno dell'antibiotico resistenza. Infatti in un altro studio realizzato da Fong *et. al.* (2019), si è valutato la possibilità di una sinergia tra l'antibiotico amoxicillina e oroxindina, un flavone presente in *Bupleurum chinense* L. Difatti anche in questo articolo, è stato condotto un test sinergico, che ha dimostrato l'effetto additivo di oroxindina con l'amoxicillina, ma anche un effetto additivo con altri due composti fitochimici in esame, acido rosmarinico e verbascoside (Tabella 1). Tale studio voleva trovare tre valide molecole, che fossero inibitori di tre target farmacologici di *H. pylori*, utili per l'eradicazione dell'infezione. I tre bersagli molecolari scelti, sono tre diversi enzimi, che hanno diverse funzionalità indispensabili alla crescita batterica, ovvero l'ureasi, il shikimato chinasi e l'aspartato-semialdeide deidrogenasi. L'ureasi è necessaria per poter mantenere nello stomaco, un valore di pH ideale per la crescita batterica. Invece lo shikimato chinasi e l'aspartato-semialdeide deidrogenasi sono due enzimi utili alla produzione di amminoacidi e metaboliti. Per poter identificare i composti bioattivi, con la funzione di inibizione, tra l'immenso pool di sostanze fitochimiche, è stato necessario l'uso del metodo dell'aggancio molecolare *in silico* e l'analisi delle proprietà simili ai farmaci. Le sostanze fitochimiche che hanno dimostrato un buon equilibrio, tra maggior possibilità di legame e funzionalità simili a farmaci, verso i tre enzimi bersaglio sono stati: l'oroxindina, l'acido rosmarinico e il verbascoside (Figura 7). Tutte e tre le molecole fitochimiche hanno avuto un buon punteggio di docking molecolare, in particolare l'oroxindina si è unita all'ureasi, l'acido rosmarinico si è legato allo shikimato chinasi ed infine il verbascoside aveva un'ottima affinità con l'aspartato-semialdeide deidrogenasi. Inoltre durante questi test l'oroxindina non ha dimostrato nessun effetto tossico, prediligendo un'ottima solubilità in acqua e uno scarso assorbimento intestinale. Tutte caratteristiche indispensabili, per un farmaco ideale contro l'infezione da *H. pylori*. Questo perché il

composto bioattivo può raggiungere la sede dell'infezione, senza entrare nel circolo sanguigno e creare un effetto sistemico.



FONG P, HAO CH, IO CC, SIN PI, MENG LR. *IN SILICO AND IN VITRO ANTI-HELICOBACTER PYLORI EFFECTS OF COMBINATIONS OF PHYTOCHEMICALS AND ANTIBIOTICS*. MOLECULES. 2019

FIGURA 7. STRUTTURE CHIMICHE DI (A) OROXINDINA, (B) VERBASCOSIDE E (C) ACIDO ROSMARINICO.

Altro test a cui furono sottoposti i tre composti bioattivi, è stato quello della concentrazione minima inibitoria. Tale test ha dato ottimi risultati affermando che l'oroxindina (50 $\mu\text{g/mL}$) fosse meno potente dell'antibiotico di controllo positivo, ovvero dell'amoxicillina. Tuttavia osservando i dati di precedenti studi che, valutavano i valori di MIC di amoxicillina, claritromicina e metronidazolo aumentati per l'antibiotico-resistenza (256 $\mu\text{g/ml}$), si è potuto confermare una maggiore potenza dell'oroxindina, rispetto agli antibiotici comuni, verso ceppi clinici di *H. pylori*. Inoltre si è riscontrato che i tre enzimi, valutati come target farmacologici, non sembrano essere associati in alcun modo ai meccanismi di resistenza degli antibiotici, supponendo così che i tre polifenoli possano influenzare allo stesso modo, sia ceppi resistenti che non. Quindi grazie a questo studio si sta sempre di più convalidando l'ipotesi di future terapie molto più efficaci, con un minor rischio di antibiotico-

resistenza e con dosaggi molto meno pesanti. Tuttavia ci saranno bisogno di ulteriori studi per valutarne la sinergia, anche se le attuali scoperte hanno comunque fornito ottime prospettive per il futuro.

TABELLA 1. INTERAZIONI ADDITIVE E INDIFFERENTI DEI COMPOSTI IN ESAME

Test samples	FIC values	Outcome
Oroxindin plus amoxicillin	0.750	additive effect
Oroxindin plus verbascoside	0.750	additive effect
Oroxindin plus rosmarinic acid	0.750	additive effect
Verbascoside plus amoxicillin	1.125	indifference
Rosmarinic acid plus amoxicillin	1.125	indifference
Verbascoside plus rosmarinic acid	1.250	indifference

FONG P, HAO CH, IO CC, SIN PI, MENG LR. *IN SILICO AND IN VITRO ANTI-HELICOBACTER PYLORI EFFECTS OF COMBINATIONS OF PHYTOCHEMICALS AND ANTIBIOTICS*. MOLECULES. 2019

Una caratteristica dei composti fenolici emersa in questi studi, è la capacità di inibire l'enzima ureasi di *Helicobacter pylori*. Questo argomento è stato affrontato nello studio di Yan *et. al.* (2022), precedentemente citato, e anche nello studio formulato da Lin *et. al.* (2005). Lin *et. al.* (2005) hanno voluto mettere alla prova l'attività antimicrobica dei composti fenolici, grazie all'uso di alcune miscele composte da diverse percentuali di *Origanum vulgare* L. e *Vaccinium macrocarpon* Aiton (Tabella 2). Inoltre si è voluto anche approfondire, la possibile inibizione della prolina deidrogenasi. I principali composti fenolici di *O. vulgare* erano l'acido rosmarinico, invece *V. macrocarpon* aveva un più ampio gruppo di composti fenolici tra cui l'acido ellagico, l'acido cinnamico, l'acido p-idrossibenzoico e l'acido p-cumarico. I risultati dei test hanno confermato l'attività antimicrobica delle due droghe miscelate insieme, in particolare con le percentuali del 25% (peso/peso) di *O. vulgare* e del 75% (peso/peso) di *V. macrocarpon*. Successivamente si è svolto il test dell'ureasi sulla miscela e sulle singole droghe. Tuttavia se *V.*

macrocarpon inibiva circa il 9% rispetto al controllo, *O. vulgare* ha determinato un'inibizione del 52%, invece la miscela ha prodotto un'inibizione del 29%. Da ciò si è potuto intuire che i principali polifenoli, responsabili dell'inibizione dell'ureasi erano quelli appartenenti a *O. vulgare*, molto probabilmente per la loro natura fenolica. Questo perché i fenoli parzialmente idrofobici sono molto più efficaci verso enzimi come l'ureasi, che si situano nella membrana plasmatica di *H. pylori*, poiché questa caratteristica strutturale permetta ai composti fenolici una maggiore adesività e un'inibizione della membrana plasmatica. Purtroppo non è ancora ben chiaro come avvenga l'inibizione dell'ureasi, tuttavia si pensa sia causata dalla modifica della conformazione dell'ureasi provocata dai fenoli.

TABELLA 2. CONTENUTO FENOLICO TOTALE DI *O. VULGARE* E DI *V. MACROCARPON* IN VARIE MISCELE

Mixture	Amt of phenolics (mg/g, dry wt)
100% oregano	18.2
75% oregano, 25% cranberry	15.1
50% oregano, 50% cranberry	12.2
25% oregano, 75% cranberry	10.0
100% cranberry	7.4

LIN YT, KWON YI, LABBE RG, SHETTY K. *INHIBITION OF HELICOBACTER PYLORI AND ASSOCIATED UREASE BY OREGANO AND CRANBERRY PHYTOCHEMICAL SYNERGIES*. APPL ENVIRON MICROBIOL. 2005

Un altro bersaglio molecolare contro l'infezione da *Helicobacter pylori*, è la prolina deidrogenasi, situata nella membrana plasmatica ed è un componente essenziale poiché è associata alla produzione di energia nel batterio. I fenoli hanno dimostrato la loro capacità di legarsi alla prolina deidrogenasi, e alla sua inibizione, e con questo si presume possa essere un sito d'azione dei fenoli. Perciò l'inibizione dell'ureasi e della

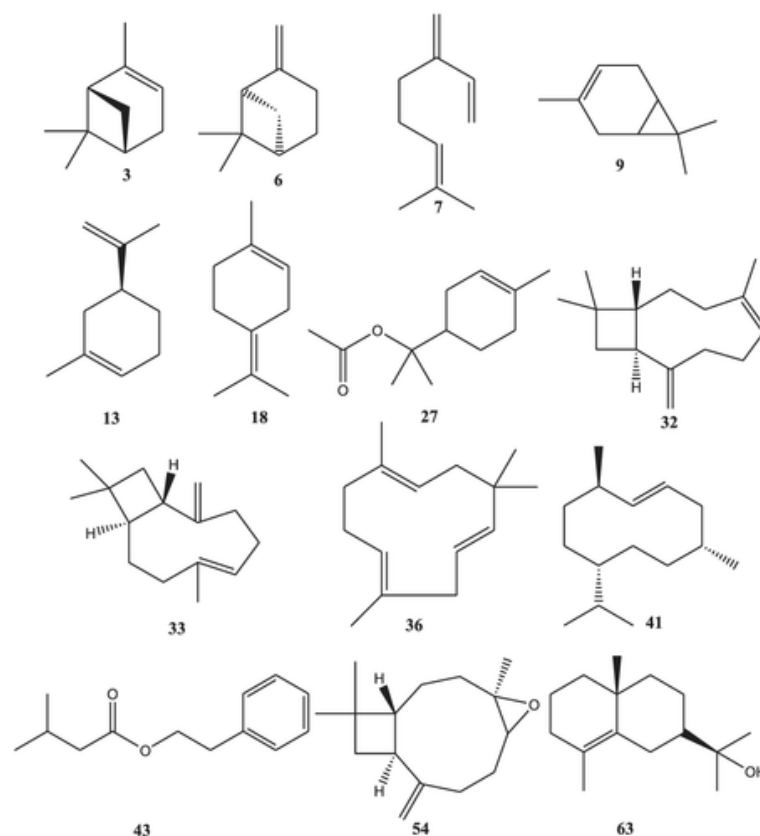
prolina deidrogenasi, sono due meccanismi che possono spiegare l'attività antimicrobica delle due droghe vegetali, sia singolarmente che all'interno di una miscela. Come già detto anche da Yan *et. al.* (2022) hanno affrontato l'argomento dell'inibizione dell'ureasi. Tuttavia a differenza di Lin *et. al.* (2005), lo studio realizzato Yan *et. al.* (2022) ha voluto valutare solo una determinata droga (*C. album*), in particolare i suoi frutti. Inoltre sono stati creati diversi estratti della droga con molteplici solventi, e ogni estratto è stato testato singolarmente. Infatti i singoli estratti sono stati sottoposti al test dell'inibizione dell'ureasi, ciò nonostante solo due estratti hanno dato esito positivo, ovvero quelli in possesso di una buona quantità di polifenoli e con la migliore MIC e MBC, ossia l'estratto di acetato di etile e l'estratto acquoso. Questi esiti positivi sono probabilmente dati dal fatto, che i due estratti hanno sottoregolato il gene trasportatore dell'urea. Infine in questo studio, si sono andati a ricercare altri meccanismi d'azione dei fenoli contro *Helicobacter pylori* e una scoperta interessante è che il batterio, trattato con i diversi estratti, ha subito delle variazioni della morfologia, in particolare la frammentazione della membrana esterna. Tali variazioni morfologiche sono le tipiche conseguenze dell'attività antibatterica e battericida dei diversi farmaci, oggi in uso. Altre modifiche della struttura del batterio come ad esempio la produzione di vescicole intracellulari, sono state citate anche nello studio di Wildeski *et. al.* (2022), nel quale si valutava l'attività antimicrobica dei composti fenolici contenuti in diversi tipi di propoli. In questa ricerca si sono utilizzati 10 tipi di propoli provenienti da diverse parti del mondo, come ad esempi dalla Polonia e dall'Ucraina. I composti fitochimici ritrovati negli estratti di queste propoli, erano molti perciò sono stati divisi in 5 classi: flavonoidi, acidi cinnamici liberi, monoesteri di acidi cinnamici, gliceridi di acidi fenolici e altri polifenoli. Tutti gli estratti sono stati valutati per la loro attività anti-*H. pylori*, e tutti i composti hanno dimostrato ottimi valori di MIC che si aggiravano tra i 26 e i 125 µg/ml. Tuttavia la propoli proveniente dall'Ucraina, ha ottenuto il valore più basso di MIC, ovvero 0,02 µg/ml. Grazie all'analisi chimica si è potuto notare che le molecole, con una maggiore attività antibatterica, erano quelle provenienti dalla propoli del pioppo. Perciò si sono

andati a ricercare gli elementi bioattivi della propoli del pioppo, i quali erano gli agliconi flavonoidici. In conclusione, grazie ai molti studi da me citati in precedenza, si sono scoperti quali fossero i composti bioattivi ad attività anti-*H. pylori* e successivamente si sono ricercati i meccanismi di azione di quest'ultimi, ovvero dei vari composti fenolici. I risultati di tali ricerche hanno portato alla luce dati importanti e soprattutto confortanti, per quanto riguarda il possibile sviluppo di nuove terapie, più efficaci e meno degradanti per il microbiota intestinale. Infatti i valori della concentrazione minima inibitoria, raccolti nei diversi test erano molto buoni, inoltre i meccanismi d'azione erano simili ai farmaci usati tutt'oggi, tranne per il fatto che i bersagli molecolari a cui si legano le molecole fitochimiche, non sono correlati ai meccanismi di resistenza degli antibiotici. Infine in alcuni casi la collaborazione, tra composti fitochimici e antibiotici, ha permesso di diminuire il dosaggio di entrambi. Perciò i composti fenolici potrebbe essere una valida idea per la formulazione di nuove terapie contro l'infezione da *Helicobacter pylori*, e fronteggiare così l'antibiotico-resistenza.

4.3. Terpeni

I composti terpenici, sono molto comuni in natura, infatti questo gruppo include più di 30.000 molecole. La caratteristica che facilita il riconoscimento di questi composti, si trova nella struttura chimica che è composta da 1 o più unità di isoprene (C_5H_8). In base alle unità di isoprene ogni composto viene identificato in maniera diversa: monoterpeni ($C_{10}H_{16}$), sesquiterpeni ($C_{15}H_{24}$), diterpeni ($C_{20}H_{32}$), triterpeni ($C_{30}H_{48}$) e tetraterpeni ($C_{40}H_{64}$). La struttura può essere lineare, ciclica o ibrida lineare e ciclica. Ovviamente i terpeni non comprendono solo i composti descritti sopra, ma anche altre molecole, come ad esempio i terpenoidi i quali posseggono la struttura base dei terpeni, arricchita da gruppi funzionali, composti non solo da atomi di carbonio, ma anche da ossigeno e azoto. Questi metaboliti secondari, oltre ad essere utili per difendere le piante da virus e insetti, usati per l'organismo umano possono avere altre

proprietà come quella antiinfiammatoria, sedativa, ma soprattutto antibatterica. Questa proprietà antibatterica è stata molto ricercata e citata negli articoli da me visionati. Infatti nello studio di Gad *et. al.* (2021), si è valutata la proprietà antimicrobica del fitocomplesso di diverse conifere del genere *Pinus*. Per i test si sono utilizzati gli oli essenziali delle foglie di *Pinus canariensis* C.Sm., *Pinus halepensis* Mill., *Pinus pinea* L. e *Pinus roxburghii* Sarg. e attraverso un gascromatografo accoppiato a uno spettrometro di massa sono stati rilevati 76 composti volatili (Figura 8). I quattro oli hanno dimostrato delle differenze nella composizione chimica, tuttavia le molecole che si ripetevano frequentemente, nelle varie specie di *Pinus* erano i monoterpeni, con α -pinene e β -pinene e i sesquiterpeni con germacrene D. Tutti gli oli hanno mostrato buoni valori di MIC, tuttavia il miglior risultato si è ottenuto con l'olio di *P. pinea*, con una MIC di 3,9 $\mu\text{g/ml}$, simile alla claritromicina. Si pensa che i risultati ottenuti siano dovuti alla sinergia che si crea tra i diversi composti fitochimici presenti, nell'olio essenziale e perciò sono loro che possono modulare l'attività antimicrobica. I composti principali ritrovati negli oli hanno dimostrato, in precedenti studi, un'attività maggiore, rispetto ad altri terpenoidi, contro l'infezione da *Helicobacter pylori*. Infatti il β -pinene ha dato prova di una potente attività antibatterica contro *H. pylori*, e ha ridotto la resistenza agli antibiotici. Invece l' α -pinene ha registrato una riduzione dello stress ossidativo delle prostaglandine gastriche e una diminuzione dell'istamina, valori aumentati causa l'infezione da *Helicobacter pylori*.



GAD H, AL-SAYED E, AYOUB I. PHYTOCHEMICAL DISCRIMINATION OF PINUS SPECIES BASED ON GC-MS AND ATR-IR ANALYSES AND THEIR IMPACT ON *HELICOBACTER PYLORI*. PHYTOCHEM ANAL. 2021

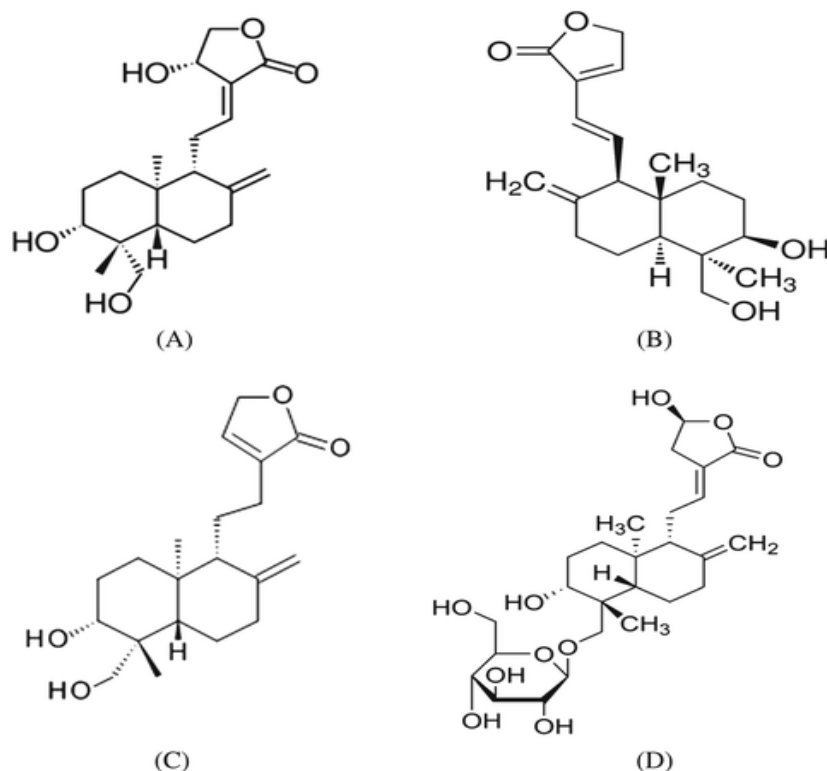
FIGURA 8. STRUTTURA CHIMICA DEI PRINCIPALI COMPOSTI VOLATILI RISCONTRATI NEL GENERE *PINUS*

Come per i polifenoli, nei terpeni si sono valutati anche i possibili meccanismi d'azione dei composti, come ad esempio l'inibizione di particolari enzimi, essenziali per la crescita batterica di *Helicobacter pylori*. Infatti, sempre, nello studio di Gad *et. al.* (2021), si sono ricercati i componenti bioattivi per poter inibire due enzimi: l'ureasi e lo shikimato chinasi. Il test è stato effettuato attraverso l'aggancio molecolare in silico o *docking* molecolare in silico, che determina il potenziale di legame tra il *pool* di sostanze fitochimiche identificate negli oli del genere *Pinus* e gli enzimi, considerati come possibili bersagli molecolari per l'eradicazione di *H. pylori*. I risultati hanno confermato che questi due enzimi, possono essere inibiti dai composti scoperti nell'olio essenziale di *Pinus*. Infatti l'estere dell'acido butanoico-3-metil-2-feniletilico, l'E-nerolidolo e l'estere dell'acido butanoico-2-metil-2-feniletilico mostravano un'elevata affinità e un

buon legame con il sito d'azione dell'ureasi. Invece il composto che ha ottenuto il più alto punteggio di legame con lo shikimato chinasi è stato Andrografolide, un diterpenoide labdano. Quindi questo studio ha ipotizzato che questi due enzimi, possano essere utilizzati come bersagli molecolari per il trattamento dell'infezione e che il *pool* di sostanze fitochimiche presenti negli oli essenziali del genere *Pinus*, siano responsabili dell'attività antibatterica.

Nei diversi articoli si nota lo studio di una determinata classe fitochimica, ovvero dei diterpeni/diterpenoidi clerodanici e labdani. In particolare gli studi di Spòsito *et. al.* (2019) ed Edmond *et. al.* (2020), trattano dei diterpeni/diterpenoidi clerodanici, invece Gad *et. al.* (2021) e Shaikh *et. al.* (2016) menzionano i diterpenoidi labdani. Per quanto riguarda i due studi sui diterpenoidi labdani, gli articoli pur trattando la stessa classe fitochimica, essa viene citata in diversi ambiti. Infatti nello studio di Gad *et. al.* il diterpenoide labdano, Andrografolide, viene nominato solo come il composto con maggiore efficacia per inibire l'enzima shikimato chinasi, senza ulteriori approfondimenti riguardo le molecole, poiché erano altri, i composti fitochimici, ad essere fonte di studio. Invece lo studio di Shaikh *et. al.* (2016), ha voluto concentrarsi totalmente sui diterpenoidi labdani e sulle loro funzioni/proprietà. La pianta in esame era *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees, usata già nell'antichità per le sue molteplici funzioni, come ad esempio epatoprotettiva, antiinfiammatoria, antivirale e antibatterica.

I composti isolati da *A. paniculata* furono: (A) Andrografolide, (B) 14-deossi-11,12-dideidroandrografolide, (C) 14-deossiandrografolide e (D) 3,14-dideossiandrografolide (Figura 9).

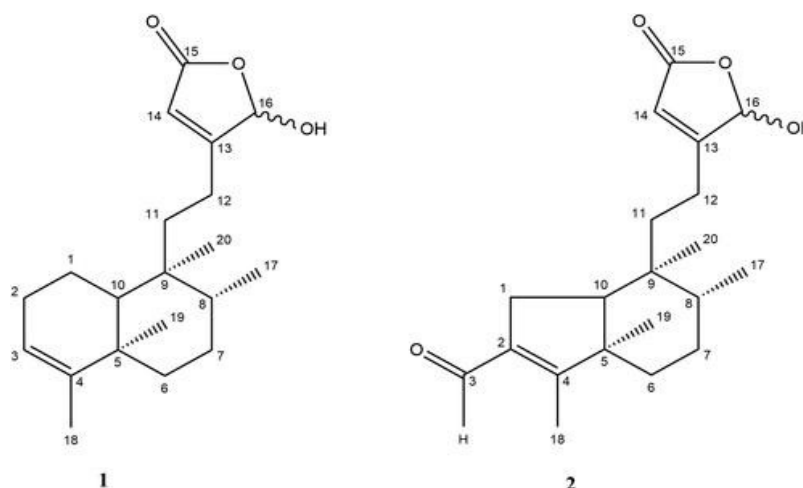


SHAIKH RU, DAWANE AA, PAWAR RP, GOND DS, MESHAM RJ, GACCHE RN. *INHIBITION OF HELICOBACTER PYLORI AND ITS ASSOCIATE UREASE BY LABDANE DITERPENOIDS ISOLATED FROM ANDROGRAPHIS PANICULATA*. PHYTOTHER RES. 2016

FIGURA 9. (A) ANDROGRAFOLIDE, (B) 14-DEOSSI-11,12-DIDEIDROANDROGRAFOLIDE, (C) 14-DEOSSIANDROGRAFOLIDE E (D) 3,14-DIDEOSSIANDROGRAFOLIDE.

Le MIC dei composti A, B, C, D e della rifampicina (agente antibatterico standard) erano rispettivamente di 9, 11, 10, 12 e 10 $\mu\text{g/ml}$. Inoltre i composti sono stati anche sottoposti al test dell'inibizione dell'ureasi con ottimi risultati. Come per la concentrazione inibitoria minima, il composto che ha dimostrato migliori risultati è stato l'Andrografolide (A), con un potenziale di inibizione dell'ureasi dell'85,54%. Anche i composti B, C e D hanno effettivamente un'ottima attività inibitoria di questo enzima, infatti B del 74,04%, C del 82,64% e D del 60,66%. Bisogna inoltre dire che tutti i diterpenoidi hanno avuto una migliore attività inibitoria rispetto al farmaco usato come standard per il test, ovvero l'acido acetoidrossamico. Infine le molecole hanno dimostrato dei buoni risultati di *docking* per quanto riguarda l'ureasi. In particolare il composto C ha ottenuto il punteggio di *docking* maggiore, circa -6,4 kcal/mol. Perciò

grazie a questi due studi, i diterpenoidi labdani hanno dimostrato oltre, ad una buona attività di inibizione dell'ureasi, anche un'efficace proprietà antibatterica. Invece gli studi di Spòsito *et. al.* (2019) ed Edmond *et. al.* (2020), trattano sempre di diterpenoidi, ma in questo caso, di quelli clerodanici. Lo studio di Edmond *et. al.* (2020) ha voluto prendere in considerazione le proprietà del fitocomplesso di *Polyalthia longifolia* (Sonn.) Thwaites, pianta originaria dell'India. Tale pianta ha esibito attività antiulcera e gastroprotettive, in test *in vivo* condotti su animali, in particolare sui ratti. Per prima cosa gli studi si sono concentrati sull'identificazione dei composti presenti in *P. longifolia*, per poi isolarli e sottoporli a test che dimostrassero la loro attività anti-*H. pylori* e la loro funzione antistaminica. Infatti è stato dimostrato che *Helicobacter pylori*, provocava la secrezione di istamina dai mastociti gastrici, causando così ulcere gastriche e gastriti, poiché tale fenomeno induceva ad un maggiore rilascio di acido gastrico. I due composti isolati e identificati furono due diterpenoidi clerodanici: 16(R/S)-idrossicleroda-3,13(14)-dien-15,16-olide (1) e (4→2)-abeo-16(R/S)-idrossi - cleroda-2,13(14)-dien-15,16-olide-3-al (2) (Figura 10).



EDMOND MP, MOSTAFA NM, EL-SHAZLY M, SINGAB ANB. TWO CLERODANE DITERPENES ISOLATED FROM *POLYALTHIA LONGIFOLIA* LEAVES: COMPARATIVE STRUCTURAL FEATURES, ANTI-HISTAMINIC AND ANTI-*HELICOBACTER PYLORI* ACTIVITIES. NAT PROD RES. 2021

FIGURA 10. 16(R/S)-IDROSSICLERODA-3,13(14)-DIEN-15,16-OLIDE (1) E (4→2)-ABEO-16(R/S)-IDROSSI - CLERODA-2,13(14)-DIEN-15,16-OLIDE-3-AL (2)

I risultati ai test sono stati ben diversi in base al tipo di molecola. Infatti il composto 1 ha avuto ottimi risultati riguardo l'istamina e la concentrazione minima inibitoria. Infatti ha determinato l'inibizione dell'istamina, in modo dose-dipendente e ha anche bloccato completamente la crescita del batterio con una concentrazione di MIC di 31,25 µg/ml. Invece il composto 2 ha ottenuto scarsi risultati in entrambi i test. Queste due molecole hanno una struttura chimica simile fra loro, eppure non sono altrettanto simili le loro attività. Questo potrebbe essere dato dal fatto, che il composto 1 possiede una porzione decalinica, invece il composto 2 non ha tale porzione, poichè questa ha subito una conversione in un sistema idrindanico. Perciò si pensa che la porzione decalinica sia l'elemento responsabile delle diverse proprietà dei diterpenoidi clerodanici. Nello studio di Spòsito *et. al.* (2019), a differenza di Edmond *et. al.* (2020), i terpeni presi in considerazione erano decisamente molti di più. Lo scopo principale dello studio era quello di dimostrare l'attività contro l'infezione da *Helicobacter pylori*, degli estratti di *Casearia sylvestris* Swartz, attraverso test *in vivo* e *in vitro*. Inoltre è stata valutata l'efficacia di questi estratti, derivati dalle foglie, in base al fatto che fossero incorporati o meno in un sistema di somministrazione di farmaci nanostrutturati. Il fitocomplesso di *C. sylvestris* comprende diversi metaboliti come monoterpeni, flavonoidi, fenoli e neolignani. Tuttavia i composti maggiormente studiati sono i diterpeni clerodanici, i quali sono considerati anche come caratteristica distintiva del genere *Casearia*. I diterpeni clerodanici riscontrati nel fitocomplesso erano 41, e 27 di questi erano simili a delle casearine (diterpeni del genere *Casearia*). Per la formulazione dei test *in vitro* e *in vivo* sono stati utilizzati diversi composti: l'olio essenziale, l'estratto etanolic e le sue frazioni e un diterpene isolato (casearina J), contro un particolare ceppo di *H. pylori*. In particolare nel test *in vivo*, con 53 ratti Wistar maschi sono stati utilizzati: l'estratto etanolic, l'estratto etanolic incorporato in un sistema lipidico nanostrutturato e la Frazione 2 (frazione di acetato di etile). Il test *in vivo* si è svolto con l'iniziale digiuno dei ratti per 12 ore, successivamente è stata somministrata loro un induttore di ulcera (indometacina). Dopo di che agli animali è stato ulteriormente

somministrata una soluzione di *H. pylori*, composta da 6×10^8 CFU/ml, per un periodo di 7 giorni. Dopo 24 ore dall'inizio del trattamento con *H. pylori*, è iniziata la tripla terapia convenzionale, con l'aggiunta dell'estratto etanolico incorporato e non e della Frazione 2 (F2), attraverso sonda gastrica. Passati i 14 giorni utili per il trattamento i topi, mediante eutanasia, sono stati sacrificati. Dopo incisione del ventre con bisturi, è stato estratto lo stomaco, per determinarne successivamente, la gravità delle lesioni e l'ipotetica presenza di *H. pylori*. Invece i test *in vitro* che sono stati effettuati comprendevano: la determinazione della MIC; l'analisi del biofilm e il *test time-kill*. I risultati delle analisi hanno evidenziato che l'estratto etanolic e la F2 contenevano le maggiori quantità di diterpenoidi clerodanici, con delle percentuali di 14,6% e 54,3%. Attraverso HPLC sottofrazione -Analisi PDA, si è notato che le sottofrazioni dell'estratto etanolic, in particolare 4 di queste (SF20, SF13, SF46 e SF17), avevano un alto contenuto di diterpenoidi clerodanici, con diversa polarità tra loro. Proprio queste 4 sottofrazioni hanno dimostrato di essere responsabili dei valori molto bassi di MIC di F2. Infatti F2 ha mostrato una MIC di 62,5 µg/ml, invece le altre 2 frazioni (1000 µg/ml), l'estratto etanolic (1000 µg/ml) e l'olio essenziale (125 µg/ml) aveva valori di MIC maggiori (Tabella 3). Inoltre come possibile elemento con attività antimicrobica, da F2 fu isolata la casearina J, che però non ha mostrato attività antimicrobica sia in forma normale che in forma idrolizzata. La casearina J è stata idrolizzata poiché i diterpenoidi clerodanici sono sensibili all'acido gastrico e quindi si degradano, ma allo stesso tempo sono bioattivi quindi si voleva scoprire se i derivati dell'idrolisi, della casearina J, avessero ancora delle attività. Avendo dimostrato una buona attività antimicrobica l'estratto etanolic e F2 sono stati incorporati in un sistema lipidico nanostrutturato, per misurarne le possibili variazioni positive, da un punto di vista concentrazione minima inibitoria. Nonostante ciò, l'attività antibatterica non venne modificata. Tuttavia questi due estratti incorporati hanno dimostrato di inibire il biofilm di *Helicobacter pylori*. L'estratto etanolic incorporato era più efficace di quello non incorporato, ma la loro azione era comunque minore rispetto a F2 non incorporata e incorporata.

TABELLA 3. MIC DEI COMPOSTI DERIVATI DALLE FOGLIE DI *C. SYLVESTRIS*

Plant derivative	MIC ($\mu\text{g/mL}$)
Essential oil	125
Ethanolic extract	1000
Fraction 1	>1000
Fraction 2	62.5
Fraction 3	>1000
Sub-fraction 13	500
Subfraction 17	>1000
Sub-fraction 20	250
Sub-fraction 46	1000
cas J	>1000
Hydrolyzed cas J	>1000
Ethanolic extract incorporated	>1000
Fraction 2 incorporated	>1000
Amoxicillin	0,007

SPÓSITO L, ODA FB, VIEIRA JH, CARVALHO FA, DOS SANTOS RAMOS MA, DE CASTRO RC, CREVELIN EJ, CROTTI AEM, SANTOS AG, DA SILVA PB, CHORILLI M, BAUAB TM. *IN VITRO AND IN VIVO ANTI-HELICOBACTER PYLORI ACTIVITY OF CASEARIA SYLVESTRIS LEAF DERIVATIVES*. J ETHNOPHARMACOL. 2019

Un ulteriore test svolto era quello del *time-kill*, il quale aveva dimostrato solo una diminuzione della crescita batterica, e anche in questo caso, i risultati migliori per inibire il ceppo batterico, erano riconducibili a F2. Inoltre nel test *in vivo*, l'estratto etanolic incorporato e non, e F2, in aggiunta alla tripla terapia hanno ridotto i margini delle lesioni gastriche. Successivamente, sempre *in vivo*, si effettuò il test dell'inibizione dell'ureasi per determinare o meno ancora la presenza del batterio, e l'unico composto ureasi positivo e quindi, non adeguato all'eliminazione del batterio era F2. Quindi si ipotizza che i diterpenoidi clerodanici sono la causa dell'attività antibatterica, di F2 e dell'estratto etanolic, poiché i due composti ne sono ricchi. Inoltre le sottofrazioni e la casearina J hanno minore attività degli estratti precedentemente nominati, pur essendo molecole isolate e quindi più concentrate. Questo fenomeno potrebbe essere

prodotto da sinergismi tra più diterpeni. Anche l'olio essenziale ha dato ottimi risultati di MIC, probabilmente causa la presenza di idrocarburi sesquiterpenici, quindi anche tali terpeni hanno attività anti-*H. pylori*. Inoltre l'incorporazione in un sistema nanostrutturato è consigliato per l'inibizione del biofilm e sconsigliato nella procedura di microdiluzione, perché l'attività antibatterica viene smorzata. Infine l'estratto etanolo è efficace anche *in vivo*, sia come riduttore di ulcera che come elemento eradicante nei confronti del batterio. Quest'ultima proprietà non è posseduta da F2, tuttavia ha documentato anch'essa una diminuzione delle lesioni gastriche, probabilmente grazie ai diterpenoidi clerodanici.

Un altro terpenoide, di cui si è approfondito l'effetto contro *Helicobacter pylori* è il Nimbolide, presente in *Azadirachta indica* A. Juss. (Wylie *et. al.*, 2022). In precedenti studi, effettuati presso lo stesso laboratorio (Blum *et. al.*, 2019), era stato provato l'attività antibatterica di *A. indica*, ma non era stato determinato il principio attivo responsabile della sua attività e il meccanismo d'azione, perciò Wylie *et. al.* (2022) si sono adoperati nel produrre una risposta chiara e specifica. Dall'olio essenziale di *A. indica* sono stati isolati e presi in considerazione 3 limonoidi: azadiractina, gedunin e nimbolide. Tuttavia solo il nimbolide, ha dato prova di un'attività battericida *in vitro*, dipendente dal tempo e dalla concentrazione. L'attività di questo terpenoide era attiva verso ceppi multiresistenti e non, e aumentata grazie al diminuire del pH. Perciò si suppone che ci sia un sinergismo con l'ambiente acido. Inoltre l'attività battericida non dipendeva dallo stato di crescita batterica di *H. pylori*, e questo effetto era costante e non reversibile, se il ceppo veniva esposto ad alte concentrazioni per un lungo periodo di tempo. Successivamente testando l'effetto del nimbolide e dell'olio essenziale di *A. indica* sul biofilm, è stato evidenziato che questi composti lo hanno inibito maggiormente rispetto all'antibiotico amoxicillina. Un vantaggio di questi due composti è che non hanno effetti negativi sulle cellule umane, nozione documentata grazie ai test di emolisi. Purtroppo uno degli obiettivi non è stato raggiunto, poiché non è ancora stato dimostrato il meccanismo d'azione di questo terpenoide. Tuttavia come altri composti della stessa classe il meccanismo d'azione, potrebbe essere la

lacerazione della membrana batterica oppure le modifiche della fosforilasi ossidativa. Anche se, la sua attività battericida, indipendente dallo stato di crescita batterica, potrebbe essere dovuta a dei processi che vanno a provocare un danno a livello del DNA. Infine si può dire che le proprietà antibatteriche di *A. indica* siano dovute ad un particolare composto fitochimico, appartenete alla classe dei terpenoidi, ciò nonostante l'olio essenziale ha molti metaboliti secondari al suo interno ed è probabile che il Nimbolide non sia l'unico composto con una attività così marcata verso *H. pylori*. Se nello studio di Wylie *et. al.* (2022) si sono andate a ricercare le molecole bioattive di una specifica droga vegetale, nelle ricerche condotte da Spiegel *et. al.* (2021) si presero in considerazione numerosi composti derivati da molte specie di piante, in gradi di legarsi al sito attivo di Spo T. Si vogliono individuare questi composti, perché la proteina Spo T è responsabile della produzione dell'enzima (p)ppGpp, che regola la "stringent response". La "stringent response" viene attivata qualora il microrganismo sia in un ambiente sfavorevole, e per sopravvivere predilige una sottoregolazione della sintesi ribosomiale e una sovraregolazione di geni riconducibili allo stress. Perciò *Helicobacter pylori* potrebbe essere eradicato grazie, all'interferenza causata dalle molecole bioattive con la proteina Spo T e quindi con la "stringent response". Gli esperimenti condotti erano tutti *in vitro*, e sono iniziati valutando i composti con maggior affinità di legame con la proteina Spo T. Una prima selezione si è basata sulle molecole che avevano un'energia libera minore di -7,6 kcal/mol, indice di un legame facile da effettuare ed efficace. Le molecole dopo la prima selezione erano 150 per poi diventare 10 con una seconda selezione, applicando maggiori filtri, come una tossicità non rilevante per l'essere umano. Successivamente sono state calcolate la concentrazione minima inibitoria (MIC) e l'attività anti-biofilm. Per quanto riguarda la MIC molte molecole hanno dimostrato una buona proprietà come amentoflavone e ipericina (128 µg/mL) ed escina (256 µg/mL), tuttavia la sostanza più attiva è stata la dioscina con 64 µg/mL (Figura 11). Il biofilm insieme alla conversione in coccoidi di *Helicobacter pylori* sono riconducibili al metodo del batterio per adattarsi all'ambiente

sfavorevole, perciò le molecole selezionate dovrebbero anche inibire il biofilm e evitare la modifica morfologica.

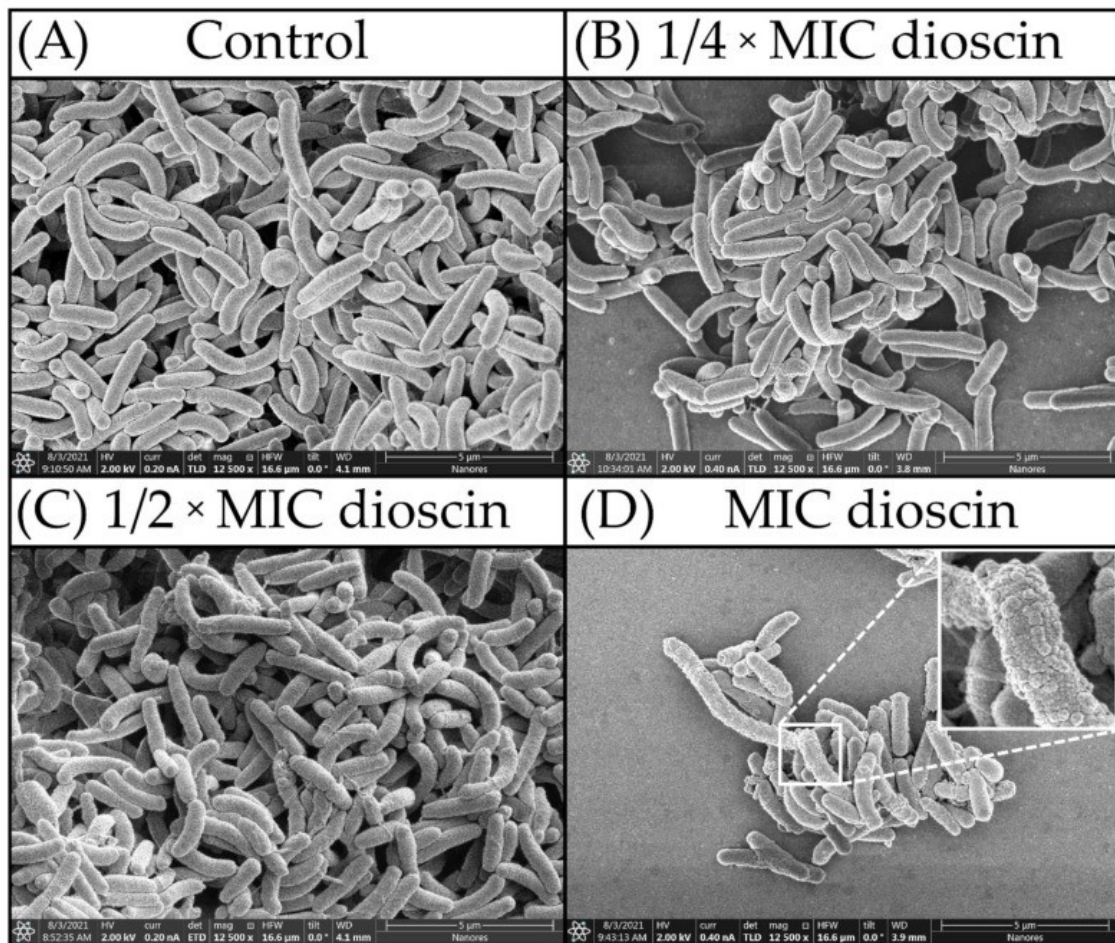


FIGURA 3 SPIEGEL M, KRZYŻEK P, DWORNICZEK E, ADAMSKI R, SROKA Z. *IN SILICO* SCREENING AND *IN VITRO* ASSESSMENT OF NATURAL PRODUCTS WITH ANTI-VIRULENCE ACTIVITY AGAINST *HELICOBACTER PYLORI*. MOLECULES. 2021

FIGURA 11. CELLULE DI *H. PYLORI* TRATTATE CON DIVERSE CONCENTRAZIONI DI DIOSCINA

Anche in questo frangente, la dioscina riportava l'inibizione maggiore verso la produzione di biofilm e una minor conversione in forme coccoidi. Gli altri composti con una MIC non indifferente come escina e amentoflavone, hanno ridotto il biofilm, ma le forme coccoidi erano troppo elevate. Inoltre tra le molecole scelte, alcune hanno perfino aumentato la quantità di biofilm, come ipericina e ginsenoside. Quindi vedendo i risultati di questi test lo studio si è focalizzato su un approfondimento dell'attività della dioscina, e le ulteriori verifiche hanno evidenziato che la molecola

non comportava una modifica nella morfologia, infatti la maggior parte delle cellule erano in forma a spirale/bastoncello. Tuttavia le cellule mostravano comunque evidenti segni di sofferenza, attraverso secrezione di vescicole di membrana, che attualmente sono considerate come meccanismi di adattamento a nuovi ambienti. Tali vescicole possono rendere possibili interazioni cellula-cellula e la secrezione di biofilm. Perciò non riscontrando un cambiamento rilevante nelle cellule, si suppone che l'attività anti-biofilm non fosse il meccanismo responsabile, della distruzione delle cellule batteriche. Infine si sono riscontrate interazioni additive tra antibiotici come claritromicina e dioscina, che hanno permesso una riduzione della dose, delle diverse sostanze esaminate, di 2-4 volte.

In conclusione i composti della classe dei terpeni hanno confermato le ipotesi poste all'inizio di ogni studio dimostrando: un'attività antibatterica, attraverso i possibili siti d'azione per l'eradicazione dell'infezione da *H. pylori*; un'inibizione di enzimi necessari alla sopravvivenza del batterio e una trascurabile tossicità delle molecole bioattive. Tutto ciò convalida l'ipotesi che la creazione di trattamenti alternativi con droghe vegetali, non sia un'idea così irrealizzabile.

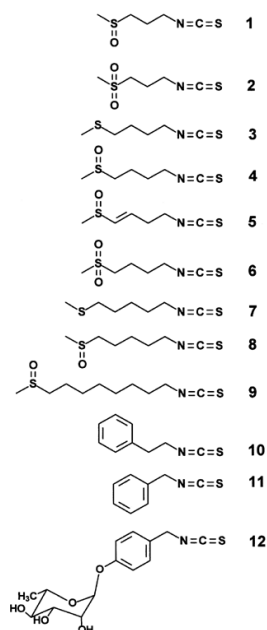
4.4. Combinazione di composti di diversa classe fitochimica

I precedenti sottocapitoli hanno dimostrato un'attività antimicrobica contro il batterio *Helicobacter pylori*, solo dei composti appartenenti a due specifiche classi fitochimiche, ovvero la classe dei polifenoli e dei terpeni. Inoltre gli studi erano direzionati verso solo una determinata classe fitochimica (polifenoli e terpeni), oppure solo i composti di una delle due classi dimostravano le loro proprietà antibatteriche. Quindi in questa parte, del mio lavoro di tesi, tratterò testi scientifici che hanno verificato l'attività antibatterica di molecole appartenenti a più di una classe fitochimica, le quali esibiscono, in certi particolari casi, un fenomeno di sinergia. Un articolo scientifico che parla proprio di due classi fitochimiche che svolgono assieme un'attività antibatterica, è quello redatto da Adeniyi *et. al.* (2009). Questo scritto ha voluto approfondire

L'attività contro l'infezione da *Helicobacter pylori*, svolta da *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. e *Eucalyptus torelliana* F. Muell., piante del genere *Eucalyptus*, che hanno dimostrato proprietà gastroprotettive. I diversi estratti sono stati sottoposti ad uno screening fitochimico e alla determinazione dell'attività antimicrobica. Lo screening ha determinato saponine e tannini nelle foglie e nella corteccia del fusto di *E. camdulensis* e nella corteccia del fusto di *E. torelliana*. Invece nelle foglie di *E. torelliana* sono stati riscontrati antrachinoni e glicosidi. In nessun estratto sono stati identificati gli alcaloidi. Inoltre tutti gli estratti, tranne quelli metanolici di foglie e corteccia di *E. camdulensis* e foglie di *E. torelliana*, hanno svelato un'attività antimicrobica verso il batterio. Infine sono state calcolate anche le MIC degli estratti grezzi, e i valori oscillano tra 12,5 a 400 µg/mL. Perciò i dati ottenuti hanno identificato le saponine (terpeni) e i tannini (polifenoli), come molecole attive presenti in queste due droghe vegetali, aventi una buona attività batterica, idonea per una futura terapia per l'eradicazione di *H. pylori*. Studi che prendono in considerazione contemporaneamente polifenoli e terpeni sono stati condotti anche da altri ricercatori, come Heidari *et. al.* (2018). Lo scopo di questa ricerca era quello di approfondire l'attività contro *H. pylori* di alcuni estratti di *Cymbocarpum erythraeum* (DC.) Boiss. e dei suoi flavonoidi. Approfondire poiché già precedenti studi, avevano mostrato l'attività dell'estratto metanolico di questa pianta e dei suoi flavonoidi, contro il batterio in questione. Per prima cosa sono stati isolati i composti e successivamente è stata determinata la suscettibilità antimicrobica, con l'uso di ceppi clinici di *H. pylori*. Il processo di isolamento delle molecole è iniziato dalla creazione degli estratti, in questo caso: un estratto di metanolo, un estratto di esano e uno di metanolo-acqua. L'estratto di metanolo, tuttavia non erano il prodotto finito, poiché tramite questo sono state generate delle sottofrazioni con, etere di petrolio, butanolo e acqua. Dall'estratto di esano si è isolato il composto 4 e dalle due sottofrazioni dell'estratto di metanolo si sono ottenuti i composti 1, 2 e 3. I composti ottenuti attraverso le vie di purificazione erano: isoquercetina (1), rutina (2), β-sitosterolo (3), e (E)-2-decenal (4).

Per quanto riguarda l'attività antibatterica, gli estratti di metanolo e di etere di petrolio hanno prodotto una zona di inibizione di $30 \pm 0,04$ mm, tuttavia l'estratto che ha inibito la maggior parte dei ceppi di *H. pylori* era l'estratto di esano. Invece gli altri estratti, i composti 1 e 2 e la frazione flavonoidica non hanno mostrato proprietà rilevanti contro i ceppi di *H. pylori*. Anche se la rutina isolata da un'altra pianta, in precedenti studi, aveva mostrato attività antibatterica contro il batterio. Quindi l'estratto di esano, essendo il composto con maggiore attività, si suppone che i componenti attivi siano di natura non polare, e uno di questi è il (E)-2-decenal. Ne è la prova l'olio essenziale di *C. erythraeume* che presenta circa il 52,55% di (E)-2-decenal (composto carbonilico di natura non terpenica) nella sua composizione, avente proprietà antibatteriche e larvicide. Perciò la proprietà anti- *H. pylori*, di questa molecola potrebbe essere ricondotte alla sua natura non polare.

Negli studi di Hamad *et. al.* (2015), di Adeniyi e Anyiam (2004), di Haristoy *et. al.* (2005) e di Njume *et. al.* (2011), si sono valutate classi fitochimiche, non ancora citate in questo lavoro di tesi, come gli isotiocianati e gli alcaloidi. Infatti nel documento formulato da Haristoy *et. al.* (2005), si è voluto determinare le proprietà di un particolare isotiocianato, L-sulforafano. In particolare si è dimostrata l'attività *in vitro*, di questo composto, di un suo enantiomero sintetico e di una miscela chirale sintetica, attraverso una coltura pura o con cellule di mammifero. Infine come elemento di confronto per l'attività del L-sulforafano, sono stati utilizzati altri 11 isotiocianati. Questo poiché gli isotiocianati precedentemente studiati hanno mostrato attività antibatteriche. Perciò è stata calcolata la MIC e l'attività battericida dei diversi isotiocinati (Figura 12), contro 25 ceppi di *Helicobacter pylori*.



HARISTOY X, FAHEY JW, SCHOLTUS I, LOZNIOWSKI A. *EVALUATION OF THE ANTIMICROBIAL EFFECTS OF SEVERAL ISOTHIOCYANATES ON HELICOBACTER PYLORI*. PLANTA MED. 2005

FIGURA 12. STRUTTURA CHIMICA DEGLI ISOTIOCIANATI IN ESAME.

D-L- suforafano, D-sulforafano e L- sulforafano (composto 4), ovvero i composti di cui si voleva avere maggiori approfondimenti, hanno evidenziato degli elevati valori di MIC (da 0,06 a 8 $\mu\text{g/mL}$). Tuttavia anche il composto 12 e il composto 9 hanno evidenziato dei buoni risultati in termini di MIC, anche se 9 ha dimostrato meno attività di 12. Infatti il composto 4 e 12 dimostravano di avere complessivamente MIC inferiori di 4/8 volte, rispetto agli altri composti. Comunque tutti gli isotiocianati, ad una concentrazione di $5 \times \text{MIC}$, hanno esibito un'inibizione dei ceppi di *H. pylori*, in particolare i composti 2, 4, 6, 9 e 12 avevano un'attività battericida molto potente, contro forme intra ed extracellulari del batterio. Bisogna però dire che se alcuni composti erano considerati meno attivi, comunque valutando i dati in maniera più ampia con altre molecole fitochimiche di diversa classe, si può affermare che tali composti erano sempre più efficaci e potenti rispetto, ad altri composti identificati come antimicrobici, come ad esempio l'epigallocatechina gallato. Inoltre si è notato che l'attività battericida dei composti non veniva influenzata dai ceppi di *H. pylori* resistenti alla claritromicina e metronidazolo. Si suppone che l'attività antibatterica sia

correlata alla struttura chimica, in particolare dal gruppo funzionale $-N=C=S$, isotiocianato. Inoltre l'attività non dipende dalla chiralità della molecola, infatti gli enantiomeri ottici studiati del sulforafano, non hanno apportato modifiche alle proprietà già presenti. Dopo di che l'attività antimicrobica diminuisce causa desaturazione della catena laterale (composto 5) e presenza, nella catena laterale, di gruppi aromatici (composto 10 e 11).

In conclusione lo scopo principale dello studio è stato raggiunto poiché si è dimostrata l'attività batterica contro *Helicobacter pylori* di L-sulforafano, di un suo enantiomero sintetico e di una miscela chirale sintetica. Inoltre si sono scoperti anche altri 2 composti, ovvero *Hirsutin* (composto 9) e *4RBTC* (composto 12), i quali anche loro hanno inibito in maniera importante *Helicobacter pylori*.

Come già detto il gruppo funzionale isotiocianato comprende lo zolfo, l'ossigeno e l'azoto. Quest'ultimo elemento chimico caratterizza una specifica classe fitochimica, ovvero gli alcaloidi. La classificazione degli alcaloidi è spesso creata in base alla natura della struttura contenente azoto, per esempio indolo, piperidina, pirrolidina etc. Ed è proprio la pirrolidina, una di queste strutture contenenti azoto, che ha esibito una buona proprietà antibatterica nello studio di Njume *et. al.* (2021).

Questo gruppo di studiosi avevano già analizzato *Sclerocarya birrea* (A.Rich.) Hochst, affermandone la sua attività verso *Helicobacter pylori*, in particolare gli estratti grezzi di acetone. Purtroppo però non sono stati trovati i composti attivi, perciò l'obbiettivo di tale studio è proprio questo. Per prima cosa è stato preparato l'estratto grezzo, poi è stato effettuato un frazionamento dell'estratto grezzo mediante analisi cromatografica su colonna e successivamente è stato determinato il numero dei componenti attraverso analisi cromatografica su strato sottile (TLC). Dopo di che l'identificazione dei singoli composti è stata definita grazie gascromatografia e analisi di spettrometria di massa, confrontando gli indici di ritenzione e gli spettri di massa dei campioni con quelli presenti nella biblioteca di Wiley 275 (New York). Infine è stata calcolata la concentrazione minima inibitoria del 50% (MIC50), dei composti e delle 18 frazioni

trovate. Dopo la cromatografia su strato sottile sono stati rilevati 9 composti, 2 in particolare e le frazioni esaminate ovvero, la frazione EA 1 e le frazioni EMW 3, 5 e 6, hanno evidenziato 29 composti volatili. Tuttavia la frazione 3 e 5 ne erano privi, quindi dovevano provenire da EA 1 (acetato di etile 100%) e EMW 6 (combinazione di solventi). Le principali molecole volatili identificate furono: terpinen-4-olo (35,83%), pirrolidina (32,15%), aromadendrene (13,63%) e α -gurjunene (8,77%). Inoltre la frazione più ricca in percentuale di tali composti volatili era EA 1 con l'86,57%. Successivamente valutarono i valori di MIC50, solo 16 frazioni sulle 18 totali hanno dimostrato un'attività inibitorie (da 310 $\mu\text{g/mL}$ a 2500 $\mu\text{g/mL}$), tuttavia i risultati più importanti si sono ottenuti con il terpen-4-olo e la pirrolidina. Queste molecole hanno registrato delle MIC50, con dei valori molto simili all'antibiotico amoxicillina. Inoltre la minor potenza inibitoria, delle frazioni, potrebbe essere causata dall'esigua quantità dei componenti attivi, oppure altri componenti fungevano da diluenti, riducendo l'attività dei principi attivi. Perciò si suppone che l'attività antibatterica dell'estratto grezzo di acetone di *S. birrea*, sia riconducibile al terpen-4-olo e alla pirrolidina, sia singolarmente che in sinergia con altri composti. Per quanto riguarda il terpinen-4-olo, si ipotizza che il meccanismo d'azione sia basato sulla frammentazione della membrana cellulare e sull'alterazione delle sue attività, grazie alla sua natura idrofobica/idrofilica, che gli permette di essere affine sia all'acqua, che si ritrova intorno alla parete cellulare del batterio, che alla membrana citoplasmatica. In conclusione i composti volatili terpenin-4-olo e la pirrolidina, hanno dimostrato un'ottima soluzione per poter combattere il microorganismo *Helicobacter pylori*. Tuttavia si dovranno condurre ulteriori studi per ottenere maggiori informazioni sulla tossicità, sul meccanismo d'azione e sulle loro proprietà *in vivo*.

Una caratteristica tipica di *Helicobacter pylori* è la sua attività ureasica e nello studio condotto da Adeniyi e Anyiam (2004), si è voluto comprendere meglio se l'estratto vegetale di *Allium ascalonicum* Linn., potesse avere un'attività inibitoria nei confronti dell'ureasi e una proprietà antibatterica. Perciò sono stati formulati degli estratti di metanolo e di esano, dalle foglie della droga vegetale. Gli estratti sono stati poi

sottoposti a diversi test, ovvero quello per dimostrarne l'attività contro il batterio *H. pylori*, la sua attività di inibizione dell'enzima ureasi e lo screening fitochimico, per individuare i metaboliti secondari.

Nella foglia di *A. ascalonicum* sono stati identificati molti metaboliti secondari, ossia alcaloidi, glicosidi cardioattivi e saponine e tracce di flavonoidi, mentre erano assenti antrachinoni e tannini, ad alte concentrazioni, tranne per i flavonoidi. Inoltre l'estratto di metanolo ha inibito tutti e 5 i ceppi di *Helicobacter pylori*, in misura differente e la concentrazione minima inibitoria aveva dei valori che oscillavano tra i 6,25 e 12,5 mg/mL. Infine si è osservato che l'estratto di metanolo ha indotto un'inibizione dell'enzima ureasi, in modo dose-dipendente, attraverso il metodo alcalimetrico. Con l'elaborazione dei dati forniti dai test, si suppone che gli effetti contro *Helicobacter pylori*, della pianta, siano dovuti alla presenza di alcaloidi, saponine e tracce di olio essenziale. Tuttavia si dovranno formulare ulteriori approfondimenti per identificare i principi attivi, la possibile tossicità e gli effetti *in vivo*.

Se in *A. ascalonicum*, si è riscontrato un mix di composti fitochimici di diverse classi, nello studio di Hamad *et. al.* (2015), si sono valutati diversi mix di estratti vegetali provenienti da molteplici droghe vegetali. Le piante in questione in questa ricerca erano: *Syzygium aromaticum* L., *Piper nigrum* L., *Cuminum cyminum* L., *Salvia officinalis* L., buccia di *Punica granatum* L., *Zingiber officinale* Rosc., *Commiphora molmol* Engl. e *Glycyrrhiza glabra* L. Delle diverse piante si sono creati degli estratti acquosi che sono stati testati singolarmente oppure in miscela, per dimostrarne l'attività contro *Helicobacter pylori*. Le miscele in totale erano 4 e potevano contenere dai 4 agli 8 estratti formulati, tutto ciò per comprendere meglio la combinazione più efficace (Tabella 4). Come per gli estratti singoli, anche per le miscele l'attività antibatterica viene testata con il metodo per diffusione, che successivamente permette di misurare in mm, il diametro delle aree inibite dagli estratti. Inoltre è stata calcolata la concentrazione minima inibitoria, delle diverse concentrazioni, della miscela più attiva contro il batterio. La miscela più attiva era Mix 2 e di questa si è voluto documentare

un'altra sua possibile proprietà, ovvero l'attività antibatterica di Mix 2 in combinazione con il latte per bambini. In effetti è un'informazione molto importante da sapere poiché, dal punto di vista di incidenza, molti bambini dei paesi sottosviluppati contraggono l'infezione nei primi mesi di vita, perciò sarebbe ideale trovare una soluzione appropriata. Per valutare l'attività batterica sono state aggiunte al latte diverse concentrazioni di Mix 2, in percentuali del 12,5, 25, 50 e 100 %, e ogni concentrazione per ogni singolo estratto è stata calcolata in mg/ml. Infine mediante il metodo per diffusione sono stati calcolati i diametri delle zone inibite da Mix 2. Successivamente sono stati calcolati i composti fenolici totali, l'attività antiossidante e lo screening fitochimico.

TABELLA 4. MISCELE FORMULATE CON DIVERSI TIPI DI ESTRATTI VEGETALI

Plants	Concentration (mg/ml)			
	Mix1	Mix2	Mix3	Mix4
Cloves	12.65	10.12	6.325	10.12
Pepper	15	-	7.5	12
Cumin	26.1	-	13.05	20.88
Sage	25.6	-	12.8	20.48
Pomegranate peel	-	24	15	24
Ginger	-	13.2	8.25	-
Myrrh	-	20	12.5	-
Licorice	-	14.44	9.025	-

HAMAD GM, TAHA TH, EL-DEEB NM, ALSHEHRI AM. *ADVANCED TRENDS IN CONTROLLING HELICOBACTER PYLORI INFECTIONS USING FUNCTIONAL AND THERAPEUTICALLY SUPPLEMENTS IN BABY MILK.* J FOOD SCI TECHNOL. 2015

Lo studio ha dimostrato che tutti gli estratti, presi singolarmente hanno inibito *H. pylori* (da 11 a 32 mm), tranne la mirra e la liquirizia, tuttavia sono state le miscele composte dagli estratti ad ottenere maggiore successo, soprattutto il Mix 2 con una zona di inibizione di 39 mm e una MIC con un valore di 3 mg/ml (Tabella 5).

FIGURA 5. MISURA DEL DIAMETRO DELL ZONE, DOVE *H. PYLORI* È STATO INIBITO CON ESTRATTI VEGETALI SINGOLI OPPURE IN MISCELA

Plant extract	Diameter of inhibition zone (mm)
Cloves	20
Pepper	11
Cumin	14
Sage	18
Pomegranate peel	32
Ginger	11
Myrrh	ND
Licorice	ND
Plant mix 1	21
Plant mix 2	39
Plant mix 3	23
Plant mix 4	28

HAMAD GM, TAHA TH, EL-DEEB NM, ALSHEHRI AM. *ADVANCED TRENDS IN CONTROLLING HELICOBACTER PYLORI INFECTIONS USING FUNCTIONAL AND THERAPEUTICALLY SUPPLEMENTS IN BABY MILK.* J FOOD SCI TECHNOL. 2015

I diversi tipi di latti formulati con differenti concentrazioni di Mix 2 hanno dimostrato un'inibizione della crescita di *Helicobacter pylori*, con zone di inibizione che variano da 18 a 30 mm. Poiché Mix 2 da solo aveva una maggiore attività batterica, rispetto alla sua combinazione con il latte, si pensa che le vitamine, proteine e grassi, nel latte utili

al fabbisogno energetico del lattante, siano anche di supporto alla crescita di *Helicobacter pylori*. Ovviamente in questo studio quando si parla di latte e lattanti, non si intende l'allattamento al seno, ma tramite biberon. Dopo di che è stata valutata la proprietà citotossica del Mix 2, tuttavia non ha mostrato nessun rischio di tossicità l'uso della miscela di estratti, anche se si raggiunge la concentrazione standard di erbe sulle cellule. Osservando queste attività antibatteriche degli estratti è stata effettuata un'analisi qualitativa dei composti fitochimici, e quasi tutti gli estratti erano composti da: alcaloidi, tannini, glicosidi, flavonoidi, terpenoidi e saponine. Inoltre queste classi di composti erano molto abbondanti nei diversi estratti acquosi. Successivamente, sempre trattando di composti fitochimici, sono stati calcolati i fenoli totali e i flavonoidi, mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC). Il Mix 2 ha mostrato un alto contenuto di composti fenoli e flavonoidi, come l'acido gallico e ferulico, responsabili dell'attività antiossidante. Il Mix 2 conteneva circa 472 mg di acido gallico/g di estratto, e tale informazione può spiegare la capacità positiva della miscela 2, di eliminare i radicali liberi dal latte. Perciò questo studio ha dimostrato che la combinazione di più estratti, in particolare di Mix 2, avevano una maggiore azione verso *H. pylori* rispetto all'estratto singolo. Inoltre non è stata dimostrata nessuna tossicità della miscela 2, e quest'ultima potrebbe essere usata per il trattamento di *Helicobacter pylori* sia nell'adulto che nel bambino. Tuttavia non si potrà comprendere precisamente l'effetto terapeutico, finché la miscela non sarà introdotta in studi con animali o con volontari. In sintesi gli studi citati hanno evidenziato l'attività antibatterica contro *H. pylori*, di terpeni, polifenoli ma anche di composti contenenti atomi di azoto e di zolfo, come alcaloidi e isotiocianati. I risultati ai diversi test sono stati incoraggianti ed evidenti.

CONCLUSIONI

Nel 2015, nel mondo, circa 4,4 miliardi di persone sono risultate positive all'infezione da *Helicobacter pylori*. Purtroppo questi numeri con il passare degli anni non sono variati di molto, e perciò è difficile ignorare questa problematica. Tuttavia è ancora più difficile ignorare che le terapie antibiotiche, utilizzate solitamente per l'eradicazione, stanno progressivamente perdendo la loro efficacia che, in passato, esercitavano sul batterio. Perciò si sta cercando di tamponare questo fenomeno con ad esempio il prolungamento delle terapie, ma purtroppo l'antibiotico-resistenza non dà segni di remissione. Quindi questo lavoro di tesi, attraverso studi, articoli e documenti scientifici, ha ricercato nuove strategie terapeutiche, in particolare nel mondo vegetale. Infatti in questo elaborato è stata condotta una analisi della letteratura scientifica per individuare studi di base riportanti l'uso di estratti vegetali per il trattamento di infezioni da *H. pylori*. Gli studi trattavano di differenti specie di piante, più o meno conosciute, e dei rispettivi composti fitochimici. I composti fitochimici più citati facevano parte dei polifenoli e dei terpeni. Ogni studio considerava una pianta diversa, tuttavia i test effettuati li accumulavano. Infatti gli articoli si sono principalmente concentrati: sull'attività antibatterica delle molecole; sull'inibizione di enzimi utili per la crescita batterica; sul calcolo della concentrazione minima; sul meccanismo d'azione dei composti fitochimici per la eliminazione del batterio; studi sulla tossicità; sull'inibizione di biofilm; sul rapporto che si creava tra antibiotici e composti fitochimici. In effetti l'oroxindina (flavone), l'estratto di acetato di etile di *Canario album* Raeusch (ricco di polifenoli) e dioscina (saponina), hanno dimostrato delle interazioni additive con antibiotici, in particolare l'estratto di *C. album* ha diminuito la MIC degli antibiotici di 16 volte. Inoltre anche i composti fitochimici di *Sclerocarya birrea* (A.Rich.) Hochst, sono stati testati con antibiotici di uso comune. Si è notato dallo studio che terpinen-4-olo e pirrolidina avevano dimostrato delle MIC simili all'antibiotico amoxicillina. Tuttavia non si può mai essere certi della reale potenza dei composti fitochimici, ne è un esempio la MIC di oroxindina (50 µg/mL) la quale aveva un valore

di MIC buono, ma non simile all'antibiotico di controllo. Tuttavia mettendo il dato in relazione ad altri dati presi da altri articoli si è scoperto che il flavone in questione era più attivo rispetto agli antibiotici poiché i valori di MIC degli antibiotici (256 µg/ml) erano aumentati per l'antibiotico-resistenza. Un altro dato molto interessante è che i composti fitochimici, ossia polifenoli, terpeni e altre classi, sono riusciti ad inibire l'attività di diversi enzimi e proteine, come l'ureasi, la prolina deidrogenasi, la proteina Spo T, lo shikimato chinasi e l'aspartato-semialdeide deidrogenasi. Ciò nonostante l'enzima maggiormente studiato era l'ureasi, questo perché è anche il più conosciuto, tra tutti. Infatti un gran numero di articoli come ad esempio lo studio condotto da Yan *et. al.* (2022) hanno riportato che oltre a dimostrare l'attività inibitoria degli estratti ricchi di polifenoli nei confronti dell'ureasi, vi è anche l'ipotesi che questa attività fosse riconducibile ad una sottoregolazione del gene trasportatore dell'urea. Invece nello studio di Lin *et. al.* (2005), si pensa che l'inibizione dell'enzima da parte dei composti fenoli, sia dovuto ad una modifica della conformazione dell'ureasi causata dalle molecole fitochimiche. Inoltre sempre lo stesso studio afferma che i composti fenolici parzialmente idrofobici, siano più efficaci verso enzimi di questo tipo, poiché la loro struttura gli permette una maggiore adesività e un'inibizione della membrana plasmatica, dei microrganismi. Si è notato, sempre parlando di target farmacologici di *H. pylori*, inibiti dai composti fitochimici, che i bersagli molecolari a cui si legano le molecole fitochimiche, non sono correlati ai meccanismi di resistenza degli antibiotici. Detto ciò è chiaro che una futura terapia a base di estratti di droghe vegetali, potrà essere efficace allo stesso modo sia per ceppi multiresistenti, che non, di *Helicobacter pylori*. Altra cosa importantissima è che nessun composto fitochimico ha evidenziato una tossicità rilevante per la salute umana. Dopo di che alcuni composti sono stati sottoposti a dei test per evidenziare un'inibizione del biofilm formato da *Helicobacter pylori* e hanno dato ottimi risultati. Infatti lo studio condotto Wylie *et. al.* (2022), riguardo al nimbolide e all'olio essenziale, estratti da *Azadirachta indica* A. Juss., hanno inibito maggiormente la produzione di biofilm rispetto all'amoxicillina. Tuttavia nello studio di Spiegel *et. al.* (2021), alcuni composti bioattivi come ipericina e ginsenoside,

hanno ottenuto dei buoni valori di MIC, causando però una sovrapproduzione di biofilm. Infine è stato ricercato il meccanismo d'azione delle diverse molecole fitochimiche, verso *Helicobacter pylori*. Molto probabilmente il batterio, trattato con i diversi estratti vegetali, subisce delle variazioni della morfologia, in particolare la frammentazione della membrana esterna, che porta successivamente alla fuoriuscita di materiale cellulare ed infine alla morte del microorganismo. Questo meccanismo d'azione è stato riscontrato in particolar modo nei terpeni. I polifenoli pur avendo evidenziato una buona attività antibatterica, alcuni studi non hanno potuto ribadire questa idea. Infatti pur avendo ottenuto molti risultati incoraggianti in diverse ricerche, nello studio di Heidari *et. al.* (2018), l'isoquercitina e la rutina isolate da *Cymbocarpum erythraeum* (DC.) Boiss., non hanno dimostrato effetti rilevanti verso *H. pylori*. Questo fatto potrebbe essere prova che le loro proprietà antimicrobiche dipendessero da un sinergismo con altri costituenti flavonoidi, oppure che il ceppo di *H. pylori* usato fosse meno suscettibile alle molecole in esame. Questo effetto diluente, nei confronti dell'attività inibitoria verso il batterio è stata riscontrata anche nei terpeni, in particolare nei terpenoidi clerodanici. Infatti due terpeni molto simili strutturalmente avevano attività diverse, e questo è stato ricondotto alla presenza o meno della porzione decalinica. Tale porzione si pensa che sia l'elemento, che può fornire una potente attività antimicrobica. In questo lavoro di tesi si sono valutati quasi solo studi *in vitro* e solo uno studio *in vivo*, riguardante i terpeni. Lo studio *in vivo* ha dimostrato che gli estratti vegetali ricchi di diterpeni clerodanici, in collaborazione con la tripla terapia, avevano ridotto il margine delle lesioni presenti nell'intestino provocate da un induttore di ulcera. Oltre a ciò alcuni estratti avevano anche inibito la crescita di *Helicobacter pylori*. I risultati di questo studio *in vivo* sono stati illuminanti ma non sufficienti, infatti un limite di questo lavoro di tesi è la mancanza di studi *in vivo*, che certificano le attività vere e proprie dei composti fitochimici, sull'organismo umano. Questo limite ovviamente è anche presente negli studi visionati, infatti molte conclusioni di questi articoli affermavano che fossero necessari maggiori approfondimenti riguardo l'attività antibatterica dei composti fitochimici, con

l'aggiunta anche di studi condotti su animali o su volontari. In conclusione dalla ricerca condotta è emerso che molti composti fitochimici, hanno dimostrato attività contro il microrganismo *Helicobacter pylori*. L'affermazione dei ricercatori che, a fronte degli studi condotti, sostiene che i composti fitochimici potrebbero essere utilizzati per la creazione di nuove strategie terapeutiche per combattere *H. pylori*, non la si può considerare come conclusione ferma e definitiva. Il tutto è ancora molto astratto per la mancanza di ulteriori approfondimenti, mediante studi *in vitro* e soprattutto *in vivo*.

BIBLIOGRAFIA

- Adeniyi BA, Anyiam FM (2004). «In vitro anti-Helicobacter pylori potential of methanol extract of *Allium ascalonicum* Linn. (Liliaceae) leaf: susceptibility and effect on urease activity.» *Phytotherapy Research* 18(5): 358-361.
- Adeniyi CB, Lawal TO, Mahady GB (2009). «In vitro susceptibility of *Helicobacter pylori* to extracts of *Eucalyptus camaldulensis* and *Eucalyptus torelliana*.» *Pharmaceutical Biology* 47(1): 99-102.
- Baj J, Forma A, Sitarz M, Portincasa P, Garruti G, Krasowska D, Maciejewski R (2020). «*Helicobacter pylori* Virulence Factors-Mechanisms of Bacterial Pathogenicity in the Gastric Microenvironment.» *Cells* 10(1).
- Bugli F, Palmieri V, Torelli R, Papi M, De Spirito M, Cacaci M, Galgano S, Masucci L, Paroni Sterbini F, Vella A, Graffeo R, Posteraro B, Sanguinetti M (2016). «In vitro effect of clarithromycin and alginate lyase against *Helicobacter pylori* biofilm.» *Biotechnology Progress* 32(6): 1584-1591.
- Coelho LG, Sant'Ana CR, Oliveira RB, Cezar RCE, Araujo ACC, Silva RCTD, Trindade OR, Coelho MC, Ferrioli E, Bendassolli JA (2018). «Performance of the 13C-urea breath test for the diagnosis of *H. pylori* infection using a substrate synthesized in Brazil: A preliminary study.» *Clinics* 73.
- de Brito BB, da Silva FAF, Soares AS, Pereira VA, Santos MLC, Sampaio MM, Neves PHM, de Melo FF (2019). «Pathogenesis and clinical management of *Helicobacter pylori* gastric infection.» *World Journal of Gastroenterology* 25(37): 5578-5589.
- Duck WM, Sobel J, Pruckler JM, Song Q, Swerdlow D, Friedman C, Sulka A, Swaminathan B, Taylor T, Hoekstra M, Griffin P, Smoot D, Peek R, Metz DC, Bloom PB, Goldschmidt S, Parsonnet J, Triadafilopoulos G, Perez-Perez GI, Vakil N, Ernst P, Czinn S, Dunne D (2004). «Antimicrobial resistance incidence and risk factors among *Helicobacter pylori*-infected persons, United States.» *Emerging Infectious Diseases* 10(6): 1088-1094.
- E. Gené, X. Calvet, R. Azagra, J. P. Gisbert (2003). «Triple vs. quadruple therapy for treating *Helicobacter pylori* infection: a meta-analysis.» *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 17(9): 1137-1143.
- Edmond MP, Mostafa NM, El-Shazly M, Singab ANB (2021). «Two clerodane diterpenes isolated from *Polyalthia longifolia* leaves: comparative structural features, anti-histaminic and anti-*Helicobacter pylori* activities.» *Natural Product Research* 35(23): 5282-5286.
- Fischbach W, Malfertheiner P (2018). «*Helicobacter Pylori* Infection.» *Deutsches Ärzteblatt International* 115(25): 429-436.
- Fong P, Hao CH, Io CC, Sin PI, Meng LR (2019). «In Silico and In Vitro Anti-*Helicobacter Pylori* Effects of Combinations of Phytochemicals and Antibiotics.» *Molecules* 24(19).
- Gad H, Al-Sayed E, Ayoub I (2021). «Phytochemical discrimination of *Pinus* species based on GC-MS and ATR-IR analyses and their impact on *Helicobacter pylori*.» *Phytochem Analysis* 32(5): 820-835.
- Hamad GM, Taha TH, El-Deeb NM, Alshehri AM (2015). «Advanced trends in controlling *Helicobacter pylori* infections using functional and therapeutically supplements in baby milk.» *Journal of Food Science and Technology* 52(12): 8156-8163.

- Haristoy X, Fahey JW, Scholtus I, Lozniewski A (2005). «Evaluation of the antimicrobial effects of several isothiocyanates on *Helicobacter pylori*.» *Planta Medical* 71(4): 326-330.
- Heidari S, Manayi A, Saeidnia S, Mighani H, Monsef Esfahani HR, Gohari AR, Setzer WN (2018). «Chemical Constituents of *Cymbocarpum erythraeum* (DC.) Boiss., and Evaluation of Its Anti-*Helicobacter pylori* Activity.» *Turkish Journal Of Pharmaceutical Sciences* 15(1): 103–106.
- Hooi JKY, Lai WY, Ng WK, Suen MMY, Underwood FE, Tanyingoh D, Malfertheiner P, Graham DY, Wong VWS, Wu JCY, Chan FKL, Sung JJY, Kaplan GG, Ng SC (2017). «Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis.» *Gastroenterology* 153(2): 420-429.
- Hutchings MI, Truman AW, Wilkinson B (2019). «Antibiotics: past, present and future.» *Current Opinion in Microbiology* 51: 72-80.
- Ji J, Yang H. Using (2020). «Probiotics as Supplementation for *Helicobacter pylori* Antibiotic Therapy.» *International Journal of Molecular Sciences* 21(3).
- Li H, Liao T, Debowski AW, Tang H, Nilsson HO, Stubbs KA, Marshall BJ, Benghezal M (2016). «Lipopolysaccharide Structure and Biosynthesis in *Helicobacter pylori*.» *Helicobacter* 21(6): 445-461.
- LM., Brown (2000). «*Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission.» *Epidemiologic Reviews* 22(2): 283–297.
- McGee DJ, Langford ML, Watson EL, Carter JE, Chen YT, Ottemann KM (2005). «Colonization and inflammation deficiencies in Mongolian gerbils infected by *Helicobacter pylori* chemotaxis mutants.» *Infection and Immunity* 73(3): 1820-1827.
- Mladenova I, Durazzo M (2018). «Transmission of *Helicobacter pylori*.» *Minerva Gastroenterology* 64(3): 251-254.
- Muhsen K, Jurban M, Goren S, Cohen D (2012). «Incidence, Age of Acquisition and Risk Factors of *Helicobacter pylori* Infection among Israeli Arab Infants.» *Journal of Tropical Pediatrics* 58(3): 208–213.
- Nista E, Gabrielli M, Gasbarrini G, Gasbarrini A, Ubaldi E (2006). «L'eradicazione dell'infezione da *Helicobacter pylori* dopo insuccesso della terapia iniziale. Revisione della letteratura e Linee Guida Maastricht III.» *SIMG*.
- Njume C, Afolayan AJ, Green E, Ndip RN (2011). «Volatile compounds in the stem bark of *Sclerocarya birrea* (Anacardiaceae) possess antimicrobial activity against drug-resistant strains of *Helicobacter pylori*.» *International Journal of Antimicrobial Agents* 38(4): 319-324.
- Savoldi A, Carrara E, Graham DY, Conti M, Tacconelli E (2018). «Prevalence of Antibiotic Resistance in *Helicobacter pylori*: A Systematic Review and Meta-analysis in World Health Organization Regions.» *Gastroenterology* 155(5): 1372-1382.
- Shaikh RU, Dawane AA, Pawar RP, Gond DS, Meshram RJ, Gacche RN (2016). «Inhibition of *Helicobacter pylori* and Its Associate Urease by Labdane Diterpenoids Isolated from *Andrographis paniculata*.» *Phytotherapy Research* 30(3): 412-417.
- Spiegel M, Krzyżek P, Dworniczek E, Adamski R, Sroka Z (2021). «In Silico Screening and In Vitro Assessment of Natural Products with Anti-Virulence Activity against *Helicobacter pylori*.» *Molecules* 27(1).

- Spósito L, Oda FB, Vieira JH, Carvalho FA, Dos Santos Ramos MA, de Castro RC, Crevelin EJ, Crotti AEM, Santos AG, da Silva PB, Chorilli M, Bauab TM (2019). «In vitro and in vivo anti-Helicobacter pylori activity of Casearia sylvestris leaf derivatives.» *Journal of Ethnopharmacology* 233: 1-12.
- Widelski J, Okińczyc P, Paluch E, Mroczek T, Szperlik J, Żuk M, Sroka Z, Sakipova Z, Chinou I, Skalicka-Woźniak K, Malm A, Korona-Główniak I (2022). «The Antimicrobial Properties of Poplar and Aspen-Poplar Propolis and Their Active Components against Selected Microorganisms, including Helicobacter pylori.» *Pathogens* 11(2).
- Wylie MR, Windham IH, Blum FC, Wu H, Merrell DS (2022). «In vitro antibacterial activity of nimbolide against Helicobacter pylori.» *Journal of Ethnopharmacology* 285.
- Yan J, Peng C, Chen P, Zhang W, Jiang C, Sang S, Zhu W, Yuan Y, Hong Y, Yao M (2022). «In-vitro anti-Helicobacter pylori activity and preliminary mechanism of action of Canarium album Raeusch. fruit extracts.» *Journal of Ethnopharmacology* 283.
- Yang JC, Lu CW, Lin CJ (2014). «Treatment of Helicobacter pylori infection: current status and future concepts.» *World Journal of Gastroenterology* 20(18): 5283–5293.