

KOMPOZYCJA ZAWIERAJĄCA MIESZANINĘ EKSTRAKTÓW ROŚLINNYCH DO WSPOMAGANIA AKTYWNOŚCI MONOCYTÓW ORAZ KOMÓREK NATURALNIE CYTOTOKSYCZNYCH (NK)

Przedmiotem wynalazku jest kompozycja zawierająca mieszaninę ekstraktów roślinnych, do wspomagania aktywności monocytów oraz komórek naturalnie cytotoksycznych (ang. natural killer, NK), w szczególności do stosowania w celu wspomagania odporności organizmu oraz w zakażeniach *Helicobacter pylori*, jak również preparat zawierający tą kompozycję.

Helicobacter pylori jest gram-ujemną, oksydazo-dodatnią, katalazo-dodatnią zakrzywioną lub spiralną bakterią o kształcie pałeczkowatym. *H. pylori* kolonizuje błonę śluzową żołądka średnio ponad połowy populacji ludzi na świecie. Bakteria ta u 10-15% zakażonych wywołuje przewlekłe zapalenie błony śluzowej żołądka, wrzody żołądka i dwunastnicy. Ponadto *H. pylori* jest czynnikiem etiologicznym raka żołądka oraz chłoniaka typu MALT, dlatego Światowa Organizacja Zdrowia zakwalifikowała ten drobnoustrój na liście kancerogenów biologicznych. Częstsze występowanie nowotworu żołądka u osób z zakażeniem *H. pylori* było powiązane z podwyższonym poziomem immunoglobulin G przeciwko *H. pylori* oraz aktywnym zapaleniem błony śluzowej żołądka (A. Nomura i in. w „*Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among japanese americans in Hawaii”). Przewlekłe stany zapalne błony śluzowej żołądka mogą prowadzić do mutagenezy, a co za tym idzie do nasilania procesu nowotworzenia, analogicznie jak w przypadku stanu zapalnego w wrzodziejącym zapaleniu okrężnicy, które zwiększa ryzyko występowania nowotworu jelita grubego.

Istotne jest zatem leczenie zakażeń *H. pylori* polegające na całkowitym usunięciu (eradykacji) bakterii obecnych w błonie śluzowej żołądka. W przypadku chorób wrzodowych eradykacja zapobiega nawrotom choroby i prowadzi do jej trwałego wyleczenia. Niestety, leczenie farmakologiczne zakażeń *H. pylori* jest długotrwałe i kosztowne, a dodatkowo związane z występowaniem skutków ubocznych takich jak: biegunka, ból głowy, nudności, wymioty, ból brzucha, nieprzyjemny posmak w ustach, zaparcia, suchość w ustach, zwiększone pragnienie itp. Ponadto, w świetle narastającej oporności *H. pylori* na antybiotyki (w szczególności na klarytromycynę, amoksycylinę i metroidazol) leczenie staje się coraz mniej skuteczne. Celowym zatem jest poszukiwanie kompozycji opartych na

składnikach pochodzenia naturalnego takich jak: ekstrakty roślinne lub olejki eteryczne w celu leczenia i zapobiegania występowania chorób wywołanych zakażeniem *H. pylori*.

Znane są różne kompozycje roślinne, w tym ekstrakty roślinne oraz kompozycje różnych ekstraktów roślinnych mające zastosowanie medyczne: w zakażeniach *H.Pylori* oraz zmniejszające ryzyko zakażenia *H.Pylori* organizmów żywych, w tym w szczególności ludzi.

Stosowanie roślin i produktów roślinnych dla ich właściwości leczniczych, jest coraz częściej stosowane w medycynie w postaci tzw. „terapii niekonwencjonalnej”. Przykładem takiej terapii alternatywnej jest aromaterapia wykorzystująca roślinne olejki eteryczne, przy założeniu, że olejki wykazują wiele efektów wynikających ze złożonego charakteru ich składu. Aromaterapia, pomimo tego, że zyskuje coraz większą akceptację społeczną, a wiele osób regularnie stosuje środki uzupełniające lub homeopatyczne, nie jest jedynym rodzajem terapii niekonwencjonalnej. W przemyśle farmaceutycznym szerokie zastosowanie znajdują środki farmakologiczne oraz suplementy diety zawierające ekstrakty roślinne.

Ekstrakty roślinne są preparatami o konsystencji płynnej, półstałej lub stałej otrzymywane z substancji pochodzenia roślinnego, takich jak całe rośliny lub ich części. Proces ekstrakcji jest operacją polegającą na wyodrębnianiu składnika lub mieszanin składników z wykorzystaniem ich dyfuzji do cieczy lepiej rozpuszczających te wybrane związki chemiczne. Dodatkowo do ekstraktów opcjonalnie dodaje się substancje pomocnicze takie jak stabilizatory czy środki konserwujące. Ekstrakty suche są ekstraktami otrzymanymi przez dodatkowe odparowanie rozpuszczalnika użytego do ich wytwarzania.

Ekstrakty roślinne stosowane są jako substancje aktywne w kompozycjach leczniczych i suplementach diety. W zależności od rodzaju i zawartości związków aktywnych opóźniają procesy starzenia skóry, nawilżają, działają przeciwbakteryjnie, mogą pełnić funkcje antyoksydantów, pochłaniają promieniowanie UV, mogą działać wybielająco i wspomagać likwidację przebarwień, łagodzić podrażnienia, czy też stymulować krążenie w naczyniach krwionośnych.

Przyjmuje się, że do scharakteryzowania czyli szczegółowego opisu ekstraktów roślinnych, umożliwiającego odtworzenie danego ekstraktu roślinnego, wystarczającym jest wskazanie następujących parametrów ekstraktu roślinnego:

nazwa łacińska oraz część roślinny z której ekstrakt został pozyskany (przykładowo: ziele - czyli nadziemna część rośliny, korzeń czy owoc), rozpuszczalnik użyty do ekstrakcji, wskaźnik DER (z ang. *Drug Extract Ratio*) oraz ewentualnie ilościowo: zawartość substancji aktywnych w tym ekstrakcie. Typowo, przy charakteryzowaniu ekstraktów roślinnych nie podaje się natomiast całkowitego składu: ilościowego i jakościowego ekstraktu, ze względu na jego złożoność, a w związku z tym trudności analityczne w tak szczegółowym jego ustaleniu.

Rumianek jest rośliną z rodziny astrowatych, której wysuszone koszyczki są surowcem zielarskim o właściwościach leczniczych. Rumianek zawiera między innymi flawonoidy, kumaryny, terpeny, kwasy organiczne, cholinę i sole mineralne. Koszyczek rumianku wchodzi w skład wielu gotowych preparatów i mieszanek leczniczych oraz suplementów diety.

Rumianek pospolity wykazuje między innymi właściwości przeciwzapalne, rozkurczające, przyspieszające gojenie ran, antybakteryjne. Preparaty wydzielane z koszyczków rumianku można stosować zarówno wewnętrznie w przypadku skurczów i stanów zapalnych żołądka i jelit, jak i zewnętrznie przykładowo w stanach zapalnych skóry i błon śluzowych, bakteryjnych schorzeniach skóry i jamy ustnej, ranach, owrzodzeniach i alergiach skórnych.

Tymianek właściwy jest rośliną należącą do rodziny jasnotowatych. Olejek eteryczny tymianku właściwego zawiera od 20 do 54% tymolu, który jest antyseptykiem wykorzystywanym między innymi jako składnik aktywny komercyjnych płynów do płukania ust. Ponadto, w skład olejku eterycznego tymianku wchodzi takie związki jak p-cymen, mircen, borneol i linalol. Przed wynalezieniem antybiotyków preparaty na bazie tymianku były wykorzystywane między innymi do zwalczania zakażeń grzybiczych paznokci u stóp.

Preparaty na bazie tymianku wykazują właściwości bakteriobójcze, grzybobójcze oraz wykrztuśne. Używa się ich przy dolegliwościach gardła takich jak kaszel czy chrypka, a także do pobudzania apetytu i trawienia. Zawarte w liściach tymianku substancje wykazują ponadto działanie przeciwutleniające.

Lebiodka pospolita jest rośliną wieloletnią należącą do rodziny jasnotowatych. Olejek eteryczny Lebiodki pospolitej składa się głównie z monoterpenoidów i monoterpenów, przy czym względne stężenie każdego związku w niej zawartego różni się znacznie w zależności od pochodzenia geograficznego i innych czynników. Zidentyfikowano ponad 60 różnych związków, przy czym podstawowymi są karwakrol

i tymol. Ponadto jako składniki aktywne występują przykładowo garbniki, p-cymen, γ -terpinen, kariofyllen, spatulenol, germakren D, alkohol β -fenchyloowy i δ -terpineol. Preparaty z lebidki pospolitej mają działanie wykrztuśne, dezynfekujące, przeciwbiegunkowe, moczopędne, przeciwskurczowe, wiatropędne, i odtruwające. Zewnętrznie olejek tymolowy wykorzystuje się do płukania gardła, kąpeli wzmacniających oraz do wspomaganego gojenia się ran skóry, a także świądów. Napar z mieszanki lebidki z innymi ziołami działa wiatropędnie, dzięki czemu stosowany jest przy takich dolegliwościach jak atonia jelit, nadmierna fermentacja w jelitach, bębnica, choroba wrzodowa żołądka i dwunastnicy, czy niedoczynność wątroby.

Żurawina amerykańska należy do rodzaju *Vaccinium*. Za lecznicze właściwości żurawiny odpowiedzialne są m.in. zawarte w niej fruktoza i proantocyjanidyny, kwas cytrynowy i chinowy, witaminy A, B1, B2 i C, flawonoidy, antocyjany, flawonole oraz taniny i glikozydy flawonoidowe. Owoce żurawiny zawierają związki o unikalnej strukturze - należące do flawonoli - które nie występują w innych owocach.

Owoce żurawiny amerykańskiej i ich właściwości m.in. bakteriobójcze oraz antyadhezyjne, są szeroko opisywane w literaturze naukowej. Sok z tych owoców jest tradycyjnie wykorzystywany do zapobiegania i leczenia zakażeń dróg moczowych. Ponadto zawarte w żurawinie polifenole powodują działanie przeciwutleniające i przeciwzapalne, co może być przydatne w zmniejszaniu procesów zapalnych, w tym związanych z kolonizacją drobnoustrojów chorobotwórczych.

Preparaty zawierające między innymi składniki pochodzenia naturalnego, takie jak olejki eteryczne czy ekstrakty roślinne wykorzystywane do suplementacji składnikami aktywnymi lub leczenia zakażeń bakterią *H. pylori* znane są również z literatury patentowej.

Z europejskiego zgłoszenia patentowego EP1281403 znana jest kompozycja suplementu diety zawierającego ekstrakty roślinne oraz mikroorganizmy probiotyczne. Spośród bardzo szerokiej gamy roślin, których ekstrakty są stosowane według EP1281403, wymienione są ekstrakty z: rumianku, tymianku oraz oregano. Wszystkie z wymienionych roślin zawierają związki chemiczne odpowiednie do wykorzystania w leczeniu lub odżywianiu. Niemniej jednak w celu intensyfikacji

efektów wywołanych przez te związki chemiczne konieczne jest ich przetworzenie (metabolizowanie) przez mikroorganizmy probiotyczne z gatunków wymienionych w EP1281403.

Z amerykańskiego zgłoszenia patentowego US20110159104 znana jest kompozycja biokompatybilnej mikroemulsji, która dodatkowo zawiera rozpuszczalne w wodzie i rozpuszczalne w tłuszczach substancje czynne w stabilnej formie. Poprzez mikroemulsję dostępne biologicznie składniki odżywcze związane z miodem, korzystnie wraz z dodatkowymi substancjami czynnymi, wprowadza się przez miejscową aplikację na skórę, doustnie lub donosowo, gdzie wywołują pozytywne efekty. Emulsje te są łatwe w przygotowaniu i można je stosować zarówno w medycynie/weterynarii, dermatologii, a także w kosmetologii. Ponadto mikroemulsje z miodem można stosować samodzielnie lub z substancjami o odpowiedniej wartości odżywczej w artykułach spożywczych, żywności funkcjonalnej, suplementach diety lub produktach dietetycznych.

Z międzynarodowego zgłoszenia patentowego WO2016106313 znana jest kompozycja do pielęgnacji jamy ustnej, która łagodzi podrażnioną błonę śluzową jamy ustnej, pobudza wydzielanie śliny i/lub odświeża oddech. Kompozycję do higieny jamy ustnej według WO2016106313 można również stosować do zapobiegania i leczenia zapalenia błon śluzowych, zapalenia dziąseł, zapalenia ozębnej, suchości w jamie ustnej (kserostomii), infekcji jamy ustnej, zapalenia jamy ustnej i cuchnącego oddechu. Kompozycje według WO2016106313 są szczególnie użyteczne w leczeniu komplikacji wewnątrz jamy ustnej u pacjentów z nowotworem, którzy przeszli chemioterapię lub radioterapię. Kompozycja zawiera naturalne składniki i może być bezalkoholowa i/lub pozbawiona sztucznych barwników. Kompozycja według WO2016106313 ma formę płynu, żelu, proszku, pasty, filmu itp. oraz zawiera składniki aktywne pochodzenia naturalnego. Składniki naturalne zawarte w kompozycji wykazują właściwości antybakteryjne, przeciwzapalne, łagodzące, nawilżające itp.

Z międzynarodowego zgłoszenia patentowego WO2005087244 znane są kompozycje zawierające co najmniej dwa olejki eteryczne pochodzące z roślin wybranych spośród: Pelargonium; palczatka; Menta; Aniba; Lawenda; Oregano, Litsea; Cytrusy; Melisa; Brodziec; Sandałowiec; Kozłek lekarski; Styrak; Cynamon; i Róża, w celu leczenia zakażeń drobnoustrojami i grzybami oraz zapobiegania skażeniu

mikrobiologicznemu powierzchni i urządzeń. Kompozycje można wytwarzać jako leki, produkty konsumenckie lub środki czyszczące.

Z międzynarodowego zgłoszenia patentowego WO2016122889 znane są kompozycje zawierające glikany oraz jedzenie medyczne je zawierające. Kompozycje te ponadto zawierają mikroelementy, polifenole, prebiotyki, probiotyki i inne środki. Kompozycje według WO2016122889 mogą być również stosowane między innymi do modulowania ludzkiej mikroflory żołądkowo-jelitowej i do leczenia dysbiozy.

Z polskiego zgłoszenia patentowego P.397719 znana jest kompozycja zapobiegająca powstawaniu oraz ograniczająca skutki istniejących owrzodzeń żołądka i dwunastnicy spowodowanych bakterią *Helicobacter pylori* oraz owrzodzeń pochodzenia bakteryjnego innej etiologii wraz ze stymulacją odbudowy śluzówki żołądka. Kompozycja według P.397719 zawiera nanokrzemionkę o odpowiednich właściwościach, opcjonalnie z dodatkiem maślanu sodu i lub bez innych substancji aktywnych. Nanokrzemionka poprzez niszczenie ścian komórek bakterii, doprowadza do ich obumierania. Zastosowanie maślanu sodu, podstawowego czynnika energetycznego komórek śluzówki żołądka i dwunastnicy, elementu silnie stymulującego proliferację komórek śluzówki, daje efekt odbudowy śluzówki żołądka i dwunastnicy, co jest istotne w szczególności w miejscach zmienionych na skutek działania bakterii.

Z europejskiego zgłoszenia patentowego EP2133121 znany jest preparat odżywczy z ekstraktem żurawinowym zawierającym od 500 do 2500 mg proszku żurawinowego do stosowania profilaktycznego, lub też leczniczo w nawracających dolegliwościach żołądkowych. Preparat, poza ekstraktem żurawinowym może zawierać: inulinę z cykorii, glukonian cynku, laktozę, aromat malinowy. Preparat można stosować pomocniczo w eliminacji *H.Pylori* z układu trawiennego.

Z polskiego zgłoszenia patentowego PL366161 znana jest natomiast kompozycja odżywcza zawierająca olejki eteryczne do stosowania profilaktycznego oraz leczniczo w infekcjach wywołanych przez organizmy z rodziny *Helicobacter*.

Z europejskiego zgłoszenia patentowego EP0577481 znane jest natomiast zastosowanie ekstraktu tymianku (łac. *Thymus*) oraz jego wodnych roztworów do hamowania wzrostu bakterii *H.Pylori* u człowieka. Ekstrakt może być podawany doustnie w formie napoju, kapsulek bądź pasty, lub też wykorzystany do

przygotowania kompozycji farmaceutycznej hamującej aktywność enzymu: ureazy komórek bakterii *H. Pylori*.

Z europejskiego zgłoszenia patentowego EP2604273 znana jest kompozycja o działaniu leczniczym w różnych infekcjach bakteryjnych, w tym w szczególności spowodowanych *Staphylococcus aureus*, zawierająca w składzie ekstrakt z lebiodki oraz co najmniej jeden dodatkowy ekstrakt z roślin z rodziny: różowatych, baldaszkowatych oraz astrowatych.

Z międzynarodowego zgłoszenia patentowego WO0115680 znana jest natomiast kompozycja do stosowania w leczeniu infekcji u ludzi i zwierząt zawierająca składnik przeciwbakteryjny: izopropyl-o-krezol, wyekstrahowany z rośliny z grupy jasnotowatych lub werbenowatych.

Ponadto, w publikacji Cogo L.L. „*Anti-Helicobacter pylori activity of plant extracts traditionally used for the treatment of gastrointestinal disorders*” Brazilian Journal of Microbiology (2010) 41: 304-309, ISSN: 1517-8382 opisano zastosowanie, ekstraktów następujących roślin w leczeniu infekcji *H.pylori*: arnota właściwa, rumianek pospolity, ostrokrzew paragwajski, babka zwyczajna, ślaz leśny, rabarbar. Przeprowadzone testy wykazały największą aktywność anty-*H.Pylori* ekstraktów z rumianku pospolitego oraz ostrokrzewu paragwajskiego. W przeprowadzonych testach, nie badano natomiast działania powyższych ekstraktów w kierunku wspomagani aktywności monocytów oraz komórek cytotoksycznych organizmów żywych, w tym człowieka. .

Znana jest także mieszanka ziół, dostępna pod nazwą handlową: *Mieszanka Heli Helicobacter Pylori* firmy Ziółko (Łopiennik Górny, Polska) zawierająca w składzie: kwiat rumianku pospolitego *Chamomilla recutita* L., liść mięty pieprzowej *Mentha piperita* L., liść tymianku pospolitego *Thymus vulgaris* L., ziele jeżówki purpurowej *Echinacea purpura* L – w postaci wysuszonych rozdrobionych części roślin, do zaparzania. Niemniej jednak dla wskazanej mieszanki brak jest jakichkolwiek informacji o zawartości poszczególnych ziół w mieszance, a także brak jest informacji o jej działaniu wspomagającym aktywność monocytów oraz komórek naturalnie cytotoksycznych. Ponadto, na stronie producenta oraz na opakowaniu nie widnieje informacja jakoby mieszanka ta miała działanie medyczne w zwalczaniu bądź profilaktyce zakażeń *H.pylori*, ponieważ wskazana w nazwie produktu, rodzina bakterii „*Helicobacter Pylori*” nie odnosi się konkretnie do zastosowania leczniczego tej kompozycji. W związku z tym - wyłącznie na podstawie ujawnionych o mieszance

informacji oraz jej dostępności, nie byłoby możliwym jednocześnie stwierdzenie jaki jest skład tej mieszanki (procentowa zawartość poszczególnych jej składników) oraz czy skład ten wykazuje działanie wspomagające aktywność monocytów oraz komórek naturalnie cytotoksycznych, a w związku z tym wspomagające organizm w zakażeniach oraz profilaktyce zakażeń *H. Pylori*.

Ponadto z publikacji red. M.Habuz „*Alternatywne substancje w leczeniu eradykacyjnym Helicobacter Pylori*” Artykuły - Biotechnologia.pl (redakcja: 06.02.2014) opisano grupy syntetycznych leków, które mogą być stosowane w leczeniu zakażenia *H. Pylori*, w tym: pochodne ksantonu: podstawione atomem chloru w pozycji 2, oraz 3 i 4, pochodne fenolowe: pochodne kwasu cyjankowego, pochodne kwasu gallusowego, oleuropeiny, rutyny czy kwercetyny. W publikacji wskazano także związki: kwas i aldehyd cyjankowy, eugenol, kumaryna izolowanych z cyjankowca chińskiego oraz wymieniono ekstrakty roślinne, w tym: ekstrakt z herbaty chińskiej, a także ekstrakt wodny z lukrecji gładkiej do stosowania w profilaktyce i leczeniu wrzodów żołądka i dwunastnicy. W publikacji ponadto wskazano na możliwość łącznego działania ekstraktów z oregano i żurawiny w zwalczaniu *H. Pylori* dla kompozycji zawierającej 25% ekstraktu oregano oraz 75% ekstraktu żurawiny, oraz opisano działanie czerwonego wina w mechanizmie unieczynniania cytotoksyny *VacA H. pylori*. W publikacji tej brak natomiast bardziej szczegółowych danych na temat składu takich kompozycji.

Natomiast w publikacji H.Sakkas, Ch. Papadopoulou „*Antimicrobial Activity of Basil, Oregano, and Thyme Essential Oils*” J. Microbiol. Biotechnol. (2017), 27(3), 429–438 opisano niezależne działanie poszczególnych olejków eterycznych bazylii, oregano, tymianku. W publikacji tej wskazano na antybakteryjne oraz przeciwgrzybicze działanie olejków eterycznych pozyskanych z powyższych roślin, jednakże nie opisano ani nie zasugerowano możliwości działania tych olejków eterycznych: bazylii, oregano oraz tymianku w odniesieniu do aktywności monocytów oraz komórek naturalnie cytotoksycznych układu odpornościowego.

Szczególnie istotnym aspektem zakażeń *Helicobacter pylori* jest ich aktywność immunomodulacyjna względem komórek odpornościowych, takich jak makrofagi, komórki naturalnie cytotoksyczne (ang. Natural Killer, NK) i limfocyty. Dzięki temu *H. pylori* może przetrwać w skolonizowanej błonie śluzowej żołądka i być odporna na jej zwalczanie przez wiele lat. Szczególną uwagę należy zwrócić na komórki NK, ze

względu na fakt, iż nie wymagają aktywacji, aby atakować komórki, które są pozbawione ekspresji cząsteczek MHC. Jest to szczególnie istotne, ponieważ szkodliwe komórki pozbawione ekspresji cząsteczek MHC nie mogą zostać wykryte i zniszczone przez inne komórki układu odpornościowego, takie jak przykładowo limfocyty T. Komórki NK pochodzą ze szpiku, a w przeciwieństwie do limfocytów T i B, do ich różnicowania oraz funkcji rearanżacja genów nie jest niezbędna. Komórki NK pełnią ważną rolę w rozpoczęciu odpowiedzi odpornościowej, przede wszystkim przez szybkie wydzielanie interferonu γ (IFN- γ) oraz innych cytokin niezbędnych w odpowiedzi na zakażenie bakteryjne, wirusowe i parazytologiczne, stanowiąc pierwszą linię obrony wraz z monocytami wobec komórek nowotworowych i zakażeń wirusowych pełniąc kluczową rolę dla powstrzymania rozwoju infekcji. Nie wykazują ekspresji konwencjonalnych receptorów dla antygenów, jak np. powierzchniowe immunoglobuliny czy receptory na limfocytach T wiążące antygen.

Jak wykazano w publikacji „*Helicobacter pylori*-driven modulation of NK cell expansion, intracellular cytokine expression and cytotoxic activity” (Karolina Rudnicka, Magdalena Chmiela i in., *Innate Immunity* 2015, Vol. 21(2) 127–139), komórki Natural Killer mogą być zaangażowane w odpowiedź immunologiczną w zwalczaniu zakażenia *Helicobacter pylori*. Dodatkowo wykazano, że we krwi dawców zakażonych *H. pylori* dominowały komórki NK o niższej aktywności cytotoksycznej w porównaniu do krwi dawców z wykluczonym zakażeniem *H. pylori*. Może to być uwarunkowane dominacją komórek NK o fenotypie CD56^{bright}, charakteryzującymi się słabymi właściwościami cytotoksycznymi u dawców zainfekowanych *H. pylori*, a także wpływem regulatorowej IL-10. Surowicze stężenie tej cytokiny było wyższe u dawców zainfekowanych *H. pylori* niż dawców niezainfekowanych. Wykazano również, że odpowiedź komórek NK na *Helicobacter pylori* zależy od typu prowokacji antygenowej. Może być modulowany dodatnio przez *H. pylori* GE poprzez IFN- γ i IL-2 lub negatywnie przez *H. pylori* LPS poprzez IL-10. Jest możliwe, że u osób zakażonych *Helicobacter pylori* antygeny o negatywnym potencjale immunomodulującym, takie jak lipopolisacharyd (LPS), mogą hamować reakcje odpornościowe i osłabiać eliminację *Helicobacter pylori* z błony śluzowej żołądka, co w konsekwencji sprzyja rozwojowi przewlekłej postaci zakażenia.

Kolejnym problemem związanym z zakażeniami *H. pylori* jest narastająca antybiotykoodporność tych drobnoustrojów. Odsetek szczepów *Helicobacter pylori* opornych na działanie klarytromycyny i niepowodzenie eradykacji pierwszego

schematu leczenia (inhibitor pompy protonowej, amoksycylina i klarytromycyna) zwiększyło się w Japonii, a także w innych krajach.

Z związku z tym, czynniki takie jak wysoka częstość występowania *H. pylori* w populacji, zmienna skuteczność leczenia i jego wysokie koszty oraz fakt, że bezobjawowe osoby nie mogą być leczone antybiotykami, czynią istotnym aspektem badań poszukiwanie alternatywnych rozwiązań zdolnych do zakłócania działania *H. pylori* w populacjach wysokiego ryzyka.

Istnieje zatem potrzeba opracowania alternatywnej kompozycji zawierającej odpowiednie połączenie ekstraktów roślinnych w celu wzmocnienia pierwszej linii obrony odpornościowej organizmu, czyli monocytów i komórek Natural Killer (NK), co mogłoby mieć zastosowanie zwłaszcza do podnoszenia ogólnej odporności organizmu i przy wspomaganiu leczenia zakażeń *Helicobacter pylori*.

Przedmiotem wynalazku jest kompozycja zawierająca mieszaninę ekstraktów z:

- tymianku właściwego (*Thymus vulgaris L.*) o wskaźniku DER wynoszącym od 5:1 do 15:1 pozyskanego poprzez wodną ekstrakcję nadziemnej części tej rośliny;
- rumianku pospolitego (*Matricaria recutita*) o wskaźniku DER wynoszącym od 3:1 do 7:1 pozyskanego poprzez wodno-alkoholową ekstrakcję kwiatów tej rośliny;
- lebidki pospolitej (*Origanum vulgare*) o wskaźniku DER wynoszącym od 5:1 do 15:1 pozyskanego poprzez wodno-alkoholową ekstrakcję nadziemnej części tej rośliny; oraz
- żurawiny amerykańskiej (*Vaccinium*) o wskaźniku DER nie mniejszym niż 15:1 pozyskanego poprzez wodą lub wodno-alkoholową ekstrakcję owoców tej rośliny;

charakteryzująca się tym, że stosuje się ją do pobudzania monocytów do sekrecji cytokiny IL-10 oraz do pobudzania komórek naturalnie cytotoksycznych (NK) do sekrecji cytokiny IL-2.

Korzystnie, kompozycję stosuje się do wspomaganie aktywności monocytów oraz komórek naturalnie cytotoksycznych (NK) w zakażeniach bakterią *Helicobacter pylori*.

Korzystnie, kompozycję stosuje się do wspomaganie odporności organizmu.

Korzystnie, kompozycja zawiera mieszaninę ekstraktów w proporcjach: tymianek właściwy : rumianek pospolity : lebidka pospolita : żurawina amerykańska równych od 14 do 20 : od 1 do 5 : od 1 do 3 : od 15 do 20.

Korzystnie, kompozycja zawiera ekstrakt z tymianku właściwego o stężeniu od 6,5 µg/ml do 50 µg/ml.

Korzystnie, kompozycja zawiera ekstrakt z żurawiny amerykańskiej o stężeniu od 6,5 µg/ml 50 µg/ml.

Korzystnie, ekstrakty są w postaci płynnej, półstałej lub stałej.

Przedmiotem wynalazku jest ponadto preparat leczniczy charakteryzujący się tym, że zawiera kompozycję według wynalazku.

Przedmiotem wynalazku jest ponadto preparat jako suplement diety, żywność specjalnego przeznaczenia medycznego lub żywność funkcjonalna charakteryzujący się tym, że zawiera kompozycję według wynalazku.

Korzystnie, preparat ma postać tabletek, kapsulek, saszetek, zawiesiny, żelu lub syropu.

Korzystnie, preparat w jednej dawce zawiera od 88 mg do 2 000 mg ekstraktu z tymianku właściwego, od 6 mg do 63 mg ekstraktu z rumianku pospolitego, od 6 mg do 19 mg ekstraktu z lebidki pospolitej oraz od 94 mg do 2 000 mg ekstraktu z żurawiny amerykańskiej.

Korzystnie, preparat zawiera ponadto probiotyki.

Korzystnie, preparat zawiera ponadto betaglukan.

Korzystnie, preparat zawiera ponadto ekstrakt z czystka.

Korzystnie, preparat jest przeznaczony do stosowania poprzez podawanie pojedynczej dawki preparatu dwa razy dziennie przed posiłkiem.

Korzystnie, preparat jest przeznaczony do stosowania poprzez podawanie podwójnej dawki preparatu raz dziennie przed posiłkiem.

Definicje stosowane w niniejszym opisie:

Poprzez określenie „*zastosowanie/stosowanie medyczne*” kompozycji według niniejszego opisu, rozumie się zastosowanie tej kompozycji w leczeniu i profilaktyce choroby/chorób, infekcji, schorzenia/schorzeń bądź dolegliwości.

Poprzez powyższe określenie „*leczenie*” rozumie się szereg działań prowadzących do usunięcia lub złagodzenia/ograniczenia, lub też zatrzymania na

obecnym etapie lub też zwolnienia tempa postępowania symptomów, skutków i/lub objawów choroby choroby/chorób, schorzenia/schorzeń bądź dolegliwości.

Poprzez powyższe określenie „profilaktyka” rozumie się szereg działań mających na celu zapobieganie, lub zmniejszenie ryzyka wystąpienia choroby/chorób, infekcji, schorzenia/schorzeń bądź dolegliwości.

W związku z powyższym termin: „zastosowanie/stosowanie medyczne” kompozycji według niniejszego opisu obejmuje:

- nie dopuszczenie do choroby/chorób, infekcji, schorzenia/schorzeń bądź dolegliwości, oraz
- ograniczenie ryzyka wystąpienia choroby/chorób, infekcji, schorzenia/schorzeń bądź dolegliwości.

Ponadto, wskaźnik DER ekstraktu roślinnego (z ang. *Drug Extract Ratio*) rozumie się jako wskaźnik ilości surowca roślinnego (A) do ilości otrzymanego przetworu roślinnego (B); zapisywane jako A:B. Jego podanie ma na celu umożliwienie porównania ekstraktów roślinnych zawierających tą samą substancję, ale otrzymywanych w różny sposób (np. ekstrakty o różnym stopniu zagęszczenia). Przykładowo, wskaźnik DER wynoszący 10:1 oznacza, że z dziesięciu części rośliny otrzymano jedną część ekstraktu.

Przedmiotem niniejszego wynalazku jest kompozycja zawierająca mieszaninę ekstraktów z rumianku pospolitego, tymianku właściwego, lebidki pospolitej i żurawiny amerykańskiej, połączonych w odpowiednich proporcjach, stanowiąca bazę preparatu wzmacniającego pierwszą linię obrony odpornościowej organizmu, czyli wspomagająca aktywność monocytów i komórek Natural Killer (NK), co jest szczególnie przydatne przy wspomaganiu leczenia oraz profilaktyce zakażeń *Helicobacter pylori*.

Przedmiot wynalazku przedstawiono na rysunku, na którym Fig. 1 przedstawia pobudzenie monocytów THP1XBlue™ po 4-godzinnej inkubacji z ekstraktami roślinnymi lub kontrolnym stymulatorem (LPS *E. coli*), Fig. 2 przedstawia pobudzenie monocytów THP1XBlue™ po 24 godzinnej inkubacji z ekstraktami roślinnymi lub kontrolnym stymulatorem (LPS *E. coli*), a Fig. 3 przedstawia pobudzenie monocytów THP1XBlue™ po 72-godzinnej inkubacji z ekstraktami roślinnymi lub kontrolnym stymulatorem (LPS *E. coli*).

Najciemniejsze słupki to najwyższe stężenie, pośrednie słupki - pośrednie stężenie, a najjaśniejsze słupki to stężenia najniższe, zgodne z Tabelą 3. Linia pozioma tzw. wartość odcięcia (cut-off) to dwukrotność kontroli ujemnej (komórki w podłożu hodowlanym bez stymulatora).

Kompozycja bazowa według wynalazku jest mieszaniną ekstraktów z rumianku pospolitego, tymianku właściwego, lebiodki pospolitej oraz żurawiny amerykańskiej w proporcji ekstrakt z tymianku właściwego : rumianku pospolitego : lebiodki pospolitej : żurawiny amerykańskiej wynoszącej: od 14 do 20 : od 1 do 5 : od 1 do 3 : od 15 do 20.

Ekstrakty wykorzystane do wytworzenia kompozycji według wynalazku są otrzymywane standardowymi sposobami znanymi w stanie techniki, poprzez ekstrakcję odpowiednio całej rośliny lub jej części z wybranym rozpuszczalnikiem przykładowo takim jak: woda, alkohol etylowy, glicerol, czy olej. Ekstrakcja następuje w wyniku kontaktu materiału roślinnego z rozpuszczalnikiem, przy czym im dłuży czas tego kontaktu tym wyższa zawartość wyekstrahowanych substancji roślinnych w uzyskanym ekstrakcie, a zatem wyższy wskaźnik DER ekstraktu.

Opracowana selekcja grupy roślin: rumianku pospolitego, tymianku właściwego, lebiodki pospolitej oraz żurawiny amerykańskiej zapewnia efekt działania kompozycji, przejawiający się pobudzeniem odpowiednich monocytów oraz komórek naturalnie cytotoksycznych w organizmie, przy czym najbardziej korzystnym jest stosowanie w kompozycji według wynalazku następujących ekstraktów roślinnych, w przypadku których ważna jest określona minimalna zawartość olejków eterycznych i/lub innych podanych poniżej substancji czynnych:

- wodny ekstrakt tymianku (*Thymus vulgaris L.*), część rośliny użyta do ekstrakcji: zióło; korzystnie stosuje się ekstrakty o wskaźniku DER wynoszącym od 5 : 1 do 15 : 1, przykładowy ekstrakt może zawierać olejki eteryczne w ilości nie mniejszej niż 1% oraz kwas rozmarynowy w ilości nie mniejszej niż 0,5%;
- wodno-alkoholowy ekstrakt z oregano (*Origanum vulgare*) (objętościowa zawartość części wody i części alkoholu w zakresie od 9:1 do 1:9), część rośliny użyta do ekstrakcji: zióło; korzystnie stosuje się ekstrakty o wskaźniku DER wynoszącym od 5 : 1 do 15, przykładowy ekstrakt może zawierać olejki eteryczne w ilości nie mniejszej niż: 2%;

- wodny lub też wodno-alkoholowy ekstrakt z żurawiny (objętościowa zawartość części wody i części alkoholu, dla ekstraktu wodno-alkoholowego w zakresie od 9:1 do 1:9), część rośliny użyta do ekstrakcji: owoce; korzystnie stosuje się ekstrakty o wskaźniku DER wynoszącym minimum 15 : 1, co oznacza możliwość stosowania ekstraktów o wskaźniku DER przykładowo: 15 : 1, 16 : 1, 17 : 1, 18 : 1, 19 : 1, czy 20 : 1, lub też przykładowo 25: 1, przykładowy ekstrakt może zawierać proantocyjanidyny w ilości nie mniejszej niż 20%;
- wodno-alkoholowy ekstrakt z rumianku (*Matricaria recutita*) (objętościowa zawartość części wody i części alkoholu w zakresie od 9:1 do 1:9), część rośliny użyta do ekstrakcji: kwiat; korzystnie stosuje się ekstrakty o wskaźniku DER wynoszącym od 3 : 1 do 7 : 1, przykładowy ekstrakt może zawierać olejki eteryczne w ilości nie mniejszej niż: 0,4%.

Przykładowy ekstrakt z tymianku właściwego, który można wykorzystać do realizacji wynalazku charakteryzuje się wskaźnikiem DER na poziomie 7:1 oraz zawartością olejków eterycznych ok. 1,6%_{wag.} Przykładowy ekstrakt z rumianku pospolitego, który można wykorzystać do realizacji wynalazku charakteryzuje się wskaźnikiem DER na poziomie 7:1 oraz zawartością olejków eterycznych ok. 0,7%_{wag.} Przykładowy ekstrakt z lebidki pospolitej, który można wykorzystać do realizacji wynalazku charakteryzuje się wskaźnikiem DER na poziomie 10:1 oraz zawartością olejków eterycznych ok. 2%_{wag.} Przykładowy ekstrakt z żurawiny amerykańskiej, który można wykorzystać do realizacji wynalazku charakteryzuje się wysoką zawartością proantocyjanów, min. 20%. Wykorzystać można również inne ekstrakty pozyskane ze wskazanych powyżej roślin, o równoważnych zawartościach substancji aktywnych, a zatem o wskaźnikach DER zawierających się we wskazanych powyżej przedziałach.

Połączenie ekstraktów roślinnych z: tymianku oregano, żurawiny oraz rumianku w wyżej wymienionych proporcjach, pozwala na otrzymanie kompozycji bazowej preparatu charakteryzującej się właściwościami wspomagającymi aktywność monocytów oraz komórek natural killer, poprzez odpowiednie pobudzenie tych komórek, przy czym pobudzenie to scharakteryzowano w wynikach badań poniżej: Przykład 3, . .

Ponadto, kompozycja ekstraktów roślinnych według wynalazku charakteryzuje się dwukrotnie silniejszym działaniem bakteriobójczym (MBC), niż w

przypadku każdego z wyżej wymienionych ekstraktów użytych indywidualnie, co potwierdziły badania, których wyniki zestawiono poniżej.

Ponadto działanie bakteriostatyczne (MIC) ekstraktu z tymianku, jest silniejsze w mieszaninie z ekstraktem z oregano, żurawiny i tymianku, niż gdy ekstrakt z tymianku jest stosowany pojedynczo - na skutek efektu synergicznego, co potwierdziły badania których wyniki zestawiono w Tabeli 2 przedstawionej poniżej dla przykładu 2.

Jak wykazały badania przedstawione w przykładach 3, 4 i 5 opracowana kompozycja ekstraktów roślinnych może być stosowana także w prewencji oraz wspomaganiu odporności na kolonizację błony śluzowej żołądka przez bakterie *Helicobacter pylori* - poprzez wzmocnienie pierwszej linii obrony odpornościowej organizmu, czyli monocytów i komórek Natural Killer (NK), ponieważ opracowana kompozycja ekstraktów roślinnych jak wskazano powyżej zapewnia odpowiednie pobudzenie tych komórek w organizmie – a w związku z tym opracowana kompozycja może być wykorzystywana do stosowania medycznego – w profilaktyce zakażeń bakterią *H.pylori*.

Struktury *Helicobacter pylori* osłabiają aktywność komórek monocytarnych oraz aktywność cytotoksyczną komórek NK w zakresie ich zdolności do wydzielania cytokin, które są mediatorami pobudzającymi do działania inne komórki odpornościowe, hamują ich zdolność do pochłaniania i zabijania wewnątrzkomórkowego bakterii, a także hamują rozpoznawanie przez nie antygenów *Helicobacter pylori*.

Kompozycja ekstraktów roślinnych według wynalazku pobudza monocyty, a ich pobudzenie jest związane z wydzielaniem cytokin co świadczy, że komórki te stają się bardziej skuteczne w zwalczaniu zakażeń, w tym tych wywołanych przez *H.pylori*, co dodatkowo potwierdza możliwość medycznego stosowania tej kompozycji zarówno w leczeniu jak i w profilaktyce zakażeń *H.pylori*, poprzez wspomaganie aktywności monocytów oraz komórek naturalnie cytotoksycznych przejawiające się ich odpowiednim pobudzeniem.

Dodatkowo zawarty w kompozycji według wynalazku ekstrakt z żurawiny wykazuje działanie które przejawia się zwiększeniem odsetek pobudzonych komórek NK, wykazujących ekspresję receptora CD25, co może być równoznaczne ze wzrostem ich aktywności cytotoksycznej względem *Helicobacter pylori*.

Kompozycja ekstraktów roślinnych według wynalazku może ponadto zawierać dodatkowe składniki, takie jak probiotyki, betaglukan, Kozieradka pospolita, Borówka czarna, Mniszek lekarski, Dzięgiel litwor, Wąkrotka azjatycka, Kasztanowiec zwyczajny, Czystek laurolistny.

Preparat na bazie kompozycji ekstraktów roślinnych według wynalazku może ponadto zawierać szereg substancji technologicznych, przykładowo węglan wapnia; dwutlenek tytanu; tlenki i wodorotlenki żelaza; glin; sorbitole, mannitol, acesulfam K, aspartam, cyklaminiany, izomalt, sacharyny, sukraloza, neohesperydyna DC, sól aspartamu i acesulfamu, maltitole, laktitol, ksylitol, erytrytol, kwas sorbowy, sorbinian potasu, kwas benzoesowy, benzoesan sodu, benzoesan potasu, benzoesan wapnia, p-hydroksybenzoesan etylu, sól sodowa p-hydroksybenzoesanu etylu, p-hydroksybenzoesan metylu, sól sodowa p-hydroksybenzoesanu metylu, kwas octowy, octan potasu, octan wapnia, kwas mlekowy, kwas jabłkowy, kwas askorbinowy, askorbinian sodu, askorbinian wapnia, mieszanina tokoferoli, alfa-tokoferol, lecytyny, mleczan sodu, mleczan potasu, mleczan wapnia, kwas cytrynowy, cytryniany sodu, cytryniany potasu, cytryniany wapnia, kwas winowy (L(+)-), winiany potasu, kwas fosforowy, jabłczan potasu, winian wapnia, ekstrakty z rozmarynu (wyciągi z rozmarynu), kwas alginowy, alginian sodu, alginian potasu, alginian wapnia, przetworzone wodorosty morskie z gatunku Eucheuma, guma guar, tragakanta, guma arabska (guma akacjowa), guma ksantanowa, guma gellan, glicerol, konjac, monooleinian polioksyetylenosorbitolu (polisorbata 80), pektyny, celuloza, metyloceluloza, etyloceluloza, hydroksypropyloceluloza, sól sodowa karboksymetylocelulozy usieciowana, sole sodowe, potasowe i wapniowe kwasów tłuszczowych, sole magnezowe kwasów tłuszczowych, węglany sodu, węglany potasu, węglany magnezu, kwas chlorowodorowy (kwas solny), wodorotlenek sodu, wodorotlenek potasu, wodorotlenek wapnia, tlenek wapnia, tlenek magnezu, dwutlenek krzemu, krzemian wapnia, krzemian magnezu, talk, l-cysteina, polidekstroza, poliwinylpiperolidon, poliwinylpolipiperolidon, alkohol poliwinylowy (PVA), pullulan, skrobia utleniona, dioctan glicerolu (diacetyna), trioctan glicerolu (triacetyna), propano-1,2-diol (glikol propylenowy), glikol polietylenowy.

Preparat na bazie ekstraktów roślinnych według wynalazku jest podawany doustnie i może mieć dowolną postać, przykładowo tabletek, kapsułek, saszetek, zawiesiny, żelu, syropu itd.

Preparat na bazie kompozycji ekstraktów roślinnych według wynalazku ma zatem zastosowanie medyczne, w tym w szczególności w leczeniu oraz leczeniu terapeutycznym obejmującym nie tylko leczenie osób chorych – to jest zakażonych *H.pylori*, ale także obejmującym profilaktyczne podawanie preparatu na bazie kompozycji ekstraktów roślinnych według wynalazku osobom zdrowym, celem wspomaganie aktywności monocytów oraz komórek cytotoksycznych – poprzez pobudzenie tych komórek u osoby, która przejęła preparat, zapewniając w ten sposób ograniczenie ryzyka zakażenia bakterią *H.pylori*. Należy zauważyć, że każda dawka preparatu zastosowana profilaktycznie – u osoby zdrowej, jest także stosowaniem medycznym kompozycji według wynalazku, ponieważ wpływa pobudzająco na monocyty oraz komórki naturalnie cytotoksyczne zmniejszając tym samym ryzyko zakażenia *H. pylori* – zgodnie z mechanizmem działania kompozycji opisanym powyżej.

Zatem, medyczne stosowanie opracowanej kompozycji ekstraktów roślinnych u osób zdrowych, to jest nie zakażonych *H.pylori*, polega na zmniejszeniu ryzyka zakażenia tą bakterią, lub też łagodniejszym przechodzeniu zakażenia *H.pylori* – w przypadku jego wystąpienia, obejmujące między innymi: ochronę przed zachorowaniem na różne choroby spowodowane zakażeniem *H.pylori*, a także występowaniem różnych chorób i/lub dolegliwości, które mogą towarzyszyć lub być następstwem zakażeń *H.pylori*, przykładowo: choroby górnego odcinka przewodu pokarmowego, w tym między innymi: zapalenia błony śluzowej żołądka, choroby wrzodowej żołądka i /lub dwunastnicy, nowotworów żołądka czy chłoniaków. Między innymi, zakażenie *H.pylori* może powodować zapalenie błony śluzowej, na początku ostre, potem przechodzące w przewlekłe. U części osób zakażonych może dochodzić do wtórnego zwiększenia produkcji kwasu żołądkowego, który działa bezpośrednio wrzodotwórczo. Natomiast zarówno prewencyjne (u osoby nie zakażonej *H.pylori*) jak i lecznicze (u osoby zakażonej *H.pylori*) zastosowanie kompozycji według wynalazku, każdorazowo, zapewni zmniejszenie ryzyka wystąpienia powyższych chorób/dolegliwości.

Kompozycję ekstraktów ziołowych według wynalazku można ponadto stosować w przypadkach zakażenia *H.pylori*, celem ograniczenia niekorzystnych dla pacjenta objawów / dolegliwości towarzyszących zakażeniu *H.pylori* takich jak: zaparcia, brak apetytu, bóle brzucha, bóle w nadbrzuszu, mdłości, zgaga, odbijanie czy wzdęcia.

Opracowana kompozycja ekstraktów roślinnych według wynalazku zawierająca ekstrakty z: rumianku pospolitego, tymianku właściwego, lebidki pospolitej oraz żurawiny amerykańskiej w proporcji ekstrakt z tymianku właściwego : rumianku pospolitego : lebidki pospolitej : żurawiny amerykańskiej wynoszącej: od 14 do 20 : od 1 do 5 : od 1 do 3 : od 15 do 20 wykazuje zatem działanie polegające na odpowiednim pobudzeniu komórek odpornościowych organizmu: monocytów oraz komórek naturalnie cytotoksycznych, dając wynikowo efekt poprawy odporności organizmu w kierunku nie tylko zwalczania, ale także profilaktyki zakażeń bakterią *H.pylori*. Jest to związane z tym, że organizm z pobudzonymi odpowiednimi komórkami układu odpornościowego – jak wskazano powyżej, nie tylko wykazuje zwiększoną tendencję do zwalczania *H.pylori* – w przypadku osób już zarażonych, ale także wykazuje zmniejszone ryzyko infekcji *H.pylori* – w przypadku osób zdrowych: to jest osób które nigdy nie były zakażone oraz osób które w przeszłości przebyły zakażenie *H.pylori* i w związku z tym są bardziej narażone na powtórna infekcję. Medyczny efekt działania powyższej kompozycji obserwuje się bez względu na wartość wskaźników DER ekstraktów roślinnych stosowanych do sporządzenia kompozycji według wynalazku, co może być spowodowane tym, że sama kompozycja powyższych ziół wykazuje działanie w kierunku pobudzania odpowiednich komórek układu odpornościowego.

Niemniej jednak najkorzystniejsze działanie powyższej kompozycji obserwuje się dla następujących ekstraktów: wodny ekstrakt z tymianku (część rośliny: zioło) o wskaźniku DER w zakresie do 5:1 do 15:1, wodno-alkoholowy ekstrakt z oregano (część rośliny: zioło) o wskaźniku DER w zakresie od 5:1 do 15:1, wodny lub wodno-alkoholowy ekstrakt z owoców żurawiny o wskaźniku DER nie mniejszym niż 15:1 oraz wodno-alkoholowy ekstrakt z kwiatów rumianku o wskaźniku DER w zakresie od 3: do 7:1.

Celem określenia pobudzającego działania kompozycji, badaniom poddano różne ekstrakty i ich kompozycje, przy czym najistotniejsze z tych badań omówiono w przykładach poniżej.

PRZYKŁAD 1: Dawkowanie kompozycji

Preparat, w którego skład wchodzi kompozycja ekstraktów roślinnych według wynalazku, podaje się dwa razy dziennie pojedynczą dawkę przed posiłkiem lub jeden raz dziennie rano przed posiłkiem podwójną dawkę w celu uzyskania pożądanych efektów.

Pojedyncza dawka kompozycji bazowej zawiera następujące ilości ekstraktów:

Tabela 1: Zawartość ekstraktów w jednej dawce kompozycji bazowej

Ekstrakt	[mg/dawka]
Tymianek właściwy (ekstrakt wodny), DER: 10:1	100
Rumianek pospolity (ekstrakt wodno-alkoholowy v:v = 1:1, DER: 4:1)	12,5
Lebiodka pospolita (nazwa zwyczajowa: oregano) (ekstrakt wodno-alkoholowy v:v = 1:1, DER: 5:1)	6,25
Żurawina amerykańska (ekstrakt wodny, DER: 18:1)	100

PRZYKŁAD 2: Wyniki badań preparatu w zakresie aktywności przeciwdrobnoustrojowej względem pałeczek *Helicobacter pylori*

Tabela 2: Aktywność przeciwdrobnoustrojowa preparatu względem *Helicobacter pylori*

Ekstrakt	MIC [µg/ml]	MBC [µg/ml]	Tolerancja
Rumianek pospolity	3,12	6,25	2
Tymianek właściwy	6,25	6,25	1
Lebiodka pospolita	3,12	6,25	2
Mieszanka powyższych	3,12	3,12	1

Jak przedstawiono w tabeli 2 ekstrakty roślinne z rumianku pospolitego, lebidki pospolitej oraz tymianku stosowane łącznie wykazują dwukrotnie silniejsze działanie bakteriobójcze (MBC) niż ekstrakty użyte indywidualnie. Ponadto działanie bakteriostatyczne (MIC) ekstraktu z tymianku, jest silniejsze w mieszaninie niż gdy jest stosowany pojedynczo. Wynika stąd, że kompozycja bazowa według wynalazku wykazuje efekt synergiczny. Badanie przeprowadzono dla kompozycji zawierającej mieszaninę ekstraktów z tymianku właściwego, rumianku pospolitego oraz lebidki pospolitej w proporcji od 16:2:1. Synergiczne działanie, polegające na silniejszym działaniu bakteriobójczym w stosunku do indywidualnych ekstraktów i silniejszym działaniu bakteriostatycznym ekstraktu z tymianku stwierdzono również dla innych mieszanin, w proporcjach od 14 do 20 : od 1 do 5 : od 1 do 3.

PRZYKŁAD 3: Badanie aktywności ekstraktów roślinnych w zakresie pobudzenia monocytów linii THP1XBlue™

W pierwszym etapie badania ekstraktów roślinnych w kierunku ich potencjału w zakresie pobudzenia monocytów linii THP1XBlue™ wykazano:

- Ekstrakt z tymianku właściwego w stężeniu 50 µg/ml istotnie stymulował (aktywował czynnik jądrowy NFκB) komórki linii THP-1 XBlue™ w porównaniu do komórek niestymulowanych ($p=0,002$);
- Ekstrakty z rumianku pospolitego i lebidki pospolitej nie powodowały aktywacji komórek linii THP1XBlue™ w porównaniu do komórek niestymulowanych;
- Mieszanina ekstraktów według badanego rozwiązania istotnie statystycznie silniej pobudza komórki THP1XBlue™ względem komórek stymulowanych ekstraktem z rumianku pospolitego i lebidki pospolitej przy $p=0,002$;
- Mieszanina ekstraktów tymianku właściwego, rumianku pospolitego oraz lebidki pospolitej istotnie statystycznie pobudza komórki THP1XBlue™ względem komórek niestymulowanych ($p=0,001$).

Można sugerować, że efekt pobudzenia komórek THP1XBlue™ w hodowlach traktowanych mieszaniną ekstraktów jest zależny od zawartego w niej ekstraktu z tymianku właściwego, a zatem badania potwierdziły zasadność stosowania w składzie kompozycji tego ekstraktu.

W kolejnym etapie zbadano czy mieszanka ekstraktów roślinnych oraz ekstrakty roślinne użyte osobno, pobudzają monocyty krwi obwodowej do wydzielania cytokin prozapalnych: czynnika martwicy guza TNF-α (ang. tumor

necrosis factor) i/lub przeciwzapalnych: interleukiny IL-(10). Badanie ekstraktów roślinnych w kierunku ich potencjału do pobudzania monocytów krwi obwodowej do wydzielania cytokin wykazało, że:

- Ekstrakt z tymianku w stężeniu 50 µg/ml istotnie pobudzał monocyty krwi obwodowej do wytwarzania cytokiny prozapalnej TNF-α (p=0,05) oraz przeciwzapalnej IL-10 (p=0,05), w porównaniu do hodowli niestymulowanej;
- Mieszanina ekstraktów według wynalazku istotnie statystycznie nasilała wydzielanie IL-10 i TNF-α przez monocyty krwi obwodowej, w porównaniu do stężenia tych cytokin w hodowlach traktowanych ekstraktem z rumianku pospolitego (p=0,05) lub Lebidki pospolitej (p=0,05) użytymi osobno;
- Mieszanina ekstraktów według wynalazku istotnie statystycznie nasilała wydzielanie TNF-α i IL-10 przez monocyty krwi obwodowej w porównaniu do stężenia tych cytokin w hodowlach niestymulowanych (p=0,05).

PRZYKŁAD 4: Test immunostymulacji ekstraktami roślinnymi oraz znanymi stymulatorami bakteryjnymi przez okres 4 godz., 24 godz. i 72 godz.

Do komórek dodano po 20 µl badanych ekstraktów roślinnych, w taki sposób aby finalnie w studzienkach uzyskać stężenia wybrane na etapach wcześniejszych (Tabela 3). Zastosowano następującą metodykę rozpuszczania ekstraktów: (1 mg/ml): ekstrakty z rumianku pospolitego, tymianku właściwego oraz czystka laurolistnego rozpuszczono w samym podłożu cRPMI, ekstrakt z porostu Usnea w 100% DMSO, natomiast resztę ekstraktów roślinnych w 10% DMSO w cRPMI. Dalsze rozcieńczenia ekstraktów wykonano w podłożu hodowlanym cRPMI, a następnie filtrowano je przez filtry o średnicy porów 0,22 µm. Ostatecznie w badaniach użyto po trzy stężenia dla każdego z badanych ekstraktów roślinnych (Tabela 3), uwzględniając kontrole ujemne; studzienki z samym podłożem hodowlanym cRPMI; studzienki zawierające komórki THP1XBlue™ w podłożu cRPMI oraz kontrole zastosowanych rozpuszczalników tj. komórki THP1XBlue w odpowiednich stężeniach DMSO, jak również kontrolę dodatnią - znany stymulator monocytów - LPS *E. coli* w stężeniu 1 pg/ml.

Tabela 3: Ekstrakty roślinne oraz ich stężenia i rozpuszczalniki wyselekcjonowane do badań immunomodulacyjnych

Ekstrakt	Zastosowany rozpuszczalnik	Stężenia [$\mu\text{g/ml}$]		
		50	6.25	3.125
Żurawina amerykańska	10% DMSO w cRPMI	50	6.25	3.125
Rumianek pospolity	cRPMI	25	6.25	3.125
Tymianek właściwy	cRPMI	50	6.25	3.125
Czystek laurolistny	cRPMI	50	6.25	3.125
Lukrecja	10% DMSO w cRPMI	50	6.25	3.125
Porost Brodaczka	100% DMSO	6.25	3.125	0.025
Lebiodka pospolita	10% DMSO w cRPMI	50	6.25	3.125

Po upływie 4 godz., 24 godz. lub 72 godzin płytki 96-studzienkowe z hodowlami komórkowymi traktowanymi ekstraktami roślinnymi, odwirowano z prędkością 1400 obr./min w czasie 10 min. a następnie pobrano po 20 μl supernatantu hodowlanego z każdej ze studzienek i przeniesiono do osobnej płytki zawierającej odczynnik do detekcji QuantiBlue (Invivogen). Po upływie 3 godzin zmierzono absorbancję przy długości fali 620 nm za pomocą czytnika ThermoScientific Multiscan Go.

Jak przedstawiono na Fig. 1, 4-godzinna inkubacja monocytów, zarówno z wszystkimi typami ekstraktów roślinnych we wszystkich stężeniach według Tabeli 3, jak i z preparatem kontrolnym LPS *E. coli* nie prowadziła do aktywacji takich komórek, a zatem wartości absorbancji pozostawały na poziomie hodowli nietraktowanej. Czterogodzinna ekspozycja monocytów na ekstrakty roślinne i stymulator kontrolny była niewystarczająca.

Jak przedstawiono na Fig. 2, 24-godzinna inkubacja monocytów z preparatem kontrolnym - LPS *E. coli* doprowadziła do silnego pobudzenia takich komórek, co objawiło się wzrostem wartości absorbancji ($\text{OD}_{620\text{nm}}$) do 1,250. Uwzględniając wartość odcięcia, która wyniosła 0,410, ekstrakt z tymianku właściwego w najwyższym zastosowanym stężeniu (50 $\mu\text{g/ml}$) istotnie pobudzał monocyty, w porównaniu do hodowli nietraktowanej. Tego efektu nie zaobserwowano dla innych badanych ekstraktów roślinnych.

Jak przedstawiono na Fig. 3, 72-godzinna inkubacja w środowisku stymulatora kontrolnego (LPS *E. coli*), poziom pobudzenia monocytów THP1XBlue™ spadł prawie o połowę do wartości 0,7. Poziom aktywacji wywołanej ekstraktem z tymianku właściwego w stężeniu 50 µg/ml pozostał ponad poziomem odcięcia, jednak obniżył się o 20% do wartości 0,450. Przedłużenie inkubacji do 72 godz. spowodowało nasilenie pobudzenia monocytów hodowanych w środowisku rumianku pospolitego oraz czystka laurolistnego w stężeniu 6,25 µg/ml.

Następnie w celu zbadania czy aktywacja monocytów związana jest z produkcją cytokin o charakterze pro- czy przeciwzapalnym, za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej monocyty izolowane z krwi obwodowej zdrowych dawców stymulowano ekstraktem z tymianku: 50 µg/ml przez 24 godziny, rumianku pospolitego lub czystka laurolistnego: 6,25 µg/ml przez 72 godziny uwzględniając kontrolę nietraktowaną oraz traktowaną LPS *E. coli*, a następnie supernatanty pochodzące przebadano na obecność TNF-α lub IL-10 w testach immunoenzymatycznych ELISA.

Tabela 4: Stężenie TNF-α (a) oraz IL-10 (b) po 24 lub 72 godzinnej stymulacji monocytów obwodowych zdrowych dawców z wykluczonym zakażeniem *H. pylori* ekstraktami roślinnymi

a) TNF-α [pg/ml]						
	Niestymul.	Tymianek właściwy [50µg/ml]	Rumianek pospolity [6.25µg/ml]	Czystek laurolistny [6.25µg/ml]	DMSO 10%	LPS <i>E.coli</i> [1µg/ml]
24 h	0	0	nb	nb	nb	23,9
72 h	0	0	0	0	0	0
b) IL-10 [pg/ml]						
	Niestymul.	Tymianek właściwy [50µg/ml]	Rumianek pospolity [6.25µg/ml]	Czystek laurolistny [6.25µg/ml]	DMSO 10%	LPS <i>E.coli</i> [1µg/ml]
24 h	0	47,7	nb	nb	nb	91,8
72 h	0	31,7	0	0	0	76,4

W supernatantach pochodzących z hodowli nietraktowanych czynnikami stymulującymi, oraz w hodowlach traktowanych rozcieńczalnikiem (DMSO/cRPMI) nie wykryto obecności żadnych z badanych cytokin. Zaobserwowano, natomiast, że pobudzeniu komórek THP1XBlue™ przez ekstrakt z tymianku właściwego (50 µg/ml) towarzyszy wydzielanie immunoregulatorowej IL-10 (Tabela 4b). Efekt ten był obserwowany zarówno po 24, jak i 72 godz. stymulacji. Ekstrakt z tymianku właściwego nie pobudzał takich komórek do wydzielania prozapalnego czynnika TNF-α, cytokiny związanej z niekorzystną, nadmierną reakcją zapalną (Tabela 4a). Dla porównania LPS *E. coli* - komponenta bakteryjna pobudzająca monocyty do patologicznej reakcji zapalnej (obserwowanej np. w przebiegu sepsy) pobudzała monocyty do wydzielania, zarówno IL-10 jak i czynnika TNF-α. W odpowiedzi na ekstrakty z rumianku pospolitego oraz czystka laurolistnego monocyty nie wydzielaly żadnych z badanych cytokin (Tabela 4a, 4b).

Podsumowując wyniki badań: ekstraktem roślinnym o najwyższym potencjale immunomodulującym jest ekstrakt z tymianku właściwego, który w najwyższym bezpiecznym *in vitro* stężeniu po 24 godzinach stymulacji wywołał istotne pobudzenie monocytów THP1XBlue™, w odniesieniu do hodowli niestymulowanej ($p < 0.05$). Ekstrakty z rumianku pospolitego oraz czystka laurolistnego pobudzały aktywność monocytów linii THP1XBlue™, wyłącznie po 72-godzinnej ekspozycji w stężeniu 6.25 µg/ml. czyli dawce, określonej jako przeciwdrobnoustrojowa wobec pałeczek *H. pylori*, ale pobudzenie to nie było związane ze wzrostem aktywności cytokinowej obwodowych monocytów w zakresie wytwarzania IL-10 lub TNF-α. Istotnym aspektem jest to że, działanie powyższych ekstraktów roślinnych w zakresie pobudzania monocytów linii THP1XBlue™, można określić jako umiarkowanie silne, gdyż stanowi połowę zakresu wzbudzanego przez czynnik kontrolny - LPS *E. coli*. Jest to cechą pożądaną w przypadku substancji o potencjale immunoprotekcyjnym, gdyż nadmierna immunostymulacja mogłaby prowadzić do niepożądanego reakcji zapalnej.

Pobudzenie monocytów do wytwarzania IL-10 przy braku TNF-α jest zaletą ekstraktu z tymianku właściwego, ponieważ IL-10 jest czynnikiem hamującym wytwarzanie cytokin prozapalnych takich jak TNF-α, IL-2, czy IFN-γ, których nasiloną produkcję obserwuje się przy przewlekłych stanach zapalnych, zapaleniu jelit, czy chorobach autoimmunologicznych.

PRZYKŁAD 5: Badanie wpływu ekstraktów pochodzenia roślinnego na aktywność cytotoksyczną, sekrecyjną oraz fenotypową obwodowych komórek NK zdrowych dawców.

Krew obwodową pobierano za zgodą komisji bioetycznej Uniwersytetu Łódzkiego, od zdrowych dawców wyselekcjonowanych spośród pracowników Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska. Upřednio dawcy byli poddani badaniu na obecność surowicznych przeciwciał przeciwko *H.pylori* oraz poddawaniu badaniu oddechowym testem mocznikowym. U wszystkich dawców objętych badaniami na podstawie wyników ujemnych obu testów wykluczono zakażenie *H.pylori*. Każdorazowo krew obwodową pobierano w przeznaczonym do tego celu pomieszczeniu, przez osobę posiadającą stosowne uprawnienia. Krew nawarstwiono na podłoże do izolacji frakcji monocytarno-limfocytarnej w stosunku 1:1, po czym wirowano przy 1400 obr./min przez 30 minut. Po wirowaniu pozyskano frakcję limfocytarno-monocytarną, przepłukano ją 2-krotnie podłożem hodowlanym, policzono gęstość zawiesiny doprowadzając ją do 2×10^7 komórek/ml. Tak przygotowaną zawiesinę komórek następnie naniesiono do studzienek naczynia 24-dolkowego i poddano 90-minutowej inkubacji. Po upływie tego czasu odzyskiwano frakcję nieadherentną - limfocytarną, którą poddano 24-godzinnej stymulacji ekstraktami roślinnymi przedstawionymi w Tabeli 5. Uwzględniono również kontrolę ujemną (hodowla niestymulowana) oraz kontrolę dodatnią (komórki stymulowane LPS *E.coli*).

Tabela 5: Ekstrakty roślinne oraz ich stężenia wyselekcjonowane do badań immunomodulacyjnych w zakresie aktywacji, fenotypowania i aktywności sekrecyjnej obwodowych komórek NK.

Ekstrakt	Stężenia [$\mu\text{g/ml}$]		
Żurawina amerykańska	50	6,25	3,125
Rumianek pospolity	25	6,25	3,125
Tymianek	50	6,25	3,125
Czystek laurolistny	50	6,25	3,125
Lukrecja	50	6,25	3,125
Oregano	50	6,25	3,125
Porost Usnea	6,25	3,125	0,02

Po stymulacji, frakcję nieadherentną zawierającą limfocyty, w tym komórki NK, zbierano do osobnych probówek (zabezpieczając supernatanty, które posłużyły w kolejnym etapie do oceny aktywności sekrecyjnej w odpowiedzi na ekstrakty roślinne), i poddano znakowaniu markerów powierzchniowych komórek NK monoklonalnymi przeciwciałami (mAb) sprzężonymi ze znacznikami fluorescencyjnymi: mAb anti-CD3-FITC; mAb anti-CD56-PE; mAb anti-CD25-APC. Powyższe znakowanie markerów powierzchniowych oraz cytometryczna analiza wyników wykonane były przy użyciu oprogramowania FlowJo oraz pozwoliły na wyliczenie odsetków komórek NK (CD3⁺CD56⁺) oraz aktywowanych komórek NK (CD3⁺CD56⁺CD25⁺).

Tabela 6: Wpływ ekstraktów roślinnych na liczbę oraz fenotyp obwodowych komórek NK określany przy pomocy immunofenotypowania receptorów powierzchniowych i analizy w cytometrze przepływowym

	Stężenie [μg/ml]	NK CD3+CD56+	Istotność statystyczna p w odniesieniu do kontroli niestymulowanej	Aktywowane komórki NK %CD25+	Istotność statystyczna p w odniesieniu do kontroli niestymulowanej
Tymianek	50	18,01	p>0,05	0,75	p>0,05
	6,25	17,92	p>0,05	1,00	p>0,05
	3,125	10,04	p>0,05	1,10	p>0,05
Rumianek pospolity	25	35,17	p<0,05	1,23	p<0,05
	6,25	26,38	p<0,05	1,40	p<0,05
	3,125	13,70	p>0,05	0,48	p>0,05
Żurawina amerykańska	50	25,56	p<0,05	2,24	p<0,05
	6,25	27,96	p<0,05	1,78	p<0,05
	3,125	11,37	p>0,05	0,85	p>0,05
Czystek laurolistny	50	30,46	p<0,05	0,86	p>0,05
	6,25	20,28	p>0,05	1,10	p>0,05
	3,125	13,15	p>0,05	0,98	p>0,05
Lukrecja	50	24,57	p>0,05	0,61	p>0,05
	6,25	17,95	p>0,05	0,47	p>0,05
	3,125	13,41	p>0,05	1,00	p>0,05

Oregano	50	24,66	p<0,05	1,06	p>0,05
	6,25	18,09	p>0,05	1,28	p>0,05
	3,125	11,65	p>0,05	0,91	p>0,05
Porost Usnea	3,25	25,62	p>0,05	0,98	p>0,05
	3,125	19,00	p>0,05	1,11	p>0,05
	0,02	12,41	p>0,05	1,03	p>0,05
Kom. Niestym.	RPMI	18,05	-	0,98	
LPS E.coli	1µg/ml	25,73	p<0,05	2,90	p<0,05

Jak przedstawiono w tabeli 6, ekstrakt z żurawiny amerykańskiej w stężeniach 50 i 6,25 µg/ml, ekstrakt z rumianku pospolitego w stężeniach 25 i 6,25 µg/ml oraz ekstrakty z czystka laurolistnego i lebidki pospolitej w stężeniu 50 µg/ml wywołały istotny wzrost odsetka komórek NK o fenotypie (CD3⁺CD56⁺), w porównaniu do hodowli niestymulowanej. Obserwowany wzrost liczby takich komórek może świadczyć o pobudzeniu do proliferacji, czyli wzrostu liczby komórek należących do tej populacji. Ponadto w hodowlach limfocytów traktowanych ekstraktem z żurawiny amerykańskiej w stężeniach 50 i 6,25 µg/ml lub ekstraktem z rumianku pospolitego w stężeniach 25 i 6,25 µg/ml odnotowano wzrost odsetka pobudzonych komórek NK, wykazujących ekspresję receptora CD25 co może być równoznaczne ze wzrostem ich aktywności cytotoksycznej (Tabela 7).

Tabela 7: Średnie stężenia IL-2 wydzielanej przez limfocyty obwodowe traktowane ekstraktem z żurawiny amerykańskiej lub ekstraktem z rumianku pospolitego, lub komórki niestymulowane

	cRPMI	Żurawina amerykańska [µg/ml]			Rumianek pospolity [µg/ml]		
		50	6,25	3,125	25	6,25	3,125
IL-2 (pg/ml)	7,49±2,63	18,77±8,30	17,05±5,72	8,77±8,30	12,11±3,42	12,43±9,71	9,05±9,05
<i>p</i>	p>0,05	p<0,05	p<0,05	p>0,05	p<0,05	p<0,05	p>0,05

p wyliczone w porównaniu do hodowli niestymulowanej testem U-Manna Whitney'a dla testów nieparametrycznych

Wzrost odsetka komórek NK oraz takich komórek z receptorem CD25, w odpowiedzi na ekstrakt z żurawiny amerykańskiej o stężeniach 50 i 6,25 µg/ml oraz ekstrakt z rumianku pospolitego o stężeniach 25 i 6,25 µg/ml był związany z aktywnością sekrecyjną takich komórek w zakresie wydzielania IL-2 (wzrost sekrecji IL-2).

Powyżej przedstawione przykłady wykazują, iż kompozycja bazowa według wynalazku, zawierająca mieszaninę ekstraktów z rumianku pospolitego, tymianku właściwego, lebiodki pospolitej oraz żurawiny amerykańskiej w proporcji ekstrakt z tymianku właściwego: rumianku pospolitego : lebiodki pospolitej: żurawiny amerykańskiej wynoszącej: od 14 do 20 : od 1 do 5 : od 1 do 3 : od 15 do 20, wspomaga aktywność monocytów oraz komórek natural killer (NK) poprzez pobudzenie tych komórek do sekrecji odpowiednich cytokin, co czyni preparaty zawierające kompozycję bazową według wynalazku szczególnie przydatną w leczeniu zakażeń *H. pylori*. Istotnym aspektem aktywności ekstraktów roślinnych według wynalazku jest to że, działanie powyższych ekstraktów roślinnych w zakresie pobudzania monocytów linii THP1XBlue™, można określić jako umiarkowanie silne, gdyż stanowi połowę zakresu wzbudzanego przez czynnik kontrolny - LPS *E. coli*, dzięki czemu są one odpowiednimi substancjami o potencjale immunoprotekcyjnym, gdyż nie powodują nadmiernej immunostymulacji mogącej prowadzić do niepożądanego reakcji zapalnej.

W związku z tym opracowany skład kompozycji ekstraktów roślinnych zapewnia zwiększenie aktywności odpowiednich komórek do poziomu umiarkowanie silnego, to jest optymalnego w kierunku zwalczania występujących w organizmie infekcji, takich jak zakażenie *H.pylori*, a także profilaktyki takich infekcji, z jednoczesnym nie dopuszczeniem do zjawiska nadmiernej aktywności układu odpornościowego, co mogłoby powodować jego działanie prozapalne. Z tego powodu opracowana kompozycja zapewnia stymulację komórek układu odpornościowego właściwą zarówno w leczeniu jak i profilaktyce zakażeń *H.pylori* – a zatem przy jej medycznym zastosowaniu.

Przedstawiony tu preparat może stanowić suplement diety, żywność specjalnego przeznaczenia medycznego lub inny rodzaj żywności funkcjonalnej.

Należy rozumieć, że powyższy opis dotyczy przykładów wykonania wynalazku, które są tylko obrazowe, objaśniające i w żaden sposób nie ograniczają wynalazku. Wszelkie zmiany i modyfikacje mogą być wprowadzone w przykładach wykonania, co będzie oczywiste dla specjalistów w tej dziedzinie. Takie odmiany należy rozważyć w zakresie wynalazku, jak zdefiniowano w poniższych zastrzeżeniach.