

In vitro* effectiviteit van Samento en Banderol kruidenextracten op de verschillende morfologische vormen van *Borrelia burgdorferi

Door Akshita Datar¹, Navroop Kaur¹, David F. Luecke¹, Shilpa Madri¹ en Eva Sapi Ph.D¹.
Lyme Disease Research Group, University of New Haven

Samenvatting

Lyme borreliosis, een door teken overgebrachte multisystemische ziekte, veroorzaakt door de spirocheet *Borrelia burgdorferi*, is in de laatste tien jaar een belangrijk openbaar gezondheidsprobleem geworden. De primaire behandeling voor de chronische ziekte van Lyme is toediening van diverse antibiotica. Terugval van de ziekte treedt echter dikwijls op wanneer de antibioticabehandeling wordt beëindigd. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat *Borrelia burgdorferi* resistent wordt tegen antibioticabehandeling, door van een vegetatieve spirocheetvorm over te gaan in andere ronde partikels en/of in biofilm-achtige kolonies. Er bestaat een dringende behoefte om nieuwe therapeutische middelen te vinden die in staat zijn om al deze verschillende morfologieën van *Borrelia burgdorferi* te verwijderen.

In deze studie werden twee kruidenextracten van het Cowden Condensed Support Program, Samento en Banderol genaamd, evenals doxycycline (één van de primaire antibiotica voor de behandeling van de ziekte van Lyme) getest op hun *in vitro* effectiviteit op verschillende morfologische vormen van *Borrelia burgdorferi* (spirocheten, ronde partikels en biofilm-achtige koloniën) door gebruik te maken van fluorescerende, donkerveld microscopische en BacLight kleuringmethoden betreffende de levensvatbaarheid. De resultaten toonden aan dat beide kruidenmiddelen, maar niet doxycycline, zeer significante effecten hadden op alle vormen van *Borrelia burgdorferi*, vooral wanneer ze in combinatie worden gebruikt, hetgeen suggereert dat kruidenmiddelen een effectieve therapie zouden kunnen verschaffen voor patiënten met de ziekte van Lyme.

Borrelia burgdorferi, het primair veroorzakende agens van de ziekte van Lyme, is een spirocheetbacterie die het vermogen heeft om verschillende inactieve vormen aan te nemen, zoals cysteuze en granulaire vormen (ronde partikels) evenals kolonie-achtige samenstelsels zowel *in vivo* als *in vitro*, in de aanwezigheid van ongunstige omstandigheden zoals blootstelling aan de antibiotica die gewoonlijk worden gebruikt voor het behandelen van Lyme borreliose¹⁻⁴. Helaas zal, wanneer *Borrelia burgdorferi* zich in deze inactieve vormen bevindt, conventionele antibioticatherapie de bacterie niet vernietigen³. Vandaag de dag is de frontlinie behandeling voor de ziekte van Lyme nog steeds toediening van farmaceutische antibiotica zoals doxycycline, minocycline, claritromycine, penicilline G en ceftriaxone^{4,5}. Veel studies hebben laten zien dat ondanks continue antibiotische therapie, de chronische ziekte van Lyme in veel gevallen niet met succes behandeld wordt⁶. Ook komt bij afwezigheid van voortgaande antibiotische behandeling, terugval van de ziekte algemeen voor^{7,8}. Dit betekent dat zelfs na antibiotische behandeling de immuniteit van de gastheer er niet in slaagt het terugkomen te voorkomen⁸. Een mogelijke verklaring voor deze klinische waarneming is de aanwezigheid van andere morfologische vormen van *Borrelia burgdorferi*, die de bacteriën misschien beschermen tegen de antibacteriële therapie. Spoedig na de behandeling wordt terugval van de ziekte waargenomen, meest waarschijnlijk doordat de *Borrelia burgdorferi* terug kan keren tot de spirocheetvorm. Verder zijn de kosten van antibiotische behandeling, vooral wanneer intraveneus toegediend, aanzienlijk. Antibiotische therapie kan ook meervoudige ongewenste bijwerkingen veroorzaken⁹. Aldus bestaat er een

dringende behoefte aan nieuwe, efficiëntere en kosteneffectievere behandelingsbenaderingen die efficiënt alle vormen van *Borrelia burgdorferi* verwijderen.

Er bestaat een alternatieve klinische behandelingsoptie die een breder gebruik verwerft, Cowden Condensed Support Program genaamd, dat gebruik maakt van verschillende plantaardige extracten die ontworpen zijn om microben te verwijderen bij patiënten met de ziekte van Lyme. Richard Horowitz, MD, Voorzitter van de International Lyme and Associated Diseases Educational Foundation (ILADEF), heeft het Cowden Condensed Support Program voor meer dan 2000 van zijn patiënten voorgeschreven en vermeldt dat het effectief is voor meer dan 70% van hen. De twee voor deze studie geselecteerde plantaardige middelen uit het Cowden Condensed Support Program zijn Samento (een pentacyclisch chemotype van Cat's Claw - *Uncaria tomentosa* dat geen tetracyclische oxindol-alkaloïden bevat), met beschreven antibacteriële en antivirale eigenschappen^{10,11} en Banderol (*Otoba sp.*) waarvan bekend is dat het antibacteriële, anti-protozoale en anti-inflammatoire effecten heeft¹². Beide plantaardige middelen worden gebruikt tijdens de eerste twee maanden van Cowden Condensed Support Program en daarna in rotatie met andere antimicrobiële middelen tijdens de duur van dit protocol van 6 maanden.

Bij deze studie evalueerden we deze natuurlijke plantaardige antimicrobiële extracten evenals doxycycline (één van de voornaamste farmaceutische antibiotica voor behandeling van de ziekte van Lyme) op hun potentiële effecten op de verschillende vormen van *Borrelia burgdorferi*.

De in deze studie gebruikte infectieuze B31-stam van *Borrelia burgdorferi*, verkregen van American Type Tissue Collection (ATCC# 35210) werd gekweekt in 5% CO₂ bij 34°C, in Barbour–Stoener–Kelly H (BSK H) medium aangevuld met 6% konijnenserum (Sigma, St. Louis MO, USA) tot mid-logaritmisch stadium (2x10⁷ cellen/ml).

Samento en Banderol werden verkregen van Nutramedix LLC (Jupiter, FL, USA). Doxycycline werd verkregen van Sigma. Aanvankelijk werd een groot scala aan concentraties van Samento en Banderol getest om de effectieve concentraties (1:100-1:1000 verdunningen) te bepalen. Voor doxycycline werd een 10x hogere concentratie dan de beschreven minimale bactericide concentratie gebruikt (250µg/ml)¹³. BSK H medium bevattende Triplicate testbuizen met en zonder de geschikt verdunde antimicrobiële middelen, werden geënt met een uiteindelijke dichtheid van 5x10⁶ cellen/ml van het testorganisme.

Rechtstreekse celtellende methoden met Petroff-Hausser tellende kamers en morfologische studies die gebruik maken van fluorescerende en donkerveld microscopische technieken evenals LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Assay (Life Technologies Corp, Carlsbad, CA, USA), werden gebruikt om het effect van de antimicrobiële middelen vast te stellen. Voor statistische analyses werd één sample paired T-test verricht door gebruik te maken van NCSS statistische software (NCSS LLC, Kaysville, UT).

In de eerste set experimenten testten we de gevoeligheid van de spirocheet en ronde partikelvormen van de B31-stam voor een breed scala concentraties van Samento- en Banderol extracten (van 1:100 tot 1:1000 verdunningen). De cellen werden gedurende 96 uur behandeld en daarna werden rechtstreekse celtelling- en donkerveld morfologische evaluatiemethoden gebruikt om de effecten van de antimicrobiële middelen te meten. Voor beide plantaardige extracten verwijderde de verdunning van 1:400 het meest efficiënt zowel de spirocheet- als de ronde partikelvormen

(figuur 1A en 1B). Wanneer we echter de combinatie van Samento- en Banderolextracten gebruikten, dan liet de 1:300 verdunning de meeste effectiviteit zien en deze concentratie werd gekozen voor verdere studie (figuur 1C). Als negatieve controle werd ook 0,25% ethanolbehandeling opgenomen bij alle experimenten, omdat deze plantaardige extracten ~25% ethanol bevatten om de nutriënten de cellen in te transporteren en voor stabiliteit.

Bij deze experimenten vergeleken we ook het effect van plantaardige Samento- en Banderolextracten met doxycycline, het meest voorkomende antibiotische behandelingsmiddel voor de behandeling van de ziekte van Lyme in een behandelingsperiode van 96 uur. Onze resultaten lieten zien dat (250µg/ml) doxycycline zeer effectief was bij het verwijderen van de spirocheetvorm van *Borrelia burgdorferi*, maar het de ronde partikelvormen van deze bacteriën aanzienlijk deed toenemen. Bij het vergelijken van deze doxycyclinegegevens met die van de plantaardige extracten was de combinatie van Samento en Banderol (1:300) efficiënter bij het verwijderen van zowel de spirocheet- als de rondepartikelvormen van *Borrelia burgdorferi in vitro* (figuur 1, grafiek A-C).

Bij de volgende set experimenten evalueerden we het effect van de verschillende antimicrobiële middelen op biofilm-achtige kolonies van *Borrelia burgdorferi*. De kweken werden zoals hierboven beschreven behandeld gedurende 96 uur en gekleurd met BacLight fluorescent levensvatbaarheidkleuringen, die kunnen helpen de effecten van de antimicrobiële middelen op de bacteriële cellen zichtbaar te maken (figuur 2). De groene fluorescerende kleuring (SYTO® 9, with excitation/emissie maxima van ongeveer 480/500 nm) kleurt gezonde bacteriën met intacte membranen, aldus levende cellen kleurend en de rode kleurstof (propidium jodide met excitatie/emissie maxima van ongeveer 490/635 nm) kleurt bacteriën met beschadigde membranen, door de groene kleurstof te verdringen, aldus dode cellen kleurend. In de afwezigheid van antimicrobiële middelen vormt *Borrelia burgdorferi* biofilm-achtige kolonies (figuur 2A) met hoofdzakelijk levende bacteriële cellen. In de aanwezigheid van Samentoextract (1:300) waren de kolonies aanzienlijk kleiner en minder georganiseerd (Figuur 2B), maar ze kleurden wel met groene kleurstof hetgeen aangeeft dat er levende cellen overbleven. In de aanwezigheid van Banderolextracten, liet de grootte van de kolonies geen enkele vermindering zien, de cellen binnen de kolonies zijn echter >90% dood. In de aanwezigheid van beide plantaardige extracten (Banderol en Samento 1:300), werd geen teken van enigerlei kolonievorming in de kweken waargenomen, maar we vonden bewijs van enkele individuele niet-mobiele maar groene spirocheten en ronde partikels. In de aanwezigheid van doxycycline (250µg/ml), nam de gemiddelde koloniegrootte toe en bevatte hoofdzakelijk levende ronde partikelvormen.

Bij deze studie was onze werkhypothese dat we een efficiënte therapie antimicrobiële middelen moeten vinden die in staat is om alle vormen van de *Borrelia burgdorferi* te verwijderen. In de loop van de *Borrelia*-infectie kan de bacterie tussen de verschillende vormen wisselen, van de spirocheetvorm overgaan naar de andere wanneer het geconfronteerd wordt met een ongunstige omgeving en het kan terugkeren naar de spirocheetvorm wanneer de omstandigheid weer gunstig is voor haar groei¹⁻⁴. Om *Borrelia burgdorferi* met succes uit te roeien dienen antimicrobiële middelen al die vormen te verwijderen waaronder de spirocheten, ronde partikels en biofilm-achtige kolonies. Hier hebben we bewijs verschaft dat twee natuurlijke antimicrobiële middelen (Samento- en Banderolextracten), *in vitro* aanzienlijk effect hadden op alle drie bekende vormen van de *Borrelia burgdorferi*. We hebben ook aangetoond dat doxycycline, een van de belangrijkste

antibiotica die in de kliniek gebruikt wordt om de ziekte van Lyme te behandelen⁵, slechts significant effect had op de spirocheetvorm van *Borrelia burgdorferi*.

Onze latere resultaten zouden enige verklaring kunnen verschaffen waarom terugval zo gewoon is na beëindiging van antibioticatherapie. Enige van de recente verslagen omtrent dierexperimenten toonden bijvoorbeeld aan dat hoewel farmaceutische antibiotica effectief zijn bij het verbeteren van ziekte, de infectie zelfs na ogenschijnlijk effectieve therapie kan persisteren, hetgeen suggereerde dat *Borrelia* zelfs levensvatbaar kunnen blijven na antibiotische toediening^{14,15}. Indien die farmaceutische antibiotica slechts een vorm van deze bacterie verwijderde dan zouden de andere vormen de bron hebben kunnen zijn van de persisterende ziekte.

Het is nodig het andere zeer belangrijke feit voor een effectieve behandeling voor *Borrelia* infectie te beschouwen, dat deze bacterie kenmerkend een levensduur heeft variërend van verschillende weken tot zes tot acht maanden; het kan daarom zes tot acht maanden vergen voordat zelfs een generatie *Borrelia* wordt blootgesteld aan het antimicrobiële middel voor verwijdering¹⁶. Omdat de plantaardige extracten zoals Samento beschreven worden als niet-toxisch¹⁷, kan het veilig dagelijks ingenomen worden gedurende de lange tijdsperiode die nodig is om *Borrelia* grondig uit een geïnfecteerd lichaam te verdelgen.

Samenvattend heeft onze nieuwe studie *in vitro* onderzoeksgegevens verschaft omtrent een nieuwe behandelingsbenadering door gebruik te maken van antimicrobiële kruidenmiddelen om op effectieve wijze *Borrelia burgdorferi*, de ziekte van Lyme bacterie, effectief uit te roeien.

Corresponding author; Eva Sapi Ph.D. University of New Haven, Department of Biology and Environmental Sciences, 300 Boston Post Road West Haven, CT 06516 USA; email: esapi@newhaven.edu

Notes:

1. Gruntar I, Malovrh T, Murgia R, Cinco M. Conversion of *Borrelia garinii* cystic forms to motile spirochetes *in vivo*. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 2001;109:383–388.
2. Brorson Ø, Brorson SH. *In vitro* conversion of *Borrelia burgdorferi* to cystic forms in spinal fluid, and transformation to mobile spirochetes by incubation in BSK-H medium. *Infection*. 1998; 26:44–50.
3. Miklossy J, Kasas S, Zurn AD, McCall S, Yu S, McGeer PL. Persisting atypical and cystic forms of *Borrelia burgdorferi* and local inflammation in Lyme neuroborreliosis. *Journal of Neuroinflammation*. 2008; 25:5-40.
4. Brorson Ø, Brorson SH, Scythes J, MacAllister J, Wier A, Margulis L. Destruction of spirochete *Borrelia burgdorferi* round-body propagules (RBs) by the antibiotic tigecycline. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Nov; 106(44):18656-18661.
5. Burrascano J: Advanced Topics in Lyme Disease. *Managing Lyme Disease*. 2005; 15th edition, 1-33.
6. Krause PJ, Foley DT, Burke GS, Christianson D, Closter L, Spielman A. Reinfection and relapse in early Lyme disease. *Am Trop Med Hyg*. 2006; 75(6):1090-1094.

7. Klempner M, Linden MD, Hu T, J Evans J et al. Two controlled trials of antibiotic treatment in patients with persistent symptoms and a history of Lyme disease. *The New England Journal of Medicine*. 2001; 345:85-92.
8. Horowitz R. Classical and Integrative Medical Approaches in Chronic Lyme Disease: New Paradigms in Diagnosis & Treatment. *8th Annual International Lyme and Associated Diseases Society (ILADS) Conference 2007 October*.
9. Matsuura T, Shimizu Y, Fujimoto H, et al. Minocycline-related lupus. *Lancet* 1992; 340:1553.
10. Ccahuana-Vasquez RA, Santos SS, Koga-Ito CY, Jorge AO. Antimicrobial activity of *Uncaria tomentosa* against oral human pathogens. *Braz Oral Res*; 2007 Jan-Mar; 21(1): 46-50.
11. Valerio LG Jr, Gonzales GF. Toxicological aspects of the South American herbs cat's claw (*Uncaria tomentosa*) and Maca (*Lepidium meyenii*): a critical synopsis. *Toxicol Rev*. 2005; 24(1):11-35.
12. Weniger B, Robledo S, Arango GJ, Deharo E, Aragón R, Muñoz V, Callapa J, Lobstein A, Anton R. Antiprotozoal activities of Colombian plants. *J Ethnopharmacol*. 2001 Dec; 78(2-3):193-200.
13. Baradaran-Dilmaghani R, Stanek G. *In vitro* susceptibility of thirty *Borrelia* strains from various sources against eight antimicrobial chemotherapeutics. *Infection*. 1996 Jan-Feb; 24(1):60-63.
14. Bockenstedt LK, Mao J, Hodzic E, et al. Detection of attenuated, noninfectious spirochetes in *Borrelia burgdorferi*-infected mice after antibiotic treatment. *J Infect Dis*. 2002; 186:1430–1437.
15. Barthold SW, Hodzic E, Imai DM, Feng S, Yang X, Luft BJ. Ineffectiveness of tigecycline against persistent *Borrelia burgdorferi*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Feb; 54(2):643-51.
16. Samuels DS and Radolf JD. *Borrelia*: Molecular Biology, Host Interaction and Pathogenesis. *Caister Academic Press*, 2010 March.
17. Reinhard, K-H. *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C.: Cat's claw, Una de Gato, or Saventaro. *J Alt Comp Med*. 1999; 5:143-51.

Figure 1A

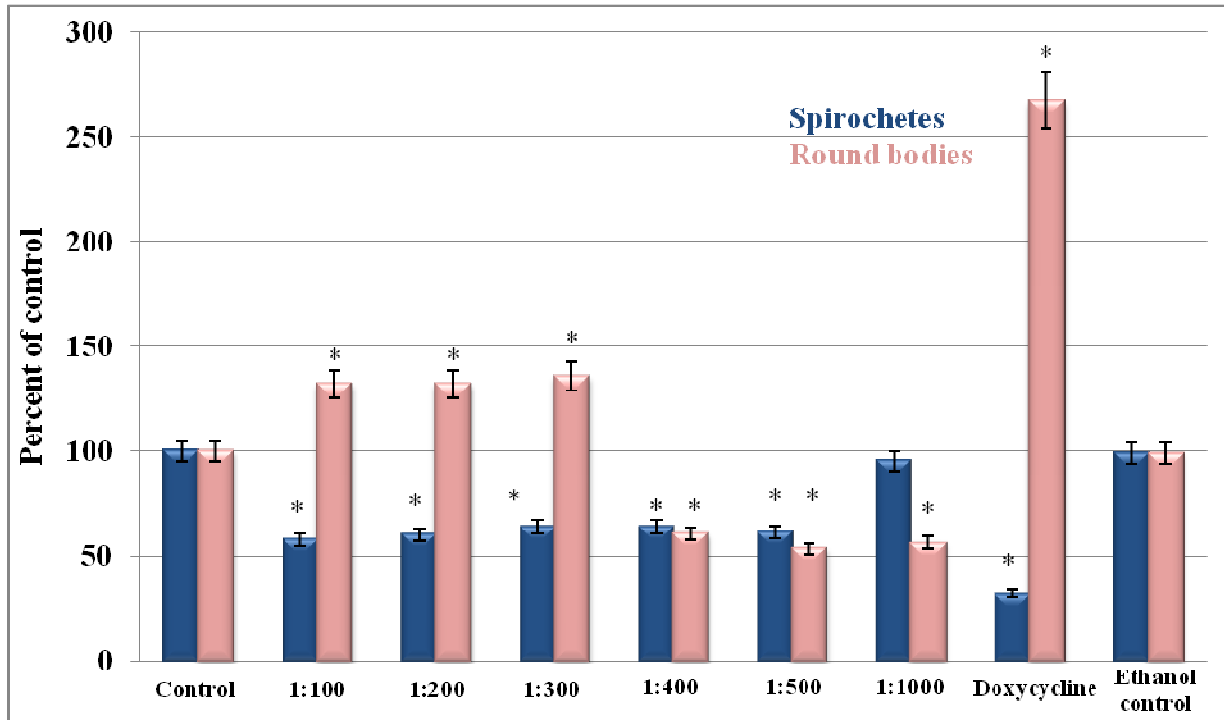


Figure 1B

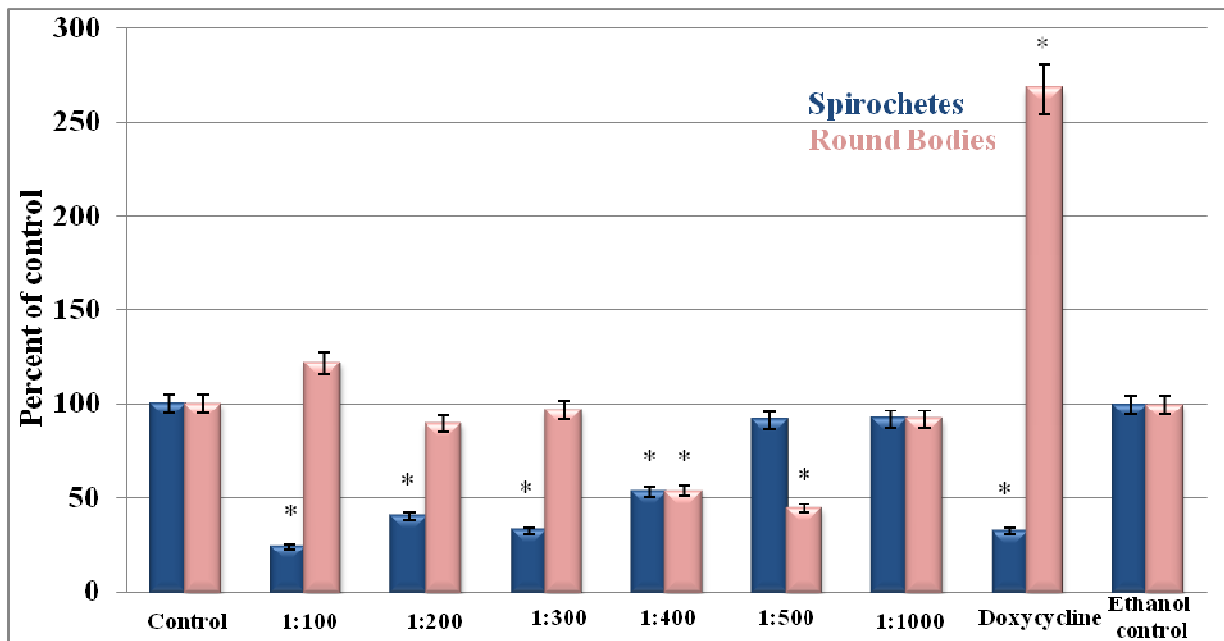


Figure 1C

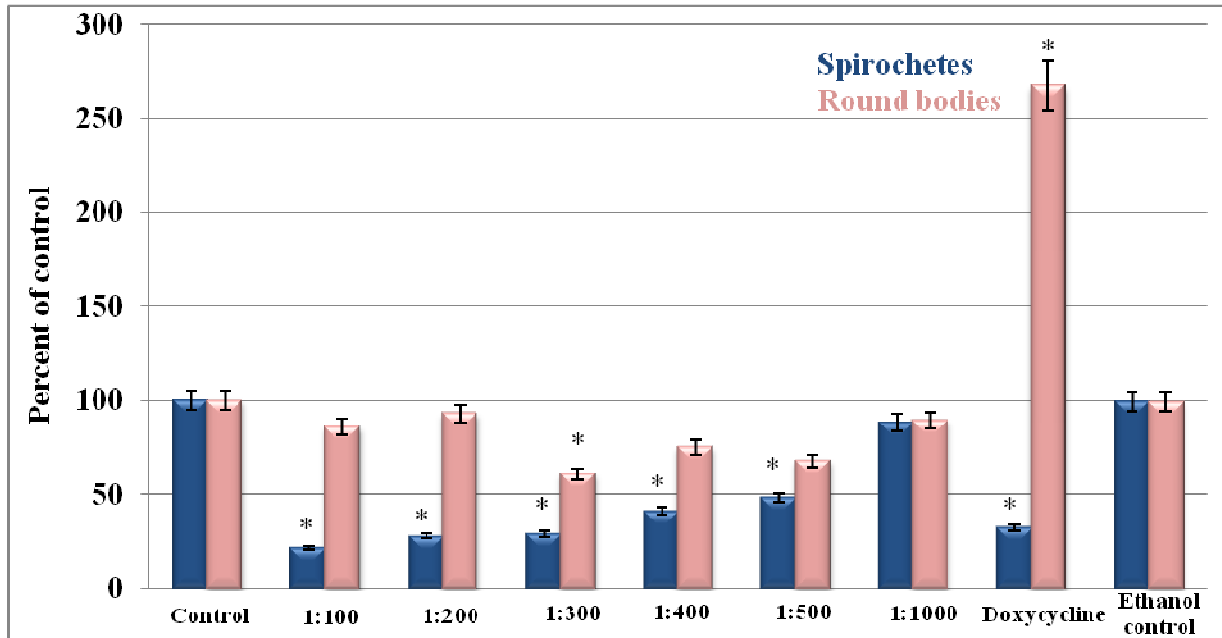


Figure 1: The *in vitro* susceptibility of the spirochete and round body forms of the B31 *Borrelia burgdorferi* to Samento and Banderol extracts and to Doxycycline (250µg/ml) for 96 hours treatment period using direct cell counting and dark-field morphological evaluation methods. **Panel A: Samento extract; Panel B: Banderol extract; and Panel C Samento + Banderol extracts.** As a negative control, 0.25% ethanol was used. *P- values >0.05 indicates statistical significance.

Figure 2

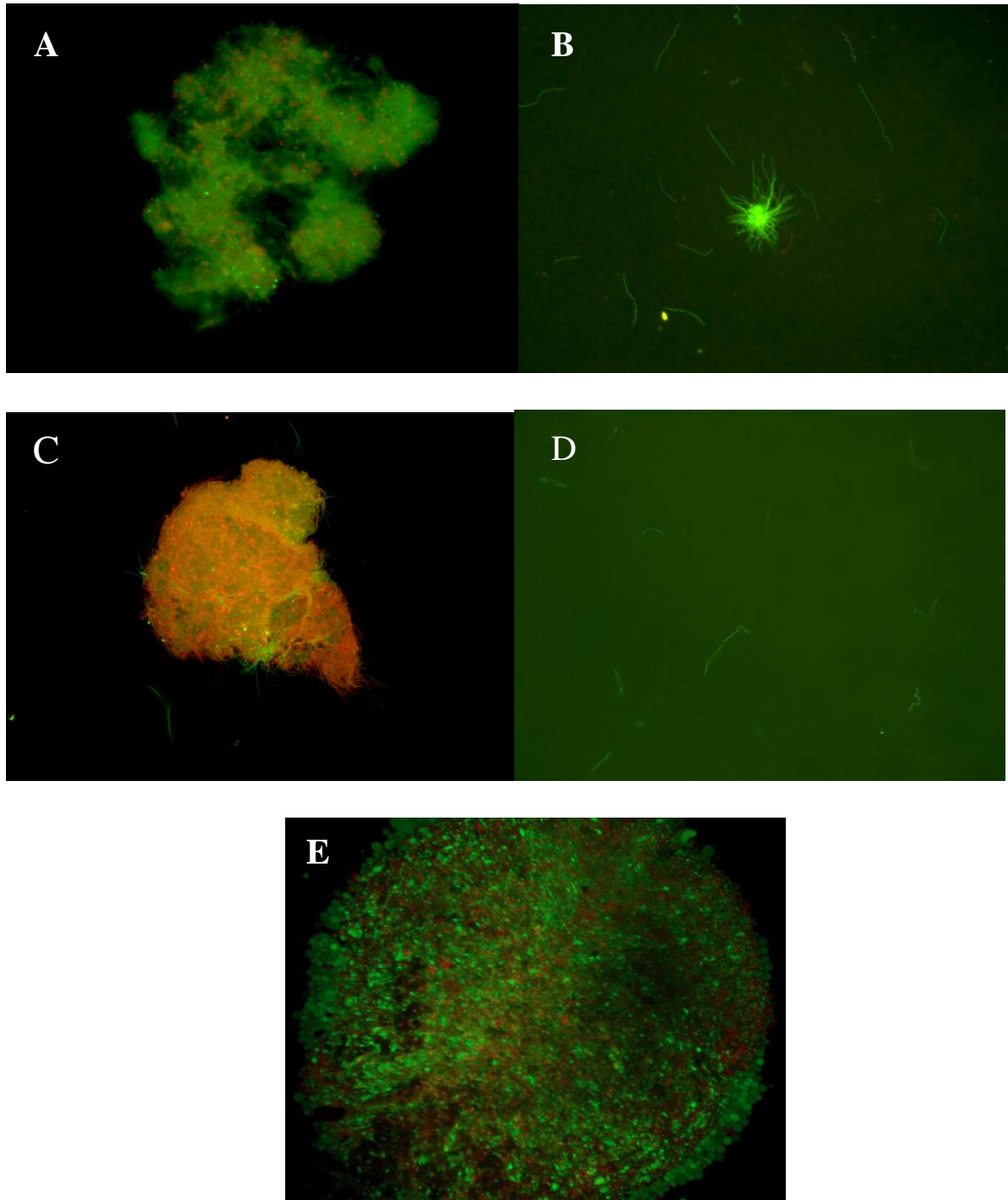


Figure 2: BacLight viability staining of B31 strain of *Borrelia burgdorferi* after 96 hour treatment using SYTO® 9 green-fluorescent nucleic acid stain (LIVE CELLS) and propidium iodide, a red-fluorescent nucleic acid stain (DEAD CELLS). A: Control; B: Samento (1:300 dilution); C: Banderol (1:300 dilution); D: Samento +Banderol (1:300 dilution); E: Doxycycline (250 µg/ml). All images are taken at 40X magnification.