

بررسی اثر فتوتوکسیک عصاره گیاه هوفاریقون بر Enterococcus Faecalis، Staphylococcus Aureus و Escherichia Coli

نسیم کاشف^۱

یاسمن سادات برقی^۲

غلامرضا اسماعیلی جاوید^۳

خلاصه

مقدمه: عصاره گیاه هوفاریقون با نام علمی Hypericum Perforatum L. به عنوان یک حساس گر نوری جدید برای درمان فتودینامیکی در چندین مطالعه آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفته است. اما، چنین به نظر می رسد که فعالیت فتوتوکسیک این عصاره تاکنون به شکل مستقل بر روی باکتری‌ها مطالعه نشده است. لذا، هدف از این پژوهش بررسی اثر فتوتوکسیک عصاره گیاه Hypericum Perforatum (به شکل قطره خوراکی هایپیران) بر سویه‌های استاندارد Enterococcus Faecalis (ATCC 11700)، Staphylococcus Aureus و Escherichia Coli (ATCC 25922) در حالت پلانکتونیک بود.

روش بررسی: اثر غلظت‌های غیر توکسیک عصاره هوفاریقون به عنوان حساس گر نوری (۱۰۰ برابر، ۲۰۰ برابر، ۵۰۰ برابر رقیق شده) در زمان تابش ۵ دقیقه بر فعالیت فتوتوکسیک این عصاره بر روی باکتری‌های مورد نظر بررسی شد.

یافته‌ها: حساس‌سازی نوری عصاره (در رقت ۱/۱۰۰) با استفاده از نور نارنجی LED (۲۴J/cm²) قادر به کاهش $5-4 \log_{10}$ در تعداد باکتری‌های مورد آزمون بود.

نتیجه‌گیری: مطالعه حاضر نشان داد این عصاره می‌تواند به عنوان یک حساس گر نوری جدید و مؤثر برای فتودینامیک‌تراپی ضد میکروبی در شرایط آزمایشگاهی مطرح باشد. مطالعات بیشتری نیاز است تا اثر فتوتوکسیک این عصاره در کشت سلول، مدل حیوانی و در نهایت در بالین بررسی شود.

واژه‌های کلیدی: فتودینامیک‌تراپی ضد میکروبی، باکتری‌ها، عصاره گیاه Hypericum Perforatum

۱. استادیار باکتری‌شناسی پزشکی، بخش میکروبیولوژی، دانشکده زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

۲. کارشناس ارشد میکروبیولوژی، بخش میکروبیولوژی، دانشکده زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

۳. مربی پژوهش، مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی جهاد دانشگاهی، واحد علوم پزشکی تهران.

نویسنده مسئول: نسیم کاشف، تلفن ۶۱۱۱۳۵۵۸
پست الکترونیک: kashfn@khayam.ut.ac.ir

مقدمه

هوفاریقون، علف چای، هزارچشم یا گل راعی با نام علمی *Hypericum Perforatum L.* و اسامی انگلیسی، *Amber, Klamath weed, Goat weed, St. John's wort, Tipton weed* و *Hardhay* یک گیاه دارویی ارزشمند از خانواده *Clusiaceae* یا *Hypericaceae* است. استفاده از این گونه به عنوان یک داروی گیاهی، بخصوص برای درمان افسردگی در چند سال اخیر به طور قابل توجهی افزایش یافته است. تجارت هوفاریقون حدود ۵۷۰ میلیون دلار در سراسر دنیا است که این مطلب خود مؤید ارزشمند بودن این گیاه است [۱]. ترکیبات مؤثر بیولوژیک مختلفی در این گیاه وجود دارد اما، اجزای مؤثر اصلی آن شامل هیپرفورین و هایپریسین است [۲].

عصاره این گیاه به عنوان یک حساس گر نوری جدید برای درمان فتودینامیکی در چندین مطالعه آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفته است:

Skalkos و همکاران خصوصیات فتوفیزیکی عصاره های *Hypericum Perforatum L.* را به عنوان یک حساس گر نوری جدید برای درمان فتودینامیکی معرفی کردند. مطالعه این محققان نشان داد عصاره های این گیاه حاوی انواع ترکیبات حساس به نور هستند (همانند مشتقات نفتودی آنترون و کلروفیل). این ترکیبات به دنبال تابش نور فعال می شوند و خصوصیات فتودینامیکی از خود بروز می دهند که می توانند به عنوان یک کلاس جدید و طبیعی از حساس گرهای نوری برای استفاده در درمان فتودینامیکی و تشخیص فتودینامیکی مطرح باشند. طیف جذبی این عصاره ها مشابه با طیف هایپریسین (مهم ترین نفتودی آنترون شناخته شده در آن ها) است [۳]. کارآیی عصاره این گیاه به عنوان یک عامل فتوتوکسیک علیه کارسینوم مثانه نیز در شرایط آزمایشگاهی بررسی شده است. فتوسایتوتوکسیسیته قابل ملاحظه، فراوانی طبیعی، تهیه آسان و ارزان نشان می دهد که این عصاره می تواند به عنوان یک حساس گر نوری جدید و مؤثر برای درمان فتودینامیکی باشد [۴]. مطالعه Yermak و همکاران در سال ۲۰۱۰، ارزیابی کارآیی *Hyperflav* به عنوان یک حساس گر نوری برای درمان فتودینامیکی بود. *Hyperflav* یک عصاره تخلیص شده از *Hypericum* است که به منظور تشخیص فتودینامیکی طراحی شده است. نتایج این مطالعه نشان داد *Hyperflav* در شرایط آزمایشگاهی، فعالیت فتودینامیکی بر کشت سلول های سرطانی دارد و بنابراین می تواند به عنوان یک حساس گر نوری در آینده مطرح باشد [۵]. چنین به نظر می رسد که اثرهای فتوتوکسیک عصاره گیاه *Hypericum Perforatum L.* در شرایط آزمایشگاهی ناشی از هایپریسین، سودوهایپریسین و هایپرفورین است [۶]. عصاره این گیاه در دو مطالعه بالینی نیز به کار برده شده است:

Batista و *Tardivo* در سال ۲۰۰۹، پروتکل های فتودینامیک تراپی

ضد میکروبی را (با استفاده از رنگ های فنوتیازینیوم و عصاره گیاه *Hypericum Perforatum L.*) برای زخم پای بیماران دیابتی مبتلا به استئومیلیت به کار بردند. رادیوگرام های این بیماران نشان داد که استخوان با هر دو پروتکل درمانی، التیام یافته است [۷]. کاربرد بالینی فتودینامیک درمانی موضعی برای لژیون های هرپس سیمپلکس در *Sao Paulo* با استفاده از حساس گرهای نوری غیر توکسیکی چون متیلن بلو و عصاره گیاه *Hypericum Perforatum* نیز مؤثر واقع شده است [۸].

باتوجه به مطالعات گذشته چنین به نظر می رسد که فعالیت فتوتوکسیک این عصاره تاکنون به شکل مستقل بر روی باکتری ها مطالعه نشده است. لذا هدف از این پژوهش بررسی اثر فتوتوکسیک عصاره گیاه *Hypericum Perforatum* (به شکل قطره خوراکی هایپیران) بر سویه های استاندارد، *Enterococcus Faecalis* (ATCC 11700) و *Escherichia Coli* (ATCC 25922) در حالت پلانکتونیک بود.

روش بررسی

سویه باکتری: سویه های *Enterococcus Faecalis* (ATCC 11700)، *Escherichia Coli* (ATCC 25922) و *Staphylococcus Aureus* (ATCC 25923) به عنوان سویه های مرجع از شرکت پادتن طب تهیه شدند.

عصاره گیاه هوفاریقون حاوی ۰/۱ mg/ml هایپریسین به صورت آماده از شرکت دارویی پورسینا خریداری شد (قطره خوراکی هایپیران). محلول با فیلتراسیون، استریل و در تاریکی نگهداری شد. برای تابش به نمونه های حاوی عصاره هوفاریقون و نمونه های کنترل از ردیف های دیودی منتشرکننده نور (LED نارنجی، ۵۹۰ نانومتر) با توان 80 mW/cm^2 استفاده شد.

باکتری ها روی محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شدند. سپس سوسپانسیونی از باکتری ها در بافر فسفات (تنظیم شده در $\text{pH}=7.4$) مطابق با استاندارد مک فارلند (شماره ۵/۵) تهیه شد (تعداد باکتری ها $10^8 \times 1-2$ CFU/ml). سوسپانسیون باکتری ها با عصاره هوفاریقون در غلظت های غیر کشنده ($100 \times$ و $200 \times$ و $500 \times$ رقیق شده با بافر فسفات، شکل ۱) مجاور شدند و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در تاریکی گرمخانه گذاری شدند. سپس ۲/۰ میلی لیتر از هر نمونه در پلیت ۹۶ خانه، تحت تابش نور نارنجی LED به مدت ۵ دقیقه (24 J/cm^2) قرار گرفت. برای حفظ شرایط استریل، در پلیت در زمان تابش دهی بسته بود. پس از تهیه رقت های سریال ۱۰ تایی از هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر بر روی محیط نوترینت آگار برده شد. پلیت ها به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شدند. سپس تعداد کلونی های رشد کرده

بر سطح محیط شمارش شد (تمام آزمون‌ها سه مرتبه تکرار شدند).

گروه‌های کنترل در این آزمایش عبارت‌اند از: گروه فاقد عصاره و بدون تابش نور (L-P-)، گروه حاوی عصاره و بدون تابش نور (L-P+) و گروه تابش نور بدون وجود عصاره هوفاریقون (L+P-) (به جای عصاره هوفاریقون از بافر فسفات استفاده شد).

گیاه در تاریکی به تنهایی در مقایسه با گروه کنترل هیچ اثر سمی روی ارگانسیم‌های مورد بررسی نداشتند. همچنین دوز نوری به تنهایی قادر به اثر باکتری کشی نبود.

بحث و نتیجه‌گیری

عصاره‌های گیاه *Hypericum Perforatum* مدت‌های مدید برای درمان افسردگی به کار برده شده است. برخلاف پتانسیل درمانی بالای این گیاه گاهی اوقات مصرف خوراکی آن، پاسخ‌های فتوتوکسیک پوستی را به دنبال دارد. به همین خاطر برخی مطالعات برای شناسایی فتوتوکسین‌های اصلی عصاره این گیاه انجام شده است [۶]. نتایج این مطالعات نشان می‌دهد که هایپریسین، سودوهایپریسین و هایپرفورین می‌توانند مسئول آثار فتوتوکسیک عصاره این گیاه در شرایط آزمایشگاهی باشند [۶].



شکل ۱: رقیق کردن عصاره هوفاریقون با بافر فسفات

اثر ضد میکروبی عصاره این گیاه در چندین مطالعه بررسی شده است [۹-۱۱] اما، فعالیت فتوتوکسیک این عصاره تاکنون به شکل مستقل بر روی باکتری‌ها مطالعه نشده است. در مطالعه حاضر، اثر کشندگی فتودینامیک‌تراپی ضد میکروبی با واسطه عصاره گیاه *Hypericum Perforatum* در *S.aureus* (ATCC 25922) و *E.coli* (ATCC 25922) و *E.faecalis* (ATCC 11700) در رقت‌های مختلف عصاره به عنوان یک محلول حاوی عامل حساس‌گر نوری و پرتودهی با

آنالیز آماری

مقادیر به صورت انحراف معیار \pm میانگین بیان شدند. مقایسه بین میانگین گروه‌های مختلف با استفاده از آزمون One-Way ANOVA بررسی گردید. مقادیر $P < 0.05$ از لحاظ آماری معنی دار تلقی شدند.

جدول ۱: اثر کشندگی فتودینامیک‌تراپی ضد میکروبی با واسطه عصاره گیاه *Hypericum Perforatum* در *S.aureus* (ATCC 25923) و *E.coli* (ATCC 25922) و *E.faecalis* (ATCC 11700) در رقت‌های مختلف عصاره و زمان تابش ۵ دقیقه منبع نوری

	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (CFU/ml)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 (CFU/ml)	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 11700 (CFU/ml)
گروه شاهد (L-P-)	$1.2 \times 10^7 \pm 0.1$	$2.2 \times 10^7 \pm 0.1$	$1 \times 10^7 \pm 0.8$
گروه آزمایش (L+P+ _{1/100})	$2.6 \times 10^2 \pm 0.4$	$2.8 \times 10^2 \pm 0.1$	$0.5 \times 10^2 \pm 0.3$
گروه آزمایش (L+P+ _{1/200})	$2.5 \times 10^2 \pm 0.3$	$3.6 \times 10^2 \pm 1.1$	$0.2 \times 10^2 \pm 0.2$
گروه آزمایش (L+P+ _{1/500})	$2.8 \times 10^2 \pm 1.2$	$1.5 \times 10^3 \pm 0.5$	$2.3 \times 10^2 \pm 0.5$

نور نارنجی LED بررسی شد. مطالعه ما نشان داد که فتودینامیک‌تراپی ضد میکروبی با عصاره هوفاریقون در غلظت‌های غیرکشنده به شکل کارآمدی باعث کشته شدن هر سه گونه باکتریایی شده است. برطبق توصیه‌های سازمان غذا و داروی آمریکا برای بیان اثر ضد باکتریایی یک درمان اختصاصی کاهش حداقل \log_{10} ۳ در تعداد باکتری‌ها ضروری است [۱۲]. با توجه به آنکه نتایج این مطالعه کاهش \log_{10} ۴-۵ در تعداد باکتری‌های مورد آزمون را نشان می‌دهد، اثر فتوتوکسیک این عصاره در مورد باکتری‌های فوق، کشنده تلقی می‌گردد.

مطالعات مختلفی اثر فتوتوکسیک هایپریسین را بر میکروارگانسیم‌ها بررسی کرده‌اند [۲۲-۱۳]. در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۲، با بررسی اثر حساس‌گر نوری هایپریسین در غلظت‌های (۰-۴۰ μ M) و دوز نوری

یافته‌ها

جدول ۱ اثر کشندگی فتودینامیک‌تراپی ضد میکروبی *E.coli* (ATCC 25922) و *S.aureus* (ATCC 25923) و *E.faecalis* (ATCC 11700) را با استفاده از عصاره گیاه *Hypericum Perforatum* در رقت‌های مختلف و دوز نوری 24 J/cm^2 نشان می‌دهد. حساس‌سازی نوری عصاره (در رقت ۱/۱۰۰) با استفاده از نور نارنجی LED (24 J/cm^2) قادر به کاهش \log_{10} ۴-۵ در تعداد باکتری‌های مورد آزمون بود. رقت‌های ۱/۲۰۰ و ۱/۵۰۰ از عصاره نیز در حضور منبع نور کاهش قابل ملاحظه‌ای در تعداد باکتری‌های سوسپانسیون اولیه در مقایسه با گروه کنترل نشان دادند ($P < 0.05$). رقت‌های مختلف عصاره این

تشکر و قدردانی

با تشکر از حمایت‌های دانشگاه تهران و مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران.

($5-30 \text{ J/cm}^2$) مشخص شد غیرفعال‌سازی فتودینامیکی قادر به کاهش بیش از $6 \log$ در تعداد باکتری‌های سویه حساس به متی‌سیلین و مقاوم به متی‌سیلین *Staphylococcus Aureus* بود [۱۶]. در مطالعه دیگر در سال ۲۰۱۴، جهت بررسی اثر فتوتوکسیک هایپریسین بر روی گونه‌های *Candida* از غلظت‌های مختلف هایپریسین ($40 \mu\text{M}$ و $2/50$ ، $1/25$ ، $0/625$) و منبع نوری لامپ LED با دوز نوری 18 J/cm^2 استفاده شد. غیرفعال‌سازی فتودینامیکی در این شرایط قادر به کاهش $6 \log$ در مورد *Candida Krusei* و *Candida Parapsilosis* بود [۱۴]. در سال ۲۰۱۰، انگل‌هارت و همکاران اثر غیرفعال‌سازی فتودینامیکی هایپریسین محلول در آب را بر روی یک سویه از *S. aureus* بررسی کردند که در حضور 100 nM هایپریسین و 30 دقیقه زمان تابش (75 mW/cm^2)، تعداد باکتری‌ها $4-5 \log$ کاهش یافتند. همچنین مشخص شد در غیاب نور هیچ اثر کشندگی بر روی سویه مورد نظر وجود نداشت [۱۸]. در سال ۲۰۰۹، لوتی و همکاران اثر فتوتوکسیسیته هایپریسین را بر روی باکتری‌های عامل پوسیدگی دندان *Streptococcus Sobrinus* و *S. mutans* مطالعه کردند. در این بررسی در حضور $2/5 \mu\text{g/ml}$ هایپریسین و 120 ثانیه تابش، باکتری‌های *S. sobrinus* به‌طور کامل (100 درصد) از بین رفتند در حالی که بر روی سویه‌های *S. mutans* هیچ اثر کشندگی مشاهده نشد [۲۰]. جانکوسکی و همکاران اثر فتوتوکسیک هایپریسین را بر روی سویه‌های باکتری‌های گرم منفی *E. coli* k_{12} و *Shigella* مطالعه کردند که در میان همه سویه‌ها کمتر از $1 \log$ کاهش مشاهده شد [۲۱]. در مطالعه پیشین ما نیز که اثر فتوتوکسیک هایپریسین (غلظت $1 \mu\text{g/ml}$ ، دوز نوری 48 J/cm^2) بر روی *E. coli* (ATCC 25922)، *S. aureus* (ATCC 25923) و *E. faecalis* (ATCC 11700) بررسی شد، کاهش $6-7 \log_{10}$ در تعداد باکتری‌های مورد آزمون مشاهده شد [۲۲].

با توجه به نتایج مشابه برای اثر فتوتوکسیک هایپریسین و عصاره هوفاریقون همچنین فراوانی طبیعی، تهیه آسان و ارزان عصاره، این عصاره می‌تواند به‌عنوان یک حساس‌گر نوری جدید و مؤثر برای فتودینامیک‌تراپی ضد میکروبی مطرح باشد. مطالعات بیشتری نیاز است تا اثر فتوتوکسیک این عصاره در کشت سلول، مدل حیوانی و در نهایت در بالین بررسی شود.

References:

1. Naghdi-Badi H, Amin G, Malekizade-Tafti M. An overview on *Hypericum perforatum* L. *Journal of Medicinal Plants* 1995; 16:1-14.
2. Saddiqe Z, Naeem I, Maimoona A. A review of the antibacterial activity of *Hypericum perforatum* L. *Journal of Ethnopharmacology* 2010; 131: 511–21.
3. Skalkos D, Gioti E, Stalikas CD, Meyer H, Papazoglou TG, Filippidis G. Photophysical properties of *Hypericum perforatum* L. extracts - novel photosensitizers for PDT. *J Photochem Photobiol B*. 2006; 82(2): 146-51.
4. Stavropoulos NE, Kim A, Nseyo UU, Tsimaris I, Chung TD, Miller TA, Redlak M, Nseyo UO, Skalkos D. *Hypericum perforatum* L. extract - novel photosensitizer against human bladder cancer cells. *J Photochem Photobiol B*. 2006; 84: 64-94.
5. Yermak PV, Gamaleia NF, Shalamay AS, Saienko TV, Kholin VV. Hyperflav-perspective photosensitizer for PDT: cell studies. *Exp Oncol*. 2010; 32(4): 233-6.
6. Onoue S, Seto Y, Ochi M, Inoue R, Ito H, Hatano T, Yamada S. In vitro photochemical and phototoxicological characterization of major constituents in St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) extracts. *Phytochemistry*. 2011; 72(14-15): 1814-20.
7. Tardivo JP, Baptista MS. Treatment of osteomyelitis in the feet of diabetic patients by photodynamic antimicrobial chemotherapy. *Photomed Laser Surg*. 2009; 27(1): 145-50.
8. Tardivo JP, Wainwright M, Baptista MS. Local clinical phototreatment of herpes infection in São Paulo. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2012; 9(2): 118-21.
9. Mortensen T, Shen S, Shen F, Walsh MK, Sims RC, Miller CD. Investigating the effectiveness of St John's wort herb as an antimicrobial agent against mycobacteria. *Phytother Res*. 2012; 26(9): 1327-33.
10. Avato P, Raffo F, Guglielmi G, Vitali C, Rosato A. Extracts from St John's Wort and their antimicrobial activity. *Phytother Res*. 2004; 18(3): 230-2.
11. Hübner AT. Treatment with *Hypericum perforatum* L. does not trigger decreased resistance in *Staphylococcus aureus* against antibiotics and hyperforin. *Phytomedicine*. 2003; 10(2-3): 206-8.
12. Boyce JM, Pittet D. Guideline for hand hygiene in health-care settings. Recommendations of the healthcare infection control practices advisory committee and the HIPAC/SHEA/APIC/IDSA hand hygiene task force. *American Journal of Infection Control* 2002; 30: 1-46.

- 13.** de MeloWde C, Lee AN, Perussi JR, Hamblin MR. Electroporation enhances antimicrobial photodynamic therapy mediated by the hydrophobic photosensitizer, hypericin. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2013; 10: 647-50.
- 14.** Paz-Cristobal MP, Royo D, Rezusta A, Andrés-Ciriano E, Alejandre MC, Meis JF, Revillo MJ, Aspiroz C, Nonell S, Gilaberte Y. Photodynamic fungicidal efficacy of hypericin and dimethyl methylene blue against azole-resistant *Candida albicans* strains. *Mycoses* 2014; 57: 35-42.
- 15.** Nafee N, Youssef A, El-Gowell H, Asem H, Kandil S. Antibiotic-free nanotherapeutics: hypericin nanoparticles thereof for improved in vitro and in vivo antimicrobial photodynamic therapy and wound healing. *Int J Pharm* 2013; 454: 249-58.
- 16.** Yow CM, Tang HM, Chu ES, Huang Z. Hypericin-mediated photodynamic antimicrobial effect on clinically isolated pathogens. *Photochem Photobiol* 2012; 88: 626-32.
- 17.** Rezusta A, López-Chicón P, Paz-Cristobal MP, Alemany-Ribes M, Royo-Díez D, Agut M, Semino C, Nonell S, Revillo MJ, Aspiroz C, Gilaberte Y. In vitro fungicidal photodynamic effect of hypericin on *Candida* species. *Photochem Photobiol* 2012; 88: 613-9.
- 18.** Engelhardt V, Krammer B, Plaetzer K. Antibacterial photodynamic therapy using water-soluble formulations of hypericin or mTHPC is effective in inactivation of *Staphylococcus aureus*. *Photochem Photobiol Sci* 2010; 9: 365-9.
- 19.** Hager B, Strauss WS, Falk H. Cationic hypericin derivatives as novel agents with photobactericidal activity: synthesis and photodynamic inactivation of *Propionibacterium acnes*. *Photochem Photobiol* 2009; 85: 1201-6.
- 20.** Lüthi M, Besic Gyenge E, Engström M, Bredell M, Grätz K, Walt H, Gmür R, Maake C. Hypericin- and mTHPC-mediated photodynamic therapy for the treatment of cariogenic bacteria. *Med Laser Appl* 2009; 24: 227-36.
- 21.** Jankowski A, Jankowski S, Mirończuk A, Niedbach J. The action of photosensitizers and serum in a bactericidal process. II. The effects of dyes: hypericin, eosin Y and saphranine O. *Pol J Microbiol* 2005; 54: 323-30.
- 22.** Kashef N, Borghei Y, Djavid G. Photodynamic effect of hypericin on the microorganisms and primary human fibroblasts. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2013; 10: 150-5.