

بررسی اثر فتوتوکسیک عصاره گیاه هوفاریقون بر *Enterococcus faecalis*، *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus*

نسیم کاشف^۱

یاسمن سادات برقی^۲

غلامرضا اسماعیلی جاوید^۳

استادیار باکتری‌شناسی پزشکی، بخش میکروبیولوژی، دانشکده زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
آکارشناس ارشد میکروبیولوژی، بخش میکروبیولوژی، دانشکده زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
مرئی پژوهش، مرکز تحقیقات لیزردر پزشکی جهاد دانشگاهی، واحد علوم پزشکی تهران

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

خلاصه

مقدمه: عصاره گیاه هوفاریقون با نام علمی *Hypericum perforatum L.* به‌عنوان یک حساس‌گر نوری جدید برای درمان فتودینامیکی در چندین مطالعه آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفته است. اما، چنین به‌نظر می‌رسد که فعالیت فتوتوکسیک این عصاره تاکنون به‌شکل مستقل بر روی باکتری‌ها مطالعه نشده است. لذا، هدف از این پژوهش بررسی اثر فتوتوکسیک عصاره گیاه *Hypericum perforatum* (به‌شکل قطره خوراکی هایپیران) بر سویه‌های استاندارد *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) و *Enterococcus faecalis* (ATCC 11700) و *Escherichia coli* (ATCC 25922) در حالت پلانکتونیک بود.

روش بررسی: اثر غلظت‌های غیر توکسیک عصاره هوفاریقون به‌عنوان حساس‌گر نوری (۱۰۰ برابر، ۲۰۰ برابر، ۵۰۰ برابر رقیق‌شده) 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 ۴-۵ log₁₀ در تعداد باکتری‌های مورد آزمون بود.

نتیجه‌گیری: مطالعه حاضر نشان داد این عصاره می‌تواند به‌عنوان یک حساس‌گر 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 درنهایت در بالین بررسی شود.

واژه‌های کلیدی: فتودینامیک‌تراپی ضد میکروبی، باکتری‌ها، عصاره گیاه *Hypericum perforatum*

مقدمه

هوفاریقون، علف چای، هزارچشم یا گل راعی با نام علمی *Hypericum perforatum L.* و اسامی انگلیسی، Amber، 'wort Goat weed, St. John's، Klamath weed، Tipton weed و Hardhay یک گیاه دارویی ارزشمند از خانواده Clusiaceae یا Hypericaceae است. استفاده از این گونه به‌عنوان یک داروی گیاهی، بخصوص برای درمان افسردگی در چند سال اخیر به‌طور 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 هایپیرسین است [۲].

عصاره این گیاه به‌عنوان یک حساس‌گر نوری جدید برای درمان فتودینامیکی در چندین مطالعه آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفته است:

Skalkos و همکاران خصوصیات فتوفیزیکی عصاره‌های *Hypericum perforatum L.* را به‌عنوان یک حساس‌گر نوری جدید برای درمان فتودینامیکی معرفی کردند. مطالعه این محققان نشان داد عصاره‌های این گیاه حاوی انواع ترکیبات حساس به نور هستند (همانند مشتقات نفتودی‌آنترون و کلروفیل). این ترکیبات به‌دنبال تابش نور فعال می‌شوند و خصوصیات فتودینامیکی از خود بروز می‌دهند که می‌توانند به‌عنوان یک کلاس جدید و طبیعی از حساس‌گرهای نوری برای

روش بررسی

سویه باکتری: سویه‌های ATCC *Enterococcus faecalis* (ATCC 11700), *Escherichia coli* (ATCC 25922) و *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) به‌عنوان

سویه‌های مرجع از شرکت پادتن طب تهیه شدند.

عصاره گیاه هوفاریقون حاوی 1 mg/ml. هایپرسیسین به‌صورت آماده از شرکت دارویی پورسینا خریداری شد (قطره خوراکی هایپیران). محلول با فیلتراسیون، استریل و در تاریکی نگهداری شد. برای تابش به نمونه‌های حاوی عصاره هوفاریقون و نمونه‌های کنترل از ردیف‌های دیودی منتشرکننده نور (LED نارنجی، ۵۹۰ نانومتر) با توان 8.0 mW/cm^2 استفاده شد.

باکتری‌ها روی محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شدند و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. سپس سوسپانسیونی از باکتری‌ها در بافر فسفات (تنظیم شده در pH=7.4) مطابق با استاندارد مک‌فارلند (شماره ۵) تهیه شد (تعداد باکتری‌ها 10^8 CFU/ml ۱-۲). سوسپانسیون باکتری‌ها با عصاره هوفاریقون در غلظت‌های غیر کشنده ($100 \times$ و $200 \times$ و $500 \times$ رقیق شده با بافر فسفات، شکل ۱) مجاور شدند و به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در تاریکی گرمخانه‌گذاری شدند. سپس ۰/۲ میلی‌لیتر از هر نمونه در پلیت ۹۶‌خانه، تحت تابش نور نارنجی LED به‌مدت ۵ دقیقه (24 J/cm^2) قرار گرفت. برای حفظ شرایط استریل، در پلیت در زمان تابش دهی بسته بود. پس از تهیه رقت‌های سریال ۱۰ تایی از هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر بر روی محیط نوترینت آگار برده شد. پلیت‌ها به‌مدت ۱۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. سپس تعداد کلونی‌های رشد کرده بر سطح محیط شمارش شد (تمام آزمون‌ها سه مرتبه تکرار شدند).

گروه‌های کنترل در این آزمایش عبارت‌انداز: 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-) (به‌جای عصاره هوفاریقون از بافر فسفات استفاده شد).



شکل ۱: رقیق کردن عصاره هوفاریقون با بافر فسفات

استفاده در درمان فتودینامیکی و تشخیص فتودینامیکی مطرح باشند. طیف جذبی این عصاره‌ها مشابه با طیف هایپرسیسین (مهم‌ترین نفتودی‌آنترون شناخته‌شده در آن‌ها) است [۳]. کارایی عصاره این گیاه به‌عنوان یک عامل فتوتوکسیک علیه کارسینوم مثانه نیز در شرایط آزمایشگاهی بررسی شده است. فتوسایتوتوکسیسیته قابل ملاحظه، فراوانی طبیعی، تهیه آسان و ارزان نشان می‌دهد که این عصاره می‌تواند به‌عنوان یک حساس‌گر نوری جدید و مؤثر برای درمان فتودینامیکی باشد [۴]. مطالعه Yermak و همکاران در سال ۲۰۱۰، ارزیابی کارایی Hyperflav به‌عنوان یک حساس‌گر نوری برای درمان فتودینامیکی بود. Hyperflav یک عصاره تخلیص‌شده از Hypericum است که به‌منظور تشخیص فتودینامیکی طراحی شده است. نتایج این مطالعه نشان داد Hyperflav در شرایط آزمایشگاهی، فعالیت فتودینامیکی بر کشت سلول‌های سرطانی دارد و بنابراین می‌تواند به‌عنوان یک حساس‌گر نوری در آینده مطرح باشد [۵]. چنین به‌نظر می‌رسد که اثرهای فتوتوکسیک عصاره گیاه *Hypericum perforatum* L. در شرایط آزمایشگاهی ناشی از هایپرسیسین، سودوهایپرسیسین و هایپرفورین است [۶].

عصاره این گیاه در دو مطالعه بالینی نیز به‌کار برده شده است: Batista و Tardivo در سال ۲۰۰۹، پروتکل‌های فتودینامیک‌تراپی ضد میکروبی را (با استفاده از رنگ‌های فتوتیازینیوم و عصاره گیاه *Hypericum perforatum* L.) برای زخم پای بیماران دیابتی مبتلا به استئومیلیت به‌کار بردند. رادیوگرام‌های این بیماران نشان داد که استخوان با هر دو پروتکل درمانی، التیام یافته است [۷]. کاربرد بالینی فتودینامیک‌درمانی موضعی برای لزیون‌های هرپس‌سیمپلکس در Sao Paulo با استفاده از حساس‌گرهای نوری غیر توکسیکی چون متیلن‌بلو و عصاره گیاه *Hypericum perforatum* نیز مؤثر واقع شده است [۸].

باتوجه به مطالعات گذشته چنین به‌نظر می‌رسد که فعالیت فتوتوکسیک این عصاره تاکنون به‌شکل مستقل بر روی باکتری‌ها مطالعه نشده است. لذا هدف از این پژوهش بررسی اثر فتوتوکسیک عصاره گیاه *Hypericum perforatum* (به‌شکل قطره خوراکی هایپیران) بر سویه‌های استاندارد *Enterococcus faecalis* (ATCC 11700) *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) و *Escherichia coli* (ATCC 25922) در حالت پلانکتونیک بود.

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.

یافته‌ها

جدول ۱ اثر کشندگی فتودینامیک تراپی ضد میکروبی E.coli (ATCC 25922)، S.aureus (ATCC 25923) و E.faecalis (ATCC 11700) را با استفاده از عصاره گیاه Hypericum perforatum در رقت‌های مختلف و دوز نوری

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

	Escherichia coli ATCC 25922 (CFU/ml)	Staphylococcus aureus ATCC 25923 (CFU/ml)	Enterococcus faecalis 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)	$2.8 \times 10^2 \pm 1.2$	$1.5 \times 10^3 \pm 0.5$	$2.3 \times 10^2 \pm 0.5$

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].

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 فتودینامیک تراپی ضد میکروبی با واسطه عصاره گیاه Hypericum perforatum در E.coli (ATCC 25922)، S.aureus (ATCC 25923) و E.faecalis (ATCC 11700) در رقت‌های مختلف عصاره به عنوان یک محلول حاوی عامل حساس‌گر نوری و پرتودهی با نور نرنجی LED بررسی شد. مطالعه ما نشان داد که فتودینامیک تراپی ضد میکروبی با عصاره هوفاریقون در غلظت‌های غیرکشنده به شکل کارآمدی

24 J/cm^2 نشان می‌دهد. حساس‌سازی نوری عصاره (در رقت $1/100$) با استفاده از نور نرنجی LED (24 J/cm^2) قادر به کاهش $4-5 \log_{10}$ در تعداد باکتری‌های مورد آزمون بود. رقت‌های $1/200$ و $1/500$ 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 گیاه در تاریکی به تنهایی در مقایسه با گروه کنترل هیچ اثر سمی روی ارگانیسم‌های مورد بررسی نداشتند. همچنین دوز نوری به تنهایی قادر به اثر باکتری کشی نبود.

باعث کشته شدن هر سه گونه باکتریایی شده است. بر طبق توصیه‌های سازمان غذا و داروی آمریکا برای بیان اثر ضد باکتریایی یک درمان اختصاصی کاهش حداقل $3 \log_{10}$ در تعداد باکتری‌ها ضروری است [۱۲]. با توجه به آنکه نتایج این مطالعه کاهش $4-5 \log_{10}$ 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 میکروارگانیسم‌ها بررسی کرده‌اند [۲۲-۱۳]. در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۲، با بررسی اثر حساس‌گر نوری هایپریسین در غلظت‌های ($40-0 \mu\text{M}$) و دوز نوری ($30-5 \text{ J/cm}^2$) 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 ، $2/50$ ، $1/25$ ، $0/625$) و منبع نوری لامپ LED با دوز نوری 18 J/cm^2 استفاده شد. غیرفعال‌سازی فتودینامیکی در

پیشین ما نیز که اثر فتوتوکسیک هایپریسین (غلظت ۱ μg/ml، دوز نوری ۴۸J/cm²) بر روی *E. coli* (ATCC 25922) و *E. faecalis* (ATCC 25923) و *S. aureus* (ATCC 11700) بررسی شد، کاهش ۶-۷ log₁₀ 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.

تشکر و قدردانی

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

این شرایط قادر به کاهش ۶ log درمورد *Candida parapsilosis* و *Candida krusei* 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 ۱۰۰ nM هایپریسین و ۳۰ دقیقه زمان تابش (۷۵ mW/cm²)، تعداد باکتری‌ها ۴-۵ 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 فتوتوکسیستی هایپریسین را بر روی باکتری‌های عامل پوسیدگی دندان *Streptococcus sobrinus* و *S. mutans* مطالعه کردند. در این بررسی در حضور ۲/۵ μg/ml هایپریسین و ۱۲۰ ثانیه تابش، باکتری‌های *S. sobrinus* به‌طور کامل (۱۰۰ 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* k₁₂ و *Shigella* مطالعه کردند که در میان همه سویه‌ها کمتر از ۱ log کاهش مشاهده شد [۲۱]. در مطالعه

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 Melo Wde 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, Alejandro 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-Gowelli 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, Mirończyk 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. Kashaf N, Borghei Y, Djavid G. Photodynamic effect of hypericin on the microorganisms and primary human fibroblasts. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2013; 10: 150-5.