
Tijana Vujanić

Ispitivanje uticaja svetlosti na antibakterijsko dejstvo ekstrakta kantariona

Cilj ovog rada je bio ispitivanje uticaja svetlosti različitih talasnih dužina na antibakterijsko dejstvo ekstrakta kantariona. Rezultati pokazuju veće antibakterijsko dejstvo za ekstrakte kantariona zračene belom svetlošću i manjim talasnim dužinama (plava i zelena svetlost), dok je manje antibakterijsko dejstvo na većim talasnim dužinama (crvena i žuta svetlost). Takođe, ispostavilo se da antibakterijsko dejstvo ekstrakta zavisi od vremena sa maksimumom između 30-tog i 90-tog minuta.

Uvod

Kantarion (*Hypericum perforatum* L. – Hypericaceae) je lekovita biljka čije etarsko ulje sadrži veliki broj biološki aktivnih jedinjenja. Najaktivnija supstanca je hipericin, policiklični aromatični dion iz grupe hinona. Koncentracija hipericina u biljci zavisi od mnogo faktora i stoga prisustvo hipericina u biljnom materijalu varira. U cvetovima njegova koncentracija se kreće do 0.086% (Scientific Committee on Food). Značajno svojstvo hipericina je da se aktivira ozračivanjem svetlošću vidljivog dela spektra. Ova osobina je osnova njegovog antibakterijskog dejstva, jer pobuđeni hipericin reaguje sa konstitutivnim elementima membrane bakterija i doводи do njenog oštećenja (Lavie *et al.* 1995).

Fotoaktivacija hipericina zavisi od talasne dužine svetlosti koju apsorbuje. Maksimum apsorpcije hipericina je u oblasti od 563–600 nm (Fox *et al.* 1998). Hipericin pokazuje najveću aktivnost nakon ozračivanja svetlošću talasne dužine 591 nm.

Antibakterijski efekat hipericina se ispoljava na Gram pozitivne i Gram negativne bakterije, kao i na viruse (Jayasuriya *et al.* 1989). Gram negativna bakterija *Escherichia coli* se često koristi kao model sistem za ispitivanje antibakterijskog dejstva različitih jedinjenja. Ova bakterija se brzo razmnožava pod standardnim laboratorijskim uslovima, što omogućava lako praćenje rasta bakterijske populacije. Rast bakterijske populacije posmatran tokom vremena predstavlja krivu rasta. Određivanje krive rasta bakterijske kulture daje uvid u dinamiku procesa razmnožavanja bakterija. Prvi korak u ispitivanju antibakterijskog svojstva nekog jedinjenja je poređenje krivih rasta čiste bakterijske kulture i kulture gajene u prisustvu ispitivanog jedinjenja. Jedinjenje sa antibakterijskim dejstvom treba da pokaže inhibitorni efekat na razmnožavanje bakterija naročito u prvih nekoliko deoba kada u kulturi ima najmanje bakterijskih ćelija. U kasnijim fazama razmnožavanja, bakterije, kojih je sve više, prevazilaze ovaj efekat, ali nikada ne dostižu brojnost populacije koju ima čista bakterijska kultura.

Cilj rada je bio ispitivanje uticaja svetlosti na antibakterijsko dejstvo ekstrakta kantariona. Ekstrakt kantariona je zračen belom svetlošću i talasnim dužinama svetlosti koje odgovaraju plavoj, zelenoj, žutoj i crvenoj svetlosti vidljivog dela spektra.

Materijal i metode

Za eksperiment korišćen je svež kantarion sakupljen na obroncima Fruške gore krajem meseca jula 2003. godine. Nakon deset dana od berbe, vršni delovi biljke korišćeni su za pripremu ekstrakta kantariona.

Priprema alkoholnog ekstrakta hipericina. Alkoholni ekstrakt hipericina pripremljen je tako što je 50 g sitno usitnjenih vršnih delova biljke potopljeno u 250 mL 50% alkohola. Nakon 24 sata ekstrakt je proceđen na Bihnerovom levku.

Tijana Vujanić (1985), Novi Sad, Partizanskih baza 19, učenica 3. razreda Gimnazije "Svetozar Marković" u Novom Sadu

Određivanje količine hipericina u ekstraktu kantariona. U 10 mL etanolnog ekstrakta kantariona dodato je 10 mL 0.1 M HCl i 60 mL etil-etra. Nakon mešanja, razdvojeni su slojevi. Ekstrakcija je ponovljena tri puta. Dodato je 10 mL destilovane vode, ponovo su odvojeni slojevi. Nakon odvajanja slojeva dodato je oko 10 mg Na₂SO₄ i ostavljeno 10-15 minuta da odstoji. Ispirano je sa 10-20 mL etil-etra i upareno na rotacionom vakuum uparivaču. Upareni etarski ekstrakt rastvoren je u 100 mL 5% dimetil-sulfoksida (DMSO) i tako pripremljenom rastvoru se određivala apsorbancija na spektrofotometru (Cintra10 UV-Visible) na talasnoj dužini od 591 nm, preko koje se dobila koncentracija hipericina u alkoholnom ekstraktu.

Koncentracija (*c*) hipericina u ekstraktu izračunata je preko Lamber-Berovog zakona:

$$A = b \cdot c \cdot E$$

gde je:

E – molarni apsorpcioni koeficijent
(43700 L cm⁻¹ mol⁻¹),

b – širina kivete (1 cm),

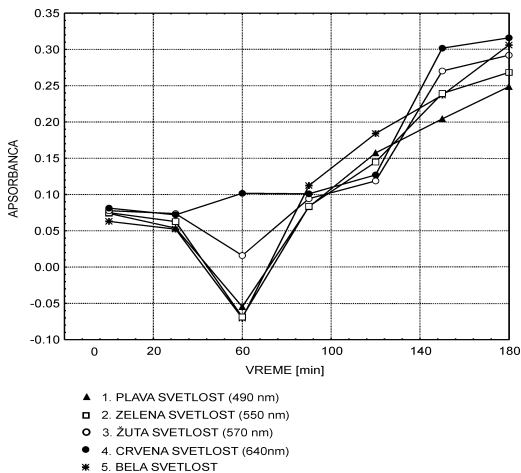
A – apsorbancija.

Zračenje etanolnog ekstrakta kantariona i određivanje krivih rasta bakterija. U erlenmajer sa 50 mL tečne *Luria-Berthrani broth* (LB) podloge dodato je 2.5 mL prekonocne kulture *Escherichia coli* soj NM522. Tako zasejane bakterije razdeljene su u sedam epruveta. Prvi uzorak predstavljao je podlogu sa bakterijama (kontrolna grupa). U ostale uzorke je dodato po 200 mL etanolnog ekstrakta kantariona. U jedan uzorak bakterijske kulture dodat je nezračeni ekstrakt kantariona, a u ostalih pet uzoraka ekstrakti kantariona zračeni belom, plavom, zelenom, žutom i crvenom svetlošću, respektivno. Ekstrakt kantariona u epruvetama je ozračivan sijalicom jačine 6W ispred koje su postavljani filteri kolorimetra (Iskra MA9505): plavi (490 nm), zeleni (550 nm), žuti (570 nm) i crveni (640 nm). Talasne dužine izabranih filtera odgovaraju talasnim dužinama spektra hipericina na kojima se najmanje (640 nm), odnosno posle 591 nm najviše (550 nm) apsorbuje svetlost. Žuti i plavi filter su ograničeni na talasne dužine koje predstavljaju, u odnosu na spektar zelenog (550 nm) filtera, gradualni pad u apsorpciji svetlosti, a u odnosu na crveni (640 nm) porast. Zračeno je i belom svetlošću volframove sijalice. Vreme zračenja ekstrakta bilo je 10 minuta, što predstavlja vreme za fotoaktivaciju hipericina i njegovo pobuđivanje (Meruelo *et al.* 1988).

Rast bakterijske populacije praćen je merenjem optičke gustine na 600 nm svakih 30 minuta tokom 180 minuta. Izmerene apsorbance korišćene su za crtanje krivih rasta. Zbog suviše male razlike među talasnim dužinama na kojima se meri optička gustina bakterija (600 nm) i maksimalna apsorpcija hipericina (591 nm), svaka od navedenih ispitivanih grupa bila je merena u odnosu na sopstvenu slepu probu koja se sastojala od čiste podloge i različito ozračenog, odnosno neozračenog ekstrakta hipericina da bi se eliminisao uticaj hipericina na ukupnu apsorpciju.

Rezultati i diskusija

Koncentracija hipericina u ispitivanom etanolnom ekstraktu kantariona iznosila je 0.0035 mg/mL. Sadržaj hipericina u ispitivanom uzorku je izuzetno mali (Scientific Committee on Food), što se može odraziti na antibakterijsku aktivnost ekstrakta kantariona.

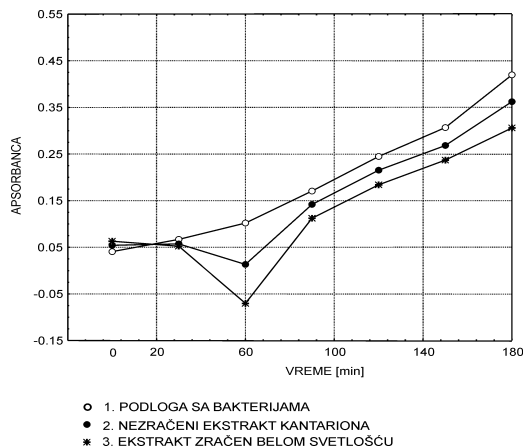


Slika 1.

Krivice rasta bakterija u uzorcima zračenim belom svetlošću i na talasnim dužinama od 490, 550, 570 i 640 nm

Figure 1.

Curved line of bacterial growth of samples radiated with white light and at 490, 550, 570 and 640 nm wavelength of light



Slika 2.

Krive rasta bakterija u samoj podlozi sa bakterijama, u podlozi sa nezračenim ekstraktom kantariona i sa ekstraktom zračenim belom svetlošću

Figure 2.

Curved line of bacterial growth in the presence of pure broth, in the broth mixed with non-radiated extract and extract of St. John's wort radiated with white light

Merenjem apsorbanci uzoraka na 600 nm dobijene su krive rasta za čistu bakterijsku kulturu (poredbena grupa) i za bakterijske kulture gajene u prisustvu ekstrakata kantariona zračenih svetlostima navedenih talasnih dužina (slike 1 i 2).

Vilkoksonov test parova je pokazao da postoji statistički značajna razlika ($p < 0.05$) između krivih rasta bakterijskih kultura sa nezračenim i sa ekstraktom kantariona zračenim belom svetlošću (slika 2). Za poređenje je korišćena kriva rasta čiste bakterijske kulture. Takođe je dobijena statistički značajna razlika kod krivih rasta bakterija gajenih u prisustvu ekstrakata zračenih zelenom i plavom svetlošću, dok kod uzorka zračenog crvenom svetlošću ove razlike nisu uočene.

Ne postoji statistički značajna razlika u jačini antibakterijskog dejstva između ekstrakata kantariona aktiviranog pomenutim talasnim dužinama. Ne može se tvrditi koji deo spektra će zaista uzrokovati najveće, odnosno najmanje antibakterijsko dejstvo hipericina.

Sa grafika se može videti da ekstrakti zračeni svetlošću manjih talasnih dužina (zeleni i plavi) pokazuju značajniju aktivnost od drugih. Ekstrakt

hipericina zračen belom svetlošću ima sličan efekat upravo zbog toga što bela svetlost u sebi sadrži i ove talasne dužine.

Vremenski zavisna kriva rasta bakterija prikazala nam je kontinualan proces rasta bakterija u toku 180 minuta. Sa grafika se može videti da ekstrakti kantariona zračeni talasnim dužinama, koje uzrokuju povećanu aktivnost hipericina, pokazuju najjače antibakterijsko dejstvo u periodu između 30-tog i 90-tog minuta. Nakon naglog pada, koncentracija bakterija se isto tako naglo vraća na početne vrednosti i dalje nastavlja rast. Ovaj rast za sve uzorke dalje ima dinamiku koja približno odgovara rastu čiste bakterijske kulture. Međutim, optička gustina bakterijske kulture u 150. minutu manja je kod kultura gajenih u prisustvu različitih ekstrakata kantariona u odnosu na optičku gustinu čiste bakterijske kulture, što samo ukazuje na to da je hipericin uticao na bakterijsku kulturu smanjivši pritom brojnost bakterija (slika 2).

Zaključak

Sadržaj hipericina u uzorku bio je relativno nizak, ali aktiviran svetlošću određenih talasnih dužina (490 i 550 nm) on je pokazao svoju aktivnost. Rezultati ukazuju da energija aktivacije hipericina, indirektno preko merenja antibakterijskog dejstva, zaista zavisi od talasne dužine svetlosti kojom je ozračen. Razlog tome je verovatno hemijska struktura molekula hipericina, karakter i brojnost dvostrukih veza, koje su potencijalni energetski rezervoari. Pitanje stabilnosti aktivisanog hipericina izlazi iz opsega ovih razmatranja. Ovo potvrđuje i statistički značajna razlika u rezultatima između nezračenog i hipericina zračenog belom svetlošću. Odabrane talasne dužine su reprezentativnog karaktera i odgovaraju osnovnim delovima vidljivog spektra (bela, plava, zelena, žuta i crvena). Sve ovo ukazuje da je fotoaktivacija hipericina uzrokovala povećanje njegove biološke aktivnosti.

Zanimljivo je da su rezultati pokazali značajnu zavisnost rasta bakterija u prisustvu ekstrakta kantariona u određenom vremenskom intervalu. Tokom vremena, u kulturi bakterija vlada dinamički proces stalnog umnožavanja bakterija. Dodavanje ekstrakta kantariona koji je aktiviran deluje tako da naglo ispoljava svoj antibakterijski efekat, koji traje određeno vreme. Posle ovoga bakterije koriste me-

hanizme odbrane kojima uspevaju da prevaziđu novonastali poremećaj sistema, aktivnost hipericina pada, bakterije nastavljaju razmnožavanje. Pravi uvid u vremensku distribuciju ovog procesa mogao bi se dobiti učestalijim praćenjem ovog događaja. Međutim, tehnički uslovi za tako nešto su daleko komplikovaniji.

Zahvalnost. Zahvaljujem se Radici Vasić, diplomiranom biotehologu sa Instituta za lekovito bilje iz Bačkog Petrovca na pomoći na pronalaženju najpodesnijeg načina za ekstrakciju hipericina. Sandri Marković, diplomiranom biohemičaru, i Mariji Raković, učenici Lazarevačke gimnazije, zahvaljujem se na svesrdnoj pomoći prilikom izvođenja eksperimenta.

Literatura

Fox F. E., Niu Z., Tobia A., Rook A. H. 1998. Photoactivated Hypericin is an Anti-Proliferative Agent that induces a high rate of apoptotic death of normal, transformed, and malignant T lymphocytes: Implications for the treatment of cutaneous lymphoproliferative and inflammatory disorders. *Journal of Investigative Dermatology*, **111** (2): 327

Jayasuriya H., McChesney J. D., Swanson S. M., Pezzuto J. M. 1989. Antimicrobial and cytotoxic activity of rottlerin-type compounds from *Hypericum drummondii*. Mississippi: Research Institute of Pharmaceutical Sciences, School of Pharmacy, University of Mississippi, **52**: 325-31

Lavie G., Mazur Y., Lavie D., Meurelo D. 1995. The chemical and the biological properties of hypericin – a compound with a broad spectrum of biological activities. *Medical Research Review*, **15**: 111

Meruelo D., Lavie G., Lavie D. 1988. Therapeutic agents with dramatic antiretroviral activity and little toxicity at effective doses: aromatic polycyclic diones hypericin and pseudohypericin. Proceedings of the USA National Academy of Science, **85**: 5230

Oubre A. Y. Hypericin's antiviral actions. Dostupno na www.lifelinknet.com

Scientific Committee on Food. Dostupno na <http://europa.eu.int>

Tijana Vujanić

Influence of Different Wavelength of Light on the Time-dependent Antibacterial Effect of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) Extract

St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.- Hypericaceae) is one of the most commonly used plants because its extract contains a number of active and healing substances. The most active compound of the extract is hypericin. This is a photodynamic compound with a wide range of biological activities such as antibacterial, antiviral, antidepressant (Oubre, available at www.lifelinknet.com). The activation of hypericin induced by UV and visible light enables the modification in all activities, even antibacterial. Therefore, the aim of this study was to find possible varieties of time dependent antibacterial effect caused by the alterations of wavelengths from the visible light spectrum.

The results have shown that the time optimum for expressing the antibacterial effect exists at all wavelengths with no exception. It could be claimed, with a certain degree of certitude, that there is some difference in the antibacterial effects of extracts depending on the light: the samples radiated with lower wavelengths (blue and green light) and white light show a larger antibacterial effect, while less antibacterial activity is evinced at a higher wavelength of light (red and yellow light).

