Investigating the antibacterial effects of extract and protein fractions isolated from *Adenium obesum* plant in laboratory conditions

Ashkan Hajinourmohammadi[1], Jamil Zargan[2*], Hanieh Jafary[1], Firouz Ebrahimi[3]

1. Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Department of Biology, Faculty of Basic Science, Imam Hossein University, Tehran, Iran
3. Milad Darou Noor Pharmacetical (MDNP) Company, Tehran,Iran

Abstract

Aim and Background: Infectious diseases caused by bacterial agents are one of the most common causes of death worldwide. Many of these agents are resistant to one or more antibiotics, some are multidrug resistant, and others are resistant to almost all commonly used antibiotics. Antimicrobial, anticancer, and antioxidant compounds have been reported from the extracts of different buffers derived from different plant species. In this study, the antibacterial activity of the buffered extract and protein fractions of the buffered extract of *Adenium obesum* were investigated.

Material and Methods: In this research, firstly, the electrophoretic-chromatographic pattern of the buffered plant leaf extract and then the antibacterial properties of the buffered extract in denatured and non-denatured forms of proteins as well as its protein fractions in the required concentrations in terms of micrograms per milliliter in Laboratory conditions (*in-vitro*) were tested using the minimum inhibitory concentration (MIC) assay for Gram-positive *Staphylococcus aureus* and Gram-negative *Escherichia coli* and ANOVA statistical analysis.

Results: Different protein bands were observed in the SDS-PAGE spectrum of crude buffer extract. In the chromatographic study, 12 main peaks were separated and collected, of which 9 fractions contained protein. The results of this study showed that crude buffer extract with undenatured proteins from 0.02 µg/ml and crude buffer extract with denatured proteins from 0.04 µg/ml had a significant inhibitory effect on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The results of this study on the protein fractions of crude buffer extract also showed different effects on the tested bacteria, including the highest inhibition rate of Gram-positive bacteria related to fraction 8 with an average inhibition of 25% at a protein concentration of 0.01 µg/mL and similarly, it was shown in gram-negative bacteria related to fraction 3 with 0.16 µg/mL gelate and fraction 10 with 0.01 µg/mL gelate with an average inhibition of 11 percent.

Conclusion: The results of this study showed for the first time that denatured and non-denatured buffer extract and its protein fractions 3, 8, and 10 have antibacterial properties.

Keywords: *Adenium obesum*, buffer extract, protein fractions, antibacterial effects**.**

Corresponding author:
Department of Basic Science, Imam Hossein, University, Tehran, Iran.
Email: jazrgan@ihu.ac.ir

بررسی اثرات ضد باکتریایی عصاره بافری و فراکسیون‌های پروتئینی جدا شده از گیاه *Adenium obesum* در شرایط آزمایشگاهی

اشکان حاجی نورمحمدی[۱]، جمیل زرگان[۲*]، هانیه جعفری[۱]، فیروز ابراهیمی[۳]

۱. گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. مرکز علم و فناوری زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین علیه السلام، تهران ایران
۳. شرکت دارویی میلاد دارو، واحد۳، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: بیماری های عفونی ناشی از عوامل باکتریایی یکی از شایع ترین علل مرگ و میر در سراسر جهان است. بسیاری از این عوامل به یک یا چند آنتی بیوتیک مقاوم هستند، برخی از آن‌ها به چند دارو مقاوم هستند و برخی دیگر تقریباً به همه آنتی بیوتیک های رایج مقاوم هستند. ترکیبات ضد میکروبی، ضد سرطانی و آنتی اکسیدانی از عصاره‌های مختلف مشتق شده از انواع گونه‌های گیاهی گزارش شده است. در این مطالعه، فعالیت ضد باکتریایی عصاره بافری گیاه *آدنیوم آبسوم* (*Adenium obesum*) و فراکسیون‌های پروتئینی جدا شده از عصاره آن مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق ابتدا الگوی الکتروفورتیک-کروماتوگرافی عصاره بافری برگ گیاه و سپس خواص ضد باکتریایی عصاره بافری در اشکال دناتوره و غیردناتوره شده پروتئین‌ها و همچنین فراکسیون های پروتئینی آن در غلظت‌های مورد نیاز بر حسب میکروگرم در میلی لیتر در شرایط آزمایشگاهی (*in-vitro*) با استفاده از سنجش حداقل غلظت بازدارنده (MIC) برای *استافیلوکوکوس اورئوس* گرم مثبت و *اشریشیا کلی* گرم منفی مورد آزمایش و آنالیز آماری آنوا قرار گرفت.

یافته‌ها: باندهای پروتئینی مختلفی در طیف SDS-PAGE عصاره بافری خام مشاهده شد. در مطالعه کروماتوگرافی، ۱۲ پیک اصلی جدا و جمع آوری شد که ۹ فراکسیون حاوی پروتئین بود. نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره بافری خام با پروتئین های دناتوره نشده از ۰/۰۲ میکروگرم در میلی لیتر و عصاره بافری خام با پروتئن های دناتوره شده از ۰/۰۴ میکروگرم در میلی لیتر اثر مهاری معنی داری بر روی باکتری های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* داشتند. نتایج این مطالعه بر روی فراکسیون های پروتئینی عصاره بافری خام نیز اثرات متفاوتی را بر روی باکتری های مورد آزمایش نشان داد، از جمله بالاترین میزان مهار باکتری گرم مثبت مربوط به فراکسیون ۸ با میانگین مهار ۲۵ درصد در غلظت پروتئینی ۰/۰۱ µg/mL و همین طور در باکتری گرم منفی مربوط به فراکسیون ۳ با غلظت ۰/۱۶ µg/mL و فراکسیون ۱۰ با غلظت ۰/۰۱ µg/m با میانگین مهار ۱۱ درصد است.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه برای اولین بار نشان داد که عصاره بافری دناتوره و غیردناتوره و فراکسیون‌های پروتئینی۳، ۸ و ۱۰ دارای خواص ضد باکتریایی هستند.

واژگان کلیدی: *آدنیوم آبسوم*، عصاره بافری، فراکسیون‌های پروتئینی، اثرات ضد باکتریایی.

مقدمه

نیازهای اخیر برای کشف و توسعه داروها و عوامل درمانی جدید برای درمان یا پیشگیری از بیماری‌های رایج وجود دارد. بیماری‌های عفونی که عمدتاً بعلت عوامل باکتریایی هستند در طول دو دهه گذشته یا بیشتر، بعلت پیشرفت‌های عمده در پزشکی، از جمله پیوند اعضا و مغز استخوان، شیمی‌درمانی، افزایش استفاده از عوامل ضد باکتریایی قوی و وسیع الطیف، باعث افزایش جدی سیستماتیک در میزان عفونت های میکروبی شده است. عفونت های میکروبی یا قارچی به عنوان یکی از دلایل اصلی مرگ و میر در بین بیماران سرطانی و گیرندگان پیوند عضو ظاهر شده است. یکی از مشکلات جدی جامعه پزشکی در درمان بیماری‌های عفونی ناشی از عوامل باکتریایی، مقاوم شدن بسیاری از باکتری‌ها به آنتی بیوتیک‌های رایج است. این باکتری‌ها در حال تبدیل شدن به یک مشکل بالینی جدی در سراسر جهان هستند. این امر سبب توجه مؤسسات داروسازی جهت کشف داروهای ضدباکتری جدید

نویسنده مسئول:
مرکز علم و فناوری زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین علیه السلام، تهران ایران
پست الکترونیکی: jazrgan@ihu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۰۴
تاریخ پذیرش:۱۴۰۲/۰۸/۰۹

یا بهینه سازی آنتی بیوتیک‌های قدیمی جهت دستیابی به تولید داروهای جدید و مؤثر شده است.

ترکیبات گیاهی از جمله عصاره‌های مختلف، اسانس و متابولیت های ثانویه و .... از گذشته تا کنون مورد توجه خاص محققین قرار گرفته اند، زیرا که این ترکیب‌ها ایمن بوده و تاریخچه استفاده طولانی مدتی در طب سنتی و ایرانی برای فرآورده های غذایی و درمان بیماری های عفونی دارند (۱). ترکیبات مشتق شده از گیاهان می‌توانند سبب یافتن داروهای ضد میکروبی جدید با سمیّت کمتر، طیف گسترده‌تر و فارماکوکینتیک مناسب شوند. به نظر می‌رسد فرآورده‌های طبیعی مشتق از گیاهان دارویی منابع جدیدی از عوامل ضد باکتریایی با مکانیسم عملکردی جدید می‌باشند. غربالگری و شناسایی گیاهان می‌تواند منجر به پیدایش ترکیبات فعال جدید در این زمینه شود (۲). *آدنیوم آبسوم(Adenium obesum)* یک گیاه متعلق به خانواده *Apocynaceae* است. این گیاه در زبان محلی به نام "رز صحرا" شناخته می‌شود. این گیاه از منطقه اتیوپی منشا گرفته است اما اکنون در اکثر نقاط جهان به‌عنوان گیاه تزیینی استفاده شده است. این گیاه گلدار است و ارتفاع آن بین ۰/۵ تا ۲ متر است. گیاه به شکل چتری و دارای پوست سبز مایل به خاکستری کم رنگ بوده و برگ‌ها به صورت مارپیچی در انتهای شاخه‌ها قرار گرفته‌اند. برگ‌ها در انتهای شاخه‌ها با هم جمع می‌شوند. به‌طور معمول، شاخه‌ها گوشتی، به صورت مارپیچی، برگ‌های سبز صاف و براق هستند. طول برگ‌ها تقریباً ۲-۴/۵ اینچ است (۳،۴،۵)

پپتیدهای ضد میکروبی (AMPs)[1] گروهی از پپتیدهای کوچک هستند که نقش مهمی در ایمنی ذاتی میزبان در برابر طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها از جمله باکتری‌های (گرم مثبت و گرم منفی)، ویروس‌ها، قارچ‌ها و انگل‌ها دارند. AMP های مشتق شده از گیاه، دارای پپتیدهای غنی از سیستئین با فعالیت ضد میکروبی وسیع الطیف علیه باکتری‌ها، قارچ ها و ویروس ها هستند. این AMP ها بر اساس موتیف‌های سیستئینی و آرایش پل‌های دی سولفیدی و شباهت توالی به خانواده‌های مختلفی طبقه بندی می شوند (۲۳). با توجه به اثرات دارویی و مخصوصا اثرات ضد باکتریایی عصاره‌های مختلف *آدنیوم آبسوم*، این گیاه می‌تواند کاندید مناسبی برای استخراج فراکشن‌های پروتئینی ضد باکتری باشد (۲۹).

هدف از این مطالعه بررسی اثرات ضد باکتریایی عصاره بافری و فراکسیون‌های پروتئینی جدا شده از گیاه *Adenium obesum* برای اولین بار در شرایط آزمایشگاهی است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه به صورت تجربی انجام گرفت. به این صورت که ابتدا اثرات ضد باکتریایی عصاره بافری (با پروتئین‌های دناتوره شده بوسیله حرارت و غیر دناتوره) و سپس فراکسیون های پروتئینی جدا شده از عصاره بافری گیاه *آدنیوم آبسوم* بررسی شد.

تأیید گونه گیاهی

تایید گونه گیاهی توسط هرباریوم پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی با کد" MPH-3194" انجام شد.

عصاره‌گیری

برگ‌های سبز *آدنیوم آبسوم* جدا شده و بلافاصله با آب مقطر سرد شسته و خشک شد. سپس برگ‌ها با همزن خرد و با استفاده از هاون چینی و در شرایط سرد به صورت پودر درآورده شد. ۱۰۰ میلی لیتر بافر استخراج (حاوی ۱۰۰ میلی مولار Tris-HCl ۸/۵pH، ۲۰% گلیسرول و PMSF,1mM) به ۵۰ گرم از پودر برگ ها اضافه شد. مخلوط حاصل به ارلن منتقل شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سلسیوس به آرامی تکان داده شد سپس به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد. مایع رویی به عنوان عصاره بافری خام *آدنیوم آبسوم* به فالکون‌های جدید منتقل شد(۱۹ و۶).

آنالیز باندهای پروتئینی

برای اطمینان از حضور پروتئین‌ها و همچنین تخمین وزن پروتئین‌ها در عصاره بافری گیاه از تکنیک ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE با ولتاژ رانینگ ۱۰۰ ولت استفاده شد (۷).پس از انجام الکتروفورز، ژل با نیترات نقره رنگ آمیزی و حضور انواع پروتئین ها در عصاره بافری اثبات شد.

رسوب پروتئین محلول در عصاره بافری

عصاره بافری گیاه را درون یک بشر ریخته و با چرخش ۱۰۰دور در دقیقه روی استیبر در دمای ۴ درجه سلسیوس قرار داده شد و در مدت ۲۴ ساعت به تدریج به آن نمک سولفات آمونیوم اضافه شد تا به اشباع۷۰ درصد رسید.

[1] Anti-Microbial Peptids

سپس سانتریفیوژ با ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه در درمای ۴ درجه سلسیوس انجام و رسوب حاوی پروتئین جدا شد.

جداسازی فراکسیون‌های پروتئینی عصاره بافری با HPLC

برای جداسازی و جمع‌آوری فراکسیون‌ها عصاره بافری *آدنیوم آبسوم* از ستون تهیه‌ای C-18 (MACHERY-NAGEL Germany SN N22010859) و کروماتوگرافی مایع فاز معکوس با کارایی بالا(RP-HPLC) (Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography) استفاده شد. بدین صورت که، مقداری از رسوب پروتئینی را در ۱ میلی لیتر آب دو بار تقطیر حل نموده و به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سلسیوس سانتریفیوژ گردید. محلول رویی پروتئین سنجی شد (۲ میلی گرم در میلی‌لیتر) و برای جداسازی اجزاء مختلف عصاره بافری مورد استفاده قرار گرفت. برای جداسازی از دو محلول A و B و برنامه شیب خطی حلال مندرج در جدول ۱ استفاده شد .محلول A شامل ۱۰ درصد استونیتریل و ۰/۱ درصد TFA و محلول B از ترکیب ۷۵ درصد استونیتریل و ۰/۱ درصد TFA تشکیل شده بود. پس از شستشوی ستون (جدول۲) نمونه با حجم ۴۰ میکرولیتر (غلظت ۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) از بافر حاوی عصاره بافری به ستون تزریق و فراکسیون ها متناظر با هر پیک در ظروف عاری از هر گونه آلودگی جمع آوری گردید. سپس به دستگاه لیوفیلیزاتور جهت خشک کردن پروتئین انتقال پیدا کرد.

حل کردن فراکسیون‌ها و پروتئین سنجی آن‌ها

با توجه به این که بافر مناسب انتخابی جهت تهیه سوسپانسیون ماده پروتئینی می‌بایست برای باکتری غیر سمی باشد، بر این اساس محلول PBS برای تست ها انتخاب شد. پروتئین سنجی به روش برادفورد (۸) در طول موج ۵۹۵ نانومتر انجام شد و برای تهیه منحنی استاندارد از غلظت‌های مختلف آلبومین سرم گاوی[1] (SIGMA-ALDRICH) استفاده شد. برای جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌ها، لوله‌های محتوی فراکشن‌ها به دمای ۲۰- درجه سیلیسیوس منتقل گردید (۲۷).

جدول ۱- برنامه شیب خطی حلال جهت جداسازی فراکسیون‌هاعصاره بافری گیاه *آدنیوم آبسوم*

زمان (دقیقه)	محلول %A	محلول %B	سرعت جریان(mL/min)
۱	۰	۱۰۰	۰
۱	۰	۱۰۰	۲۵
۱	۱۰۰	۰	۳۵
۱	۱۰۰	۰	۷۰

جدول ۲- برنامه شستشوی ستون کروماتوگرافی

زمان (دقیقه)	محلول %A	محلول %B	سرعت جریان
۱	۱۰۰	۰	۰
۱	۰	۱۰۰	۳۰

باکتری‌های مورد مطالعه

سویه‌های باکتریایی مورد استفاده در این مطالعه باکتریگرم مثبت پاتوژن *استافیلوکوکوس اورئوس Staphylococcus aureus*, ATCC 25923) و گرم منفی غیر بیماری زا اشریشیا کولی(*Escherichia coli*, ATCC 25922) که از مرکز قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران (PTC[2]) خریداری شدند.

مطالعه اثرات ضد باکتریایی

محیط کشت و آنتی بیوتیک

جهت کشت باکتری‌ها و انجام آزمایش‌های ضد باکتریایی از محیط کشت مولر هینتون براث (MH) شرکت Quelab (CatNo.249892) کانادا استفاده شد. بمنظور مقایسه خواص ضد باکتریایی عصاره بافری از تتراسایکلین با غلظت۵۰ میکروگرم در میلی لیتر .Sigma, USA (CatNo: T3258) استفاده گردید.

مطالعه اثرات ضد باکتری با سنجش MIC[3]

در این آزمایش اثرات ضد باکتریایی عصاره بافری به صورت دناتوره و غیر دناتوره پروتئینی و فراکسیون های پروتئینی جدا شده از عصاره بافری با غلظت‌های مختلف بر روی رشد باکتری‌ها با استفاده از پلیت ۹۶ خانه بررسی شد. جهت دناتوره نمودن پروتئین‌های موجود در عصاره بافری، عصاره

[1] BSA
[2] Persian Type Culture Collection
[3] minimum inhibitory concentration assay

۱۰ دقیقه در آب در حال جوشیدن قرار داده شد تا پروتئین‌های موجود در آن از حالت فعال خارج شد و به شکل دناتوره شده در آمد. به منظور انجام این تست ابتدا از باکتری‌ها کشت تازه تهیه شد. پس از تهیه سوسپانسیون باکتریایی با غلظت نیم مک فارلند (CFU/mL ۱۰۸×۱/۵)(۹)، مقدار ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده در چاهک‌ها ریخته شد. سپس از عصاره بافری و فراکسیون‌های پروتئینی با غلظت ۰/۱۶ میکروگرم در میلی لیتر برعلیه باکتری‌های گرم مثبت و منفی به آن‌ها اضافه و با استفاده از محیط کشت مایع (مولر هینتون براث) حجم چاهک‌ها به ۱۰۰ میکرولیتر رسانده شد. در این آزمایش از سوسپانسیون باکتری و محیط کشت به عنوان کنترل منفی، تتراسایکلین(غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) به عنوان کنترل مثبت و محیط کشت فاقد باکتری به عنوان بلانک استفاده گردید. پس از ریختن فراکسیون‌ها در چاهک‌ها و انکوبه کردن به مدت ۲۴-۱۸ ساعت، جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۶۰۵ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (Biotek, USA) اندازه‌گیری شد. آزمایش فوق ۳ مرتبه انجام و در هر مرتبه برای هر فراکسیون ۳ چاهک (۳ تکرار) در نظر گرفته شد و درصد مهاری باکتری‌ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (۲۸):

درصد مهار باکتری =۱۰۰ × [۱- (a/b)]
a = جذب نوری نمونه منهای جذب نوری بلانک
b = جذب نوری کنترل منفی منهای جذب نوری

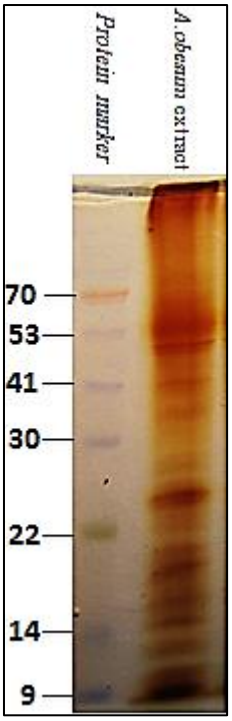
تحلیل آماری

همه آزمون‌ها در سه تکرار انجام شد و نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده است. داده‌ها با استفاده از نرم افزار (Graphpad Prism 8، CA، USA) تجزیه و تحلیل شد. اثر سمیت غلظت‌های مختلف فراکسیون‌های عصاره بافری *A.obesum* با استفاده از آزمون‌های ANOVA یک طرفه با گروه کنترل مقایسه شد.

یافته‌ها

الگوی باندهای پروتئینی

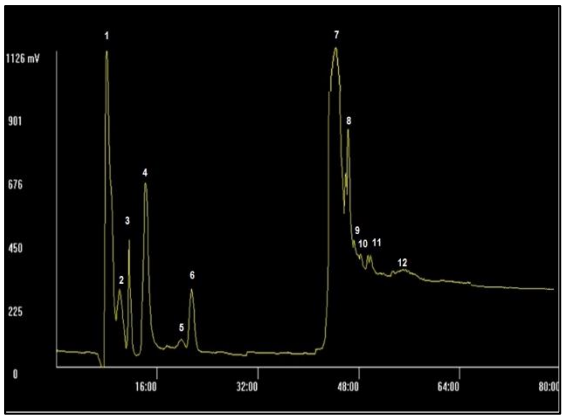
درمطالعه الکتروفورزیس عصاره بافری گیاه *آدنیوم آبسوم* که با استفاده از ژل ۱۲ درصد PAGE-SDS انجام شد، وجود انواع پروتئین‌ها با وزن‌های مولکولی مختلف اثبات شد. (شکل ۱).



شکل ۱- الگوی الکتروفورزی عصاره بافری گیاه *آدنیوم آبسوم* در ژل ۱۲درصد SDS-PAGE. چاهک ۱: استاندارد وزنی پروتئین kDa و چاهک ۲:عصاره بافری *آدنیوم آبسوم*

نتایج مطالعه کروماتوگرافی عصاره بافری و جداسازی فراکشن‌های مرتبط

بر اساس داده‌های دستگاه R-HPLC تعداد ۱۲ فراکسیون جدا شد(شکل ۲). پروتئین سنجی فراکسیون‌ها نشان داد که فراکسیون‌های شماره ۱ ، ۵ و ۶ فاقد پروتئین بوده و بر این اساس در بررسی‌های بعدی مورد توجه قرار گرفته نشد.

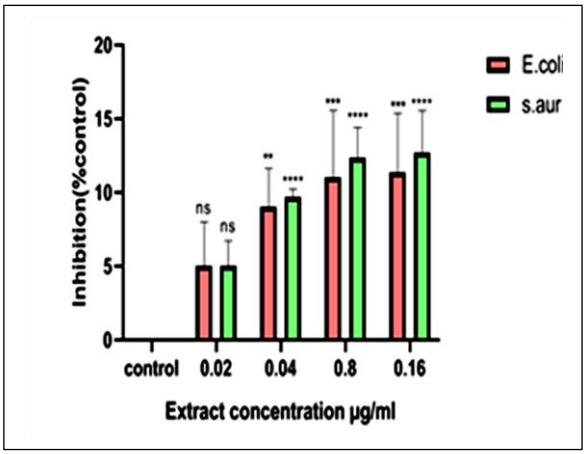


شکل ۲- کروماتوگرام عصاره بافری گیاه *آدنیوم آبسوم* بر اساس نتایج حاصل از R-HPLC.

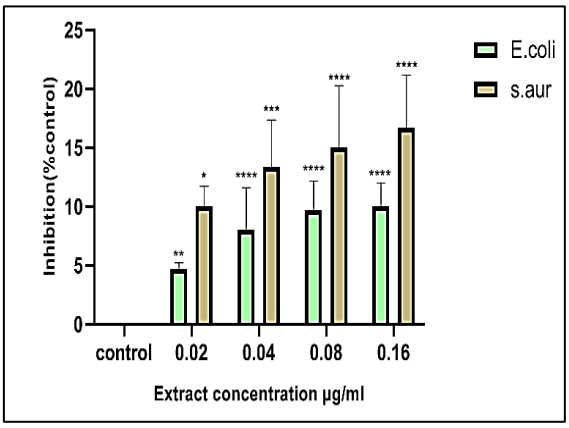
با آشکارساز UV (جذب ۲۲۰ نانومتر) ستون C18 و برنامه خطی گرادیان (بافر A: استونیتریل ۱۰درصد حاوی ۰/۱ درصد TFA و بافر B: استونیتریل ۷۵ درصد حاوی ۰/۱ درصد TFA) جداسازی شد. فراکسیون‌های متناظر با هر پیک به صورت دستی در شیشه‌های عاری از آلودگی جمع آوری شد.

نتایج حداقل غلظت مهاری (سنجش) MIC عصاره بافری دناتوره و غیر دناتوره *آدنیوم آبسوم*

تست حداقل غلظت مهاری در غلظت‌های ۰/۱۶، ۰/۰۸، ۰/۰۴ و ۰/۰۲ میکروگرم در میلی‌لیتر از عصاره بافری با پروتئین دناتوره و غیر دناتوره بر روی دو گونه باکتری گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس*) و گرم منفی (*اشریشیا کولی*) انجام شد. پس از بررسی نتایج مشخص گردید که درصد مهار رشد باکتری *اشریشیاکلی* در حضور غلظت‌های ۰/۱۶، ۰/۰۸، ۰/۰۴ و ۰/۰۲ میکروگرم در میلی‌لیتر از عصاره بافری غیر دناتوره به ترتیب ۱۰، ۹/۶، ۸ و ۴/۶ درصد بوده است(نمودار۲) و نتایج مهار درمورد عصاره بافری دناتوره در غلظت‌های۰/۱۶، ۰/۰۸، ۰/۰۴ و ۰/۰۲ میکروگرم در میلی‌لیتر به ترتیب ۱۱/۳، ۱۱، ۹ و ۵ درصد بوده است که غلظت ۰/۰۲ نسبت به کنترل معنی دار نبود اما دیگر غلظت ها نسبت به کنترل معنی دار بودند(نمودار ۱). این مقادیر در مورد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در غلظت‌های ۰/۱۶، ۰/۰۸، ۰/۰۴ و ۰/۰۲ میکروگرم در میلی‌لیتردر مورد عصاره بافری غیر دناتوره به ترتیب ۱۶/۶، ۱۸/۳، ۱۳/۳ و ۱۰ درصد بوده است و نتایج در مورد عصاره بافری دناتوره به ترتیب ۱۲/۶، ۱۲/۳، ۹/۶ و ۵ درصد بوده است که غلظت ۰/۰۲ نسبت به کنترل معنی دار نبود اما دیگر غلظت ها نسبت به کنترل معنی دار بودند.



نمودار ۱- درصد مهار رشد باکتری *اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس* ($۱/۵\times۱۰^{۸}$ باکتری در هر چاهک) در حضور غلظت‌های۰/۰۲ تا ۰/۱۶ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره بافری دناتوره گیاه *A. obesum* در سنجش MIC. جذب نوری نمونه‌ها در OD 605nm خوانده‌شده و غلظت‌ها نسبت به گروه کنترل منفی ارزیابی شدند ($p<0.0001$: ****).



نمودار ۲- درصد مهار رشد باکتری *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* (۱۰۸×۱/۵ باکتری در هر چاهک) در حضور غلظت‌های۰/۰۲ تا ۰/۱۶ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره بافری غیر دناتوره گیاه*A.obesum* در سنجش MIC. جذب نوری نمونه‌ها در OD 605nm خوانده‌شده و غلظت‌ها نسبت به گروه کنترل منفی ارزیابی شدند (p<0.0001:****).

نتایج حداقل غلظت مهاری (سنجش) MIC فراکسیون های پروتئینی عصاره بافری *آدنیوم آبسوم* بر علیه باکتری های گرم مثبت و گرم منفی

جداسازی فراکشن های مختلف عصاره حاوی پروتئین فعال با RP-HPLC با برنامه ذکر شده و پروتئین سنجی آنها سبب جمع آوری ۹ فراکشن پروتئینی از مجموع ۱۲ فراکشن مختلف بدست آمده از آن بود. در این مطالعه درصد مهار رشد دو گونه باکتری مورد مطالعه پس از تیمار با این فراکشن‌ها در غلظت های ۰/۰۱- ۰/۰۰۰۶ میکروگرم بر میلی لیتر بررسی شد. قابل ذکر است که در غلظت‌های خارج از دامنه ذکر شده اثر ضد باکتریایی دارای سیر نزولی بوده است. نتایج نشان داد که فراکشن شماره ۹ و ۱۱ به‌ترتیب بیشترین اثر ضد باکتریایی را بر *استافیلوکوکوس اورئوس* (باکتری گرم مثبت) و *اشریشیا کولی* (باکتری گرم منفی) را داشته و درصد رشد مهاری آنها در غلظت ۰/۰۱ میکروگرم بر میلی لیتر بترتیب ۲۵ و ۱۱ درصد بوده است. اثرات ضد باکتریایی سایر فراکشن ها در فراکشن‌های ۷، ۱۱ و ۱۲ در غلظت ۰/۰۱- ۰/۰۰۰۶ میکروگرم بر میلی لیتر فاقد اثر مهاری معنادار در مقایسه با کنترل بوده و اثر ضد باکتری بر علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* نداشتند. همچنین فراکشن شماره ۴ در غلظت های ذکر شده اثر مهاری ثابت حدود ۱۰درصد را بر رشد این باکتری از خود نشان داده است.کلیه فراکشن‌های پروتئینی به جز فراکشن شماره ۱۱ بر علیه باکتری‌های گرم منفی *اشریشیا کولی* در مقایسه با کنترل اثرمهاری معنادار از خود نشان نداده‌اند. درصد مهاری رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* پس از تیمار با فراکشن‌های ۲، ۳، ۸، ۹ و ۱۰ در غلظت ۰/۰۱- ۰/۰۰۰۶ میکروگرم بر میلی لیتر با افزایش غلظت پروتئین سیر صعودی داشته است (جدول۳) .

جدول ۳- نتایج میانگین درصد مهاری فراکشن های پروتئینی مستخرج از عصاره گیاه*آدنیوم آبسوم* بر علیه باکتری‌های مورد مطالعه

باکتری	غلظت پروتئین (µg/ml)					فراکشن
	۰/۰۱	۰/۰۰۵	۰/۰۰۲۵	۰/۰۰۱۲	۰/۰۰۰۶	
استافیلوکوکوس اورئوس	۲۰	۱۹	۱۴	۱۴	۸	۲
	۲۰	۲۰	۱۴	۱۳	۸	۳
	۱۷	۱۴	۷	۱۰	۰	۸
	۲۵	۲۴	۱۸	۱۴	۰	۹
	۱۸	۱۵	۱۱	۴	۰	۱۰
اشریشیا کولی	۱۱	۱۰	۹	۵	۰	۱۱

بحث

با توجه به مقاومت برخی از پاتوژن ها به آنتی بیوتیک‌های رایج، درمان عفونت های ناشی از آن‌ها به یک مشکل عمده بهداشت عمومی تبدیل شده است (۱۰). گیاهان حاوی غلظت بالایی از متابولیت‌های ثانویه از جمله تانن‌ها، کینین‌ها، ترپنوئیدها، فنل‌ها و پپتیدهای ضد میکروبی تولید شده توسط سلول‌های گیاهی از طریق مسیرهای متابولیک ناشی از مسیرهای متابولیک اولیه برای تولید یک سیستم دفاعی کارآمد هستند (۱۱ و ۱۹). این متابولیت‌های ثانویه در واکنشی در گیاه برای دفع حشرات، باکتری‌ها و قارچ‌ها تولید می‌شوند. متابولیت‌های ثانویه اثرات متعددی (ضدباکتری‌ها، ضد قارچ و ضد ویروسی) بر علیه پاتوژن‌ها دارند (۱۲). با این حال، آگاهی از اینکه میکروب@ها تمایل کمتری به ایجاد مقاومت در برابر پپتیدهای ضد میکروبی (AMPs)[1] دارند، آن‌ها را برای استفاده محبوب تر کرده‌است (۱۳). پپتیدهای ضد میکروبی (AMPs) مواد کاتیونی هستند که قادر به مهار انتقال پروتئین، کانال‌های یونی یا آنزیم‌ها هستند، به عنوان تنظیم‌کننده هورمون استروئیدی عمل می‌کنند و با DNA و RNA برهم‌کنش می‌کنند (۱۴). AMPها به عنوان پپتیدهای دفاعی میزبان در برابر آفات و پاتوژن‌ها در بسیاری از ارگانیسم‌ها گسترده هستند (۱۵).

در این مطالعه اثرات ضد باکتریایی عصاره بافری خام به صورت دناتوره و غیر دناتوره و فراکسیون‌های پروتئینی گیاه *آدنیوم آبسوم* مطالعه گردید. از نتایج به دست آمده از کروماتوگرافی HPLC عصاره بافری گیاه *آدنیوم آبسوم*، تعداد ۱۲ فراکسیون حاصل شد. نتایج پروتئین سنجی این فراکسیون‌ها نشان داد که از میان۱۲ فراکسیون به دست آمده, فراکسیون‌های مربوط به پیک‌های شماره ۱، ۵ و ۶ فاقد پروتئین بوده‌اند.

آنالیز و تجزیه و تحلیل الکتروفورزی عصاره بافری برگ *آدنیوم آبسوم* توسط Hastutiو همکاران در سال ۲۰۱۰ نشان داد که بر اساس الگوهای الکتروفورزی عصاره بافری این گیاه، محدوده ای بین ۹ تا ۱۲۰کیلودالتون را برای پروتئین‌های موجود در عصاره بافری را نشان داده است (۶). برخی پپتیدها بر باکتری‌های گرم مثبت و برخی بر باکتری‌های گرم منفی مؤثر هستند.

فعالیت اختصاصی برخی پپتیدهای ضد میکروبی ممکن است به دلیل عوامل مختلفی ازجمله تفاوت گونه‌های باکتریایی ازجمله تراکم و ساختار لیپوپلی‌ساکارید در دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی و یا ترکیب لیپیدی غشای سیتوپلاسمی و پتانسیل الکترواستاتیک و بار کلی غشاء در باکتری‌های گرم مثبت باشد (۱۶) با توجه به یافته‌های حاصل از این مطالعه, عصاره بافری گیاه *آدنیوم آبسوم* بصورت دناتوره شده با حرارت و غیر دناتوره شده اثرات ضد باکتریایی وابسته به غلظت برعلیه سویه های باکتریایی گرم مثبت و گرم منفی نشان داد.

در مقایسه بین باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت شاهد بودیم که اثر عصاره بافری دناتوره در باکتری‌های گرم منفی و مثبت تقریبا یکسان است، اما اثر عصاره بافری غیر دناتوره در برابر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی بیشتر است که این موضوع می‌تواند به دلیل ساختار خاص غشا و دیواره سلولی منحصربه فرد باکتری‌های گرم منفی باشد (۱۷) و تفاوت نتایج در عصاره بافری دناتوره و غیر دناتوره می‌تواند به‌علت وجود پپتیدهای فعال در عصاره بافری غیر دناتوره باشد که میزان اثرات ضدباکتری عصاره بافری غیردناتوره نیز بیشتر بود.

این یافته با گزارش فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌های مختلف گیاه *آدنیوم آبسوم* توسط Al Rashdi و همکاران در سال ۲۰۲۱(۱۸)، وSharma همکاران در سال ۲۰۱۷ (۲۰) مورد بررسی قرار گرفته اند منطبق بوده است با این تفاوت که نوع عصاره گیری آن‌ها متفاوت بوده است و بر خلاف این تحقیق از حلال‌های الکلی برای عصاره بافری گیری استفاده نموده اند.

همین‌طور Adamu و همکاران در سال ۲۰۰۵ (۲۴) گزارش کردند که عصاره آبی *آدنیوم آبسوم* دارای پتانسیل ضد باکتریایی قوی در برابر سویه‌های مختلف باکتریایی بیماری‌زای بیمارستانی، یعنی *پروتئوس میرابلیس، سودوموناس ائروژینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کولی* است که با مطالعات حاضر همخوانی داشت.

ضمن اینکه Tijjani و همکاران در سال ۲۰۱۱ (۲۵) بررسی کردند که عصاره‌های متانولی و پترولیوم اتری پوست ساقه گیاه*آدنیوم آبسوم* نیز دارای خاصیت ضد باکتریایی قوی در برابر چندین سویه باکتری‌های گرم منفی بیماری‌زا، *مثل اشریشیا کولی،نایسریا گونوره‌آ و سالمونلا تیفی* هستند که علت تاثیر زیاد ضد باکتریایی آن نسبت به تحقیق حاضر ممکن است بخاطر بافت گیاهی انتخاب شده و حلال‌های الکلی بوده باشد. Sharma و همکاران در سال ۲۰۱۵ (۲۶) نشان دادند که عصاره متانولی برگ *آدنیوم آبسوم* دارای فعالیت ضد باکتریایی در برابر باکتری‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس آمیلولیکوفاسینس*

[1] Anti Microbial peptide

بوده و در برابر باکتری‌های گرم منفی بی اثر است که در مورد باکتری‌های گرم مثبت با مطالعه حاضر همخوانی دارد اما در برابر باکتری‌های گرم منفی، تفاوت می‌تواند به علت یکسان نبودن نوع عصاره‌گیری یا اثر پروتئین‌های فعال عصاره بافری غیر دناتوره پروتئینی بر باکتری‌های گرم منفی که در عصاره متانولی غیر فعال شده است باشد که در نتایج همین تحقیق مشاهده شد که عصاره بافری غیر دناتوره اثر مهاری بیشتری نسبت به عصاره بافری دناتوره شده از خود نشان داده است. شایان ذکر است با توجه به نتایج بدست آمده، اثر عصاره‌ها بر باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی ها است. در این مطالعه برای اولین بار اثرات ضدباکتری فراکسیون‌های پروتئینی جدا شده از عصاره بافری گیاه *آدنیوم آبسوم* مورد بررسی قرار گرفت. در بین ۹ فراکسیون پروتئینی بیشترین تاثیر بر روی باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* را فراکسیون ۹ با ۲۵درصد مهار داشت و همین طور بیشترین مهار علیه باکتری گرم منفی *اشریشیا کولی* توسط فراکسیون ۱۱ با ۱۱درصد مهار ثبت شد. نتایج این تحقیق نشان داد تاثیر فراکسیون‌های پروتئینی روی باکتری های گرم مثبت بیشتر است. همانطور که در مورد عصاره بافری‌ها هم همین طور بود.

نتایج حداقل غلظت مهاری فراکسیون‌ها در باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت دو نوع رفتار باکتری‌ها در مواجهه با فراکسیون‌های پروتئینی را نشان داد. پاسخ باکتری‌ها به برخی فراکسیون‌ها وابسته به دوز و غلظت[1] بود در حالیکه در برخی فراکسیون‌ها این پاسخ ها به صورت[2] غیر وابسته به دوز مانند فراکسیون ۴ و ۷ در اثر باکتری‌های گرم مثبت مشاهده شد. بررسی اطلاعات منتشرشده نشان می‌دهد که گاهی اوقات پاسخ باکتری‌ها به عوامل ضد میکروبی به صورت غیر وابسته به دوز پیش می‌رود که این اثر منحصربه فرد با اثر ایگل[3] قابل توجیه است. اثر ایگل پدیده‌ای را توصیف می‌کند که در آن باکتری‌ها یا قارچ‌ها در معرض غلظت آنتی بیوتیک بالاتر از غلظت باکتری‌کشی بهینه، به نسبت غلظت کشنده بهینه، میزان بقا و زنده مانی را به طور متناقضی بهبود می‌دهند و منجر به کاهش میزان خالص مرگ می‌شوند. با وجود مشاهدات گسترده‌ای که از این اثر در میکروارگانیسم‌های مختلف گزارش شده است, نحوه عملکرد آن به خوبی درک نشده است. اگرچه جنبه‌هایی از اثر ایگل شباهت زیادی به مقاومت دارد, اما شواهد محکمی وجود دارد مبنی بر اینکه این پدیده‌ها, به طور قابل ملاحظه‌ای واکنش فنوتیپی به درمان آنتی‌بیوتیکی هستند (۲۱)

نتیجه‌گیری

برای نتیجه گیری نهایی می‌توان گفت عصاره بافری خام برگ گیاه *آدنیوم آبسوم*، به تنهایی در باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت دارای اثر بازدارنده رشد می‌باشد که این میزان در باکتری‌های گرم مثبت به مراتب بیشتر است. یافته‌های این مطالعه می‌تواند زمینه تحقیقات آینده برای کشف مولکول‌های ضد باکتریایی جدید از عصاره بافری این گیاه را فراهم نماید.

ملاحظات اخلاقی

ندارد.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله اعلام می دارند تعارض منافعی وجود ندارد.

سپاسگزاری

نویسندگان مایلند از مرکز علم و فناوری زیست شناسی دانشگاه جامع امام حسین علیه السلام و واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران برای حمایت از این مطالعه قدردانی کنند. این مقاله مستخرج از پایان نامه دکتری با کد ۱۲۳۴۸۱۷۵۲۵۲۵۹۲۲۱۴۰۰۱۶۲۵۳۷۱۶۶ می باشد.

[1] DOSE-DEPENDENT MANNER
[2] Non-DOSE-DEPENDENT MANNER
[3] The Eagle Effect

منابع

1. Alvarez-Martínez FJ, Barrajón-Catalan E,Encinar JA, Rodríguez-Díaz JC, Micol V. Antimicrobial capacity of plant polyphenols against gram-positive bacteria: A comprehensive review. Current Medicinal Chemistry.2020;27(15): 2606-2576.
2. Atanasov AG, Waltenberger B, PferschyWenzig EM, Linder T, Wawrosch, C, Uhrin P, Temml V, Wang L, Schwaiger S, Heiss EH, Rollinger JM. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. Biotechnology Advances. 2015;33(8): 1614-1582.
3. Al Rashdi RS, Hossain MA, Al Touby SS. Antioxidant and antibacterial activities of leaves crude extracts of Adenium obesum grown in Oman National Botanical Garden. Advances in Biomarker Sciences and Technology. 2021 Jan 1;3:8-14
4. Tijjani A, Ndukwe IG, Ayo RG. Studies on antibacterial activity of Adenium obesum (Apocynaceae) stembark. Continental Journal of Microbiology. 2011;5(1):12-7.
5. Jamil Zargan , Majid Mirzaei Nodushan , Hosein Sobati , Hamidreza Goodarzi , Ashkan Haji Noormohammadi ,Firuz Ebrahimi.In-Vitro Evaluation of Anticancer and Antibacterial Properties of Pseudocerastes Persicus Snake Venom Fractions.Jundishapur journal of medical science. March and April 2022. Volume 21. Number 136.
6. Hastuti DW, Suranto S, Setyono P. Variation of morphology, karyotype and protein band pattern of adenium (Adenium obesum) varieties. Nusantara Bioscience. 2009;1(2)
7. Laemmli VK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the heat of bacteriophage T4. Nature 227: 680.
8. Bradford MM. 1976**.**A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the rinciple of protein-dye binding. Anal Biochem; 72(1): 248-54.
9. Yalcın HT, Ozen MO, Gocmen B, Nalbantsoy A.Effect of Ottoman viper (Montivipera xanthina (Gray, 1849))venom on various cancer cells and on microorganisms. Cytotechnology 2014. 66: 87-94
10. Moridikia A, Zargan, Sobati H, Goodarzi H-R, Hajinourmohammadi A.. Anticancer and antibacterial Effects of Iranian Viper (*Vipera latifii*) Venom; an in-vitro study Journal of Cellular Physiology 10 January 2018 .https://doi.org/10.1002/jcp.26428
11. Isah, T. Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. Biogical. Research. 2019, 52, 39–64.
12. Sharma, S.; Sanyal, S.K.; Sushmita, K.; Chauhan, M.; Sharma, A.; Anirudhan, G. Modulation of phototropin signalosome with artificial illumination holds great potential in the development of climate-smart crops. Curr. Genom. 2021, 22, 181–213.
13. Crabbé, A.; Jensen, P.; Bjarnsholt, T.; Coenye, T. Antimicrobial tolerance and metabolic adaptations in microbial biofilms. Trends Microbiol. 2019, 27, 850–863
14. Kenny RG, Marmion CJ. Toward multi-targeted platinum and ruthenium drugs—a new paradigm in cancer drug treatment regimens?. Chemical reviews. 2019 Jan 14;119(2):1058-137.
15. Li W, Separovic F, O'Brien-Simpson NM, Wade JD. Chemically modified and conjugated antimicrobial peptides against superbugs. Chemical Society Reviews. 2021;50(8):4932-73.
16. San TM, Vejayan J, Shanmugan K, Ibrahim H. Screening antimicrobial activity of venoms from snakes commonly found in malaysia. Journal of applied sciences. 2010;10(19):2328-32.
17. Zeng XC, Wang S, Nie Y, Zhang L, Luo X. Characterization of BmKbpp, multifunctional peptide from the Chinese scorpion Mesobuthus martensii Karsch: gaining insight into a new mechanism for the functional diversification of scorpion venom peptides. Peptides 2012;33: 44-51.
18. Al Rashdi RS, Hossain MA, Al Touby SS. Antioxidant and antibacterial activities of leaves crude extracts of Adenium obesum grown in Oman National Botanical Garden. Advances in Biomarker Sciences and Technology. 2021 Jan 1;3:8-14.
19. Hajinourmohammadi A, Zargan J, Jafary H, Ebrahimi F. Cytotoxic and apoptotic effects of the Adenium obesum extract on the hepatocellular carcinoma cell line (HepG2). Gene Reports. 2024 Jun 1;35:101907.
20. Sharma Y. A study of antibacterial, antioxidant and neuroprotective effect of stem of Syzygium cumini. International Journal of Green Pharmacy (IJGP). 2017;11(04).
21. Prasetyoputri A, Jarrad AM, Cooper MA, Blaskovich MA. The Eagle effect and antibiotic-induced persistence: two sides of the same coin? Trends Microbiol 2019; 27: 339-354.
22. Alipour Y, Zargan J, Haji Nour Mohammadi A. Antibacterial effects of crude venom and their protein) fractions of Hottentotta saulcyi scorpion. Koomesh. 2022 May 10;24(3):376-87.
23. Hassan M, Flanagan TW, Kharouf N, Bertsch C, Mancino D, Haikel Y. Antimicrobial proteins: structure, molecular action, and therapeutic potential. Pharmaceutics. 2022 Dec 26;15(1):72.
24. Adamu HM, Abayeh OJ, Agho MO,Abdullahi AL, Uba A, Dukku HU and Wufem BM (2005). An ethnobotanical survey of Bauchi State herbal plants and their antimicrobial activity. Journal of Ethnopharmacology; 99(1):1-4.
25. Tijjani A, Ndukwe IG and Ayo RG.Studies on antibacterial activity of Adenium obesum (Apocynaceae) stem - bark. Continental Journal of Microbiology; (2011) 5(1):12-17.
26. Sharma Y, Nagar A and Shukla S.Antimicrobial activity and phytochemicalscreening of Adenium obesum (desert rose) leaf. International Journal of Pharma and Bio Sciences; (2015)6(3):85-92.

27. Zargan J, Sajad M, Umar S, Naime M, Shakir A, Haider AK. 2011 .Scorpion (Androctonus crassicauda) venom limits growth of transformed cells (SH-SY5Y and MCF-7) by cytotoxicity and cell cycle arrest. Experimental and Molecular Pathology 91 (2011) 447–454
28. Mousavi M, Zargan J, Hajinourmohammadi A etal. May-Jun, 2019. Investigating antibacterial effects of Latrodectus Dalhi crude venom on Escherichia coli, staphylococcus aureus and Bacillus subtilis. Medical Laboratory Journal; Vol 13: No 3.
29. Hossain MA. A review on Adenium obesum: A potential endemic medicinal plant in Oman. Beni-Suef University journal of basic and applied sciences. 2018 Dec 1;7(4):559-63.