DOI: 10.48305/jims.v42.i777.0657

مجله دانشکده پزشکی اصفهان — سال چهل و دوم/شماره‌ی ۷۷۷/هفته‌ی اول مهر ۱۴۰۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۶/۲۴ تاریخ چاپ: ۱۴۰۳/۰۷/۰۶

استخراج، جداسازی و تعیین اثرات تنظیم کنندگی سیستم ایمنی پپتیدهای حلقوی مستخرج از گیاه Viola odorata

لادن دیانی[۱]، آزاده طاهری بروجنی[۱]، ژاله ورشوساز[۱]، مهدی علی عمرانی[۲]، مسعود صادقی دینانی[۳]، حسین هاشم‌پور[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: پپتیدهای حلقوی گیاهی، محدوده‌ی گسترده‌ای از اثرات درمانی را دارند و در خانواده‌های مختلفی از گیاهان از جمله Violaceae وجود دارند. در این مطالعه، وجود پپتیدهای حلقوی در گیاه Viola odorata بررسی شد.

روش‌ها: پپتیدهای حلقوی با استفاده از دی کلرومتان و متانول استخراج شدند. عصاره‌ی خام به دست آمده به کمک کروماتوگرافی مایع تحت خلاء با اتانول ۵۰ و ۸۰ درصد فرکشنه گردید. فراکسیون‌های به دست آمده، با استفاده از HPLC و MALDI-TOF بررسی گردید. در ادامه تعداد ۳۰ موش C57/Bl6 به صورت تصادفی در ۶ گروه تقسیم شدند. گروه‌های مختلف دریافت‌کننده‌ی پپتیدهای حلقوی فراکسیون‌های ۵۰ و ۸۰ درصد در دوزهای ۵ mg/kg، ۵۰ و ۱۰۰ به صورت داخل صفاقی بودند. شمارش کل گلبول‌های سفید، لنفوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها، ائوزینوفیل و مونوسیت‌ها قبل و ۲۴ ساعت پس از تزریق انجام شد.

یافته‌ها: نتایج کروماتوگرافی نشان داد که پپتیدهای حلقوی در فراکسیون‌های ۵۰ و ۸۰ گیاه Viola odorata وجود دارند. طیف MALDI-TOF نیز مشخص کرد که وزن مولکولی فراکسیون‌ها در محدوده‌ی مربوط به پپتیدهای حلقوی می‌باشند. همچنین نتایج مطالعات حیوانی مشخص کرد، گروه دریافت‌کننده‌ی فراکسیون ۸۰ درصد می‌تواند منجر به کاهش تعداد گلبول‌های سفید شده در حالی که فراکسیون ۵۰ درصد آن را افزایش می‌دهد.

نتیجه‌گیری: پپتیدهای حلقوی می‌توانند به عنوان عوامل تعدیل‌کننده‌ی ایمنی مورد استفاده قرار گیرند و می‌توانند برای طیف وسیعی از بیماری‌هایی که مربوط به سیستم ایمنی هستند استفاده شوند.

واژگان کلیدی: پپتیدهای حلقوی؛ گیاه بنفشه؛ تنظیم کننده‌ی سیستم ایمنی

ارجاع: دیانی لادن، طاهری بروجنی آزاده، ورشوساز ژاله، علی عمرانی مهدی، صادقی دینانی مسعود، هاشم‌پور حسین. **استخراج، جداسازی و تعیین اثرات تنظیم کنندگی سیستم ایمنی پپتیدهای حلقوی مستخرج از گیاه Viola odorata.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۳؛ ۴۲ (۷۷۵): ۶۵۷-۶۶۵.

مقدمه

سدهای بزرگی بر سر راه دارورسانی پروتئین‌ها و پپتیدهای درمانی وجود دارد که از این بین، مهم‌ترین آن‌ها، پایداری پپتیدها و پروتئین‌ها می‌باشد (۱). پپتیدهای خطی در شرایط فیزیولوژیک و یا توسط آنزیم‌ها به سرعت تخریب می‌شوند و در نتیجه فعالیت بیولوژیک خود را از دست می‌دهند (۲).

سیستم‌های جدید مبتنی بر پپتیدها، بر اساس استفاده از پپتیدهای حلقوی هستند. پپتیدهای حلقوی در حیطه‌ی درمانی بسیار موفق بوده‌اند (۳). از پپتیدهای حلقوی که به عنوان دارو استفاده می‌شوند می‌توان به آنالوگ‌های هورمونی مانند اکسی‌توسین، اکترئوتاید و وازوپرسین اشاره نمود (۴، ۵).

موفقیت این دسته از پپتیدها را به عنوان عامل درمانی، می‌توان به چند

۱ – گروه فارماسیوتیکس، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲ – گروه فارماکولوژی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳ - گروه فارماکوگنوزی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۴- گروه شیمی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: آزاده طاهری: گروه فارماسیوتیکس، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: az.taheri@pharm.mui.ac.ir

ویژگی مطلوب آن‌ها نسبت داد. اول این که پپتیدهای حلقوی مساحت سطحی زیادی دارند و تمایل بالایی برای اتصال به محل هدف پیدا می‌کنند. دوم، پپتیدهای حلقوی حداقل سمیت را دارند. سوم، پپتیدهای حلقوی را به راحتی می‌توان با توجه به اهداف اصلاح کرد. چهارم، به جهت ایجاد ساختارهای حلقوی، کنفورماسیون مولکول، انعطاف‌پذیری کمتری دارد و ریجیدیتی آن بیشتر است در نتیجه سطح انرژی آزاد گیبس در آن پایین‌تر می‌آید و به همین دلیل ساختارها پایدارتر هستند. پنجم، تمایل بیشتر برای برقراری پیوندهای هیدروژنی داخلی دارند. از طرفی پپتیدهای حلقوی نسبت به پروتئین‌ها، مولکول‌های کوچک‌تری هستند و تهیه‌ی آن‌ها هزینه کمتری دارد (۶، ۷).

حلقوی شدن پپتیدها منجر به تشکیل باند آمیدی بین گروه‌های انتهایی آمینو و کربوکسیل می‌شود و در نتیجه به جهت نبود دو انتهای کربوکسیل و آمینو، این ساختارها در مقابل اگزوپپتیدازها مقاوم هستند و نفوذپذیری غشایی آن‌ها بالاتر می‌رود (۸، ۹). همچنین برخی از پپتیدهای حلقوی به خاطر وجود شش آمینواسید سیستئین دارای سه باند دی‌سولفیدی هستند و به همین دلیل گره‌های سیستینی در ساختار آن‌ها ایجاد می‌شود (۱۰). ترکیب این دو ویژگی ساختاری باعث شده تا در پپتیدهای حلقوی ویژگی‌های استثنایی از جمله پایداری بالا در مقابل حرارت، ترکیبات شیمیایی، تغییرات pH و آنزیم‌های گوارشی وآنزیم‌های پرتئولیتیک داشته باشند (۱۱).

نشان داده شده است که پپتیدهای حلقوی به طور طبیعی به عنوان متابولیت ثانویه در مکانیسم‌های دفاعی گیاهان به کار می‌روند. این ترکیبات به طور عمده در برگ، ریشه، ساقه و بافت‌هایی که بیشتر درمعرض حمله آفات، حشرات و کرم‌ها هستند، وجود دارند. پپتیدهای حلقوی فعالیت‌های متعددی از جمله اثرات آنتی‌میکروبیال، حشره‌کشی و آفت‌کشی، اثرات ضد کرم و ضد HIV دارند (۱۲، ۱۳). همچنین اغلب برای درمان سرطان، بیماری‌های متابولیک، چاقی، درد، التهاب و سرکوب سیستم ایمنی در بیماری MS (Multiple Sclerosis) و تنظیم‌کننده‌ی رسپتورهای کوپل شده با پروتئین G نیز کاربرد دارند (۱۴–۱۶).

در بین گیاهان ذکر شده حاوی پپتیدهای حلقوی، خانواده Violaceae بیشتر از بقیه دارای این ترکیبات هستند. مشخص شده گیاه Viola odorata با نام بنفشه‌ی معطر یا Sweet violet، مقادیر زیادی پپتیدهای حلقوی را بیان می‌کند که در مکانیسم‌های دفاعی به گیاه کمک می‌کنند. در بسیاری از مطالعات گذشته نشان داده شده است که گیاهان خانواده Violacea دارای مقادیر زیادی پپتیدهای حلقوی هستند (۵، ۷، ۱۷).

Pränting و همکاران اثبات کردند گیاه Viola odorata، دارای پپتیدهای حلقوی بسیاری است که بر روی باکتری‌های گرم منفی اثرگذار است (۱۸).

Slazak و همکاران نشان دادند پپتیدهای حلقوی موجود در گیاه Viola odorata می‌توانند به صورت طبیعی از گیاه در برابر حشرات محافظت کند (۱۹).

سیستم ایمنی بدن سلاحی قوی در برابر پاتوژن‌ها است. اما عملکرد نادرست آن منجر به ایجاد بیش‌فعالی این ماشین دفاعی و در بعضی موارد بیماری‌های خودایمنی مثل آرتریت روماتوئید، بیماری کرون می‌شود و یک گزینه برای درمان این بیماری‌ها سرکوب سیستم ایمنی است (۲۰). چون لنفوسیت‌های T در این نوع پاسخ ایمنی تأثیر زیادی دارند، بنابراین اغلب داروهای سرکوب‌گر سیستم ایمنی روی این دسته از سلول‌ها تمرکز دارند (۲۱). در مطالعات گذشته مشخص شده که پپتیدهای حلقوی می‌توانند اثرات تنظیم‌کننده‌ی سیستم ایمنی را داشته باشند (۲۰، ۲۲، ۲۳).

به دلایل ذکر شده، پپتیدهای حلقوی می‌توانند گزینه‌ی مناسبی برای بررسی و مطالعه باشند. به همین جهت هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی پپتیدهای حلقوی از گیاه Viola odorata می‌باشد و در ادامه‌ی اثرات تنظیم‌کنندگی سیستم ایمنی این پپتیدهای جداسازی شده بررسی می‌گردد.

روش‌ها

آماده‌سازی گیاه

برای استخراج پپتید، قسمت‌های هوایی گیاه Viola odorata به کار برده شد. این گیاهان به کمک یک آسیاب به پودر ریز و هموژن آسیاب گردیدند تا استخراج به خوبی انجام گیرد.

استخراج پپتیدهای حلقوی از گیاه بنفشه

برای شروع استخراج، ۶ کیلوگرم پودر تهیه شده با ۲۰ لیتر مخلوط دی کلرومتان و متانول با نسبت ۱:۱ به مدت سه شبانه روز خیسانده شد. عصاره‌گیری در دمای محیط انجام گرفت. پس از سه بار تکرار عصاره‌گیری (هر بار ۲۰ لیتر مخلوط حلال و جمعاً ۶۰ لیتر)، عصاره حاصل با کمک کاغذ واتمن فیلتر شد تا باقیمانده‌ی گیاهی از آن جدا شود. سپس با دستگاه روتاری متصل به خلا در دمای ۳۷ °C تغلیظ صورت گرفت (۲، ۲۴).

پارتیشنه کردن عصاره

عصاره‌ی حاصل، با آب دیونیزه به نسبت حجمی نیم مجدداً سوسپانسیون شده و توسط قیف جداکننده پارتیشنه گردید. پس از گذشت یک شبانه روز فاز آبی– الکلی جدا شده و با روتاری تغلیظ شد. انتظار می‌رود فاز آبی– الکلی، شامل پپتیدهای حلقوی و فاز دی‌کلرومتان، حاوی ترکیبات غیرپلار شامل چربی‌ها و کلروفیل باشد. فاز آبی– الکلی پس از تغلیظ به کمک روتاری با استفاده از فریزدرایر خشک گردید (۲۴).

تخلیص و جداسازی پپتیدهای حلقوی با استفاده از VLC[1]

جهت تخلیص، نمونه حاصل روی ستون (Vacuum liquid chromatography) VLC حاوی مادهی جاذب C18 منتقل شد. سپس عصارهی خام حاصل از مرحلهی قبل در بافر آمونیوم استات (pH~8, 0.1M) حل شده و پس از آن با استفاده از کروماتوگرافی مایع تحت خلاء فراکسیونه شد. در ابتدا، ستون با یک حجم متانول (معادل یک لیتر) فعال گردید و سپس دو حجم بافر آمونیوم استات از آن عبور داده شد. در مرحلهی بعد، نمونه روی ستون لود گردید و بعد از آن با اتانول ۳۰، ۵۰ و ۸۰ درصد (هر کدام معادل دو حجم ستون در کل ۱ لیتر) ستون شسته شد. فراکسیون‌های ۵۰ و ۸۰ درصد جداسازی شدند و فریزدرای گردیدند (۲۵، ۲۶).

شناسایی پپتیدها با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC)

جهت انجام کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا برای شناسایی و پی بردن به وجود پپتیدهای حلقوی، از ستون HPLC (ستون mm ۳۰۰ ×۳/۹ ,Navapack) و مادهی جاذب C-18 و اندازهی ذرهای ۵ میکرومتر برای بررسی نهایی استفاده گردید. در سیستم HPLC از سیستم گرادیان استفاده شد که فاز متحرک آن شامل حلال‌های A:B به صورت گرادیان پیوسته از نسبت ۹۵:۵ تا ۲۰:۸۰ و با سرعت جریان موبایل فاز ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه بود. حلال A حاوی آب دیونیزه همراه با ۰/۰۵ درصد تری فلوراستیک اسید (TFA) و حلال B حاوی استونیتریل و ۰/۰۵ درصد تری فلوراستیک اسید بوده است. بررسی در طول موج ۲۱۵ نانومتر انجام گرفت (۲۶).

آنالیز و شناسایی پپتیدهای حلقوی با کمک MALDI-TOF

جهت شناسایی و تأیید پپتیدهای حلقوی استخراج شده از طیف جرمی با روش MALDI-TOF یا یونیزاسیون لیزری با تجزیه‌گر جرمی زمان پرواز استفاده شد.

تعیین محتوای کمی پپتید حلقوی در هر فراکسیون

کمی سازی محتوای پپتید حلقوی در هر کدام از فراکسیون‌های ۵۰ و ۸۰ درصد با استفاده از متد UV اسپکترو سکوپی انجام شد. بدین منظور، ۱ میلی‌گرم از هر فراکسیون در ۱ سی سی بافر آمونیوم استات با pH برابر با ۸ حل گردید تا غلظت ۱ mg/ml از هر فراکسیون به دست آید. سپس مقدار جذب نمونه‌ها در طول موج‌های ۲۸۰ nm و ۳۳۰ خوانده شد. میزان جذب در ۲۸۰ nm مربوط به جذب ترکیبات پپتید حلقوی می‌باشد در حالی که میزان جذب در ۳۳۰ nm مربوط به جذب ترکیبات فنولیک است. غلظت نهایی پپتید حلقوی در هر فراکسیون از معادلهی ۱ به دست آمد و سپس نسبت به غلظت اولیه ۱ mg/ml، درصد پپتید حلقوی در هر فراکسیون محاسبه شد.

معادله ۱ $mg/ml = ((A280-A330) *D*MW)/\epsilon$

در این معادله، A280 میزان جذب فراکسیون ها در طول موج ۲۸۰ nm و A330 میزان جذب هر فراکسیون در طول موج ۳۳۰ nm می‌باشد. مقدار D برابر همان ضریب رقت‌سازی است. Mw وزن مولکولی پپتید حلقوی می‌باشد و ϵ در اصل ضریب extinction برای پپتید حلقوی است.

حیوانات آزمایشگاهی

تمام مطالعات حیوانی صورت گرفته مطابق با دستورالعمل‌های مصوب کمیته‌ی ملی اخلاق در کار با حیوانات آزمایشگاهی انجام شد. در این مطالعه موش‌های C57BL/6 جنس ماده در محدوده‌ی وزنی ۳۰-۲۰ گرم از لانه‌ی حیوانات پژوهشگاه رویان اصفهان خریداری شده و به مدت ۷ روز در آزمایشگاه تحقیقاتی گروه فارماکولوژی و سم‌شناسی در قفس پلی پروپیلنی در دمای اتاق °C ۴±۲۵ نگهداری شدند. قبل از شروع مطالعه، حیوانات از نظر بارداری و شیردهی بررسی شدند و در صورت بارداری یا شیردهی وارد مطالعه نمی‌گردیدند. در تمام مدت انجام آزمایش، حیوانات دسترسی آزاد به غذا و آب داشتند و پس از ۷ روز به صورت تصادفی تقسیم شدند.

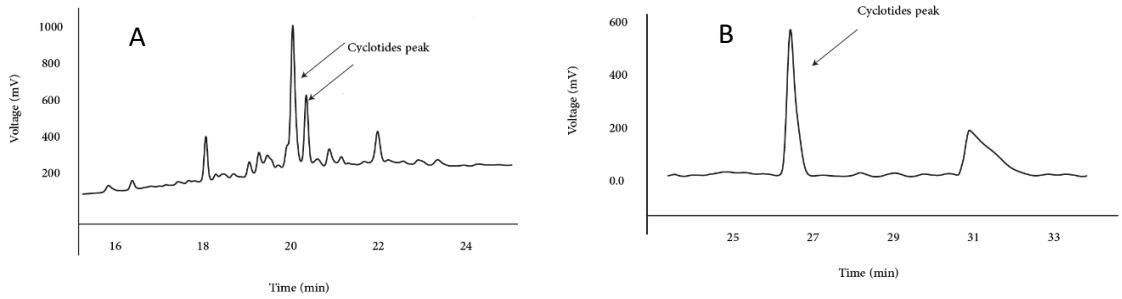
تجویز پپتیدهای حلقوی

تعداد ۳۰ موش C57/BL6 به صورت تصادفی در ۶ گروه تقسیم شدند. گروه های مختلف در یا فتک‌نده‌ی پپتید های حلقوی فراکسیون‌های ۵۰ و ۸۰ درصد در دوزهای mg/kg ۵، ۵۰ و ۱۰۰ به صورت داخل صفاقی بودند. شمارش کل گلبول‌های سفید، لنفوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها، ائوزینوفیل‌ها و مونوسیت‌ها قبل و ۲۴ ساعت پس از تزریق انجام شد.

یافته‌ها

بررسی کروماتوگرام حاصل از کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC)

شکل ۱ کروماتوگرام مربوط به نتایج HPLC فراکسیون‌های ۵۰ و ۸۰ درصد را نشان می‌دهد. همانطور که مشخص است، پپتیدهای حلقوی متعددی در این دو فراکسیون وجود دارد. در کروماتوگرام HPLC مربوط به پپتید حلقوی دو فاکتور مهم است. یکی زمان بازداری (Retention time) که در حدود ۳۰-۲۰ دقیقه می‌باشد و دیگری ترکیب فاز متحرک است. به این معنی که در طی فرایند جداسازی، پپتید حلقوی با موبایل فاز در حدود ۶۰-۵۰ درصد استونیتریل از ستون خارج می شوند. بنابراین در شکل ۱ مشخص است که هر دو فراکسیون ۵۰ و ۸۰ درصد حاوی پپتید حلقوی می‌باشند و کروماتوگرام آن‌ها نیز هر دو فاکتور را دارد و در نتیجه تأییدکننده‌ی وجود پپتید حلقوی می‌باشند.



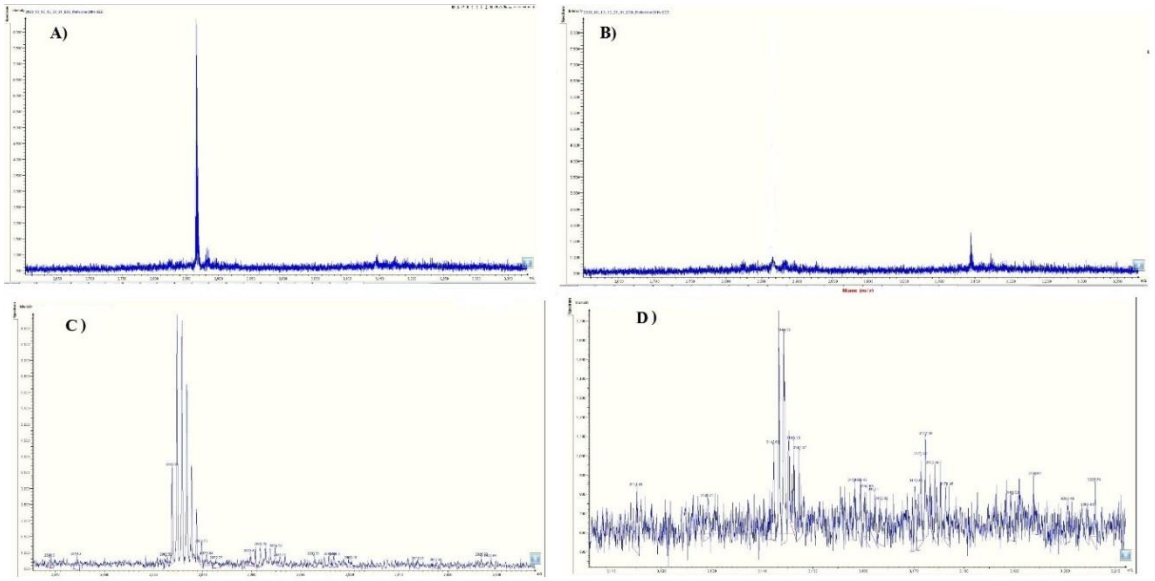
شکل ۱ : نتایج کروماتوگرام مربوط به فراکسیون‌های به دست آمده از کروماتوگرافی مایع تحت خلأ :A) کروماتوگرام فراکسیون ۵۰ درصد B) کروماتوگرام فراکسیون ۸۰ درصد

بررسی طیف MALDI-TOF

شکل ۲- A وB به ترتیب نتایج طیف مربوط به MALDI-TOF دو فراکسیون ۵۰ و ۸۰ درصد را نشان می‌دهد. همانطور که در شکل ۲ -A مشخص است، پیک بلند در محدوده‌ی ۲۹۰۰-۲۸۰۰ دالتون بیانگر وجود پپتید حلقوی است چون وزن مولکولی پپتید حلقوی به طور کلی در حدود ۳/۷-۲/۴ کیلودالتون می‌باشد. شکل B-۲ نیز طیف کلی مربوط به فراکسیون ۸۰ درصد را نشان می‌دهد. در این طیف نیز پیک‌هایی در محدوده‌ی ۳۲۰۰-۳۱۰۰ دالتون مشاهده می‌شود و این پیک‌ها نیز مربوط به پپتیدهای حلقوی می‌باشند. شکل C-۲ طیف گسترده از فراکسیون ۵۰ درصد را نشان می‌دهد. این طیف مشخص می‌کند که دو پپتید حلقوی به طور عمده در این فراکسیون وجود دارد که به ترتیب وزن مولکولی ۲۸۶۳/۰۵ و ۲۸۷۹/۸ دالتون را دارند. شکل D-۲ نیز طیف گسترده شده از فراکسیون ۸۰ درصد را نشان می‌دهد و در این طیف نیز، پپتیدهای حلقوی با وزن مولکولی ۳۱۴۲/۰۵ و ۳۱۷۰/۴ دالتون مشخص شده است. تمامی محدوده‌ی پیک‌ها از دیتابیس Cybase به دست آمده است.

بررسی پپتیدهای حلقوی استخراج شده در دیتابیس Cybase

جدول ۱ تمام پپتیدهای حلقوی شناسایی شده در طیف MALDI-TOF را نشان می‌دهد. وزن مولکولی ترکیبات به دست آمده در قسمت قبل که همگی در محدوده‌ی وزن مولکولی پپتیدهای حلقوی می‌باشند در دیتابیس Cybase بررسی گردید تا نام پپتید حلقوی پیشنهادی مشخص شود و ویژگی‌های آن‌ها تعیین گردد. از جمله این که این پپتیدهای حلقوی Möbius یا bracelet هستند. لینک دیتابیس مورد استفاده نیز قرار داده شده است.



شکل ۲: نتایج طیف MALDI-TOF مربوط به فراکسیون‌های ۵۰ و ۸۰ درصد. A) طیف کلی از فراکسیون ۵۰٪ B) طیف کلی از فراکسیون ۸۰ درصد. C) طیف گسترده از فراکسیون ۵۰درصد. D) طیف گسترده از فراکسیون ۸۰ درصد.

جدول ۱: نتایج حاصل از بررسی وزن مولکولی ترکیبات به دست آمده در طیف MALDI_TOF و جستجوی نام و مشخصات پپتیدهای حلقوی در دیتابیس Cybase

زیر گروه	میانگین وزن مونوایزوتوپیک در دیتابیس	نتایج سرچ	وزن مونوایزوتوپیک به صورت جرمی	وزن مونوایزوتوپیک به دست آمده $[M+H]^+$
Mobius	۲۸۶۲/۱۱	Vaby A	۲۸۶۲/۰۵	۲۸۶۳/۰۵
Mobius	۲۸۷۸/۱۲	Viba 30 linear	۲۸۷۸/۸	۲۸۷۹/۸
Mobius	۲۸۷۸/۰۸	Kalata B12		
bracelet	۳۱۴۱/۳۹	Hypa A	۳۱۴۱/۰۵	۳۱۴۲/۰۵
bracelet	۳۱۴۱/۳۴	cT30		
bracelet	۳۱۶۹/۳۴	cT31	۳۱۶۹/۴	۳۱۷۰/۴
bracelet	۳۱۶۹/۳۶	HB8		

http://research.imb.uq.edu.au/cybase/index.php?page=welcome

تعیین کمی مقدار محتوای پپتیدهای حلقوی در هر فراکسیون

تعیین مقدار محتوای پپتید حلقوی در هر فراکسیون با استفاده از متد UV اسپکتروسکوپی انجام گرفت همچنین برای انتخاب پپتید حلقوی در هر فراکسیون از پیک‌های به دست آمده از طیف MALDI-TOF استفاده شد. برای فراکسیون ۵۰ درصد، با توجه به جدول ۱ و همچنین شکل ۲A–، پپتید حلقوی Vaby A انتخاب شد. مقدار وزن مولکولی این ترکیب در دیتابیس Cybase برابر ۲۸۶۴ دالتون گزارش شده است. مقدار Extinction coefficient نیز M-1cm-1 ۵۶۹۰ می باشد. در نتیجه مشخص شد که در فراکسیون ۵۰ درصد، غلظت پپتید حلقوی mg/ml ۰/۰۴ ± ۰/۹۶۹ می‌باشد. به همین جهت می‌توان نتیجه گرفت ۹۶/۹ درصد از فراکسیون ۵۰ درصد حاوی پپتید حلقوی است. برای فراکسیون ۸۰ درصد، با توجه به جدول ۱ و همچنین شکل ۲B–، پپتید حلقوی cT30 انتخاب شد. مقدار وزن مولکولی این ترکیب در دیتابیس Cybase برابر ۳۱۴۳ دالتون گزارش شده است. مقدار Extinction coefficient نیز M-1cm-1 ۵۶۹۰ می‌باشد. در نتیجه مشخص شد که در فراکسیون ۸۰ درصد، غلظت پپتید حلقوی mg/ml ۰/۰۳ ± ۰/۹۷۶ می‌باشد. به همین جهت می‌توان نتیجه گرفت ۹۷/۶ در صد از فراکسیون ۸۰ در صد حاوی پپتید حلقوی است.

نتایج بررسی تنظیم سیستم ایمنی پپتیدهای حلقوی

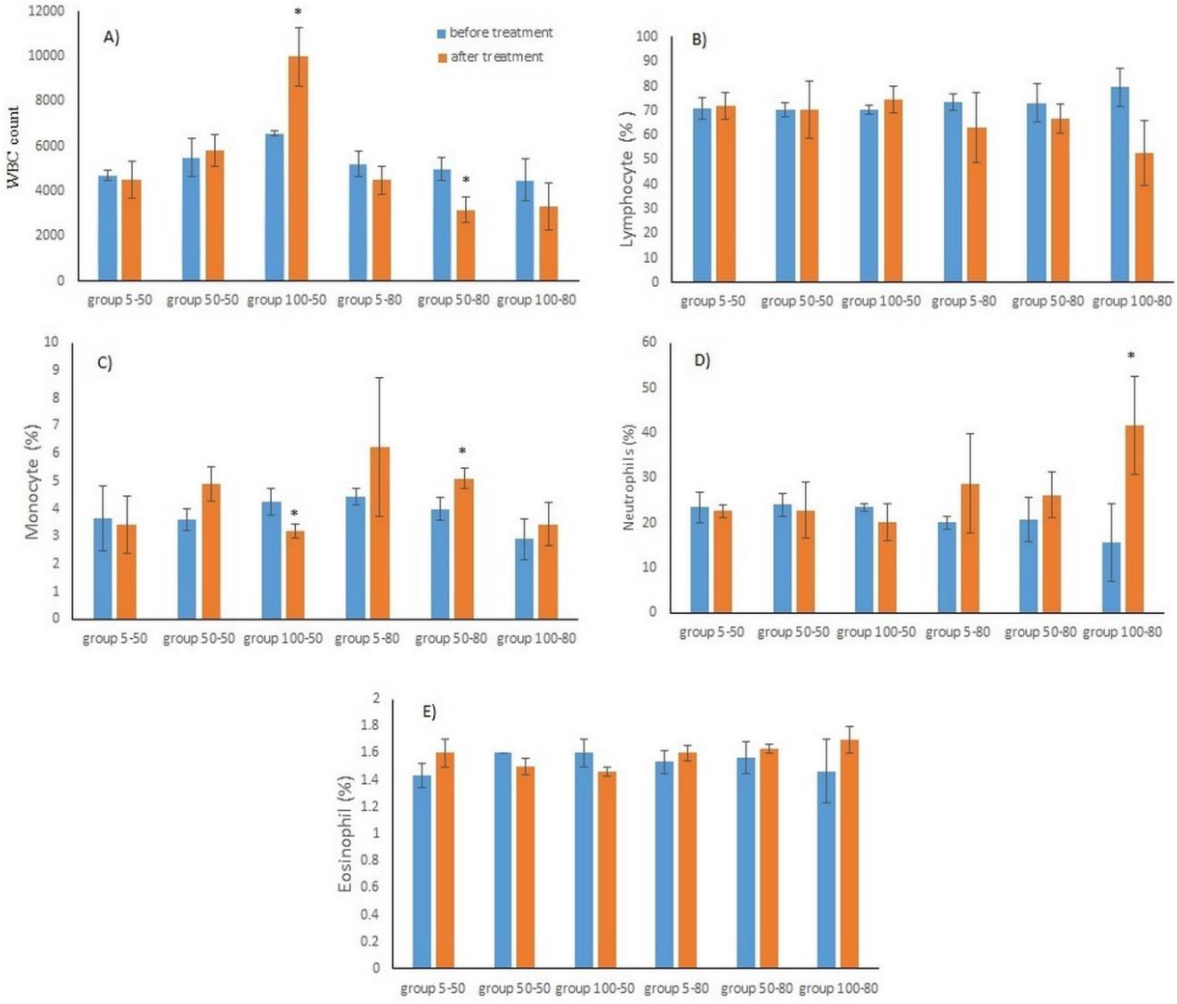
نتایج شمارش گلبول‌های سفید به صورت کلی و به شکل افتراقی در شکل ۳ نشان داده شده است. همانطور که در شکل مشخص است، فراکسیون ۵۰ درصد در دوزهای بالا یعنی در mg/kg ۱۰۰ می‌تواند به صورت معنی‌دار باعث افزایش تعداد گلبول‌های سفید شود ($P < ۰/۰۵$). در صورتی که فراکسیون ۸۰ درصد در تمامی دوزها اثرات کاهش تعداد گلبول‌های سفید را داشته است. همچنین فراکسیون ۸۰ درصد توانسته باعث کاهش لنفوسیت‌ها و مونوسیت‌ها شود. فراکسیون‌های ۵۰ و ۸۰ درصد تأثیری درصد ائوزینوفیل‌ها نداشته است ($P > ۰/۰۵$).

بحث

کشف و استخراج پپتیدهای حلقوی در زمینه‌های مختلفی کاربرد دارد. به خصوص که از پپتیدهای حلقوی اثرات درمانی مختلف و قابل قبولی مشاهده شده است (۲۷). پپتیدهای حلقوی به طور طبیعی در خانواده‌ی مختلف گیاهان از جمله خانواده‌ی Violaceae یافت می‌شوند (۱۵، ۲۸، ۲۹). بنابراین شناسایی پپتیدهای حلقوی در گیاهان مختلف و بررسی اثرات درمانی آن‌ها بسیار مهم می‌باشد (۳۰، ۳۱).

در این مطالعه با توجه به نتایج HPLC (شکل ۱) و MALDI-TOF (شکل ۲) و همچنین نتایج اسپکتروسکوپی مشخص شد که گیاه Viola odorata دارای مقادیر زیادی از پپتید حلقوی می‌باشد که این خود نتیجه‌ای بسیار با ارزش است چرا که نشان داده شده است می‌توان با کروماتوگرافی مایع تحت خلا یا VLC به خوبی فراکسیون هایی غنی از پپتید حلقوی تهیه نمود. در مطالعات گذشته نیز اثبات شده است که گیاهان خانواده‌ی Violaceae دارای پپتید حلقوی هستند (۳۱، ۳۲). گیاه Viola odorata نیز گیاهی بومی ایران است و به راحتی در دسترس می‌باشد و بنابراین به راحتی می‌توان از آن برای استخراج پپتید حلقوی استفاده نمود. در این مطالعه نیز اثبات گردید که پپتیدهای حلقوی در گیاه Viola odorata وجود دارد و بنابراین می‌توان انتظار داشت که این ترکیبات در بیماری‌های مختلفی اثربخش باشند.

پپتیدهای حلقوی به سه زیرگروه تقسیم می شوند: ۱- Möbius، ۲- bracelet، ۳- مهارکننده‌های تریپسین. ساختار Möbius و bracelet بسیار به یکدیگر نزدیک هستند. تفاوت زیرگروه‌های Möbius و bracelet به خاطر حضور یا عدم حضور cis-Proline بین سیستئین‌های ۵ و ۶ در لوپ ۵ و در نتیجه چرخش ۱۸۰ درجه در ساختار پپتیدی می‌باشد که در Möbius این حالت وجود دارد و در bracelet خیر. زیرگروه بعدی مهارکننده‌های تریپسین می‌باشند که توالی‌های متفاوتی نسبت به دو زیرگروه دیگر دارند و دسته‌ی کوچکتری هستند و به طور معمول cyclic knottins نامیده می‌شوند (۲۹، ۳۰). در این مطالعه پس از بررسی وجود پپتیدهای



شکل ۳: نتایج شمارش کل A)گلبول‌های سفید، B) لنفوسیت‌ها، D) مونوسیت‌ها، C)نوتروفیل‌ها، E) ائوزینوفیل‌ها قبل و ۲۴ ساعت پس از تزریق فراکسیون‌های ۵۰ و ۸۰ درصد از پپتیدهای حلقوی به صورت تزریق داخل صفاقی. علامت ستاره نشان‌دهنده‌ی معنی‌دار بودن تفاوت نتیجه بعد از تزریق نسبت به قبل از تزریق می‌باشد.

حلقوی با استفاده از HPLC و تأیید نهایی با کمک MALDI-TOF در دیتابیس معتبر Cybase نوع پپتیدهای حلقوی محتمل در گیاه Viola odorata، Möbius و bracelet مشخص گردید.

مشاهده شد که پپتیدهای حلقوی می‌توانند بدون ایجاد عوارض جانبی کبدی در بهبود بیماری مالتیپل اسکلروزیس مؤثر باشند. در مطالعه‌ای Gründemann و همکاران ذکر کردند که استفاده از تک دوز این پپتیدها به حیوانات سالم تا ۱۵ mg/kg از طریق داخل وریدی و ۷۵ mg/kg به صورت داخل صفاقی و ۲۵۰ mg/kg از راه خوراکی اثرات سمی نشان نداده است (۲۳). این پپتیدها تکثیر سلول‌های T را با کاهش آزادسازی IL-2 و کاهش بیان رسپتورهای سطحی IL-2R/CD25، کم می‌کند. IL-2 سایتوکاینی است که به صورت فیزیولوژیک نقش مهمی در فعالیت لنفوسیت‌های T ایفا می‌کند و به صورت اتوکراین منجر به تکثیر این سلول‌ها می‌شود وافزایش فعالیت این سلول‌ها بیماری‌های خودایمنی را ایجاد می‌کند (۲۲). در مطالعات نشان داده شده است که پپتیدهای حلقوی می‌توانند به صورت خوراکی مصرف شده و اثرات مثبتی در درمان بیماری مالتیپل اسکلروزیس داشته باشند (۳). با توجه به نتایج این مطالعه، مشخص است که فراکسیون‌های ۵۰ و ۸۰ درصد استخراج شده از گیاه بنفشه می‌توانند باعث تغییر در شمارش گلبول‌های سفید شوند و به خصوص لنفوسیت‌ها و مونوسیت‌ها را تغییر می‌دهند (شکل ۳).

در آخر می‌توان نتیجه گرفت گیاه Viola odorata، گیاهی غنی از پپتید حلقوی می‌باشد که ارزش بالایی برای مطالعه جهت تعیین نوع پپتید حلقوی دارد و همچنین پیشنهاد می‌شود پس از جداسازی و شناسایی، اثربخشی آن‌ها در حوزه‌های مختلفی از جمله بیماری‌های مختلف عفونی، سرطان، ایمنی و ... بررسی گردد.

نتیجه‌گیری

در نهایت نتایج این مطالعه نشـان داد که پپتیدهای حلقوی می‌توانند اثرات تنظیم‌کننده‌ی سیستم ایمنی را داشته باشند. در نتیجه پپتیدهای حلقوی در بیماری‌های خود ایمنی مانند مالتیپل اســکلروزیس یا آرتریت روماتوئید می‌تواند کاربرد داشته باشند.

تشکر و قدردانی

این مقاله منتج ازطرح تحقیقاتی / پایان نامه مقطع دکترای تخصـصـی رشته فارماسیوتیکس.می باشد که در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان .به ت صویب ر سیده وبا حمایت مالی دان شگاه علوم پز شکی ا صفهان به انجام رسیده است.بدینوسیله اززحمات دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تقدیر وتشکر می شود.

References

1. Afroz M, Akter S, Ahmed A, Rouf R, Shilpi JA, Tiralongo E, et al. Ethnobotany and antimicrobial peptides from plants of the solanaceae family: an update and future prospects. Front Pharmacol 2020; 11: 565.
2. Ovesen RG, Göransson U, Hansen SH, Nielsen J, Hansen HCB. A liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry method for quantification of cyclotides in plants avoiding sorption during sample preparation. J Chromatogr A 2011; 1218(44): 7964–70.
3. Del Gatto A, Saviano M, Zaccaro L. An overview of peptide-based molecules as potential drug candidates for multiple sclerosis. Molecules 2021; 26(17): 5227.
4. Camarero JA, Campbell MJ. The potential of the cyclotide scaffold for drug development. Biomedicines 2019; 7(2): 31.
5. Narayani M, Chadha A, Srivastava S. Cyclotides from the Indian Medicinal Plant Viola odorata (Banafsha): Identification and Characterization. J Nat Prod 2017; 80(7): 1972–80.
6. Kwon S, Duarte JN, Li Z, Ling JJ, Cheneval O, Durek T, et al. Targeted Delivery of Cyclotides via Conjugation to a Nanobody. ACS Chem Biol 2018; 13(10): 2973–80.
7. Nguyen GKT, Zhang S, Nguyen NTK, Nguyen PQT, Chiu MS, Hardjojo A, et al. Discovery and characterization of novel cyclotides originated from chimeric precursors consisting of albumin-1 chain a and cyclotide domains in the Fabaceae family. J Biol Chem 2011; 286(27): 24275–87.
8. Rosengren KJ, Daly NL, Plan MR, Waine C, Craik DJ. Twists, knots, and rings in proteins. Structural definition of the cyclotide framework. J Biol Chem 2003; 278(10): 8606–16.
9. Zhang H, Chen S. Cyclic peptide drugs approved in the last two decades (2001–2021). RSC Chem Biol 2022; 3(1): 18-31.
10. Mourenza A, Ganesan R, Camarero JA. Resistance is futile: targeting multidrug-resistant bacteria with de novo Cys-rich cyclic polypeptides. RSC Chem Biol 2023; 4(10): 722-35.
11. Huang YH, Jiang Z, Du Q, Yap K, Bigot A, Kaas Q, Wang CK, Craik DJ. Scanning mutagenesis identifies residues that improve the long-term stability and insecticidal activity of cyclotide kalata B1. J Biol Chem 2024; 300(3): 105682.
12. Azmi S, Mustafa M, Shoaib S, Hussain MK. Structures, functions and therapeutic potential of cyclotides. JERP 2022; 7(4): 234-42.
13. Conzelmann C, Muratspahić E, Tomašević N, Münch J, Gruber CW. In vitro inhibition of HIV-1 by cyclotide-enriched extracts of Viola tricolor. Front Pharmacol 2022; 13: 888961.
14. Chia LY, Kumar PV, Maki MA, Ravichandran G, Thilagar S. A review: The antiviral activity of cyclic peptides. Int J Pept Res Ther 2022; 29(1): 7.
15. Poth AG, Colgrave ML, Lyons RE, Daly NL, Craik DJ. Discovery of an unusual biosynthetic origin for circular proteins in legumes. Proc Natl Acad Sci U S A 2011; 108(25): 10127-32.
16. Attah A, Fagbemi A, Olubiyi O, Dada-Adegbola H, Oluwadotun A, Elujoba A, et al. Therapeutic Potentials of Antiviral Plants Used in Traditional African Medicine With COVID-19 in Focus: A Nigerian Perspective. Front Pharmacol 2021; 12: 596855.
17. Herrmann A, Burman R, Mylne JS, Karlsson G, Gullbo J, Craik DJ, et al. The alpine violet, Viola biflora, is a rich source of cyclotides with potent cytotoxicity. Phytochemistry 2008; 69(4): 939–52.
18. Pränting M, Lööv C, Burman R, Göransson U, Andersson DI. The cyclotide cycloviolacin O2 from Viola odorata has potent bactericidal activity against Gram-negative bacteria. J Antimicrob Chemother 2010; 65(9): 1964–71.
19. Slazak B, Jacobsson E, Kuta E, Göransson U. Exogenous plant hormones and cyclotide expression in Viola uliginosa (Violaceae). Phytochemistry 2015; 117: 527–36.
20. Nguyen KNT, Nguyen GKT, Nguyen PQT, Ang KH, Dedon PC, Tam JP. Immunostimulating and Gram-negative-specific antibacterial cyclotides from the butterfly pea (Clitoria ternatea). FEBS J 2016; 283(11): 2067–90.
21. Bourque J, Hawiger D. Current and future immunotherapies for multiple sclerosis. Mo Med 2021; 118(4): 334-9.
22. Gründemann C, Koehbach J, Huber R, Gruber C. Do plant cyclotides have potential as immunosuppressant peptides? J Nat Prod 2012; 75: 167–74.
23. Gründemann C, Stenberg KG, Gruber CW. T20K: An Immunomodulatory Cyclotide on Its Way to the Clinic. Int J Pept Res Ther 2019; 25(1): 9–13.
24. Fahradpour M, Keov P, Tognola C, Perez-Santamarina E, McCormick PJ, Ghassempour A, et al. Cyclotides isolated from an ipecac root extract antagonize the corticotropin releasing factor type 1 receptor. Front Pharmacol 2017; 8: 616.

25. Claeson P, Göransson U, Johansson S, Luijendijk T, Bohlin L. Fractionation protocol for the isolation of polypeptides from plant biomass. J Nat Prod 1998; 61(1): 77–81.
26. Hashempour H, Koehbach J, Daly NL, Ghassempour A, Gruber CW. Characterizing circular peptides in mixtures: Sequence fragment assembly of cyclotides from a violet plant by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. Amino Acids 2013; 44(2): 581–95.
27. Ji X, Nielsen AL, Heinis C. Cyclic peptides for drug development. Angew Chem Int Ed Engl 2024; 63(3): e202308251.
28. Park S, Yoo K-O, Marcussen T, Backlund A, Jacobsson E, Rosengren KJ, et al. Cyclotide evolution: insights from the analyses of their precursor sequences, structures and distribution in violets (Viola). Front Plant Sci 2017; 8: 2058.
29. Poth AG, Colgrave ML, Philip R, Kerenga B, Daly NL, Anderson MA, et al. Discovery of cyclotides in the Fabaceae plant family provides new insights into the cyclization, evolution, and distribution of circular proteins. ACS Chem Biol 2011; 6(4): 345–55.
30. Fazeenah A, Quamri MA. Banafsha (Viola Odorata Linn.) -A review. World J Pharm Res 2020; 9(10): 514–37.
31. Slazak B, Kapusta M, Strömstedt AA, Słomka A, Krychowiak M, Shariatgorji M, et al. How Does the Sweet Violet (Viola odorata L.) Fight Pathogens and Pests – Cyclotides as a Comprehensive Plant Host Defense System. Front Plant Sci 2018; 9: 1296.
32. Svangård E, Göransson U, Hocaoglu Z, Gullbo J, Larsson R, Claeson P, et al. Cytotoxic cyclotides from Viola tricolor. J Nat Prod 2004; 67(2): 144–7.

DOI: *10.48305/jims.v42.i777.0657*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 42, No. 777, 1st Week, October 2024**

Received: 29.04.2024 Accepted: 14.09.2024 Published: 27.09.2024

Extraction, Purification and Characterization of Immunomodulatory Effects of Cyclotides Isolated from Viola Odorata

Ladan Dayani [1], Azade Taheri [1], Jaleh Varshosaz [1], Mehdi Aliomrani [2], Masoud Sadeghi Dinani [3], Hossein Hashempour [4]

Original Article

Abstract

Background: Plant cyclic peptides have displayed a diverse range of biological activities. Cyclic peptides exist in different plant families, such as Violaceae.

Methods: In this study, the existence of cyclic peptides in Viola odorata has been investigated. The plant materials were subjected to maceration in methanol: CH2-Cl2 (1:1; v/v), and then the crude extract passed through the C18 column by vacuum liquid chromatography method and fractionated into 50% and 80 % ethanol extract. The obtained fractions were analyzed by HPLC and MALDI-TOF. Finally, the 50% and 80% fractions were injected into the female C57BL/6 mice intraperitoneally at doses of 5, 50, and 100 mg/kg. The lymphocyte, monocyte, neutrophil, eosinophil, and white blood cell (WBC) counts of whole blood in different groups were compared before and 24 hours after the injection. The results confirmed the presence of cyclic peptides in Viola odorata.

Findings: The MALDI-TOF showed the mass weights of fractions were in the range of cyclic peptides. The 80% fraction at all doses reduced the number of lymphocytes and WBC. On the other hand, interestingly, the 50% fraction increased them.

Conclusion: The cyclic peptides can be used as immunomodulatory agents and, thus, can be effective in a wide range of diseases related to the immune system.

Keywords: Cyclic peptides; Viola odorata; Immunomodulating agents

Citation: Dayani L, Taheri A, Varshosaz J, Aliomrani M, Sadeghi Dinani M, Hashempour H. **Extraction, Purification and Characterization of Immunomodulatory Effects of Cyclotides Isolated from Viola Odorata.** J Isfahan Med Sch 2024; 42(775): 657-65.

1- Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

2 -Department of Toxicology and Pharmacology, School of Pharmacy, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran .

3 -Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

4 -Department of Chemistry, School of Basic Sciences, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran.MSc Student, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Azade Taheri, Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; Email: az.taheri@pharm.mui.ac.ir