Applied Biology
Online ISSN: 2538-3434
Homepage: http://sjoapb.journal.qom-iau.ac.ir

# Investigating the phytochemical, antimicrobial and anti-Alzheimer properties of lemon balm extract (Melissa officinalis)

**Giti Ghasemi** | Master's degree, Department of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran. giti.ghasemi91@gmail.com
**Amir Arasteh** | Assistant Professor, Department of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran **(Corresponding author).** arasteh@iau.ac.ir

## Abstract

**Objective:** Lemon balm (Melissa officinalis) is one of the most important medicinal plants and belongs to the mint family, which is known as a medicine that increases memory. The purpose of this study was to investigate the effective compounds, anti-microbial effects and inhibitory effects of hydroalcoholic extract of lemon balm for the production of amyloid nanofibers as an effective agent in Alzheimer's disease.

**Materials and methods:** The effective compounds of lemo balm plant were investigated by gas chromatography-mass spectrometry. Antimicrobial effects on two bacteria Escherichia coli and Staphylococcus aureus were investigated by well method and the values of minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration were determined. The inhibitory effects of lemon balm extract on the fibrillation of bovine serum albumin were investigated by Concord absorbance method.

**Findings:** The presence of the active substance pyrrolidinone was confirmed with a probability of 90%. The diameter of the halo of non-growth of hydroalcoholic lemon balm extract for Staphylococcus aureus and Escherichia coli was 20 and 17 mm, respectively, and the MIC and MBC values were 0.137, 0.068, 0.068, and 0.068 g/ml, respectively. Liter was obtained. The maximum inhibition of amyloid nanofibers was observed at a concentration of 4 mg/ml of lemon balm extract.

**Conclusion:** lemon balm extract with proper antimicrobial effects and lower side effects and cost than other synthetic drugs can have a good effect against infectious agents. By inhibiting the production of amyloid nanofibers, lemon balm extract can be useful for reducing the complications of Alzheimer's disease.

**Keywords:** Melissa officinalis, phytochemical, amyloid, Alzheimer's, lemon balm.

**Received:** 2023/07/02 ; **Revised:** 2023/08/20 ; **Accepted:** 2023/09/25 ; **Published online:** 2023/12/26

**Cite:** Rostami, Z. & Hassanpourezatti, M. (2023). Investigating the effect of methadone on lifespan up to the fourth generation, fertility, whole body malondialdehyde level and brain tissue damage in the first generation of Drosophila. *Applied Biology*, 13(4), p. 55-68.

**Article type:** Research Article © the authors **Publisher:** Qom Islamic Azad University

بیولوژی کاربردی
شاپا الکترونیکی: ۲۵۳۸-۳۴۳۴
Homepage: http://sjoapb.journal.qom-iau.ac.ir

# بررسی خواص فیتوشیمیایی، ضدمیکروبی و ضدآلزایمری عصاره بادرنجبویه (*Melissa officinalis*)

**گیتی قاسمی** | کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران. giti.ghasemi91@gmail.com
**امیر آراسته** | استادیار، گروه زیست‌شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران (**نویسنده مسئول**). arasteh@iau.ac.ir

## چکیده

**هدف:** بادرنجبویه (*Melissa officinalis*) یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی و از خانواده نعناعیان است که به‌عنوان یک داروی افزایش‌دهنده حافظه شناخته می‌شود. هدف این مطالعه بررسی ترکیبات موثره، اثرات ضدمیکروبی و اثرات مهارکنندگی عصاره هیدروالکلی بادرنجبویه برای تولید نانو رشته‌های آمیلوئیدی به‌عنوان یک عامل موثر در بیماری آلزایمر بوده است.

**مواد و روش‌ها:** ترکیبات موثره گیاه بادرنجبویه با روش گاز کروماتوگرافی جرمی بررسی شد. اثرات ضدمیکروبی روی دو باکتری *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* با روش چاهک بررسی شده و مقادیر حداقل غلظت مهاری و حداقل غلظت باکتری‌کشی تعیین گردید. اثرات مهارکنندگی عصاره بادرنجبویه بر فیبریلاسیون آلبومین سرم گاوی با روش جذب‌سنجی کنگورد بررسی شد.

**یافته‌ها:** حضور ماده موثره پیرولیدینون با احتمال حضور ۹۰٪ تایید شد. قطر هاله عدم رشد عصاره هیدروالکلی بادرنجبویه برای *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* به ترتیب ۲۰ و ۱۷ میلی‌متر و مقادیر MIC و MBC به ترتیب ۰/۱۳۷ و ۰/۰۶۸ و ۰/۰۶۸ و ۰/۰۶۸ گرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد. بیش‌ترین مهار نانو رشته‌های آمیلوئیدی در غلظت ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره بادرنجبویه مشاهده شد.

**نتیجه‌گیری:** عصاره بادرنجبویه با اثرات ضدمیکروبی مناسب و عوارض و هزینه کمتری نسبت به سایر داروهای سنتزی می‌تواند اثر مناسبی در برابر عوامل عفونت‌زا داشته باشد. عصاره بادرنجبویه با مهار تولید نانو رشته‌های آمیلوئیدی می‌تواند برای کاهش عوارض بیماری آلزایمر مفید باشد.

**کلیدواژه‌ها:** *Melissa officinalis*، فیتوشیمیایی، آمیلوئید، آلزایمر، بادرنجبویه.

**تاریخ دریافت:** ۱۴۰۲/۰۴/۱۱ ؛ **تاریخ بازنگری:** ۱۴۰۲/۰۵/۲۹ ؛ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۲/۰۷/۰۳ ؛ **تاریخ انتشار:** ۱۴۰۲/۱۰/۰۵
**استناد به این مقاله:** قاسمی، گیتی؛ آراسته، امیر (۱۴۰۲). بررسی خواص فیتوشیمیایی، ضدمیکروبی و ضدآلزایمری عصاره بادرنجبویه (*Melissa officinalis*). *بیولوژی کاربردی*، ۱۳(۴)، ص۵۵-۶۸.
**ناشر:** دانشگاه قم
**© نویسندگان**
**نوع مقاله:** پژوهشی

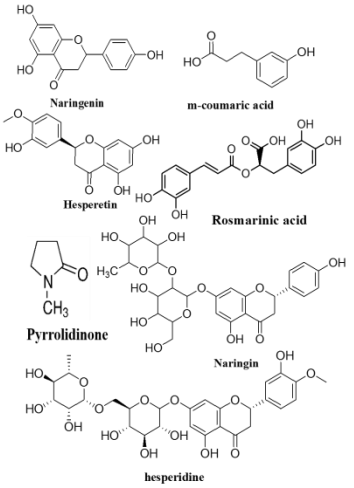
## ۱. مقدمه

بیماری آلزایمر[1] یکی از شایع‌ترین علل از دست دادن عملکرد ذهنی می‌باشد. ناهنجاری‌های پاتولوژیکی بیماری آلزایمر شامل رسوب دو پروتئین رشته‌ای است. این دو نوع پروتئین شامل پروتئین‌های بتا آمیلوئید و پروتئین‌های تائو هستند. پروتئین‌های بتا آمیلوئید دارای آپولیپوپروتئین E می‌باشند که در خارج نورون‌ها قرار دارند و پروتئین‌های تائو از میکروتوبول‌هایی مشتق می‌شوند که در داخل نورون‌ها قرار دارند. بسیاری از پروتئین‌ها، زمانی که شرایط طبیعی به حالت غیرطبیعی تبدیل می‌شود، تمایل شدیدی به ایجاد تجمعات رشته‌ای منظم آمیلوئیدی دارند. رشته‌های آمیلوئیدی تجمعات پلی پپتیدی با یک مرکز سازماندهی شده توسط رشته‌های بتا هستند که عمود بر محور اصلی فیبریل قرار گرفته‌اند. چنین ساختارهایی نقش کلیدی در بیماری‌های تحلیل برنده ایمنی مثل آلزایمر، پارکینسون و همچنین در ایجاد اختلال در نقل و انتقال اطلاعات ژنتیکی و ارتباطات سیناپسی مرتبط با حافظه برعهده دارند (۱). برای این کار میزان تولید رشته‌های آمیلوئیدی از آلبومین سرم گاوی[2] به عنوان یک پروتئین مدل و در دسترس در شرایط آزمایشگاهی و در حضور و عدم حضور عصاره بادرنجبویه با روش جذب‌سنجی کنگورد مورد بررسی قرار می‌گیرد. در صورتی که عصاره بادرنجبویه تولید رشته‌های آمیلوئیدی را مهار کند، دارای اثرات ضد آلزایمری و کاهنده اثرات جانبی بیماری آلزایمر خواهد بود.

گیاهان دارویی از مدت زمان طولانی به دلیل دسترسی آسان، ارزان بودن و عوارض جانبی کمتر در مقایسه با داروهای شیمیایی، برای درمان برخی از بیماری‌ها استفاده می‌شوند (۲). عصاره‌های گیاهی ترکیبات معطر، آب گریز، تغلیظ شده و فراری هستند که در سلول‌ها و کرک‌های ترشحی برگ‌ها، گل، میوه، جوانه و شاخه‌ها وجود دارند. در کنار خاصیت ضد میکروبی، عصاره‌ها دارای اثرات ضدقارچی، ضد ویروسی، ضد انگلی و غیره نیز می‌باشند (۳). گیاه بادرنجبویه با نام علمی *Melissa officinalis* یکی از مهم‌ترین گونه‌های دارویی، از خانواده نعناع‌سانان است. بادرنجبویه گیاهی معطر، پایا، ایستاده و علفی، به ارتفاع ۳۰ تا ۱۲۰ سانتیمتر، ساقه چهار گوش، افراشته و منشعب، سبز ک رنگ، پوشیده از کرک‌های نرم، برگ متقابل، برگ‌های پایینی قلبی و برگ‌های بالایی تخم‌مرغی شکل، حاشیه برگ دندانه‌دار یا کنگره‌دار، دارای رگبرگ‌های متعدد، به رنگ سبز متمایل به آبی، گل‌های کوچک، به رنگ سفید مایل به صورتی، دارای دم گل کوتاه و میوه فندقه کوچک، بذر

1. AD
2. BSA

تخم مرغی، سیاه رنگ و براق است و پیکر رویشی گیاه بوی خاصی تقریباً شبیه به لیمو دارد (۴). بیشترین ترکیب شناخته شده این گیاه رزمارینیك اسید و بعد از آن کوماریك اسید و کافئیك اسید می‌باشند. ترکیبات فلاونوئیدی گیاه شامل نارینجنین[۱]، هسپریدین[۲]، هسپرتین[۳]، نارینجین[۴] هستند که همگی خاصیت آنتی اکسیدانی دارند (۵). همچنین بادرنجبویه دارای ترکیبات منوترپن، سزکویی ترپن است و جز اصلی آن را سیترونلول (۳۰ تا ۴۰ درصد) سیترال، اوسمین و کاریوفیلن تشکیل می‌دهد (۶). از مواد موثره این گیاه، داروهایی برای درمان ناراحتی‌های عصبی و مداوای بیماری‌های معده، مسکن، درمان اختلالات گوارشی قلبی و روده‌ای با منشاء عصبی و اضطراب، ضدویروس، ضدباکتری، ضداسپاسم، ضدنفخ و آرام‌بخش به دست می‌آید (۷). شکل (۱) ساختار شیمیایی برخی از مواد موثره مهم عصاره بادرنجبویه و شکل (۲) نمونه‌ای از گیاه به همراه اطلاعات جغرافیایی رویشگاه‌های گیاه را نشان می‌دهد.




**شکل ۱- ساختار شیمیایی مهم‌ترین ترکیبات موجود در عصاره بادرنجبویه**

**شکل ۲- برگ‌های گیاه بادرنجبویه**

1. Naringenin
2. Hespiridin
3. Hesperetin
4. Naringin

بادرنجبویه در ایران تقریباً در اکثر نقاط کوهستانی می‌روید و در نواحی کوهستانی شمال کشور و شمال خراسان و نواحی زاگرس مرکزی به وفور یافت می‌شود. در این تحقیق علاوه‌بر اثر ضد میکروبی، اثر مهارکنندگی عصاره بادرنجبویه بر تولید رشته‌های آمیلوئیدی (موثر در ایجاد بیماری آلزایمر) مورد بررسی قرار گرفته است تا از این طریق اثر ضد آلزایمری ترکیبات موجود در عصاره و همچنین مکانیزم احتمالی آنها بررسی شود.

## ۲. مواد و روش‌ها

محیط‌های کشت مولر هینتون آگار و مولر هینتون براث از (Qlab) و موارد شیمیایی شامل سدیم فسفات دی بازیک، اسید سیتریک، کلرید پتاسیم و پودر کنگورد از شرکت مرک آلمان (Merck) تهیه شد. تجهیزات مهم شامل اسپکتروفوتومتر (SHIMADZU UV-1800، ژاپن)، میکروسکوپ الکترونی (Philips EM 2000، هلند)، طیف‌سنج جرمی (مدل 5977A با کروماتوگراف گازی مدل 7890B، Agilent، آمریکا) و کروماتوگرافی مایع در فشار بالا (Agilent 1200، آمریکا) مورد استفاده قرار گرفت. جهت ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی عصاره، از میکروارگانیسم‌های سویه استاندارد TTC شامل *اشریشیا کلی* (ATTC8739) و *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATTC6538) استفاده شد.

### ۲-۱. تهیه عصاره هیدروالکلی

ابتدا گیاه بادرنجبویه در آذر سال ۱۳۹۶ از ارتفاعات استان گیلان تهیه و جنس و گونه آن توسط استاد گیاه‌شناس دانشگاه علوم پزشکی گیلان تعیین گردید (*Melissa officinalis, record 340536*). پس از شستشو، در سایه خشک شد و در آزمایشگاه تحقیقاتی بیوشیمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت توسط آسیاب خرد گردید. برای تهیه عصاره هیدروالکلی، مقدار ۱۰ گرم از پودر گیاه بادرنجبویه در یک بشر، ۷۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد و ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر ریخته شد و محلول را به مدت ۲۴ ساعت در شیکر قرار داده و بعد از تنظیف عبور داده و داخل دستگاه تقطیر قرار گرفت تا حلال خارج شود. در انتهای عصاره‌گیری، برای از بین رفتن آلودگی احتمالی، به مدت ۲۴ ساعت تحت اشعه UV قرار گرفت و تا زمان استفاده، در یخچال به دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد (۸).

### ۲-۲. بررسی عصاره به روش گاز کروماتوگرافی جرمی (GC–Mass)

جهت تجزیه ترکیب‌های شیمیایی عصاره‌ها، به روش گاز کروماتوگرافی جرمی (GC–Mass)، ابتدا نمونه عصاره آماده شده بخش‌های مختلف گیاه به دستگاه گاز کروماتوگراف تزریق شده و مناسب‌ترین برنامه‌ریزی دمایی ستون برای جداسازی کامل ترکیب‌های عصاره مشخص گردید.

شناسایی ترکیب‌های عصاره با استفاده از شاخص بازداری و بررسی طیف‌های جرمی هر یک از اجزای عصاره و مقایسه آنها با طیف‌های مرجع انجام شد. سپس منحنی کروماتوگرام توسط دستگاه رسم گردید. در این مطالعه دستگاه کروماتوگراف گازی، از نوع دستگاه Agilent آمریکا، و مدل دستگاه کروماتوگراف گازی B۷۸۹۰ و طیف‌سنجی جرمی A۵۹۷۷ مورد استفاده قرار گرفت. برنامه دمایی oven از ۵۰ درجه سانتیگراد شروع و تا ۳۰۰ درجه سانتیگراد پایان یافت، و در ۳۰۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه قرار گرفت. دمای اتاقک تزریق نیز ۲۹۰ درجه سانتیگراد بود و از گاز هلیوم به عنوان گاز حامل با سرعت جریان ۰/۸ میلی‌لیتر در دقیقه استفاده شد (۸).

### ۲-۳. بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره هیدروالکلی به روش چاهک

سوسپانسیون باکتری‌های مورد مطالعه با استاندارد ۰/۵ مک فارلند تنظیم و با استفاده از سوآب استریل در محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد و در محیط کشت میکروبی مورد استفاده قرار گرفت (۹). سپس با استفاده از پیپت پاستور استریل چاهکی ایجاد کرده و میزان ۵۰-۷۰ میکرولیتر عصاره داخل چاهک ریخته و دیسک آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین و تتراسایکلین جهت مقایسه داخل پلیت گذاشته شد. سپس پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شدند و در پایان زمان انکوباسیون قطر هاله ممانعت از رشد محاسبه شد و با جدول قطر هاله عدم رشد آنتی بیوتیک‌های جنتامایسن و تتراسایکلین مقایسه گردید.

### ۲-٤. تعیین حداقل غلظت مهاری (MIC) و حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC)

حداقل غلظت مهار رشد و کشندگی این عصاره بر روی باکتری‌های پاتوژن مورد مطالعه براساس روش استاندارد ارزیابی شد. سوسپانسیون باکتری‌های مورد مطالعه با استاندارد ۰/۵ مک فارلند تنظیم گردید. برای این منظور ۶ لوله با رقت‌های ۱:۲ تا ۱:۶۴ برای هر دو باکتری مورد مطالعه، از عصاره بادرنجبویه تهیه شد. لازم به ذکر است که در هر کدام از مراحل یاد شده، شاهد مثبت و منفی در نظر گرفته شد. در ادامه، پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت در انکاباتور قرار داده شدند. بعد از انکوباسیون ۲۴ ساعته، برای هر لوله در محیط کشت مولر هینتون آگار با لوپ، کشت خطی انجام شد و مجدداً، پلیت‌ها به صورت وارونه در انکوباتور به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شده و از نظر رشد باکتری مورد بررسی قرار گرفتند. سپس در پایان زمان انکوباسیون (۲۴ ساعت) مقادیر حداقل غلظت مهار رشد و حداقل غلظت کشندگی (MBC) برحسب گرم بر میلی‌لیتر محاسبه شدند.

### ۲-۵. بررسی اثر ضد آلزایمری عصاره هیدروالکلی به روش طیف‌سنجی مرئی

در یک میکروتیوب ۲۰ میلی‌گرم پودر آلبومین سرم گاوی ریخته و یک میلی‌لیتر بافر سیترات-فسفات با pH ۳ به آن افزوده شده و خوب به‌هم زده شد. سپس در شش میکروتیوب دیگر هر کدام ۱۰۰ میکرولیتر از این محلول ریخته و ۳۰۰ میکرولیتر بافر سیترات فسفات اضافه شد. میکروتیوب‌ها با شماره ۱ تا ۶ شماره‌گذاری شده و مطابق جدول (۱) عمل شد.

**جدول ۱- تهیه رشته‌های آمیلوئیدی در حضور مقادیر مختلف عصاره گیاه بادرنجبویه**

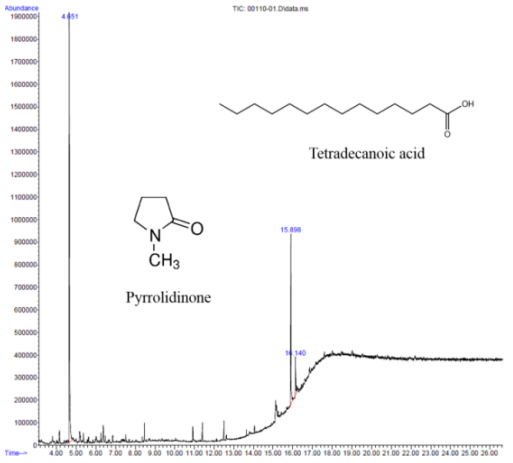
| شماره | محلول آلبومین سرم گاوی (میکرولیتر) | عصاره گیاهی (میکرولیتر) | بافر سیترات-فسفات (میکرولیتر) |
|---|---|---|---|
| ۱ | ۴۰۰ | ۱۰۰ | - |
| ۲ | ۴۰۰ | ۸۰ | ۲۰ |
| ۳ | ۴۰۰ | ۶۰ | ۴۰ |
| ۴ | ۴۰۰ | ۴۰ | ۶۰ |
| ۵ | ۴۰۰ | ۲۰ | ۸۰ |
| ۶ | ۴۰۰ | - | ۱۰۰ |

در هر میکروتیوب یک مگنت کوچک برنجی انداخته و با پارافیلم، دور در میکروتیوب را محکم بسته تا رطوبت خارج نگردد. میکروتیوب‌ها برای ۴۸ ساعت روی هیتر استایرر با دمای ۶۰ الی ۷۰ درجه سانتیگراد قرار گرفته و با دور (۱۰۰ دور در دقیقه) به هم زده شدند. میزان تولید رشته‌های آمیلوئیدی با استفاده از روش طیف‌سنج کنگورد مورد بررسی قرار گرفت. برای این کار به ۱۰۰ میکرولیتر از هر نمونه، ۱۹۰۰ میکرولیتر بافر کنگورد اضافه گردید و میزان جذب آن‌ها با اسپکتوفتومتر در محدوده بین ۴۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر خوانده شد (۱۰).

## ۳. یافته‌ها

### ۳-۱. نتایج حاصل از بررسی عصاره بادرنجبویه با کروماتوگرافی گازی- طیف‌سنجی جرمی (GC–Mass)

در شکل (۳) نمودار در زمان ۴/۶ دقیقه نشان داده شده با احتمال ۹۰ درصد حضور پیرولیدینون را برای عصاره بادرنجبویه تایید می‌کند.




**شکل ۳- گاز کروماتوگرام حاصل از بررسی عصاره *Melissa officinalis***

## ۳-۲. نتایج حاصل از بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره هیدروالکلی

اثر ضدمیکروبی عصاره بادرنجبویه با سه روش انتشار در آگار (چاهک آگار)، تعیین حداقل غلظت مهاری (MIC) و حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) بر روی باکتری گرم منفی *اشریشیاکلی* و باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد بررسی قرار گرفت. با ایجاد چاهک بر روی آگار و افزودن عصاره هیدروالکلی، نمونه‌ها برای ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شدند و قطر هاله عدم رشد پلیت با خطکش اندازه‌گیری شد. قطر هاله عدم رشد عصاره هیدروالکلی بادرنجبویه علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ۲۰ میلی‌متر و قطر هاله عدم رشد عصاره هیدروالکلی بادرنجبویه علیه باکتری *اشریشیاکلی* ۱۷ میلی‌متر گزارش شد. نتایج حاصل در جدول شماره (۲) نشان داده شده است.

**جدول ۲- جدول مقایسه‌ای قطر هاله عدم رشد عصاره هیدروالکلی *Melissa officinalis***

| باکتری مورد بررسی | عصاره بادرنجبویه (mm) | جنتامایسین (mm) | تتراسایکلین (mm) | شاهد منفی آب |
|---|---|---|---|---|
| *استافیلوکوکوس اورئوس* | ۲۰ | ۴۰ | ۴۵ | بدون هاله |
| *اشریشیاکلی* | ۱۷ | ۱۸ | ۱۹ | بدون هاله |

برای تعیین حداقل غلظت مهاری از عصاره بادرنجبویه، ابتدا یک میلی‌لیتر از عصاره به دقت وزن شد و غلظت عصاره به میزان میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محاسبه گردید. میزان حداقل غلظت ممانعت‌کننده عصاره هیدروالکلی بادرنجبویه لوله شماره (۲) با غلظت ۰/۱۳۷ گرم بر میلی‌لیتر در حضور باکتری

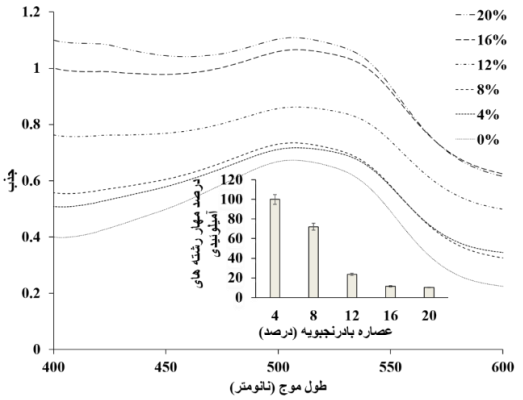
*استافیلوکوکوس اورئوس* تاییدی بر MIC و لوله شماره (۳) حاوی عصاره هیدروالکلی بادرنجبویه با غلظت ۰/۰۶۸ گرم بر میلی‌لیتر در حضور باکتری *شریشیاکلی* تاییدی بر MIC می‌باشد. برای تعیین حداقل غلظت باکتری‌کشی نیز به روش ذکر شده میزان غلظت عصاره محاسبه شد و پلیت شماره (۳) با غلظت ۰/۰۶۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره هیدروالکلی گیاه بادرنجبویه علیه سویه *اشریشیاکلی* و پلیت شماره (۳) با غلظت ۰/۰۶۸ گرم بر میلی‌لیتر علیه سویه *استافیلوکوکوس اورئوس*، تاییدی برای MBC است.

**جدول ۳- بررسی حداقل غلظت مهاری و حداقل غلظت باکتری‌کشی در عصاره بادرنجبویه**

| میکروارگانیزم | MIC (g/ml) | MBC (g/ml) |
|---|---|---|
| *استافیلوکوکوس اورئوس* | ۰/۱۳۷ | ۰/۰۶۸ |
| *اشریشیاکلی* | ۰/۰۶۸ | ۰/۰۶۸ |

## ۳-۳. نتایج حاصل از بررسی اثر ضد آلزایمری عصاره بادرنجبویه

اتصال کنگورد به رشته‌های آمیلوئیدی باعث افزایش میزان جذب می‌شود. نتایج بدست آمده نشان داد که با به‌کارگیری ۴ درصد عصاره بادرنجبویه در محلول تولید آمیلوئیدها می‌توان بیشترین مهار را در تولید آمیلوئید مشاهده کرد. همانطور که در شکل (۴) دیده می‌شود، بیشترین کاهش در میزان جذب نیز با بکارگیری ۴ درصد از عصاره در محلول مشاهده می‌شود که شاهد کم‌ترین میزان تولید رشته‌های آمیلوئیدی هستیم. با افزایش میزان عصاره، میزان جذب نیز بالا رفته است. این امر می‌تواند به دلیل تداخل ترکیبات موجود در عصاره (در طول موج بین ۴۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر) با طول موج جذبی رشته‌های آمیلوئیدی باشد.




**شکل ٤- درصد مهار تولید نانوبیوفیبریل‌های آمیلوئیدی در برابر درصد عصاره بادرنجبویه در محلول**

## ٤. بحث

در مطالعه حاضر با روش گاز کروماتوگرافی جرمی، حضور ترکیب پیرولیدینون[1] با احتمال ۹۰ درصد در عصاره گیاه بادرنجبویه شناسایی شد. در مطالعه عبدالنعیم و همکاران حضور ژرانیول[2]، نریل[3]، پالمیتیک اسید، میریستیک اسید و فیتول در عصاره بادرنجبویه تائید شد (۸). در عصاره برگ گیاه بادرنجبویه (طی تجزیه با دستگاه کروماتوگرافی متصل به طیف‌سنج جرمی) عمده‌ترین مواد به ترتیب ژرانیول[4] ۴۳/۱ درصد، نرول[5] ۳۳/۴ درصد، ژرانیول استات[6] ۲/۹ درصد و بتاکاریوفیلن[7] ۲/۴ درصد بوده است. در مطالعه سلیمانی و همکاران ترکیب‌های شیمیایی عصاره برگ بادرنجبویه شامل کاریوفیلن اکساید[8] ۲۴/۰۱درصد، آلفاپینن[9] ۱۴/۸۹ درصد، دلتا کادنین ۸/۶۴ درصد و ژرماکرن-D[10] ۴/۷۰ درصد بوده‌اند (۱۱). در بررسی‌های مختلف، که توسط مرادخانی و همکاران انجام شد، در عصاره بادرنجبویه تا ۶۶ ترکیب اسانسی، ۳۷ درصد مونوترپن[11]، ۲۰ درصد سزکویی ترپن[12] شناسایی شد و بیش از ۷۰ درصد عصاره برگ‌های بادرنجبویه شامل سیترونلول[13]، بتاکاریوفیلن[14]، نریل[15]، ژرانیول[16]، استات اوژنول[17]، اسیدهای فنولیک یک کربنه و فلاونوئیدها[18]، لوتئین-۷-گلوکوزید[19] بوده است (۱۲). این موارد، نتایج حاصل از این تحقیق را نیز تایید می‌کند. برخی تفاوت‌ها در نوع و درصد ترکیبات، مربوط به تفاوت در شرایط اقلیمی گیاه، قسمت‌های مورد آزمایش

1. Pyrrolidinone
2. Geraniol
3. Neryl
4. Geraniol
5. Nerol
6. Geraniol Acetate
7. β-Caryophyllene
8. Caryophyllene oxide
9. A-pinene
10. Germacrene-D
11. Monoterpene
12. Sesquiterpene
13. Citronellol
14. β-Caryophyllene
15. Neryl
16. Geraniol
17. Acetate Eugenol
18. Flavonoids
19. Lutein-7-glucoside

و یا حتی زمان برداشت و نحوه خشک کردن و عصاره‌گیری مربوط می‌شود.

روش‌های انتشار از دیسک و میکرودایلوشن (تعیین MIC و MBC) از روش‌های تشخیص خاصیت ضد باکتریایی عصاره‌های گیاهی می‌باشد. اغلب مطالعات انجام شده روی اثرات عصاره‌ها بر میکروارگانیسم‌های عامل فساد و پاتوژن‌های با فساد مواد غذایی، موافق این مسئله هستند که اثر اسانس‌ها روی باکتری‌های گرم مثبت قدری بیشتر از باکتری‌های گرم منفی است، که در بررسی‌های انجام شده این یافته مورد تایید قرار گرفته است (۱۳). با مطالعه روی اسانس گیاه بادرنجبویه مشخص شد که باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* حساس‌تر از باکتری گرم منفی *اشریشیاکلی* بود و از طرفی میزان حساسیت، تابعی از نوع و میزان عصاره بوده است. با توجه به بررسی‌های انجام شده، حساسیت آنتی‌بیوتیکی سوش‌های مختلف باکتری‌ها خیلی متنوع است. بعد از گذشت زمان لازم محیط‌های کشت شده مورد بررسی قرار گرفت. برخی از نمونه‌ها نسبت به عصاره بادرنجبویه تزریق شده به محیط کشت واکنش ضعیف‌تری نشان دادند و در روش چاهک برخی هاله‌های بسیار کم قطر و برخی هاله‌های وسیعی از عدم رشد را نشان دادند. *استافیلوکوکوس‌اورئوس* نسبت به *اشریشیاکلی* واکنش حساسیتی نشان داد و هاله عدم رشد *اشریشیاکلی* در حد حساسیت کم‌تر بروز کرد.

نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که میزان حداقل غلظت ممانعت‌کننده عصاره هیدروالکلی بادرنجبویه لوله شماره (۲) با غلظت ۰/۱۳۷ گرم بر میلی‌لیتر در حضور باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و لوله شماره (۳) حاوی عصاره هیدروالکلی بادرنجبویه با غلظت ۰/۰۶۸گرم بر میلی‌لیتر در حضور باکتری *اشریشیاکلی* می‌باشد. همچنین حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) نیز پلیت شماره (۳) با غلظت ۰/۰۶۸گرم بر میلی‌لیتر از عصاره هیدروالکلی گیاه بادرنجبویه در حضور باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و همینطور پلیت شماره (۳) با غلظت ۰/۰۶۸گرم بر میلی‌لیتر از عصاره هیدروالکلی گیاه بادرنجبویه در حضور باکتری *اشریشیاکلی* بوده است.

نتایج حاصل از روش انتشار در آگار با ایجاد چاهک بسیار، قابل قبول بوده است. بدین صورت که قطر هاله ممانعت از رشد عصاره هیدروالکلی گیاه بادرنجبویه علیه باکتری *اشریشیاکلی* ۱۷ میلی‌متر بود، این در حالی است که قطر هاله ممانعت از رشد آنتی بیوتیک‌های تتراسایکلین و جنتامایسین در این بخش به ترتیب ۱۹ و ۱۸ میلی‌متر بوده است که از این نظر، عصاره گیاه بادرنجبویه اثر ضد باکتری خود را به اثبات می‌رساند. همچنین عصاره بادرنجبویه علیه باکتری

*استافیلوکوکوس اورئوس* نیز فعالیت خوبی نشان داده است. قطر هاله ممانعت از رشد عصاره بادرنجبویه علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ۲۰ میلی‌متر بود. قطر هاله ممانعت از رشد آنتی بیوتیک‌های تتراسایکلین و جنتامایسین در این بخش به ترتیب ۴۵ و ۴۰ میلی‌متر بوده است. طبق این نتیجه، عصاره بادرنجبویه، اثر ضد باکتری خود را به اثبات می‌رساند. یافته‌های حاصل از ارزیابی توان ضدباکتریایی اسانس روغنی بادرنجبویه به روش دیسک در مطالعه محمودی و همکاران نیز نشان داد که اندام برگ، گل و ساقه گیاه بادرنجبویه به ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین اثر ضدباکتریایی را داشته‌اند. باکتری‌های *سودوموناس آئروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* بیش‌ترین قطر هاله عدم رشد باکتری را از عصاره برگ داشتند (۱۳).

در پژوهشی که روی تاثیر عصاره و اسانس گیاه بادرنجبویه علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکلی* در شرایط آزمایشگاهی صورت گرفت، نتایج مشابهی مبنی بر مهار رشد این باکتری‌ها توسط اسانس گیاه بادرنجبویه بدست آمد (۱۴، ۱۵).

نتایج حاصل از آزمایش انتشار از دیسک با عصاره هیدروالکلی نشان می‌دهد که عصاره بادرنجبویه اثر بیشتری بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* داشته است. علت حساسیت کمتر باکتری‌های گرم منفی، به اثرات ضد باکتریایی عصاره‌ها، به خاطر غشاء خارجی اطراف دیواره سلولی گرم منفی‌ها می‌باشد که سبب محدود کردن انتشار اجزای آبگریز اسانس‌ها به لایه لیپو پلی ساکاریدی می‌گردد. علت حساسیت کمتر باکتری‌های گرم منفی به اثرات ضد باکتریایی عصاره‌ها را می‌توان به لیپوپلی ساکاریدها در غشاء بیرونی باکتری‌های گرم منفی نسبت داد که آنها را ذاتاً به عوامل خارجی مثل رنگ‌های آب‌دوست، آنتی بیوتیک‌ها و شوینده‌ها مقاوم می‌کند. یک نکته در اینجا قابل ذکر است که باکتری‌های گرم مثبت *S.aureus* نسبت به عصاره بادرنجبویه از باکتری‌های گرم منفی *E.coli* حساس‌تر بودند. به دلیل وجود غشاءهای خارجی احاطه‌کننده دیواره سلولی در باکتری‌های گرم منفی، منطقی به نظر می‌رسد که این باکتری‌ها در برابر اثرات ضد باکتریایی عصاره‌ها حساسیت کمتری از خود نشان دهند. این غشاء خارجی انتشار مواد هیدروفوب میان این لایه پوشاننده لیپوپلی ساکاریدی را محدود می‌کند. در باکتری‌های گرم مثبت، تماس مستقیم ترکیبات هیدروفوب اسانس‌ها با این فسفولیپید دو لایه‌ای صورت می‌گیرد. این محل جایی است که این ترکیبات اثر خود را برجای می‌گذارند. این اثر یا به صورت افزایش نفوذپذیری یون‌ها و یا نشت ترکیبات حیاتی سلولی رخ می‌دهد و یا اینکه به‌صورت ناتوانی سیستم آنزیمی باکتریایی بروز می‌کند (۸).

## ۵. نتیجه‌گیری

با توجه به بررسی‌های انجام شده، در صورتی که ترکیبات موجود در عصاره‌های بادرنجبویه فرایند تولید رشته‌های آمیلوئیدی را کم کرده و یا مهار نمایند، اثرات ضد آلزایمری آن به عنوان یک گیاه دارویی پرکاربرد مورد تایید قرار می‌گیرد. اگر میزان تولید رشته‌های آمیلوئیدی، کاهش معنی‌داری ایجاد کند، دلیلی بر اثرات ضد آلزایمری عصاره بادرنجبویه با مکانیزم مهار تولید نانو رشته‌های آمیلوئیدی خواهد بود. در این تحقیق بیشترین مهار تولید رشته‌های آمیلوئیدی در غلظت ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره مشاهده شد که مبین اثرات ضدآلزایمری ترکیبات موجود در عصاره بادرنجبویه است. پیشنهاد می‌شود تا در تحقیقات آینده از سایر روش‌های ردیابی آمیلوئیدها نیز برای بررسی رشته‌های آمیلوئیدی استفاده شود.

## ٦. تشکر و قدردانی

نویسندگان از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت جهت ایجاد امکان استفاده از آزمایشگاه همکار استاندارد (SAHA)، کمال تشکر و قدردانی را دارند.

## References


1. Iadanza MG, Jackson MP, Hewitt EW, Ranson NA & Radford SE. A new era for understanding amyloid structures and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2018; 19(12): 755-73.
2. Ugboko HU, Nwinyi OC, Oranusi SU, Fatoki TH & Omonhinmin CA. Antimicrobial importance of medicinal plants in Nigeria. *The Scientific World Journal*. 2020; 1: 705-716
3. Jabborova D, Davranov K & Egamberdieva D. Antibacterial, antifungal, and antiviral properties of medical plants. *Medically Important Plant Biomes: Source of Secondary Metabolites*. 2019: 51-65. **DOI:** 10.1007/978-981-13-9566-6_3
4. Carvalho F, Duarte AP & Ferreira S. Antimicrobial activity of Melissa officinalis and its potential use in food preservation. *Food Bioscience*. 2021; 44: 101437.
5. Sepand M, Soodi M, Soleimani M & Hajimehdipoor H. Protective effects of Melissa officinalis extract against beta-amyloid-induced oxidative stress in PC12 cells. *Journal of Medicinal Plants.* 2012; 2(42): 74-85.
6. Serra E, Saubade F, Ligorio C, Whitehead K, Sloan A, Williams DW & et al. Methylcellulose hydrogel with Melissa officinalis essential oil as a potential treatment for oral candidiasis. *Microorganisms*. 2020; 8(2): 215.
7. Spadaccino G, Frabboni L, Petruzzi F, Disciglio G, Mentana A, Nardiello D & et al. Essential oil characterization of Prunus spinosa L., Salvia officinalis L., Eucalyptus globulus L., Melissa officinalis L. and Mentha x piperita L. by a volatolomic approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2021; 202: 114167.
8. Abdel-Naime W, Fahim J, Fouad M & Kamel M. Antibacterial, antifungal, and GC-MS studies of Melissa officinalis. *South African Journal of Botany*. 2019; 124: 228-34.
9. Borgheei S, Sarikhani H, Chaichi M & Kashi A. In vitro induction of polyploidy in lemon balm (Melissa officinalis L.). *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants.* 2010; 3(26): 7-15. [in persian]
10. Arasteh A, Rezaei MH, Habibi AE & Ali AMM. Bovine serum albumin aggregation: An optimizing approach. *Clinical Biochemistry.* 2011; 44(13): S136-S7.
11. Norouzi M, Soleimani T & Zanousi MP. Essential oil component in leaf and flower of Lemon balm (Melissa officinalis L.). *Research in Pharmaceutical Sciences.* 2012; 7(5): 749.
12. Moradkhani H, Sargsyan E, Bibak H, Naseri B, Sadat-Hosseini M, Fayazi-Barjin A & et al. Melissa officinalis L., a valuable medicine plant: A review. *Journal of Medicinal Plants Research.* 2010; 4(25): 2753-9.[in persian]
13. Mahmodi R, Amini K, Asadi Dashbolagh J & Farhoodi A. Antioxidant and antibacterial properties of Melissa officinalis essential oil. *J Qazvin Univ Med Sci.* 2016; 20(2): 49-57.
14. Schnitzler P, Schuhmacher A, Astani A & Reichling J. Melissa officinalis oil affects infectivity of enveloped herpesviruses. *Phytomedicine.* 2008; 15(9): 734-40.
15. Ehsani A, Alizadeh O, Hashemi M, Afshari A & Aminzare M (ed.). *Phytochemical, antioxidant and antibacterial properties of Melissa officinalis and Dracocephalum moldavica essential oils.* Veterinary Research Forum; Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran, 2017. [in persian]