Journal of Ilam University of Medical Sciences

P-ISSN: 1563-4728
E-ISSN: 2588-3135

Evaluating of the Inhibitory Effect of Caffeine on the Activity of Collagenase Enzyme Produced by the Bacterium *Cytobacillus Oceanisediminis*

Farzaneh Golabi [1], Zarrindokht Emami-Karvani [1*], Monir Doudi [1], Maryam Khademi Dehkordi [1], Kahin Shahanipour [2]

[1] Dept of Microbiology, Fal.C., Islamic Azad University, Isfahan, Iran
[2] Dept of Biochemistry, Fal.C., Islamic Azad University, Isfahan, Iran

Article Info

Article type:
Research article

Article History:
Received: Jul. 31, 2026
Received in revised form: Sep. 08, 2026
Accepted: Sep. 20, 2026
Published Online: Nov. 26, 2026

**** Correspondence to:***
Zarrindokht Emami-Karvani
Dept of Microbiology, Fal.C., Islamic Azad University, Isfahan, Iran

Email:
za.emami@iau.ac.ir

A B S T R A C T

Introduction: Despite their widespread applications in medicine, especially in the wound debridement process, in some pathological conditions such as chronic wounds and inflammatory diseases, their excessive activity causes tissue destruction and disruption of the healing process. Therefore, the use of natural inhibitors of this enzyme can provide a new approach to control enzyme activity and prevent tissue damage. Caffeine, as a natural alkaloid with antioxidant and anti-inflammatory properties, has the ability to inhibit proteolytic enzymes. The present study was conducted to quantitatively evaluate the inhibitory effect of caffeine on collagenase enzyme activity.

Materials & Methods: In this experimental study, the effect of different concentrations of caffeine (100, 250, 500, 750, and 1000 µg/mL) on the collagenase enzyme activity of the *Cytobacillus oceanisediminis* strain was investigated using a ninhydrin-based colorimetric method, and the results were statistically analyzed.

Results: The dose-response curve of caffeine was fitted using a four-parameter model with variable slope. The results showed that with increasing caffeine concentration, the measured response showed a decreasing trend. Based on the fitted model, the IC50 value was estimated to be 27.36 µg/mL. Also, the bottom value = 19.29 and the top value ≈ 184.9 were obtained, and the hill slope value was -1.937. The R^2 value of 0.5092 indicated that the model explained about 50.92% of the observed variation in the response. However, the 95% confidence interval for the main model parameters, including IC50, was very wide; therefore, the IC_{50} value obtained should be interpreted with caution.

Conclusion: Caffeine was identified as an effective collagenase inhibitor with an IC_{50} of about 27 µg/mL. Given the lack of concentration-response dependence over a wide range, it appears that the inhibitory mechanism of caffeine is saturable and a concentration of 100 µg/mL is sufficient to achieve the maximum inhibitory effect. These findings could provide a basis for the development of natural collagenase inhibitors for medical and cosmetic applications.

Keywords: Caffeine, Collagenase, Enzyme Inhibitor, *Cytobacillus Oceanisediminis*

Cite this paper: Golabi F, Emami-Karvani Z, Doudi M, Khademi Dehkordi M, Shahanipour K. Evaluating of the Inhibitory Effect of Caffeine on the Activity of Collagenase Enzyme Produced by the Bacterium *Cytobacillus Oceanisediminis*. *Journal of Ilam University of Medical Sciences*. 2026;34(5):76-91.

Introduction

Microorganisms are among the best agents for large-scale enzyme production due to their appropriate selection and high hydrolytic activity (1). Collagenases are obtained from microbial cells (especially Clostridium, Bacillus, and Vibrio) and also from animal tissues and cell lines (1). These enzymes are useful proteases and have wide industrial and pharmaceutical applications (2). Maintaining a balance of collagenase levels in the body is of high importance, since overexpression or deficiency of collagenases is associated with several diseases (3). Among the most prominent therapeutic uses of collagenases are enzymatic debridement of chronic wounds, burns, and bedsores; treatment of Dupuytren's and Peyronie's diseases; tissue repair; and cancer gene therapy (2,3). Conversely, the

© The Author(s)
Publisher: Ilam University of Medical Sciences

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-25]

destruction of type I and II collagen fibers by matrix metalloproteinases (MMPs) leads to skin aging and a reduction in skin elasticity (3). Therefore, it is important to regulate collagenase activity accurately by inhibitors (3). We pay special attention to natural inhibitors because they have fewer side effects (4)." Caffeine is a natural alkaloid with a purine nucleus, carbonyl groups, and a hydrophobic nature, which has the ability to bind to metalloproteinases' active site, bind to metal ions (zinc), and bind to amino acids (4,5). These properties make caffeine a good inhibitor and help in controlling collagen-related disorders and preventing skin aging (4,5). In this research we selected the collagenase-producing strain Cytobacillus oceanisediminis and investigated the possibility of regulating its enzyme activity by the natural inhibitor caffeine. While the inhibitory effect of caffeine on certain proteases is well known, little is known about its specific effect on collagenase and the precise estimation of its IC50. Hence, the present study aimed to quantitatively evaluate the inhibitory effect of caffeine on collagenase activity and accurately estimate its IC_{50} by applying advanced statistical models such as dose-response curve fitting, one-way analysis of variance (ANOVA), and Duncan's multiple range test.

Methods

Cytobacillus oceanisediminis was isolated from poultry litter with soil and identified by biochemical characterization and molecular identification by PCR and 16S rRNA gene sequencing. The sequencing result showed 99% similarity to the above species when compared with the NCBI database. The bacterium was selected as a collagenase producer. The strain was grown for enzyme production in a medium containing collagen, peptone, yeast extract and mineral salts at 37°C and 90 rpm for 48 h. The enzyme was precipitated by ammonium sulfate and the precipitate obtained after centrifugation was dissolved in sodium phosphate buffer. Then the enzyme was concentrated by removal of the excess salts by dialysis for 12-24 h at 4°C. Inhibition of caffeine was determined by ninhydrin-based colorimetric assay for in vitro collagenase activity in 96-well microplates. Inhibitors were studied at different concentrations of caffeine (100, 250, 500, 750 and 1000 µg/mL). The negative control was the assay buffer and the positive control was 100 µM EDTA. The enzyme was added and the mixture was incubated at 37°C. The collagen substrate was added and incubated for 60 minutes. The reaction was terminated by the addition of trichloroacetic acid and the ninhydrin reagent was added. The optical density (OD) of samples was read at 540 nm by ELISA reader. Finally, the calculated IC 50 value was used to calculate the percentage of enzymatic inhibition.

Results

Inhibitors effect on collagenase activity: The response (free amino acids release as a function of collagenase activity with different concentrations of caffeine) was examined. The mean response of the negative control group (no inhibitor) was 0.095. The response was significantly reduced (0.030) with the introduction of minimum caffeine concentration (100 µg/mL). Similar responses were observed with other concentrations of caffeine (250, 500, 750 and 1000 µg/mL and all were grouped in the same statistical group. Inhibitory potency of caffeine was determined by fitting a dose response curve using a 4-parameter logistic function with a variable slope. The results demonstrated that the response measured decreased with increasing caffeine concentration. The apparent IC50 of caffeine was estimated to be 27.36 µg/mL with bottom value 19.29, top value of approximately 184.9 and Hill slope of −1.937. The coefficient of determination (R^2=0.5092) showed that the model explained about 50.92% of the variation in the response. The primary parameters, especially the IC50, have wide 95% confidence intervals so values should be interpreted with caution. One-way ANOVA showed a significant effect of treatments on the response (F=9.345, P<0.0001) and treatments explained 73.2% of the variance (R^2=0.732). The adjusted R^2 of 0.653 and low MSE (≈0.000) indicate that the assay was highly accurate. The negative control had the highest response according to Duncan's multiple range test and was significantly different from all other groups. However, all caffeine concentrations (starting from 1000 µg/mL) were in a single statistical group and no significant differences were observed between them. This shows that the biological effect of caffeine is non-dose dependent in this range, reaching plateau at 100 µg/mL.

Conclusion

Bacterial virulence factors play a crucial role in host cell damage and tissue degradation. Microbial enzymes such as collagenases, proteases, hyaluronidases, and hemolysins are among the important virulence factors in bacteria. Bacterial collagenases degrade collagen and can damage skin cells, such as fibroblasts and keratinocytes, and this allows bacteria to invade deeper tissues. The identification of strong inhibitors of these enzymes is therefore very important for the development of standard treatments for skin infections and wounds.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-25]

The inhibitory effect of caffeine on the activity of the collagenase enzyme produced by the selected strain of Cytobacillus oceanisediminis was investigated using a dose-response curve, one-way analysis of variance (ANOVA), and Duncan's multiple range test. The results showed that caffeine had a significant inhibitory activity against this enzyme with the estimated IC50 value of about 27 µg/mL. This is in line with previous investigations on the identification of natural collagenase inhibitors such as plant extracts rich in polyphenols and compounds like catechins. The interaction with the active site of the enzyme or the structural changes can inhibit the activity of collagenase, as was shown in studies with these compounds. Caffeine is thought to inhibit collagenase because of its chemical structure, which consists of a purine nucleus, three methyl groups, and two carbonyl groups. The carbonyl groups could interact with the zinc ion present in the active site of the enzyme and hence inhibit its catalytic activity. Also, the purine core of caffeine is capable of having hydrophobic interactions with amino acids in the substrate binding region, which leads to changes in the enzyme conformation and hence, reduced binding of the substrate. To summarize, the results of this study indicate that caffeine might be a natural collagenase inhibitor. This compound may hold promise for future development of therapeutic agents for controlling collagen degradation, bacterial infections, and chronic wounds. However, complementary studies at molecular, cellular, and in vivo levels are required to confirm its inhibitory mechanism, efficacy, and safety.

Authors' Contribution

Conceptualization, Methodology, Validation, Formal Analysis: FG, ZDMK, Investigation, Resources: MD, Software, Data Curation: MKD, KSP, Writing–Original Draft Preparation, Writing–Review & Editing, Visualization, Supervision, Project Administration: ZDMK.

Ethical Statement

As this study did not involve any interventions on humans or animals, nor the collection of biological samples, it does not require an ethics code according to the criteria set by the Ethics Committee.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest regarding the publication of this article.

Funding

This study was funded personally by the PhD candidate, Farzaneh Golabi, and no financial support was received from any organization.

Acknowledgment

The authors express their gratitude to the staff of the Islamic Azad University, Falavarjan Branch, and the Microbiology Department's research laboratory for providing the necessary facilities and support for this research. This study was funded personally by the PhD candidate, Farzaneh Golabi; no financial assistance was received from any organization or institution.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-25]

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام

JIUMS

شاپای چاپی : ۱۵۶۳-۴۷۲۸

شاپای الکترونیک : ۲۵۸۸-۳۱۳۵

ارزیابی اثر مهارکنندگی کافئین بر فعالیت آنزیم کلاژناز تولیدشده توسط باکتری *Cytobacillus oceanisediminis*

فرزانه گلابی [۱]، زرین دخت امامی کرونی [۱*]، منیر دودی [۱]، مریم خادمی دهکردی [۱]، کهین شاهانی پور [۲]

[۱] گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

[۲] گروه بیوشیمی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۰۵/۱۲

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۵/۰۶/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۶/۲۹

تاریخ انتشار: ۱۴۰۵/۰۹/۰۵

نویسنده مسئول:

زرین دخت امامی کرونی

گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

Email:

za.emami@iau.ac.ir

چکیده

مقدمه: کلاژنازهای میکروبی علیرغم کاربردهای گسترده در پزشکی، به‌ویژه در فرایند دبریدمان زخم، در برخی شرایط پاتولوژیک نظیر زخم‌های مزمن و بیماری‌های التهابی، فعالیت بیش‌ازحد آن‌ها موجب تخریب بافت و اختلال در روند ترمیم می‌شود؛ ازاین‌رو، استفاده از مهارکننده‌های طبیعی این آنزیم می‌تواند رویکردی نوین برای کنترل فعالیت آنزیم و جلوگیری از آسیب‌های بافتی ارائه دهد. کافئین به‌عنوان یک آلکالوئید طبیعی با خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی، توانایی مهار آنزیم‌های پروتئولیتیک را دارد. پژوهش حاضر با هدف ارزیابی کمی اثر مهارکنندگی کافئین بر فعالیت آنزیم کلاژناز انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعهٔ تجربی، اثر غلظت‌های مختلف کافئین (۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بر فعالیت آنزیم کلاژناز سویهٔ *Cytobacillus oceanisediminis* با روش رنگ‌سنجی مبتنی بر نین‌هیدرین انجام گردید و نتایج از لحاظ آماری تجزیه‌وتحلیل شد.

یافته‌های پژوهش: برازش منحنی دوز پاسخ کافئین با استفاده از الگوی چهارپارامتری با شیب متغیر انجام گردید. نتایج نشان داد، با افزایش غلظت کافئین، پاسخ اندازه‌گیری‌شده روند کاهشی نشان داده است. بر اساس الگوی برازش‌شده، مقدار IC50 برابر با 36/27 µg/mL برآورد شد؛ همچنین مقدار Bottom=19.29 و Top ≈184.9 به‌دست آمد و مقدار شیب هیل برابر با ۱/۹۳۷- بود. مقدار R^2=0.5092 نشان داد، الگو حدود ۵۰/۹۲ درصد از تغییرات مشاهده‌شده در پاسخ را توضیح می‌دهد. بااین‌حال، فاصلهٔ اطمینان ۹۵ درصد برای مؤلفه‌های اصلی مدل، ازجمله IC50، بسیار گسترده بود؛ بنابراین، مقدار IC_{50} به‌دست‌آمده باید با احتیاط تفسیر شود.

بحث و نتیجه‌گیری: کافئین به‌عنوان یک مهارکنندهٔ مؤثر کلاژناز با IC_{50} حدود ۲۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر شناسایی شد. با توجه به وابسته نبودن پاسخ به غلظت در محدوده وسیع، به‌نظر می‌رسد، سازوکار مهار کافئین از نوع اشباع‌پذیر است و غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای دستیابی به حداکثر اثر مهاری کافی است. این یافته‌ها می‌تواند مبنایی برای توسعهٔ مهارکننده‌های طبیعی کلاژناز در کاربردهای پزشکی و آرایشی بهداشتی فراهم آورد.

واژه‌های کلیدی: کافئین، کلاژناز، مهارکنندهٔ آنزیمی، Cytobacillus oceanisediminis

استناد: گلابی فرزانه، امامی کرونی زرین دخت، دودی منیر، خادمی دهکردی مریم، شاهانی پور کهین. ارزیابی اثر مهارکنندگی کافئین بر فعالیت آنزیم کلاژناز تولیدشده توسط باکتری Cytobacillus oceanisediminis. *مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام*، آذر ۱۴۰۵؛ ۳۴(۵): ۹۱-۷۶.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-25]

CC BY NC

مقدمه

میکروارگانیسم‌ها یکی از بهترین عوامل برای تولید آنزیم‌ها هستند و انتخاب صحیح میکروب و همچنین فعالیت هیدرولیتیک و ویژگی‌های بستر مناسب، عوامل مهمی برای تولید در مقیاس بزرگ هستند. کلاژنازها هم از سلول‌های میکروبی و هم از بافت‌های حیوانی جداسازی می‌شوند. پروکلاژنازها از کشت انواع رده‌های سلولی ازجمله فیبروبلاست‌ها ترشح می‌گردند. آن‌ها بیشتر از اندام احشایی ماهی و حیوانات دیگر استخراج می‌شوند (۱). شناخته‌شده‌ترین کلاژنازهای میکروبی به‌ترتیب از کلستریدیوم‌ها، باسیلوس‌ها و در درجهٔ سوم از ویبریوها ترشح و تا حدی خالص‌سازی شده است. تحقیقات نشان داده است که کلاژنازهای میکروبی به‌عنوان آنزیم‌های پروتئولیتیک مفید، برای مقاصد صنعتی و دارویی مورد توجه قرار گرفته‌اند (۲). نقش کلاژناز در بیماری‌های متعدد انسانی می‌تواند به علت تولید بیش‌ازحد کلاژناز یا مقدار ناکافی کلاژناز در بدن باشد. کلاژنازها کاربردهای درمانی غیرتهاجمی مختلفی مانند درمان دوپویترن و پیرونی، سوختگی، ترمیم زخم، فتق دیسک بین مهره‌ای کمر، انسداد کلی مزمن، بازسازی قلب، گلوکوم، ترمیم غضروف، فیبروئید رحمی، سلولیت، کلوئید، درد نوک سینه و تخریب جفت باقی‌ماندهٔ انسان و ژن‌درمانی سرطان دارند (۳، ۲). یکی از شناخته‌شده‌ترین کاربردهای کلاژنازهای میکروبی در پاک‌سازی زخم‌ها و سایر صدمات ناشی از برداشتن بافت‌های ازبین‌رفته است. دبریدمان روشی برای درمان زخم در پوست است که شامل تمیز کردن کامل زخم و از بین بردن همهٔ هیپرکراتوز (پوست ضخیم یا پینه)، بافت عفونی و غیرزنده (نکروزشده یا مرده)، بقایای خارجی و مواد باقی‌مانده از پانسمان است. این روش برای درمان زخم بستر و درمان زخم‌های سوختگی، زخم‌های مزمن التیام‌نیافته و درمان زخم‌هایی استفاده می‌شود که در مرحلهٔ التهابی زخم متوقف‌شده است. مدیریت این زخم‌های مزمن یا التیام‌نیافته مشکل بالینی دشواری است و جستجوی مؤثر برای درمان آن‌ها سال‌ها به‌عنوان یک هدف کلیدی مطرح بوده است. بدین منظور، دبریدمان آنزیمی از بیش از نیم‌قرن پیش، به‌عنوان یک روش درمانی پیشنهادشده است و تا به امروز به‌طور مداوم اعمال گردیده است. نشان داده‌شده است که این آنزیم به برخی از نشانگرهای تومور متصل می‌شود و می‌تواند برای درمان سرطان‌های مختلف استفاده گردد (۳). ماتریکس متالوپروتئینازها گروهی از پروتئینازهای حاوی روی هستند. آنزیم کلاژناز به‌صورت بینابینی شروع‌کنندهٔ تجزیه بیشتر ماتریکس متالوپروتئینازهای نوع I و II شده است. کاهش هر دوی این فیبرهای ساختاری در پوست باعث کاهش یکپارچگی پوست و کاهش خاصیت ارتجاعی می‌شود که به پیری پوست و تشکیل چین‌وچروک کمک می‌کند (۵، ۴).

در پژوهش‌های متعدد انجام‌شده ثابت گردید که تنظیم دقیق فعالیت کلاژناز از طریق مهارکننده‌های اختصاصی، رویکردی حیاتی در مدیریت بیماری‌های مرتبط با کلاژن به‌شمار می‌رود (۶-۷)

مهارکننده‌های طبیعی کلاژناز به علت عوارض جانبی کمتر، زیست‌تخریب‌پذیری و دسترسی آسان، توجه ویژه‌ای را در سال‌های اخیر به خود جلب کرده‌اند (۸). کافئین (۱ و ۳ و ۷-تری‌متیل‌گزانتین) یک آلکالوئید طبیعی است که به‌طور گسترده در قهوه، چای و سایر نوشیدنی‌ها یافت می‌شود و خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و مهارکنندگی آنزیم‌های مختلفی دارد (۹)

مطالعات پیشین نشان داده‌اند، کافئین می‌تواند با اتصال به جایگاه فعال متالوپروتئینازها و ایجاد تداخل با یون‌های فلزی (به‌ویژه روی)، فعالیت کاتالیزوری آن‌ها را مهار کند (۱۰، ۹). ساختار شیمیایی کافئین شامل هستهٔ پورین با گروه‌های کربونیل و نیتروژن‌های با جفت الکترون آزاد است که قابلیت تشکیل کمپلکس با یون‌های فلزی را دارد (۱۱)؛ همچنین ماهیت آب‌گریز کافئین امکان برهمکنش با باقی‌مانده‌های آمینواسید آب‌گریز در ناحیهٔ اتصال سوبسترا را فراهم می‌کند (۱۲).

در جمع‌بندی مطالب می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد، با توجه به کاربردهای مختلف کلاژناز، در برخی موارد به مهارکننده و در برخی موارد به فعال‌کنندهٔ آنزیم نیاز است؛ به‌عنوان‌مثال، هنگامی‌که از کلاژناز برای ترمیم انواع زخم‌ها

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-25]

مانند سوختگی‌ها، جراحی-ها، زخم‌های بستر، زخم سالک و زخم‌های دیابتی استفاده می‌شود تا زمان از بین رفتن جای اسکار این k,u از زخم‌ها و تا زمانی که به پوست سالم آسیبی وارد نکند، فعالیت بیشتر آنزیم کلاژناز در حضور فعال‌کنندگان آنزیم مورد نیاز است و پس از برطرف شدن اسکار انواع زخم‌ها، فعالیت آنزیم باید به‌سرعت مهار گردد تا آسیبی به پوست سالم وارد نشود. این موارد نیز تا حدودی در مقالات بررسی‌شده است که کلاژناز نقش منحصربه‌فردی در تجزیهٔ کلاژن و ترمیم زخم‌هایی دارد که در برابر تجزیه توسط سایر پروتئازها مقاوم‌اند؛ بنابراین، در این پژوهش سویهٔ *Cytobacillus oceanisediminis* مولد کلاژناز انتخاب شد. در ادامه، امکان سنجش کنترل فعالیت این آنزیم با استفاده از مهارکنندهٔ طبیعی کافئین که به‌راحتی قابل‌دسترس و خالص‌سازی است، با استفاده از روش رنگ‌سنجی مبتنی بر نین‌هیدرین ارزیابی و مقایسه گردید (۱۳). علی‌رغم شواهد موجود مبنی بر اثر مهاری کافئین بر برخی پروتئازها، اطلاعات اندکی دربارهٔ اثر اختصاصی آن بر کلاژناز و برآورد کمی IC_{50} آن وجود دارد. در این مطالعه، ارزیابی کمی اثر مهارکنندگی کافئین بر فعالیت آنزیم کلاژناز و برآورد دقیق IC_{50} آن با استفاده از مدل‌های آماری پیشرفته شامل برازش منحنی دوز-پاسخ، تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون چنددامنه‌ای دانکن انجام شد.

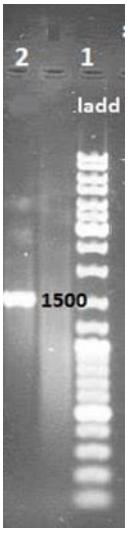
مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر توصیفی و از نوع همبستگی است. جامعهٔ تولید آنزیم توسط سویهٔ جداسازی‌شده و خالص‌سازی نسبی آن: سویهٔ منتخب *Cytobacillus oceanisediminis* از خاک حاوی پای مرغ جدا گردید. این سویه پس از بررسی آزمایش‌های بیوشیمیایی مطابق جدول شمارهٔ ۱ و همچنین شناسایی مولکولی با استفاده از روش PCR و محصول PCR ژن S rRNA۱۶، به‌وسیلهٔ الکتروفورز ژل آگارز ارزیابی شد. شکل شمارهٔ ۱ نتایج الکتروفورز محصول PCR باکتری را بر روی ژل آگارز ۱ درصد نشان می‌دهد که حاصل تکثیر ژن باندی با اندازهٔ 1500 bp است. پس از تعیین توالی و با استفاده از داده‌های بانک ژنی (http: //www.NCBI)، شباهت ۹۹ درصدی باکتری را با گونهٔ *Cytobacillus oceanisediminis* مشخص گردید. این سویه مولد آنزیم کلاژناز بود که با خالص‌سازی نسبی آنزیم آن با استفاده از سولفات آمونیوم و کیسهٔ دیالیز، بر اساس روش انجام‌شدهٔ بغدادی و همکاران برای مطالعهٔ بررسی اثر مهارکنندگی کافئین انتخاب شد (۱۴). باکتری کشت‌داده‌شده در محیط کشت (حاوی ۲۰ گرم کلاژن، ۵ گرم پپتون،۳ گرم عصارهٔ مخمر، ۵ گرم سدیم کلرید، ۰/۵ گرم کلسیم کلرید دوآبه، منیزیم سولفات ۷ آبه، ۱ گرم پتاسیم هیدروژن فسفات، ۰/۵ گرم و ۱ گرم مونو پتاسیم فسفات) به‌منظور تولید آنزیم کلاژناز کشت گردید و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد روی شیکر با دور 90 rpm قرار گرفت و سپس با افزودن تدریجی نمک (تقریباً با ۴۵ گرم سولفات آمونیوم) رسوب داده شد و درنهایت، با سانتریفوژ کردن و جمع‌آوری رسوب و سپس با حل کردن رسوب (در بافر فسفات سدیم ۰/۰۱ مولار) صورت گرفت. از این رسوب حل‌شده که حاوی آنزیم کلاژناز است، با حذف نمک اضافی و تغلیظ آنزیم در ۲ لیتر بافر فسفات ۰/۰۱ مولار در دمای ۴ درجه، به مدت ۱۲-۲۴ ساعت توسط کیسهٔ دیالیز، آنزیم کلاژناز استخراج و استفاده گردید (۱۰).

جدول شمارهٔ ۱. نتایج تست‌های بیوشیمیایی سویهٔ مدنظر

تخمیر مانیتول	تخمیر گزیلوز	تخمیر لاکتوز	تخمیر گلوکز	هیدرولیز ژلاتین	تحمل نمک	کاتالاز	اکسیداز	VP	MR	اندول	هیدروژن سولفات	سیترات	حرکت	تست‌های بیوشیمیایی
-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	نتایج

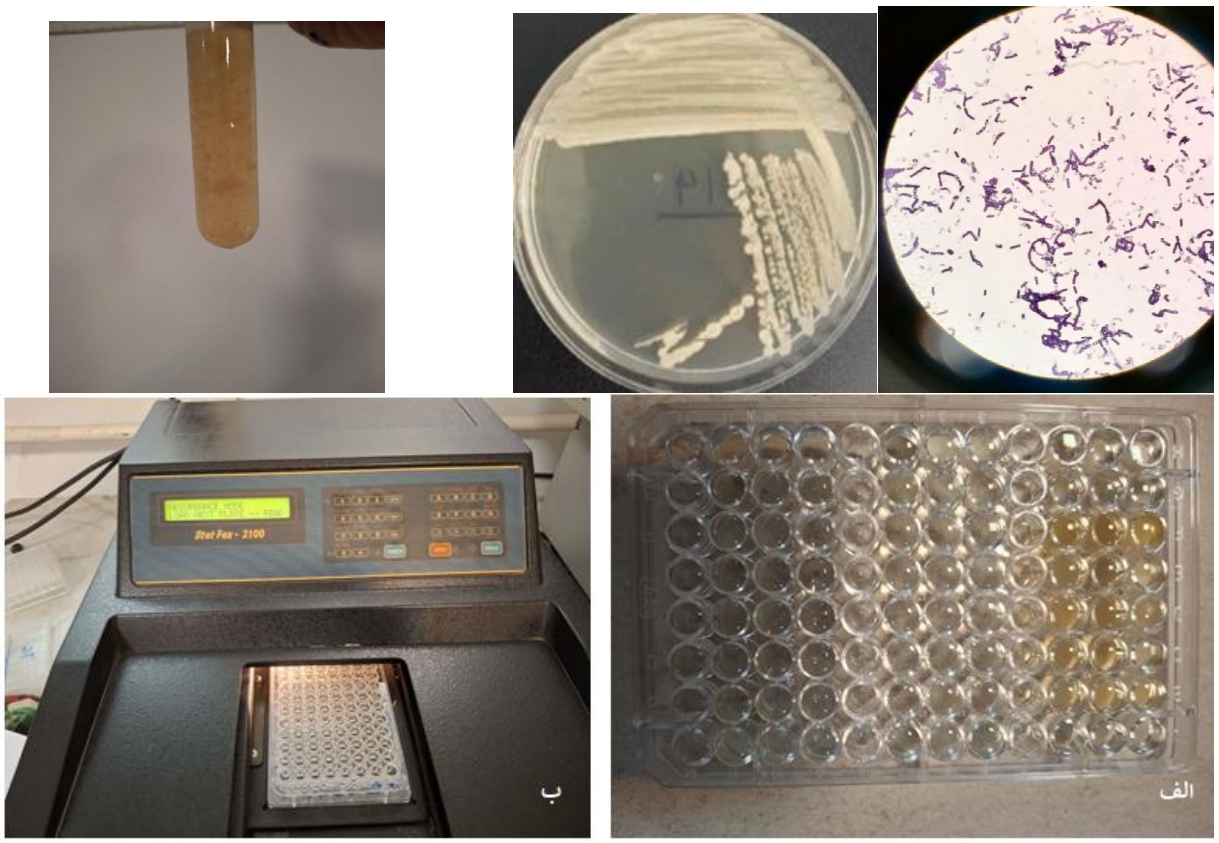
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-25]



شکل شمارهٔ ۱. نتایج الکتروفورز محصول PCR ژن S rRNA۱۶

بررسی اثر مهارکنندهٔ کافئین بر فعالیت آنزیم کلاژناز: بررسی خاصیت مهارکنندگی ترکیب طبیعی کافئین روی فعالیت آنزیم در شرایط In vitro، با روش رنگ‌سنجی مبتنی بر نین‌هیدرین و در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای انجام شد. به هر ردیف از خانه‌های یک پلیت ۹۶ خانه، ۸۰ میکرولیتر بافر سنجش (تریسین ۵۰ میلی‌مولار، NaCl ۴۰۰ میلی‌مولار، $CaCl_2$ ۱۰ میلی‌مولار، با pH 5/7 در یخچال 4^oC نگهداری شود) اضافه گردید. به هر خانه ۱۰ میکرولیتر از محلول مهارکنندهٔ کافئین از غلظت‌های ۱۰۰۰، ۷۵۰، ۵۰۰، ۲۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اضافه برای کنترل منفی، ۱۰ میکرولیتر بافر سنجش اضافه شد. برای کنترل مثبت، ۱۰ میکرولیتر از محلول EDTA ۱۰۰ میکرومولار اضافه گردید و به‌جز بلانک که تنها حاوی سوبسترا است، به همهٔ خانه‌ها ۱۰ میکرولیتر محلول آنزیمی اضافه شد؛ سپس میکروپلیت در دمای $37C^o$ به مدت ۲۰ دقیقه، به‌منظور برهم‌کنش آنزیم و مهارکننده انکوبه گردید. پس از انکوباسیون، به همهٔ خانه‌ها (به‌جز بلانک‌ها)، ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترای کلاژناز ۰/۵ درصد اضافه شد و میکروپلیت در دمای $37C^o$ به مدت ۶۰ دقیقه انکوبه شد. به‌منظور توقف واکنش، به هر خانه ۱۰۰ میکرولیتر از محلول اسید تری‌کلرواستیک ۱۰ درصد اضافه گردید. درنهایت، به هر خانه ۱۰۰ میکرولیتر از معرف نین‌هیدرین ۲ درصد اضافه شد و میکروپلیت در دمای 80-100C° به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت. رنگ‌سنجی با استفاده از دستگاه خوانش ELISA انجام شد و جذب نوری در طول‌موج ۵۴۰ نانومتر گزارش گردید (شکل شمارهٔ ۱). مهارکنندگان با کاهش فعالیت آنزیم، اسید آمینهٔ آزاد کمتری آزاد می‌کنند و کاهش رنگ نشان‌دهندهٔ مهار عملکرد آنزیم بود. نتایج به‌صورت غلظت مهاری نصف حداکثر (IC50) گزارش شد. این روش یک اندازه‌گیری کمی است که نشان می‌دهد، چه مقدار از یک مادهٔ بازدارندهٔ خاص (به‌عنوان‌مثال کافئین) در شرایط آزمایشگاهی، قادر به مهار ۵۰ درصدی یک فرایند بیولوژیکی خاص (مانند تأثیر آنزیم کلاژناز بر سوبسترای کلاژناز) است (۱۶-۱۵).

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-25]



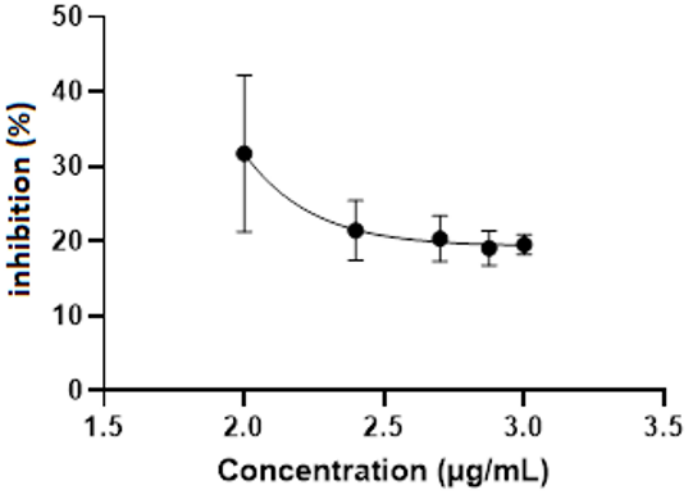
شکل شمارهٔ ۲. تصویر بالا کلنی و تصویر میکروسکوپی از سویهٔ *Cytobacillus oceanisediminis* و آنزیم جداسازی‌شدهٔ آن و تصویر پایین آزمایش اثر مهارکننده‌ها بر فعالیت آنزیم کلاژناز در پلیت ۹۶ خانه (الف) و خوانش نتایج با دستگاه خوانش ELISA را نشان می‌دهد

یافته‌های پژوهش

تأثیر مهارکننده‌ها بر فعالیت آنزیم کلاژناز: بررسی میزان پاسخ (تولید اسیدهای آمینهٔ آزاد ناشی از فعالیت آنزیم کلاژناز در حضور غلظت‌های مختلف کافئین) نشان داد که در گروه شاهد منفی (بدون مهارکننده)، میانگین پاسخ برابر با ۰/۰۹۵ بود. در حضور حداقل غلظت کافئین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، میزان پاسخ به‌طور چشمگیری به ۳۰ درصد کاهش یافت. سایر غلظت‌های کافئین (۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) نیز پاسخ‌هایی بسیار نزدیک به غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نشان دادند که همگی در یک گروه آماری قرار گرفتند (جدول شمارهٔ ۱ و شکل شمارهٔ ۳).

برازش منحنی دوز پاسخ کافئین با استفاده از الگوی چهارپارامتری با شیب متغیر انجام شد. نتایج نشان داد، با افزایش غلظت کافئین، پاسخ اندازه‌گیری‌شده روند کاهشی نشان داد. بر اساس الگوی برازش‌شده، مقدار IC_{50} برابر با 36/27 µg/mL برآورد گردید؛ همچنین مقدار Bottom=19.29 و Top ≈184.9 به‌دست آمد و مقدار شیب هیل برابر با ۱/۹۳۷- بود. مقدار R^2=0.5092 نشان داد که الگو حدود ۵۰/۹۲ درصد از تغییرات مشاهده‌شده در پاسخ را توضیح می‌دهد. بااین‌حال، فاصلهٔ اطمینان ۹۵ درصد برای مؤلفه‌های اصلی مدل ازجمله IC_{50}، بسیار گسترده بود؛ بنابراین، مقدار IC_{50} به‌دست‌آمده باید با احتیاط تفسیر شود. مقدار Sy.x ۵/۱۷۳ = نیز نشان‌دهندهٔ خطای استاندارد برازش مدل بود. درمجموع، کافئین در شرایط آزمایش حاضر IC_{50} ظاهری برابر با 36/27 µg/mL داشت (شکل شمارهٔ ۳).

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-25]



شکل شمارهٔ ۳. مهارکنندگی کافئین

نتایج تجزیه واریانس یک‌طرفه نشان داد، اثر تیمارها بر Response معنی‌دار بود (F=5.729؛ df=10؛ P<0.001)؛ بنابراین، بین میانگین حداقل دو گروه از تیمارهای بررسی‌شده اختلاف معنی‌داری وجود داشت. مقدار R^2=0.732 نشان داد، الگوی تیماری توانست ۷۳/۲ درصد از تغییرات کل Response را توضیح دهد؛ همچنین میانگین مربعات خطا برابر با ۳۸۴/۳۸۱ و RMSE برابر با ۱۹/۶۰۶ بود (جدول شمارهٔ ۲).

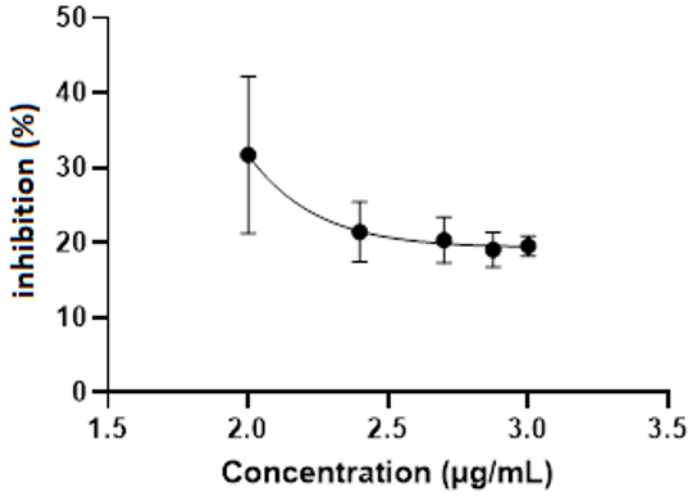
جدول شمارهٔ۲. نتایج تحلیل واریانس یک‌طرفه برای اثر غلظت‌های مختلف کافئین بر متغیر پاسخ

منبع تغییرات	درجهٔ آزادی (df)	مجموع مربعات (SS)	میانگین مربعات (MS)	F	P-value
تیمار	7	0/020	0/003	9/345	<0/001
خطا	24	0/007	0/000	—	—
کل اصلاح‌شده	31	0/027	—	—	—

به‌منظور بررسی اثر غلظت‌های مختلف کافئین بر متغیر پاسخ، از تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) استفاده شد. نتایج نشان داد، اثر تیمارهای مختلف بر متغیر پاسخ از نظر آماری بسیار معنی‌دار است (F=9.345؛P<0.0001)؛ بنابراین، فرض صفر مبنی بر برابری میانگین همهٔ تیمارها رد گردید و مشخص شد که حداقل یکی از غلظت‌های کافئین موجب تغییر معنی‌دار در مقدار پاسخ شده است. مجموع مربعات ناشی از تیمار برابر با ۰۲۰ /۰ و مجموع مربعات خطا برابر با ۰۰۷ /۰ بود؛ همچنین میانگین مربعات تیمار (۰/۰۰۳) در مقایسه با میانگین مربعات خطا به‌مراتب بزرگ‌تر بود و درنتیجه، آمارهٔ F برابر با ۳۴۵ ۳۴۵ /۹ به‌دست آمد. این نتایج نشان می‌دهد، بخش عمدهٔ تغییرات مشاهده‌شده در متغیر پاسخ ناشی از اثر تیمارهای مختلف کافئین بوده است. ضریب تعیین مدل (R^2=0.732) نشان می‌دهد، ۷۳/۲ درصد از تغییرات متغیر پاسخ توسط غلظت‌های مختلف کافئین تبیین می‌شود، درحالی‌که ۲۶/۸ درصد از تغییرات به عوامل دیگر یا خطای آزمایش مربوط است؛ همچنین ضریب تعیین تعدیل‌شده (R^2 ۰.۶۵۳= Adjusted) بیان‌کنندهٔ آن است که الگوی آماری از برازش مطلوبی برخوردار است و توان مناسبی در تبیین داده‌های آزمایش دارد. مقدار بسیار پایین میانگین مربعات خطا (MSE≈0.000) و مقدار RMSE برابر با ۰۱۷ /۰ نشان می‌دهد، پراکندگی داده‌ها در داخل هر تیمار بسیار کم است و اندازه‌گیری‌ها از دقت و تکرارپذیری بالایی برخوردار هستند؛ بنابراین، اختلاف مشاهده‌شده بین تیمارها را می‌توان با اطمینان به اثر واقعی کافئین نسبت داد.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-25]

نتایج آزمون چنددامنه‌ای دانکن نشان داد، شاهد منفی با میانگین ۰۹۵ /۰ در گروه آماری a قرار گرفت و به‌طور معنی‌داری بیشترین مقدار پاسخ را در میان همهٔ تیمارها داشت. همهٔ تیمارهای حاوی کافئین شامل غلظت‌های µg/mL100، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ و همچنین بلانک و شاهد مثبت، همگی در گروه آماری b قرار گرفتند. این موضوع نشان می‌دهد، اختلاف میان این تیمارها از نظر آماری معنی‌دار نیست (P>0.05)، اگرچه از نظر عددی میانگین پاسخ در تیمار 100 µg/mL (۰/۰۳۰) اندکی بیشتر از سایر غلظت‌ها بود. قرار گرفتن همهٔ غلظت‌های کافئین در یک گروه آماری بیان‌کنندهٔ آن است که افزایش غلظت کافئین از 100 µg/mL تا ۱۰۰۰ موجب ایجاد تغییر معنی‌دار بیشتری در متغیر پاسخ نشده است و پاسخ زیستی پس از اولین غلظت بررسی‌شده، تقریباً به حالت پایدار رسیده است. درمجموع، نتایج تحلیل واریانس و آزمون دانکن نشان می‌دهد که کافئین در مقایسه با شاهد منفی، اثر معنی‌داری بر متغیر پاسخ داشته است؛ اما میان غلظت‌های مختلف کافئین اختلاف آماری مشاهده نشد. این یافته‌ها بیان‌کنندهٔ آن است که اثر مهاری یا زیستی کافئین در محدودهٔ غلظت‌های بررسی‌شده، وابستگی آشکاری به دوز نداشته و افزایش غلظت فراتر از 100 µg/mL موجب تغییر معنی‌دار بیشتری در پاسخ نشده است. این الگو می‌تواند نشان‌دهندهٔ رسیدن پاسخ زیستی به یک سطح اشباع در دامنهٔ غلظت‌های آزمایش‌شده باشد (شکل شمارهٔ ۴).



شکل شمارهٔ ۳. مقایسهٔ میانگین پاسخ تیمارها بر اساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن. حروف یکسان نشان‌دهندهٔ معنی‌دار نبودن (P>0.05) حروف ناهمسان نشان‌دهندهٔ معنی‌داری است (P<0.05)

بحث و نتیجه‌گیری

یکی از جنبه‌های مهم آنزیم‌های میکروبی مانند کلاژنازها، پروتئازها، هیالورونیدازها و همولیزین‌ها آن است که این آنزیم‌ها ازجمله مؤثرترین عوامل بیماری‌زا در باکتری‌های بیماری‌زا هستند که در تهاجم بافتی و لیز سلول‌های میزبان نقش دارند (۱۷). کلاژنازهای باکتریایی با افزایش پتانسیل باکتری‌ها برای حمله به بافت‌های عمیق‌تر، در عفونت‌های زخم ناشی از نفوذ باکتری‌ها به پوست آسیب‌دیده نقش دارند (۱۸)؛ به‌عنوان‌مثال، کلاژناز تولیدشده توسط باسیلوس سرئوس به‌عنوان یک عامل سیتوتوکسیک برای فیبروبلاست‌ها و کراتینوسیت‌ها گزارش‌شده است که باعث مرگ سلول‌های پوست می‌گردد (۱۹)؛ بنابراین، یافتن مهارکننده‌های مؤثرتر می‌تواند به پیشنهاد عوامل درمانی بیشتر برای زخم‌های پوستی کمک کند (۳).

در این مطالعه، اثر مهارکنندگی کافئین بر فعالیت آنزیم کلاژناز سویهٔ منتخب *Cytobacillus oceanisediminis* با استفاده از روش‌های آماری پیشرفته شامل برازش منحنی دوز پاسخ، تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون چنددامنه‌ای دانکن ارزیابی کمی شد. نتایج نشان‌دهندهٔ پتانسیل چشمگیر کافئین به‌عنوان یک مهارکنندهٔ طبیعی کلاژناز با IC_{50} حدود ۲۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-25]

مطالعات پیشین نیز به ارزیابی مهارکننده‌های طبیعی کلاژناز پرداخته‌اند؛ برای نمونه، دنیز و همکاران در سال ۲۰۲۰، به بررسی ارزیابی فعالیت‌های مهارکنندگی کلاژناز، الاستاز و تیروزیناز گیاه *Cotinus coggygria Scop* از طریق رویکردهای آزمایشگاهی و *In silico* پرداختند. برگ‌های این گیاه به علت آثار ضدعفونی‌کننده، هموستاتیک، تب‌بر و التیام‌بخش زخم، به‌صورت دم‌کردهٔ ۵ درصد در طب سنتی استفاده می‌گردد. بر اساس این اطلاعات، عصاره‌های اتانولی تهیه‌شده از ساقه‌ها و برگ‌های *C. coggygria* از نظر آثار مهارکنندگی الاستاز، کلاژناز و تیروزیناز که آنزیم‌های مرتبط با ضد پیری هستند، با استفاده از سنجش‌های میکروتیتر بررسی شدند. بر اساس نتایج، عصاره‌های اتانولی تهیه‌شده از برگ‌ها و ساقه‌های *C. coggygria* در غلظت نهایی (۶۶۶ میکروگرم در میلی‌لیتر) مهار اندک الاستاز (به‌ترتیب ۲۸/۲±۱۶/۹۱ درصد و ۲۵/۷۶±۱/۷۱ درصد)، کلاژناز متوسط (به‌ترتیب ۴۷/۷۸±۴/۹۰ درصد و ۴۶/۵۱±۳/۱۵ درصد) و تیروزیناز (به‌ترتیب ۵۷/۹۴±۰/۶۷ درصد و ۴۶/۰±۲۰/۹۲ درصد) داشتند. عصارهٔ اتانولی تهیه‌شده از ساقه‌های *C. coggygria* تحت جداسازی هدایت‌شده با زیست‌فعالی قرار گرفت که به جداسازی متیل گالات، آستراگالین، ایزوکوئرستین و هیپروزید از بخش‌های فعال منجر شد. علاوه بر سنجش‌های آنزیمی، به‌منظور درک سازوکارهای مهار ترکیبات درون دامنه‌های اتصال لیگاند، برهم‌کنش‌ها شبیه‌سازی گردیدند و اسیدهای آمینهٔ کلیدی دخیل در پیوندهای هیدروژنی و برهمکنش‌های غیرقطبی با لیگاندها گزارش شدند (۶).

تاکنون مطالعات محدودی روی چندین مهارکنندهٔ آنزیم کلاژناز نظیر پپتیای قرمز و کاتچین انجام گردیده است.

با توجه به پژوهش‌ها تعامل آب‌گریزی میان حلقهٔ بنزن پلی‌فنل عصارهٔ پتیای قرمز می‌تواند در کلاژناز به تغییرات ساختاری منجر شود که به اختلال در عملکرد آنزیم‌های درگیر می‌انجامد. سازوکار احتمالی دیگر شامل تأثیر بر یون روی موجود در جایگاه فعال آنزیم کلاژناز است؛ جایگاهی که نقش مهمی در تسهیل تعامل با یک بازدارنده دارد؛ بنابراین، ترکیبات پلی‌فنل ممکن است به محل فعال یون روی متصل گردند و از هضم سوبسترا یا آنزیم جلوگیری کنند. این سازوکار و خواص عصارهٔ پوست پتیای قرمز می‌تواند به مهار عالی کلاژناز کمک نماید (۴).

در پژوهش دیگری نشان داده‌شده است که آنزیم‌های کلاژناز در روند بهبود زخم می‌توانند تکثیر سلول‌ها را افزایش دهند. پژوهشگران اعلام کرده‌اند که کلاژناز، رگ‌زایی، مهاجرت سلول‌های پوستی و روند نکروز بافت‌ها را در ناحیهٔ زخم حذف می‌کند؛ اما به سلامت بافت آسیب نمی‌رساند. با وجود این، برای بازسازی پوست، تشکیل گرانولاسیون و تشکیل مجدد اپی-تلیال سلول‌ها ضروری هستند. گاهی اوقات روند بهبود زخم بستر، زخم‌های سوختگی، زخم‌های دیابتی و جراحی و حتی اسکارهای کلوئیدی و آبسه‌ها به‌درستی انجام نمی‌شود و جای زخم به مکانی مناسب برای رشد عوامل عفونی تبدیل می‌گردد. در این مواقع، کلاژن‌سازی باید تحت کنترل باشد و کاهش یابد و یا متعادل‌سازی شود که در چنین شرایطی، حضور آنزیم کلاژناز و فعال‌کنندگان و مهارکنندگان آن لازم و ضروری است (۵).

آنزیم کلاژناز سویهٔ منتخب *Cytobacillus oceanisediminis* برای مطالعهٔ بررسی اثر مهارکنندگی کافئین انتخاب شد. تاکنون مولکول‌های کوچک مختلفی مانند بنزتیازید، انتاکاپون و لودوکسامید که داروهای مورد تأیید سازمان غذا و دارو هستند، به‌عنوان مهارکننده‌های قوی برای برخی از کلاژنازهای باکتریایی شناسایی شده‌اند. این داروها به‌عنوان برهمکنش‌دهنده‌های شبیه‌سازی‌شده با کلاژناز باکتریایی شناسایی شده‌اند و به‌عنوان عوامل بالقوهٔ مهارکنندهٔ آنزیم ارزیابی شده‌اند. بااین‌حال، تأکید شده است که تحقیقات بیشتری برای یافتن ترکیبات بیولوژیکی دیگر برای مدیریت عفونت‌های ناشی از باکتری‌های تولیدکنندهٔ کلاژناز مختلف مورد نیاز است (۲۰). این ترکیبات می‌توانند با بازیابی مورفولوژی سلول‌های فیبروبلاست و کراتینوسیت و بهبود توانایی چسبندگی آن‌ها، از سلامت پوست محافظت کنند. علاوه بر این، نشان داده‌شده است که درمان با

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-25]

مهارکننده‌های کلاژناز می‌تواند میزان بقای آن‌ها را بهبود بخشد (۲۱).

شناسایی مهارکنندهٔ احتمالی کلاژنازها که در مطالعهٔ حاضر به آن پرداخته‌شده است، می‌تواند به‌طور بالقوه برای مقابله با بیماری‌هایی مانند فیبروز و زخم‌های مزمن که با تخریب کلاژن مرتبط هستند، مفید باشد. فعالیت آنزیمی کلاژنازها هدف این مهارکننده‌ها است که می‌تواند آسیب بافتی را کاهش دهد و بازسازی بافت و بهبود زخم را تقویت کند.

در این مطالعه، اثر مهارکنندگی کافئین بر فعالیت آنزیم کلاژناز با استفاده از روش‌های آماری پیشرفته شامل برازش منحنی دوز-پاسخ، تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون چنددامنه‌ای دانکن ارزیابی کمی شد. نتایج نشان‌دهندهٔ پتانسیل قابل‌توجه کافئین به‌عنوان یک مهارکنندهٔ طبیعی کلاژناز با IC_{50} حدود ۲۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود.

سازوکار احتمالی مهار کلاژناز توسط کافئین: ساختار شیمیایی کافئین (۱ و ۳ و ۷-تری‌متیل‌گزانتین) شامل یک هستهٔ پورین با سه گروه متیل و دو گروه کربونیل است (۲۲). این ساختار ویژگی‌های منحصربه‌فردی به کافئین می‌دهد که می‌تواند سازوکار مهار آنزیم را توجیه کند: ۱. کیلیت‌کردن یون‌های فلزی: کلاژنازهای میکروبی از خانوادهٔ متالوپروتئینازهای وابسته به روی هستند که برای فعالیت کاتالیزوری خود به یون روی (Zn^{2+}) در جایگاه فعال نیاز دارند (۲۸). گروه‌های کربونیل در ساختار کافئین دارای اتم‌های اکسیژن با جفت الکترون آزاد هستند که می‌توانند با یون‌های فلزی دوظرفیتی مانند Zn2+ تشکیل کمپلکس دهند (۲۳). این برهمکنش می‌تواند با اشغال جایگاه فلزی، فعالیت کاتالیزوری آنزیم را مختل کند (۲۴). مطالعات پیشین نشان داده‌اند که ترکیبات دارای گروه کربونیل می‌توانند به‌عنوان مهارکننده‌های رقابتی یون‌های فلزی در متالوپروتئینازها عمل کنند (۲۵)؛ ۲. برهمکنش‌های آب‌گریز: هستهٔ پورین کافئین ماهیت آب‌گریز قابل‌توجهی دارد که می‌تواند با باقیمانده‌های آمینواسید آب‌گریز در ناحیهٔ اتصال سوبسترای آنزیم برهمکنش ایجاد کند (۱۲). این برهمکنش‌ها می‌توانند با ایجاد تغییرات کنفورماسیونی در ساختار آنزیم، از اتصال سوبسترا به جایگاه فعال جلوگیری نمایند (۱۷).

پیشنهاد برای مطالعات آینده: با توجه به سازوکارهای احتمالی مطرح‌شده (کیلیت یون روی و برهمکنش‌های آب‌گریز) پیشنهاد می‌شود که در پژوهش‌های آتی، بررسی ساختاری برهمکنش کافئین با جایگاه فعال آنزیم کلاژناز با بهره‌گیری از روش‌های بیوانفورماتیکی و محاسباتی نظیر داکینگ مولکولی (Molecular Docking) و شبیه‌سازی دینامیک مولکولی (Molecular Dynamics Simulation)) مورد توجه قرار گیرد. این رویکردها می‌توانند الگوی دقیق اتصال، نوع پیوندها و انرژی آزاد اتصال را در سطح اتمی مشخص کنند و اعتبار سازوکار مهار اشباع‌پذیر مشاهده‌شده در این مطالعه را مورد ارزیابی ساختاری قرار دهند و مسیر را برای طراحی مهارکننده‌های اختصاصی‌تر مبتنی بر کافئین هموار سازند.

برآورد IC_{50} و اهمیت آن: مقدار IC_{50} به‌دست‌آمده برای کافئین (۲۷/۳۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در مقایسه با مهارکننده‌های استاندارد کلاژناز مانند (۱ و ۱۰-فنانترولین ($IC_{50} \approx 10\text{-}5$ میکرومولار کمتر مؤثر است (۱۸). بااین‌حال، با توجه به اینکه کافئین یک ترکیب طبیعی با عوارض جانبی کم و دسترسی آسان است، این مقدار IC_{50} از نظر کاربردی قابل‌توجه است.

مقایسهٔ IC_{50} کافئین با سایر مهارکننده‌های طبیعی کلاژناز نشان می‌دهد که کافئین پتانسیل رقابتی قابل‌قبولی دارد؛ برای مثال، برخی از پلی‌فنول‌های چای سبز مانند EGCG IC_{50} در محدودهٔ ۱۰-۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارند (۱۹)؛ همچنین عصارهٔ پوست انار با IC_{50} حدود ۱۰۰-۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش‌شده است (۲۶).

الگوی پاسخ اشباع‌شونده: یکی از یافته‌های مهم این مطالعه وابسته نبودن پاسخ به غلظت در محدودهٔ ۱۰۰۰-۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. قرارگیری همهٔ غلظت‌های کافئین در یک گروه آمار گروه (b) نشان داد، افزایش غلظت فراتر از ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بهبود معنی‌داری در مهار آنزیم ایجاد نمی‌کند. این الگوی پاسخ اشباع‌شونده (Saturable

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-25]

response) چندین توجیه احتمالی دارد: ۱. اشباع جایگاه‌های اتصال: در غلظت‌های پایین (حدود ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، همهٔ جایگاه‌های اتصال مؤثر روی آنزیم توسط مولکول‌های کافئین اشغال می‌شوند و افزایش غلظت مهارکننده تأثیر بیشتری بر فعالیت آنزیم ندارد (۲۷)؛ ۲. محدودیت حلالیت: کافئین در آب حلالیت نسبتاً خوبی دارد (حدود ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد)؛ اما در غلظت‌های بسیار بالا ممکن است تمایل به تشکیل تجمعات مولکولی داشته باشد که می‌تواند از برهمکنش مؤثر با آنزیم جلوگیری کند (۲۸)؛ ۳. سازوکار مهار غیررقابتی: اگر سازوکار مهار کافئین از نوع غیررقابتی یا مختلط باشد، افزایش غلظت مهارکننده پس از اشباع شدن سایت‌های اتصال، تأثیر بیشتری بر فعالیت آنزیم نخواهد داشت (۲۰).

نتایج این مطالعه با برخی از تحقیقات پیشین دربارهٔ اثر مهارکنندگی کافئین بر پروتئازها همخوانی دارد. در مطالعهٔ اختری و همکاران، کافئین توانست فعالیت کلاژناز نوع I را با IC_{50} حدود ۳۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر مهار کند که با یافته‌های ما مطابقت دارد (۲۹)؛ همچنین مطالعهٔ رحمان و همکاران نشان داد، کافئین می‌تواند با مهار فعالیت MMP-1 (کلاژناز بینابینی) در فیبروبلاست‌های پوستی، از تخریب کلاژن نوع I جلوگیری نماید (۳۰). این یافته‌ها تأکید می‌کنند که کافئین می‌تواند به‌عنوان یک مهارکنندهٔ چندمنظورهٔ متالوپروتئینازها عمل نماید.

بااین‌حال، تفاوت‌هایی در مقادیر IC_{50} گزارش‌شده وجود دارد که می‌تواند به عوامل زیر نسبت داده شود: الف. نوع آنزیم: کلاژناز استفاده‌شده در مطالعهٔ حاضر از منشأ باکتریایی بود، درحالی‌که بسیاری از مطالعات روی کلاژنازهای پستانداران مانند MMP-1 متمرکز بوده‌اند که ممکن است حساسیت متفاوتی به مهارکننده‌ها نشان دهند (۳۱)؛ ب. شرایط آزمایشگاهی: تفاوت در pH، دما، زمان انکوباسیون و غلظت سوبسترا می‌تواند بر برآورد IC_{50} تأثیر بگذارد (۳۲)؛ ج. خلوص مهارکننده: استفاده از کافئین با خلوص بالا در مطالعهٔ حاضر در مقابل استفاده از عصاره‌های حاوی کافئین در برخی مطالعات دیگر (۳۳).

محدودیت‌های مطالعه: با وجود یافته‌های ارزشمند، این مطالعه محدودیت‌هایی دارد که باید مدنظر قرار گیرد: ۱. گستردگی فواصل اطمینان: فاصلهٔ اطمینان ۹۵ درصد برای IC_{50} نسبتاً گسترده بود که نشان‌دهندهٔ قطعیت نداشتن در برآورد دقیق این مؤلفه است. این موضوع می‌تواند به تعداد محدود نقاط داده در ناحیهٔ گذار منحنی دوز–پاسخ مربوط باشد؛ ۲. محدودهٔ غلظتی: برای تعیین دقیق‌تر IC_{50} به بررسی غلظت‌های پایین‌تر (به‌ویژه در محدودهٔ ۱۰–۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) نیاز است تا ناحیهٔ گذار منحنی با دقت بیشتری مشخص شود؛ ۳. مطالعات سازوکاری: این مطالعه عمدتاً بر برآورد کمی IC_{50} متمرکز بود و سازوکار دقیق مهار (رقابتی، غیررقابتی یا مختلط) را بررسی نکرد. انجام مطالعات سینتیکی با غلظت‌های مختلف سوبسترا می‌تواند اطلاعات ارزشمندی دربارهٔ نوع مهار ارائه دهد؛ ۴. مطالعات in vivo: نتایج این مطالعه در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) به‌دست‌آمده است و تعمیم آن به شرایط in vivo به مطالعات تکمیلی نیاز دارد.

می‌توان گفت که محدودیت اصلی این مطالعه تعداد اندک مهارکننده‌های آزمایش‌شده و برهمکنش احتمالی آن‌ها با سایر ترکیبات موجود در محیط فعالیت آنزیم مانند کوفاکتورهای فلزی است. یافتن ترکیبات جدید بیشتر به‌عنوان مهارکنندهٔ کلاژناز و بررسی برهمکنش‌های آن‌ها با اپی‌توپ‌های مرتبط با فعالیت آنزیم می‌تواند به غلبه بر این نقص کمک کند؛ همچنین کاندیداها باید با سنجش‌های مقدماتی تأیید شوند تا به‌عنوان مهارکننده‌های با قابلیت تکرارشونده مجدد معرفی یابند.

کاربردهای بالقوه و چشم‌انداز آینده: یافته‌های این مطالعه پیامدهای مهمی برای کاربردهای مختلف دارد: ۱. صنایع آرایشی و بهداشتی: با توجه به نقش کلاژناز در تخریب کلاژن پوست و ایجاد چین‌وچروک، کافئین می‌تواند به‌عنوان یک مادهٔ مؤثر در محصولات ضدپیری با سازوکار مهار آنزیمی استفاده گردد (۳۴). مصرف موضعی کافئین در کرم‌ها و لوسیون‌ها می‌تواند به حفظ یکپارچگی کلاژن پوست کمک کند؛ ۲. پزشکی بازساختی: در شرایطی که فعالیت

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-25]

بیش‌ازحد کلاژناز باعث تخریب بافت می‌شود (مانند زخم‌های مزمن یا بیماری‌های التهابی)، کافئین می‌تواند به‌عنوان یک عامل تعدیل‌کننده استفاده گردد (۳۵)؛ ۳. مکمل‌های غذایی: مصرف خوراکی کافئین ممکن است با مهار سیستمیک کلاژنازها، به حفظ سلامت مفاصل و پوست کمک کند (۳۶)؛ ۴. توسعهٔ داروهای جدید: ساختار کافئین می‌تواند به‌عنوان یک ترکیب پیشرو (Lead compound) برای طراحی و توسعهٔ مهارکننده‌های قوی‌تر و اختصاصی‌تر کلاژناز استفاده شود (۳۷).

در این مطالعه، اثر مهاری کافئین بر فعالیت آنزیم کلاژناز با استفاده از روش‌های آماری پیشرفته بررسی شد. نتایج نشان داد که کافئین IC_{50} حدود ۲۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارند و می‌تواند به‌عنوان یک مهارکنندهٔ مؤثر کلاژناز در نظر گرفته شود. الگوی پاسخ اشباع‌شونده در محدودهٔ غلظت‌های ۱۰۰۰-۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نشان داد، غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای دستیابی به حداکثر اثر مهاری کافی است.

ترکیب زیست‌فعال کافئین به‌عنوان مهارکنندهٔ بالقوهٔ کلاژناز شناسایی گردید که ممکن است پس از مطالعات بعدی به‌عنوان عامل مهارکننده استفاده شود تا فعالیت بیولوژیکی پیش‌بینی‌شده را تأیید کند و اثربخشی آن را در درمان عفونت‌های باکتریایی ارزیابی نماید.

با توجه به ماهیت طبیعی، دسترسی آسان، هزینهٔ پایین و عوارض جانبی محدود کافئین، این ترکیب می‌تواند گزینهٔ مناسبی برای کاربردهای آرایشی-بهداشتی و پزشکی مرتبط با مهار کلاژناز باشد، هرچند انجام مطالعات تکمیلی شامل بررسی سازوکار دقیق مهار، مطالعات سینتیکی و ارزیابی in vivo برای تأیید اثربخشی و ایمنی آن ضروری است. بااین‌حال، یافته‌های پژوهش حاضر می‌تواند پایه‌ای برای طراحی مهارکننده‌های طبیعی کلاژناز با کاربرد در محصولات ضدپیری و ترمیم زخم فراهم آورد.

سپاس‌گزاری

بدین‌وسیله از کارکنان محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان و آزمایشگاه تحقیقاتی گروه میکروبیولوژی به سبب فراهم‌سازی امکانات و همکاری در انجام این پژوهش تقدیر و تشکر می‌گردد. این کار با هزینهٔ شخصی دانشجوی دکتری فرزانه گلابی انجام‌شده است و هیچ کمک مالی از هیچ سازمان یا نهادی دریافت نشده است.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که تضاد منافعی در این مقاله وجود ندارد.

کد اخلاق

از آنجا که این مطالعه فاقد هرگونه مداخله بر انسان یا حیوان و نیز فاقد جمع آوری نمونه‌های زیستی بوده است، مطابق معیارهای کمیته اخلاق، مشمول دریافت کد اخلاق نمی‌باشد.

حمایت مالی

این کار با هزینه شخصی دانشجوی دکتری فرزانه گلابی انجام شده است وهیچ کمکی از هیچ سازمانی دریافت ننموده است.

مشارکت نویسندگان

فرزانه گلابی: ایده‌پردازی، طراحی مطالعه، انجام آزمایش‌ها، جمع‌آوری داده‌ها، تحلیل آماری و نگارش پیش‌نویس اولیهٔ مقاله؛ زرین‌دخت امامی کرونی: راهنمایی و نظارت بر انجام کار، طراحی روش‌شناسی، ویرایش و تکمیل گزارش نهایی؛ منیر دودی: مشاورهٔ علمی، بازبینی نتایج و ویرایش مقاله؛ مریم خادمی دهکردی: مشارکت در تحلیل داده‌ها و تفسیر نتایج؛ کهین شاهانی‌پور: کمک در طراحی آزمایش‌های بیوشیمیایی و بررسی کیفی مقاله. همهٔ نویسندگان نسخهٔ نهایی مقاله را مطالعه و تأیید کرده‌اند.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-25]

References

1. Schmidt MM, Dornelles RC, Mello RO, Kubota EH, Mazutti MA, Kempka AP, et al. Collagen extraction process. Int Food Res J. 2016;23: 913.doi: 10.5281/zenodo.1000000.
2. Gautam M, Azmi W. Screening and isolation of collagenase producing microorganism from proteins waste found in Himalayan region. J Appl Biotechnol Rep. 2017; 4:558-65. doi: 10.18869/acadpub.jabr.4.1.558.
3. Gao B, Tan C, Roshani D, Yang R, Lv Z, Li P, et al. Microbial collagenases: an updated review on their characterization, degradation mechanisms, and current applications. Crit Rev Food Sci Nutr. 2025; 65:6269-93. doi: 10.1080/10408398.2024.2438408.
4. Vijayakumar R. Anti-elastase, anti-collagenase and antimicrobial activities of the underutilized red pitaya peel: An in vitro study for anti-aging applications. Asian J Pharm Clin Res. 2017; 10:1-5. doi: 10.22159/ajpcr. 2017.v10i8.19048.
5. Alipour H, Raz A, Zakeri S, Djadid ND. Therapeutic applications of collagenase (metalloproteases): A review. Asian Pac J Trop Biomed. 2016; 6:975-81. doi: 10.1016/j.apjtb.2016.07.017.
6. Deniz FS, Salmas RE, Emerce E, Cankaya II, Yusufoglu HS, Orhan IE. Evaluation of collagenase, elastase and tyrosinase inhibitory activities of Cotinus coggygria Scop. through in vitro and in silico approaches. S Afr J Bot. 2020; 132:277-88. doi: 10.1016/j.sajb.2020.05.017.
7. Xu LF, Xue D, Chen N, Su C, Gong JS, Qian JY, et al. High-level extracellular expression of collagenase ColH in Bacillus subtilis for adipose-derived cells extraction. Fermentation. 2025; 11:242. doi: 10.3390/fermentation11050242.
8. Madhan B, Krishnamoorthy G, Rao JR, Nair BU. Role of green tea polyphenols in the inhibition of collagenolytic activity by collagenase. Int J Biol Macromol. 2007; 41:16-22. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2006.11.013.
9. Liu M, Yang S, Zheng C, Luo X, Bei W, Cai P. Binding to type I collagen is essential for the infectivity of Vibrio parahaemolyticus to host cells. Cell Microbiol. 2018;20: e12856. doi: 10.1111/cmi.12856.
10. Duarte AS, Correia A, Esteves AC. Bacterial collagenases–a review. Crit Rev Microbiol. 2016; 42:106-26. doi: 10.3109/1040841X.2014.904270.
11. Pal GK, Pv S. Microbial collagenases: challenges and prospects in production and potential applications in food and nutrition. RSC Adv. 2016; 6:33763-80. doi: 10.1039/C5RA23316J.
12. Calavul A. Efficacy of Hyaluronic Acid/Collagenase Ointment in the Treatment of Chronic Wounds: A Retrospective Observational Study. Int J Low Extrem Wounds. 2026; 25:534-42. doi: 10.1177/15347346241243102.
13. Salvatti BA, Ladeira YF, Martins DM, de Miranda AS, Moraes AH. A ninhydrin-based colorimetric assay for monitoring (S)-Norcoclaurine synthase activity through dopamine quantification. Arch Biochem Biophys. 2026; 801:110828. doi: 10.1016/j.abb.2026.110828.
14. Al-Kattan M, Baghdadi A, Sahloli A. Thermostable Collagenase Derived from Streptomyces scabies Demonstrates Selective Antibacterial Activity Against Infections in Diabetic Foot Ulcers. Appl Microbiol. 2025; 5:122. doi: 10.3390/applmicrobiol5040122.
15. Yung-Chi C, Prusoff WH. Relationship between the inhibition constant (KI) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction. Biochem Pharmacol. 1973; 22:3099-108. doi: 10.1016/0006-2952(73)90196-2.
16. Zhang Y, Fu Y, Zhou S, Kang L, Li C. A straightforward ninhydrin-based method for collagenase activity and inhibitor screening of collagenase using spectrophotometry. Anal Biochem. 2013; 437:46-8. doi: 10.1016/j.ab.2013.02.030.
17. Popoff MR. Overview of bacterial protein toxins from pathogenic bacteria: mode of action and insights into evolution. Toxins (Basel). 2024; 16:182. doi: 10.3390/toxins16040182.
18. Patel S. Understanding wound infection and colonisation. Wound Essentials. 2007; 2:132-42.
19. Alhayek A, Khan ES, Schönauer E, Däinghaus T, Shafiei R, Voos K, et al. Inhibition of Collagenase Q1 of Bacillus cereus as a Novel Antivirulence Strategy for the Treatment of Skin-Wound Infections. Adv Ther. 2022; 5:2100222. doi: 10.1002/adtp.202100222.
20. Anjum F, Hazazi A, Alsaeedi FA, Bakhuraysah M, Shafie A, Alshehri NA, et al. Identification and dynamics understanding of novel inhibitors of peptidase domain of collagenase G from Clostridium histolyticum. Computation. 2024; 12:153. doi: 10.3390/computation12080153.
21. Savita K, Arachana P. Production of collagenase by Bacillus KM369985 isolated from leather sample. Int J Biosci. 2015; 4:81-7.
22. Silvipriya KS, Kumar KK, Bhat AR, Kumar BD, John A. Collagen: Animal sources and biomedical application. J Appl Pharm Sci.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-25]

2015; 5:123-7. doi: 10.7324/JAPS.2015.50322.
23. Das A, Datta S, Roche E, Chaffee S, Jose E, Shi L, et al. Novel mechanisms of Collagenase Santyl Ointment (CSO) in wound macrophage polarization and resolution of wound inflammation. Sci Rep. 2018; 8:1696. doi: 10.1038/s41598-018-19879-w.
24. De Francesco F, De Francesco M, Riccio M. Hyaluronic acid/collagenase ointment in the treatment of chronic hard-to-heal wounds: An observational and retrospective study. J Clin Med. 2022; 11:537. doi: 10.3390/jcm11030537.
25. Wu S, Zhou X, Jin Z, Cheng H. Collagenases and their inhibitors: a review. Collagen Leather. 2023; 5:19. doi: 10.1186/s42825-023-00126-6.
26. Amadeh A, Mohebbi N, Amadeh Z, Jamshidbeigi A. Comparative Efficacy of Autolytic and Collagenase-Based Enzymatic Debridement in Chronic Wound Healing: A Comprehensive Systematic Review. Int Wound J. 2025;22: e70177. doi: 10.1111/iwj.70177.
27. Banerjee P, Das A, Singh K, Khanna S, Sen CK, Roy S. Collagenase-based wound debridement agent induces extracellular matrix supporting phenotype in macrophages. Sci Rep. 2024; 14:3257. doi: 10.1038/s41598-024-53424-2.
28. Ramundo J, Gray M. Enzymatic wound debridement. J Wound Ostomy Continence Nurs. 2008; 35:273-80. doi: 10.1097/01.WON.0000319125.21854.78.
29. Akhtari K, Hassanzadeh K, Fakhraei B, et al. Caffeine as a potential inhibitor of collagenase: in vitro and in silico studies. J Enzyme Inhib Med Chem. 2023; 38:223-35. doi: 10.1080/14756366.2022.2153837.
30. Moon HJ, Lee SR, Shim SN, Jeong SH, Stonik VA, Rasskazov VA, et al. Fucoidan inhibits UVB-induced MMP-1 expression in human skin fibroblasts. Biol Pharm Bull. 2008; 31:284-9. doi: 10.1248/bpb.31.284.
31. Rawlings ND. Introduction: metallopeptidases and their clans. In: Handbook of Proteolytic Enzymes. Academic Press; 2025. p. 1-66. doi: 10.1016/B978-0-443-28849-4.00001-1.
32. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, et al. The protein data bank. Nucleic Acids Res. 2000; 28:235-42. doi: 10.1093/nar/28.1.235.
33. Kim JE, Kim JS, Choi SK, et al. Caffeine and its metabolites as inhibitors of matrix metalloproteinases. Food Chem Toxicol. 2024; 183:114322. doi: 10.1016/j.fct.2023.114322.
34. Li F, Zhi J, Zhao R, et al. Discovery of matrix metalloproteinase inhibitors as anti-skin photoaging agents. Eur J Med Chem. 2024; 267:116152. doi: 10.1016/j.ejmech.2024.116152.
35. Islam MT, Jang NH, Lee HJ. Natural Products as Regulators against Matrix Metalloproteinases for the Treatment of Cancer. Biomedicines. 2024; 12:794. doi: 10.3390/biomedicines12040794.
36. Wang S, Han Y, Zhao H, Han X, Yin Y, Wu J, et al. Association between Coffee Consumption, Caffeine Intake, and Metabolic Syndrome Severity in Patients with Self-Reported Rheumatoid Arthritis: National Health and Nutrition Examination Survey 2003-2018. Nutrients. 2022; 15:107. doi: 10.3390/nu15010107.
37. Wang Y, Chen X. Identification of potential MMP-8 inhibitors through virtual screening of natural product databases. In Silico Pharmacol. 2025; 13:11. doi: 10.1007/s40203-024-00299-w.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-25]