● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ بیست و یکم، شمارهٔ ۴، ص ۳۰۱-۲۹۰، ۱۳۹۳

مقالهٔ پژوهشی

مقایسه اثرمهارکنندگی عصاره چای سبز و دارچین بر فیبری شدن لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ

حسن رامشینی*[1]، فاطمه ایوبی[2]

خلاصه

مقدمه: تعداد زیادی از بیماری‌های تحلیل برنده سیستم عصبی از جمله آلزایمر، پارکینسون و هانتینگتن در اثر رسوب تجمعات پروتئینی تحت عنوان رسوبات آمیلوئیدی بوقوع می‌پیوندند. در حال حاضر هیچ روش درمانی مؤثری برای درمان این بیماری‌ها وجود ندارد. یکی از روش‌های درمانی مهم برای جلوگیری از بروز این بیماری‌ها استفاده از گیاهان دارویی می‌باشد. در مطالعه حاضر فعالیت مهاری عصاره پوست دارچین (Cinnamomum zeylanicum Nees) و برگ چای سبز (Camellia sinensis L) روی روند فیبری شدن لیزوزیم سفیده تخم مرغ مورد مطالعه قرار گرفته است.

روش: در این مطالعه تجربی، برای القای آمیلوئید در این پروتئین از pH اسیدی و دمای بالا استفاده شد. ۲ میلی‌گرم لیزوزیم، در یک میلی‌لیتر بافر ۵۰ میلی‌مولار گلیسین با pH =۲/۵ در دمای ۵۷ درجه، در یک مدت مشخص قرار داده شد. برای اثبات تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی از تکنیک‌هایی مثل شدت فلورسانس تیوفلاوین T و عکسبرداری میکروسکوپ نیروی اتمی استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون آماری تی مستقل و با نرم‌افزار SPSS.16 انجام گرفت.

یافته ها: نتایج نشان داد که در غیاب عصاره پوست دارچین و برگ چای سبز بعد از ۲۴ ساعت الیگومرهای محلول ایجاد و بعد از ۴۸ ساعت فیبرهای بالغ حاصل می‌شود. در اثر انکوباسیون HEWL در شرایط بالا با غلظت‌های مختلف عصاره دارچین و چای سبز در دامنه۱- ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی به‌صورت وابسته به غلظت مهار گردید ولی عصاره چای سبز مهار کننده مؤثرتری بود (P=۰/۰۲۵). همچنین نتایج نشان داد که بر عکس عصاره دارچین، چای سبز می‌تواند فرم جزئی باز شده پروتئین را به فرم طبیعی تبدیل و روی همه مراحل تشکیل تجمعات آمیلوئیدی تا ثیر بگذارد .

نتیجه‌گیری: با توجه به این مشاهدات به نظر می‌رسد پلی‌فنل‌های موجود در عصاره دارچین و چای سبز هر دو قادرند به‌طور مستقیم مانع تشکیل هسته‌های اولیه آمیلوئید شده و درنتیجه رشد و بلوغ فیبرهای آمیلوئیدی را مهار کنند ولی چای سبز احتمالاً به دلیل نوع ساختار شیمیایی موجود در عصاره‌اش قادر است با کار آیی بهتر مانع رشد و بلوغ فیبرهای آمیلوئیدی گردد.

واژه‌های کلیدی: لیزوزیم، عصاره پوست دارچین، عصاره برگ چای سبز، مهار تجمعات آمیلوئیدی

۱- استادیار بیوشیمی، گروه علمی زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران ۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد فیزیولوژی انسانی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

*** نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک:** hramshini@ibb.ut.ac.ir

دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۱۱/۲۶ **دریافت مقاله اصلاح شده :** ۱۳۹۲/۴/۱۵ **پذیرش مقاله:** ۱۳۹۲/۶/۲۷

مقدمه

پیری یک فرایند طبیعی در تمام موجودات زنده است. به دلیل افزایش جمعیت پیر در دنیای مدرن امروزی دانشمندان زیادی علاقه مند مطالعه در این حیطه هستند و به همین دلیل مطالعات گسترده‌ای برای مهار این روند انجام شده است (۱،۲). امروزه، هدف از تحقیقات ضد پیری صرفا افزایش طول عمر نیست، بلکه افزایش طول عمر توام با کیفیت و سلامت است. متأسفانه علی‌رغم تحقیقات گسترده‌ای که در این زمینه صورت گرفته است به دلیل عوامل متعددی که در ایجاد پیری و بیماری‌های وابسته به آن دخیل هستند، درمان این بیماری‌ها چندان موفقیت‌آمیز نبوده است. بیماری‌هایی مثل آلزایمر و پارکینسون به عنوان بیماری‌های تحلیل برنده سیستم عصبی وابسته به پیری بوده که به میزان زیادی کیفیت زندگی افراد پیر را دستخوش تغییرات قرار می‌دهند. ویژگی مشترک آلزایمر با سایر بیماری‌های تحلیل برنده سیستم عصبی مثل پارکینسون، هانتینگتن و جنون گاوی، وجود پلاک‌های آمیلوئیدی در بخش قشری بافت مغزی است. پلاک‌های آمیلوئیدی مربوط به آلزایمر در اثر تجمع غیر طبیعی پپتیدهای Aβ بوجود می‌آید (۳). پپتیدهای Aβ نیز در اثر شکسته شدن پروتئین پیش‌ساز آمیلوئید توسط آنزیم‌های β و γ سکرتاز حاصل می‌شوند. منومرهای Aβ به دلایل مختلف ساختار سه بعدی طبیعی خود را از دست داده و به ساختارهای مستعد تجمع تبدیل شده و سپس با اتصال به همدیگر هسته‌های اولیه فیبرهای آمیلوئیدی را بوجود می‌آورند. از اتصال هسته‌های اولیه الیگومرها، سپس پروتوفیلامنت‌ها و در نهایت فیبرهای آمیلوئیدی بوجود می‌آید (۳). فیبرهای آمیلوئیدی و پیش‌سازهای آن در مغز سمی بوده و باعث تحلیل رفتن سلول‌های عصبی و مرگ آنها می‌گردند (۴،۵). این فیبریل‌ها توانایی اتصال به رنگ‌های ویژه‌ای مثل کنگورد و تیوفلاوین T را داشته و قابل دیدن به‌وسیله میکروسکوپ نیروی اتمی و یا الکترونی هستند (۶). درحال حاضر اکثر روش‌های درمانی آلزایمر علامتی بوده و هیچکدام از این روش‌ها نتوانسته است باعث جلوگیری از بروز این بیماری گردد (۷). در گذشته از گیاهان متعدی برای درمان بیماری‌های گوناگون از جمله بیماری‌های مربوط به کاهش حافظه استفاده می‌شده است .امروزه نیز استفاده از تولیدات گیاهی به میزان زیادی در دنیای غرب و همچنین در کشورهای در حال توسعه افزایش یافته است. دانشمندان بر این باورند که بعضی از گیاهان دارویی دارای خواص ضد پیری بوده و باعث تقویت حافظه شده و مانع بیماری‌های وابسته به حافظه مثل آلزایمر می‌شوند (۸).استفاده از گیاهانی مثل ژینکو *(Ginko biloba)*، جین سنگ *(Panax ginseng)*، رزماری *(Rosmarinus officinalis)* و زرچوبه *(Curcuma longa)* برای جلوگیری از زوال عقل و تقویت حافظه بسیار موفقیت‌آمیز بوده است (۱۲-۹). در مطالعه حاضر اثر ضد آمیلوئیدی دو گیاه چای سبز با نام علمی *Camellia sinensis* و دارچین با نام علمی *Cinnamomum zeylanicum* که در طب سنتی از آنها به عنوان تقویت کننده حافظه استفاده می‌شود بررسی شده است (۸). مطالعات نشان می‌دهد تشکیل آمیلوئید مختص پروتئین‌های که در بدن و در شرایط *in vivo* تولید بیماری می‌کنند نیست بلکه اکثر پروتئین‌هایی که هیچ ارتباطی با بیماری‌های آمیلوئیدی ندارند نیز در شرایط مناسب تولید فیبرهای آمیلوئیدی می‌نمایند (۱۳). بنابراین در مطالعه حاضر ابتدا درلیزوزیم سفیده تخم مرغ که ساختار و مکانیسم تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی در آن بخوبی شناخته شده و یک مدل پروتئینی عام برای مطالعات تجمع آمیلوئیدی شناخته می‌شود (۱۴) در شرایط مناسب و براساس روش‌های مرسوم القای آمیلوئید شد (۱۵) و سپس اثر عصاره پوست گیاه دارچین و برگ چای سبز روی مهار تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی لیزوزیم سفیده تخم مرغ (HEWL: hen egg white lysozyme) بررسی و مکانیسم اثر احتمالی آنها با هم مقایسه گردید.

روش بررسی

لیزوزیم سفیده تخم مرغ، تیوفلاوین T، کنگو رد و بافرهای استفاده شده از شرکت سیگما خریداری شد. ۸-آنیلینونفتالن سولفونات (ANS) از شرکت مرک (Darmstadt, Germany) خریداری شد. عصاره‌های پوست دارچین و برگ چای سبز در مرکز تحقیقات فیزیولوژی و فارماکولوژی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان تهیه شد.

روش عصاره‌گیری

پوست دارچین و برگ چای سبز از هرباریوم گیاهی اصفهان تهیه شده و پس از اینکه به وسیله کارشناس هرباریم گونه مورد نظر تأیید گردید، پودر شده وعصاره استونی و اتانولی آن با استفاده از دستگاه استخراج کننده و روتاری بدست آمد. ابتدا حلال را در قسمت بالن ریخته و دمای آن به‌وسیله گرماساز تنظیم شد (۵۰ درجه). سپس گیاه پودر شده در داخل کارتوش و سپس در قسمت استخراج کننده قرار داده شد. عصاره گیاه پس از جدا شدن به بالن زیری هدایت شده و این عمل تا وقتی که عصاره به اندازه کافی غلیظ شود ادامه یافت (حدود ۵-۴ ساعت). سپس عصاره به‌دست آمده به دستگاه روتاری منتقل شد تا حلال آن در دمای پایین جدا شود. عصاره به‌دست آمده پس از خشک شدن کامل در فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۶).

تعیین غلظت پروتئین

با توجه به خالص بودن نمونه پروتئینی به کار گرفته شده در این مطالعه، سنجش غلظت پروتئین همه جا بر اساس جذب ۲۸۰ نانومتر محلول حاوی پروتئین در مقایسه با حلال به کار گرفته شده انجام می‌شد. ضریب جذب لیزوزیم ۲/۶۵ برای یک گرم در یک لیتر در مسیر یک سانتی متری در نظر گرفته شد.

القای فیبرهای آمیلوئیدی در لیزوزیم سفیده تخم مرغ

۲میلی‌گرم پروتئین در یک میلی‌لیتر بافر ۵۰ میلی‌مولار گلیسین با۲/۵= pH در دمای ۵۷ درجه قرار داده شد، به گونه‌ای که در تمام این مدت با استفاده از ماگنت ریز تفلونی محلول به نحو آرام هم زده می‌شد. با استفاده از روش‌های مختلفی، تشکیل تجمعات آمیلوئیدی مورد بررسی قرار گرفت.

فلورسانس خارجی

۸ - آنیلینونفتالن سولفونات (ANS) برای ارزیابی میزان هیدرو فوبیسیتهٔ سطح در دسترس پروتئین مورد استفاده قرار گرفت در این راستا، نشر فلوئورسانس ANS در غلظت ۲۰ میکرومولار ANS و در غیاب یا حضور ۰/۰۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر لیزوزیم اندازه‌گیری می‌شد. غلظت مولی به کار گرفته شده ANS در مقایسه با پروتئین مازاد بود. طول موج برانگیختگی ۳۶۵ نانومتر و پهنای اسلیت برانگیختگی و نشر به ترتیب ۵ و ۱۰ نانومتر بود. افزایش شدت نشر و به ویژه انتقال به آبی به عنوان افزایش دسترسی پذیری جایگاه‌های هیدرو فوب در سطح پروتئین تفسیر می‌شد.

مطالعات سنجش ThT

برای ارزیابی تشکیل یا عدم تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی یا شبه آمیلوئیدی از محلول تازه تهیه شده تیوفلاوین T که با استفاده از سرنگ فیلتر شده بود استفاده گردید. طول موج برانگیختگی ۴۴۰ نانومتر و پهنای اسلیت برانگیختگی و نشر به ترتیب ۵ و ۱۰ نانو متر بود. افزایش شدت نشر تیوفلاوین T به عنوان تشکیل احتمالی فیبرهای آمیلوئیدی یا شبه آمیلوئیدی تفسیر می‌شد.

تصویربرداری میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM)

حدود ۲۰ میکرولیتر از نمونه‌های رقیق شده آمیلوئید روی میکا قرار داده و و به‌وسیله جریان ملایم هوا خشک

شـد و تصـاویر AFM در هـوا بـا یـک میکروسـکوپ (solver next , NT_MDT, Russia) که به یک بخـش اسـکن کننده (ماکزیمم سایز اسـکن ۱۰۰ µm) و یـک کنتـرل کننده Nanoscope IIIa مجهز بود به دست آمـد. فرکـانس استفاده شده بین ۳۴۲ و ۳۴۱ کیلو هرتز و سرعت اسـکن نیز بین ۰/۶ تا ۱ هرتز بود.

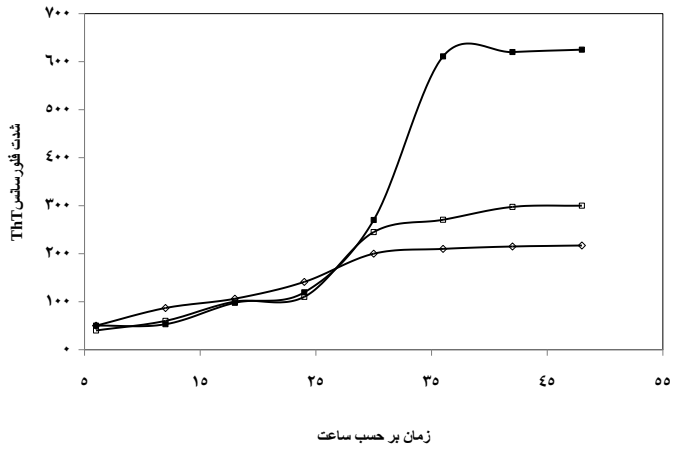
آنالیز آماری: هر آزمایش حداقل سه بار به‌صورت مستقل انجام و در هر بار هر کدام حداقل سه بار تکرار شد و تمام نمودارها به‌صورت میانگین Mean± SD گزارش شده اسـت. داده‌ها توسط نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۶ با اسـتفاده از آزمون تی مستقل و با ضریب اطمینـان P<۰/۰۵ تجزیـه و تحلیل شد.

نتایج

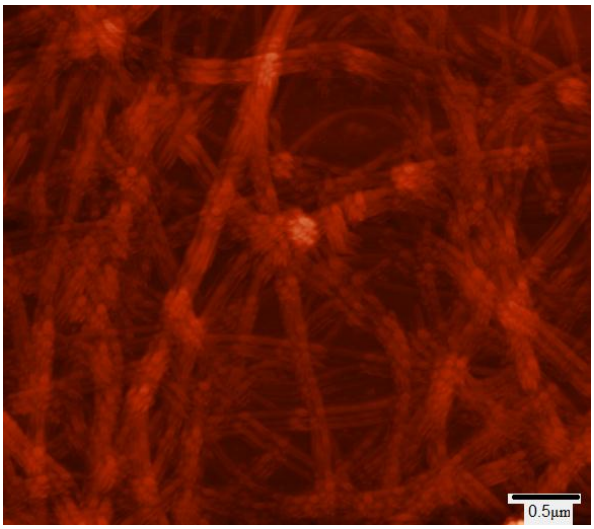
القای تجمع آمیلوئیدی در لیزوزیم سفیده تخم مرغ

بر اساس آنچه که در بخش روش‌ها ذکر شد پـروتئین لیزوزیم تبدیل به فیبرهـای آمیلوئیـدی گردیـد .تشـکیل فیبرهای آمیلوئیدی بعد از ۴۸ ساعت با استفاده از تیوفلاوین T و عکس میکروسکوپ نیروی اتمی ارزیابی شد. پـس از برانگیختگی در طول موج ۴۴۰ نـانومتر، تیـوفلاوین T بـه تنهایی نشر ضعیفی را نشـان داد. اضـافه کـردن پـروتئین طبیعی نیز تغییر قابل ملاحظه‌ای‌را در شدت یا الگوی طیف نشری تیوفلاوین T موجب نشد، ولی پس از اضافه کـردن پروتئین انکوبه شده در شرایط ذکر شده در بـالا افـزایش شدت نشر مشاهده شد و این افزایش به‌صورت وابسـته بـه زمان بوده و شامل سه مرحله فاز تـأخیری، رشـد سـریع و مرحله تعادل انتهایی می‌شد (شکل ۱).

ارزیابی به‌وسیله تیو فلاوین T نشان داد که لیـزوزیم در این شرایط تولیـد فیبریـل‌هـای آمیلوئیـدی مـی‌نمایـد و عکس‌های میکروسکوپ نیروی اتمی نیز فیبرهای طویل و بدون شاخه آمیلوئیـدی را بـه وضـوح نشـان مـی‌دهـد (شکل ۲).



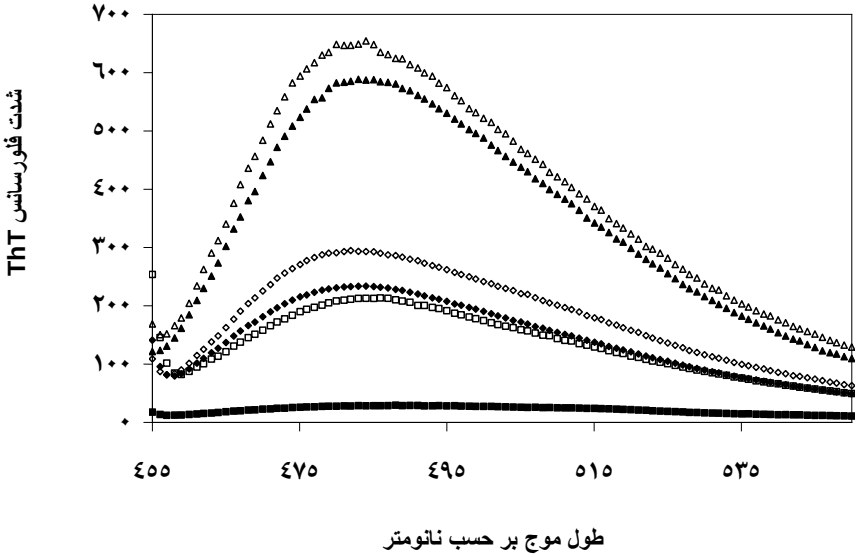
شکل ۱. *تغییرات نشر بیشینه فلوئورسانس تیوفلاوین T در حضور لیزوزیم انکوبه شده در زمان‌های مختلف در pH ۲/۵ و دمای ۵۷ درجه به همراه ۱ میلی‌گرم عصاره‌های برگ چای سبز (◊) و پوست دارچین (□) و پروتئین به تنهایی و بدون افزودن عصاره (■)*



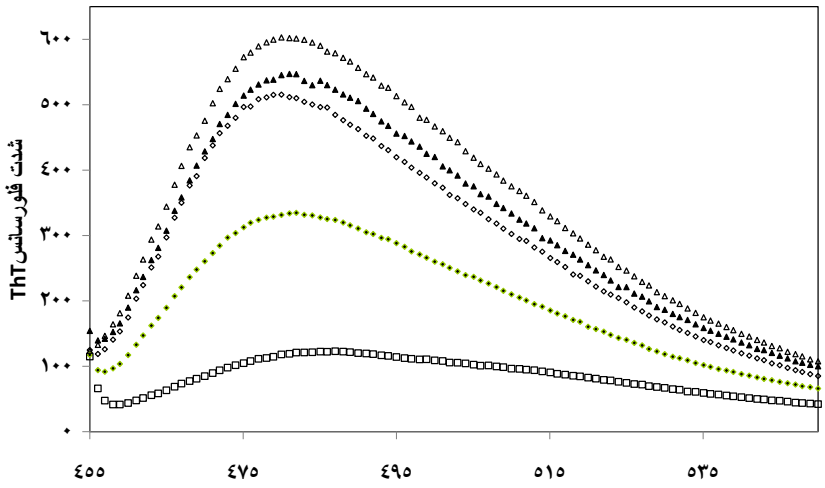
شکل ۲. *تصویر میکروسکوپ نیروی اتمی ۲ میلیگرم بر میلی‌لیتر لیزوزیم در بافر گلایسین با pH=۲/ ۵ بعد از ٤٨ ساعت انکوباسیون در دمای ۵۷ درجه سانتی گراد*

اثر غلظت‌های مختلف عصاره پوست دارچین و برگ چای سبز بر مهار تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی

همان‌طور که در شکل ۳ و ۴ مشاهده می‌شود میزان شدت نشر فلورسانس تیو فلاوین T در حضور غلظت‌های مختلف عصاره پوست دارچین (*Cinnamomum zeylanicum*) و برگ چای سبز (*Camellia sinensis*) کاهش می‌یابد. این کاهش به‌دلیل فرونشانی فلورسانس توسط این عصاره‌ها نیست چرا که افزودن همین غلظت‌ها به محلول دارای آمیلوئید بالغ سبب کاهش نشر نمی‌گردد. همان‌طور که در این دو شکل مشخص است عصاره‌ها به‌صورت کاملا وابسته به غلظت مانع تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی می‌شوند. با توجه به انحلال این عصاره‌ها در حلال غیر قطبی DMSO، به منظور بررسی اثر DMSO در روند فیبری شدن، به‌عنوان کنترل در HEWL در حضور غلظت‌های مختلف DMSO القای آمیلوئید گردید و اثر عصاره‌ها بر روند فیبری شدن با فیبرهای تشکیل شده در حضور DMSO مقایسه شد و تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. شکل ۳ و ۴ روند مهار تشکیل فیبر آمیلوئیدی را در غلظت‌های مختلف عصاره‌های دارچین و چای سبز نشان می‌دهد. در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲۵، ۰/۵و ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره دارچین درصد مهار به ترتیب ۹/۷۵±۱/۵، ۵۵/۱±۲/۲۵، ۶۴/۶ ±۲/۱ و ۶۷/۶±۳/۲۱ درصد (شکل ۳) و در حضور عصاره چای سبز در همین دامنه غلظت درصد مهار به‌ترتیب ۱۵/۷±۲/۲۳، ۲۱±۲/۸، ۴۹/۳±۲/۵۶ و ۸۱/۷±۳/۷ درصد بود (شکل۴). با مقایسه درصد مهار واضح است که هر دو عصاره در این دامنه غلظت قادر به مهار تشکیل فیبر آمیلوئید می‌باشند و در غلظت‌های بالاتر قدرت مهار کنندگی وابسته به غلظت افزایش می‌یابد اما در مقایسه دو عصاره، غلظت ۱ میلی‌گرم عصاره چای سبز مهار کننده مؤثرتری می‌باشد که بر اساس آزمون آماری تی مستقل تفاوت معنی‌دار است (P=۰/۰۲۵). درصد کاهش شدت نشر فلورسانس به دلیل کاهش فیبرهای آمیلوئیدی نشان دهنده میزان مهارکنندگی است. برای مقایسه این دو عصاره در مطالعات بعدی از مؤثرترین غلظت آنها یعنی ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استفاده شد که هر دو عصاره بهترین اثر را داشتند.



شکل ۳. *طیف نشر فلوئورسانس تیوفلاوین T در حضور HEWL ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در بافر ۵۰ میلی‌مولار گلایسین ۲/۵ =pH انکوبه شده در دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد همراه با هم زدن به مدت ۴۸ ساعت (Δ) و در حضور غلظت‌های ۰/۱ میلی‌گرم (▲)، ۰/۲۵ میلی‌گرم (◊)، ۰/۵ میلی‌گرم(♦) و ۱ میلی‌گرم (□) عصاره دارچین. طیف نشر فلورسانس تیو فلاوین T در عدم حضور HEWL و عصاره دارچین (■)*



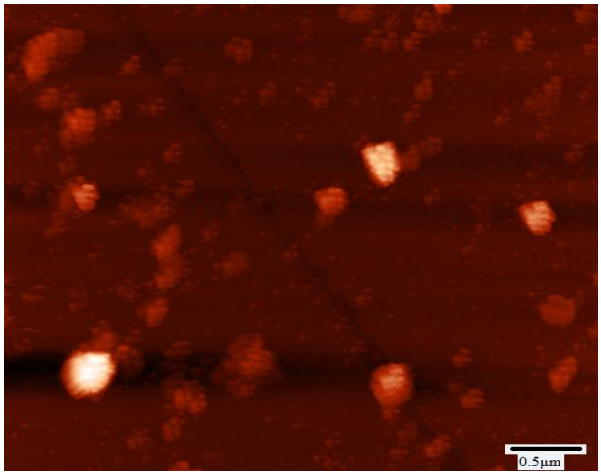
شکل ٤. *طیف نشر فلوئورسانس تیوفلاوین T در حضور HEWL ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر د ر بافر ۵۰ میلی‌مولار گلایسین ۲/۵ =pH/انکوبه شده در دمای ۵۷ درجه سانتی گراد همراه با هم زدن به مدت ٤٨ ساعت (Δ)و در حضور غلظت‌های ۰/۱ میلی‌گرم (▲)، ۰/۲۵ میلیگرم (◊)، ۰/۵ میلی‌گرم(♦) و ۱ میلی‌گرم (□) عصاره چای سبز*

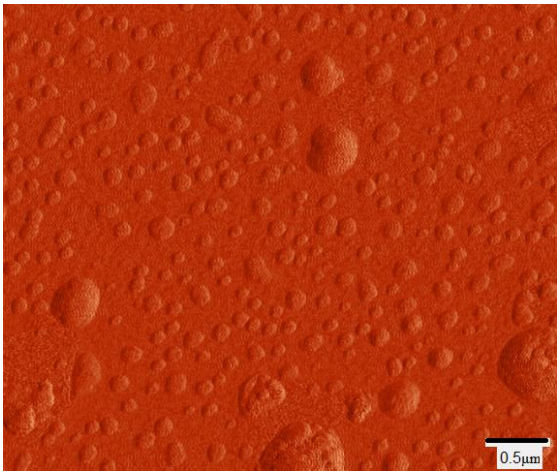
اثر عصاره‌های پوست دارچین و برگ چای سبز بر کینتیک تجمع آمیلوئیدی HEWL

نشر فلوئورسانس محلول ۶۵ میکرومولار تیوفلاوین T در حضور نمونه پروتئینی انکوبه شده در زمانهای صفر تا ۴۸ ساعت بررسی گردید که در شکل ۱ نشان داده شده است .روند تغییرات نشری تیوفلاوین T در طی زمان از مدل سیگموئیدی تبعیت می‌نماید که شامل سه مرحله فاز تأخیری، مرحله رشد سریع و مرحله تعادلی انتهایی است. فاز تأخیری که به آن مرحله هسته‌گذاری (Nucleation) گفته می‌شود که در این مرحله هسته‌های اولیه تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی حاصل می‌شود و مرحله محدود کننده فرآیند است و بعد از آن یک شدت نشر تصاعدی را شاهد هستیم. نشر فلورسانس همین نمونه پروتئین در شرایط تشکیل آمیلوئید در حضور ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصارهای پوست دارچین و برگ چای سبز نیز بررسی شد. همان‌طور که شکل ۱ نشان می‌دهد هر دو عصاره بر روی کینتیک تشکیل فیبر آمیلوئیدی لیزوزیم تأثیر قابل ملاحظه‌ای گذاشته ولی میزان مهار وابسته به زمان در حضور عصاره چای سبز بیشتر از عصاره دارچین می‌باشد (هم فاز رشد سریع و هم فاز تعادلی انتهایی از نظر شدت فلورسانس در حضور عصاره چای سبز نسبت به دارچین کاهش بیشتری را نشان می‌دهد) .

اثر عصاره‌های برگ چای سبز و پوست دارچین روی شکل ظاهری فیبرهای آمیلوئیدی

برای مطالعه اثر عصاره‌های فوق‌الذکر روی مورفولوژی فیبرهای آمیلوئیدی، از نمونه‌های آمیلوئید تشکیل شده بعد از ۴۸ ساعت از هر کدام به میزان ۲۰ میکرولیتر برداشته شد و بر روی ورقه‌های نازک میکا و به‌وسیله جریان ملایم هوا تثبیت شد و به‌وسیله میکروسکوپ نیروی اتمی از هر یک از نمونه‌ها عکس گرفته شد. همانطور که شکل ۵ نشان می‌دهد، در غیاب عصاره‌ها فیبرهای طویل آمیلوئیدی حاصل شده (شکل ۲) و در حضور هر دو عصاره به‌طور مشخص از تشکیل فیبرها جلوگیری به عمل آمده است.





شکل ۵. *تصویر میکروسکوپ نیروی اتمی ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر لیزوزیم در بافر گلایسین با pH=۲/۵ بعد از ۲٤ ساعت انکوباسیون در دمای ۵۷ درجه سانتی گراد و در حضور ۱ میلی‌گرم عصاره چای سبز (شکل سمت چپ) و دارچین (شکل سمت راست)*

اثر عصاره‌های برگ چای سبز و پوست دارچین بر ساختار پروتئین

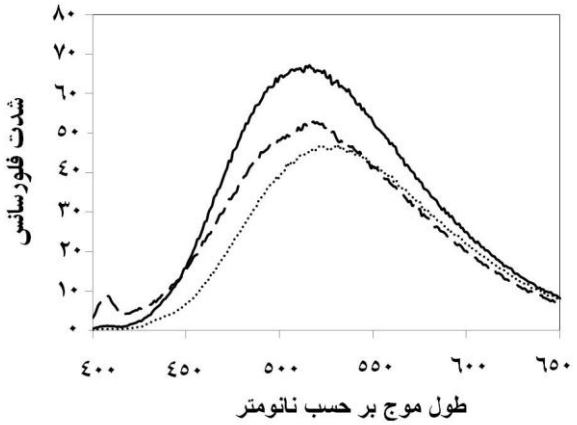
بر اساس آنچه که در بخش مقدمه اشاره شد برای تشکیل فیبرهای بالغ آمیلوئیدی که از نشانه‌های آلزایمر است ابتدا پروتئین مونومر Aβ به دلایل مختلف به‌صورت جزئی واسرشته شده و به‌صورت چند تایی کنار هم قرار گرفته و هسته‌های اولیه فیبر را تشکیل می‌دهد و وقتی غلظت این هسته‌ها به یک حد مشخصی رسید پروتوفیبریل تشکیل و سپس از اتصال پروتوفیبریل‌ها فیبرها طبق فرمول زیر بوجود می‌آید:

فرمول ۱

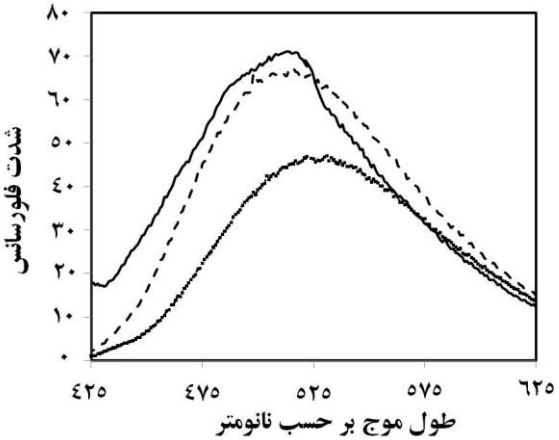
فرم طبیعی ↔ فرم غلط تاخورده ↔ تشکیل هسته‌ها ↔ تشکیل پروتوفیبریل‌ها ↔ تشکیل آمیلوئید

هر کدام از این مراحل می‌تواند هدف تولید دارو ومهار این فرایند باشد. برای مشخص شدن اینکه آیا این عصاره‌ها باعث پایداری فرم طبیعی و ممانعت از تشکیل هسته‌ها می‌شوند یا خیر از تکنیک فلورسانس خارجی استفاده شد. در اثر قرارگیری لیزوزیم در شرایط اسیدی، پروتئین به‌صورت جزئی واسرشته شده لذا فلورسانس خارجی آن افزایش می‌یابد (۱۷). اگر عصاره‌ها قادر باشند فرم واسرشته را به فرم طبیعی تبدیل کنند باعث کاهش فلورسانس خارجی می‌شوند. بنابراین فلورسانس خارجی لیزوزیم در حضور و غیاب عصاره‌ها بررسی شد . همانطور که شکل ۶ نشان می‌دهد در حضور عصاره برگ چای سبز شدت فلورسانس کاهش یافته بنابراین به نظر می‌رسد باعث برگشت‌پذیری پروتئین به سمت ساختار طبیعی شده است ولی در حضور عصاره پوست دارچین شدت فلورسانس افزایش یافته است (شکل ۷). این نشان می‌دهد که عصاره دارچین نه تنها باعث مهار این مرحله نشده بلکه حتی ساختار پروتئین را بیشتر باز کرده است لذا اثر مهاری دارچین در مراحل بعدی تولید آمیلوئید اتفاق می‌افتد. اثر عصاره دارچین و چای سبز در مراحل فاز تشکیل پروتوفیبریل و مرحله تشکیل فیبرهای بالغ آزمایش شد و

نتایج نشان داد که هر دو عصاره باعث مهار این دو مرحله می‌شوند. بنابراین عصاره چای سبز اثر مهاری روی تمام مراحل تشکیل فیبر دارد ولی عصاره دارچین روی مرحله اول یعنی پایدار سازی شکل طبیعی پروتئین تأثیری ندارد.



شکل ٦. *ANS فلوئورسانس، ANS به تنهایی (....) و لیزوزیم در بافر گلایسین ۵۰ میلی مولار pH =۲/۵ در غیاب (—) و یا حضور (– –) ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره چای سبز. طول موج تحریک ۳۸۰ نانومتر بود و طیف نشری بین ٤۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر بدست آمد.*



شکل ۷. *ANS فلوئورسانس، ANS به تنهایی (....) و لیزوزیم در بافر گلایسین ۵۰ میلی‌مولار pH =۲/۵ در غیاب (– – –) و یا حضور (—) ۱ میلی‌گرم عصاره دارچین. طول موج تحریک ۳۸۰ نانو متر بود و طیف نشری بین ٤۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر به‌دست آمد.*

بحث

استفاده از گیاهان دارویی برای درمان بیماری‌ها قدمت بسیار طولانی دارد ومردم هر ناحیه استفاده خاص براساس نظریه‌های سنتی خاص خودشان از گیاهان دارویی می‌کردند. در مورد خواص آنتی‌اکسیدانی گیاهان دارویی که برای محافظت از مواد غذایی ضروری است و خواص مفیدی برای سلامتی انسان دارد، مطالعات گسترده‌ای صورت گرفته است (۱۸،۱۹). از طرف دیگر عصاره های گیاهان دارویی علاوه بر نقش آنتی اکسیدانی به دلیل نوع مواد شیمیایی موجود در آنها منشأ اثرات دیگری نیز می باشند. تحقیقات مختلف نشان می دهد که ترکیبات پلی فنولیک و ایندولی (صرف نظر از نقش آنتی‌اکسیدان بودنشان) قادرند مستقیما روی تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی تاثیر گذاشته و مانع رشد و بلوغ فیبرهای آمیلوئیدی گردند. مطالعات نشان داده است که ماده مؤثر اغلب گیاهان دارویی که باعث تقویت حافظه می‌گردد دارای ترکیبات پلی فنولیک و مولکول‌های کوچک آروماتیک است (۱۲-۹). از جمله گیاهانی که در طب سنتی از آنها به عنوان ضد آلزایمر نام برده می‌شوند دارچین و چای سبز هستند (۸). در عصاره پوست دارچین ترکیباتی مثل سینامالدهید، پروآنتوسیانیدن‌ها (proanthocyanidin) و مولکول‌های پلی فنلیک و در عصاره چای سبز کافئین و دائیدزئین (daidzein) وجود دارد که همگی ساختار آروماتیکی دارند (۱۶). در مطالعه حاضر اثر این دو عصاره روی مهار مستقیم تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی بررسی گردید و همان‌طور که در شکل ۳ و ۴ مشاهده می‌شود هر دو قادربه مهار تشکیل فیبر بوده اند ولی در غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر چای سبز دارای اثر بهتری بود. اثر این عصاره‌ها در غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر روی کینتیک تشکیل فیبرهای لیزوزیم نشان می‌دهد که هر دو عصاره در این غلظت روی مرحله تشکیل هسته‌ها، تشکیل پروتوفیبریل و همچنین تشکیل فیبرهای بالغ آمیلوئیدی اثر می‌گذارند ولی چای سبز روی تمام مراحل

مهار کننده قوی‌تری می‌باشد (شکل ۱). سرعت تجمع پروتئین‌های مختلف به عوامل فیزیکوشیمیایی مثل هیدروفوبیستی، استعداد آن‌ها به ایجاد ساختارهای ثانویه، بار و اندرکنش‌های آروماتیکی Stacking π-π بستگی دارد (۲۰،۲۱). نقش اندرکنش‌های آروماتیک در تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی براساس مطالعات روی تعدادی از پروتئین‌ها و قطعات کوچک پپتیدی که قادر به تولید فیبر آمیلوئیدی هستند ارائه شده است (۲۲،۲۳). این فرضیه منتج به این پیشنهاد شد که Stacking اسیدهای آمینه آروماتیک نقش مؤثری در تسریع فرایند کنار هم قرارگیری و تولید فیبرهای آمیلوئیدی ایفا می‌کنند. اندرکنش‌های Stacking ممکن است باعث ایجاد جهت‌گیری مناسب عناصر سازنده بخش اصلی (Core) تشکیل دهندهٔ فیبرهای آمیلوئیدی در مراحل خیلی اولیهٔ آن گردد (۲۴،۲۵). به نظر می‌رسد عصاره چای سبز به دلیل وجود ترکیبات آروماتیک از جمله کافئین و دائیدزئین و عصاره دارچین به دلیل وجود سینامالدهید، پروآنتوسیانیدن‌ها و سایر مولکول‌های پلی‌فنولیک توسط همین مکانیسم قادرند مانع تشکیل هسته‌های اولیه و در نهایت مهار رشد و بلوغ فیبرهای آمیلوئیدی شوند. از نظر ساختار شیمیایی، کافئین و دائیدزئین دارای حلقه‌های آروماتیک بیشتری هستند و احتمالاً بهتر می‌توانند پیوندهای استکینگ را در هسته‌های اولیه ناپایدار کرده و باعث مهار بهتر نسبت به دارچین شوند. از طرف دیگر به دلیل پایدارسازی لیزوزیم توسط عصاره چای سبز (شکل ۶) و ممانعت از تشکیل گونه‌های مستعد تجمع این عصاره می‌تواند صرف نظر از اثر نیروهای استکینگ، مانع از تشکیل فیبر نیز گردد و بنابراین نسبت به عصاره دارچین که قادر به پایدارسازی لیزوزیم نیست مهار کننده بهتری است. به‌طور خلاصه داده‌های این پژوهش نشان می‌دهد که عصاره‌های پوست دارچین و برگ چای سبز به دلیل داشتن ترکیبات شیمیایی آروماتیک با بر هم زدن نیروهای استکینگ بین اسیدهای آمینه آروماتیک لیزوزیم مانع تشکیل هسته‌های اولیه و مستعد تشکیل تجمع شده و باعث مهار تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی می‌گردد و عصاره چای سبز هم به دلیل پایدارسازی لیزوزیم و هم به دلیل داشتن تعداد حلقه‌های آروماتیک بیشتر به‌صورت مؤثرتری این فرایند را مهار می‌کند.

سپاسگزاری

از معاونت پژوهشی دانشگاه پیام نور به‌دلیل تصویب اعتبار پژوهشی لازم برای انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می‌گردد. همچنین از جناب آقای یاسر تبرایی برای کمک در بخش تحلیل آماری این مقاله قدردانی می‌گردد.

References

1. Ho YS, So KF, Chang RC. Anti-aging herbal medicine-How and why can they be used in aging-associated neurodegenerative diseases? *Ageing Res Rev* 2010; 9(3): 345-62.
2. Price DL, Sisodia SS, Borchelt DR. Alzheimer's disease—when and why? *Nat Genet* 1998; 19: 314–6.
3. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 2002; 297(5580): 353–6.
4. Lansbury PT Jr. Evolution of amyloid: what normal protein folding may tell us about fibrillogenesis and disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(7): 3342–4.
5. Stefani M, Dobson CM. Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *J Mol Med*. 2003; 81(11): 678–99.
6. Nilsson MR. Techniques to study amyloid fibril formation *in vitro*. *Methods* 2004; 34(1): 151-60.
7. Desai AK, Grossberg GT. Diagnosis and treatment of Alzheimer's disease. *Neurology* 2005; 64(12 suppl 3): 34-9.
8. Adams M, Gmunder F, Hamburger M. Plants traditionally used in age related brain disorders—A survey of ethnobotanical literature. *J Ethnopharmacol* 2007*;* 113(3): 363–81.
9. Gertz HJ, Kiefer M. Review about *Ginkgo biloba* special extract EGb 761 (Ginkgo). *Curr Pharm Des* 2004; 10(3): 261–4.
10. Wang J, Xu HM, Yang HD, Du XX, Jiang H, Xie JX. Rg1 reduces nigral iron levels of MPTP-treated C57BL6 mice by regulating certain iron transport proteins. *Neurochem Int* 2009; 54(1): 43–8.
11. Alkam T, Nitta A, Mizoguchi H, Itoh A, Nabeshima T. A natural scavenger of peroxynitrites, rosmarinic acid, protects against impairment of memory induced by Abeta (25-35). *Behav Brain Res* 2007; 180(2): 139-45.
12. Wang Y, Yin H, Wang L, Shuboy A, Lou J, Han B, Zhang X, Li J. Curcumin as a potential treatment for Alzheimer's disease: a study of the effects of curcumin on hippocampal expression of glial fibrillary acidic protein. *Am J Chin Med* 2013; 41(1): 59-70.
13. Dobson CM. Protein folding and misfolding. *Nature* 2003; 426(6968): 884–90
14. Arnaudov LN, de Vries R. Thermally induced fibrillar aggregation of hen egg white lysozyme. *Biophys J* 2005; 88(1): 515–26.
15. Morshedi, D, Rezaei-Ghaleh N, Ebrahim-Habibi A, Ahmadian S, Nemat-Gorgani M. Inhibition of amyloid fibrillation of lysozyme by indole derivatives-possible mechanism of action. *FEBS J* 2007; 274(24): 6415-25.
16. Peterson DW, George RC, Scaramozzino F, Lapointe NE, Anderson RA, Graves DJ, Lew J. Cinnamon extract inhibits tau aggregation associated with alzheimer's disease *in vitro. J Alzheimers Dis* 2009; 17(3): 585-97.
17. Ramshini A, Ebrahim-Habibi A. Thermal disaggregation of type B yeast

hexokinase by indole derivatives: A mechanistic study. *Int J Biol Macromol* 2012; 50(5): 1260-6.

18. Agarwal KC. Therapeutic actions of garlic constituents. *Med Res Rev* 1996; 16(1): 111–24.
19. Aggarwal BB, Sundaram C, Malani N, Ichikawa H. Curcumin: the Indian solid gold. *Adv Exp Med Biol* 2007; 595: 1–75.
20. Pawar A P, Dubay KF, Zurdo J, Chiti F, Vendruscolo M, Dobson CM. Prediction of "aggregation-prone" and "aggregation-susceptible" regions in proteins associated with neurodegenerative diseases. *J Mol Biol* 2005; 350(2): 379–92.
21. Tartaglia G G, Cavalli A, Pellarin R, Caflisch A. The role of aromaticity, exposed surface, and dipole moment in determining protein aggregation rates. *Protein Sci* 2004; 13(7): 1939–41.
22. Gazit E. A possible role for π-stacking in the self-assembly of amyloid fibrils. *FASEB J* 2002; 16(1): 77–83.
23. Gazit E. Mechanistic studies of the process of amyloid fibrils formation by the use of peptide fragments and analogues: implications for the design of fibrillization inhibitors. *Curr Med Chem* 2002; 9(19): 1725–35.
24. Gazit E. Global analysis of tandem aromatic octapeptide repeats: the significance of the aromatic-glycine motif. *Bioinformatics* 2002; 18(6): 880–3.
25. Azriel R, Gazit E. Analysis of the minimal amyloid-forming fragment of the islet amyloid polypeptide. An experimental support for the key role of the phenylalanine residue in amyloid formation. *J Biol Chem* 2001; 276(36): 34156–61.

Inhibitory Effect of *Cinnamomum Zeylanicum* and *Camellia Sinensis* Extracts on the Hen Egg-White Lysozyme Fibrillation

Ramshini H., Ph.D.[1*], Ayoubi F., M.Sc.[2]

1. Assistant Professor of Biochemistry, Department of Biology, Payam-e-Noor University, Tehran, Iran

2. Master of human Physiology, Physiology-Pharmacology Research Center, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran

* Corresponding author; E-mail: hramshini@ibb.ut.ac.ir

(Received: 15 Feb. 2013 Accepted: 18 Sep. 2013)

Abstract

Background & Aims: Many neurodegenerative diseases including Alzheimer's, Parkinson and Huntington diseases are associated with the deposition proteinaceous aggregates known as amyloid fibrils. Currently, there is no approved therapeutic agent for inhibition of fibrillar assemblies. One important approach in the development of therapeutic agents is the use of herbal extracts. At the present comparative study, the effect of *Cinnamomum zeylanicum Nees* and *Camellia sinensis L*, extracts on prevention of hen egg white lysozyme (HEWL) amyloidogenesis were studied.

Methods: In this experimental study, acidic pH and high temperature were used to drive the protein towards amyloid formation. Lysozyme was dissolved at 2 mg/mL in 50mM glycine buffer (pH 2.5), and then incubated at 57 °C for a specified time while stirred gently by Teflon magnetic bars. Measurement of thioflavin T fluorescence intensity and AFM micrography were used to characterize the HEWL fibrillation processes. Data were analyzed through SPSS 16 using descriptive statistics as well as independent t-test.

Results: In the absence of the extracts, soluble oligomers became evident after 24 h of incubation, followed by subsequent appearance of mature fibrils after 48h. Upon incubation with various concentrations of *Cinnamomum zeylanicum* and *Camellia sinensis* extracts in range of 0.1-1 mg/ml, formation of fibrillar assemblies were dose-dependently inhibited but the extract of Camellia was more efficient (P=0.025). Also, in contrast to Cinnamomum, Camellia extract can stabilize native protein and reverse partial unfolded form into native form and thus, can inhibit all of amyloid formation pathways.

Conclusion: The obtained results suggest that poly phenols of the extracts directly insert into amyloidogenic core of early aggregates and inhibit amyloid fibril formation but *Camellia* extract, due to its specific chemical structure, is probably more effective for aggregation inhibition.

Keywords: Lysozyme, *Cinnamomum zeylanicum* extract, *Camellia sinensis* extract, Amyloid aggregation inhibition

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2014; 21(4): 290-301