فصلنامه علمی زیست‌شناسی کاربردی دانشگاه الزهرا(س)
دوره ۳۵، شماره ۲، پیاپی ۷۲، تابستان ۱۴۰۱، ص ۱۸-۷
نوع مقاله: مقاله پژوهشی

The Quarterly Scientific Journal of Applied Biology
Vol.36, No.2, Sering.72, Summer 2022, p. 7-18
Article type: Research paper

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۳۱
وب سایت نشریه: https://jab.alzahra.ac.ir
10.22051/JAB.2021.34309.1398

بررسی تاثیر عصاره الکلی دوگیاه دارویی سیاهدانه و گلپر برروی تجمعات آمیلوئیدی پروتئین انسولین

کیمیا احدی عمندی،[۱]سید ابوالقاسم قدمی *[۲]

چکیده

مقدمه: *بررسی نقش متنوع و حیاتی پروتئین‌ها در بدن، در مقابل نقص و بیماری ناشی از عدم فعالیت صحیح آن‌ها موضوع مورد علاقه‌ای برای تحقیقات علمی می‌باشد. تجمعات آمیلوئیدی و به دنبال آن بیماری‌های مربوط به تخریب سیستم عصبی جنبه‌ی دیگری از نقش پروتئین‌ها در بیماری‌زایی را به نمایش گذاشته‌اند. با در نظر گرفتن این موضوع که درحال حاضر درمان مشخصی برای این بیماری‌ها وجود ندارد، پیشگیری از ایجاد تجمعات آمیلوئیدی کاربردی‌ترین روش برخورد با آن‌ها است.*

روش‌ها: *در این پژوهش اثرات عصاره الکلی دو گیاه دارویی برروی ایجاد تجمعات فیبریلی انسولین بررسی شد. تشکیل ساختار آمیلوئیدی در پروتئین انسولین تحت شرایط دما و pH خاص و تحت تاثیر عصاره‌ی الکلی گیاه سیاهدانه و گلپر در غلظت‌های مختلف به کمک تکنیک فلورسانس تیوفلاوین‌تی (ThT) و میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) بررسی شد.*

نتایج و بحث: *بررسی‌ها نشان دادند که عصاره‌های به دست آمده تاثیر پیشگیرانه‌ی به سزایی در تجمعات آمیلوئیدی پروتئین انسولین ایفا می‌کنند. با توجه به سابقه‌ی طولانی استفاده از گیاهان دارویی مانند سیاهدانه و گلپر در فرهنگ ایرانی و اسلامی و همچنین حضور ترکیبات با ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و ضدتشنجی در آن‌ها و برطبق داده‌های به دست آمده از این پژوهش، دو گیاه معرفی شده کاندیدهای مناسبی برای بررسی ترکیبات ضدتجمع پروتئینی هستند.*

واژه های کلیدی: آلزایمر، بیماری‌های تخریب عصبی، بیماری‌های وابسته به سن ، فیبریل‌های آمیلوئیدی، گیاه گلپر، گیاه سیاهدانه

---

۱ . دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران
۲ . استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران

مقدمه

در جامعه‌ی جهانی امروز با افزایش امید به زندگی، بیماری‌های تخریب‌کننده سیستم عصبی (Neurodegenerative diseases) به عنوان بیماری‌های وابسته به سن نگرانی‌های زیادی را به همراه آورده‌اند. این بیماری‌ها مانند آلزایمر (Alzheimer's disease)، پارکینسون (Parkinson's disease)، اسکلروزیس آمیوتروفیک جانبی (ALS)، هانتینگتون (Huntington's disease)، آتاکسی مخچه‌ای نخاعی (Spinocerebellar Ataxia)، زوال عقل لب گیجگاهی (frontotemporal dementia)، به طور معمول با نشانه‌های بیماری‌زایی مشابه مانند زوال عقلی، فراموشی، ناتوانی در صحبت و حرکت که به طور پیشرونده‌ای با افزایش سن افزایش می‌یابند، شناسایی می‌شوند که عوامل مشابه درونی مانند تخریب نورون‌ها در قسمت‌های مشخصی از مغز، تخریب شبکه‌ی ارتباط سیناپسی و از دست رفتن توده‌ی مغزی به عنوان منشاء اصلی این نشانه‌های بیماری‌زایی به شمار می‌روند (Soto & Pritzkow, 2018). بیماری آلزایمر از اولین انواع بیماری‌های تخریب‌کننده سیستم عصبی شناخته شده و بررسی شده است که عامل ایجاد بیش از ۸۰ درصد زوال عقل در سنین بالا به شمار می‌رود (Durães *et al*., 2018)، گرچه هنوز هم مکانیسم دقیق ایجاد کننده‌ی این بیماری مشخص نیست اما حضور پلاک‌های آمیلوئیدی متشکل از آمیلوئید بتا (β-amyloid) و ریسمان‌های نوروفیبری ایجاد شده از پروتئین تاو (Tau) با تاخوردگی نامناسب، در داخل مغز افراد مبتلا به این بیماری گزارش شده‌است (Fu *et al*., 2018). کم و بیش تمام بیماری‌های تخریب‌کننده سیستم عصبی به گونه‌ای با ساختار نامناسب پروتئین‌ها مرتبط هستند، این مشکل ساختاری می‌تواند با تاخوردگی نامناسب پروتئین، برش‌های نامناسب ایجاد شده در یک پروتئین، تغییرات پس از ترجمه‌ی اشتباه ایجاد شده برروی پروتئین، مشکلات مربوط به بیان پروتئین و حتی جهش‌های ژنی در ارتباط باشد (Prusiner, 2001).

پروتئین‌ها مسئولیت انجام بسیاری از فعالیت‌های سلولی را برعهده دارند، این مواد برای انجام فعالیت‌های خود نیازمند فرم ساختاری ویژه‌ای هستند. در فرآیند تاخوردگی، ساختار خطی اولیه پروتئین‌ها به ساختار پویای سه بعدی نهایی و عملکردی خود تبدیل می‌شوند. در این فرآیند حدواسط‌های نیمه فولد شده‌ی (partially folded) ایجاد شده از ساختار خطی اولیه مسئول ایجاد ساختار نهایی هستند (Thompson & Barrow, 2002). طی این مسیر چپرون‌های سلولی نقش به سزایی دارند و در صورت ایجاد هرگونه نقص در عملکرد این مولکول‌ها، ساختارهای حدواسط به سمت ایجاد تجمعات اولیگومری پروتئینی و به دنبال آن آمیلوئیدها حرکت می‌کنند، درواقع در فیبریلاسیون پروتئینی، پروتئین‌های کروی و محلول طی تغییر ساختمانی ساختارهای بتا فراوان و آبگریز ایجاد می‌کنند. ساختارهای نامناسب پروتئینی توسط پروتئازها و با مصرف انرژی قابل حذف شدن هستند (Merlini *et al*., 2001)، اما گاهی سنتز بیش از حد پروتئین، جهش‌های وراثتی و یا ساختارهای مستعد تجمع در پروتئین (Picken, 2020) در کنار عدم کارایی مناسب سیستم چپرونی و سیستم پروتئازی، ساختارهای آمیلوئیدی برگشت ناپذیر و سمی ایجاد خواهد کرد (Merlini et al., 2001). ساختارهای آمیلوئیدی ایجاد شده به فیبرهای آمیلوئیدی نامحلول پلیمریزه شده و در ادامه پلاک‌ها را ایجاد می‌کنند، این ساختارهای پلاک مانند، مسیر کینازی‌ای را فعال می‌کنند که باعث ایجاد پاسخ‌های التهابی می شود، این پاسخ‌ها برای مثال در مغز به سمیت عصبی منجر خواهند شد (Tiwari *et al*., 2019). ایجاد ساختارهای تجمعی و آمیلوئیدی پروتئین‌ها در شرایط *in vitro* به عوامل متفاوتی وابسته است، از میان این عوامل می‌توان به pH، دمای بالا که باعث از بین رفتن برهمکنش‌های هیدروژنی و هیدروفوبی می‌شود، غلظت بالای پروتئین و عوامل دیگر اشاره کرد (Lee *et al*., 2020). انسولین پروتئینی کوچک، متشکل از دو

زنجیره‌ی A و B که توسط دو پیوند دی‌سولفید به یکدیگر متصل شده‌اند و هورمون اصلی تنظیم کننده‌ی قند خون است. این پروتئین همواره به عنوان مدلی برای تجمعات آمیلوئیدی به شمار می‌رفته است، که این انتخاب برگرفته از تمایل زیاد پروتئین انسولین به تشکیل آمیلوئید در شرایط در شیشه و همچنین مشاهده‌ی تشکیل آمیلوئید در محل تزریق انسولین در افراد مبتلا به دیابت نوع ۲ می‌باشد ((Iannuzzi *et al*., 2017)).

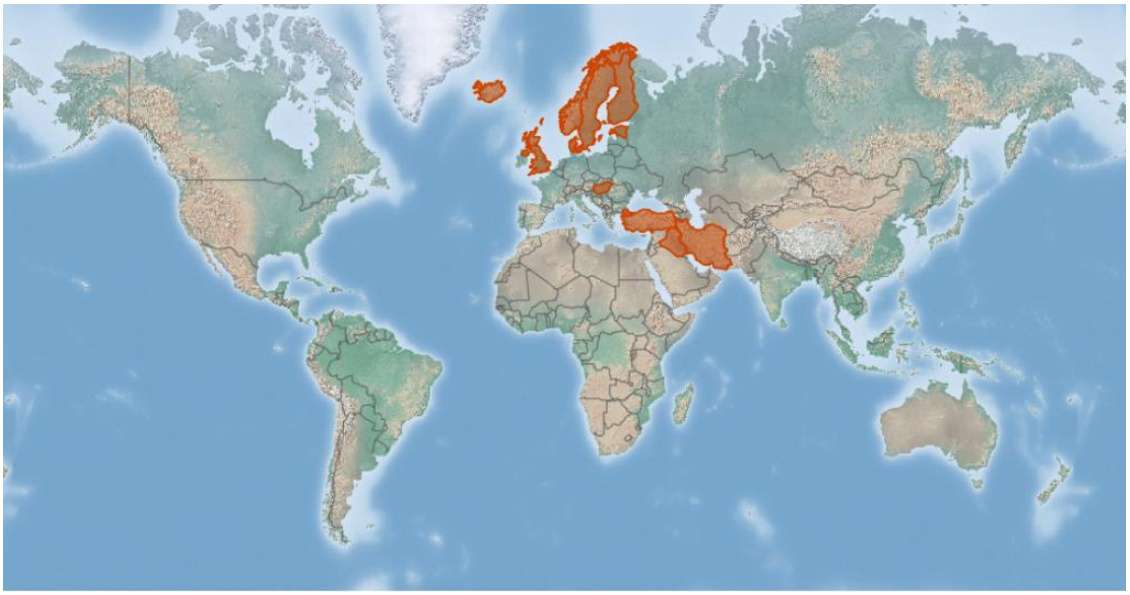
پزشکی سنتی از زمان‌های گذشته همواره در زندگی مردم نقش پررنگی داشته است، با این که با مکانیزه شدن و سنتز شیمیایی داروهـــا، توجه به طب سنتی مانند گذشته نیست اما گیاهان دارویی همواره گزینه‌ی مورد توجهی بوده‌اند. ترکیبات متفاوتی در پزشکی سنتی برای تقویت حافظه و جلوگیری از فراموشی پیشنهاد شده‌اند که از معروف‌ترین آن‌ها می‌توان به کندر، صمغ درختچه *Boswellia carteri* Birdw.، اشاره کرد . به طور کلی در گذشته (کتب قدیمی) فراموشی را تحت عنوان «نسیان» می‌شناختند و ناشی از سردی مغز می‌دانستند و برای درمان آن از ترکیبات تغییر دهنده‌ی مزاج استفاده می‌کردند. در علم جدید ارتباطی میان بیماری‌های تخریب‌کننده سیستم عصبی و استرس اکسیداتیو مطرح شده‌است و به کارگیری گیاهان واجد ترکیبات آنتی اکسیدان به عنوان منبعی برای یافت ترکیبات درمانی، اهمیت پیدا کرده است (Jamshidi *et al*., 2020). در دهه‌های گذشته بررسی‌های فراوانی برای یافتن عوامل پیشگیری کننده از ایجاد ساختارهای آمیلوئیدی صورت گرفته‌است که در این میان می‌توان به اثرگذاری میوه‌ها و سبزیجات حاوی ترکیبات طبیعی اشاره کرد. مشخص شده‌است که ترکیبات موثر در پیش‌گیری عارضه‌های تخریب‌کننده عصبی به طور معمول آنتی‌اکسیدان هستند و اثرگذاری ضدتجمعی در رابطه با خودپیرایشی برخی پپتیدها و پروتئین‌ها در مورد گیاهان سرشار از ترکیبات فنلی گزارش شده است (Ciccone *et al*., 2020).

گیاه گلپر *Heracleum persicum* Desf. ex Fisch., C.A.Mey. & Avé-Lall. (شکل ۱) گیاه گلدار بومی کشورهای آسیایی شامل ایران، عراق و ترکیه، عضو خانواده‌ی Apiaceae و متعلق به تیره مرکبان است (شکل ۲). این گیاه که از گذشته به عنوان ادویه و طعم دهنده‌ی غذا استفاده می‌شده است، دارای ترکیبات مختلفی مانند فورانوکومارین‌ها، هیدروکسی بوتیرات، هگزیل ایزوبوتیرات و غیره می‌باشد که خواص متعددی از جمله خاصیت آنتی‌اکسیدانی به آن بخشیده‌اند (Atefeh *et al*., 2010). این گیاه به طور سنتی و بـــومی از زمـــان‌های گذشته در ایران برای درمان بسیاری از عارضه‌ها مانند مشکلات تنفسی، گوارشی و تقویت حافظه به کار می‌رفته است. افراد دارای فراموشی، مشکلات حافظه و کندذهن نیز از زمان‌های گذشته به خوردن آب این میوه تشویق می‌شده‌اند (Majidi & Sadati Lamardi, 2018).بررسی‌ها مشخص کرده‌است که عصاره استونی (acetone extract) دانه‌ی گلپر تاثیر مثبتی برروی کاهش اثرات ناشی از تشنج القا شده با پنتیلن تترازول و یا شوک الکتریکی حداکثری، داشته است (Sayyah *et al*., 2005).

گیاه سیاهدانه *Nigella sativa* L. (شکل ۳) از تیره Ranunculaceae گیاهی سرشار از ترکیبات کینون و پلی‌فنلی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی است که فعالیت اثرگذاری در رابطه با جلوگیری از تجمعات پروتئینی از خود نشان داده است (Khan *et al*., 2015). این گیـــاه به عنـــوان گیـــاه دارویی جادویی از زمان‌های گذشته کاربردهای زیادی داشته‌است. این گیاه به طور خودرو در جنوب اروپا، شمال آفریقا و جنوب غرب آسیا رشد می‌کند و در برخی کشورهای دیگر مانند کشورهای خاورمیانه‌ای کشت داده شده‌است (Ahmad *et al*., 2013)، (شکل ۴). در این مقاله تاثیر عصاره‌ی الکلی گیاه گلپر و گیاه سیاهدانه به‌منظور مهار تشکیل تجمعات آمیلوئیدی پروتئین انسولین مورد مطالعه قرار گرفته است.

شکل ۱- گیاه گلپر (گیاه کامل، میوه) (UK: CAB International. www.cabi.org/isc)

Figure 1. *Heracleum persicum* (whole plant, fruit)

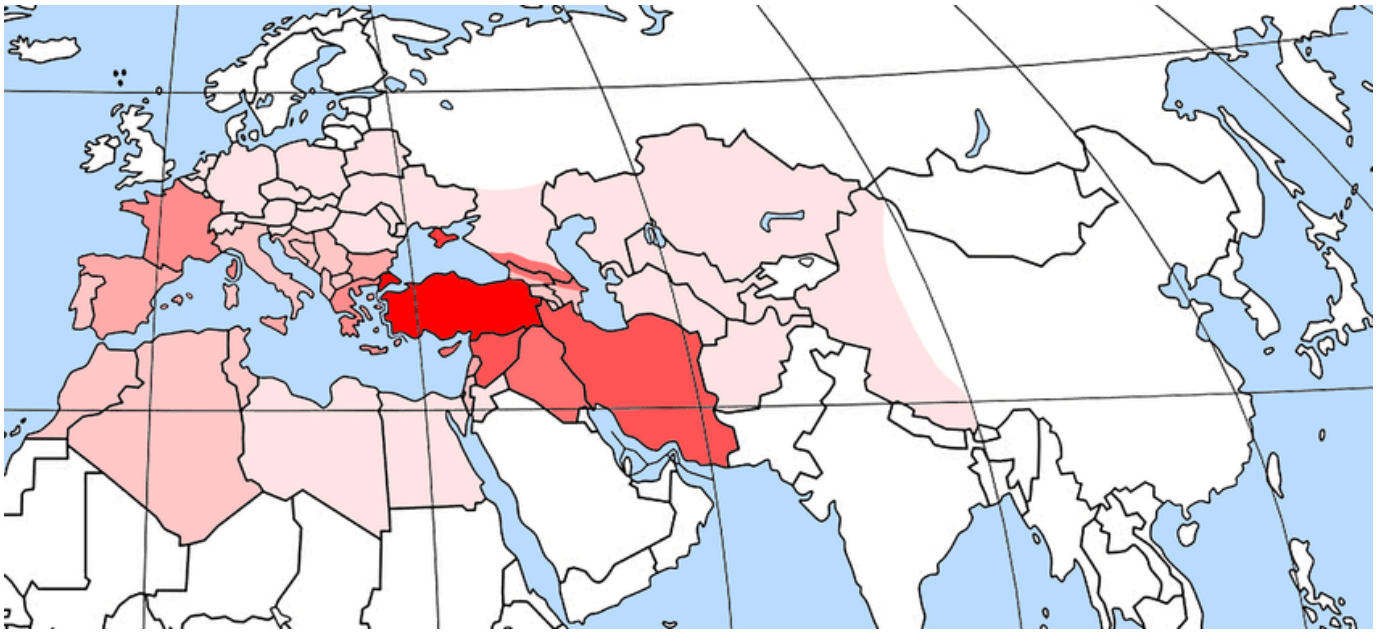


شکل ۲- پراکنش گیاه گلپر (UK: CAB International. www.cabi.org/isc)

Figure 2. *H. persicum* distribution

شکل ۳- سیاه دانه (گیاه کامل، گل، دانه) (http://bioweb.uwlax.edu)

Figure 3. *N. sativa* (Whole plant, flower, seed)



شکل ۴- پراکنش گیاه سیاهدانه (Heiss et al., 2013).

***Figure 4. Nigella sativa L.* distribution**

مواد و روش‌ها

تهیه‌ی محلول‌ها، بافر و پروتئین

پروتئین انسولین نوترکیب انسانی از شرکت سیگما خریداری شد. تمام مواد لازم این تحقیق مانند نمک‌های سدیم دی‌هیدروکسی فسفات، دی‌سدیم هیدروکسی فسفات، هیدروکلریدریک اسید و هیدروکسید سدیم از شرکت سیگما خریداری شدند. تمام نمونه‌ها در بافر سدیم فسفات ۵۰ میلی مولار ساخته شدند. تمام داده های ارائه شده حاصل سه بار تکرار بوده و نمودارها و تصاویر به دست آمده مجموع این سه تکرار می‌باشند. برای تهیه بافر فسفات از نمک‌های سدیم دی‌هیدروکسی فسفات و دی‌سدیم هیدروکسی فسفات استفاده شد، به این صورت که غلظت مورد نظر جهت تهیه بافر مشخص شده و طی محاسبات استوکیومتری میزان گرم مورد نیاز از نمک اسیدی و بازی در حجم مورد نظر با یکدیگر مخلوط شدند

تهیه‌ی عصاره‌ی الکلی

پودر میوه گیاه گلپر و دانه‌ی گیاه سیاهدانه (تبدیل به پودر توسط دستگاه آسیاب خانگی) به صورت محلی از عطاری بزرگ تجریش، شهر تهران خریداری شد. میزان ۱۰۰ گرم از هر گیاه در ۴۹۰ میلی‌لیتر الکل اتانول خیسانده شده و برای ۷۲ ساعت در دستگاه شیکر تحت دمای ۳۷ درجه شیک شد. سپس نمونه‌های شیک شده به منظور جداسازی محلول الکلی از پودرهای باقی‌مانده، از کاغذ صافی عبور داده شدند. محلول‌های الکلی به دست آمده برای خارج‌سازی الکل و تهیه‌ی عصاره از آن‌ها وارد دستگاه تقطیر دوار (روتاری) شدند و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و تحت تاثیر پمپ خلاء تغلیظ شدند. عصاره‌های به دست آمده در نهایت توسط بافر رقیق شده و در غلظت‌های مختلف (غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تهیه شدند (Atefeh *et al*., 2010).

آماده‌سازی نمونه‌ی فیبریل پروتئینی

نمونه‌ی انسولین نوترکیب انسانی طبق قانون بیر-لامبرت تعیین غلظت شد (طول موج= ۲۸۰ نانومتر و ضریب جذب مولی انسولین= ۱/۰۶۷۵). غلظت مورد نظر از نمونه‌ی انسولین (۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با استفاده از بافر فسفات تهیه شد. به منظور ایجاد فیبریل انسولین، pH نمونه‌ی انسولین تهیه شده در غلظت مورد نظر، توسط HCl به ۵/۴ رسید و نمونه‌ی تنظیم pH شده، برای مدت ۵ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد گرمادهی (انکوبه) شد (Gancar *et al*., 2020).

فلورسانس اسپکتوفتومتری تیوفلاوین تی

برای سنجش تشکیل و یا عدم تشکیل ساختار آمیلوئیدی در پروتئین انسولین روش فلورسانس- تیوفلاوین‌تی مورد استفاده قرار گرفت. محلول ۵ میلی‌مولار تیوفلاوین‌تی تهیه شد. ۴۰ میکرولیتر از محلول ۵ میلی‌مولار تیوفلاوین تی به ۲ میلی‌لیتر از محلول انسولین اضافه شد و سپس میزان نشر توسط دستگاه فلورسانس اسپکترومتری (Shimadzu RFg000) مورد سنجش قرار گرفت. افزایش میزان نشر فلورسانس ترکیب تیوفلاوین تی به معنی تشکیل ساختارهای آمیلوییدی و قرار گرفتن این ترکیب در این ساختارها

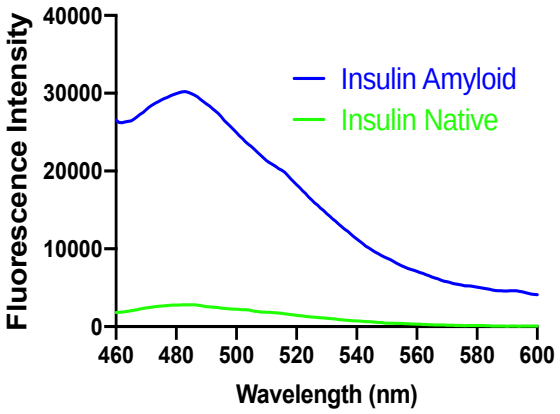
در نظر گرفته شد (تنظیمات دستگاه شامل، طول موج تهیج ثابت= ۴۴۰ نانومتر، شکاف نشر= ۵ نانومتر، شکاف تهیج= ۲/۵ نانومتر بود) (Merlini *et al.*, 2001).

بررسی تشکیل فیبریل توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

نمونه‌های فیبریل شده‌ی انسولین به تنهایی، و انسولین همراه با غلظت‌های مختلف عصاره‌ی الکلی گلپر و سیاهدانه، برروی ورق آلومینیومی قطره گذاری شده و سپس با پودر طلا پوشش داده شدند. این نمونه‌ها سپس توسط دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) با مشخصات (TESCAN VEGA3) تصویر برداری شدند *(Ghadami et al., 2021)*.

نتایج و بحث

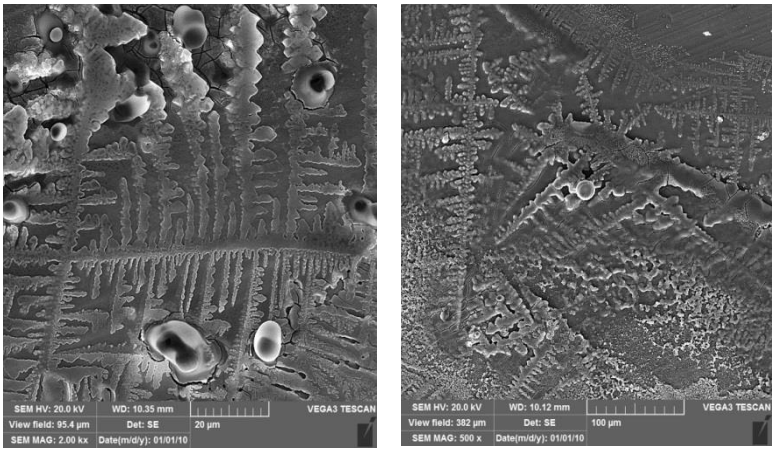
گیاهان از زمان‌های گذشته منابع اصلی ترکیبات دارویی به شمار می‌رفته‌اند، از آنجا که بیماری‌های تخریب کننده سیستم عصبی، بیماری‌های وابسته به سن بوده و افراد مبتلا به این بیماری‌ها افراد مسن با مصرف تعداد زیاد و متنوعی از داروهای شیمیایی هستند امید است که به کمک پزشکی سنتی و جایگزینی برخی از داروهای شیمیایی با مواد گیاهی و طبیعی از اثرات سوء مصرف همزمان چندین دارو در سنین بالا جلوگیری کرد. در این پژوهش فرم آمیلوئیدی پروتئین نوترکیب انسانی انسولین تحت شرایط در شیشه (دما= ۶۰ درجه سانتی‌گراد، زمان= ۵ ساعت، pH= ۵/۴) در آزمایشگاه تهیه شد. نمونه‌ی آمیلوئیدی ایجاد شده توسط نشانگر تیوفلاوین‌تی (ThT) و به کمک دستگاه اسپکتوفتومتری فلورسانس مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد، زمانی که ترکیب ThT به عنوان شناساگر داخل ساختار آمیلوئیدی قرار می‌گیرد نسبت به حالت پروتئین در ساختار طبیعی و ThT به حالت تنها، افزایش نشر مشاهده می‌شود که این افزایش در واقع نشان دهنده‌ی تشکیل فرم آمیلوئیدی انسولین است.



شکل ۵- بررسی نشر تیوفلاوین‌تی پروتئین انسولین در حالت طبیعی و حالت آمیلوئیدی

Figure 5. Thioflavin T emission of native and amyloid forms of Insulin

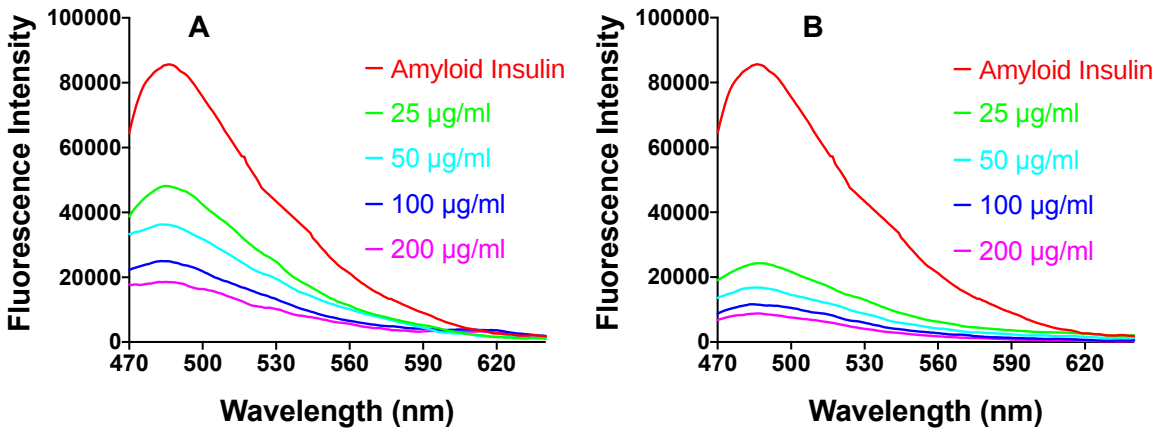
در ادامه برای مشاهده‌ی فیبریل آمیلوئیدی تشکیل شده از پروتئین انسولین در شرایط مشخص شده، نمونه‌ی انسولینی با pH=۵/۴ پس از ۵ ساعت انکوباسیون در ۶۰ درجه سانتیگراد برروی ورقه‌ی آلومینیومی قطره گذاری شده و پس از پوشش با پودر طلا توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره برای بررسی تشکیل فیبریل مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۶).



شکل۶- تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره فیبریل انسولین در شرایط در شیشه (pH= 5.4, Temp= 60 ºC, Time= 5 h)

Figure 6. SEM images of insulin fibrils (in vitro)

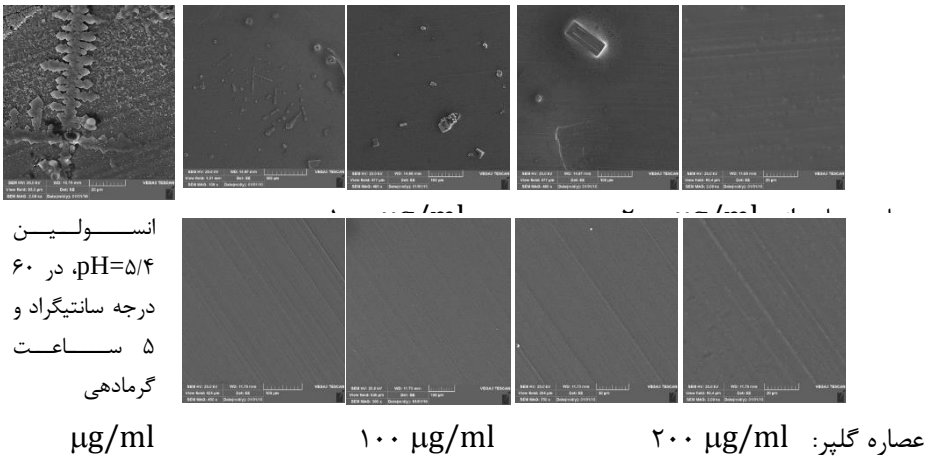
برای بررسی اثر ضد آمیلوئیدی عصاره گیاهان سیاهدانه و گلپر، نمونه‌ی انسولینی تهیه شده (در شرایط pH و دمای مطرح شده) در معرض غلظت‌های مختلفی از عصاره‌ی این دو گیاه (غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) قرار گرفت و برای بررسی تشکیل و یا عدم تشکیل فیبریل انسولین تحت غلظت‌های مختلف عصاره، نمونه‌ها توسط اسپکتوفتومتری فلورسانس-تیوفلاوین‌تی مورد بررسی قرار گرفتند. بررسی‌ها نشان داد که در مورد عصاره‌ی گیاه سیاهدانه اثر ضد آمیلوئیدی وابسته به غلظت در مورد پروتئین انسولین مشاهده می‌شود. به این صورت که با افزایش میزان غلظت عصاره الکلی سیاهدانه میزان شدت فلورسانس کاهش پیدا می‌کند که نشان دهنده کاهش تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی پروتئین انسولین است که این مشاهدات از لحاظ تاثیر مثبت عصاره سیاهدانه بر تجمعات آمیلوئیدی انسولین نتایج کار (Khan *et al*., 2015) را تایید می‌کند، ولی در رابطه با تاثیر میزان موثر غلظت، اندکی تفاوت وجود دارد به این صورت که در مطالعات khan و همکاران از میزان غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره به میزان‌های بالاتر، تاثیر ضدتجمعی ثابت بوده و تفاوت چشمگیری مشاهده نشده‌است و این نتایج با نتایج شرح داده شده در این پژوهش متفاوت است (شکل ۷). در مورد عصاره‌ی گلپر غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تاثیر نسبتا یکسانی را نشان داده و باعث عدم تشکیل آمیلوئید شد (شکل ۷). به‌نظر می‌رسد که این نتایج نشان می‌دهند، در غلظت‌های یکسان از عصاره‌های الکلی گیاهان مورد نظر، گیاه گلپر اثرات مهاری قوی‌تری را نشان می‌دهد. البته برای نتیجه گیری قطعی نیاز به مطالعات آماری دقیق‌تری است.



شکل۷- بررسی نشر تیوفلاوین تی پروتئین انسولین در غلظت‌های مختلف عصاره الکلی سیاهدانه (A)، بررسی نشر تیوفلاوین تی پروتئین انسولین در غلظت‌های مختلف عصاره الکلی گلپر (B)

Figure 7. Thioflavin T emission of insulin protein in different concentration of *N. sativa* alcoholic extract (A), Thioflavin T emission of insulin protein in different concentration of *H. persicum* alcoholic extract (B)

برای بررسی دقیق‌تر تاثیر عصاره گلپر و سیاهدانه بر تشکیل آمیلوئید، غلظت های تاثیر گذار این عصاره‌ها به همراه انسولین pH=۵/۴ و پس از طی ۵ ساعت انکوباسیون در ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد برروی ورق آلومینیومی قطره گذاری، با پودر طلا پوشش داده شد و سپس توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که غلظت‌های مشخصی از عصاره گیاهان سیاهدانه و گلپر از تشکیل آمیلوئید جلوگیری کردند (شکل ۸). نتایج میکروسکوپ الکترونی با نتایج مربوط به تیوفلاوین‌تی هم‌خوانی داشته و نشان می‌دهد که گیاه گلپر اثرات مهاری قوی‌تری برای جلوگیری از تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی نسبت به گیاه سیاهدانه دارد. همان‌طور که در شکل ۸ دیده می‌شود در غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر گیاه سیاهدانه فیبریل‌های انسولین دیده می‌شود ولی در همان غلظت در عصاره الکلی گیاه گلپر فیبریلی مشاهده نگردید. در غلظت‌های بالاتر از ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره هر دو گیاه در نمونه‌های پروتئینی فیبریلی دیده نشد.



شکل ۸- تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره پروتئین انسولین در غلظت های مختلف از عصاره‌های گلپر و سیاهدانه

Figure 8. SEM images of insulin protein in different concentration of *H. persicum and N. sativa*

تجمع آمیلوئیدی عارضه‌ای گسترده و به همان میزان ناشناخته است، وابستگی بسیاری از بیماری‌ها از جمله بیماری‌های تخریب کننده سیستم عصبی شامل آلزایمر، پارکینسون و غیره به تجمعات آمیلوئیدی مشخص شده‌است. پروتئین‌های فراوانی در صنعت به عنوان مکمل و یا دارو تحت شرایط گوناگون ساخته می‌شوند، از این میان می‌توان به پروتئین انسولین اشاره کرد که در درمان بیماری دیابت کاربرد دارد. گزارش‌های مختلفی از حضور تجمعات آمیلوئیدی پروتئین انسولین در محل تزریق این دارو گزارش شده است که اهمیت پرداختن به موضوع آمیلوئیدی شدن در صنعت تولید دارو و مواد مکمل پروتئینی را نشان می‌دهد (Gancar *et al*., 2020). تا به حال ترکیبات و مواد زیادی از نظر خاصیت موثر در جلوگیری از تجمعات آمیلوئیدی مورد بررسی قرار گرفته‌اند، امید است با بررسی ترکیبات مختلف تاثیرگذار، بهترین ترکیبات با بالاترین سطح اثرگذاری و کمترین عوارض جانبی شناخته شوند. در این پژوهش، گیاه گلپر گیاهی با خاصیت آنتی اکسیدانی بالا در کنار گیاه سیاهدانه به عنوان گیاه دارویی شناخته شده، به منظور بررسی اثرات ضدآمیلوئیدی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. عصاره‌ی الکلی گیاه گلپر و سیاهدانه در غلظت‌های مناسب اثرات مهاری بر تجمع انسولین نشان داده و ارزش مطالعات و پژوهش‌های بیشتر را دارد.

منابع

Ahmad, A., Husain, A., Mujeeb, M., Khan, S. A., Najmi, A. K., Siddique, N. A., . . . Anwar, F. (2013). A review on therapeutic potential of Nigella sativa: A miracle herb. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 3*(5), 337-352. doi:https://doi.org/1/۰,۱۰۱۶S2221-1691(13)60075-1

Atefeh, H., Azamia, M., & Abdolhamid-Angaj, S. (2010). Medicinal effects of Heracleum persicum (Golpar). *Middle-East Journal of Scientific Research, 5*(3), 174-176 .

Ciccone, L., Tonali, N., Nencetti, S., & Orlandini, E .(۲۰۲۰) .Natural compounds as inhibitors of transthyretin amyloidosis and neuroprotective agents: analysis of structural data for future drug design. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 35*(1), 1145-1162. doi:10.1080/14756366.2020.1760262

Durães ,F., Pinto, M., & Sousa, E. (2018). Old Drugs as New Treatments for Neurodegenerative Diseases. *Pharmaceuticals, 11*(2), 44 .

Fu, H., Hardy, J., & Duff, K. E. (2018). Selective vulnerability in neurodegenerative diseases. *Nature Neuroscience, 21*(10), 1350 .۱۳۵۸-doi:10.1038/s41593-018-0221-2

Gancar, M., Kurin, E., Bednarikova, Z., Marek, J., Mucaji, P., Nagy, M., & Gazova, Z. (2020). Amyloid Aggregation of Insulin: An Interaction Study of Green Tea Constituents. *Scientific Reports, 10*(1), 9115. doi:10.1038/s41598-020-66033-6

Ghadami, S. A., Ahmadi, Z., & Moosavi-Nejad, Z. (2021). The albumin-based nanoparticle formation in relation to protein aggregation. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 252*, 119489. doi:10.1016/j.saa.2021.119489

Heiss, A., Stika ,H.-P., Zorzi, N., & Jursa, M. (2013). Nigella in the Mirror of Time: A Brief Attempt to Draw a Genus' Ethnohistorical Portrait (pp. 147–169).

Iannuzzi, C., Borriello, M., Portaccio, M., Irace, G., & Sirangelo, I. (2017). Insights into Insulin Fibril Assembly at Physiological and Acidic pH and Related Amyloid Intrinsic Fluorescence. *Int J Mol Sci, 18*(12), 2551 .

Jamshidi, A. H., Eghbalian, F., Mahroozade, S., Mohammadi Kenari, H., Ghobadi, A., & Yousefsani, B. S. (2020). Recommended natural products in Alzheimer's disease based on traditional Persian medicine. *Journal of Medicinal Plants, 19*(75), 17-29. doi:10.29252/jmp.19.75.17

Khan, M. S., Tabrez, S., Rabbani, N., Oves, M., Shah, A., Alsenaidy, M. A., & Al-Senaidy, A. M. (2015). Physico-chemical stress induced amyloid formation in insulin: Amyloid characterization, cytotoxicity analysis against human neuroblastoma cell lines and its prevention using black seeds (Nigella sativa). *Chin J Integr Med*. doi:10.1007/s11655-015-2153-y

Lee, S., Choi, M. C., Al Adem, K., Lukman, S., & Kim, T.-Y. (2020). Aggregation and Cellular Toxicity of Pathogenic or Non-pathogenic Proteins. *Scientific Reports, 10*(1), 5120. doi:10.1038/s41598-020-62062-3

Majidi, Z., & Sadati Lamardi, S. N. (2018). Phytochemistry and biological activities of Heracleum persicum: a review. *J Integr Med, 16*(4), 223-235. doi:10.1016/j.joim.2018.05.004

Merlini, G., Bellotti, V., Andreola, A., Palladini, G., Obici, L., Casarini, S., & Perfetti, V. (2001). Protein aggregation. *Clin Chem Lab Med, 39* .۱۰۶۵-۱۰۷۵ ,(۱۱)doi:10.1515/cclm.2001.172

Picken, M. M. (2020). The Pathology of Amyloidosis in Classification: A Review. *Acta Haematologica, 143*(4), 322-334. doi:10.1159/000506696

Prusiner, S. B. (2001). Neurodegenerative Diseases and Prions. *New England Journal of Medicine, 344*(20), 1516-1526. doi:10.1056/nejm200105173442006

Sayyah, M., Moaied, S., & Kamalinejad, M. (2005). Anticonvulsant activity of Heracleum persicum seed. *J Ethnopharmacol, 98*(1-2), 209-211. doi:10.1016/j.jep.2004.12.026

Soto, C., & Pritzkow, S. (2018). Protein misfolding, aggregation, and conformational strains in neurodegenerative diseases. *Nature Neuroscience, 21*(10), 1332-1340. doi:10.1038/s41593-018-0235-9

Thompson, A. J., & Barrow, C. J. (2002). Protein conformational misfolding and amyloid formation: characteristics of a new class of disorders that include Alzheimer's and Prion diseases. *Curr Med Chem, 9*(19), 1751-1762. doi:10.2174/0929867023369123

Tiwari, S., Atluri, V., Kaushik, A., Yndart, A., & Nair, M. (2019). Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *International journal of nanomedicine, 14*, 5541-5554. doi:10.2147/IJN.S200490

Effects of *Heracleum persicum* and *Nigella sativa* L. alcoholic extracts on insulin amyloid formation

K.Ahadi Amandi,[1] S. A. Ghadami[2] *

Received:2020.7.5
Accepted:2020.8.17

Abstract

Introduction: Discovering and describing the critical role of proteins in contrast to disease and defects causing by their inactivity is a major interest for scientific studies. Amyloid aggregation and the diseases caused by them, known as neurodegenerative diseases, reveal new aspect of proteins roles in pathogenicity. Due to lack of clear treatment to these age-related diseases, prevention of amyloid formation would be the most practical way to deal with them.

Methods: In this research, we analyzed the effects of *Heracleum persicum* Desf. ex Fisch., C.A.Mey. & Avé-Lall. and *Nigella sativa* L. alcoholic extracts on insulin amyloid formation. Human insulin (HI) amyloid formation was analyzed under specific pH and temperature conditions by Thioflavin T (ThT) assay and scanning electron microscopy (SEM) while treating with different concentrations of *H. persicum* and *N. sativa* alcoholic extracts.

Result and discussions: Our results reveal that the alcoholic extracts of *H. persicum* and *N. sativa* have significant preventing effects on HI amyloid formation. Considering the long history of these medicinal plant usage in Iranian and Islamic cultures and the presence of antioxidant and anticonvulsant compounds in them, and according to the data obtained from this study, we strongly suggest that these two herbs are suitable candidates as sources of amyloid aggregation prevention compounds.

Key words: Age-related diseases, Alzheimer's disease, Amyloid fibrils, Neurodegenerative diseases, Heracleum persicum, Nigella sativa L.

1MSc student of biotechnology, Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran
2Assistant Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran;
*Corresponding Author's: a.ghadami@alzahra.ac.ir