DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijmapr.2016.108082

دوماهنامه علمی- پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران

جلد ۳۲، شماره ۵، صفحه ۸۵۶-۸۴۴ (۱۳۹۵)

فعالیت ضد آمیلوئیدی عصاره برگ گیاه مرزه (*Satureia hortensis* L.) روی فیبری شدن لیزوزیم و تأثیر احتمالی آن در درمان بیماریهای وابسته به آمیلوئید

حسن رامشینی[۱*]، نیره کوثری[۲] و اعظم‌السادات مقدسی[۳]

۱*- نویسنده مسئول، استادیار بیوشیمی، گروه علمی زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران، پست الکترونیک: ramshini@alumni.ut.ac.ir

۲- کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، بیمارستان مبینی، سبزوار، ایران

۳- کارشناسی ارشد، گروه علمی زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، ایران

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۴ تاریخ اصلاح نهایی: آذر ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش: دی ۱۳۹۴

چکیده

تجمعات آمیلوئیدی از ویژگی‌های تعداد زیادی از بیماری‌های تحلیل برنده سیستم عصبی ازجمله آلزایمر است. بنابراین مهار این تجمعات یک راهکار جذاب برای درمان این بیماری است. به‌طوری که با وجود تحقیقات گسترده‌ای که انجام شده است، یک روش درمانی مؤثر که به‌طور مستقیم باعث مهار این تجمعات گردد تاکنون کشف نشده است. یکی از روش‌های درمانی مهم برای جلوگیری از بروز این بیماری‌ها استفاده از گیاهان دارویی (غنی از ترکیب‌های آروماتیک) می‌باشد. در این مطالعه فعالیت مهاری عصاره برگ گیاه مرزه (*Satureia hortensis* L.) روی روند فیبریلاسیون لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ مورد مطالعه قرار گرفته است. لیزوزیم با غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در بافر گلایسین ۵۰ میلی‌مولار با pH=۲/۵ تهیه و در دمای ۵۷ درجه به‌طوری که مدام هم زده می‌شود تبدیل به فیبر شد. برای اثبات تشکیل فیبرها از تکنیک‌های مختلفی ازجمله سنجش تیوفلاوین T، فلورسانس خارجی و عکس میکروسکوپ نیروی اتمی استفاده شد. تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون آماری تی مستقل و با نرم‌افزار SPSS.16 انجام گردید. در غیاب عصاره مرزه بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون فیبرهای بالغ آمیلوئیدی ظاهر شد. در حضور عصاره در دامنه غلظت ۱-۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی مهار شد. اثر مهاری وابسته به غلظت بود و بهترین غلظت مؤثر ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. عصاره روی تمام مراحل تشکیل فیبر شامل فازهای تأخیر، رشد و تعادل تأثیر می‌گذارد. مطالعه سمّیت سلولی به روش MTT در حضور عصاره در مقایسه با عدم حضور آن نشان داد که سمّیت آنها به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) کاهش می‌یابد. با توجه به نقش مهاری عصاره روی سمّیت سلولی و اثر آن روی تمامی مراحل مختلف تشکیل فیبر می‌توان از آن در آینده به‌عنوان یک مهارکننده احتمالی برای درمان این نوع از بیماری‌ها استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: تجمعات آمیلوئیدی، عصاره مرزه (*Satureia hortensis* L.)، لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ، سمّیت سلولی.

مقدمه

آمیلوئید یک پروتئین غیرمحلول و به شکل فیبرهای طویل و غیرمنشعب و با عرض حدود ۱۲-۶ نانومتر می‌باشد. شکل ظاهری فیبریل‌ها گاهی اوقات متنوع است اما همه فیبرهای آمیلوئیدی نظم ساختاری بالایی داشته و در اثر تفرق اشعه X الگوی cross-β از خود نشان می‌دهند (Chiti &

Dobson, 2006؛ Greenwald & Riek, 2010). این الگو نشان‌دهنده ساختار دوم β است که صفحات β پروتئین به‌صورت خاصی بر محور فیبر عمود می‌شوند. اهمیت مطالعه فیبرهای آمیلوئیدی ناشی از حدود ۲۷ بیماری انسانی است که عامل آنها وجود این رسوبات پروتئینی در بدن است. یکی از شاخص‌ترین این بیماری‌ها بیماری آلزایمر است که معمولاً در افراد مسن اتفاق می‌افتد (Sipe *et al.*, 2010). بیماری آلزایمر اصلی‌ترین عامل زوال عقل بوده که با تخریب پیش‌رونده عملکرد هوش و حواس فرد مبتلا همراه است (Mattson, 2000). ویژگی پاتولوژیکی بیماران آلزایمری وجود پلاک‌های آمیلوئیدی شامل آمیلوئید β پپتید (Aβ)، رسوبات نوروفیبری پروتئین تاو (tau) (که به‌شدت فسفریله شده است) در مغز این بیماران است (Nordberg, 2004). در حال حاضر بیشتر درمان‌های رایج برای این بیماری علامتی بوده و درمان قطعی بیماری را به همراه ندارد. اعتقاد بر این است که رسوب پیش‌رونده تجمعات Aβ باعث شروع علائم این بیماری مثل سمّیت سلولی، آسیب‌های اکسیداتیو و التهاب‌های عصبی و مرگ سلولی می‌شود (Chromy, 2003). براساس اطلاعات توضیح داده شده و به‌منظور کنترل یا درمان این بیماری راهکارهای مختلفی برای تولید مهارکننده‌های تجمع پروتئین Aβ ارائه شده‌است؛ ازجمله این راهکارها می‌توان به استفاده از بلوکه‌کننده‌های صفحات β (Soto *et al.*, 1998)، مهارکننده‌های سکرتازهای β و γ (γ and β-Secretase)، استفاده از واکسن‌های ضدآمیلوئیدی، آنتی‌اکسیدانت‌ها و استفاده از مولکول‌های کوچک با یک یا چند حلقه آروماتیک اشاره کرد (Ramshini *et al.*, 2015a). در سال‌های اخیر، مطالعه گیاهان دارویی در زمینه استفاده از آنها برای مهار یا درمان بیماری آلزایمر توجه دانشمندان را به خود جلب کرده‌است. مطالعات نشان داده‌است که بعضی از گیاهان دارویی دارای خاصیت ضد پیری بوده و آنها می‌توانند قابلیت استفاده به‌عنوان درمان یا مهار بیماریهای وابسته به پیری را ازجمله آلزایمر داشته باشند (Ho *et al.*, 2010). استفاده از گیاهانی مثل ژینکو (*Ginko biloba*)، جین‌سینگ (*Pabax ginseng*)، رزماری (*Rosmarimus officinalis*)، چای سبز (*Camellia sinensis*) و دارچین (*Cinnamomm zeylanicum*) که در طب سنتی از آنها به‌عنوان تقویت‌کننده حافظه نام برده می‌شود، بسیار موفقیت‌آمیز بوده است (Alkam, 2007؛ Ramshini *et al.*, 2015a؛ Lieberman, 2001؛ Rietveld & Wiseman, 2003؛ Gertz & Kiefer, 2004). گیاه مرزه با نام علمی *Satureia hortensis* یک گیاه دارویی معطر است که علاوه‌بر استفاده به‌عنوان ادویه و نگهدارنده طبیعی در طب سنتی برای درمان بیماری‌های قلبی عروقی، دردهای ماهیچه‌ای، معده درد و ناهنجاری‌های روده‌ای، همچنین به‌عنوان ماده ضدالتهابی در درمان سینوزیت استفاده می‌شود (Mihajilov-Krstev *et al.*, 2009). مطالعات نشان داده‌است که عصاره این گیاه دارای فعالیت ضدقارچی، ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانتی است (Güllüce, 2003). آنالیز عصاره این گیاه نشان می‌دهد که ترکیب‌هایی مثل کارواکرول، تیمول، فنل و فلاوونیک اسید وجود دارد که البته کارواکرول بیشترین ترکیب موجود در عصاره این گیاه است. کارواکرول یا ۲-متیل-۵-ایزوپروپیل فنل یک مولکول کوچک آروماتیک با عملکردی دارویی متنوع می‌باشد (Zgorka & Glowniak, 2001).

در این مطالعه، اثر گیاه مرزه (*Satureia hortensis*) روی مهار تجمع پروتئین لیزوزیم مورد مطالعه قرار گرفته است. به‌دلیل وجود تنوع زیاد در ترکیب‌های شیمیایی موجود در این گیاه، ارزش درمانی آن در طب سنتی بسیار بالا می‌باشد. مطالعات نشان داده‌است که مولکول‌های شیمیایی یا بیولوژیکی که دارای یک یا چند حلقه آروماتیک هستند قادرند مانع تجمع پروتئین‌ها شوند (Burley & Petsko, 1985؛ Hunter *et al.*, 2001) و به‌دلیل اینکه ترکیب‌های موجود در عصاره مرزه دارای ساختار آروماتیکی است (کارواکرول، تیمول)، از این‌رو در این پژوهش اثر آن روی مهار مستقیم تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ (یک پروتئین مدل برای مطالعه تجمع آمیلوئیدی) مورد مطالعه قرار گرفته‌است. از آنجایی که این آنزیم در حضور دناتوره‌کننده‌های مختلف مثل استفاده از حلال‌های آلی، مواد شیمیایی یا شرایط اسیدی و دماهای بالا به راحتی

تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی مشابه پروتئین Aβ می‌دهد و از طرف دیگر خواص، ساختار و مکانیسم تشکیل فیبرها در شرایط مختلف به خوبی شناخته شده‌است (Morozova-Roche *et al.*, 2000)، بنابراین در این پژوهش برای مطالعه اثر عصاره مرزه روی مهار پروسه تجمع آمیلوئیدی از این آنزیم به‌عنوان یک پروتئین مدل استفاده شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی که به‌روش دستگاهی انجام شده، هر آزمایش سه بار تکرار و نتیجه به‌صورت Mean±SD گزارش شده‌است. لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ، تیوفلاوین T و بافرهای استفاده شده از شرکت سیگما خریداری شد. ۸-آنیلینونفتالن سولفونات (ANS) از شرکت مرک (Darmstadt, Germany) خریداری شد. عصاره برگ مرزه از مرکز تحقیقات فیزیولوژی و فارماکولوژی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان تهیه شد.

روش عصاره‌گیری

روش عصاره‌گیری که در مرکز تحقیقات فیزیولوژی و فارماکولوژی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان انجام شد به‌طور خلاصه به‌صورت زیر می‌باشد. برگ چای سبز از هرباریوم گیاهی اصفهان تهیه شده و پس از اینکه به‌وسیله کارشناس هرباریوم گونه مورد نظر تأیید گردید، پودر شده و عصاره استونی و اتانولی آن با استفاده از دستگاه سوکسله و روتاری بدست آمد. ابتدا حلال را در قسمت بالن ریخته و دمای آن به‌وسیله هیتر تنظیم شد (۵۰ درجه)، سپس گیاه پودر شده را در داخل کارتوش قرار داده و بعد در قسمت سوکسله 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 بدست‌آمده به دستگاه روتاری منتقل شده تا حلال آن در دمای پایین جدا شود. عصاره بدست‌آمده پس از خشک شدن کامل در فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

تعیین غلظت پروتئین

با توجه به خالص بودن نمونه پروتئینی بکار گرفته شده در این مطالعه، سنجش غلظت پروتئین همه جا براساس جذب ۲۸۰ نانومتر محلول حاوی پروتئین در مقایسه با حلال بکار گرفته شده، انجام شد. ضریب جذب لیزوزیم ۲/۶۵ برای یک گرم در یک لیتر در مسیر یک سانتی‌متری در نظر گرفته شد (Ramshini *et al.*, 2015b).

القای فیبرهای آمیلوئیدی در لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ

۲ میلی‌گرم پروتئین در یک میلی‌لیتر بافر ۵۰ میلی‌مولار گلیسین با pH=۲/۵ در دمای ۵۷ درجه به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد، به گونه‌ای که در تمام این مدت با استفاده از ماگنت ریز تفلونی محلول به آرامی هم زده شد. با استفاده از روش‌های مختلفی، تشکیل تجمعات آمیلوئیدی مورد بررسی قرار گرفت (Nilsson, 2004).

فلورسانس خارجی

۸-آنیلینونفتالن سولفونات (ANS) برای ارزیابی میزان هیدرو فوبیسیته 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 شد. غلظت مولی بکار گرفته شده ANS در مقایسه با پروتئین مازاد بود. طول موج برانگیختگی ۳۶۵ نانومتر و پهنای اسلیت برانگیختگی و نشر به‌ترتیب ۵ و ۱۰ نانومتر بود، افزایش شدت نشر و به‌ویژه انتقال به آبی به‌عنوان افزایش دسترسی‌پذیری جایگاه‌های هیدروفوب در سطح پروتئین تفسیر شد.

مطالعات سنجش ThT

برای ارزیابی تشکیل یا عدم تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی یا شبه‌آمیلوئیدی از محلول تازه تهیه شده تیوفلاوین T که با استفاده از سرنگ فیلتر شده بود، استفاده گردید. موج برانگیختگی ۴۴۰ نانومتر و پهنای اسلیت برانگیختگی و نشر به‌ترتیب ۵ و ۱۰ نانو متر بود. افزایش شدت نشر تیوفلاوین T

به‌عنوان تشکیل احتمالی فیبرهای آمیلوئیدی یا شبه‌آمیلوئیدی تفسیر شد (Nilsson, 2004).

تصویربرداری میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM)

حدود ۲۰ میکرولیتر از نمونه‌های رقیق شده آمیلوئید را روی میکا قرار داده و به‌وسیله جریان ملایم هوا خشک شد و تصاویر AFM با میکروسکوپ (solver next, NT-MDT, Russia) که به یک بخش اسکن‌کننده (حداکثر سایز اسکن ۱۰۰µm) و یک کنترل‌کننده Nanoscope IIIa مجهز بود، بدست آمد. فرکانس استفاده شده بین ۳۴۲ و ۳۴۱ کیلوهرتز و سرعت اسکن نیز بین ۰/۶ تا ۱ هرتز بود.

مطالعه سمّیت سلولی با سنجش MTT (3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetraazolium bromide)

در این آزمایش سلول‌های نوع MCF7، در محیط کشت اختصاصی که شامل Dulbeccols Modified Eague's medium (۵۰٪)، F-12 Ham (۵۰٪)، fetal calf serum (۵۰٪)، penicillin (۱٪)، streptomycin (۱٪) و glutamine (۱٪) بود، کشت داده شد (همه مواد از شرکت سیگما، آمریکا خریداری شد). سلول‌ها در شرایط CO_2 (۵٪) و در دمای ۳۷^{o}C رشد داده شدند. نمونه‌های آمیلوئیدی تشکیل شده در حضور یا عدم حضور عصاره مرزه که تحت شرایط ذکر شده در بالا تهیه شده بودند سانتریفوژ شده و نمونه زیرین آن با محیط کشت DMEM دوباره محلول شده و به محیط کشت سلول‌های MCF7 و با غلظت نهایی ۲ میکرومولار، به مدت ۲۴ ساعت اضافه شدند. سمّیت نمونه‌ها برای سلول در یک ظرف ۹۶ چاهکی (96-well plates) به‌وسیله MTT سنجش شد. به‌طور خلاصه، بعد از اضافه کردن نمونه‌ها به محیط کشت سلول‌ها در دمای ۳۷^{o}C و به مدت ۲۴ ساعت، محیط کشت سلول‌ها با محلول ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محلول MTT در دمای ۳۷^{o}C و به مدت ۴ ساعت و بعد با بافر لیزکننده سلول شامل N,N-dimethyl formamide ۵۰٪ و SDS ۲۰٪، pH=۴/۷ برای مدت ۳ ساعت انکوبه شدند. میزان جذب blue formazan در ۵۹۰nm تعیین شد. در نهایت زیستایی سلول‌ها به‌عنوان درصد احیاء MTT در سلول‌های تیمار شده در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده بیان شد (Ramshini *et al*., 2011).

تجزیه و تحلیل آماری

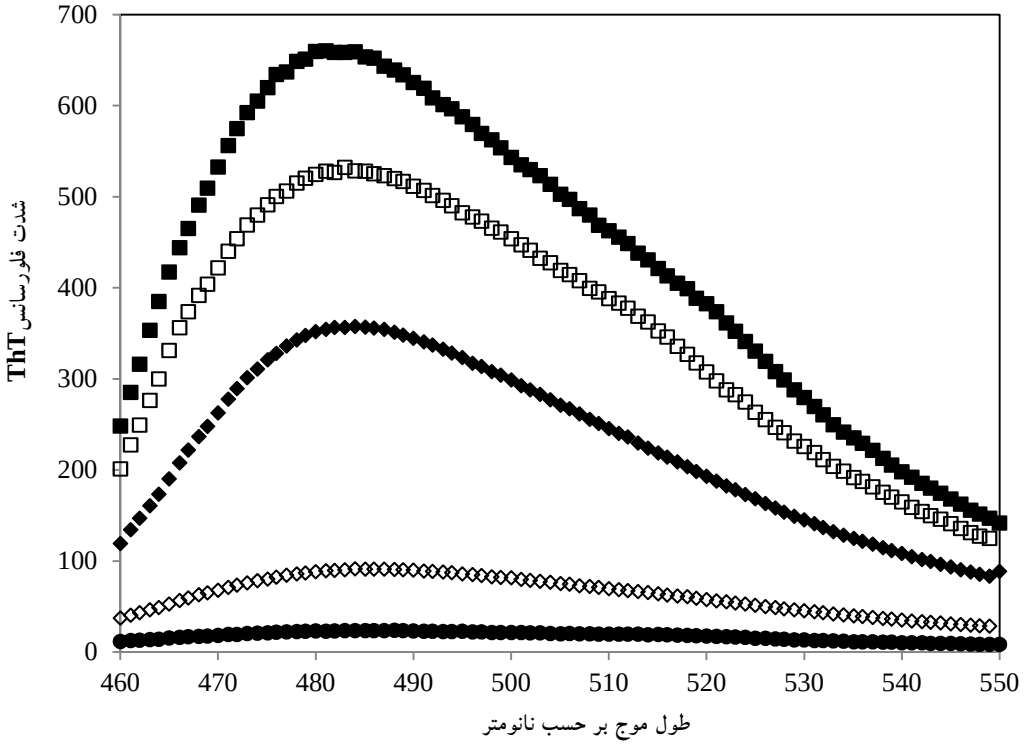
هر آزمایش حداقل سه بار به‌صورت مستقل انجام و در هر بار هر یک حداقل سه بار تکرار شد و تمام شکل‌ها به‌صورت میانگین Mean±SD گزارش شده‌است. داده‌ها توسط نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۶ با استفاده از آزمونT مستقل با ضریب اطمینان ۹۵٪ تجزیه و تحلیل شد.

نتایج

القای فیبرهای آمیلوئیدی در پروتئین لیزوزیم و بررسی اثر مهاری عصاره مرزه

در این مطالعه براساس دستورالعمل ارائه شده در بخش روش‌ها پروتئین لیزوزیم تبدیل به فیبر آمیلوئیدی شد و وجود این ساختارها بعد از ۴۸ ساعت با استفاده از تکنیک‌های مختلف مورد مطالعه قرار گرفت. به‌طوری که افزایش شدت نشر فلورسانس تیوفلاوین T یکی از معیارهای وجود فیبرهای آمیلوئیدی می‌باشد (Nilson, 2004). همان‌طور که شکل ۱ نشان می‌دهد پس از برانگیختگی در طول موج ۴۴۰ نانومتر، تیوفلاوین T به تنهایی نشر ضعیفی را نشان می‌دهد. اضافه کردن پروتئین طبیعی نیز تغییر قابل‌ملاحظه‌ای را در شدت یا الگوی طیف نشری تیوفلاوین T موجب نمی‌شود، ولی پس از اضافه کردن پروتئین انکوبه شده در شرایط ذکر شده (برای القای آمیلوئید) افزایش شدت نشر مشاهده می‌شود (افزایش از ۲۳/۶±۵/۵a.u. به ۶۶۰±۲۵a.u.). این افزایش در شدت نشر را به تبدیل لیزوزیم به فیبرهای آمیلوئیدی نسبت می‌دهند. بعد از اثبات تبدیل لیزوزیم به فیبرهای آمیلوئیدی اثر عصاره مرزه روی مهار تشکیل این تجمعات مورد بررسی قرار گرفت. تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی در حضور غلظت‌های مختلف عصاره مرزه (از ۰/۲۵ تا ۱ میلی‌گرم بر

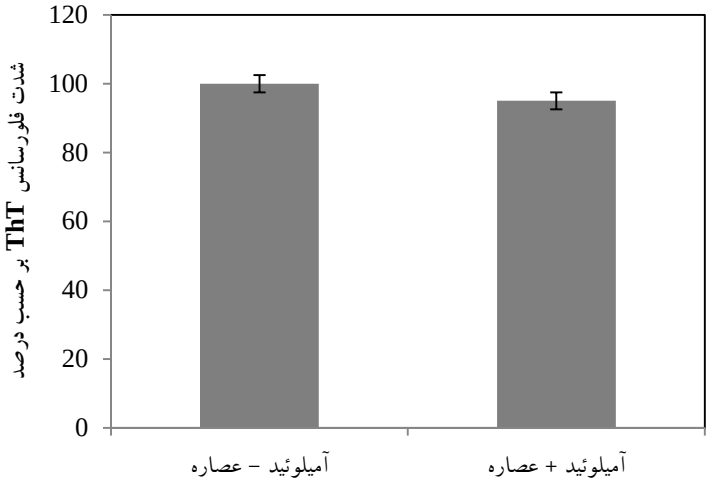
میلی‌لیتر) مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که عصاره این گیاه می‌تواند به‌صورت وابسته به غلظت باعث مهار تشکیل تجمعات آمیلوئیدی شود. براساس شکل ۱ در این دامنه از غلظت‌های عصاره مرزه غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر این عصاره بهترین اثر را داشت، به همین دلیل در مطالعات بعدی از این غلظت بهینه استفاده شد.



شکل ۱- شکل طیف نشر فلورسانس تیوفلاوین (ThT) پروتئین انکوبه شده لیزوزیم در شرایط آمیلوئیدی با حضور عصاره مرزه در غلظت‌های ۰/۲۵ (◊)، ۰/۵ (♦)، ۱ (□) میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مرزه و عدم حضور عصاره مرزه (■) طیف نشر ThT به تنهایی نیز برای مقایسه آورده شده است (●).

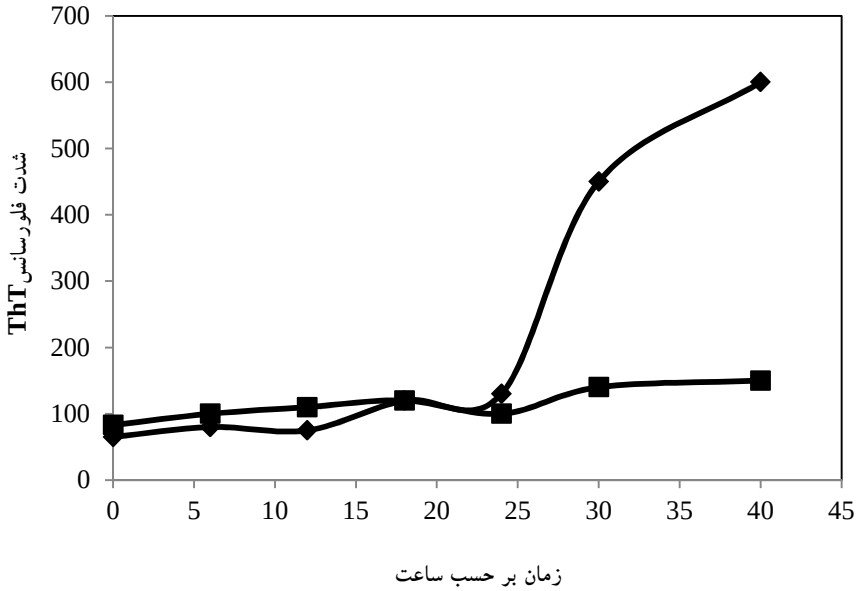
یکی از کنترل‌هایی که باید انجام شود این است که آیا کاهش نشر فلورسانس توسط عصاره مرزه مربوط به مهار تجمعات آمیلوئیدی توسط عصاره مرزه است یا به‌دلیل اثر خاموش‌کنندگی طیف فلورسانس در طول موج‌های بین ۵۵۰-۴۶۰ نانومتر توسط عصاره است.

برای بررسی اثر خاموش‌کنندگی، ابتدا طیف نشر فلورسانس فیبرهای بالغ آمیلوئیدی قرائت شد. سپس عصاره مرزه با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر روی آن اثر داده شده و بلافاصله شدت نشر فلورسانس آن را مورد مطالعه قرار دادیم. اگر کاهش شدید نشر به‌وقوع بپیوندد ناشی از اثر خاموش‌کنندگی عصاره است نه مهارکنندگی آن. همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود افزودن عصاره به محلول دارای آمیلوئید بالغ و بلافاصله مشاهده طیف فلورسانس آن، کاهش شدت نشر را نشان نمی‌دهد، از این‌رو اثر عصاره مرزه روی تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی اثر مهاری دارد و کاهش شدت فلورسانس به‌دلیل اثر خاموش‌کنندگی آن نیست.



شکل ۲- مطالعه اثر فرونشانی نشر فلورسانس عصاره مرزه

فیبرهای بالغ آمیلوئیدی بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون لیزوزیم در pH=۲/۵ و دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد تشکیل و نشر فلورسانس آن در عدم حضور عصاره بدست آمده‌است (ستون سمت چپ). نشر فلورسانس فیبرهای آمیلوئیدی نیز بلافاصله بعد از اضافه کردن ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره در ستون سمت راست نشان داده شده‌است.



شکل ۳- بررسی کینتیک تشکیل آمیلوئید لیزوزیم در حضور عصاره مرزه

طیف نشر فلورسانس تیوفلاوین (ThT) ۲ میلی‌گرم لیزوزیم انکوبه شده در دمای ۵۷ درجه و pH=۲/۵ در عدم حضور عصاره مرزه (■) و با حضور عصاره مرزه (♦) در زمان‌های مختلف.

اثر عصاره مرزه 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 ۳ نشان داده شده‌است. روند تغییرات نشری تیوفلاوین T در طی زمان از مدل سیگموئیدی تبعیت می‌کند که شامل سه مرحله فاز تأخیری، مرحله رشد سریع و مرحله تعادلی انتهایی است. فاز تأخیری که به آن مرحله هسته‌گذاری یا Nucleation گفته می‌شود، در این مرحله هسته‌های اولیه تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی حاصل می‌شود و مرحله محدود کننده فرایند 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 عصاره مرزه نیز بررسی شد. همانطور که شکل ۳ نشان می‌دهد عصاره مرزه بر روی کینتیک تشکیل فیبر آمیلوئیدی لیزوزیم تأثیر قابل‌ملاحظه‌ای گذاشته، به این صورت که هم فاز رشد سریع و هم فاز تعادلی انتهایی از نظر شدت فلورسانس در حضور عصاره مرزه در مقایسه با عدم حضور آن کاهش را نشان می‌دهد. البته افزایش فاز تأخیر و کاهش فاز رشد در حضور عصاره مرزه دلیل بر اثر مهارکنندگی این عصاره می‌باشد.

تصویر میکروسکوپ نیروی اتمی تجمعات آمیلوئیدی لیزوزیم در حضور و غیاب عصاره مرزه

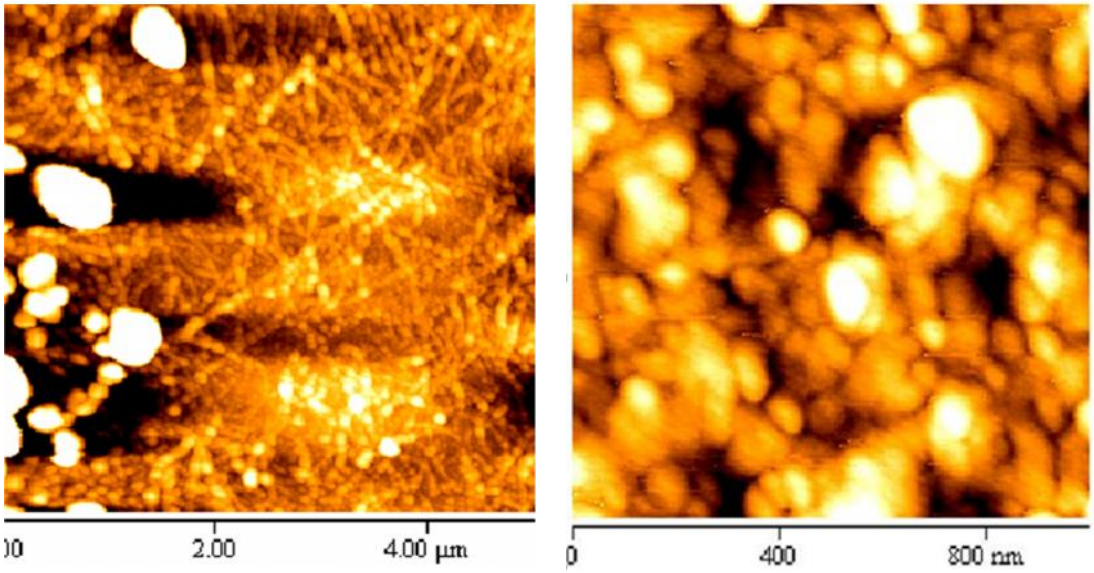
برای مطالعه اثر عصاره مرزه روی شکل ظاهری فیبرهای آمیلوئیدی از نمونه‌های آمیلوئید تشکیل شده در حضور یا عدم حضور عصاره مرزه از میکروسکوپ نیروی اتمی استفاده شد. بعد از ۴۸ ساعت از هریک به میزان ۲۰ میکرولیتر برداشته و بر روی ورقه‌های نازک میکا قرار داده و به‌وسیله جریان ملایم هوا تثبیت شد و بعد به‌وسیله میکروسکوپ نیروی اتمی از هریک از نمونه‌ها عکس گرفته شد. همانطور که شکل ۴ نشان می‌دهد، در غیاب عصاره فیبرهای طویل و غیرمنشعب آمیلوئیدی حاصل می‌شود (شکل ۴ سمت راست) ولی در حضور عصاره مرزه به‌طور مشخص از تشکیل فیبرها جلوگیری بعمل آمده است (شکل ۴ سمت چپ).

اثر عصاره مرزه روی سمّیت سلولی ناشی از تجمعات آمیلوئیدی لیزوزیم

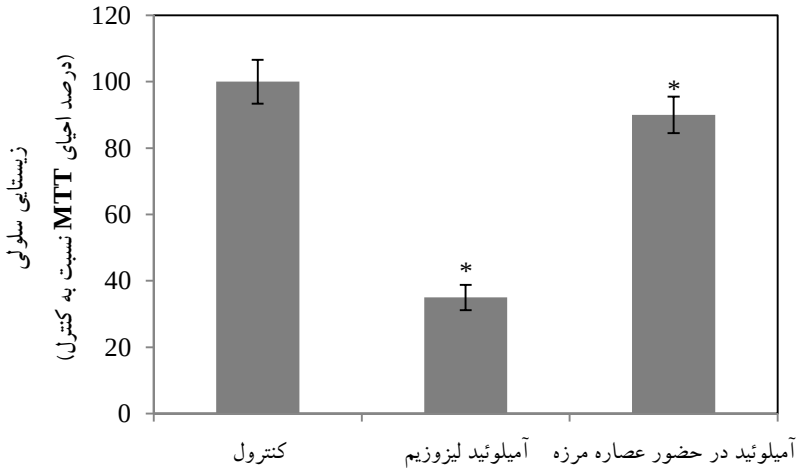
برای اثبات اینکه عصاره مرزه با مهار تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی می‌تواند سمّیت سلولی حاصل از اولیگومرهای لیزوزیم را مهار کند، این اولیگومرها بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون ۲ میلی‌گرم لیزوزیم در pH=۲/۵ و دمای ۵۷ درجه در حضور و عدم حضور ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره مرزه بدست آمد. بعد از سانتریفیوژ کردن، محلول رویی را دور ریخته و رسوبات حاصل به‌وسیله محلول فیزیولوژیک DMEM به‌صورت محلول درآمد.

سپس این اولیگومرها به محیط کشت سلول‌های MCF7 اضافه شده و زیستایی سلول‌ها مطابق دستورالعمل ارائه شده در بخش روش‌ها ارزیابی شد. همان‌طور که نتایج آزمایش MTT نشان می‌دهد در سلول‌هایی که با اولیگومرها تیمار نشده بودند هیچ‌گونه مرگ سلولی مشاهده نشد ولی در مقایسه در اثر افزودن آمیلوئیدهای بوجود آمده در غیاب عصاره به محیط کشت سلولی به میزان قابل توجهی زیستایی سلول‌ها کاهش یافته است (۳۵٪). اما افزودن اولیگومرهای تیمار شده در حضور عصاره به محیط کشت سلولی زیستایی سلول‌ها به حدود ۹۰٪ افزایش یافت (شکل ۵) و این نشان‌دهنده این است که عصاره مرزه توانسته است به‌طور معنی‌داری مانع تشکیل فیبرهای سمّی آمیلوئیدی گردد ($P<۰/۰۵$). البته عصاره مرزه قادر است فیبرهای بالغ آمیلوئیدی را تخریب کند.

به‌منظور بررسی اثر عصاره مرزه روی فیبرهای بالغ آمیلوئیدی، لیزوزیم تبدیل به آمیلوئید بالغ شده (یعنی انکوباسیون این پروتئین در شراط تولید آمیلوئید به مدت ۴۸ ساعت) و بعد از ۴۸ ساعت از شروع واکنش به محیط عصاره مرزه با غلظت نهایی ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اضافه شد. پس از اضافه کردن عصاره مرزه ۲۴ ساعت دیگر نیز اجازه داده شد تا واکنش ادامه پیدا کند. همانطور که شکل ۶ نشان می‌دهد اضافه کردن عصاره باعث کاهش شدت فلورسانس به میزان ۶۰/۷۵٪ شد.

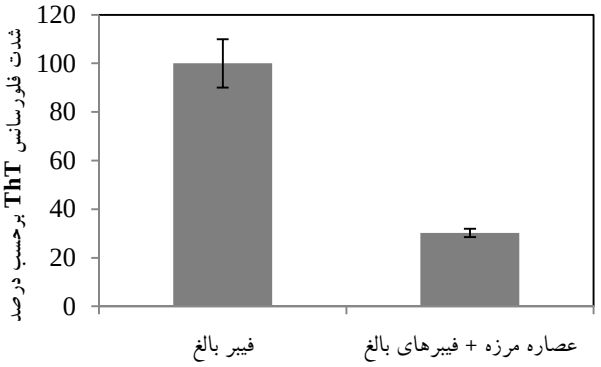


شکل ۴- تصویر میکروسکوپ نیروی اتمی ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر لیزوزیم در بافر گلایسین با pH=۲/۵ بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد در عدم حضور عصاره (شکل ۴ سمت راست) و یا حضور ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره مرزه (شکل ۴ سمت چپ)



شکل ۵- ارزیابی زیستایی سلولی به‌وسیله سنجش کاهش MTT

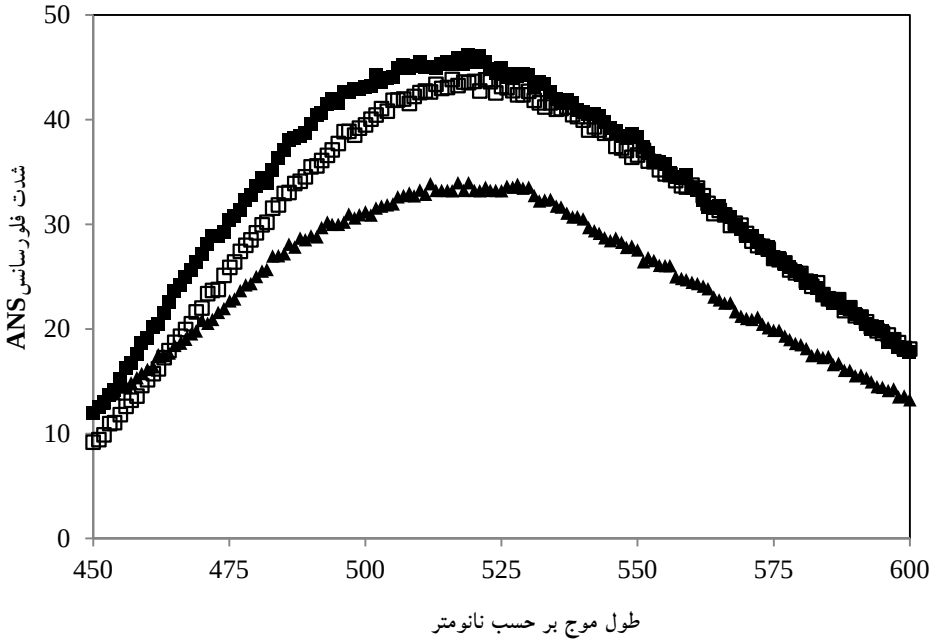
زیستایی سلول‌های تیمار شده با ۲ میکرومولار فیبرهای آمیلوئیدی حاصل از لیزوزیم انکوبه شده در pH=۲/۵ و دمای ۵۷ درجه به مدت ۴۸ ساعت در غیاب و حضور عصاره مرزه. زیستایی سلولهایی که با آمیلوئید لیزوزیم تیمار نشده‌اند نیز به‌عنوان کنترل نشان داده شده‌است. داده‌های حاصل میانگین دو بار آزمایش مستقل و هر بار هر آزمایش چهار بار تکرار شده است ($^{*}P<۰/۰۵$).



شکل ۶- اثر عصاره مرزه با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر روی فیبرهای بالغ تشکیل شده لیزوزیم بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون در شرایط آمیلوئیدی

اثر عصاره مرزه روی پایدارسازی پروتئین لیزوزیم

ترکیب‌های کوچک آروماتیک می‌توانند با مکانیسم‌های مختلفی ازجمله پایدارسازی پروتئین‌ها و جلوگیری از واسرشته شدنشان باعث مهار تشکیل تجمعات آمیلوئیدی شوند. برای بررسی اینکه آیا عصاره مرزه نیز می‌تواند از طریق همین مکانیسم مانع از شروع واکنش تجمع گردد یا خیر از تکنیک فلورسانس خارجی استفاده شد. در اثر قرارگیری لیزوزیم در شرایط اسیدی، پروتئین به‌صورت جزئی واسرشته شده، از این‌رو فلورسانس خارجی آن افزایش یافته است (Ramshini *et al*, 2015b). اگر عصاره مرزه قادر باشد فرم واسرشته را به فرم طبیعی تبدیل کند باعث کاهش فلورسانس خارجی می‌شود. بنابراین فلورسانس خارجی لیزوزیم در حضور و غیاب عصاره بررسی شد. همان‌طور که شکل ۷ نشان می‌دهد در حضور عصاره مرزه شدت فلورسانس کاهش یافته، بنابراین به نظر می‌رسد باعث برگشت‌پذیری پروتئین به سمت ساختار طبیعی شده‌است. این آزمایش نشان داد که عصاره مرزه نه تنها روی تشکیل هسته‌های اولیه تجمع (فاز تأخیر) و فاز رشد تجمعات اولیه به آمیلوئیدهای بالغ اثر می‌گذارد بلکه قادر است با پایدارسازی پروتئین نیز مانع واکنش پلیمریزاسیون گردد.



شکل ۷- ANS فلوئورسانس، ANS به تنهایی (▲) و لیزوزیم در بافر گلایسین ۵۰ میلی‌مولار pH=۲/۵ در غیاب (■) و یا حضور (□) ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره مرزه

طول موج تحریک ۳۸۰ نانومتر بود و طیف نشری بین ۴۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر بدست آمد.

بحث

مطالعات انجام شده روی پدیده تجمع آمیلوئیدی نشان می‌دهد که همه پروتئین‌ها صرف‌نظر از بیماری‌زا و یا غیربیماری‌زا بودن اگر در شرایط مناسب قرار گیرند قادرند تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی را بدهند. فیبرهای تشکیل شده توسط این پروتئین‌ها به لحاظ ساختاری و سمّیت تفاوتی با فیبرهای تشکیل شده با آنهایی که توسط پروتئین Aβ در بیماری آلزایمر تشکیل می‌شود، ندارند (Canale *et al.*, 2006؛ Wang, 2005). به‌عنوان مثال محققان با القای تجمع آمیلوئیدی در پروتئین‌های غیروابسته به بیماری (پروتئین‌های مدل) مثل انسولین و یک پروتئین سنتتیک به‌نام HypF-N و تزریق آن به موش صحرایی توانسته‌اند باعث بیماری آلزایمر در موش‌های صحرایی شوند (Tatini *et al.*, 2013؛ Kheirbakhsh *et al.*, 2015). از طرف دیگر لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ پروتئینی شناخته شده‌است که در شرایط مختلف قادر است تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی را بدهد (Ramshini *et al.*, 2015a؛ Wang *et al.*, 2009). بنابراین، این پروتئین به‌عنوان یک پروتئین مدل خوب برای مطالعه تجمعات آمیلوئیدی مورد استفاده قرار می‌گیرد. همانطور که در بخش مقدمه اشاره شد امروزه مطالعات نشان می‌دهد که تبدیل پپتید Aβ به رسوبات آمیلوئیدی یک اتفاق مهم است که باعث آغاز پاتولوژی بیماری آلزایمر می‌گردد (Haass & Selkoe, 2007). از این‌رو حذف تجمعات آمیلوئیدی یا مهار تشکیل این تجمعات یکی از مهمترین راهکارها برای جلوگیری از بروز و یا درمان این بیماری است (Estrada & Soto, 2007؛ Porat *et al.*, 2006). مطالعات نشان می‌دهد که مولکول‌های کوچک آروماتیک قادر است با اتصال به هسته‌های اولیه تشکیل‌دهنده فیبرهای آمیلوئیدی باعث مهار تشکیل و یا مهار رشد و بلوغ آنها گردد (Porat *et al.*, 2006). به همین منظور در این مطالعه اثر عصاره گیاه دارویی مرزه که دارای ماده مؤثره کارواکرول (ساختار آروماتیک است) و سایر ساختارهای پلی فنلیک است برای مهار تجمع آمیلوئیدی پروتئین لیزوزیم استفاده شد. مطالعات ما نشان داد که این عصاره به‌صورت وابسته به غلظت (با غلظت مؤثر ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) قادر است تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی را مهار کند (شکل ۱). همچنین این عصاره روی سینتیک تشکیل تجمع اثر گذاشته و با طولانی کردن فاز تأخیر و کاهش فاز رشد اثر مهاری خود را روی این واکنش می‌گذارد (شکل ۳). از سوی دیگر عکس میکروسکوپ نیروی اتمی نشان می‌دهد که در حضور عصاره مرزه در شرایط آمیلوئیدی فیبرهای طویل و بالغ آمیلوئیدی تشکیل نشده بلکه اولیگومرهای کوچک غیرسمّی حاصل می‌شوند (شکل‌های ۱ و ۲). عصاره مرزه نه‌تنها روی مرحله تشکیل اولیگومرها از هسته‌های اولیه و تشکیل فیبرهای بالغ از اولیگومرها اثر می‌گذارند بلکه با پایدارسازی پروتئین و جلوگیری از تشکیل پروتئین‌های تانخورده که مستعد تجمع هستند باعث جلوگیری از تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی می‌شوند (شکل ۶). مطالعات متعدد نشان داده‌است که پلی‌فنل‌های آروماتیک گیاهان دارویی باعث بهبود حافظه فضایی موش صحرایی می‌گردند. ازجمله این مطالعات، می‌توان به مطالعه اثر عصاره زعفران توسط Hosseinzadeh و Ziaei (۲۰۰۶)، اثر آب انگور توسط Siahmard و همکاران (۲۰۱۲) و عصاره آبی سنجد توسط Tamtaji و همکاران (۱۹۹۳) اشاره کرد. Ramshini و Ayoubi (۲۰۱۴) اثر مستقیم عصاره دارچین و چای سبز را روی مهار مستقیم فیبرهای آمیلوئیدی مورد مطالعه قرار داده و نشان دادند که این عصاره‌ها باعث تخریب فیبرهای آمیلوئیدی می‌شوند. Azizi و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که ترکیب‌های مؤثر عصاره مرزه (کارواکرول، تیمول) در افزایش حافظه موشهای مدل آلزایمری نقش مؤثری دارند. به‌طور خلاصه داده‌های این پژوهش نشان می‌دهد که عصاره مرزه به‌دلیل داشتن ترکیب‌های شیمیایی آروماتیک با بر هم زدن اندرکنش‌های بین اسیدهای آمینه آروماتیک لیزوزیم مانع تشکیل هسته‌های اولیه مستعد تشکیل تجمع شده، از این‌رو باعث مهار تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی می‌گردد. از سوی دیگر باعث پایدارسازی پروتئین لیزوزیم می‌شود که خود مانعی برای واسرشتگی آن است، از این‌رو قادر است با

این مکانیسم نیز مانع تولید حدواسط‌های مستعد تجمع گردد. به همین دلیل عصاره مرزه با توجه به اثرات گفته شده در مهار تشکیل تجمعات آمیلوئیدی می‌تواند به‌عنوان یک کاندید مناسب برای درمان بیماری‌های تحلیل برنده عصبی مورد مطالعه کاملتر قرار گیرد.

منابع مورد استفاده

- Alkam, T., Nitta, A., Mizoguchi, H., Itoh, A. and Nabeshima, T., 2007. A natural scavenger of peroxynitrites, rosmarinic acid, protects against impairment of memory induced by Abeta (25-35). Behavioural Brain Research, 180: 139-145.
- Azizi, Z., Ebrahimi, S., Saadatfar, E., Kamalinejad, M. and Majlessi, N., 2012. Cognitive-enhancing activity of thymol and carvacrol in two rat models of dementia. Behavioural Pharmacology, 23: 241-249.
- Burley, S.K. and Petsko, G.A., 1985. Aromatic-aromatic interaction: A mechanism of protein structure stabilization. Science, 229: 23-28.
- Canale, C., Torrassa, S., Rispoli, P., Relini, A., Rolandi, R., Bucciantini, M., Stefani, M. and Gliozzi, A., 2006. Natively folded HypF-N and its early amyloid aggregates interact with phospholipid monolayers and destabilize supported phospholipid bilayers. Biophysical Journal, 91(12): 4575-4588.
- Chiti, F. and Dobson, C.M., 2006. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. Annual Review of Biochemistry, 75: 333-366.
- Chromy, B.A., Nowak, R.J., Lambert, M.P., Viola, K.L., Chang, L., Velasco, P.T., Jones, B.W., Fernandez, S.J., Lacor, P.N., Horowitz, P., Finch, C.E., Krafft, G.A. and Klein, W.L., 2003. Self-assembly of Aβ1- 42 into globular neurotoxins. Biochemistry, 42(44): 12749-12760.
- Estrada, L.D. and Soto, C., 2007. Disrupting beta-amyloid aggregation for Alzheimerdisease treatment. Current Topics in Medicinal Chemistry, 7: 115-126.
- Gertz, H. and Kiefer, M., 2004. Review about *Ginkgo biloba* special extract EGb 761 (Ginkgo). Current Pharmaceutical Design, 10: 261-264.
- Greenwald, J. and Riek, R., 2010. Biology of amyloid: structure, function, and regulation. Structure, 18(10): 1244-1260.
- Haass, C. and Selkoe, D.J., 2007. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer’s amyloid beta-peptide. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 8: 101-112.
- Ho, Y.S., So, K.F. and Chang, R.C., 2010. Anti-aging herbal medicine-how and why can they be used in aging-associated neurodegenerative diseases? Ageing Research Reviews, 9: 354-362.
- Hosseinzadeh, H. and Ziaei, T., 2006. Effects of *Crocus sativus* stigma extract and its constituents, crocin and safranal, on intact memory and scopolamine-induced learning deficits in rats performing the morris water maze task. Journal of Medicinal Plants, 5(19): 3: 40-50.
- Hunter, C.A., Lawson, K.R., Perkins, J. and Urch, C.J., 2001. Aromatic interactions. Journal of the Chemical Society Perkin Transactions2, 5: 651-669.
- Kheirbakhsh, R., Chinisaz, M., Khodayari, S., Amanpour, S., Dehpour, AR., Muhammadnejad, A., Larijani, B. and Ebrahim-Habibi, A., 2015. Injection of insulin amyloid fibrils in the hippocampus of male Wistar rats: report on memory impairment and formation of amyloid plaques. Neurological Sciences, 36(8): 1411-1416.
- Lieberman, H.R., 2001. The effects of ginseng, ephedrine, and caffeine on cognitive performance, mood and energy. Nutrition Reviews, 59: 91-102.
- Mattson, M.P., 2000. Apoptosis in neurodegenerative disorders. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 1: 120-129.
- Mihajilov-Krstev, T., Radnović, D., Kitić, D., Zlatković, B., Ristić, M. and Branković, S., 2009. Chemical composition and antimicrobial activity of *Satureja hortensis* L. Central European Journal of Biology, 4: 411-416.
- Morozova-Roche, L.A., Zurdo, J., Spencer, A., Noppe, W., Receveur, V., Archer, D. B., Joniau, M. and Dobson, C.M., 2000. Amyloid fibril formation and seeding by wild-type human lysozyme and its disease- related mutational variants. Journal of Structural Biology, 130: 339-351.
- Nilsson, M.R., 2004. Techniques to study amyloid fibril formation in vitro. Methods, 34: 151-160.
- Nordberg, A., 2004. PET imaging of amyloid in Alzheimer's disease. The Lancet Neurology, 3: 519-527.
- Porat, Y., Abramowitz, A. and Gazit, E., 2006. Inhibition of amyloid fibril formationby polyphenols: structural similarity and aromatic interactions as a commoninhibition mechanism. Chemical Biology & Drug Design, 67: 27-37.
- Ramshini, H., Parrini, C., Relini, A., Zampagni, M., Mannini, B., Pesce, A., Saboury, A.A., Nemat-Gorgani, M. and Chiti, F., 2011. Large proteins have a great tendency to aggregate but a low propensity to form amyloid fibrils. Plos One, 6: e16075.

- Ramshini, H., Ebrahim-Habibi, A., Aryanejad, S. and Rad, A., 2015a. Effect of *Cinnamomum verum* extract on the amyloid formation of hen egg-white lysozyme and study of its possible role in Alzheimer's disease. Basic and Clinical Neuroscience, 6: 29-37.
- Ramshini, H., Mohammad-Zadeh, M. and Ebrahim-Habibi, A., 2015b. Inhibition of amyloid fibril formation and cytotoxicity by a chemical analog of Curcumin as a stable inhibitor. International Journal of Biological Macromolecules, 78: 396-404.
- Ramshini, H. and Ayoubi, F., 2014. Inhibitory effect of *Cinnamomum zeylanicum* and *Camellia sinensis* extracts on the hen egg-white lysozyme fibrillation. Journal of Kerman University of Medical Sciences, 21: 290-301.
- Rietveld, A. and Wiseman, S., 2003. Antioxidant effects of tea: Evidence from human clinical trials. Journal of Nutrition, 133(10): 3285S-3292S.
- Siahmard, Z., Alaei, H., Reisi, P. and Pilehvarian, A.A., 2012. Evaluation of the effects of red grape juice on Alzheimer's disease in rat. Journal of Isfahan Medical School, 29(167): 2383-2390.
- Sipe, J.D., Benson, M.D., Buxbaum, J.N., Ikeda, S., Merlini, G., Saraiva, M.J. and Westermark, P., 2010. Amyloid fibril protein nomenclature: 2010 recommendations from the nomenclature committee of the International Society of Amyloidosis. Amyloid, 17: 101-104.
- Soto, C., Sigurdsson, E.M., Morelli, L., Kumar, R.A., Castaño, E.M. and Frangione, B., 1998. βsheet breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis: implications for Alzheimer's therapy. Nature Medicine, 4: 822-826.
- Tamtaji, O.R., Taghizadeh, M., Takhtfiroozeh, S.M. and Talaei, S.A., 1993. The effect of *Elaeagnus angustifolia* water extract on scopolamine-induced memory impairment in rats. Journal of Zanjan University of Medical Sciences, 22: 101-111.
- Tatini, F., Pugliese, A.M., Traini, C., Niccoli, S., Maraula, G., Ed Dami, T., Mannini, B., Scartabelli, T., Pedata, F., Casamenti, F. and Chiti, F. 2013. Amyloid-β oligomer synaptotoxicity is mimicked by oligomers of the model protein HypF-N. Neurobiol of Aging, 34(9): 2100-2109.
- Wang, W., 2005. Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics. International Journal of Pharmaceutics, 289: 1-30.
- Wang, S.S., Liu, K.N. and Lee, W.H., 2009. Effect of curcumin on the amyloid fibrillogenesis of hen egg-white lysozyme. Biophysical Chemistry, 144: 78-87.
- Zgorka, G. and Glowniak, K., 2001. Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to Lamiaceae family. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 26: 79-87.

Anti-amyloidogenic activity of *Satureja hortensis* L. extract on lysozyme fibrillogenesis and its possible influence on amyloidal diseases treatment

H. Ramshini[1*], N. Kovsari[2] and A.A. Moghaddasi[3]

1*- Corresponding author, Department of Biology, Payam Noor University, Tehran, Iran, E-mail: ramshini@alumni.ut.ac.ir
2- Mobini Hospital, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran
3- Department of Biology, Azad University, Branch of Damghan, Damghan, Iran

Received: August 2015 Revised: November 2015 Accepted: January 2016

Abstract

Amyloid aggregate plaques are the hallmarks of many neurodegenerative disorders including Alzheimer's disease. Thus, reducing amyloid deposits is an attractive approach to improve the therapeutic arsenal for the diseases. Despite of intensive research carried out, there is no therapeutic agent directed towards inhibition of aggregation formation. One important approach in the development of therapeutics is the use of herbal extracts, which are rich in aromatic small molecules. This study aimed to explore the inhibitory activity of *Satureia hortensis* extract against the fibril formation of hen egg-white lysozyme. In this experimental study, amyloid fibrillation was formed in hen egg-white lysozyme under acidic conditions at high temperature. Lysozyme (2 mg/mL) was dissolved in glycine buffer 50 mM, pH=2.5 and incubated at 57°C for the specified durations, while being gently stirred. Various techniques including thioflavin T, ANS fluorescence assay, and atomic force microscopy were used to confirm fibrillation. Data were analyzed through SPSS 16 using descriptive statistics as well as independent t-test. In the absence of *Satureia hortensis*, mature amyloid aggregates became evident after 48 hours of incubation but upon incubation with various extract concentrations (ranging from 0.25 to 1 mg/ml), formation of amyloid fibrils and oligomers was inhibited. The inhibition was dose-dependent and the best concentration was 1 mg/ml. Our results showed that, the extract was effective in all of amyloid formation processes including lag, polymerization, and equilibrium phases. Also, cytotoxicity of oligomers in the presence of the extract significantly ($P<0.05$) decreased, as indicated by the MTT assay. Based on inhibitory role of the extract on cytotoxicity of amyloid fibers and its inhibitory effect on all processes of amyloid aggregation, it could be used as a novel inhibitor for Alzheimer's disease.

Keywords: Amyloid aggregation, *Satureia hortensis* extract, hen egg-white lysozyme, cytotoxicity.