

## بررسی اثرات ضد آمیلوئیدوزنیکی و بازکنندگی فیبریل‌های آمیلوئیدی گیاه مریم گلی در شرایط آزمایشگاهی: استراتژی برای کاهش تجمع فیبریل‌های آمیلوئید انسولین در اثر تزریق‌های مکرر زیرپوستی در بیماران دیابتی

وجیهه حاتموند<sup>۱</sup>، سیف‌الله بهرامی کیا<sup>۲\*</sup>، فاطمه بردی نشین<sup>۱</sup>، پرستو شوهانی<sup>۱</sup>

۱- کارشناس ارشد بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، لرستان، ایران

۲- استادیار، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، لرستان، ایران

یافته / دوره ۲۲ / شماره ۳ / پاییز ۹۹ / مسلسل ۸۵

### چکیده

دریافت مقاله: ۹۹/۴/۱۰ پذیرش مقاله: ۹۹/۵/۱۰

مقدمه: اخیراً تلاش‌های رو به رشد زیادی در جهت روشن ساختن مکانیسم مولکولی تشکیل آمیلوئید و بررسی ترکیبات مؤثر برای مهار ساختارهای آمیلوئیدی صورت گرفته است. بررسی فرایند فیبریل‌زایی از طریق القا و مهار آن با استفاده از ترکیبات خاص مانند مشتقات آروماتیک اطلاعات مفیدی در جهت پایدارسازی ساختار پروتئین در اختیار می‌گذارد. در مطالعه حاضر، اثرات ضد آمیلوئیدوزنیکی و ناپایدارکنندگی مریم گلی در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از انسولین گاوی به عنوان پروتئین الگو بررسی شد.

مواد و روش‌ها: برای القای فیبریل‌زایی، انسولین پانکراس گاوی به مدت ۱۰ روز در بافر گلاسیین ۵۰ میلی‌مولار با  $\text{pH}=2/2$  در دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. ایجاد آمیلوئید با استفاده از روش‌های اسپکتروسکوپی جذب CR، فلورسانس THT، ANS و میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی (FE-SEM) بررسی شد. سپس تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره مریم گلی (نسبت‌های ۱/۱، ۱ و ۵ عصاره تام به ۱ پروتئین) روی مهار فیبریل‌سازی و ناپایدار کردن فیبریل‌های از پیش شکل گرفته انسولینی بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج حاکی از کاهش قابل توجه تجمعات فیبریل‌های آمیلوئیدی در نمونه‌های انکوبه شده با دارو نسبت به نمونه شاهد بود. علاوه بر این، نتایج نشان داد که عصاره مریم گلی در همه غلظت‌ها به ویژه در نسبت ۱:۱ دارو به پروتئین، دارای اثر مهاری قوی بر فرآیند فیبریل‌سازی و دفیبریل‌سازی پروتئین انسولین است.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که با تخلیص و جداسازی ترکیبات مؤثره گیاه مریم گلی و اثر آن بر فیبریل‌های آمیلوئیدی، احتمالاً می‌توان از این گیاه برای درمان بیماری‌های آمیلوئیدی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: انسولین گاوی، مریم گلی، فیبریل‌های آمیلوئیدی.

\*آدرس مکاتبه: خرم‌آباد، کیلومتر ۵ جاده خرم‌آباد تهران، دانشگاه لرستان، گروه زیست‌شناسی.

پست الکترونیک: bahramikia.s@lu.ac.ir

## مقدمه

بیش از ۲۰ بیماری انسانی از جمله بیماری آلزایمر، دیابت نوع ۲، بیماری پارکینسون و رسوب آمیلوئید وابسته به همودیالیز عنوان شده است که با تشکیل آمیلوئید در پلی پپتیدها ارتباط دارند (۲،۱). در طی این وقایع، پروتئین‌های محلولی که در حالت معمول تاخوردده هستند، ساختارهای حد واسط بدتاخوردده تشکیل می‌دهند و در رسوبات فیبریلی تجمع می‌یابند که این امر منجر به آسیب سلولی و اختلال عملکرد اندامها می‌شود. تشکیل فیبریل آمیلوئید به پروتئین‌های مرتبط با بیماری محدود نمی‌شود. بسیاری از پروتئین‌های دیگر نیز در شرایط آزمایشگاهی پتانسیل تشکیل تجمعات آمیلوئیدی را تحت شرایط دناتوراسیون جزئی دارند (۳).

یکی از پروتئین‌هایی که تشکیل آمیلوئید در آن مورد توجه قرار دارد انسولین است (۴) انسولین، هورمون پلی پپتیدی کوچکی متشکل از ۵۱ آمینواسید با یک ساختار مارپیچ آلفای نسبتاً بزرگ است که نقش مهمی در متابولیسم گلوکز دارد. انسولین به طور عمده در وزیکول‌های ترشحی لوزالمعده دارای ساختار هگزامر است، در جریان خون آزاد می‌شود و با گیرنده خود به عنوان مونومر برهم‌کنش می‌کند (۵،۶). انسولین تولید شده در بدن به صورت هگزامر ذخیره می‌شود در حالی که فرم فعال آن به صورت مونومر است (۷). انسولین گاوی با انسولین انسانی فقط در سه اسید آمینه متفاوت است. ساختار اولیه انسولین گاوی برای اولین بار توسط فردریک سانگر در سال ۱۹۵۱ تعیین شد. سپس مطالعات بیشتری در این زمینه صورت گرفت (۸،۹). در مطالعات آزمایشگاهی نشان داده شده است که تحت شرایط دناتورده کردن از جمله pH اسیدی و درجه حرارت بالا، مولکول‌های مونومری انسولین به صورت فیبریل‌های آمیلوئید تجمع می‌یابند (۱۰،۱۱). از آنجا که این فیبریل‌ها به روش‌های مختلفی به خوبی مشخص شده‌اند، انسولین به عنوان سیستم

الگوی ایده‌آل برای مطالعه تجمع آمیلوئید ارائه می‌شود. برای مهار فیبریلاسیون آمیلوئید انسولین و اختلال در رسوب آمیلوئید از پیش تشکیل شده، راهکارهای درمانی لازم است (۱۲).

راهکارهای درمانی برای درمان اختلالات آمیلوئیدوزنیک در دو مسیر ارائه شده است که عبارتند از: مهار تشکیل آمیلوئید و قطع تجمعات آمیلوئیدی تشکیل شده (۱۳). مولکول‌های آروماتیک کوچک مانند قرمز کنگو و تیوفلاوین T، باعث مهار فرایند فیبریل‌زایی می‌شوند. در سال‌های اخیر انبوهی از گزارش‌ها مبنی بر این که مولکول‌های کوچک مانع از فیبریل‌زایی می‌شوند، ارائه شده است (۱۶-۱۴). گروهی از ترکیبات مولکولی کوچک، پلی فنول‌ها و فلاونوئیدها هستند. نشان داده شده است ترکیبات پلی فنولی طبیعی که به طور گسترده در مواد غذایی و داروهای گیاهی یافت می‌شوند، باعث اختلال در ساختارهای آمیلوئیدی و کاهش سمیت سلولی فیبریل‌های آمیلوئیدی می‌شوند (۱۳). امروزه علاقه زیادی به استفاده از داروهای طبیعی و گیاهان دارویی به علت داشتن کمترین عوارض جانبی و تحمل بیشتر در مقایسه با داروهای مصنوعی وجود دارد.

مریم گلی با نام علمی *Salvia officinalis* L متعلق به خانواده *Lamiaceae* است (۱۷). *Salvia officinalis* گیاهی همیشه سبز، دارای ساقه‌های چوبی، برگ‌های خاکستری و گل‌های آبی متمایل به ارغوانی است. این گیاه دارای ویژگی‌های ضدسرطان، ضد اسپاسم، ضد عفونت و قابض است. همچنین دارای اثرات درمانی قوی در بیماران مبتلا به زوال عقل و یا اختلال شناختی است (۱۸،۱۹).

گونه‌های جنس مریم گلی منبعی غنی از ترکیبات پلی فنولی با بیش از ۱۶۰ پلی فنول شناخته شده هستند که حاوی مجموعه‌ای از اسیدهای فنولی و فلاونوئیدها هستند. تأثیرات مثبت بالینی این جنس در زمینه‌های مختلف از جمله افزایش نوروتروفین‌ها، فعالیت

عصاره‌گیری ۱۰۰ گرم از گیاه مورد نظر در ۵۰۰ میلی لیتر اتانول ۸۰ درصد خیسانده و ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد و با کاغذ صافی صاف شد. عصاره به دست آمده در ظرفی تیره در یخچال نگهداری شد. این کار یک بار دیگر تکرار و عصاره به دست آمده به مرحله قبلی اضافه گردید. دو مرحله دیگر به همین صورت البته با اتانول ۷۰ درصد انجام شد. در پایان یکبار دیگر کل عصاره صاف و برای تبخیر حلال آلی در روتاری قرار گرفت. سپس عصاره آبی باقی مانده در فریز درایر قرار داده شد تا خشک شود. عصاره خشک شده به دست آمده از مرحله آخر در فریز ۲۰- درجه تا زمان استفاده نگهداری شد. برای تهیه عصاره‌های گیاهی، عصاره تام اولیه با غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر تهیه و سپس از آنها غلظت‌های پایین‌تر ۰.۱، ۱، ۵ عصاره تام به ۱ پروتئین (میلی گرم بر میلی لیتر) تهیه شد. محلول‌ها بعد از آماده‌سازی در دمای ۲۰- درجه و در تاریکی نگهداری شدند.

#### تهیه نمونه‌ها

برای مطالعه اثر عصاره بر روند شکل‌گیری فیبریل‌های آمیلوئیدی، انسولین پانکراس گاوی با استفاده از بافر گلیسین ۵۰ میلی مولار (pH=۲/۲) در غلظت ۱ میلی مولار تهیه شد. سپس میکروتیوپ‌های حاوی محلول پروتئین در غیاب و حضور عصاره (نسبت‌های ۰/۱، ۱ و ۵ عصاره تام به ۱ پروتئین) در داخل حمام آب بدون هم‌زده شدن محلول در دمای ۵۷°C به مدت ۱۰ روز انکوبه گردید. برای مطالعه اثر عصاره بر روند دفیبریلاسیون، نمونه فیبریله شده در روز دهم، در غیاب و حضور عصاره (نسبت‌های ۰/۱، ۱ و ۵ عصاره تام به ۱ پروتئین) در دمای ۳۷°C به مدت سه روز انکوبه شد.

#### روش‌های مطالعه فیبریل‌های آمیلوئیدی

##### آزمون اتصال قرمز کنگو (CR)

ابتدا استوک غلیظ CR به وسیله بافر فسفات ۱۰ میلی مولار (NaCl ۰/۱۵ میلی مولار،  $\text{NaN}_3$  ۰/۰۲ درصد،

کولینرژیک، فعالیت آن‌تی کولین استرازی، اثرات آن‌تی اکسیدانی، ضد التهابی، ضد افسردگی و ضد انعقادی بررسی شده است (۲۰). با توجه به جنبه‌های بالینی مریم گلی و وجود مقادیر بالای فنول‌ها و فلاونوئیدها در گیاهان، در این مطالعه عصاره مریم گلی به منظور بررسی اثرات احتمالی آن بر درمان بیماری‌های وابسته به آمیلوئید بررسی گردید و از انسولین پانکراس گاوی به- عنوان پروتئین الگو استفاده شد.

#### مواد و روش‌ها

##### مواد

انسولین پانکراس گاوی، تیوفلاوین T (THT)، آنیلینو نفتال ۸- سولفونیک اسید (ANS)، قرمز کنگو (CR)، گلیسین، سدیم فسفات منوبازیک دی هیدرات ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )، سدیم فسفات دی‌بازیک دی هیدرات ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )، سدیم آزید ( $\text{NaN}_3$ )، اسید هیدروکلریک (HCL) و سدیم هیدروکسید (NaOH) از شرکت مرک (آلمان)؛ الکل اتیلیک طبی ۹۶ درصد حجمی از شرکت الکل نصر.

##### تجهیزات

دستگاه اسپکتروفلوریمتری (Fluorescence Spectrophotometer) مدل Cary-Eclipse ساخت شرکت آمریکایی Agilent، دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل FE-SEM ساخت شرکت TESCAN کشور چک، دستگاه بن ماری سرولوژی مدل WB ساخت شرکت ایرانی دی تجهیز آریا، دستگاه میکروپلیت ریدر مدل Epoch ساخت شرکت بیوتک (BioTek)، پی‌اچ متر ساخت شرکت آمریکایی TwinLab.

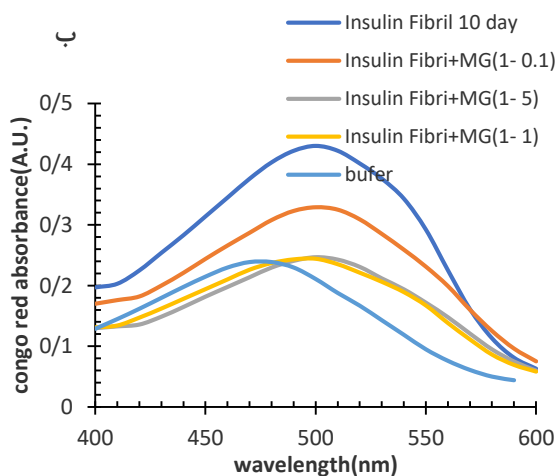
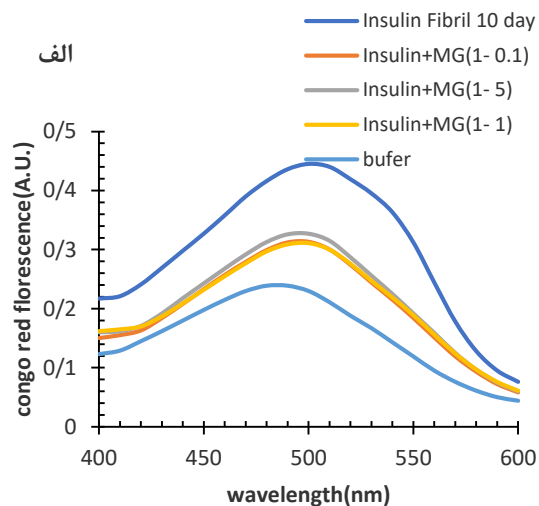
##### تهیه عصاره گیاهی

گیاه مریم گلی از زمین‌های شهرستان دورود واقع در استان لرستان جمع‌آوری و توسط استادیار سیستماتیک گیاهی از دانشگاه لرستان شناسایی و با شماره هرباریومی ۱۴۰۵۵ در هرباریوم دانشگاه لرستان نگهداری شد. برای

## یافته‌ها

## آزمون اتصال قرمز کنگو (CR)

فیبریل‌های آمیلوئیدی دارای جایگاه‌های اتصال به مولکول CR هستند. این جایگاه‌ها واقع در سطح صفحات بتای فیبریل‌های آمیلوئیدی است. وقتی CR به فیبریل‌های آمیلوئیدی متصل می‌شود افزایش ماکزیم جذب در طیف CR مشاهده می‌شود و ماکزیم جذب نوری آن از ۴۹۰ به ۵۰۰ نانومتر انتقال (red shift) پیدا می‌کند (۲۱). در شکل ۱ با استفاده از آزمون اتصال قرمز کنگو، تأثیر عصاره مریم گلی بر روند فیبریلاسیون و دفیبریلاسیون انسولین به تصویر کشیده شده است.



شکل ۱. آزمون اتصال قرمز کنگو در غیاب و حضور غلظت‌های مختلف عصاره مریم گلی. الف) ارزیابی اثر عصاره مریم

۷/۴ pH) تهیه شد. سپس ۵ ماکرولیتر از نمونه پروتئین به ۴۰۰ ماکرولیتر از محلول کاری CR (۲۰ ماکرومولار) افزوده و کاملاً مخلوط شد. محلول حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه شد. سپس شدت جذب در طول موج ۴۰۰-۷۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

## آزمایش فلورسانس تیوفلاوین T (THT)

ابتدا استوک غلیظ THT به وسیله بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار (NaCl ۰/۱۵ میلی‌مولار،  $\text{NaN}_3$  ۰/۰۲ درصد، pH ۷) تهیه شد. سپس ۱۵ ماکرولیتر از نمونه پروتئین به ۲۹۸۵ ماکرولیتر از محلول کاری THT (۱۵ ماکرومولار) افزوده و کاملاً مخلوط شد. شدت فلورسانس با اسپکتروفلورسانس در excitation ۴۴۰ و emission ۴۶۰-۶۰۰ و عرض شکاف ۵ و ۱۰ (به ترتیب برای excitation و emission) اندازه‌گیری شد.

## آزمایش فلورسانس آنیلینو نفتالن ۸- سولفونیک اسید (ANS)

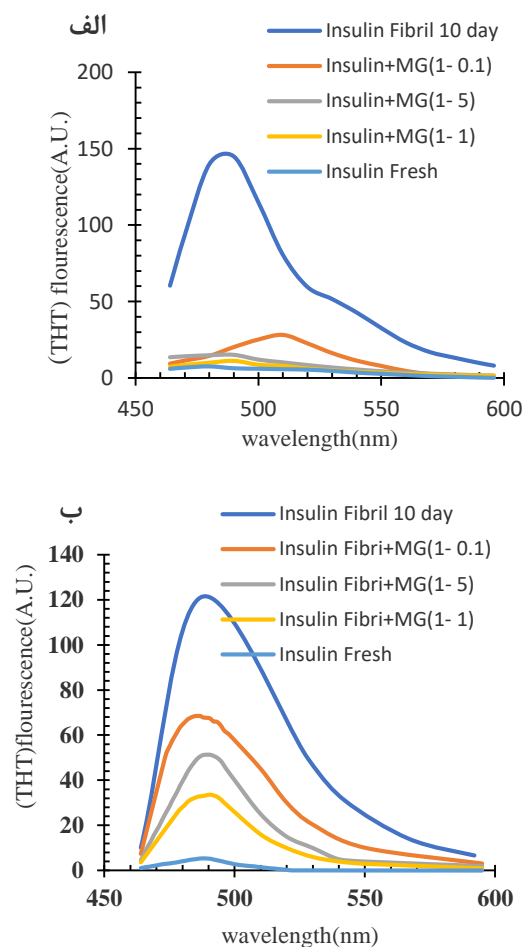
ابتدا استوک غلیظ ANS به وسیله بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار (NaCl ۰/۱۵ میلی‌مولار،  $\text{NaN}_3$  ۰/۰۲ درصد، pH ۷) تهیه شد. سپس ۱۵ ماکرولیتر از نمونه پروتئین به ۳۰۰ میکرولیتر از محلول کاری ANS (۲۰ ماکرومولار) و ۲۶۸۵ میکرولیتر از بافر گلیسین افزوده و کاملاً مخلوط شد. شدت فلورسانس با اسپکتروفلورسانس در excitation ۳۸۰ و emission ۴۲۰-۶۰۰ و عرض شکاف ۵ برای excitation و emission اندازه‌گیری شد.

## بررسی ریخت‌شناسی ساختاری با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (FE-SEM)

پنج میکرولیتر از هر نمونه رقیق شده (به وسیله آب - مقطر به میزان ۷۰ برابر) روی فویل آلومینیومی قرار داده شد. نمونه‌ها پس از خشک شدن در مجاورت هوا به وسیله لایه‌ای از طلا پوشانده شد و در ولتاژ ۱۵Kev با بزرگ-نمایی ۹۰kx توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی اسکن شدند.

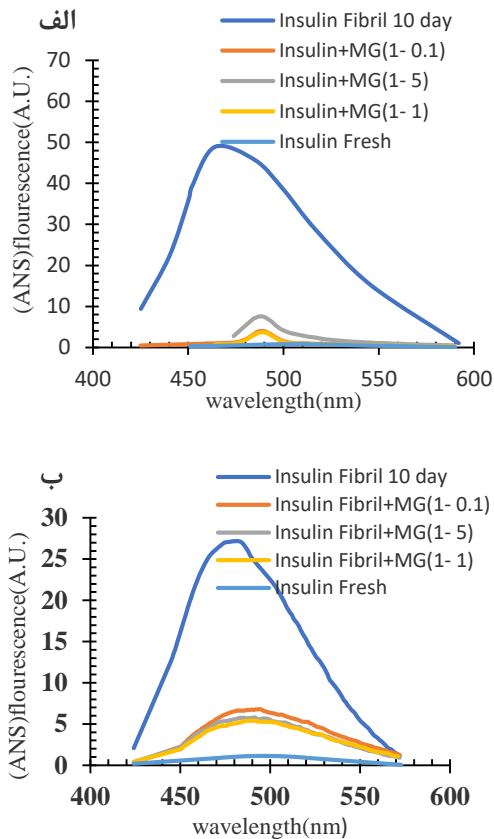
## فلورسانس THT

فیبریل‌های آمیلوئیدی دارای جایگاه‌های اتصال برای پروپ فلورسنت THT هستند. این جایگاه‌ها واقع در کانال بین صفحات بتای فیبریل‌های آمیلوئیدی است. زمانی که این ترکیب به ساختار صفحات بتای موجود در فیبریل‌های آمیلوئید متصل می‌شود، شدت فلورسانس THT افزایش می‌یابد (۲۲). در شکل ۲ با استفاده از آزمایش فلورسانس THT، تأثیر عصاره مریم گلی بر روند فیبریلیاسیون و دفیبریلیاسیون انسولین به تصویر کشیده شده است.



شکل ۲. اندازه‌گیری شدت فلورسانس THT در غیاب و حضور غلظت‌های مختلف عصاره مریم گلی برای ارزیابی تأثیر عصاره (الف) تأثیر بر روند فیبریلیاسیون انسولین، ۱۰ روز پس از انکوباسیون نمونه‌های پروتئین در دمای  $57^{\circ}\text{C}$  (ب) تأثیر بر روند دفیبریلیاسیون تجمعات آمیلوئیدی انسولین، ۳ روز پس از انکوباسیون فیبریل‌ها در دمای  $37^{\circ}\text{C}$

گلی بر روند فیبریلیاسیون انسولین، ۱۰ روز پس از انکوباسیون نمونه‌های پروتئین در دمای  $57^{\circ}\text{C}$  (ب) ارزیابی اثر عصاره مریم گلی بر روند دفیبریلیاسیون تجمعات آمیلوئیدی انسولین، سه روز پس از انکوباسیون فیبریل‌ها در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  همان طور که در شکل ۱ الف مشاهده می‌شود، طیف جذب نوری قرمز کنگوی انسولین گاوی، ۱۰ روز پس از انکوباسیون در دمای  $57^{\circ}\text{C}$  افزایش می‌یابد و ماکزیمم جذب نوری آن به سمت طول موج  $510$  نانومتر انتقال پیدا می‌کند. این تغییرات بیانگر فیبریل‌شدن پروتئین انسولین تحت شرایط اسیدی و حرارت بالا است. در نمونه‌هایی که محلول پروتئین حاوی غلظت‌های مختلفی از عصاره مریم گلی است، شرایط اسیدی و حرارت بالا صرفاً منجر به افزایش اندک در شدت جذب نوری قرمز کنگوی می‌شود و تغییر در شانه طیف و انتقال به طول موج‌های بالاتر مشاهده نمی‌شود. لذا می‌توان نتیجه گرفت که عصاره مریم گلی از فیبریل‌شدن انسولین ممانعت می‌کند و مانع از تکمیل شدن فرآیند فیبریلیاسیون پروتئین می‌شود. تایید این ادعا نیاز به آزمایشات تکمیلی دیگری دارد که در ادامه تحقیقات بدان پرداخته می‌شود. همان طور که در شکل ۱ ب مشاهده می‌شود، تحت شرایط برگشت‌پذیری روند فیبریلیاسیون، شدت طیف جذب نوری قرمز کنگوی فیبریل‌های از پیش شکل‌گرفته انسولین کاهش می‌یابد اما ماکزیمم طیف جذب همچنان در ناحیه  $500$  نانومتر قرار دارد که نشان دهنده وجود مقادیر بالای فیبریل‌های آمیلوئیدی در نمونه کنترل است. تحت این شرایط، ماکزیمم جذب نوری نمونه‌های انکوبه شده در حضور غلظت‌های مختلف عصاره مریم گلی از  $500$  به  $490$  نانومتر انتقال (*blue shift*) پیدا می‌کند. این تغییرات بیانگر اثر این عصاره بر تسریع روند دفیبریلیاسیون پروتئین است. بیشترین میزان تأثیر عصاره بر برگشت‌پذیری فیبریل‌های آمیلوئیدی در نسبت  $1:1$  عصاره به فیبریل است.



شکل ۳. اندازه گیری شدت فلورسانس ANS در غیاب و حضور غلظت های مختلف عصاره مریم گلی برای ارزیابی تأثیر عصاره الف) تأثیر بر روند فیبریلاسیون انسولین، ۱۰ روز پس از انکوباسیون نمونه های پروتئین در دمای ۵۷°C  
 ب) تأثیر بر روند دفیبریلاسیون تجمعات آمیلوئیدی انسولین، ۳ روز پس از انکوباسیون فیبریل ها در دمای ۳۷°C  
 همان طور که در شکل ۳ الف مشاهده می شود، شدت فلورسانس ANS، ۱۰ روز پس از انکوباسیون انسولین در دمای ۵۷°C افزایش می یابد. این افزایش بیانگر افزایش هیدروفوبیسیته سطحی انسولین و شکل گیری فیبریل های آمیلوئید در نمونه انکوبه شده است. در نمونه های حاوی عصاره مریم گلی (در تمامی غلظت های مورد آزمایش عصاره) افزایش در شدت فلورسانس ANS نسبت به پروتئین شاهد ناچیز است که بیانگر اثر مهارى عصاره گیاه بر قرارگیری سطوح آب گریز پروتئین در معرض سطح و در نتیجه مهار فیبریلاسیون انسولین است.

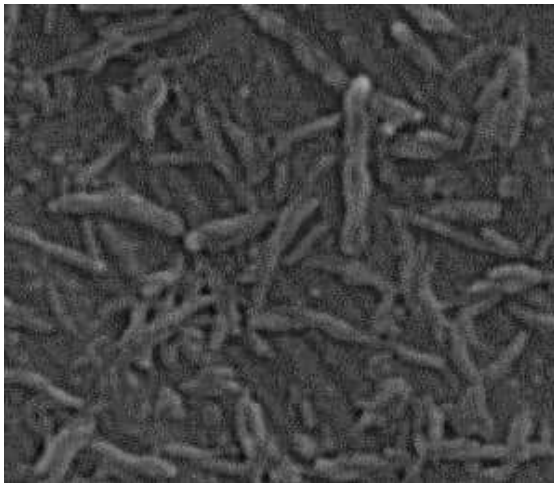
همانطور همان طور که در شکل ۲ الف مشاهده می شود، شدت فلورسانس THT، ۱۰ روز پس از انکوباسیون انسولین در دمای ۵۷°C افزایش می یابد. این افزایش بیانگر شکل گیری فیبریل های آمیلوئید در نمونه انکوبه شده است. در نمونه های حاوی عصاره مریم گلی (در تمامی غلظت های مورد آزمایش عصاره) افزایش در شدت فلورسانس THT نسبت به پروتئین شاهد ناچیز است که بیانگر اثر مهارى عصاره گیاه بر فیبریلاسیون انسولین است.

در شکل ۲ ب روند دفیبریلاسیون به تصویر کشیده شده است. شدت فلورسانس THT نمونه فیبریل های از پیش شکل گرفته انسولین، ۳ روز پس از انکوباسیون در دمای ۳۷°C از حدود ۱۵۰ a.u در شکل ۲ الف به کمتر از ۱۴۰ a.u در شکل ۲ ب می رسد. این تغییرات بیانگر تأثیر دمای پایین بر شروع روند برگشت پذیری فیبریل ها است. در حضور عصاره مریم گلی (در تمامی غلظت های مورد آزمایش) کاهش بیشتری در شدت فلورسانس THT نسبت به نمونه شاهد مشاهده می شود که بیانگر تأثیر عصاره گیاه بر تسریع روند دفیبریلاسیون است. در این خصوص نیز بیشترین میزان تأثیر عصاره بر برگشت پذیری فیبریل های آمیلوئیدی در نسبت ۱:۱ عصاره به فیبریل دیده می شود.

### فلورسانس ANS

برای تعیین میزان هیدروفوبیسیته سطحی از نشر فلورسانس آنیلینو نفتالن ۸- سولفونیک اسید (ANS) استفاده شد. نواحی آب گریز در معرض حلال فیبریل های آمیلوئیدی جایگاه های اتصال برای پروب فلورسنت ANS هستند. زمانی که این ترکیب به ساختار صفحات بتای موجود در فیبریل های آمیلوئید متصل می شود، شدت فلورسانس آن افزایش می یابد (۲۳). در شکل ۳ با استفاده از آزمایش فلورسانس ANS؛ تأثیر عصاره مریم گلی بر هیدروفوبیسیته سطحی طی روند فیبریلاسیون و دفیبریلاسیون انسولین به تصویر کشیده شده است.

ب



شکل ۴. تصاویر میکروسکوپ FE-SEM در غیاب و حضور عصاره

## مریم گلی

الف) شکل ساختاری انسولین، ۱۰ روز پس از انکوباسیون نمونه‌های پروتئین (شاهد) در دمای  $57^{\circ}\text{C}$  با بزرگ‌نمایی  $500\text{ nm}$

ب) شکل ساختاری انسولین انکوبه شده در حضور عصاره مریم گلی (آزمودنی) به نسبت (۱:۱) با بزرگ‌نمایی  $500\text{ nm}$

پروتئین انسولین در حالت طبیعی فیزیولوژیکی دارای ساختار کروی است. همان‌طور که در شکل ۴.الف ملاحظه می‌شود در غیاب عصاره مریم گلی، مورفولوژی ساختاری انسولین (۱۰ روز پس از انکوباسیون نمونه‌های پروتئین در دمای  $57^{\circ}\text{C}$ ) دارای ساختار رشته‌ای و فیبریلی است. در حضور عصاره مریم گلی فیبریلهای انسولین، با وجود تغییر شکل از حالت کروی به سمت شکل‌گیری ساختارهای فیبریلی و خطی سوق داده نمی‌شوند. این تصویر بیانگر تأثیر مهاری عصاره مریم گلی بر شکل‌گیری فیبریلهای آمیلوئید است (شکل ۴.ب).

## بحث و نتیجه‌گیری

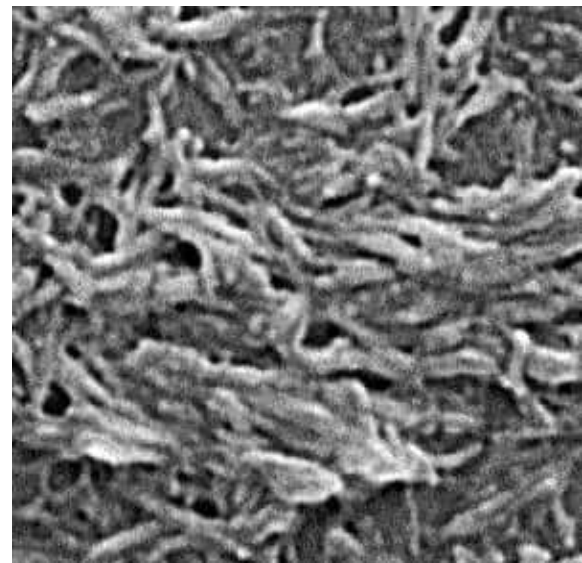
رویکردهای مشترک برای مطالعه فیبریلهای آمیلوئیدی، یافتن استراتژی برای جلوگیری یا درمان بیماری‌های وابسته به پلاک‌های آمیلوئیدی است (۲۵). ترکیبات مختلفی شناسایی شده‌اند که از تشکیل فیبریلهای آمیلوئیدی در محیط *in vitro* جلوگیری می‌کنند. در نتیجه کارهای متنوعی برای شناسایی ترکیبات مهارگر تشکیل آمیلوئید یا ترکیبات

در شکل ۳.ب شدت فلورسانس ANS نمونه فیبریلهای از پیش شکل گرفته انسولین، ۳ روز پس از انکوباسیون در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  از حدود  $50\text{ a.u}$  در شکل ۳.الف به حدود  $28\text{ a.u}$  در شکل ۳.ب کاهش می‌یابد. این تغییرات بیانگر تأثیر دمای پایین بر شروع روند برگشت-پذیری فیبریل‌ها است. در حضور عصاره مریم گلی (در تمامی غلظت‌های مورد آزمایش) کاهش بیشتری در شدت فلورسانس ANS نسبت به نمونه شاهد مشاهده می‌شود که بیانگر تأثیر عصاره گیاه بر کاهش بیشتر سطوح هیدروفوب در معرض سطح پروتئین و تسریع روند دفیبریلاسیون است. در این خصوص نیز بیشترین میزان تأثیر عصاره نسبت ۱:۱ عصاره به فیبریلهای دیده می‌شود.

## تصاویر میکروسکوپی (FE-SEM)

فیبریلهای آمیلوئیدی بدون توجه به پروتئین منبع آنها دارای شکل ساختاری رشته مانند هستند (۲۴). میکروسکوپ الکترونی روبشی (FE-SEM) وسیله‌ای بسیار عالی برای مشاهده شکل ساختاری پروتئین‌ها است. در شکل ۴ با استفاده از میکروسکوپ FE-SEM، تأثیر عصاره مریم گلی (در نسبت ۱:۱ عصاره به پروتئین) بر مورفولوژی ساختاری پروتئین طی روند فیبریلاسیون به تصویر کشیده شده است.

الف



آنتی آمیلوئیدوژنیک صورت گرفته و ابزارهای مختلفی برای روبش این ترکیبات معرفی شده‌اند. یکی از راهبردهای امیدوارکننده برای درمان بیماری‌های آمیلوئیدی، تداخل در تجمع پروتئین و یا بی‌ثبات ساختن الیگومرها و فیبریل‌های تشکیل شده با استفاده از مولکول‌های کوچک است. گروهی از ترکیبات مولکولی کوچک، پلی‌فنول‌ها هستند که در غلظت‌های بالا در گیاهان وجود دارند. فنول‌ها عمدتاً نه تنها دارای اثرات ضد آمیلوئیدوژنیک هستند، بلکه اثرات بی‌ثبات کننده‌ای بر فیبریل‌های آمیلوئیدی (تبدیل فیبریل به تجمعات بی‌شکل) دارند. مکانیسم بی‌ثبات نمودن فیبریل‌ها احتمالاً متفاوت از مکانیسم مهار تشکیل آمیلوئید است (۱۹، ۲۶، ۲۷) ترکیبات مولکولی کوچک حاوی حلقه‌های آروماتیک و گروه‌های هیدروکسیل (مانند پلی‌فنول‌ها) با آمینواسیدهای آروماتیک موجود در پروتئین‌ها ارتباط برقرار می‌کنند و از تعامل میان زنجیره‌های جانبی آمینواسیدها- که موجب تشکیل هسته‌های هیدروفوبیک فیبریل‌های آمیلوئیدی می‌شوند- جلوگیری می‌کنند. علاوه بر حلقه فنولی، اتصال هیدروژنی نیز برای جلوگیری از تعامل ساختاری فیبریل‌های آمیلوئیدی ضروری است. حضور گروه‌های OH در حلقه‌های فنولی سبب پیوند هیدروژنی بین بازدارنده و ساختارهای بتای موجود در فیبریل‌های آمیلوئیدی می‌شود. این پیوندهای هیدروژنی پایداری کمپلکس "بازدارنده-فیبریل" را افزایش می‌دهد و در نتیجه اثر مهاری پلی‌فنول را افزایش می‌دهد (۲۶، ۲۸).

انسولین از جمله پروتئین‌هایی است که توان بالایی برای تشکیل ساختارهای پلی‌میریزه دارد. انسولین اولین پروتئین خارج سلولی است که از نظر شیمیایی در تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی در انسان شناسایی شده است. طی بررسی‌های مختلف تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی انسولین در شرایط متفاوت دیده شده است، برای مثال انسولین قادر است در pH=۲/۲ و دمای ۵۷ درجه (pH=

اسیدی و دمای بالا) آمیلوئید تشکیل دهد (۲۹). به علاوه اگر با جدا شدن یون روی انسولین هگزامری به فرم مونومری فعال تبدیل شود تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی در pH=۷/۵ و دمای ۳۷ درجه مسلم می‌باشد. برای دستیابی به این هدف باید از جداکننده یون روی مانند اتیدیوم دی آمید ترا استیک اسید (EDTA) استفاده کرد (۳۰). هم‌چنین تحقیقاتی در زمینه آمیلوئیدی شدن انسولین و تایید این مطلب که زنجیره B در آمیلوئیدی شدن نقش کلیدی دارد صورت گرفته است و مشاهده شده که زنجیره B از انسولین گاوی به تنهایی قادر به تشکیل فیبریل در pH اسیدی است. در واقع تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی انسولین شامل ۲ فاز می‌باشد: فاز اول، فاز کند واکنش است که در طی آن زنجیره B انسولین آمیلوئید تشکیل می‌دهد و فاز دوم فاز سریع واکنش است که در طی آن سایر قسمت‌های انسولین فیبریل تشکیل می‌دهند (۲۹). هم‌چنین تجمع انسولین به صورت فیبریل‌های آمیلوئید در محل تزریق زیرپوستی انسولین و در استفاده از پمپ‌های انسولین در بیماران دیابتی مشاهده شده است که این تجمع باعث بروز پاسخ‌های ایمنی ناخواسته می‌شود. انسولین انسانی دارویی مصرف برای بیماران دیابتی است (۳۱).

تحقیقات مختلف نشان داده‌اند که فلاونوئیدها ساختارهای آمیلوئیدی را مختل می‌کنند و سمیت فیبریل‌های آمیلوئید را کاهش می‌دهند (۳۲). تاکنون عصاره‌ها و ترکیبات گیاهی مختلفی برای یافتن ترکیبات درمانی مؤثر در مهار شکل‌گیری و حذف فیبریل‌های آمیلوئید بررسی شده‌اند. به عنوان مثال، عصاره آبی ریشه گیاه *Withania somnifera*، خانواده Solanaceae، در شرایط *in vitro* تشکیل فیبریل‌های A $\beta$  را به صورت وابسته به مقدار مهار می‌کند (۱۸). عصاره آبی سیر دارای تأثیر بر هر دو فرایند فیبریلاسیون و دفیبریلاسیون است. این مهار وابسته به مقدار و زمان است (۱۹). یکی از مهم-

گلی باعث افزایش فسفوریلاسیون CREB و بهبود حافظه فضایی در موش‌ها می‌شود. اسید کلروژنیک و اسید فلورونیک اجزای مهم عصاره مریم گلی هستند که باعث کاهش فعالیت کولین استراز می‌شوند. مهارکننده‌های استیل کولین استراز تنها عوامل مورد تأیید سازمان غذا و دارو برای معالجه بیماری آلزایمر هستند. مطالعات قبلی نشان می‌دهند که ۱ میلی‌گرم عصاره مریم گلی باعث بهبود یادگیری و حافظه در موش‌هایی می‌شود که به آنها آمیلوئید بتا تزریق شده است (۳۸،۳۹). بر این اساس با توجه به این که عصاره مریم گلی حاوی مقادیر بالایی از فنول‌ها و فلاونوئیدها است، این عصاره به منظور بررسی اثرات احتمالی بر فیبریلاسیون و فیبریل‌زدایی آمیلوئید روی پروتئین انسولین گاوی به عنوان الگوی شناخته شده با استفاده از روش‌های متنوعی از قبیل آزمون THT، ANS، آزمون جذب قرمز کنگو و FE-SEM استفاده گردید. نتایج حاصل از بررسی میزان اسپکتروسکوپی فرابنفش - مرئی نشان داد که میزان جذب نوری نمونه‌های پروتئینی فاقد عصاره گیاه در مقایسه با نمونه‌های پروتئینی دارای عصاره گیاه خیلی بیشتر می‌باشد و نمودار جذب به سمت طول موج بالاتر رفته است. بالا بودن میزان جذب نوری نمونه‌های پروتئینی فاقد عصاره ممکن است ناشی از تجمع این پروتئین باشد اما با افزوده شدن عصاره گیاه به نمونه‌های پروتئینی میزان جذب کاهش یافت. این امر احتمالاً می‌تواند ناشی از اتصال ترکیبات موجود در آنها (مانند ترکیبات آنتی‌اکسیدانی) به نواحی خاصی از پروتئین در جهت ممانعت از تجمع پروتئین باشد، به طوری که عصاره مریم گلی میزان جذب در نسبت ۱:۱ را بیشتر کاهش داد. نتایج فلورسانس THT نیز در غیاب مریم گلی افزایش شدت فلورسانس را نشان داد که احتمالاً به دلیل نبود مریم گلی، فیبریلاسیون در پروتئین صورت گرفته و جذب فلورسانس افزایش یافته است. نسبت ۱:۱ از پروتئین و

ترین پلی‌فنول‌های چای سبز، (Epigallocatechin Gallate) EGCG است که در *in vivo* مانع شکل‌گیری فیبریل‌های hiAPP در مراحل اولیه فرآیند شکل‌گیری فیبریل‌ها می‌شود. در *in vitro* به جای تشکیل فیبریل‌های سمی آمیلوئید منجر به تشکیل تجمعات غیر سمی بی‌شکل می‌شود. این ترکیب تجمعات فیبریلی را در موش‌های غیر دیابتی کاهش می‌دهد (۳۳). عصاره گونه‌های *Sideritis scardica* و *Sideritis euboica* (از اعضای خانواده Lamiaceae و منبع غنی از فلاونوئیدها) در درمان اولیه شروع AD، تأثیرات قابل توجهی در کاهش مقدار تجمعات ندارد اما استفاده از این عصاره‌ها باعث کاهش قابل توجهی در اندازه فیبریل‌ها می‌شود. در مراحل پیشرفته AD، این عصاره‌ها منجر به کاهش در تعداد و اندازه پلاک‌ها می‌گردد (۳۴). عصاره برگ درخت *Ginkgo biloba* (EGb761) در *in vitro* مانع شکل‌گیری فیبریل‌های  $A\beta$  می‌شود (۳۵). عصاره متانول *Cassia tora* (خانواده Leguminosae) علاوه بر این که منجر به مهار فیبریلاسیون  $A\beta_{42}$  می‌شود، فیبریل‌های از پیش ساخته شده را نیز تجزیه می‌کند (۳۶).

اخیراً گزارش شده است که عصاره مریم گلی به خصوص برخی ترکیبات موجود در آن از جمله Thujone، Camphor و 1,8-Cineole دارای خاصیت ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی و ضد سرطان است (۱۷). بر مبنای یک بررسی گذشته‌نگر در مورد نقش تاریخی تعدادی از گیاهان اروپایی در بهبود شناخت و حافظه، نشان داده شده است که گیاه مریم گلی ممکن است به طور بالقوه برای بیماری آلزایمر درمان طبیعی فراهم کند (۳۷). CREB عامل رونویسی است که از مدت‌های طولانی عاملی مهم در اساس مولکولی یادگیری و حافظه به حساب می‌آید. آمیلوئید بتا، فسفوریلاسیون CREB و تکثیر سلولی در هیپوکامپ موش تراریخته را مهار می‌کند. مطالعات قبلی حاکی از آن است که عصاره مریم

بین رنگ قرمز کنگو با باقی مانده آروماتیک فنیل آلانین ۲۴ در انسولین برهم کنش ویژه صورت گرفته، تشکیل فیبریل را مهار می کند (۴۳). در این بررسی پیش بینی شد که حلقه های آروماتیک مریم گلی احتمالاً با باقی مانده های آروماتیک انسولین ارتباط برقرار می کنند و منجر به تثبیت ساختار انسولین بد تاخوردگی می شوند. کاهش شدت فلورسانس ANS در حضور انسولین (شکل ۳) ممکن است به دلیل تثبیت انسولین در کانفورماسیون خاص باشد، همان گونه که در بررسی انجام شده توسط امینی و همکاران (۴۰) پیش بینی شده که حلقه های آروماتیک اپی ژنین احتمالاً با باقی مانده های آروماتیک انسولین برهم کنش ایجاد می کنند و منجر به تثبیت ساختار انسولین باز شده (unfolded) می شوند. از طرف دیگر، اعتقاد بر این است که پیوندهای هیدروژنی، ساختار مرکزی همه فیبریل های آمیلوئیدی را تثبیت می کنند (۳۲). بر اساس گزارشی از پورات و همکاران، همه مهارکننده های پلی فنولی حداقل دارای دو حلقه فنول، یک اتصال دهنده و حداقل سه گروه OH روی حلقه های آروماتیک هستند. تأکید شده است که این عناصر ساختاری برای برهم کنش غیرکووالانسی با ساختارهای صفحات بتا ضروری هستند (۳۲). در مطالعه ای دیگر اثر کوئرتستین بر روند فیبریلاسیون انسولین توسط وانگ و همکاران (۱۳) بررسی شد. آنها مشاهده کردند که بخش هیدروفوبیک کوئرتستین می تواند به هسته هیدروفوبیک انسولین که در معرض اتصال قرار دارد متصل شود بنابراین تشکیل هسته انسولین را مهار کند. در نتیجه مطالعه فوق نشان داد که کوئرتستین تأثیر مهاری بر فیبریلاسیون انسولین و اثر بی ثبات کننده بر فیبریل های انسولین بالغ دارد. بنا بر نتایج به دست آمده در بررسی حاضر، عصاره مریم گلی نیز مانند کوئرتستین می تواند چنین اثری را بر مناطق هیدروفوب انسولین بگذارد و سطوح هیدروفوب در معرض را کاهش و تشکیل

عصاره، شدت فلورسانس را بیشتر کاهش داد. تیوفلاوین T در بین صفحات بتا قرار می گیرد و فلورسانس ساطع می کند پس کاهش شدت جذب فلورسانس نشان دهنده کاهش صفحات بتا است.

ANS به عنوان ردیاب فلورسانس می تواند به نواحی هیدروفوب پروتئین متصل شود. بررسی میزان شدت فلورسانس ANS در حضور و غیاب غلظت های متفاوت عصاره مریم گلی نشان داد که در حضور مریم گلی شدت فلورسانس ANS نسبت به نبود آن کاهش می یابد. این کاهش احتمالاً به دلیل ترکیبات موجود در عصاره (مانند ترکیبات آنتی اکسیدانی) از طریق اتصال و محافظت از مناطق هیدروفوب در مقابل حلال است که این عامل یعنی کاهش سطوح هیدروفوب در معرض از تشکیل تجمعات پروتئینی جلوگیری می کند. مطابق با منحنی اتصال THT که در شکل ۲ نشان داده شده است، در مطالعه حاضر تحت شرایط آزمایشگاهی، فیبریل های بالغ انسولین گاوی در ۱۰ روز تشکیل شد.

در حضور مریم گلی در نسبت مولی ۱:۱ دارو به پروتئین، تجمع اولیه انسولین قطع شد. اعتقاد بر این است که مرحله بحرانی قبل از تشکیل آمیلوئید، بد تاخوردگی ناقص ساختار پروتئین طبیعی است (۴۰). در این حالت، هسته هیدروفوبیک و باقی مانده های آروماتیک موجود در پروتئین ها در دسترس تر از اشکال طبیعی هستند بنابراین برهم کنش های استاکینگ و آب گریز بین باقی مانده ها تقویت می شود. مطرح شده است که برهم کنش های استاکینگ، سهمی پرانرژی و هم چنین جهت گیری و تمایل لازم برای فرآیند تجمع را فراهم می کند و از این رو باعث تسریع در فیبریلاسیون آمیلوئید می شود (۳۲). بنابراین، تثبیت حالت طبیعی توسط ترکیبات کوچک با داشتن حلقه های آروماتیک ممکن است مرز انرژی فعال سازی را افزایش دهد، در نتیجه سرعت تجمع را کند کند (۴۰-۴۲). به عنوان مثال، نشان داده شده است که

تجمعات پروتئینی را مهار کند. نتایج این بررسی نشان داد که مریم گلی تقریباً اثر بی‌ثبات کننده نیز بر فیبریل‌های انسولین بالغ دارد. این نتایج را می‌توان به قدرت آنتی‌اکسیدانی مریم گلی نسبت داد. مطالعات بی‌شماری نشان داده‌اند که بازده رسوب فیبریل پلی‌فنول‌ها مستقیماً با ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آنها ارتباط دارد (۴۴، ۱۳).

با توجه به این که پدیده تجمع پروتئین‌ها باعث ایجاد برخی از بیماری‌ها می‌گردد، مریم گلی احتمالاً به واسطه ترکیبات فلاوونوئیدی باعث تثبیت حالت مونومری می‌شود و از این طریق باعث به هم ریختن ساختار فیبریلی می‌شود. این گیاه به علت داشتن گروه‌های هیدروکسیل متصل به حلقه باعث باز شدن فیبریل‌های از پیش تشکیل شده می‌شود. پیشنهاد می‌شود در جلوگیری از تجمع پروتئین انسولین، تحقیقات بیشتری در زمینه ترکیبات موجود در گیاه مریم گلی صورت پذیرد و انجام آزمایشات در مدل‌های حیوانی و در شرایط *in vivo* صورت گیرد و پتانسیل دارویی آن برای استفاده انسان برای پیشگیری و درمان تجمع‌های پروتئینی محرز شود. نتایج کار حاضر نشان داد که با تخلیص و جداسازی ترکیبات مؤثر گیاه مریم گلی و اثر آن بر فیبریل‌های آمیلوئیدی، احتمالاً می‌توان از این گیاه برای درمان بیماری‌های آمیلوئیدی استفاده کرد.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه لرستان که با حمایت مالی امکان انجام این تحقیق را فراهم آوردند تقدیر و تشکر به عمل می‌آورند.

## References

1. Dobson CM. Protein folding and misfolding. *Nature*. 2003;426(6968):884-890.
2. Stefani M. Protein misfolding and aggregation: new examples in medicine and biology of the dark side of the protein world. *Biochimica et biophysica acta (BBA)-Molecular basis of disease*. 2004;1739(1):5-25.
3. Krebs MR, Bromley EH, Donald AM. The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications. *Journal of structural biology*. 2005;149(1):30-37.
4. Ratha BN, Ghosh A, Brender JR, Gayen N, Ilyas H, Neeraja C, et al. Inhibition of insulin amyloid fibrillation by a novel amphipathic heptapeptide mechanistic details studied by spectroscopy in combination with microscopy. *Journal of biological chemistry*. 2016;291(45):23545-23556.
5. Hua Q. Insulin: a small protein with a long journey. *Protein & cell*. 2010;1(6):537-551.
6. Ottensmeyer F, Beniac DR, Luo RZ-T, Yip CC. Mechanism of transmembrane signaling: insulin binding and the insulin receptor. *Biochemistry*. 2000;39(40):12103-12112.
7. Dunn MF. Zinc-ligand interactions modulate assembly and stability of the insulin hexamer—a review. *Biometals*. 2005;18(4):295-303.
8. Marglin B, Merrifield R. The synthesis of bovine insulin by the solid phase method. *Journal of the american chemical society*. 1966;88(21):5051-5052.
9. Sanger F, Tuppy H. The amino-acid sequence in the phenylalanyl chain of insulin. 1. The identification of lower peptides from partial hydrolysates. *Biochemical Journal*. 1951;49(4):463.
10. Nielsen L, Frokjaer S, Brange J, Uversky VN, Fink AL. Probing the mechanism of insulin fibril formation with insulin mutants. *Biochemistry*. 2001;40(28):8397-8409.
11. Richards JP, Stickelmeyer MP, Flora DB, Chance RE, Frank BH, DeFelippis MR. Self-association properties of monomeric insulin analogs under formulation conditions. *Pharmaceutical research*. 1998;15(9):1434-1441.
12. Patel P, Parmar K, Das M. Inhibition of insulin amyloid fibrillation by Morin hydrate. *International journal of biological macromolecules*. 2018;108:225-239.
13. Wang J-B, Wang Y-M, Zeng C-M. Quercetin inhibits amyloid fibrillation of bovine insulin and destabilizes preformed fibrils. *Biochemical and biophysical research communications*. 2011;415(4):675-679.
14. Lee VM-Y. Amyloid binding ligands as Alzheimer's disease therapies. *Neurobiology of aging*. 2002 ;23(6):1039-1042.
15. Lorenzo A, Yankner BA. Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. *Proceedings of the national academy of sciences*. 1994;91(25):12243-12247.
16. Poli G, Ponti W, Carcassola G, Ceciliani F, Colombo L, Dall'Ara P, et al. In vitro

- evaluation of the anti-prionic activity of newly synthesized Congo red derivatives. *Arzneimittelforschung*. 2003;53(12):875-888.
17. Ahmadi L. Study of chemical composition of essential oil from sage during growth period. *Iranian journal of medicinal and aromatic plants research*. 1999; 4(1) 33-52. (In persian)
  18. Kumar S, Harris RJ, Seal CJ, Okello EJ. An aqueous extract of *Withania somnifera* root inhibits amyloid  $\beta$  fibril formation in vitro. *Phytotherapy research*. 2012; 26(1):113-117.
  19. Necula M, Kayed R, Milton S, Glabe CG. Small molecule inhibitors of aggregation indicate that amyloid  $\beta$  oligomerization and fibrillization pathways are independent and distinct. *Journal of biological chemistry*. 2007;282(14):10311-10324.
  20. Gupta VB, Indi S, Rao K. Garlic extract exhibits anti-amyloidogenic activity on amyloid-beta fibrillogenesis: relevance to Alzheimer's disease. *Phytotherapy research*. 2009;23(1):111-115.
  21. Howie AJ, Brewer DB. Optical properties of amyloid stained by Congo red: history and mechanisms. *Micron*. 2009;40(3):285-301.
  22. Nilsson MR. Techniques to study amyloid fibril formation in vitro. *Methods*. 2004;34(1):151-160.
  23. Bolognesi B, Kumita JR, Barros TP, Esbjorner EK, Luheshi LM, Crowther DC, et al. ANS binding reveals common features of cytotoxic amyloid species. *ACS chemical biology*. 2010;5(8):735-740.
  24. Sunde M, Serpell LC, Bartlam M, Fraser PE, Pepys MB, Blake CC. Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. *Journal of molecular biology*. 1997;273(3):729-739.
  25. Dobson CM. The structural basis of protein folding and its links with human disease. *Philosophical transactions of the royal society of london series B: Biological sciences*. 2001;356(1406):133-145.
  26. Bilej M. Mucosal immunity in invertebrates. In: Mestecky J, Strober W, Russell m, Cheroutre H, Lambrecht BN, Kelsall B, editors. *Mucosal immunology*, 4<sup>th</sup> edition, Elsevier: 2015.p. 135-144.
  27. Feng S, Song X-H, Zeng C-M. Inhibition of amyloid fibrillation of lysozyme by phenolic compounds involves quinoprotein formation. *FEBS letters*. 2012;586(22):3951-3955.
  28. Bahramikia S, Yazdanparast R, Gheysarzadeh A. Syntheses and structure-activity relationships of seven Manganese-Salen derivatives as anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing agents against hen egg-white lysozyme aggregation. *Chemical biology & drug design*. 2012;80(2):227-236.
  29. Manno M, Craparo EF, Podestà A, Bulone D, Carrotta R, Martorana V, et al. Kinetics of different processes in human insulin amyloid formation. *Journal of molecular biology*. 2007;366(1):258-274.
  30. Quinn R, Andrade J. Minimizing the aggregation of neutral insulin solutions. *Journal of pharmaceutical sciences*. 1983;72(12):1472-1473.

31. Herrmann B, Kasser C, Keuthage W, Huptas M, Dette H, Klute A. Comparison of insulin aspart vs. regular human insulin with or without insulin detemir concerning adipozytokines and metabolic effects in patients with type 2 diabetes mellitus. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes*. 2013;121(04):210-213.
32. Porat Y, Abramowitz A, Gazit E. Inhibition of amyloid fibril formation by polyphenols: structural similarity and aromatic interactions as a common inhibition mechanism. *Chemical biology & drug design*. 2006;67(1):27-37.
33. Franko A, Camargo DCR, Böddrich A, Garg D, Camargo AR, Rathkolb B, et al. Epigallocatechin gallate (EGCG) reduces the intensity of pancreatic amyloid fibrils in human islet amyloid polypeptide (hIAPP) transgenic mice. *Scientific reports*. 2018;8(1):1116.
34. Hofrichter J, Krohn M, Schumacher T, Lange C, Feistel B, Walbroel B, et al. Sideritis spp. extracts enhance memory and learning in Alzheimer's  $\beta$ -amyloidosis mouse models and aged C57Bl/6 mice. *Journal of Alzheimer's disease*. 2016;53(3):967-980.
35. Luo Y, Smith JV, Paramasivam V, Burdick A, Curry KJ, Buford JP, et al. Inhibition of amyloid- $\beta$  aggregation and caspase-3 activation by the *Ginkgo biloba* extract EGb761. *Proceedings of the national academy of sciences*. 2002;99(19):12197-12202.
36. Chethana K, Senol FS, Orhan IE, Anilakumar K, Keri RS. *Cassia tora* Linn.: A boon to Alzheimer's disease for its anti-amyloidogenic and cholinergic activities. *Phytomedicine*. 2017;33:43-52.
37. Iuvone T, De Filippis D, Esposito G, D'Amico A, Izzo AA. The spice sage and its active ingredient rosmarinic acid protect PC12 cells from amyloid- $\beta$  peptide-induced neurotoxicity. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2006;317(3):1143-1149.
38. Akhondzadeh S, Noroozian M, Mohammadi M, Ohadinia S, Jamshidi A, Khani M. *Salvia officinalis* extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a double blind, randomized and placebo-controlled trial. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*. 2003;28(1):53-59.
39. Mohseni I, Peeri M, Azarbayjani MA. Dietary supplementation with *Salvia officinalis* L. and aerobic training attenuates memory deficits via the CREB-BDNF pathway in amyloid beta-injected rats. *Journal of medicinal plants*. 2020;1(73):119-132.
40. 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. *The FEBS journal*. 2007;274(24):6415-6425.
41. Chiti F, Webster P, Taddei N, Clark A, Stefani M, Ramponi G, et al. Designing conditions for in vitro formation of amyloid protofilaments and fibrils. *Proceedings of*

- the National Academy of Sciences. 1999;96(7):3590-3594.
42. Pickhardt M, Bergen Mv, Gazova Z, Hascher A, Biernat J, Mandelkow E-M, et al. Screening for inhibitors of tau polymerization. *Current alzheimer research*. 2005;2(2):219-226.
43. Turnell WG, Finch JT. Binding of the dye congo red to the amyloid protein pig insulin reveals a novel homology amongst amyloid-forming peptide sequences. *Journal of molecular biology*. 1992;227(4):1205-1223.
44. He J, Xing Y-F, Huang B, Zhang Y-Z, Zeng C-M. Tea catechins induce the conversion of preformed lysozyme amyloid fibrils to amorphous aggregates. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2009;57(23):11391-11396.

## Anti-amyloidogenic and disaggregating effects of *Salvia officinalis* in vitro: a strategy to reduce the insulin amyloid fibrils due to repeated subcutaneous injections in diabetic patients

Hatamvand V<sup>1</sup>, Bahramika S<sup>2\*</sup>, Bardineshin F<sup>1</sup>, Shohani P<sup>1</sup>

1. MSc of Biochemistry, Department of Biology, Faculty of Science, Lorestan University, Khorramabad, Iran

2. Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Lorestan University, Khorramabad, Iran, bahramikia.s@lu.ac.ir

Received: 22 Jun 2020

Accepted: 10 Aug 2020

### Abstract

**Background:** Recently, there has been growing efforts to elucidate the molecular mechanism of amyloid formation and investigating effective compounds for inhibiting of amyloid structures. Investigation of the fibrillation process through its induction and inhibition using specific compounds such as aromatic derivatives provide useful information for stabilizing the protein structure. In the present study, the in vitro anti-amyloidogenic and destabilizing effects of *Salvia officinalis* were investigated using bovine insulin as a model protein.

**Materials and Methods:** To induce fibrillation, the bovine pancreatic insulin was incubated for 10 days in 50 mM glycine buffer at pH = 2.2 at 57° C. Amyloid formation was examined using CR absorption spectroscopy, ANS and THT fluorescence and Field-emission Scanning Electron Microscope (FE-SEM) methods. Then, the effect of different concentrations of *Salvia officinalis* extract (ratios of 0.1, 1, and 5 extracts to 1 protein) on inhibition of fibrillation and destabilization of pre-formed insulin fibrils was investigated.

**Results:** Results indicated a significant decrease in the accumulation of amyloid fibrils in drug-incubated samples compared to control. It also found that *Salvia officinalis* extract in all concentrations, especially in the 1: 1 ratio of drug to protein, has a strong inhibitory effect on fibrillation and defibrillation of insulin protein.

**Conclusion:** The results of this study showed that by purification and isolation of effective compounds of *Salvia officinalis* and its effect on amyloid fibrils, this plant could probably be used to treat amyloid diseases.

**Keywords:** Bovine insulin; *Salvia officinalis*; Amyloid fibrils

\***Citation:** Hatamvand V, Bahramika S, Bardineshin F, Shohani P. Anti-amyloidogenic and disaggregating effects of *Salvia officinalis* in vitro: a strategy to reduce the insulin amyloid fibrils due to repeated subcutaneous injections in diabetic patients. *Yafte*. 2020; 22(3):68-83.