



بررسی اثر مهاری سیلیمارین بر فرایند فیبریلایسیون پروتئین لیزوزیم سفیده تخم مرغ

محسن مهدوی مهر^۱، علی اکبر مراتان^{۱*}

^۱ دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی علوم پایه زنجان، زنجان، ایران

* Email: a.meratan@iasbs.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۲/۰۴

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۱/۰۸

چکیده

بسیاری از مطالعات انجام شده در سال‌های اخیر نشان می‌دهد که ترکیبات حلقوی پلی‌فنلی که به وفور در بسیاری از گیاهان وجود دارند قادر به مهار تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی هستند. با اینحال مکانیسم دقیقی که بدان وسیله این ترکیبات طبیعی روند تشکیل تجمعات آمیلوئیدی را تحت تاثیر قرار می‌دهند بطور کامل شناسائی نشده است. گیاه خارمریم (*Silybum Marianum*) از جمله گیاهان دارویی می‌باشد که دارای خواص درمانی بسیار زیادی است. عصاره حاصل از دانه این گیاه که تحت عنوان سیلیمارین نامیده می‌شود غنی از ترکیبات فلاونولیگنانی و فلاونوئیدی است. در این مطالعه، با استفاده از طیف وسیعی از تکنیک‌ها شامل نشر فلورسانس نشانگرهای تیوفلاوین T و Nile red، سنجش میزان جذب قرمز کنگو، طیف سنجی دورنگ نمایی دورانی، و میکروسکوپ نیروی اتمی، توانایی سیلیمارین در مهار تشکیل تجمعات آمیلوئیدی پروتئین لیزوزیم سفیده تخم مرغ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج ما نشان داد که سیلیمارین، بطور وابسته به غلظت، باعث مهار تشکیل تجمعات آمیلوئیدی می‌شود. نتایج حاصل از میکروسکوپ نیروی اتمی نیز دلالت بر تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی در نمونه‌های کنترل داشت، حال آنکه نمونه‌های پروتئینی انکوبه شده در حضور سیلیمارین فاقد فیبریل‌های آمیلوئیدی بوده و مقادیر جزئی از تجمعات پروتئینی بدون شکل در آنها مشاهده شد. براساس نتایج حاصل پیشنهاد می‌شود که ممانعت از برهمکنش‌های آبگریز بین گونه‌های پروتئینی بطور نسبی باز شده، مکانیسمی است که بدان وسیله سیلیمارین باعث مهار تشکیل تجمعات آمیلوئیدی در پروتئین لیزوزیم می‌شود. با اینحال مطالعات و آزمایشات بیشتری برای تعیین دقیق مکانیسم عمل سیلیمارین مورد نیاز می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: آمیلوئید، پلی فنل، تجمع پروتئینی، خارمریم، سیلیمارین، میکروسکوپ نیروی اتمی.

مقدمه

بیماری‌های تحلیل برنده سیستم عصبی مانند بیماری

آلزایمر، پارکینسون، هانتینگتون و همچنین بیماری‌های

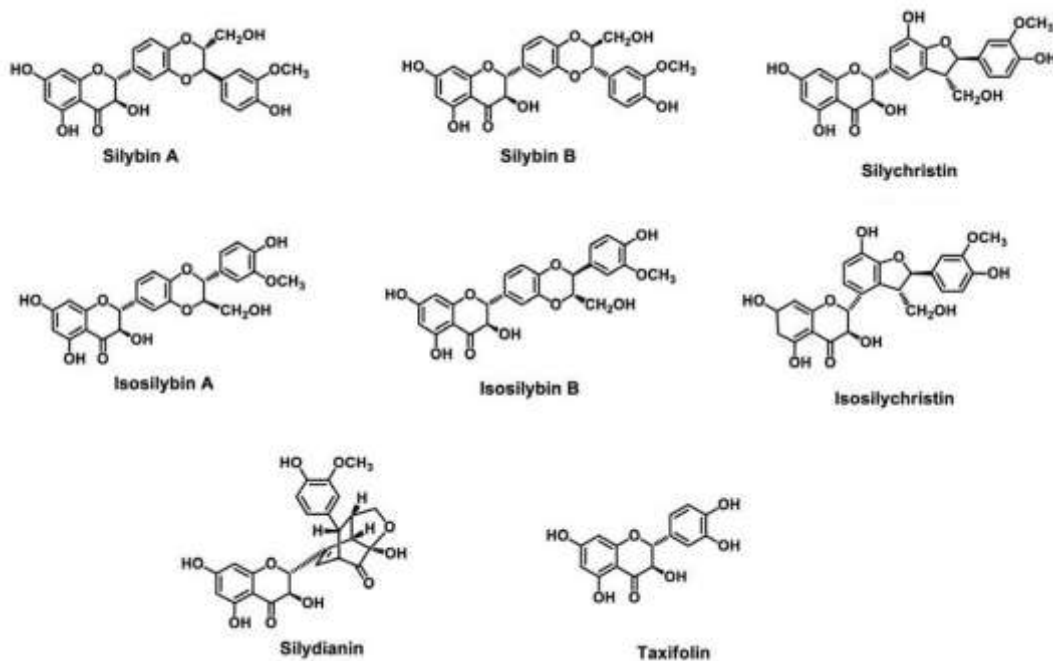
محیطی مانند آمیلوئیدوزیس سیستمیک و دیابت نوع ۲

امروزه مشخص شده است که تاخوردگی ناصحیح

و تجمع پروتئینی ارتباط مستقیمی با تعداد زیادی از

[۸،۱۰،۱۱]. در اين رابطه گزارشات زيادى در ارتباط با اثرات موثر بسيارى از ملكول‌هاى طبيعى كوچك، و بويژه پلى فنل‌هاى طبيعى، در مهار تجمعات پروتئينى وجود دارد [۱۱،۱۲،۱۸،۲۶،۲۸]. همچنين مطالعات قبلى ما نيز نشان دهنده اثرات مهاركنندگى پلى فنل‌ها در رابطه با فيبريلاسيون آميلوئيد بتا (قطعه ۲۵-۳۵) و همچنين پروتئين ليزوزيم سفيده تخم مرغ مى‌باشد [۱۶،۳۳]. پروتئين ليزوزيم سفيده تخم مرغ از جمله پروتئين‌هاى است كه بطور كامل ساختار آن مورد مطالعه قرار گرفته و براحتى در شرايط آزمايشگاهى قادر به تشكيل تجمعات آميلوئيدى است [۲۲]. از آنجائيكه ليزوزيم سفيده تخم مرغ داراى شباهت ساختارى زيادى با ليزوزيم انساني، كه در بيمارى ژنتيكي غيرنورونى آميلوئيدوزير سيستميك نقش دارد، مى‌باشد و با علم به اين مطلب كه تجمعات پروتئينى (اعم از بيماريزا و غيربیماريزا) قادر به اعمال سميت سلولى هستند، پروتئين ليزوزيم سفيده تخم مرغ را بعنوان يك مدل مناسب در مطالعات مربوط به مهار تشكيل تجمعات پروتئينى مطرح مى‌كند [۵،۲۶،۲۹]. تركيب سيليمارين كه در اين مطالعه مورد استفاده قرار گرفته است، عصاره استاندارد استخراج شده از دانه‌هاى گياه خارمریم (*Silybum marianum*) مى‌باشد كه حاوى هفت نوع فلاونولیگنان شامل (سيليبين نوع A، سيليبين نوع B، ايزوسيليبين نوع A، ايزوسيليبين نوع B، سيليكريستين، ايزوسيليكريستين و سيليديانين) و يك فلاونويد به نام تاكسيپولين مى‌باشد [۳۱]. ساختار شيميايى و نام تركيبات موجود در سيليمارين در شكل ۱ نشان داده شده است.

دارد [۲]. مشخصه بارز تمامى اين بيمارى‌ها تاخوردگى ناصحيح و تجمع انواع مختلفى از پروتئين‌ها و پپتيدها به شكل ساختارهاى رشته‌اى به نام فيبريل‌هاى آميلوئيدى مى‌باشد [۱۴،۳۶]. با اينحال، تجمع پروتئينى يك فرايند پيچيده و شامل تشكيل يكسرى حدواسط‌هاى اليگومرى كوچك مى‌باشد كه بتدریج اين حدواسط‌ها به يكدیگر متصل و پروتوفیبریل‌ها و در نهايت فيبريل‌هاى آميلوئيدى را ايجاد مى‌نمايند [۱۴،۳۶]. مطالعات انجام شده در سال‌هاى اخير نشان مى‌دهد كه ناپايدار شدن ساختار فضائى طبيعى پروتئين‌ها، كه منجر به تجمع آنها مى‌شود، يك فاکتور مهم در نقص عملكردى و مرگ سلول‌هاى نورونى در بسيارى از بيمارى‌هاى مرتبط با تجمع پروتئينى ميباشد [۲،۵،۲۰]. بنا بر اين مهار اين فرايند مى‌تواند به عنوان يك روش درمانى در بهبود بيمارى‌هاى مرتبط با آميلوئيد مورد استفاده قرار گيرد. مهمترين راهكارهاى مهار تجمعات پروتئينى و تشكيل فيبريل‌هاى آميلوئيدى عبارتند از: پايدارسازى حالت تاخوردگى طبيعى پروتئينها، محدود كردن جمعيت پروتئين مونومر، مهار تشكيل فيبريل‌هاى آميلوئيدى يا پاك سازى تجمعات پروتئينى، و در نهايت هدايت گونه‌هاى آميلوئيدى به سمت مسيرهاىي كه منجر به تشكيل تجمعات پروتئينى فاقد شكل و غيرسمى مى‌شوند [۲،۷،۱۹،۳۵]. در اين بين، بسيارى از روش‌هاى درمانى مبتنى بر مهار فرايند تشكيل تجمعات آميلوئيدى يا پاك سازى آنها مى‌باشد [۲،۱۵،۲۳،۳۴،۳۷]. بهمين دليل مطالعات زيادى در جهت شناسايى تركيباتى با خاصيت مهارى و بويژه در ارتباط با پروتئين‌هاى درگير در بيمارى‌هاى تحليل برندهى سيستم عصبى انجام شده است



شکل ۱- ساختار شیمیایی و نام ترکیبات موجود در سیلیمارین.

مواد و روش‌ها

مواد مورد نیاز

پروتئین لیزوزیم سفیده تخم مرغ، تیوفلاوین T، Nile red، قرمز کنگو و سیلیمارین از شرکت سیگما خریداری شد. سایر مواد مورد نیاز از شرکت مرک آلمان خریداری شدند.

القاء تشکیل تجمعات آمیلوئیدی در پروتئین لیزوزیم سفیده

تخم مرغ

بدین منظور محلول لیزوزیم سفیده تخم مرغ در غلظت نهایی ۵۰ میکرومولار در بافر گلیسین (۵۰ میلی مولار و pH ۲/۲)، در حضور و عدم حضور غلظت‌های مختلف از سیلیمارین (۰، ۲۵، ۵۰، و ۱۰۰ میکرومولار) تهیه شد. سپس ویال‌های حاوی نمونه‌های پروتئینی به مدت ۷ روز در دمای ۵۷ درجه سانتی گراد و بر روی استیر که با سرعت ۵۰۰ دور بر دقیقه در حال چرخش بود انکوبه شد. غلظت پروتئین با استفاده از ضریب خاموشی $2/63 \text{ mg.ml}^{-1}.\text{cm}^{-1}$

سیلیمارین دارای خواص درمانی بسیار زیادی می‌باشد که بارزترین آن درمان ناهنجاری‌های کبدی است. همچنین این ترکیب بدلیل خواص آنتی‌اکسیدانی خود در کاهش استرس اکسیداتیو در سلول‌های کبدی، ماکروفاژها و انواع سلول‌های نورونی نیز موثر است [۳۱]. علاوه براین، مطالعات انجام شده در سال‌های اخیر توانایی سیلیمارین در درمان انواع مختلفی از سرطانها را نیز نشان داده است [۳۲]. در رابطه با بیماری‌های تحلیل برنده سیستم عصبی، آقای موراتا و همکاران نشان دادند که سیلیمارین قادر به مهار تجمع پپتید آمیلوئید بتا بوده و سمیت تجمعات پروتئینی حاصل از آن را بر روی سلول‌های PC12 نیز کاهش می‌دهد [۲۷]. با اینحال گزارشی مبنی بر مکانیسمی که بدان وسیله سیلیمارین مانع تشکیل تجمعات آمیلوئیدی میشود وجود ندارد. بنابراین در این مطالعه توانایی سیلیمارین در مهار تشکیل تجمعات آمیلوئیدی پروتئین لیزوزیم سفیده تخم مرغ مورد بررسی قرار گرفت.

تعيين گرديد [۱۷].

نهایی Nile red ۱۰ میکرومولار می باشد. تمامی آزمایشات فلورسانس با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر Cary Eclipse VARIAN انجام شد.

سنجش برانگیختگی فلورسانس نشانگر تیوفلاوین T

به منظور بررسی کینتیک تشکیل تجمعات آمیلوئیدی در پروتئین لیزوزیم سفیده تخم مرغ، مقدار ۴۰ میکرولیتر از نمونه‌ی پروتئینی انکوبه شده در حضور و عدم حضور سیلمارین با ۹۶۰ میکرولیتر محلول ۱۰ میکرومولار تیوفلاوین T (تهیه شده در بافر فسفات سدیم ۲۵ میلی مولار و pH برابر ۶/۵) مخلوط گردیده و به مدت ۵ دقیقه انکوبه شد. در این روش غلظت نهایی پروتئین ۲ میکرومولار می باشد. طول موج تحریک ۴۴۰ نانومتر و طیف نشری پروتئین در محدوده ۶۰۰-۴۵۰ نانومتر اندازه گیری شد. پهنای دريچه برای طول موج تحریک و نشر به ترتیب ۵ و ۱۰ نانومتر انتخاب شد. افزایش تدریجی نشر فلورسانس نمونه های انکوبه شده بیانگر تشکیل تجمعات آمیلوئیدی می باشد.

سنجش میزان جذب قرمز کنگو

بدین منظور محلول قرمز کنگو در غلظت نهایی ۷ میلی گرم بر میلی لیتر در بافر کنگو (بافر ۵ میلی مولار فسفات پتاسیم، ۱۵۰ میلی مولار کلرید سدیم و pH برابر ۷/۴) تهیه شد. سپس مقدار ۵۰ میکرولیتر از محلول پروتئینی انکوبه شده در حضور و عدم حضور سیلمارین به ۹۵۰ میکرولیتر از محلول قرمز کنگو (در غلظت نهایی ۲۰ میکرومولار) اضافه شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه شد. سپس طیف جذبی نمونه ها در محدوده ۶۰۰-۴۰۰ نانومتر اندازه گیری شد. میزان اتصال کنگو به فیبریل های آمیلوئیدی بطور کمی و با استفاده از معادله زیر محاسبه گردید:

$$\text{Congo red}_{\text{bound}} = (A_{540}/25295) - (A_{477}/46306)$$

در این معادله مقدار قرمز کنگو متصل شده به آمیلوئید بر حسب میکرومولار می باشد و ارقام ۲۵۲۹۵ و ۴۶۳۰۶ به ترتیب ضریب خاموشی قرمز کنگو متصل به آمیلوئید و قرمز کنگو آزاد می باشند [۲۱].

بررسی تغییرات ساختاری تجمعات آمیلوئیدی با استفاده از طیف سنجی دورنگ نمایی دورانی

برای اندازه گیری طیف دورنگ نمایی دورانی در محدوده فرابنفش دور، از غلظت ۱۰ میکرومولار لیزوزیم و کووت با ضخامت ۰/۰۵ سانتی متر استفاده شد. بدین منظور نمونه های پروتئینی انکوبه شده در حضور و عدم حضور سیلمارین به مدت ۷ روز

سنجش برانگیختگی فلورسانس نشانگر Nile red

به منظور بررسی میزان آبگریزی حدواسط های مختلف پروتئینی از نشر فلورسانس نشانگر Nile red استفاده شد. بدین منظور مقدار ۹۴۰ میکرولیتر بافر گلايسين ۵۰ میلی مولار (pH ۲/۲) با ۱۰ میکرولیتر محلول Nile red (غلظت ۱ میلی مولار تهیه شده در استونیتریل) مخلوط شده و سپس مقدار ۵۰ میکرولیتر محلول پروتئینی انکوبه شده در حضور و عدم حضور سیلمارین به آن اضافه گردید. طول موج تحریک ۵۳۰ نانومتر و طیف نشری در محدوده ۸۰۰-۵۴۰ نانومتر اندازه گیری شد. پهنای دريچه برای طول موج تحریک و نشر به ترتیب ۵ و ۱۰ نانومتر انتخاب شد. در این روش غلظت نهایی پروتئین ۲/۵ میکرومولار و غلظت

Ara-Reseach Co، ساخت کشور ایران تهیه شده‌اند.

آنالیز آماری

تمامی آزمایشات در سه زمان متفاوت و با نمونه‌های پروتئینی مختلف انجام شد. همچنین هر آزمایش بین ۳ تا ۵ بار تکرار گردید. نتایج نهایی حاصل نیز به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شده است.

نتایج و بحث

سیلیمارین به عصاره دانه گیاه خارمریم اطلاق می‌شود که حاوی ۷ فلاونولیگنان و یک فلاونوئید می‌باشد [۳۱]. سیلیمارین خواص درمانی بسیار زیادی دارد و بطور رایج در درمان بیماری‌های کبدی و دیابت استفاده می‌شود. همچنین این ترکیب دارویی دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی بوده و در درمان سلولهای سرطانی نیز استفاده می‌شود [۳۱، ۳۲]. علاوه بر این، گزارشات مبنی بر خواص آنتی‌آمیلوئیدوزنیک برخی از ترکیبات موجود در سیلیمارین نیز ارائه شده است [۶، ۳۸]. با اینحال گزارشی در مورد اثرات احتمالی عصاره کامل گیاه خارمریم (سیلیمارین) بر فرایند تجمع پروتئینی وجود ندارد. در این مطالعه با استفاده از طیف وسیعی از تکنیک‌ها شامل طیف سنجی فلورسانس (تیوفلاوین T و Nile red)، طیف سنجی جذبی (جذب قرمز کنگو و جذب در ناحیه ۲۸۰ نانومتر)، طیف سنجی دورنگ نمایی دورانی، و میکروسکوپ نیروی اتمی، توانایی سیلیمارین در مهار تشکیل تجمعات آمیلوئیدی پروتئین لیروزیم سفیده ی تخم مرغ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که سیلیمارین بطور

برداشته شده و تغییرات ساختار دوم آنها مورد بررسی قرار گرفت. طیف‌های دورنگ نمایی دورانی نمونه‌های پروتئینی با استفاده از دستگاه اسپکتروپلاریمتر AVIV 215 به دست آمدند. میزان محتوای ماریچ آلفا و صفحات بتا نمونه‌های پروتئینی با استفاده از نرم افزار CDNN محاسبه گردید.

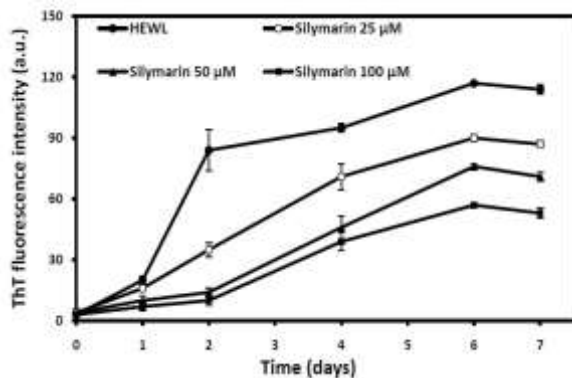
تعیین مقدار کمی تجمعات آمیلوئیدی

به منظور بررسی کمی فیبریل‌های آمیلوئیدی تشکیل شده در عدم حضور و حضور غلظت‌های مختلف سیلیمارین، نمونه‌های انکوبه شده به مدت ۷ روز تحت شرایط آمیلوئیدوزنیک به مدت ۱ ساعت در ۱۶۰۰۰ دور بر دقیقه و دمای ۴ درجه سانتیگراد شده و سپس میزان جذب سوپرناتانت حاصل (که حاوی نمونه‌های مونومری و پیش فیبریلی می‌باشد) در ۲۸۰ نانومتر قرائت شده و غلظت آنها محاسبه گردید. تفاضل غلظت پروتئینی موجود در سوپرناتانت و غلظت اولیه پروتئینی (۵۰ میکرومولار) برابر با مقدار آمیلوئید موجود در محیط می‌باشد [۲۴].

آنالیز میکروسکوپ نیروی اتمی

به منظور بررسی مورفولوژی تجمعات پروتئینی حاصل، نمونه‌های پروتئینی انکوبه شده به مدت ۷ روز در عدم حضور و حضور غلظت ۱۰۰ میکرومولار سیلیمارین برداشته شده و به میزان ۱۰ بار توسط بافر گلیسین (۵۰ میلی مولار و pH ۲/۲) رقیق شد. سپس مقدار ۱۰ میکرولیتر از آن بر روی صفحات میکا منتقل و به مدت ۵ دقیقه در معرض جریان هوا قرار داده شدند. در نهایت نمونه‌ها در زیر میکروسکوپ نیروی اتمی مشاهده و بررسی شد. تصاویر میکروسکوپ نیروی اتمی توسط دستگاه ARA-AFM، شرکت

نمونه‌های پروتئینی انکوبه شده در حضور غلظت ۱۰۰ میکرومولار سیلیمارین در حدود ۰.۵٪ نشر فلورسانس تیوفلاوین T کمتری نسبت به نمونه‌های کنترل داشتند (شکل ۲). آزمایشات کنترل نشان داد که غلظت‌های مختلف سیلیمارین بخودی خود تاثیری بر میزان نشر تیوفلاوین T ندارند (نتایج نشان داده نشده است). در نهایت می‌توان اینگونه نتیجه‌گیری کرد که سیلیمارین بطور وابسته به غلظت باعث مهار روند تشکیل تجمعات آمیلوئیدی در پروتئین لیزوزیم می‌شود.



شکل ۲- کینتیک تشکیل تجمعات آمیلوئیدی با استفاده از نشر فلورسانس نشانگر تیوفلاوین T. نمودار براساس میزان بیشینه نشر نشانگر تیوفلاوین T در طول موج ۴۸۵ نانومتر رسم شده است. نتایج حاصل میانگین سه آزمایش مستقل می‌باشد.

در رابطه با فرایند تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی، مطالعات قبلی ما نشان می‌دهد که بازشدن نسبی ساختار پروتئینی و انتقال سطوح آب گریز پروتئین به سطح از عوامل اولیه و اصلی در پیشبرد فرایند تجمع پروتئین لیزوزیم می‌باشد [۲۴]. نشانگر Nile red یک ملکول آبگریز می‌باشد که اتصال آن به سطوح آبگریز با افزایش میزان نشر فلورسانس آن و یک انتقال به سمت طول موج‌های کوتاهتر (blue shift) همراه است و بطور رایج در بررسی تغییرات ساختار سوم پروتئین‌ها در طی روند تجمع پروتئینی استفاده می‌شود [۲۴]. بنابراین، به منظور بررسی اثر سیلیمارین بر

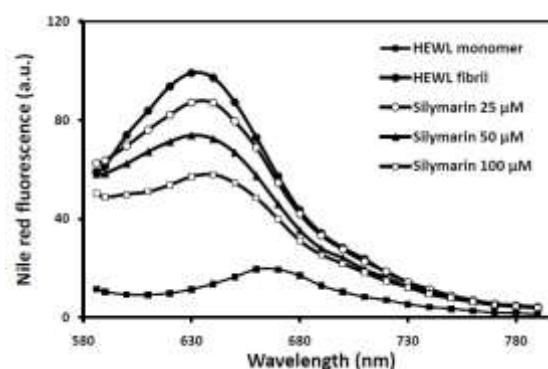
موثری باعث کاهش تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی در پروتئین لیزوزیم می‌شود.

مهار تشکیل تجمعات آمیلوئیدی پروتئین لیزوزیم توسط سیلیمارین

به منظور بررسی اثرات ضد آمیلوئیدی سیلیمارین، سرعت تشکیل تجمعات آمیلوئیدی پروتئین لیزوزیم در عدم حضور و حضور غلظت‌های مختلف سیلیمارین (۰، ۲۵، ۵۰، و ۱۰۰ میکرومولار) و با استفاده از میزان نشر نشانگر تیوفلاوین T مورد بررسی قرار گرفت. مطالعات قبلی ما نشان داد که کینتیک تشکیل تجمعات آمیلوئیدی در پروتئین لیزوزیم، با یک فاز تاخیری (زمان مورد نیاز برای بازشدن نسبی پروتئین که لازمه تشکیل تجمعات آمیلوئیدی است) همراه می‌باشد [۲۴]. همانطور که در شکل ۲ نشان داده شده است، قرارگرفتن پروتئین لیزوزیم در شرایط آمیلوئیدوژنیک منجر به افزایش شدید در میزان نشر نشانگر تیوفلاوین T، پس از فاز تاخیری حدود ۱ روز، گردید و میزان آن پس از ۶ روز به بیشینه خود رسید که موید تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی می‌باشد. با این حال، در مورد نمونه‌های پروتئینی انکوبه شده یا سیلیمارین یک کاهش قابل توجه و وابسته به غلظت در میزان نشر تیوفلاوین T مشاهده شد که بیانگر مهار تشکیل تجمعات آمیلوئیدی در نمونه‌های انکوبه شده با سیلیمارین می‌باشد (شکل ۲). نتایج حاصل نشان می‌دهد که فاز تاخیری کینتیک تشکیل تجمعات آمیلوئیدی از حدود ۱ روز در نمونه‌های پروتئینی فاقد سیلیمارین به ۲ روز در نمونه‌های دارای غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار سیلیمارین افزایش یافته است. علاوه براین، شدت نشر فلورسانس نشانگر تیوفلاوین T نیز بطور وابسته به غلظت کاهش یافت بگونه‌ای که

آمیلوئیدی در پروتئین لیزوزیم می‌باشد [۲۴]، به نظر می‌رسد که ممانعت از تشکیل و اتصال نواحی آبگریز سطحی یکی از مکانیسم‌هایی است که بدان وسیله سیلیمارین باعث مهار تشکیل تجمعات آمیلوئیدی در پروتئین لیزوزیم می‌شود. بطور مشابهی آقای شریعت و همکاران نشان دادند که ممانعت از تشکیل سطوح آبگریز یکی از مکانیسم‌هایی است که بدان وسیله پلی‌فنل‌های رزوراترول و رزمارینیک اسید تشکیل تجمعات آمیلوئیدی در پروتئین لیزوزیم را مهار میکنند [۳۳]. در رابطه با فرایند تجمع پروتئینی، مطالعات انجام شده در سال‌های اخیر نشان می‌دهد که برهمکنش‌های آروماتیک، نیروهای آبگریز و تشکیل باندهای هیدروژنی بین زنجیره‌های جانبی پروتئین‌ها نقش مهمی در تشکیل صفحات بتا و پایداری ساختارهای آمیلوئیدی دارد [۱۳، ۱۴، ۳۰]. بنابراین، به نظر می‌رسد که ترکیبات فلاونولیکانی و فلاونوئیدی که در سیلیمارین وجود دارد بواسطه‌ی توانایی بالایشان در ایجاد برهمکنش‌های آروماتیک و آبگریز با زنجیره‌های جانبی پروتئین مانع برقراری برهمکنش‌های بین ملکولی در پروتئین لیزوزیم شده و بدین ترتیب اثرات مهاری خود را اعمال می‌نمایند. در حقیقت تحت شرایط آمیلوئیدوژنیک نواحی آبگریز پروتئین به سطح منتقل شده و امکان برهمکنش ترکیبات حلقوی موجود در سیلیمارین را با پروتئین افزایش می‌دهد. با توجه به مطالب گفته شده پیشنهاد می‌شود که ممانعت از برهمکنش‌های آروماتیک و نیروهای آبگریز بین زنجیره‌های جانبی پروتئین‌ها مکانیسمی است که بدان وسیله سیلیمارین مانع تشکیل تجمعات آمیلوئیدی توسط پروتئین لیزوزیم می‌شود [۱۳، ۱۴، ۳۰، ۳۳].

تغییرات ساختار سوم پروتئین در طی روند تشکیل تجمعات آمیلوئیدی، میزان نشر نشانگر Nile red نمونه‌های پروتئینی انکوبه شده در حضور غلظت‌های مختلف سیلیمارین نیز مورد سنجش قرار گرفت. شکل ۳ میزان نشر فلورسانس نشانگر Nile red نمونه‌های پروتئینی انکوبه شده به مدت ۷ روز در عدم حضور و حضور غلظت‌های مختلف سیلیمارین را نشان می‌دهد. نتایج حاصل نشان دهنده‌ی افزایش شدید در میزان نشر فلورسانس نشانگر Nile red به‌مراه انتقال به سمت طول موج‌های کوتاه‌تر در مورد نمونه‌های پروتئین انکوبه شده در غیاب سیلیمارین می‌باشد، حال آنکه حضور سیلیمارین باعث یک کاهش شدید و وابسته به غلظت در میزان نشر نشانگر Nile red گردید. همچنین این کاهش همراه با یک انتقال به سمت طول موج‌های بلندتر بود (شکل ۳). این مشاهده دلالت بر این دارد که انتقال نواحی آبگریز به سطح پروتئین بطور قابل توجهی در نمونه‌های حاوی سیلیمارین مهار شده است.



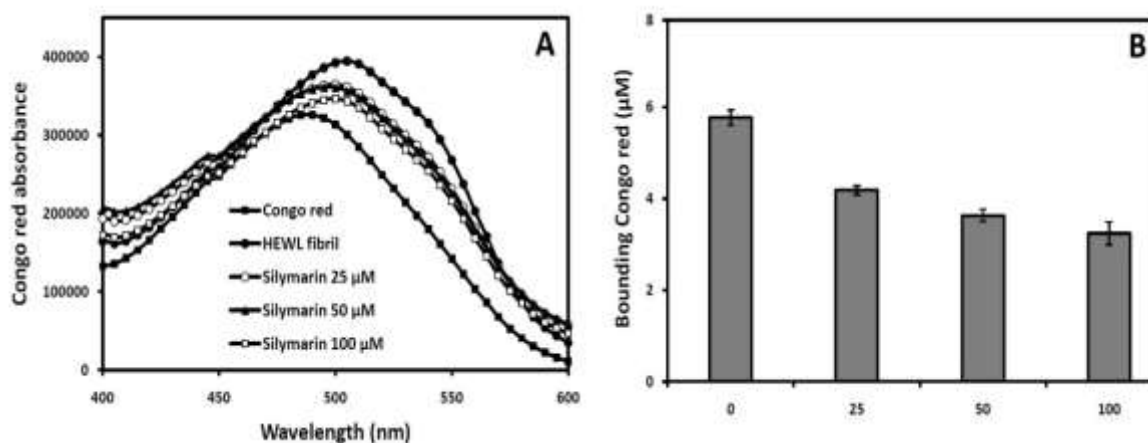
شکل ۳- طیف نشر فلورسانس نشانگر Nile red نمونه‌های پروتئینی انکوبه شده در عدم حضور و حضور غلظت‌های مختلف سیلیمارین به مدت ۷ روز تحت شرایط آمیلوئیدوژنیک (بافر گلیسین ۵۰ میلی مولار و pH برابر ۲/۲). طول موج برانگیختگی ۵۳۰ نانومتر می‌باشد.

از آنجائی‌که افزایش نواحی آبگریز سطحی از عوامل اصلی و پیش برنده در روند تشکیل تجمعات

گرفت. نتايج حاصل نشان دهنده افزايش جذب و انتقال به سمت طول موجهاى بلندتر در مورد نمونه‌هاى پروتئينى انكوبه شده در غياب سيليمارين مى‌باشد كه نشان دهنده تشكيل فيبريل‌هاى آميلوئيدى است (شكل A۴). ولى در مورد نمونه‌هاى انكوبه شده با غلظت‌هاى مختلف سيليمارين يك کاهش در ميزان جذب و انتقال به سمت طول موجهاى کوتاه‌تر مشاهده شد كه بيانگر کاهش ميزان فيبريل‌هاى آميلوئيدى مى‌باشد. همچنين ميزان نشانگر قرمز كنگو متصل شده به فيبريل‌هاى آميلوئيدى با استفاده از معادله ۱ محاسبه گرديد كه نتايج آن در شكل B۴ آورده شده است. مادامى كه قرمز كنگو به مقدار قابل توجهى به نمونه‌هاى پروتئينى فاقد سيليمارين متصل گرديد، ميزان باند شدن آن به نمونه‌هاى پروتئينى داراى سيليمارين بطور وابسته به غلظت کاهش يافت (شكل B ۴). اين مشاهده بيانگر کاهش ميزان تشكيل فيبريل‌هاى آميلوئيدى در نمونه‌هاى حاوى سيليمارين مى‌باشد كه با نتايج قبلى ما همخوانى دارد.

بررسى كمى تشكيل تجمعات آميلوئيدى پروتئين ليزوزيم در حضور و عدم حضور سيليمارين

نشانگر تيوفلاوين T اگرچه بطور رايج در بررسى كينتيك تشكيل تجمعات آميلوئيدى استفاده مى‌شود ولى علاوه بر فيبريل‌هاى آميلوئيدى به تجمعات بى‌شكل و همچنين گونه‌هاى پيش فيبريلى كه داراى صفحات بتا مى‌باشند نيز متصل مى‌شود [۱،۴]. بنا بر اين روش مناسبى براى بررسى كمى فيبريل‌هاى آميلوئيدى نمى‌باشد. در مقابل، نشانگر قرمز كنگو بطور اختصاصى به فيبريل‌هاى آميلوئيدى باند شده و اين اتصال با افزايش جذب و انتقال به سمت طول موجهاى بلندتر (red shift) همراه است. علاوه بر اين مقدار قرمز كنگو باند شده به فيبريل‌هاى آميلوئيدى كه متناسب با مقدار آميلوئيد موجود در محيط مى‌باشد به راحتى با استفاده از معادله ۱ قابل اندازه‌گيرى مى‌باشد [۲۱]. به همين دليل در ادامه مطالعه ميزان جذب قرمز كنگو نمونه‌هاى پروتئينى انكوبه شده در عدم حضور و حضور غلظت‌هاى مختلف سيليمارين مورد سنجش قرار



شكل ۴- الف- طيف جذبى قرمز كنگو نمونه‌هاى پروتئينى انكوبه شده در عدم حضور و حضور غلظت‌هاى مختلف سيليمارين ب- ميزان باند شدن قرمز كنگو به نمونه‌هاى پروتئينى انكوبه شده در عدم حضور و حضور غلظت‌هاى مختلف سيليمارين. نمونه‌ها به مدت ۷ روز تحت شرايط آميلوئيدوژنيك انكوبه شدند.

دارد [۲۴]. بعد از ۷ روز انکوباسیون تحت شرایط آمیلوئیدوزنیک و در عدم حضور سیلیمارین، یک پیک بارز در ناحیه بین ۲۱۵ تا ۲۱۸ نانومتر ظاهر شده است که دلالت بر تغییرات کنفورماسیونی پروتئین از حالت بطور عمده ماریپچ آلفا (در ابتدای انکوباسیون) به ساختار غنی از صفحات بتا دارد که مشخصه بارز فیبریل‌های آمیلوئیدی است (شکل ۵ A). این تغییرات کنفورماسیونی همچنین با یک کاهش شدید در میزان محتوای ماریپچ آلفا (از حدود ۲۷٪ در پروتئین مونومر به حدود ۶٪ بعد از ۷ روز انکوباسیون) و یک افزایش شدید در میزان محتوای صفحات بتا (از حدود ۱۱/۵٪ در پروتئین مونومر به حدود ۳۳/۵٪ بعد از ۷ روز انکوباسیون) همراه است که خود نشان دهنده تغییرات ساختاری عمده در پروتئین طی روند تجمع می باشد (شکل ۵ B). در مورد نمونه‌های پروتئینی حاوی سیلیمارین شدت پیک در ناحیه ۲۱۵ تا ۲۱۸ نانومتر کاهش یافت که این کاهش در غلظت ۱۰۰ میکرومولار سیلیمارین کاملاً بارز می‌باشد، و دلالت بر این امر دارد که تشکیل صفحات بتا در نمونه‌های حاوی سیلیمارین بطور چشم‌گیری کاهش یافته است. این مشاهده در تطابق کامل با نتایج حاصل از نشر فلورسانس نشانگر تیوفلاوین T و جذب قرمز کنگو می‌باشد. نتایج حاصل از آنالیز محتوای ساختارهای دوم (ماریپچ آلفا و صفحات بتا) نمونه‌های پروتئینی انکوبه شده در حضور غلظت‌های مختلف سیلیمارین نیز در شکل ۵ B آورده شده است، که نشان دهنده کاهش محتوای صفحات بتا و افزایش ماریپچ آلفا در نمونه‌های دارای سیلیمارین می‌باشد. این مشاهده بیانگر این مطلب می‌باشد که تغییرات ساختاری از ماریپچ آلفا به صفحات بتا تا حد زیادی توسط سیلیمارین مهار شده است.

فیبریل‌های آمیلوئیدی بدلیل بزرگی و وزن ملکولی بالا براحتی در دوره‌های سانتریفیوژ ۱۲۰۰۰ تا ۱۶۰۰۰ دور بر دقیقه رسوب کرده و قابل جداسازی هستند [۲۴]. جدول شماره ۱ میزان فیبریل‌های آمیلوئیدی تشکیل شده در عدم حضور و حضور غلظت‌های مختلف سیلیمارین را تحت شرایط آمیلوئیدوزنیک نشان می‌دهد. نتایج حاصل نشان دهنده یک کاهش وابسته به غلظت در میزان فیبریل‌های آمیلوئیدی تشکیل شده در نمونه‌های حاوی سیلیمارین می‌باشد که با نتایج حاصل از آزمایشات بالا مطابقت می‌نماید.

جدول ۱- میزان فیبریل‌های آمیلوئیدی تشکیل شده در نمونه‌های پروتئینی انکوبه شده به مدت ۷ روز در عدم حضور و حضور غلظت‌های مختلف سیلیمارین.

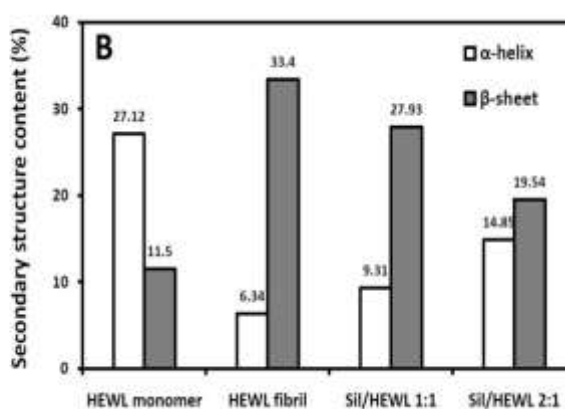
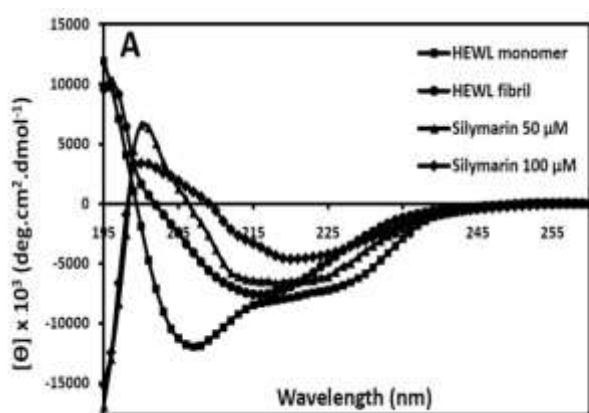
HEWL amyloid fibril (μM)	
HEWL	37.34 \pm 1.22
25 μM	32.42 \pm 1.26
50 μM	28.67 \pm 1.42
100 μM	25.08 \pm 1.38

بررسی اثر سیلیمارین بر تغییرات ساختار دوم پروتئین لیزوزیم تحت شرایط آمیلوئیدوزنیک

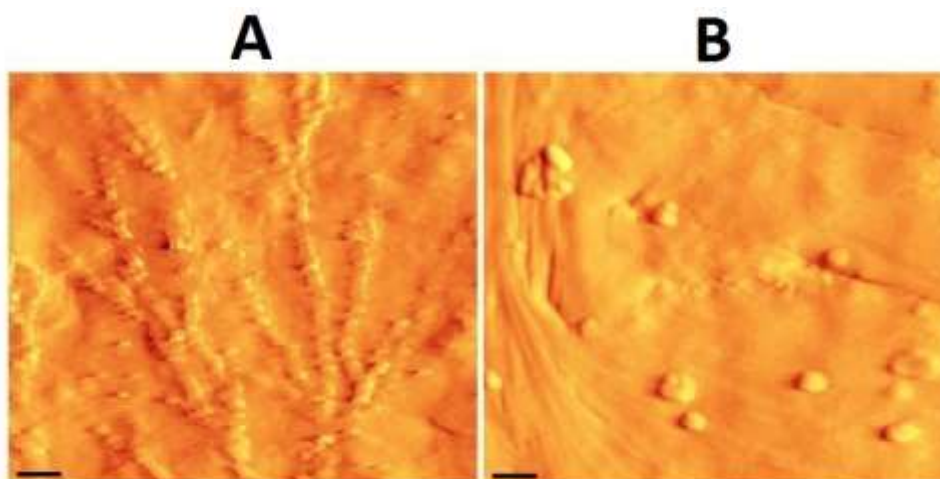
در مرحله بعد به منظور بررسی تغییرات ساختار دوم پروتئین در طی روند تجمع و همچنین مطالعه تاثیر سیلیمارین بر آن، طیف دورنگ نمایی دورانی پروتئین در ناحیه ماوراء بنفش - مرئی در عدم حضور و حضور غلظت‌های مختلف سیلیمارین اندازه گیری شد. همانطور که در شکل ۵ نشان داده شده است، طیف دورنگ نمایی دورانی پروتئین لیزوزیم در حالت مونومری دارای دو پیک در نواحی ۲۰۸ و ۲۲۲ نانومتر می‌باشد که مشخصه بارز ساختار ماریپچ آلفا است و با نتایج حاصل از مطالعات قبلی ما مطابقت

آمیلوئیدی به وضوح دیده می‌شود. با اینحال، در نمونه‌های پروتئینی انکوبه شده در حضور غلظت ۱۰۰ میکرومولار سیلیمارین تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی بطور موثری مهار شد و در مقابل مقادیر کمی تجمعات پروتئینی بی شکل تشکیل گردید (شکل ۶ B). این نتایج بیانگر توانایی بالای سیلیمارین در مهار تشکیل تجمعات آمیلوئیدی بوده و با نتایج حاصل از آزمایشات قبلی ما مطابقت می‌نماید.

بررسی مورفولوژی تجمعات پروتئینی لیزوزیم در حضور و عدم حضور سیلیمارین در مرحله آخر مورفولوژی تجمعات پروتئینی ایجاد شده در عدم حضور و حضور سیلیمارین توسط میکروسکوپ نیروی اتمی مورد بررسی قرار گرفت. شکل ۶ A مربوط به نمونه‌های پروتئینی انکوبه شده در عدم حضور سیلیمارین به مدت ۷ روز تحت شرایط آمیلوئیدوژنیک می‌باشد که در آن رشته‌های



شکل ۵- الف- طیف دورنگ نمایی دورانی در ناحیه مرئی دور، ب- محتوای مارپیچ آلفا و صفحات بتا نمونه‌های پروتئینی انکوبه شده در عدم حضور و حضور غلظت‌های مختلف سیلیمارین



شکل ۶- تصاویر میکروسکوپ نیروی اتمی نمونه‌های پروتئینی انکوبه شده به مدت ۷ روز در عدم حضور و حضور سیلیمارین. الف- تصویر میکروسکوپ نیروی اتمی نمونه‌های پروتئینی به تنهایی. ب- تصویر میکروسکوپ نیروی اتمی نمونه‌های پروتئینی انکوبه شده در حضور غلظت ۱۰۰ میکرومولار سیلیمارین. مقیاس نشان داده شده برابر ۵۰۰ نانومتر می‌باشد.

توسط دانشگاه مربوطه تامین گردیده است.

نتیجه گیری

در این مطالعه توانایی سیلیمارین در مهار تشکیل تجمعات آمیلوئیدی توسط پروتئین لیزوزیم سفیده تخم مرغ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان دهنده توانایی بالای سیلیمارین در مهار تشکیل تجمعات آمیلوئیدی در پروتئین لیزوزیم می باشد. این مشاهده که نمونه های انکوبه شده در حضور سیلیمارین نسبت به نمونه های پروتئینی شاهد دارای فاز تاخیری طولانی تری هستند دلالت بر این دارد که سیلیمارین احتمالاً در مراحل اولیه تشکیل تجمعات آمیلوئیدی اختلال ایجاد می کند. این مشاهده با نتایج حاصل از مطالعات انجام شده با پژوهشگران دیگر نیز همخوانی دارد [۳،۳۳]. بر اساس نتایج بدست آمده از آزمایش های مختلف پیشنهاد می شود که سیلیمارین از طریق اتصال به حدواسط های پیش فیبریلی و ممانعت از برهمکنش های آبگریز بین آنها باعث مهار تشکیل تجمعات آمیلوئیدی می شود. بعبارتی اتصال سیلیمارین به حدواسط های نسبی باز شده گونه های پروتئینی آنها را از مسیر تشکیل فیبریل های آمیلوئیدی منحرف و به سمت تشکیل تجمعات بی شکل سوق می دهد. نتایج حاصل از این مطالعه می تواند در درک بهتر مکانیسم های احتمالی مهار تشکیل تجمعات آمیلوئیدی توسط ملکول های کوچک طبیعی، از جمله پلی فنل ها، موثر باشد و ما را در انتخاب مهارکننده های موثر در رابطه با تاخوردگی ناصحیح و تجمع پپتیدها و پروتئین های مرتبط با بیماری های تحلیل برنده ی سیستم عصبی یاری نماید.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در دانشگاه تحصیلات تکمیلی علوم پایه زنجان انجام شده و کلیه هزینه های پژوهشی آن

References

- [1]. Azami-Movahed, M., Shariatizi, S., Sabbaghian, M., Ghasemi, A., Ebrahim-Habibi, A., Nemat-Gorgani, M. 2013. Heme binding site in apomyoglobin may be effectively targeted with small molecules to control aggregation. -Int. J. Biochem. Cell Biol. 45(2): 299-307.
- [2]. Bartolini, M., Andrisano, V. 2010. Strategies for the inhibition of protein aggregation in human diseases.- ChemBioChem. 11(8): 1018-1035.
- [3]. Borana, M.S., Mishra, P., Pissurlenkar, R.R., Hosur, R.V., Ahmad, B. 2014. Curcumin and kaempferol prevent lysozyme fibril formation by modulating aggregation kinetic parameters. -Biochim. Biophys. Acta. 1844(3): 670-680.
- [4]. Bouma, B., Kroon-Batenburg, L.M., Wu, Y.P., Brünjes, B., Posthuma, G., Kranenburg, O., de Groot, P.G., Voest, E.E., Gebbink, M.F. 2003. Glycation induces formation of amyloid cross-beta structure in albumin. -J. Biol. Chem. 278 (43): 41810-9.
- [5]. Bucciantini, M., Giannoni, E., Chiti, F., Baroni, F., Formigli, L., Zurdo, J., Taddei, N., Ramponi, G., Dobson, C.M., Stefani, M. 2002. Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases.- Nature, 416(6880): 507-511.
- [6]. Cheng, B., Gong, H., Li, X., Sun, Y., Zhang, X., Chen, H., Liu, X., Zheng, L., Huang, K. 2012. Silibinin inhibits the toxic aggregation of human islet amyloid polypeptide. -Biochem Biophys Res Commun. 419(3): 495-9.
- [7]. Cohen, F.E., Kelly, J.W. 2003. Therapeutic approaches to protein-misfolding diseases. -Nature. 426(6968): 905-909.
- [8]. Cohen, T., Frydman-Marom, A., Rechter, M., Gazit, E. 2006. Inhibition of amyloid fibril formation and cytotoxicity by hydroxyindole derivatives. -Biochemistry 45(15): 4727-4735.
- [9]. De Felice, F.G., S.T. Ferreira, S.T. 2002. Beta-Amyloid production, aggregation, and clearance as targets for therapy in

- Alzheimer's disease. -Cell. Mol. Neurobiol. 22(5-6): 545-563.
- [10].De Felice, F.G., Houzel, J.C., Garcia-Abreu, J., Louzada Jr., P.R., Afonso, R.C. Meirelles, M.N., Lent, R., Neto, V.M., Ferreira, S.T. 2001. Inhibition of Alzheimer's disease beta-amyloid aggregation, neurotoxicity, and in vivo deposition by nitrophenols: implications for Alzheimer's therapy. -FASEB J. 15(7): 1297-1299.
- [11].Ebrahimi, A., Schluesener, H. 2012. Natural polyphenols against neurodegenerative disorders: potentials and pitfalls. -Ageing Res. Rev. 11(2): 329-345.
- [12].Ferreira, N., Saraiva, M.J., Almeida, M.R. 2011. Natural polyphenols inhibit different steps of the process of transthyretin (TTR) amyloid fibril formation. -FEBS Lett. 585(15): 2424-2430.
- [13].Gazit, E. 2002. A possible role for pi-stacking in the self-assembly of amyloid fibrils. -FASEB J. 16(1): 77-83.
- [14].Gazit, E. 2005. Mechanisms of amyloid fibril self-assembly and inhibition. Model short peptides as a key research tool. -FEBS J. 272(23): 5971-5978.
- [15].Gazova, Z., Siposova, K., Kurin, E., Mucaji, P., Nagy, M. 2013. Amyloid aggregation of lysozyme: the synergy study of red wine polyphenols. -Proteins. 81(6): 994-1004.
- [16].Ghobeh, M., Ahmadian, S., Meratan, A.A., Ebrahim-Habibi, A., Ghasemi, A., Shafizadeh, M., Nemat-Gorgani, M. 2014. Interaction of A β (25-35) fibrillation products with mitochondria: effect of small-molecule natural products. -Biopolymers. 102(6): 473-486.
- [17].Goldberg, M.E., Rudolph, R., Jaenicke, R. 1991. A kinetic study of the competition between renaturation and aggregation during the refolding of denatured-reduced egg white lysozyme. -Biochemistry. 30(11): 2790-2797.
- [18].Hafner-Bratkovic, I., Gaspersic, J., Smid, L.M., Bresjanac, M., Jerala, R. 2008. Curcumin binds to the alpha-helical intermediate and to the amyloid form of prion protein -a new mechanism for the inhibition of PrP (Sc) accumulation. -J. Neurochem. 104(6): 1553-1564.
- [19].Härd, T., Lendel, C. 2012. Inhibition of amyloid formation. -J. Mol. Biol. 421(4-5): 441-465.
- [20].Kayed, R., Head, E., Thompson, J.L., McIntire, T.M., Milton, S.C., Cotman, C.W., Glabe, C.G. 2003. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanisms of pathogenesis. -Science. 300(5618): 486-489.
- [21].Klunk, W.E., Pettegrew, J.W., Abraham, D.J. 1989. Quantitative evaluation of Congo red binding to amyloid-like proteins with a beta-pleated sheet conformation. -J. Histochem. Cytochem. 37(8): 1273-1281.
- [22].Krebs, M.R., Wilkins, D.K., Chung, E.W., Pitkeathly, M.C., Chamberlain, A.K., Zurdo, J., Robinson, C.V., Dobson, C.M. 2000. Formation and seeding of amyloid fibrils from wild-type hen lysozyme and a peptide fragment from the β -domain. -J.Mol. Biol. 300(3): 541-549.
- [23].Masuda, M., Suzuki, N., Taniguchi, S., Oikawa, T., Nonaka, T., Iwatsubo, T., Hisanaga, S., Goedert, M., Hasegawa, M. 2006. Small molecule inhibitors of alpha-synuclein filament assembly. -Biochemistry. 45(19): 6085-6094.
- [24].Meratan, A.A., Ghasemi, A., Nemat-Gorgani, M. 2011. Membrane integrity and amyloid cytotoxicity: a model study involving mitochondria and lysozyme fibrillation products. -J. Mol. Biol. 409(5): 826-838.
- [25].Mishra, R., Sjölander, D., Hammarström, P. 2011. Spectroscopic characterization of diverse amyloid fibrils in vitro by the fluorescent dye Nile red. -Mol Biosyst. 7(4): 1232-40.
- [26].Mishra, R., Sellin, D., Radovan, D., Gohlke, A., Winter, R. 2009. Inhibiting islet amyloid polypeptide fibril formation by the red wine compound resveratrol. -ChemBioChem. 10(3): 445-449.
- [27].Murata, N., Murakami, K., Ozawa, Y., Kinoshita, N., Irie, K., Shirasawa, T., Shimizu, T. 2010. Silymarin attenuated the amyloid β plaque burden and improved behavioral abnormalities in an Alzheimer's disease mouse model. -Biosci Biotechnol Biochem. 74(11): 2299-306.
- [28].Ono, K., Yamada, M. 2006. Antioxidant compounds have potent anti-fibrillogenic

- and fibril-destabilizing effects for alpha-synuclein fibrils in vitro. -*J. Neurochem.* 97(1): 105-115.
- [29].Pepys, M.B. Hawking, P.N. Booth, D.R., Vigushin, D.M., Tennent, G.A., Soutar, A.K., Totty, N., Nguyen, O., Blake, C.C., Terry, C.J., Feast, T.G., Zalin, A.M., Hsuan, J.J. 1993. Human lysozyme gene mutations cause hereditary systemic amyloidosis. -*Nature.* 362(6420): 553-557.
- [30].Porat, Y., Abramowitz, A., Gazit, E. 2006. Inhibition of amyloid fibril formation by polyphenols: structural similarity and aromatic interactions as a common inhibition mechanism. -*Chem. Biol. Drug Des.* 67(1): 27-37.
- [31].Polyak, S.J., Ferenci, P., Pawlotsky, J.M. 2013. Hepatoprotective and antiviral functions of silymarin components in hepatitis C virus infection. -*Hepatology.* 57(3): 1262-71.
- [32].Ramasamy, K., Agarwal, R. 2008. Multitargeted therapy of cancer by silymarin. -*Cancer Lett.* 269(2): 352-62.
- [33].Shariatizi, S., Meratan, A.A., Ghasemi, A., Nemat-Gorgani, M. 2015. Inhibition of amyloid fibrillation and cytotoxicity of lysozyme fibrillation products by polyphenols. -*Int. J. Biol. Macromol.* 80: 95-106.
- [34].Soto, C. 1999. Plaque busters: strategies to inhibit amyloid formation in Alzheimer's disease. -*Mol. Med. Today.* 5(8): 343-350.
- [35].Soto, C. 2003. Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. -*Nat. Rev. Neurosci.* 4(1): 49-60.
- [36].Uversky, V.N., Fink, A.L. 2004. Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded.- *Biochim. Biophys. Acta.* 1698(2): 131-153.
- [37].Wang, J.B., Wang, Y.M., Zeng, C.M. 2011. Quercetin inhibits amyloid fibrillation of bovine insulin and destabilizes preformed fibrils. -*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 415(4): 675-679.
- [38].Zeng, H., Miao, M., Yang, R., Qu, L. 2017. Effect of silybin on the fibrillation of hen egg white lysozyme. -*J. Mol. Recognit.* 30(1): e2566.