

بررسی اثر حفاظتی عصاره‌ی آبی گیاه چای ترش بر جلوگیری از تجمع پروتئین آلفا-لاکتالبومین

شهره رحیمی، آرزو قهقایی*

زاهدان، دانشگاه سیستان و بلوچستان، دانشکده علوم

تاریخ دریافت: ۹۴/۵/۶ تاریخ پذیرش: ۹۴/۹/۲۴

چکیده

تجمع پروتئینی از عوامل مختلفی ناشی شده و منجر به بیماری‌های گوناگون در انسان‌ها و سایر موجودات زنده می‌گردد. یافتن راهکاری مناسب جهت جلوگیری از ایجاد اینگونه تجمعات می‌تواند بسیار حائز اهمیت باشد. گیاه چای ترش منبع غنی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی است که می‌تواند از بدن در برابر آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد محافظت کند. در این پژوهش اثر عصاره‌ی آبی گیاه چای ترش بر روی تجمعات پروتئین آلفا-لاکتالبومین در حضور دی‌تیوتریتول (DTT) به عنوان عامل القاکننده‌ی تجمع مورد بررسی قرار گرفت. خاصیت چاپرونی عصاره بر روی تجمع پروتئین توسط روش‌های طیف‌سنجی نور مرئی، فلورسانس تیوفلاوین تی (ThT)، اسپکتروسکوپی فلورسانس ذاتی، ۱-آنیلینو-۸-نفتالین سولفونات (ANS) و دورنگ‌نمایی دورانی (Circular dichroism) بررسی شد. نتایج بدست آمده از طیف‌سنجی نور مرئی و اتصال تیوفلاوین تی نشان داد که عصاره‌ی چای ترش از ایجاد تجمع و تشکیل آمیلوئید در پروتئین جلوگیری کرده و این تاثیر با افزایش غلظت عصاره افزایش می‌یابد. طبق نتایج بدست آمده از آزمایشات فلورسانس، عصاره با نواحی هیدروفوب در معرض قرار گرفته در پروتئین احیا شده برهمکنش کرده و از تجمع جلوگیری می‌کند. نتایج حاصل از دورنگ‌نمایی حلقوی نشان داد که دی‌تیوتریتول تغییراتی در ساختمان دوم پروتئین ایجاد می‌کند که در حضور عصاره تغییرات کمتری مشاهده می‌شود. نتایج این پژوهش چای ترش را به عنوان عاملی بالقوه جهت جلوگیری از تجمع پروتئین‌های مختلف دخیل در بیماری‌های گوناگون ناشی از تجمع پیشنهاد می‌کند.

واژه‌های کلیدی: تجمع پروتئین، آلفا-لاکتالبومین، چای ترش

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۵۴۳۳۴۴۶۵۶۵، پست الکترونیکی: arezou@chem.usb.ac.ir

مقدمه

عدم تاخوردگی صحیح پروتئین‌ها یا باقی‌نماندن آنها در حالت درست تا شده، با اختلالات زیادی در عملکرد سلول‌ها همراه است که منجر به بیماری‌های مختلف می‌شود (۹). پروتئین‌های تجمع یافته مولکول‌هایی با ساختار اشتباه تاخوردگی هستند که از ناتوانی پروتئین در تاخوردگی صحیح به صورت کنفورماسیون عملکردی فعال و یا عدم توانایی باقی‌مانده در آن کنفورماسیون، ناشی می‌شوند (۱۹). بسته به شرایط استرس مانند دما، pH و حضور عامل کاهنده، تجمعات نامظم (آمورف) یا منظم (فیبریل‌های آمیلوئیدی) ایجاد می‌گردد (۵).

چای ترش گیاهی یک ساله است که ارتفاع آن گاهی به ۴-چهارمتر می‌رسد. این گیاه در سراسر جهان، در مناطق گرمسیر و نیمه گرمسیر یافت می‌شود و در نواحی تولیدکننده به نام روسل معروف می‌باشد (۲۲) چای ترش بومی ایران نمی‌باشد و کشت این گیاه در ایران تنها در استان سیستان و بلوچستان گزارش شده است (۲). کاسبرگ خشک گیاه چای ترش حاوی فلاونوئید، آنتوسیانین و مقدار بالایی اسید مانند اگزالیک اسید، سوکسینیک اسید و

در کمپلکس لاکتوز سنتاز ایفا کنند (۱۸). آلفا-لاکتآلبومین تحت شرایط مختلف محیطی شامل pH پایین و غلظت پایین نمک در غیاب کلسیم، حالت مولتن گلوبول تشکیل می‌دهد (۱۱ و ۱۰) که باند های دی سولفیدی را مستعد احیا و منجر شدن به فیبریل های آمیلوئیدی می‌کند (۸ و ۱۳). این فرم از آلفا-لاکتآلبومین ساختار دومی مشابه حالت طبیعی دارد اما ساختار سوم کمی را نشان می‌دهد (۷). از آنجایی که آلفا-لاکتآلبومین به بهترین شکل حالت مولتن گلوبول را نشان می‌دهد، این پروتئین می‌تواند به عنوان مدلی مناسب برای مشاهده ی دقیق چارپون‌های مولکولی و حالت مولتن گلوبول بکار گرفته شود (۱۶).

مواد و روشها

مواد مورد استفاده

مواد شیمیایی و پروتئین‌ها: پروتئین آلفا-لاکتآلبومین (۱۴KD) از شرکت سیگما تهیه شد.

مواد شیمیایی شامل: دی‌تیوتریتول (DTT)، سدیم آزید (NaN_3)، سدیم فسفات (Na_2HPO_4)، ۱-آنیلینو-۸-فتالن

سولفونیک اسید (ANS) و تیوفلاوین T (ThT) نیز از شرکت سیگما در آمریکا تهیه شدند.

مواد گیاهی

گیاه چای ترش از زاهدان واقع در استان سیستان و بلوچستان جمع‌آوری شد.

عصاره گیری از گیاه: عصاره‌گیری به این صورت انجام شد که میزان ۱۵ گرم از پودر گیاه به ۱۵۰ cc آب دو بار تقطیر اضافه شده، به مدت ۲۴ ساعت توسط همزن مغناطیسی کاملاً مخلوط شد. عصاره‌ی حاصل سپس با استفاده از کاغذ صافی صاف شده، به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد. محلول رویی به پلیت شیشه-ای منتقل شده و به مدت ۳-۴ روز در داخل انکوباتور

اسیدهای آلی است. به علاوه مقدار اسید آسکوربیک چای ترش در مقایسه با خانواده‌ی مرکبات بیشتر می‌باشد. در آزمایشات انجام شده حضور آهن، فسفر، کلسیم، منگنز، آلومینیوم، سدیم، پتاسیم، موسیلاژ، گوسپیتین، هیپستین، پروتئین و مواد معدنی در آن مشاهده شده است (۲۳ و ۲۴).

چای ترش منبع غنی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی است که می‌توانند از بدن در برابر آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد و پراکسیداسیون لیپیدی محافظت کنند. اثرات محافظتی احتمالاً از طریق مقادیر بالای آسکوربیک اسید، بتا کاروتن و ترکیبات فنولی و به خصوص آنتوسیانین‌ها اعمال می‌شود (۱۷). در بین قسمتهای مختلف چای ترش، عصاره‌ی آبی کاسبرگ آن بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را دارا است (۲۳). این نتایج ناشی از این است که کاسه‌ی گل منبع غنی ویتامین C (۱۴۱ mg در ۱۰۰g)، آنتوسیانین‌ها (۲/۵ mg در ۱۰۰g)، بتاکاروتن (۱/۸۸ mg در ۱۰۰g)، لیکوپین (۱۶۴ μg در ۱۰۰g)، پلی فنول‌ها و دیگر آنتی-اکسیدان‌های محلول در آب است (۱۵).

به دنبال به اثبات رسیدن خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالای عصاره‌ی گیاه، این احتمال داده شد که ترکیبات آنتی-اکسیدانی موجود در این گیاه بر روی تجمع پروتئین و تشکیل آمیلوئید تأثیرگذار باشند. بنابراین برآن شدیم که تأثیر عصاره‌ی این گیاه را بر روی تجمع پروتئین آلفا-لاکتآلبومین بررسی نماییم.

آلفا-لاکتآلبومین یک مونومر کوچک با وزن مولکولی ۱۴/۱۸ کیلو دالتون و حاوی ۱۲۳ اسید آمینه است (۱۸). این پروتئین دارای ۸ باقیمانده سیستین است که ۴-چهار پل دی سولفیدی تشکیل می‌دهند (۶). آلفا-لاکتآلبومین که بخشی از کمپلکس لاکتوز سنتاز است، دارای جایگاهی برای اتصال کلسیم است که به نظر می‌رسد در تغییر ساختار پروتئین از حالت طبیعی به فرم غیر طبیعی شده نقش داشته باشد (۲۰). این پروتئین همچنین دارای ناحیه‌ی اتصال روی است. این نواحی اتصال ممکن است نقشی را

خشک شد. نمونه پس از خشک شدن کامل، به صورت پودر جهت انجام آزمایش مورد استفاده قرار گرفت.

استفاده از تکنیک اسپکتروسکوپی جذب نوری: توانایی عصاره‌ی گیاه چای ترش در جلوگیری از تجمع و ته‌نشینی پروتئین آلفا-لاکتالبومین با استفاده از طیف‌سنجی نور مرئی مورد بررسی قرار گرفت. آلفا-لاکتالبومین در غلظت ۲/۵mg/ml در بافر فسفات ۵۰ mM (pH ۷/۴)، حاوی سدیم آزید (NaN₃) ۰/۰۵٪ که سدیم کلرید (NaCl) mM ۱۰۰ نیز به آن افزوده شده بود، تهیه گردید. یک نمونه به عنوان شاهد، بدون عصاره در نظر گرفته‌شده و نمونه‌های دیگر در معرض غلظت‌های متفاوت عصاره‌ی چای ترش (با نسبت‌های ۱ : ۰/۲۵ : ۱، ۰/۵ : ۱ و ۱ : ۱ وزنی : وزنی پروتئین : عصاره) قرار گرفتند. به تمامی غلظت‌های آماده شده مقدار یکسان ۲۰mM DTT افزوده شد. در اثر افزوده شدن DTT، غیرطبیعی شدن و تجمع آغاز شده، آزمایش در طول موج ۳۴۰nm و دمای ۳۷ C° درجه توسط دستگاه الیزا (کمپانی Biotek) صورت گرفت و جذب به مدت ۱۸۰ دقیقه در فاصله‌های زمانی هر ۳ دقیقه توسط دستگاه خوانده شد.

بررسی تشکیل آمیلوئید با استفاده از رنگ تیو فلاوین تی (ThT): تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی به وسیله آلفا-لاکتالبومین (۲/۵ mg/ml) در حضور عامل احیا کننده پیوندهای دی‌سولفیدی DTT (۲۰ mM) و عصاره‌ی چای ترش در غلظت‌های مختلف (با نسبت‌های ۱ : ۰/۲۵ : ۱، ۰/۵ : ۱ و ۱ : ۱ وزنی : وزنی پروتئین : عصاره). بررسی شد. نمونه‌های مورد نظر حاوی بافر فسفات ۵۰ mM DTT، ۲۰mM، pH ۷/۴ به مدت ۳۰ ساعت درون دستگاه انکوباتور A-Q German در دمای ۳۷ C° انکوبه شدند. بمنظور تسهیل درتشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی، نمونه‌های درون انکوباتور با استفاده از دستگاه شیکر با دور ۲۱۰ rpm تکان داده شدند. سپس نمونه‌های انکوبه شده طی فاصله‌های زمانی متفاوت برداشته می‌شوند تا روند تشکیل

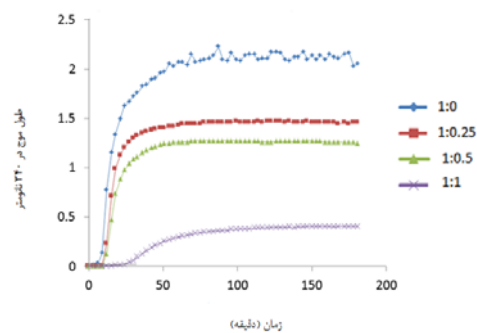
آمیلوئید با گذشت زمان سنجیده شود. نمونه‌های برداشته شده بمنظور سنجش نشر آن‌ها توسط فلورسانس ThT (۰/۴μM) در بافر فسفات ۵۰۰ mM، سدیم آزید (NaN₃) ۰/۰۵٪، pH ۷/۴) به دستگاه فلوریمتر منتقل می‌شوند. با استفاده از نرم افزار Carry Eclipse (varian USA) spectro-fluorimeter و تنظیمات آن نشر نمونه‌ها خوانده می‌شود. به گونه‌ای که با تنظیمات نرم افزار، طول موج برانگیختگی نمونه‌ها برابر ۴۴۶ nm و طول موج نشر آن‌ها برابر ۴۸۰-۶۰۰ nm تنظیم شد.

استفاده از تکنیک اسپکتروسکوپی فلورسانس ذاتی Intrinsic fluorescence: شدت فلورسانس ذاتی برای آلفا-لاکتالبومین (۱۰ μM) و غلظت‌های مختلف عصاره‌ی چای ترش (۱ : ۰/۲۵ : ۱، ۰/۵ : ۱ و ۱ : ۱ وزنی : وزنی پروتئین : عصاره) اندازه‌گیری شد. نمونه‌ها در بافر فسفات ۵۰mM (Na₂HPO₄) حاوی سدیم‌آزید (NaN₃) ۰/۰۵٪ و pH=۷/۴ آماده شدند. بعد از اضافه کردن DTT، نمونه‌ها به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ C° انکوبه شدند سپس طیف فلورسانس با استفاده از دستگاه Carry Eclipse spectrofluorimeter (varian USA) بدست آمد. طول موج برانگیختگی برای ریشه‌های تربیتوفان ۲۹۵ nm باعرض عبوری ۲/۵ nm در دستگاه تنظیم شد. همچنین طیف نشری حاصل در طول موج ۳۰۰-۴۰۰ با عرض عبوری ۵nm ثبت شد.

استفاده از نشانگر فلورسنت متصل شونده به ۱-آنیلو نفتالن سولفونات (ANS): سنجش اتصال ANS برای ارزیابی تغییرات هیدروفوبیستی حاصل از فعل و انفعال بین پروتئین و عصاره‌ی چای ترش مورد استفاده قرار گرفت. نمونه‌ها حاوی پروتئین آلفا-لاکتالبومین (۱۰mM)، غلظت‌های مختلف عصاره‌ی چای ترش (۱ : ۰/۲۵ : ۱، ۰/۵ : ۱ و ۱ : ۱ وزنی : وزنی پروتئین : عصاره) همراه با DTT ۲۰ mM در بافر فسفات ۵۰ mM حاوی سدیم آزید (NaN₃) ۰/۰۵٪ و pH برابر با ۷/۴ انکوبه شدند. فلورسانس

سیستئین در نواحی مختلف تشکیل شده‌اند، توسط DTT بوقوع می‌پیوندد (۱۴).

همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، شدت جذب پروتئین آلفا-لاکتالبومین با گذشت زمان در حضور دی‌تیوتریتول افزایش می‌یابد که نشان دهنده‌ی تشکیل تجمع در این مولکول پروتئینی است. ضمن اضافه کردن غلظت‌های مختلف از عصاره‌ی چای ترش مشخص شد که با افزودن عصاره به پروتئین، از سرعت غیر طبیعی شدن و تشکیل تجمعات در پروتئین آلفا-لاکتالبومین در یک نسبت وابسته به غلظت کاسته شده و زمان مورد نیاز برای شکل‌گیری این ساختارها افزایش می‌یابد. چنانکه میزان جلوگیری از تجمعات پروتئینی در حضور غلظت‌های مختلف عصاره‌ی چای ترش در جدول ۱ آورده شده است، در نسبت ۰/۲۵ : ۱ وزنی/وزنی آلفا-لاکتالبومین / عصاره، به میزان ۳۱/۱۲ درصد از تشکیل تجمعات جلوگیری شد و با افزایش نسبت عصاره به پروتئین به میزان ۱ : ۱ وزنی/وزنی، این درصد محافظت به ۳۲ / ۸۳ درصد افزایش پیدا کرد. میزان درصد حفاظت (جلوگیری از تجمع) در غلظت‌های مختلف عصاره، نشان‌دهنده‌ی تاثیر گذاری ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در عصاره‌ی چای ترش در جلوگیری از تجمع پروتئین آلفا-لاکتالبومین است.



شکل ۱- میزان جذب نوری در 340nm در مدت زمان ۱۸۰ دقیقه برای پروتئین آلفا-لاکتالبومین (2 mg/ml) در عدم حضور و حضور عصاره‌ی گیاه چای ترش (در نسبت‌های وزنی : وزنی ۱ : ۰/۲۵، ۰/۵ : ۱ و ۱ : ۱ پروتئین : عصاره). پروتئین در بافر فسفات 50 mM در

ANS بوسیله دستگاه varian spectrofluorimeter قابل مشاهده است. طول موج تحریکی برابر 400nm قرار می‌گیرد و طول موج نشر در یک دامنه 400nm - 600nm تنظیم می‌شود. عرض عبوری برای این نور تحریکی برابر با $2/5$ قرار داده می‌شود. بعد از قرار گرفتن کووت حاوی نمونه‌ها در دستگاه فلوریمتر، طی فاصله‌های زمانی مداوم، 1mL میکرولیتر از محلول استوک ANS به نمونه‌ها اضافه شده و با هر بار اضافه کردن این مقدار از رنگ ANS، نشر خوانده می‌شود. این عمل تا زمانی ادامه پیدا می‌کند که شدت فلورسانس به حالت یکنواخت رسیده باشد و دیگر افزایشی در شدت فلورسانس مشاهده نشود.

استفاده از روش اسپکتروسکوپی دورنگ نمای حلقوی (CD): در این روش ساختار دوم و سوم پروتئین آلفا-لاکتالبومین در حضور و عدم حضور عصاره‌ی گیاه چای ترش با استفاده از دورنگ نمای حلقوی Far-uv CD (طول موج‌های 190nm - 260nm نانومتر) مورد آزمایش قرار گرفت. نمونه‌ها، آلفا-لاکتالبومین ($0/2\text{ mg/ml}$) در حضور عصاره‌ی چای ترش (در نسبت‌های وزنی : ۱ : ۰/۲۵، ۰/۵ : ۱ و ۱ : ۱ وزنی : وزنی پروتئین : عصاره). بافر استفاده شده، بافر فسفات 10mM pH برابر با $7/4$ از DTT به عنوان احیا کننده‌ی پیوندهای دی‌سولفیدی استفاده شد. اندازه‌گیری‌ها در کووت‌های با طول مسیر 1cm در 37 C° با استفاده از اسپکتروپلاریمتر varian مدل Aviv انجام شد.

نتایج

بررسی اثر عصاره‌ی چای ترش بر تشکیل تجمع در پروتئین آلفا-لاکتالبومین با استفاده از طیف سنجی نور مرئی: قابلیت عصاره‌ی گیاه چای ترش در جلوگیری از تجمع پروتئین آلفا-لاکتالبومین توسط اسپکتروسکوپی نور مرئی اندازه‌گیری شد. فرآیند غیر طبیعی شدن و تجمع پروتئین آلفا-لاکتالبومین به دنبال احیا شدن چهار-۴ پیوند دی‌سولفیدی موجود در ساختمان آن که بین ریشه‌های

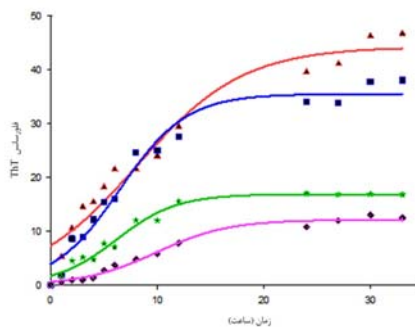
DTT در حضور $0.05\% \text{ NaNO}_3$ و $\text{pH } 7.4$ و دمای 37°C در حضور 20 mM تهیه گردید. همچنین 100 mM NaCl نیز به بافر افزوده

شد. این آزمایش ۳ بار تکرار گردیده است

جدول ۱- درصد بازداری از تجمع پروتئین آلفا-لاکتالبومین توسط غلظت‌های مختلف عصاره‌ی چای ترش

ترکیبات نمونه	در صد بازداری (درصد)
آلفا-لاکتالبومین + عصاره‌ی چای ترش (۱ : ۰/۲۵)	۳۱/۱۲
آلفا-لاکتالبومین + عصاره‌ی چای ترش (۱ : ۰/۵)	۳۶/۶۴
آلفا-لاکتالبومین + عصاره‌ی چای ترش (۱ : ۱)	۸۳/۳۲

تشکیل آمیلوئید را در پروتئین آلفا-لاکتالبومین احیا شده کاهش می‌دهد.



شکل ۲- تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی آلفا-لاکتالبومین ($2/5 \text{ mg/ml}$) در حضور عصاره‌ی چای ترش (با نسبت‌های وزنی $1 : 0.25$ ، $1 : 0.5$ و $1 : 1$ عصاره : پروتئین)، و $4 \mu\text{M ThT}$ بافر استفاده شده بافر فسفات 50 mM حاوی سدیم آزید $0.05\% \text{ NaNO}_3$ و pH برابر 7.4 است. از 20 mM DTT به عنوان احیا کننده پیوندهای دی-سولفیدی استفاده شده است. این آزمایش ۲ بار تکرار گردیده است.

بررسی فلورسانس ذاتی آلفا-لاکتالبومین در حضور و

عدم حضور عصاره‌ی گیاه چای ترش: فلورسانس ذاتی آلفا-لاکتالبومین از چهار-۴ ریشه‌ی تریپتوفان موجود در آن ناشی می‌شود و بر حسب اینکه پروتئین در چه شرایطی قرار بگیرد، متفاوت است. در این آزمایش فلورسانس ذاتی آلفا-لاکتالبومین در حضور عامل احیا کننده پیوندهای دی‌سولفیدی دی‌تیوتریتول (DTT) و غلظت‌های مختلف عصاره‌ی گیاه چای ترش مورد بررسی قرار گرفت.

نمودار ستونی مربوط به مقایسه ماکزیم شدت فلورسانس پروتئین آلفا-لاکتالبومین در حضور عصاره‌ی چای ترش در نسبت‌های مختلف در شکل ۳ قابل مشاهده است.

بررسی تشکیل فیبریل آمیلوئید α -لاکتالبومین در حضور

غلظت‌های مختلف عصاره‌ی چای ترش به وسیله اتصال

تیوفلاوین تی (ThT): تشکیل فیبریل آلفا-لاکتالبومین احیا

شده توسط DTT در عدم حضور و حضور نسبت‌های

مختلف عصاره گیاه چای ترش مورد بررسی قرار گرفت.

این بررسی توسط تکنیک اتصال ThT به فیبریل‌های

آمیلوئیدی انجام گرفت که نمودار آن به صورت مقیاسی از

فلورسانس ThT نسبت به زمان در شکل ۲ آمده است.

همانطور که در شکل مشاهده می‌شود یک افزایش در

شدت فلورسانس وابسته به زمان در نمونه‌ی آلفا-لاکتالبومین

احیا شده توسط DTT مشاهده می‌شود، در حضور عصاره-

ی چای ترش از شدت فلورسانس کاسته شده و با افزایش

غلظت عصاره این کاهش شدت فلورسانس بیشتر می‌شود

که نشان دهنده‌ی اثر محافظتی عصاره گیاه چای ترش در

جلوگیری از تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی در پروتئین

آلفا-لاکتالبومین است.

این اثر با محاسبه ثابت سرعت نیز تایید می‌شود. چنانچه

جدول ۲ نشان می‌دهد، در عدم حضور عصاره ثابت سرعت

تشکیل آمیلوئید در آلفا-لاکتالبومین برابر با 10^{-1} min^{-1}

(0.345 ± 0.003) بود و با افزودن عصاره با نسبت 0.25

: 1 وزنی : وزنی عصاره نسبت به پروتئین، مقدار ثابت

سرعت به 10^{-1} min^{-1} (0.321 ± 0.005) کاهش یافت.

با افزودن غلظت عصاره به نسبت 0.5 : 1 و 1 : 1 عصاره

نسبت به پروتئین، این مقدار بترتیب به 10^{-1} min^{-1}

(0.295 ± 0.014) و 10^{-1} min^{-1} (0.200 ± 0.002)

رسید. که نشان می‌دهد عصاره‌ی چای ترش سرعت

جدول ۲- خلاصه‌ای از ثابت‌های سرعت آلفا-لاکتالبومین در حضور غلظت‌های مختلف عصاره چای ترش با استفاده از بررسی تیوفلاوین T. ثابت‌های سرعت با استفاده از نرم افزار سیگما پلات محاسبه شده است. انحراف استاندارد از محاسبات به دست آمده از سیگما پلات محاسبه شده است.

ترکیبات نمونه	ثابت سرعت $\times 10^{-1} \text{ (min}^{-1}\text{)}$
آلفا-لاکتالبومین	0.345 ± 0.003
آلفا-لاکتالبومین + عصاره‌ی چای ترش (۱ : ۰/۲۵)	0.321 ± 0.005
آلفا-لاکتالبومین + عصاره‌ی چای ترش (۱ : ۰/۵)	0.295 ± 0.014
آلفا-لاکتالبومین + عصاره‌ی چای ترش (۱ : ۱)	0.200 ± 0.002

های دی‌سولفیدی استفاده شده است. نمونه‌ها به مدت ۳ ساعت در دمای 37°C انکوبه شده‌اند.

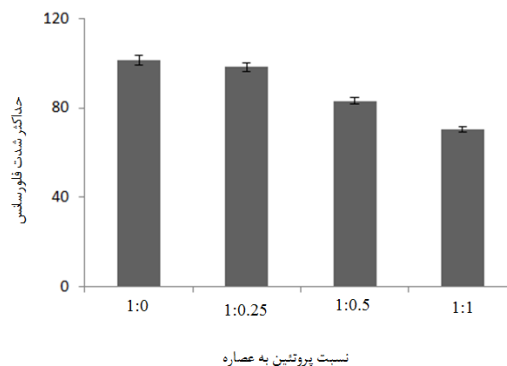
جدول ۳- درصد بازداری از تجمع پروتئین آلفا-لاکتالبومین توسط غلظت‌های مختلف عصاره‌ی چای ترش.

ترکیبات نمونه	درصد بازداری
آلفا-لاکتالبومین + عصاره‌ی چای ترش (۱ : ۰/۲۵)	۳/۰۵
آلفا-لاکتالبومین + عصاره‌ی چای ترش (۱ : ۰/۵)	۱۹
آلفا-لاکتالبومین + عصاره‌ی چای ترش (۱ : ۱)	۳۰/۷۹

بررسی اتصال ۸- آنیلینو -۱- نفتالن- سولفونیک اسید (ANS) به آلفا-لاکتالبومین در حضور و عدم حضور عصاره‌ی چای ترش: تکنیک اتصال ANS جهت بررسی تغییرات نواحی هیدروفوب در معرض قرار گرفته ی پروتئین آلفا-لاکتالبومین در عدم حضور و حضور غلظت‌های مختلف عصاره ی چای ترش استفاده شد. پروتئین آلفا-لاکتالبومین احیا شده اتصال بالایی نشان می‌دهد درحالی‌که نتایج نشان داد که افزایش عصاره‌ی گیاه چای ترش باعث کاهش فلورسانس ANS پروتئین شده و با افزایش میزان غلظت عصاره روند کاهش فلورسانس ANS ادامه می‌یابد. چنانچه در شکل ۴ مشاهده می‌شود، افزودن عصاره با نسبت ۰/۲۵ : ۱ موجب کاهش ۱۹/۲۳ درصدی در شدت فلورسانس شده و با افزایش نسبت عصاره به ۰/۵ : ۱ و ۱ : ۱ وزنی/ وزنی، بترتیب کاهش ۲۹/۷۶ و ۳۵/۱۸ درصدی در شدت فلورسانس مشاهده می‌شود. این کاهش در شدت فلورسانس نشان دهنده‌ی تاثیر عصاره در جلوگیری از برهمکنش بین نواحی هیدروفوب پروتئین و ANS است. به لحاظ آماری از

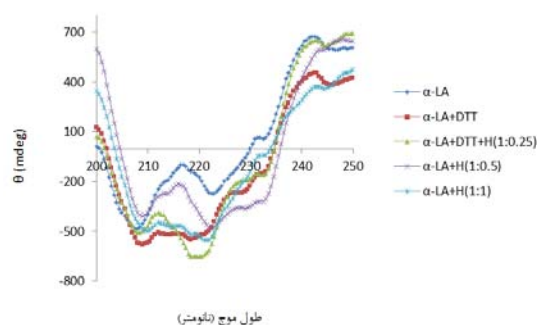
چنانچه در شکل ملاحظه می‌شود، مطابق با جدول ۳، پروتئین آلفا-لاکتالبومین فلورسانسی در حدود ۱۰۰ نشان می‌دهد. در حضور عصاره با نسبت ۰/۲۵ : ۱ وزنی/ وزنی عصاره : پروتئین، کاهش ۳/۰۵ درصدی در شدت فلورسانس مشاهده شد و با افزایش نسبت عصاره به ۰/۵ : ۱ و ۱ : ۱ وزنی/ وزنی عصاره : پروتئین این کاهش بترتیب به ۱۹ درصد و ۳۰/۷۹ درصد رسید.

به لحاظ آماری از آنجایی‌که t محاسبه شده بوسیله‌ی نرم-افزار SPSS بین ستون‌های مربوط به پروتئین در عدم حضور عصاره و در حضور عصاره با نسبت ۱ : ۰/۲۵، برابر ۰/۰۳، بین ستون‌های مربوط به نسبت‌های ۱ : ۰/۲۵ و ۱ : ۰/۵ برابر ۰/۰۱۶، و در ستون‌های مربوط به نسبت-های ۱ : ۰/۵ و ۱ : ۱ برابر ۰/۰۲، در سطح اطمینان ۹۵٪ نمودار کوچکتر از مقدار بحرانی جدول T می‌باشد که معنا دار بودن تفاوت مشاهده شده را نشان می‌دهد.



شکل ۳- ماکزیم شدت فلورسانس ذاتی α -لاکتالبومین ($10 \mu\text{M}$) در حضور عصاره گیاه چای ترش (با نسبت‌های وزنی ۰/۲۵ : ۱، ۰/۵ : ۱ و ۱ : ۱). نمونه‌ها در بافر ۵۰ mM فسفات، NaN_3 ۰/۰۵٪ و pH برابر ۷/۴ تهیه شدند و از ۲۰ mM DTT به عنوان احیا کننده‌ی پیوند-

شده است که تغییر کنفورماسیونی از هلیکس آلفا به صفحات بتا منجر به ایجاد ساختارهای آمیلوئیدی می شود (۱۲). با اضافه کردن عصاره گیاه چای ترش افزایش پیکهای منفی در ۲۰۸ و ۲۲۲ نانومتر مشاهده شد و با افزایش غلظت عصاره به ۰/۵ : ۱ و ۱ : ۱ وزنی : وزنی پروتئین : عصاره، افزایش سیگنال منفی در ۲۲۰-۲۲۲ نانومتر مشاهده شد که نشان دهنده ی پایداری افزایش یافته نواحی آلفا هلیکس و بیانگر اثر حفاظتی عصاره گیاه چای ترش در جلوگیری از تشکیل فیبریل های آمیلوئیدی در پروتئین آلفا-لاکتالبومین است. چنانکه در جدول ۴ مشاهده می شود، محتوای کنفورماسیون هلیکس آلفا از ۲۲/۸ درصد به ۲۵/۲ درصد افزایش یافت در حالیکه محتوای صفحات بتا از ۴۶/۲ درصد به ۳۱/۲ درصد کاهش پیدا کرد.

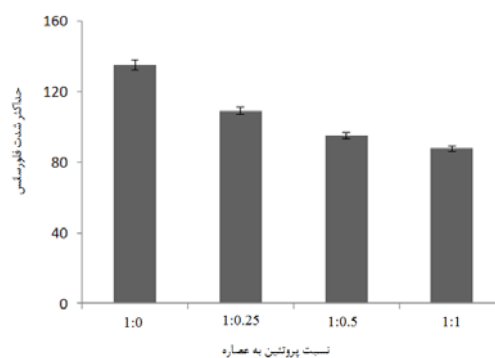


شکل ۵- طیف Far-UV CD پروتئین آلفا-لاکتالبومین در حالت ذاتی، حالت کاهش یافته در حضور DTT و در حضور غلظت های مختلف عصاره گیاه چای ترش (با نسبت های وزنی ۰/۲۵ : ۱، ۰/۵ : ۱ و ۱ : ۱ عصاره : پروتئین). غلظت پروتئین ۰/۲ mg/ml در بافر فسفات mM ۱۰ و pH ۷ و دمای ۳۷°C در اسپکتروپلاریمتر JASCO J180 با سلی به طول مسیر ۱cm

بحث

به دلیل عوارض جانبی بسیار پایین تر گیاهان دارویی اخیرا توجه زیادی بر روی آنها به عنوان عوامل محافظتی معطوف شده است. در این پژوهش برای اولین بار است که اثرات گیاه چای ترش بر روی تجمع پروتئین بررسی می شود.

آنجاییکه مقادیر t محاسبه شده بوسیله نرم افزار SPSS بین ستون های مربوط به پروتئین در عدم حضور عصاره و در حضور عصاره با نسبت ۱ : ۰/۲۵ برابر ۱/۰۳، بین ستون های مربوط به نسبت های ۱ : ۰/۲۵ و ۱ : ۰/۵ برابر ۰/۳۷، و بین ستون های مربوط به نسبت های ۱ : ۰/۵ و ۱ : ۱ برابر ۰/۴۵، در سطح اطمینان ۹۵ درصد نمودار کوچکتر از مقدار بحرانی جدول T می باشد که معنا دار بودن تفاوت مشاهده شده را نشان می دهد.



شکل ۴- نمودار ستونی نشر فلورسانس آلفا-لاکتالبومین (۱۰ μM) در حضور نسبت های وزنی مختلف عصاره گیاه چای ترش (۰/۲۵ : ۱، ۰/۵ : ۱ و ۱ : اعصاره : پروتئین). رنگ ANS ۴ μM استفاده شده است. بافر فسفات حاوی سدیم آزید NaN₃ ۰/۰۵٪ و pH برابر ۷/۴ است. از DTT به عنوان احیا کننده ی پیوندهای دی سولفیدی استفاده شده است

ارزیابی طیف Far-UV CD از آلفا - لاکتالبومین در حضور غلظت های مختلف عصاره گیاه چای ترش: چنانچه قبلا ثابت شده است طیف Far-UV CD پروتئین آلفا-لاکتالبومین در حالت طبیعی دارای دو پیک منفی در ناحیه ی ۲۰۸ و ۲۲۲ نانومتر است که نشان دهنده ی وجود هلیکس آلفا است (۲۱). شکل ۵ نشان می دهد که با اضافه کردن دی تیوتریتول و احیای باندهای دی سولفیدی، باندهای منفی مربوط به هلیکس آلفا کاهش یافته و یک پیک منفی در ناحیه ی ۲۱۸ نانومتر ایجاد شده است که نشان دهنده وجود صفحات بتا است. بنابراین یک تغییر ساختار از هلیکس آلفا به ساختار دارای صفحه بتا در حالت احیا شده آلفا-لاکتالبومین مشاهده می شود. گزارش

جدول ۴- ساختار دوم پیش‌بینی شده از طیف Far-UV آلفا-لاکتالبومین در حضور عصاره‌ی چای ترش با استفاده از برنامه‌ی JASCO

نمونه	% ماریچ آلفا	% صفحات بتا	% پیچ‌های بتا	% کلاف‌بختانه
آلفا لاکتالبومین	۳۰/۱	۳۷/۲	۹/۱	۲۸/۶
آلفالاکتالبومین+ DTT	۲۲/۸	۴۶/۲	۱۵/۴	۲۹/۶
آلفالاکتالبومین+DTT+عصاره	۲۵/۲	۳۱/۲	۱۱/۲	۳۲/۴

نتایج حاصل از بررسی میزان اسپکتروسکوپی نور مرئی نشان داد که میزان جذب نوری پروتئین در عدم حضور عصاره در مقایسه با نمونه دارای عصاره بسیار بیشتر می‌باشد. بالا بودن میزان جذب نوری می‌تواند ناشی از تجمع پروتئین باشد. با افزوده شدن عصاره‌ی گیاه میزان جذب کاهش یافت که احتمالاً ناشی از اتصال ترکیبات آنتی-اکسیدانی گیاه (احتمالاً از طریق مقادیر بالای آسکوربیک اسید، بتا کاروتن و ترکیبات فنولی و به خصوص آنتوسیانین‌ها) به سطوح هیدروفوبیک پروتئین در جهت ممانعت از تجمع آن باشد. چنانچه پیش از این تاثیر ترکیبات فلاونوئیدی و آسکوربیک‌اسید در افزایش توانایی آنتی‌اکسیدانی بر علیه تنش‌های اکسیدتیو مختلف نشان داده شده است (۳۱).

به دنبال آن جهت بررسی تأثیر عصاره در جلوگیری از تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی در آلفا-لاکتالبومین، از روش فلورسانس ThT استفاده شد.

داده‌های حاصل از آزمایش فلورسانس ThT بر روی تشکیل آمیلوئید در پروتئین آلفا-لاکتالبومین نشان می‌دهند که افزایش شدت فلورسانس پروتئین احیا شده با DTT در pH طبیعی (۷/۴)، نتیجه‌ی تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی می‌باشد. با توجه به ثابت‌های سرعت به دست آمده مشاهده شد که عصاره‌ی چای ترش سرعت تشکیل آمیلوئید در آلفا-لاکتالبومین را کاهش می‌دهد. این احتمال داده شد که این اثر از طریق واکنش عصاره با نواحی هیدروفوب پروتئین آلفا-لاکتالبومین اعمال شود. به دنبال

این فرضیه مطالعات فلورسانس در حضور عصاره‌ی چای ترش بر روی پروتئین آلفا-لاکتالبومین انجام شد.

آزمایش‌های انجام شده به وسیله‌ی فلورسانس ذاتی آلفا-لاکتالبومین نشان می‌دهد که در حضور دی‌تیوتریتول ساختار پروتئین باز شده و اسیدهای آمینه آروماتیک که به علت داشتن گروه‌های هیدروفوب در محلول در داخل پروتئین قرار گرفته بودند به سطح پروتئین منتقل می‌شوند و به این دلیل است که افزایش در شدت فلورسانس مشاهده می‌شود (۱۲). نتایج فلورسانس ذاتی بر روی پروتئین احیا شده در حضور و عدم حضور عصاره‌ی گیاه چای ترش نشان داد ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در عصاره‌ی گیاه چای ترش می‌تواند با تاثیر گذاری بر محیط اطراف ریشه‌های تریپتوفان مانع از در معرض قرارگیری آنها در حلال شده و در نتیجه شدت فلورسانس ذاتی در نمونه‌های دارای عصاره کاهش می‌یابد و افزایش میزان عصاره گیاه باعث کاهش بیشتر فلورسانس ذاتی می‌شود.

در تایید نتایج فلورسانس ذاتی مطالعات ANS نیز نشان می‌دهد که آلفالاکتالبومین با اضافه شدن DTT فلورسانس رو به افزایش دارد و تا زمانی که سطوح هیدروفوب این پروتئین از این کروموفور اشباع نشده باشند، این افزایش فلورسانس ادامه می‌یابد. در حالیکه در حضور عصاره‌ی گیاه چای ترش مشاهده شد که سطوح هیدروفوب در معرض قرار گرفته کاهش یافتند و با افزایش میزان عصاره این کاهش بیشتر شد که این کاهش احتمالاً می‌تواند نتیجه‌ی تاثیر ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از طریق اتصال و محافظت از مناطق هیدروفوب در مقابل حلال بوده و این عامل یعنی

بر روی تجمع پروتئین‌ها پرداخت. همچنین می‌توان این اثرات را بر روی پروتئین‌های دخیل در بیماری‌های تجمعی و یا بر روی مدل‌های آزمایشگاهی بررسی نمود.

جمع بندی

به طور خلاصه این نتایج ثابت می‌کند که عصاره‌ی گیاه چای ترش دارای اثر محافظتی در جلوگیری از تجمع و تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی در پروتئین آلفا-لاکتالبومین بوده و با افزایش غلظت عصاره این اثرات بیشتر می‌شود. این اثر محافظتی احتمالاً از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در گیاه (مقادیر بالای آسکوربیک اسید، بتا کاروتن و ترکیبات فنولی و به خصوص آنتوسیانین‌ها) ناشی می‌شود. و می‌توان احتمال داد که عصاره با اتصال به نواحی آبگریز پروتئین، مانع از ایجاد برهم‌کنش‌های هیدروفوب-هیدروفوب پروتئین و تجمع آن می‌شود.

کاهش سطوح هیدروفوب در معرض می‌تواند از تشکیل تجمعات پروتئینی جلوگیری کند.

موافق با نتایج فلورسانس، نتایج اسپکتروسکوپی CD در far-uv نشان داد که در حضور DTT ساختارهای دوم هلیکس آلفا به میزان زیادی کاهش و صفحات بتا افزایش یافتند. در حضور عصاره‌ی چای ترش اما تغییر کمی در ساختار دوم پروتئین نسبت به حالت طبیعی مشاهده شد که بیانگر اثر حفاظتی عصاره‌ی گیاه چای ترش در جلوگیری از تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی در پروتئین بوده و تاثیر مثبت عصاره در جلوگیری از تغییرات ساختار دوم آلفا-لاکتالبومین را نشان می‌دهد.

با توجه به اثر ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در عصاره‌ی گیاه چای ترش در جلوگیری از تجمع پروتئین و تشکیل آمیلوئید، می‌توان به جداسازی و شناسایی ترکیبات موجود در عصاره این گیاه و بررسی اثر هر کدام از این ترکیبات

منابع

- ۱- آزاده نجار خدابخش، نادر چاپارزاده. ۱۳۹۴. نقش آسکوربیک اسید در تقلیل اثرات اکسیداتیو شوری روی گیاه شاهی. مجله‌ی پژوهش‌های گیاهی (مجله‌ی زیست‌شناسی ایران). ۲۸(۱).
- ۲- صندوق داران، م. ۱۳۷۹. گزارش پیرامون کشت آزمایشی گیاهان چاه ترش در چاه نیمه زابل، معاونت آموزش و تحقیقات مرکز تحقیقات منابع طبیعی و امور دام استان سیستان و بلوچستان.
- 3- نرگس خانپور اردستانی، مظفر شریفی، مهرداد بهمنش. ۱۳۹۳. اثر متیل جاسمونات بر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در کشت سلول *Scrophularia straita Boiss*. مجله‌ی پژوهش‌های گیاهی (مجله‌ی زیست‌شناسی ایران). ۲۷(۵).
- 4- Augustine, M., Olusola, Adesayo, L., Olusola, Bada, Fredrick, O. 2012. Comparative Study on the Effect of *Hibiscus sabdariffa* Calyx Anthocyanins and Ascorbate on 2,4-Dinitrophenylhydrazine-induced Damage in Rabbits, American Journal of Biochemistry, 2(2), PP. 1-6.
- 5- Booth DR, Sunde M, Bellotti V, Robinson CV, Hutchinson WL, Fraser PE, Hawkins PN, Dobson CM, Radford SE, Blake CCF, Pepys MB. 1997. Instability, unfolding and aggregation of human lysozyme variants underlying amyloid fibrillogenesis. Nature 385:787-793.
- 6- Brew, K., et al. 1967. Comparison of the amino acid sequence of bovine α -lactalbumin and hens egg white lysozyme. J. Biol. Chem., 242(16), 3747-3749.
- 7- Carver JA, Guerreiro KN, Nicholls A, Truscott RJW. 1995. Small stress proteins. Biochim Biophys Acta 1252:251-260.
- 8- Carver JA, Lindner RA, Lyon C, Canet D, Hernandez H, Dobson CM, Redfield C. 2002. Biochim Biophys Acta, The interaction of the molecular chaperone. J Mol Biol 318:815-827.
- 9- Christopher M. Dobson. 2004. Experimental investigation of protein folding and misfolding. Methods.; 34:4-14.
- 10- Creighton, T. E. & Ewbank, J. J. 1994. Disulfide rearranged molten globule state of α -lactalbumin. Biochemistry, 33, 1534-1538.
- 11- Dolgikh, D. A., Gilmanshin, R. I., Brazhnikov, E. V., Bychkova, V. E., Semisotnov, G. V., Venyaminov, S. Y. & Ptitsyn, O. B. 1981. α -Lactalbumin: compact state with fluctuating

- tertiary structure. FEBS Letters, 136, (2), 311-315.
- 12- Ghahghaei, A., Divsalar, A., Faridi, N. 2010. The Effects of Molecular Crowding on the Amyloid Fibril Formation of α -Lactalbumin and the Chaperone Action of α -Casein. *Protein J*, 29:257-264.
- 13- Goers J, Permyakov SE, Uversky VN, Fink LA. 2002. α -Lactalbumin conformational prerequisites for α -lactalbumin fibrillation. *Biochem J*, 361:12546-12551.
- 14- Hatter, D.M., Linder, R.A. and Howlett, J.G. 2001. The molecular chaperone, α -crystallin, inhibits amyloid formation by apolipoprotein CII. *Biol. Chem.* 276, pp. 33755-33761.
- 15- Norhaizan, M., Fong, S. H., Ismail, A., Yee, C. L. 2010. Antioxidant activity in different parts of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extracts and potential exploitation of the seeds, *Food Chemistry* 122, pp. 1055-1060.
- 16- Okazaki, A., Ikura, T., Nikaido, K., and Kuwajima, K. 1994. The chaperonin GroEL does not recognize apo- α -lactalbumin in the molten Globule state. *Nature Struct. Biol.* 1, 439-446.
- 17- Pau-Ling, T., Salmah, Y., Suhaila, M. 2002. Antioxidative properties of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) in linoleic acid model system. *Nutrition & Food Science* ISSN, pp. 0034-6659.
- 18- Ren, J., et al. 1993. α -lactalbumin possesses a distinct zinc binding site. *J. Biol. Chem.*, 268(26), 19292-19298.
- 19- Rochet, J.C, Lansbury, P.J. 2000. Amyloid fibrillogenesis: Themes and variations. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 10, 60-68.
- 20- Veprintsev, D. B., et al. 1997. Cooperative thermal transitions of bovine and human apo- α -lactalbumins: evidence for a new intermediate state. *FEBS Lett.*, 412(3), 625-628.
- 21- Wijesinha-Bettoni, R., Gao, C., JenKins, A.J., Mackie, R.A., Wilde, J.P., Mills, C.N.E., Smith, L. 2007. Heat Treatment of bovine α -Lactalbumin Results in Partially Folded, Disulfide Bond Shuffled States with Enhanced Surface Activity. *Biochemistry*, Vol. 46, pp. 9774-9784.
- 22- Yadong, Qi, Chin, L. Malekian, F. Berhane, M. Gager, J. 2005. Biological Characteristics, Nutritional and Medicinal Value of Roselle, *Hibiscus Sabdariffa*, CIRCULAR – Urban Forestry Natural Resources and Environment 604.
- 23- Yurdiansyah, A., Suhartanti, D., Dahlan, A. 2012. Test Activities Antifungal Methanol Extract Red Flowers Rosella Calyx (*Hibiscus sabdariffa* L.) on *Candida albicans*, As In Vitro, and Screening Phytochemicals. *IC-GWBT2012*, PP. 23-24.

Investigation the protective ability of *H. sabdariffa* aqueous extract on the aggregation of α -lactalbumin

Rahimi Sh. and Ghahghaei A.

Biology Dept., Faculty of Science, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, I.R. of Iran

Abstract

protein aggregates generated by different reason, cause many diseases in humans and other organisms. Finding proper ways to stabilize or prevent of protein aggregation could be important. *H. sabdariffa* is a good source of natural antioxidants which may protect the body from damage effected by free radicals. This study examined the effect of aqueous extract of *H. sabdariffa* on the aggregation of reduced α -lactalbumin. The chaperone properties of *H. sabdariffa* extract on protein aggregation were determined by measuring light scattering absorption, thioflavin T binding assay, fluorescence, and circular dichroism (CD) spectroscopy. Visible absorption spectroscopy and ThT fluorescence results shows that *H. sabdariffa* extract prevent protein aggregation and amyloid formation in a concentration-dependent manner. According to the results of Fluorescence Spectroscopy, *H. sabdariffa* extract interact with hydrophobic area of protein and inhibit aggregation. CD spectroscopy results shows that DTT caused changes in secondary structure of protein and in the presence of extract, fewer changes observed. Our finding suggests the possibility of using *H. sabdariffa* extract as a potential agent for inhibition of protein aggregation in various disease.

Key words *H. sabdariffa* α -lactalbumin protein aggregation