

## بررسی اثر عصاره جفت بلوط بر روند شکل‌گیری تجمعات آمیلوئیدی و تجمع‌زدایی فیبرهای پروتئین لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ

معصومه فرامرزیان و دکتر سیف‌اله بهرامی‌کیا\*

ایران، خرم‌آباد، دانشگاه لرستان، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۷/۰۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۲۴

### چکیده

در شرایط نرمال فیزیولوژیکی، پروتئین‌ها عمدتاً دارای ساختار کروی و محلول در آب هستند. در برخی شرایط پروتئین‌ها به ساختارهایی بنام فیبریل‌ها یا پلاک‌های آمیلوئیدی که نامحلول و بیماری‌زا هستند تبدیل می‌شوند. در این مطالعه، اثرات عصاره هیدروالکلی جفت بلوط ایرانی (*Quercus brantii*) بر شکل‌گیری فیبریل‌های لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ و همچنین اثر این عصاره بر حذف فیبریل‌های از پیش شکل‌گرفته بررسی شده است. به همین منظور لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ در حضور و غیاب عصاره هیدروالکلی جفت بلوط در دمای ۶۰°C بمدت ۱۵ روز انکوبه شد. اثر عصاره با استفاده از آزمون‌های اتصال CR، طیف سنجی CD و تست فلورسانس THT و ANS و میکروسکوپ FE-SEM مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که عصاره جفت بلوط در تمامی نسبت‌های مورد آزمایش دارای اثر مهار بر شکل‌گیری فیبریل‌های آمیلوئید است. همچنین عصاره جفت بلوط اثر تسریع‌کننده بر تجمع‌زدایی فیبریل‌های آمیلوئیدی دارد و بیشترین اثر بر تجمع‌زدایی فیبریل‌های در نسبت ۱:۰/۵ عصاره به فیبریل مشاهده می‌شود. از نتایج بدست آمده در این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که جفت بلوط حاوی ترکیباتی است که می‌تواند بعنوان عوامل موثر در تهیه داروها برای حذف پلاک‌های آمیلوئیدی در درمان بیماری‌های وابسته به آمیلوئید بکار گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: *Quercus brantii*، عصاره بلوط، فیبریل‌های آمیلوئید، بیماری‌های آمیلوئیدی، پلاک‌های آمیلوئیدی، لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ، HEWL

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۶۶۶۱۴۰۸۲، پست الکترونیکی: bahramikia.s@lu.ac.ir

### مقدمه

متفاوتی در نظر گرفته شده است. از جمله این رویکردها می‌توان به مواردی مانند استفاده از مهارکننده‌های مولکولی کوچک (۱۸)، استفاده از پپتیدهای مینی‌چاپرون مصنوعی (۲۹)، پیوند بافت آسیب دیده (۳۰)، تثبیت ساختار فرم محلول پروتئین، ژن درمانی در مواردی که بیماری آمیلوئیدی منشاء ژنتیکی داشته باشد (۱۶)، مهار تولید پروتئین آمیوئیدوژنیک یا پیش‌سازهای آن، مهار شکسته-شدن پروتئین‌های پیش‌ساز و تبدیل شدن آن‌ها به فرم‌های آمیلوئیدوژنیک در پروتئین‌هایی مثل آمیلوئید بتا (Aβ) و

در شرایط بیماری‌زا مانند جهش، استرس، تب و افزایش سن؛ پروتئین‌های از اشکال طبیعی خود خارج شده و در شکل پلاک‌ها (فیبریل‌های) آمیلوئیدی تجمع می‌یابند. این اشکال نامحلول پروتئینی که غنی از ساختارهای ثانویه صفحات بتا هستند با تجمع در اندام‌های مختلف مانند مغز، روده، کلیه و غیره موجب بیماری‌های مختلف مانند آلزایمر، آتاکسی مغزی-نخاعی، آنسفالوپاتی اسفنجی و غیره می‌شوند (۱۴ و ۱۹). برای پیشگیری یا درمان بیماری‌های آمیلوئیدی رویکردهای

ایمونوتراپی مبتنی بر آنتی‌بادی (۱۷) اشاره نمود.

مهارکننده‌های مولکولی کوچک عامل‌های بالقوه برای درمان مکانیسم‌های پایه این بیماری‌ها هستند که بر مسیرهای مختلف تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی تأثیر می‌گذارد (۲۰). گروهی از ترکیبات مولکولی کوچک، پلی‌فنول‌ها و فلاونوئیدها هستند که در غلظت‌های بالا در گیاهان وجود دارند. فنل‌ها عمدتاً نه تنها دارای اثرات ضد آمیلوئیدوژنیک‌اند، بلکه اثرات بی‌ثبات‌کننده‌ای بر فیبریل‌های آمیلوئید (تبدیل فیبریل به تجمعات بی‌شکل) دارند. مکانیسم بی‌ثبات نمودن فیبریل‌ها احتمالاً متفاوت از مکانیسم مهار تشکیل آمیلوئید است (۱۱، ۱۸ و ۲۳).

امروزه علاقه زیادی به استفاده از داروهای طبیعی و گیاهان دارویی بعثت داشتن کمترین عوارض جانبی و تحمل بیشتر در مقایسه با داروهای مصنوعی، وجود دارد. از سوی دیگر همانطور که اشاره شد گیاهان دارای مقادیر بالای فنول‌ها و فلاونوئیدها هستند. از اینرو در مطالعات بسیاری تأثیر گیاهان دارویی بر درمان بیماری‌های وابسته به آمیلوئید مورد بررسی قرار گرفته است که از جمله آنها می‌توان به بررسی اثر عصاره گیاهان *Cassia tora* Linn، *Ginkgo biloba*، *Withania somnifera* عصاره سیر و پلی‌فنول‌های موجود در چای سبز اشاره نمود (۲۲، ۱۳، ۲۶، ۳۳-۳۲).

درخت بلوط (*Quercus*) از اعضای خانواده راش (*Fagaceae*) است (۲۵). یکی از گونه‌های درخت بلوط گونه *Quercus brantii* (بلوط فارسی یا بلوط زاگرس) می‌باشد که درختی با ارتفاع تقریبی ۲۰ متر دارای یک تاج بزرگ کروی است. برگ‌های این درخت تخم‌مرغی شکل با حاشیه‌های دندانی‌اند. میوه آن بیضوی کشیده است که در کاسه سفید مخروطی شکل قرار دارد (۳۱).

پوسته میوه بلوط ایرانی (جفت) بعنوان داروهای ضد اسهال در طب سنتی مورد استفاده قرار می‌گیرند. عصاره جفت دارای اثر ضد باکتری و بهبود زخم است. ترکیبات

فنولی و آنتی‌اکسیدانی موجود در قسمت‌های مختلف درخت بلوط بر کاهش علائم مربوط به اختلالات عصبی، آلزایمر و دیابت موثر است (۸، ۱۵ و ۲۵).

با توجه به جنبه‌های بالینی جفت بلوط و نظر بحضور مقادیر بالای فنول‌ها و فلاونوئیدها در گیاهان، در این مطالعه عصاره هیدروالکلی جفت بلوط بمنظور بررسی اثرات احتمالی آن بر درمان بیماری‌های وابسته به آمیلوئید مورد بررسی قرار گرفت و لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ (HEWL: Hen egg-white lysozyme) بعنوان پروتئین مدل استفاده شد.

### مواد و روشها

**مواد:** لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ (HEWL)، تیوفلاوین T (THT: Thioflavin T)، آنیلینو نفتالن ۸- سولفونیک اسید (ANS: Anilinonaphthalene-8-sulfonic acid)، قرمز کنگو (CR: Congo red)، کاتچین و گالیک اسید از شرکت سیگما؛ 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 ( $\text{NaN}_3$ )، سدیم کلراید (NaCl)، آلومینیوم کلراید ( $\text{AlCl}_3$ )، فولین سیوکالتیو (FCR: Folin-Ciocalteu)، اسید هیدروکلریک (HCl)، سدیم نیتريت ( $\text{NaNO}_2$ ) و سدیم هیدروکسید (NaOH) از شرکت مرک؛ الکل اتیلیک طبی ۹۶ درصد حجمی از شرکت الکل نصر

**تجهیزات:** دستگاه اسپکتروفلوریمتری (Fluorescence Spectrophotometer) مدل Cary-Eclipse ساخت شرکت Agilent، دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل FE-SEM (Field-emission Scanning Electron Microscope) 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)، پی اچ متر

## ساخت شرکت WinLab

**تهیه عصاره گیاهی:** دانه بلوط فارسی از پارک جنگلی شورآب واقع در کوهپایه‌های زاگرس شهرستان خرم‌آباد در استان لرستان جمع‌آوری شد. دانه بلوط در سایه خشک و سپس جفت آن جدا شد. عصاره هیدروالکلی جفت طی ۴ مرحله (در دو مرحله اول با اتانول ۸۰ درصد و در دو مرحله دوم با اتانول ۷۰ درصد) استخراج گردید. عصاره حاصل بوسیله دستگاه روتاری تغلیظ و در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در آون خشک شد.

**تعیین محتوای فنولی عصاره‌ی جفت:** محتوای فنولی عصاره با استفاده از معرف فولین سیوکالتیو (FCR) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (۲۷). غلظت ۱۰ تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر گالیک‌اسید برای طراحی منحنی استاندارد استفاده شد. برای این منظور، ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره با ۲/۵ میلی‌لیتر FCR (رقیق شده به نسبت ۱:۱۰) و سپس با ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم (۷/۵ درصد) مخلوط شد. مخلوط نهایی بمدت ۹۰ دقیقه در دمای اتاق، در تاریکی انکوبه گردید. جذب نمونه‌ها در ۷۶۵ نانومتر، با استفاده از میکروپلیت ریدر خوانده شد. این روش هم‌زمان برای غلظت‌های مختلف گالیک‌اسید انجام و نتایج بر حسب میلی‌گرم گالیک‌اسید در هر گرم وزن خشک عصاره بیان شد.

**تعیین محتوای فلاونوئیدی عصاره‌ی جفت:** محتوای فلاونوئیدی عصاره با استفاده از معرف آلومینیوم کلراید مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (۳۴). غلظت ۱۰ تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کاتچین برای طراحی منحنی استاندارد مورد استفاده قرار گرفت. برای این منظور، ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره با ۲ میلی‌لیتر آب مقطر و سپس با ۰/۱۵ میلی‌لیتر محلول  $\text{NaNO}_2$  (۱۵ درصد) مخلوط شد. پس از ۶ دقیقه، ۰/۱۵ میلی‌لیتر محلول  $\text{AlCl}_3$  (۱۰ درصد) اضافه شد. بعد از ۶ دقیقه، ۲ میلی‌لیتر محلول  $\text{NaOH}$  (۴ درصد) اضافه و سپس بلافاصله ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه

شد. مخلوط نهایی بمدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. جذب نمونه‌ها در ۵۱۰ نانومتر، با استفاده از میکروپلیت ریدر خوانده شد. این روش هم‌زمان برای غلظت‌های مختلف کاتچین انجام شد. نتایج بر حسب میلی‌گرم کاتچین در هر گرم وزن خشک عصاره بیان شد.

**تهیه نمونه‌ها:** برای مطالعه اثر عصاره بر روند شکل‌گیری فیبریل‌های آمیلوئیدی، HEWL با استفاده از بافر گلیسین ۵۰ میلی‌مولار (pH 2.2) در غلظت ۱۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. سپس میکروتیوپ‌های حاوی محلول پروتئین در غیاب و حضور عصاره (نسبت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ عصاره تام به ۱ پروتئین) در داخل حمام آب-بدون همزده شدن محلول- در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد بمدت ۱۵ روز انکوبه گردید. جهت مطالعه اثر عصاره بر روند تجمع‌زدایی آمیلوئیدی؛ نمونه فیبریل‌شده در روز پانزدهم، در غیاب و حضور عصاره (نسبت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ عصاره تام به ۱ پروتئین) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بمدت سه روز انکوبه شد (۷).

## روش‌های مطالعه فیبریل‌های آمیلوئیدی

**آزمون اتصال قرمز کنگو (CR):** ابتدا استوک غلیظ CR بوسیله بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار (NaCl ۰/۱۵ میلی‌مولار،  $\text{NaN}_3$  ۰/۰۲ درصد، pH ۷/۴) تهیه شد. سپس ۲/۵ ماکرولیتر از نمونه پروتئین به ۲۰۰ ماکرولیتر از محلول کاری CR (۲۰ ماکرومولار) افزوده و کاملاً مخلوط شد. محلول حاصل بمدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه شد. سپس شدت جذب در طول موج ۷۰۰-۴۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (۲۴).

**تست فلونورسانس تیوفلاوین T (THT):** ابتدا استوک غلیظ THT بوسیله 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

بررسی مورفولوژی ساختاری با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (FE-SEM): پنج میکرولیتر از هر نمونه رقیق شده (بوسیله آب مقطر به میزان ۷۰ برابر) بر روی فویل آلومینیومی قرارداد شد. نمونه‌ها پس از خشک شدن در مجاورت هوا بوسیله لایه‌ای از طلا پوشانده شد و در ولتاژ ۱۵Kev با بزرگنمایی ۹۰kx توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی اسکن شدند.

### نتایج

**محتوی فنولی و فلاونوئیدی عصاره‌ی جفت بلوط: میزان**  
محتوی فنولی و فلاونوئیدی عصاره‌ی هیدروالکلی جفت بلوط در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- محتوی فنولی و فلاونوئیدی عصاره‌ی هیدروالکلی جفت بلوط

نمونه	محتوی فنولی*	محتوی فلاونوئیدی*
جفت بلوط	۱/۵۷ ± ۴۵۴/۴۴	۴/۴۲ ± ۲۷۱/۸۸

\* آزمایشات در سه کنترل انجام و نتایج میانگین سه آزمایش مستقل  $\pm$  SD است، n=۳

همانطور که در شکل ۱- الف مشاهده می‌شود؛ طیف جذب نوری قرمز کنگوی HEWL، ۱۵ روز پس از انکوباسیون در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد افزایش می‌یابد و ماکزیمم جذب نوری آن از ۴۹۰ به ۵۰۰ نانومتر شیفت پیدا می‌کند. این تغییرات بیانگر فیبریل شدن پروتئین لیزوزیم تحت شرایط اسیدی و حرارت بالاست. در نمونه‌هایی که محلول پروتئین حاوی غلظت‌های مختلفی از عصاره جفت بلوط است؛ شرایط اسیدی و حرارت بالا صرفاً منجر به افزایش اندک در شدت جذب نوری قرمز کنگو می‌شود و تغییر در شانه طیف و شیفت به طول موج‌های بالاتر مشاهده نمی‌شود. لذا می‌توان نتیجه گرفت که عصاره جفت بلوط از فیبریل شدن HEWL ممانعت می‌کند و مانع از تکمیل شدن فرآیند شکل‌گیری تجمعات آمیلوئیدی پروتئین می‌شود.

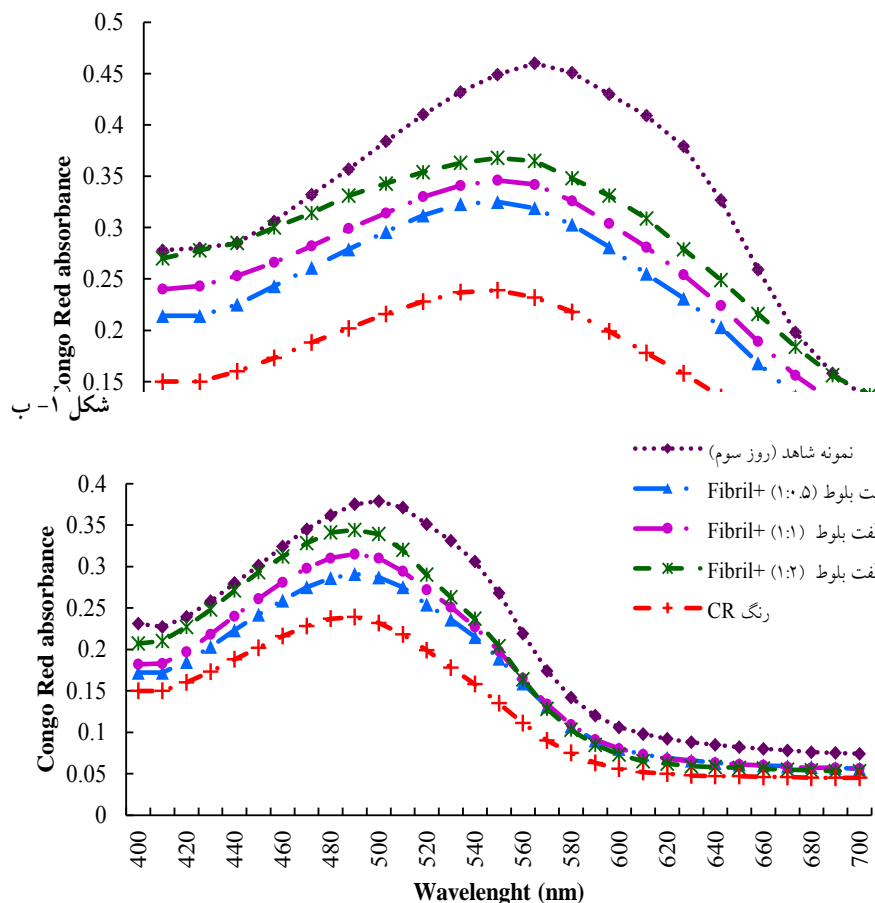
مخلوط شد. شدت فلوروسانس با اسپکتروفلوروسانس در ۴۴۰ excitation و ۶۰۰-۴۶۰ emission و عرض شکاف ۵ و ۱۰ (بترتیب برای excitation و emission) اندازه‌گیری شد (۲۴).

**تست فلوروسانس آنیلینو نفتالن ۸- سولفونیک اسید (ANS):** ابتدا استوک غلیظ ANS بوسیله بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار (NaCl ۰/۱۵ میلی‌مولار، Na<sub>3</sub>N ۰/۰۲ درصد، ۷ pH) 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 فلوروسانس با اسپکتروفلوروسانس در ۳۸۰ excitation و ۶۰۰-۴۲۰ emission و عرض شکاف ۵ برای excitation و emission اندازه‌گیری شد (۹).

مقدار کل ترکیبات فنولی بر اساس میلی‌گرم گالیک اسید در هر گرم وزن خشک عصاره بیان شد. مقدار کل ترکیبات فلاونوئیدی بر اساس میلی‌گرم کاتچین در هر گرم وزن خشک عصاره بیان شد.

**آزمون اتصال قرمز کنگو (CR):** فیبریل‌های آمیلوئیدی دارای جایگاه‌های اتصال جهت مولکول CR هستند. این جایگاه‌ها واقع در سطح صفحات بتای فیبریل‌های آمیلوئیدی است. وقتی CR به فیبریل‌های آمیلوئیدی متصل می‌شود؛ افزایش ماکزیمم جذب در طیف CR مشاهده می‌شود و ماکزیمم جذب نوری آن از ۴۹۰ به ۵۰۰ نانومتر شیفت (red shift) پیدا می‌کند (۲۱). در شکل ۱ با استفاده از آزمون اتصال قرمز کنگو؛ تاثیر عصاره جفت بلوط بر روند شکل‌گیری تجمعات آمیلوئیدی و تجمع‌زدایی فیبرهای HEWL به تصویر کشیده شده است.

شکل ۱- الف



شکل ۱- آزمون اتصال قرمز کنگو در غیاب و حضور غلظت‌های مختلف عصاره جفت بلوط جهت ارزیابی تاثیر عصاره الف) بر روند شکل‌گیری تجمعات آمیلوئیدی HEWL، ۱۵ روز پس از انکوباسیون نمونه‌های پروتئین در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد ب) بر روند تجمع‌زدایی فیبرهای HEWL، سه روز پس از انکوباسیون فیبریل‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد

نشانه‌گر وجود مقادیر بالای فیبرهای آمیلوئیدی در نمونه کنترل است. تحت این شرایط؛ ماکزیمم جذب نوری نمونه‌های انکوبه شده در حضور غلظت‌های مختلف عصاره جفت بلوط از ۵۰۰ به ۴۹۰ نانومتر شیفت (blue shift) پیدا می‌کند. این تغییرات بیانگر اثر این عصاره بر تسریع روند تجمع‌زدایی فیبرهای پروتئین است. بیشترین میزان تاثیر عصاره بر برگشت‌پذیری فیبرهای آمیلوئیدی در نسبت ۱:۰/۵ عصاره به فیبر است. با افزایش غلظت عصاره؛ تاثیر آن بر روند فیبریل‌زدایی کاهش می‌یابد.

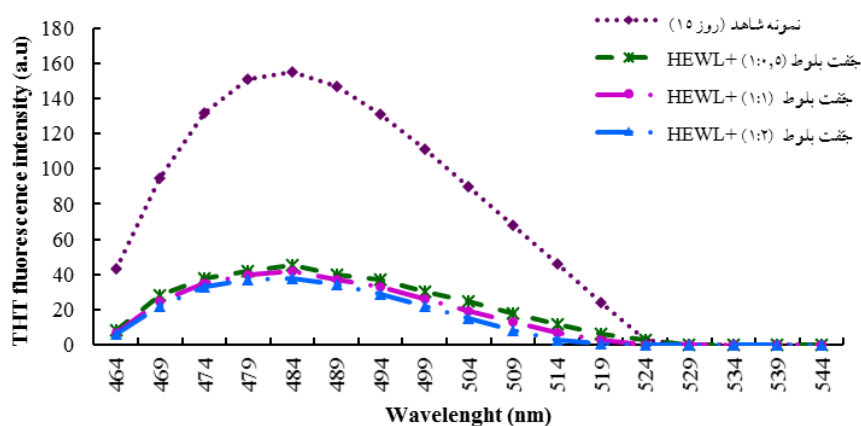
فلوئورسانس **THT**: فیبریل‌های آمیلوئیدی دارای

در مقایسه اثرگذاری غلظت‌های مختلف عصاره؛ با افزایش غلظت میزان مهار روند شکل‌گیری فیبرهای آمیلوئیدی افزایش می‌یابد. بنابراین بهترین غلظت تاثیرگذار عصاره در نسبت ۲:۱ عصاره به پروتئین حاصل می‌شود.

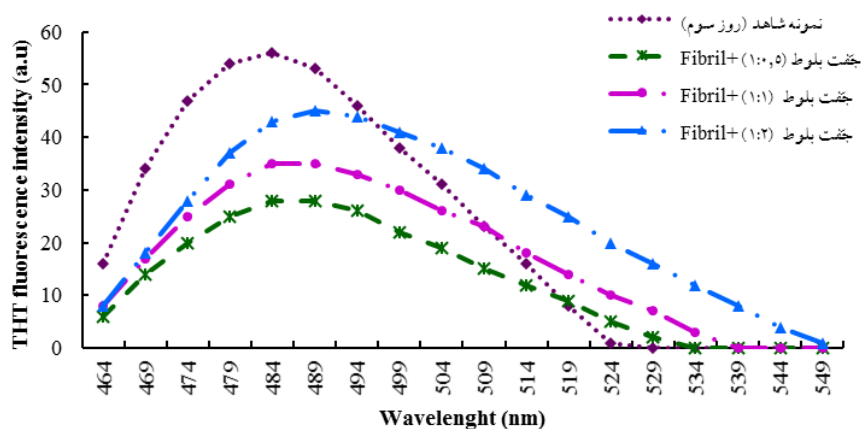
همانطور که در شکل ۱- ب مشاهده می‌شود؛ تحت شرایط برگشت‌پذیری روند شکل‌گیری تجمعات آمیلوئیدی (سه روز پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد)، شدت طیف جذب نوری قرمز کنگوی فیبریل‌های از پیش شکل گرفته لیزوزیم کاهش می‌یابد اما ماکزیمم طیف جذب همچنان در ناحیه ۵۰۰ نانومتر قرار دارد که

جایگاه‌های اتصال جهت پروب فلورسنت THT هستند. این جایگاه‌ها واقع در کانال بین صفحات بتای فیبریل‌های آمیلوئیدی است. زمانی که این ترکیب به ساختار صفحات بتای موجود در فیبرهای آمیلوئید متصل می‌شود؛ شدت فلورسانس THT افزایش می‌یابد (۲۴). در شکل ۲ با استفاده از تست فلورسانس THT؛ تاثیر عصاره جفت بلوط بر روند شکل‌گیری تجمعات آمیلوئیدی و تجمع‌دایی فیبرهای HEWL به تصویر کشیده شده است.

شکل ۲- الف



شکل ۲- ب



شکل ۲- اندازه‌گیری شدت فلورسانس THT در غیاب و حضور غلظت‌های مختلف عصاره جفت بلوط جهت ارزیابی تاثیر عصاره الف) بر روند شکل‌گیری تجمعات آمیلوئیدی HEWL، ۱۵ روز پس از انکوباسیون نمونه‌های پروتئین در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد (ب) بر روند تجمع‌زدایی فیبریل‌های HEWL، سه روز پس از انکوباسیون فیبریل‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد

غلظت‌های مورد آزمایش عصاره) افزایش در شدت فلورسانس THT نسبت به پروتئین شاهد ناچیز است که بیانگر اثر مهاری عصاره گیاه بر روند شکل‌گیری تجمعات آمیلوئیدی HEWL است. همانطور که مشاهده می‌شود؛ با افزایش غلظت عصاره میزان افزایش فلورسانس کاهش

همانطور که در شکل ۲- الف مشاهده می‌شود؛ شدت فلورسانس THT پانزده روز پس از انکوباسیون HEWL در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد افزایش می‌یابد. این افزایش بیانگر شکل‌گیری فیبریل‌های آمیلوئید در نمونه انکوبه شده است. در نمونه‌های حاوی عصاره جفت بلوط (در تمامی

می‌یابد. این کاهش بیانگر کاهش در میزان شکل‌گیری فیبرهای آمیلوئیدی است. اما اختلاف بین اثر مهار غلظت‌های مختلف عصاره بسیار کم است که این اختلاف اندک می‌تواند بدلیل اشباح شدن جایگاه اتصال عوامل موثر عصاره بر روی پروتئین باشد.

در شکل ۲- ب روند تجمع‌زدایی فیبرهای لیزوزیم به تصویر کشیده شده است. شدت فلوروسانس THT نمونه فیبریل‌های از پیش شکل گرفته لیزوزیم سه روز پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد از حدود ۰.۵ a.u در شکل ۲- الف به کمتر از ۰.۶۰ a.u در شکل ۲- ب می‌رسد. این تغییرات بیانگر تاثیر دمای پایین بر شروع روند برگشت‌پذیری فیبریل‌هاست. در حضور عصاره جفت بلوط (در تمامی غلظت‌های مورد آزمایش) کاهش بیشتری در شدت فلوروسانس THT نسبت به نمونه شاهد مشاهده می‌شود که بیانگر تاثیر عصاره گیاه بر تسریع روند تجمع‌زدایی فیبرهاست. در این خصوص نیز بیشترین میزان تاثیر عصاره بر برگشت‌پذیری فیبرهای آمیلوئیدی در نسبت ۱:۰/۵ عصاره به فیبر دیده می‌شود و با افزایش غلظت عصاره؛ تاثیر آن بر روند فیبریل‌زدایی کاهش می‌یابد.

**فلوروسانس ANS:** نواحی هیدروفوب در معرض حلال فیبریل‌های آمیلوئیدی جایگاه‌های اتصال جهت پروب فلورسنت ANS هستند. زمانی که این ترکیب به ساختار صفحات بتای موجود در فیبرهای آمیلوئید متصل می‌شود؛ شدت فلوروسانس آن افزایش می‌یابد (۱۲). در شکل ۳ با استفاده از تست فلوروسانس ANS؛ تاثیر عصاره جفت بلوط بر هیدروفوبیسته سطحی طی روند شکل‌گیری تجمعات آمیلوئیدی و تجمع‌زدایی فیبرهای HEWL به تصویر کشیده شده است.

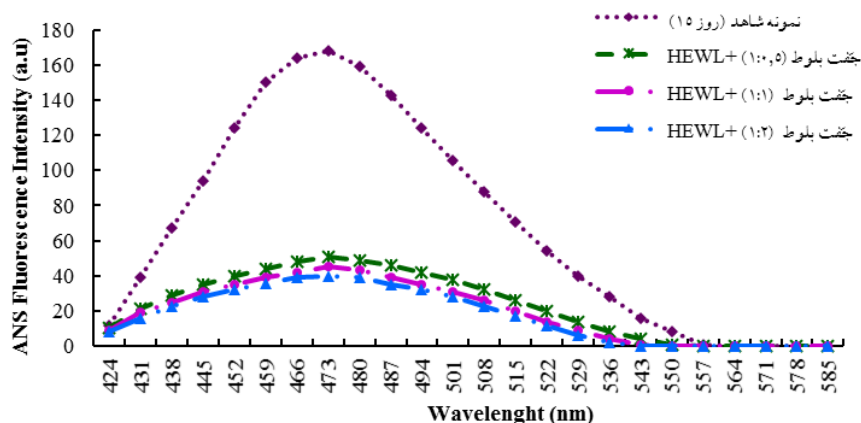
همانطور که در شکل ۳- الف مشاهده می‌شود؛ شدت فلوروسانس ANS پانزده روز پس از انکوباسیون HEWL در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد افزایش می‌یابد. این افزایش بیانگر افزایش هیدروفوبیسته سطحی HEWL و شکل-

گیری فیبریل‌های آمیلوئید در نمونه انکوبه شده است. در نمونه‌های حاوی عصاره جفت بلوط (در تمامی غلظت‌های مورد آزمایش عصاره) افزایش در شدت فلوروسانس ANS نسبت به پروتئین شاهد ناچیز است که بیانگر اثر مهار عصاره گیاه بر در معرض سطح قرارگیری سطوح هیدروفوب پروتئین و در نتیجه مهار شکل‌گیری تجمعات آمیلوئیدی HEWL است. با افزایش غلظت عصاره؛ میزان هیدروفوبیسته سطحی پروتئین کاهش می‌یابد. بطوریکه در نسبت ۱:۲ عصاره به پروتئین HEWL دارای کمترین هیدروفوبیسته سطحی است. در اینجا نیز اختلاف بین اثر مهار غلظت‌های مختلف عصاره بسیار کم است که این اختلاف اندک می‌تواند بدلیل اشباح شدن جایگاه اتصال عوامل موثر عصاره بر روی پروتئین باشد.

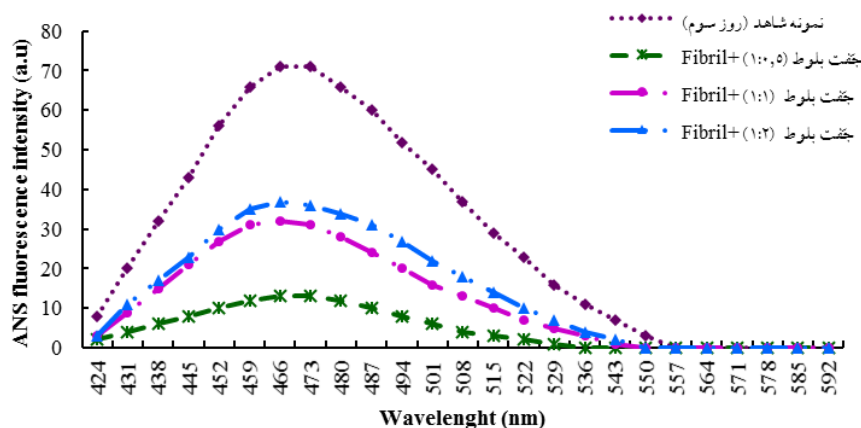
در شکل ۳- ب شدت فلوروسانس ANS نمونه فیبریل‌های از پیش شکل گرفته HEWL سه روز پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد از حدود ۰.۵ a.u در شکل ۳- الف به حدود ۰.۷۰ a.u در شکل ۳- ب کاهش می‌یابد. این تغییرات بیانگر تاثیر دمای پایین بر شروع روند برگشت‌پذیری فیبریل‌هاست. در حضور عصاره جفت بلوط (در تمامی غلظت‌های مورد آزمایش) کاهش بیشتری در شدت فلوروسانس ANS نسبت به نمونه شاهد مشاهده می‌شود که بیانگر تاثیر عصاره گیاه بر کاهش بیشتر سطوح هیدروفوب در معرض سطح پروتئین و تسریع روند تجمع‌زدایی فیبرهاست. در این خصوص نیز بیشترین میزان تاثیر عصاره در نسبت ۱:۰/۵ عصاره به فیبر دیده می‌شود.

**تصاویر میکروسکوپی (FE-SEM):** فیبریل‌های آمیلوئیدی بدون توجه به پروتئین منع آن‌ها دارای مورفولوژی ساختاری رشته مانند هستند (۳۰). میکروسکوپ الکترونی روبشی (FE-SEM) یک وسیله بسیار عالی برای مشاهده مورفولوژی ساختاری پروتئین‌ها است.

شکل ۳- الف



شکل ۳- ب



شکل ۳- اندازه‌گیری شدت فلوروسانس ANS در غیاب و حضور غلظت‌های مختلف عصاره جفت بلوط جهت ارزیابی تاثیر عصاره الف) بر روند شکل‌گیری تجمعات آمیلویدی HEWL، ۱۵ روز پس از انکوباسیون نمونه‌های پروتئین در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد (ب) بر روند تجمع‌زدایی فیبریل‌های HEWL، سه روز پس از انکوباسیون فیبریل‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد

پروتئین در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد) و همچنین مورفولوژی ساختاری فیبریل‌های لیزوزیم (سه روز پس از انکوباسیون فیبریل‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) دارای ساختار رشته‌ای و فیبریلی است. در حضور عصاره جفت بلوط، پروتئین لیزوزیم در شرایط انکوباسیون در شرایط اسیدی و دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد-علیرغم تغییر شکل از حالت کروی- به سمت شکل‌گیری ساختارهای فیبریلی و خطی سوق داده نمی‌شود. این تصویر بیانگر تاثیر مهاری عصاره جفت بلوط بر شکل‌گیری فیبرهای آمیلوئید است

در شکل ۴ با استفاده از میکروسکوپ FE-SEM؛ تاثیر عصاره جفت بلوط (در نسبت ۱:۰/۵ عصاره به پروتئین) بر مورفولوژی ساختاری پروتئین طی روند شکل‌گیری تجمعات آمیلویدی و تجمع‌زدایی فیبرها به تصویر کشیده شده است.

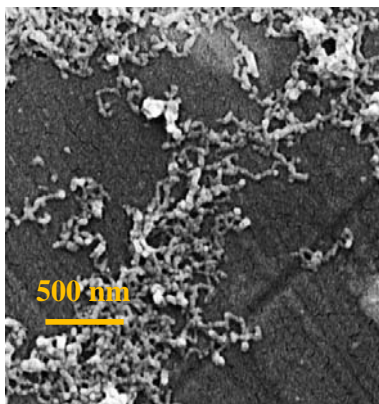
پروتئین لیزوزیم در حالت نرمال فیزیولوژیکی دارای ساختار کروی است. همان‌طور که در شکل ۴- الف ملاحظه می‌شود در غیاب عصاره جفت بلوط، مورفولوژی ساختاری لیزوزیم (۱۵ روز پس از انکوباسیون نمونه‌های



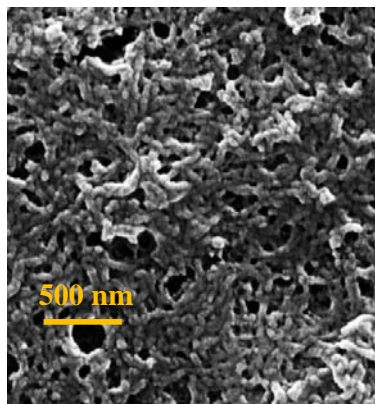
بیانگر تاثیر این عصاره بر تغییر شکل و تجمع‌زدایی فیبرهای آمیلوئیدی است.

(شکل ۴-ب). همچنین در شکل ۴-ج مشاهده می‌شود که فیبریل‌های از پیش تشکیل شده لیزوزیم در حضور عصاره جفت بلوط از حالت رشته‌ای خارج شده‌اند که

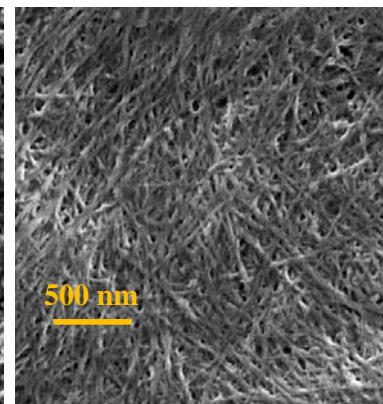
شکل ۴-ج



شکل ۴-ب



شکل ۴-الف



شکل ۴- تصاویر میکروسکوپ FE-SEM در غیاب و حضور غلظت‌های مختلف عصاره جفت بلوط، اندازه‌گیری در نوار مقیاس ۵۰۰nm (الف) مورفولوژی ساختاری لیزوزیم (۱۵ روز پس از انکوباسیون نمونه‌های پروتئین در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد) و فیبریل‌های لیزوزیم (سه روز پس از انکوباسیون فیبریل‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) در غیاب عصاره جفت بلوط (تصاویر میکروسکوپی هر دو نمونه یکسان است)، (ب) مورفولوژی ساختاری HEWL در حضور عصاره جفت بلوط (۱۵ روز پس از انکوباسیون نمونه‌های پروتئین در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد)، (ج) مورفولوژی ساختاری تجمعات آمیلوئیدی HEWL در حضور عصاره جفت بلوط (سه روز پس از انکوباسیون فیبریل‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد)

## بحث و نتیجه‌گیری

جانبی اسیدهای آمینه در پروتئین‌های مختلف شوند. در نتیجه فرآیند شکل‌گیری فیبریل‌های آمیلوئیدی و همچنین استحکام ساختاری فیبریل‌ها مختل می‌گردد (۱۰). مکانسیم اثر این ترکیبات بر روند شکل‌گیری فیبرهای آمیلوئیدی متفاوت از مکانسیم اثر آن‌ها بر از بین بردن تجمعات از پیش شکل گرفته شده است (۹ و ۱۰). از آنجایی که عصاره جفت بلوط حاوی مقادیر بالایی از این ترکیبات حلقوی است؛ این عصاره بمنظور بررسی اثرات احتمالی بر شکل‌گیری تجمعات آمیلوئیدی و فیبریل‌زدایی آمیلوئید مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که از نتیجه آزمایشات مشاهده گردید؛ عصاره جفت بلوط در تمامی نسبت‌های مورد آزمایش دارای اثر مهاري وابسته به دوز بر شکل‌گیری تجمعات آمیلوئیدی پروتئین است. همچنین این عصاره موجب تسریع فرآیند تجمع‌زدایی فیبرها می‌شود. بیشترین

عصاره‌های گیاهی به دلیل داشتن مقادیر بالایی از ترکیبات معدنی و فنولی و اثر احتمالی این ترکیبات بر پیشگیری و درمان بیماری‌های مختلف توسط محققان مختلف مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۴ و ۵). ترکیب شیمیایی میوه و جفت بلوط شامل مقدار زیادی کربوهیدرات، مقدار متوسطی پروتئین و چربی، و مقدار قابل توجهی از مواد معدنی است (۱) همچنین همانطور که در جدول ۱ نشان داده شد جفت بلوط حاوی مقادیر بالایی از ترکیبات حلقوی فنولی و فلاونوئیدی است. ترکیبات مولکولی حاوی حلقه‌های آروماتیک می‌توانند با آمینواسیدهای آروماتیک موجود در پروتئین‌ها برهمکنش نموده و مانع برقراری برهمکنش‌های هیدروفوب و استکینگ زنجیره‌های

بطوریکه در نسبت ۱: ۰/۵ (عصاره برگ چای سبز به HEWL)، این عصاره موجب مهار کامل فرآیند شکل‌گیری تجمعات آمیلویدی می‌شود. رامشینی و همکاران (۳) اثر مهاری عصاره برگ چای سبز را مربوط به حضور مقادیر بالای از پلی فنول‌ها و ترکیبات حلقوی و ایجاد پیوندهای استکینگ این ترکیبات با اسیدهای آمینه حلقوی موجود در ساختار HEWL می‌دانند.

اثر مهاری سیلیمارین (عصاره حاصل از دانه گیاه خار مریم (*Silybum Marianum*)) بر فرآیند شکل‌گیری تجمعات آمیلویدی HEWL بررسی و مشاهده شد که سیلیمارین باعث مهار تشکیل تجمعات آمیلویدی می‌شود (۶). سیلیمارین نیز همانند عصاره جفت بلوط دارای اثر مهاری وابسته به غلظت بر روند شکل‌گیری تجمعات آمیلویدی پروتئین لیزوزیم است اما دارای اثر مهاری کم‌تری از اثر عصاره جفت بلوط است. سیلیمارین همانند عصاره جفت بلوط موجب شکل‌گیری تجمعات بی‌شکل می‌شود. مهدوی مهر و همکاران (۶) اثر مهاری سیلیمارین را وابسته به وجود ترکیبات فلاونولیکانی و فلاونوئیدی می‌دانند که با ایجاد برهمکنش‌های آروماتیک و آبگریز با زنجیره‌های جانبی پروتئین مانع در معرض سطح قرارگرفتن سطوح هیدروفوب پروتئین و برقراری برهمکنش‌های بین زنجیره‌های جانبی آن‌ها و تشکیل تجمعات آمیلویدی می‌شوند.

از مقایسه نتایج حاصل از این آزمایش با نتایج حاصل از مطالعات ذکر شده می‌توان نتیجه گرفت که حضور مقادیر بالای فنول و فلاونوئید در عصاره جفت بلوط منجر به مهار فیبریل‌زایی و تسریع فیبریل‌زدایی پروتئین می‌شود. نکته قابل تامل در این آزمایش در خصوص بیشترین اثر عصاره بر روند تجمع‌زدایی آمیلویدی است که در نسبت ۱: ۰/۵ عصاره به فیبریل مشاهده می‌شود و با افزایش غلظت عصاره میزان تاثیرگذاری کاهش می‌یابد. با افزایش غلظت عصاره، میزان حلالیت آن در محلول حاوی پروتئین در دمای ۳۷ درجه کاهش یافت. احتمالاً این کاهش

اثر عصاره بر روند تجمع‌زدایی فیبرها در نسبت ۱: ۰/۵ عصاره به فیبریل مشاهده می‌شود.

مطالعات بسیاری برای بررسی اثر عصاره‌ها و ترکیبات گیاهی بر فرآیندهای شکل‌گیری و حذف فیبریل‌های آمیلوئیدی انجام شده است. بعنوان مثال رامشینی و همکاران (۲) مشاهده کردند که عصاره برگ گیاه مرزه (*Satureia hortensis L.*) موجب مهار شکل‌گیری تجمعات آمیلویدی HEWL و تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی می‌شود. عصاره جفت بلوط همانند عصاره برگ گیاه مرزه از شکل‌گیری فیبرهای آمیلوئید جلوگیری می‌نماید. روند مهاری عصاره جفت بلوط منجر به کاهش طول فیبریل‌ها و سوق‌دهی آن‌ها به سمت تجمعات بی‌شکل می‌شود. درحالی‌که در حضور عصاره برگ گیاه مرزه بجای شکل‌گیری فیبریل‌های بالغ اولیگومرهای کوچک غیرسمی تشکیل می‌شوند. این تفاوت بدلیل تاثیر عصاره این دو گیاه بر مراحل مختلف شکل‌گیری تجمعات آمیلویدی پروتئین است. عصاره برگ گیاه مرزه بر کلیه مراحل شکل‌گیری تجمعات آمیلویدی اثر مهاری دارد در حالی‌که عصاره جفت بلوط بر بازشدن پروتئین در مراحل اولیه شکل‌گیری تجمعات آمیلویدی تاثیری ندارد. رامشینی و همکاران (۲) اثر عصاره برگ گیاه مرزه بر مهار شکل‌گیری تجمعات آمیلویدی HEWL را مربوط به حضور مقادیر بالایی از پلی فنول‌ها و ترکیبات حلقوی بر می‌شمارند.

در مطالعه دیگر اثر عصاره برگ چای سبز بر روند شکل‌گیری تجمعات آمیلویدی HEWL مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده شد که عصاره این گیاه بر روند شکل‌گیری تجمعات آمیلویدی پروتئین دارای اثر مهاری است (۳). اثر مهاری عصاره برگ چای سبز بر روند شکل‌گیری تجمعات آمیلویدی پروتئین لیزوزیم نیز همانند عصاره جفت بلوط وابسته به دوز است. عصاره برگ چای سبز نسبت به عصاره جفت بلوط دارای اثر مهاری قوی‌تر بر روند شکل‌گیری تجمعات آمیلویدی HEWL است

جلوگیری از شکل‌گیری فیبرهای آمیلوئید و همچنین حذف فیبرهای ازپیش تشکیل‌شده لیزوزیم است. بررسی‌های بیشتری برای یافتن این ترکیبات موثر جهت ساخت داروهای مورد نیاز در درمان بیماری‌های وابسته به آمیلوئید نیاز است.

حلالیت منجر به کاهش میزان ترکیبات موثره عصاره (ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی) و در نتیجه کاهش تاثیرگذاری آن بر تسریع روند تجمع‌زدایی فیبرها باشد.

از داده‌های حاصل از این آزمایش‌ها می‌توان نتیجه گرفت که عصاره جفت بلوط حاوی ترکیباتی است که قادر به

## منابع

- ۱- ایرانمنش، ی.، جهانبازی گوجانی، ح. (۱۳۹۶). تعیین ویژگی‌های تغذیه‌ای روغن استخراج‌شده از میوه بلوط ایرانی. *مجله علوم غذایی و تغذیه*، ۱۵ (۱)، ۶۵-۷۲.
- ۲- رامشینی، ح.، کوثری، ن.، مقدسی، ا. (۱۳۹۵). فعالیت ضد آمیلوئیدی عصاره برگ گیاه مرزه (*Satureia hortensis L.*) روی فیبری شدن لیزوزیم و تأثیر احتمالی آن در درمان بیماری‌های وابسته به آمیلوئید. *مجله تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران*، ۳۲ (۵)، ۸۴۴-۸۵۶.
- ۳- رامشینی، ح. (۱۳۹۳). اثر عصاره چای سبز (*Camellia Sinensis*) بر روی تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی لیزوزیم سفیده تخم مرغ و مطالعه مکانیسم احتمالی آن در پیشگیری از بیماری آلزایمر. *مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی زابل*، ۶ (۴)، ۷۸-۸۹.
- ۴- عزیزی مرادی، ف.، بهرامی کیا، س. (۱۳۹۷). بررسی فعالیت ضد گلیکوزیلاسیون عصاره هیدروالکلی گیاه کنگر (*Gundelia tournefortii*) در آلبومین سرم گاو در مدل‌های دیابتی. *مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران)*، ۱۳۹۷.
- ۵- عصاره، ز.، بهرامی کیا، س. (۱۳۹۸). اثر مهار فراکسیون موثر گیاه کنگر (*Gundelia tournefortii L.*) و تعدادی از داروهای ضد دیابتی بر فعالیت آنزیم آلدوز ردوکتاز لنز چشم: یک مطالعه مقایسه‌ای. *مجله پژوهش‌های جانوری (مجله زیست‌شناسی ایران)*، ۳۲ (۳)، ۲۳۲-۲۴۵.
- ۶- مهدوی مهر، م.، مراتان، ع. (۱۳۹۶). بررسی اثر مهار سیلیمارین بر فرایند فیبریلاسیون پروتئین لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ. *مجله زیست‌شناسی تکوینی*، ۹ (۴)، ۲۳-۳۶.
- 7- Arnaudov, L. N., & de Vries, R. (2005). Thermally induced fibrillar aggregation of hen egg white lysozyme. *Biophysical Journal*, 88(1), 515-526. doi: https://doi.org/10.1529/biophysj.104.048819
- 8- Azizi, S., Ghasemi Pirbalouti, A., & Amirmohammadi, M. (2014). Effect of Hydroalcoholic Extract of *Persian Oak (Quercus brantii)* in Experimentally Gastric Ulcer. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 13(3), 967-974. doi:10.22037/ijpr.2014.1532
- 9- Bahramikia, S., & Yazdanparast, R. (2012). Anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of two manganese-salen derivatives against hen egg-white lysozyme aggregation. *International journal of biological macromolecules*, 50(1), 187-197. doi: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.10.018
- 10- Bahramikia, S., Yazdanparast, R., & Gheysarzadeh, A. (2012). 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*, 80(2), 227-236. doi: https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2012.01391.x
- 11- Bilej, M. (2015). Mucosal Immunity in Invertebrates. In *Mucosal Immunology: Fourth Edition (Vol. 1-2, pp. 135-144)*. Elsevier Inc. doi: https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415847-4.00009-4
- 12- Bolognesi, B., Kumita, J. R., Barros, T. P., Esbjorner, E. K., Luheshi, L. M., Crowther, D. C., Wilson, M. R., Dobson, C. M., Favrin, G., Yerbury, J. J. (2010). ANS binding reveals common features of cytotoxic amyloid species. *ACS chemical biology*, 5(8), 735-740. doi: https://doi.org/10.1021/cb1001203
- 13- Chethana, K. R., Senol, F. S., Orhan, I. E., Anilakumar, K. R., Keri, R. S. (2017). Cassia tora Linn.: A boon to Alzheimer's disease for its anti-amyloidogenic and cholinergic activities. *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 33, 43-52. doi: 10.1016/j.phymed.2017.06.002

- 14- Chiti, F., & Dobson, C. M. (2006). Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annual Review of Biochemistry*, 75, 333-366. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.101304.123901>
- 15- Custódio, L., Patarra, J., Alberício, F., da Rosa Neng, N., Nogueira, J. M. F., & Romano, A. (2015). Phenolic composition, antioxidant potential and in vitro inhibitory activity of leaves and acorns of *Quercus suber* on key enzymes relevant for hyperglycemia and Alzheimer's disease. *Industrial Crops and Products*, 64, 45-51. doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.11.001>
- 16- Dobson, C. M., Swoboda, B. E. P., Joniau, M., & Weissman, C. (2001). The structural basis of protein folding and its links with human disease. *In Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 356, 133-145. doi: <https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0758>
- 17- Eisenberg, D., & Jucker, M. (2012). The amyloid state of proteins in human diseases. *Cell*, 148, 1188-1203. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.022>
- 18- Feng, S., Song, X. H., & Zeng, C. M. (2012). Inhibition of amyloid fibrillation of lysozyme by phenolic compounds involves quinoprotein formation. *FEBS Letters*, 586(22), 3951-3955. doi: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.09.037>
- 19- Funahashi, J., Takano, K., Ogasahara, K., Yamagata, Y., & Yutani, K. (1996). The Structure, Stability, and Folding Process of Amyloidogenic Mutant Human Lysozyme. *The Journal of Biochemistry*, 120(6), 1216-1223. doi: [10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021544](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021544)
- 20- Hawe, A., Sutter, M., & Jiskoot, W. (2008). Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization. *Pharmaceutical Research*, 25, 1487-1499. doi: <https://doi.org/10.1007/s11095-007-9516-9>
- 21- Howie, A. J., & Brewer, D. B. (2009). Optical properties of amyloid stained by Congo red: history and mechanisms. *Micron*, 40(3), 285-301. doi: <https://doi.org/10.1016/j.micron.2008.10.002>
- 22- Kumar, S., Harris, R. J., Seal, C. J., and Okello, E. J. (2011). An Aqueous Extract of *Withania somnifera* Root Inhibits Amyloid  $\beta$  Fibril Formation In Vitro. *Phytotherapy Research*, 26(1), 113-117. doi: [10.1002/ptr.3512](https://doi.org/10.1002/ptr.3512)
- 23- Necula, M., Kaye, R., Milton, S., & Glabe, C. G. (2007). Small molecule inhibitors of aggregation indicate that amyloid  $\beta$  oligomerization and fibrillization pathways are independent and distinct. *Journal of Biological Chemistry*, 282(14), 10311-10324. doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M608207200>
- 24- Nilsson, M. R. (2004). Techniques to study amyloid fibril formation in vitro. *Methods*, 34(1), 151-160. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2004.03.012>
- 25- Popović, B. M., Štajner, D., Ždero, R., Orlović, S., & Galić, Z. (2013). Antioxidant characterization of oak extracts combining spectrophotometric assays and chemometrics. *The Scientific World Journal*, 2013. doi: <https://doi.org/10.1155/2013/134656>
- 26- Qin, X. Y., Cheng, Y., Yu, L. C. (2012). Potential protection of green tea polyphenols against intracellular amyloid beta-induced toxicity on primary cultured prefrontal cortical neurons of rats. *Neuroscience Letters*, 513, 170-173. doi: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.02.029>
- 27- Slinkard, K., & Singleton, V. L. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American journal of enology and viticulture*, 28(1), 49-55. doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.06.030>
- 28- Soto, C. (1999). Alzheimer's and prion disease as disorders of protein conformation: Implications for the design of novel therapeutic approaches. *Journal of Molecular Medicine*, 77, 412-418. doi: <https://doi.org/10.1007/s001090050371>
- 29- Stangou, A. J., & Hawkins, P. N. (2004). Liver transplantation in transthyretin-related familial amyloid polyneuropathy. *Current Opinion in Neurology*, 17, 615-620. doi: <https://doi.org/10.1097/00019052-200410000-00012>
- 30- Sunde, M., Serpell, L. C., Bartlam, M., Fraser, P. E., Pepys, M. B., & Blake, C. C. F. (1997). Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. *Journal of molecular biology*, 273(3), 729-739. doi: <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1348>
- 31- Taleshi, H., & Babarabi, M. M. (2013). Leaf morphological variation of *Quercus brantii* Lindl. along an altitudinal gradient in Zagros forests of Fars Province, Iran. *European Journal of Experimental Biology*, 3(5), 463-468. Retrieved from [www.pelagiaresearchlibrary.com](http://www.pelagiaresearchlibrary.com)

- 32- Yuan Luo, Y., Smith, J. V., Paramasivam, V., Burdick, A., Curry, K. J., Buford, J. P., Khan, I., Netzer, W. J., Xu, H., and Butko, P. (2002). Inhibition of amyloid- $\beta$  aggregation and caspase-3 activation by the *Ginkgo biloba* extract EGb761. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99 (19), 12197–12202. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.182425199>
- 33- Upta, V. B., Indi, S. S., and Rao, K. S. J. (2009). *Garlic* extract exhibits anti-amyloidogenic activity on amyloid-beta fibrillogenesis: relevance to Alzheimer's disease. *Phytotherapy Research*, 23(1), 111-115. doi:10.1002/ptr.2574
- 34- Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in *mulberry* and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food chemistry*, 64(4), 555-559. doi: [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2)

## Investigation the effect of *Quercus brantii* fruit-hull extract on hen egg-white lysozyme fibrillation and defibrillation

Faramarzian M.<sup>1</sup> and Bahramikia S.<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Dept. of Biology, Lorestan University, Khorramabad, I.R. of Iran

<sup>2</sup> Dept. of Biology, Faculty of Science, Lorestan University, Khorramabad, I.R. of Iran

### Abstract

In normal physiological conditions, proteins are mostly spherical and water-soluble. In some cases, proteins are converted into structures called fibrils or amyloid plaques that are insoluble and pathogenic. In this study, the effects of hydroalcoholic extracts of *Quercus brantii* fruit-hull on the formation of hen egg-white lysozyme fibrils as well as the effect of this extract on the elimination of preformed HEWL fibrils have been investigated. For this purpose, lysozyme was incubated in presence and absence of *Q. brantii* extract at 60 °C for 15 days. The effect of extract was evaluated using CR binding assay, CD spectroscopy, THT and ANS fluorescence testing, and FE-SEM microscope. The results showed that *Q. brantii* extract in all tested ratios has an inhibitory effect on the formation of amyloid fibrils. Also, the extract has an accelerating effect on the defibrillation of amyloid aggregates and the greatest effect of it on defibrillation is observed in the ratio of 0.5: 1 extract to fibril. From the results obtained in this study, it can be concluded that *Quercus brantii* fruit-hull contains compounds that can be used as agents in the preparation of drugs for the removal of amyloid plaques in the treatment of amyloid-dependent diseases.

**Key words:** *Quercus brantii*, Oak extract, Amyloid fibrils, Amyloid diseases, Amyloid plaques, Hen egg-white lysozyme, HEWL