ارزیابی فیتوشیمیایی، آنتی‌اکسیدانی و اثر مهاری عصاره گیاه دارویی *Citrullus colocynthis* L. بر تولید نانوبیوفیبریل‌های آمیلوئیدی از آلبومین سرم گاوی به‌عنوان یک پروتئین مدل

حوریه منصوری[1]، امیر اراسته[2*]، رمضانعلی خاوری‌نژاد[3]

[1]کارشناسی‌ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[2]استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

[3]استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۸/۱۱/۲ تاریخ پذیرش: ۹۹/۹/۱۹

چکیده

هندوانه ابوجهل با نام علمی *Citrullus colocynthis* L. یکی از گیاهانی است که اثرات آنتی اکسیدانی و ضد دیابتی آن در پژوهش‌های قبلی به اثبات رسیده است. در این پژوهش ضمن بررسی فیتوشیمیایی عصاره هیدروالکلی هندوانه ابوجهل، اثرات آنتی‌اکسیدانی و مهاری آن بر تولید نانوبیوفیبریل‌های آمیلوئیدی از آلبومین سرم گاوی به‌عنوان یک پروتئین مدل مورد بررسی قرار گرفت. میوه گیاه در پائیز ۱۳۹۶ از مناطق بیابانی اطراف قم جمع آوری، خشک و سپس به روش خیساندن عصاره گیری گردید. آنالیز مهمترین ترکیبات ثانوی عصاره: با استفاده از روشهای کروماتوگرافی گازی-طیف سنجی جرمی و HPLC ازیابی گردید. ارزیابی اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با استفاده از روش DPPH بررسی گردید و سپس رشته‌های آمیلوئیدی در لوله آزمایش و در دمای بالا و pH پائین تهیه و از تصویر برداری میکروسکوپ الکترونی برای تائید حضور رشته‌ها استفاده گردید. از روش طیف‌سنجی کنگورد برای بررسی اثرات مهاری عصاره بر تولید رشته‌های آمیلوئیدی استفاده شد. نتایج نشان داد که متیل بتا دی گالاکتوپیرانوزید و بتا دی گلوکوپیرانوزید به‌ترتیب با ۲۹/۵۱ و ٦/۳۱ درصد از فراوان‌ترین ترکیبات شیمیایی و تترادکانوئیک اسید با ۱٦/۳۱ و سپس اکتا و هگزادکانوئیک اسید به‌ترتیب با ۱٤/۱۱ و ۱۰/۹٤ درصد، بیش‌ترین ترکیبات یافت شده در عصاره بودند. مقادیر سیترولین و سیترونلول نیز در عصاره به‌ترتیب ۰/۰۰٤۱ و ۰/۰۱۳ میلی‌گرم بود. بیشترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره و به میزان ۷۱/۵ درصد و بیش‌ترین میزان مهار تولید رشته‌های آمیلوئیدی در غلظت یک میلی-گرم بر میلی‌لیتر و به میزان ۹۹ درصد دیده شد. بنابراین عصاره هندوانه ابوجهل با حضور ترکیبات آنتی‌اکسیدان قوی و نیز اثرات مهاری که بر تولید رشته‌های آمیلوئیدی دارد، ممکن است در کاهش عوارض ناشی از بیماری آلزایمر موثر واقع شود.

واژه‌های کلیدی: آمیلوئید، آلزایمر، آلبومین سرم، سیترولین، سیترونلول، هندوانه ابوجهل، *Citrullus colocynthis* L.

*نویسنده مسئول: ra.khavarinejad@gmail.com

مقدمه

با افزایش تعداد جمعیت سالمند جهان در قرن بیست و یکم، بیماری‌های دوران پیری هم افزایش یافته است. یکی از این بیماری‌های مهم و غیر قابل علاج آلزایمر است (Norton, Matthews et al., 2014). این بیماری نخستین بار در سال ۱۹۰۶ توسط یک عصب‌شناس آلمانی به نام آلویز آلزایمر و طی تحقیق و پژوهش بر روی مغز یک بانوی ٥٤ ساله به نام آگوستی دتر[1] معرفی گردید. با مطالعاتی که روی مغز بیمار فوت شده انجام شد، مشخص گردید که ترکیباتی در محل سیناپس نورون‌ها رسوب کرده‌اند که موجب از بین رفتن ارتباط آن‌ها با یکدیگر و عدم انتقال پیام‌های عصبی شده‌اند. در داخل نورون‌ها نیز کلاف‌های رشته‌ای (NFT_S)[2] یافت شد. در پژوهش‌های بعدی مشخص گردید که NFTها، پروتئین‌های تائو و تائوی‌هایپر فسفریله هستند که از پروتئین میکروتوبول (MAP)[3] ایجاد شده‌اند (O'Brien and Wong, 2011; Dorostkar, Zou et al., 2015). بعدها در پژوهش‌های گلنر و ونگ[4] مشخص گردید که این کلاف‌ها، عمدتا از یک پپتید ٤/٢ کیلو دالتونی با ٤٠ تا ٤٢ اسید آمینه تشکیل شده‌اند که به آمیلوئید بتا (Aβ) معروفند (Mroczko, Groblewska et al., 2018). تاکنون پژوهش‌های بسیاری در مورد بیماری آلزایمر انجام شده است، ولی دلایل ایجاد بیماری و راه درمان موثری برای آن یافت نشده است (Taghizadeh, Talaei et al., 2014). در گذشته به دلیل دسترسی آسان و هم‌چنین منابع طبیعی و سالم گیاهی، استفاده از گیاهان دارویی در معالجه بیماری‌ها رواج بیشتری داشته است. امروزه نیز به علت عوارض جانبی و هزینه‌های گزاف داروهای سنتزی، استفاده از گیاهان و یافتن مواد موثره آن‌ها به منظور درمان و کاهش اثرات بیماری‌ها، اهمیت زیادی دارد (Arise, Malomo et al., 2009). یکی از این گیاهان دارویی ارزشمند، گیاه هندوانه ابوجهل با نام علمی *Citrullus colocynthis* L. متعلق به خانواده کوکوربیتاسه (*Cucurbitaceae*) است. رویش‌گاه اولیه این گیاه کشور یونان بوده و در ایران در مناطق کویری انتشار خوبی دارد. میوه این گیاه دارویی گرد، زرد رنگ، تقریبا به اندازه نارنج، دارای طعم تلخ و لعاب‌دار است و میان بر آن اسفنجی و سفید رنگ می‌باشد (Kamil, Ahmad et al., 2020). ترکیبات شیمیایی بسیاری در میوه هندوانه ابوجهل شناسایی شده است که از جمله این ترکیبات می‌توان به گلوکوزید کولوسنتین[5]، سیترولین[6]، کولوسنتتین[7]، سیترونلول[8]، مواد صمغی و املاح گوناگون اشاره کرد. کولوسنتین درصورت هیدرولیز به گلوکز و کولوسنتتین تبدیل می‌شود (Chawech, Jarraya et al., 2015; Gupta, Tripathi et al., 2018; Ahmed, Peiwen et al., 2020). دانه این گیاه دارای اسیدهای چربی همچون اسید پالمتیک، اسید استئاریک، اسید لینولئیک، اسید لینولنیک و اسید مریستیک می‌باشد (Najafi, Sanadgol et al., 2010; da Silva and Hussain 2017; Olushola-Siedoks, Igbo et al., 2019). مواد مغذی موجود در بذر این گیاه شامل ٤٠ درصد روغن، ٣٠ درصد پروتئین، ١٠ درصد کربوهیدرات، ٤ درصد خاکستر و ٣ درصد فیبر است (Olushola-Siedoks, Igbo et al., 2019). هدف از این مطالعه بررسی فیتوشیمیایی، آنتی‌اکسیدانی و اثرات مهاری عصاره میوه کامل هندوانه ابوجهل بر تولید نانوبیوفیبریل‌های آمیلوئیدی

1. Auguste Deter
2. Neurofibrillary tangles
3. Microtubule-associated protein
4. Glenner and Wong
5. Colocynthin
6. Citrulline
7. Colocynthetine
8. Citronellal

به‌عنوان یک عامل مهم مولد بیماری آلزایمر بوده است.

مواد و روش‌ها

مواد: آلبومین سرم گاوی، کنگورد، ۱و۱- دی فنیل-۲-پیکریل- هیدرازیل (DPPH)، اورنیل استات و دیگر مواد شیمیایی از شرکت مرک آلمان خریداری شدند. مواد ذکر شده با بالاترین درجه خلوص مورد استفاده قرار گرفتند.

تهیه عصاره: میوه گیاه در پائیز سال ۱۳۹٦ از مناطق بیابانی اطراف قم جمع‌آوری شد و پس از خشک شدن به مدت یک ماه در شرایط سایه و دمای ۲۵ درجه آزمایشگاه، مورد استفاده قرار گرفت. برای تهیه عصاره هیدروالکلی از روش ماسراسیون استفاده گردید. برای تهیه عصاره درون یک بشر از پیش اتوکلاو شده ۵۰ گرم از پودر میوه خشک شده با ۲۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد مخلوط شد و برای ٢٤ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانت‌گراد روی شیکر قرار گرفت. به منظور تغلیظ، محلول حاصله پس از عبور از کاغذ صافی، در دستگاه روتاری برای ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. سپس عصاره تغلیظ شده برای ٢٤ ساعت در دستگاه فریز درایر و دمای ۵۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و به پودر تبدیل شد. پودر عصاره برای انجام مراحل بعدی در یخچال نگه‌داری شد (Karimabad, Niknia et al., 2020).

عصاره‌گیری از هندوانه ابوجهل با سوکسله: ابتدا میوه گیاه پس از خشک‌شدن به مدت یک ماه در دمای ۲۵ درجه آزمایشگاه، پودر گردید و سپس یک کاغذ صافی به صورت لوله در آورده شد و ۱۰۰ گرم از پودر میوه کامل هندوانه ابوجهل درون آن قرار داده شد. کاغذ داخل اتاقک دستگاه سوکسله قرار گرفت و ۵۰۰ میلی‌لیتر هگزان به‌عنوان حلال به داخل بالن سوکسله افزوده شد. بعد از گذشت ۷ ساعت با استفاده از دستگاه روتاری، روغن از هگزان جدا گردید. برای متیله‌کردن اسیدهای چرب موجود در روغن حاصل از عصاره‌گیری، ابتدا ۰/۵ گرم از روغن تهیه شده با ۲ میلی‌لیتر هگزان نرمال و ۲ میلی‌لیتر محلول متانولی هیدروکسید پتاسیم ۲ نرمال مخلوط شد و محلول برای ۱۰ دقیقه ورتکس گردید. سپس لایه رویی آن که همان استرهای متیلی محلول در هگزان است، جدا شد. برای تعیین نوع اسیدهای چرب و میزان آن‌ها، لایه رویی استرهای متیلی محلول به دستگاه GC-Mass تزریق گردید (Aliyu, Nwaedozie et al., 2013).

بررسی ترکیبات موجود در عصاره با کروماتوگرافی گازی –طیف سنجی جرمی (GC-Mass): عصاره هیدروالکلی میوه کامل هندوانه ابوجهل را در متانول حل شده و سپس به دستگاه GC–Mass تزریق شد. دمای تزریق ۲۵۰ و دمای آون از ۱۸۰ تا ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد بود. ترکیبات شیمیایی، زمان خروج و میزان آن‌ها در عصاره توسط دستگاه ثبت گردید. در این دستگاه اجزای موجود در نمونه پس از ورود به ستون جداسازی بر مبنای فراریت و قطبیت از یکدیگر جداسازی شده و در خروجی ستون از طریق رابطی وارد بخش طیف‌سنجی می‌گردد و به‌صورت فراوانی بر حسب نسبت جرم به بار (m/z)، که طیف جرمی نام دارد، گزارش می‌گردد. با مقایسه طیف حاصل با الگوی جرمی موجود در کتابخانه نرم‌افزاری دستگاه، ترکیب مورد نظر شناسایی می‌شود (Torkey, Abou-Yousef et al., 2009).

تعیین غلظت ماده موثره موجود در عصاره به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC): پس از طی مراحل آماده‌سازی فاز متحرک، آماده‌سازی

استانداردها و نمونه، محلول‌ها به دستگاه HPLC تزریق شده و مورد آنالیز قرار گرفت. به‌منظور رسم منحنی کالیبراسیون سطح زیر منحنی در مقابل مقدار تزریق رسم و معادله خط رگرسیون و ضریب همبستگی r^2 محاسبه گردید. برای آماده سازی فاز متحرک ترکیب استونیتریل و آب به نسبت (۵۵ : ٤٥ میلی‌لیتر) در یک بشر با هم مخلوط شد. برای آماده سازی نمونه نیز ۱۰۰ میلی‌گرم از پودر عصاره هیدروالکلی گیاه میوه کامل هندوانه ابوجهل با ۲ میلی‌لیتر متانول مخلوط شده و به‌مدت ۳۰ ثانیه ورتکس شد. سپس فالکون محتوی نمونه برای ۱۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک قرار گرفت و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۸۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. محتویات فالکون از فیلتر ۰/۲۲ نانومتر عبور داده شد. نمونه تا زمان تزریق به دستگاه HPLC در تیوپ ۲ میلی‌لیتری و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد یخچال نگه‌داری گردید. برای آماده سازی استانداردها، ابتدا یک میلی‌گرم از سیترولین و سیترونلول با ۱ میلی‌لیتر از حلال (فاز متحرک) مخلوط شده و سپس رقت‌های ۲۰، ۵۰ و ppm ۱۰۰ از آن تهیه و تا قبل از تزریق به دستگاه، در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد یخچال نگه‌داری شد (Torkey, Abou-Yousef et al., 2009).

جدول ۱: غلظت‌های مختلف نمونه در سنجش خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره

شماره لوله	استوک (µL)	اتانول (µL)	غلظت‌های نمونه (mg/ml)
۱	۱	۹۹۹	۰/۰۱
۲	۱۰	۹۹۰	۰/۱
۳	۱۰۰	۹۰۰	۱
٤	۲۰۰	۸۰۰	۲
٥	۳۰۰	۷۰۰	۳
٦	٤۰۰	٦۰۰	٤
۷	٥۰۰	٥۰۰	٥
۸	٦۰۰	٤۰۰	٦
۹	۷۰۰	۳۰۰	۷
۱۰	۸۰۰	۲۰۰	۸
۱۱	۹۰۰	۱۰۰	۹
۱۲	۱۰۰۰	–	۱۰

تعیین درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره با روش DPPH: روش به دام اندازی رادیکال‌های دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH)[1] بر مبنای توانایی هیدروژن دهی به عوامل اکسید کننده استوار است (Chen, Bertin et al., 2013). مطابق جدول (۱)، ابتدا غلظت‌های مختلف از نمونه تهیه شد و سپس مطابق جدول (۲)، آزمایش برای هر دوز به طور جداگانه انجام گردید.

برای تعیین میزان درصد فعالیت آنتی اکسیدانی، تعدادی لوله آزمایش خشک و تمیز انتخاب شد و پس از تهیه محلول ۰/۵ میلی مولار DPPH، آزمایش مطابق جدول (۲) انجام شد. از محلول بلانک برای صفر کردن دستگاه استفاده گردید.

1. 1,1 diphenyl-2-picrylhydrazyl

جدول ۲: نحوه انجام آزمایش DPPH برای هر غلظت

لوله	نمونه (ml)	اتانول (ml)	محلول ۰/۵ میلی‌مولار DPPH در اتانول (ml)
نمونه (Sample)	۰/۵	۳	۰/۳
کنترل (Control)	–	۳/۵	۰/۳
بلانک (Blank)	۰/۵	۳/۳	–

لوله‌ها برای ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار گرفتند تا شدت رنگ نمونه از بنفش پررنگ به زرد تبدیل گردد. سپس جذب نمونه و کنترل در مقابل بلانک خوانده شد و با استفاده از رابطه زیر درصد فعالیت آنتی اکسیدانی محاسبه گردید (Sharma and Bhat, 2009).

$$\text{Inhibition \%} = \frac{\text{Absorbance of control} - \text{Absorbance of Sample}}{\text{Absorbance of control}} \times ۱۰۰$$

بررسی اثر مهاری عصاره بر تولید نانو رشته‌های آمیلوئیدی با روش جذب‌سنجی مرئی: در یک لوله آزمایش ۵ میلی‌گرم پودر عصاره هیدروالکلی میوه کامل هندوانه ابوجهل با یک میلی لیتر آب مقطر مخلوط شد و در بشر دیگری ۵۰ میلی‌گرم پروتئین آلبومین سرم گاوی در ۱۰ میلی لیتر بافر میکس سیترات فسفات با pH برابر ۳ حل شده و سپس مطابق جدول ۳ عمل شد. پس از قرار دادن یک مگنت برنجی در هر میکروتیوپ، درب آن‌ها با پارافیلم محکم شد. نمونه‌ها تا تولید رشته‌های آمیلوئیدی برای مدت ۷۲ ساعت درون یک حمام آب روی دستگاه گرم کن و در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد قرار گرفتند و به کمک مگنت‌های برنجی با دور rpm ۱۰۰، به‌طور مداوم به‌هم زده شدند (Arasteh, Habibi-Rezaei et al. 2012).

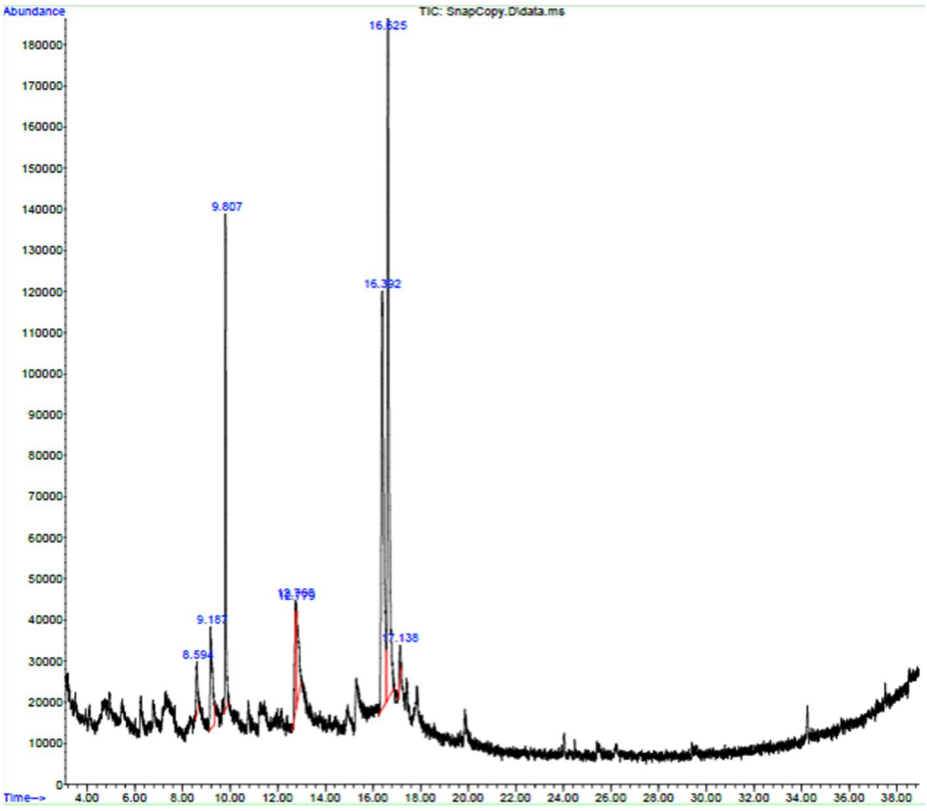
جدول ۳: نحوه تهیه غلظت‌های مختلف از عصاره در فرایند تولید نمونه‌های آمیلوئیدی

شماره میکروتیوپ	محلول آلبومین سرم گاوی (۵ mg/ml)	عصاره گیاهی µL	بافر سیترات-فسفات µL
۱	۸۰۰	۲۰۰	–
۲	۸۰۰	۱٦۰	٤۰
۳	۸۰۰	۱۲۰	۸۰
٤	۸۰۰	۸۰	۱۲۰
۵	۸۰۰	٤۰	۱٦۰
٦	۸۰۰	–	۲۰۰

سپس به ۱۰۰ میکرولیتر از هر نمونه آمیلوئیدی حاصله ۱۹۰۰ میکرولیتر از محلول بافر اضافه شد. نمونه‌ها پس از به‌هم زدن برای ۱۰ دقیقه تا تثبیت رنگ در دمای آزمایشگاه قرار گرفتند. طیف مرئی نمونه‌ها در طول موج ٤۰۰ تا ٦۰۰ نانومتر، در مقابل بافر کنگورد به عنوان بلانک، تهیه شده و با هم مورد مقایسه قرار گرفتند. با توجه به این‌که میزان طول موج ماکزیمم جذب محلول پروتئینی حاوی کنگورد، مبین

میزان تولید رشته‌های آمیلوئیدی است، با مقایسه میزان شدت جذب در حضور غلظت‌های مختلف از عصاره، میزان مهار تولید آمیلوئید محاسبه گردید.

بررسی رشته‌های آمیلوئیدی با میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM): مقدار ۲۰ میلی‌گرم اورنیل استات با یک میلی‌لیتر الکل ۵۰ درصد مخلوط شده و به‌مدت ۱۵ ثانیه به هم زده شد. سپس برای ۲۰ دقیقه با دور ۸۰۰ rpm سانتریفیوژ شده و از فیلتر ۰/۲ میکرونی عبور داده شد و تا زمان استفاده در یخچال نگه‌داری گردید.



شکل ۱: گاز کروماتوگرام حاصل از عصاره هیدروالکلی هندوانه ابوجهل

سپس روی گریدهای پوشیده از کربن (۴۰۰ مش[1])، میزان ۵ میکرولیتر از نمونه پروتئینی تولید شده شده از آلبومین سرم گاوی با غلظت نهایی یک میلی‌گرم برمیلی‌لیتر برای مدت ۴۵ ثانیه قرار داده شد. نمونه با محلول ۲ درصد وزنی اورانیل استات به مدت یک دقیقه شستشو شدد. گرید آماده پس از خشک شدن در آزمایشگاه با میکروسکوپ الکترونی گذاره و با ولتاژ ۷۵ کیلو ولت تصویر برداری شد (Holm, Jespersen et al. 2007).

نتایج

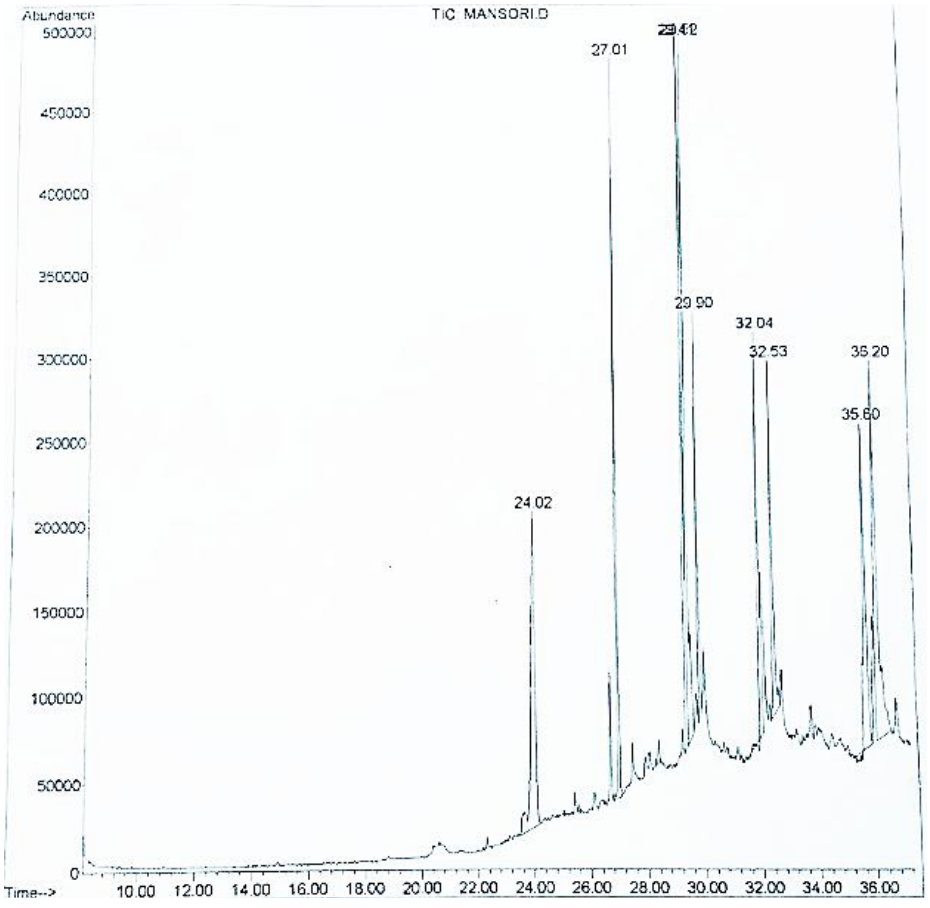
نتایج حاصل از بررسی ترکیبات عصاره با کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی (GC-Mass): ترکیبات ردیابی شده با روش کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی در جدول (۴) ارائه شده است. شکل (۱)، کروماتوگرام حاصل ترکیبات شیمیایی عصاره هندوانه ابوجهل را نشان می‌دهد.

1. Carbon coated grids (400 mesh)

جدول ٤: ترکیبات شیمیایی موجود در عصاره هیدروالکلی هندوانه ابوجهل

ماده اصلی	زمان شناسایی (دقیقه)	احتمال حضور (درصد)	درصد تشکیل‌دهنده در عصاره
۳- هیدروکسی بنزن متانول	۹/۱۸٦	۹٦	٦/۲۲
٤- اتوکسی متیل فنول	۹/۸۱۰	۹۳	۱٤/۵۲
بتا دی آلوز	۱۲/۷٦۳	۵۹	۳/۹۸
بتا دی گلوکو پیرانوز	۱۲/۷۸۰	٦٤	٦/۳۳
متیل بتا دی گالاکتو پیرانوزید	۱٦/۳۹۰	۵٦	۲۹/۵۱
آلفا دی گلوکو پیرانوز	۱٦/٦۲۵	۸۷	۳٦/۳
n- اکتادکان	۱۷/۱٤۰	۱۵	۱/۲۲

اسیدهای چرب موجود در عصاره و زمان خروج آن‌ها در جدول (۵) و کروماتوگرام حاصل از اسیدهای چرب عصاره هندوانه ابوجهل در شکل (۲) ارائه شده است.



شکل ۲: کروماتوگرام حاصل از بررسی اسیدهای چرب موجود در عصاره هندوانه ابوجهل با GC–mass

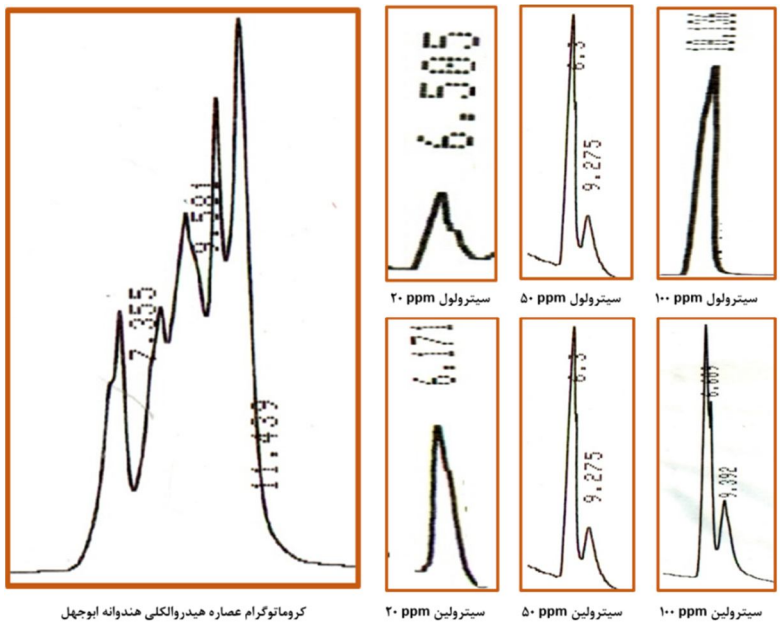
جدول ۵: اسیدهای چرب موجود در عصاره هندوانه ابوجهل

ماده اصلی	زمان شناسایی (دقیقه)	احتمال حضور (درصد)	درصد تشکیل دهنده عصاره
تترا ایکوزانوئیک اسید	۲٤/۰۲	۹۷	۱٦/۳۱
هگزا دکانوئیک اسید	۲۷/۰۲	۹۸	۱۰/۹٤
۱۳،۱۰- اکتا دکا دی انوئیک اسید	۲۹/٤۲	۹۹	۱۲/۲۷
۹- اکتا، دی سنوئیک اسید	۲۹/۵۲	۹۹	۱٤/۱۱
اکتا دکانوئیک اسید	۲۹/۹۰	۹۹	٦/۲۱
متیل آراشیدونیک	۳۲/۰٤	۹۳	۷/٤۰
هگزا دکانوئیک اسید	۳۲/۵٤	٤٦	۷/۵۷
۲ ،٦ آلفا - سیس ۱۰،۹ - دی متیل	۳۵/۸۱	۳۵	۱۰/۳۵
۹- اکتا دکانوئیک اسید	۳٦/۲۱	۳۸	۱٤/۸۵

نتایج حاصل از تعیین غلظت ماده موثره با روش HPLC: در آزمون HPLC از سیترولین و سیترونلول به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. سپس کروماتوگرام حاصل از آن با کروماتوگرام حاصل از نمونه مجهول مقایسه شد و وجود یا عدم وجود گلیکوزید در نمونه بررسی شد. زمان بازداری برای سیترولین استاندارد ۰/٤۳۸ دقیقه و سیترونلول استاندارد ۰/۷٤۹ دقیقه بود که در نمونه مجهول نیز زمان‌های بازداری مشابه مشاهده گردید. برای رسم منحنی کالیبراسیون سطح زیر پیک در مقابل مقدار تزریق رسم شد و مقدار سیترولین و سیترونلول در ۱۰۰ میلی گرم نمونه تعیین گردید. جدول (٦) گلیکوزیدهای موجود در نمونه و زمان شناسایی آن‌ها را نشان می‌دهد.

جدول ٦: گلیکوزیدهای ردیابی شده در عصاره هندوانه ابوجهل با روش HPLC

ترکیب استاندارد (ppm)	زمان شناسایی (دقیقه)	سطح زیر پیک
سیترولین ۱۰۰	۹/۳۲	۹۳۱۲۰٦
سیترولین ۵۰	۹/۲۷	۵۸٤۹۱۲
سیترولین ۲۰	٦/۱۷۱	۲۷۳۸۰۰
سیترونلول ۱۰۰	۱۸/۱۳٦	۱٦۵۰۱۱٦۹
سیترونلول ۵۰	۹/۸٤۱	۷۸۵۰٤۸٤
سیترونلول ۲۰	٦/۵۰۵	٦٤۸٤۹٤

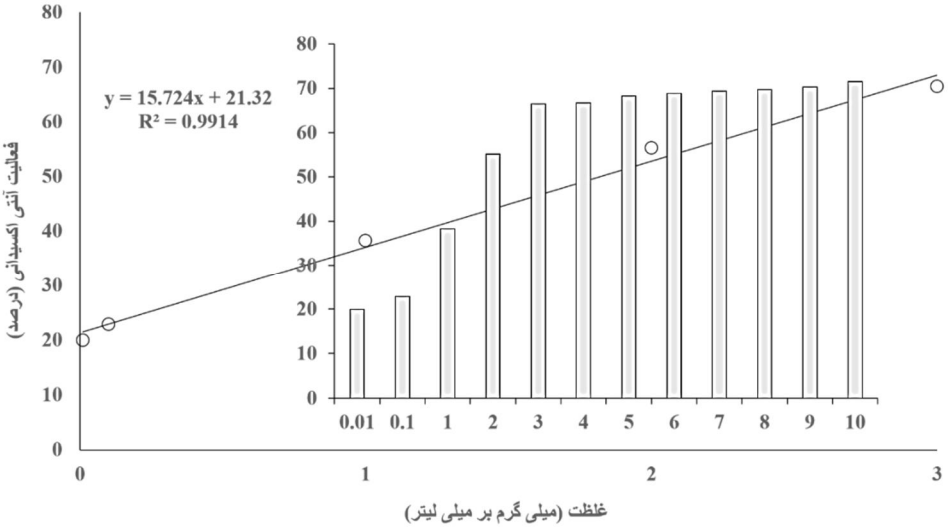


شکل ۳: کروماتوگرام عصاره هیدروالکلی هندوانه ابوجهل و پیک‌های مربوط به استانداردهای سیترولین و سیترونلول

نتایج حاصل از بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره با روش DPPH : نتایج فعالیت آنتی‌اکسیدانی در جدول (۷) و روند افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی در شکل (٤) ارائه شده است. نتایج نشان می‌دهد که با افزایش غلظت عصاره، فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش می‌یابد و حداکثر خاصیت آنتی‌اکسیدانی در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دیده می‌شود.

جدول ۷: نتایج حاصل از درصد فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره هندوانه ابوجهل

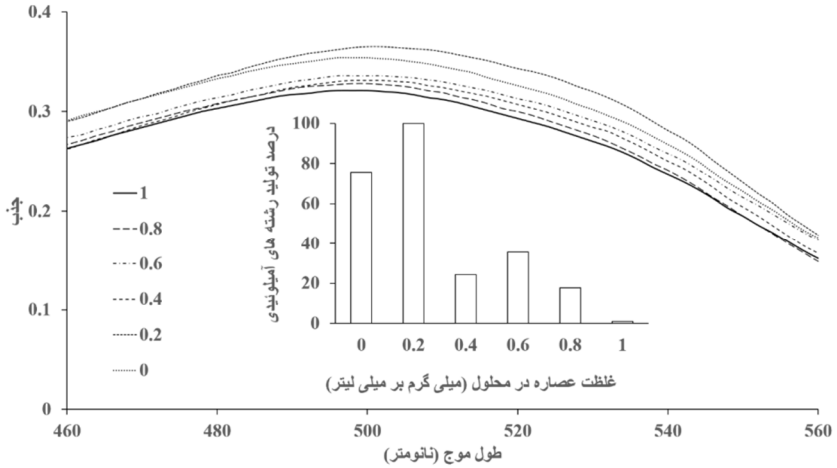
شماره لوله	غلظت (mg/ml)	فعالیت آنتی اکسیدانی (درصد)
۱	۰/۰۱	۱۹/۸۸
۲	۰/۱	۲۲/۸٤
۳	۱	۳۸/۲۷
٤	۲	۵۵/۱۹
۵	۳	٦٦/٤٦
٦	٤	٦٦/۷٦
۷	۵	٦۸/۲٤
۸	٦	٦۸/۸٤
۹	۷	٦۹/٤۳
۱۰	۸	٦۹/۷۳
۱۱	۹	۷۰/۳۲
۱۲	۱۰	۷۱/۵۱



شکل ٤: نمودار درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی در برابر غلظت عصاره هندوانه ابوجهل

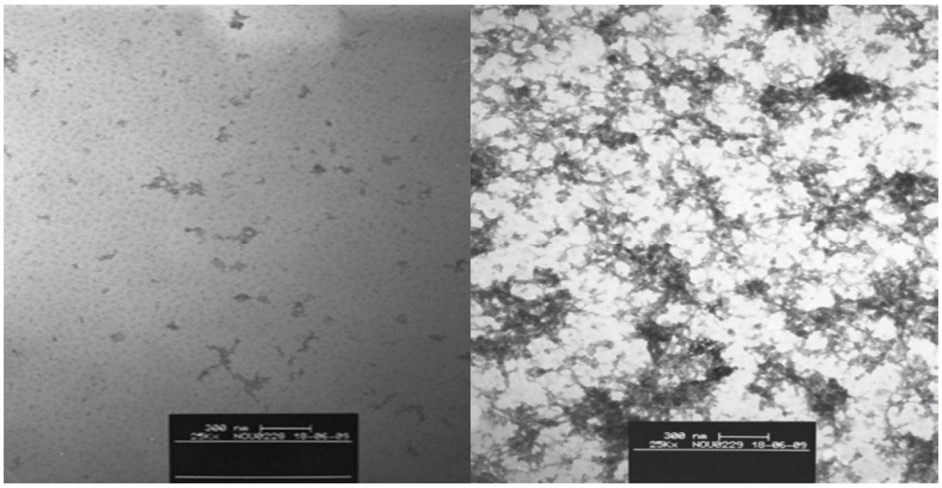
برای تعیین میزان IC_{50} و بـه منظـور بـه‌دسـت آوردن بهترین رگرسیون، از پنج غلظت اول عصاره (۰/۰۱ تا ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) استفاده شد. برای این کـار در معادله خـط نمـودار حاصـله، y را برابـر ۵۰ در نظـر گرفته و میزان x (IC_{50}) محاسبه شد که این میـزان در مورد هندوانه ابوجهل ۱/۸۲ به‌دست آمد.

نتایج حاصل از بررسی اثر مهاری عصاره بر تولیـد رشته‌های آمیلوئیـدی: همـان‌طـور کـه در شـکل (۵) نشان داده شده است، با افزایش میزان غلظت عصـاره به‌کار رفته در واکنش، میزان طول موج ماکزیمم نمونه آمیلوئیدی کاهش یافته که مبین کاهش تولید یـا مهـار نانو رشته‌های آمیلوئیدی می‌باشد.



شکل ۵: درصد تولید رشته‌های آمیلوئیدی در برابر غلظت عصاره در محلول

نتایج حاصل از بررسی رشـته‌هـای آمیلوئیـدی بـا میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM): روند تولیـد نانو رشته‌های آمیلوئیدی در شکل (٦) دیده مـی‌شـود. بر این اساس، میزان رشته‌های آمیلوئید بتا در حضـور عصاره نسبت به غیاب آن، کاهش چشم‌گیـری داشـته است.



شکل ٦: تصاویر میکروسکوپ الکترونی از پروتئین آلبومین سرم گاوی در غیاب (سمت راست) و حضور عصاره هندوانه ابوجهل (سمت چپ)

بحث

مهمترین یافته‌های این تحقیق حاکی از آن است که متیل بتا دی گالاکتوپیرانوزید و بتا دی گلوکوپیرانوزید به‌ترتیب با ۲۹/۵۱ و ٦/۳۱ درصد از فراوان‌ترین ترکیبات شیمیایی موجود در عصاره بوده (شکل ۱ و جدول ٤) و هگزادکانوئیک اسید (میریستیک اسید) با ۱٦/۳۱ درصد و سپس اکتا و هگزا دکانوئیک اسید با ۱٤/۱۱ و ۱۰/۹٤ درصد، بیشترین اسیدهای چرب یافت شده در عصاره بوده اند که با روش کروماتوگرفی گازی-طیف سنجی جرمی ردیابی شده‌اند (شکل ۲ و جدول ۵). همچنین میزان مواد موثره اصلی عصاره شامل سیترولین و سیترونلول با HPLC به‌ترتیب ۰/۰۰٤۱ و ۰/۰۱۳ میلی‌گرم تعیین شد (شکل ۳ و جدول ٦). حضور اسیدهای چرب در مطالعات دیگری نیز گزارش شده است. به‌عنوان مثال Snafi و همکاران در سال ۲۰۱٦ اسیدهای چرب پالمیتیک اسید را به میزان ۱۰/٤۰ درصد و استئاریک اسید، آراشیدیک اسید و اولئیک اسید را به ترتیب به میزان ٦/۵۲، ۱/۷ و ۱۱/۷ درصد گزارش کردند (Al-Snafi, 2016). در مطالعه احمد و همکاران در سال ۲۰۲۰، میزان ۱ درصد از عصاره را پالمیتیک اسید تشکیل داده و سایر اسیدهای چرب دریابی نشده اند. از این نظر نتایج این تحقیق مقادیر بهتری در اسیدهای چرب را در عصاره نشان می‌دهد. به نظر می‌رسد، تفاوت موجود بین مقادیر ترکیبات ردیابی شده به دلیل عوامل تاثیر گذار بر اکوسیستم‌ها و گونه گیاه مربوط به آن منطقه است (Ahmed, Peiwen et al., 2020).

نتایج این مطالعه نشان داد میوه هندوانه ابوجهل دارای خواص آنتی اکسیدانی می‌باشد و از این جهت با مطالعات دیگری که قبلا صورت گرفته همخوانی دارد. بیش‌ترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره و به میزان ۷۱/۵ درصد دیده شد (شکل ٤ و جدول ۷). اثرات آنتی اکسیدانی عمدتا مربوط به دو ماده اصلی موجود در عصاره (سیترولین و سیترونلول) می‌باشد که در مطالعه حسین و همکارن در سال ۲۰۱٤ نیز به این اثرات اشاره شده است (Hussain, Rathore et al., 2014). به نظر می رسد حضور این ترکیبات در عصاره، عامل اصلی خاصیت آنتی‌اکسیدانی ردیابی شده در عصاره و همچنین اثرات مهاری عصاره بر تولید نانو رشته‌های آمیلوئیدی باشد (Sinyor, Mineo et al., 2020).

یکی از اهداف کلی این تحقیق بررسی توانایی گیاه دارویی هندوانه ابوجهل در مهار تولید رشته‌های

آمیلوئیدی بوده است. فرضیه آبشار آمیلوئید در تحقیقات بیماری آلزایمر اهمیت زیادی دارد. در این فرضیه بیان می شود مهم‌ترین علت بیماری آلزایمر تجمع پروتئین آمیلوئید بتا می‌باشد و درمان‌هایی که موجب کاهش آمیلوئید بتا می‌شوند سبب بهبود علائم بیماری آلزایمر می‌گردند (Creed and Milgram 2010; Giuffrida, Caraci et al., 2010) بنابراین، اگر تولید نانو رشته‌های آمیلوئیدی در حضور ترکیبی مهار شود، می‌تواند بر اثرات درمانی آن برای کاهش عوارض ناشی از بیماری آلزایمر دلالت داشته باشد (Shahat, Ibrahim et al., 2015). در این پژوهش با بررسی نتایج حاصل از طیف‌سنجی کنگورد مشخص گردید که عصاره هندوانه ابوجهل توانایی کاهش تولید پروتئین آمیلوئید را دارد. نتایج ما نشان داد که بیش‌ترین میزان مهار رشته‌های آمیلوئیدی در غلظت یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره و به میزان ۹۹ درصد می‌باشد (شکل ۵). علاوه براین، تصاویر میکروسکوپ الکترونی گذاره نیز که یکی از موثرترین ابزارهای مورد استفاده در تائید حضور تجمعات آمیلوئیدی می‌باشد، کاهش شدیدی را در میزان نانو رشته‌های آمیلوئیدی نشان داد. این مطلب موید اثرات مهاری ترکیبات موجود در عصاره بر تولید رشته‌های آمیلوئیدی می‌باشد (شکل ٦). بر اساس نتایج تحیقات راجا و همکاران در سال ۲۰۲۰، این اثرات کاهشی را می‌توان به حضور ترکیبات آنتی اکسیدان موجود در عصاره نسبت داد (Qi, Yi et al. 2020; Rajasekhar, Samanta et al., 2020).

نتیجه‌گیری نهایی

این مطالعه برای اولین اثرعصاره گیاه هندوانه ابوجهل بر میزان تولید نانو رشته‌های آمیلوئیدی را بررسی کرد و نشان داد که عصاره هیدروالکلی این گیاه، با حضور ترکیبات آنتی اکسیدان مثل سیترولین و سیترونلول و نیز اثرات مهاری که بر تولید رشته‌های آمیلوئیدی دارد، می‌تواند کاندیدای مناسبی برای پیشگیری و کاهش عوارش ناشی از بیماری آلزایمر- باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان از آزمایشگاه استاندارد دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت برای انجام آزمایش‌های کروماتوگرافی کمال تشکر را دارند.

References

1. Ahmed, M., Peiwen, Q., Gu, Z., Liu, Y., Sikandar, A., Hussain, D., Javeed, A., Shafi, J., Iqbal, M.F. and An, R. 2020. "Insecticidal activity and biochemical composition of *Citrullus colocynthis*, *Cannabis indica* and *Artemisia argyi* extracts against cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae* L.)." Scientific reports 10(1): 1-10.
2. Al-Snafi, A.E. 2016. "Chemical constituents and pharmacological effects of *Citrullus colocynthis*-A review." IOSR Journal of Pharmacy 6(3): 57-67.
3. Aliyu, A., Nwaedozie, J. and Adams, A. 2013. "Quality parameters of biodiesel produced from locally sourced *Moringa oleifera* and *Citrullus colocynthis* l. Seeds found in Kaduna, Nigeria." Int. res. J. pure appl. Chem. 3: 377-390.
4. Arasteh, A., Habibi-Rezaei, M., Ebrahim-Habibi, A. and Moosavi-Movahedi, A.A. 2012. "Response surface methodology for optimizing the bovine serum albumin fibrillation." The protein Journal, 31(6): 457-465.
5. Arise, R., Malomo, S., Adebayo, J. and Igunnu, A. 2009. "Effects of aqueous extract of *Eucalyptus globulus* on lipid peroxidation and selected enzymes of rat liver." Journal of Medicinal Plants Research, 3(2): 077-081.
6. Chawech, R., Jarraya, R., Girardi, C., Vansteelandt, M., Marti, G. Nasri, I., Racaud-Sultan, C. and Fabre, N. 2015. "Cucurbitacins from the leaves of

Citrullus colocynthis (L.) Schrad." Molecules, 20(10): 18001-18015.
7. Chen, Z., Bertin, R. and Froldi, G. 2013. "EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs." Food chemistry, 138(1): 414-420.
8. Creed, M.C. and Milgram, N.W. 2010. "Amyloid-modifying therapies for alzheimer's disease: therapeutic progress and its implications." Age 32(3): 365-384.
9. da Silva, J.A.T. and Hussain, A.I. 2017. "*Citrullus colocynthis* (L.) schrad. (colocynth): biotechnological perspectives." Emirates Journal of Food and Agriculture: 83-90.
10. Dorostkar, M.M., Zou, C., Blazquez-Llorca, L. and Herms, J. 2015. "Analyzing dendritic spine pathology in alzheimer's disease: problems and opportunities." Acta neuropathologica, 130(1): 1-19.
11. Giuffrida, M., Caraci, F., De Bona, P., Pappalardo, G., Nicoletti, F., Rizzarelli, E. and Copani, A. 2010. "The monomer state of beta-amyloid: where the alzheimer's disease protein meets physiology." Reviews in the neurosciences, 21(2): 83-94.
12. Gupta, S.C., Tripathi, T., Paswan, S.K., Agarwal, A.G., Rao, C.V. and Sidhu, O.P. 2018. "Phytochemical investigation, antioxidant and wound healing activities of *Citrullus colocynthis* (bitter apple)." Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 8(8): 418.
13. Holm, N.K., Jespersen, S.K., Thomassen, L.V., Wolff, T.Y., Sehgal, P., Thomsen, L.A., Christiansen, G., Andersen, C.B., Knudsen, A.D. and Otzen, D.E. 2007. "Aggregation and fibrillation of bovine serum albumin." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics, 1774(9): 1128-1138.
14. Hussain, A.I., Rathore, H.A., Sattar, M.Z., Chatha, S.A. Sarker, S.D. and Gilani, A.H. 2014. "*Citrullus colocynthis* (L.) Schrad (bitter apple fruit): A review of its phytochemistry, pharmacology, traditional uses and nutritional potential." Journal of ethnopharmacology, 155(1): 54-66.
15. Kamil, M., Ahmad, F. and Abdallah, E.T. 2020. "Scientific studies on *Citrullus Colocynthis* with special reference to anti-hyperglycemic activity." Journal of Pharmacy and Pharmacology, 8: 286-292.
16. Karimabad, M.N., Niknia, S., Golnabadi, M.B., Poor, S.F., Hajizadeh, M.R. and Mahmoodi, M. 2020. "Effect of *Citrullus colocynthis* extract on glycated hemoglobin formation (in vitro)." The Eurasian Journal of Medicine, 52(1): 47.
17. Mroczko, B., Groblewska, M., Litman-Zawadzka, A., Kornhuber, J. and Lewczuk, P. 2018. "Amyloid β oligomers (AβOs) in alzheimer's disease." Journal of Neural Transmission, 125(2): 177-191.
18. Najafi, S., Sanadgol, N., Nejad, B.S., Beiragi, M.A. and Sanadgol, E. 2010. "Phytochemical screening and antibacterial activity of *Citrullus colocynthis* (Linn.) Schrad against Staphylococcus aureus." Journal of Medicinal Plants Research 4(22): 2321-2325.
19. Norton, S., Matthews, F.E., Barnes, D.E. Yaffe, K. and Brayne, C. 2014. "Potential for primary prevention of alzheimer's disease: an analysis of population-based data." The Lancet Neurology, 13(8): 788-794.
20. O'Brien, R.J. and Wong, P.C. 2011. "Amyloid precursor protein processing and alzheimer's disease." Annual review of neuroscience, 34: 185-204.
21. Olushola-Siedoks, A., Igbo, U., Asieba, G., Ojo, B., Akinola, T. and Igwe, C. 2019. "Preliminary investigations on the health benefits of *Citrullus colocynthis* (L.) schrad seeds." European Journal of Nutrition & Food Safety: 187-198.
22. Qi, Y., Yi, P., He, T., Song, X., Liu, Y., Li, Q., Zheng, J., Song, R., Liu , C. and Zhang, Z. 2020. "Quercetin-loaded selenium nanoparticles inhibit amyloid-β aggregation and exhibit antioxidant activity." Colloids and surfaces A:

physicochemical and Engineering Aspects: 125058.
23. Rajasekhar, K., Samanta, S., Bagoband, V., Murugan, N.A. and Govindaraju, T. 2020. "Antioxidant berberine-derivative inhibits multifaceted amyloid toxicity." Iscience: 101005.
24. Shahat, A.A., Ibrahim, A.Y., Ezzeldin, E. and Alsaid, M.S. 2015. "Acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of some medicinal plants for treating neuro degenarative disease." African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines 12(3): 97-103.
25. Sharma, O.P. and Bhat, T.K. 2009. "DPPH antioxidant assay revisited." Food chemistry 113(4): 1202-1205.
26. Sinyor, B., Mineo, J. and Ochner, C. 2020. "Alzheimer's disease, inflammation and the role of antioxidants." Journal of Alzheimer's Disease Reports. 2(Preprint): 1-8.
27. Taghizadeh, M., Talaei, S.A. Djazayeri, A. and Salami, M. 2014. "Vitamin D supplementation restores suppressed synaptic plasticity in alzheimer's disease." Nutritional neuroscience, 17(4): 172-177.
28. Torkey, H., Abou-Yousef, H., Abdel Azeiz, A. and Hoda, E. 2009. "Insecticidal effect of cucurbitacin E glycoside isolated from *Citrullus colocynthis* against aphis craccivora." Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 3(4): 4060-4066.

Phytochemical evaluation and antioxidant and inhibitory effects of *Citrullus colocynthis* L. extract on production of amyloid nano–biofibrils from bovine serum albumin as a model protein

Mansouri, H.[1], Arasteh, Amir[2*], Khavari-Nejad, R.A.[3]

[1]M.Sc., Department of Biology, Faculty of Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

[2]Assistant Professor, Department of biology, Faculty of Science Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

[3]Professor, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: 2020-1-22 ; Accepted: 2020-12-9

Abstract

Citrullus colocynthis L. is one of the plants that it's anti–oxidant and anti–diabetic effects has been proven in previous studies. In this study, in addition to the phytochemical study of hydro–alcoholic extract of Colocynth, its anti–oxidant and inhibitory effects on the production of amyloid nanobiofibrils from bovine serum albumin as a model protein have been investigated. The fruit plant was collected from the desert areas around Qom in fall 2017. After drying, the extraction was performed by maaceration method. The secondary compounds of the extract were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry and the amount of its most important compounds including citrulline and citronellol was obtained by HPLC. The antioxidant activity of the extract was evaluated using DPPH method, then the amyloid fibrils were prepared in the test tube at high temperature and low pH and electron microscopy imaging was used to confirm the presence of the fibrils. Congored spectroscopy was used to investigate the inhibitory effects of the extract on the production of amyloid fibrils. The results showed that methyl beta-galactopyranoside (29.51%) and beta-diglucopyranoside (6.31%) were the most abundant chemical compounds and tetradcanoic acid (16.31%) and then octa (14.11%) and hexadecanoic acid (10.94%) were the most compounds found in the extract. The levels of citrulline and citronellol in the extract were 0.0041 and 0.013 mg, respectively. The highest anti–oxidant activity was at a concentration of 10 mg/ml of the extract (71.5%) and the highest inhibition of amyloid fibers production was at a concentration of 1 mg/ml (99%). Therefore, colocynth extract with the presence of potent anti–oxidant compounds and its inhibitory effects on the amyloid fibers production, may be useful in reducing the incidence of Alzheimer's disease.

***Keywords*:** Amyloid, Alzheimer, Citrulline, Citronellol, *Citrullus colocynthis* L.

*Corresponding author; ra.khavarinejad@gmail.com