مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی
سال دهم، شماره اول، پیاپی سی و هفتم، تابستان ۱۴۰۰ (۲۲-۱۱)

مقاله پژوهشی:

بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی و مهاری عصاره دانه سویا (*Glycine max*) بر استیل کولین استراز و تولید نانوبیوفیبریل‌های آمیلوئیدی

فرشته فلاح دیگسرا[۱]، امیر آراسته[۲*]
۱. کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران
۲. استادیار، گروه زیست‌شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/٦/۸ – تاریخ پذیرش: ۱٤۰۰/٤/۲۸)

چکیده
سویا (*Glycine max*) گیاهی از خانواده بقولات و از مهم‌ترین گیاهان روغنی است. دانه سویا سرشار از پروتئین و ترکیبات فیتوشیمیایی مختلف، به‌ویژه ایزوفلاون‌ها می‌باشد. هدف از انجام این تحقیق بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی و مهاری عصاره هیدروالکلی دانه سویا بر استیل‌کولین‌استراز و تولید نانوبیوفیبریل‌های آمیلوئیدی در پروتئین آلبومین سرم گاوی به‌عنوان یک پروتئین مدل است. ابتدا دانه زردرنگ سویا پودر شده، سپس عصاره هیدروالکلی آن تهیه گردید. با روش گاز کروماتوگرافی جرمی، ترکیبات عصاره به دست آمد. اثرات ضدآلزایمری با سنجش فعالیت آنتی‌آکسیدانی به‌روش DPPH، بررسی مهار آنزیم استیل‌کولین‌استراز به روش المن و بررسی مهار تولید نانوبیوفیبریل‌های آمیلوئیدی به روش جذب سنجی کنگورد انجام شد. از تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی گذاره برای تأیید حضور رشته‌های آمیلوئیدی استفاده شد. حضور ماده مؤثره جنیستئین، به مقدار ۲/۹۷ درصد و اسیدهای چرب پالمیتیک و لینولئیک‌اسید به ترتیب ۳/۱۱ و ۱۰/٦۹ درصد در عصاره دانه زرد سویا تأیید شد. بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره سویا با دوزهای مختلف نشان داد که با افزایش غلظت عصاره، درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز افزایش می‌یابد. بررسی مهار آنزیم استیل‌کولین‌استراز با استفاده از آنالوگ سوبسترا به نام استیل تیوکولین یدید (*ATCI*) نشان داد که با افزایش غلظت عصاره میزان مهار آنزیم افزایش می‌یابد. میزان عصاره در غلظت‌های بالا موجب کاهش تولید نانورشته‌های آمیلوئیدی شد. این مطلب با تصاویر میکروسکوپ الکترونی مورد تأیید قرار گرفت. دانه‌های زرد سویا، با اثرات آنتی‌اکسیدانی و مهاری خوبی که بر آنزیم استیل‌کولین‌استراز دارند، می‌توانند کاندیدای مناسبی برای کاهش عوارض جانبی آلزایمر باشند.

واژه‌های کلیدی: آلزایمر، آنتی‌اکسیدان، استیل‌کولین‌استراز، جنیستئین، دانه سویا.

* نویسندهٔ مسئول: امیر آراسته Email: arasteh@iaurasht.ac.ir

Investigation of antioxidant and Inhibitory properties of soybean seeds extract (*Glycine max*) on the acetylcholinesterase and the production of Amyloid Nano-biofibrils

Fereshteh Fallah Digsara[1], Amir Arasteh[2*]
1. M. A., Department of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran
2. Assistant Professor, Department of biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

(Received: Aug. 30.2019 - Accepted: Jul. 19, 2021)

Abstract
Soybean (*Glycine max*) is a plant of the legume family and one of the most important oil plants. Soybean is rich in various proteins and phytochemicals, especially isoflavones. The aim of this study was to investigate the antioxidant and inhibitory effects of hydro-alcoholic extract of soybean seed on acetyl cholinesterase and production of amyloid nanobiofibrils in bovine serum albumin protein as a model protein. First, the yellow soybean seeds was powdered, then its hydro-alcoholic extract was prepared. The extracts composition were obtained by GC-MS spectroscopy. Anti-Alzheimer's effects were performed by measuring antioxidant activity by DPPH method, Inhibition of acetylcholinesterase by ellman method and inhibition of the production of amyloid nanobiofibrils by congored absorption method. Transmission electron microscopy was used to confirm the presence of amyloid fibrils. The presence of genistein active component in yellow soybean seed extract was confirmed by 2.97% and palmitic and linoleic acids by 3.11 and 10.69%, respectively. Investigation of antioxidant activity of soybean extract in different doses showed that with increasing the concentration of the extract, the percentage of antioxidant activity also increases. Investigation of acetylcholinesterase inhibition using a substrate analogue called acetylthiocholine iodide (ATCI) showed that with increasing the concentration of the extract, the amount of enzyme inhibition increases. The amounts of extract at high concentrations reduced the production of amyloid nanofibrils. This was confirmed by electron microscope images. Yellow soybeans, with their good antioxidant and inhibitory effects on the acetylcholinesterase enzyme, can be a good candidate for reducing the side effects of Alzheimer's.

Keywords: Acetylcholinesterase, Alzheimer, Antioxidant, Genistein, Soybean.

مقدمه

بیماری آلزایمر (AD)[1] یکی از علل زوال عقلی است که در حافظه و سایر توابع شناختی بروز می‌کند. این بیماری فرساینده با یک نقص در فعالیت کولینرژیک که نتیجه آن اختلال در حافظه، قضاوت فضایی و غیره است، مشخص می‌گردد (Sharififar *et al*., 2012). بیماری آلزایمر شایع‌ترین بیماری عصبی است که به‌طور کلی به دو نوع خانوادگی (*FAD*)[2] و پراکنده (*SAD*)[3] تقسیم می‌شود (Bertram *et al*., 2010). این بیماری دارای دو خصوصیت نوروپاتولوژیکی است (Cipriani *et al*., 2011; Amani, 2017). یکی تجمع پلاک در قسمت خارج سلولی نورون‌ها بوده و پپتیدهای بتا آمیلوئید (*Aβ*) جزو اصلی این پلاک‌ها را تشکیل می‌دهند و دیگری تشکیل کلافه‌های نوروفیبریلاری در داخل نورون‌ها است (Cooper & Ma, 2017). در فرایند تجمع پروتئین[4]، مولکول‌هایی که در حالت طبیعی به شکل منومری یا الیگومرهای کوچک در محلول وجود دارند، به یکدیگر متصل شده و ذرات پروتئینی درشت‌تری را تشکیل می‌دهند که یا به‌صورت پراکنده[5] در محلول می‌مانند و یا به‌تدریج رسوب یافته و از محلول جدا می‌شوند (Arasteh & Salehzadeh, 2016; Schramm *et al*., 2020). رشته‌های آمیلوئیدی دسته‌ای از نانو رشته‌های پروتئینی هستند، که در آن پروتئین طبیعی به رشته‌های متراکم تبدیل شده‌اند. اخیراً این رشته‌ها با توجه به ساختار منحصر به فردی که دارند، برای تولید نانومواد زیستی مورد توجه قرار گرفته‌اند (Lotfi *et al*., 2017).

مطالعات نشان داده‌اند که مواد مؤثره سویا به تنهایی می‌توانند یادگیری و حافظه را بهبود بخشیده و آغاز برخی از بیماری‌های نورولوژیکی از جمله آلزایمر را به تعویق اندازند (Nasirzadeh *et al*., 2013). سویا (گلیسین مکس)[6] از تیره نخودیان[7] و خانواده باقلاسانان[8] گونه‌ای بومی در شرق آسیا است. روغن‌ها و پروتئین ۶۰ درصد وزن خشک سویا را تشکیل می‌دهند. همچنین حاوی کربوهیدرات‌ها و ایزوفلاون‌های جنیستین و دایدزیین است که نوعی فیتواستروژن به‌حساب می‌آیند. استروژن‌ها خواص آنتی‌اکسیدانی داشته و محافظت از سلول‌ها در برابر اثرات مضر رادیکال‌های آزاد که به افزایش پیری معروف هستند، در جلوگیری و درمان تعدادی از بیماری‌ها مانند آترواسکلروز، التهاب مفاصل و اختلال دیابتی و عروق قلبی را بر عهده دارند (Sharififar *et al*., 2012). در این مطالعه، اثرات ضد آلزایمری دانه زرد رنگ سویا در عصاره هیدروالکلی آن موردبررسی قرار گرفت. برای بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی و مهاری عصاره دانه سویا بر استیل‌کولین‌استراز و تولید نانوبیوفیبریل‌های آمیلوئیدی از آلبومین سرم گاوی به عنوان یک پروتئین مدل استفاده شد.

مواد و روش‌ها

مواد

دانه زرد رنگ سویا، آلبومین سرم گاوی، کنگورد، ۱و۱- دی فنیل-۲-پیکریل-هیدرازیل (*DPPH*)، استیل‌کولین‌استراز، استیل‌تیوکولین‌یدید (*ATCI*)، دی تیونیتروبنزوئیک اسید (*DTNB*) و دیگر مواد شیمیایی از شرکت مرک آلمان خریداری شدند. مواد ذکرشده با بالاترین درجه خلوص مورداستفاده قرار گرفتند.

شناسایی و تهیه نمونه

گیاه سویا (*Glycine max*) در اردیبهشت‌ماه ۱۳۹۷ در منطقه دیگه سرای تالش واقع در استان گیلان کشت گردید. پس از برداشت، دانه‌های زرد رنگ سویا به خوبی

1. Alzheimer's disease
2. Familial Alzheimer's disease
3. Sporadic Alzheimer's disease
4. Protein aggregation
5. Dispersed
6. Glycine max
7. Leguminoceae
8. Fabaceae

شسته و در محلی مناسب کاملاً خشک شد. دانه‌های حاصله با هاون دستی و بعد از آن با آسیاب برقی چندین مرتبه آسیاب شده و از صافی عبور داده شد.

عصاره‌گیری نمونه

پس از آسیاب‌کردن و آماده‌سازی پودر دانه سویا، عصاره سویا را می‌توان از روش عصاره‌گیری هیدروالکلی و روش خیساندن[1] عصاره هیدروالکلی با استفاده از دستگاه تقطیر با حلال مناسب تهیه نمود.

تهیه عصاره هیدروالکلی

در یک بشر تمیز (ترجیحاً اتوکلاو شده) مقدار ۱۰ گرم پودر سویا، در ۲۰۰ میلی‌لیتر محلول ۸۰ درصد اتانول و آب (۱۶۰ میلی‌لیتر اتانول و ۴۰ میلی‌لیتر آب مقطر) ریخته شد. پس از بستن آن به‌کمک پارافیلم، به مدت ۴۸ الی۷۲ ساعت در دمای آزمایشگاه بر روی شیکر یا هیتر استایرر قرار داده و سپس محلول به‌دست آمده را به‌شدت تکان داده تا عصاره مناسب و یک دستی به‌دست آید. سپس ترکیب گیاه و حلال را از گاز استریل عبور داده و عصاره حاصله را درون یک بشر تمیز ریخته و برای حلال پرانی و حذف باقیمانده اتانول، محلول صاف شده را تا رسیدن به حجم یک چهارم میزان اولیه دوباره در دمای آزمایشگاه بر روی هیتر استایرر قرار داده و سپس تمام عصاره را زیر نور UV قرارداده شد. عصاره در ظرف شیشه‌ای دودی ریخته شده و تا زمان استفاده در دمای ۴ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردید (Yusnawan, 2018).

تهیه عصاره هیدروالکلی به روش خیساندن

مقدار ۱۰ گرم از پودر خشک شده دانه گیاه سویا داخل بطری درپیچ دار ریخته شده و با حلال به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس روی شیکر به مدت ۴۸ ساعت حرکت داده و با کاغذ صافی، صاف شد. به منظور تبخیر حلال، محلول به‌دست آمده در دستگاه تقطیر قرار گرفت. عصاره حاصله تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد (Ponnusha *et al*., 2011).

بررسی عصاره به روش گاز کروماتوگرافی جرمی (*GC–Mass*)

پس از آماده‌سازی، عصاره مورد نظر را آبگیری کرده تا کمی غلیظتر شود و میزان آب در عصاره به حداقل برسد. از گاز هلیم به‌عنوان گاز حامل و فاز متحرک با نرخ جریان ۳۶/۸ سانتی‌متر بر ثانیه استفاده شد. حدود یک میکرولیتر از نمونه عصاره آماده شده سویا به‌روش ماسیراسیون در سرنگ GC-MS قرار گرفت و با نرخ تزریق ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه به ستون تزریق شد. برنامه دمایی Oven روی دمای اولیه ۵۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد و با نرخ افزایشی ۸ درجه بر دقیقه به دمای ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد رسید. سپس با نرخ ۷ درجه بر دقیقه به دمای ۲۹۰ درجه سانتی‌گراد رسانیده شد. پتانسیل یونیزاسیون آشکارساز انتخابی–جرمی ۷۰ الکترون ولت (eV) و طیف‌سنج جرمی در دمای ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد فعال شد (Alghamdi *et al*., 2018).

بررسی اثر ضدآلزایمری به‌روش مهار تولید نانوبیوفیبریل‌های آمیلوئیدی

در یک میکروتیوب ته گرد ۲ میلی‌لیتری ۲۰ میلی‌گرم پودر آلبومین سرم گاوی ریخته (با دقت وزن شود) و یک میلی‌لیتر بافر سیترات–فسفات با pH برابر ۳ به آن اضافه و با هم ترکیب شدند. در شش میکروتیوب دیگر هر کدام ۱۰۰ میکرولیتر از این محلول ریخته و ۳۰۰ میکرولیتر بافر سیترات–فسفات اضافه گردید. بدین ترتیب غلظت نهایی ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای تمام میکروتیوب‌ها تهیه شد. محلول‌ها مطابق جدول ۱ تهیه شده و سپس در هر میکروتیوب یک مگنت کوچک برنجی قرار داده و با پارا فیلم بسته شد. میکروتیوب‌ها برای ۴۸ ساعت تا تولید رشته‌های آمیلوئیدی روی هیتر استایرر با دمای ۶۰ درجه سانتگراد با دور ۱۰۰ (دور در دقیقه) قرار داده شد (Arasteh *et al*., 2012).

1. Maceration

جدول ۱. تهیه رقت‌های مختف از عصاره

شماره میکروتیوب	محلول آلبومین سرم گاوی با غلظت ۵mg/ml (میکرولیتر)	استوک عصاره با غلظت ۱۰mg/ml (میکرولیتر)	بافر سیترات–فسفات pH= ۳ (میکرولیتر)	غلظت عصاره در محلول (mg/ml)
۱	۴۰۰	–	۱۰۰	۰
۲	۴۰۰	۲۰	۸۰	۰/۴
۳	۴۰۰	۴۰	۶۰	۰/۸
۴	۴۰۰	۶۰	۴۰	۱/۲
۵	۴۰۰	۸۰	۲۰	۱/۶
۶	۴۰۰	۱۰۰	–	۲

برای انجام طیف‌سنجی کنگورد، در شش میکروتیوب تمیز هر کدام ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های آمیلوئیدی ریخته و ۱۹۰۰ میکرولیتر (۱/۹ میلی‌لیتر) از بافر کنگورد به آن اضافه شد. میکروتیوب‌ها برای ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار گرفته، سپس میزان جذب در محدوده ۴۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر با اسپکتروفوتومتر و در مقابل بافر سیترات–فسفات به عنوان بلانک اندازه‌گیری و ثبت شد (Arasteh *et al*., 2012).

میکروسکوپ الکترونی گذاره (*TEM*)

برای مشاهده رشته‌های آمیلوئیدی از میکروسکوپ الکترونی گذاره استفاده شد. میزان ۵ میکرولیتر از نمونه‌های آمیلوئیدی حاصل از آلبومین سرم گاوی با غلظت نهایی یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با بافرسیترات–فسفات برای ۴۵ ثانیه، روی گریدهای مسی پوشیده شده با لایه فرموار قرار داده شد و پس از آن مقادیر اضافه با کاغذ صافی برداشته شد. نمونه نیاز به رنگ‌آمیزی[1] اورانیل استات دارد. سپس نمونه‌ها با محلول ۳ درصد وزنی اورانیل استات به مدت یک دقیقه رنگ‌آمیزی و باز مقادیر اضافه با کاغذ صافی برداشته شد. پس از خشک‌شدن به مدت دو ساعت در دمای آزمایشگاه، گریدهای آماده با میکروسکوپ الکترونی گذاره Philips EM 208(S) در ولتاژ ۷۵ کیلوولت تصویربرداری گردید. از بزرگ‌نمایی ۶۰ هزار برابر استفاده گردید (Holm *et al*., 2007).

1. Staining

بررسی اثر ضد آلزایمری به روش سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی

مطابق جدول ۲، دوزهای مختلف از یک استوک ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره هیدروالکلی سویا تهیه شده و فعالیت آنتی‌اکسیدانی با روش المن و با استفاده از ترکیب *DPPH*، برای هر یک از دوزهای تهیه‌شده به صورت مجزا انجام گردید.

جدول ۲. تهیه دوزهای مختلف نمونه
(بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)

شماره لوله	استوک نمونه (میکرولیتر)	اتانول (میکرولیتر)	دوز نمونه (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)
۱	۱۰۰	۹۰۰	۱
۲	۲۰۰	۸۰۰	۲
۳	۳۰۰	۷۰۰	۳
۴	۴۰۰	۶۰۰	۴
۵	۵۰۰	۵۰۰	۵
۶	۶۰۰	۴۰۰	۶
۷	۷۰۰	۳۰۰	۷
۸	۸۰۰	۲۰۰	۸
۹	۹۰۰	۱۰۰	۹
۱۰	۱۰۰۰	–	۱۰

در این روش نمونه به‌صورت مایع درون ظرفی از جنس کوارتز یا شیشه ریخته شده و در معرض تابش الکترومغناطیسی حاصل از منبع تابش لامپ دوتریم و یا تنگستن–هالوژن، که به‌ترتیب تابشی در نواحی فرابنفش و مرئی تولید می‌نمایند، قرار داده شد. سپس جذب لوله‌های کنترل و نمونه اندازه‌گیری و ثبت شد. با استفاده از فرمول درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی (رابطه ۱) محاسبه شد (Arasteh *et al*., 2012).

$$\text{درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی} = \frac{(A_{Control} - A_{Sample})}{A_{Control}} \times ۱۰۰ \quad (۱)$$

بررسی اثر مهارکنندگی عصاره بر آنزیم استیل کولین استراز

مهار آنزیم استیل‌کولین‌استراز با استفاده از آنالوگ سوبسترا محلول‌ها را برای ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس از محلول سوبسترا (۱۰/۸۵ میلی‌گرم *ATCI* در ۵ میلی‌لیتر بافر فسفات) به آن افزوده و برای ۵ دقیقه دیگر در دمای ۲۵ درجه نگهداری شد. استیل تیوکولین یدید (*ATCI*) که توسط آنزیم به تیوکولین تبدیل گردید که تیوکولین با ترکیب کروموژن دی‌تیو نیتروبنزوئیک اسید (*DTNB*) واکنش داده که آنیون زرد رنگ نیترو بنزوئیک اسید تولید شده که در طول موج ۴۱۲ نانومتر جذب دارد. پس از انجام آزمایش، جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۱۲ نانومتر و در برابر بلانک اندازه‌گیری و ثبت شد و با استفاده از رابطه (۲) درصد مهار آنزیم محاسبه شد (Vinutha *et al*., 2007).

$$\text{درصد مهار آنزیم} = ۱۰۰ - \left(\left[\frac{Abs.S}{Abs.C} \right] \right) \times ۱۰۰ \quad (۲)$$

نتایج

بررسی عصاره به روش گاز کروماتوگرافی جرمی (*GC–Mass*)

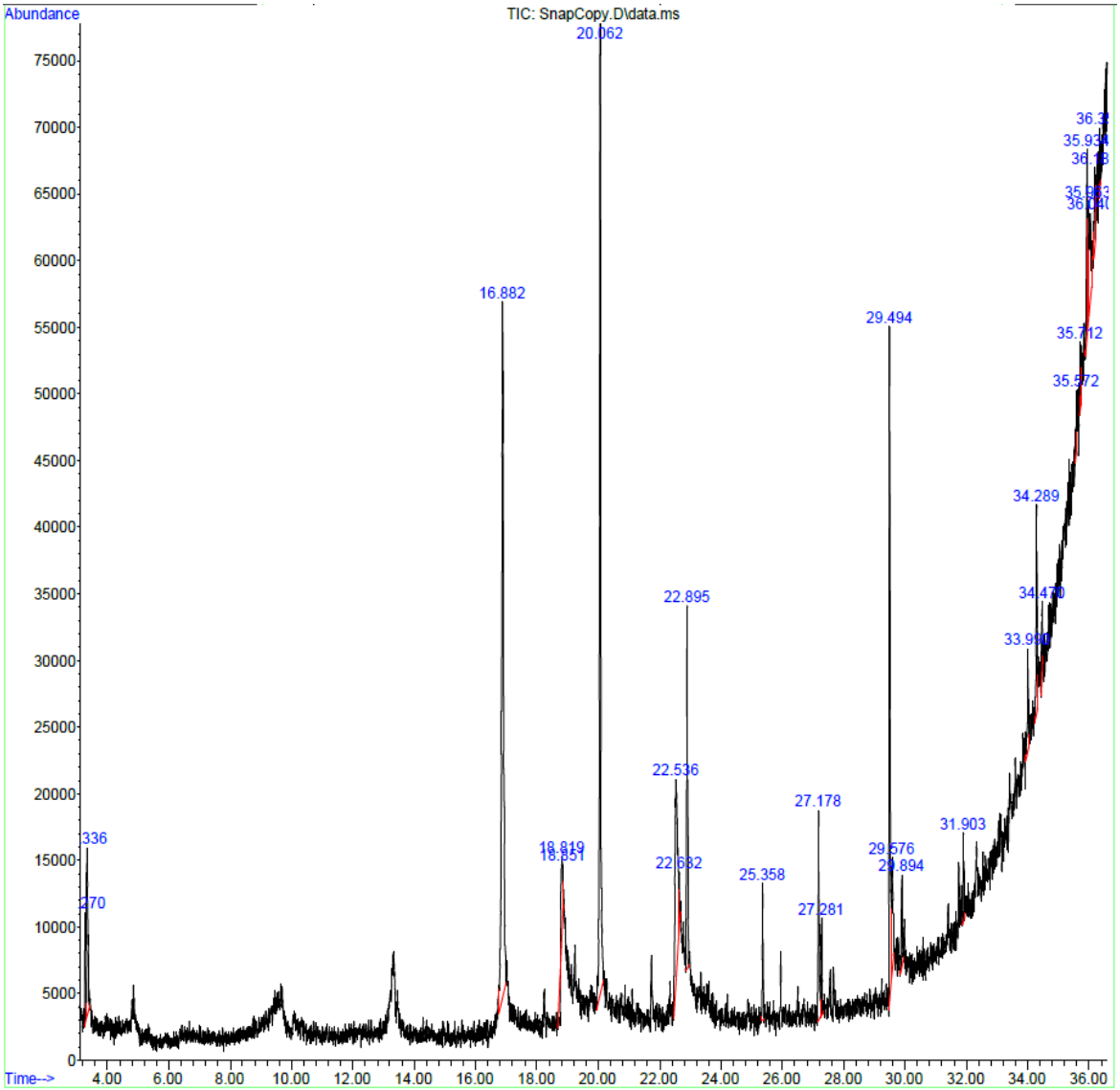
پیک‌هایی که در شکل ۱ مشاهده می‌شود به ترتیب زمان تشخیص آورده شده است. می‌تواند نوع ماده مربوط به هر پیک را با بیان درصد اطمینان ارائه نماید. نمودار کلی به‌دست‌آمده از روش طیف‌سنجی جرمی در شکل ۱ ارائه شده است. بر این اساس ترکیب جنیستئین، به مقدار ۲/۹۷ درصد و اسیدهای چرب پالمیتیک و لینولئیک‌اسید به میزان ۳/۱۱ و ۱۰/۶۹ درصد در عصاره دانه زرد سویا یافت شدند. نام ترکیبات موجود در عصاره در جدول ۵ آمده است.

نتایج حاصل از بررسی رشته‌های آمیلوئیدی به روش طیف‌سنجی کنگورد

نتایج به‌دست‌آمده نشان داد، با افزایش غلظت عصاره سویا از تولید رشته‌های آمیلوئیدی کاسته شده است. پس در این صورت می‌توان گفت که عصاره سویا خاصیت ضد آلزایمری داشته است.

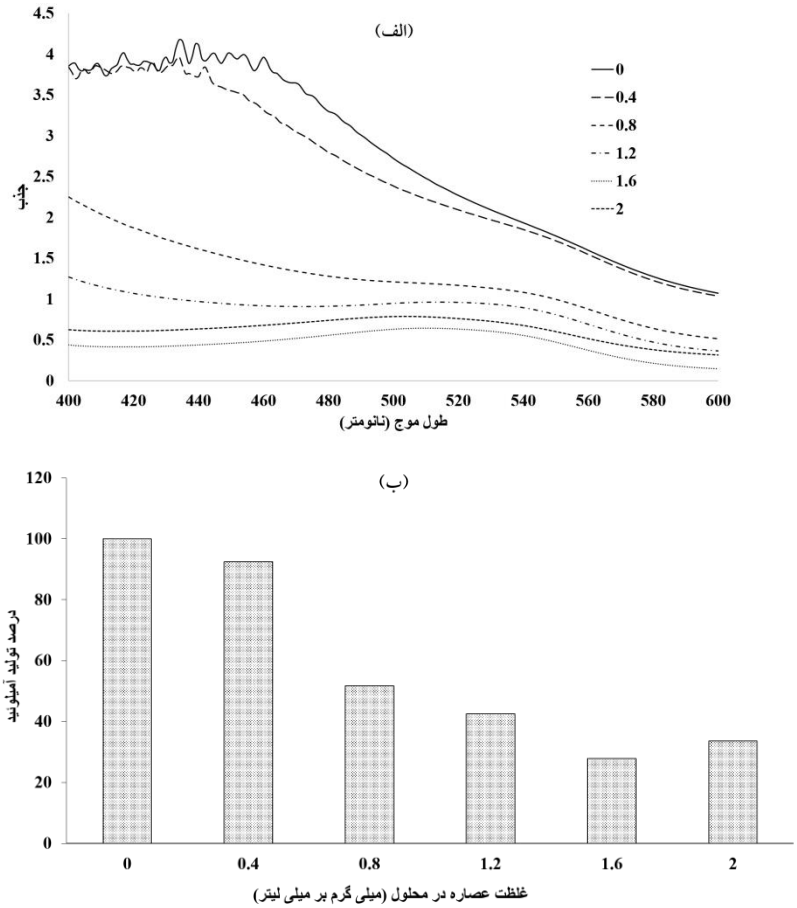
جدول ۳. ترکیبات موجود در عصاره سویا

ردیف	ماده اصلی	نام دیگر	زمان شناسایی (دقیقه)	احتمال حضور (درصد)	میزان حضور (درصد)
۱	۱،۳- بنزودی وکسول، ۵- (۲- نیترو- ۱- پروپن- ۱- ایل)	نیترو ایزواسفرول	۳/۲۷	۹	۱/۵۳
۲	۵،۷ دی هیدروکسی ۳ (۴ هیدروکسی فنیل) کروم ۱،۴	تری هیدروکسی ایزوفلاون (جنیستئین)	۳/۳۳	۱۰	۲/۹۷
۳	کلروفنیل) ۸- فلوئور ۳- متیل	کینولینون، ۲۱	۱۳/۳۲	۵۶	۰/۹۱
۴	۴-(۴-کلروفنیل)-۶،۲-دیفنیل پیریدین	پیریدین، ۴ - (۴ - کلروفنیل)- ۲،۶ -دی فنیل	۱۶/۷۶	۴۷	۱/۱۲
۵	دی_مانیتول		۱۸/۸۱	۱۲	۱/۳۹
۶	سریل- سرینn-		۲۲/۵۳	۳۸	۸/۴۷
۷	بنزن استیک اسید	β - فنیل استیک اسید	۲۲/۸۶	۴۳	۶/۱۲
۸	سیستین		۲۲/۸۹	۶۴	۷/۴۲
۹	جیبرلین	GA_3	۲۴/۷۷	۵۹	۰/۲۱
۱۰	۴-برومو-۳-کلروآنیلین		۲۴/۸۸	۵	۰/۴۹
۱۱	اسید هگزادکانوئیکn	پالمیتیک اسید	۲۷/۱۷	۹۶	۳/۱۱
۱۲	اکتادکا ۹،۱۲ اسید دی انوئیک	اسید لینولئیک	۲۹/۴۹	۹۹	۱۰/۶۹



شکل ۱. کروماتوگرام عصاره هیدروالکلی سویا با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر

در این تحقیق اثر غلظت عصاره سویا بر فرایند فیبریل زایی بررسی شد و نتایج حاصله با روش طیف‌سنجی کنگورد به صورت تغییرات طول موج ماکزیمم ($\lambda\ max$) مورد تأیید قرار گرفت. مشخص شد که بهترین شرایط تشکیل رشته‌های آمیلوئیدی در غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از پروتئین *BSA*، در عدم حضور عصاره سویا، در pH بافر برابر ۳ و پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون در دمای ۶۰ الی ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته شد. با افزایش غلظت عصاره هیدروالکلی سویا، از تولید رشته‌های آمیلوئیدی کاسته شد که عصاره مانع آمیلوئیدی شده است که عصاره سویا اثرات مهاری بر تولید رشته‌های پروتئینی آمیلوئیدی داشته است. از روش ساده جذب‌سنجی کنگورد به عنوان آزمایش اولیه برای تأیید حضور نانو رشته‌های پروتئینی آمیلوئید در حضور و عدم حضور عصاره سویا استفاده شد. در این راستا، میزان جذب در طول موج ماکزیمم به‌عنوان یک شاخص موثق معرفی شد. که موج ماکزیمم ($\lambda\ max$) هم به سمت نور قرمز حرکت کرده و هم میزان جذب بالا رفته است. نمودار طیف‌سنجی مرئی برای عصاره هیدروالکلی گیاه سویا در شکل ۲ نشان داده شد.



شکل ۲. نمودار طیف‌سنجی مرئی برای عصاره هیدروالکلی گیاه سویا. (الف) نمودار جذب در برابر طول موج در غلظت‌های مختلف از عصاره، (ب) نمودار درصد تولید رشته های آمیلوئیدی در غلظت‌های مختف از عصاره.

نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی گذاره (*TEM*)

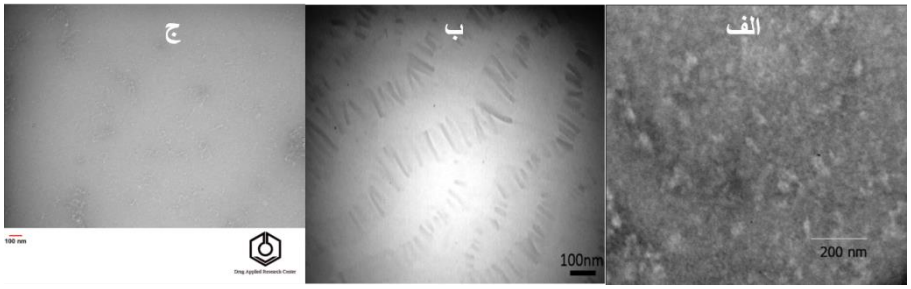
در این مطالعه در سه حالت مختلف از فیبریل‌ها تصاویر میکروسکوپ الکترونی تهیه شده است. دسته اول، آلبومین سرم گاوی قبل از تشکیل رشته‌های آمیلوئیدی، دسته دوم که فیبریل‌های به‌دست‌آمده پس از تولید رشته‌های آمیلوئیدی است که رشته‌های واضح با قطر تقریبی ۲۰ نانومتر را نشان می‌دهد، دسته سوم تشکیل رشته‌های پروتئین در حضور عصاره سویا است. این روش یکی از مطمئن‌ترین ابزارهای مورد استفاده در جهت اثبات وجود تجمعات آمیلوئیدی می‌باشد. تصاویر به‌دست‌آمده در مقایسه با نمونه کنترل که در شرایط فیبریل زایی قرار نگرفته است، ساختارهای فیبریلی را به‌طور واضح که در شکل ۳ نشان داده است که نتایج حاصل از بررسی رشته‌های آمیلوئیدی به روش میکروسکوپ الکترونی گذاره نیز مورد تأیید قرار گرفت.

نتایج حاصل از سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی

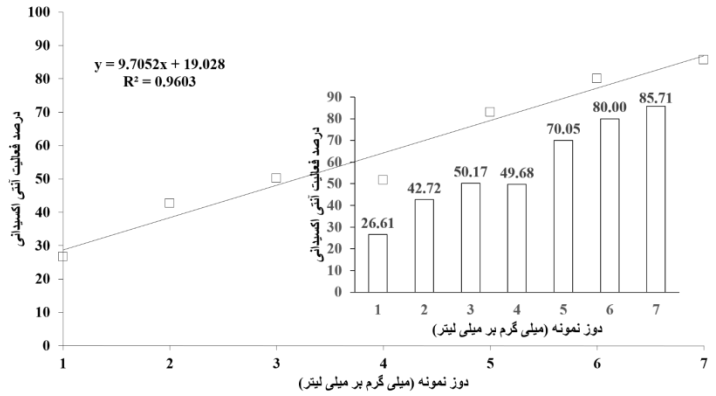
با افزایش غلظت عصاره سویا، درصد بازدارندگی رادیکال *DPPH* شدت می‌یابد که نشان‌دهنده فعالیت آنتی‌اکسیدانی دانه زرد سویا است. دستگاه اسپکتروفوتومتر را روی طول موج ۵۱۸ نانومتر تنظیم شده را با محتویات لوله بلانک صفر نموده شد. جذب نوری لوله‌های کنترل و نمونه قرائت شد. درصد مهار رادیکال‌های آزاد *DPPH* با استفاده از فرمول محاسبه شد. شکل ۴ نمودار درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها با دوزهای مختلف را نشان داده است.

نتایج حاصل از بررسی فعالیت آنزیم استیل‌کولین استراز

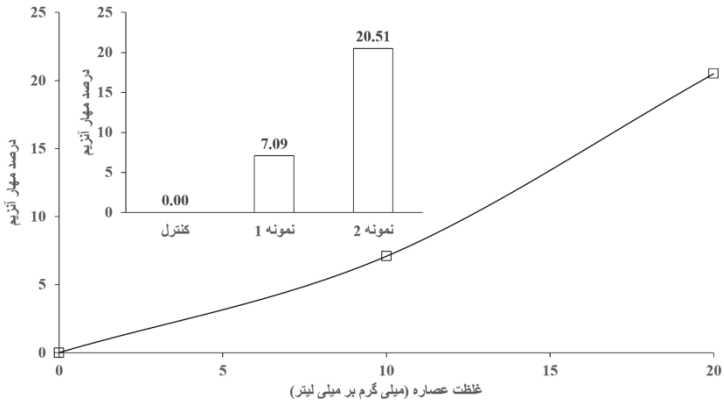
در این آزمایش، آنزیم بر آنالوگ سوبسترا (*ATCI*) اثر گذاشته و آن را تجزیه کرده است. محصول ایجاد شده با کروموژن (*DTNB*) واکنش داده و ایجاد رنگ نموده که حداکثر جذب را در ۴۱۲ نانومتر دارد. نمونه اول (S1) با ۵۰۰ میکرو لیتر بافر و ۵۰۰ میکرو لیتر از عصاره آماده شد، که غلظت آن ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و نمونه دوم (S2) با ۱۰۰۰ میکرو لیتر از عصاره آماده شد، که غلظت آن ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است. شکل ۵ نمودار درصد مهار آنزیم استیل کولین استرازی در غلظت‌های مختلف از عصاره سویا را نشان داده است.



شکل ۳. تصاویر میکروسکوپ الکترونی از فیبریل‌های به‌دست آمده همراه با نمونه کنترل، الف) قبل از تشکیل رشته‌های آمیلوئیدی، ب) پس از تشکیل رشته‌های آمیلوئیدی، ج) در حضور عصاره سویا



شکل ٤. نمودار درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی در دوزهای مختلف از عصاره



شکل ۵. نمودار درصد مهار آنزیم استیل کولین استراز در غلظت‌های مختلف از عصاره سویا

بحث و نتیجه‌گیری

تحلیل نتایج حاصل از بررسی عصاره با گاز کروماتوگرافی جرمی (*GC–Mass*)

طبق بررسی‌های انجام‌شده مشخص گردید، می‌توان نوع ماده مربوط به هر پیک را با بیان درصد اطمینان از روش طیف‌سنجی جرمی ارائه نمود. حضور ماده مؤثره جنیستئین، به مقدار ۲/۹۷ درصد و اسیدهای چرب پالمیتیک و لینولئیک‌اسید به میزان ۳/۱۱ و ۱۰/۶۹ درصد در عصاره دانه زرد سویا تأیید شد. بنابراین می‌توان عنوان نمود که به طورکلی، کار در گاز کروماتوگرافی جرمی با دیگر محققین یکسان بوده اما با توجه به مستندات، نتایج بررسی‌های ما بهتر از نتایج دیگر محققین (Correa *et al*., 2010; Fisk & Gray, 2011; Zhang *et al*., 2011, Kim *et al*., 2014) بوده است که دلیل آن می‌تواند بستگی به نوع گیاه سویا، نحوه خشک کرده دانه‌های زرد رنگ سویا، اندازه پودر آسیاب شده و هم‌چنین عصاره‌گیری داشته باشد.

تحلیل نتایج حاصل از بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی

پژوهش‌گران در پژوهشی موفق شدند علاوه بر اسید وانیلیک و وانیلین، اسید فرولیک را نیز در سوسپانسیون سویا شناسایی کنند. اسید فرولیک، اسید وانیلیک و وانیلین نیز برای سلامت انسان مفید است. به طور خاص، اسید فرولیک به عنوان یک عامل ضد التهابی، ضد دیابتی، ضد پیری، ضد آپوپتوتیک و ضد سرطان، به‌طور عمده از طریق خواص آنتی‌اکسیدانی قوی آن به‌عنوان پتانسیل درمانی مطرح می‌باشد (Sansanelli *et al*., 2014). Ponnusha *et al*. (2011) در بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی سویا از مدل رادیکال پایدار *DPPH* استفاده کردند. آنتی‌اکسیدان‌ها با *DPPH* رنگ بنفش ارغوانی واکنش نشان داده و آن را به ۲،۲–دی فنیل –۱– پیکریل هیدرازین زرد رنگ[1] تبدیل نمود. میزان تغییر رنگ به‌دلیل خاصیت پتانسیل در پاک‌کنندگی آنتی‌اکسیدانی عصاره سویا بود که به خاطر توانایی اهدای هیدروژن است، دریافتند که فعالیت پاک‌کنندگی رادیکال آزاد از عصاره سویا، با استفاده از یک ۲،۲–دی فنیل–۱– پیکریل هیدرازین پایدار تعیین نمودند که *DPPH* یک رادیکال آزاد رنگ بنفش است. در بررسی Soussi *et al*. (2017) فعالیت بیولوژیکی و آنتی‌اکسیدانی عصاره به‌دست‌آمده از سویا با دانه زرد، که عصاره مواد پروتئینی سویا با استفاده از آب و n–هگزان مورد استخراج قرار گرفت. پروتئین‌های جدا شده را برای ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی آزمایش کردند. خاصیت آنتی‌اکسیدانی، عصاره پروتئین‌دار سویا از طریق فعالیت ضد رادیکالی، به روشی که توسط Banerjee *et al*. (2008) توصیف شده بود ارزیابی کردند. آنها دریافتند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره پروتئین‌دار گیاه سویا به‌عنوان غلظت مهاری مورداستفاده قرار گرفتند. غلظت مهاری (IC_{50}) که همان غلظتی از عصاره است که برای پاک‌کردن ۵۰ درصد از غلظت DPPH اولیه مورد نیاز است، تخمین زده شد. هرچه (IC_{50}) کم‌ترباشد، فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن بیش‌تر است. آنها بیان کردند، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت زیستی عصاره پروتئین گیاه سویا که توسط n–هگزان استخراج شده بیش‌تر نسبت به عصاره استخراج شده سویا با آب است (Soussi *et al*., 2017). در بررسی Yusnawan (2018)، مشخص شد که هرچه قدر میزان فلاونوئید بیش‌تر باشد میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز بالاتر خواهد بود. در سویا زرد، بیش‌تر فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی به خاطر وجود ایزوفلاون‌ها و اسید فرولیک موجود در دانه و جوانه می‌باشد. با وجود این، ایزوفلاون‌های موجود در

1. 2, 2-diphenyl-1-picryl hydrazine (yellow)

سویای زرد رنگ فعالیت آنتی‌اکسیدانی ضعیف‌تری نسبت به پروسیانیدین‌ها و آنتوسیانین‌های موجود در پوسته سویای سیاه رنگ دارند.

نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد، با افزایش غلظت عصاره سویا، درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش یافته، به طوری‌که بیش‌ترین میزان مهار در غلظت ۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره و به میزان ۸۵/۷ درصد به دست آمد. در واقع با افزایش غلظت عصاره سویا، درصد بازدارندگی رادیکال‌های *DPPH* شدت می‌یابد که نشان‌دهنده فعالیت آنتی‌اکسیدانی دانه زرد سویا است.

تحلیل نتایج حاصل از بررسی اثر مهارکنندگی بر آنزیم استیل کولین استراز

نتایج حاصل از این تحقیق، بیشترین خاصیت مهاری عصاره بر فعالیت آنزیم استیل‌کولین‌استراز را در غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و به میزان ۲۰/۵ درصد نشان داد. Sharififar *et al*. (2012) در یک تحقیق به بررسی اثرات مهار آنزیم استیل‌کولین‌استرازی، آنتی‌اکسیدانی و فعالیت سیتوتوکسیک روی سه گیاه دارویی از جمله گیاه سویا پرداختند. آنها نشان دادند که همه عصاره‌ها، آنزیم استیل‌کولین‌استراز را به صورت وابسته به دوز مهار کرده و عصاره اتانولی سویا، بیش‌ترین اثر مهاری را بر آنزیم دارد. بیش‌ترین اثر مهاری این عصاره در غلظت ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و به میزان ۶۸/۴ درصد گزارش شد. در تحقیق دیگر که به بررسی اثر مهاری برخی گیاهان هندی بر آنزیم استیل کولین استراز پرداخته است نیز از آنالوگ استیل تیوکولین یدید (ATCI) و ترکیب کروموژن دی‌تیو نیترو بنزوئیک اسید (DTNB) استفاده شده است (Vinutha *et al*., 2007). در این روش تیوکولین با ترکیب کروموژن واکنش داده و آنیون رنگ زرد نیتروبنزوئیک اسید ایجاد می‌کند که در طول موج ۴۱۲ نانومتر بیشترین جذب را دارد. با توجه به این‌که در محلول کنترل هیچ مهارکننده‌ای وجود ندارد، هرچه میزان مهار آنزیم بیش‌تر باشد، محصول کم‌تری تولید شده و میزان جذب محلول نمونه کاهش بیشتری داشته و بر اساس فرمول میزان مهار آنزیم بیش‌تر خواهد بود.

تحلیل نتایج حاصل از بررسی میزان مهار تولید رشته‌های آمیلوئیدی

تجمعات پروتئینی از جنبه‌های مختلف مورد علاقه محققان قرار گرفته است. نانو رشته های آمیلوئیدی حاصل از آلبومین سرم گاوی، به‌عنوان یکی از مهم‌ترین حامل‌های داروئی در درمان انواع بیماری‌ها مورد استفاده قرار گرفته است (Lotfi *et al*., 2017). با استفاده از روش طیف‌سنجی کنگورد که بر اتصال رنگ کنگورد به ساختارهای بتا آمیلوئیدی استوار است، امکان تشخیص حضور آمیلوئیدها در نمونه ممکن می‌گردد. رنگ کنگورد با قرارگیری بین صفحات بتا باعث افزایش طول موج جذب و جابه‌جایی نمودار به سمت طول موج‌های بلندتر می‌گردد (Waterhouse & Gerrard 2004).

با توجه به بررسی‌های انجام‌شده در این تحقیق، عصاره هیدروالکلی سویا دارای اثرات مهارکنندگی تولید رشته‌های آمیلوئیدی است. مشخص شد که با افزایش درصد غلظت عصاره سویا، میزان جذب در طول موج ماکزیمم که به‌عنوان شاخص حضور رشته‌های آمیلوئیدی است، کاهش یافته، به‌طوری‌که بیش‌ترین کاهش در تولید نانورشته‌های آمیلوئیدی در غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره سویا تا ۳۰ درصد میزان اولیه مشاهده شد. در بررسی اثر چهار متغیر دما، pH، زمان و غلظت پروتئین بر فرایند فیبریل‌زایی که توسط Arasteh *et al*. (2012) انجام شد، مشخص شد که بهترین شرایط تشکیل رشته‌های آمیلوئیدی در غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از پروتئین BSA و در pH بافر برابر ۳ و پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. هم‌چنین مشخص شد که در دمای

فیزیولوژیک نیز با توجه به پیوندهای زیادی که ساختار پروتئین را پایدار می‌سازند امکان تشکیل ساختارهای آمیلوئیدی کم‌تر شده است. آنها از روش ساده جذب سنجی کنگورد به‌عنوان آزمایش اولیه برای تأیید حضور نانو رشته های پروتئینی استفاده نمودند و در این راستا، میزان جذب در طول موج ماکزیمم به عنوان یک شاخص موثق معرفی کردند (Holm *et al*., 2007; Arasteh *et al*., 2012).

تحلیل نتایج حاصل از بررسی رشته‌های آمیلوئیدی به روش میکروسکوپ الکترونی گذاره (*TEM*)

تصاویر میکروسکوپ الکترونی نشان‌دهنده ساختار پیچ خورده فیبری و بدون انشعاب است که قطر آن‌ها به‌طور معمول در حدود ۷ تا ۱۲ نانومتر می‌باشد. تحقیقات دقیق‌تر در این زمینه توسط Holm *et al*. (2007) روی شش نوع فیبریل متفاوت انجام شد و مشخص شد همه آن‌ها از پروتوفیلامنت‌هایی متشکل از صفحات بتای متقاطع تشکیل شده‌اند (Holm *et al*., 2007; Arasteh *et al*., 2012). نتایج به‌دست آمده با میکروسکوپ الکترونی گذاره در این تحقیق نشان می‌دهد که به‌کارگیری عصاره در مراحل تولید رشته‌های آمیلوئیدی، میزان تولید رشته‌های آمیلوئیدی را به شدت کاهش داده است.

به‌طورکلی بررسی نتایج این تحقیق نشان می‌دهد، حداکثر مهار تولید نانورشته‌های آمیلوئیدی با به‌کارگیری غلظت‌های بالاتر از عصاره مشاهده می‌شود. با افزایش غلظت عصاره، درصد مهار آنزیم استیل‌کولین‌استراز نیز افزایش می‌یابد. با توجه به نتایج حاصل، عصاره سویا با اثرات آنتی‌اکسیدانی و مهاری خوبی که بر آنزیم استیل‌کولین‌استراز دارد، میتواند کاندیدای مناسبی برای کاهش عوارض جانبی بیماری آلزایمری باشد.

سپاسگزاری

از آزمایشگاه استاندارد دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت و همچنین از کلیه دانشجویان و دوستان همکلاسی، کمال تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERECNES

Alghamdi, S.; Migdadi, H.; Khan, M.; El-Harty, E. H.; Ammar, M.; Farooq, M. & Afzal, M. (2018). Phytochemical Profiling of Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) Genotypes Using GC-MS Analysis. Phytochemicals-Source of Antioxidants and Role in Disease Prevention.

Amani, M. (2017). Pathophysiology of Alzheimer's Disease. J Ardabil Univ Med Sci.; 16(4): 452-463.

Arasteh, A.; Habibi-Rezaei, M.; Ebrahim-Habibi A. & Moosavi-Movahedi, A. A. (2012). Response surface methodology for optimizing the bovine serum albumin fibrillation. The protein journal; 31(6): 457-465.

Arasteh, A. & Salehzadeh, A. (2016). Effect of environmental factors on aggregation and fibrillation of kappa casein. New Biotechnology; (33): S204.

Bertram, L.; Lill, C. M. & Tanzi, R. E. (2010). The genetics of Alzheimer disease: back to the future. Neuron; 68(2): 270-281.

Banerjee, D.; Chakrabarti, S.; Hazra, A.K.; Banerjee, S.; Ray, J.; Mukherjee, B. (2008). Antioxidant activity and total phenolics of some mangroves in Sundarbans. African Journal of Biotechnology; 7(6).

Cipriani, G.; Dolciotti, C.; Picchi, L. & Bonuccelli, U. (2011). Alzheimer and his disease: a brief history. Neurological Sciences; 32(2): 275-279.

Cooper, E.L. & Ma, M.J. (2017). Alzheimer Disease: Clues from traditional and complementary medicine. Journal of traditional and complementary medicine; 7(4): 380-385.

Correa, C.R.; Li, L.; Aldini, G.; Carini, M.; Chen, C.-Y. O.; Chun, H.-K.; Cho, S.-

M.; Park, K.-M.; Russell, R.M. & Blumberg, J.B. (2010). Composition and stability of phytochemicals in five varieties of black soybeans (*Glycine max*). Food chemistry;123(4):1176-1184.

Fisk, I.D. & Gray, D.A. (2011). Soybean (*Glycine max*) oil bodies and their associated phytochemicals. Journal of food science; 76(9): C1349-C1354.

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. & Otzen, D.E. (2007). Aggregation and fibrillation of bovine serum albumin. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics; 1774(9): 1128-1138.

Kim, J.K.; Kim, E.-H.; Park, I.; Yu, B.-R.; Lim, J.D.; Lee, Y.-S.; Lee, J.-H.; Kim, S.-H. & Chung, I.-M.(2014). Isoflavones profiling of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] germplasms and their correlations with metabolic pathways. Food chemistry; 153: 258-264.

Lotfi, Z.; Fazilati, M.; Arasteh, A. & Nazem, H. (2017). Fibrillation induction in Bovine serum Albumin and production of amyloid fibrils for use as new Bio–nanomaterial.

Nasirzadeh, M.R.; Babapour, V.; Ahmadi-Asl, N.; Roshangar, L. & Nazemeih, H. (2013). Effects of methanol extract of soy on the apoptosis of hippocampal cells in ovariectomized rats. KAUMS Journal (FEYZ); 16(6): 501-506.

Ponnusha, B.S.; Subramaniyam, S. & Pasupathi, P. (2011). Antioxidant and Antimicrobial properties of Glycine Max-A review. Int J Cur Bio Med Sci.; 1(2): 49-62.

Sansanelli, S.; Zanichelli, D.; Filippini, A.; Ferri, M. & Tassoni, A. (2014). Production of free and glycosylated isoflavones in in vitro soybean (*Glycine max* L.) hypocotyl cell suspensions and comparison with industrial seed extracts. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC); 119(2): 301-311.

Schramm, F.D.; Schroeder, K. & Jonas, K. (2020). Protein aggregation in bacteria. FEMS microbiology reviews; 44(1): 54-72.

Sharififar, F.; Moshafi, M.; Shafazand, E. & Koohpayeh, A. (2012). Acetyl cholinesterase inhibitory, antioxidant and cytotoxic activity of three dietary medicinal plants. Food chemistry; 130(1): 20-23.

Soussi, N.; Moulay, S.; Bachari, K. & Benmiri, Y. (2017). Antioxidant and Biological Activities of Proteinaceous Extract from Algerian Glycine max Plant. Pakistan journal of biological sciences: PJBS; 20(3): 124-131.

Vinutha, B.; Prashanth, D.; Salma, K.; Sreeja, S.; Pratiti, D.; Padmaja, R.; Radhika, S.; Amit, A.; Venkateshwarlu, K. & Deepak, M. (2007). Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. Journal of ethnopharmacology; 109(2): 359-363.

Waterhouse, S.H. & Gerrard, J.A. (2004). Amyloid fibrils in bionanotechnology. Australian journal of chemistry; 57(6): 519-523.

Yusnawan, E. (2018). Effects of different extraction methods on total phenolic content and antioxidant activity in soybean cultivars. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, IOP Publishing.

Zhang, R.F.; Zhang, F.X.; Zhang, M.W.; Wei, Z.C.; Yang, C.Y.; Zhang, Y.; Tang, X.J.; Deng, Y.Y. & Chi, J.W. (2011). Phenolic composition and antioxidant activity in seed coats of 60 Chinese black soybean (*Glycine max* L. Merr.) varieties. Journal of agricultural and food chemistry; 59(11): 5935-5944.