

مقاله پژوهشی:

## Inhibitory effect of *Portulaca oleracea* L. Extract against the *Lysozyme* fibrillation and its possible role in ameliorate of neurodegenerative diseases

## تأثیر مهارکنندگی عصاره خرفه (*Portulaca oleracea* L.) بر روی فیبریلاسیون لیزوزیم و نقش احتمالی آن در بهبود بیماری‌های تحلیل برنده سیستم عصبی

Hassan Fazelinejad<sup>1,2\*</sup>, Nayyereh Keighobadi<sup>3</sup>

1. Associate Professor, Department of Biology, Payam Noor University, Po BOX, 19395-3697, Iran.
2. Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Iran.
3. M.A. of Biochemistry, Department of Biology, Payam Noor University, PO BOX, 19395-3697, Iran.

حسن فاضلی‌نژاد<sup>۱،۲\*</sup>، نیره کیقبادی<sup>۳</sup>

۱. دانشیار، دانشگاه پیام نور، گروه زیست‌شناسی، تهران، ایران، صندوق پستی ۱۹۳۹۵-۴۶۹۷.
۲. دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار، ایران.
۳. کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران، صندوق پستی ۱۹۳۹۵-۴۶۹۷.

(Received: Apr. 05, 2022 - Accepted: Mar. 19, 2023)

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۲۶ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۲۸)

### Abstract

One of the main features of neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease (AD) is the amyloid aggregation of specific proteins in the brain tissue. Inhibition of protein misfolding and aggregation is results of utmost importance in the prevention and treatment of such diseases. In the experimental present study the possible effects of *Portulaca oleracea* extract on amyloid fibrillation of hen egg white lysozyme (HEWL) as a protein model and possible its role in treatment of amyloidosis diseases were explored. Lysozymal amyloid was prepared in the harsh condition such as acidic pH and high temperature and confirmed by various techniques including Congo red (CR), Thioflavin T (ThT) binding assays and atomic force microscopy. Data were analyzed through SPSS 16 using descriptive statistics as well as independent t-test. The collected and dried *Portulaca oleracea* was first dechlorophyllized and then its hydroalcoholic extract was obtained. The extract was concentrated and dried for 48 h, then stored at -20°. This studies by ThT showed that, amyloid formation in the presence of *Portulaca oleracea* extract significantly ( $p < 0.05$ ) in a concentration-dependent manner was inhibited. The Amyloid formation inhibition in presence of the extract also were confirmed by Congo red assay and AFM images. Both Intrinsic and ANS fluorescence showed that inhibition effect of the extract is not due to stabilization of native structure of the protein. The results suggested that aromatic compounds in the extract may directly insert into amyloidogenic core of aggregates and disrupt pi-pi stacking interactions and thus inhibit amyloid fibril formation. These results may ultimately find applications in the development of potential inhibitors against amyloid fibril formation and its biologically adverse effects.

**Keywords:** Amyloid inhibitors, *Lysozyme*, neurodegenerative diseases, portulaca oleracea extract, protein aggregation.

### چکیده

یکی از ویژگی‌های اصلی بیماری‌های تحلیل برنده سیستم عصبی مانند آلزایمر تجمع آمیلوئیدی پروتئین‌های ویژه در بافت مغز می‌باشد. بنابراین، جلوگیری از تجمع آمیلوئیدی و رسوب آن‌ها در پیشگیری و درمان چنین بیماری‌هایی از اهمیت بالایی برخوردار است. در مطالعه تجربی حاضر، اثرات احتمالی عصاره خرفه بر روند فیبریلاسیون آمیلوئیدی لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ به‌عنوان یک پروتئین مدل و نقش احتمالی آن در درمان بیماری‌های آمیلوئیدوز بررسی شده است. آمیلوئید لیزوزیم در شرایط نسبتاً ناملامیمی مانند pH به‌شدت اسیدی و دمای بالا تولید شد و با تکنیک‌های مختلف از جمله سنجش اتصال قرمز کنگو، تیوفلاوین T و میکروسکوپ نیروی اتمی تشکیل آن تأیید شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 و با استفاده از آزمون t مستقل مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برگ گیاه خرفه بعد از جمع‌آوری و خشک‌شدن، ابتدا کلروفیل‌زدایی شده و سپس عصاره هیدروالکلی آن به‌دست آمد. عصاره پس از تغلیظ و خشک‌شدن به‌مدت ۴۸ ساعت، در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. بررسی‌ها با تیوفلاوین T نشان داد که تشکیل آمیلوئید در حضور عصاره خرفه به‌صورت وابسته به غلظت و به‌صورت معنی‌داری مهار می‌شود ( $p < 0.05$ ). آزمایش کنگورد و همچنین تصاویر میکروسکوپ نیروی اتمی نیز مهار تشکیل آمیلوئید در حضور عصاره خرفه را تأیید کرد. فلورسانس ذاتی و خارجی (ANS) نشان داد که مهار تشکیل آمیلوئید از طریق پایدارسازی ساختار طبیعی پروتئین انجام نمی‌گیرد. نتایج نشان داد که ترکیبات آروماتیک موجود در عصاره خرفه احتمالاً به‌طور مستقیم به هسته آمیلوئیدوژنیک تجمعات وارد شده و در نتیجه تشکیل فیبریل آمیلوئید را مهار می‌کند. این نتایج ممکن است در نهایت منجر به کشف مهارکننده‌های بالقوه برای مهار تشکیل فیبریل‌های آمیلوئید و اثرات نامطلوب بیولوژیکی آن شود.

**واژه‌های کلیدی:** بیماری‌های تحلیل برنده سیستم عصبی، تجمعات پروتئینی، عصاره خرفه، لیزوزیم، مهارکننده‌های آمیلوئید.

## مقدمه

تاخوردگی اشتباه پروتئین‌ها منشأ تعداد زیادی از بیماری‌های تحلیل برنده سیستم عصبی مثل بیماری آلزایمر، پارکینسون، هانتینگتون و هم‌چنین بیماری‌های غیر عصبی مثل دیابت نوع ۲ و آمیلوئیدوز مرتبط با همودیالیز می‌باشد. تاکنون حدود ۶۰ نوع اختلال پاتولوژیکی از این دست که منشأ آن‌ها پروتئین‌های غلط تا خورده می‌باشند شناخته شده است (Chiti & Dobson, 2017). منومرهای پروتئینی غلط تاخوردگی اگر توسط سیستم کنترل کیفیت سلولی تصحیح نگردند و غلظتشان در داخل یا خارج سلول افزایش یابد می‌توانند از طریق استک‌شدن (stacking) با یکدیگر تولید لیگومر، پروتوفیبریل و درنهایت فیبریل‌های بالغ را بنمایند (Porat et al., 2006). مطالعات نشان داده است که لیگومرهای این پروتئین‌ها بسیار سمی بوده و بسته به نوع پروتئین در بافت‌های مختلف و یا در قسمت‌های مختلف یک بافت باعث سمیت سلولی و در نهایت مرگ سلولی می‌شوند (Cascella et al., 2018). بیماری آلزایمر شایع‌ترین بیماری تخریب‌کننده عصبی است که تقریباً ۲۹ میلیون سالمند از این بیماری رنج می‌برند و پیش‌بینی می‌شود که تا سال ۲۰۵۰ شیوع آن سه برابر شود (Prado-Prado & García, 2012; Cho et al., 2012). پژوهش‌گران در تلاش برای تولید داروهایی برای درمان این بیماری هستند که عملکرد چندگانه از جمله کاهش التهاب، مهارکننده بتا سكرتاز، فعال‌کننده آلفا سكرتاز و هم‌چنین مهارکننده تشکیل تجمعات آمیلوئیدی A $\beta$  و تاو (tau) داشته باشند (Hardy & Selkoe, 2002; Pallàs & Camins, 2006). در حال حاضر بیش‌تر درمان‌ها علامتی بوده و هیچ داروی کاملاً مؤثری تاکنون کشف نشده است، بنابراین امروزه طیف وسیعی از پژوهش‌ها روی ترکیبات طبیعی به‌عنوان یک راه‌حل جایگزین درمان این بیماری تمرکز کرده است (Chiang & Koo, 2014). مطالعات نشان داده است که عصاره گیاهانی مثل *Curcuma longa* (زردچوبه) (Ramshini et al., 2015)،

*Centella asiatica* (آب بشقابی) (Berrocal et al., 2015)، *Ginkgo biloba* (جینکوئیلوبا) (Kumar & Khanum, 2012)، *Paeonia suffruticosa* (گل صد تومانی) (Park, 2010)، *Cinnamomum verum* (دارچین) (Ramshini et al., 2014)، *Camellia Sinensis* (چای سبز) (Ramshini et al., 2014) به‌طور قابل‌توجهی مانع تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی شده و سمیت این تجمعات را نیز کاهش می‌دهند. گیاه خرفه با نام علمی *Portulaca oleracea* L. هشتمین گیاه پرکاربرد دنیاست و معمولاً همه قسمت‌های گیاه مورد استفاده قرار می‌گیرد، اما بخش‌های هوایی مثل برگ‌ها، ساقه و بذر بیش‌تر استفاده می‌شود (Zhou et al., 2015). این گیاه به‌طور گسترده به‌عنوان گیاه دارویی به سوپ‌ها و سالادهای اطراف مدیترانه و کشورهای استوایی آسیایی اضافه می‌شود (Zhou et al., 2015). خرفه هم‌چنین به‌دلیل داشتن اسیدهای چرب امگا ۳ و خواص آنتی‌اکسیدانی، منبعی از فواید تغذیه‌ای را فراهم می‌کند (Palaniswamy et al., 2001). مطالعات نشان می‌دهد که از نظر اهمیت دارویی فلاونوئیدهای گیاهی مؤثرترین ترکیبات گیاهی هستند، بر این اساس هفت فلاونوئید مختلف از جمله کامفرول، میریستین، لوتولین، آپیزنین، کورستین، جنیستین و جنیستین در این گیاه شناسایی و تخلیص شده است (Palaniswamy et al., 2001). پژوهش‌گران طیف وسیعی از اثرات دارویی برای این گیاه از جمله فعالیت‌های ضد میکروبی، ضد هیپوکسی، ضد دیابت، ضد سرطان، ضد التهاب، ضد درد، کاهش چربی خون، شل‌کننده اسکلت و فعالیت‌های محافظ کبدی گزارش کرده‌اند (Arshiya & Khaleequr, 2013). مطالعات فارماکولوژیکی نیز نشان داده است که این گیاه دارای عملکرد آنتی‌اکسیدانی، ضدپیری است و باعث بهبود شناخت و حافظه می‌شود (Jin et al., 2011). از آنجایی که استرس اکسیداتیو ناشی از گونه‌های اکسیداتیو فعال (ROS) در پاتوژنز پیری و بیماری‌های عصبی مرتبط با پیری نقش دارد و کمبود

ابتدا بالن را از ۵۰۰ میلی‌لیتر هگزان پر و در حرارت غیرمستقیم هیتر قرار گرفت. ۱۲ گرم پودر خشک خرفه درون کاغذ صافی و در محفظه وسط دستگاه قرار داده شد. هگزان درون بالن در اثر حرارت غیرمستقیم هیتر تبخیر شده و این بخار وارد بخش کنداسیون دستگاه شد. به دلیل جریان آب سرد در کنداسیون عمل میعان صورت گرفته، بخار تبدیل به مایع شده و به محفظه وسطی دستگاه یعنی محل قرارگیری نمونه می‌ریزد و به‌طور کامل روی نمونه را می‌گیرد. در نهایت مایع هگزان و عصاره به داخل بالن تخلیه می‌شود. این عمل سه بار تکرار شد تا عمل کلروفیل‌زدایی کامل انجام گیرد. در مرحله بعد همین کار برای عصاره‌گیری انجام گرفت با این تفاوت که در بالن به جای هگزان، از آب و الکل به نسبت ۳۰ به ۷۰ استفاده شد. وقتی عصاره به اندازه کافی غلیظ شد آن را در ظرف پتری‌دیش ریخته و به مدت ۴۸ ساعت در آن گذاشته تا عصاره به شکل پودر خشک به‌دست آید. پس از خشک‌شدن کامل در فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

#### تعیین غلظت پروتئین

مقدار مشخصی از پودر خالص پروتئین در ۱ میلی‌لیتر بافر گلیسین ۵۰ میلی‌مولار و با pH برابر ۲/۵ حل شد. سنجش غلظت پروتئین همه جا براساس جذب ۲۸۰ نانومتر ۱۰ میکرولیتر از این محلول حاوی پروتئین در مقایسه با حلال به‌کار گرفته شده به‌دست آمد. جذب به‌دست‌آمده در ضریب رقت ضرب شد و براساس ضریب جذب لیزوزیم ۲/۶۵ برای یک گرم در یک لیتر در مسیر یک سانتی‌متری غلظت پروتئین محاسبه شد (Ramshini et al., 2015).

**القای فیبرهای آمیلوئیدی در لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ**  
میزان ۲ میلی‌گرم پروتئین در یک میلی‌لیتر بافر ۵۰ میلی‌مولار گلیسین با pH ۲/۵ در دمای ۵۷ درجه قرار داده شد و اجازه داده شد که به مدت ۴۸ ساعت درحالی‌که در این مدت با استفاده از ماگنت ریز تفلونی

آنتی‌اکسیدان‌ها در سرم یا مغز، استرس اکسیداتیو را افزایش می‌دهد و شناخت را مختل می‌کند (Dixit et al., 2015)، بنابراین، فلاونوئیدهای موجود در گیاه خرفه که دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی هستند، نقش مهمی را در بهبود حافظه و جلوگیری از بیماری آلزایمر ایفا می‌کند (Lakey-Beitia et al., 2015). مطالعات گوناگون نشان می‌دهد فلاونوئیدها علاوه بر نقش آنتی‌اکسیدانی قابلیت مهار مستقیم تشکیل تجمعات آمیلوئیدی که عامل اصلی القای مرگ سلولی و همچنین بیماری‌های آمیلوئیدی هستند را نیز دارند (Porat et al., 2006). در مطالعه حاضر از عصاره گیاه خرفه به دلیل منبع غنی فلاونوئیدی برای مهار تشکیل تجمعات آمیلوئیدی و بررسی نقش احتمالی این عصاره در تقویت حافظه و جلوگیری از بیماری‌های تحلیل‌برنده عصبی استفاده شد.

#### مواد و روش‌ها

پروتئین لیزوزیم از منبع سفیده تخم‌مرغ، شناساگرهای آمیلوئید مثل تیوفلاوین T، کنگو رد و کلیه بافرهای استفاده‌شده در این پژوهش از شرکت سیگما خریداری شد. جهت بررسی فلورسانس خارجی از ۸-آنیلینونفتالین سولفونات (ANS) که محصول شرکت مرک (Darmstadt, Germany) بود استفاده شد.

#### روش عصاره‌گیری

گیاه خرفه که به‌صورت خودرو در مناطق پر آبی مثل کنار جوی‌ها و باغ‌ها می‌روید، جمع‌آوری شده و اصالت آن به‌وسیله کارشناس هرباریم تأیید شد. به این جهت که ساقه گیاه بسیار گوشتی و پرآب است و روند خشک‌شدن آن طولانی می‌باشد و همچنین بذر گیاه باعث اختلال در نتیجه آزمایش می‌شود، فقط برگ‌های گیاه جدا شده و در سایه و دمای محیط خشکانده و به‌صورت پودر درآمد. در مرحله اول عمل کلروفیل‌زدایی صورت گرفت تا ترکیب مؤثره گیاه خالص‌تر شود. این کار با حجم مشخصی از یک مایع مثل هگزان انجام شد.

به‌دست آمد. به دلیل غلظت بالای تجمعات حاصل آن‌ها به میزان ۵۰۰ برابر توسط بافر گلاسیسین ۵۰ میلی‌مولار و pH برابر ۲ رقیق شد. سپس حدود ۲۰ میکرولیتر از نمونه‌های رقیق شده آمیلوئید روی میکا (با ابعاد ۲×۲ سانتی‌متر) قرار داده و به‌وسیله جریان ملایم هوا خشک شد و تصاویر AFM در هوا با میکروسکوپی (solver next, NT\_MDT, Russia) که به یک بخش اسکن‌کننده (ماکزیمم سایز اسکن ۱۰۰ μm) و یک کنترل‌کننده Nanoscope IIIa مجهز بود به‌دست آمد. فرکانس استفاده‌شده بین ۳۴۲ و ۳۴۱ کیلوهرتز و سرعت اسکن نیز بین ۰/۶ تا ۱ هرتر بود (Ramshini & Rostami, 2021).

#### فلورسانس ذاتی و خارجی

برای بررسی مکانیسم اثر خرفه بر روی تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی از روش فلورسانس ذاتی و خارجی استفاده شد. در فلورسانس ذاتی ابتدا ۲ میلی‌گرم لیزوزیم در pH برابر ۲ تهیه شد. سپس از این محلول پروتئینی به میزانی به سل فلورسانس اضافه شد تا غلظت نهایی آن ۰/۰۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌دست آید. سپس خرفه با غلظت بهینه به محیط اضافه شد. طیف فلورسانس با طول موج برانگیختگی ۲۸۰ نانومتر و دامنه طیف نوری بین ۲۸۵ تا ۶۰۰ نانومتر به‌دست آمد. ۷- آنیلینونفتالن سولفونات (ANS) برای ارزیابی میزان هیدرو فوبیسیته سطح در دسترس پروتئین مورد استفاده قرار گرفت در این راستا، نشر فلورسانس ANS در غلظت ۲۰ میکرومولار ANS و در غیاب یا حضور ۰/۰۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر لیزوزیم اندازه‌گیری می‌شد. غلظت مولی به‌کار گرفته‌شده ANS در مقایسه با پروتئین مازاد بود. طول موج برانگیختگی ۳۶۵ نانومتر و پهنای اسلیت برانگیختگی و نشر به‌ترتیب ۵ و ۱۰ نانومتر بود، افزایش شدت نشر و به‌ویژه انتقال به آبی به‌عنوان افزایش دسترسی‌پذیری جایگاه‌های هیدرو فوب در سطح پروتئین تفسیر می‌شد (Ramshini & Rostami, 2021).

محلول به‌نحو آرام هم زده می‌شد انکوباسیون ادامه پیدا نماید. با استفاده از روش‌های مختلفی، تشکیل تجمعات آمیلوئیدی مورد بررسی قرار گرفت (Ramshini et al., 2015).

#### مطالعات سنجش تیوفلاوین T (ThT)

در پروتئین لیزوزیم در حضور و غیاب غلظت‌های متفاوتی از عصاره خرفه با روشی که در قسمت قبلی توضیح داده شد القای تجمع آمیلوئیدی انجام گرفت. برای ارزیابی تشکیل یا عدم تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی یا شبه‌آمیلوئیدی از محلول تازه تهیه‌شده تیوفلاوین T که با استفاده از سرنگ فیلتر شده بود استفاده گردید. طول موج برانگیختگی ۴۴۰ نانومتر و پهنای اسلیت برانگیختگی و نشر به‌ترتیب ۵ و ۱۰ نانومتر بود. افزایش شدت نشر تیوفلاوین T به‌عنوان تشکیل احتمالی فیبرهای آمیلوئیدی یا شبه‌آمیلوئیدی تفسیر می‌شد (Nilsson, 2004).

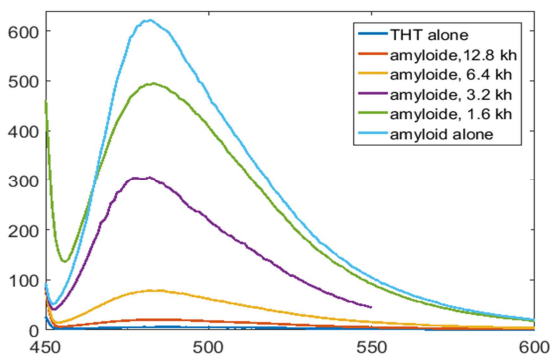
#### مطالعات سنجش قرمز کنگو (Congo red)

مشابه سنجش تشکیل آمیلوئید به‌وسیله تیوفلاوین T تشکیل یا عدم تشکیل تجمعات آمیلوئیدی به‌وسیله روش کنگورد مورد ارزیابی قرار گرفت. رنگ کنگورد به غلظت ۲۰ میکرومولار در ۵ میلی‌مولار بافر فسفات سدیم، ۱۵۰ میلی‌مولار NaCl، pH ۷/۴ تهیه شد. به نمونه‌های آمیلوئیدی تشکیل شده در حضور و یا عدم حضور عصاره خرفه محلول کنگورد اضافه شده و بعد از هم‌خوردن، طیف جذبی آن در محدوده طول موج ۴۰۰-۷۰۰ نانومتر بعد از ۲ یا ۳ دقیقه صبرکردن برای ایجاد تعادل با دستگاه اسپکتروفوتومتر به‌دست آمد (Nilsson, 2004).

#### تصویربرداری میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM)

برای مشاهده مورفولوژی تجمعات آمیلوئیدی تشکیل‌شده در حضور یا عدم حضور عصاره خرفه ابتدا به روشی که در بالا توضیح داده شد این گونه تجمعات

همان‌طور که شکل ۱ نشان می‌دهد تشکیل تجمعات آمیلوئیدی در حضور خرفه به‌صورت وابسته به غلظت کاهش یافته، هم‌چنین مشخص است بهترین غلظتی که هم مهار خوبی را نشان می‌دهد و هم باعث پراکندگی طول موج‌ها (scatter) در نمونه نمی‌شود غلظت ۶/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر می‌باشد، به همین دلیل در ادامه از این غلظت به‌عنوان غلظت بهینه استفاده شد. به‌عنوان کنترل نشان داده شد که خرفه به‌تنهایی اثری روی طیف نشری فلورسانس تیوفلاوین T ندارد، لذا افزایش یا کاهش طیف نشری فقط بستگی به میزان تجمعات آمیلوئیدی دارد و بنابراین کاهش شدت طیف نشری در حضور عصاره به اثر مهارکنندگی آن روی تشکیل تجمعات آمیلوئیدی نسبت داده شد (Ramshini & Ebrahim-Habibi *et al.*, 2012).



**شکل ۱.** اثر غلظت‌های مختلف خرفه روی روند تجمع آمیلوئیدی پروتئین لیزوزیم. طیف شدت نشر فلورسانس آمیلوئید لیزوزیم در عدم حضور (آبی روشن) و در حضور غلظت‌های مختلف ۱۲/۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (رنگ قرمز)، ۶/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (رنگ زرد)، ۳/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (رنگ بنفش)، ۱/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (رنگ سبز) (غلظت) و رنگ پروتئین لیزوزیم به‌تنهایی) را نشان می‌دهند. رنگ آبی تیره طیف نشری تیوفلاوین T به‌تنهایی را نشان می‌دهد.

مطالعات نشان می‌دهد که سینتیک تشکیل تجمعات آمیلوئیدی از مکانیسم وابسته به هسته‌زایی (nucleation-dependent) تبعیت کرده و نمودار سینتیکی تجمع شامل سه مرحله فاز تأخیری، مرحله رشد سریع و مرحله تعادلی انتهایی است (Ramshini *et al.*

## آنالیز آماری

هر آزمایش حداقل سه بار به‌صورت مستقل انجام و در هر بار هر کدام حداقل سه بار تکرار شد و تمام نمودارها به‌صورت میانگین  $\text{Mean} \pm \text{SD}$  گزارش شده است. داده‌ها بر توسط نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۱۶) با استفاده از آزمون T مستقل و با ضریب اطمینان  $p < 0.05$  تجزیه و تحلیل شد.

## نتایج

### بررسی اثر ضدتجمعی عصاره خرفه با استفاده از طیف سنجی فلورسانس

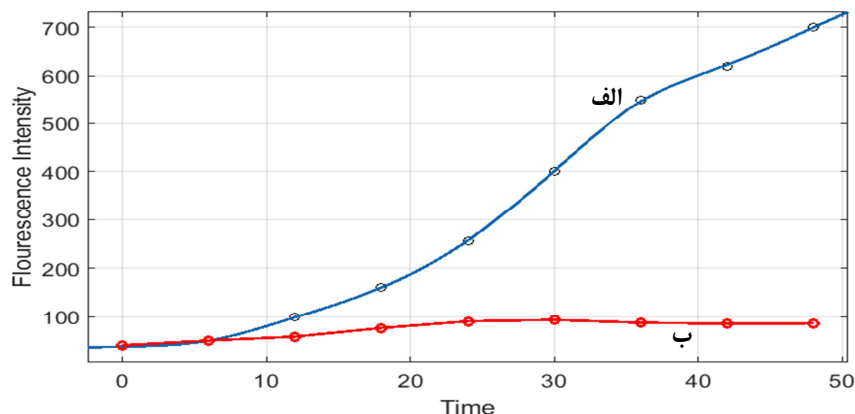
همان‌طور که در بخش روش‌ها اشاره شد پروتئین لیزوزیم در غلظت ۲ میلی‌گرم در pH اسیدی و در دمای ۵۷ درجه بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون تبدیل به فیبرهای بالغ آمیلوئیدی می‌گردد. تشکیل تجمعات آمیلوئیدی به روش‌های گوناگونی موردتأیید قرار می‌گیرد. یکی از شناساگرهای مهم تشکیل تجمعات آمیلوئیدی تیوفلاوین T می‌باشد. در اثر اتصال این رنگ به فیبریل‌ها، و با تحریک آن در طول موج ۴۴۰ نانومتر، شدت نشر بالایی در طول موج‌های بین ۴۴۵ تا ۵۵۰ نانومتر دیده می‌شود. همان‌طور که شکل ۱ نشان می‌دهد تیوفلاوین T به‌تنهایی حداکثر نشر  $31.1 \pm 3.2$  اما در حضور تجمعات آمیلوئیدی حداکثر نشر  $619.84 \pm 10.5$  را نشان می‌دهد. برای نشان دادن احتمال مهار تشکیل تجمعات توسط عصاره خرفه، فرایند تشکیل تجمعات لیزوزیم در حضور غلظت‌های مختلف عصاره این گیاه موردبررسی قرار گرفت. بنابراین تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی توسط پروتئین لیزوزیم (در شرایط تشکیل این فیبرها که در بخش روش‌ها توضیح داده شد)، در حضور دامنه غلظت ۱/۶ تا ۱۲/۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره بررسی شد و نتایج آن به‌وسیله تغییرات شدت فلورسانس تیوفلاوین T نشان داده شد. همان‌طور که شکل ۱ نشان می‌دهد، براساس میزان نشر فلورسانس، مؤثرترین غلظت از این عصاره که بیش‌ترین مهار را داشته غلظت ۶/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است.

اثر مهاری عصاره خرفه روی روند تشکیل تجمعات آمیلوئیدی است.

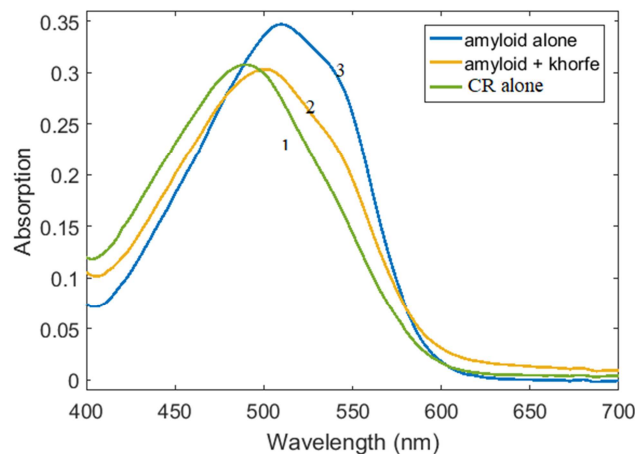
### بررسی اثر ضدتجمعی عصاره خرفه با استفاده از قرمز کنگو و از طریق طیف سنجی اسپکتروفتومتری در غلظت بهینه

برای تأیید نقش مهاری عصاره خرفه در غلظت ۶/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از دیگر شناساگر تجمعات آمیلوئیدی یعنی اندازه‌گیری میزان شدت جذب قرمز کنگو (Congo red) توسط دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد. معمولاً طیف جذبی قرمز کنگو در اثر اتصال به تجمعات آمیلوئیدی افزایش یافته و جابه‌جایی کاملاً مشخصی به راست (red-shift) پیدا می‌کند. همان‌طور که شکل ۳ نشان می‌دهد طیف جذبی قرمز کنگو واجد بیشینه‌ای در طول موج ۴۹۰ نانومتر است. اضافه کردن پروتئین طبیعی تغییر قابل‌ملاحظه‌ای در شدت یا الگوی طیف جذبی قرمز کنگو ایجاد نمی‌کند، اما پس از اضافه‌کردن پروتئین انکوبه شده در شرایط آمیلوئیدی شدت جذب به ۵۳۰ نانومتر رسیده و حدود ۳۰ نانومتر به سمت راست منحرف شده است. این یافته مؤید تشکیل تجمعات آمیلوئیدی لیزوزیم در عدم حضور عصاره است و از طرفی کاهش شدت طیف جذبی و همچنین کاهش جابه‌جایی به سمت راست در حضور عصاره به‌خوبی نشان‌دهنده مهار تشکیل آن‌ها می‌باشد (Nilsson, 2004).

(al., 2016). فاز تأخیری که به آن مرحله هسته‌گذاری یا Nucleation گفته می‌شود که در این مرحله هسته‌های اولیه فیبرهای آمیلوئیدی که شامل اتصال چند مونومر غلط تاخورد پروتئینی می‌باشد که گاهی اوقات به آن‌ها لیگومر هم گفته می‌شود، شکل می‌گیرد. این فاز مرحله محدودکننده فرایند است و بعد از این مرحله یک شدت نشر تصاعدی را شاهد هستیم که لیگومرها به هم متصل و پروتوفیبریل‌ها و فیبرهای بالغ آمیلوئیدی را تشکیل می‌دهند و در انتها وارد فاز تعادل می‌شود که در این مرحله معمولاً با گذشت زمان افزایش شدت نشر فلورسانس به‌وقوع نمی‌پیوندد. برای فهم چگونگی سینتیک تشکیل تجمعات آمیلوئیدی و اثر عصاره خرفه بر این فرایند، تغییرات مهاری این عصاره با غلظت بهینه ۶/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر هر ۶ ساعت و به مدت ۴۸ ساعت به‌دست آمد و تغییرات شدت نشر در مقابل تغییرات زمان رسم شد تا نمودار سینتیکی تجمع در حضور و عدم حضور عصاره به‌دست آید. همان‌طور که در شکل ۲ مشخص است، نمودار سینتیکی تجمع آمیلوئید لیزوزیم در غیاب خرفه سه مرحله توضیح داده شده در بالا را داراست، اما در حضور عصاره با غلظت بهینه (۶/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) فاز هسته‌زایی طویل و فاز رشد سریع به شدت کوتاه شده است و این دو نشان می‌دهد که عصاره خرفه مانع تشکیل هسته‌های اولیه شده و همچنین از اتصال هسته‌ها و تولید پروتوفیبریل و فیبرهای بالغ جلوگیری کرده است و این نتایج تأییدکننده



شکل ۲. سینتیک تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی در زمان‌های مختلف در حضور (ب) و عدم حضور (الف) عصاره خرفه در غلظت بهینه



شکل ۳. شکل طیف جذبی کنگو رد، پیش (۳) و پس (۲) از اضافه کردن ۴/۶ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره خرفه در شرایط تشکیل آمیلوئید. طیف جذبی کنگو رد به تنهایی جهت مقایسه نیز آورده شده است.

#### مطالعات فلورسانس ذاتی و خارجی پروتئین لیزوزیم

##### در حضور و عدم حضور عصاره خرفه

آمینواسیدهای آروماتیکی که در قسمت عمقی پروتئین‌ها قرار می‌گیرند، قادرند طول موج ۲۸۰ نانومتر را جذب و در طول موج‌های بالاتر آن را نشر دهند. چنانچه ساختار پروتئین باز شود، به دلیل این که آمینواسیدهای آروماتیکی در محیط قطبی و آبی قرار می‌گیرند، هم شدت طیف نشری آن کاهش می‌یابد و هم طیف شیفت به راست پیدا می‌کند. بنابراین کاهش شدت نشر و شیفت به راست نشان‌دهنده باز شدن پروتئین می‌باشد. بعضی مولکول‌ها قادرند در مقابل عوامل بازکنندگی پروتئین‌ها آن‌ها را پایدار کنند. برای بررسی این که آیا خرفه می‌تواند پروتئین لیزوزیم باز شده را پایدار نموده و مانع از تشکیل هسته‌های مستعد تجمع شود به پروتئین قرار گرفته در pH اسیدی (که در حالت واسرشتگی است) غلظت‌های مختلف خرفه اضافه شد و طیف نشری آن بررسی شد. همان‌طور که شکل ۵-الف نشان می‌دهد، نشر فلورسانس در تمام نمودارها کاهش یافته و به سمت راست شیفت پیدا کرده است که نشان‌دهنده این واقعیت است که پروتئین باز شده در حضور عصاره خرفه نه تنها پایدار نشده بلکه دچار ناپایداری بیش‌تر نیز شده است.

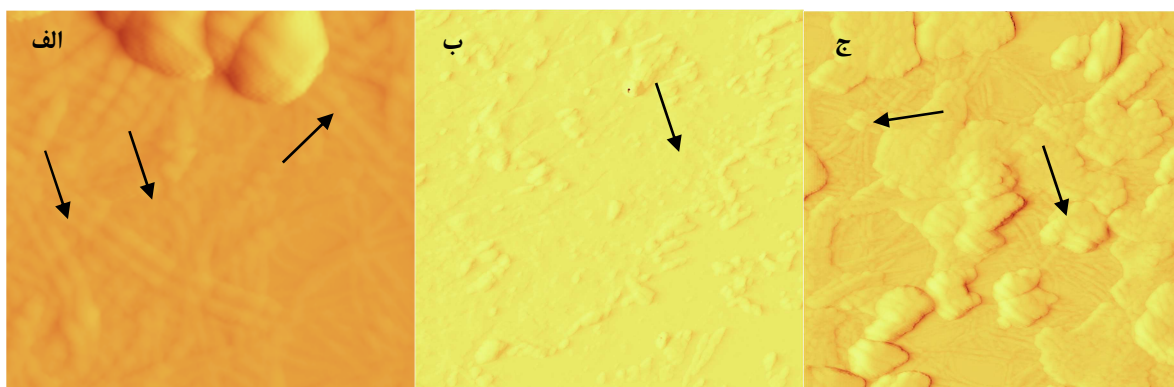
#### عکس برداری میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM)

یکی از روش‌های اثبات مهار تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی، نشان دادن مورفولوژی این فیبریل‌ها به وسیله عکس میکروسکوپ نیروی اتمی است. به این منظور حدود ۱۵ میکرولیتر از فیبرهای تشکیل شده لیزوزیم در حضور و عدم حضور عصاره خرفه با غلظت بهینه مورد بررسی قرار گرفت. همان‌طور که شکل ۴-الف نشان می‌دهد، در عدم حضور خرفه، فیبرهای بدون شاخه‌ی آمیلوئیدی مشاهده می‌شود (بخشی از فیبرها روی شکل با فلش نشان داده شده است)، اما در حضور خرفه شکل ۴-ب فرایند تشکیل فیبرهای بالغ آمیلوئیدی متوقف شده و الیگومرها و هسته‌های اولیه مشاهده می‌شوند. شکل به وضوح نشان می‌دهد عصاره خرفه مانع تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی می‌گردد و این آزمایش نتایج حاصل از فلورسانس ThT و کنگورد را تأیید می‌کند. بررسی نشان داد که اضافه کردن خرفه بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون لیزوزیم در شرایط آمیلوئیدی و اجازه دادن ادامه واکنش به مدت ۲۴ ساعت دیگر فیبرهای دستجات بزرگ آمیلوئیدی حاصل شد و اضافه شدن خرفه بعد از تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی باعث تخریب فیبرهای از پیش تشکیل شده نگردید (شکل ۴-ج)، بنابراین عصاره خرفه فقط در ابتدای واکنش می‌توانست مانع تشکیل فیبر آمیلوئیدی شود.

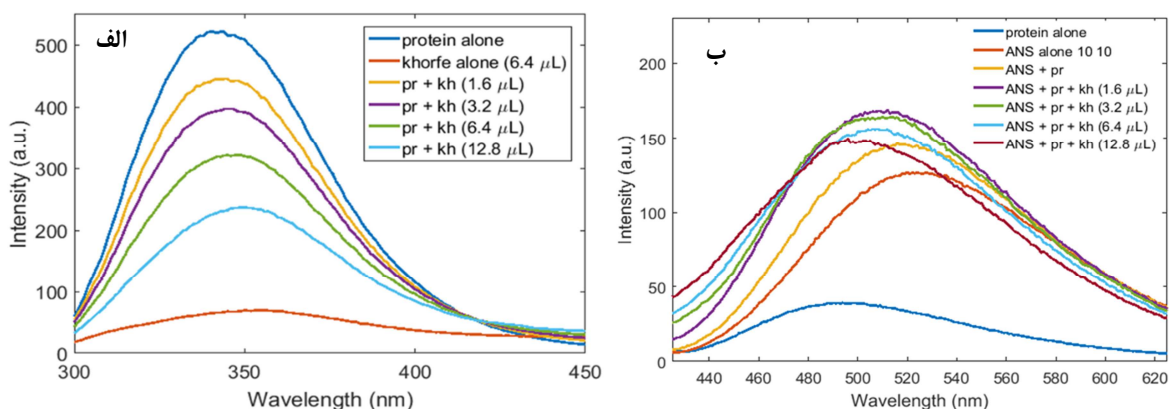


چپ انحراف پیدا می‌کند. همان‌طور که شکل ۵-ب نشان می‌دهد افزودن عصاره خرفه با غلظت‌های مختلف نه تنها باعث پایدارسازی پروتئین نشده است بلکه با افزایش غلظت میزان بازشدگی پروتئین افزایش یافته هم شدت فلورسانس افزایش پیدا کرده و هم شیفیت به سمت چپ (شیفت آبی) بیش‌تر پیدا کرده است. هر دو مطالعه فلورسانس ذاتی و خارجی نشان داد که اثر مهارى عصاره خرفه روی تشکیل تجمع آمیلوئیدی مربوط به پایدارسازی مونومرهای باز شده نیست.

براساس این مطالعه مکانیسم تأثیر خرفه در مهار تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی مربوط به پایدارسازی پروتئین نیست بلکه مربوط به مراحل بعدی تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی می‌باشد. ANS به‌عنوان یک فلوروفور خارجی در محیط قطبی مثل آب نشر بسیار ضعیفی دارند، اما اگر در مجاورت پروتئین با واسرشتگی جزئی قرار بگیرد (پروتئینی که در حضور بافر اسیدی گلايسين باز شده است) در پاکت‌های هیدروفوب در معرض قرار گرفته، وارد شده و شدت نشر فلورسانس آن افزایش و به سمت



شکل ۴. تصاویر AFM تجمعات آمیلوئیدی لیزوزیم در شرایط تشکیل آمیلوئید (۵۰ میلی‌مولار گلايسين، pH ۲/۵ و غلظت پروتئین ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بعد از ۴۸ ساعت) در عدم حضور خرفه (الف)، در حضور خرفه (ب) و همچنین افزودن خرفه بعد از گذشت ۴۸ ساعت از شروع فرایند فیبریلاسیون و ادامه آنکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت (ج). در تمام شرایط دامنه اسکن ۵ میکرومتر و دامنه Z هم ۵ میکرومتر بود.



شکل ۵. فلورسانس ذاتی پروتئین در حضور و عدم حضور عصاره خرفه با غلظت‌های مختلف. ۱/۶ (رنگ نارنجی)، ۳/۲ (رنگ بنفش)، ۶/۴ (رنگ سبز)، ۱۲/۸ (آبی روشن) میلی‌گرم بر میلی‌لیتر. طیف نشری پروتئین به تنهایی (قرمز)، خرفه به تنهایی (آبی تیره) جهت کنترل آورده شده است. طول موج تحریک ۲۸۰ نانومتر و طیف نشری بین ۳۰۰ تا ۴۵۰ نانومتر می‌باشد (الف). بررسی فلورسانس خارجی (ANS) در حضور غلظت‌های مختلف خرفه. ۱/۶ (بنفش)، ۳/۲ (سبز)، ۶/۴ (آبی روشن) و ۱۲/۸ (زرشکی) میلی‌گرم بر میلی‌لیتر. فلورسانس ANS به تنهایی (رنگ قرمز)، پروتئین به تنهایی (آبی تیره) برای کنترل آورده شده است. طول موج تحریک ۳۸۰ نانومتر و طیف نشری بین ۴۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر می‌باشد (ب).



## بحث و نتیجه‌گیری

سال‌های متمادی، انسان از محصولات طبیعی با منبع گیاهی به‌منظور استفاده دارویی بدون این‌که اطلاعاتی در مورد خواص شیمیایی آن‌ها داشته باشند استفاده می‌کرده است. هرچقدر اطلاعات بیش‌تری در مورد استفاده صحیح و تأثیر احتمالی این ترکیبات کشف‌شده، استفاده دارویی از آن‌ها تخصصی‌تر شده است. بخش قابل‌توجهی از این ترکیبات گیاهی به‌عنوان پلی‌فنل‌های طبیعی نام‌گذاری می‌شوند که این مولکول‌های زیستی فعالیت خود را از طریق مکانیسم‌های مختلفی از جمله حذف رادیکال‌های آزاد، اتصال به یون‌های فلزی، مهار سیستم‌های آنزیمی تولیدکننده رادیکال آزاد، عمل به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌های داخل سلولی و القای بیان انواع ژن‌های مسئول سنتز آنزیم‌های مهارکننده استرس اکسیداتیو انجام می‌دهند (Ramassamy *et al.*, 2006). پژوهش‌گران طی مطالعات گوناگونی اثر محافظت‌کنندگی عصاره خرفه را روی سلول‌های عصبی در موش‌ها نشان داده‌اند (Abdel Moneim, 2013). همچنین نقش عصاره خرفه در جلوگیری از اختلال حافظه (Tao *et al.*, 2018)، فعالیت آنتی‌کولین استرازی (Ma *et al.*, 2012) و نقش آنتاگونیستی روی گیرنده بتا-۲ آدنرژیک (Jin *et al.*, 2018) مورد تأیید قرار گرفته است. از طرف دیگر، مطالعات نشان می‌دهد عصاره خرفه سرشار از ترکیبات آروماتیک مثل کافئیک‌اسید، کینامیک‌اسید و کومارین نیز می‌باشد (Zhou *et al.*, 2015). بنابراین پیش‌بینی می‌شود که این عصاره بتواند روی تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی تأثیر مستقیم بگذارد. همان‌طور که در بخش نتایج نشان داده شد، عصاره خرفه به‌صورت وابسته به غلظت قادر به مهار تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی است. مطالعات مربوط به تیوفلاوین T (شکل‌های ۱ و ۲) و کنگورد (۳)، این مسئله را تأیید کرد. همچنین عکس‌های میکروسکوپ نیروی اتمی (شکل‌های ۴-الف و ب) که به‌صورت مستقیم مهار تشکیل فیبر را نشان می‌دهد نیز این مسئله را تأیید کرد. برای بررسی مکانیسم اثر، عصاره خرفه

روی فیبرهای بالغ از قبل تشکیل‌شده نیز اثر داده شد و نتایج نشان داد که خرفه در غلظت (۶/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) نمی‌تواند روی فیبرهای بالغ اثر بگذارد (شکل ۴-ج) و از طرف دیگر برای این‌که نشان داده شود که آیا عصاره خرفه قادر به پایدارسازی پروتئین لیزوزیم در pH برابر ۲/۵ هست یا خیر مطالعات فلورسانس ذاتی و خارجی انجام شد. هر دو مطالعه نشان داد که عصاره خرفه نه‌تنها نمی‌تواند پروتئین را پایدار نماید بلکه خود عصاره باعث ناپایدارسازی پروتئین می‌گردد (شکل‌های ۵-الف و ب). بنابراین اگر روند تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی به‌صورت نمودار زیر در نظر گرفته شود؛ (فرم طبیعی)  $\leftrightarrow$  فرم غلط تاخورد  $\leftrightarrow$  تشکیل هسته‌ها  $\leftrightarrow$  تشکیل پروتوفیبریل‌ها  $\leftrightarrow$  تشکیل آمیلوئید) به‌نظر می‌رسد مکان اثر عصاره خرفه مرحله تشکیل هسته‌های اولیه فیبرهای آمیلوئیدی است. سرعت تجمع پروتئین‌های مختلف به عوامل فیزیکوشیمیایی مثل هیدروفوبیستی، استعداد آن‌ها به ایجاد ساختارهای ثانویه، بار و اندرکنش‌های آروماتیکی  $\pi$ - $\pi$  Stacking بستگی دارد (Porat *et al.*, 2006). نقش اندرکنش‌های آروماتیک در تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی براساس مطالعات روی تعدادی از پروتئین‌ها و قطعات کوچک پپتیدی که قادر به تولید فیبر آمیلوئیدی هستند اثبات شده است (Porat, 2006). این فرضیه منتج به این پیشنهاد شد که Stacking اسیدهای آمینه آروماتیک نقش مؤثری در تسریع فرایند کنار هم قرارگیری و تولید فیبرهای آمیلوئیدی دارد. اندرکنش‌های Stacking ممکن است باعث ایجاد جهت‌گیری مناسب عناصر سازنده بخش اصلی (Core) تشکیل دهنده فیبرهای آمیلوئیدی در مراحل خیلی اولیه آن شود (Porat, 2006). به‌نظر می‌رسد عصاره خرفه به‌دلیل وجود ترکیبات آروماتیک پلی‌فنلیک توسط همین مکانیسم قادر است مانع تشکیل هسته‌های اولیه و در نهایت مهار رشد و بلوغ فیبرهای آمیلوئیدی شود. ساختار شیمیایی این مولکول‌ها دارای حلقه‌های آروماتیک است و احتمالاً

احتمال استفاده دارویی آن برای پیشگیری و درمان بیماری آلزایمر نیاز به مطالعه دقیق‌تر مکانیسم اثر آن بر روی روند تجمع آمیلوئیدی دارد.

### تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه پیام نور به‌خاطر تصویب اعتبار پژوهشی لازم برای انجام این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌گردد.

### تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافی بین نویسندگان وجود ندارد.

می‌تواند با نفوذ در پیوندهای استکینگ اسیدهای آمینه آروماتیک موجود در ساختار لیزوزیم که یکی از عوامل شکل‌گیری هسته‌های اولیه می‌باشد، این هسته‌های اولیه را ناپایدار کرده و باعث مهار روند شکل‌گیری فیبرهای آمیلوئیدی شوند.

نتایج این پژوهش برای اولین بار نشان داد که عصاره خرفه علاوه بر خواص آنتی‌اکسیدانی به‌دلیل داشتن مولکول‌های کوچک آروماتیک اثر مستقیم در جلوگیری از شکل‌گیری هسته‌های اولیه تجمع و تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی دارد. شناخت مکانیسم مولکولی دقیق این عصاره بر روند تجمع آمیلوئیدی و

## REFERENCES

- Abdel Moneim, A.E. (2013). The neuroprotective effects of purslane (*Portulaca oleracea*) on rotenone-induced biochemical changes and apoptosis in brain of rat. *CNS Neurol Disord Drug Targets*; 12: 830-41.
- Arshiya, S.; Khaleequr, R. (2013). *Portulaca oleracea* Linn: a global panacea with ethnomedicinal and pharmacological potential. *Inter J Pharm Pharm Sci*; 5: 33-39.
- Berrocal, R.; Vasudevaraju, P.; Indi, S.S.; Sambasiva Rao, K.R.; Rao, K.S. (2014). In vitro evidence that an aqueous extract of *Centella asiatica* modulates  $\alpha$ -synuclein aggregation dynamics. *J Alzheimers Dis*; 39: 457-465.
- Cascella, R.; Fani, G.; Capitini, C.; Rusmini, P.; Poletti, A.; Cecchi, C.; Chiti, F. (2018). Toxic HypF-N Oligomers Selectively Bind the Plasma Membrane to Impair Cell Adhesion Capability. *Biophys J*; 114: 1357-1367.
- Chiang, K.; Koo, E. (2014). Emerging therapeutics for Alzheimer's disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*; 54: 381-405.
- Chiti, F.; Dobson, C.M. (2017). Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress over the last decade. *Annu Rev Biochem*; 86: 27-68.
- Cho, J.K.; Ryu, Y.B.; Curtis-Long, M.J.; Ryu, H.W.; Yuk, H.J.; Kim, D.W.; Kim, H.J.; Lee, W.S.; Park, K.H. (2012). Cholinesterase inhibitory effects of geranylated flavonoids from *Paulownia tomentosa* fruits. *Bioorg Med Chem*; 20: 2595-2602.
- Dixit, S.; Bernardo, A.; Walker, J.M.; Kennard, J.A.; Kim, G.Y.; Kessler, E.S.; Harrison, F.E. (2015). Vitamin C deficiency in the brain impairs cognition, increases amyloid accumulation and deposition, and oxidative stress in APP/PSEN1 and normally aging mice. *ACS Chem Neurosci*; 6: 570-581.
- Hardy, J.; Selkoe, D.J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*; 297: 353-356.
- Jin, Y.Z.; Zhang, H.Y.; Sun, X.Y. (2011). Effects of different extracts from *Portulacae Herba* on spatial learning performance in senile mice induced by D-gal. *Chin. J Exp Tradit Med Form*; 17: 178-181.
- Jin, T-Y.; Li, S-Q.; Jin, C-R.; Shan, H.; Wang, R.-M.; Zhou, M-X.; Li, A.-L.; Li, L-Y.; Hu, S-Y.; Shen, T.; Xiang, L. (2018). Catecholic Isoquinolines from *Portulaca oleracea* and Their Anti-inflammatory and  $\beta$ 2-Adrenergic Receptor Agonist Activity. *J Nat Prod*; 81: 768-777.

- Kumar, G.P.; Khanum, F. (2012). Neuroprotective potential of phytochemicals. *Pharmacogn Rev*; 6: 81-90.
- Lakey-Beitia, J.; Berrocal, R.; Rao, K. S, Durant, A.A. (2015). Polyphenols as Therapeutic Molecules in Alzheimer's Disease. Through Modulating Amyloid Pathways. *Mol Neurobiol*; 51: 466-479.
- Lee, C-C.; Nayak, A.; Sethuraman, A.; Belfort, G.; McRae, G.J. A. (2007). Three-Stage Kinetic Model of Amyloid Fibrillation. *Biophys. J*; 92: 3448-3458.
- Liu, L.; Howe, P.; Zhou, Y. F.; Xu, Z. Q.; Hocart, C.; Zhan, R. (2000). Fatty acids and  $\beta$ -carotene in Australian purslane (*Portulaca oleracea*) varieties. *J chromatogr A*; 893: 207-213.
- Ma, Y.; Li, X.; Zhang, W.; Ying, X.; Stien, D. (2021). A trace alkaloid, oleraisoindole A from *Portulaca oleracea* L. and its anticholinesterase effect. *Nat Prod Res.*; 35: 350-353.
- Nilsson, M.R. (2004). Techniques to study amyloid fibril formation in vitro. *Methods*; 34: 151-60.
- Palaniswamy, U.R.; McAvoy, R. J.; Bible, B.B. (2001). Stage of harvest and polyunsaturated essential fatty acid concentrations in purslane (*Portulaca oleraceae*) leaves. *J Agric Food Chem*; 49: 3490-3493.
- Pallàs, M.; Camins, A. (2006). Molecular and biochemical features in Alzheimer's disease. *Curr Pharm*; 12: 4389-4408.
- Prado-Prado, F.; García, I. (2012). Review of theoretical studies for prediction of neurodegenerative inhibitors. *Mini Rev Med Chem*; 12: 452-466.
- Park, S.Y. (2010). Potential therapeutic agents against Alzheimer's disease from natural sources. *Arch Pharm Res*, 33: 1589-1609.
- Porat, Y.; Abramowitz, A.; Gazit, E. (2006). Inhibition of Amyloid Fibril Formation by Polyphenols: Structural Similarity and Aromatic Interactions as a Common Inhibition Mechanism. *Chem Biol Drug Des*; 67: 27-37.
- Ramassamy, C. (2006). Emerging Role of Polyphenolic Compounds in the Treatment of Neurodegenerative Diseases: A Review of Their Intracellular Targets. *Eur. J. Pharmacol*; 545: 51-64.
- Ramshini, H.; Ebrahim-Habibi, A. (2012). Thermal disaggregation of type B yeast hexokinase by indole derivatives: a mechanistic study. *Int J Biol Macromol*; 50: 1260-6.
- Ramshini, H.; Ayoubi, F. (2014). Inhibitory Effect of Cinnamomum Zeylanicum and Camellia Sinensis Extracts on the Hen Egg-White Lysozyme Fibrillation. *Journal of Kerman University of Medical Sciences*; 21: 290-301.
- Ramshini, H.; Mohammad-zadeh, M.; Ebrahim-Habibi, A. (2015). Inhibition of amyloid fibril formation and cytotoxicity by a chemical analog of Curcumin as a stable inhibitor. *Int J Biol Macromol*; 78: 396-404.
- Ramshini, H.; Ebrahim-Habibi, A.; Aryanejad, S.; Rad, A. (2015). Effect of Cinnamomum Verum Extract on the Amyloid Formation of Hen Egg-white Lysozyme and Study of its Possible Role in Alzheimer's Disease. *Basic Clin Neurosci.*; 6: 29-37.
- Ramshini, H.; Mannini, B.; Khodayari, K.; Ebrahim-Habibi, A.; Moghaddasi, A.S.; Tayebee, R.; Chiti, F. (2016). Bis (indolyl) phenylmethane derivatives are effective small molecules for inhibition of amyloid fibril formation by hen lysozyme. *Eur J Med Chem*; 124: 361-371.
- Ramshini, H.; Rostami, S. (2021). Dual function of Selenium nanoparticles: Inhibition or induction of lysozyme amyloid aggregation and evaluation of their cell based cytotoxicity. *Arch Ital boil*; 159: 82-94.
- Tao, H.; Ye, D-L.; Wu, Y-L.; Han, M-M.; Xue, J-S.; Liu, Z-H.; Chen, X-T.; Wang, H-L. (2018). The protective effect of polysaccharide extracted from *Portulaca oleracea* L. against Pb-induced learning and memory impairments in rats. *Int. J. Biol. Macromol*; 119: 617-623.
- Zhou, Y-X.; Xin, H-L.; Khalid Rahman, K.; Su-Juan Wang S-J.; Peng, C.; Zhang, H. (2015). *Portulaca oleracea* L. A Review of Phytochemistry and Pharmacological Effects. *Biomed Res Int*; 2015: 925631.