

## ارزیابی فیتوشیمیایی، ضدباکتریایی و ضدآلزایمیری عصاره گیاه دارویی *Curcuma longa* L. به روش مهار تولید نانویوفیبریل های آمیلوئیدی

زهرا صیادی قصبه<sup>۱</sup>، امیر آراسته<sup>۱\*</sup>

<sup>۱</sup> کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

آستادیار، گروه زیست‌شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

تاریخ دریافت: ۹۹/۴/۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۲/۱۸

### چکیده

زردچوبه با نام علمی *Curcuma longa* L. به تیره *Zingiberaceae* تعلق دارد. با توجه به ضرورت یافتن داروهای جدید ضد میکروبی، در این مطالعه ارزیابی فیتوشیمیایی، اثر ضدباکتریایی و مهارت عصاره زردچوبه بر تولید نانویوفیبریل‌های آمیلوئیدی انجام شده است. پوست خشک و سائیده‌شده گیاه در پائیز ۱۳۹۵ از کشور هندوستان تهیه و سپس به روش خیساندن عصاره‌گیری گردید. آنالیز ترکیبات ثانوی عصاره با روش کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی انجام شد. اثر ضد میکروبی عصاره آبی و هیدروالکلی زردچوبه با روش انتشار در آگار با ایجاد چاهک، MIC و MBC روی دو باکتری *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* بررسی شد. اثر مهارت عصاره هیدروالکلی بر تولید رشته‌های آمیلوئیدی با روش طیف‌سنجی مرئی مطالعه گردید. نتایج نشان داد تورمرون و زینجیبرن به ترتیب با ۲۱/۲۶ و ۱۱/۶۵ درصد فراوانترین ترکیبات موجود در عصاره هیدروالکلی بودند. قطر هاله عدم‌رشد در عصاره هیدروالکلی برای *اشریشیاکلی* ۱۲ و برای *استافیلوکوکوس اورئوس* ۱۳ میلی‌متر بود و در مورد عصاره آبی، هاله عدم‌رشد ایجاد نشد. میزان MIC در عصاره هیدروالکلی برای *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکلی* به ترتیب ۲۶ و ۵۳ و در عصاره آبی هر دو باکتری ۱۲۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش شد. میزان MBC نیز در حضور عصاره هیدروالکلی برای *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکلی* به ترتیب ۵۳ و ۱۰۶ و برای عصاره آبی هر دو باکتری ۲۴۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش شد. افزایش غلظت عصاره هیدروالکلی، تولید رشته‌های آمیلوئیدی را تا ۴۰ درصد میزان اولیه کاهش داد و این کاهش با میکروسکوپ الکترونی گذاره تأیید شد. عصاره هیدروالکلی زردچوبه با اثرات ضد میکروبی و کاهندگی که بر تولید رشته‌های آمیلوئید دارد، می‌تواند به‌عنوان یکی از داروهای مفید برای کاهش عوارض بیماری آلزایمر مورد استفاده قرار گیرد.

**واژه‌های کلیدی:** آمیلوئید، آلزایمر، تورمرون، زینجیبرن، زردچوبه، *Curcuma longa* L.

## مقدمه

بار در سال ۱۹۰۶ توسط آلویز آلزایمر<sup>۳</sup> شناسایی شد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی که در سال ۱۹۶۳ از پلاک‌های آمیلوئیدی در مغز بیماران مبتلا به آلزایمر (Kidd 1963) گرفته شد، رابطه میان فیبریل‌های آمیلوئیدی و این بیماری را برجسته کرد (Fitzpatrick, Falcon et al., 2017). البته امروزه مشخص شده است که فیبریل‌های آمیلوئیدی با تعدادی از بیماری‌های دیگر مثل پارکینسون و دیابت تیپ ۲ نیز مرتبط هستند (Fitzpatrick, Falcon et al., 2017). این ساختارهای رشته‌ای، خود مونتاژ بوده و در پروتئین‌های مختلف تعداد پیش رشته‌های متفاوتی دارند که غنی از ساختارهای بتای متقاطع<sup>۴</sup> است (Ayala, Genevaux et al., 2019). یکی از پروتئین‌های مدل که در بررسی‌های آمیلوئیدی به دلیل در دسترس و ارزان بودن، مورد استفاده قرار می‌گیرد، آلبومین سرم گاوی است. این پروتئین بیضی شکل، ۵۸۲ آمینو اسید آمینه دارد و وزن مولکولی آن معادل ۶۶/۲۸ KD می‌باشد. آلبومین سرم گاوی دارای سه دومین همولوگ (I,II,III) و نه لوب (L<sub>1</sub>-L<sub>9</sub>) مختلف است که به وسیله ۱۷ باند دی سولفیدی به یکدیگر متصل می‌شوند (Ledema, Chemes et al., 2017).

با توجه به این که امروزه استفاده بی رویه از مواد نگه‌دارنده و آنتی بیوتیک‌ها در صنایع غذایی و درمانی موجب افزایش مقاومت دارویی باکتری‌ها شده است (Ackers, Ackers-Johnson et al., 2020)، در این مطالعه اثرات ضد میکروبی عصاره زردچوبه روی باکتری‌های اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس نیز مورد مطالعه قرار گرفته است. اشریشیاکلی نوعی باسیل گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه است که از ساکنین طبیعی روده انسان به‌شمار می‌رود. این باکتری از مهمترین علل میکروبی شایع در عفونت‌های ادراری

زردچوبه با نام علمی *Curcuma longa* L. به خانواده زینجیبراسه<sup>۱</sup> تعلق دارد. این گیاه در مناطق استوایی آسیا، آمریکای مرکزی و آفریقا می‌روید، دارای چهار گونه مختلف از جمله *C. aromatica*, *C. zedoria*, *C. amada* و *C. longa* بوده و دارای خواص مختلفی است (Stanojević, Stanojević et al., 2015). این گیاه، بوته‌ای به ارتفاع یک تا یک و نیم متر داشته و دارای ریزوم متورمی است که به‌عنوان دارو و ادویه استفاده می‌شود (Grover, Deswal et al., 2015). ریزوم‌های آن به شکل مستطیل و گاهی گلابی شکل، با انشعابات کوتاه است. ماده موثره ریزوم با نام شیمیایی دی فرولیل متان<sup>۲</sup> و فرمول شیمیایی (C<sub>12</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>)، به کورکومین معروف است و علاوه بر آن روغن‌های فرار، زینجیبرن، آلفا و بتا تورمرون، آرابینوز، فروکتوز، گلوکز و نشاسته نیز در ریزوم زرد چوبه وجود دارد (Camilo, de Carvalho et al., 2020). رنگ زردچوبه مربوط به کورکومین است. نتایج مطالعات آزمایشگاهی حاکی از آن است که خواص آنتی اکسیدانی، ضدالتهابی و تنظیم سیستم ایمنی توسط زردچوبه در بهبود متابولیسم و پیشگیری از روند آسیب سلولی در بیماری آلزایمر موثر است (Krup, Prakash et al., 2013, Sharma, Ahlawat et al., 2016, Mirzaee, Hosseinzadeh et al., 2019, Camilo, de Carvalho et al., 2020). با توجه به ضرورت یافتن داروهای ضدآلزایمیری جدید و با هدف بررسی امکان استفاده از گیاه دارویی زردچوبه برای کاهش عوارض بیماری آلزایمر، در این مطالعه، اثرات ضد آلزایمیری و مهار عصاره هیدروالکلی زردچوبه بر تولید نانوبیوفیبریل‌های آمیلوئیدی مورد بررسی قرار گرفته است. بیماری آلزایمر برای اولین

3. Alois Alzheimer  
4. Cross beta structure

1. Zingiberaceae  
2. Difeouloylmethane

در محلول ۹۶ درصد اتانول ریخته شد و به مدت ۷۲ ساعت در دستگاه شیکر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به هم زده شد. سپس عصاره در دمای ۴ درجه روتاری قرار گرفت تا حلال آن تبخیر شده و یک عصاره زرد تیره غلیظ تولید گردد. میزان بازه تولید عصاره هیدروالکلی ۱۴ درصد بود (Shakeri, Soukhtanloo et al., 2017).

**کروماتوگرافی گازی - طیف‌سنجی جرمی<sup>۱</sup>:** برای بررسی ترکیبات تشکیل دهنده عصاره زردچوبه از دستگاه کروماتوگرافی گازی - طیف‌سنجی جرمی Agilent مدل 5977A استفاده شد. مقداری از نمونه عصاره هیدروالکلی در متانول ریخته شده و پس از انحلال، از فیلتر سرنگی عبور داده شد. برنامه دمایی oven دستگاه از ۷۵ درجه سانتی‌گراد شروع و تا ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد پایان یافت. از فاز متحرک هلیوم با سرعت ۰/۸ میلی‌لیتر بر دقیقه استفاده شد (Naz, Ilyas et al., 2010).

**انتشار در آگار با ایجاد چاهک:** برای این منظور از باکتری اشريشیاکلی (ATCC 25922) و استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 25923) به صورت مقایسه‌ای، یک سوسپانسیون با رقت معادل نیم مک فارلند ( $10^8 \text{ CFU/ml}$ ) تهیه شد و با استفاده از سوآپ استریل روی محیط مولر هیتون آگار به صورت چمنی کشت داده شد. سپس به کمک پیت پاستور استریل چاهکی در آگار ایجاد شد. در محله بعد عصاره داخل چاهک ریخته شد و در کنار چاهک از دیسک‌های آنتی بیوتیک جنتامایسین و تتراسایکلین در فواصل مناسب برای مقایسه اثر ضد میکروبی آنها با عصاره استفاده شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده شد (Balouiri, Sadiki et al., 2016).

است و عامل بسیاری از عفونت‌های بیمارستانی از قبیل سپسیس، عفونت‌های زخم، گاستروانتریت و مننژیت نوزادی به شمار می‌رود (Pormohammad, Nasiri et al., 2019). استافیلوکوکوس اورئوس نیز نوعی کوکسی گرم مثبت است که امروزه به‌عنوان یک بیماری‌زای مهم بیمارستانی شناخته می‌شود (Bryce, Hay et al., 2016). این باکتری موجب ایجاد طیف وسیعی از بیماری‌ها مانند اندوکاردیت، استئومیلیت، مسمومیت غذایی، سپتسمی، عفونت‌های پوستی، کورک، کفگیرک، عفونت‌های بافت نرم و سندرم پوسته پوسته شدن پوست در انسان می‌گردد (Lehar, Pillow et al., 2015). در این مطالعه، پس از بررسی فیتوشیمیایی عصاره هیدروالکلی گیاه دارویی زردچوبه با کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی، اثرات ضد-باکتریایی عصاره آبی و هیدروالکلی آن بررسی و مقایسه شد. همچنین اثرات مهاری عصاره هیدروالکلی بر تولید نانوبیوفیریل‌های آمیلوئیدی با روش جذب سنجی مرئی مورد بررسی قرار گرفته است.

#### مواد و روش‌ها

**تهیه عصاره آبی و هیدروالکلیک:** پوست خشک گیاه زردچوبه به‌عنوان نمونه در پائیز سال ۱۳۹۵ از کشور هندوستان تهیه شد و پس از سائیده‌شدن به طور کامل، عصاره آن با روش ماسراسیون تهیه گردید. برای تهیه عصاره آبی ده گرم پودر زردچوبه با ۴۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد. سپس بر روی هیتز قرار گرفت و دما به ۹۰ درجه رسانده شد و با استفاده از مگنت آنقدر به هم زده شد تا حجم نهایی پس از چند ساعت به ۲۰۰ میلی‌لیتر رسید. پس از سرد شدن، عصاره با گاز استریل صاف شد. میزان بازه تولید عصاره آبی ۱۲ درصد محاسبه شد. برای تهیه عصاره هیدروالکلی ۱۰۰ گرم پودر زردچوبه با نسبت ۱:۱۰

جدول ۱: روش تهیه نمونه‌ها از محلول عصاره و آلبومین سرم گاوی

شماره	محلول آلبومین سرم گاوی (۲۵ mg/ml)	محلول عصاره (۱۰ mg/ml)	بافر سیترات-فسفات (۱۰۰ mM با pH=3)	غلظت عصاره در نمونه (mg/ml)
۱	۴۰۰ میکرولیتر	-	۱۰۰ میکرولیتر	۰
۲	۴۰۰ میکرولیتر	۲۰ میکرولیتر	۸۰ میکرولیتر	۴
۳	۴۰۰ میکرولیتر	۴۰ میکرولیتر	۶۰ میکرولیتر	۸
۴	۴۰۰ میکرولیتر	۶۰ میکرولیتر	۴۰ میکرولیتر	۱۲
۵	۴۰۰ میکرولیتر	۸۰ میکرولیتر	۲۰ میکرولیتر	۱۶
۶	۴۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	-	۲۰

استفاده از محلول ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آلبومین سرم گاوی و محلول ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره هیدروالکلی تهیه شدند.

میکروتیوب‌ها برای ۴۸ بر روی هیتر استایر با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و با دور ۱۰۰ (دور در دقیقه) بهم زده شد. برای سنجش میزان جذب کنگورد در محدوده ۴۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر، میزان ۱۰۰ میکرولیتر از هر نمونه با ۱۹۰۰ میکرولیتر از بافر کنگورد مخلوط گردید و میزان جذب نمونه‌ها با اسپکتروفوتومتر مرئی خوانده شد (Arasteh, Habibi, Rezaei et al., 2012).

**میکروسکوپ الکترونی گذاره<sup>۳</sup>:** میزان ۵ میکرولیتر از نمونه‌های آلبومین سرم گاوی با غلظت نهایی یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای ۴۵ ثانیه روی گرید مسی پوشیده شده با لایه‌ای از فرموار قرار داده شد و پس از آن مقادیر اضافه با کاغذ صافی برداشته شد. سپس نمونه‌ها توسط محلول ۳ درصد وزنی اورانیل استات به مدت یک دقیقه شستشو شده و دوباره مقادیر اضافه با کاغذ صافی برداشته شد. گریدهای آماده پس از خشک شدن به مدت ۲ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار گرفت و با میکروسکوپ الکترونی گذاره مدل Philips EM 2008(S) در ولتاژ ۷۵ کیلو ولت

تعیین حداقل غلظت مهاری<sup>۱</sup> و حداقل غلظت کشندگی<sup>۲</sup>: شش لوله آزمایش استریل برای هر باکتری انتخاب و به ترتیب شماره گذاری شد و غلظت ۱:۲ و ۱:۶۴ تهیه شد. در ادامه کار ۲ لوله تحت عنوان شاهد برای هر باکتری استفاده شد. در لوله اول شاهد محیط کشت مولر هیتتون برات و سوسپانسیون باکتری و در لوله دوم شاهد محیط مولر هیتتون برات و عصاره زردچوبه ریخته شد و برای ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده شد. برای تعیین MBC، لوله‌ها را پس از ۲۴ ساعت از انکوباتور خارج شد و از هر لوله به کمک لوپ استریل روی یک پلیت مولر هیتتون آگار کشت خطی داده شد. پلیت‌ها برای ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار گرفت و پس از آن رشد میکروبی روی آنها بررسی شد (Balouiri, Sadiki et al., 2016).

**روش جذب سنجی مرئی:** بررسی اثر ضد آلزایمیری عصاره با روش جذب سنجی مرئی و تعیین طول موج ماکزیمم در طیف جذبی ۴۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر انجام شد. برای این کار در یک میکروتیوب، ۲۵ میلی‌گرم پودر آلبومین سرم گاوی ریخته شد و یک میلی‌لیتر بافر ۱۰۰ mM از سیترات-فسفات با pH برابر ۳ به آن افزوده شد و خوب بهم زده شد. سپس مطابق جدول (۱)، نمونه‌ها در شش میکروتیوب مختلف و با

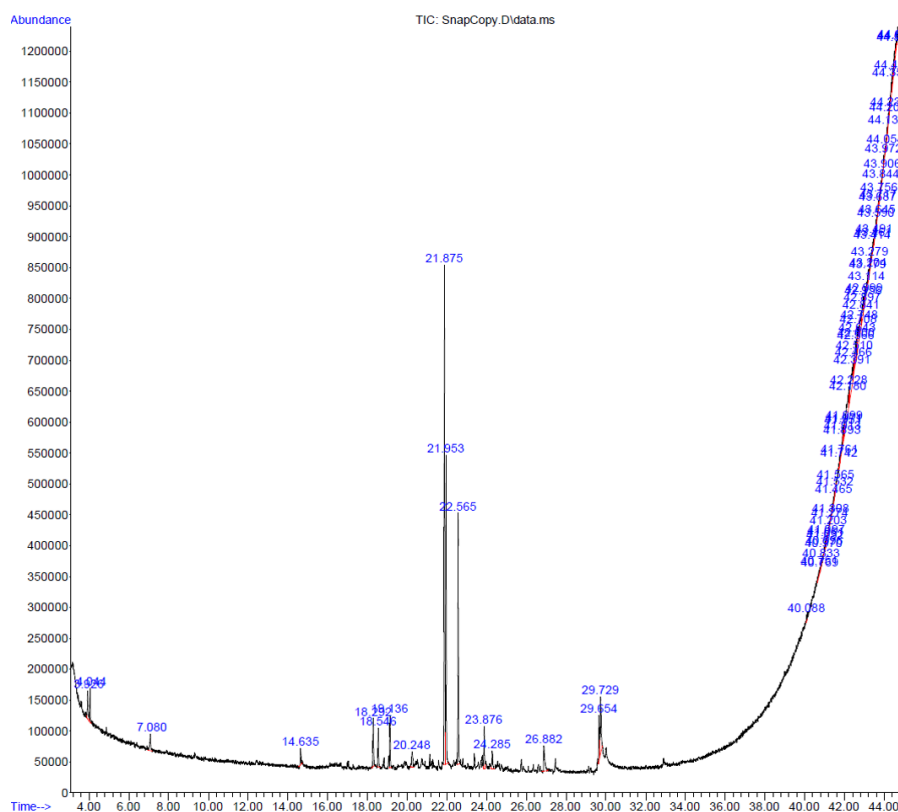
1. MIC
2. MBC

جرمی: جدول (۲) ترکیبات موجود در عصاره هیدروالکلی زردچوبه را نشان داده است. مهم‌ترین این ترکیبات شامل تورمرون، زینجیبرن و اسید اولئیک بودند.

تصویر برداری گردید. از بزرگ نمایی ۲۰ تا ۸۰ هزار برابر استفاده شد (Holm, Jespersen et al., 2007).

## نتایج

نتایج حاصل از کروماتوگرافی گازی- طیف‌سنجی



شکل ۱: گازکروماتوگرام حاصل از عصاره هیدروالکلی گیاه زردچوبه

جدول ۲: اطلاعات حاصل از گازکروماتوگرام عصاره زردچوبه

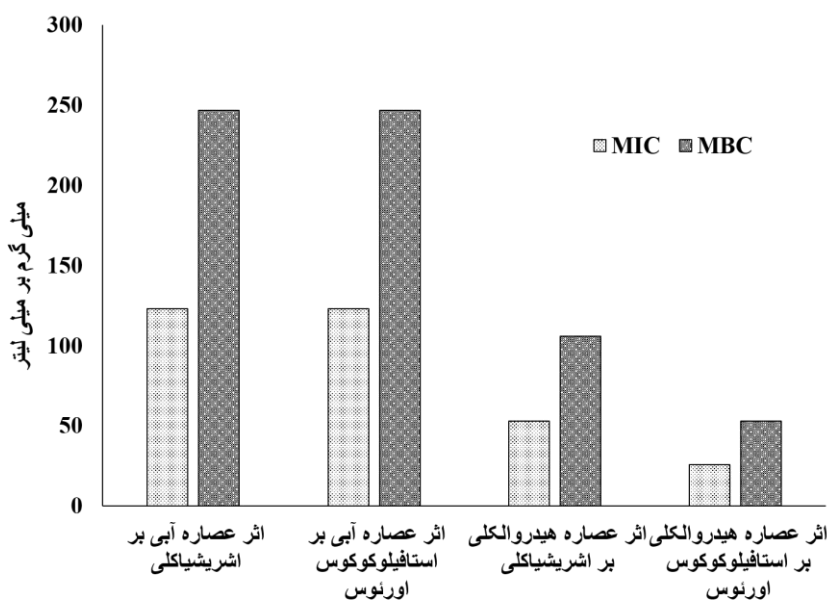
نام ترکیب	زمان شناسایی (دقیقه)	درصد حضور در عصاره	احتمال حضور در عصاره (درصد)
تورمرون	۲۱/۸۷۸	۲۱/۲۶	۹۸
زینجیبرن	۱۸/۵۴۸	۱۱/۶۵	۹۳
بتا-سزکوئی فلاندرن	۱۹/۱۳۷	۲/۱۴	۹۸
کرلون	۲۲/۵۶	۱۰/۹۱	۹۶
آلفا-آتلانتون	۲۳/۸۷	۵/۰۷	۹۸
هگزا دکانوئیک اسید	۲۶/۸۸	۱۵/۹۷	۶۴
اولئیک اسید	۲۹/۶۴	۱۹/۳۳	۹۱

نمونه‌ها برای ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند، میزان قطر هاله عدم رشد در پلیت اندازه‌گیری شد.

نتایج حاصل از روش چاهک: جدول (۳) نتایج حاصل از بررسی قطر هاله عدم رشد در باکتری‌های مورد مطالعه را در مورد عصاره های آبی و هیدروالکلی نشان داده شده است. پس از این‌که

جدول ۳: مقایسه‌ای قطر هاله عدم رشد ناشی از عصاره آبی و هیدروالکلی

باکتری	عصاره (mm)		جتتامایسین (mm)		تتراسایکلین (mm)		شاهد منفی (آب)
	آبی	هیدروالکلی	آبی	هیدروالکلی	آبی	هیدروالکلی	
استافیلوکوکوس اورئوس	بدون هاله	۱۳	۲۵	۲۵	۲۰	۱۶	بدون هاله
اشریشیاکلی	بدون هاله	۱۲	۱۸	۱۹	۱۶	۱۶	بدون هاله



شکل ۲: نمودار مقادیر MIC و MBC مربوط به عصاره آبی و هیدروالکلی زردچوبه بر باکتری های مورد مطالعه

باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی تاییدی بر MIC بود. برای تعیین حداقل غلظت باکتری‌کشی نیز به روش ذکر شده، پلیت شماره ۲ با غلظت ۲۴۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره آبی زردچوبه علیه هر دو باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی، به‌عنوان MBC گزارش گردید (جدول ۴). در عصاره هیدروالکلی زردچوبه نسبت به باکتری

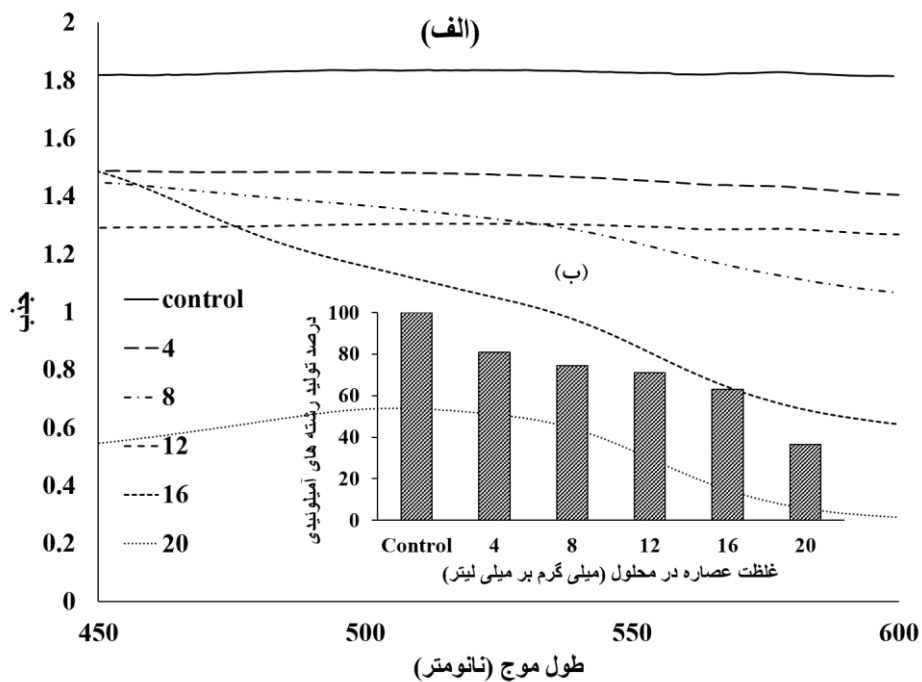
نتایج حاصل از تعیین حداقل غلظت مهاری و حداقل غلظت کشندگی: برای تعیین حداقل غلظت مهاری از عصاره زردچوبه ابتدا یک میلی‌لیتر از عصاره به دقت وزن شد و غلظت عصاره به میزان میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محاسبه گردید. میزان حداقل غلظت ممانعت کننده عصاره آبی زردچوبه لوله‌ی شماره ۳ با غلظت ۱۲۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در حضور هر دو

پلیت شماره ۴ با غلظت ۵۳ میلی گرم بر میلی لیتر در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* و پلیت شماره ۳ با غلظت ۱۰۶ میلی گرم بر میلی لیتر علیه سویه باکتری *اشریشیاکلی* به عنوان MBC گزارش گردید (شکل ۲).

*استافیلوکوکوس اورئوس*، لوله‌ی شماره ۵ با غلظت ۲۶ میلی گرم بر میلی لیتر و نسبت به *اشریشیاکلی* لوله‌ی شماره ۴ با غلظت ۵۳ میلی گرم بر میلی لیتر تأییدی بر حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد باکتری (MIC) بود. در عصاره هیدروالکلی زردچوبه

جدول ۴: حداقل غلظت مهاری و حداقل غلظت باکتری کشی در عصاره آبی و هیدروالکلی زردچوبه

عصاره هیدروالکلی زردچوبه		عصاره آبی زردچوبه		میکروارگانیسم
MBC(mg/ml)	MIC(mg/ml)	MBC(mg/ml)	MIC(mg/ml)	
۱۰۶	۵۳	۲۴۷	۱۲۳	اشریشیاکلی
۵۳	۲۶	۲۴۷	۱۲۳	استافیلوکوکوس اورئوس



شکل ۳: (الف) طیف جذب رشته‌های آمیلوئیدی و (ب) درصد تولید رشته‌های آمیلوئیدی در غلظت‌های مختلف عصاره. با افزایش غلظت عصاره هیدروالکلی زردچوبه از ۴ تا ۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر، میزان طول موج ماکزیمم که نمادی از تولید رشته‌های آمیلوئیدی است، کاسته می‌شود.

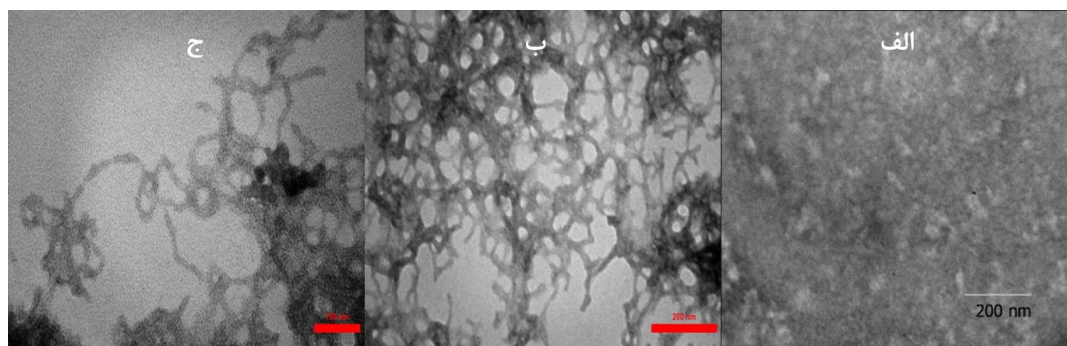
آمیلوئیدی) کاسته می‌شود، تا جایی که به‌کارگیری ۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر از عصاره در محلول، موجب ایجاد حداکثر کاهش در تولید رشته‌های آمیلوئیدی

نتایج حاصل از بررسی اثر ضد آلزایمری عصاره زردچوبه: نتایج نشان داد که با افزایش غلظت عصاره زردچوبه از میزان جذب (مقیاسی از حضور رشته‌های

آلبومین سرم گاوی قبل از تشکیل رشته‌های آمیلوئیدی است که ساختاری کریستالی و بدون رشته را نشان می‌دهد. دسته دوم که رشته‌های به دست آمده پس از تولید است که رشته‌های واضح با قطر تقریبی ۲۰ نانومتر را نشان می‌دهد و دسته سوم رشته‌های آمیلوئیدی پس از اثر عصاره هیدروالکلی زردچوبه را نشان می‌دهد که مقدار رشته‌های آمیلوئیدی پس از اثر عصاره به حداقل رسیده است (شکل ۴).

گردید. نتایج حاصل از بررسی طیف جذبی رشته‌های آمیلوئیدی و درصد تولید رشته‌های آمیلوئیدی در غلظت‌های مختلف از عصاره در شکل (۳) آمده است. با افزایش غلظت عصاره، میزان طول موج ماکزیمم که نمادی از تولید رشته‌های آمیلوئیدی است، کاهش می‌یابد.

**نتایج حاصل از بررسی رشته‌های آمیلوئیدی با میکروسکوپ الکترونی گذاره:** تصاویر میکروسکوپ الکترونی در سه حالت مختلف تهیه شد. دسته اول،



**شکل ۴:** تصاویر میکروسکوپ الکترونی از رشته‌های به دست آمده همراه با نمونه کنترل. (الف) آلبومین سرم گاوی قبل از تشکیل رشته‌های آمیلوئیدی، (ب) پس از تشکیل رشته‌های آمیلوئیدی (ج) پس از اثر عصاره هیدروالکلی زردچوبه

## بحث

مهمترین یافته این تحقیق مبین آن است که تورمرول و زینجیرن به ترتیب با ۲۱/۲۶ و ۱۱/۶۵ درصد، فراوانترین ترکیبات موجود در عصاره بوده و سایر ترکیبات شامل beta.-Sesquiphellandrene به میزان ۲/۱۴ درصد، Curlone به میزان ۱۰/۹۱ درصد، Hexadecanoic acid به میزان ۱۵/۹۷ درصد و Oleic acid به میزان ۱۹/۳۳ درصد بودند (جدول ۲)، که با نتایج بسیاری از محققین همخوانی دارد. گیمارس و همکاران در سال ۲۰۲۰، ترکیبات alpha-phellandrene به میزان ۰/۳۵ درصد، Ar-turmerone به میزان ۳۱/۳۱ درصد، Curlone به میزان ۲۰/۳۷ درصد، beta-Sesquiphellandrene به میزان ۲/۴۴ درصد را

گزارش کردند (Guimarães, Vinhas et al., 2020). در تحقیق Peron و همکاران در سال ۲۰۲۰ مشخص شد که عصاره زردچوبه دارای ۱۰/۳ درصد ar-Turmerone، ۰/۴۹ درصد ar-Turmerol، ۰/۵۲ درصد Curlone و ۰/۲۲ درصد (E)-Atlantone می‌باشد (Peron, Sut et al., 2020). در مطالعه Topiar و همکاران نیز که در سال ۲۰۱۹ انجام شد، مقادیر ترکیبات موجود در عصاره زردچوبه شامل ۰/۴۲ درصد ar-Caryophyllene، ۱/۶۲ درصد beta-Sesquiphellandrene، ۲/۷ درصد Curcumene، ۱۹/۹۳ درصد Turmerone و ۱۳/۱۲ درصد Curlone گزارش گردید که با نتایج حاصل از تحقیق حاضر همخوانی دارد. همچنین در پژوهش Sandeep و همکاران در سال ۲۰۱۶، میزان turmerone برابر



مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۶ انجام شد، اثر ضد میکروبی کورکومین بر عوامل بیماری‌زای غذایی مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه، میزان MIC برای کورکومین به ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای استافیلوکوکوس اورئوس و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای اشریشیاکلی گزارش شد (Altunatmaz, Aksu et al., 2016). محمد و همکاران نیز در سال ۲۰۲۱ به بررسی اثر ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی گیاه زردچوبه پرداختند. آنها اثر مهار عصاره زردچوبه را بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی متعددی تأیید کردند (Muhamed, Ahmad et al., 2019). این اثرات در مطالعه نيسار و همکاران به حضور ترکیبات فنولی در عصاره مثل کورکومینوئیدها، آکالوئیدها و تورمرون نسبت داده شده است (Nisar, Iqbal et al., 2015). در مطالعه دیگری نیز که در سال ۲۰۲۰ بر روی ماده موثره کورکومین انجام شد، میزان حداقل غلظت مهار در مقابل سویه‌های مختلف باکتریای مورد بررسی قرار گرفت و این میزان برای استافیلوکوکوس اورئوس ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و اشریشیاکلی ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش شد (Adamczak, Ozarowski et al., 2020).

نتایج حاصل از این تحقیق مانند بسیاری از تحقیقات دیگر (Wang, Kim et al., 2014, Giacomeli, Izoton et al., 2019, Huo, Zhang et al., 2020, Wu, Li et al., 2019)، مکانیزم مهار تولید نانو رشته‌های آمیلوئیدی را برای عصاره زردچوبه تأیید کرد. نتایج این تحقیق نشان داد که با افزایش غلظت عصاره، میزان تولید رشته‌های آمیلوئیدی کاهش می‌یابد. ردی و همکاران در سال ۲۰۱۸ نیز اثرات مستقیم ماده موثره کورکومین موجود در زردچوبه را در کاهش آسیب حاصل از حضور رشته‌های آمیلوئیدی در سیستم عصبی مرکزی گزارش

۱۴/۳۷ درصد، میزان  $\alpha$ -phellandrene برابر ۱۹/۵۶ درصد و Zingiberene برابر ۱/۵ درصد گزارش گردید (Sandeep, Kuanar et al., 2016). در مطالعه دیگری  $\alpha$ -phellandrene به میزان ۱۱/۸ درصد، cineole به میزان ۱۱/۷ درصد،  $\alpha$ -zingiberene به میزان ۱۲/۵ درصد،  $\beta$ -sesquiphellandrene به میزان ۸ درصد، ar-turmerone به میزان ۳۲/۵ درصد و  $\beta$ -turmerone به میزان ۱۸/۴ درصد گزارش شد (Setzer, Duong et al., 2021).

در مطالعه حاضر، میزان MIC برای عصاره آبی در مورد هردو باکتری به ۱۲۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای عصاره هیدروالکلی، در مورد استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی به ترتیب ۲۶ و ۵۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش شد. همچنین، نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس حساس‌تر از باکتری گرم منفی اشریشیاکلی است و میزان حساسیت، تابعی از نوع و میزان عصاره بود. علت حساسیت کمتر باکتری‌های گرم منفی را می‌توان به حضور غشاء خارجی در اطراف دیواره سلولی گرم منفی‌ها نسبت داد که سبب محدود کردن انتشار اجزاء آبگریز عصاره به لایه لیپوپلی ساکاریدی می‌گردد (Karimi, Ghanbarzadeh et al., 2018). عصاره هیدروالکلی زردچوبه نسبت به عصاره آبی اثر گذاری بهتری داشت که علت آن را می‌توان در توانایی بالاتر الکل برای استخراج ترکیبات موثره از سلول‌های گیاهی دانست (Lim 2016). با توجه به اینکه حساسیت آنتی‌بیوتیکی سوش‌های مختلف باکتری‌ها متنوع بوده و از طرفی مقاومت میکروبی رو به افزایش است، استفاده از مواد طبیعی برای استفاده در درمان ترکیبی با آنتی‌بیوتیک‌ها برای کاهش مقاومت میکروبی بسیار مورد توجه است (Karimi, Ghanbarzadeh et al., 2018, MacLean and San Millan 2019).

گیاه دارویی زردچوبه را مورد بررسی قرار داد. نتایج نشان داد که زردچوبه با حضور ترکیباتی چون تورمرون و زینجیبرن که حضور آنها در عصاره هیدروالکلی به اثبات رسید، دارای اثرات ضدباکتریایی بوده و می‌توان آن را به‌عنوان یکی از ترکیبات ضد میکروبی مناسب در غذا مورد استفاده قرار داد. همچنین اثرات مهاری عصاره زردچوبه بر تولید نانورشته‌های آمیلوئیدی مورد بررسی و تأیید قرار گرفت. نتایج حاصل از این تحقیق، این گیاه دارویی را به‌عنوان کاندیدایی مناسب برای کاهش عوارض ناشی از بیماری آلزایمر معرفی می‌کند.

#### سپاسگزاری

نویسندگان مراتب قدردانی و تشکر خود را از تمام دوستان و همکارانی که در اجرای این پژوهش یاری و پشتیبانی نمودند، اعلام می‌دارند.

کردند (Reddy, Manczak et al., 2018). در صورتی که ترکیبات موجود در عصاره هیدروالکلی زردچوبه بتوانند تولید رشته‌های آمیلوئیدی را کم و یا مهار نمایند، اثرات ضد آلزایمیری آن به‌عنوان یک گیاه دارویی مناسب برای کاهش عوارض ناشی از بیماری آلزایمر مورد تأیید قرار می‌گیرد (Kim, Shrestha et al., 2019, Sharman, Gyengesi et al., 2019). البته برای اثرات ضدآلزایمیری زردچوبه می‌توان به مکانیزم‌های دیگری نیز مانند اثرات بهبود سمیت گونه‌های آمیلوئید بتا و مهار قطعات متعدد در طول پاتولوژی آلزایمر اشاره کرد (Yao and Xue 2014, Reddy, Manczak et al., 2018).

#### نتیجه‌گیری نهایی

این مطالعه اثرات ضدباکتریایی عصاره آبی و اثرات ضدباکتریایی و فیتوشیمیایی عصاره هیدروالکلی

#### References

1. Ackers, L., et al., 2020. Anti-microbial resistance in global perspective, Springer Nature.
2. Adamczak, A., et al., 2020. "Curcumin, a natural antimicrobial agent with Strain-Specific activity." *Pharmaceuticals*, 13(7): 153.
3. Altunatmaz, S.S., et al., 2016. Antimicrobial effects of curcumin against *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. typhimurium* and *E. coli* O157: H7 pathogens in minced meat." *Veterinárni Medicina*, 61(5): 256-262.
4. Arasteh, A., et al., 2012. "Response surface methodology for optimizing the bovine serum albumin fibrillation." *The protein Journal*. 31(6): 457-465.
5. Ayala, S., et al., 2019. "(Bio) chemical strategies to modulate amyloid- $\beta$  self-assembly." *ACS chemical neuroscience*. 10(8): 3366-3374.
6. Balouiri, M., et al., 2016. "Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review." *Journal of pharmaceutical analysis*. 6(2): 71-79.
7. Bryce, A., et al., 2016. "Global prevalence of antibiotic resistance in paediatric urinary tract infections caused by *Escherichia coli* and association with routine use of antibiotics in primary care: systematic review and meta-analysis." *Bmj* 352: i939.
8. Camilo, C.J., et al., 2020. "Chemical composition and in vitro biological activities of the essential oils of the rhizomes of *Zingiber officinale* roscoe and *Curcuma longa* L.(Zingiberaceae) / Composição química e atividades biológicas in vitro dos óleos essenciais dos rizomas de *Zingiber officinale* Roscoe e *Curcuma longa* L.(Zingiberaceae)." *Brazilian Journal of Development*. 6(4): 17766-17772.
9. Fitzpatrick, A.W., et al., 2017. "Cryo-EM structures of tau filaments from Alzheimer's disease." *Nature*. 547(7662): 185-190.

10. Giacomeli, R., et al., 2019. "Neuroprotective effects of curcumin lipid-core nanocapsules in a model Alzheimer's disease induced by  $\beta$ -amyloid 1-42 peptide in aged female mice." *Brain research* 1721: 146325.
11. Grover, H., et al., 2015. "Curcumin: A medicinal plant and its effects in medicine and dentistry." *International Journal of Contemporary Dental & Medical Reviews* 2015.
12. Guimarães, A. F., et al., 2020. "Essential oil of *Curcuma longa* L. rhizomes chemical composition, yield variation and stability." *Química Nova*. 43(7): 909-913.
13. Holm, N.K., et al., 2007. "Aggregation and fibrillation of bovine serum albumin." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. 1774(9): 1128-1138.
14. Huo, X., et al., 2019. "A novel synthesis of selenium nanoparticles encapsulated PLGA nanospheres with curcumin molecules for the inhibition of amyloid  $\beta$  aggregation in Alzheimer's disease". *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 190: 98-102.
15. Karimi, N., et al., 2018. "Antioxidant, antimicrobial and physicochemical properties of turmeric extract-loaded nanostructured lipid carrier (NLC)." *Colloid and Interface Science Communications* 22: 18-24.
16. Kidd, M. 1963. "Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease." *Nature*. 197(4863): 192-193.
17. Kim, J.E., et al., 2019. "WS-5 Extract of *Curcuma longa*, *Chaenomeles sinensis*, and *Zingiber officinale* contains anti-aChE compounds and improves  $\beta$ -amyloid-induced memory impairment in mice." *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM* 2019.
18. Krup, V., et al., 2013. "Pharmacological activities of turmeric (*Curcuma longa* Linn): A review." *J Homeop Ayurv Med* 2(133): 2167-1206.1000133.
19. Ledesma, A.E., et al., (2017). "Spectroscopic characterization and docking studies of ZnO nanoparticle modified with BSA." *Applied Surface Science* 412: 177-188.
20. Lehar, S. M., et al., 2015. "Novel antibody-antibiotic conjugate eliminates intracellular *S. aureus*." *Nature* 527(7578): 323-328.
21. Lim, T. 2016. *Curcuma longa*. Edible medicinal and non-medicinal plants, Springer: 241-362.
22. MacLean, R.C. and San Millan, A. 2019. "The evolution of antibiotic resistance". *science* 365(6458): 1082-1083.
23. Mirzaee, F., et al., 2019. "Diverse effects of different "protein-based" vehicles on the stability and bioavailability of curcumin: spectroscopic evaluation of the antioxidant activity and cytotoxicity in vitro." *Protein and peptide letters*. 26(2): 132-147.
24. Muhamed, I. A., et al., 2019. "Antimicrobial and antioxidant property of *Curcuma longa* Linn." *International Journal of Basic & Clinical Pharmacology*. 8(11): 2383.
25. Naz, S., et al., 2010. "Chemical analysis of essential oils from turmeric (*Curcuma longa*) rhizome through GC-MS." *Asian Journal of Chemistry*. 22(4): 3153.
26. Nisar, T., et al., 2015. "Turmeric: A promising spice for phytochemical and antimicrobial activities." *Am Eur J Agric Environ Sci*. 15(7): 1278-1288.
27. Peron, G., et al., 2020. "Untargeted UPLC-MS metabolomics reveals multiple changes of urine composition in healthy adult volunteers after consumption of *Curcuma longa* L. extract." *Food research international*. 127: 108730.
28. Pormohammad, A., et al., 2019. "Prevalence of antibiotic resistance in *Escherichia coli* strains simultaneously isolated from humans, animals, food, and the environment: a systematic review and meta-analysis." *Infection and drug resistance*. 12: 1181.
29. Reddy, P.H., et al., 2018. "Protective effects of Indian spice curcumin against amyloid- $\beta$  in Alzheimer's disease." *Journal of Alzheimer's Disease*. 61(3): 843-866.

30. Sandeep, I.S., et al., 2016. "Agroclimatic zone based metabolic profiling of turmeric (*Curcuma Longa* L.) for phytochemical yield optimization." *Industrial Crops and Products*. 85: 229-240.
31. Setzer, W.N., et al., 2021. "Variation in the chemical composition of five varieties of *Curcuma longa* rhizome essential oils cultivated in north alabama." *Foods*. 10(2): 212.
32. Shakeri ,F., et al., 2017. "The effect of hydro-ethanolic extract of *Curcuma longa* rhizome and curcumin on total and differential WBC and serum oxidant, antioxidant biomarkers in rat model of asthma." *Iranian journal of basic medical sciences*. 20(2): 155.
33. Sharma, A., et al., 2016. "Turmeric its applications in dentistry." *J. Adv Res Med* 3(1): 27-30.
34. Sharman, M.J., et al., 2019. "Assessment of diets containing curcumin, epigallocatechin-3-gallate, docosahexaenoic acid and  $\alpha$ -lipoic acid on amyloid load and inflammation in a male transgenic mouse model of Alzheimer's disease: Are combinations more effective?" *Neurobiology of disease*. 124: 505-519.
35. Stanojević, J.S., et al., 2015. "Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of the turmeric essential oil (*Curcuma longa* L.)." *Advanced technologies*. 4(2): 19-25.
36. Wang, X., et al., 2014. "Effects of curcuminoids identified in rhizomes of *Curcuma longa* on BACE-1 inhibitory and behavioral activity and lifespan of Alzheimer's disease *Drosophila* models." *BMC complementary and alternative medicine*. 14(1): 1-14.
37. Wu, P. Q., et al., 2020. "Isolation, characterization, and possible anti-alzheimer's disease activities of bisabolane-type sesquiterpenoid derivatives and phenolics from the rhizomes of *Curcuma longa*." *Chemistry & biodiversity*. 17(5): e2000067.
38. Yao, E.C. and Xue, L. 2014. "Therapeutic effects of curcumin on alzheimer's disease." *advances in alzheimer's disease*. 3(04): 145.

## Phytochemical, Antibacterial and Anti-Alzheimer's Evaluation of *Curcuma longa* L. Extract by Inhibiting Production of Amyloid Nanobiofibrils

Sayadi Ghasabeh, Z.<sup>1</sup>, Arasteh, A.<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>M.Sc, Department of biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

<sup>2</sup>Assistant Professor, Department of biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

Received: 2020-6-25; Accepted: 2021-5-8

### Abstract

*Curcuma longa* L. known as Turmeric belongs to the *zingiberaceae* family. Due to the need to find new antimicrobial drugs, in this study the phytochemical evaluation, antibacterial and inhibitory effects of turmeric extract on the production of amyloid nanobiofibrils were investigated. Dry and abraded skin of the plant was prepared from India in autumn 2016 and then extracted by maceration method. Analysis of secondary compounds of the extract was performed by gas chromatography-mass spectrometry. The anti-microbial effect of aqueous and hydro-alcoholic extract of turmeric was examined by the agar well diffusion method and Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were determined for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Anti-Alzheimer's effects of Hydro-alcoholic extract on the production of amyloid fibrils were studied by spectrophotometry. The results were showed that turmerone and zingiburn were the most abundant compounds in hydro-alcoholic extract with 21.26% and 11.65%, respectively. The diameter of the clear inhibitory zone formed around the wells in the hydro-alcoholic extract was 12 for *E. coli* and 13 mm for *S. aureus* and in the case of aqueous extract, no growth inhibition zone was observed. The MIC values of the hydro-alcoholic extract for *S. aureus* and *E. coli* were determined at concentration of 26 and 53 mg/ml, respectively and for the aqueous extract they were 123 mg/ml for both. The MBC values of the hydro-alcoholic extract for *S. aureus* and *E. coli* were at concentration of 53 and 106 mg/ml, respectively and for the aqueous extract they were 247 mg/ml for both. Increasing the concentration of hydro-alcoholic extract reduced the production of amyloid fibrils by up to 40 % of the initial amount and this decrease was confirmed by transmission electron microscopy. Therefore, the hydro-alcoholic extract of turmeric with antimicrobial and reducing effects on the production of amyloid fibrils, can be used as one of the useful drugs to reduce the complications of Alzheimer's disease.

**Keywords:** Alzheimer, Amyloid, *Curcuma longa* L., Turmerone, Turmeric, Zingiberene.

---

\*Corresponding author: arasteh@iaurasht.ac.ir