مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی
سال نهم، شماره چهارم، پیاپی سی و ششم، بهار ۱۴۰۰ (۱۰۱-۸۹)

مقاله پژوهشی:

بررسی اثرات ضدمیکروبی و ضدآلزایمری عصاره‌های آبی و هیدروالکلی سیاه‌دانه به‌روش مهار رشته‌های آمیلوئیدی

سارا تاجدوست[۱*]، امیر آراسته[۲]، سیده محدثه موسوی اشکیکی[۳]
۱. استادیار، گروه زیست‌شناسی، واحد آستانه اشرفیه، دانشگاه آزاد اسلامی، آستانه اشرفیه، ایران.
۲. استادیار، گروه زیست‌شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران.
۳. کارشناس، گروه زیست‌شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۹/۸ – تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱/۲۱)

چکیده
سیاه‌دانه گیاهی علفی و یک‌ساله است که دارای اثرات دارویی متعددی است. در این مطالعه پژوهشی، اثرات ضدمیکروبی و ضدآلزایمری عصاره‌های آبی و هیدروالکلی سیاه‌دانه ارزیابی شد. پس از شناسایی ترکیبات موجود در عصاره هیدروالکلی با گاز کروماتوگرافی جرمی (GS-MS)، شاخص‌های فعالیت ضدمیکروبی شامل MIC، MBC و انتشار چاهک در باکتری‌های اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس، با استفاده از روش‌های رقت در لوله و آگار انجام شد. اثرات ضدآلزایمری عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه روی پروتئین آلبومین سرم گاوی، با روش طیف‌سنجی کنگورد و میکروسکوپ الکترونی گذاره بررسی شد. اسیدهای چرب اولئیک‌اسید (۵۲/۱۸٪) و پس از آن پالمیتیک‌اسید (۱۹/۷۷٪) و لینولئیک‌اسید (۱۴/۹۶٪) عمده‌ترین اسیدهای‌چرب موجود در عصاره بودند. میزان MIC و MBC عصاره هیدروالکلی برای هردو باکتری *اشرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس*، به‌ترتیب ۳۰/۶ و ۶۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. در روش انتشار چاهک، بیش‌ترین فعالیت ضدمیکروبی در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* با قطر هاله عدم‌رشد ۲۲/۶۷±۰/۲۹ میلی‌متر مشاهده شد، اما عصاره آبی اثری بر باکتری‌ها نداشت. نتایج طیف‌سنجی کنگورد نشان داد، با افزایش غلظت عصاره سیاه‌دانه از میزان جذب نمونه پروتئینی (مقیاسی از حضور رشته‌های آمیلوئیدی) کاسته شده و کمترین درصد جذب در بیش‌ترین غلظت عصاره (۲۰ میکرولیتر) نسبت به شاهد (بدون عصاره) مشاهده شد. این نتایج با میکروسکوپ الکترونی گذاره تأیید شد. مطالعه حاضر نشان می‌دهد که بذر سیاه‌دانه می‌تواند به‌عنوان یک منبع طبیعی و با ارزش برای کنترل عفونت‌های میکروبی و کاهش علایم در مبتلایان به آلزایمر به‌کار رود.

واژه‌های کلیدی: اثرات ضدمیکروبی، بیماری آلزایمر، آمیلوئید بتا، سیاه‌دانه.

* نویسندهٔ مسئول: سارا تاجدوست Email: S.tajdoust@gmail.com

Investigation of anti–microbial and anti-Alzheimer effects of aqueous and hydro-alcoholic extracts of *Nigella sativa* by inhibiting the production of amyloid fibrils

Sara Tajdoust[1*], Amir Arasteh[2], Seyedeh Mohadeseh Mousavi Eshkiky[3]
1. Assistant Professor, Department of biology, Astaneye Ashrafiyeh Branch, Islamic Azad University, Astaneye Ashrafiyeh, Iran.
2. Assistant Professor, Department of biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.
3. M.A., Department of biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.

(Received: Nov. 29, 2019 - Accepted: Apr. 10, 2021)

Abstract
Nigella sativa is an annual herbaceous plant that has various pharmacological effects. In this research study, anti–microbial and anti–Alzheimer effects of aqueous and hydro–alcoholic extracts of *N. sativa* were evaluated. After identification of hydro–alcoholic extract compounds by GC–MS, anti–microbial activity indices including well diffusion, MIC and MBC for *E. coli* and *S. aureus*, were carried out by tube and agar dilution methods. In Anti–Alzheimer's effects of hydro–alcoholic extract of *N. sativa* on bovine serum albumin were examined using Congo–red spectrophotometry and transmission electron microscopy. Oleic acid (52.18%) followed by palmitic (19.77%) and linoleic acid (14.96%) were the major fatty acids in the extract. The amounts of MIC and MBC for both *E. coli and S. aureus* were 30.6 and 61 $mg.ml^{-1}$ respectively in hydro–alcoholic extract. Well diffusion method showed highest antimicrobial activity against *S. aureus* with inhibition zone diameter of 22.67±0.29 mm, but aqueous extract did not any effects on bacteria. Congo–red spectrophotometry results showed that the absorbance of the protein sample (as a measure of amyloid fibril presence) was reduced by increasing the concentration of *N. sativa* extract and the lowest percentage of adsorption, compared to the control (extract less), was observed at the highest concentration of extract (20 µL). These results were confirmed by transmission electron microscope. The present study shows that the *N. sativa* seed, as a natural and valuable source, can be used for controlling the microbial infections and reducing symptoms in patients with Alzheimer's disease.

Keywords: Anti-microbial effects, Alzheimer's disease, Beta amyloid, *Nigella sativa*.

مقدمه

بیماری آلزایمر که با اختلالات پیش‌رونده قوای ذهنی و ناهنجاری‌های رفتاری مشخص می‌شود، شایع‌ترین نوع بیماری زوال عقل است. میزان بروز آلزایمر به شکل هشدار دهنده‌ای در حال افزایش بوده و در بسیاری از کشورها در حال تبدیل شدن به یک دغدغه اجتماعی است (Cipriani *et al*., 2011).

براساس آمار، ۲۳ تا ۳۵ میلیون نفر در سراسر جهان تحت اثر بیماری آلزایمر هستند و افزایش سن مهمترین عامل در بروز این بیماری است (Cacace *et al*., 2016). بیماری آلزایمر با تجمع پلاک‌های آمیلوئیدی نامحلول در مغز همراه است. این پلاک‌ها در فرآیندی موسوم به آمیلوئیدوز تشکیل شده و در این فرایند یک پپتید با توالی ۴۰ تا ۴۳ تایی موسوم به آمیلوئید بتا (Aβ) به‌صورت فیبریل‌های نامحلول در مغز تجمع می‌یابد. بسیاری از بیماری‌های تحلیل برنده عصبی دیگر نیز با تجمع پروتئین‌ها یا پپتیدهای خاص در بخش‌های مختلف مغز همراه هستند که می‌توان به مواردی مانند تجمع پروتئین آلفا–سینوکلئین (Alpha-synuclein) در بیماری پارکینسون، تجمع هانتینگتین (Huntingtin) در بیماری هانتینگتون، تجمع پریون‌ها در آنسفالوپاتی‌های اسفنجی‌شکل و ترانس‌تیرتین (Transthyretin) در آمیلوئیدوز اشاره نمود (Murphy, 2002; Mason *et al.,* 2003). پپتید آمیلوئید بتا که عنصر اصلی پلاک‌های موجود در سیستم عصبی افراد مبتلا به بیماری آلزایمر است، به وسیله پروتئولیز گلیکوپروتئینی بزرگ در غشای داخلی به نام پروتئین پیش‌ساز آمیلوئید (APP) تولید شده و آنزیم‌های بتا و گاما سکرتاز (Secretes)، در تجزیه این پروتئین پیش‌ساز نقش دارند (Vetrivel & Thinakaran 2010).

مکانیسم‌های بیولوژیکی ایجادکننده آلزایمر ناشناخته است. افزایش سن، فعالیت زیاد آنزیم استیل کولین استراز و در نتیجه کاهش میزان استیل کولین، اختلال در هموستازی یونی، آسیب اکسایشی، فرایندهای التهابی و سمیت تحریکی وابسته به افزایش میزان گلوتامات، در ایجاد این بیماری دخیل هستند (Sharififar *et al*., 2012). متأسفانه در حال حاضر داروهایی که برای درمان آلزایمر استفاده می‌شوند، فقط به‌منظور درمان اختلالات شناختی و علاج ناهنجاری‌های رفتاری در این بیماری به‌کار رفته و توانایی مهار عامل اصلی بیماری را ندارند (Musardo *et al*., 2013).

امروزه گیاهان دارویی به‌دلیل داشتن اثرات درمانی متعدد و عوارض جانبی کمتر، توجه جوامع بشری را برای درمان بیماری‌ها به خود جلب کرده‌اند. گیاه سیاه‌دانه با نام علمی (*Nigella sativa*)، متعلق به خانواده آلالگان بوده و به‌طور گسترده در جنوب اروپا، شمال آفریقا، آسیا و کشورهایی مانند هند، ایران و کشورهای عربی یافت می‌شود. مواد مؤثره عصاره آبی سیاه‌دانه شامل تیموکینون، دی تیموکنیون و تیمو هیدروکینون است، همچنین دانه‌های این گیاه حاوی ویتامین، مواد معدنی، پروتئین، کربوهیدرات، فسفولیپیدها، اسیدهای چرب، توکوفرول، استرول، کاروتن، کلسیم، آهن و پتاسیم می‌باشد (Mohamadin *et al*., 2010; Yaman & Balikci, 2010).

مطالعات اخیر، نشان داده است که عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه منبع غنی از اسیدهای چرب غیر اشباع مانند اولئیک و لینولئیک اسید بوده و این اسیدهای چرب با افزایش سیالیت غشاهای نورونی نقش مؤثری در بهبود یادگیری داشته و از مرگ سلول‌های عصبی و اختلال حافظه در بیماری‌هایی مانند آلزایمر جلوگیری می‌کنند (Tamadonfard *et al*., 2014; Sharma *et al*., 2017; Mouwakeh *et al*., 2018). همچنین با توجه به مطالعات گسترده روی سوش‌های مختلف باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت و مطالعه بر روی اثرات آنتی بیوتیک‌ها بر روی باکتری‌ها و مقاومت رو به افزایش آن‌ها نسبت به این داروها، استفاده از مواد طبیعی ضد باکتریایی و استفاده از آن‌ها به‌عنوان مکمل در کنار آنتی‌بیوتیک‌ها بسیار

مورد توجه قرار گرفته است. ازآنجایی‌که گیاهان دارویی دارای اثرات جانبی کمتر و هزینه بسیار پایین‌تری می‌باشند، استفاده از آنها می‌تواند راه درمانی مناسبی برای مقابله با باکتری‌ها باشد. در سال‌های اخیر از دانه‌های سیاه‌دانه در طب سنتی و درمان بیماری‌های میکروبی استفاده شده و تاکنون گزارشی از عوارض جانبی مصرف آن مشاهده نشده است، بنابراین این گیاه می‌تواند دارویی مؤثـر برای بیماری‌های میکروبی نیز باشد و نیاز به مطالعات گسترده تر جهت ارزیابی و بررسی مکانیسم‌های مولکولی و سلولی دخیل در اثرات ضد میکروبی این گیاه، به تنهایی یا در ترکیب با داروهای دیگر است (Dinagaran *et al.*, 2016; Islam *et al.*, 2017).

نتایج این تحقیق می‌تواند عصاره سیاه‌دانه را به‌عنوان یک فرآورده طبیعی با کارایی بالا در کاهش عوارض ناشی از بیماری آلزایمر معرفی نماید. در این تحقیق، اثرات ضد میکروبی عصاره آبی و هیدروالکلی گیاه سیاه‌دانه، همچنین آنالیز ترکیبات لیپیدی عصاره این گیاه و اثر عصاره بر فرایند فیبریل زایی پروتئین آلبومین سرم گاوی به‌عنوان یک پروتئین مدل در آزمایشگاه، مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه گیاه

دانه‌های گیاه سیاه‌دانه از فروشگاه‌های گیاهان دارویی (عطاری) شهر رشت تهیه و گونه و جنس آن به وسیله کارشناس گیاه شناس دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت مورد بررسی و تأیید قرار گرفت.

عصاره گیری از سیاه‌دانه

تهیه عصاره آبی و هیدروالکلی سیاه‌دانه

برای تهیه عصاره آبی، ۲۵۰ گرم بذر آسیاب‌شده سیاه‌دانه با یک لیتر آب مقطر به‌مدت ۶۰ دقیقه جوشانده شد. بعد از عبور مخلوط حاصل از صافی، نمونه‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه با ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. برای تهیه عصاره هیدروالکی، میزان ۳۰۰ گرم پودر سیاه‌دانه با دستگاه سوکسله (مدل EME61000/CEB ساخت شرکت Electrothermal انگلستان) عصاره‌گیری و عصاره حاصل با دستگاه روتاری (مدل RV10 ساخت شرکت IKA آلمان)، در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ شد وعصاره‌ها تا زمان استفاده درون شیشه کدری در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند (Samarakoon *et al.*, 2010). جهت تعیین وزن خشک عصاره‌های آبی و الکلی سیاه‌دانه، ابتدا وزن یک لوله آزمایش خالی تعیین و پس از آن یک میلی‌لیتر از عصاره‌های آبی یا هیدروالکلی در آن ریخته شد، سپس لوله‌های حاوی عصاره در دمای آزمایشگاه خشک گردید. اختلاف وزن لوله‌ها معادل یک میلی‌لیتر از عصاره بود. میانگین سه بار تکرار به‌عنوان وزن خشک عصاره محاسبه شد و وزن یک میلی‌لیتر عصاره آبی و هیدروالکلی به‌ترتیب برابر ۹۶۰ و ۹۸۰ میلی‌گرم بود.

بررسی و آنالیز عصاره سیاه‌دانه به روش گاز کروماتوگرافی جرمی (GC–Mass)

جهت شناسایی ترکیبات موجود در عصاره سیاه‌دانه از دستگاه کروماتوگرافی گازی سری 7890B ساخت شرکت Agilent آمریکا مجهز به ستون موئینه‌ای HP-5MS و طیف‌نگار جرمی مدل 5977 A، استفاده شد. گاز هلیوم به‌عنوان فاز متحرک با سرعت ۰/۸ میلی‌متر در دقیقه انتخاب شد. برنامه‌ریزی حرارتی ستون از ۵۰ درجه سانتی‌گراد شروع و به تدریج با سرعت ۳ درجه در دقیقه افزایش یافت و به ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد رسید. درجه حرارت محفظه تزریق نیز ۲۹۰ درجه سانتی‌گراد بود. در نهایت نتایج به‌صورت منحنی کروماتوگرام توسط دستگاه رسم گردید. جهت شناسایی طیف‌ها، ابتدا آلکان‌های نرمال سری (C5-C25)، در شرایط مشابه نمونه‌ها تزریق و زمان بازداری آنها به‌دست آمد. شناسایی طیف‌ها براساس شاخص

بازداری و مقایسه با طیف‌های جرمی استاندارد صورت گرفت. دستگاه کروماتوگرافی گازی–طیف‌سنجی جرمی دارای کتابخانه‌هایی به نام NIST و Willey است که مواد را بر اساس درصد مشابهت با استانداردی که دارد، در پیک‌ها ثبت می‌کند. تمام موارد موجود در طیف ارائه‌شده با توجه به زمان بازداری در ستون جرمی و استاندارد موجود در دستگاه شناسایی و مشخص شدند (Benkaci-Ali *et al.*, 2010).

تهیه سوسپانسیون‌های میکروبی استاندارد

سویه‌های باکتری مورد استفاده به‌صورت استاندارد از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی) تهیه و خریداری شد.

تعیین حداقل غلظت مهاری[1]

سویه‌های استاندارد باکتری‌های *اشرشیاکلی* (PTCC 1399) و *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC 1431) از محیط کشت ذخیره به محیط کشت شیبدار آگار مغذی (مرک آلمان) تلقیح شدند، پلیت‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند، تا کلنی‌های لازم ایجاد گردد. از کشت‌های تازه و جوان باکتری‌ها چند کلنی به محیط کشت مولر هینتون براث (ساخت شرکت کیولب کانادا) منتقل شد، تا کدورت سوسپانسیون‌های میکروبی تهیه شده مطابق با لوله استاندارد نیم مک فارلند ($۱/۵\times۱۰^{۸}$CFU/ml) تنظیم گردد، سپس دوازده لوله آزمایش استریل برای هر باکتری به‌طور جداگانه اانتخاب شد و در آن‌ها از غلظت ۱:۲ تا ۱:۶۴ از عصاره‌های آبی و الکلی به‌صورت مجزا در محیط کشت مولر هینتون براث تهیه شد و به هر کدام از رقت‌ها ۱۰۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون‌های باکتریایی تهیه شده با غلظت نیم مک فارلند اضافه شد. دو لوله یکی به‌عنوان شاهد مثبت (محیط کشت همراه با باکتری مورد نظر) و دیگری به‌عنوان شاهد منفی (محیط کشت همراه با عصاره) در نظر گرفته شد. پس از انکوباسیون به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، نتایج به روش کدورت سنجی ارزیابی شد و غلظت اولین لوله‌ای که در آن کدورت مشاهده نگردید، به‌عنوان MIC در نظر گرفته شد.

تعیین حداقل غلظت کشندگی[2]

برای تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره‌ها، تمام لوله‌های MIC در سطح محیط کشت مولر هینتون آگار کشت شدند. محیط‌های کشت تلقیح شده به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند، پلیت مربوط به لوله‌ای که حاوی کمترین غلظت عصاره بود و در آن رشد باکتری مشاهده نشد به‌عنوان MBC در نظر گرفته شد.

روش انتشار در آگار با ایجاد چاهک[3]

در روش انتشار چاهک ۵۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی با غلظت ۰/۵ مک فارلند در سطح محیط کشت مولر هینتون آگار به‌صورت یکنواخت گسترش داده شد. فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌های هیدروالکلی در رقت‌های ۴۸۰، ۲۴۰، ۱۲۰، ۶۰، ۳۰ و ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر با روش انتشار چاهک سنجیده شد و از آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین و جنتامایسین به‌عنوان شاهد مثبت استفاده گردید و آزمایش‌ها در سه تکرار انجام و قطر هاله عدم رشد با کولیس و بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد. مقادیر میانگین‌ها± انحراف معیار با استفاده از آزمون تی مستقل در سطح احتمال ۵ درصد با نرم‌افزار SPSS 16 تخمین زده شد (Finegold & Martin, 1982).

1. Minimum Inhibitory Concentration

2. Minimum Bacteriocidal Concentration

3. Agar well diffusion method

بررسی اثرات ضدآلزایمری عصاره سیاه‌دانه

آلبومین سرم گاوی، فسفات دی‌بازیک و کلیه ترکیبات در تهیه بافر کنگورد از شرکت مرک آلمان تهیه شده است.

الف) تهیه بافر سیترات – فسفات

۰/۱ مولار از اسید سیتریک و ۰/۲ مولار از فسفات دی بازیک در آب دو بار تقطیر با نسبت‌های مشخص با هم ترکیب شدند وpH آنها سنجیده شد. میزان pH این بافر بایستی ۳ باشد.

ب) تهیه بافر کنگورد

میزان ۰/۰۰۱۳ گرم رنگ کنگورد در فسفات بافر سالین (PBS) شامل (۱۴۰ میلی‌مولار سدیم کلراید، ۲/۵ میلی‌مولار پتاسیم کلراید، ۱۰ میلی‌مولار دی سدیم فسفاتاز دهیدروژناز و ۲ میلی‌مولار پتاسیم دی هیدروژن فسفات) حل شده و با آب مقطر به حجم نهایی ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد، pH بافر بایستی برابر ۷/۴ باشد و آن را از فیلترهای مخصوص گذرانیده و پس از استریل شدن تا زمان استفاده در شیشه‌های تیره مخصوص و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگه‌داری شد (Arasteh *et al*., 2012).

ج) تولید رشته‌های آمیلوئیدی

در یک میکروتیوب ۰/۰۲ گرم پودر آلبومین سرم گاوی (BSA) و یک میلی‌لیتر بافر سیترات–فسفات (pH=۳)، روی شیکر کاملاً مخلوط شدند و مطابق جدول ۱، حجم نهایی میکروتیوپ‌ها با افزودن رقت‌های متفاوت عصاره هیدروالکلی و بافر سیترات–فسفات به ۵۰۰ میکرولیتر رسید و میزان تولید رشته‌های آمیلوئیدی با استفاده از دستگاه طیف‌سنج مرئی–فرابنفش (مدل Lambda 750s ساخت شرکت Perkin Elmer آمریکا) اندازه‌گیری گردید. برای این منظور، ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های آمیلوئیدی تهیه شده (جدول ۱)، با ۱۹۰۰ میکرولیتر از بافر کنگورد مخلوط شده و سپس طیف جذبی هر نمونه توسط دستگاه طیف‌سنج در محدوده طول موج بین ۴۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر سنجش شد. اطلاعات حاصل از هر بار اسکن توسط دستگاه ذخیره شده و به کمک نرم‌افزار Excel برای تعیین تغییرات طول موج ماکزیمم در برابر جذب در طول موج ماکزیمم رسم شد. در این محدوده مولکول کنگورد به تنهایی حداکثر جذب را در طول موج ۴۸۵ نانومتر دارد، ولی در صورت تشکیل ساختارهای آمیلوئیدی، این میزان می‌تواند تا بیش از ۵۰۰ نانومتر نیز افزایش پیدا کند (Arasteh *et al*., 2012).

بررسی رشته‌های آمیلوئیدی به روش میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM)

۵ میکرولیتر از نمونه‌های آلبومین سرم گاوی با غلظت نهایی یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌مدت ۴۵ ثانیه بر روی گریدهای مسی پوشیده شده با لایه‌ای از پلیمر فرموار قرار داده شد و مقادیر اضافه آن با کاغذ صافی برداشته شد، سپس نمونه‌ها توسط محلول ۳ درصد اورانیل استات به‌مدت یک دقیقه شستشو شده و مقادیر اضافه با کاغذ صافی برداشته شد و نمونه‌ها پس از خشک‌شدن به‌مدت ۲ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار گرفتند. گریدهای آماده توسط میکروسکوپ الکترونی گذاره (مدل208S ساخت شرکتPhilips هلند)، در ولتاژ ۷۵ کیلو ولت تصویر برداری شده و از بزرگ‌نمایی ۱۸ تا ۷۷ هزار برابر استفاده گردید (Holm, Jespersen *et al.* 2007).

نتایج

آنالیز ترکیبات لیپیدی عصاره سیاه‌دانه به روش گاز کروماتوگرافی جرمی (GC–Mass)

ترکیبات شیمیایی شناسایی‌شده در عصاره سیاه‌دانه و درصد آن‌ها به‌ترتیب در شکل ۱ و جدول ۲ نشان داده شده است. قله‌ها در شکل ۲ به‌ترتیب زمان تشخیصی آورده شده است. بر اساس نتایج حاصله، ماده

پالمیتیک اسید در دقیقه ۸/۳۵ به میزان ۱۹/۷۷ درصد، اولئیک اسید در دقیقه ۸/۸۳ به میزان ۵۲/۱۸ درصد و لینولئیک اسید در دقیقه ۸/۸۵ به میزان ۱۴/۹۶ درصد عمده‌ترین ترکیبات موجود در عصاره را تشکیل دادند.

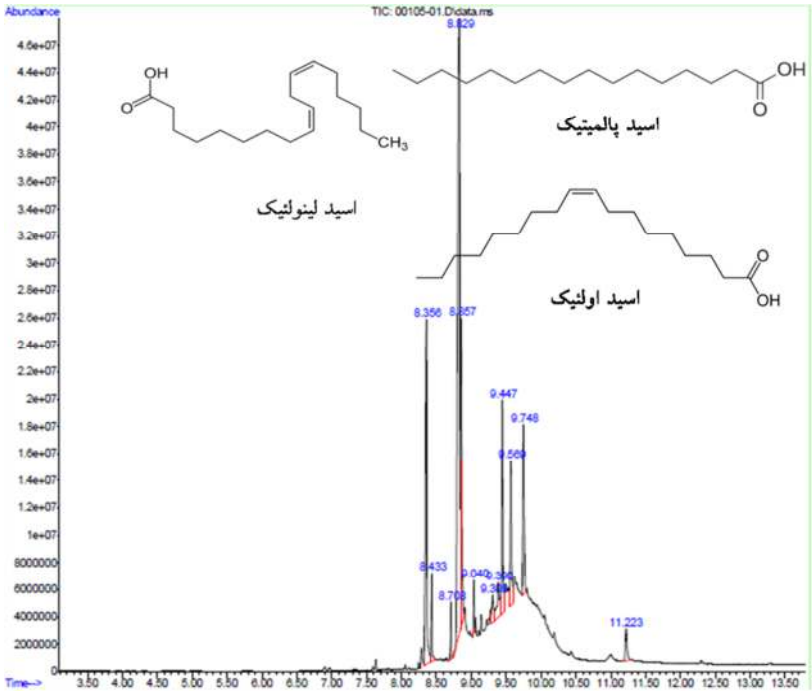
بررسی حداقل غلظت مهاری (MIC) عصاره‌های آبی و هیدروالکلی سیاه‌دانه

پس از انکوباسیون به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، میزان کدورت لوله‌ها (رشد یا عدم رشد باکتری) بررسی شد و آخرین لوله شفاف به‌عنوان MIC در نظر گرفته شد و غلظت آن بر حسب میلی‌گرم در میلی‌لیتر محاسبه شد.

نتایج حاصل از وزن لوله‌های محتوی عصاره نشان داد که وزن یک میلی‌لیتر عصاره آبی و هیدروالکلی به‌ترتیب برابر ۹۶۰ و ۹۸۰ میلی‌گرم است. مطابق جدول ۳، تا لوله شماره ۵ عصاره هیدروالکلی، برای هر دو باکتری *اشرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* کدورتی مشاهده نشد و غلظت MIC عصاره هیدروالکلی برای هر دو باکتری ۳۰/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود، اما هیچ گونه اثر مهاری رشد در غلظت‌های مختلف عصاره آبی بر روی باکتری‌های *اشرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده نشد و همه لوله‌ها کدر بودند (جدول ۴).

جدول ۱. تهیه رقت متوالی از محلول پروتئین آمیلوئید و عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه

شماره لوله	محلول آلبومین سرم گاوی (۵ mg / ml)	عصاره گیاهی	بافر سیترات- فسفات ۳= pH
۱	۴۰۰ میکرولیتر	–	۱۰۰ میکرولیتر
۲	۴۰۰ میکرولیتر	۲۰ میکرولیتر	۸۰ میکرولیتر
۳	۴۰۰ میکرولیتر	۴۰ میکرولیتر	۶۰ میکرولیتر
۴	۴۰۰ میکرولیتر	۶۰ میکرولیتر	۴۰ میکرولیتر
۵	۴۰۰ میکرولیتر	۸۰ میکرولیتر	۲۰ میکرولیتر
۶	۴۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	-



شکل ۱. نمودار کلی گاز کروماتوگرافی جرمی عصاره سیاه‌دانه

جدول ۲. اسیدهای چرب موجود در عصاره سیاه‌دانه

ردیف	ماده اصلی	زمان شناسایی	کتابخانه	احتمال حضور (درصد)	درصد حضور (٪)
۲	اسید پالمیتیک	۸/۳۵	NIST05aL	۹۸	۱۹/۷۷
۳	اسید اولئیک	۸/۸۳	NIST05aL	۹۶	۵۲/۱۸
۱	اسید لینولئیک	۸/۸۵	NIST05aL	۹۹	۱۴/۹۶
۴	اسید میریستیک	۹/۳	NIST05aL	۹۶	۸/۱۸

جدول ۳. غلظت‌های مختلف عصاره هیدرو الکلی سیاه‌دانه

شماره لوله	۱	۲	۳	۴	۵	۶
رقت	۱:۲	۱:۴	۱:۸	۱:۱۶	۱:۳۲	۱:۶۴
غلظت (mg / ml)	۴۹۰	۲۴۵	۱۲۲	۶۱	۳۰/۶	۱۵/۳

جدول ٤. غلظت‌های مختلف عصاره آبی سیاه‌دانه

شماره لوله	۱	۲	۳	۴	۵	۶
رقت	۱:۲	۱:۴	۱:۸	۱:۱۶	۱:۳۲	۱:۶۴
غلظت (mg / ml)	۴۸۰	۲۴۰	۱۲۰	۶۰	۳۰	۱۵

بررسی حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره‌های آبی و هیدروالکلی سیاه‌دانه

به‌منظور تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC)، لوله‌های MIC را در پلیت مخصوص به خود کشت داده و پس از ۲۴ ساعت نتایج بررسی و آخرین پلیت فاقد باکتری به‌عنوان MBC در نظر گرفته شد. در تست MBC عصاره هیدروالکلی، تا پلیت شماره ۴ هر دو باکتری هیچ کلنی مشاهده نشد و غلظت MBC عصاره هیدروالکلی برای هردو باکتری *اشرشیاکلی* و *استافیلوکوکس اورئوس* ۶۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود (جدول ۳). در بررسی MBC عصاره آبی، هیچ‌گونه اثر کشندگی از عصاره آبی روی دو باکتری مشاهده نشد (جدول ۴).

بررسی فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌های آبی و هیدروالکلی سیاه‌دانه با روش انتشار چاهک

براساس نتایج، عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه بر خلاف عصاره آبی از رشد *استافیلوکوکس اورئوس* و *اشرشیاکلی* جلوگیری نموده و این اثر بازدارندگی با افزایش غلظت عصاره هیدروالکلی به‌صورت معنی‌داری افزایش یافت. تحلیل آماری نتایج مشخص نمود که میانگین قطر هاله عدم‌رشد باکتری‌ها در غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌ها (شاهد مثبت) در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار است (جدول ۵). بیشترین قطر هاله عدم‌رشد ۲۲/۶۷±۰/۲۹ میلی‌متر، در غلظت ۴۸۰ میلی‌لیتر عصاره هیدروالکلی علیه باکتری *استافیلوکوکس اورئوس* مشاهده شد، این عصاره بازدارندگی بیش‌تری نسبت به آنتی بیوتیک‌های جنتامایسین و تتراسایکلین (شاهد مثبت) روی باکتری *استافیلوکوکس اورئوس* نشان داد. اثر بازدارندگی عصاره هیدروالکلی روی باکتری *اشرشیاکلی* به‌صورت معنی‌داری کمتر از باکتری *استافیلوکوکس اورئوس* بود (جدول ۵). هر دو باکتری نسبت به عصاره آبی مقاوم بوده و هاله عدم رشد در عصاره آبی مشاهده نشد. بررسی توزیع نرمال داده‌ها با استفاده از آزمون کلموگروف- اسمیرنوف و همگنی واریانس‌ها با استفاده از آزمون لون با نرم‌افزار SPSS 16 انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون تی مستقل در سطح احتمال ۵ درصد تخمین زده شد.

نتایج حاصل از بررسی اثر ضدآلزایمری عصاره سیاه‌دانه

در این پژوهش، اثر تغییرهای غلظت عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه روی روند مهار تولید فیبریل‌های آمیلوئیدی در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و pH=۳ (شرایط بهینه) نشان داده شده است. بر اساس نتایج حاصله، با افزایش درصد غلظت عصاره سیاه‌دانه از میزان جذب (مقیاسی از حضور رشته‌های آمیلوئیدی) کاسته شده و کمترین درصد جذب در بیشترین غلظت

به‌کارگیری عصاره (۲۰ میکرولیتر)، نسبت به شاهد (عدم حضور عصاره سیاه‌دانه) مشاهده شد (شکل ۲).

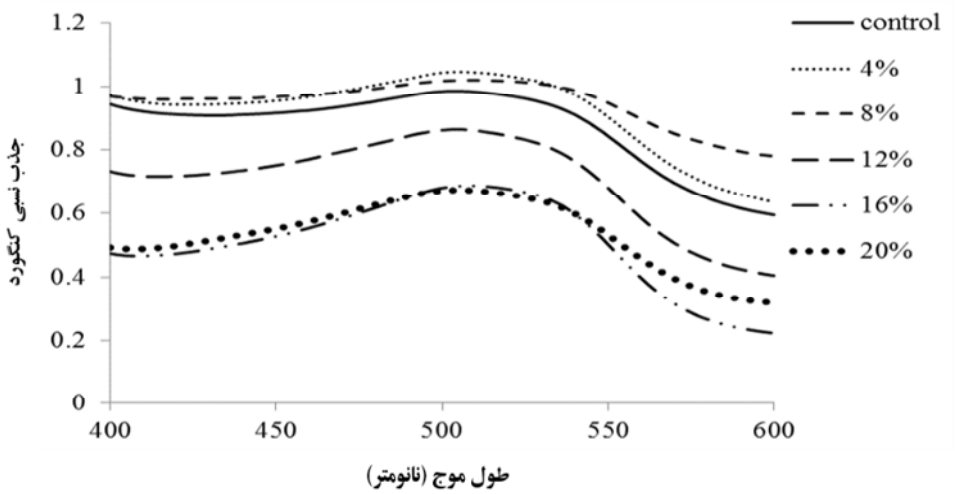
بررسی رشته‌های آمیلوئیدی به روش میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM)

در دو حالت مختلف از فیبریل‌ها، تصاویر میکروسکوپ الکترونی تهیه شده است. در شکل ۳، تصویر پروتئین آلبومین سرم گاوی قبل و بعد از تشکیل رشته‌های آمیلوئیدی نشان داده شده که رشته‌هایی واضح با قطر تقریبی ۲۰ نانومتر تشکیل داده است. این روش، یکی از مطمئن‌ترین ابزارهای مورد استفاده در جهت اثبات وجود تجمعات آمیلوئیدی می‌باشد.

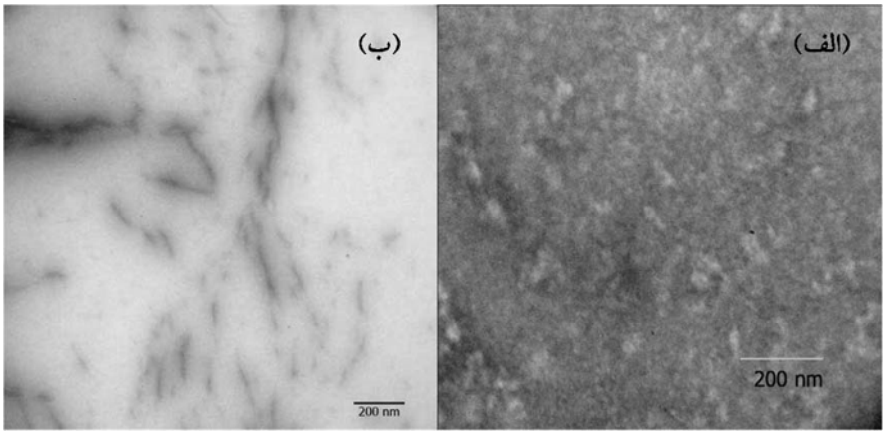
جدول ۵. میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری‌ها (mm) در غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی و آنتی بیوتیک‌ها

باکتری	غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی (mg/ml)						آنتی بیوتیک	
	۴۸۰	۲۴۰	۱۲۰	۶۰	۳۰	۱۵	تتراسایکلین	جنتامایسین
استافیلوکوکوس اورئوس	۲۲/۶۷±۰/۲۹*	۱۴/۸۹±۰/۷۷	۶/۴۴±۰/۰۹	۳/۱۸±۰/۴۲	۱/۵۴±۰/۰۴	۰/۸۰±۰/۰۲	۱۸±۰/۰	۵/۹۹±۰/۸۷
اشرشیا کلی	۹/۳۲±۰/۰۲	۷/۵۷±۰/۰۶	۲/۹۷±۰/۸۴	۰/۱۹±۰/۰۱	۰/۰۵±۰/۰۱	۰/۰۱±۰/۰	۱۲/۱۷±۱/۱	۹/۱۹±۰/۱۷

*میانگین ± انحراف معیار (Mean ± SD) قطر هاله عدم رشد



شکل ۲. طیف‌های جذب کنگورد پروتئین آلبومین سرم گاوی در رقت‌های مختلف عصاره سیاه‌دانه



شکل ۳. تصاویر میکروسکوپ الکترونی گذاره از فیبریل‌زایی پروتئین آلبومین سرم گاوی.

(الف) قبل از تشکیل رشته‌های آمیلوئیدی، (ب) بعد از تشکیل رشته‌های آمیلوئیدی با بزرگ نمایی ۷۷ هزار برابر.

بحث و نتیجه‌گیری

در این پژوهش، نتایج ارزیابی ترکیبات موجود در عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه نشان داد که لینولئیک اسید به میزان ۱۴/۹۶ درصد، پالمیتیک اسید به میزان ۱۹/۷۷ درصد و اولئیک اسید به میزان ۵۲/۱۸ درصد، عمده‌ترین ترکیبات موجود در عصاره سیاه‌دانه هستند. Mousavi *et al.* (2010) نیز گزارش دادند که دانه‌های سیاه‌دانه حاوی لینولئیک اسید (۵۵/۶ درصد)، اولئیک (۲۳/۴ درصد) و پالمیتیک اسید (۱۲/۵ درصد) است. بر پایه گزارش برخی از محققین نیز اسیدهای چرب غیر اشباع با کاهش میزان کلسترول غشاهای نورونی باعث افزایش سیالیت این غشاها شده و افزایش سیالیت غشاها، جوانه زنی اکسون‌ها و دندریت‌های جدید را تسهیل می‌کند (Mousavi *et al.*, 2010).

در پژوهشی که روی ترکیب اسیدهای چرب روغن سیاه‌دانه انجام گرفت، مشخص شد که از میان اسیدهای چرب غیر اشباع، لینولئیک اسید (۵۷/۹۶ درصد) و بعد اولئیک اسید (۲۱/۴۹ درصد) دارای بالاترین درصد بودند و پالمیتیک اسید (۱۲/۵ درصد) نیز از سایر اسیدهای چرب اشباع بیشتر بود. این محققان، همچنین گزارش دادند که لینولئیک اسید موجود در عصاره روغنی این گیاه دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به آلفاتوکوفرول‌ها بوده و این فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا، برای سلامتی انسان و پیشگیری از بیماری‌های متعدد مفید است (Al-Naqeep *et al.*, 2011). در پژوهش Al-Juhaimi *et al.* (2016) نیز گزارش گردید که ارزش تغذیه‌ای لینولئیک اسید به واسطه نقش متابولیسمی آن در سطوح بافتی است و این اسیدچرب می‌تواند زنجیره بلندی از اسیدهای چرب غیراشباع و پروستاگلاندین‌ها را تولید کند. بنابر این، روغن گیاه سیاه‌دانه منبع خوبی از اسیدهای چرب غیر ضروری است و می‌تواند جایگزین خوبی برای روغن‌های گیاهی مصرفی متداول باشد. براساس مطالعات محققین، علت تفاوت درصد اسیدهای چرب در تحقیقات متعدد می‌تواند مربوط به فاکتورهای ژنتیکی، شرایط محیطی، اقلیمی، رشدی و یا شرایط آزمایشگاهی باشد (Al-Juhaimi *et al.*, 2016).

مطالعات فارماکولوژیک نشان داده‌اند که مواد مؤثره دانه‌های سیاه‌دانه شامل تیموکینون، تیموهیدروکینون، دی تیموکوئینون، تیمول و ملانین بوده که دارای اثرات ضدمیکروبی بر علیه پاتوژن‌های مختلف مانند باکتری‌ها، ویروس‌ها، شیستوزوما و قارچ‌ها هستند (Halawani, 2009; Boubertakh *et al.*, 2013). نتایج این پژوهش روی MIC عصاره آبی و هیدروالکلی سیاه‌دانه نشان داد که، عصاره هیدروالکلی تأثیرات مشابهی روی هر دو باکتری *اشرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* داشته و MIC عصاره هیدروالکلی برای هر دو باکتری *اشرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس* ۳۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود، اما هیچ‌گونه اثر مهاری رشد در عصاره آبی روی باکتری-های *اشرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده نشد. میزان MBC عصاره هیدروالکلی نیز برای هردو باکتری *اشرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر بود، اما هیچ‌گونه اثر کشندگی از عصاره آبی بر روی دو باکتری مشاهده نشد. بنابراین، عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه دارای اثرات ضدباکتریایی نسبتاً خوبی بود.

در مطالعه‌ای که روی فعالیت ضدباکتریایی عصاره آبی و هیدروالکلی سیاه‌دانه در برابر باکتری‌های *سودوموناس آئروژینوزا*، *کلبسیلا پنومونیا* و *پروتئوس ولگاریس* انجام گرفت، هیچ کدام از عصاره‌های آبی و الکلی سیاه‌دانه در غلظت پایین‌تر از ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مؤثـر نبوده و عصاره الکلی بازدارندگی بیشتری نسبت به عصاره آبی نشان داد. این محققان، گزارش دادند که استخراج ترکیبات فعال از گیاه بستگی به نوع حلال استخراجی دارد (Hasan *et al.*, 2013). در گزارش Parekh *et al.* (2006) نیز نشان داده شده است که متانول، اتانول و آب متداول‌ترین حلال‌های مورد استفاده، جهت تعیین فعالیت

ضدمیکروبی در گیاهان بوده و ترکیبات فعال ضدمیکروبی گیاهان در حلال‌های قطبی نظیر متانول، نسبت به آب حلالیت بیشتری دارند. بنابراین، در این تحقیق نیز اثر قوی‌تر عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه نسبت به عصاره آبی روی باکتری‌های مورد مطالعه، می‌تواند ناشی از حلالیت بیشتر ترکیبات مؤثره این گیاه در حلال الکلی، نسبت به حلال آبی باشد (Parekh *et al*., 2006).

در مطالعه Mashhadian & Rakhshande (2005)، عصاره آبی سیاه‌دانه اثر بازدارندگی رشدی روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* نداشته، اما عصاره‌های متانولی و کلروفرمی سیاه‌دانه اثرات بازدارندگی رشدی بالایی داشته و غلظت بازدارندگی آنها از ۶۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تا ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر متغیر بود (Mashhadian & Rakhshandeh, 2005).

در پژوهش Hannan *et al*. (2008)، همه سویه های *استافیلوکوکس اورئوس* مورد بررسی که مقاوم به متی سیلین بودند، به عصاره اتانولی سیاه‌دانه حساس بوده و MIC آنها از ۰/۲ تا ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر متغیر بود (Hannan *et al*., 2008)، اما در مطالعه Dadgar *et al*. (2006)، تأثیر عصاره‌های آبی و هیدروالکلی سیاه‌دانه بر سویه‌های *استافیلوکوکس اورئوس* مقاوم و حساس به متی‌سیلین، مقدار MIC هر دو عصاره آبی و هیدروالکلی ۰/۰۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود (Dadgar *et al*., 2006)، که با مقدار عددی آزمایش Hannan متفاوت بود. این پژوهش‌گران، گزارش دادند که این تفاوت‌ها می‌تواند مربوط به روش های متفاوت استخراج و سنجش MIC باشد، لذا برای ارزیابی فعالیت ضد میکروبی سیاه‌دانه و سنجش مواد مؤثر عصاره این گیاه در نواحی مختلف نیاز به تدوین یک روش استاندارد جهت آماده‌سازی عصاره است تا عواملی که در فعالیت ضدمیکروبی این گیاه دخیل هستند، به درستی شناسایی شوند.

در این پژوهش، اثرات مهارکنندگی رشد عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (گرم مثبت) بیشتر از باکتری *اشرشیاکلی* (گرم منفی) بود. در مطالعه Usman *et al*. (2017)، بیشترین فعالیت ضدمیکروبی عصاره الکلی سیاه‌دانه بر علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* با قطر هاله عدم رشد ۱۹ میلی‌متر مشاهده شد و در هیچ غلظتی از عصاره الکلی بازدارندگی رشد بر علیه باکتری *اشرشیاکلی* مشاهده نشد. تفاوت بازدارندگی رشد در باکتری‌های گرم منفی و مثبت می‌تواند ناشی از آن باشد که باکتری‌های گرم مثبت فاقد غشای خارجی در دیواره خود هستند و این امر سبب نفوذ بیشتر ترکیبات فعال در آنها می‌شود، اما باکتری‌های گرم منفی به علت وجود لایه لیپو پلی‌ساکاریدی در غشای بیرونی خود نفوذناپذیرتر بوده و این لایه مانند سدی از عبور مولکول‌های بزرگ و آب‌گریز ممانعت می‌کند و از آنجایی که اکثر ترکیبات موجود در عصاره‌ها ماهیت آبگریزی دارند، لذا این مواد امکان نفوذ و دسترسی به نقاط فعال داخل باکتری‌های گرم منفی را نداشته و به همین دلیل معمولا باکتری‌های گرم منفی در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت مقاومت بیشتری نسبت به ترکیبات دارویی نشان می‌دهند (Usman *et al*., 2017).

ساختارهای آمیلوئیدی با تأثیرهای ناهنجار بسیار پیچیده بر عوامل مختلف سلولی، سؤال‌های متعددی را در ذهن دانشمندان ایجاد کرده‌اند. این ناهنجاری‌های سلولی در نهایت باعث ایجاد بیماری‌های مختلف مانند آلزایمر و پارکینسون می‌شوند. به این ترتیب، بررسی مکانیسم‌های تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی در یافتن راه‌های درمان و حتی پیشگیری از ابتلا به آنها مؤثر است (Chiti & Dobson, 2009; Mroczko *et al*., 2018). در این تحقیق، تشکیل تجمعات آمیلوئیدی در پروتئین آلبومین سرم گاوی با استفاده از تصاویر میکروسکوپ الکترونی گذاره مورد تأیید قرار گرفت و سپس اثر غلظت‌های مختلف عصاره سیاه‌دانه در مهار فرایند فیبریل‌زایی با روش طیف‌سنجی کنگورد در محدوده

طول موج بین ۴۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. در این محدوده از طول موج، در صورت تشکیل ساختارهای آمیلوئیدی میزان جذب می‌تواند تا بیش از ۵۰۰ نانومتر افزایش پیدا کند. تغییر فرم فضایی آلبومین سرم گاوی به‌صورت رشته‌های آمیلوئیدی موجب می‌شود تا رنگ کنگورد این امکان را پیدا کند تا لابلای ساختارهای بتای متقاطع موجود در آمیلوئیدها قرار گیرد. این امر موجب افزایش میزان طول موج ماکزیمم نمونه پروتئینی در حضور کنگورد می‌گردد. در شکل ۲ طیف حاصل از پروتئین آلبومین طبیعی (نمونه کنترل) با نمونه‌های آمیلوئیدی که در حضور عصاره گیاهی تهیه شده‌اند، به‌صورت مقایسه‌ای آمده است. همان‌طور که در شکل دیده می‌شود، با افزایش غلظت عصاره (در غلظت‌های ۱۲، ۱۶ و ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) از میزان طول‌موج ماکزیمم کاسته شده است و این نشان می‌دهد که عصاره سیاه‌دانه موجب کاهش تولید رشته‌های آمیلوئیدی و به‌عبارتی مهار رشته‌های آمیلوئیدی که عاملی برای بیماری آلزایمر هستند، شده است.

برپایه مطالعات Tamadonfard *et al*. (2014)، تجویز عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه به‌دلیل داشتن اولئیک و لینولئیک اسید و ترکیبات آنتی اکسیدانی باعث افزایش حافظه و یادگیری می‌شود (Tamadonfard *et al*., 2014).

مطالعه Tiwari *et al*. (2019) نیز نشان داد که سیاه‌دانه علاوه بر اثرات ضد تشنجی، می‌تواند نقش محافظ عصبی نیز داشته و از ایجاد اختلال حافظه جلوگیری کند. نتایج این پژوهش نشان داد که عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه دارای اثرات ضدمیکروبی قوی‌تری نسبت به عصاره آبی آن است. همچنین آنالیز ترکیبات لیپیدی عصاره نشان داد که لینولئیک اسید، اولئیک و پالمیتیک اسید عمده‌ترین اسیدهای چرب موجود در عصاره سیاه‌دانه هستند (Tiwari *et al*., 2019). کاهش تولید رشته‌های آمیلوئیدی با افزایش غلظت عصاره سیاه‌دانه نیز می‌تواند نشان دهنده اثرات ضد آلزایمری این گیاه باشد. بنابراین، لازم است مطالعات بیشتری در شرایط *In vitro* صورت گیرد تا غلظت مؤثر این عصاره بر جدایه‌های بالینی و اثرات جانبی آن‌ها (در صورت وجود) مورد ارزیابی قرار گیرد، تا در نهایت بتوان پس از مراحل تکمیلی این گیاه را به‌عنوان یک داروی جدید ضد میکروبی و ضدآلزایمری با هزینه و عوارض جانبی کمتر نسبت به ترکیبات دارویی صنعتی معرفی کرد.

سپاسگزاری

از آزمایشگاه تحقیقاتی میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت بابت همکاری در اجرای این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

Al-Naqeep, G.; Al-Zubairi, A.S.; Ismail, M.; Amom, Z.H., & Esa, N.M. (2011). Antiatherogenic potential of *Nigella sativa* seeds and oil in diet-induced hypercholesterolemia in rabbits. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2011.

AL Juhaimi, F.; Matthaeus, B.; Ghafoor, K.; ElBabiker, E.F., & Ozcan, M. (2016). Fatty acids, tocopherols, minerals contents of *Nigella sativa* and Trigonella foenum-graecum seed and seed oils. Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse; 93(3): 165-171.

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.

Asliranifam, N.; Najafzadeh, H.; Papahn, A.A.; Moazedi, A.A., & Pourmahdi, M. (2011). Effect of sesame oil consumption on the passive avoidance memory of rat offspring during pregnancy. Physiology and Pharmacology; 15(2): 268-276.

Benkaci-Ali, F.; Baaliouamer, A.; Wathelet, J.P., & Marlier, M. (2010). Chemical composition of volatile oils from Algerian *Nigella sativa* L. seeds. Journal of Essential Oil Research; 22(4): 318-322.

Boubertakh, B.; Liu, X.G.; Cheng, X.L., & Li, P. (2013). A spotlight on chemical constituents and pharmacological activities of Nigella glandulifera Freyn et Sint seeds. Journal of Chemistry 2013.

Cacace, R.; Sleegers, K., & Van Broeckhoven, C. (2016). Molecular genetics of early-onset Alzheimer's disease revisited. Alzheimer's & Dementia; 12(6): 733-748.

Chiti, F., & Dobson, C.M. (2009). Amyloid formation by globular proteins under native conditions. Nature chemical biology; 5(1): 15-22.

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

Dadgar, T.; Asmar, M.; Saifi, A.; Mazandarani, M.; Bayat, H.; Moradi, A. *et al*. (2006). Antibacterial activity of certain Iranian medicinal plants against methicillin-resistant and sensitive Staphylococcus aureus. Asian J Plant Sci; 5(5): 861-866.

Dinagaran, S.; Sridhar, S., & Eganathan, P. (2016). Chemical composition and antioxidant activities of black seed oil (*Nigella sativa* L.). International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research; 7(11): 4473.

Finegold, S.M., & Martin, W.J. (1982). Diagnostic microbiology. Diagnostic microbiology, CV Mosby.

Halawani, E. (2009). Antibacterial activity of thymoquinone and thymohydroquinone of *Nigella sativa* L. and their interaction with some antibiotics. Advances in Biological Research; 3(5-6): 148-152.

Hannan, A.; Saleem, S.; Chaudhary, S.; Barkaat, M., & Arshad, M.U. (2008). Anti bacterial activity of *Nigella sativa* against clinical isolates of methicillin resistant Staphylococcus aureus. J Ayub Med Coll Abbottabad; 20(3): 72-74.

Hasan, N.A.; Nawahwi, M.Z., & Ab Malek, H. (2013). Antimicrobial activity of *Nigella sativa* seed extract. Sains Malaysiana; 42(2): 143-147.

Holm, N.K.; Jespersen, S.K.; Thomassen, L.V.; Wolff, T.Y.; Sehgal, P.; Thomsen, L.A. *et al.* (2007). Aggregation and fibrillation of bovine serum albumin. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics; 1774(9): 1128-1138.

Islam, M.; Guha, B.; Hosen, S.; Riaz, T., & Shahadat, S. (2017). Nigellalogy: A Review on *Nigella sativa*. MOJ Bioequiv Availab; 3(6): 00056.

Mashhadian, N., & Rakhshandeh, H. (2005). Antibacterial and antifungal effects of *Nigella sativa* extracts against S. aureus, P. aeroginosa and C. albicans. Pak J Med Sci; 21(1): 47-52.

Mason, J.M.; Kokkoni, N.; Stott, K., & Doig, A.J. (2003). Design strategies for anti-amyloid agents. Current opinion in structural biology; 13(4): 526-532.

Mohamadin, A.M.; Sheikh, B.; El-Aal, A.A.A.; Elberry, A.A., & Al-Abbasi, F.A. (2010). Protective effects of *Nigella sativa* oil on propoxur-induced toxicity and oxidative stress in rat brain regions. Pesticide biochemistry and physiology; 98(1): 128-134.

Mousavi, S.; Tayarani-Najaran, Z.; Asghari, M., & Sadeghnia, H. (2010). Protective effect of *Nigella sativa* extract and thymoquinone on serum/glucose deprivation-induced PC12 cells death. Cellular and molecular neurobiology; 30(4): 591-598.

Mouwakeh, A.; Radácsi, P.; Pluhár, Z.; Németh Zámboriné, É.; Muránszky, G.; Mohácsi-Farkas, C. *et al.* (2018). Chemical composition and antimicrobial activity of *Nigella sativa* crude and essential oil. Acta Alimentaria; 47(3): 379-386.

Mroczko, B.; Groblewska, M.; Litman-Zawadzka, A.; Kornhuber, J., & Lewczuk, P. (2018). Amyloid β oligomers (AβOs) in Alzheimer's disease. Journal of Neural Transmission; 125(2): 177-191.

Murphy, R.M. (2002). Peptide aggregation in neurodegenerative disease. Annual review of biomedical engineering; 4(1): 155-174.

Musardo, S.; Saraceno, C.; Pelucchi, S., & Marcello, E. (2013). Trafficking in neurons: Searching for new targets for Alzheimer's disease future therapies. European Journal of Pharmacology; 719(1-3): 84-106.

Parekh, J.; Karathia, N., & Chanda, S. (2006). Evaluation of antibacterial activity and phytochemical analysis of Bauhinia variegata L. bark. African Journal of Biomedical Research; 9(1).

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.

Sharma, D.; Kosankar, K.V., & Lanjewar, L.M. (2017). extraction and chemical tests on nigella sativa l. collected from vidarbha region of india.

Tamadonfard, Z.; Sepehrara, L., & Johari, H. (2014). The effect of nigella sativa extract on learning and spatial memory of adult male rats. Journal of Jahrom University of Medical Sciences;12(1):30.

Tiwari, P.; Jena, S.; Satpathy, S., & Sahu, P.K. (2019). *Nigella sativa*: Phytochemistry, Pharmacology and its Therapeutic Potential. Research Journal of Pharmacy and Technology; 12(7): 3111-3116.

Usman, M.; Kabiru, M.; Manga, S.; Opaluwa, S.; Nataala, S.; Garba, M. *et al.* (2017). Evaluation of antibacterial activity and phytochemical screening of the crude extract of nigella sativa seeds on the bacterial isolates of wound.

Vetrivel, K.S., & Thinakaran, G. (2010). Membrane rafts in Alzheimer's disease beta-amyloid production. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids; 1801(8):860-867.

Yaman, İ., & Balikci, E. (2010). Protective effects of *Nigella sativa* against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. Experimental and Toxicologic Pathology; 62(2): 183-190.