

بررسی اثر محافظتی پلی فنول رزوراترول بر روی انسجام غشاء میتوکندری در برابر حدواسط‌های الیگومری پروتئین لیزوزیم سفیده تخم مرغ

- شقایق روغنیان قزوینی: مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک ایران، دانشگاه تهران، صندوق پستی: ۱۳۱۴۵-۱۳۸۴
- علی اکبر مراتان: گروه اصلاح و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان
- شهین احمدیان*: مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک ایران، دانشگاه تهران، صندوق پستی: ۱۳۱۴۵-۱۳۸۴
- مهشید شفیع زاده: مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک ایران، دانشگاه تهران، صندوق پستی: ۱۳۱۴۵-۱۳۸۴
- عطیه قاسمی: مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک ایران، دانشگاه تهران، صندوق پستی: ۱۳۱۴۵-۱۳۸۴

تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۹۳ تاریخ پذیرش: تیر ۱۳۹۳

چکیده

نتایج حاصل از مطالعات انجام شده در سال‌های اخیر نشان می‌دهد که گونه‌های الیگومری، به‌عنوان حدواسط‌های سمی در روند تشکیل تجمعات آمیلوئیدی، از طریق افزایش نفوذپذیری غشاهای بیولوژیک منجر به مرگ سلولی می‌شوند. در این بین غشاء میتوکندری از اهمیت به‌سزائی برخوردار است به‌گونه‌ای که اختلال در عملکرد میتوکندری ویژگی بارز بسیاری از بیماری‌های مرتبط با تجمع پروتئین‌هاست. در نتیجه به‌منظور بررسی اینترکشن تجمعات آمیلوئیدی با غشاء میتوکندری در این مطالعه میانکنش نمونه‌های مونومری، حدواسط‌های الیگومری و فیبریل‌های آمیلوئیدی پروتئین لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ با غشاء میتوکندری (به‌عنوان یک مدل بیولوژیک *in vitro*)، تهیه شده از مغز موش مورد بررسی قرار گرفت. در ابتدا ویژگی‌های ساختاری حدواسط‌های پیش فیبریلی با استفاده از تکنیک‌های مختلف مانند فلورسانس (ThT و ANS) و دورنگ نمائی دورانی مورد بررسی قرار گرفت و در ادامه افزایش نفوذپذیری غشاء میتوکندری در حضور گونه‌های مختلف تجمعات پروتئینی و از طریق سنجش میزان رها شدن آنزیم‌های شاخص میتوکندری بررسی شد. نتایج حاصل نشان‌دهنده رها شدن آنزیم‌های میتوکندریائی به‌دنبال انکوباسیون با حدواسط‌های الیگومری می‌باشد، حال آن‌که مونومرها و فیبریل‌های آمیلوئیدی اثری نداشتند. به‌نظر می‌رسد که هیدروفوبیسیته سطحی بالای حدواسط‌های الیگومری توانائی آن‌ها را برای میان‌کنش با غشاء میتوکندری، افزایش می‌دهد. در ادامه توانائی پلی‌فنول رزوراترول برای مهار تخریب و نفوذپذیری غشاء میتوکندری توسط حدواسط‌های الیگومری، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد رزوراترول به‌طور موثری افزایش نفوذپذیری غشاء میتوکندری توسط حدواسط‌های الیگومری را مهار می‌کند. پیشنهاد می‌شود که رزوراترول به‌واسطه اثرات پایدارکنندگی خود بر روی غشاء میتوکندری آن‌را در برابر سمیت حدواسط‌های الیگومری محافظت می‌کند. نتایج حاصل می‌تواند در طراحی ترکیبات دارویی موثر در درمان بیماری‌های مرتبط با تجمع پروتئینی مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ، میتوکندری، رزوراترول، نفوذپذیری غشاء، الیگومر، پلی‌فنول



مقدمه

تجمعات پروتئینی و بیماری‌های ناشی از آن، یکی از موضوعات جالب و تازه در عرصه پزشکی ملکولی می‌باشد. به نظر می‌رسد که مطالعه این تجمعات نه تنها می‌تواند رهگشای شناخت اساس ملکولی و بیوشیمیایی بیماری‌های مرتبط با آن باشد، بلکه می‌تواند به‌عنوان ابزاری موثر در جهت شناخت راهکارهای درمان این بیماری‌ها نیز مورد استفاده قرار گیرد (Stefani, 2004). این بیماری‌ها که تحت عنوان بیماری‌های تحلیل برنده سیستم عصبی نامیده می‌شوند شامل طیف وسیعی از بیماری‌ها می‌باشند که عمده‌ترین آن‌ها عبارتند از: بیماری آلزایمر، پارکینسون، هانتینگتون، بیماری ALS و بیماری پرایون (Dobson, 2001). مشخصه بازر تمامی این بیماری‌ها وجود تجمعات پروتئینی به شکل ساختارهای رشته‌ای منظم تحت عنوان آمیلوئید و یا به‌صورت پلاک‌های آمیلوئیدی در داخل و یا خارج سلول‌ها می‌باشد که در نواحی مختلف سیستم عصبی نمایان می‌شوند و از آن‌ها به‌عنوان مارکرهای تشخیص در بیماری استفاده می‌شود (Poirier و Ross, 2003). گرچه تجمعات پروتئینی با رنج وسیعی از بیماری‌های نروپاتیک و غیرنروپاتیک در ارتباط هستند، ولی توانایی ایجاد تجمع تحت شرایط خاص به‌عنوان یک ویژگی ذاتی همه پروتئین‌ها معرفی شده و منحصر به انواع بیماری‌زای آن نمی‌باشد (Stefani, 2004). امروزه مشخص شده که تمامی پروتئین‌ها (اعم از بیماری‌زا و غیربیماری‌زا) تحت تاثیر عوامل محیطی و یا موتاسیون، ساختار طبیعی خود را از دست داده و طی مسیری پیچیده و گذرا از حدواسط‌هایی ناپایدار تحت عنوان لیگومر یا پرتوفیبریل عبور کرده و در نهایت ساختارهای رشته‌ای تحت عنوان فیبریل‌های آمیلوئیدی را به‌وجود می‌آورند (Uversky و همکاران, 2001). با این که در سال ۱۹۹۸ گونه‌های لیگومری به‌عنوان عامل اصلی ایجاد سمیت در سلول معرفی شدند و تجمعات فیبریلی به‌عنوان گونه‌های بی‌خطر و حتی به‌عنوان یک مکانیسم دفاعی برای سلول پیشنهاد گردید (Reixach و همکاران, 2004؛ Lambert و همکاران, ۱۹۹۸؛ Franke و همکاران, ۱۹۸۲)، ولی امروزه شواهد زیادی دال بر سمیت فیبریل‌ها نیز به‌دست آمده است (Gharibyan و همکاران, 2007؛ Novitskaya و همکاران, 2006). به‌علت وجود ساختارهای فضائی شبیه به هم در گونه‌های لیگومری مربوط به پروتئین‌های مختلف، به‌نظر می‌رسد که مکانیسم‌های القای سمیت برای این گونه‌ها (حداقل در مکانیسم‌های اولیه) نیز یکسان باشد (Kayed و

همکاران, 2003). با توجه به پراکنش پروتئین‌های مختلف بیماری‌زا در داخل و خارج سلول‌ها غشاهای سلولی، و من جمله غشاء اندامک‌های درون سلولی، که از هردو سطح خارج و داخل سلولی قابل دسترسی می‌باشد، می‌تواند به‌عنوان هدف مشترک برای القاء سمیت گونه‌های لیگومری تلقی گردد (Demuro و همکاران, 2005). از جمله غشاهای درون سلولی که می‌تواند به‌عنوان جایگاهی برای القاء سمیت لیگومرها قرار بگیرد، غشای میتوکندری می‌باشد (Narayanan, 2000). میتوکندری یکی از اندامک‌های درون سلولی مهم می‌باشد که در تنظیم بسیاری از فرآیندهای حیاتی سلول از قبیل تنفس سلولی و آپوپتوز نقش دارد. عدم عملکرد صحیح میتوکندریایی و ارتباط آن با بیماری‌های تحلیل برنده سیستم عصبی در چندین مطالعه به اثبات رسیده است. به‌عنوان مثال در بیماری‌های آلزایمر و پارکینسون، اختلال در عملکرد میتوکندری، سیستم عصبی مرکزی را که نیازمند دریافت انرژی میتوکندریایی به‌میزان بالایی می‌باشد تحت تاثیر قرار می‌دهد (Hashimoto و همکاران, 2003). لذا اهمیت عملکرد صحیح میتوکندریایی به‌عنوان یکی از فاکتورهای اصلی در این بیماری‌ها مطرح می‌باشد. هم‌چنین تجمعات پپتیدهای بتا آمیلوئید و آلفا سینوکلئین در ساختارهای درون غشایی میتوکندری مشاهده شده است (Pavlov و همکاران, 2011؛ Lin و Beal, 2006). در تعدادی از مطالعات انجام شده تاثیر گونه‌های لیگومری لیزوزیم به‌خصوص لیزوزیم سفیده تخم مرغ (Hen Egg White Lysozyme) بر روی انسجام و پایداری غشاء میتوکندریایی مورد بررسی قرار گرفته است (Abbasabadi و همکاران, 2013؛ Meratan و همکاران, 2011). لیزوزیم سفیده تخم مرغ، پروتئینی است با خصوصیات شناخته شده که به‌علت ارزان بودن و سهولت دسترسی به آن در بسیاری از مطالعات، به‌عنوان یک مدل پروتئینی که قادر به تشکیل تجمعات آمیلوئیدی می‌باشد، مورد استفاده قرار می‌گیرد (Radford و همکاران, ۱۹۹۲). با علم به این مطلب که غشاهای سلولی هدف اولیه القاء سمیت حدواسط‌های لیگومری هستند، بنابراین ترکیباتی که بتوانند با مداخله بر روی این حدواسط‌های سمی مانع اتصال و اینترکشن آن‌ها با غشاءهای سلولی گردند می‌توانند به‌عنوان یک مکانیسم محافظتی در جهت کاهش سمیت این گونه‌ها عمل نمایند. در بین ترکیبات مختلف مورد مطالعه، پلی فنول‌های طبیعی موجود در گیاهان از اهمیت به‌سزائی برخوردار هستند که به‌مقدار زیادی در رژیم غذایی انسان یافت می‌شوند و ارتباط مستقیمی در استفاده از این ترکیبات و بهبود بیماری‌های تحلیل برنده سیستم



مواد و روش‌ها

مواد مورد نیاز: پروتئین لیزوزیم سفیده تخم مرغ (HEWL)، تیوفلاوین T (ThT)، استیل کوانزیم A، NADH و ADP، از شرکت سیگما و ۱-سولفوناتو-۸-آیلیینو نفتالن (ANS) از شرکت Fluka خریداری شد. سایر مواد از شرکت مرک آلمان خریداری شدند.

القاء تشکیل تجمعات آمیلوئیدی در پروتئین لیزوزیم:

سفیده تخم مرغ: پودر لیزوزیم سفیده تخم مرغ در غلظت نهایی ۱ میلی مولار در محلول آبی حاوی HCl و pH حدود ۱/۶ حل شد و به عنوان نمونه مونومری مورد استفاده قرار گرفت. به منظور القاء تشکیل حدواسط های الیگومری، محلول های پروتئینی به مدت ۲ روز در دمای ثابت ۵۷ درجه سانتی گراد و بدون هم زدن انکوبه شدند. از آن جایی که نمونه های ۲ روزه فاقد هرگونه تجمعات آمیلوئیدی بودند در نتیجه غلظت الیگومرها برابر با غلظت مونومرها در نظر گرفته شد (Goldberg و همکاران، ۱۹۹۱). به منظور تشکیل فیبریل های آمیلوئیدی، نمونه های پروتئینی به مدت ۷ روز و در دمای ثابت ۵۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. از آن جایی که نمونه های فیبریلی حاوی مقداری نمونه مونومری والیگومری نیز می باشند، در نتیجه به منظور حذف این حدواسط ها، محلول پروتئینی حاوی فیبریل های آمیلوئیدی به مدت ۴۰ دقیقه در دور ۲۱۰۰۰ g سانتی فیوژ گردید. محلول روئی حاصل برداشته شده و غلظت پروتئین آن با استفاده از ضریب خاموشی $2/63 \text{ mg.ml}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ تعیین گردیده و از غلظت اولیه محلول پروتئینی کم شد. بدین ترتیب غلظت رسوب حاصل، که حاوی فیبریل های آمیلوئیدی می باشد، تعیین گردید.

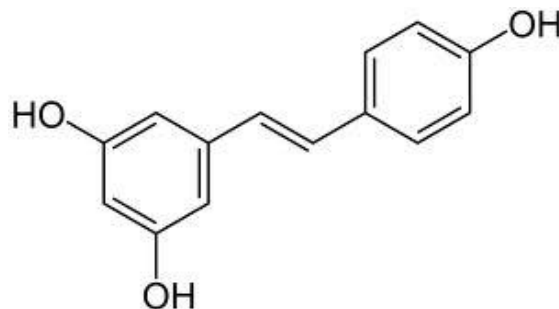
سنجش برانگیختگی فلورسانس تیوفلاوین T (ThT):

کینتیک رشد تجمعات آمیلوئیدی بر اساس افزایش نشر فلورسانس ThT و توسط دستگاه اسپکتروفتومتر Cary Eclipse VARIAN اندازه گیری شد. بدین منظور مقدار ۹۹۰ میکرو لیتر محلول ThT با غلظت ۱۰ میکرو مولار با ۱۰ میکرو لیتر از نمونه های پروتئینی (غلظت نهائی ۲۰ میکرو مولار) مخلوط گردید و به مدت ۵ دقیقه انکوبه شد. سپس نشر فلورسانس نمونه پروتئینی در طول موج ۴۸۵ نانومتر قرائت گردید. طول موج تحریک ۴۴۰ نانومتر و طیف نشری در محدوده ۶۰۰-۴۵۰ نانومتر اندازه گیری شد. این کار با فواصل ۲۴ ساعت و به مدت ۷ روز انجام شد.

سنجش برانگیختگی فلورسانس ANS: به منظور بررسی

کینتیک تغییرات هیدروفوبیسیته حدواسط های پروتئینی در طی فرایند آمیلوئید شدن، مقدار ۹۷۵ میکرو لیتر محلول آبی

عصبی مشاهده شده است (Rossi و همکاران، ۲۰۰۸؛ Hendrich، ۲۰۰۶). به عنوان مثال ترکیبات پلی فنولی موجود در عصاره چای سیاه به عنوان عامل مهارکننده در برابر ناپایداری کردن غشاء سلولی توسط تجمعات آمیلوئید بتا و آلفا سینوکلئین پیشنهاد شده است (Camilleri و همکاران، ۲۰۱۳). رزوراترول پلی فنول انتخابی در انجام این مطالعه می باشد که به طور غالب در پوست انگور قرمز یافت می شود (Frémont، ۲۰۰۰). همانند بسیاری از ترکیبات پلی فنولی دیگر رزوراترول، دارای خواص آنتی اکسیدانی می باشد که این نقش را از طریق اهدای اتم هیدروژن/الکترون از گروه های هیدروکسیل خود، ایفا می کند (Fang و همکاران، ۲۰۰۲؛ Fauconneau و همکاران، ۱۹۹۷). خواص دیگر محافظتی از قبیل خواص ضد التهابی و محافظت از قلب نیز برای آن گزارش شده است ولی ویژگی محافظت نرونی آن در سال های اخیر توجه بسیاری از دانشمندان را به خود جلب کرده است (Gupta و همکاران، ۲۰۱۴). رزوراترول با داشتن رسپتور بر روی غشا پلاسمایی و داشتن ویژگی لیپوفیلیتی تمایل به اینترکشن با غشاهای زیستی را نشان می دهد (Han و همکاران، ۲۰۰۶). همچنین نشان داده شده که از طریق پروتئین mitoNEET، رزوراترول ۳ سولفات که یکی از مشتقات رزوراترول می باشد قادر است به غشای خارجی میتوکندری متصل شود (Arif و همکاران، ۲۰۱۱). تحقیقات نشان داده است که رزوراترول به واسطه مکانیسم های مختلفی اثرات محافظتی خود بر روی غشای میتوکندری را اعمال می کند. یکی از این مکانیسم های حفاظتی، اینترکشن رزوراترول با غشاهای زیستی و پایدارسازی آن در شرایط ایسکمی و دوباره اکسیژن رسانی به بافت می باشد (Zinia و همکاران، ۲۰۰۲). با توجه به مطالب ذکر شده در بالا، در این مطالعه اثرات مخرب گونه های الیگومری پروتئین لیزوزیم سفیده تخم مرغ بر روی پایداری و انسجام غشاء میتوکندری بررسی شده و برای اولین بار اثرات محافظتی پلی فنل طبیعی رزوراترول (شکل ۱) بر روی غشای میتوکندری مورد مطالعه قرار گرفت.



شکل ۱: ساختار شیمیائی رزوراترول



انتهایی آسیبی وارد شود. در نهایت ۱ میلی لیتر محلول سرم آلومین فاقد اسید چرب آزاد (در غلظت نهایی ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر) به هر تیوب اضافه شد و مخلوط به آرامی هم زده شد و پس از افزودن ۴/۵ میلی لیتر بافر استخراج به هر کدام از تیوب ها، به مدت ۱۰ دقیقه نمونه ها در دور ۶۹۰۰ سانتریفیوژ شدند. رسوب میتوکندریایی جمع آوری شده انتهایی در غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر در نیتروژن مایع نگهداری گردید (Kristian, ۲۰۱۰). انسجام غشاء میتوکندریایی به وسیله سنجش میزان فعالیت آنزیم های شاخص میتوکندری شامل ملات دهیدروژناز، گلوتامات دهیدروژناز، سیترات سنتاز و آدنیلات کیناز مورد تأیید قرار گرفت (Golestani و همکاران، ۲۰۰۷). غلظت پروتئین با روش Lowry اندازه گیری شد (Lowry و همکاران، ۱۹۵۱).

آنالیز تاثیر حدواسط های الیگومری لیزوزیم بر روی

نفوذپذیری غشاء میتوکندریایی: مقدار ۲۰۰ میکرو لیتر از هموزن های میتوکندریایی (با غلظت یک میلی گرم بر میلی لیتر) با نمونه مونومری، حدواسط های الیگومری و فیبریل های آمیلوئیدی پروتئین لیزوزیم در غلظت نهایی ۲۵ میکرومولار (و یا محلولی آبی HCl با pH برابر ۱/۶ به عنوان شاهد) مخلوط شده و بلافاصله ورتکس گردید. سپس نمونه ها به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم و دمای ۳۰ درجه سانتی گراد انکوبه شده و در نهایت به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۲۱۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. به منظور بررسی اثرات مخرب احتمالی نمونه های مختلف پروتئینی بر ساختار و نفوذپذیری غشاء میتوکندری، محلول روئی حاصل جمع آوری شده و آزاد شدن آنزیم های میتوکندریایی اندازه گیری شد. آنزیم های مورد بررسی شامل آدنیلات کیناز (AK)، آنزیم شاخص فضای بین دو غشاء میتوکندری و آنزیم ملات دهیدروژناز (MDH) آنزیم موجود در ماتریکس میتوکندری می باشند. هم چنین تریتون ۱۰۰-X، در غلظت نهایی ۰/۵٪، به عنوان شاهد مثبت برای بیشینه آزاد شدن آنزیم های میتوکندریایی مورد استفاده قرار گرفت. نتایج حاصل به صورت درصدی از بیشینه فعالیت آنزیمی اندازه گیری شده در محلول روئی، آزاد شده توسط تریتون ۱۰۰-X، و با استفاده از معادله زیر محاسبه گردید:

(فعالیت آنزیمی نمونه شاهد-فعالیت آنزیمی سنجش شده)

(فعالیت آنزیمی نمونه شاهد-فعالیت آنزیمی ماکزیمم)

در مورد آنزیم AK، از آن جایی که تریتون ۱۰۰-X با فعالیت آنزیم لوسیفراز تداخل می کند، میزان فعالیت این آنزیم نسبت

حاوی HCl (pH ۱/۶) با ۲۰ میکرو لیتر محلول تهیه شده ANS با غلظت ۵ میلی مولار مخلوط شده و سپس مقدار ۵ میکرو لیتر محلول پروتئینی (با غلظت ۱ میلی مولار) به آن اضافه گردید و میزان نشر فلورسانس ANS در طول موج تحریک ۳۵۰ نانومتر و نشر ۴۰۰-۶۰۰ اندازه گیری شد. در این روش غلظت نهایی لیزوزیم ۵ میکرومولار و غلظت نهایی ANS ۱۰۰ میکرومولار می باشد. این کار با فواصل ۲۴ ساعت و به مدت ۷ روز انجام شد.

بررسی تغییرات ساختاری حدواسط های آمیلوئیدی

با استفاده از دورنگ نمائی دورانی: برای اندازه گیری طیف دورنگ نمایی دورانی در محدوده فرابنفش دور از غلظت ۰/۲ میلی گرم بر میلی لیتر لیزوزیم و کووت با ضخامت ۰/۵ سانتی متر استفاده شد. بدین منظور نمونه های پروتئینی در زمان های مختلف انکوباسیون (زمان های ۰، ۲ و ۷ روز) برداشته شده و تغییرات ساختار دوم پروتئین مورد بررسی قرار گرفت. طیف های دورنگ نمایی دورانی حدواسط های مختلف پروتئین لیزوزیم با استفاده از دستگاه اسپکتروپلاریمتر AVIV 215 به دست آمدند.

تخلیص و آماده سازی میتوکندری مغز موش: جداسازی

مغز از موش های صحرایی نر (وزن تقریبی ۲۰۰-۱۵۰ گرم) بر طبق پروتکل Sims صورت گرفت (Sims و Anderson، ۲۰۰۸). مغز های جدا شده سپس به بافر استخراج میتوکندری (۱۰ میلی مولار Tris-HCl، ۱ میلی مولار EDTA و ۰/۳۲ مولار سوکروز، pH برابر ۷/۴) که از قبل در یخچال قرار داده شده بود، انتقال داده شدند. در مرحله بعد هر گرم از بافت مغز با ۱۰ میلی لیتر بافر جداسازی مخلوط و توسط پوتر تفلون- شیشه به صورت هموزن درآمد. هموزن میتوکندریایی حاصل در دور ۳۰۰۰ به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ گردید و رسوب حاصل دور ریخته شد. سپس محلول روئی به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۲۱۰۰۰g سانتریفیوژ شد و سپس ۳/۵ میلی لیتر محلول Percoll ۱۵٪ به ازای هر مغز به رسوب باقیمانده اضافه گردید و به مدت ۸ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد و دور ۳۰۷۰۰ سانتریفیوژ گردید (با استفاده از افزایش سرعت آرام از ۵۰ تا ۱۵۰۰ rpm و به دنبال آن سرعت نرمال و سپس کاهش سرعت آرام از ۱۵۰۰ تا ۰). در این مرحله محلول روئی که به طور غالب حاوی میلیون می باشد دور ریخته شد. در مرحله بعد ۸ میلی لیتر بافر استخراج به ازای هر مغز به میتوکندری های جمع آوری شده اضافه و پس از همگن کردن مجدد به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد و در دور ۱۶۷۰۰ سانتریفیوژ گردید و محلول روئی با دقت جدا گردیده بدون این که به رسوب شل

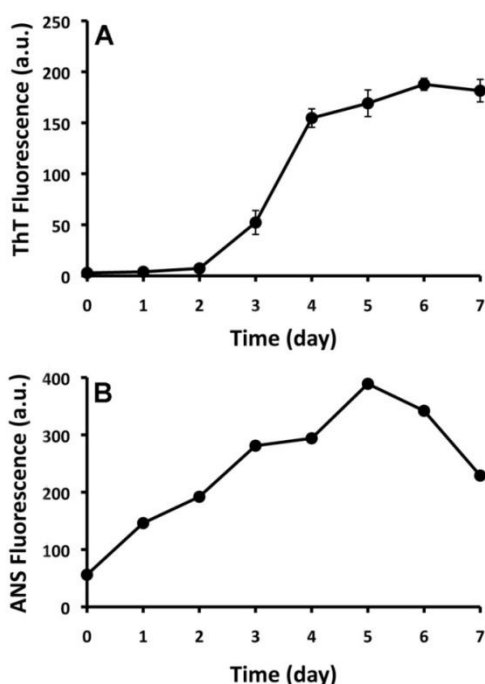


نمونه‌های پروتئینی مختلف انجام شد. هم‌چنین هر سنجش آنزیمی حداقل دو یا سه بار تکرار گردید. نتایج نهایی حاصل به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شده است و میزان معنی‌دار بودن نتایج حاصل توسط t-test مورد بررسی قرار گرفته است. $p < 0.05$ و $p < 0.01$ معنی‌دار بودن تغییرات مشاهده شده در نمونه‌های میتوکندریایی تیمار شده در مقایسه با نمونه‌های شاهد را نشان می‌دهد.

نتایج

بررسی ویژگی‌های ساختاری حدواسط‌های الیگومری:

برای القاء تشکیل تجمعات آمیلوئیدی، پروتئین لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ طبق روش ذکر شده در قسمت روش‌ها در غلظت ۱ میلی‌مولار و دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس به منظور تعیین کینتیک شکل‌گیری حدواسط‌ها و تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی، نشر فلورسانس ThT نمونه‌های پروتئینی انکوبه شده در روزهای مختلف خوانده شد (شکل ۲).



شکل ۲: فرایند آمیلوئید شدن پروتئین لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ (A) کینتیک تشکیل تجمعات آمیلوئیدی که با نشر فلورسانس ThT در طول موج ۴۸۵ نانومتر همراه است. (B) تغییرات نشر فلورسانس ANS در طی روند تشکیل تجمعات آمیلوئیدی.

به شاهد محاسبه گردید (Meratan و همکاران، ۲۰۱۱).

سنجش میزان فعالیت آنزیم‌های میتوکندریایی:

سنجش فعالیت آنزیم AK به روش اسپکتروفلوریمتری و با توجه به روش Wu و همکاران (۲۰۰۱) و با اعمال تغییرات اندکی انجام شد. بدین منظور، مقدار ۲۰ میکرولیتر از محلول روئی میتوکندری به ۲۷ میکرولیتر از مخلوط واکنش (۵۰ میلی‌مولار بافر Tris-HCl و ۲۰ میلی‌مولار $MgCl_2$, pH برابر ۷/۴) اضافه شده و سپس مقدار ۲۰ میکرولیتر از محلول ۰/۵ میلی‌مولار ADP به آن اضافه شد. محلول حاصل به مدت ۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه شده و سپس ۳ میکرولیتر محلول ۲۰ میلی‌مولار D-لوسیفیرین (که حاوی ۴۰ میلی‌مولار $MgSO_4$ می‌باشد) و به دنبال آن ۵ میکرولیتر آنزیم لوسیفراز (با غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بدان اضافه شده و بلافاصله سیگنال لومینسانس حاصل بر حسب Relative Light Unit (RLU) و با استفاده از دستگاه System Berthold Detection Luminometer اندازه‌گیری شد. میزان فعالیت آنزیم MDH به روش اسپکتروفلوریمتری و با توجه به روش Sottocasa و همکاران (۱۹۶۷) انجام شد. محلول سنجش، در حجم نهایی ۰/۵ میلی‌لیتر، حاوی ۵۶ میلی‌مولار Tris-HCl (pH برابر ۷/۵)، ۵/۶ میلی‌مولار اگزالواسات و ۰/۱ میلی‌مولار NADH می‌باشد. واکنش آنزیمی با افزودن ۱۰ میکرولیتر هموژن میتوکندریایی آغاز شده و سرعت کاهش جذب، در نتیجه اکسیداسیون NADH، در ۳۴۰ نانومتر و با استفاده از ضریب خاموشی $6/22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ اندازه‌گیری شد.

آنالیز تاثیر مهاری رزوراتول بر روی نفوذپذیری

غشاء میتوکندریایی توسط حدواسط‌های الیگومری

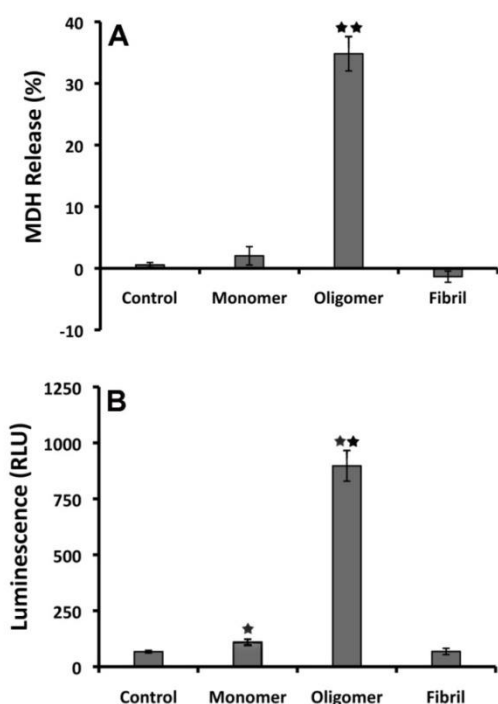
لیزوزیم: این آزمایش به دو روش انجام شد. در روش A، رزوراتول در غلظت‌های مختلف (۰ تا ۵۰ میکرومولار) به مدت ۳۰ دقیقه با هموژن میتوکندریایی (در غلظت نهایی ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و پس از اضافه نمودن نمونه‌های مونومری و یا حدواسط‌های الیگومری در غلظت نهایی ۲۵ میکرومولار، میزان رهاسدن آنزیم‌های AK و MDH مورد سنجش قرار گرفت. در روش B، در ابتدا رزوراتول با نمونه‌های مونومری و یا حدواسط‌های الیگومری در غلظت نهایی ۲۵ میکرومولار به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد و سپس به هموژن میتوکندریایی اضافه شده و میزان رهاسدن آنزیم‌های مورد نظر مورد سنجش قرار گرفت.

آنالیز آماری: کلیه آزمایشات در سه زمان متفاوت و با



تداوم آنکوباسیون در زمان‌های طولانی (تا ۷ روز) با ایجاد پیک جدیدی در ناحیه ۲۱۸ نانومتر همراه است، که بیانگر افزایش ساختارهای صفحات بتا و مشخصه بارز فیبریل‌های آمیلوئیدی است.

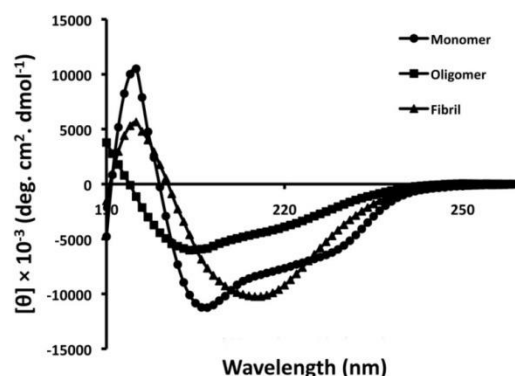
بررسی اثر حدواسط‌های مختلف آمیلوئیدی بر رهاشدن آنزیم‌های میتوکندریایی تهیه شده از مغز موش: مطالعات قبلی نشان داده است که حدواسط‌های الیگومری مربوط به پروتئین‌های مختلف به دلیل داشتن هیدروفوبیسیته بالا تمایل زیادی برای اینترکشن و نفوذ در غشاهای زیستی از خود نشان می‌دهند. با این حال، به منظور اطمینان از صحت این مطلب، میزان رها شدن آنزیم‌های MDH و AK توسط نمونه‌های مونومری، گونه‌های الیگومری ۲ روزه و فیبریل‌های آمیلوئیدی مورد بررسی قرار گرفت. همان‌طور که در شکل ۴ نشان داده شده است، آنکوباسیون میتوکندری‌ها با حدواسط‌های الیگومری



شکل ۴: رها شدن آنزیم‌های میتوکندریایی پس از آنکوباسیون با گونه‌های مونومری، الیگومری و فیبریلی پروتئین لیزوزیم (A): رها شدن آنزیم MDH که میزان رها شدن آنزیم به صورت درصدی از بیشینه رها شدن آنزیم توسط تریپتون X-۱۰۰ بیان شده است. (B): رها شدن آنزیم AK که نسبت به بافر (به عنوان شاهد) بیان شده است. نتایج میانگین سه تکرار مستقل می‌باشد. * $p < 0.05$ و ** $p < 0.01$ ، معنی‌دار بودن تغییرات مشاهده شده را نسبت به شاهد نشان می‌دهد.

موجب رها شدن آنزیم‌های میتوکندریایی گردید در حالی که

همان‌طور که در شکل ۲ مشخص است، روند تغییرات نشر بیشینه فلورسانس ThT در طول موج ۴۸۵ نانومتر نسبت به زمان از مدل سیگموئیدی پیروی می‌کند. از نظر کینتیکی بیشینه حدواسط‌های الیگومری، که توانایی اتصال آن‌ها به ThT اندک و سیگنال فلورسانس ضعیفی دارند، در ابتدای مرحله رشد سریع قرار دارند که در آزمایشات ما برابر ۲ روز است. همچنین مرحله تعادل نهایی موید تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی بالغ است که در این مرحله، شدت فلورسانس تغییرات چشمگیری نداشته و به حالت تعادل می‌رسد (شکل ۲). در ادامه به منظور بررسی تغییرات هیدروفوبیسیته نمونه‌های پروتئینی در طی فرایند آمیلوئید شدن از نشانگر فلورسانس ANS استفاده شد. نتایج حاصل بیانگر افزایش میزان هیدروفوبیسیته سطحی حدواسط‌های پروتئینی تا روز ۵ و بدنبال آن کاهش میزان هیدروفوبیسیته سطحی می‌باشد (شکل ۲). علت این کاهش هیدروفوبیسیته می‌تواند به دلیل رشد گونه‌های پیش فیبریلی و اتصال جانبی رشته‌های آمیلوئیدی حاصل به یکدیگر باشد که این امر باعث پوشیده شدن سطوح هیدروفوب در دسترس و در نتیجه کاهش میزان نشر فلورسانس ANS می‌گردد. در نهایت به منظور بررسی تغییرات ساختار دوم پروتئین در طی روند تشکیل تجمعات آمیلوئیدی از تکنیک دورنگ نمایی دورانی استفاده شد. همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده است آنکوباسیون به مدت ۲ روز همراه با انتقال ساختاری از حالت طبیعی پروتئین (که با پیک‌های موجود در ناحیه ۲۰۸ و ۲۲۵ نانومتر مشخص می‌گردد) به حالت باز شده جزئی می‌باشد که مشخصه حدواسط‌های الیگومری است.

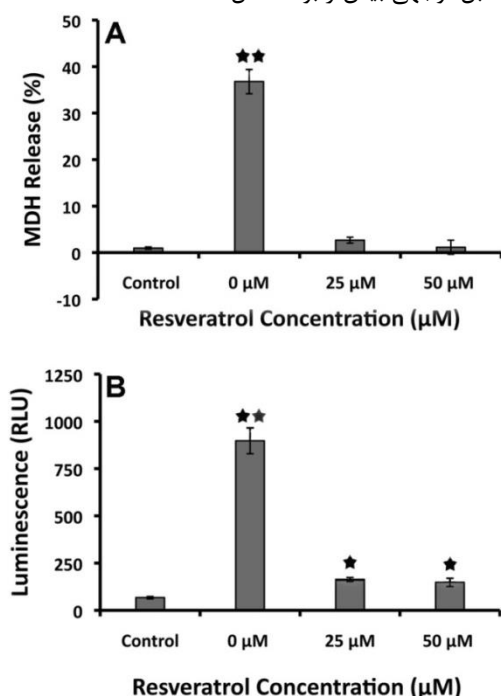


شکل ۳: طیف دورنگ نمایی دورانی لیزوزیم در طی روند تشکیل تجمعات آمیلوئیدی

تغییرات ساختار دوم پروتئین در زمان‌های مختلف ۰ (مونومر)، ۲ روز (الیگومر) و ۷ روز (فیبریل) نشان داده شده است.

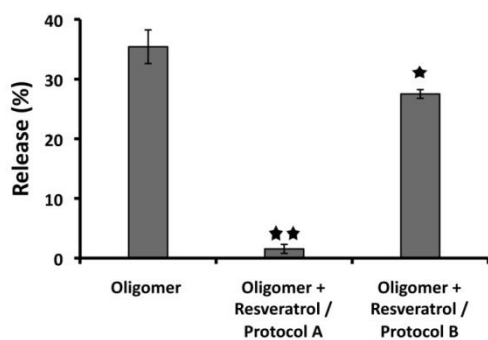


میتوکندریایی (روش B) اگرچه باعث کاهش نسبی در میزان رهاشدن آنزیم MDH گردید، ولی این کاهش در روش A به طور قابل توجهی بیش تر بود (شکل ۷).



شکل ۶: بررسی اثر مهارى رزوراترول بر میزان رهاشدن آنزیم های میتوکندریایی

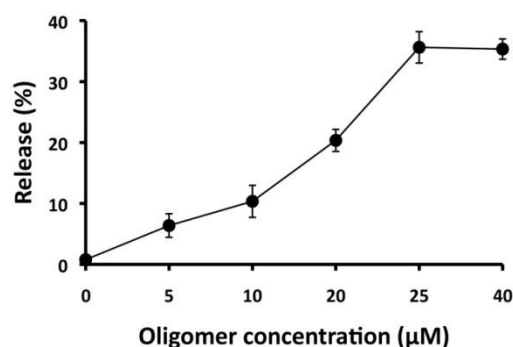
بدین منظور هموزن های میتوکندریایی ابتدا با غلظت های مختلف رزوراترول (۰، ۲۵ و ۵۰ میکرومولار) انکوبه شده و سپس در معرض غلظت ۲۵ میکرومولار حدواسط های الیگومری قرار گرفته و میزان رهاشدن آنزیم های MDH (A) و AK (B) مورد سنجش قرار گرفت. *، * > p/0.05 و *، * > p/0.01 معنی دار بودن تغییرات مشاهده شده را نسبت به شاهد نشان می دهد.



شکل ۷: بررسی اثر مهارى غلظت ۵۰ میکرومولار رزوراترول بر رها شدن آنزیم MDH توسط حدواسط های الیگومری (غلظت ۲۵ میکرومولار) با استفاده از روش های A و B *، * > p/0.05 و *، * > p/0.01 معنی دار بودن تغییرات مشاهده شده را نسبت به شاهد نشان می دهد.

نمونه های مونومری و فیبریل های آمیلوئیدی تأثیری بر رهاشدن آنزیم های مورد بررسی نداشتند.

علاوه بر این، رها شدن آنزیم های میتوکندریایی توسط حدواسط های الیگومری وابسته به غلظت می باشد، به گونه ای که با افزایش غلظت گونه های الیگومری میزان رهاشدن آنزیم MDH نیز افزایش می یابد (شکل ۵). از آنجائی که بیشینه رهاشدن آنزیم MDH در غلظت ۲۵ میکرومولار حدواسط های الیگومری مشاهده شد، این غلظت برای آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفت.



شکل ۵: وابستگی رهاشدن آنزیم MDH به غلظت حدواسط های الیگومری پروتئین لیوزیم

نتایج میانگین سه تکرار مستقل می باشد.

بررسی اثر محافظتی رزوراترول بر رهاشدن آنزیم های

میتوکندریایی توسط حدواسط های الیگومری: مطالعات زیادی نشان می دهد که ترکیبات پلی فنولی قادر به حفاظت غشاء های فسفولیپیدی در برابر سمیت حدواسط های الیگومری مربوط به پروتئین های مختلف می باشند. بنابراین در ادامه این مطالعه اثر غلظت های مختلف رزوراترول بر رها شدن آنزیم های میتوکندریایی توسط حدواسط های الیگومری مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از اثر غلظت های مختلف رزوراترول بر رهاشدن آنزیم های میتوکندریایی در روش A و B در شکل های ۶ و ۷ نشان داده شده است. همان طور که در شکل ۶ مشخص می باشد انکوباسیون هموزن های میتوکندریایی با غلظت های مختلف رزوراترول قبل از اضافه نمودن حدواسط های الیگومری (روش A) به طور قابل توجهی میزان رهاشدن آنزیم های میتوکندریایی را کاهش داد به طوری که در غلظت ۵۰ میکرومولار رزوراترول رهاشدن آنزیم ها تا بیش از ۹۵٪ مهار گردید. بنابراین در روش B غلظت ۵۰ میکرومولار رزوراترول به عنوان غلظت بهینه استفاده شد. انکوباسیون اولیه حدواسط های الیگومری با غلظت ۵۰ میکرومولار رزوراترول قبل از افزودن هموزن



بحث

به طور کلی تخریب و افزایش نفوذپذیری غشاهای بیولوژیک (اعم از غشاء سیتوپلاسمی یا غشاء اندامک‌های درون سلولی) توسط حدواسط‌های الیگومری به عنوان مکانیسم اولیه دخیل در سمیت و مرگ سلولی در بسیاری از بیماری‌های تحلیل برنده سیستم عصبی مطرح می‌باشد. این گونه به نظر می‌رسد که افزایش هیدروفوبیسیته سطحی گونه‌های الیگومری، در نتیجه باز شدن و برهم خوردن ساختارهای حدواسط پروتئینی، آن‌ها را قادر به اینترکشن با غشاهای فسفولیپیدی نموده و بدین ترتیب سبب برهم خوردن انسجام غشاهای بیولوژیک و نهایتاً مرگ سلولی می‌شود (Meratan و همکاران، ۲۰۱۱؛ Wang و همکاران، ۲۰۱۱؛ Bieschke و همکاران، ۲۰۱۰). در این راستا نتایج حاصل از نشر فلورسانس ANS نشان می‌دهد که نمونه‌های روز ۲ دارای سطح بالایی از هیدروفوبیسیته می‌باشند (شکل ۲)، که این ویژگی باعث افزایش تمایل و توان آن‌ها برای اینترکشن و اتصال به غشاهای بیولوژیک (مانند غشاء میتوکندری) می‌گردد. با افزایش زمان انکوباسیون و تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی (متناسب با روز ۷) کاهش چشمگیر در میزان هیدروفوبیسیته سطحی نمونه‌های پروتئینی مشاهده می‌گردد که این امر منجر به کاهش توانایی این ساختارهای فیبریلی برای اینترکشن با غشاء میتوکندریایی می‌شود (شکل ۲). بنابراین، افزایش هیدروفوبیسیته سطحی حدواسط‌های الیگومری که ناشی از تغییر ساختاری از حالت طبیعی پروتئین به حالت جزئی باز شده در طی فرایند آمیلوئید شدن می‌باشد (شکل‌های ۲ و ۳)، توانایی الیگومرها را برای اینترکشن و افزایش نفوذپذیری غشاء میتوکندریایی افزایش داده و در نتیجه منجر به رها شدن آنزیم‌های میتوکندریایی می‌گردد (شکل ۴). حال آن‌که نمونه‌های فیبریلی به دلیل پوشیده شدن سطوح هیدروفوب آن‌ها فاقد توانایی برای اتصال به غشاء‌های میتوکندریایی و تخریب آن‌ها می‌باشند (Khurana و همکاران، ۲۰۰۳؛ Kremer و همکاران، ۲۰۰۰). با توجه به نتایج ذکر شده در بالا و با علم به این مطلب که غشاء‌های بیولوژیک (اعم از غشاء سیتوپلاسمی و یا غشاء اندامک‌های درون سلولی) هدف اولیه و اصلی القاء سمیت حدواسط‌های الیگومری هستند، مطالعات انجام شده در سال‌های اخیر به طور عمده در جهت شناسائی ترکیبات و ملکول‌هایی می‌باشد که به واسطه اتصال به این حدواسط‌های پروتئینی و یا از طریق اینترکشن با غشاء‌های بیولوژیک و پایدارسازی آن‌ها، سمیت حدواسط‌های الیگومری را مهار می‌کنند. بدیهی است که

شناسائی این ترکیبات روشی موثر در درمان بیماری‌های مرتبط با تجمع پروتئینی است. در بین ترکیبات طبیعی مورد مطالعه، پلی فنول‌ها از اهمیت به‌سزایی برخوردارند. پلی فنول‌ها گروهی از ترکیبات آروماتیک هستند که به وفور در گیاهان و رژیم غذایی روزانه وجود دارند (Manach و همکاران، ۲۰۰۴). علاوه بر این، خواص مفید آنتی‌بیوتیکی، ضدالتهابی و ضدسرطانی این ترکیبات از مدت‌ها قبل مورد مطالعه و به اثبات رسیده است (Scalbert و همکاران، ۲۰۰۵). هم‌چنین بسیاری از مطالعات انجام شده در سال‌های اخیر نشان می‌دهد که پلی فنول‌ها ترکیباتی موثر در حفاظت غشاء‌های فسفولیپیدی و من جمله غشاء میتوکندری در برابر تجمع پروتئینی حاصل از پپتیدهای بتا آمیلوئید و آلفا سینوکلئین می‌باشند (Caruana و همکاران، ۲۰۱۲؛ Gauci و همکاران، ۲۰۱۱؛ Arora و همکاران، ۲۰۰۰). نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که رزوراترول به طور موثری روند آزاد شدن آنزیم‌های میتوکندریایی توسط حدواسط‌های الیگومری را مهار می‌کند (شکل ۶ و ۷). به منظور مشخص نمودن مکانیسم مهار رزوراترول علیه تخریب غشاء میتوکندری‌های مغز موش توسط حدواسط‌های الیگومری، دو سری آزمایش طراحی شد. در روش A، هموزن‌های میتوکندریایی قبل از این که در معرض حدواسط‌های الیگومری قرار گیرند با رزوراترول انکوبه شدند: در این روش رزوراترول امکان اینترکشن و اتصال به میتوکندری‌ها را داشته و بنابراین با نفوذ در غشاء میتوکندری و افزایش استحکام و پایداری آن قادر به مهار اثرات مخرب الیگومرها بر روی غشاء میتوکندری خواهد بود. در روش B، حدواسط‌های الیگومری قبل از اضافه شدن به هموزن‌های میتوکندریایی با رزوراترول انکوبه شدند: در این روش رزوراترول به واسطه اینترکشن با حدواسط‌های الیگومری و تجزیه آن‌ها و یا ممانعت از اتصال آنها به غشاء میتوکندری قادر به مهار اثرات مخرب الیگومرها بر روی غشاء میتوکندری خواهد بود. نتایج حاصل از دو سری آزمایش نشان داد که اثر مهار رزوراترول در روش A بسیار چشمگیر می‌باشد حال آن‌که در روش B اثر مهار آن ضعیف‌تر است (شکل ۶ و ۷). بنابراین این گونه به نظر می‌رسد که رزوراترول به واسطه اتصال به غشاء میتوکندری و اثر پایدارکنندگی خود بر روی آن، مانع از نفوذ حدواسط‌های الیگومری در غشاء میتوکندریایی شده و بدین ترتیب مانع افزایش نفوذپذیری آن می‌شود. گزارشات زیادی مبنی بر اثرات پایدارکنندگی پلی فنول‌ها بر روی غشاء‌های فسفولیپیدی وجود دارد. به نظر می‌رسد که پلی فنول‌ها به واسطه اینترکشن و نفوذ در غشاء‌های فسفولیپیدی و کاهش میزان سیالیت



- membrane protein mitoNEET with resveratrol 3-sulfate. *Biochemistry*. Vol. 50, No. 25, pp: 5806-5811.
2. **Arora, A.; Byrem, T.M.; Nair, M.G. and Strasburg, G.M., 2000.** Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Vol. 373, No. 1, pp: 102-109.
 3. **Bieschke, J.; Russ, J.; Friedrich, R.P.; Ehrnhoefer, D.E.; Wobst, H.; Neugebauer, K. and Wanker, E.E., 2010.** EGCG remodels mature α -synuclein and amyloid- β fibrils and reduces cellular toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Vol. 107, No. 17, pp: 7710-7715.
 4. **Camilleri, A., Zarb, C.; Caruana, M.; Ostermeier, U.; Ghio, S.; Högen, T.; S, F.; Giese, A.; Vassallo, N., 2013.** Mitochondrial membrane permeabilisation by amyloid aggregates and protection by polyphenols. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. Vol. 1828, No. 11, pp: 2532-2543.
 5. **Caruana, M.; Neuner, J.; Högen, T.; Schmidt, F.; Kamp, F.; Scerri, C.; Giese, A. and Vassallo, N., 2012.** Polyphenolic compounds are novel protective agents against lipid membrane damage by α -synuclein aggregates in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. Vol. 1818, No. 11, pp: 2502-2510.
 6. **Demuro, A.; Mina, E.; Kaye, R.; Milton, S.C.; Parker, I. and Glabe, C.G., 2005.** Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 280, No. 17, pp: 17294-17300.
 7. **Dobson, C.M., 2001.** The structural basis of protein folding and its links with human disease. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. Vol. 356, No. 1406, pp: 133-145.
 8. **Fang, J.G., Lu, M.; Chen, Z.H.; Zhu, H.H.; Li, Y.; Yang, L.; Wu, L.M. and Liu, Z.L., 2002.** Antioxidant Effects of Resveratrol and its Analogues against the Free Radical Induced Peroxidation of Linoleic Acid in Micelles. *Chemistry-A European Journal*. Vol. 8, No. 18, pp: 4191-4198.
 9. **Fauconneau, B.; Waffo-Teguo, P.; Huguet, F.; Barrier, L.; Decendit, A. and Merillon, J.M., 1997.** Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from *Vitis vinifera* cell

آن‌ها، باعث افزایش سختی و استحکام آن‌ها شده و بدین ترتیب نفوذ عوامل مخرب و آسیب‌رسان به درون غشاء فسفولیپیدی را مهار می‌کنند (Camilleri و همکاران، ۲۰۱۳؛ Margina و همکاران، ۲۰۱۲؛ Hendrich، ۲۰۰۶). رزوراترول پلی‌فنول غالب در انگور می‌باشد که گزارشات زیادی مبنی بر خواص ضد آمیلوئیدوژنیک آن وجود دارد (Vingtdeux و همکاران، ۲۰۰۸؛ Marambaud و همکاران، ۲۰۰۵). این پلی‌فنول هم‌چنین دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد سرطانی، ضد التهابی بوده و در درمان سکته مغزی موثر می‌باشد (Scalbert و همکاران، ۲۰۰۵). بسیاری از مطالعات انجام شده در سال‌های اخیر نشان می‌دهد که پلی‌فنول‌ها و از جمله رزوراترول به واسطه اتصال و اینترکشن با غشاء میتوکندری خواص حفاظتی خود را اعمال می‌کنند (Li و همکاران، ۲۰۱۲؛ Lagoa و همکاران، ۲۰۱۱؛ Yousuf و همکاران، ۲۰۰۹). به‌عنوان مثال Zinia و همکاران (۲۰۰۲) نشان دادند که رزوراترول به ۳ طریق (خاصیت آنتی‌اکسیدانی، عمل بر روی کمپلکس شماره III و اثر پایدارکنندگی خود بر روی غشاء میتوکندریایی) اثرات حفاظتی خود بر میتوکندری را اعمال می‌کند. بنابراین این‌گونه می‌توان نتیجه گرفت که اگرچه رزوراترول به واسطه مکانیسم‌های مختلفی اثرات حفاظتی خود را در سلول اعمال می‌کند ولی اینترکشن آن با غشاء‌های زیستی و به‌خصوص غشاء میتوکندری نقش اساسی در محافظت سلول و میتوکندری، بر علیه عوامل و شرایط آسیب‌رسان را دارد. در این مطالعه برای اولین بار اثرات حفاظتی رزوراترول بر غشاء میتوکندری مغز موش در برابر سمیت حدواسط‌های الیگومری پروتئین لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این مطالعه پیشنهاد می‌کند که رزوراترول عمده‌تاً به واسطه اثرات پایدارکنندگی خود بر غشاء میتوکندری، آن را در برابر حدواسط‌های الیگومری سمی پروتئین لیزوزیم محافظت می‌کند. بنابراین استفاده از رزوراترول به‌عنوان یک ترکیب دارویی روش کارآمد و مناسبی در درمان آسیب‌های میتوکندری در بیماری‌های تحلیل برنده سیستم عصبی می‌باشد. با این حال مطالعات بیش‌تری جهت شناسایی مکانیسم دقیق اینترکشن رزوراترول با غشاء میتوکندری و چگونگی اعمال اثرات حفاظتی این ملکول، مورد نیاز می‌باشد.

منابع

1. **Arif, W.; Xu, S.; Isailovic, D.; Geldenhuys, W.J.; Carroll, R.T. and Funk, M.O., 2011.** Complexes of the outer mitochondrial



- biological effects of some polyphenolic compounds. *Acta Pharmacologica Sinica*. Vol. 27, No. 1, pp: 27-40.
20. **Kayed, R.; Head, E.; Thompson, J.L.; McIntire, T.M.; Milton, S.C.; Cotman, C.W. and Glabe, C.G., 2003.** Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science*. Vol. 300, No. 5618, pp: 486-489.
 21. **Khurana, R.; Ionescu-Zanetti, C.; Pope, M.; Li, J.; Nielson, L.; Ramirez-Alvarado, M.; Regan, L.; Fink, A.L. and Carter, S.A., 2003.** A general model for amyloid fibril assembly based on morphological studies using atomic force microscopy. *Biophysical journal*. Vol. 85, No. 2, pp: 1135-1144.
 22. **Kremer, J.J.; Pallitto, M.M.; Sklansky, D.J. and Murphy, R.M., 2000.** Correlation of β -amyloid aggregate size and hydrophobicity with decreased bilayer fluidity of model membranes. *Biochemistry*. Vol. 39, No. 33, pp: 10309-10318.
 23. **Kristian, T., 2010.** Isolation of mitochondria from the CNS. *Current Protocols in Neuroscience*. pp: 72210-72212.
 24. **Lagoa, R.; Graziani, I.; Lopez-Sanchez, C.; Garcia-Martinez, V. and Gutierrez-Merino, C., 2011.** Complex I and cytochrome c are molecular targets of flavonoids that inhibit hydrogen peroxide production by mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. Vol. 1807, No. 12, pp: 1562-1572.
 25. **Lambert, M.P.; Barlow, A.K.; Chromy, B. A.; Edwards, C.; Freed, R.; Liosatos, M.; Morgan, T.E.; Rozovsky, I.; Trommer, B.; Viola K.L.; Wals, P.; Zhang, C.; Finch, E.; Krafft, G.A. and Klein, W.L., 1998.** Diffusible, nonfibrillar ligands derived from $A\beta_{1-42}$ are potent central nervous system neurotoxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Vol. 95, No. 11, pp: 6448-6453.
 26. **Li, F.; Gong, Q.; Dong, H. and Shi, J., 2012.** Resveratrol, a neuroprotective supplement for Alzheimer's disease. *Current pharmaceutical design*. Vol. 18, No. 1, pp: 27-33.
 27. **Lin, M.T. and Beal, M.F., 2006.** Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *nature*. Vol. 443, No. 7113, pp: 787-795.
 28. **Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, L.A. and Randall, R.J., 1951.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J biol chem*. Vol. 193, No. 1, pp: 265-275.
 - cultures using in vitro tests. *Life sciences*. Vol. 61, No. 21, pp: 2103-2110.
 10. **Franke, W.W.; Schmid, E.; Grund, C. and Geiger, B., 1982.** Intermediate filament proteins in nonfilamentous structures: transient disintegration and inclusion of subunit proteins in granular aggregates. *Cell*. Vol. 30, No. 1, pp: 103-113.
 11. **Frémont, L., 2000.** Biological effects of resveratrol. *Life sciences*. Vol. 66, No. 8, pp: 663-673.
 12. **Gauci, A.J.; Caruana, M.; Giese, A.; Scerri, C. and Vassallo, N., 2011.** Identification of polyphenolic compounds and black tea extract as potent inhibitors of lipid membrane destabilization by $A\beta_{42}$ aggregates. *Journal of Alzheimer's Disease*. Vol. 27, No. 4, pp: 767-779.
 13. **Gharibyan, A.L.; Zamotin, V.; Yanamandra, K.; Moskaleva, O.S.; Margulis, B.A.; Kostanyan, I.A. and Morozova-Roche, L.A., 2007.** Lysozyme Amyloid Oligomers and Fibrils Induce Cellular Death via Different Apoptotic/ Necrotic Pathways. *Journal of molecular biology*. Vol. 365, No. 5, pp: 1337-1349.
 14. **Goldberg, M.E.; Rudolph, R. and Jaenicke, R., 1991.** A kinetic study of the competition between renaturation and aggregation during the refolding of denatured-reduced egg white lysozyme. *Biochemistry*. Vol. 30, No. 11, pp: 2790-2797.
 15. **Golestani, A.; Ramshini, H. and Nemat-Gorgani, M., 2007.** A study on the two binding sites of hexokinase on brain mitochondria. *BMC biochemistry*. Vol. 8, No. 1, pp: 20.
 16. **Gupta, C., Sharma, G. and Chan, D., 2014.** Resveratrol: a chemo-preventative agent with diverse applications. *Phytochemicals of Nutraceutical Importance*. 47 p.
 17. **Han, Y.S.; Bastianetto, S.; Dumont, Y. and Quirion, R., 2006.** Specific plasma membrane binding sites for polyphenols, including resveratrol, in the rat brain. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. Vol. 318, No. 1, pp: 238-245.
 18. **Hashimoto, M.; Rockenstein, E.; Crews, L. and Masliah, E., 2003.** Role of protein aggregation in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Neuromolecular medicine*. Vol. 4, No. 1-2, pp: 21-35.
 19. **Hendrich, A.B., 2006.** Flavonoid-membrane interactions: possible consequences for



- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Vol. 101, No. 9, pp: 2817-2822.
39. **Ross, C.A. and Poirier, M.A., 2004.** Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med.* Vol.10, pp: 7-10.
 40. **Rossi, L.; Mazzitelli, S.; Arciello, M.; Capo, C.R. and Rotilio, G., 2008.** Benefits from dietary polyphenols for brain aging and Alzheimer's disease. *Neurochemical research.* Vol. 33, No. 12, pp: 2390- 2400.
 41. **Scalbert, A.; Manach, C.; Morand, C.; Rémésy, C. and Jiménez, L., 2005.** Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical reviews in food science and nutrition.* Vol. 45, No. 4, pp: 287-306.
 42. **Sims, N.R. and Anderson, M.F., 2008.** Isolation of mitochondria from rat brain using Percoll density gradient centrifugation. *Nature protocols.* Vol. 3, No. 7, pp: 1228-1239.
 43. **Sottocasa, G.L.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. and Randall, R.J., 1967.** Separation and some enzymatic properties of the inner and outer membranes of rat liver mitochondria. *Methods in enzymology.* Vol. 10, pp: 448-463.
 44. **Stefani, M., 2010.** Biochemical and biophysical features of both oligomer/fibril and cell membrane in amyloid cytotoxicity. *FEBS journal.* Vol. 277, No. 22, pp: 4602-4613.
 45. **Stefani, M., 2004.** Protein misfolding and aggregation: new examples in medicine and biology of the dark side of the protein world. *Biochim Biophys Acta.* Vol. 1739, No. 1, pp: 5-25.
 46. **Stefani, M. and Dobson, C.M., 2003.** Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *Journal of molecular medicine.* Vol. 81, No. 11, pp: 678-699.
 47. **Uversky, V.N.; Li, J. and Fink, A.L., 2001.** Evidence for a partially folded intermediate in α -synuclein fibril formation. *Journal of Biological Chemistry.* Vol. 276, No. 14, pp: 10737-10744.
 48. **Vingtdeux, V.; Dreses-Werringloer, U.; Zhao, H.; Davies, P. and Marambaud, P., 2008.** Therapeutic potential of resveratrol in Alzheimer's disease. *BMC neuroscience.* Vol. 9, No. 2, pp: 6.
 49. **Wang, J.B.; Wang, Y.M. and Zeng, C.M., 2011.** Quercetin inhibits amyloid fibrillation of bovine insulin and destabilizes preformed
 29. **Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C. and Jiménez, L., 2004.** Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition.* Vol. 79, No. 5, pp: 727-747.
 30. **Marambaud, P.; Zhao, H. and Davies, P., 2005.** Resveratrol promotes clearance of Alzheimer's disease amyloid- β peptides. *Journal of Biological Chemistry.* Vol. 280, No. 45, pp: 37377-37382.
 31. **Margina, D.; Ilie, M.; Manda, G.; Neagoe, I.; Mocanu, M.; Ionescu, D.; Gradinaru, D. and Ganea, C., 2012.** Quercetin and epigallocatechin gallate effects on the cell membranes biophysical properties correlate with their antioxidant potential. *General physiology and biophysics.* Vol. 31, No. 1, pp: 47-55.
 32. **Meratan, A.A.; Ghasemi, A. and Nemat-Gorgani, M., 2011.** Membrane integrity and amyloid cytotoxicity: a model study involving mitochondria and lysozyme fibrillation products. *Journal of molecular biology.* Vol. 409, No. 5, pp: 826-838.
 33. **Narayanan, P., 2000.** Essentials of biophysics New age international publishers. 552 p.
 34. **Novitskaya, V.; Bocharova, O.V.; Bronstein, I. and Baskakov, I.V., 2006.** Amyloid fibrils of mammalian prion protein are highly toxic to cultured cells and primary neurons. *Journal of Biological Chemistry.* Vol. 281, No. 19, pp: 13828-13836.
 35. **Oladzad Abbasabadi, A.; Javanian, A.; Nikkiah, M.; Meratan, A.A.; Ghiasi, P. and Nemat-Gorgani M., 2013.** Disruption of mitochondrial membrane integrity induced by amyloid aggregates arising from variants of SOD1. *International journal of biological macromolecules.* Vol. 61, p: 212-217.
 36. **Pavlov, P.F.; Wiehager, B.; Sakai, J.; Frykman, S.; Behbahani, H.; Winblad, B. and Ankarcrona, M., 2011.** Mitochondrial γ -secretase participates in the metabolism of mitochondria-associated amyloid precursor protein. *The FASEB Journal,* 25(1): p. 78-88.
 37. **Radford, S.E.; Dobson, C.M. and Evans, P.A., 1992.** The folding of hen lysozyme involves partially structured intermediates and multiple pathways. *Nature.* Vol. 358, No. 6384, pp: 302-307.
 38. **Reixach, N.; Deechongkit, S.; Jiang, X.; Kelly, J.W. and Buxbaum, J.N., 2004.** Tissue damage in the amyloidoses: Transthyretin monomers and nonnative oligomers are the major cytotoxic species in tissue culture.



- fibrils. *Biochemical and biophysical research communications*. Vol. 415, No. 4, pp: 675-679.
50. **Wu, Y.; Brovko, L. and Griffiths, M. 2001.** Influence of phage population on the phage-mediated bioluminescent adenylate kinase (AK) assay for detection of bacteria. *Letters in applied microbiology*. Vol. 33, No. 4, pp: 311-315.
51. **Yousuf, S.; Atif, F.; Ahmad, M.; Hoda, N.; Ishrat, T.; Khan, B. and Islam, F., 2009.** Resveratrol exerts its neuroprotective effect by modulating mitochondrial dysfunctions and associated cell death during cerebral ischemia. *Brain research*. Vol. 1250, pp: 242-253.
52. **Zinia, R.; Morina, C.; Bertellib, A.; Bertellic, A.A.E. and Tillement, J.P., 2002.** Resveratrol-induced limitation of dysfunction of mitochondria isolated from rat brain in an anoxia-reoxygenation model. *Life Science*. Vol. 71, pp: 3091-3108.

