



بررسی اثر مهاری تاکسیفولین بر فرایند فیبریلاسیون پروتئین لیزوزیم سفیده تخم مرغ

محسن مهدوی مهر^۱، علی اکبر مراتان^{۱*}، علی اصغر باقری کشتلی^۲، فریبا خسروی نژاد^۳

^۱ دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی علوم پایه زنجان، زنجان، ایران

^۲ گروه زیست شناسی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران

^۳ دانشکده زیست شناسی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

*Email: a.meratan@iasbs.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۰/۱۶

تاریخ دریافت: ۹۶/۵/۲۸

چکیده

در بین روش‌های درمانی مورد استفاده برای بیماری‌های مرتبط با تجمع‌های آمیلوئیدی، روش‌های مبتنی بر استفاده از ترکیبات طبیعی با خاصیت آنتی آمیلوئیدوژنیک بسیار مورد توجه قرار گرفته است. اگرچه مطالعات *in vivo* و *in vitro* زیادی دلالت بر توانایی مهار فیبریلاسیون توسط این ترکیبات دارد، ولی مکانیسم عمل این ترکیبات با یکدیگر متفاوت می‌باشد. در این مطالعه، با استفاده از محدوده وسیعی از تکنیک‌ها شامل فلورسانس تیوفلاوین T و نایل رد، جذب قرمز کنگو، و میکروسکوپ نیروی اتمی توانایی ملکول طبیعی تاکسیفولین در مهار فرایند فیبریلاسیون پروتئین لیزوزیم سفیده تخم مرغ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که تاکسیفولین از طریق اتصال به تجمع‌های پیش فیبریلی اثرات مهاری خود را اعمال می‌نماید. بعلاوه، اتصال تاکسیفولین باعث تغییر مسیر فیبریلاسیون به سمت ایجاد ساختارهای کروی زنجیره‌ای شکل بزرگ می‌شود که دارای محتوای صفحات بتا کم و سطوح آگریز در دسترس اندک می‌گردد. همچنین، سنجش میزان فلورسانس تیوفلاوین T نشان داد که توانایی اتصال تاکسیفولین به تجمع‌های پیش فیبریلی با رشد آنها و تشکیل تجمع‌های پروتئین فیبریلی بزرگ در انتهای فاز رشد کاهش می‌یابد. به نظر می‌رسد که نتایج حاصل در طراحی مهارکننده‌های تجمع پروتئینی مرتبط با بیماری‌های تحلیل برنده‌ی سیستم عصبی موثر باشد.

کلیدواژه‌ها: آمیلوئید، تاکسیفولین، تجمع پروتئینی، میکروسکوپ نیروی اتمی.

۱- مقدمه

آمیلوئیدوزیز نامیده می‌شوند که مشخصه‌ی بارز آنها وجود فیبریل‌های آمیلوئیدی طویل و بدون شاخه می‌باشد [۶]. فرایند تاخوردگی ناصحیح پروتئین و ایجاد ساختارهای آمیلوئیدی به نظر می‌رسد بر اثر

تاخوردگی ناصحیح پروتئین و رسوب آن در اندام‌ها و بافت‌های مختلف ممکن است منجر به بیماری‌های تحلیل برنده‌ی شدید گردد که رویهم رفته

گیاهان دیگر مانند خارمریم وجود دارد [۳۳]. تاكسیفولین علاوه بر ویژگی‌های ضدتوموری، ضد التهابی و خواص درمانی در بیماری‌های کبدی [۳۲]، یک ترکیب آنتی اکسیدان قوی نیز می‌باشد [۲۷]. در رابطه با بیماری‌های مرتبط با آمیلوئید برخی مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که تاكسیفولین یک مهارکننده موثر تجمع آمیلوئید بتا می‌باشد [۲۰، ۲۱]. با این وجود مکانیسم دقیقی که بدان وسیله تاكسیفولین فرایند تجمع پروتئینی را تحت تاثیر قرار می‌دهد بطور دقیق مشخص نشده است. بنابراین، در این مطالعه اثرات تاكسیفولین بر فرایند فیبریلاسیون لیزوزیم سفیده تخم مرغ مورد مطالعه قرار گرفت.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد مورد نیاز

پروتئین لیزوزیم سفیده تخم مرغ، تیوفلاوین T، نایل رد، قرمز کنگو و تاكسیفولین از شرکت سیگما خریداری شد. سایر مواد مورد نیاز از شرکت مرک آلمان خریداری شدند.

۲-۲- القاء تشکیل تجمعات آمیلوئیدی در پروتئین

لیزوزیم سفیده تخم مرغ

بدین منظور محلول لیزوزیم سفیده تخم مرغ در غلظت نهایی ۵۰ میکرومولار در بافر گلايسین (۵۰ میلی مولار و pH ۲/۲)، در حضور و عدم حضور غلظت‌های مختلف از تاكسیفولین (۰ تا ۱۰۰ میکرومولار) تهیه شد. سپس ویال‌های حاوی نمونه‌های پروتئینی به مدت ۷ روز در دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد و بر روی استیر که با سرعت ۵۰۰ دور بر دقیقه در حال چرخش بود انکوبه شد. غلظت پروتئین با استفاده از ضریب خاموشی $2/63 \text{ mg.ml}^{-1}.\text{cm}^{-1}$

ناپایدار شدن کفورماسیون طبیعی آنها آغاز شده و در نهایت منجر به تشکیل ساختارهای بطور نسبی باز شده می‌شود [۲]. براین اساس مهار تشکیل تجمعات آمیلوئیدی و/یا پاکسازی ساختارهای آمیلوئیدی ممکن است یک روش درمانی موثر و مفید برای بیماری‌های مرتبط با آمیلوئید باشد [۸، ۱۳، ۳۱]. در بین استراتژی‌های موجود برای مهار تشکیل تجمعات آمیلوئیدی، یک روش موثر و ساده استفاده از ملکول‌های کوچک طبیعی یا سنتزی بعنوان مهارکننده‌های تجمع پروتئینی می‌باشد. در این بین استفاده از ترکیبات پلی فنلی طبیعی از اهمیت زیادی برخوردار است [۱۸، ۲۶]. پروتئین لیزوزیم سفیده تخم مرغ همواره بعنوان یک پروتئین مدل در مطالعات مربوط به مکانیسم تشکیل تجمعات آمیلوئیدی و مهار آن توسط ملکول‌های کوچک استفاده می‌شود [۱۲، ۲۸]. از آنجائیکه لیزوزیم سفیده تخم مرغ دارای شباهت ساختاری زیادی با لیزوزیم انسانی، که در بیماری ژنتیکی غیرنورونی آمیلوئیدوزیز سیستمیک نقش دارد، می‌باشد و با علم به این مطلب که تجمعات پروتئینی (اعم از بیماریزا و غیربیماریزا) قادر به اعمال سمیت سلولی هستند، پروتئین لیزوزیم سفیده تخم مرغ را بعنوان یک مدل مناسب در مطالعات مربوط به مهار تشکیل تجمعات پروتئینی مطرح می‌کند [۵، ۱۷، ۱۴]. در مطالعات اخیر ما نشان دادیم که دو پلی فنل طبیعی روزمارینیک اسید و رزوراترول قادر به مهار تشکیل تجمعات آمیلوئیدی در پروتئین لیزوزیم سفیده تخم مرغ، تجزیه ی فیبریل‌های آن و مهار سمیت این تجمعات هستند [۲۲]. تاكسیفولین (که تحت عنوان دی هیدروکوئرسیستین نیز نامیده می‌شود) یک ترکیب فلاونوئیدی است که به فراوانی در انگور، مرکبات، پیاز، چای سبز، روغن زیتون، و بسیاری از

تعیین گردید [۱۰].

تحریک و نشر به ترتیب ۵ و ۱۰ نانومتر انتخاب شد. در این روش غلظت نهایی پروتئین ۲/۵ میکرومولار و غلظت نهایی نایل رد ۱۰ میکرومولار می باشد. تمامی آزمایشات فلورسانس با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر Cary Eclipse VARIAN انجام شد.

۲-۵- سنجش میزان جذب قرمز کنگو

بدین منظور محلول قرمز کنگو در غلظت نهایی ۷ میلی گرم بر میلی لیتر در بافر کنگو (۵ میلی مولار فسفات پتاسیم، ۱۵۰ میلی مولار کلرید سدیم و pH برابر ۷/۴) تهیه شد. سپس مقدار ۵۰ میکرولیتر از محلول پروتئینی انکوبه شده در حضور و عدم حضور تاکسیفولین به ۹۵۰ میکرولیتر از محلول قرمز کنگو (در غلظت نهایی ۲۰ میکرومولار) اضافه شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه شد. سپس طیف جذبی نمونه ها در محدوده ۶۰۰-۴۰۰ نانومتر اندازه گیری شد. میزان اتصال کنگو به فیبریل های آمیلوئیدی بطور کمی و با استفاده از معادله زیر محاسبه گردید:

معادله ۱

$$\text{Congo red}_{\text{bound}} = (A_{540}/25295) - (A_{477}/46306)$$

در این معادله مقدار قرمز کنگو متصل شده به آمیلوئید بر حسب میکرومولار می باشد و ارقام ۲۵۲۹۵ و ۴۶۳۰۶ به ترتیب ضریب خاموشی قرمز کنگو متصل به آمیلوئید و قرمز کنگو آزاد می باشند [۱۱].

۲-۶- آنالیز میکروسکوپ نیروی اتمی

به منظور بررسی مورفولوژی تجمعات پروتئینی حاصل، نمونه های پروتئینی انکوبه شده به مدت ۷ روز در عدم حضور و حضور غلظت های مختلف

۲-۳- سنجش برانگیختگی فلورسانس نشانگر

تیوفلاوین T

به منظور بررسی کینتیک تشکیل تجمعات آمیلوئیدی در پروتئین لیزوزیم سفیده تخم مرغ، مقدار ۴۰ میکرولیتر از نمونه ی پروتئینی انکوبه شده در حضور و عدم حضور تاکسیفولین با ۹۶۰ میکرولیتر محلول ۱۰ میکرومولار تیوفلاوین T (تهیه شده در بافر فسفات سدیم ۲۵ میلی مولار و pH برابر ۶,۵) مخلوط گردیده و به مدت ۵ دقیقه انکوبه شد. در این روش غلظت نهایی پروتئین ۲ میکرومولار می باشد. طول موج تحریک ۴۴۰ نانومتر و طیف نشری پروتئین در محدوده ۶۰۰-۴۵۰ نانومتر اندازه گیری شد. پهنای دریچه برای طول موج تحریک و نشر به ترتیب ۵ و ۱۰ نانومتر انتخاب شد. افزایش تدریجی نشر فلورسانس نمونه های انکوبه شده بیانگر تشکیل فیبریل های آمیلوئیدی می باشد.

۲-۴- سنجش برانگیختگی فلورسانس نشانگر نایل

رد

به منظور بررسی میزان آبگریزی حدواسط های مختلف پروتئینی از نشر فلورسانس نشانگر نایل رد استفاده شد. بدین منظور مقدار ۹۴۰ میکرولیتر بافر گلايسين ۵۰ میلی مولار (pH ۲/۲) با ۱۰ میکرولیتر محلول نایل رد (غلظت ۱ میلی مولار تهیه شده در استونیتریل) مخلوط شده و سپس مقدار ۵۰ میکرولیتر محلول پروتئینی انکوبه شده در حضور و عدم حضور تاکسیفولین به آن اضافه گردید. طول موج تحریک ۵۳۰ نانومتر و طیف نشری در محدوده ۸۰۰-۵۴۰ نانومتر اندازه گیری شد. پهنای دریچه برای طول موج

غلظت باعث کاهش تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی در پروتئین لیزوزیم سفیده تخم مرغ می‌شود.

۳-۱- مهار تشکیل تجمعات آمیلوئیدی پروتئین لیزوزیم توسط تاکسیفولین

به منظور بررسی اثرات مهارکنندگی تاکسیفولین، سرعت تشکیل تجمعات آمیلوئیدی پروتئین لیزوزیم در عدم حضور و حضور غلظت‌های مختلف تاکسیفولین (۰ تا ۱۰۰ میکرومولار) و با استفاده از میزان نشر نشانگر تیوفلاوین T مورد بررسی قرار گرفت. مطالعات قبلی ما نشان داد که کینتیک تشکیل تجمعات آمیلوئیدی در پروتئین لیزوزیم، با یک فاز تاخیری (زمان مورد نیاز برای بازشدن نسبی پروتئین که لازمه تشکیل تجمعات آمیلوئیدی است) همراه می‌باشد [۱۶]. همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است، انکوباسیون پروتئین لیزوزیم تحت شرایط آمیلوئیدوژنیک منجر به افزایش شدید در نشر نشانگر تیوفلاوین T، پس از فاز تاخیری حدود ۱ روز، گردید که میزان آن پس از ۴ روز به بیشینه خود رسید که موید تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی می‌باشد. تداوم انکوباسیون تا ۷ روز منجر به تغییر چندانی در میزان نشر فلورسانس تیوفلاوین T نگردید. با این حال، در مورد نمونه‌های پروتئینی انکوبه شده با تاکسیفولین یک کاهش قابل توجه و وابسته به غلظت در میزان نشر تیوفلاوین T مشاهده شد که بیانگر مهار تشکیل تجمعات آمیلوئیدی در نمونه‌های انکوبه شده با تاکسیفولین می‌باشد (شکل ۱). علاوه بر این، شدت نشر فلورسانس نشانگر تیوفلاوین T نیز بطور وابسته به غلظت کاهش یافت بگونه‌ای که نمونه‌های پروتئینی انکوبه شده در حضور غلظت ۱۰۰ میکرومولار تاکسیفولین در حدود ۸۵٪ نشر فلورسانس تیوفلاوین

تاکسیفولین برداشته شده و به میزان ۱۰ بار توسط بافر گلاسیسین (۵۰ میلی مولار و pH ۲/۲) رقیق شد. سپس مقدار ۱۰ میکرولیتر از آن بر روی صفحات میکا منتقل و به مدت ۵ دقیقه در معرض جریان هوا قرار داده شدند. در نهایت نمونه‌ها در زیر میکروسکوپ نیروی اتمی مشاهده و بررسی شد. تصاویر میکروسکوپ نیروی اتمی توسط دستگاه ARA-AFM، شرکت Ara-Reseach Co، ساخت کشور ایران تهیه شدند.

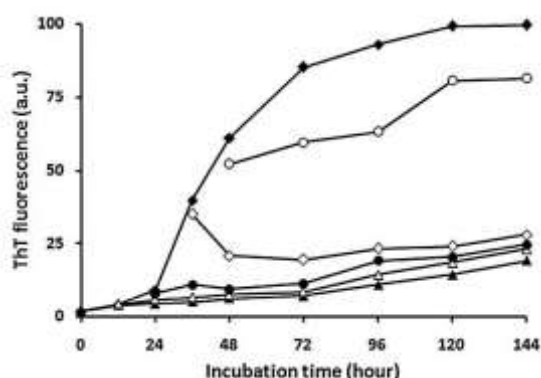
۲-۷- آنالیز آماری

تمامی آزمایشات در سه زمان متفاوت و با نمونه‌های پروتئینی مختلف انجام شد. همچنین هر آزمایش بین ۳ تا ۵ بار تکرار گردید. نتایج نهایی حاصل نیز به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شده است. آنالیز آماری با استفاده از روش T test و با استفاده از نرم افزار اکسل انجام شد.

۳- نتایج و بحث

در سال‌های اخیر ترکیبات طبیعی و سنتزی کوچک بسیاری با خاصیت مهارکنندگی فرایند تجمع پروتئینی شناسایی و معرفی شده‌اند [۲۵،۷]. با اینحال، اکثر این ترکیبات بدلیل سمی بودن و یا عدم توانایی عبور از سد خونی- مغزی قابلیت استفاده برای موارد درمانی را ندارند. در این مطالعه، خواص آنتی آمیلوئیدوژنیک تاکسیفولین بعنوان یک پلی فنل طبیعی که به وفور در رژیم غذایی انسان وجود دارد و فاقد هرگونه سمیت می‌باشد، مورد بررسی قرار گرفت [۳،۳۳،۱۹]. بدین منظور غلظت‌های مختلف تاکسیفولین به محلول پروتئینی اضافه شد و فرایند فیبریلاسیون با استفاده از تکنیک‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد تاکسیفولین بطور موثر و وابسته به

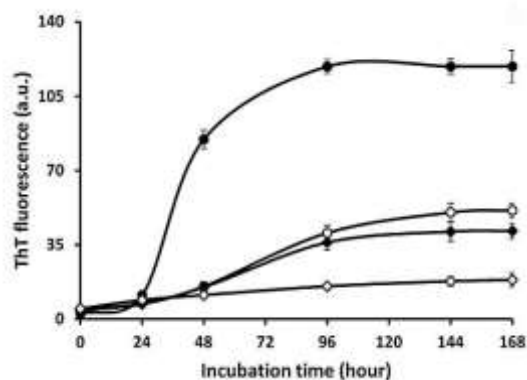
شدید در نشر تیوفلاوین T مشاهده شد، اضافه کردن تاکسیفولین در فواصل زمانی مختلف باعث کاهش شدید در میزان نشر گردید. با اینحال زمانی که تاکسیفولین پس از ۴۸ ساعت اضافه شد خاصیت مهارکنندگی آن بطور قابل توجهی کاهش یافت (شکل ۲). بر اساس این مشاهده، پیشنهاد می‌شود که تاکسیفولین اثرات مهاری خود را از طریق اتصال به گونه‌های پیش فیبریلی تولید شده در مراحل اولیه تجمع پروتئینی لیزوزیم اعمال می‌کند که مشابه گزارشات قبلی می‌باشد [۹، ۲۹، ۱۸، ۱۴]. در طی رشد گونه‌های آمیلوئیدوزنیک و تولید تجمعات پروتئینی بزرگ، توانایی اتصال تاکسیفولین کاهش می‌یابد (شکل ۲).



شکل ۲- تاثیر تاکسیفولین بر کینتیک تشکیل تجمعات آمیلوئیدی پروتئین لیزوزیم. تاکسیفولین در غلظت نهایی ۱۰۰ میکرومولار بلافاصله (▲)، یا پس از فواصل زمانی ۱۲ (Δ)، ۲۴ (●)، ۳۶ (◇)، و ۴۸ (○) ساعت اضافه شده و میزان نشر فلورسانس نشانگر تیوفلاوین T اندازه گیری شد. پروتئین لیزوزیم انکوبه شده در غیاب تاکسیفولین (◆) بعنوان کنترل نشان داده شده است.

در رابطه با فرایند تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی، مطالعات قبلی ما نشان می‌دهد که باز شدن نسبی ساختار پروتئینی و انتقال سطوح آب گریز پروتئین به سطح از عوامل اولیه و اصلی در پیشبرد فرایند تجمع پروتئین لیزوزیم سفیده تخم مرغ می‌باشد [۱۶]. نشانگر

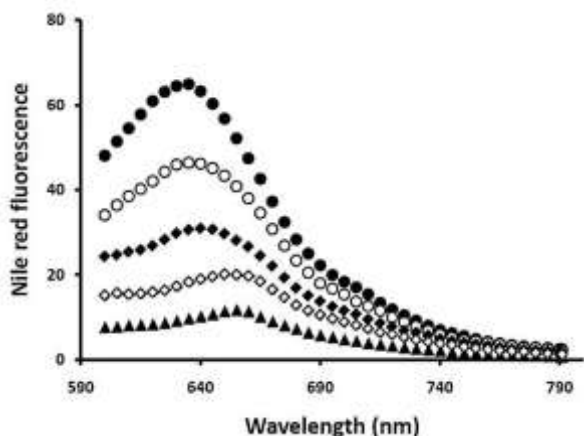
T کمتری نسبت به نمونه‌های کنترل داشتند (شکل ۱). در نهایت میتوان اینگونه نتیجه‌گیری کرد که تاکسیفولین بطور وابسته به غلظت باعث مهار روند تشکیل تجمعات آمیلوئیدی در پروتئین لیزوزیم می‌شود. با این حال تغییر چندانی در مرحله شروع فرایند فیبریلیاسیون (فاز تاخیری) مشاهده نشد که موید این مطلب است که تاکسیفولین احتمالاً با گونه‌های پیش فیبریلی، و نه گونه‌های مونومری، برهمکنش دارد.



شکل ۱- تاثیر تاکسیفولین بر کینتیک تشکیل تجمعات آمیلوئیدی پروتئین لیزوزیم. نمونه‌های پروتئینی (۵۰ میکرومولار) به تنهایی (●)، یا در حضور غلظت‌های ۲۵ (○)، ۵۰ (◆)، و ۱۰۰ (◇) میکرومولار تاکسیفولین تحت شرایط آمیلوئیدوزنیک انکوبه شده و میزان نشر فلورسانس نشانگر تیوفلاوین T اندازه گیری شد. نمودار بر اساس میزان بیشینه نشر نشانگر تیوفلاوین T در طول موج ۴۸۵ نانومتر رسم شده است. نتایج حاصل میانگین سه آزمایش مستقل می‌باشد.

به منظور بررسی این فرضیه، پروتئین تحت شرایط آمیلوئیدوزنیک قرار داده شد و تاکسیفولین (در غلظت نهایی ۱۰۰ میکرومولار) در فواصل زمانی مختلف (۰، ۱۲، ۲۴، ۳۶، و ۴۸ ساعت پس از شروع انکوباسیون) به محلول پروتئینی اضافه شده و میزان نشر فلورسانس تیوفلاوین T بمدت ۶ روز اندازه‌گیری شد. مادامیکه در نمونه‌های پروتئینی فاقد تاکسیفولین یک افزایش

دادند که ممانعت از تشکیل سطوح آبرگريز یکی از مکانیسم‌هایی است که بدان وسیله پلی‌فنل‌های رزوراترول و رزمارینیک اسید تشکیل تجمعات آمیلوئیدی در پروتئين ليزوزيم را مهار می‌کنند [۳۳].



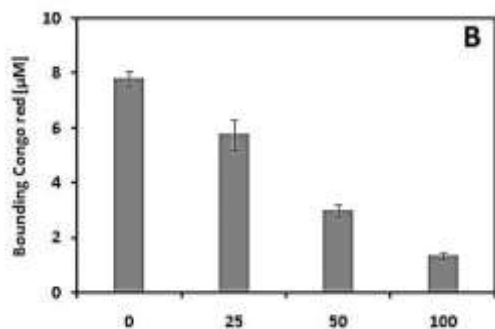
شکل ۳- تاثیر تاكسي فولين بر آبرگريز سطحی پروتئين ليزوزيم. نمونه‌های پروتئينی (۵۰ میکرومولار) به تنهایی (●)، یا در حضور غلظت‌های ۲۵ (○)، ۵۰ (◆)، و ۱۰۰ (◇) میکرومولار تاكسي فولين تحت شرایط آمیلوئیدوژنیک به مدت ۷ روز انکوبه شده و میزان نشر فلورسانس نشانگر نایل رد اندازه‌گیری شد. میزان نشر نشانگر نایل رد در حضور مونومر ليزوزيم (▲) نیز آورده شده است.

۳-۲- بررسی کمی تشکیل تجمعات آمیلوئیدی پروتئين ليزوزيم در حضور و عدم حضور تاكسي فولين

برخلاف نشانگر تیوفلاوین T که علاوه بر فیبریل‌های آمیلوئیدی به تجمعات پروتئينی بی شکل و گونه‌های پیش فیبریلی نیز متصل می‌شود [۴، ۱]، قرمز کنگو بطور اختصاصی به فیبریل‌های آمیلوئیدی باند شده و این اتصال با افزایش جذب و انتقال به سمت طول موج‌های بلندتر (red shift) همراه است. علاوه بر این اتصال قرمز کنگو به فیبریل‌های آمیلوئیدی متناسب با مقدار آمیلوئید موجود در محیط می‌باشد و به راحتی با استفاده از معادله ۱ قابل اندازه‌گیری می‌باشد [۱۱]. بنابراین در ادامه مطالعه میزان جذب

نایل رد یک ملکول آبرگريز میباشد که اتصال آن به سطوح آبرگريز با افزایش میزان نشر فلورسانس آن و یک انتقال به سمت طول موج‌های کوتاه‌تر (blue shift) همراه است و بطور رایج در بررسی تغییرات ساختار سوم پروتئين‌ها در طی روند تجمع پروتئينی استفاده می‌شود [۱۵]. بنابراین، به منظور بررسی اثر تاكسي فولين بر تغییرات ساختار سوم پروتئين در طی روند تشکیل تجمعات آمیلوئیدی، میزان نشر نشانگر نایل رد نمونه‌های پروتئينی انکوبه شده در حضور غلظت‌های مختلف تاكسي فولين نیز مورد سنجش قرار گرفت. شکل ۳ میزان نشر فلورسانس نشانگر نایل رد نمونه‌های پروتئينی انکوبه شده به مدت ۷ روز در عدم حضور و حضور غلظت‌های مختلف تاكسي فولين را نشان می‌دهد. نتایج حاصل نشان دهنده‌ی افزایش شدید میزان نشر فلورسانس نشانگر نایل رد به همراه انتقال به سمت طول موج‌های کوتاه‌تر در مورد نمونه‌های پروتئينی انکوبه شده در غیاب تاكسي فولين می‌باشد، حال آنکه حضور تاكسي فولين باعث یک کاهش شدید و وابسته به غلظت در میزان نشر نشانگر نایل رد گردید. همچنین این کاهش همراه با یک انتقال به سمت طول موج‌های بلندتر بود (شکل ۳). این مشاهده می‌تواند بدلیل توانایی تاكسي فولين برای اتصال به سطوح آبرگريز باشد که در مورد ترکیبات پلی فنلی دیگر نیز مشاهده شده است [۲۳، ۲۴].

از آنجائیکه افزایش نواحی آبرگريز سطحی از عوامل اصلی و پیش برنده در روند تشکیل تجمعات آمیلوئیدی در پروتئين ليزوزيم سفیده تخم مرغ می‌باشد [۱۶]، بنابراین به نظر میرسد که ممانعت از آشکار شدن سطوح آبرگريز یکی از مکانیسم‌هایی باشد که بدان وسیله تاكسي فولين اثرات مهاري خود را اعمال می‌کند. بطور مشابهی آقای شریعت و همکاران نشان



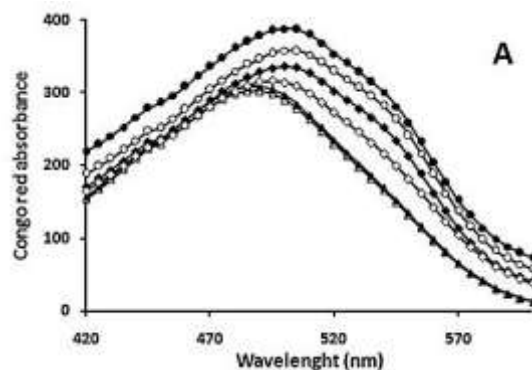
شکل ۴- (A) طیف جذبی قرمز کنگو نمونه‌های پروتئینی انکوبه شده در عدم حضور (●) و حضور غلظت‌های ۲۵ (○)، ۵۰ (◊) و ۱۰۰ (◇) میکرومولار تاکسیفولین. میزان جذب قرمز کنگو به تنهایی (Δ) و در حضور مونومر لیزوزیم (▲) نیز آورده شده است. (B) میزان باندشدن قرمز کنگو به نمونه‌های پروتئینی انکوبه شده در عدم حضور و حضور غلظت‌های مختلف تاکسیفولین. نمونه‌ها به مدت ۷ روز تحت شرایط آمیلوئیدوژنیک انکوبه شدند.

۳-۳- بررسی مورفولوژی تجمعات پروتئینی

لیزوزیم در حضور و عدم حضور تاکسیفولین

در مرحله آخر مورفولوژی تجمعات پروتئینی ایجاد شده در عدم حضور و حضور تاکسیفولین توسط میکروسکوپ نیروی اتمی مورد بررسی قرار گرفت. شکل ۵ تصاویر میکروسکوپ نیروی اتمی نمونه‌های پروتئینی انکوبه شده به مدت ۷ روز تحت شرایط آمیلوئیدوژنیک را نشان می‌دهد. همانطور که در شکل A۵ نشان داده شده است در غیاب تاکسیفولین فیبریل‌های آمیلوئیدی بالغ با دو مورفولوژی خطی و کرمی شکل مشاهده می‌شود. در نمونه‌های انکوبه شده با ۲۵ میکرومولار تاکسیفولین تشکیل ساختارهای فیبریلی مهار و در مقابل ساختارهای پرتوفیبریلی کوچک مشاهده شد (شکل B۵). در نمونه‌های پروتئینی حاوی ۵۰ میکرومولار تاکسیفولین تشکیل تجمعات پرتوفیبریلی بطور کامل مهار و در مقابل تجمعات بی‌شکل با اندازه بزرگ مشاهده شد (شکل C۵). در نهایت در نمونه‌های پروتئینی انکوبه شده با

قرمز کنگو نمونه‌های پروتئینی انکوبه شده در عدم حضور و حضور غلظت‌های مختلف تاکسیفولین مورد سنجش قرار گرفت. همانطور که در شکل A۴ نشان داده شده است انکوباسیون نمونه‌های پروتئینی به مدت ۷ روز در غیاب تاکسیفولین منجر به یک افزایش جذب و انتقال به سمت طول موجهای بلندتر گردید که بیانگر تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی است. همچنین یک شانه در طول موج حدود ۵۴۰ نانومتر نیز مشاهده شد که نشان‌دهنده‌ی اتصال قوی بین پروتئین لیزوزیم و قرمز کنگو می‌باشد و بیانگر وجود مقادیر قابل توجهی از فیبریل‌های آمیلوئیدی در نمونه‌های فاقد تاکسیفولین می‌باشد [۳۰]، ولی در نمونه‌های پروتئینی حاوی تاکسیفولین تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی بطور وابسته به غلظت مهار گردید (شکل A۴). در ادامه میزان اتصال نشانگر قرمز کنگو به فیبریل‌های آمیلوئیدی با استفاده از معادله ۱ محاسبه گردید که نتایج آن در شکل B۴ آورده شده است. مادامیکه قرمز کنگو به مقدار قابل توجهی به نمونه‌های پروتئینی فاقد تاکسیفولین متصل گردید، میزان باند شدن آن به نمونه‌های پروتئینی دارای تاکسیفولین بطور وابسته به غلظت کاهش یافت (شکل B۴). این مشاهده بیانگر کاهش میزان تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی در نمونه‌های حاوی تاکسیفولین می‌باشد که با نتایج قبلی ما همخوانی دارد.



سمیت سلولی هستند یا نه؟ نتایج حاصل از این تحقیق میتواند در درک بهتر مکانیسم‌های احتمالی مهار تشکیل تجمعات آمیلوئیدی توسط ملکول‌های کوچک طبیعی، از جمله پلی‌فنل‌ها، موثر باشد و ما را در انتخاب مهارکننده‌های موثر در رابطه با تاخوردگی ناصحیح و تجمع پپتیدها و پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌های تحلیل برنده‌ی سیستم عصبی یاری نماید.

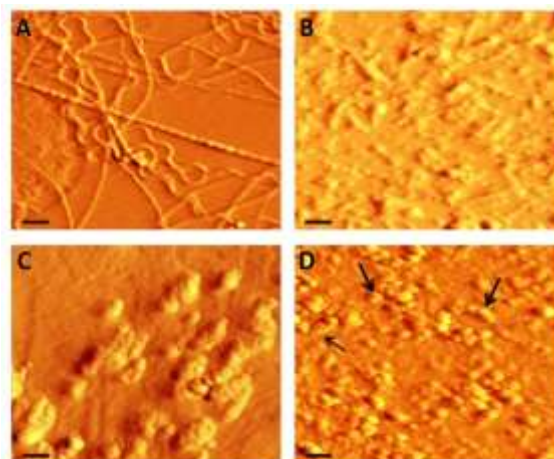
۵- تشکر و قدردانی

این تحقیق در دانشگاه تحصیلات تکمیلی علوم پایه زنجان انجام شده و کلیه هزینه‌های پژوهشی آن توسط دانشگاه مربوطه تامین گردیده است.

۶- منابع

- [1]. Azami-Movahed M., Shariatizi S., Sabbaghian M., Ghasemi A., Ebrahim-Habibi A., Nemat-Gorgani M. 2013, Heme binding site in apomyoglobin may be effectively targeted with small molecules to control aggregation. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 45(2): 299-307.
- [2]. Bartolini M., Andrisano V. 2010, Strategies for the inhibition of protein aggregation in human diseases. *ChemBioChem*. 11(8): 1018-1035.
- [3]. Booth A.N., Deeds F. 1958, The toxicity and metabolism of dihydroquercetin. *Journal of American Pharmaceutical Association. Americal Pharmaceutical Association*. 47(3, part1):183-184.
- [4]. Bouma B., Kroon-Batenburg L.M., Wu Y.P., Brünjes B., Posthuma G., Kranenburg O., de Groot P.G., Voest E.E., Gebbink M.F. 2003, Glycation induces formation of amyloid cross-beta structure in albumin. *Journal of Biological Chemistry*. 278 (43): 41810-9.
- [5]. Bucciantini, M., Giannoni, E., Chiti, F., Baroni, F., Formigli, L., Zurdo, J., Taddei, N., Ramponi, G., Dobson, C.M., Stefani, M. 2002, Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein

غلظت ۱۰۰ میکرومولار تاكسیفولین تجمعات پروتئینی کروی زنجیره ای شکل تشکیل گردید (شکل D۵). این نتایج بیانگر این مطلب است که در حضور تاكسیفولین تولید فیبریل‌های آمیلوئیدی بطور موثری مهار می‌شود که با نتایج حاصل از آزمایشات قبلی ما مطابقت می‌نماید.



شکل ۵- تصاویر میکروسکوپ نیروی اتمی نمونه‌های پروتئینی در عدم حضور و حضور غلظت‌های مختلف تاكسیفولین. نمونه‌های پروتئینی (۵۰ میکرومولار) به تنهایی (A)، یا در حضور غلظت‌های ۲۵ (B)، ۵۰ (C)، و ۱۰۰ (D) میکرومولار تاكسیفولین تحت شرایط آمیلوئیدوژنیک به مدت ۷ روز انکوبه شدند. مقیاس اندازه‌ی ۵۰۰ نانومتر را نشان می‌دهند.

۴- نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که تاكسیفولین بطور موثری تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی توسط پروتئین لیزوزیم سفیده تخم مرغ را مهار میکند. بر اساس نتایج حاصل پیشنهاد میشود که تاكسیفولین به تجمعات پیش فیبریلی تولید شده در طی فرایند تجمع پروتئینی متصل شده و مسیر فیبریلاسیون را به سمت تشکیل تجمعات کروی زنجیره‌ای شکل هدایت می‌نماید. بااینحال این سوال همچنان باقی است که تجمعات ایجاد شده در حضور تاكسیفولین دارای

- misfolding diseases. *Nature*, 416(6880): 507-511.6.
- [6]. Chiti F., Dobson C.M. 2006, Protein misfolding, functional amyloid and human disease. *Annual Review of Biochemistry*.75:333-366.
- [7]. De Felice F.G., Ferreira S.T. 2002, β -Amyloid production, aggregation, and clearance as targets for therapy in Alzheimer's disease. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 22(5-6):545-5638.
- [8]. Gazova Z., Siposova K., Kurin E., Mučaji P., Nagy M. 2013, Amyloid aggregation of lysozyme: the synergy study of red wine polyphenols. *Proteins*.81(6):994-1004.
- [9]. Ghobeh M., Ahmadian S., Meratan A.A., Ebrahim-Habibi A., Ghasemi A., Shafizadeh M., Nemat-Gorgani M.2014, Interaction of A β (25-35) fibrillation products with mitochondria: effect of small-molecule natural products. *Biopolymers*. 102 (6):473-486.
- [10].Goldberg M.E., Rudolph R., Jaenicke R. 1991, A kinetic study of the competition between renaturation and aggregation during the refolding of denatured-reduced egg white lysozyme. *Biochemistry*. 30(11): 2790-2797.
- [11].Klunk W.E., Pettegrew J.W., Abraham D.J. 1989, Quantitative evaluation of Congo red binding to amyloid-like proteins with a beta-pleated sheet conformation. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 37(8): 1273-1281.
- [12].Krebs M.R., Wilkins D.K., Chung E.W., Pitkeathly M.C., Chamberlain A.K., Zurdo J., Robinson C.V., Dobson C.M.2000, Formation and seeding of amyloid fibrils from wild-type hen lysozyme and a peptide fragment from the β -domain. *Journal of Molecular Biology*. 300(3):541-549.
- [13].Masuda M., Suzuki N., Taniguchi S., Oikawa T., Nonaka T., Iwatsubo T., Hisanaga S., Goedert M., Hasegawa M. 2006, Small molecule inhibitorsof alpha-synuclein filament assembly. *Biochemistry*. 45(19):6085-6094.
- [14].Mishra, R., Sellin, D., Radovan, D., Gohlke, A., Winter, R. 2009, Inhibiting islet amyloid polypeptide fibril formation by the red wine compound resveratrol. *ChemBioChem*. 10(3): 445-449.
- [15].Mishra, R., Sjölander, D., Hammarström, P. 2011, Spectroscopic characterization of diverse amyloid fibrils in vitro by the fluorescent dye Nile red. *Molecular Biosystems*. 7(4): 1232-40.
- [16].Meratan A.A., Ghasemi A., Nemat-Gorgani M. 2011, Membrane integrity and amyloid cytotoxicity: a model study involving mitochondria and lysozyme fibrillation products. *Journal of Molecular Biology*. 409(5): 826-838.
- [17].Pepys M.B., Hawking P.N., Booth D.R., Vigushin D.M., Tennent G.A., Soutar A.K., Totty N., Nguyen O., Blake C.C., Terry C.J., Feast T.G., Zalin A.M., Hsuan J.J. 1993, Human lysozyme gene mutations cause hereditary systemic amyloidosis. *Nature*. 362(6420): 553-557.
- [18].Porat Y., Abramowitz A., Gazit E. 2006, Inhibition of amyloid fibril formation by polyphenols: structural similarity and aromatic interactions as a common inhibition mechanism. *Chemical Biology & Drug Design*. 67(1):27-37.
- [19].Saito S., Yamamoto Y., Maki T., Hattori Y., Ito H., Mizuno K., Harada-Shiba M., Kalaria R.N., Fukushima M., Takahashi R., Ihara M.2017, Taxifolin inhibits amyloid- β oligomer formation and fully restores vascular integrity and memory in cerebral amyloid angiopathy. *Acta Neuropathologica Communications*. 5(1):26.
- [20].Sato M., Murakami K., Uno M., Ikubo H., Nakagawa Y., Katayama S., Akagi K., Irie K.2013, Structure-Activity relationship for (-)-taxifolin isolated from Silymarin as an inhibitor of Amyloid β Aggregation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 77(5):1100-1103.
- [21].Sato M., Murakami K., Uno M., Nakagawa Y., Katayama S., Akagi K., Masuda Y., Takegoshi K., Irie K.2013, Site-specific inhibitory mechanism for Amyloid β 42 aggregation by catechol-type flavonoids targeting the Lys residues. *Journal of Biological Chemistry*. 288(32):23212-23224.
- [22].Shariatizi S., Meratan A.A., Ghasemi A., Nemat-Gorgani M. 2015, Inhibition of amyloid fibrillation and cytotoxicity of lysozyme fibrillation products by

- polyphenols. *International Journal of Biological Macromolecules*. 80:95–106.
- [23]. Siebert K.J., Troukhanova N.V., Lynn, P.Y. 1996, Nature of polyphenol-protein interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44(1):80–85.
- [24]. Soares S., Mateus N., Freitas Vd. 2007, Interaction of different polyphenols with bovine serum albumin (BSA) and human salivary alpha-amylase (HSA) by fluorescence quenching. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007; 55(16):6726–6735.
- [25]. Soto C. 1999, Plaque busters: strategies to inhibit amyloid formation in Alzheimer's disease. *Molecular Medicine Today*. 5(8):343–350.
- [26]. Stefani M., Rigacci S. 2013, Protein folding and aggregation into amyloid: the interference by natural phenolic compounds. *International Journal of Molecular Sciences*. 14(6):12411–12457.
- [27]. Sun X., Chen R.C., Yang Z.H., Sun G.B., Wang M., Ma X.J., Yang L.J., Sun X.B. 2014, Taxifolin prevents diabetic cardiomyopathy in vivo and in vitro by inhibition of oxidative stress and cell apoptosis. *Food and Chemical Toxicology*. 63:221–232.
- [28]. Swaminathan R., Ravi V.K., Kumar S., Kumar M.V., Chandra N. 2011, Lysozyme: a model protein for amyloid research. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. 84:63–111.
- [29]. Taniguchi S., Suzuki N., Masuda M., Hisanaga S., Iwatsubo T., Goedert M., Hasegawa M. 2005, Inhibition of heparin-induced tau filament formation by phenothiazines, polyphenols, and porphyrins. *Journal of Biological Chemistry*. 280(9):7614–7623.
- [30]. Wang S.S.S., Chen P.H., Hung Y.T. 2006, Effects of p-benzoquinone and melatonin on amyloid fibrillogenesis of hen egg-white lysozyme. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*. 43(1-4):49–57.
- [31]. Wang J.B., Wang Y.M., Zeng C.M. 2011, Quercetin inhibits amyloid fibrillation of bovine insulin and destabilizes preformed fibrils. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 415(4):675–679.
- [32]. Weidmann A.E. 2012, Dihydroquercetin: More than just an impurity? *European Journal of Pharmacology*. 684(1-3):19–26.
- [33]. Yang P., Xu F., Li H.F., Wang Y., Li F.C., Shang M.Y., Liu G.X., Wang X., Cai S.Q. 2016, Detection of 191 Taxifolin metabolites and their distribution in Rats using HPLC-ESI-IT-TOF-MSn. *Molecules*. 21(9):1209.