

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

- شقایق روغیان قزوینی: مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک ایران، دانشگاه تهران، صندوق پستی: 13145-1384
- علی اکبر مرآتان: 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: 13145-1384
- مهشید شفیع زاده: مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک ایران، دانشگاه تهران، صندوق پستی: 13145-1384
- عطیه قاسمی: مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک ایران، دانشگاه تهران، صندوق پستی: 13145-1384

تاریخ دریافت: فروردین 1393 تاریخ پذیرش: تیر 1393

### 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 به‌سزایی 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 میانکشن نمونه‌های مونومری، حدواسط‌های الیگومری و فیبریل‌های آمیلوئیدی پروتئین لیزوزیم سفیده تخم مرغ 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 نمایی دورانی مورد بررسی قرار گرفت و در ادامه افزایش نفوذپذیری غشاء میتوکندریایی در حضور گونه‌های مختلف تجمعات پروتئینی و از طریق سنجش میزان رها شدن آنزیم‌های شاخص میتوکندری بررسی شد. نتایج حاصل نشان‌دهنده رها شدن آنزیم‌های میتوکندریایی به‌دنبال انکوباسیون با حدواسط‌های الیگومری می‌باشد، حال آن‌که مونومرها و فیبریل‌های آمیلوئیدی اثری نداشتند. به‌نظر می‌رسد که هیدروفوبیسیته سطحی بالای حدواسط‌های الیگومری توانایی آن‌ها را برای میان‌کنش با غشاء میتوکندری، افزایش می‌دهد. در ادامه توانایی پلی-فنول 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 بیمارهای مرتبط با تجمع پروتئینی مورد استفاده قرار گیرد.

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

### مقدمه

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 (Ross و Poirier، 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؛ Dobson و Stefani، 2003). 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

تجمعات پروتئینی و بیماری‌های ناشی از آن، یکی از موضوعات جالب و تازه در عرصه پزشکی ملکولی می‌باشد. به‌نظر 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 بارز تمامی این بیماری‌ها وجود تجمعات

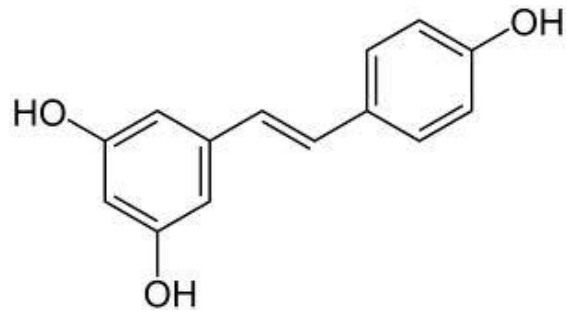


ترکیباتی که بتوانند با مداخله بر روی این حواسط های سمی مانع اتصال و اینترکشن آن‌ها با غشاءهای سلولی گردند می‌توانند به‌عنوان یک مکانیسم محافظتی در جهت کاهش سمیت این گونه‌ها عمل نمایند. در بین ترکیبات مختلف مورد مطالعه، پلی فنول‌های طبیعی موجود در گیاهان از اهمیت به‌سزائی برخوردار هستند که به‌مقدار زیادی در رژیم غذایی انسان یافت می‌شوند و ارتباط مستقیمی در استفاده از این ترکیبات و بهبود بیماری‌های تحلیل برنده سیستم عصبی مشاهده شده است (Rossi و همکاران، 2008؛ Hendrich، 2006). به‌عنوان مثال ترکیبات پلی فنولی موجود در عصاره چای سیاه به‌عنوان عامل مهارکننده در برابر ناپایداری کردن غشاء سلولی توسط تجمعات آمیلوئید بتا و آلفا سینوکلئین پیشنهاد شده است (Camilleri و همکاران، 2013). رزوراترول پلی فنول انتخابی در انجام این مطالعه می‌باشد که به‌طور غالب در پوست انگور فرمز یافت می‌شود (Frémont، 2000). همانند بسیاری از ترکیبات پلی فنولی دیگر رزوراترول، دارای خواص آنتی‌اکسیدانی می‌باشد که این نقش را از طریق اهدای اتم هیدروژن/الکترون از گروه‌های هیدروکسیل خود، ایفا می‌کند (Fang و همکاران، 2002؛ Fauconneau و همکاران، 1997). خواص دیگر محافظتی از قبیل خواص ضدالتهابی و محافظت از قلب نیز برای آن گزارش شده است ولی ویژگی محافظت نرونی آن در سال‌های اخیر توجه بسیاری از دانشمندان را به‌خود جلب کرده است (Gupta و همکاران، 2014). رزوراترول با داشتن رسپتور بر روی غشا پلاسمایی و داشتن ویژگی لیپوفیلیتی تمایل به اینترکشن با غشاهای زیستی را نشان می‌دهد (Han و همکاران، 2006). همچنین نشان داده شده که از طریق پروتئین mitoNEET، رزوراترول 3 سولفات که یکی از مشتقات رزوراترول می‌باشد قادر است به غشای خارجی میتوکندری متصل شود (Arif و همکاران، 2011). تحقیقات نشان داده‌است که رزوراترول به‌واسطه مکانیسم‌های مختلفی اثرات محافظتی خود بر روی غشای میتوکندری را اعمال می‌کند. یکی از این مکانیسم‌های حفاظتی، اینترکشن رزوراترول با غشاهای زیستی و پایداری آن در شرایط ایسکمی و دوباره اکسیژن‌رسانی به بافت می‌باشد (Zinia و همکاران، 2002). با توجه به مطالب ذکر شده در بالا، در این مطالعه اثرات مخرب گونه‌های الیگومری پروتئین لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ بر روی پایداری و انسجام غشاء-میتوکندری بررسی شده و برای اولین بار اثرات محافظتی پلی فنل طبیعی رزوراترول (شکل 1) بر روی غشای میتوکندری مورد مطالعه قرار گرفت.

و گذرا از حواسط‌هایی ناپایدار تحت عنوان الیگومر یا پروتوفیبریل عبور کرده و در نهایت ساختارهای رشته‌ای تحت عنوان فیبریل‌های آمیلوئیدی را به‌وجود می‌آورند (Uversky و همکاران، 2001). با این که در سال 1998 گونه‌های الیگومری 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، 1998؛ Franke و همکاران، 1982)، ولی امروزه شواهد زیادی دال بر سمیت فیبریل‌ها نیز به‌دست آمده‌است (Gharibyan و همکاران، 2007؛ Novitskaya و همکاران، 2006). به‌علت وجود ساختارهای فضائی شبیه به هم در گونه‌های الیگومری مربوط به پروتئین‌های مختلف،

به‌نظر می‌رسد که مکانیسم‌های القای سمیت برای این گونه-ها (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 هر دو سطح خارج و داخل سلولی قابل دسترسی می‌باشد، می‌تواند به‌عنوان هدف مشترک برای القاء سمیت گونه‌های الیگومری تلقی گردد (Demuro و همکاران، 2005). از جمله غشاهای درون سلولی که می‌تواند به‌عنوان جایگاهی برای القاء سمیت الیگومرها 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 الیگومری لیزوزیم به‌خصوص لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ (Hen Egg White Lysozyme) بر روی انسجام و پایداری غشاء میتوکندریایی مورد بررسی قرار گرفته است (Oladzad و همکاران، 2013؛ Meratan و همکاران، 2011). لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ، 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، 1992). با علم به این مطلب که غشاءهای سلولی هدف اولیه القاء سمیت حواسط‌های الیگومری هستند، بنابراین





شکل 1: ساختار شیمیایی رزوراترول

### 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 1-سولفوناتو-8-آنیلینو نفتالن (ANS) از شرکت Fluka خریداری شد. سایر مواد از شرکت مرگ آلمان خریداری شدند.

**القاء تشکیل تجمعات آمیلوئیدی در پروتئین لیزوزیم:** سفیده تخم مرغ: پودر لیزوزیم سفیده تخم مرغ در غلظت نهایی 1 میلی‌مولار در محلول آبی حاوی HCl و pH حدود 1/6 حل شد و به عنوان نمونه مونومری مورد استفاده قرار گرفت. به منظور القاء تشکیل حواسط های الیگومری، محلول‌های

به مدت 2 روز در دمای ثابت 57 درجه سانتی‌گراد و بدون هم-زدن انکوبه شدند. از آنجائی‌که نمونه‌های 2 روزه فاقد هرگونه تجمعات آمیلوئیدی بودند در نتیجه غلظت الیگومرها برابر با غلظت مونومرها در نظر گرفته شد (Goldberg و همکاران، 1991).

به منظور تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی، نمونه‌های پروتئینی به مدت 7 روز و در دمای ثابت 57 درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. از آنجائی‌که نمونه‌های فیبریلی حاوی مقداری نمونه مونومری و الیگومری نیز می‌باشند، در نتیجه به منظور حذف این حواسط‌ها، محلول پروتئینی حاوی فیبریل‌های آمیلوئیدی به مدت 40 دقیقه در دور 21000 سانتریفیوژ گردید. محلول روئی حاصل برداشته شده و غلظت پروتئین آن با استفاده از ضریب خاموشی  $2/63 \text{ mg.ml}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  تعیین گردیده و از غلظت اولیه محلول پروتئینی کم شد. بدین-ترتیب غلظت رسوب حاصل، که حاوی فیبریل‌های آمیلوئیدی می‌باشد، 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 اندازه‌گیری شد. بدین‌منظور مقدار 990 میکرولیتر محلول ThT با غلظت 10 میکرومولار با 10 میکرولیتر از نمونه‌های پروتئینی (غلظت نهائی 20 میکرومولار) مخلوط گردید و به مدت 5 دقیقه انکوبه شد. سپس نشر فلورسانس نمونه پروتئینی در طول موج 485 نانومتر قرائت گردید. طول موج تحریک 440 نانومتر و طیف نشری در محدوده 450-600 نانومتر اندازه‌گیری شد. این کار با فواصل 24 ساعت و به مدت 7 روز انجام شد.

**سنجش برانگیختگی فلورسانس ANS:** به منظور بررسی کینتیک تغییرات هیدروفوبیسیتة حواسط‌های پروتئینی در طی فرایند آمیلوئید شدن، مقدار 975 میکرولیتر محلول آبی حاوی HCl (pH/6) با 20 میکرولیتر محلول تهیه شده ANS با غلظت 5 میلی‌مولار مخلوط شده و سپس مقدار 5 میکرولیتر محلول پروتئینی (با غلظت 1 میلی‌مولار) به آن اضافه گردید و میزان نشر فلورسانس ANS در طول موج تحریک 350 نانومتر و نشر 400-600 اندازه‌گیری شد. در این روش غلظت نهایی لیزوزیم 5 میکرومولار و غلظت نهایی ANS 100 میکرومولار می‌باشد. این کار با فواصل 24 ساعت و به-مدت 7 روز انجام شد.

**بررسی تغییرات ساختاری حواسط‌های آمیلوئیدی با استفاده از دورنگ نمائی دورانی:** برای اندازه‌گیری طیف دورنگ نمایی دورانی در محدوده فرابنفش دور از غلظت 0/2 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر لیزوزیم و کووت با ضخامت 0/05 سانتی‌متر استفاده شد. بدین‌منظور نمونه‌های پروتئینی در زمان‌های مختلف انکوباسیون (زمان‌های 0، 2 و 7 روز) برداشته شده و تغییرات ساختار دوم پروتئین مورد بررسی قرار گرفت. طیف‌های دورنگ نمایی دورانی حواسط های مختلف پروتئین لیزوزیم با استفاده از دستگاه اسپکتروپلاریومتر AVIV 215 به دست آمدند.

**تخلیص و آماده‌سازی میتوکندری مغز موش:** جداسازی مغز از موش‌های صحرایی نر (وزن تقریبی 200-150 گرم) بر طبق پروتکل Sims صورت گرفت (Sims و Anderson، 2008). مغزهای جدا شده سپس به بافر استخراج میتوکندری (10 میلی‌مولار Tris-HCl، 1 میلی‌مولار EDTA و 0/32 مولار سوکرروز، pH برابر 7/4) که از قبل در یخچال قرار داده شده بود، انتقال داده شدند. در مرحله بعد هر گرم از بافت مغز با 10 میلی‌لیتر بافر جداسازی مخلوط و توسط پوتر تفلون- شیشه به صورت هموژن درآمد. هموژن میتوکندریایی حاصل در دور 3000 g به مدت 3 دقیقه سانتریفیوژ گردید و رسوب حاصل دور ریخته شد. سپس محلول روئی به مدت 10 دقیقه در دور 21000g سانتریفیوژ شد و سپس 3/5 میلی‌لیتر محلول Percoll 15% به‌ازای هر مغز به رسوب باقی‌مانده اضافه گردید و به مدت 8 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی‌گراد و دور 30700 سانتریفیوژ گردید (با استفاده از افزایش سرعت آرام از 0 تا 500 rpm و به دنبال آن سرعت نرمال و سپس کاهش سرعت آرام از 1500 تا 0). در این مرحله محلول روئی که به‌طور غالب حاوی میلین می‌باشد دور ریخته شد. در مرحله بعد 8 میلی‌لیتر بافر استخراج به‌ازای هر مغز به میتوکندری‌های جمع‌آوری شده اضافه و پس از همگن کردن مجدد به مدت 10 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی‌گراد و در دور 16700g سانتریفیوژ گردید و محلول روئی با دقت جدا گردیده بدون این‌که به رسوب شل انتهایی آسیبی وارد شود. در نهایت 1 میلی‌لیتر محلول سرم آلبومین فاقد اسید چرب آزاد (در غلظت نهایی 10 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به هر تیوب اضافه شد و مخلوط به آرامی هم‌زده شد و پس از افزودن 4/5 میلی‌لیتر بافر استخراج به هر



حاصل برحسب (RLU) Relative Light Unit و با استفاده از دستگاه System Luminometer Berthold Detection اندازه‌گیری شد. میزان فعالیت آنزیم MDH به روش اسپکتروفتومتری و با توجه به روش Sottocasa و همکاران (1967) انجام شد. محلول سنجش، در حجم نهایی 0/5 میلی-لیتر، حاوی 56 میلی‌مولار Tris-HCl (pH برابر 7/5)، 5/6 میلی‌مولار اگزالوستات و 0/1 میلی‌مولار NADH می‌باشد. واکنش آنزیمی با افزودن 10 میکرولیتر هموزن میتوکندریایی آغاز شده و سرعت کاهش جذب، در نتیجه اکسیداسیون NADH، در 340 نانومتر و با استفاده از ضریب خاموشی  $6/22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  اندازه‌گیری شد.

**آنالیز تاثیر مهاری رزوراترول بر روی نفوذپذیری غشاء میتوکندریایی توسط حدواسط‌های الیگومری لیزوزیم:** این آزمایش به دو روش انجام شد. در روش A، رزوراترول در غلظت‌های مختلف (0 تا 50 میکرومولار) به مدت 30 دقیقه با هموزن میتوکندریایی (در غلظت نهایی 1 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در دمای 30 درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و پس از اضافه نمودن نمونه‌های مونومری و یا حدواسط‌های الیگومری در غلظت نهایی 25 میکرومولار، میزان رهاشدن آنزیم‌های AK و MDH مورد سنجش قرار گرفت. در روش B، در ابتدا رزوراترول با نمونه‌های مونومری و یا حدواسط‌های الیگومری در غلظت نهایی 25 میکرومولار به مدت 30 دقیقه انکوبه شد و سپس به هموزن میتوکندریایی اضافه شده و میزان رهاشدن آنزیم-های مورد نظر مورد سنجش قرار گرفت.

**آنالیز آماری:** کلیه آزمایشات در سه زمان متفاوت و با 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.  $p < 0/01$  و  $p < 0/05$  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 تخم مرغ طبق روش ذکر شده در قسمت روش‌ها در غلظت 1 میلی‌مولار و دمای 57 درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. به منظور تعیین کینتیک شکل‌گیری حدواسط‌ها و تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی، نشر فلورسانس ThT نمونه‌های پروتئینی انکوبه شده در روزهای مختلف خوانده شد (شکل 2).

کدام از تیوب‌ها، به مدت 10 دقیقه نمونه‌ها در دور 6900 سانتریفیوژ شدند. رسوب میتوکندریایی جمع‌آوری شده انتهایی در غلظت 10 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در نیتروژن مایع نگهداری گردید (Kristian، 2010). انسجام غشاء میتوکندریایی به وسیله سنجش میزان فعالیت آنزیم‌های شاخص میتوکندری شامل ملات دئیدروژناز، گلوتامات دئیدروژناز، سیتراز سنتاز و آدنیلات کیناز مورد تأیید قرار گرفت (Golestani و همکاران، 2007). غلظت پروتئین با روش Lowry اندازه‌گیری شد (Lowry و همکاران، 1951).

**آنالیز تاثیر حدواسط‌های الیگومری لیزوزیم بر روی نفوذپذیری غشاء میتوکندریایی:** مقدار 200 میکرولیتر از هموزن‌های میتوکندریایی (با غلظت یک میلی‌گرم بر میلی-لیتر) با نمونه‌های الیگومری، حدواسط‌های الیگومری و فیبریل‌های آمیلوئیدی پروتئین لیزوزیم در غلظت نهایی 25 میکرومولار (و با محلولی آبی HCl با pH برابر 1/6 به-عنوان شاهد) مخلوط شده و بلافاصله ورتکس گردید. سپس نمونه‌ها به مدت 30 دقیقه در حمام آب گرم و دمای 30 درجه سانتی‌گراد انکوبه شده و در نهایت به مدت 15 دقیقه در دور 21000 سانتریفیوژ شدند. به منظور بررسی اثرات مخرب احتمالی نمونه‌های مختلف پروتئینی بر ساختار و نفوذپذیری غشاء میتوکندری، محلول‌روئی حاصل جمع‌آوری شده و آزاد شدن آنزیم‌های میتوکندریایی اندازه-گیری شد. آنزیم‌های مورد بررسی شامل آدنیلات کیناز (AK)، آنزیم شاخص فضای بین دو غشاء میتوکندری و آنزیم ملات دئیدروژناز (MDH) آنزیم موجود در ماتریکس میتوکندری می‌باشند. همچنین تریتون X-100، در غلظت نهایی 0/5 %، به عنوان شاهد مثبت برای بیشینه آزاد شدن آنزیم‌های میتوکندریایی مورد استفاده قرار گرفت. نتایج حاصل به صورت درصدی از بیشینه فعالیت آنزیمی اندازه-گیری شده در محلول روئی، آزاد شده توسط تریتون X-100، و با استفاده از معادله زیر محاسبه گردید:

**(فعالیت آنزیمی نمونه شاهد-فعالیت آنزیمی سنجش شده)**

**(فعالیت آنزیمی نمونه شاهد-فعالیت آنزیمی ماکزیم)**

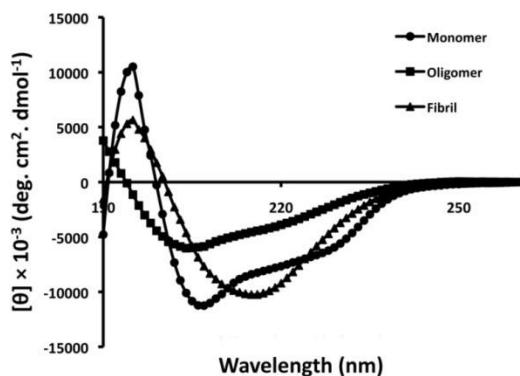
در مورد آنزیم AK، از آن‌جائی‌که تریتون X-100 با فعالیت آنزیم لوسیفراز تداخل می‌کند، میزان فعالیت این آنزیم نسبت به شاهد محاسبه گردید (Meratan و همکاران، 2011).

**سنجش میزان فعالیت آنزیم‌های میتوکندریایی:**

سنجش فعالیت آنزیم AK به روش اسپکتروفلومینومتری و با توجه به روش Wu و همکاران (2001) و با اعمال تغییرات اندکی انجام شد. بدین‌منظور، مقدار 20 میکرولیتر از محلول‌روئی میتوکندری به 27 میکرولیتر از مخلوط واکنش (50 میلی‌مولار بافر Tris-HCl و 20 میلی‌مولار  $\text{MgCl}_2$ ، pH برابر 7/4) اضافه شده و سپس مقدار 20 میکرولیتر از محلول 0/5 میلی‌مولار ADP به آن اضافه شد. محلول حاصل به مدت 5 دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه شده و سپس 3 میکرولیتر محلول 20 میلی‌مولار D-لوسیفربین (که حاوی 40 میلی‌مولار  $\text{MgSO}_4$  می‌باشد) و بدنبال آن 5 میکرولیتر آنزیم لوسیفراز (با غلظت 20 میکروگرم بر میلی‌لیتر) بدان اضافه شده و بلافاصله سیگنال لومینسانس



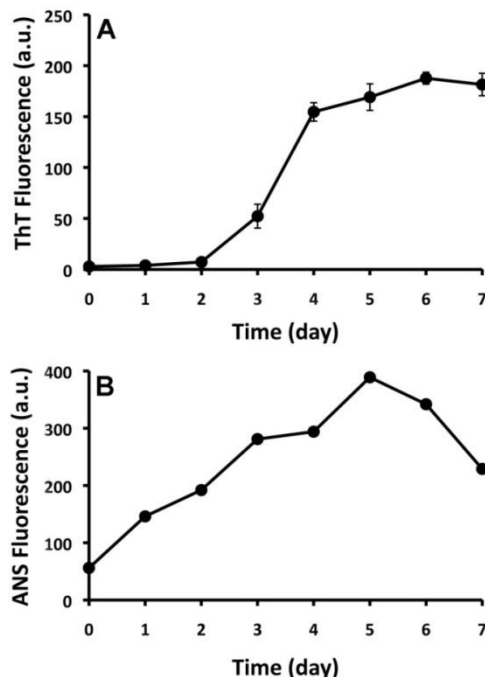
208 و 225 نانومتر مشخص می‌گردد) به حالت باز شده جزئی می‌باشد که مشخصه حدواسط‌های الیگومری است.



شکل 3: طیف دورنگ نمای دورانی لیزوزیم در طی روند تشکیل تجمعات آمیلوئیدی

تغییرات ساختار دوم پروتئین در زمان‌های مختلف (0 (مونومر)، 2 روز (الیگومر) و 7 روز (فیبریل) نشان داده شده است. تداوم انکوباسیون در زمان‌های طولانی (تا 7 روز) با ایجاد پیک جدیدی در ناحیه 218 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 2 روزه و فیبریل‌های آمیلوئیدی مورد بررسی قرار گرفت. همان‌طور که در شکل 4 نشان داده شده است، انکوباسیون میتوکندری‌ها با حدواسط‌های الیگومری



شکل 2: فرایند آمیلوئید شدن پروتئین لیزوزیم سفیده تخم مرغ

(A) کینتیک تشکیل تجمعات آمیلوئیدی که با نشر فلورسانس ThT در طول موج 485 نانومتر همراه است. (B) تغییرات نشر فلورسانس ANS در طی روند تشکیل تجمعات آمیلوئیدی.

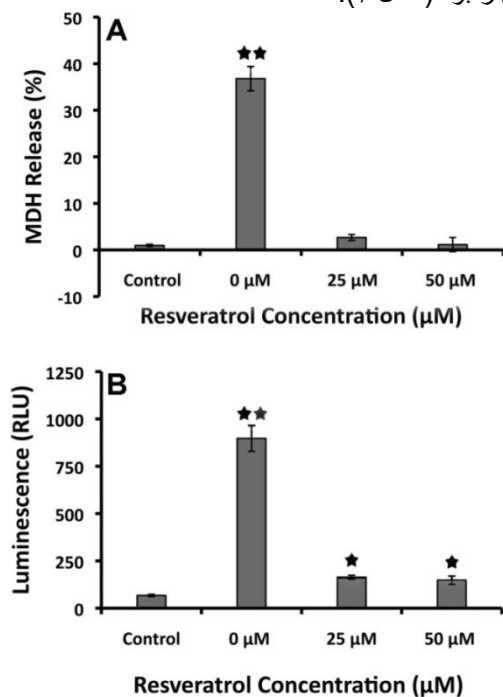
همان‌طور که در شکل 2 مشخص است، روند تغییرات نشر بیشینه فلورسانس ThT در طول موج 485 نانومتر نسبت به زمان از مدل سیگموئیدی پیروی می‌کند. از نظر کینتیکی بیشینه حدواسط‌های الیگومری، که توانایی اتصال آن‌ها به ThT اندک و سیگنال فلورسانس ضعیفی دارند، در ابتدای مرحله رشد سریع قرار دارند که در آزمایشات ما برابر 2 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 2). 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 5 و بدنبال آن کاهش میزان هیدروفوبیسیته سطحی می‌باشد (شکل 2). علت این کاهش هیدروفوبیسیته می‌تواند به دلیل رشد گونه‌های پیش فیبریلی و اتصال جانی 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 نمای دورانی استفاده شد. همان‌طور که در شکل 3 نشان داده شده است انکوباسیون به مدت 2 روز همراه با انتقال ساختاری از حالت طبیعی پروتئین (که با پیک‌های موجود در ناحیه



### شکل 5: وابستگی رهاشدن آنزیم MDH به غلظت حدواسط‌های الیگومری پروتئین لیزوزیم

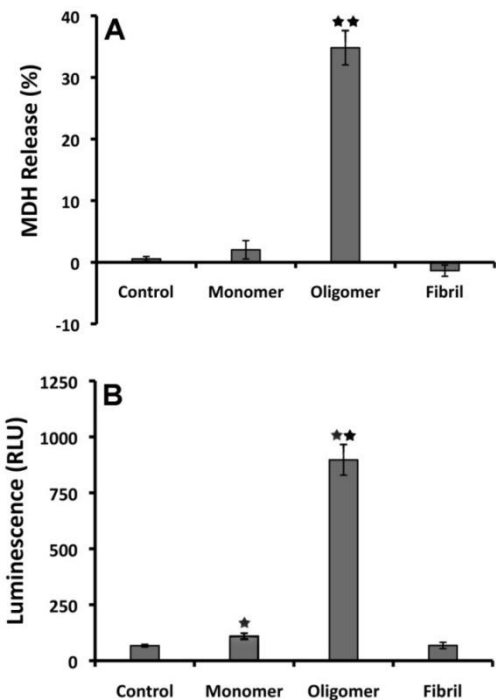
نتایج میانگین سه تکرار مستقل می‌باشد.

**بررسی اثر محافظتی رزوراترول بر رهاشدن آنزیم‌های میتوکندریایی توسط حدواسط‌های الیگومری:** مطالعات زیادی نشان می‌دهد که ترکیبات پلی فنولی قادر به حفاظت غشاءهای فسفولیپیدی در برابر سمیت حدواسط‌های الیگومری مربوط به پروتئین‌های مختلف می‌باشند. بنابراین در ادامه این مطالعه اثر غلظت‌های مختلف رزوراترول بر رها شدن آنزیم‌های میتوکندریایی توسط حدواسط‌های الیگومری مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از اثر غلظت‌های مختلف رزوراترول بر رهاشدن آنزیم‌های میتوکندریایی در دوروش A و B در شکل‌های 6 و 7 نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل 6 مشخص می‌باشد انکوباسیون هموزن‌های میتوکندریایی با غلظت‌های مختلف رزوراترول قبل از اضافه نمودن حدواسط‌های الیگومری (روش A) به‌طور قابل توجهی میزان رهاشدن آنزیم‌های میتوکندریایی را کاهش داد به‌طوری‌که در غلظت 50 میکرومولار رزوراترول رهاشدن آنزیم‌ها تا بیش از 95% مهار گردید. بنابراین در روش B غلظت 50 میکرومولار رزوراترول به‌عنوان غلظت بهینه استفاده شد. انکوباسیون اولیه حدواسط‌های الیگومری با غلظت 50 میکرومولار رزوراترول قبل از افزودن هموزن میتوکندریایی (روش B) اگرچه باعث کاهش نسبی در میزان رهاشدن آنزیم MDH گردید، ولی این کاهش در روش A به‌طور قابل توجهی بیش‌تر بود (شکل 7).



### شکل 6: بررسی اثر مهار رزوراترول بر میزان رهاشدن آنزیم‌های میتوکندریایی

بدین‌منظور هموزن‌های میتوکندریایی ابتدا با غلظت‌های مختلف

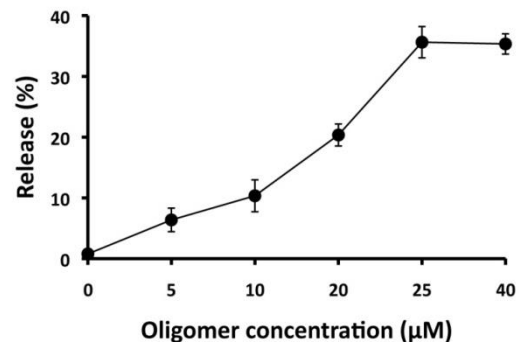


### شکل 4: رها شدن آنزیم‌های میتوکندریایی پس از انکوباسیون با گونه‌های مونومری، الیگومری و فیبریلی پروتئین لیزوزیم

(A): رها شدن آنزیم MDH که میزان رها شدن آنزیم به‌صورت درصدی از بیشینه رها شدن آنزیم توسط تراکتون X-100 بیان شده است. (B): رها شدن آنزیم AK که نسبت به بافر (به‌عنوان 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.

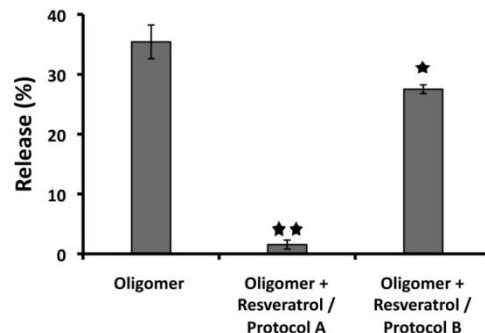
موجب رها شدن آنزیم‌های میتوکندریایی گردید درحالی‌که نمونه‌های مونومری و فیبریلی‌های آمیلوئیدی تاثیری بر رهاشدن آنزیم‌های مورد بررسی نداشتند.

علاوه بر این، رها شدن آنزیم‌های میتوکندریایی توسط حدواسط‌های الیگومری وابسته به غلظت می‌باشد، به گونه‌ای که با افزایش غلظت گونه‌های الیگومری میزان رهاشدن آنزیم MDH نیز افزایش می‌یابد (شکل 5). از آن‌جایی‌که بیشینه رهاشدن آنزیم MDH در غلظت 25 میکرومولار حدواسط‌های الیگومری مشاهده شد، این غلظت برای آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفت.



توانائی برای اتصال به غشاهای میتوکندریائی و تخریب آن‌ها می‌باشند (Khurana و همکاران، 2003؛ Kremer و همکاران، 2000). با توجه به نتایج ذکر شده در بالا و با علم به این مطلب که غشاهای 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 به‌طور عمده در جهت شناسائی ترکیبات و ملکول‌هایی می‌باشد که به‌واسطه اتصال به این حدواسط‌های پروتئینی و یا از طریق اینترکشن با غشاهای بیولوژیک و پایدارسازی آن‌ها، سمیت حدواسط‌های الیگومری را مهار می‌کنند. بدیهی است که شناسائی این ترکیبات روشی موثر در درمان بیماری‌های مرتبط با تجمعات پروتئینی است. در بین ترکیبات طبیعی مورد مطالعه، پلی‌فنول‌ها از اهمیت به‌سزائی برخوردارند. پلی‌فنول‌ها گروهی از ترکیبات آروماتیک هستند که به وفور در گیاهان و رژیم غذایی روزانه وجود دارند (Manach و همکاران، 2004). علاوه بر این، خواص مفید آنتی‌بیوتیکی، ضدالتهابی و ضدسرطانی این ترکیبات از مدت‌ها قبل مورد مطالعه و به‌اثبات رسیده است (Scalbert و همکاران، 2005). همچنین بسیاری از مطالعات انجام شده در سال‌های اخیر نشان می‌دهد که پلی‌فنول‌ها ترکیباتی موثر در حفاظت غشاهای فسفولیپیدی و من جمله غشاء میتوکندری در برابر تجمعات پروتئینی حاصل از پپتیدهای بتا آمیلوئید و آلفا سینوکلئین می‌باشند (Caruana و همکاران، 2012؛ Gauci و همکاران، 2011؛ Arora و همکاران، 2000). نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که رزوراترول به‌طور موثری روند آزاد شدن آزریم‌های میتوکندریائی توسط حدواسط‌های الیگومری را مهار می‌کند (شکل 6 و 7). به‌منظور مشخص نمودن مکانیسم مهار رزوراترول علیه تخریب غشاء میتوکندری‌های مغز موش توسط حدواسط‌های الیگومری، دو سری آزمایش طراحی شد. در روش A، هموزن‌های میتوکندریائی قبل از این‌که 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 میتوکندریائی با رزوراترول انکوبه شدند: در این روش رزوراترول به‌واسطه 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 6 و 7). بنابراین این‌گونه به‌منظر می‌رسد که رزوراترول به‌واسطه اتصال به غشاء میتوکندری و اثر پایدارکنندگی خود بر روی آن، مانع از نفوذ حدواسط‌های الیگومری در غشاء میتوکندریائی شده و بدین ترتیب مانع افزایش نفوذپذیری آن

رزوراترول (0، 25 و 50 میکرومولار) انکوبه شده و سپس در معرض غلظت 25 میکرومولار حدواسط‌های الیگومری قرار گرفته و میزان رهاسدن آزریم‌های MDH (A) و AK (B) مورد سنجش قرار گرفت. \*،  $p > 0/05$  و \*،  $p > 0/01$  معنی‌دار بودن تغییرات مشاهده شده را نسبت به شاهد نشان می‌دهد.



شکل 7: بررسی اثر مهار غلظت 50 میکرومولار رزوراترول بر رهاسدن آزریم MDH توسط حدواسط‌های الیگومری (غلظت 25 میکرومولار) با استفاده از روش‌های A و B \*،  $p > 0/05$  و \*،  $p > 0/01$  معنی‌دار بودن تغییرات مشاهده شده را نسبت به شاهد نشان می‌دهد.

## بحث

به‌طور کلی تخریب و افزایش نفوذپذیری غشاهای بیولوژیک (اعم از غشاء سیتوپلاسمی یا غشاء اندامک‌های درون سلولی) توسط حدواسط‌های الیگومری به‌عنوان مکانیسم اولیه دخیل در سمیت و مرگ سلولی در بسیاری از بیماری‌های تحلیل برنده سیستم عصبی مطرح می‌باشد. این‌گونه به‌منظر 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، 2011؛ Wang و همکاران، 2011؛ Bieschke و همکاران، 2010). در این راستا نتایج حاصل از نشر فلورسانس ANS نشان می‌دهد که نمونه‌های روز 2 دارای سطح بالائی از هیدروفوبیسیته می‌باشند (شکل 2)، 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 7) کاهش چشمگیر در میزان هیدروفوبیسیته سطحی نمونه‌های پروتئینی مشاهده می‌گردد که این امر منجر به کاهش توانایی این ساختارهای فیبریلی برای اینترکشن با غشاء میتوکندریائی می‌شود (شکل 2). 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 2 و 3)، توانائی الیگومرها را برای اینترکشن و افزایش نفوذپذیری غشاء میتوکندریائی افزایش داده و در نتیجه منجر به رهاسدن آزریم‌های میتوکندریائی می‌گردد (شکل 4). حال آن‌که نمونه‌های فیبریلی به‌دلایل پوشیده شدن سطوح هیدروفوب آن‌ها فاقد



- در
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  $\alpha$ -synuclein and amyloid- $\beta$  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  $\alpha$ -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-Tegu, 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 cultures using in vitro tests. *Life sciences*. Vol. 61, No. 21, pp: 2103-2110.
  10. **Franke, W.W.; Schmid, E.; Grund, C.** می شود. گزارشات زیادی مبنی بر اثرات پایدارکنندگی پلی-فنول ها بر روی غشاءهای فسفولیپیدی وجود دارد. به نظر می رسد که پلی فنول ها به واسطه اینترکشن و نفوذ در غشاءهای فسفولیپیدی و کاهش میزان سیالیت آن ها، باعث افزایش سختی و استحکام آن ها شده و بدین ترتیب نفوذ عوامل مخرب و آسیب رسان به درون غشاء فسفولیپیدی را مهار می کنند (Camilleri و همکاران، 2013؛ Margina و همکاران، 2012؛ Hendrich، 2006). رزوراترول پلی-فنول غالب در انگور می باشد که گزارشات زیادی مبنی بر خواص ضدآمیولینوژنیک آن وجود دارد (Vingtdeux و همکاران، 2008؛ Marambaud و همکاران، 2005). این پلی فنول همچنین دارای خواص آنتی اکسیدانی، ضدسرطانی، ضدالتهابی بوده و در درمان سکتة مغزی موثر می باشد (Scalbert و همکاران، 2005). بسیاری از مطالعات انجام شده در سال های اخیر نشان می دهد که پلی فنول ها و از جمله رزوراترول به واسطه اتصال و اینترکشن با غشاء میتوکندری خواص محافظتی خود را اعمال می کنند (Li و همکاران، 2012؛ Lagoa و همکاران، 2011؛ Yousuf و همکاران، 2009). به عنوان مثال Zinia و همکاران (2002) نشان دادند که رزوراترول به 3 طریق (خاصیت آنتی اکسیدانی، عمل بر روی کمپلکس شماره III و اثر پایدارکنندگی خود بر روی غشاء میتوکندریایی) اثرات محافظتی خود بر میتوکندری را اعمال می کند. بنابراین این گونه می توان نتیجه گرفت که اگرچه رزوراترول به واسطه مکانیسم های مختلفی اثرات محافظتی خود را در سلول اعمال می کند ولی اینترکشن آن با غشاءهای زیستی و به خصوص غشاء میتوکندری نقش اساسی در محافظت سلول و میتوکندری، بر علیه عوامل و شرایط آسیب رسان را دارد. در این مطالعه برای اولین بار اثرات حفاظتی رزوراترول بر غشاء میتوکندری مغز موش در برابر سمیت حدواسطه های الیگومری پروتئین لیوزوزیم سفیده تخم مرغ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این مطالعه پیشنهاد می کند که رزوراترول عمدتاً به واسطه اثرات پایدارکنندگی خود بر غشاء میتوکندری، آن را در برابر حدواسطه های الیگومری سمی پروتئین لیوزوزیم محافظت می کند. بنابراین استفاده از رزوراترول به عنوان یک ترکیب دارویی روش کارآمد و مناسبی در درمان آسیب های میتوکندری در بیماری های تحلیل برنده سیستم عصبی می باشد. با این حال مطالعات بیشتری جهت شناسایی مکانیسم دقیق اینترکشن رزوراترول با غشاء میتوکندری و چگونگی اعمال اثرات محافظتی این ملکول، مورد نیاز می باشد.
- منابع**
1. **Arif, W.; Xu, S.; Isailovic, D.; Geldenhuys, W.J.; Carroll, R.T. and Funk, M.O., 2011.** Complexes of the outer mitochondrial membrane protein mitoNEET with resveratrol 3-sulfate. *Biochemistry*. Vol. 50, No. 25, pp: 5806-5811.





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  $\beta$ -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.
29. **Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C. and Jiménez, L., 2004.** Polyphenols: food sources and bioavailability. **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 biological effects of some polyphenolic compounds. *Acta Pharmacologica Sinica*. Vol. 27, No. 1, pp: 27-40.



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  $\alpha$ -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 fibrils. *Biochemical and biophysical research communications.* Vol. 415, No. 4, pp: 675-679.
- 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- $\beta$  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.; Nikkhah, M.; Meratan, AA.; 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  $\gamma$ -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.; Dechongkit, 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* Vol. 101, No. 9, pp: 2817-2822.



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.; Bertellic, 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.

