

سنتر و شناسایی یک ترکیب آروماتیک جدید به عنوان مهارکننده تجمعات آمیلوئیدی لیزوزیم

حسن رامشینی^{۱*}، شهریار سعیدیان^۲، لیلیا ناظمیان^۳

۱. دانشیار بیوشیمی، گروه علمی زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
۲. استادیار بیوشیمی، گروه علمی زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
۳. دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه علمی زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

چکیده

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۱/۰۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۲۴

زمینه و هدف بیماری‌های تحلیل‌برنده سیستم عصبی به دلیل عواملی همچون افزایش جمعیت سالمندان، افزایش طول عمر و فقدان داروهای مؤثر، معضلی جهانی است. به نظر می‌رسد مولکول‌های دارای حلقه‌های آروماتیک به‌وسیله مهار یا تغییر تجمع آمیلوئیدی و مانع شدن از ایجاد الیگومرها و فیبریل‌ها که عامل به‌وجودآورنده این بیماری‌ها هستند، نقش محافظت‌کننده از نوروها را ایفا می‌کنند. در پژوهش حاضر، اثرات مهارتی ۳، ۵ و تری‌فنیل‌بنزن، به‌عنوان مولکول آروماتیک، روی تجمع و سمیت لیزوزیم بررسی شد.

مواد و روش‌ها لیزوزیم با غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در بافر گلیسین ۵۰ میلی‌مولار و شرایط اسیدی حل شد و سپس در دمای ۵۷ درجه برای مدت مشخصی در حضور یا غیاب تری‌فنیل‌بنزن قرار داده شد. اثر مهارتی این ترکیب بر لیزوزیم با استفاده از تکنیک‌هایی مثل میکروسکوپ نیروی اتمی، تیوفلاوین T، قرمز کنگو و سنجش MTT مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها این ترکیب قادر به مهار تجمع لیزوزیم به‌صورت وابسته به غلظت و با IC_{50} برابر ۰/۱ میکرومولار است. مطالعه سینتیکی این ترکیب باعث طولانی شدن فاز تأخیر و کاهش فاز تعادل شد و همچنین سمیت تجمعات لیزوزیم در حضور این ترکیب کاهش معناداری ($p = ۰/۰۲۵$) یافت.

نتیجه‌گیری این مشاهدات نشان داد که تری‌فنیل‌بنزن قادر به وارد شدن به بخش مستعد تولید آمیلوئید در مراحل اولیه تشکیل تجمع است و باعث مهار تشکیل آن می‌شود.

کلیدواژه‌ها:

لیزوزیم، تجمع آمیلوئیدی، سمیت سلولی، تری‌فنیل‌بنزن.

۱. مقدمه

شروع دیابت در بزرگسالان با عنوان دیابت نوع ۲ یا دیابت شیرین نیز نقش دارد. [۲] با اینکه فیبرهای آمیلوئیدی توسط پروتئین‌های مختلف به‌وجود می‌آید، همه آن‌ها معماری مولکولی مشابهی به‌نام موتیف Cross- β دارند که در آن، زنجیره‌های پلی‌پپتیدی به‌صورت صفحات بتای

تجمع نابجای پروتئین‌ها و تشکیل رسوبات آمیلوئیدی اساس حدود ۲۵ بیماری تحلیل‌برنده سیستم عصبی در انسان مثل بیماری‌های آلزایمر، پارکینسون، هانتینگتون و کروتزفلد - ژاکوب^۱ است. [۱] رسوبات آمیلوئیدی در

1. Cruetzfeldt-Jacob

* نویسنده مسئول: حسن رامشینی

نشانی: گروه علمی زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

دورنگار: ۰۵۱۴۴۴۴۱۷۸۸

تلفن: ۰۵۱۴۴۴۴۴۰۱۲

رایانه: ramshini@alumni.ut.ac.ir

شناسه ORCID: 0000-0002-6615-2651

شناسه ORCID نویسنده اول: 0000-0002-6615-2651

مجله علمی - پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دوره ۲۷، شماره ۱، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۹، ص ۶۳-۵۵

آدرس سایت: <http://jsums.medsab.ac.ir> رایانه: journal@medsab.ac.ir

شاپای چاپی: ۱۶۰۶-۷۴۸۷

بهینه بین این دو حلقه (۶-۱۹ آنگستروم) در کارایی مهارای آن بر روی تجمع پروتئین‌ها نقش دارد. [۸، ۱۲] به‌منظور شناسایی مهارکننده‌های مؤثر فرایند تجمع آمیلوئیدی، ترکیبات هتروسیکلیک متعددی بررسی شده است؛ از جمله این مواد می‌توان کلیوکوینول^۲، اپیگالوکاتچین^۳ و کومارین^۴ [۱۳-۱۵] را نام برد. همان‌طور که قبلاً گفته شد، اثربخشی مولکول‌های آروماتیک به نوع حلقه‌ها، تعداد آن‌ها و گروه‌های جانبی متصل به حلقه بستگی دارد. نویسندگان در پژوهش‌های قبلی خود، نقش ترکیبات آروماتیک تک‌ایندولی [۱۶] و دوایندولی و مشتقات مختلف آن [۱۷] را در مهار تجمع آمیلوئیدی بررسی کرده‌اند. در مطالعه حاضر اثر یک ترکیب چهارحلقه‌ای متشکل از سه حلقه آروماتیک فنیل بنزن که با یک پیوند کووالانسی به سه جایگاه فنیل بنزن مرکزی متصل شده است، با عنوان ۱، ۳ و ۵ تری فنیل بنزن بررسی شد. هدف اصلی این پژوهش بررسی نقش ساختار متفاوت ترکیبات آروماتیک از نظر تعداد حلقه‌ها و آرایش حلقه‌های آروماتیک در میزان مهار فرایند تجمع و نقش آن در کاهش سمیت سلولی تجمعات بعد از اثر آن بر فیبرهای آمیلوئیدی لیزوزیم (به‌منزله یک پروتئین مدل تحت عنوان پروتئین) است. در این مطالعه، از لیزوزیم برای بررسی مهار تجمع آمیلوئیدی استفاده شد؛ چراکه این پروتئین به‌راحتی در شرایط مختلف دناتوره‌شوندگی^۵ از جمله در دمای بالا به فیبر تبدیل می‌شود و مکانیسم تشکیل فیبر و ساختار آن به‌خوبی شناخته شده است.

۲. مواد و روش‌ها

لیزوزیم با کد EC 3.2.1.17، کنگو رد، تیوفلاوین T و تمام بافرها از شرکت سیگما خریداری شد. تمام مواد دیگر جهت سنتز از شرکت مرک تهیه شد. ترکیب سنتز شده به‌وسیله مقایسه داده‌های طیفی و فیزیکی با اطلاعاتی که قبلاً در مقالات گزارش شده بود، مورد تأیید قرار گرفت.

۲.۱. سنتز ترکیب ۱، ۳ و ۵ تری فنیل بنزن

این ترکیب در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه حکیم سبزواری سنتز شد. به‌طور خلاصه استوفن (۱ میلی‌مول) و ۱۵ میلی‌گرم HPA/NCP (که سطوح آن‌ها قبلاً تغییر داده شده بود) به یک لوله آزمایش اضافه شد و مخلوط حاصل به مدت ۲/۵ ساعت در دمای ۱۰۰ درجه به آرامی هم زده شد. بعد از کامل شدن واکنش و تأیید به‌وسیله TLC

موازی یا ضد موازی درمی‌آید و به‌شکل عمود حول محور اصلی فیبر آمیلوئیدی می‌پیچد. [۳] امروزه مشخص شده است که افزایش تولید پپتید A β و تجمع آن عامل اصلی ایجاد بیماری آلزایمر است. [۴] آلزایمر بیماری‌ای مزمن و پیچیده است که چهارمین عامل مرگ‌ومیر و تقریباً ۴۰-۵۰ درصد زوال عقل در دنیا به‌شمار می‌رود. [۵] تقریباً ۱۰ درصد افراد بالای ۶۵ سال به این بیماری مبتلا بوده و اعتقاد بر این است که حدود ۳۰,۰۰۰,۰۰۰ نفر در دنیا با این بیماری دست‌وپنجه نرم می‌کنند. [۵] تاکنون دارویی عرضه نشده که بتواند هم مانع تشکیل رسوبات آمیلوئیدی در مغز شود و هم رسوبات ازپیش تشکیل شده را حذف کند؛ اما درمورد مکانیسم‌های مولکولی منجر به این بیماری پیشرفت معناداری حاصل شده است. تحقیقات درون‌تنی و برون‌تنی دلالت بر این دارند که تولید بیش از حد پپتید A β و به‌تبع آن تجمع این پروتئین عامل اولیه سمیت سلولی در سلول‌های نورونی است. مطالعات گوناگون نشان می‌دهد کاهش سطح تولید A β و پایدارسازی فرم طبیعی این پروتئین، مهار تجمع آن و پاک‌سازی تجمعات ازپیش تشکیل شده استراتژی‌های درمانی امیدبخش برای درمان آلزایمر است. [۶] دانشمندان براساس مشاهداتی که نشان می‌دهد اسیدهای آمینه آروماتیک در پروتئین‌های مستعد تجمع از جمله پپتیدهای A β به‌وفور دیده می‌شود، پیشنهاد داده‌اند که نیروهای استکینگ پای^۱ بین زنجیره‌های جانبی اسیدهای آمینه آروماتیک باعث پایداری بنای فضایی فیبری پپتید A β می‌شود و نیروی پیش‌برنده قوی و مؤثری در تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی به‌شمار می‌رود. [۷-۸] برپایه مطالعات، ترکیباتی که دارای حداقل دو حلقه آروماتیک هستند، خاصیت ضدآمیلوئیدی دارند. [۹] دیگر پژوهش‌ها نیز نشان داده‌اند که تعداد حلقه‌های آروماتیک و گروه‌های متصل به این حلقه‌ها و همچنین جایگاه اتصال گروه‌های جانبی به حلقه‌ها در میزان تأثیرشان بر مهار تجمع پروتئین‌ها نقش دارند. [۱۰] از دیگر یافته‌های تحقیقات این است که پلی‌فنل‌ها شامل مولکول‌های کوچک دارای حلقه‌های فنیل در میوه‌ها و سبزیجات دارای اثرات مهار در بیماران آلزایمری و ناهنجاری‌های تحلیل‌برنده سیستم عصبی است. گرچه مکانیسم عمل این ترکیبات به‌درستی تبیین نشده، ساختار حلقوی گروه‌های فنیل به‌نظر می‌رسد متضمن ایفای چنین نقشی در پلی‌فنل‌ها است. [۱۱] مثلاً تحقیقات درباره کورکومین (ماده مؤثر زردچوبه) نشان می‌دهد دو گروه فنیل در دو انتهای این مولکول و یک فاصله

4. coumarin
5. denaturation

1. π - π stacking
2. clioquinol
3. epigallocatechin

۲.۶. بررسی سمیت با روش MTT

فیبرهای آمیلوئیدی طبق روش مذکور در حضور تری فنیل بنزن (با غلظت بهینه ۳ میکرومولار) و عدم حضور آن تهیه شد. سپس ویال‌های حاوی مواد فوق سانتریفیوژ شد و محلول رویی برداشته شد. به اندازه محلول رویی خارج شده، محیط کشت DMEM به بخش رسوبی ویال‌ها اضافه گردید و بخش رسوبی در آن حل شد. بعد از چندین بار سمپلینگ، ماده آماده تزریق بلافاصله به محیط کشت سلول‌ها اضافه و سمیت نمونه‌ها برای سلول در یک ظرف ۹۶ چاهکی به وسیله MTT سنجش شد. [۱۸]

۲.۷. آنالیز آماری

هر آزمایش حداقل سه بار به طور مستقل انجام و در هر بار هر کدام دست کم سه بار تکرار شد و تمام نمودارها به صورت میانگین $SD \pm Mean$ گزارش شد. داده‌ها با نرم افزار آماری SPSS (نسخه ۱۶) با استفاده از آزمون تی مستقل با ضریب اطمینان ۹۵ درصد تجزیه و تحلیل شد.

۳. یافته‌های پژوهش

مطالعات گوناگون نشان می‌دهد اسیدهای آمینه آروماتیک در ساختار پروتئین‌ها و پپتیدها به دلیل ایجاد پیوندهای استکینگ پای، آن‌ها را مستعد تجمع می‌کند. [۱۹] همچنین بر پایه تحقیقات دانشمندان، یک سری ترکیبات آروماتیک مصنوعی یا طبیعی مثل کورکومین، رزوراتول، اپیجنین و آپومورفین از طریق تخریب اندرکنش‌های $\pi-\pi$ قادرند از تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی و سمیت ناشی از آن‌ها جلوگیری کنند. [۸] در مطالعه حاضر، از یک ترکیب با چهار گروه آروماتیکی برای مهار تجمع این پروتئین استفاده شد.

۳.۱. تعیین غلظت بهینه و بررسی کینیتیک مهار تجمع فیبرهای لیزوزیم توسط تری فنیل بنزن در غلظت بهینه

همان‌طور که در بخش روش‌ها اشاره شد، یکی از شناساگرهای تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی استفاده از رنگ فلورسنت تیوفلاوین T است که در این روش، بر اثر اتصال این رنگ به فیبریل‌ها، با تحریک آن در طول موج ۴۴۰ نانومتر، شدت نشر بالایی در طول موج‌های بین ۴۴۵-۵۵۰ نانومتر دیده می‌شود. برای به دست آوردن بهترین غلظتی که ترکیب تری فنیل بنزن بتواند باعث مهار تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی گردد، فرایند تشکیل این فیبرها در دامنه غلظت ۰/۳-۲/۶ میکرومولار این ترکیب انجام و

دمای واکنش به ۲۵ درجه رسانیده شد و سپس اتانول داغ به مخلوط حاصل اضافه و به مدت ۵ دقیقه هم زده شد. کاتالیست موجود در مخلوط واکنش با فیلتراسیون از محیط واکنش حذف شد. محلول خارج شده از فیلتر تحت فشار تغلیظ شد. محلول تغلیظ شده از طریق کریستالیزاسیون مجدد در مخلوط اتانول و آب با نسبت ۳:۱ خالص و به وسیله TLC دوباره تأیید شد. ماده خالص تهیه شده به این روش به وسیله داده‌های طیفی و همچنین تعیین نقطه ذوب آن تأیید شد.

۲.۲. تشکیل تجمع پروتئین

ابتدا ۲۰ میلی گرم پودر پروتئین در بافر گلايسين ۵۰ میلی مولار، $pH = 2/5$ حل شد و به وسیله قرائت جذب ۲۸۰ نانومتر غلظت پروتئین محاسبه گردید. سپس از محلول پروتئینی فوق مقداری برداشت شد تا در بافر ۵۰ میلی مولار گلايسين با pH برابر ۲/۵ غلظت معادل ۲ میلی گرم بر میلی لیتر به دست آید. مخلوط حاصل در دمای ۵۷ درجه به مدت مشخص درحالی که به آرامی هم زده می‌شد، انکوبه گردید.

۲.۳. سنجش تیوفلاوین T

ابتدا یک محلول مادر ۲/۵ میلی مولار از تیوفلاوین T در بافر فسفات ۱۰ میلی مولار و نمک طعام ۱۵۰ میلی مولار با pH برابر ۷ تهیه و پس از عبور دادن از فیلتری با قطر ۰/۴۵ میکرومتر برای ادامه کار در دمای ۴ درجه ذخیره شد. در زمان‌های مختلف ۱۰ میکرولیتر نمونه پروتئینی و ۹۹۰ میکرولیتر از محلول تیوفلاوین T در یک سل کوارتز قرار داده شد. نشر فلورسانس آن بعد از تحریک در ۴۴۰ نانومتر ثبت گردید.

۲.۴. سنجش کنگورد

یک محلول مادر با غلظت ۲۰ میلی مولار در بافر فسفات ۵ میلی مولار با pH برابر ۷/۴ و شامل نمک طعام ۱۵۰ میلی مولار تهیه شد. سپس این محلول برای حذف ناخالصی‌ها فیلتر شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ذخیره گردید. در فاصله زمانی مشخص ۶۰ میکرولیتر از نمونه پروتئینی با ۴۴۰ میکرولیتر از محلول کنگورد ترکیب گردید و سپس طیف جذبی آن در دامنه ۴۰۰-۷۰۰ نانومتر ثبت گردید.

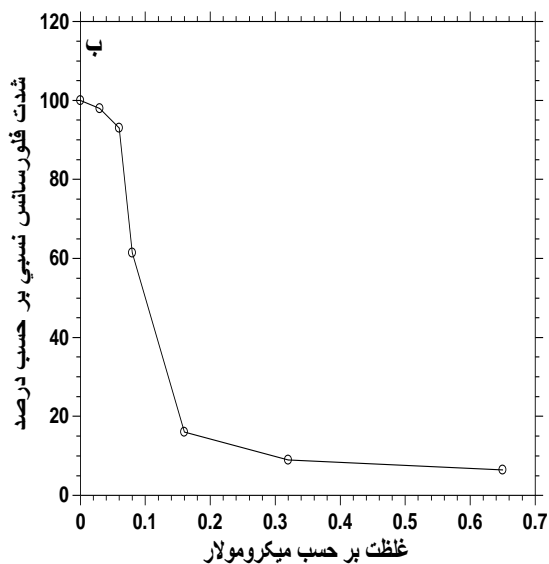
۲.۵. تهیه نمونه برای عکس برداری آمیلوئید توسط میکروسکوپ نیروی اتمی

مقدار ۱۰ میکرولیتر از نمونه حاوی فیبرهای آمیلوئیدی تشکیل شده بر روی قطعات کوچک از جنس میکا ریخته شد و بعد از پخش و خشک شدن آن، از دستگاه میکروسکوپ نیروی اتمی برای مشاهده مستقیم فیبرهای آمیلوئیدی تشکیل شده استفاده شد.

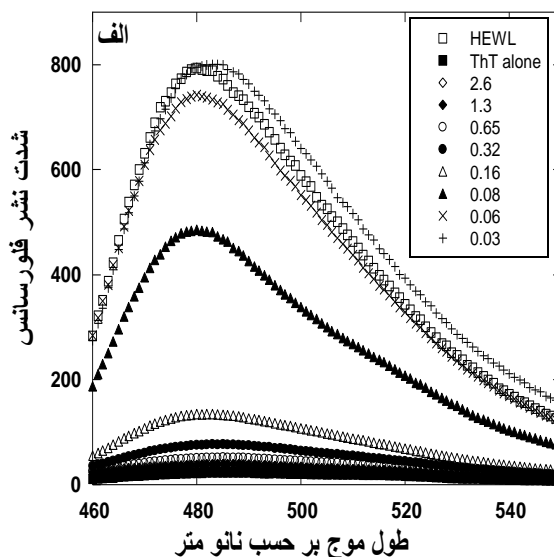
مرحله کینتیکی تشکیل تجمع (فاز تأخیر و فاز رشد سریع) مهار شده است. این شکل نشان می‌دهد که در حضور این ترکیب هم فاز تأخیر طولانی شده و هم به طور معناداری فاز فیبریلاسیون (فاز سریع) کاهش یافته و این هر دو نشانه عمل مهاری این ترکیب است.

۳.۲. بررسی جذب نوری کنگورد در حضور تری فنیل بنزن

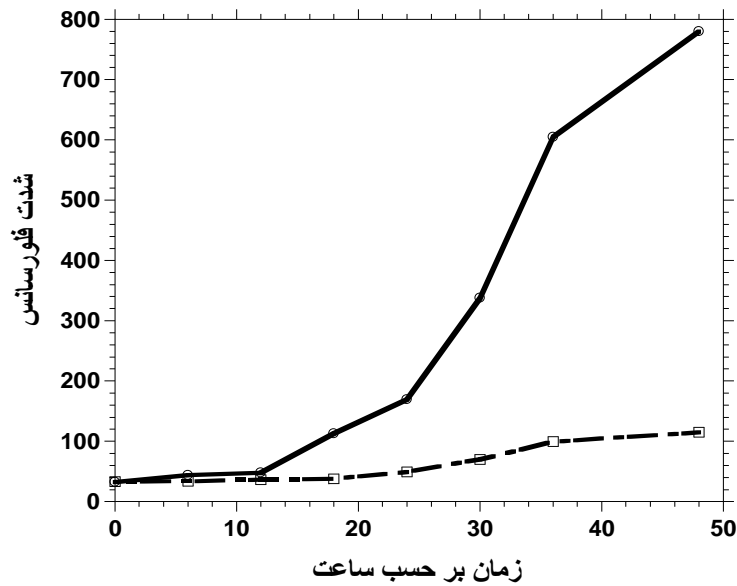
طیف جذبی کنگورد یکی دیگر از مارکرهای تشکیل فیبرهای آمیلوئید است. طیف جذبی تجمعات آمیلوئیدی نسبت به کنگورد به تنهایی افزایش می‌یابد و همچنین شیفت به راست پیدا می‌کند که این نشان‌دهنده حضور فیبرهای آمیلوئیدی در محیط است. پس از تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی در حضور یا غیاب ترکیب تری فنیل بنزن، طیف جذبی کنگورد آن‌ها به دست آمد. همان‌طور که شکل ۳ نشان می‌دهد، طیف جذبی (شدت جذب) فیبرهای آمیلوئیدی در حضور این ترکیب در غلظت بهینه (۰/۳۲ میکرومولار) نسبت به لیزوزیم و کنگورد به تنهایی کاهش یافت و طیف جذبی نیز به سمت چپ جابه‌جایی پیدا کرد که نشان‌دهنده کاهش تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی در حضور این مهارکننده است.



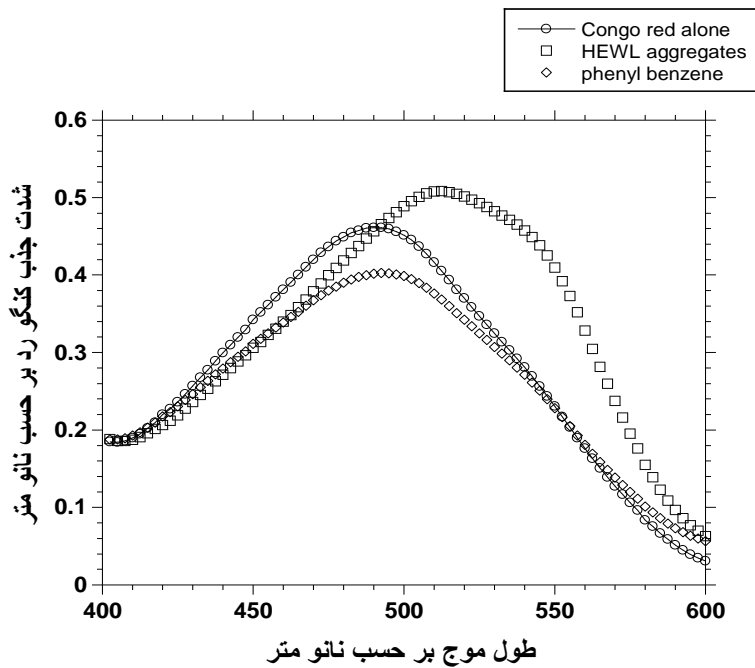
نتایج آن با بررسی شدت طیف فلورسانس ThT بررسی شد. همان‌طور که شکل ۱ الف نشان می‌دهد، اثر مهاری این ترکیب به صورت وابسته به غلظت است و بهترین غلظتی که بهترین اثر مهاری را نشان می‌داد، ۰/۳۲ میکرومولار بر میلی‌لیتر بود؛ زیرا تیوفلاوین T کمترین شدت نشر فلورسانس را در دامنه ۴۴۵-۵۵۰ نانومتر در این غلظت نشان داد. از طرف دیگر محاسبه IC_{50} ، یعنی غلظتی از این مهارکننده که ۵۰ درصد تشکیل فیبرهای لیزوزیمی را مهار می‌کند، ۰/۱ میکرومولار را نشان می‌دهد (شکل ۱ ب). کینتیک مهاری این تری فنیل بنزن در زمان‌های مختلف (دوره‌های شش ساعته) مورد بررسی قرار گرفت. روند تغییرات نشری تیوفلاوین T در طی زمان از مدل سیگموئیدی تبعیت می‌کند که شامل سه مرحله فاز تأخیری، مرحله رشد سریع و مرحله تعادلی انتهایی است. در فاز تأخیری که به آن مرحله هسته گذاری^۱ گفته می‌شود، هسته‌های اولیه تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی حاصل می‌شود و مرحله محدودکننده فرایند است و بعد از آن یک شدت نشر تصاعدی رخ می‌دهد. همان‌طور که در شکل ۲ مشخص است، در حضور این غلظت از تری فنیل بنزن، میزان شدت فلورسانس و تشکیل آمیلوئید بعد از ۴۸ ساعت به میزان چشمگیری کاهش یافته و هر دو



شکل ۱ الف: طیف شدت نشر فلورسانس تیوفلاوین T (ThT) لیزوزیم انکوبه شده در شرایط آمیلوئیدی (براساس بخش روش‌ها) در حضور و غیاب غلظت‌های مختلف تری فنیل بنزن (طیف نشر ThT به تنهایی نیز برای مقایسه آورده شده است)؛ ۱ ب: نمودار IC_{50} اثر تری فنیل بنزن در غلظت‌های مختلف بر مهار تجمع آمیلوئیدی لیزوزیم



شکل ۲. طیف نشر فلورسانس تیوفلاوین T، ۲ میلی گرم لیزوزیم انکوبه شده در دمای ۵۷ درجه و pH = ۲/۵ در غیاب تری فنیل بنزن (○) یا حضور آن (□) در زمان های مختلف



شکل ۳. شکل طیف جذبی کنگو رد، پیش (○) و پس (◇) از اضافه کردن ۰/۳۲ میکرومولار تری فنیل بنزن در شرایط تشکیل آمیلوئید. طیف جذبی کنگو رد به تنهایی جهت مقایسه نیز آورده شده است (□).

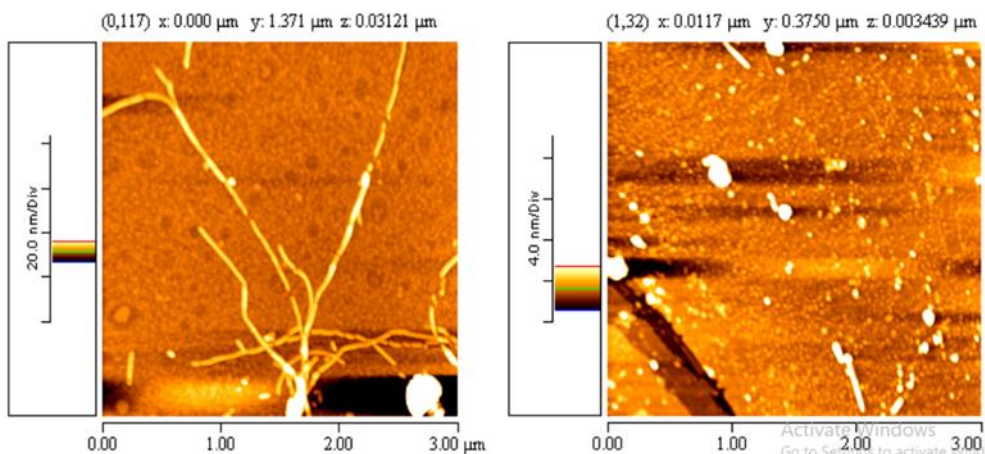
۳.۳. عکس برداری با میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM)

از روش های اثبات تشکیل یا مهار فیبرهای آمیلوئیدی است. به این منظور حدود ۱۰ میکرولیتر از فیبرهای تشکیل شده لیزوزیم در حضور و غیاب تری فنیل بنزن (با

عکس برداری با میکروسکوپ نوری یا نیروی اتمی یکی دیگر

فرایند تشکیل فیبرهای بالغ آمیلوئیدی متوقف و الیگومرها و هسته‌های اولیه مشاهده می‌شود.

غلظت بهینه) مورد بررسی قرار گرفت. مطابق شکل ۴، در غیاب تری فنیل بنزن، فیبرهای طولی و بدون شاخه آمیلوئیدی مشاهده می‌شود؛ اما در حضور تری فنیل بنزن

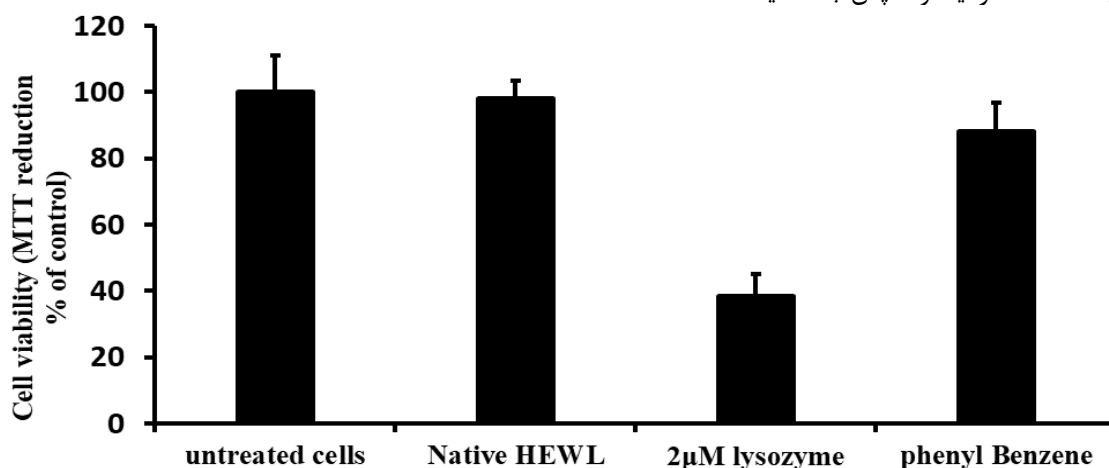


شکل ۴. تصویر میکروسکوپ نیروی اتمی ۲ میلی‌لیتر در بافر گلايسين با $\text{pH} = 2/5$ بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد در غیاب (تصویر سمت چپ) و حضور (تصویر سمت راست) تری فنیل بنزن

سلول‌های MCF7 در غلظت نهایی ۲ میکرومولار اضافه شد. توانایی این تجمعات برای تخریب عملکرد سلول‌ها با ارزیابی احیای MTT براساس توضیحاتی که در بخش مواد و روش‌ها داده شده، انجام گرفت؛ همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود.

۳.۴. کاهش سمیت فیبرهای آمیلوئیدی در حضور تری فنیل بنزن

هر دو تجمعات تشکیل‌یافته لیزوزیم در غیاب و حضور تری فنیل بنزن ابتدا در ۱۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد و بعد از دور ریختن محلول رویی به قسمت رسوب به همان حجم محیط فیزیولوژیک اضافه گردید و سپس به محیط کشت



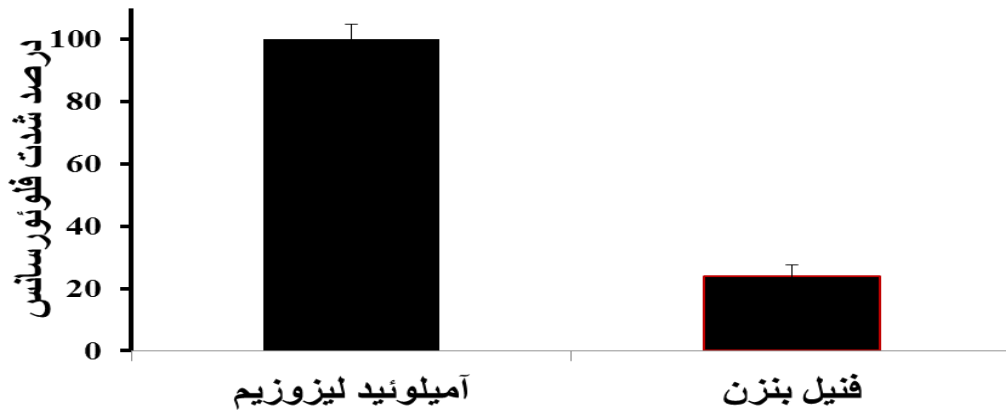
شکل ۵. زیستایی سلول‌های تیمار شده با ۲ میکرومولار فیبرهای آمیلوئیدی حاصل از لیزوزیم در غیاب یا حضور تری فنیل بنزن. زیستایی سلول‌هایی که با آمیلوئید لیزوزیم تیمار نشده‌اند، جهت کنترل آورده شده است. داده‌های حاصل میانگین دو بار آزمایش مستقل و هر بار، هر آزمایش چهار بار تکرار شده است ($p < 0.05$).

MTT در مقایسه با سلول‌های شاهد (که در مجاورت هیچ نوع

فیبرهای آمیلوئیدی لیزوزیم کاهش معناداری را در احیای

بنابراین، این ترکیب سمیت ناشی از فیبرهای آمیلوئیدی را کاهش می‌دهد و باعث جلوگیری از تخریب عملکرد سلول‌ها توسط فیبرهای آمیلوئیدی می‌شود.

تجمعی قرار نگرفته‌اند) نشان می‌دهد (به میزان ۶۱/۵ درصد کاهش) و تجمعات تشکیل شده در حضور فنیل بنزن (با غلظت بهینه) نشانگر حدود ۱۲ درصد کاهش احیای MTT است؛



شکل ۶. اثر ۰/۳۲ میکرومولار تری فنیل بنزن بر فیبرهای بالغ از پیش تشکیل شده

ستون سمت چپ آمیلوئید لیزوزیم بعد از ۴۸ ساعت در غیاب تری فنیل بنزن، و ستون سمت راست آمیلوئید لیزوزیم بعد از افزودن تری فنیل بنزن به فیبرهای از قبل تشکیل شده را نشان می‌دهد.

بین رشته‌های بتا (β -strand) در تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی تأثیر بگذارند. [۲۲] بنابراین، این مولکول‌های آروماتیک ممکن است برای بیماری‌هایی که منشأ آن‌ها تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی است، مانند آلزایمر، دارای اثر دارویی باشد. [۲۳] به همین دلیل پژوهش در زمینه یافتن مولکول‌های آروماتیک جدید که در این زمینه مؤثر باشد، از مسائل مورد علاقه محققان است.

هدف از تحقیق حاضر سنتز ترکیب فنیل بنزن و مطالعه نقش مهارکنندگی آن در تشکیل تجمعات لیزوزیم بود. ترکیب سنتز شده به صورت وابسته به غلظت توانست شدت فلورسانس تیوفلاوین T را کاهش دهد (شکل ۱). بهترین غلظت که بیشترین مهار را در این زمینه داشت (۰/۳۲ میکرومولار) انتخاب و کینتیک مهار تجمع مطالعه شد. مطابق شکل ۲، فنیل بنزن فاز هسته‌زایی را طولانی می‌کند و از این طریق زمان رسیدن به غلظت لازم برای تشکیل پروتو فیبریل‌ها و فیبرهای بالغ را طولانی و تشکیل آن‌ها را مهار می‌کند. همچنین تجمعات تشکیل شده لیزوزیم در حضور این ترکیب غیرسمی بوده (شکل ۵) و این منطبق بر مطالعه لادی والا و همکاران [۲۴] است که نشان داده‌اند تجمعات تشکیل شده در حضور این نوع از مولکول‌های آروماتیکی برای سلول‌ها غیرسمی است. مطالعات درباره ایندول‌ها اثبات می‌کند مشتقات مختلف آن می‌توانند تجمعات آمیلوئیدی با منشأ پروتئینی مختلف را مهار کنند. براساس نتایج این پژوهش‌ها، گروه ایندولی نقش اساسی در این

مهارکننده‌های مسیر تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی قادرند در مراحل مختلف تشکیل فیبر اختلال ایجاد کنند و مانع تشکیل این آمیلوئیدهای بالغ شوند. به منظور بررسی اینکه آیا فنیل بنزن بر فیبرهای بالغ آمیلوئیدی هم اثر می‌گذارد یا خیر، این ترکیب با غلظت نهایی ۰/۳۲ میکرومولار بعد از تشکیل فیبر بالغ (انکوباسیون این پروتئین در شرایط تولید آمیلوئید در غیاب فنیل بنزن) یعنی بعد از ۴۸ ساعت از شروع واکنش، به محیط واکنش اضافه شد. پس از اضافه کردن فنیل بنزن، ۲۴ ساعت دیگر نیز اجازه داده شد تا واکنش ادامه یابد. همان‌طور که شکل ۶ نشان می‌دهد، اضافه کردن این ترکیب باعث کاهش ۷۶ درصدی شدت فلورسانس و به تبع آن کاهش فیبر آمیلوئیدی گردید که بیانگر آن است نه تنها ترکیب فوق از ابتدا مانع تشکیل هسته‌های اولیه تجمع می‌شود و مسیر تولید فیبر آمیلوئیدی را متوقف می‌کند، بلکه به تخریب فیبرهای بالغ از پیش تشکیل شده نیز می‌پردازد.

۴. بحث و نتیجه‌گیری

براساس پژوهش‌ها، مولکول‌های آروماتیک برای مهار اتصالات بین پروتئینی بسیار کارآمد است. [۲۰] بعضی از این مولکول‌ها (مثل لیگاندها، سوبستراها و مهارکننده‌های آنزیمی) به‌طور ویژه به فرم طبیعی پروتئین‌ها متصل می‌شوند و آن‌ها را در مقابل تغییرات ساختاری در پروتئین‌ها پایدار می‌کنند [۲۱] و بعضی دیگر از آن‌ها می‌توانند به‌طور مستقیم با مداخله در استکینگ

و از تشکیل ساختارهای بالغ آمیلوئیدی جلوگیری کنند. [۱۷] به طور خلاصه داده‌های پژوهش حاضر نشان می‌دهد فنیل بنزن دارای نقش مهمی در تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی بوده و تجمع‌های آمیلوئیدی سمی را به تجمعات غیرسمی تبدیل می‌کند. بنابراین تحقیق بیشتر درباره این ترکیبات ممکن است به استفاده احتمالی آن‌ها به عنوان یک روش درمانی برای بیماری‌هایی با منشأ تشکیل رسوبات آمیلوئیدی در بافت‌های بدن منجر شود.

References

- [1]. Chiti F, Dobson CM. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease *Annu. Rev. Biochem.* 2006; 75: 222-66.
- [2]. Cao P, Abedini A, Raleigh DP. Aggregation of islet amyloid polypeptide: from physical chemistry to cell biology *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2013; 23: 82-9.
- [3]. Sawaya MR, Sambashivan S, Nelson R, Ivanova MI, Sievers SA, Apostol MI, Thompson MJ, Balbirnie M, Wiltzius JJ, McFarlane HT, Madsen A, Riekel C, Eisenberg D. Atomic structures of amyloid cross-beta spines reveal varied steric zippers *Nature.* 2007; 447: 453-7.
- [4]. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* 2002; 297: 353-6.
- [5]. Hamley IW. The amyloid beta peptide: a chemist's perspective. Role in Alzheimer's and fibrillization. *Chem Rev.* 2012; 112: 5147-92.
- [6]. Soto C, Saborido GP, Permanne B. Inhibiting the conversion of soluble amyloid-beta peptide into abnormally folded amyloidogenic intermediates: relevance for Alzheimer's disease therapy. *Acta Neurol Scand Suppl.* 2000; 176: 90-5.
- [7]. Gazit E. A possible role for pi-stacking in the self-assembly of amyloid fibrils. *FASEB J.* 2002; 16: 77-83.
- [8]. Reinke AA, Gestwicki JE. Structure-activity relationships of amyloid beta-aggregation inhibitors based on curcumin: influence of linker length and flexibility. *Chem Biol Drug Des.* 2007; 70: 206-15.
- [9]. Porat Y, Abramowitz A, Gazit E. Inhibition of amyloid fibril formation by polyphenols: structural similarity and aromatic interactions as a common inhibition mechanism. *Chem Biol Drug Des.* 2006; 67: 27-37.
- [10]. Begum AN, Jones MR, Lim GP, Morihara T, Kim P, Heath DD, et al. Curcumin structure function, bioavailability, and efficacy in models of neuroinflammation and Alzheimer's disease. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008; 326: 196-208.
- [11]. Yang F, Lim GP, Begum AN, Ubeda OJ, Simmons MR, Ambegaokar SS, Chen PP, Kayed R, Glabe CG, Frautschy SA, Cole GM (2005) Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. *J Biol Chem* 280(7): 5892-901.
- [12]. Ramshini H, mohammad-zadeh M, Ebrahim-Habibi A. Inhibition of amyloid fibril formation and cytotoxicity by a chemical analog of Curcumin as a stable inhibitor. *Int J Biol Macromol.* 2015;78: 396-404.
- [13]. Adlard PA, Cherny RA, Finkelshtein DI, Gautier E, Robb E, Cortes M, Volitakis I, Liu X, Smith JP, Perez K, Laughton K, Li QX. Rapid restoration of cognition in Alzheimer's transgenic mice with 8-hydroxy quinoline analogs is associated with decreased interstitial Abeta, *Neuron.* 2008; 59: 43-55.
- [14]. Mandel SA, Amit T, Kalfon L, Reznichenko L, Weinreb O, Youdim MB. Cell signaling pathways and iron chelation in the neurorestorative activity of green tea polyphenols: special reference to epigallocatechin gallate (EGCG), *J. Alzheimers Dis.* 2008; 15: 211-22.
- [15]. Garbe TR, Kobayashi M, Shimizu N, Takesue N, Ozawa M, Yukawa H. Indolyl carboxylic acids by condensation of indoles with a-keto acids, *J. Nat. Prod.* 2000; 63: 596-598.
- [16]. Ramshini H, Ebrahim-Habibi A. Thermal disaggregation of type B yeast hexokinase by indole derivatives: a mechanistic study *Int J Biol Macromol.* 2012 Jun 1; 50(5): 1260-6.
- [17]. Ramshini H, Mannini B, Khodayari K, Ebrahim-Habibi A, Moghaddasi AS, Tavebee R, et al. Bis (indolyl) phenylmethane derivatives are effective small molecules for inhibition of amyloid fibril formation by hen lysozyme *Eur J Med Chem.* 2016; 29: 361-71.
- [18]. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods.* 1983; 65: 55-63.
- [19]. Armstrong AH, Chen J, McKoy AF, Hecht MH. Mutations that replace aromatic side chains promote aggregation of the Alzheimer's Abeta peptide. *Biochemistry.* 2011; 50: 4058-67.
- [20]. LeVine III H. Small molecule inhibitors of Abeta assembly, *Amyloid.* 2007; 14: 185-97.
- [21]. Chiti F, Taddei N, Stefani M, Dobson CM, Ramponi G. Reduction of the amyloidogenicity of a protein by specific binding of ligands to the native conformation, *Protein Sci.* 2001; 10: 879-86.
- [22]. Burley SK, Petsko GA. Aromatic-aromatic interaction: a mechanism of protein structure stabilization, *Science.* 1985; 229: 23-8.
- [23]. Rezai-Zadeh K, Arendash GW, Hou H, Fernandez F, Jensen M, Runfeldt M, et al. Green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) reduces beta amyloid mediated cognitive impairment and modulates tau pathology in Alzheimer transgenic mice, *Brain Res.* 2008; 1214: 177-87.
- [24]. Ladiwala AR, Dordick JS, Tessier PM. Aromatic small molecules remodel toxic soluble oligomers of amyloid beta through three independent pathways, *J. Biol. Chem.* 2011; 286: 3209-18.
- [25]. Cohen T, Frydman-Marom A, Rechter M, Gazit E. Inhibition of amyloid fibril formation and cytotoxicity by hydroxyindole derivatives, *Biochemistry.* 2006; 45: 4727-35.
- [26]. Bendheim PE, Poeggeler B, Neria E, Ziv V, Pappolla MA, Chain DG. Development of indole-3-propionic (oxigon) for Alzheimer's disease, *J. Mol. Neurosci.* 2002; 19: 213-7.

Synthesis and Identification of Novel Aromatic Compound as Inhibitor of Lysozyme Amyloid Aggregation

Hassan Ramshini^{1*}, Shahryar Saeidian², Nazemian Leila³

1. Associate Professor, Department of Biology, Payam Noor University, Tehran, Iran
2. Assistant Professor, Department of Biology, Payam Noor University, Tehran, Iran
3. MSc, Department of Biology, Payam Noor University, Tehran, Iran

Abstract

Introduction: Alzheimer's disease is of major concern all over the world due to a number of factors including (i) an aging population (ii) increasing life span and (iii) lack of effective pharmacotherapy options. Aromatic small molecules have been found to play a neuroprotective role by inhibiting and/or modifying the self-assembly of peptide or proteins into oligomers and fibrils, which are linked to the pathogenesis of the diseases. In this study, the inhibitory effects of 1, 3, 5 triphenyl benzene as an aromatic molecule on aggregation and neurotoxicity of hen egg white lysozyme (HEWL) was investigated.

Materials and Methods: Acidic pH and high temperatures were used to drive the protein towards amyloid formation. Lysozyme was dissolved at 2 mg/mL in 50mM glycine buffer (pH 2.5), and then incubated at 57 °C for the specified durations. The inhibitory effect of the compounds against hen egg white lysozyme (HEWL) fibrillation using AFM (atomic force microscope), ThT (thioflavin T), Congo red and MTT assay was investigated.

Results: We found that the compounds is able to inhibit HEWL aggregation in a dose-dependent manner with IC₅₀ 0.1 μM. Kinetic study of the compound caused lag phase prolonged and stationary phase decreased and also cytotoxic activity of HEWL aggregates in presence of the compounds was diminished.

Conclusion: These observations suggest that 1, 3, 5 triphenyl benzene is capable to insert directly into amyloidogenic core of early aggregates and inhibiting amyloid fibril formation.

Received: 2019/01/28

Accepted: 2019/03/15

Keywords: Lysozyme, Amyloid aggregation, Cell cytotoxicity, Tri phenyl benzene.