

بررسی اثرات مهارى زیره سبز ایرانی بر فیبریلاسیون و سمیت پروتئین لیزوزیم در سلول‌های SK-N-MC

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۲/۲۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۴/۱۱

چکیده

سابقه و هدف: تجمعات آمیلوئیدی با برخی از بیماری‌ها نظیر بیماری‌های تحلیل برنده عصبی و سیستماتیک در ارتباط می‌باشند. از زمان‌های بسیار دور از زیره سبز (کومینوم سیمینوم) در درمان جنون که با بیماری‌های فیبریلاسیون پروتئین مرتبط است استفاده می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی اثرات مهارى زیره سبز ایرانی در مهار فرایند فیبریلاسیون و سمیت تجمعات پروتئینی بر سلول‌ها می‌باشد.

مواد و روش‌ها: فیبریلاسیون پروتئین لیزوزیم سفیده تخم مرغ در حضور و عدم حضور کومینوم سیمینوم با طیف دورنگ نمایی دورانی (CD)، نشر فلورسانس تیوفلاوین T، تصاویر میکروسکوپ نیروی اتمی بررسی شد. مرگ سلولی بر روی رده سلولی SK-N-MC با روش‌های LDH، MTT، و مصرف گلوکز مطالعه شد.

یافته‌ها: کومینوم سیمینوم مانع از تشکیل ساختارهای فیبریلی پروتئین لیزوزیم شد و این اثر مهار کنندگی ویژه کومینوم سیمینوم می‌باشد چراکه در حضور سایر روغن‌های ضروری نه تنها مهارى صورت نگرفت بلکه در برخی موارد نیز باعث القای فیبریلاسیون می‌شد. نتایج سنجش مرگ سلولی نیز نشان داد که روغن کومینوم سیمینوم باعث مرگ سلول‌ها می‌شود. **نتیجه‌گیری:** اگرچه کومینوم سیمینوم دارای اثر بارزی در مهار فیبریلاسیون پروتئین می‌باشد اما خود باعث مرگ سلولی می‌شود.

کلمات کلیدی: آمیلوئید، لیزوزیم سفیده تخم مرغ، کومینوم سیمینوم، رده سلولی SK-N-MC

طیبعلی سلمانی^۱، فرهنگ علی اکبری^۲ و دینا مرشدی^{۳*}

^۱کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی، گروه زیست شناسی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران
^۲کارشناس ارشد آزمایشگاه زیست فناوری پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران
^۳استادیار بیوشیمی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

* نویسنده مسئول: استادیار بیوشیمی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

۰۲۱-۴۴۵۸۰۴۲۳

E-mail: morshedi@nigeb.ac.ir

مقدمه

شواهد زیادی نشان داده‌اند که بروز هر نوع نقصی در مکانیسم‌های کنترل و پاکسازی، ممکن است منجر به تجمع پروتئین‌ها و ایجاد بیماری‌های تحلیل برنده عصبی شود. از طرفی تجمع بیشتر پروتئین‌های بدتاخورده، اجزای پروتئینی تشکیل دهنده سیستم کنترل کیفیت را تحت الشعاع قرار داده و منجر به تجمع بیشتر، استرس سلولی و تحلیل عصبی می‌شود.^۱ تشکیل تجمعات پروتئینی ویژگی مشترک چندین بیماری مختلف موسوم به بیماری‌های آمیلوئیدی می‌باشد. ۲۷ مورد از پروتئین‌های انسانی که عامل بیماری‌های آمیلوئیدی هستند، شناسایی شده‌اند که قادر به تشکیل ساختارهایی بنام فیبریل‌های آمیلوئیدی در بافت‌های مختلف می‌باشند.^۲ از جمله این بیماری‌ها می‌توان به بیماری‌های تحلیل

تقریباً ۳۰٪ پروتئین‌های سنتز شده‌ی جدید درون سلول به صورت ناصحیح تا می‌خورند که در شرایط طبیعی درون سلول، سیستم کنترل کیفیت سلول قادر به شناسایی و حذف آنها می‌باشد. چاپرون‌های مولکولی موجود در سیستم کنترل کیفیت مانند پروتئین‌های محافظ گرمایی (heat shock proteins) پروتئین‌های بدتاخورده را شناسایی نموده و ضمن کمک به تاخوردگی صحیح آنها مانع از گردهم‌آیی و تجمع بعدی آنها می‌شوند. همچنین چاپرون‌های مولکولی با اجزای یوبی کوئیتینی میانکنش داده و پروتئین‌های بدتاخورده را به سیستم‌های پروتازوم-یوبی کوئیتون و یا مسیر اتوفاگوزوم - لیزوزوم جهت تجزیه و تخریب هدایت می‌کنند.

برنده عصبی مانند هانتینگتون، آلزایمر و پارکینسون اشاره نمود. البته بیماری‌های دیگری نیز در بافت‌های غیر مغزی ناشی از تجمعات پروتئینی می‌باشند که می‌توان به دیابت نوع دو و آمیلوئیدوزیس سیستمیک اشاره نمود. بر اساس تخمین سازمان بهداشت جهانی تا سال ۲۰۲۰ نرخ بیماری‌های تحلیل برنده عصبی تا ۱۴/۷٪ افزایش خواهد یافت. مطالعات نشان داده‌اند که پروتئین‌های با ساختارهای بسیار متفاوت می‌توانند با تغییر یافتن ساختار طبیعی خود به سمت این تجمعات ویژه پیش روند. پروتئین‌های مختلف مستعد آمیلوئیدی شدن (تجمع یافتن) توالی آمینواسیدی و یا ساختارهای سه بعدی مشترکی ندارند، اما علی‌رغم منشاء متفاوت آنها، آمیلوئیدهای ایجاد شده ساختارهای مشابهی داشته و مکانیسم سمیت سلولی تقریباً یکسانی دارند.^۱ تا خوردگی صحیح پروتئین فرایندی دقیق بوده و از میان تمام تا خوردگی‌های ممکن یک پروتئین، تا خوردگی صحیح انتخاب می‌شود. پروتئین‌های جهش یافته در معرض تا خوردگی نادرست قرار دارند. مولکول‌های بد تا خوردگی بدلیل داشتن گروه‌های آبگریز محافظت نشده قابلیت تشکیل تجمعات بزرگ‌تر را داشته و بواسطه این تجمعات منجر به سمیت و آسیب سلولی و نهایتاً مرگ برنامه ریزی شده (آپوپتوز) می‌شوند. شواهد روز افزونی اثبات می‌کنند که در ناهنجاری‌های مرتبط با آمیلوئیدها، پیش سازهای پروتئینی محلول (الیگومرها یا پروتوفیبریل‌ها) نسبت به فیبریل‌های بالغ آمیلوئیدی، دارای سمیت بیشتری هستند.^{۷۶} مکانیسم‌های ایجاد آسیب سلولی توسط تجمعات پروتئینی شامل: تشکیل کانال‌های نفوذپذیر در غشاء و آسیب به آن، میانکنش‌های غیرطبیعی با پروتئین‌های مهم سلولی و اختلال در عملکرد طبیعی آنها^{۱۱} مانند پروتئین‌های دخیل در سیستم کنترل کیفیت تا خوردگی‌های پروتئین‌ها.^{۱۳} علیرغم تحقیقات گسترده در رابطه با فرایند تشکیل آمیلوئید و بیماری‌های مرتبط با آن، در حال حاضر درمان‌های اندکی برای این بیماری‌ها در دسترس می‌باشند.^{۱۴} مطالعات انجام شده در سلول‌ها و مدل‌های حیوانی مختلف بیان می‌کنند که جلوگیری از تشکیل آمیلوئیدها در کاهش عوارض آمیلوئیدوزیس مفید می‌باشند.^{۱۵} در همین راستا فعالیت ضد آمیلوئیدی ترکیبات مختلفی از قبیل آنتی‌بادی‌ها، پپتیدهای سنتزی، پروتئین محافظت کننده معروف به چاپرون‌ها و ترکیبات شیمیایی^{۱۶-۱۸} شناسایی شده‌اند. شمار زیادی از

کوچک مولکول‌های متنوعی یافت شده‌اند که پتانسیل بالایی را در مهار تشکیل تجمعات آمیلوئیدی دارند.^{۲۰} گیاهان دارویی و روغن‌های ضروری موجود در آنها دارای کوچک مولکول‌های طبیعی با ارزشی هستند که می‌توانند تشکیل و تجمع آمیلوئیدها را مهار کنند. رزمارینیک اسید گرفته شده از *سالویا آفیسینالیس*، فرکشن‌های آلی گرفته شده از عصاره *آکروکلین تومنتوزا*، *ژینکو بیلوبا*، رزوراتورال (برگرفته از انگور قرمز)، آلفا پی گالوگاتچین - ۳ - گالات (EGCG) برگرفته از چای سبز، کورکومین (مشتقی از زردچوبه) و کومین‌آلدئید (کومینوم سیمینوم) قادر به مهار تشکیل فیبریل‌ها بوده‌اند.^{۲۱-۲۴} باور عمومی بر این است که ترکیبات حاصل از منابع طبیعی سالم‌تر بوده و نسبت به داروهای سنتزی شیمیایی اثرات سوء کمتری را دارند.^{۲۵} اما علیرغم استفاده روزافزون جهانی از عصاره‌های گیاهان دارویی مختلف، برخی از اثرات نامطلوب این ترکیبات بر سلامت افراد گزارش شده است که سمیت عصاره‌های گیاهان دارویی مختلف را غالباً ناشی از وجود فنول، آلدئیدها و الکل‌ها می‌دانند.^{۲۷} خاصیت سمی این ترکیبات، ضرورت استفاده از روغن‌های ضروری را علیه عوامل بیماری‌زای انسانی یا حیوانی مبنی بر حفاظت از تولیدات کشاورزی و دریایی اثبات می‌نماید.^{۲۰} عصاره‌های گیاهی دارای مخلوط پیچیده‌ای از ترکیبات فعال (فیتوشیمیایی) هستند، اما تعیین ترکیبات گیاهی اصلی و یا مواد موثره در عرصه تحقیقات دارویی جایگاه والایی دارد.^{۲۸-۳۰} بر همین اساس در این مطالعه از روغن ضروری کومینوم سیمینوم (*C. cyminum*) ایرانی (زیره سبز) جهت ممانعت از تشکیل آمیلوئید از پروتئین لیزوزیم سفیده تخم مرغ استفاده شد. البته اثر عصاره‌های گیاهان دیگر مانند لیمون، تاراگون، متتا و کومینوم در آمیلوئیدی شدن لیزوزیم مورد مطالعه قرار گرفت که از میان آن‌ها، بالاترین اثر مهاری مربوط به *C. cyminum* بود. به طوری که مطالعات بعدی بر اساس *C. cyminum* انجام پذیرفت. لیزوزیم سفیده تخم مرغ (HEWL) بعنوان پروتئین مدل استفاده شد. دلایل انتخاب HEWL به عنوان پروتئین مدل، شناخته شده بودن تمام خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آن، توانایی تشکیل ساختارهای آمیلوئیدی تحت شرایط ناپایدارکننده^{۳۱} و همسانی بالای آن (۶۱٪) با پروتئین لیزوزیم انسانی می‌باشد. لیزوزیم انسانی عامل آمیلوئیدوزیس سیستمیک توارثی می‌باشد.^{۳۲} نتایج مطالعات مختلف نشان داده‌اند

نشر فلورسانس تیوفلاوین T

تمامی سنجش‌های فلورسانس با اسپکتروفتومتر فلورسانس واریان کری (مولگراوا، استرالیا) در دمای محیط انجام شد. برای ارزیابی تشکیل یا عدم تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی $10 \mu\text{l}$ از نمونه HEWL (2 mg/ml) انکوبه شده با و بدون کومینوم سیمینوم، به $490 \mu\text{l}$ محلول ThT با غلظت $10 \mu\text{M}$ (که از یک محلول استوک ThT با غلظت 10 mM دارای 10 تریس با $\text{pH } 8.0$) به آرامی مخلوط شد و بمدت ۵ دقیقه در فضای تاریک نگه داشته شد. سپس نشر فلورسانس در طول موج برانگیختگی 440 نانومتر اندازه‌گیری شد. پهنای هر دو اسلیت برانگیختگی و نشر 5 نانومتر بود.

جذب نوری کنگو رد

کنگو رد با غلظت 1 mg/ml در بافر دارای 150 mM کلرید سدیم و 5 mM فسفات پتاسیم ($\text{pH } 7.4$) حل شده بود. برای ارزیابی تشکیل یا عدم تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی از محلول تازه تهیه شده کنگو رد استفاده شد. $10 \mu\text{l}$ از نمونه گرماگذاری شده کاملاً یکنواخت به $490 \mu\text{l}$ از محلول کنگو رد افزوده شد و بعد از ۵ دقیقه طیف جذب نوری کنگو رد در طول موج $600 - 400$ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر مرئی - فرابنفش PGT80 ثبت شد.

طیف دورنگ نمایی دورانی (CD)

طیف دورنگ نمایی دورانی پروتئین با استفاده از ابزار اسپکتروپلاریومتر AVIV 215 در ناحیه بالاتر از فرابنفش با استفاده از کووت با ضخامت 1 mm در دمای اتاق اندازه‌گیری شد. غلظت پروتئین 0.1 mg/mL بود.

تصاویر میکروسکوپ نیروی اتمی

HEWL با غلظت 2 mg/ml در حضور یا عدم حضور کومینوم سیمینوم به میزان 20 برابر در بافر گلايسين $50 \mu\text{M}$ ($\text{pH } 2.5$) رقیق شد و در حجم‌های کم ($10 \mu\text{l}$) بر روی صفحات میکای نازک قرار داده شد. سپس نمونه‌ها تحت نیتروژن گازی خشک شده و تصاویر نیروی اتمی (AFM) با دستگاه Veeco Auto probe - CP- research

که، روند تشکیل آمیلوئید و سمیت سلولی گونه‌های آمیلوئیدی حاصل از پروتئین‌های متفاوت، تقریباً یکسان می‌باشد. از این رو می‌توان از پروتئین‌های مدل در پیگیری مطالعات آمیلوئیدی استفاده مفیدی نمود.^{۳۴} در طب سنتی ایران نیز از کومینوم سیمینوم برای درمان سردرد، اختلالات گوارشی، اسهال، صرع، جنون و مشکلات مربوط به زوال حافظه استفاده شده است.^{۳۳} این مطالعه برای اولین بار اثر مهارى کومینوم سیمینوم بر آمیلوئیدی شدن لیزوزیم سفیده تخم مرغ در شرایط آزمایشگاهی را نشان می‌دهد اما مطالعات کشت سلولی با استفاده از سلول‌های نوروبلاست (SK-N-MC) سمیت این روغن ضروری را نشان دادند.

مواد و روش‌ها

لیزوزیم سفیده تخم مرغ (HEWL, EC 3.2.1.17)، تیوفلاوین (ThT) (ThT)، کنگورد از شرکت سیگما، عصاره گیاهی کومینوم سیمینوم (شرکت باریج اسانس کاشان)، سلول‌های نوروبلاست (SK-N-MC) از انستیتو پاستور ایران. محیط کشت RPMI (گیبکو)، سرم جنین گوساله FBS (گیبکو)، آب سترون قابل تزریق، آنتی بیوتیک استریل (پنی سیلین - استریتومايسين) (گیبکو)، بی‌کربنات سدیم (سیگما آلدریج)، اسید کلریدریک (مرک)، سدیم هیدروکسید (مرک)، تریپسین (سیگما آلدریج)، ۳-(۴-۵-دی‌متیل تیازول-۲-یل)-۲-۵-دی‌فنیل تترازولیم برماید (MTT) (سیگما) و دی‌متیل سولفکسید (مرک). MTT، دارای فرمول شیمیایی $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{BrN}_5\text{S}$ ، وزن مولکولی $414/32$ گرم بر مول می‌باشد. کیت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH) از شرکت زیست شیمی، کیت سنجش مصرف گلوکز (گرینر).

القای فیبریلاسیون لیزوزیم

HEWL با غلظت 2 میلی گرم در میلی لیتر در بافر 50 میلی مولار گلیسین با $\text{pH } = 2/5$ در دمای 57°C و چرخش منظم 80 دور در دقیقه در حمام آب گرم قرار داده شد. جهت مطالعه مهار فیبریلاسیون، لیزوزیم در حضور کومینوم سیمینوم و تحت شرایط مشابه گرماگذاری گردید.

در حالت بدون تماس گرفته شد.

در روز سوم (پس از ۴۸ ساعت) به میزان ۲۰ میکرولیتر محلول MTT (با غلظت ۵ میلی گرم در ۱ میلی لیتر بافر فسفات سالین) به هر چاهک افزوده شد و به مدت ۴ ساعت نمونه‌ها در انکوباتور قرار گرفتند تا واکنش تبدیل نمک‌های تترازولیوم به کریستال‌های فورمازان کامل شود. پس از گذشت ۴ ساعت محلول داخل چاهک‌ها خارج شده و به هر چاهک به میزان ۱۰۰ میکرولیتر دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) افزوده شد و پلیت به مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه چرخنده همزده شد تا کریستال‌های فورمازان به طور کامل حل شدند (محلول حاصل بنفش رنگ بود). برای ثبت میزان جذب محلول‌های حاصل، از دستگاه اسپکتروفوتومتر الیزا ریدر (Lab system Multiscan-ms) استفاده شد (طول موج بین ۷۰۰ تا ۴۹۲ نانومتر).

رنگ آمیزی فلورسانت نانوفیبریل‌ها

با استفاده از فلوروفورهای مختص آمیلوئید مانند ThT می‌توان تصاویر مراحل مختلف فیبریلاسیون پروتئین‌ها را مشاهده کرد.^{۳۴} به‌طور خلاصه ۱۵ μl از پروتئین که در مدت زمان‌های مختلف گرماگذاری شده بود را به ۱۵ μl ThT (500 μM) افزوده و تحت شرایط القا کننده تشکیل آمیلوئید قرار داده شد. نمونه‌ها را به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده و در مرحله بعد بر روی لام میکروسکوپی پخش کرده و با میکروسکوپ فلورسانت Ceti inverso tc100 مشاهده شد.

کشت سلول و تیمار سلول‌ها

سلول‌های SK-N-MC در محیط کشت RPMI 1640 و سرم FBS با نسبت ۱۰ درصد حجمی و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین با غلظت‌های به ترتیب ۱۰۰ واحد بر میلی لیتر و ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر در انکوباتور با اتمسفر ۵ درصد گاز دی‌اکسید کربن و بخار آب و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد کشت و نگهداری شدند. سلول‌ها با تراکم موردنظر در پلیت ۹۶ تایی ب مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شدند. پس از این مدت محیط کشت سلول‌ها عوض شده و با حجم ۲۰ μl پروتئین لیزوزیم با یا بدون حضور کومینوم سیمینوم تیمار شدند.

سنجش سمیت ساختارهای مختلف لیزوزیم بر اندامک

میتوکندری سلول و تعیین درصد سلول‌های زنده به روش MTT آزمایش MTT جهت تعیین میزان سمیت ساختارهای مختلف لیزوزیم بر میتوکندری سلول‌های SK-N-MC انجام شد. بدین منظور ابتدا سلول‌های SK-N-MC در پلیت‌های کشت ۹۶ تایی به مدت ۲۴ ساعت به صورت معمول کشت داده شدند (غلظت اولیه ۳۵۰۰۰ سلول در هر چاهک). پس از ۲۴ ساعت، سلول‌ها با پروتئینی که با و بدون حضور روغن کومینوم سیمینوم گرماگذاری شده بودند تیمار شده و کشت به مدت ۲۴ ساعت دیگر ادامه یافت.

سنجش سمیت ساختارهای مختلف لیزوزیم بر غشاء سلول با اندازه‌گیری میزان آزاد شدن لاکتات دهیدروژناز (LDH)

اساس این تست سنجش تاثیر ساختارهای آمیلوئیدی لیزوزیم بر غشای سلول‌های SK-N-MC می‌باشد. نحوه عملکرد این آنزیم بدین صورت است که اگر سوبسترای این آنزیم (پروات) در محیط کشت وجود داشته باشد، مورد استفاده قرار گرفته و میزان آن در محیط کاهش می‌یابد. کاهش سوبسترا نسبت به نمونه کنترل بیانگر اثر سمیت ساختارها بر غشای سلول‌ها و خروج آنزیم‌ها به محیط کشت می‌باشد. بدین منظور ابتدا در روز اول سلول‌های SK-N-MC در پلیت‌های کشت ۹۶ تایی به مدت ۲۴ ساعت به صورت معمول کشت داده شدند (غلظت اولیه ۳۵۰۰۰ سلول در هر چاهک). پس از ۲۴ ساعت، سلول‌ها تحت تیمارهای مختلف از ساختارهای لیزوزیم (پروتئین گرماگذاری شده در و بدون حضور روغن کومینوم سیمینوم) قرار گرفتند و کشت به مدت ۲۴ ساعت دیگر ادامه یافت. در روز سوم (پس از ۴۸ ساعت) به میزان ۱۰ میکرولیتر از محیط روی سلول‌ها از هر چاهک برداشته و به یک میلی لیتر محلول از قبل آماده شده (ترکیب حاوی چهار حجم از محلول ۱ یا سوبسترا و یک حجم از محلول ۲ یا کوفاکتور آنزیم) افزوده شد و جذب نمونه‌ها چهار بار هر بار به فاصله ۱ دقیقه، در طول موج ۳۴۰ نانومتر بررسی شدند. برای بررسی جذب نمونه‌ها از

دستگاه اسپکتروفتومتر PG T80+ استفاده شده است.

سنجش سمیت ساختارهای مختلف لیوزیم بر فعالیت‌های فیزیولوژیک آنزیم‌های دخیل در مصرف انرژی سلول با اندازه‌گیری میزان مصرف گلوکز

اثرات سمیت ترکیبات مختلف بر سلول‌ها با بررسی میزان مصرف انرژی با استفاده از کیت گلوکز براساس دستورالعمل ارائه شده توسط شرکت سازنده (گیرنر آلمان) اندازه‌گیری شد. میزان جذب در طول موج ۵۰۰ نانومتر با از دستگاه اسپکتروفتومتر PG T80+ اندازه‌گیری شد.

مطالعات آماری

تمامی آزمایشات با سه بار تکرار انجام شده و میانگین داده‌ها به همراه انحراف معیار بیان شده است. برای بررسی معنی دار بودن داده‌های بدست آمده از نرم افزار SPSS 16.0 با برنامه‌های تی تست و آنووا با ارزش پی کمتر از ۰/۰۵ استفاده شد.

بحث و نتیجه‌گیری

دلایل اصلی تجمع پروتئین در بیماری‌های آمیلوئیدوزیس بسیار پیچیده بوده و کاملاً شناسایی نشده است. اما یکی از راهکارهای مطرح در درمان و البته پیشگیری از این بیماری‌ها، مهار روند فیبریلاسیون با استفاده از ترکیبات شیمیایی ویژه می‌باشد. چراکه با مهار تشکیل تجمعات و جلوگیری از اثرات مخرب آنها بر سیستم‌های زیستی، می‌توان گام مؤثری را در درمان بیماری‌های تحلیل برنده مختلف برداشت.

تأثیر کومینوم سیمینوم بر فیبریلاسیون لیوزیم

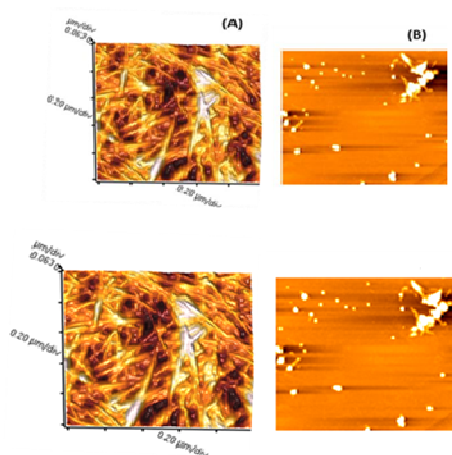
تجمعات آمیلوئیدی لیوزیم با گرماگذاری لیوزیم در شرایط

اسیدی و دمای بالا تهیه شدند. زمانی که پروتئین‌های مونومری به فیبریل‌های آمیلوئیدی تبدیل می‌شوند با روش‌های معین و استاندارد می‌توان تشکیل فیبریل‌ها را مورد مطالعه قرار داد. با قرار دادن پروتئین تحت شرایط آمیلوئیدی شدن، شدت فلورسانت افزایش و جذب کنگو رد بالا رفته و به سمت امواج قرمز جابجا می‌شود. ساختارهای ثانویه و فیبریل‌های استوانه‌ای و بدون شاخه با روش CD و تصاویر میکروسکوپی قابل بررسی بودند. اثرات مهارکنندگی کومینوم سیمینوم بر تشکیل تجمعات آمیلوئیدی از پروتئین طبیعی، با افزودن روغن ضروری کومینوم سیمینوم در غلظت‌های مختلف (۱۰٪ v/v و ۱،۳،۵) به لیوزیم در طول فیبریلاسیون مورد بررسی قرار گرفت. میزان تجمع یافتگی لیوزیم در حضور کومینوم سیمینوم بعد از ۲۴ ساعت گرماگذاری ارزیابی شد. نمودار ۱ A نشان می‌دهد که شدت فلورسانت ThT نمونه‌های تیمار شده با روغن بطور آشکاری پائین‌تر از نمونه‌های کنترل می‌باشد که این بیانگر نقش موثر روغن در مهار فرایند فیبریلاسیون لیوزیم می‌باشد. جذب کنگو رد نیز این یافته را اثبات نمود (نمودار ۱B). خاصیت مهارکنندگی کومینوم سیمینوم وابسته به غلظت می‌باشد چراکه بیشترین مهار تشکیل آمیلوئید، بدنبال افزودن غلظت‌های ۵٪ و ۱۰٪ (v/v) از کومینوم ایجاد شد. آنالیزهای CD موجود در نمودار ۱C ایجاد شدن ساختارهای ثانویه را پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون نشان می‌دهد که این ساختارها از تبدیل پروتئین طبیعی به ساختارهای بتا، حاصل شده است. بررسی‌ها طیف CD با نرم‌افزار CDNN نشان داد که بیش از ۸۵٪ ساختارهای طبیعی پروتئین در حضور روغن کومینوم پایدار هستند در حالی که در نمونه‌های بدون روغن ساختار ثانویه پروتئین به صفحات بتا تبدیل شده بودند (جدول ۱). نتایج حاصل از تصاویر میکروسکوپ نیروی اتمی (شکل ۱) و رنگ آمیزی فلورسانت نانوفیبریل‌ها با تیوفلاوین تی (شکل ۲) نیز بیانگر اثر مهارى روغن ضروری کومینوم سیمینوم در مقابل فیبریلاسیون لیوزیم می‌باشد.

جدول ۱: بررسی طیف Far CD برای ارزیابی ساختارهای ثانویه پروتئین با نرم‌افزار CDNN

لیوزیم طبیعی	لیوزیم فیبریل (۲۴ ساعته)	لیوزیم تیمار شده با روغن در مدت ۲۴ ساعت
۳۵/۶۰٪	۲۲/۳۶٪	۳۰/۷۸٪
۸/۹۵٪	۱۲/۸۱٪	۹/۹۰٪
۸/۲۴٪	۱۰/۶۳٪	۹/۱۱٪
۱۷/۰۹٪	۱۶/۶۳٪	۱۶/۸۶٪
۳۰/۲۱٪	۳۷/۵۴٪	۳۳/۴۳٪

داده‌های حاصل از کروماتوگرافی گازی و اسپکتروفتومتری جرمی (GC-MS) روغن ضروری کومینوم سیمینوم در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج گویای اینست که کومینوم سیمینوم بومی ایران دارای بیش از ۳۳ ترکیب با ساختارهای شیمیایی مختلف می‌باشد که بیشترین آن هیدروکربن‌های ترپنی، آلدهیدها و الکل‌ها هستند. علاوه بر اینکه روغن‌های ضروری با منشاء گیاهی مختلف دارای مولکول‌های اختصاصی هستند، ترکیبات مشابهی را نیز دارا می‌باشند. تاثیر کومینوم سیمینوم بر سرعت تشکیل آمیلوئید لیزوزیم با بررسی شدت نشر ThT (۴۸۱ nm) در طول ۴ روز گرماگذاری پروتئین تحت شرایط آمیلوئیدی شدن مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که در نمودار ۲ نشان می‌دهد، اثرات مهار کومینوم سیمینوم تقریباً تا بعد از ۹۰ ساعت گرماگذاری پروتئین تحت شرایط آمیلوئیدی شدن ادامه داشت که این بیانگر پایداری و قدرت مهار بالای روغن در زمان‌های طولانی می‌باشد.

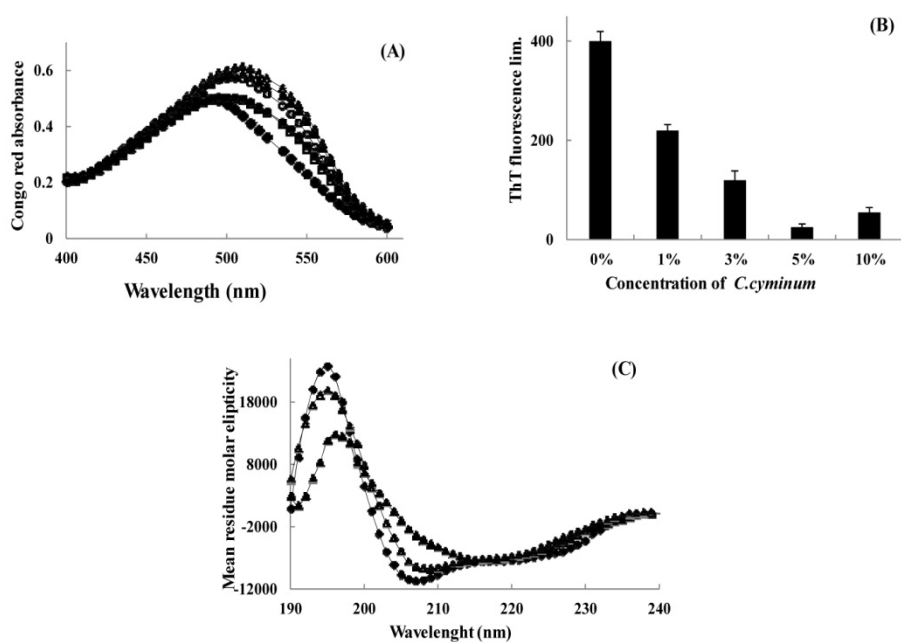


شکل ۱: تصاویر AFM مربوط به نمونه HEWL که بمدت ۴۸ ساعت در عدم حضور (A) و حضور کومینوم سیمینوم (B) گرماگذاری شده است.

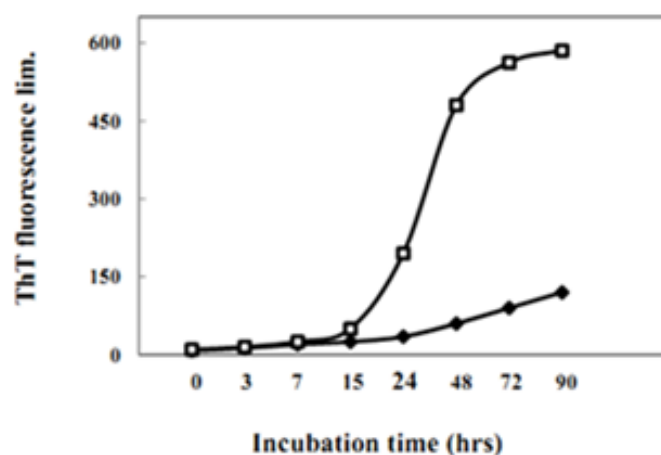
روغن‌های ضروری منابع ارزشمند و پیچیده‌ای از ترکیبات ناشناخته هستند که دارای کاربردهای بالقوه‌ای در پزشکی می‌باشند.

جدول ۲: ترکیبات شیمیایی روغن کومینوم سیمینوم

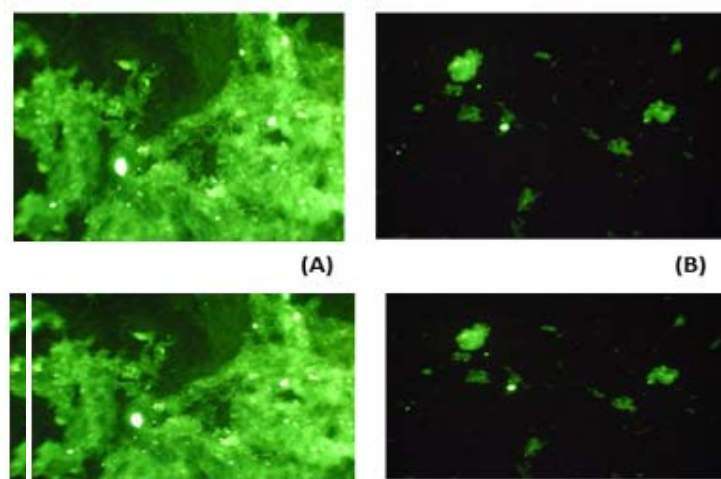
Compound ID	RI	Compound ID	RI
α -Pinene	۹۳۹	Myrtenal	۱۲۰۳
Sabinene	۹۷۷	Transe-chrysanthemyl acetate	۱۲۲۷
β -pinene	۹۸۴	Cumin aldehyde	۱۲۵۳
β -Myrcene	۹۸۹	P-menth-1-en-7-al	۱۲۸۴
α -Phellandrine	۱۰۰۹	α -Terpinene-7-al	۱۲۹۵
α -Terpinene	۱۰۲۰	γ -Terpinene-7-al	۱۳۰۱
P-cymene	۱۰۲۸	Daucene	۱۳۹۳
Limonene	۱۰۳۲	Carryophyllene	۱۴۳۸
β -Phellandrine	۱۰۳۴	α -transe-Bergmotne	۱۴۴۵
1,8-cinenol	۱۰۳۶	E- β -Farnesene	۱۴۵۸
γ -Terpinene	۱۰۶۴	α -Humulene	۱۴۷۲
α -terpineolene	۱۰۹۲	Dauca-5,8-diene	۱۴۸۵
1,4-Dimethyl- δ -3-tetrahydroacetophonene	۱۱۵۵	B-Cadinene	۱۴۸۸
2-neonalal	۱۱۵۸	10-epi- β -acoradiene	۱۴۹۲
Terepinene-4-ol	۱۱۸۳	B-Bisabolene	۱۵۱۶
P-cymene-8-ol	۱۱۸۹	Isodaucene	۱۵۱۸
Transe-4-Caranone	۱۱۹۸	Caratol	۱۶۱۸



نمودار ۱: اثر کومینوم سیمینوم بر تجمع HEWL. تشکیل فیبریل HEWL (۲ mg/ml) در حضور و یا عدم حضور غلظت‌های مختلف کومینوم سیمینوم مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌ها بمدت ۲۴ ساعت در دمای ۵۷ °C انکوبه شدند. تشکیل فیبریل با سنجش جذب کنگورد (A) و فلورسانس ThT (B) ارزیابی شدند. غلظت‌های کومینوم سیمینوم در شکل A، ۰٪ (Δ)، ۱٪ (▲)، ۳٪ (○)، ۵٪ (□)، ۱۰٪ (●) (v/v). جذب کنگورد بتنهایی با (■) نشان داده شده است. (C) طیف Far-CD پروتئین طبیعی (◆)، لیزوزیم انکوبه شده بمدت ۲۴ ساعت در دمای ۵۷ °C در حضور (Δ) و عدم حضور (v/v) ۵٪ کومینوم سیمینوم (▲).



نمودار ۲: اثر کومینوم سیمینوم بر سرعت تشکیل فیبریل HEWL. مطالعه فلورسانس ThT در طول موج ۴۸۱ nm در زمان‌های مختلف فیبریلاسیون HEWL بدون حضور (□) و با حضور (■) ۵٪ (v/v) کومینوم سیمینوم. تمام محلول‌ها در بافر گلايسين (pH = ۲/۵) و انکوباسیون در ۵۷ °C آماده شدند.



شکل ۲: تصاویر میکروسکوپ فلورسانس مربوط به نمونه HEWL که بمدت ۴۸ ساعت در عدم حضور (A) و حضور کومینوم سیمینوم (B) گرماگذاری شده است.

سلول‌های کنترل (تیمار نشده) بطور طبیعی به اندازه‌ی ۲۶/۷٪ آزاد سازی LDH را نشان دادند درحالی‌که سلول‌های تیمار شده با فیبریل‌های ۲۴ ساعته این میزان را بیشتر از ۵۵٪ نشان دادند. همچنین تیمار سلول‌ها با نمونه‌های لیزوزیم ۲۴ ساعته منجر به کاهش مصرف گلوکز شد (نمودار ۳C). تمام داده‌های حاصل از تیمار سلول‌ها معنادار بودند ($P < 0.05$). نتایج بدست آمده بیانگر کاهش محسوس سلول‌های زنده هنگام تیمار با نمونه‌های ۲۴ ساعته HEWL می‌باشد. توجیه احتمالی این پدیده، حضور بیشتر انواع ساختارهای مخرب پروتئین مانند الیگومر و پروتوفیبریل در این مرحله از فیبریل‌اسیون می‌باشد.^{۳۹}

در گام بعد جهت ارزیابی توانایی کومینوم سیمینوم در مهار سمیت سلولی ناشی از تجمع‌های آمیلوئیدی، از تکنیک‌های MTT، آزاد شدن LDH و میزان مصرف گلوکز استفاده شد. نتایج حاصل نشان دادند که علیرغم قدرت مهار کومینوم سیمینوم در ممانعت از تشکیل ساختارهای آمیلوئیدی، نمونه‌های تیمار شده با کومینوم سیمینوم کاهش شدیدی در میزان سلول‌های زنده را داشتند بطوری که میزان مرگ سلولی در این حالت در مقایسه با حالتی که سلول‌ها با فیبریل‌های آمیلوئیدی (بدون حضور روغن ضروری) تیمار شده بودند، بیشتر بود. نتیجه‌ی MTT سلول‌های تیمار شده با کومینوم سیمینوم به غلظت (v/v) ۰/۰۵٪ (حجمی که هنگام فرایند

بررسی اثرات سمیت ساختارهای آمیلوئیدی بر سلول‌های SK-N-MC در حضور و عدم حضور کومینوم سیمینوم

این نکته به اثبات رسیده است که فیبریل‌های آمیلوئیدی و ساختارهای تجمع یافته می‌توانند عامل آسیب‌های کشنده به سلول‌های زنده باشند.

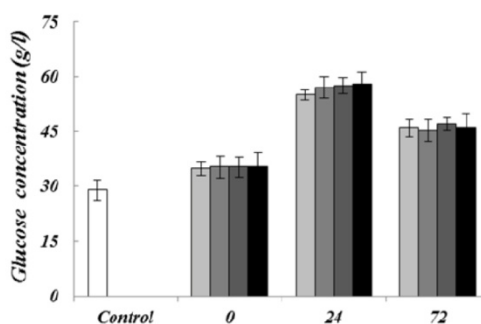
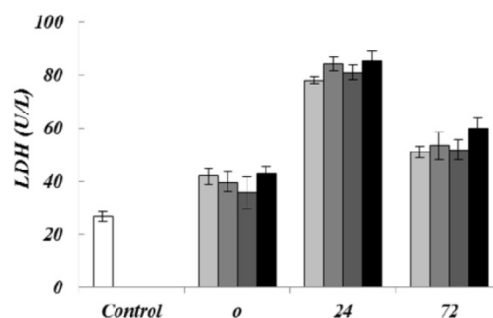
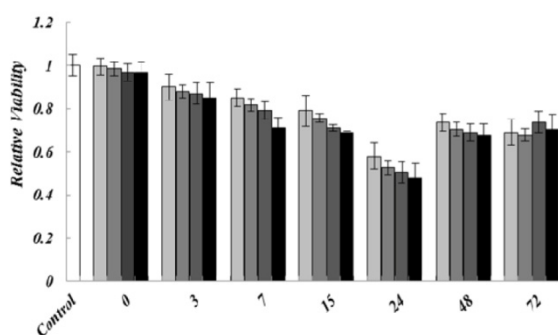
تجمعات آمیلوئیدی دارای ساختارهای مختلفی از قبیل، فیبریل‌های بالغ، پروتوفیبریل‌ها و حدواسط‌های با وزن مولکولی کم هستند که در مراحل مختلف فرایند فیبریل‌اسیون ظاهر می‌شوند و دارای اثرات سمی می‌باشند.^{۳۷،۳۸} به منظور مطالعه سمیت ساختارهای مختلف لیزوزیم بر سلول‌ها، پروتئین انکوبه شده در فواصل زمانی مختلف به محیط کشت سلول‌ها افزوده شد و سمیت سلولی پروتئین با روش‌های MTT، آزاد شدن LDH و میزان مصرف گلوکز اندازه‌گیری شد. نمودار ۳A احیای MTT سلول‌های تیمار شده با لیزوزیم انکوبه شده (v/v) ۱۰٪ در مدت زمان‌های مختلف را نشان می‌دهد. تیمار سلول‌ها با نمونه‌های لیزوزیم ۲۴ ساعت انکوبه شده، منجر به کاهش بیش از ۴۰٪ سلول‌های زنده شد درحالی‌که سلول‌های تیمار شده با نمونه‌های دیگر کمتر آسیب دیدند. بررسی‌های فعالیت LDH نیز نشان داد که نمونه‌های لیزوزیم ۲۴ ساعت انکوبه شده، نفوذ پذیری غشاء را به میزان معناداری افزایش دادند ($p < 0.05$ ، نمودار ۳B). لازم به ذکر است که

می‌باشد.^{۴۰}

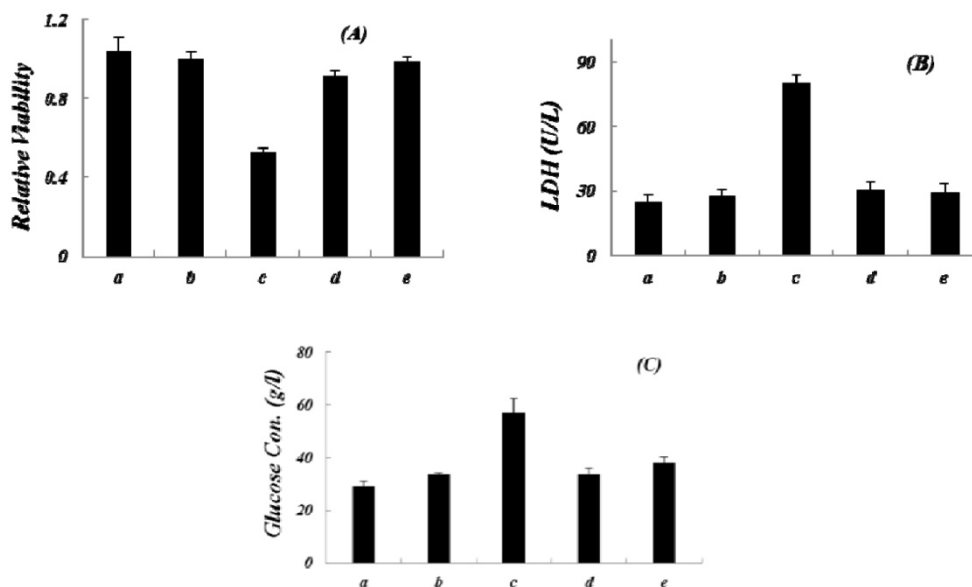
نفوذپذیری غشاهای داخلی و خارجی میتوکندری منجر به افزایش مرگ سلولی از طریق مرگ برنامه‌ریزی شده و نکروز می‌شود.^{۴۰} مشاهدات حاصل از میکروسکوپ الکترونی گذاره نیز تغییرات ساختاری در برخی از اجزای سلولی مانند غشای پلاسمایی، سیتوپلاسم (آماس، واکوئله شدن و تراوش) و هسته را نشان داده‌اند.^{۴۱} سمیت غالباً می‌تواند ناشی از وجود برخی ترکیبات از قبیل تریپتین‌ها که رشد سلول‌های M14 ملانومای انسانی را مختل می‌کنند^{۳۸}، بتاکاریوفیلین و آلفاهامولن که سمیت بالایی رادر سلول‌های A-549 و هلا و HT-29 نشان دادند^{۴۲} و دو - نوننال (2-nonenal) باشد که بعنوان یک آلدئید فعالیت‌های حیاتی سلول را از قبیل تقسیم سلولی و سنتز DNA و پروتئین مهار می‌کند.^{۴۳}

فیبریلاسیون افزوده می‌شد) بعد از ۲۴ ساعت، کاهش بیش از ۸۰٪ سلول‌های زنده را نشان داد (نمودار ۴A). آزمایش‌های LDH (نمودار ۴B) و مصرف گلوکز نیز نتایج مشابهی را نشان دادند (نمودار ۴C).

روغن‌های ضروری دارای ترکیباتی هستند که بر سیتوپلاسم، میتوکندری و غشای پلاسمایی سلول‌های یوکاریوت اثرات سمی دارند. سمیت فرآورده‌های گیاهی مانند روغن‌های ضروری غیراختصاصی بوده و بنظر می‌رسد ناشی از بهم ریختن قطبیت غشای میتوکندری با کاهش پتانسیل غشاء، تاثیر بر چرخه ی Ca^{2+} ، پمپ پروتونی و ذخیره ATP باشد. این روغن‌ها سیالیت غشاها را تغییر داده و باعث نفوذپذیری غیرطبیعی و تراوش رادیکال‌های آزاد، سیتوکروم C، یونهای کلسیم و پروتئین‌ها می‌شوند. این وضعیت مشابه استرس اکسیداتیو و نقص سیستم انرژی زیستی



نمودار ۴: ارزیابی میزان زنده ماندن سلول‌ها تیمار شده با نمونه‌های HEWL. زنده بودن سلول‌ها با آزمایش احیای MTT (A)، آزاد شدن LDH (B)، و مصرف گلوکز (C) اندازه‌گیری شد. سلول‌های SK-N-MC توسط HEWL ۵٪ (خاکستری روشن)، ۱۰٪ (خاکستری)، ۱۵٪ (خاکستری تیره) و ۲۰٪ (تیره) (v/v) که بین ۰ تا ۷۲ ساعت در شرایط آمیلوئیدساز انکوبه شده بودند تیمار شدند. پس از تیمار سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در $37^{\circ}C$ انکوبه شدند.



نمودار ۴: اثر کومینوم سیمینوم بر سمیت فیبریل‌های HEWL. HEWL (۲ mg/ml) با و یا بدون (v/v) ۵٪ کومینوم سیمینوم مدت ۲۴ ساعت در دمای ۵۷ °C انکوبه شد. این نمونه‌ها به سلول‌های انکوبه شده افزوده شدند. میزان زنده ماندن سلول‌ها پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری، سلول‌های تیمار نشده (a)، سلول‌های تیمار شده با HEWL طبیعی (b)، سلول‌های تیمار شده با HEWL ۲۴ ساعت از قبل انکوبه شده (c)، سلول‌های تیمار شده با HEWL ۲۴ ساعت انکوبه شده در حضور (d) و عدم حضور (e) ۵٪ کومینوم سیمینوم با آزمایش MTT (A)، آزاد شدن LDH (B)، و مصرف گلوکز (C) اندازه‌گیری شد.

بر جداسازی ماده موثره‌های خالص‌تر می‌باشد که دارای توانایی مهار فیبریلاسیون پروتئین و عدم سمیت سلولی باشند.

این نتایج نشان می‌دهد که کومینوم سیمینوم پتانسیل بالایی در مهار فیبریلاسیون لیزوزیم دارد اما بدلیل داشتن ترکیبات مضر باعث مرگ سلولی می‌شود که این نیازمند روش‌های تخلیص بهینه مبنی

References

- Dobson CM . Principles of protein folding, misfolding and aggregation. *Seminars in cell & developmental biology* 2004;15(1):3-16.
- Porat Y, Abramowitz A, & Gazit E .Inhibition of amyloid fibril formation by polyphenols: structural similarity and aromatic interactions as a common inhibition mechanism. *Chemical biology & drug design* 2006;67(1):27-37.
- Sipe JD, et al .Amyloid fibril protein nomenclature: 2010 recommendations from the nomenclature committee of the International Society of Amyloidosis. *Amyloid* 2010;17(3-4):101-104.
- Antosova A, et al. Structure-activity relationship of acridine derivatives to amyloid aggregation of lysozyme. *Biochimica et biophysica acta* 2011;1810(4):465-474.
- Wang SS, Liu KN, & Han TC .Amyloid fibrillation and cytotoxicity of insulin are inhibited by the amphiphilic surfactants. *Biochimica et biophysica acta* 2010; 1802(6):519-530.
- Ferreira ST, Vieira MN, & De Felice FG .Soluble protein oligomers as emerging toxins in Alzheimer's and other amyloid diseases. *IUBMB life* 2007;59(4-5):332-345.
- Selkoe DJ .Folding proteins in fatal ways. *Nature* 2003;426(6968):900-904.
- Engel MF. Membrane permeabilization by Islet Amyloid Polypeptide. *Chemistry and physics of lipids* 2009;160(1):1-10.
- Hashimoto M, Rockenstein E, Crews L, & Masliah E . Role of protein aggregation in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Neuromolecular medicine* 2003;4(1-2):21-36.
- Imai J, Yashiroda H, Maruya M, Yahara I, & Tanaka K. Proteasomes and molecular chaperones: cellular machinery responsible for folding and destruction of unfolded proteins. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 2003;2(6):585-590.

11. Mari Takalo, Antero Salminen & Hilikka Soinen . Protein aggregation and degradation mechanisms in neurodegenerative diseases. *Am J Neurodegener Dis* 2013;2(1):1-14.
12. Orenstein SJ & Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy: molecular mechanisms and physiological relevance. *Seminars in cell & developmental biology* 2010 ;21(7):719-726.
13. Massey AC, Kaushik S, Sovak G, Kiffin R, & Cuervo AM .Consequences of the selective blockage of chaperone-mediated autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006;103(15):5805-5810.
14. Huang VT, et al. Catechol derivatives inhibit the fibril formation of amyloid-beta peptides. *Journal of bioscience and bioengineering* 2010;109(6):629-634.
15. Jucker M. The benefits and limitations of animal models for translational research in neurodegenerative diseases. *Nature medicine* 2010;16(11):1210-1214.
16. Wang SS, Chen YT, & Chou SW. Inhibition of amyloid fibril formation of beta-amyloid peptides via the amphiphilic surfactants. *Biochimica et biophysica acta* 2005;1741(3):307-313.
17. Gazova Z, et al. Acridine derivatives inhibit lysozyme aggregation. *Eur Biophys J* 2008;37(7):1261-1270.
18. Glabe CG. Conformation-dependent antibodies target diseases of protein misfolding. *Trends in biochemical sciences* 2004;29 (10):542-547.
19. Feng BY, et al. Small-molecule aggregates inhibit amyloid polymerization. *Nature chemical biology* 2008;4(3):197-199.
20. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, & Idaomar M. Biological effects of essential oils--a review. *Food Chem Toxicol* 2008 ;46(2):446-475.
21. Wang J, et al. Grape-derived polyphenolics prevent Abeta oligomerization and attenuate cognitive deterioration in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2008 ; 28(25):6388-6392.
22. Ebrahimi A & Schluesener H. Natural polyphenols against neurodegenerative disorders: potentials and pitfalls. *Ageing research reviews* 2012;11(2):329-345.
23. Morshedi D & Ali-Akbari F. The Inhibitory Effects of Cuminaldehyde on Amyloid Fibrillation and Cytotoxicity of Alpha-synuclein. *Modares journal of medical science* 2012;15(1):45-60. [In Persian]
24. Morshedi D & Aliakbari F. The inhibitory effects of cuminaldehyde on the amyloid fibrillation and cytotoxicity of alpha-synuclein. *Modares Journal of medical science* 2012;15(1):45-60. [In Persian]
25. Kang IJ, et al. Butanol extract of *Ecklonia cava* prevents production and aggregation of beta-amyloid, and reduces beta-amyloid mediated neuronal death. *Food Chem Toxicol* 2011;49(9):2252-2259.
26. Si W, et al. Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards *Clostridium perfringens*. *Journal of applied microbiology* 2009;106(1):213-220.
27. Sacchetti G, et al. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry* 2005;91(4):621-632.
28. Suk K. Regulation of neuroinflammation by herbal medicine and its implications for neurodegenerative diseases. A focus on traditional medicines and flavonoids. *Neuro-Signals* 2005;14(1-2):23-33.
29. Ho YS, So KF, & Chang RC. Anti-aging herbal medicine--how and why can they be used in aging-associated neurodegenerative diseases? *Ageing research reviews* 2010;9(3):354-362.
30. Vinutha B, et al. Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. *Journal of ethnopharmacology* 2007;109(2):359-363.
31. Morshedi D, Rezaei-Ghaleh N, Ebrahim-Habibi A, Ahmadian S, & Nemat-Gorgani M .Inhibition of amyloid fibrillation of lysozyme by indole derivatives--possible mechanism of action. *The FEBS journal* 2007;274(24):6415-6425.
32. Dumoulin M, Kumita JR, & Dobson CM. Normal and aberrant biological self-assembly: Insights from studies of human lysozyme and its amyloidogenic variants. *Accounts of Chemical Research* 2006;39(9):603-610.
33. Boskabady MH, Kiani S, & Azizi H. Relaxant effect of *Cuminum cyminum* on guinea pig tracheal chains and its possible mechanism(s). *BMC pharmacology* 2005; 37 : 111.
34. Nilsson MR. Techniques to study amyloid fibril formation in vitro. *Methods (San Diego, Calif)* 2004;34(1):151-160.
35. Klunk WE, Pettegrew JW, & Abraham DJ . Quantitative evaluation of congo red binding to amyloid-like proteins with a beta-pleated sheet conformation. *J Histochem Cytochem* 1989;37(8):1273-1281.
36. Karami-Osboo R, Khodaverdi M, & Ali-Akbari F. Antibacterial Effect of Effective Compounds of *Satureja hortensis* and *Thymus vulgaris* Essential Oils against *Erwinia amylovora* J. *Agr. Sci. Tech* 2010;12: 35-45.
37. Akolade JO, et al. Chemical composition, antioxidant and cytotoxic effects of *Eucalyptus globulus* grown in north-central Nigeria. *J. Nat. Prod. Plant Resour* 2012;2(1):1-8.
38. Calcabrini A, et al. Terpinen-4-ol, the main component of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil inhibits the in vitro growth of human melanoma cells. *The Journal of investigative dermatology* 2004;122(2):349-360.

39. Caughey B & Lansbury PT. Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. Annual review of neuroscience 2003;26:267-298.
40. Kroemer G, Galluzzi L, & Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. Physiological reviews 2007;87(1):99-163.
41. Santoro GF, et al. Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. Parasitology research 2007; 100 (4) : 783-790.
42. Silva S, Figueiredo P, & Yano T. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. leaves. Acta Amazonica 2007;37(2):281-286.
43. Spitz DR, Malcolm RR, & Roberts RJ. Cytotoxicity and metabolism of 4-hydroxy-2-nonenal and 2-nonenal in H₂O₂-resistant cell lines. Do aldehydic by-products of lipid peroxidation contribute to oxidative stress? The Biochemical journal 1990;267(2):453-459.