

معرفی ویتامین‌های D₃ و E به‌عنوان پایدارکننده‌های فرم هگزامر انسولین جهت رهایش تنظیم‌شده، بر اساس مطالعه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

رضا مهدویان^۱، حسین سلیمانی^۲، محمد قربانی^۲، حسین نادری‌منش^{۳*}

۱-دانش آموخته کارشناسی‌ارشد بیوفیزیک، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم‌زیستی، دانشگاه تربیت‌مدرس، تهران، ایران

۲-دانش آموخته دکتری بیوفیزیک، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم‌زیستی، دانشگاه تربیت‌مدرس، تهران، ایران

۳-استاد، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم‌زیستی، دانشگاه تربیت‌مدرس، تهران، ایران

*صندوق پستی ۱۷۵-۱۴۱۱۵، تهران، ایران

naderman@modares.ac.ir

پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۲۱

دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۲۳

چکیده

ویتامین‌های D و E از معمول‌ترین داروهای درمان طولانی‌مدت دیابت هستند. یکی از مسائل مهم در این حوزه رهایش انسولین است. افزایش پایداری حالت‌های غیرفعال انسولین (فرم هگزامر) در بهبود کارایی رهایش انسولین یک راهکار در حال توسعه است. پروتئین انسولین به طور معمول در سه فرم مونومر، دایمر و هگزامر مشاهده می‌شود. در این تحقیق برای اولین بار، بررسی اثر ویتامین‌های D₃ و E بر پایداری فرم ذخیره‌ای انسولین، از طریق روش‌های محاسباتی صورت گرفت. نتایج حاصل از داکینگ مولکولی نشان‌دهنده وجود ۶ جایگاه اتصال برای این ویتامین‌ها است. ویتامین‌های مذکور به‌واسطه حلقه‌های ساختاری و خواص هیدروفوب به منطقه هیدروفوب در مرز بین دو زیر واحد انسولین متصل می‌شوند. نتایج حاصل از مطالعات G-mmpbsa نشان‌دهنده نقش پایدارکننده این ویتامین‌ها در فرم هگزامر انسولین است. اتصال آنها به هگزامر موجب افزایش معنادار انرژی اتصال بین زیر واحدهای انسولین شده است. حضور ویتامین‌های مذکور موجب افزایش تعداد پیوندهای هیدروژنی بین زیرواحدهای مونومر هر همودایمر انسولین شده و نیز تعداد پیوندهای هیدروژنی درونی پروتئین هگزامر انسولین را به طور معناداری افزایش می‌دهد. اتصال این ویتامین‌ها به فرم هگزامر انسولین موجب پایدارسازی، رهایش آهسته‌تر و متعادل‌تر انسولین و همچنین، افزایش نیمه‌عمر فرم دایمر در جریان خون می‌شود. این یافته‌ها به‌منظور طراحی راهکار جدید برای تنظیم رهایش انسولین در بدن و همچنین، افزایش نیمه‌عمر انسولین در خون برای درمان بیماری دیابت نوع II راهگشا خواهد بود. علاوه بر این پایدارسازی فرم هگزامر می‌تواند به‌عنوان یک راهکار مؤثر برای درمان دیابت نوع I از طریق رهایش آهسته از سامانه‌های زیست‌حسگری ایمپلنت‌شده نیز مورد استفاده قرار بگیرد.

کلید واژگان: انسولین، داکینگ مولکولی، دیابت، دینامیک مولکولی، شبیه‌سازی، ویتامین D₃ و E

۱- مقدمه

دیابت ملیتوس شایع‌ترین اختلال ناشی از غدد درون‌ریز در سرتاسر جهان است که به دلیل رشد جمعیت، افزایش روند سالمندی، شهرنشینی، شیوع چاقی، عدم تحرک و به عبارت دیگر سبک زندگی نادرست، به‌سرعت در حال گسترش می‌باشد. انتظار می‌رود تعداد کل افراد مبتلا به دیابت در سراسر جهان از ۱۷۱ میلیون نفر در سال ۲۰۱۱ به ۳۶۶ میلیون نفر در ۲۰۳۱ در کشورهای در حال توسعه افزایش یابد. این بیماری ناشی از نقص ترشح یا عملکرد انسولین است. آمارها نشان می‌دهد، تقریباً شش درصد از مردم ایالات متحده درجاتی از اختلالات متابولیسم گلوکز را دارند که نشانه دیابت یا تمایل به ایجاد آن است. همچنین، این آمار نرخ بالای ۹/۵ درصد را برای بزرگسالان در ایران نشان می‌دهد. بر اساس گزارش فدراسیون بین‌المللی دیابت^۱ IDF، حدود ۵/۵ میلیون مبتلای به انواع دیابت در میان جمعیت بزرگسالان ایران وجود دارد. پیش‌بینی می‌شود که این آمار تا سال ۲۰۳۰ حدود ۹/۲ میلیون ایرانی مبتلا به دیابت باشند [۱].

دو کلاس بالینی اصلی از دیابت ملیتوس وجود دارد: دیابت نوع ۱، یا دیابت ملیتوس وابسته به انسولین و دیابت نوع ۲، یا دیابت ملیتوس غیر وابسته به انسولین که دیابت مقاوم به انسولین نیز نامیده می‌شود. دیابت نوع ۲ که حدود ۹۰-۹۵ درصد موارد ابتلا به دیابت را تشکیل می‌دهد، باعث افزایش مرگ‌ومیر، کاهش کیفیت زندگی، کاهش امید به زندگی، افزایش هزینه‌های هنگفت مراقبت بهداشتی و عوارض میکرو و ماکرواسکولار همچون کوری، بیماری‌های کلیوی، قلبی و نروپاتی است [۲-۵]. دیابت ملیتوس وابسته به انسولین، نیاز به درمان با انسولین و کنترل دقیق توازن بین جذب غذا (خوردن غذا) و میزان انسولین (غلظت انسولین) تزریق شده در طول زندگی دارد [۶، ۷]. مقاومت به انسولین و التهاب دو عامل مؤثر

شناخته شده در گسترش دیابت نوع ۲ و بروز عوارض تأخیری در مبتلایان است و تعدیل این دو عامل رویکرد جدید در مدیریت دیابت و پیشگیری از عوارض آن است. مقاومت به انسولین به‌صورت کاهش پاسخ بافت‌های محیطی به عملکرد انسولین تعریف شده است [۸].

در کشورهایی مانند ایالات متحده آمریکا و اسکانندیناوی که از غذاهای غنی شده با ویتامین D استفاده می‌کنند، شیوع کمبود ویتامین D در گروه‌های سنی مختلف ۱/۶ تا ۱۸/۴ درصد است، در حالی که در سایر کشورهای اروپایی که از مکمل ویتامین D استفاده نمی‌کنند، کمبود ویتامین D تا ۵۹/۶ درصد گزارش شده است. مطالعه‌ی IOMS^۲ در پنج شهر بزرگ ایران نیز بیانگر کمبود ویتامین D در مردان و زنان مورد مطالعه به ترتیب ۷۲/۲ و ۷۵/۱ درصد بود. به‌طور کلی تخمین زده می‌شود که یک میلیارد نفر در سراسر جهان تحت تأثیر درجات متفاوتی از کمبود ویتامین D قرار دارند [۹، ۱۰].

تجویز ویتامین‌های E و D از مرسوم‌ترین روش‌های پیشگیری و درمان دیابت نوع ۱ و ۲ است. ویتامین‌های E و D از دسته ویتامین‌های محلول در چربی هستند که فرم فعال آن‌ها در خون به ترتیب آلفا-توکوفرول و کله کلسیفرول (D₃) نام دارند. مطالعات متعددی وجود دارند که نقش مکمل ویتامین‌های D و E در پیشگیری و بهبود دیابت را گزارش کرده‌اند [۱۱-۱۴]. ویتامین D به‌صورت مستقیم و غیرمستقیم از طریق بهبود ترشح انسولین، فعال کردن کانال‌های کلسیمی، اثرات آنتی‌اکسیدانی و کاهش مقاومت به انسولین موجب پیشگیری از دیابت می‌شود. همچنین، مصرف خوراکی ویتامین E به عنوان یک ترکیب فنولی باعث کاهش تنش اکسیداتیو، کاهش گلیکوزیلاسیون پروتئین‌ها، افزایش حساسیت به انسولین و همچنین افزایش فعالیت انسولین می‌شود.

^۲ Iran Obesity and Metabolic Surgery (IOMS)

^۱ International Diabetes Federation

پارامترهای مربوط به ویتامین‌ها با استفاده از برنامه ProDrug تهیه شد. کمپلکس انسولین-ویتامین توسط مدل آب TIP3P و غلظت نهایی ۱۰۰ میلی‌مولار NaCl احاطه شد. مرحله بهینه‌سازی با استفاده از روش steepest descend انجام شد. مرحله تعادل‌سازی در هنگرد NVT برای تنظیم در دمای ۳۱۰ درجه کلون و تعادل‌سازی در هنگرد NPT برای تنظیم فشار در دمای ۱ اتمسفر به مدت ۳۰۰ پیکوثانیه انجام شد. مرحله نهایی شبیه‌سازی به مدت ۵۰ نانوثانیه انجام شد. تمامی تصاویر با استفاده از برنامه PyMol v 2.0 تهیه شد [۱۹]. آنالیزهای آماری و تهیه نمودارها توسط برنامه Origin 2017 انجام شد.

۲-۳ محاسبه انرژی آزاد اتصالی بین مونومرهای کمپلکس هگزامر انسولین

انرژی آزاد اتصالی بین مونومرهای انسولین در کمپلکس هگزامر در حضور و عدم حضور ویتامین‌ها با استفاده از برنامه G_mmpbsa انجام شد. برای محاسبه انرژی آزاد اتصالی از ۱۰ نانوثانیه انتهای شبیه‌سازی استفاده شد [۲۰].

۳- نتایج

۳-۱-۳ داکینگ مولکولی

نتایج داکینگ مولکولی کور^۳ نشان‌دهنده وجود ۶ جایگاه اتصالی برای ویتامین‌ها بر روی ساختار هگزامر انسولین می‌باشد. بر طبق مطالعات قبلی برای فرم‌های ذخیره‌ای پروتئین انسولین به ازای هر مونومر انسولین یک جایگاه اتصال برای ویتامین‌ها وجود دارد [۱۶]. ویتامین‌ها به واسطه ویژگی‌های آب‌گریز شان، به سطوح هیدروفوب هگزامر انسولین متصل می‌شوند (شکل ۱). نتایج داکینگ هدفمند^۴ نشان می‌دهد که ویتامین‌های D₃ و E به ترتیب با میانگین انرژی اتصالی ۳۰/۲۴- و ۳۱/۹۲- کیلوژول بر مول به هگزامر انسولین متصل می‌شوند که توسط نتایج مطالعات اخیر تأیید می‌شود [۱۵].

مطالعات قبلی با تکیه بر سنجش‌های بیوشیمیایی و بیوفیزیکی شامل گرماسنجی روبشی تفاضلی (DSC)، سنجش طیف جذبی، رنگ‌تابی دورانی (CD) و شبیه‌سازی دینامیک مولکولی به بررسی نقش ویتامین‌های D و E بر کانفورماسیون مولکول انسولین پرداخته و نقش پایدارکننده‌ی این ویتامین‌ها را بر ساختار دوم و سوم پروتئین نشان داده‌اند. همچنین، اثر فعال‌کنندگی این ویتامین‌ها بر سیگنالینگ انسولین پس از اتصال به رسپتور مربوطه انجام‌شده و نقش مثبت آنها در افزایش انرژی اتصال گزارش شده است [۱۵، ۱۶].

با این حال، تا کنون مطالعه‌ای به بررسی اثر این ویتامین‌ها بر فرم‌های ذخیره‌ای انسولین نپرداخته است و از آنجایی که پایدارسازی فرم ذخیره‌ای انسولین یکی از چالش‌های اساسی در درمان بیماری دیابت می‌باشد، در این مطالعه سعی بر آن است تا اثر برهم‌کنش ویتامین‌های D₃ و E با انسولین انسانی بر تغییرات کانفورماسیونی و پایداری انسولین سنجیده شود.

۲- روش‌ها

۲-۱ مطالعات داکینگ مولکولی

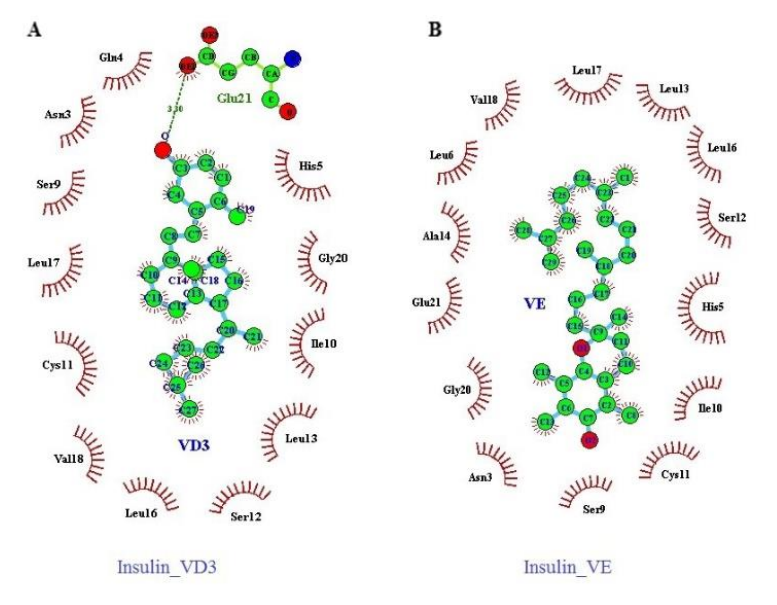
ساختار هگزامر انسولین از پایگاه داده RCSB با کد 5AIY به دست آمد. برنامه داکینگ مولکولی برای یافتن جایگاه‌های اتصال ویتامین بر روی ساختار هگزامر انسولین توسط برنامه AutoDock Vina انجام شد [۱۷] و در نهایت ساختار با بهترین انرژی اتصال انتخاب شد.

۲-۲ مطالعه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

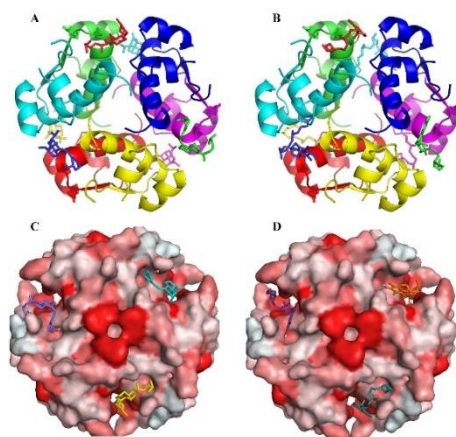
برای مطالعه اثر ویتامین‌های D₃ و E بر پایداری فرم ذخیره‌ای پروتئین انسولین (هگزامر) از کمپلکس پروتئین-ویتامین به دست آمده از نتایج داکینگ استفاده شد. شبیه‌سازی دینامیک مولکولی با استفاده از برنامه گرومکس ۲۰۱۹ و ثابت‌های نیرو gromos 53a6 استفاده شد [۱۸].

⁴ Local docking

³ Blind docking



شکل ۱ تصاویر دوبعدی به دست آمده از اتوداک وینا برای کمپلکس‌های هگزامر انسولین با ویتامین‌های D₃ و E (به ترتیب بخش A برای ویتامین D₃ و بخش B برای ویتامین E). آمینواسیدهای درگیر در پیوند در تصویر مشخص شده‌اند. اتصال در این کمپلکس عمدتاً به صورت آب‌گریز است.



شکل ۲ تصاویر سه‌بعدی مربوط به کمپلکس‌های هگزامر انسولین و ویتامین‌ها. تصاویر A و B به ترتیب مربوط به ساختار کارتون کمپلکس هگزامر انسولین و ویتامین‌های D₃ و E می‌باشد. تصاویر C و D سطوح آب‌گریز و اتصال ویتامین‌ها به حفرات آب‌گریز هگزامر انسولین را نمایش می‌دهد. مناطق آب‌گریز به رنگ قرمز نشان داده شده‌اند.

همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، در اتصال ویتامین D₃-هگزامر انسولین آمینواسیدهای Glu4، Asn3، Leu17، Val18، Gly20 و Glu21 نقش اصلی را در اتصال بر عهده دارند. همچنین، در اتصال ویتامین E-هگزامر انسولین آمینواسیدهای Asn3، Glu4، His5، Ser9، Leu6،

Leu16، Leu13، Ser12، Cys11، Ile10، Ser9، His5

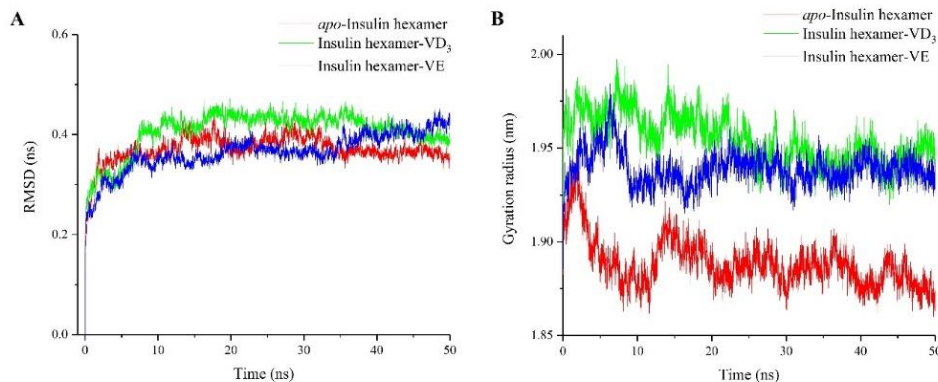
۳-۳ انرژی آزاد اتصالی بین مونومر های کمپلکس هگزامر انسولین

برای بررسی اثر ویتامین ها بر روی پایداری ساختار هگزامر انسولین از روش G-mmpbsa استفاده شد. نتایج حاصل نشان از نقش مؤثر ویتامین D₃ در پایداری هگزامر انسولین دارد. میانگین انرژی بین دو مونومر انسولین در حالت بدون ویتامین و حضور ویتامین D₃ و E به ترتیب ۸۷٫۲-، ۱۷۸٫۲- و ۱۵۳٫۱- محاسبه شد. ویتامین های D₃ و E موجب افزایش انرژی اتصالی بین مونومرها در ساختار هگزامر انسولین شده است. به عبارت دیگر هر سه ساختار همودایمر در کمپلکس هگزامر-ویتامین پایدارتر هستند. به نظر می رسد حضور ویتامین در پایداری بیشتر ساختار هگزامر انسولین از طریق پایدار کردن همودایمرها نقش دارد. شکل ۴ نشان دهنده نقش انرژی اتصالی آمینواسیدها در اتصال به مونومر مجاور است. نتایج نشان می دهد ویتامین ها موجب افزایش انرژی اتصالی از طریق آمینواسیدهای هیدروفوب شده اند؛ بنابراین حضور ویتامین های مذکور از طریق افزایش انرژی اتصالی بین زیر واحدها موجب پایداری بیشتر شکل ذخیره ای انسولین (هگزامر) می شود.

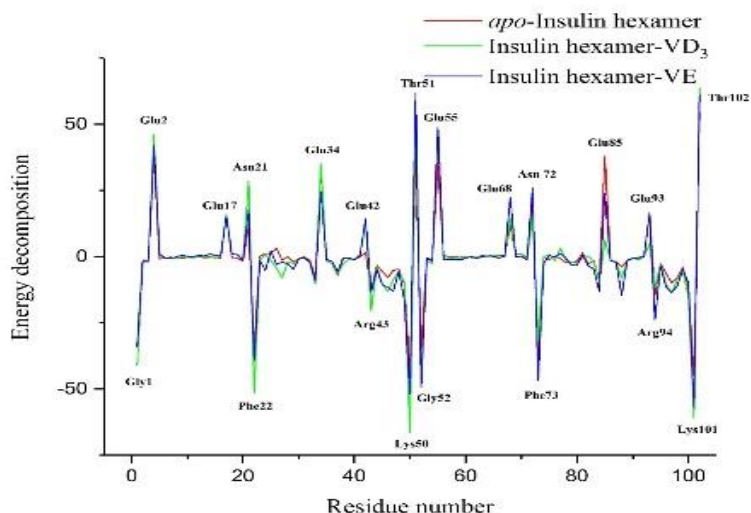
Val18, Leu17, Ala14, Leu13, Ser12, Cys11, Ile10, Gly20 و Glu21 نقش اصلی را در اتصال بر عهده دارند. جایگاه اتصال ویتامین های D₃ و E در منطقه هیدروفوب مونومر های انسولین در مرز بین دو دایمر انسولین است (شکل ۲).

۲-۳ شبیه سازی دینامیک مولکولی

شبیه سازی دینامیک مولکولی یک روش قابل اعتماد برای بررسی تحرکات ساختاری مولکول ها و اتم ها در طول زمان است. در ابتدا تغییرات ساختاری انسولین و صحت انجام شبیه سازی دینامیک مولکولی توسط پارامترهای RMSD و شعاع ژیراسیون (R_g) بررسی شد. نتایج به دست آمده نشانگر ثبات کمپلکس های انسولین-ویتامین در طول شبیه سازی می باشد و در ۲۰ نانوثانیه ابتدایی شبیه سازی تغییرات کمی در ساختار انسولین وجود داشته است، اما در ۳۰ نانوثانیه پایانی شبیه سازی ساختار پروتئین به تعادل رسیده است (شکل ۳A). شعاع ژیراسیون کمپلکس های انسولین-ویتامین نسبت به انسولین خالی اندکی افزایش داشته است که بیانگر تغییرات ساختار سوم هگزامر انسولین می باشد (شکل ۳B). دلیل افزایش شعاع ژیراسیون هگزامر انسولین می تواند نفوذ ویتامین ها به داخل حفره های آب گریز پروتئین باشد.



شکل ۳ تغییرات RMSD (A) و شعاع ژیراسیون (B) کمپلکس هگزامر انسولین و ویتامین های D₃ و E در طول شبیه سازی



شکل ۴ نمودار مربوط به انرژی اتصالی بین زیر واحدهای در حالت بدون حضور ویتامین و در حضور ویتامین‌های D3 و E است. تصاویر مربوط به نقش آمینواسیدها در انرژی آزاد اتصالی مونومرهای انسولین در ساختار هگزامر انسولین می‌باشند.

جدول ۱ انرژی اتصالی ویتامین‌های D3 و E به هگزامر انسولین. برای خلاصه‌سازی تنها انرژی‌های مربوط به یک ویتامین از ۶ ویتامین متصل شده در جدول زیر گزارش شده است.

کمپلکس	انرژی واندروالس	انرژی الکترواستاتیک	انرژی حلالیت قطبی	انرژی SASA	انرژی اتصال
هگزامر انسولین-ویتامین D ₃	- ۷۹/۰۲۴	۰/۸۷۵	۲۳/۲۴۷	- ۰۹/۸۴۴	- ۶۴/۷۴۶
هگزامر انسولین-ویتامین E	- ۵۱/۱۵۳	- ۳/۷۸۲	۶/۶۸۰	- ۶/۴۸۹	- ۵۴/۷۴۴

نتایج به‌دست‌آمده از آنالیز mm-pbsa بیانگر این مطلب است که انرژی اتصالی مونومرها در ساختار انسولین افزایش یافته است. از آنجا که ساختار هگزامر انسولین از اتصال ۶ مولکول انسولین به‌صورت سه همودایمر انسولین ایجاد شده است [۲۱]، به نظر می‌رسد افزایش انرژی اتصالی بین مونومرها به معنی پایداری ساختارهای دایمر می‌باشد. از نتایج به‌دست آمده می‌توان پیش‌بینی کرد که ساختارهای دایمری در هگزامر انسولین پایدار شده‌اند، در نتیجه باعث پایداری ساختار هگزامری شده‌اند.

برای بررسی پایداری فرم هگزامر انسولین و اثبات فرضیه پایداری دایمرها در اثر اتصال ویتامین‌ها از ۳ روش استفاده

همچنین، انرژی اتصالی ویتامین‌های D₃ و E به هگزامر انسولین به‌دست‌آمده از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی نسبت به داکینگ به طور معنی‌داری افزایش یافته است (جدول ۱). این افزایش انرژی اتصالی از ۳۰/۲۴- به ۶۴/۷۴۶- برای ویتامین D₃ و از ۳۱/۹۲- به ۵۴/۷۴۴- برای ویتامین E نشانگر نفوذ ویتامین‌ها به داخل حفرات آب‌گریز هگزامر انسولین و درگیر شدن تعداد بیشتری از آمینواسیدها در پیوند می‌باشد. افزایش انرژی اتصالی ویتامین‌ها به انسولین در طول شبیه‌سازی بیانگر داکینگ صحیح و صحت روند شبیه‌سازی نیز می‌باشد.

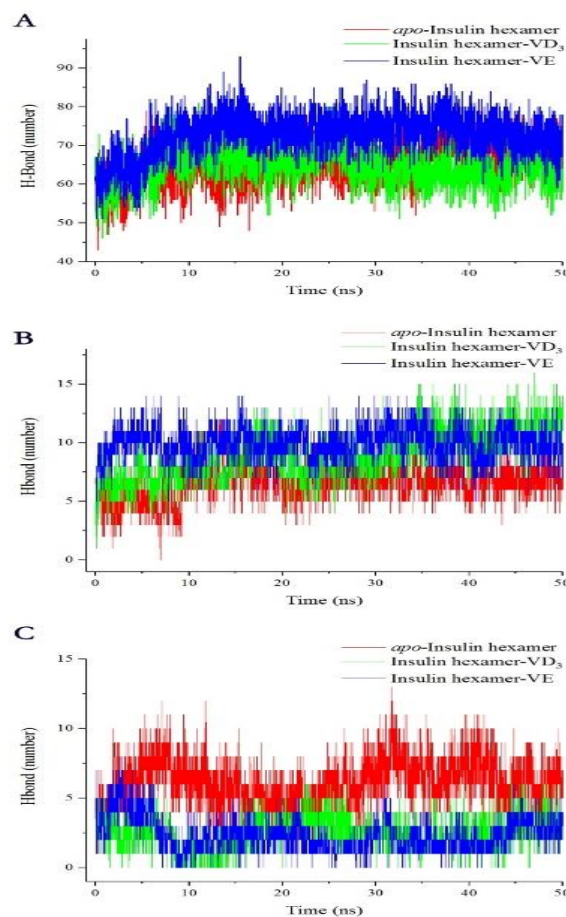
۳-۴ پایداری هگزامر انسولین

بررسی تعداد پیوندهای هیدروژنی درونی پروتئین در سه شرایط بدون حضور ویتامین، در حضور ویتامین D3 و E محاسبه شد. نتایج نشان‌دهنده افزایش تعداد پیوندهای هیدروژنی درونی دایمرها در حضور ویتامین‌ها نسبت به حالت بدون ویتامین است (شکل ۵A). همچنین، نتایج نشان می‌دهند تعداد پیوندهای هیدروژنی بین مونومرها در هر سه دایمر در حضور ویتامین‌ها افزایش یافته است (شکل ۵B). نمودار ۵C نیز کاهش تعداد پیوندهای هیدروژنی بین دایمرها در طول شبیه‌سازی را بیان می‌کند.

شد: بررسی تغییرات پیوند هیدروژنی درون دایمرها، بررسی تغییرات فاصله بین مونومرها در هر سه دایمر و بررسی تغییرات ساختارهای دوم پروتئین. در ادامه نتایج بخش پایداری به دلیل تعداد بسیار بالای نمودارها به صورت میانگینی از نتایج کلی ارائه شده است.

۳-۵ بررسی پیوند هیدروژنی

در این مطالعه، شکل‌گیری و شکست پیوند هیدروژنی در طی شبیه‌سازی دینامیک مولکولی بررسی شد. در این



شکل ۵ نمودار مربوط به تغییرات پیوند هیدروژنی پروتئین هگزامر انسولین در حالت بدون حضور ویتامین و در حضور ویتامین‌های D3 و E (به ترتیب، A، B و C) است. نمودار حاوی میانگین تعداد پیوندهای هیدروژنی بین مونومرهای هگزامر انسولین در زمان شبیه‌سازی برای سه شرایط A، B و C است.

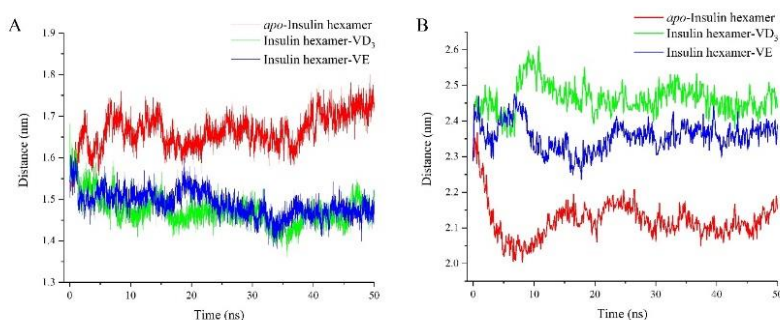
در واقع افزایش پیوندهای هیدروژنی در ساختارهای دایمری انسولین در حضور ویتامین‌ها نشان‌دهنده افزایش پایداری دایمرهای انسولین در طی شبیه‌سازی است. با نفوذ ویتامین‌ها به داخل ساختار هگزامر می‌توان انتظار کاهش در تعداد پیوندهای هیدروژنی بین دایمرها را نیز داشت که موجب افزایش شعاع ژیراسیون هگزامر انسولین نیز شده است، بااین حال تعداد کلی پیوندها در کمپلکس‌های دایمری انسولین-ویتامین افزایش یافته است که بیانگر پایداری کمپلکس می‌باشد.

۳-۶ بررسی فاصله دایمرها

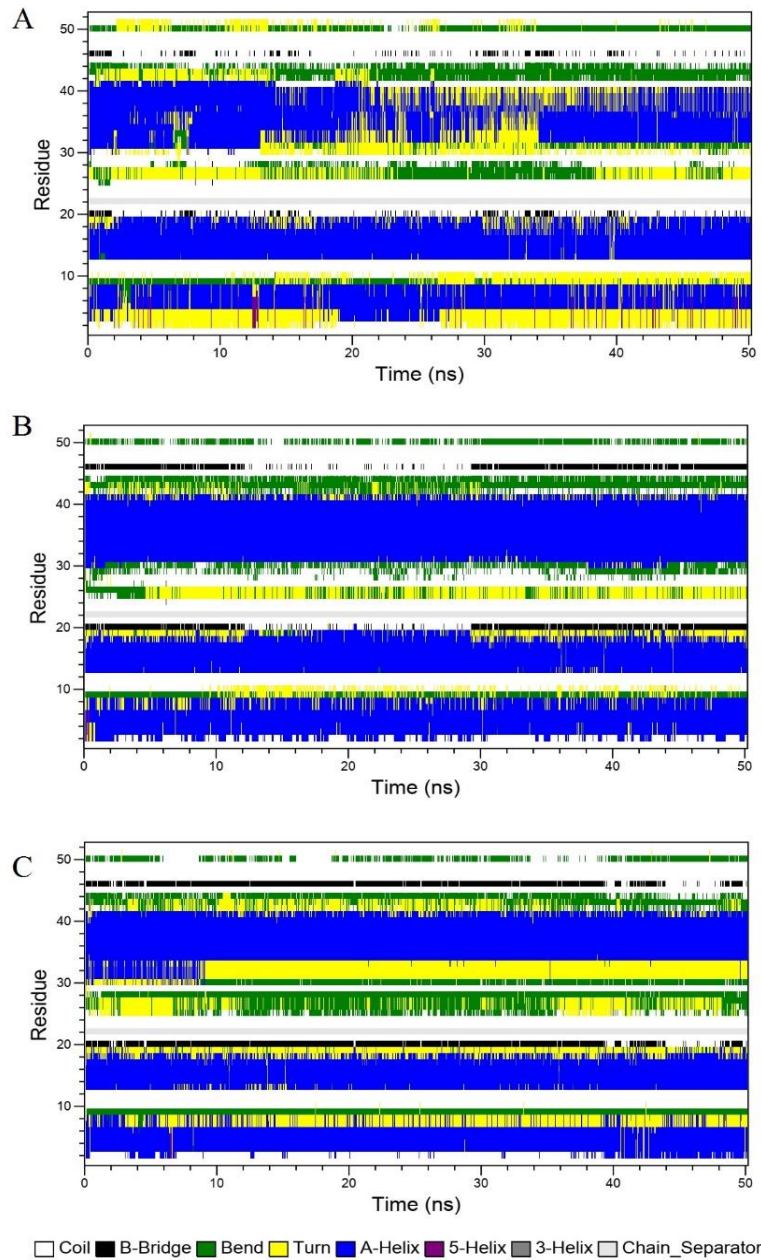
برای این مطالعه از مرکز جرم مونومرها به‌عنوان مرکز محاسبه فاصله در طول شبیه‌سازی استفاده شد. سپس، فاصله مونومرها از هم در هر کدام از ساختارهای دایمری در طول شبیه‌سازی محاسبه شد. نتایج بیانگر کاهش فاصله و نزدیک‌تر شدن مونومرها به هم در هر سه ساختار همودایمر در طول شبیه‌سازی است که بیانگر تأثیر اتصال ویتامین‌ها در افزایش پایداری دایمرها می‌باشد (شکل ۶A). همچنین، نشان داده می‌شود که فاصله دایمرها از هم

۳-۷ بررسی تغییرات ساختار دوم

افزایش یافته است که در تطابق با نتایج پیوند هیدروژنی است (شکل ۶B).
 برای مطالعه تغییرات ساختار دوم هگزامر انسولین از ابزار DSSP استفاده شد. همان‌طور که بر اساس مطالعات پیشین انتظار می‌رفت، هر دو ویتامین D_3 و E باعث تغییرات معنی‌دار ساختار دوم انسولین شدند [۱۵، ۱۶]. شکل ۷ تغییرات ساختار دوم یکی از مونومرهای ساختار هگزامر انسولین در حضور و عدم حضور ویتامین‌ها نمایش می‌دهد. همان‌طور که مشخص است ساختارهای آلفا هلیکس انسولین در حضور ویتامین‌ها افزایش یافته و در طول شبیه‌سازی پایدار مانده است. این یافته‌ها با یافته‌های مربوط به افزایش پیوندهای درونی دایمرها در تطابق است. افزایش ساختارهای هلیکسی در پروتئین یکی از شاخص‌های افزایش پایداری می‌باشد. همان‌طور که انتظار می‌رود ویتامین E همانند ترکیبات فنولی باعث افزایش معنی‌دار ساختار دوم آلفاهلیکس در پروتئین انسولین می‌شود [۱۶].



شکل ۶ نمودار میانگین تغییرات فاصله مرکز جرم مونومرها از هم در هر ساختار همودایمر برای هگزامر انسولین در حالت بدون ویتامین و در حضور ویتامین‌های D_3 و E. (A) و نمودار میانگین تغییرات فاصله مرکز جرم دایمرها از هم در ساختار هگزامر انسولین در عدم حضور ویتامین‌ها و در حضور ویتامین‌های D_3 و E در طول شبیه‌سازی (B)



شکل ۷ نمودار تغییرات ساختار دوم فرم هگزامر پروتئین انسولین در سه حالت عدم حضور ویتامین (A)، در حضور ویتامین E (B) و در حضور ویتامین D3 (C) در طول شبیه‌سازی. برای خلاصه‌سازی و درک بهتر تصویر تنها ساختار یک مونومر از فرم هگزامر انسولین آورده شده است.

۴- بحث و نتیجه‌گیری

شود. فرم مونومر فرم فعال و عملکردی، فرم دایمر فرم پایدار در جریان خون و فرم هگزامر مربوط به حالت ذخیره‌ای انسولین قبل از ترشح به داخل جریان خون می‌باشد [۲۲]. نتایج حاصل از داکینگ مولکولی در این پژوهش نشان دهنده جایگاه اتصال ویژه برای ویتامین‌های

در این تحقیق برای اولین بار بررسی اثر ویتامین‌های E و D بر فرم ذخیره‌ای پروتئین انسولین (هگزامر) از طریق روش‌های محاسباتی انجام شد. پروتئین انسولین به طور معمول در سه فرم مونومر، دایمر و هگزامر مشاهده می‌

عدم حضور این ویتامین‌ها افزایش قابل توجهی داشته است.

همچنین، در ادامه تعداد پیوندهای هیدروژنی درونی و بین واحدهای مونومری در هر دایمر انسولین در طول شبیه‌سازی محاسبه شد. تعداد پیوندهای هیدروژنی درونی فرم هگزامر نیز در حضور ویتامین افزایش قابل توجهی نسبت به فرم هگزامر بدون ویتامین دارد. همچنین، تعداد پیوندهای هیدروژنی بین مونومری در فرم هگزامر در حضور ویتامین افزایش قابل توجهی نسبت به حالت کنترل دارد.

نتایج به دست آمده در این پژوهش، شامل افزایش پایداری مولکول انسولین و کاهش انرژی آزاد سامانه طی اتصال این ویتامین‌ها به فرم هگزامر انسولین، با نتایج آزمایشگاهی قبلی ما مطابقت دارد [۱۶]. نتایج حاصل از این آزمایش‌ها نشان‌دهنده‌ی اثرگذاری ویتامین‌های D3 و E بر پایداری کانفورماسیون فضایی مولکول انسولین بود و نقش ویژه‌ی آنها را بر افزایش پایداری ساختار دوم و سوم پروتئین نشان داده‌است.

D3 و E است. ویتامین‌های مذکور به واسطه حلقه‌ها و خواص هیدروفوب به ناحیه هیدروفوب در مرز بین دو زیرواحد مونومری انسولین متصل می‌شوند. در اتصال ویتامین‌ها به فرم هگزامر انسولین آمینواسیدهای Asn3، Gln4، His5، Leu6، Ser9، Ile10، Cys11، Ser12، Leu13، Ala14، Leu16، Leu17، Val18، Gly20 و Glu21 نقش دارد. نتایج حاصل از محاسبه انرژی آزاد اتصالاتی حاکی از اثر پایدارکنندگی هر دو ویتامین D3 و E بر روی ساختار هگزامر انسولین است. همچنین، انرژی آزاد اتصالاتی بین مونومرهای هگزامر انسولین در سه حالت، عدم حضور ویتامین و در حضور ویتامین‌های D3 و E به ترتیب ۸۷/۲-، ۱۷۸/۲- و ۱۵۳/۱- محاسبه شد (جدول ۲).

نتایج مربوط به توزیع انرژی اتصالاتی هر آمینواسید نشان‌دهنده افزایش انرژی اتصالاتی برای آمینواسیدهای هیدروفوب در اتصالات بین مونومری در پروتئین هگزامر انسولین است. توزیع انرژی آزاد اتصالاتی برای آمینواسیدهای ۱۷، ۲۲، ۴۲، ۵۲، ۷۲ و ۸۵ فرم هگزامر انسولین، در حضور ویتامین‌های D3 و E نسبت به حالت

جدول ۲ میانگین انرژی اتصالاتی زیر واحدهای مونومری به هم در هر همودایمر برای فرم هگزامر انسولین در عدم حضور ویتامین‌ها و در

حضور ویتامین‌های D3 و E

انرژی کمپلکس / انرژی	انرژی واندروالس	انرژی الکترواستاتیک	انرژی حل‌شوندگی قطبی	انرژی سطح در دسترس	انرژی اتصالاتی
هگزامر انسولین	-۳۲۴/۹۸۸ +/- ۱/۷۲۳	-۷۰/۲۵۷ +/- ۴/۲۶۴	۳۴۲/۰۴۸ +/- ۵/۱۲۰	-۳۴/۰۴۱ +/- ۲/۴۹۸	-۸۷/۲۳۸ +/- ۴/۰۱۳
هگزامر انسولین- ویتامین D3	-۲۹۵/۴۵۶ +/- ۱/۵۱۰	-۲۹۰/۳۱۷ +/- ۷/۴۷۲	۴۳۹/۴۷۴ +/- ۹/۲۰۸	-۳۱/۸۷۷ +/- ۲/۵۴۱	-۱۷۸/۱۷۶ +/- ۳/۸۲۱
هگزامر انسولین- ویتامین E	-۳۰۵/۳۴۵ +/- ۲/۳۶۹	-۲۷۰/۰۸۷ +/- ۳/۹۹۲	۴۵۶/۹۸۷ +/- ۵/۷۸۱	-۳۴/۷۰۸ +/- ۲/۶۳۲	-۱۵۳/۱۵۴ +/- ۵/۵۳۸

دیابت نوع II کاهش نیمه‌عمر انسولین در داخل خون است [۲۸]، با افزایش پایداری فرم دایمری نیز می‌توان نیمه‌عمر انسولین در خون را افزایش داد و به این ترتیب به مقابله با دیابت نوع II پرداخت. این روش با توجه به نداشتن اثرات جانبی می‌تواند یک راهکار مناسب برای کنترل سرعت رهایش انسولین و کنترل نیمه‌عمر انسولین در داخل خون باشد. علاوه بر این، برای درمان دیابت نوع I نیز استفاده از زیست‌حسگرهای ایمپلنت شده در داخل یا خارج بدن بیماران در حال توسعه می‌باشد. از آنجا که انسولین پایدار شده رهایش منظم و متعادلی از این زیست‌حسگرهای ایمپلنت شده خواهد داشت، بنابراین در این روش می‌توان از انسولین پایدار شده با ویتامین‌های D3 و E به عنوان انسولین تزریقی استفاده کرد.

۵- منابع

- [1] Esteghamati, A., et al., Diabetes in Iran: prospective analysis from first nationwide diabetes report of National Program for Prevention and Control of Diabetes (NPPCD-2016). Scientific reports, 2017. 7(1): p. 1-10.
- [2] Group, N.D.D., Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. Diabetes, 1979. 28(12): p. 1039-1057.
- [3] Hanley, A.J., et al., Prediction of type 2 diabetes mellitus with alternative definitions of the metabolic syndrome. Circulation, 2005. 112(4): p. 3713-3721.
- [4] Morgan, C.L., C.J. Currie, and J.R. Peters, Relationship between diabetes and mortality: a population study using record linkage. Diabetes care, 2000. 23(8): p. 1103-1107.
- [5] Wild, S., et al., Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. Diabetes care, 2004. 27(5): p. 1047-1053.
- [6] Hoehn, K.L., et al., Insulin resistance is a cellular antioxidant defense mechanism. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. 106(42): p. 17787-17792.
- [7] Goldberg, R.B., Cytokine and cytokine-like inflammation markers, endothelial dysfunction, and imbalanced coagulation in development of diabetes and its complications. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2009. 94(9): p. 3171-3182.
- [8] Souberbielle, J.-C., et al., Vitamin D status and redefining serum parathyroid hormone reference range in the elderly. The Journal of Clinical

همچنین، مشخص شده است که این برهمکنش در افزایش انرژی اتصالاتی انسولین به رسپتور نقش داشته و با تقویت فرم فعال انسولین در فرایند سیگنالینگ انسولین در بدن، موجب بروز نقش فعال‌کنندگی بر مولکول انسولین مونومری می‌شود [۱۵]. تکمیل این نتایج با سنجش نقش این دو ویتامین بر فرم ذخیره‌ای انسولین، نتایج کسب شده پیشین در راستای تقویت رهایش تنظیم‌شده انسولین با ارائه مولکول‌های پایدارساز جدید را تایید می‌کند.

مطالعات پیشین به خوبی نشان داده‌اند که پایداری فرم هگزامر انسولین به عنوان حالت ذخیره‌ای نقش مؤثری در سرعت رهایش انسولین دارد [۲۳]. افزایش پایداری فرم هگزامر به عنوان فرم ذخیره‌ای انسولین از طریق پایدارسازی همودایمرها موجب افزایش نیمه‌عمر هگزامر می‌شود [۲۴]. همچنین، پایدارسازی هگزامر انسولین از تشکیل ساختارهای آگریگه جلوگیری می‌کند [۲۵]. این پایدارسازی با به کارگیری مواد متعددی شامل ترکیبات ایزوتونیک، ترکیبات حفظ‌کننده و مواد کاهش‌دهنده‌ی سرعت واکنش آنزیمی ارزیابی شده است [۲۶]. به عنوان مثال مطالعات شبیه‌سازی برای بررسی نقش پایدارکنندگی ترکیبات فنولی مانند ام-کرسول بر فرم هگزامر پروتئین انسولین، وجود جایگاه اتصال اختصاصی در نواحی هیدروفوب زیرواحدهای پروتئین هگزامر را نشان می‌دهد [۲۷]. نتایج مطالعه‌ی حاضر نیز با تأیید مطالعات آزمایشگاهی و شبیه‌سازی پیشین، نقش مثبت پایدارکننده‌های ویتامین D3 و E را در افزایش نیروی اتصالاتی زیرواحدها و در نتیجه افزایش نیمه‌عمر فرم هگزامر، نشان می‌دهد.

افزایش پایداری فرم هگزامر (فرم ذخیره‌ای) انسولین، در روند رها سازی آن در سیستم‌های بیولوژیکی بسیار حائز اهمیت است. همچنین، این افزایش نیمه‌عمر فرم ذخیره‌ای انسولین می‌تواند منجر به رهایش منظم و متعادل انسولین به داخل خون شود. از آنجایی که مشکل اصلی مبتلایان به

- [18] Van Der Spoel, D., et al., GROMACS: fast, flexible, and free. *Journal of computational chemistry*, 2005. 26(16): p. 1701-1718.
- [19] DeLano, W.L., PyMOL. 2002.
- [20] Kumari, R., et al., g_mmpbsa□ A GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations. *Journal of chemical information and modeling*, 2014. 54(7): p. 1951-1962.
- [21] Chang, X., et al., Solution structures of the R6 human insulin hexamer. *Biochemistry*, 1997. 36(31): p. 9409-9422.
- [22] Mayer, J.P., F. Zhang, and R.D. DiMarchi, Insulin structure and function. *Peptide Science: Original Research on Biomolecules*, 2007. 88(5): p. 687-713.
- [23] Weiss ,M.A., Design of ultra-stable insulin analogues for the developing world. *J. Health Spec*, 2013. 1(2): p. 59-70.
- [24] Dunn, M.F., Zinc–ligand interactions modulate assembly and stability of the insulin hexamer—a review. *Biometals*, 2005. 18(4): p. 295-303.
- [25] Xiong, X., et al., Novel four-disulfide insulin analog with high aggregation stability and potency. *Chemical science*, 2020. 11(1): p. 195-200.
- [26] Mukherjee, S., et al., What gives an insulin hexamer its unique shape and stability? Role of ten confined water molecules. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2018. 122(5): p. 1631-1637.
- [27] Akbarian, M., et al., Chemical modifications of insulin: Finding a compromise between stability and pharmaceutical performance. *International journal of pharmaceutics* : (۲-۱)۰۴۷ .۲۰۱۸ , p. 450-468.
- [28] Tomasi, T., et al., Insulin half-life in normal and diabetic subjects. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1967. 126(1): p. 315-317.
- Endocrinology & Metabolism*, 2001. 86(7): p. 3086-3090.
- [9] Heshmat, R., et al., Vitamin D deficiency in Iran: A multi-center study among different urban areas. *Iran J Public Health*, 2008. 37(1): p. 72-8.
- [10] Baz-Hecht, M. and A.B. Goldfine, The impact of vitamin D deficiency on diabetes and cardiovascular risk. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity* : (۲)۱۷ .۲۰۱۰ , p. 113-119.
- [11] Group, E.S.S., Vitamin D supplement in early childhood and risk for Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*, 1999. 42(1): p. 51-54.
- [12] Hyppönen, E., et al., Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes :a birth-cohort study. *The Lancet*, 2001. 358(9292): p. 1500-1503.
- [13] Fronczak, C.M., et al., In utero dietary exposures and risk of islet autoimmunity in children. *Diabetes care*, 2003. 26(12): p. 3237-3242.
- [14] Mathieu, C., et al., Seasonality of birth in patients with type 1 diabetes. *The Lancet*, 2002. 359(9313): p. 1248.
- [15] Soleymani, H., et al., Activation of human insulin by vitamin E: A molecular dynamics simulation study. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 2019. 91: p. 194-203.
- [16] Soleymani, H., et al., Vitamin E induces regular structure and stability of human insulin, more intense than vitamin D3. *International journal of biological macromolecules*, 2016. 93: p. 868-878.
- [17] Trott, O. and A.J. Olson, AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry*, 2010. 31(2): p. 455-461.

Introducing the Vitamins D3 and E as Stabilizers of Insulin Hexamer Form for Regulated Release, Based on Molecular Dynamics Simulation Study

Reza Mahdavian¹, Hossein Soleymani¹, Mohammad Ghorbani¹, Hossein Naderi-Manesh^{1*}

1-Master of Biophysics, Department of Biophysics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran.

2-PhD of Biophysics, Department of Biophysics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran.

3- Professor of Biophysics, Department of Biophysics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran.

naderman@modares.ac.ir

Receipt: 2022/02/12

Accepted: 2022/06/11

Abstract

Vitamins D and E are two common medicines for diabetes treatment. Among the main issues in this field is the release of insulin into the circulatory system. Increasing the stability of insulin hexamer is an evolving strategy in improving insulin secretion efficiency. Insulin protein is commonly found in three forms: monomer, dimer, and hexamer. In this study, for the first time, computational approaches were used to investigate the effect of vitamins D3 and E on the stability of insulin hexamer. The molecular docking results indicate six specific binding sites for these vitamins. These bind to the hydrophobic sites of insulin subunits due to their structural rings and hydrophobic properties. The G-mmpbsa analysis indicates the stabilizing role of both vitamins. The binding of these vitamins to the hexamer has significantly increased the binding energy between insulin subunits. Also, the number of hydrogen bonds between monomeric subunits of each insulin homodimer increased in the presence of the vitamins. It also significantly increases the number of internal hydrogen bonds of hexamer protein. Accordingly, vitamins D3 and E bind to and stabilize the insulin hexamer, resulting in a slower and more balanced insulin release as well as a longer half-life for the dimer in the bloodstream. These findings will pave the way to design a new strategy to regulate insulin release and increase its half-life in the blood for type II diabetes treatment. Besides, hexamer stabilization can be an effective treatment strategy for type I diabetes through slow release from an implanted biosensor system.

Keywords: Diabetes, G-mmpbsa, Insulin, Molecular docking, Molecular dynamics Simulation, Vitamins D₃ and E