معرفی ویتامین‌های D_3 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
دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۲۳ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۲۱

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 درحال‌توسعه است. پروتئین انسولین به طور معمول در سه فرم مونومر، دایمر و هگزامر مشاهده می‌شود. در این تحقیق برای اولین‌بار، بررسی اثر ویتامین‌های D_3 و E بر پایداری فرم ذخیره‌ای انسولین، از طریق روش‌های محاسباتی صورت گرفت. نتایج حاصل از داکینگ مولکولی نشان‌دهنده وجود ٦ جایگاه اتصالی 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 اتصالی بین زیر واحدهای انسولین شده است. حضور ویتامین‌های مذکور موجب افزایش تعداد پیوندهای هیدروژنی بین زیرواحدهای مونومری 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 می شود. 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 زیست حسگری ایمپلنت‌شده نیز مورد استفاده قرار بگیرد.

کلید واژگان: انسولین، داکینگ مولکولی، دیابت، دینامیک مولکولی، شبیه‌سازی، ویتامین D_3 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 ۳٦٦ میلیون نفر در ۲۰۳۱ در کشورهای درحال‌توسعه افزایش یابد. این بیماری ناشی از نقص ترشح یا عملکرد انسولین است. آمارها نشان می‌دهد، تقریباً شش درصد از مردم ایالات‌متحده 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 IDF[1]، 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 نوروپاتی 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 [٦, ۷]. مقاومت به انسولین و التهاب دو عامل مؤثر شناخته شده در گسترش دیابت نوع 2 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 ایالات‌متحده‌ی آمریکا و اسکاندیناوی که از غذاهای غنی‌شده با ویتامین D استفاده می‌کنند، شیوع کمبود ویتامین D در گروه‌های سنی مختلف ۱/٦ تا ۱۸/٤ درصد است، درحالی‌که در سایر کشورهای اروپایی که از مکمل ویتامین D استفاده نمی‌کنند، کمبود ویتامین D تا ۵۹/٦ در صد گزارش شده است. مطالعه‌ی IOMS[2] 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. به‌طورکلی تخمین زده می‌شود که یک میلیارد نفر در سراسر جهان تحت تأثیر درجات متفاوتی از کمبود ویتامین D قرار دارند [۹, ۱۰].

تجویز ویتامین های E و D از مرسوم‌ترین روش های پیشگیری و درمان دیابت نوع ۱ و ۲ است. ویتامین‌های E و D از دسته ویتامین‌های محلول در چربی هستند که فرم فعال آن ها در خون به ترتیب آلفا-توکوفرول و کله کلسیفرول (D_3) نام دارند. مطالعات متعددی وجود دارند که نقش مکمل ویتامین‌های D و E در پیشگیری و بهبود دیابت را گزارش کرده‌اند [۱۱-۱٤]. 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.

[1] International Diabetes Federation

[2] Iran Obesity and Metabolic Surgery (IOMS)

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 این‌حال، تا کنون مطالعه‌ای به بررسی اثر این ویتامین‌ها بر فرم‌های ذخیره‌ای انسولین نپرداخته است و ازآنجایی‌که پایدارسازی فرم ذخیره‌ای انسولین یکی از چالش‌های اساسی در درمان بیماری دیابت می‌باشد، در این مطالعه سعی بر آن است تا اثر برهم‌کنش ویتامین‌های D_3 و E با انسولین انسانی بر تغییرات کنفورماسیونی و پایداری انسولین سنجیده شود.

۲- روش‌ها

۲-۱ مطالعات داکینگ مولکولی

ساختار هگزامر انسولین از پایگاه داده RCSB با کد 5AIY به‌دست 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 ویتامین های D_3 و E بر پایداری فرم ذخیره‌ای پروتئین انسولین (هگزامر) از کمپلکس پروتئین-ویتامین به‌دست‌آمده از نتایج داکینگ استفاده شد. شبیه‌سازی دینامیک مولکولی با استفاده از برنامه گرومکس ۲۰۱۹ و ثابت‌های نیرو gromos 53a6 استفاده شد [۱۸]. 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 کلوین 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].

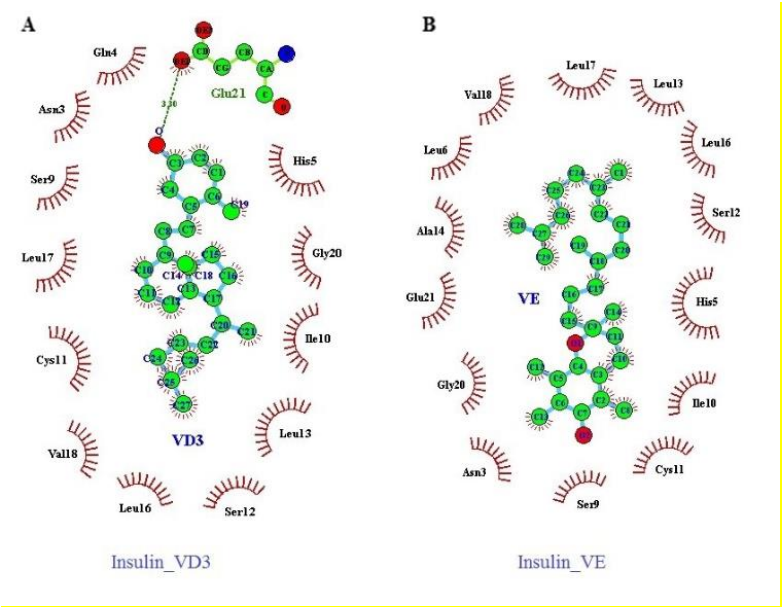
۳- نتایج

۳-۱ داکینگ مولکولی

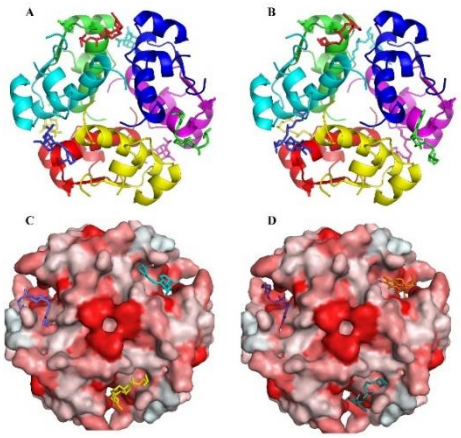
نتایج داکینگ مولکولی کور[3] نشان‌دهنده وجود ٦ جایگاه اتصالی برای ویتامین‌ها بر روی ساختار هگزامر انسولین می‌باشد. بر طبق مطالعات قبلی برای فرم‌های ذخیره‌ای پروتئین انسولین به ازای هر مونومر انسولین یک جایگاه اتصال برای ویتامین ها وجود دارد [۱٦]. ویتامین ها به‌واسطه ویژگی‌های آب‌گریز شان، به سطوح هیدروفوب هگزامر انسولین متصل می شوند (شکل ۱). نتایج داکینگ هدفمند[4] نشان می‌دهد که ویتامین‌های D_3 و E به ترتیب با میانگین انرژی اتصالی ۳۰/۲٤- و ۳۱/۹۲- کیلوژول بر مول به هگزامر انسولین متصل می شوند که توسط نتایج مطالعات اخیر تأیید می‌شود [۱۵].

[3] Blind docking

[4] Local docking



شکل ۱ تصاویر دوبعدی به‌دست‌آمده از اتوداک وینا برای کمپلکس‌های هگزامر انسولین با ویتامین‌های D_3 و E (به ترتیب بخش A برای ویتامین D_3 و بخش B برای ویتامین E). آمینواسیدهای درگیر در پیوند در تصویر مشخص شده‌اند. اتصال در این کمپلکس عمدتاً به‌صورت 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 D_3 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 D_3–هگزامر انسولین آمینواسیدهای Asn3 ،Gln4، His5، Ser9، Ile10، Cys11، Ser12، Leu13، Leu16، Leu17، Val18، Gly20 و Glu21 نقش اصلی را در اتصال بر عهده دارند. همچنین، در اتصال ویتامین E–هگزامر انسولین آمینواسیدهای Asn3،Gln4، His5، Leu6، Ser9،

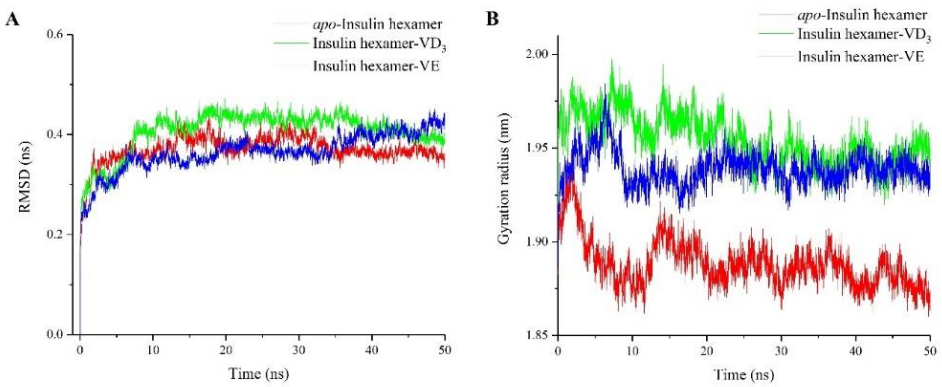
Ile10، Cys11، Ser12، Leu13، Ala14، Leu17، Val18، Gly20 و Glu21 نقش اصلی را در اتصال بر عهده دارند. جایگاه اتصال ویتامین‌های D_3 و E در منطقه هیدروفوب مونومرهای انسولین در مرز بین دو دایمر انسولین است (شکل ۲).

۳-۲ شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

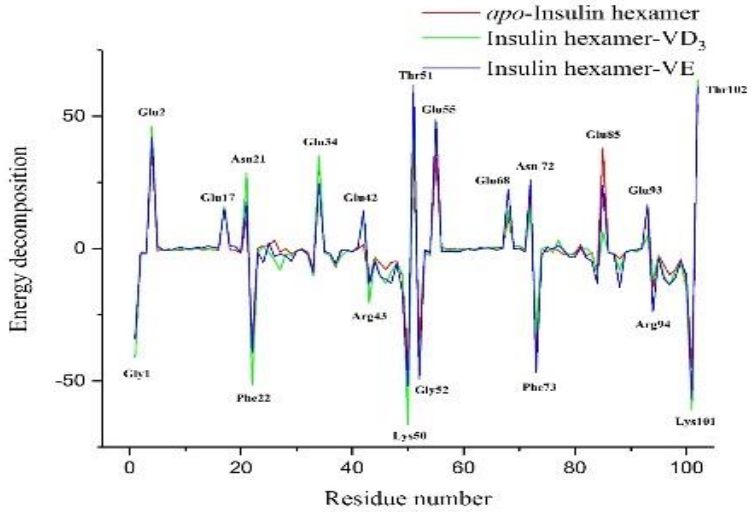
شبیه‌سازی دینامیک مولکولی یک روش قابل‌اعتماد برای بررسی تحرکات ساختاری مولکول‌ها و اتم‌ها در طول زمان است. در ابتدا تغییرات ساختاری انسولین و صحت انجام شبیه‌سازی دینامیک مولکولی توسط پارامترهای RMSD و شعاع ژیراسیون (R_g) بررسی شد. نتایج به‌دست‌آمده نشانگر ثبات کمپلکس‌های انسولین-ویتامین در طول شبیه‌سازی می‌باشد و در ۲۰ نانوثانیه ابتدایی شبیه‌سازی تغییرات کمی در ساختار انسولین وجود داشته است، اما در ۳۰ نانوثانیه پایانی شبیه‌سازی ساختار پروتئین به تعادل رسیده است (شکل ۳A). شعاع ژیراسیون کمپلکس‌های انسولین-ویتامین نسبت به انسولین خالی اندکی افزایش داشته است که بیانگر تغییرات ساختار سوم هگزامر انسولین می‌باشد (شکل ۳B). دلیل افزایش شعاع ژیراسیون هگزامر انسولین می‌تواند نفوذ ویتامین‌ها به داخل حفره‌های آب‌گریز پروتئین باشد.

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

برای بررسی اثر ویتامین‌ها 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. ویتامین‌های D3 و E موجب افزایش انرژی اتصالی بین مونومر ها در ساختار هگزامر انسولین شده است. به عبارت دیگر هر سه ساختار همودایمر در کمپلکس هگزامر-ویتامین پایدارتر هستند. به نظر می‌رسد حضور ویتامین در پایداری بیشتر ساختار هگزامر انسولین از طریق پایدار کردن همودایمرها نقش دارد. شکل ٤ نشان‌دهنده نقش انرژی اتصالی آمینواسیدها در اتصال به مونومر مجاور است. نتایج نشان می‌دهد ویتامین‌ها موجب افزایش انرژی اتصالی از طریق آمینواسیدهای هیدروفوب شده‌اند؛ بنابراین حضور ویتامین‌های مذکور از طریق افزایش انرژی اتصالی بین زیر واحدها موجب پایداری بیشتر شکل ذخیره‌ای انسولین (هگزامر) می‌شود.



شکل ۳ تغییرات RMSD (A) و شعاع ژیراسیون (B) کمپلکس هگزامر انسولین و ویتامین‌های D_3 و E در طول شبیه‌سازی



شکل ٤ 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 D_3 و E به هگزامر انسولین. برای خلاصه‌سازی تنها انرژی‌های مربوط به یک ویتامین از ٦ 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	- ۷۹/۰۲٤	۰/۸۷۵	۲۳/۲٤۷	- ۰۹/۸٤٤	- ٦٤/۷٤٦
هگزامر انسولین-ویتامین E	- ۵۱/۱۵۳	- ۳/۷۸۲	٦/٦۸۰	- ٦/٤۸۹	- ۵٤/۷٤٤

همچنین، انرژی اتصالی ویتامین‌های D_3 و E به هگزامر انسولین به‌دست‌آمده از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی نسبت به داکینگ به طور معنی‌داری افزایش‌یافته است (جدول ۱). این افزایش انرژی اتصالی از ۳۰/۲٤- به ٦٤/۷٤٦- برای ویتامین D_3 و از ۳۱/۹۲- به ۵٤/۷٤٤- 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.

۳-٤ پایداری هگزامر انسولین

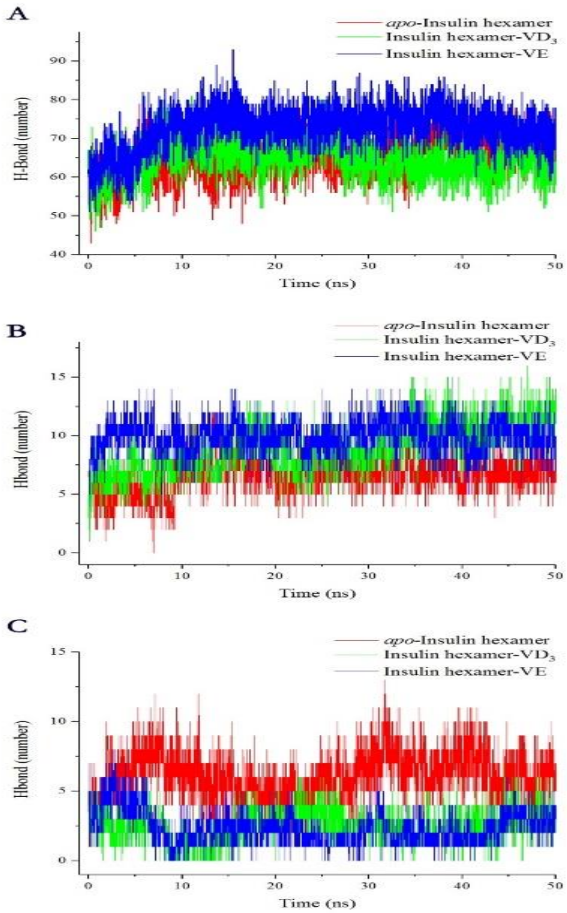
نتایج به‌دست‌آمده از آنالیز mm-pbsa بیانگر این مطلب است که انرژی اتصالی مونومرها در ساختار انسولین افزایش‌یافته است. ازآنجاکه ساختار هگزامر انسولین از اتصال ٦ مولکول انسولین به‌صورت سه همودایمر انسولین ایجاد شده است [۲۱]، به نظر می‌رسد افزایش انرژی اتصالی بین مونومرها به معنی پایداری ساختارهای دایمر می‌باشد. از نتایج به‌دست آمده می‌توان پیش‌بینی کرد که ساختارهای دایمری در هگزامر انسولین پایدار شده‌اند، درنتیجه باعث پایداری ساختار هگزامری شده‌اند.

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

شـــد: بررســـی تغییرات پیوند هیدروژنی درون دایمرها، بررسـی تغییرات فاصـلهٔ بین مونومرها در هر سـه دایمر و بررسـی تغییرات سـاختارهای دوم پروتئین. در ادامه نتایج بخش پایداری به دلیل تعداد بســـیار بالای نمودارها به‌صورت میانگینی از نتایج کلی ارائه شده است.

۳-۵ بررسی پیوند هیدروژنی

در این مطالعه، شکل‌گیری و شکست پیوند هیدروژنی در طی شـبیه‌سـازی دینامیک مولکولی بررسـی شـد. در این بررسی تعداد پیوندهای هیدروژنی درونی پروتئین در سه شرایط بدون حضور ویتامین، در حضور ویتامین D3 و E محاسـبه شـد. نتایج نشـان‌دهندهٔ افزایش تعداد پیوندهای هیدروژنی درونی دایمرها در حضـور ویتامین‌ها نسـبت به حالت بدون ویتامین اسـت (شـکل ۵A). همچنین، نتایج نشان می‌دهند تعداد پیوندهای هیدروژنی بین مونومرها در هر سـه دایمر در حضـور ویتامین‌ها افزایش‌یافته اسـت (شـکل ۵B). نمودار ۵C نیز کاهش تعداد پیوندهای هیدروژنی بین دایمرها در طول شبیه‌سازی را بیان می‌کند.



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، Bو C) است. نمودار حاوی میانگین تعداد پیوندهای هیدروژنی بین مونومرهای هگزامر انسولین در زمان شبیه‌سازی برای سه شرایط A، B و C است.

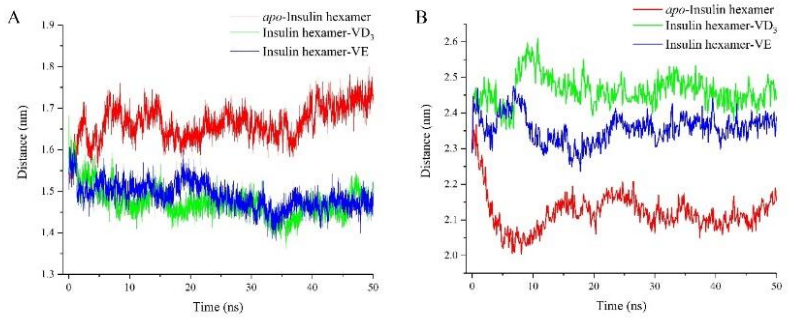
در واقع افزایش پیوندهای هیدروژنی در ساختارهای دایمری انسولین در حضور ویتامین‌ها نشان‌دهنده افزایش پایداری دایمرهای انسولین در طی شبیه‌سازی است. با نفوذ ویتامین‌ها به داخل ساختار هگزامر می‌توان انتظار کاهش در تعداد پیوندهای هیدروژنی بین دایمرها را نیز داشت که موجب افزایش شعاع ژیراسیون هگزامر انسولین نیز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

۳-٦ بررسی فاصلهٔ دایمرها

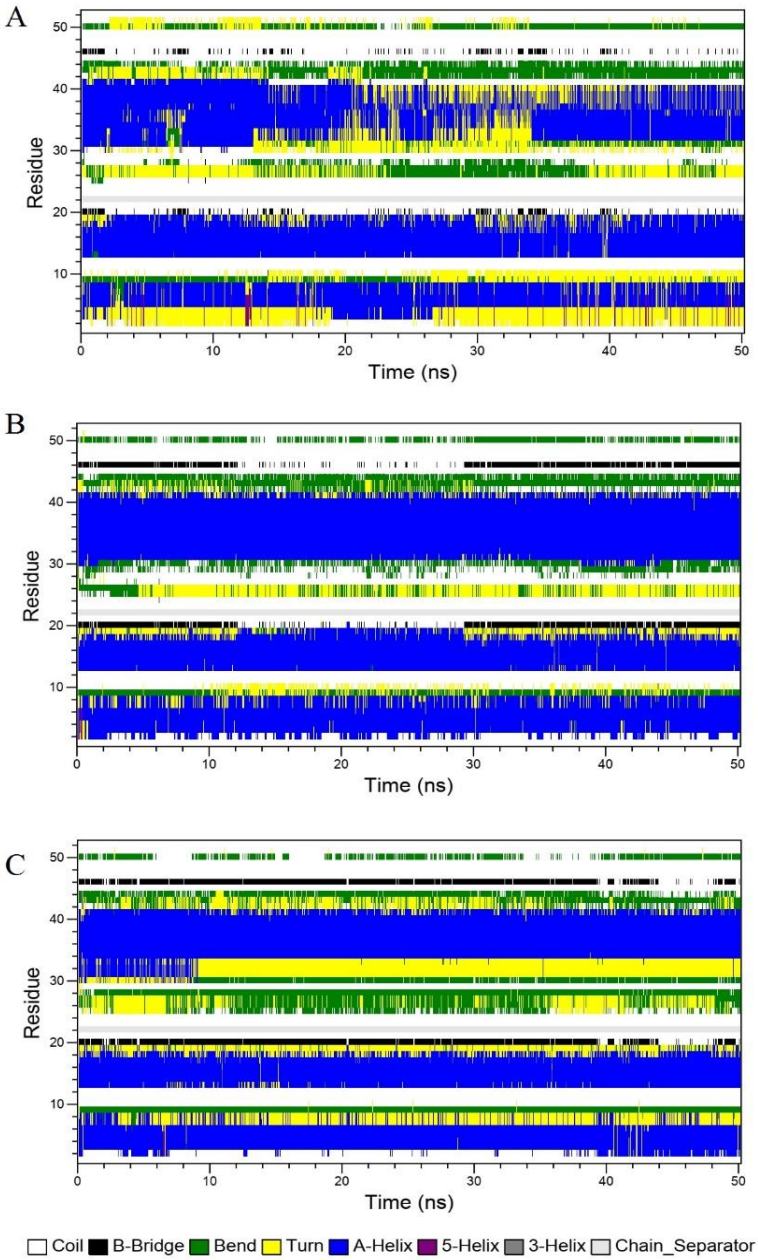
برای این مطالعه از مرکز جرم مونومرها به‌عنوان مرکز محاسبهٔ فاصله در طول شبیه سازی استفاده شد. سپس، فاصلهٔ مونومرها از هم در هرکدام از ساختارهای دایمری در طول شبیه‌سازی محاسبه شد. نتایج بیانگر کاهش فاصله و نزدیک‌تر شدن مونومرها به هم در هر سه ساختار همودایمر در طول شبیه سازی است که بیانگر تأثیر اتصال ویتامین‌ها در افزایش پایداری دایمرها می‌باشد (شکل ٦A). همچنین، نشان داده می‌شود که فاصلهٔ دایمرها از هم افزایش‌یافته است که در تطابق با نتایج پیوند هیدروژنی است (شکل ٦B).

۳-۷ بررسی تغییرات ساختار دوم

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, ۱٦]. 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 [۱٦].



شکل ٦ نمودار میانگین تغییرات فاصلهٔ مرکز جرم مونومرها از هم در هر ساختار همودایمر برای هگزامر انسولین در حالت بدون ویتامین و در حضور ویتامین‌های D3 و E. (A) و نمودار میانگین تغییرات فاصلهٔ مرکز جرم دایمرها از هم در ساختار هگزامر انسولین در عدم حضور ویتامین‌ها و در حضور ویتامین‌های D3 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.

٤- بحث و نتیجه‌گیری

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 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 می باشد [۲۲]. نتایج حاصل از داکینگ مولکولی در این پژوهش نشان دهنده جایگاه اتصالی ویژه برای ویتامین‌های

D3 و E اســـت. ویتامین‌های مذکور به‌واســـطه حلقه‌ها و خواص هیدروفوب به ناحیه هیدروفوب در مرز بین دو زیرواحد مونومری انســولین متصــل می‌شــوند. در اتصــال ویتامین‌ها به فرم هگزامر انســولین آمینواســیدهای Asn3، Gln4، His5، Leu6، Ser9، Ile10، Cys11، Ser12، Leu13، Ala14، Leu16، Leu17، Val18، Gly20 و Glu21 نقش دارد. نتایج حاصـــل از محاســـبه انرژی آزاد اتصالی حاکی از اثر پایدارکنندگی هر دو ویتامین D3 و E بر روی ســاختار هگزامر انســولین اســت. همچنین، انرژی آزاد اتصالی 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- محاســبه شــد (جدول ۲).

نتایج مربوط به توزیع انرژی اتصـــالی هر آمینواســـید نشـــان‌دهنده افزایش انرژی اتصـــالی برای آمینواســـیدهای هیدروفوب در اتصالات بین مونومری در پروتئین هگزامر انســـولین اســـت. توزیع انرژی آزاد اتصـــالی برای آمینواســـیدهای ۱۷، ۲۲، ٤۲، ٥۲ ، ۷۲ و ۸٥ فرم هگزامر انسولین، در حضور ویتامین‌های D3 و E نسبت به حالت عدم حضـــور این ویتامین‌ها افزایش قابل‌توجهی داشـــته است.

همچنین، در ادامه تعداد پیوندهای هیدروژنی درونی و بین واحـدهـای مونومری در هر دایمر انســـولین در طول شبیه‌سازی محاسبه شد. تعداد پیوندهای هیدروژنی درونی فرم هگزامر نیز در حضـــور ویتامین افزایش قابل‌توجهی نســـبت به فرم هگزامر بدون ویتامین دارد. همچنین، تعداد پیو ند های ه یدروژنی بین مونومری در فرم هگزامر در حضـــور ویتامین افزایش قابل‌توجهی نســـبت حالت کنترل دارد.

نتایج به‌دست آمده در این پژوهش، شامل افزایش پایداری مولکول انســولین و کاهش انرژی آزاد ســامانه طی اتصــال این ویتامین‌ها به فرم هگزامر انسولین، با نتایج آزمایشگاهی قبلی ما مطابقت دارد [١٦]. نتایج حا صل از این آزمایش‌ها نشـــان‌دهنده‌ی اثرگذاری ویتامین‌های D3 و E بر پایداری کانفورماسیون فضایی مولکول انسولین بود و نقش ویژه‌ی آنها را بر افزایش پایداری ســـاختار دوم و ســـوم پروتئین نشان داده‌است.

جدول ۲ میانگین انرژی اتصالی 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 واندروالس	انرژی الکترواستاتیک	انرژی حل‌شوندگی قطبی	انرژی سطح در دسترس	انرژی اتصالی
هگزامر انسولین	−۳۲٤/۹۸۸ +/− ۱/۷۲۳	−۷۰/۲٥۷ +/− ٤/۲٦٤	۳٤۲/۰٤۸ +/− ٥/۱۲۰	−۳٤/۰٤۱ +/− ۲/٤۹۸	**−۸۷/۲۳۸** **+/− ٤/۰۱۳**
هگزامر انسولین− ویتامین D3	−۲۹٥/٤٥٦ +/− ۱/٥۱۰	−۲۹۰/۳۱۷ +/− ۷/٤۷۲	٤۳۹/٤۷٤ +/− ۹/۲۰۸	−۳۱/۸۷۷ +/− ۲/٥٤۱	**−۱۷۸/۱۷٦** **+/− ۳/۸۲۱**
هگزامر انسولین− ویتامین E	−۳۰٥/۳٤٥ +/− ۲/۳٦۹	−۲۷۰/۰۸۷ +/− ۳/۹۹۲	٤٥٦/۹۸۷ +/− ٥/۷۸۱	−۳٤/۷۰۸ +/− ۲/٦۳۲	**−۱٥۳/۱٥٤** **+/− ٥/٥۳۸**

همچنین، مشخص‌شده است که این برهمکنش در افزایش انرژی اتصالی 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 به‌خوبی نشان داده‌اند که پایداری فرم هگزامر انسولین به‌عنوان حالت ذخیره‌ای نقش مؤثری در سرعت رهایش انسولین دارد [۲۳]. افزایش پایداری فرم هگزامر به‌عنوان فرم ذخیره‌ای انسولین از طریق پایدارسازی همودایمرها موجب افزایش نیمه‌عمر هگزامر می‌شود [۲٤]. همچنین، پایدارسازی هگزامر انسولین از تشکیل ساختارهای اگریگه جلوگیری می‌کند [۲۵]. این پایدارسازی با به‌کارگیری مواد متعددی شامل ترکیبات ایزوتونیک، ترکیبات حفظ‌کننده و مواد کاهش‌دهنده‌ی سرعت واکنش آنزیمی ارزیابی شده است [۲٦]. 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 پایدارکننده های ویتامین D3 و E را در افزایش نیروی اتصالی زیرواحدها و در نتیجه افزایش نیمه‌عمر فرم هگزامر، نشان می‌دهد.

افزایش پایداری فرم هگزامر (فرم ذخیره‌ای) انسولین، در روند رهاسازی 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. ازآنجایی‌که مشکل اصلی مبتلایان به 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 به‌این‌ترتیب به مقابله با دیابت نوع II پرداخت. این روش باتوجه 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 زیست حسگرهای ایمپلنت شده در داخل یا خارج بدن بیماران درحال‌توسعه می‌باشد. از آنجا که انسولین پایدار شده رهایش منظم و متعادلی از این زیست حسگرهای ایمپلنت شده خواهد داشت، بنابراین در این روش می‌توان از انسولین پایدار شده با ویتامین‌های D3 و E به‌عنوان 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. 1 :(۲٤)۱۲p. 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. 17787-1779.۲

[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

[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 :(۱-۲)۵۴۷ .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 Mahdavian[1], Hossein Soleymani[1], Mohammad Ghorbani[1], 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 it's 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 D_3 and E