مجله دیابت و متابولیسم ایران. فروردین- اردیبهشت ۱۳۹۳؛ دوره ۱۳ (شماره۴) ۳۱۸-۳۰۸

مطالعه فرایند فیبریل زایی انسولین رگولارو مهار آن با استفاده از ترکیبات آروماتیک

مریم چینی ساز[۱]، آزاده ابراهیم حبیبی[۲و۳]، پریچهره یغمایی*[۱]، کاظم پریور[۱]، احمد رضا دهپور[٤]

چکیده

مقدمه: ساختار انعطاف‌پذیر پروتئین باعث می‌شود که پروتئین‌ها به‌سمت تشکیل تجمعات نظم یافته (فیبریل آمیلوئیدی) هدایت شوند. این حالت برای پروتئین‌های ضروری مانند انسولین که کاربرد دارویی دارند، یک مشکل مهم تلقی می‌شود. بررسی فرایند فیبریل‌زایی از طریق القاء و مهار آن با استفاده از ترکیبات خاص مانند مشتقات آروماتیک می‌تواند اطلاعات مفیدی در جهت پایدارسازی ساختار پروتئین در اختیار قرار دهد.

روش‌ها: جهت القای فیبریل‌زایی به‌مدت ٢٤ ساعت انسولین رگولار در بافر فسفات با pH خنثی انکوبه شد. ایجاد آمیلوئید با استفاده از روش‌های اسپکتروسکوپی جذب کنگورد و میکروسکوپ الکترونی (TEM) بررسی شد. سپس تاثیر تزریق زیرپوستی آمیلوئیدهای به‌دست آمده در شرایط *in vitro* در موش سوری بعد از بافت برداری با استفاده از رنگ آمیزی کنگورد و میکروسکوپ پولاریزه مورد مطالعه قرار گرفت. در عین حال از لیگاندهای آروماتیک جهت بررسی تاثیر آنها بر فرایند فیبریلاسیون استفاده شد.

یافته‌ها: انسولین رگولار در pH خنثی و دمای ۳۷°C قادر به تشکیل ساختار فیبریلار آمیلوئیدی است. از بین لیگاندها، سیلیبینین و کلروپروپامید بیشترین تاثیر مهاری را داشتند. همچنین در اثر تزریق فیبریل‌های به‌دست آمده در شرایط *in vitro*، شرایطی مشابه با آمیلوئیدوزیز ندولار ایجاد شد.

نتیجه‌گیری: انسولین رگولار استعداد بالایی در تشکیل تجمعات آمیلوئیدی دارد. همچنین ایجاد شرایطی مشابه با آمیلوئیدوزیز ندولار، فیبریل‌زایی توسط انسولین رگولار را در شرایط *in vitro* تایید کرد. جهت مهار این پدیده سیلیبینین دارای بیشترین تاثیر بود و می‌تواند به‌عنوان داروی بالقوه در پایداری ساختار پروتئین مطرح باشند.

واژگان کلیدی: انسولین رگولار، فیبریل‌های آمیلوئیدی، ترکیبات آروماتیک، آمیلوئیدوزیز ندولار

۱-گروه تخصصی زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲- مرکز تحقیقات بیوسنسور، پژوهشکده علوم سلولی- مولکولی غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳- مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم، پژوهشکده علوم بالینی غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
٤- گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

***نشانی**: تهران، انتهای بزرگراه اشرفی اصفهانی، میدان دانشگاه آزاد اسلامی،بلوار شهدای حصارک، دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده علوم پایه، نمابر : ٤٤٨٦٩٤٤٢، آدرس پست الکترونیک: yaghmaei_p@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۲/۱۴ تاریخ درخواست اصلاح: ۱۳۹۳/۰۱/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۲/۰۵

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-07-22]

مقدمه

انسولین انسانی هورمونی با ۵۱ اسید آمینه می‌باشد که در محلول به‌صورت تعادلی به‌حالت هگزامر، ترامر، دایمر، و مونومر می‌باشد. یکی از مشکلات انسولین ناپایداری ساختاری آن در اثر مواجه شدن با شرایطی مانند pH اسیدی و دمای بالا است، که این ناپایداری ساختاری در نهایت می‌تواند تشکیل ساختارهای فیبریلار دهد [۱]. این ساختارها در زمینه‌های بیوتکنولوژی و زیست‌پزشکی (به‌خصوص در پمپ‌های انسولین) به‌عنوان یک مشکل مطرح است. تجمعات آمیلوئیدی انسولین در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو، با بالا رفتن سن و پس از تزریق زیرجلدی با تکرار زیاد مشاهده شده است [۲]. مطالعات اخیر نشان داده است که حضور آمیلوئیدهای انسولین در شرایط بالینی افزایش می‌یابد. به‌نظر می‌رسد که تزریق انسولین صرف نظر از محل تزریق باعث ایجاد اشکال فیبریل مانند می‌شود. برای مثال، آمیلوئیدهای انسولین در نواحی ران، شانه‌ها، بازوها، و دیواره‌های شکمی بیماران و یا در اطراف محل تزریقات مکرر مشاهده شده است. مشاهدات نشان می‌دهند که آمیلوئیدهای انسولینی صرف‌نظر از منبع و نوع انسولین ایجاد می‌شوند [۳].

تجمعات آمیلوئیدی به‌صورت گسترده و یا سیستمیک معمولاً زمینه را برای بدخیمی‌های دستگاه گردش خون یا التهاب‌های مزمن و به‌تدریج اختلالات عملکرد اعضای بدن فراهم می‌کند. همچنین آمیلوئید در ارتباط با طیف وسیعی از تومورهای مختلف اپی‌تلیال و غیر از آن، مانند کارسینومای مدولای تیروئید، پرولاکتینوما، کارسینومای نازوفارنکس، تومورهای نوروراندوکرینی، لنفوم و غیره می‌باشد. در این موارد، آمیلوئید معمولاً در داخل تومورها خود را نشان می‌دهد. در مواردی نادر نیز، آمیلوئید در اطراف و یا دور از منطقه غدد لنفاوی و در ارتباط با افراد مبتلا به سرطان ریه مشاهده شده است [٤]. بنابراین مطالعات تجمعات انسولینی می‌تواند کارکرد وسیعی در بهبود درمان با انسولین تجویز شده به بیماران دیابتی داشته باشد. زمانی که مشاهده می‌شود که تعداد مردمی که از این بیماری رنج می‌برند بیشمار است، این مسئله اهمیت خود را بیشتر نشان می‌دهد [۳]. تاکنون مطالعهٔ فرآیند و تجمع آمیلوئیدی شدن در انسولین به‌وسیلهٔ روش‌هایی نظیر استفاده از رنگ قرمز کنگو و تیوفلاوین تی، همچنین با تکنیک‌های نظیر CD[1]، FT-IR[2]، TEM[3]، AFM[4] صورت گرفته است [۵].

از راه‌های مقابله با بیماری‌های آمیلوئیدی می‌توان افزایش پایداری حالت طبیعی پروتئین‌های آمیلوئیدوژنیک و مهار سیستم فرایند اتصال به هم اجزای پروتئینی و تجمع را نام برد. مولکول‌های آروماتیک کوچک مانند کنگورد و تیوفلاوین تی، باعث مهار فرایند فیبریل‌زایی می‌شوند. در سال‌های اخیر انبوهی از گزارش‌ها ارائه شده، مبنی بر اینکه مولکول‌های کوچک مانع از فیبریل‌زایی می‌شود [۸-٦]. با توجه به اهمیت انسولین انسانی رگولار در زمینه‌های مختلف دارویی و تحقیقاتی، در این مطالعه القای ساختار آمیلوئیدی در این پروتئین بررسی شد. همچنین از تزریق این فیبریل‌ها ەصورت زیرپوستی در سوری، و ایجاد توده آمیلوئیدی، به‌عنوان روشی در جهت تایید استعداد بالای فیبریل‌زایی در انسولین، استفاده شد. همچنین اکثر لیگاندهای به‌کار برده شده دارای تاثیر مهاری قابل توجهی در مسیر فیبریل‌زایی انسولین رگولار بودند. لازم به‌ذکر است که برای اولین بار است که تاثیر این ترکیبات بر فرایند فیبریل‌زایی انسولین مورد مطالعه قرار گرفته است. در این راستا با استفاده از نرم‌افزارهای مُدل‌سازی، برهم‌کُنش احتمالی لیگاندها با انسولین انسانی بررسی شد.

روش‌ها

وسایل و تجهیزات شامل اسپکتروفتومتر شیمادزو و UV-1800، ترازوی آنالیتیک، دستگاه pH متر Jenway، هیتر استیرر، فیلتر پولاریزه، و نرم‌افزارهای مورد استفاده شامل MOE 2010.10، Auto Dock Vina می‌باشند.

[1] Circular Dichorism
[2] Fourier transform infrared spectroscopy
[3] TEM
[4] High resolution atomic force microscopy

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-07-22]

مواد

قرمز کنگو، NHDC[1]، HMCH[2]، 4CHPH[3]، 2BOPH[4]، N-NDMIA[5]، I3AA[6]، CHPP[7] و SILI[8] از شرکت سیگما (St. Louis, Mo)، فسفات پتاسیم از شرکت مرک (Merck-Germany-Darmstadt) و انسولین رگولار از شرکت اکسیر(EXIR pharmaceutical Co.) خریداری گردید. ۸ سر موش سوری نر نژاد NMRI با میانگین وزنی۲±۲۲ از انستیتو پاستور تهران خریداری شد.

آماده‌سازی نمونه جهت فرایند فیبریل‌زایی انسولین رگولار

محلول ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر انسولین رگولار در بافر فسفات با pH برابر ۷/٤ تهیه شد. سپس۵۰۰ میکرولیتر از محلول پروتئینی تهیه شده را در ویال‌های ۲ میلی‌لیتری ریخته، درب ویال‌ها را طوری با پارافیلم محکم می‌کنیم تا بافر داخل تبخیر نشود و آب موجود در حمام آب نیز وارد نمون ها نگردد. در نهایت نمونه‌ها را در حمام آب با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده و به کمک مگنت‌های برنجی با دور ۱۰۰ rpm، هم می‌زنیم. در این مطالعه از نمونه انکوبه شده بعد از دوره‌های زمانی۳۰ دقیقه‌ای در زمان‌های ۰ تا ٤ ساعت، سپس در زمان‌های ۸، ۲۱، ۲۲، ۲٤ و ٤۸ ساعت نمونه‌برداری انجام شد.

جذب نوری قرمز کنگورد:

کنگورد[9] یکی از ترکیبات رنگی آلی به شمار می‌رود که قادر است با ساختار های بتای متقاطع موجود در آمیلوئیدها، پیوند عرضی ایجاد کرده و در نتیجه آن میزان λ_{max} مربوط به رنگ کنگورد افزایش می‌یابد. البته این تغییر مکان قرمز[10]، معمولاً با افزایش میزان جذب[11] نیز همراه است. برای این منظور در یک میکروتیوپ ۰/۵ میلی‌لیتری به‌میزان ۵۰۰ میکرولیتر از محلول بافر کنگورد و ۲۵ میکرولیتر از نمونه مورد نظر، ریخته و با یک بار معکوس کردن، آن را به‌هم زده و برای مدت ۱۰ دقیقه تا تثبیت رنگ در شرایط آزمایشگاه قرار داده شد. سپس توسط دستگاه طیف سنج مرئی (Shimadzu UV-1800 Spectrophotometer) جذب نمونه‌ها از طول موج ٤۰۰ تا ٦۰۰ نانومتر مقابل بافر کنگورد به‌عنوان بلانک، خوانده شد.

میکروسکوپ الکترونی گذاره[12]:

برای تایید تشکیل آمیلوئید بعد از زمان ۱۲و ۲٤ ساعت انکوباسیون، عکس‌برداری توسط میکروسکوپ TEM انجام گرفت. در این راستا روی گریدهای پوشیده از کربن (٤۰۰)، ۵-۱۰ میکرولیتر از نمونه پروتئینی قرار داده می‌شود. پس از ٤۵ ثانیه، روی گریدها را با آب دوبار تقطیر شسته و سپس با اورانیل استات ۲ درصد رنگ‌آمیزی انجام شده و پس از ۲-۵ دقیقه، نمونه جهت بررسی آماده می‌شود [۹].

تجمع زیر بافتی آمیلوئید انسولین رگولار

این آزمایش برروی دو گروه سوری نر از نژاد NMRI (n=4) با میانگین وزنی ۲±۲۲ انجام شد. درجه حرارت اتاق نگهداری حیوانات ۳±۲۲ درجه سانتی‌گراد و نور آن به‌طور مصنوعی در شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی نگهداری شد و با غذای استاندارد جوندگان و آب قطره‌ای تغذیه شدند. رطوبت محیط نگهداری نیز حدود ۵۰ درصد بود. پس از یک هفته سازش با محیط جدید دوباره تعیین وزن و گروه‌بندی شده و سپس آزمایش انجام شد. هرروز به میزان ۱۱۳میکرولیتر به موش‌های گروه تجربی آمیلوئید انسولینی به‌صورت زیرپوستی و به گروه کنترل به همین میزان بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با pH=۷ تزریق می‌شد. این کار به‌مدت ۲۱ روز

[1] نئوهسپریدین دی هیدروچالکون
[2] هسپریدین متیل چالکون
[3] ٤-کومیل فنول
[4] ۲- بنزوئیل اکسی فنول
[5] N-N دی متیل ایندوآنیلین
[6] ایندول ۳- استیک اسید
[7] کلروپروپامید
[8] سیلیبینین
[9] Congored
[10] Red shift
[11] Hyper chromacity
[12] TEM

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-07-22]

انجام شد. همه گروه‌ها در طول انجام آزمایش رژیم غذایی نرمال داشتند.

بافت برداری و رنگ آمیزی

بعد از ۲۱ روز توده قابل ملاحظه‌ای در زیر پوست همه موش‌های تجربی در محل تزریق ایجاد شد. سپس با انجام عمل جراحی این توده از زیر پوست برداشته شد. در طی کار با حیوانات مورد آزمایش کلیه اصول مورد تایید توسط کمیته اخلاقی گروه زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران رعایت گردید. نمونه‌های بیوپسی شده، برای مدت ۲٤ ساعت در محلول فرمالین ۱۰ درصد تثبیت شدند. پس از انجام مراحل آب‌گیری با استفاده از درجات مختلف الکل، با پارافین قالب‌گیری شدند. بعد از آن نمونه‌ها توسط میکروتوم روتری با ضخامت ۵ میکرون برش‌گیری شدند. سپس جهت حضور فیبریل‌های آمیلوئیدی، رنگ‌آمیزی اختصاصی کنگورد جهت تشخیص فیبریل‌های آمیلوئیدی برروی لام‌ها انجام شد. سپس از لام‌ها با فیلتر پولاریزه عکس‌برداری صورت گرفت.

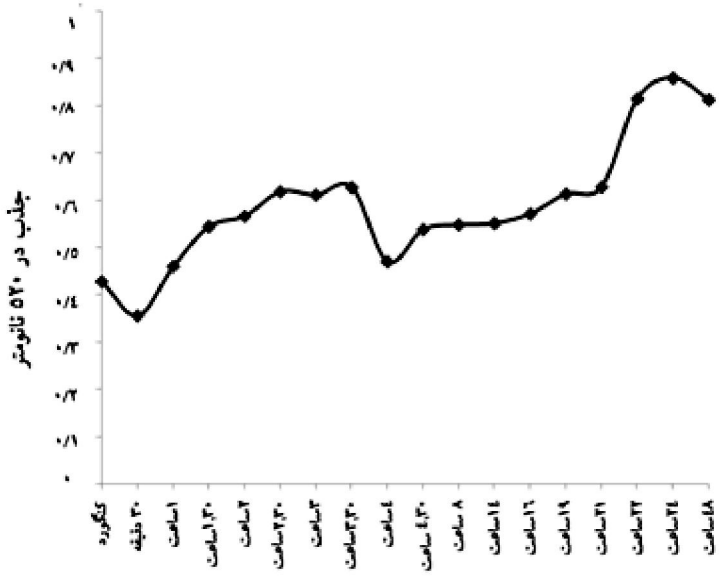
داکینگ (Docking)

داکینگ با Auto dock Vina انجام شد [۱۰]. فایل انسولین رگولار (EWZ ٤) ابتدا از سایت Protein Data Bank(PDB) بارگذاری شد، سپس مولکول‌های اضافی همراه پروتئین مانند حلال حذف شدند. همچنین ساختار پروتونه شده جهت pH خنثی تنظیم گردید. محفظه مکعبی شکلی (Grid box) با ابعاد ۳۸×٤۰×٤۰ با فضای ۱ آنگسترمی و مرکز مکعب تعریف شد. ۱۰۰ جای‌گیری برای ترکیبات آروماتیک فوق به‌دست آمد.

یافته‌ها

بررسی کینتیک فیبریل زایی انسولین رگولار

در این مطالعه از نمونه انکوبه شده بعد از دوره‌های زمانی ۳۰ دقیقه‌ای در زمان‌های ۰ تا ٤ ساعت، سپس در زمان‌های ۸، ۲۱، ۲۲، ۲٤ و ٤۸ ساعت نمونه برداری انجام شد و جذب آن‌ها در ۵۲۰ نانومتر (شکل ۱) خوانده شد.



شکل۱- جذب کنگورد در زمان‌های مختلف انکوباسیون در شرایط اپتیمم فیبریل زایی انسولین رگولار

با توجه به افزایش جذب کنگورد با گذشت زمان در طول موج ۵۲۰ نانومتر می‌بینیم که بعد از ۸ ساعت افزایش جذب ادامه داشته و تا اینکه در ۲٤ ساعت دیگر افزایش جذبی نداریم. این داده گویای تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی بالغ است. به‌طوری که در ٤۸ ساعت دیگر افزایش جذبی دیده نمی‌شود.

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-07-22]

تصاویرحاصل از میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) و فیلتر پولاریزه

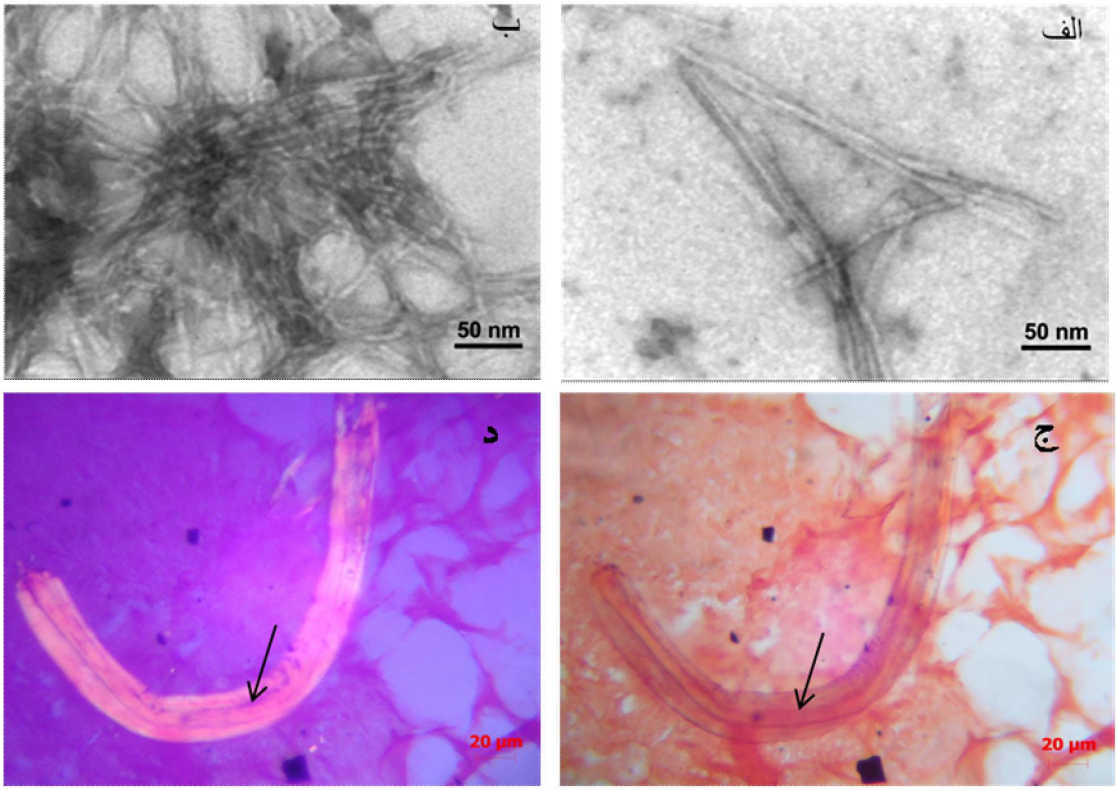
برای تایید تشکیل آمیلوئید بعد از زمان ۱۲ و ۲٤ ساعت انکوباسیون عکس‌برداری توسط میکروسکوپ TEM انجام شد. همچنین حضور فیبریل‌های آمیلوئیدی در توده بافتی با فیلتر پولاریزه بررسی شد (شکل ۲).

همان‌طور که در شکل ۲-الف نشان داده شده است بعد از ۱۲ ساعت فیبریل‌های آمیلوئیدی ابتدایی تشکیل شده است. اما در تصویر"ب" تجمعات زیادی از فیبریل‌های بالغ در اندازه‌های بزرگ در هم تنیده شده‌اند. در شکل "ج" رنگ‌آمیزی اختصاصی کنگورد تجمعات آمیلوئیدی نشان داده شده است. همچنین در شکل "د" این تجمعات همراه با تلالو نور می‌باشند. اما در گروه کنترل هیچ‌گونه اثری از التهاب و تجمع زیر پوستی دیده نشد.

مهار القای آمیلوئید

مهار تجمع آمیلوئیدی در انسولین رگولار در pH=7 و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، در حضور لیگاندهای آروماتیک

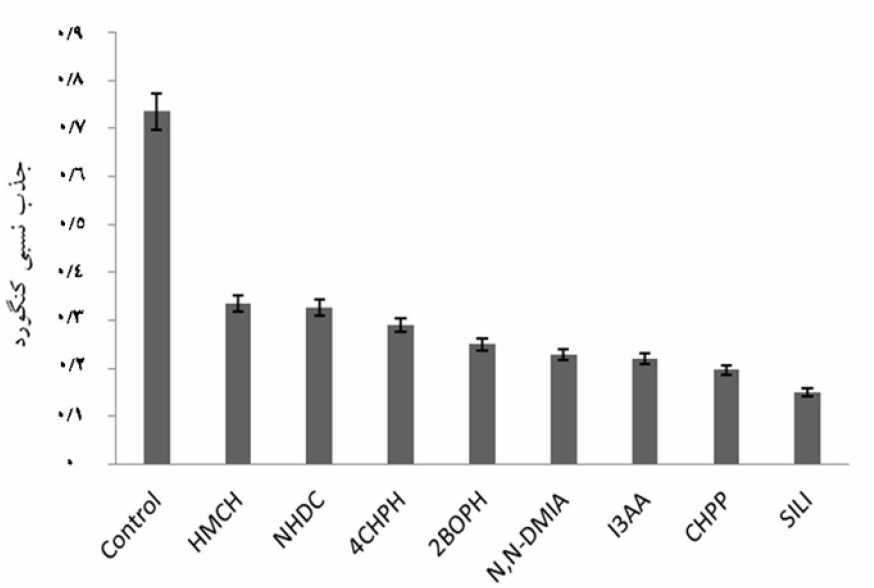
داده‌های زیادی نشان می‌دهد که ترکیبات پلی فنولیک در مهار روند فیبریل زایی پروتئین دخالت دارند. برای بررسی اثر این نوع ترکیبات برروی فرایند تجمع، از غلظت ۲۰۰ میکرومولار لیگاندها در شرایط انکوباسیون بر پروتئین مذکور تاثیر داده شد. شکل ۳ جذب نسبی کنگورد در طول موج ۵۲۰ نانومتر، تاثیر لیگاندها را در مدت ۲٤ ساعت انکوباسیون را نشان می‌دهد. حضور همه لیگاندها موجب کاهش شدت جذب در این طول موج می‌گردد.



شکل۲- تصاویر میکروسکوپ الکترونی از فیبریل های آمیلوئیدی به‌دست آمده در شرایط اپتیمم فیبریل زایی

الف بعد از ۱۲ ساعت و ب: بعد از ۲٤ ساعت، ج: تجمعات آمیلوئیدی (میکروسکوپ نوری)، د: تجمعات آمیلوئیدی (فیلتر پولاریزه).

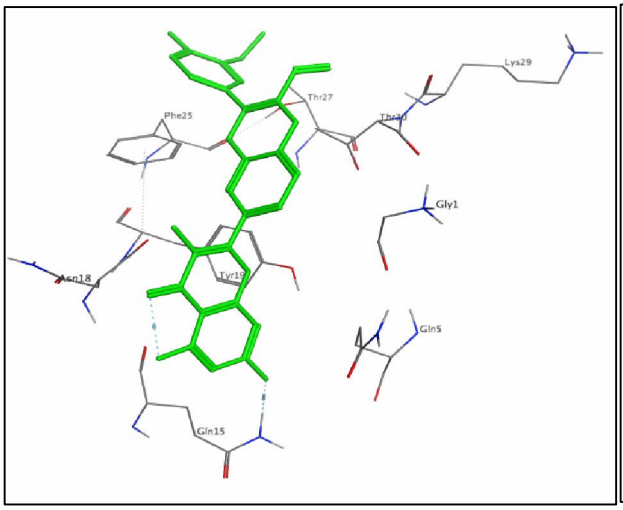
[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-07-22]



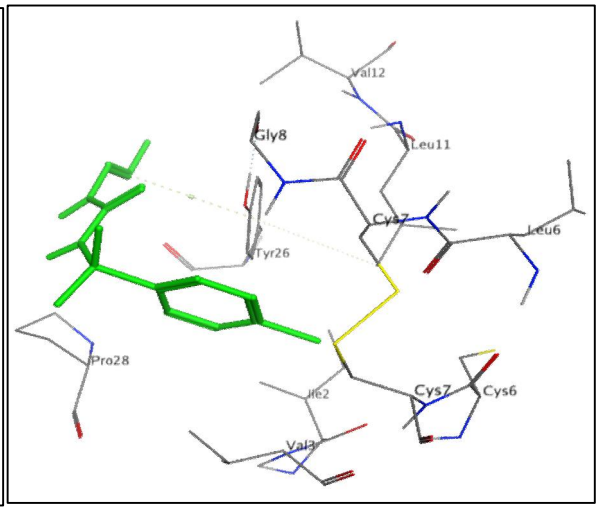
شکل ۳- جذب نسبی کنگورد در حضور و عدم حضور لیگاندها بر انسولین انسانی در شرایط اپتیمم فیبریل زایی

بررسی برهم‌کُنش‌های احتمالی ترکیبات آروماتیک با پروتئین

جهت درک بیشتر چگونگی تعامل ترکیبات آروماتیک فوق بر انسولین رگولار انسانی، داکینگ انجام شد. با استفاده از روش داکینگ، محل اتصال احتمالی لیگانده در سطح پروتئین مشخص گردید. محل فرضی اتصال لیگاندها در این محل‌ها در شکل‌های ٤ تا ۱۱ نشان داده شده است.

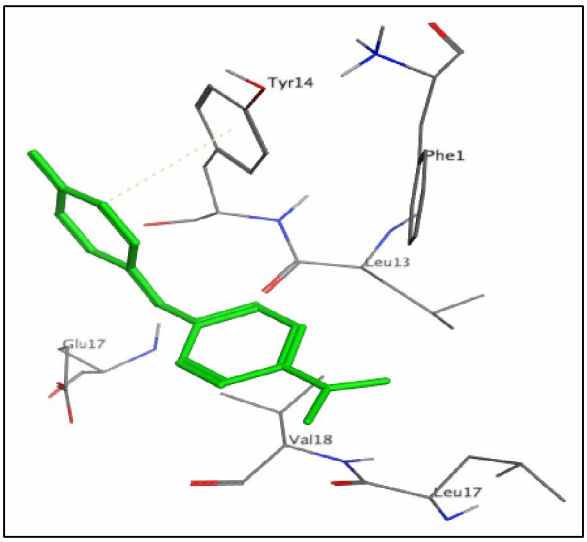


شکل ۴- برهم‌کُنش احتمالی SILI با انسولین رگولار

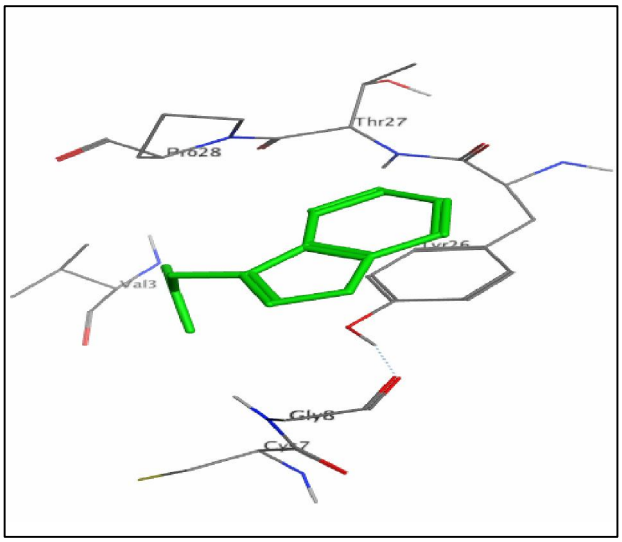


شکل۵- برهم‌کُنش احتمالی CHPP با انسولین رگولار

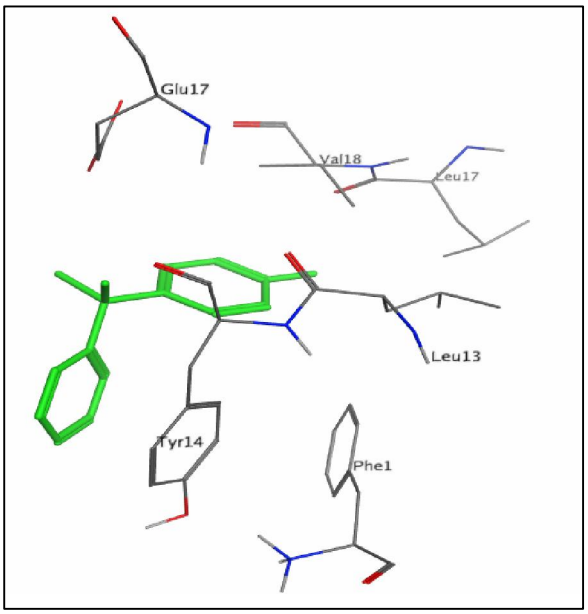
[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-07-22]



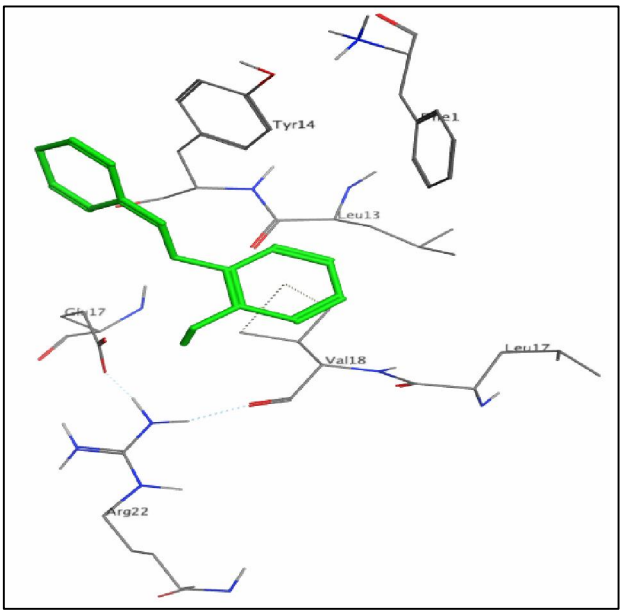
شکل۷- برهم‌کُنش احتمالی N-N DMIA با انسولین رگولار



شکل۶- برهم‌کُنش احتمالی I3AA با انسولین رگولار

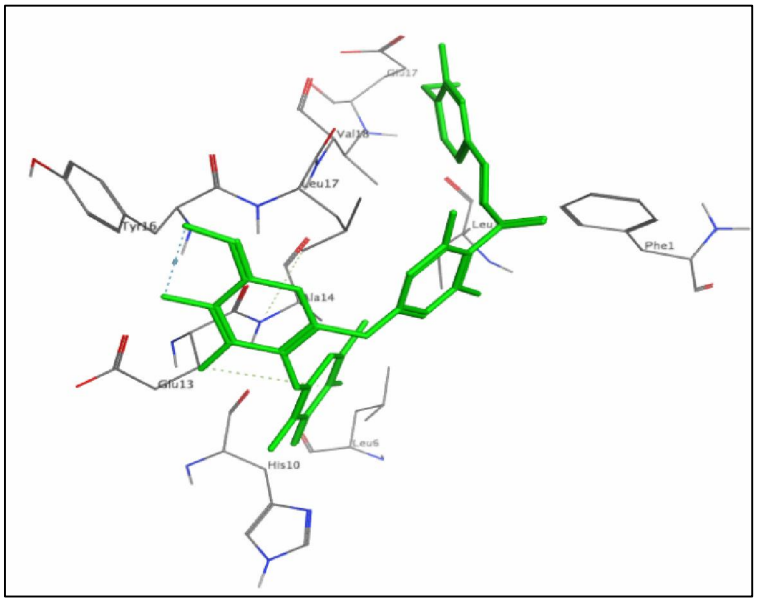


شکل ۹- برهم‌کُنش احتمالی 4CHPH با انسولین رگولار

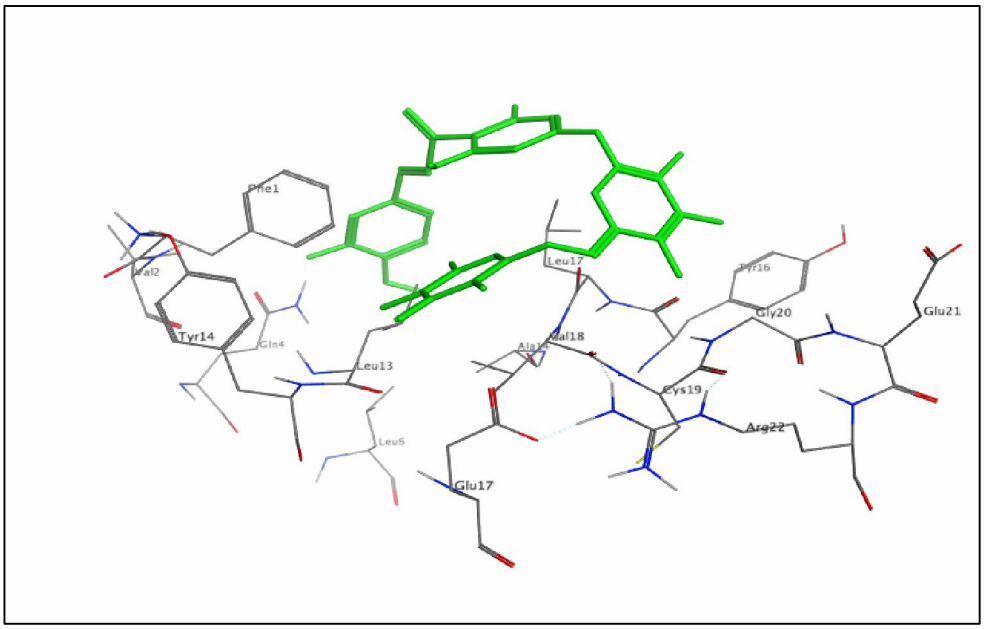


شکل ۸- برهم‌کُنش احتمالی 2BOPH با انسولین رگولار

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-07-22]



شکل ۱۰- برهم‌کُنش احتمالی NHDC با انسولین رگولار



شکل ۱۱- برهم‌کُنش احتمالی HMCH با انسولین رگولار

بحث

یک استعداد ذاتی مشترک در بین پُلی‌پپتیدها برای تشکیل فیبریل وجود دارد و الگوی مشترکی در تشکیل فیبریل در پروتئین‌ها دیده شده است. امروزه مطالعات زیادی روی ترکیبات مهار کننده فیبرلاسیون انجام می‌گیرد که دو جنبه اصلی این مطالعات، شناسایی سازوکار عمل آنها و جنبه دیگر یافتن ترکیبات مهار کننده موثرتر و عام‌تر می‌باشد. یافتن میان کُنش‌های بین مولکولی در فیبریل‌ها در طراحی ترکیبات مهاری مهم است [۱۱].

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-07-22]

بررسی تشکیل آمیلوئید انسولین رگولار و تزریق زیر پوستی آن

انسولین از جمله پروتئین‌هایی است که توان بالایی جهت تشکیل ساختارهای پلیمریزه دارد. انسولین دهمین پروتئین و اولین پروتئین خارج سلولی می‌باشد که از نظر شیمیایی در تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی در انسان شناسائی شده است. طی بررسی‌های مختلف تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی انسولین در شرایط متفاوت دیده شده است، برای مثال انسولین قادر است در pH: ۲ و دمای ۵۷ درجه (pH اسیدی و دمای بالا) آمیلوئید تشکیل دهد [۱۲]. به علاوه اگر با جداشدن یون روی انسولین هگزامر به فرم مونومری فعال تبدیل شود تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی در pH: ۷/۵ و دمای ۳۷ درجه مسلم می‌باشد، جهت دست‌یابی به این هدف می‌بایست از یک جداکنندهٔ یون روی مانند اتیدیوم دی آمید تترا استیک اسید (EDTA) استفاده کرد [۱۳]. هم‌چنین تحقیقاتی در زمینهٔ آمیلوئیدی شدن انسولین و اثبات این مطلب که زنجیره B در آمیلوئیدی شدن نقش کلیدی دارد صورت گرفته است و مشاهده شده که زنجیره B از انسولین گاوی به تنهایی قادر به تشکیل فیبریل در pH های اسیدی می‌باشد. در واقع تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی انسولین شامل ۲ فاز می‌باشد: فاز اول، فاز کند واکنش است که در طی آن زنجیره B انسولین آمیلوئید تشکیل می‌دهد و فاز دوم فاز سریع واکنش است که در طی آن سایر قسمت‌های انسولین فیبریل تشکیل می‌دهند [۱۲]. همچنین تجمع انسولین به صورت فیبرهای آمیلوئید در محل تزریق زیرپوستی انسولین و همچنین در استفاده از پمپ‌های انسولین در بیماران دیابتی مشاهده شده است، که این تجمع باعث بروز پاسخ‌های ایمنی ناخواسته می‌شود.

انسولین انسانی رگولار یک داروی پُرمصرف برای بیماران دیابتی است [۱٤]. به‌همین دلیل برآن شدیم که پایداری ساختاری این انسولین را در مقابل فیبریل‌زایی بررسی کنیم. همان‌طور که داده‌های حاصل از کنگورد و تصاویر میکروسکوپ الکترونی نشان می‌دهد، بعد از ۱۲ ساعت از انکوباسیون در شرایط اپتیمم فیبریل‌زایی، فیبریل‌های بالغ کاملاً قابل مشاهده هستند. سپس تجمع زیرپوستی فیبریل‌های آمیلوئیدی تشکیل شده را در موش سوری مورد بررسی قرار گرفت. زیرا یکی از مشکلات بیماران دیابتی، آمیلوئیدوزیز در محل تزریق است. همچنین روشی برای تایید فیبریلاسیون انسولین رگولار به فیبریل های آمیلوئیدی در شرایط *invitro* می باشد. بعد از ۲۱روز تزریق تجمعات ندولاری ایجاد شد. این بافت مثل یک بافت توموری می‌ماند که در بین سلول‌ها رگ‌زایی صورت گرفته و سلول‌ها تقسیم بی‌رویه داشته‌اند. تصویر با فیلتر پولاریزه نشان‌دهنده حضور فیبریل‌های آمیلوئیدی در توده زیرپوستی بود. اما در گروه کنترل شواهدی مبنی بر تجمع و التهاب وجود نداشت.

بررسی چگونگی مهار توسط ترکیبات آروماتیک

به‌طور کلی مهارکننده‌های پُلی فنولی حداقل ۲ حلقه فنولیک با ۲ تا ٦ اتم اتصالی دارند که برای اتصال غیرکووالانی با ساختار بتا مورد نیاز است و معمولاً طویل‌سازی فیبریل آمیلوئیدی یا اتصال الیگومرها را مهار می‌کند ولی در مرحله هسته‌زایی دخالتی ندارد و با مونومرهای آمیلوئیدوژنیک برهم‌کُنش نمی‌دهد، بلکه برهم‌کُنش‌های آنها با ساختارهای آمیلوئیدوژنیک است [۱۵]. پروتئین‌هایی که دارای تریپتوفان و فنیل‌آلانین فراوانی هستند، ساختاری مستعد جهت فیبریل‌زایی دارند. زیرا این رزیدوهای آروماتیک، باعث تسهیل جهت‌دهی اجزای پروتئینی به‌سمت تشکیل تجمع می‌شود. به‌همین دلیل پیشنهاد شده که ترکیبات آروماتیک می‌توانند با برهم‌کُنش با این رزیدوها، مهارکننده‌های خوبی باشند [۱٦، ۱۷].

در مورد همه لیگاندهای استفاده شده در این تحقیق می‌توان مهار در فرایند فیبریل‌زایی را مشاهده کرد. SILI بیشترین تاثیر مهاری داشت. همچنین نشان داده شده که این ترکیب می‌تواند در شرایط invitro و invivo باعث مهار در تشکیل ساختار آمیلوئیدی شود [۱۸]. در شکل ٤ نحوه جای‌گیری آن را در پروتئین می‌توان دید. پیوند هیدروژنی آن با گلوتامین ۱۵ و جای‌گیری مناسب حلقه‌های آروماتیک نسبت به تیروزین ۱۹ و فنیل‌آلانین ۲۵ می‌تواند نشانگر تاثیر مهاری آن بر فرایند فیبریل‌زایی باشد.

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-07-22]

CHPP دومین ترکیب از لحاظ بیشترین تاثیر مهار بعد از SILI است. این ترکیب به‌عنوان دارو در افراد دیابتی استفاده شده و خاصیت ضد التهابی دارد [۱۹]. اخیراً مشخص شده که در مهار روند فیبریل‌زایی نیز موثر است [۱۶]. همان‌طور که در شکل ۵ مشخص شده، این ترکیب می‌تواند با تیروزین ۲۶ زنجیره B انسولین پیوند هیدروژنی برقرار کند. همچنین از طریق برهم‌کُنش هیدروفوبیک و هیدروژنی می‌تواند از تشکیل صفحات بتا جلوگیری کند. در شکل ۶ می‌توان برهم‌کُنش آروماتیک π–π حلقه ایندولی در I3AA را با تیروزین ۲۶ زنجیره B انسولین مشاهده کرد. همچنین گزارش شده که ساختارهای ایندولی می‌توانند در مهار ساختار تجمعی پروتئین‌ها موثر باشند [۲۰]. N-NDMIA بیشتر در ترکیبات آرایشی و در صنعت تولید رنگ استفاده می‌شود و کاربرد دارویی ندارد [۲۱]. شکل ۷ نشان می‌دهد که حلقه آروماتیک آن با تیروزین ۱۴ زنجیره A برهم‌کُنش آروماتیک π–π داده است که بی‌ارتباط با اثر مهاری آن نیست. در شکل ۸ حلقه آروماتیک 2BOPH نسبت به حلقه تیروزین ۱۴ زنجیره A جای‌گیری مناسبی داشته و حلقه دیگر آن با هیدروژن‌های والین ۱۸ نیز پیوند arene-H (در این پیوند حلقه آروماتیک دهنده الکترون به اوربیتال S هیدروژن است [۲۳].) بر قرار کرده است. شکل ۹ جای‌گیری مناسب حلقه فنولی 4CHPH را با حلقه تیروزین ۱۴ زنجیره A نشان می‌دهد. تحقیقات در ارتباط با مشتقات دیگر این ترکیب مانند بیس فنول A نشان از تاثیر آن در مهار فرایند فیبریل‌زایی دارد [۲۳]. شکل ۱۰ و ۱۱ به‌ترتیب جای‌گیری ترکیبات قندی چالکونی NHDC و HMCH را نسبت به پروتئین نشان می‌دهند. توانایی اتصال ترکیبات چالکونی به ساختار های فیبریلاری [۲۴] و مهار فرایند فیبریل‌زایی دی‌ساکاریدها گزارش شده است [۲۵]. این دو ترکیب نسبت به سایر ترکیبات تاثیر مهاری کمتری داشتند. می‌توان گفت که شاید به‌علت جای‌گیری نامناسب آن نسبت به رزیدوهای آروماتیک انسولین باشد. به‌طور کلی ترکیبات پیشین نسبت به رزیدوهای آروماتیک تیروزین و فنیل آلانین جای‌گیری مناسبی داشتند که تاثیر مهاری زیاد آنها را توجیه می‌کند.

به‌طور کلی هدف از این تحقیق کمک به دانش کلی در زمینهٔ ارتباط ساختار پروتئین با تجمع آن می‌باشد. همچنین مطالعات دقیق تر و کسب جزئیات بیشتر با استفاده از مطالعات دینامیکی مولکولی پروتئین‌های هدف نه تنها در این ارتباط می‌تواند راهگشا باشد بلکه می‌تواند در جهت مهار این اشکال بیماری‌زا مفید واقع شود. در حال حاضر این تحقیق می‌تواند در پیشبرد این هدف در زمینه داروسازی و فرمولاسیون بهتر انسولین تاثیرگذار باشد. در همین راستا می‌توان اثر ترکیبات احتمالی فیبریل‌زایی را با استفاده از مُدل ساده (موش سوری) به‌کار رفته در این تحقیق، در شرایط *invivo* بررسی کرد.

سپاسگزاری

بخشی از این مطالعه در پژوهشگاه غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است.

مأخذ

1. Uversky VN, Fink AL: Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* 2004, 1698(2): 131-153.
2. Vestergaard B, Groenning M, Roessle M, Kastrup JS, Van De Weert M, Flink JM, Frokjaer S, Gajhede M, Svergun DI: A helical structural nucleus is the primary elongating unit of insulin amyloid fibrils. *PLoS biology* 2007, 5(5):e.134.
3. Muzaffar M, Ahmad A: The mechanism of enhanced insulin amyloid fibril formation by NaCl is better explained by a conformational change model. *PloS one* 2011, 6(11):e.27906.
4. Sahoo S, Reeves W, DeMay RM: Amyloid tumor: a clinical and cytomorphologic study. *Diagnostic cytopathology* 2003,28(6):.325-328.
5. Jansen R, Dzwolak W, Winter R : Amyloidogenic self-assembly of insulin aggregates probed by high resolution atomic force microscopy. *Biophysical journal* 2005, 88(2):.1344-1353.

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-07-22]

6. Lee VM-Y: Amyloid binding ligands as Alzheimer's disease therapies. *Neurobiology of aging* 2002, 23(6):.1039-1042.
7. Lorenzo A, Yankner BA: Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. *Proceedings of the National Academy of Sciences 19944*, 91(25):.12243-12247.
8. Poli G, Ponti W, Carcassola G, Ceciliani F, Colombo L, Dall'Ara P, Gervasoni M, Giannino ML, Martino PA, Poller C: In vitro evaluation of the anti-prionic activity of newly synthesized Congo red derivatives. *Arzneimittelforschung* 2003, 53(12):875-888.
9. 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. *Febs Journal* 2007, 274(24): 6415-6425.
10. Trott O, Olson AJ: 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):.455-461.
11. .Kao C-Y, Lai J-K, Lin T-H, Lin Y-J, Jan J-S, Wang SS-S: Examining the Inhibitory Actions of Copolypeptides Against Amyloid Fibrillogenesis of Bovine Insulin. *Biochemical Engineering Journal* 2013.
12. Manno M, Craparo EF, Podestà A, Bulone D, Carrotta R, Martorana V, Tiana G, San Biagio PL: Kinetics of different processes in human insulin amyloid formation. *Journal of molecular biology* 2007, 366(1):.258-274
13. Quinn R, Andrade J: Minimizing the aggregation of neutral insulin solutions. *Journal of pharmaceutical sciences* 1983, 72(12):.1472-1473.
14. Herrmann B, Kasser C, Keuthage W, Huptas M, Dette H, Klute A: Comparison of Insulin Aspart vs. Regular Human Insulin with or without Insulin Detemir Concerning Adipozytokines and Metabolic Effects in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* 2013 (EFirs).
15. Bag S, Tulsan R, Sood A, Datta S, Torok M: Pharmacophore Modeling, Virtual and In Vitro Screening for Acetylcholinesterase Inhibitors and their Effects on Amyloid-Self-Assembly. *Current Computer-Aided Drug Design* 2013, 9(1):.2-14.
16. Chinisaz M, Ghasemi A, Larijani B, Ebrahim-Habibi A: Amyloid formation and inhibition of an all-beta protein: a study on fungal polygalacturonase. *Journal of Molecular Structure 2013*.
17. Platt GW, McParland VJ, Kalverda AP, Homans SW, Radford SE: Dynamics in the Unfolded State of β2-microglobulin Studied by NMR. *Journal of molecular biology* 2005, 346(1):.279-294.
18. Cheng B, Gong H, Li X, Sun Y, Zhang X, Chen H, Liu X, Zheng L, Huang K: Silibinin inhibits the toxic aggregation of human islet amyloid polypeptide. *Biochemical and biophysical research communications* 2012, 419(3):.495-499.
19. Sartoretto J, Melo G, Bersani-Amado C, Oliveira M, Santos R, Passaglia R, Nigro D, Cuman R, Carvalho M, Fortes ZB: Chlorpropamide treatment restores the reduced carrageenan-induced paw edema and pleural exudate volume in diabetic rats .*Inflammation Research* 2008, 57(9):.438-443.
20. Chyan Y-J, Poeggeler B, Omar RA, Chain DG, Frangione B, Ghiso J, Pappolla MA: Potent neuroprotective properties against the Alzheimer β-amyloid by an endogenous melatonin-related indole structure, indole-3-propionic acid. *Journal of Biological Chemistry* 1999, 274(31):.21937-21942.
21. Adachi M, Murata Y, Nakamura S: Theoretical and experimental studies of indoaniline dyes. A novel relationship between absorption spectra and molecular structure. *Journal of the American Chemical Society* 1993, 115(10):.4331-4338.
22. eyer EA, Castellano RK, Diederich F: Interactions with aromatic rings in chemical and biological recognition. *Angewandte Chemie International Edition* 2003, 42(11):1210-1250.
23. Zhou Y, Jiang C, Zhang Y, Liang Z, Liu W, Wang L, Luo C, Zhong T, Sun Y, Zhao L: Structural Optimization and Biological Evaluation of Substituted Bisphenol A Derivatives as β-Amyloid Peptide Aggregation Inhibitors. *Journal of medicinal chemistry* 2010, 53(15):.5449-5466.
24. Ono M, Ikeoka R, Watanabe H, Kimura H, Fuchigami T, Haratake M, Saji H, Nakayama M: Synthesis and evaluation of novel chalcone derivatives with 99 mTc/Re complexes as potential probes for detection of β-amyloid plaques. ACS Chemical Neuroscience 2010, 1(9):598-607.
25. Nayak A, Lee CC, McRae GJ, Belfort G: Osmolyte controlled fibrillation kinetics of insulin: New insight into fibrillation using the preferential exclusion principle .Biotechnology progress 2009, 25(5): 1508-1514.

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-07-22]

STUDY OF AMYLOID FIBRILLATION OF REGULAR INSULIN: INHIBITION BY AROMATIC COMPOUNDS

Maryam Chinisaz[1], Azadeh Ebrahim-Habibi[2,3], Parichehreh Yaghmaei[*1], Kazem Parivar[1], Ahmad-Reza Dehpour[4]

1. *Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran*
2. *Biosensor Research Center, Endocrinology and Metabolism Molecular-Cellular Sciences Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
3. *Endocrinology and Metabolism Research Center, Endocrinology and Metabolism Clinical Sciences Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
4. *Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

ABSTRACT

Background: The flexible structure of proteins is one important factor in the formation of ordered aggregates (amyloid fibril). This is a major problem for therapeutic proteins such as insulin. Study on the induction and inhibition of insulin fibrillation process with specific compounds such as aromatic derivatives may provide useful information about means of stabilization of protein structures.
Methods: To induce fibrillation, regular insulin was incubated in phosphate buffer (pH=7.4) during 24 hours. Amyloid formation was investigated by using Congo red absorbance and transmission electron microscopy (TEM). Then nodular amyloidosis was observed in mice upon amyloid fibril injection, after which the excised nodule was studied by Congo red staining and polarized light microscopy. Then, some aromatic compounds effect was investigated on the fibrillation process.
Results: Regular insulin form mature amyloid fibrils at pH=7.4, 37°C after 24 hours. Silibinin had the highest inhibitory effect on that process. Furthermore, Amyloid fibril injection in mice caused nodular amyloidosis.
Conclusion: Regular insulin has a high potential to undergo amyloid aggregation. Nodular amyloidosis confirms fibril formation by insulin under in vitro condition. Silibinin could be considered as a potential compound capable to increase protein structure stability.

Keywords: Regular insulin, Amyloid fibril, Aromatic compound, Nodular amyloidosis

[*] Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Hesarak Street, Daneshgah Square, Tehran, Iran 1477893855, Fax: +98 21 22363520, Email: yaghmaei_p@yahoo.com

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-07-22]