

## بررسی تاثیر ترانس چالکون بر روی فیبریلایسیون پروتئین انسولین

ماریا امیدی شاهسوندی<sup>۱</sup>، پریچهره یغمایی<sup>۱\*</sup>، شهین احمدیان<sup>۲</sup>، آزاده ابراهیم حبیبی<sup>۳</sup>

۱- گروه بیولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک تهران، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۳- مرکز تحقیقات غدد درن ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

\*مسئول مکاتبات: yaghmaei\_p@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۵/۰۹

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۲۷

DOI: 10.22034/ascij.2023.1989037.1499

## چکیده

فیبریل‌های آمیلوئیدی تجمعات رشته‌مانندی هستند که از باز شدن ساختار طبیعی و بدتاخوردگی انواع مختلف پپتیدها و پروتئین‌ها بوجود می‌آیند. این تجمعات آمیلوئیدی با برخی از بیماری‌ها نظیر بیماری‌های تحلیل برنده عصبی و سیستماتیک از قبیل آلزایمر، پارکینسون و دیابت نوع دو در ارتباط می‌باشند. هدف از این مطالعه بررسی اثرات مهاری ترانس چالکون در مهار فرایند فیبریلایسیون انسولین (پروتئین مدل) می‌باشد. در مرحله اول با استناد به مطالعات انجام شده، شرایط مناسب برای تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی برای پروتئین مدل مد نظر ما فراهم شد. سپس پپتید انسولین در حضور و عدم حضور ترانس چالکون به مدت ۲۴ ساعت در شرایط تشکیل تجمعات آمیلوئیدی انکوبه شد و فیبریل‌های تشکیل شده با تکنیک‌های مختلف از جمله مطالعه تغییرات جذب نوری کنگورد با تکنیک اسپکتروسکوپی، تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) و تصویربرداری و آنالیز تجمعات آمیلوئیدی با میکروسکوپ فلورسان بررسی شدند در نهایت، با استفاده از روش داکینگ مولکولی توسط نرم‌افزار AutoDock برهمکنش‌های احتمالی ترکیب ترانس چالکون با پپتید انسولین تحلیل شد. نتایج حاصل از پژوهش، کاهش قابل ملاحظه تجمعات آمیلوئیدی را در نمونه تغییر داده شده نسبت به نمونه شاهد نشان داد.

کلمات کلیدی: تجمعات آمیلوئیدی، ترانس چالکون، انسولین، ترکیبات آروماتیک، کنگورد، تیوفلاوین S، داکینگ.

## مقدمه

تجمع پروتئینی بدون شک یکی از جذاب‌ترین و چالش‌برانگیزترین موضوعات در زیست‌شناسی است. تشکیل توده‌های پروتئینی منظم، معروف به فیبریل‌های آمیلوئیدی، عامل اصلی بسیاری از پاتولوژی‌های تحلیل برنده سیستم عصبی، از جمله دیابت نوع دو، آلزایمر، بیماری‌های پرئونی و غیره هستند (۳۳). آمیلوئیدوز بیماری است که با رسوب خارج سلولی پروتئین‌های غیرطبیعی تحت عنوان

آمیلوئید در یک اندام (آمیلوئیدوز موضعی) یا کل بدن (آمیلوئیدوز سیستمیک) شناخته می‌شود. آمیلوئید در هر اندامی که ایجاد شود، منجر به اختلال در ساختار و عملکرد آن اندام می‌شود (۸). رسوبات و فیبریل‌های سازمان یافته‌ای که ساختار فوق ثانویه بتا متقابل را اتخاذ می‌کنند، به‌عنوان آمیلوئید شناخته می‌شوند. با توجه به وجود توده‌های پروتئینی آسیب دیده و تبعات بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و بالینی، علائم بالینی

بین‌زنجیره‌ای و یک پیوند دی‌سولفید داخلی به هم متصل شده‌اند. انسولین در حالت محلول به صورت ترکیبی از هگزامریک، دیمریک و مونومریک وجود دارد. نخستین بار تشکیل فیبریل انسولین در دهه ۱۹۴۰ شناسایی شد. تشکیل فیبریل به pH، دما و میزان هم‌زدن محلول بستگی دارد (۱۸، ۳۵). در محیط آزمایشگاهی، هنگامی که انسولین در دماهای بالا، pH کم و در محلولی با قدرت یونی بالا گرم می‌شود، تغییرات ساختاری در پروتئین رخ می‌دهد که منجر به تشکیل ساختارهای فیبریلی می‌شود (۷). طی مطالعات مختلف، تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی انسولین در شرایط متفاوت انجام شده است. برای مثال انسولین قادر است در pH ۲ و دمای ۵۷ درجه (pH اسیدی و دمای بالا) آمیلوئید تشکیل دهد (۲۰). چالکون‌ها از ترکیبات فلاونوئیدی و ایزوفلاونوئیدی هستند که به‌طور گسترده در گیاهان خوراکی یافت می‌شوند. از نظر شیمیایی این مواد (فلاونوئیدها)، دارای زنجیره بازی هستند که دو حلقه آروماتیک دارند که به وسیله سه کربن غیراشباع به یکدیگر متصل شده‌اند. چالکون‌ها ترکیباتی هستند که به‌طور گسترده دارای فعالیت‌های بیولوژیکی هستند که شامل خواص ضد التهابی، ضدتهاجمی، ضدتومور و ضدباکتری و ... هستند (۲۹، ۳۱). اثرات سمی این خانواده بر روی سلول‌های سرطانی اثبات شده است (۱۵). یکی از انواع چالکون‌ها ترانس‌چالکون است. ترانس‌چالکون سبب حفاظت بر علیه استرس اکسیداتیو ناشی از هیدروژن پراکساید (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) می‌شود. رادیکال‌های آزاد و در رأس آنها ترکیبات مشتق از اکسیژن فعال (ROS) مهمترین عوامل شکل‌گیری واکنش استرس اکسیداتیو هستند. امروزه، آسیب رادیکالی به‌عنوان عامل مؤثری در بسیاری از بیماری‌ها از جمله آلزایمر، آترواسکلروز و سرطان در نظر گرفته می‌شود (۲۴). هدف این مطالعه، بررسی تأثیر ترانس‌چالکون بر

و پیش‌آگهی بیماری‌های مرتبط با آمیلوئید می‌توانند به‌طور قابل توجهی متفاوت باشند (۱۹). فیبریل‌های آمیلوئیدی اغلب از ۲ تا ۸ پروتوفیلامنت تشکیل شده‌اند، هر کدام با قطر ۲ تا ۷ نانومتر و عرض ۳ نانومتر و ارتفاع ۲ تا ۷ نانومتر. پروتوفیلامنت‌ها اغلب به دور یکدیگر پیچیده شده و فیبریل‌های با عرض ۵ تا ۱۵ نانومتر را شکل می‌دهند (۶). علاوه بر پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌های تحلیل برنده سیستم عصبی، سایر پروتئین‌ها مانند انسولین، لیزوزیم، بتا-۲-میکروگلوبولین و غیره نیز می‌توانند در شرایط مشخصی از pH، قدرت یونی و دمای بالا، فیبریل‌هایی شبیه به آمیلوئید تشکیل دهند. پیشنهاد شده است که شکل‌گیری ساختارهای فیبریلی، بر اساس برخی اصول مشترک اتفاق می‌افتد. گزارشات قبلی نشان می‌دهند که شکل‌گیری فیبریل مستقل از ساختار اولیه پروتئین است. با این حال، بیشتر فیبریل‌های آمیلوئیدی و شبیه به آمیلوئید، ساختار صفحات بتا مشترکی را دارا هستند. به همین دلیل، یک داروی مهارکننده فیبریل‌های آمیلوئیدی فقط می‌تواند بر روی ساختار ثانویه صفحات بتا موثر باشد و اثری بر ساختار اولیه پروتئین ندارد (۴، ۱۷، ۲۳، ۲۸، ۳۶). انسولین، هورمون پپتیدی، تحت شرایط خاص و مشخص در محیط آزمایشگاه می‌تواند فیبریل‌هایی شبیه به آمیلوئید تشکیل دهد (۲، ۱۲). فیبریل‌های آمیلوئیدی انسولین، در کاربردهای بیوتکنولوژی و پزشکی مشکلات مختلفی ایجاد می‌کنند. مطالعات نشان داده است که تجمع انسولین به صورت فیبرهای آمیلوئید در محل تزریق زیر پوستی انسولین و همچنین در استفاده از پمپ‌های انسولین در بیماران دیابتی نوع ۱ مشاهده شده است که این تجمع باعث بروز مقاومت به انسولین می‌گردد (۱، ۱۰). انسولین از دو زنجیره پلی‌پپتیدی A (۲۱ رزیدو) و B (۳۰ رزیدو) تشکیل شده است که با دو پیوند دی‌سولفید

(۳۷).

رنگ‌آمیزی فلورسانت تجمعات آمیلوئیدی: برای بررسی تشکیل تجمعات آمیلوئیدی با استفاده از رنگ آمیزی تیوفلاوین S، ابتدا در تاریکی به ۱۰ میکرولیتر از نمونه محلول در میکروتیوب (حاوی تجمعات آمیلوئید در هر گروه مورد بررسی) به میزان هم حجم از محلول تیوفلاوین S ۱درصد (Sigma-T1892) اضافه شد، سپس نمونه‌ها جهت از بین رفتن رنگ اضافی با حجم ۵۰۰ میکرولیتر PBS ترکیب و پس از ته‌نشین شدن ترکیبات آمیلوئید، ۱۰ میکرولیتر از محلول ته میکروتیوب جهت مطالعه بر روی لام آزمایشگاهی قرار داده شد و با قرار دادن لام، از حرکت محلول جلوگیری به عمل آمده و سپس با بزرگنمایی ۴۰۰ و با لنز ۴۰ میکروسکوپ فلورسانت (با میکروسکوپ Olympus) عکسبرداری انجام شد.

**تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی انتقالی (TEM):** یکی از معیارهای تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی یا شبه آمیلوئیدی، مشاهده فیبرهای مستقیم، طولانی و فاقد شاخه با قطر تقریبی ۱۲-۴ نانومتر در تصاویر میکروسکوپ الکترونی انتقالی (EM10 C; Zeiss, Germany) نمونه پروتئینی است. در این راستا، ۱۰-۵ میکرولیتر از نمونه پروتئینی برداشته شده و بر روی گریدهای پوشیده از کربن (۴۰۰) قرار داده می‌شد. پس از ۴۵ ثانیه، گریدها با آب دو بار تقطیر شسته شده و سپس رنگ‌آمیزی با اورانیل استات ۲ درصد انجام می‌شد و پس از ۵-۲ دقیقه دیگر، که محلول‌ها در سطح گرید خشک شده بودند، آنالیز نمونه با کمک میکروسکوپ الکترونی گذاره EM10C Zeiss مشاهده می‌شد (۳۲). تمامی آزمایشات با سه بار تکرار انجام شده و میانگین داده‌ها به همراه انحراف معیار بیان شده است. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم افزار SPSS 16 و آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه و تست توکی تجزیه

فیبریلاسیون انسولین در شرایط آزمایشگاهی و همچنین با استفاده از روش داکینگ مولکولی است.

#### مواد و روش‌ها

ترانس‌چالکون، تیوفلاوین اس (thioflavin S) و کنگو رد (Congo red) از شرکت سیگما (Saint Louis, MO, USA) خریداری شد. انسولین رگولار از EXIR, Pharmaceutical Company, Iran خریداری شد. کلروفرم، مونوپتاسیم فسفات (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)، پتاسیم فسفات (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) و دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) از شرکت مرک آلمان خریداری شد.

**القای تشکیل تجمعات آمیلوئیدی در پروتئین انسولین:** بدین منظور محلول انسولین با غلظت نهایی ۰/۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر در بافر فسفات (pH= ۷/۴، ۵۰ میکرومولار) در حضور و عدم حضور ترانس‌چالکون (غلظت ۱ میلی‌مولار) تهیه شد. سپس ویال‌های حاوی نمونه‌های پروتئینی به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و بر روی استیرر که با سرعت ۱۰۰ دور بر دقیقه (RPM) در حال چرخش بود انکوبه شد (۳۸).

**جذب نوری کنگورد:** برای بررسی تشکیل تجمعات آمیلوئیدی با استفاده از طیف جذب نوری کنگورد، در یک میکروتیوب کنگورد با غلظت ۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر در بافر ۵ میلی‌مولار پتاسیم فسفات و ۱۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم (pH = ۷/۴) حل شده و به‌منظور ارزیابی تشکیل تجمعات آمیلوئیدی ۲۰ میکرولیتر از نمونه مورد نظر به ۴۸۰ μl از محلول کنگورد افزوده با فیلتر سرنگی با منافذ ۰/۲ میکرومولار فیلتر شد. سپس با یک بار معکوس کردن، به هم زده و برای مدت ۱۰ دقیقه تا تثبیت رنگ در آزمایشگاه قرار داده شد. در نهایت طیف جذب نوری کنگورد در طول موج ۶۰۰-۴۰۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر مرئی - فرابنفش Shimadzu UV-1800 ثبت شد (۳۴).

و تحلیل شدند.

### نتایج

بررسی تشکیل تجمعات آمیلوئیدی پروتئین انسولین با استفاده از طیف جذب نوری کنگورد: در این تحقیق انسولین رگولار (در حضور و عدم حضور ترانس‌چالکون) جهت القای فیبریل‌زایی در pH خنثی و دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد. تحت این شرایط انسولین قادر به تشکیل ساختار فیبریلار آمیلوئیدی است. ایجاد آمیلوئید و حدواسط‌های آمیلوئیدی با استفاده از روش اسپکتروسکوپی جذب کنگورد مورد بررسی قرار گرفتند. نشانگر قرمز کنگو بطور اختصاصی به فیبریل‌های آمیلوئیدی باند شده و این اتصال با افزایش جذب و انتقال به سمت طول موج‌های بلندتر (red shift) همراه است. در این پژوهش میزان جذب قرمز کنگو نمونه انسولین رگولار انکوبه شده (در حضور و عدم حضور ترانس‌چالکون) در زمان‌های ۸، ۱۶، ۲۴ ساعت مورد سنجش قرار گرفت. همانطور که در شکل مشاهده می‌شود، نتایج حاصل برای نمونه‌های حاوی انسولین رگولار نشان دهنده افزایش تدریجی جذب و انتقال به سمت طول موج‌های بلندتر متناسب با افزایش زمان انکوباسیون می‌باشد. در حضور ترانس‌چالکون نیز انسولین قادر به تشکیل ساختار فیبریلار می‌باشد. ایجاد آمیلوئید و میزان تأثیر ترانس‌چالکون بر فرایند فیبریلیاسیون با استفاده از روش اسپکتروسکوپی جذب کنگورد مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان دهنده تأثیر کاهنده ترانس‌چالکون بر فرایند فیبریلیاسیون انسولین می‌باشد (شکل ۱).

**نتایج حاصل از مطالعات میکروسکوپ الکترونی (TEM):** یکی از معیارهای تشکیل فیبریل آمیلوئیدی مشاهده مستقیم فیبریل‌های آمیلوئیدی در تصاویر میکروسکوپی است. میکروسکوپ الکترونی TEM قادر است توسط امواج الکترونی که از جسم عبور می‌دهد، تصاویر خیلی واضح با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰ تا

**داکینگ مولکولی:** اتصال مولکولی بین ترانس‌چالکون و انسولین با استفاده از نرم افزار AutoDock 4 بررسی شد. ۴۲ نقشه شبکه (grid maps)  $70 \times 70 \times 70 \text{ \AA}$  (انگستروم) که کل پروتئین را در برمی‌گیرد با AUTOGRID محاسبه شد که فاصله هر نقطه در شبکه‌های تولید شده  $0.375 \text{ \AA}$  (تقریباً یک چهارم طول یک پیوند تک کربن-کربن) بود. در میان سه الگوریتم جستجوی مختلف موجود، ارائه شده توسط AutoDock 4، رویکرد LGA برای جستجوی موقعیت اتصال بهینه کلی استفاده شد. ساختار مولکولی ترانس‌چالکون از پایگاه داده pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) تهیه شد. سپس یک کمینه‌سازی انرژی با استفاده از نرم‌افزار آوگادرو برای به‌دست آوردن یک ساختار سه بعدی پایدار انجام شد. انسولین با کدهای به ترتیب 3I40 برای ساختار طبیعی و 1SF1 مربوط به ساختار دناتوره شده، از پایگاه داده پروتئین RCSB تهیه شد. در اولین مرحله مولکول‌های آب از ساختار کریستالی به صورت دستی حذف شدند. سپس با استفاده از نرم افزار AutoDock Tools هیدروژن‌های قطبی و بارهای Gastiger به اتم‌های لیگاند و پروتئین‌ها اضافه شد. همه پیوندهای قابل چرخش لیگاند، در نظر گرفته شدند. نحوه اتصال با استفاده از روش داکینگ بدون جایگاه هدف مشخص (Blind docking) انجام شد و فضای جستجو به اندازه کافی بزرگ برای کل پروتئین در نظر گرفته شد، زیرا تمام سطح پروتئین در دسترس لیگاند بود. برهمکنش‌های پروتئین لیگاند دو بعدی با استفاده از نرم افزار LIGPLOT به نمایش در آمد. تصاویر سه بعدی نیز با استفاده از نرم افزار VMD ترسیم شد.

۱۰۰۰۰۰۰ برابر با قدرت تفکیکی در حد کوچکتر از 1 نانومتر را ایجاد نماید. در این مطالعه از تجمعات حاصله از انکوباسیون انسولین رگولار و انسولین رگولار در حضور ترکیب ترانس‌چالکون تصاویر میکروسکوپ الکترونی تهیه شده است (شکل ۲). فیبریل‌های به دست آمده بعد از ۲۴ ساعت، رشته‌هایی واضح با قطر تقریبی ۷/۶-۴/۵ نانومتر را نشان می‌دهند. این روش یکی از مطمئن‌ترین ابزارهای مورد استفاده در جهت اثبات وجود تجمعات آمیلوئیدی می‌باشد. تصاویر به دست آمده، ساختارهای فیبریلی و تجمعات بی‌شکل را به‌طور واضح نشان می‌دهد. به نظر می‌رسد تشکیل فیبریل انسولین در حضور ترانس‌چالکون موجب کاهش تعداد و قطر رشته‌های فیبریل‌ها نسبت به گروه فیبریل انسولین شده است.

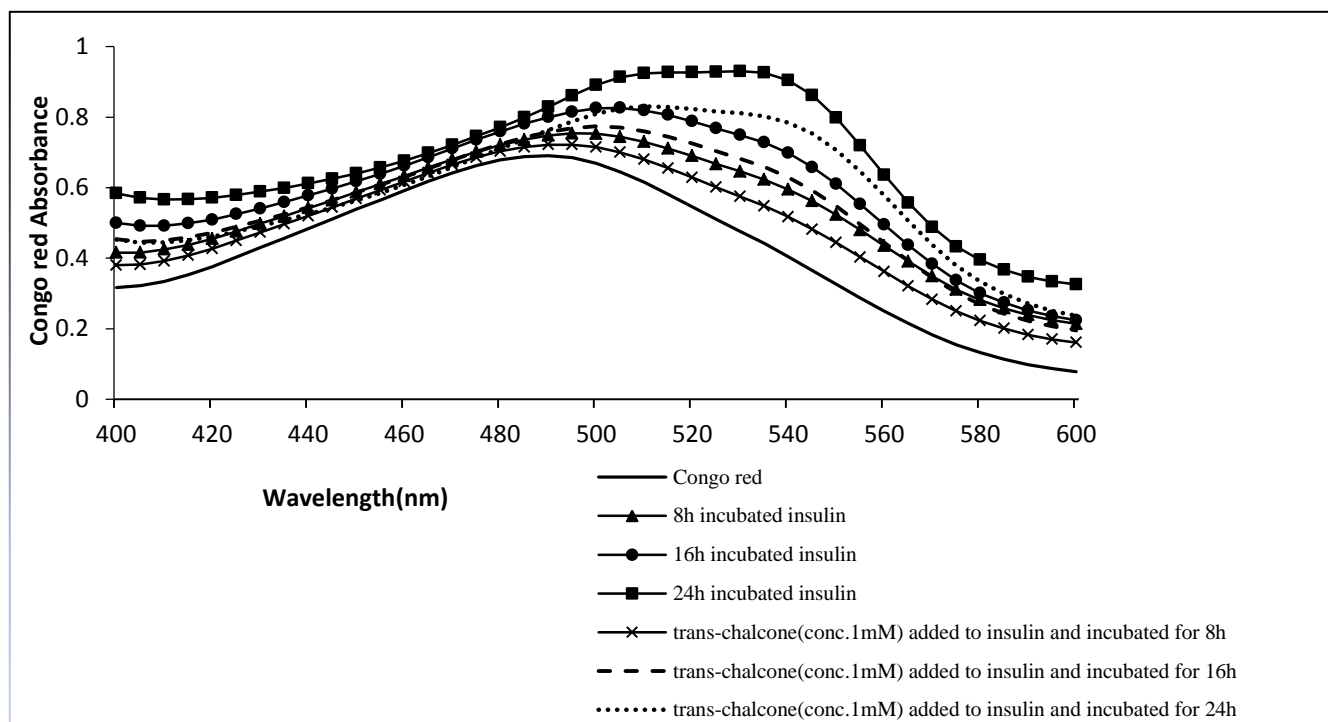
**بررسی تشکیل تجمعات آمیلوئیدی انسولین با استفاده از رنگ آمیزی تیوفلاوین S:** در تمامی ساعت‌های مطالعه تفاوت معنی‌دار بین گروه انسولین و گروه (انسولین + ترانس‌چالکون) مشاهده شد. براساس نتایج مشخص گردید که شدت بیان تیوفلاوین S، به عنوان شاخصی جهت اندازه‌گیری تجمعات فیبریلی، در همه زمان‌ها در گروه (انسولین + ترانس‌چالکون) کمتر از گروه انسولین بود. مقایسه بین گروه انسولین در زمان‌های مختلف مطالعه افزایش شدت را نشان داد. حال آن که این افزایش میزان تجمعات در گروه (انسولین + ترانس‌چالکون) با وجود افزایش در ۲۴ ساعت نسبت به ۸ ساعت، معنی‌دار نبود (نمودار ۱). در تمامی ساعت‌های مورد مطالعه بین گروه انسولین و (انسولین + ترانس‌چالکون) تفاوت معنی‌دار مشاهده گردید. براین اساس مشخص گردید که تعداد تجمعات فیبریلی در گروه (انسولین + ترانس‌چالکون) نسبت به انسولین به‌طور معنی‌داری کمتر بود ( $p < 0/05$ ). به‌علاوه مقایسه بین گروه انسولین در زمان‌های مختلف مطالعه، افزایش تعداد

تجمعات فیبریل را با گذشت زمان نشان می‌دهد. مقایسه انسولین با (انسولین + ترانس‌چالکون) بر روی شمار تجمع فیبریل‌ها در زمان‌های مورد مطالعه معنی‌دار بود. در گروه (انسولین + ترانس‌چالکون) با وجود افزایش تعداد تجمعات با گذر زمان، این افزایش از نظر آماری در این گروه معنی‌دار نبود (نمودار ۲). در تمامی ساعت‌های مورد بررسی بین گروه انسولین و (انسولین + ترانس‌چالکون) تفاوت معنی‌داری از نظر آماری مشاهده شد. به این ترتیب نتایج نشان می‌دهد که اندازه تجمعات آمیلوئید در گروه انسولین با گذشت زمان افزایش نشان داد حال آن که در گروه (انسولین + ترانس‌چالکون) با گذشت زمان این اندازه‌های تجمعات آمیلوئید تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. نتایج نشان داد که بیشترین تفاوت در بین ساعات مورد مطالعه ۱۶ ساعت پس از شروع مطالعه بود که تفاوت بین اندازه تجمعات آمیلوئید در گروه انسولین با گروه (انسولین + ترانس‌چالکون) تفاوت معنی‌داری ( $p < 0/01$ ) را نشان داد. این میزان معنی‌داری در ۲۴ ساعت نیز در دو گروه حفظ گردید (نمودار ۳).

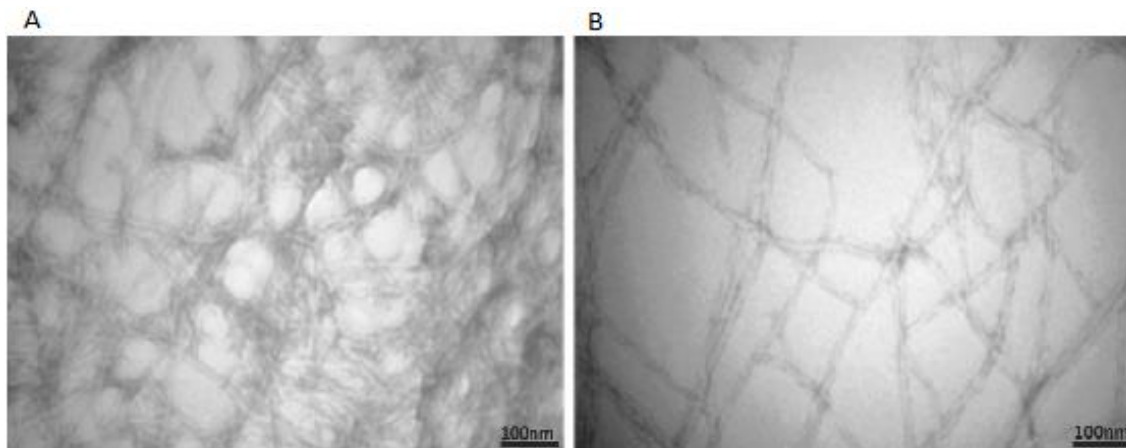
**بررسی داکینگ مولکولی:** روش داکینگ مولکولی رایج‌ترین روش برای تخمین برهمکنش بین پروتئین و لیگاند است. بر اساس دانش ما، هیچ جایگاه اتصال مشخص برای اتصال لیگاندهای چالکونی به انسولین وجود ندارد. در این تحقیق از داکینگ بدون جایگاه هدف مشخص برای تعیین محل اتصال استفاده شد و کل پروتئین مورد بررسی قرار گرفت. ۲۰۰ هندسه داکینگ ایجاد شده برای ترانس‌چالکون پس از داکینگ بر اساس Rmsd ( $0.5 \text{ \AA}$ ) به خوشه‌های مختلف تفکیک شدند. این بدان معنی است که در یک خوشه، تمام ترکیبات ترانس‌چالکون عمدتاً یک پیکربندی مشابه و نزدیک به هم دارند. علاوه بر تجزیه و تحلیل خوشه‌ای بر اساس AutoDock rmsd انرژی آزاد

توان گفت که عمده نیروهای درگیر در اتصال ترانس‌چالکون به انسولین طبیعی از نوع هیدروفوب است. در شکل ۵ نتایج داکینگ ترانس‌چالکون بر روی انسولین دناتوره نشان داده شده است. همان طوری که در این شکل مشخص است، ترانس‌چالکون جایی بین دو زنجیره A و B قرار گرفته است. با توجه به شکل ۸-ب عمده برهمکنش‌هایی هم که در این حالت اتفاق می‌افتد از نوع هیدروفوب است. همان طوری که در شکل ۵-ب مشاهده می‌شود آمینواسید-های مهم درگیر در ایترکشن ترانس‌چالکون و انسولین شامل Tyr19 از زنجیره A و Thr27، Leu11، Tyr19، Phe25 می‌باشد. گروه کربونیل ترانس‌چالکون با داشتن بار جزئی منفی جایی بین Thr27، Tyr26 از زنجیره B قرار گرفته است.

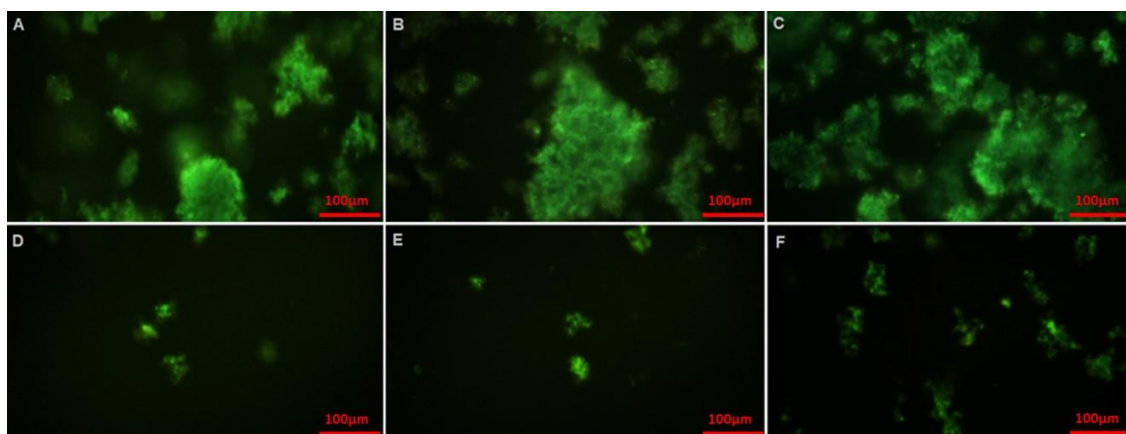
اتصال را برای تعیین بهترین نحوه اتصال محاسبه می‌کند. بر اساس پروتکل اتصال ارائه شده در بخش روش کار، ترانس‌چالکون به انسولین طبیعی و دناتوره متصل شد. شکل ۷ ترکیب اتصال ترانس‌چالکون روی پروتئین طبیعی را نشان می‌دهد. همان طوری که در شکل ۷-الف مشخص است ترانس‌چالکون جایی در بین بخش‌های مختلف پروتئین و نزدیک به ساختار-های آلفا هلیکس دو زنجیره A و B قرار می‌گیرد. این بخش‌ها عمدتاً در زنجیره A انسولین واقع شده است. در شکل ۴-ب مشخص است که چهار آمینواسید نقش اصلی را در اتصال ترانس‌چالکون به انسولین طبیعی ایفا کرده‌اند. لوسین ۱۳، تیروزین ۱۴، گلوتامات ۱۷ و آسپارژین ۱۸ که همگی در زنجیره A پروتئین هستند. عمده بر همکنش‌های مهم با این چهار آمینواسید از نوع هیدروفوب است، بنابراین می-



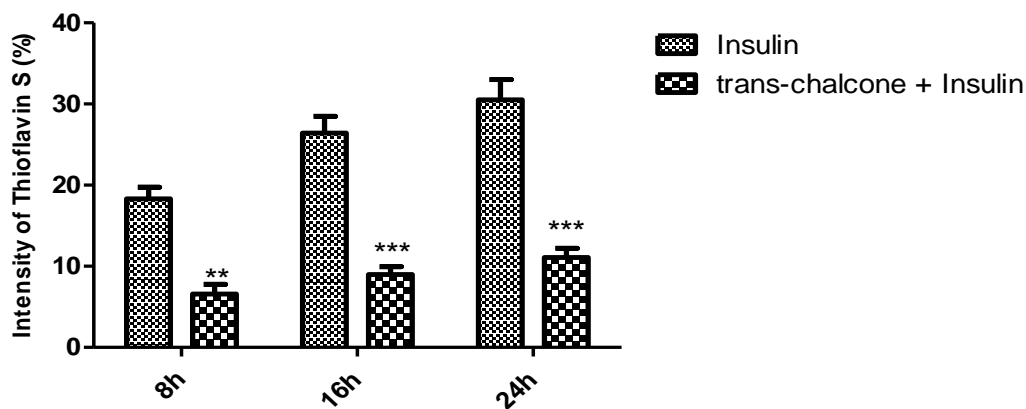
شکل ۱- طیف جذب قرمز کنگو پروتئین انسولین در حضور ترانس‌چالکون در زمان‌های ۸، ۱۶، ۲۴ ساعت



شکل ۲- تصویر میکروسکوپ الکترونی TEM. (A) فیبریل‌های به‌دست آمده در شرایط اپتیمم فیبریل‌زایی آمیلوئیدی انسولین رگولار بعد از گذشت ۲۴ ساعت (B) فیبریل‌های به‌دست آمده در شرایط اپتیمم فیبریل‌زایی آمیلوئیدی انسولین رگولار در حضور ترانس‌چالکون پس از ۲۴ ساعت

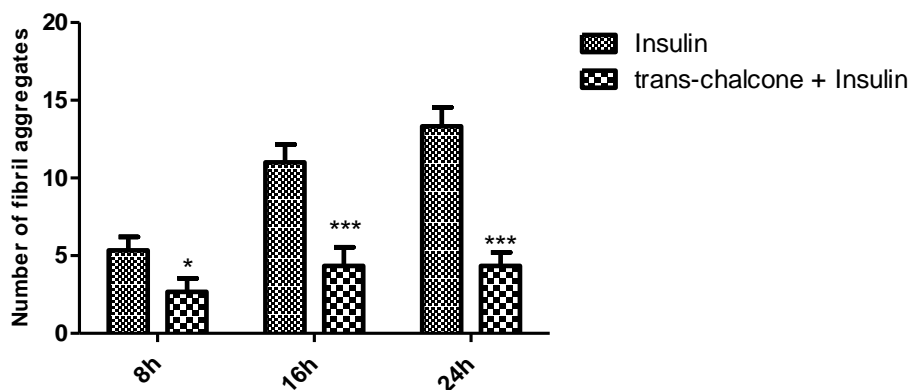


شکل ۳- رسوبات فیبریل آمیلوئید با رنگ‌آمیزی تیوفلاوین S (نتایج میکروسکوپ فلورسانس)، A، B، C: تصاویر آمیلوئید انسولین به ترتیب در زمان‌های ۸، ۱۶، ۲۴ ساعت. D، E، F: تصاویر آمیلوئید انسولین در حضور ترانس‌چالکون به ترتیب در زمان‌های ۸، ۱۶، ۲۴ ساعت



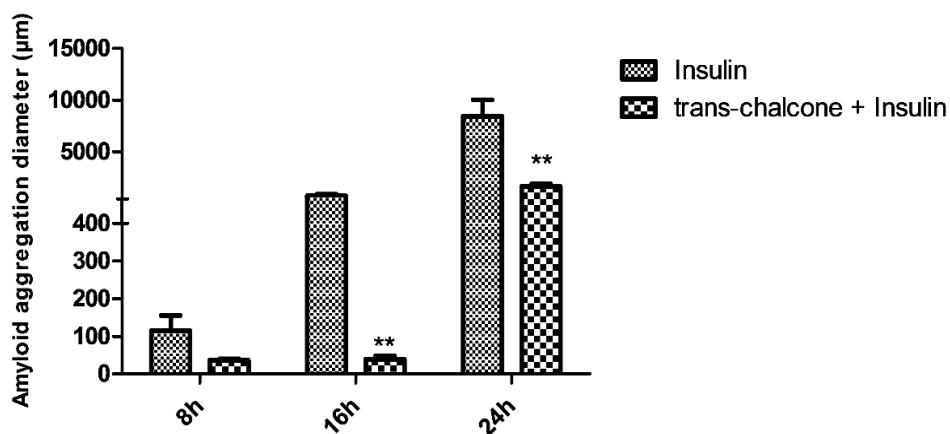
نمودار ۱- درصد شدت تیوفلاوین S در گروه‌های انسولین و (انسولین+ ترانس‌چالکون) در ساعات ۸، ۱۶ و ۲۴.

$$p < 0/001 \text{ ***}, p < 0/01 \text{ **}, p < 0/05 \text{ *}$$



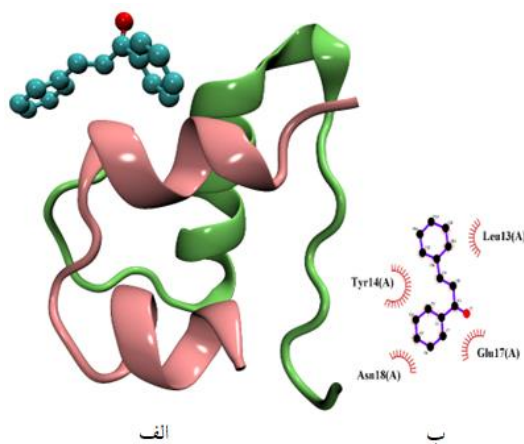
نمودار ۲- تعداد تجمعات فیبریل در گروه‌های انسولین و (انسولین + ترانس‌چالکون) در ساعات ۸، ۱۶ و ۲۴.  $p < 0.05$  \*\*

$p < 0.001$  \*\*\*,  $p < 0.01$



نمودار ۳- اندازه تجمعات آمیلوئید در گروه‌های انسولین و (انسولین + ترانس‌چالکون) در ساعات ۸، ۱۶ و ۲۴

$p < 0.001$  \*\*\*,  $p < 0.01$  \*\*,  $p < 0.05$  \*

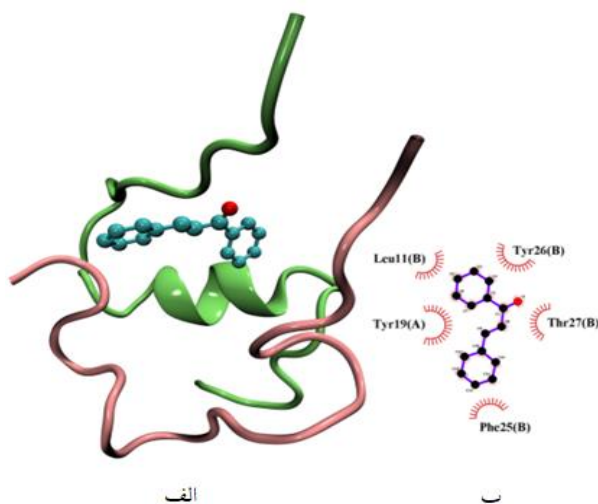


الف

ب

شکل ۴- الف) نحوه اتصال ۳ بعدی ترانس‌چالکون به انسولین طبیعی ب) آمینو اسید های مهم درگیر در اتصال ترانس‌چالکون به انسولین طبیعی





شکل ۵- الف) نحوه اتصال ۳ بعدی ترانس چالکون به انسولین دنا توره ب) آمینواسیدهای مهم درگیر در اتصال ترانس چالکون به انسولین طبیعی

### بحث

است که ترکیبات آروماتیک می‌توانند با برهمکنش با این رزیدوها، مهارکننده‌های خوبی باشند (۲۲). در این پروژه، از انسولین به عنوان یک پروتئین مدل آمیلوئیدی استفاده شده است و تشکیل فیبریل آمیلوئید و عوامل موثر در مهار آن مورد بررسی قرار گرفته‌اند. پس از تبدیل شدن به فرم آمیلوئید، انسولین عملکرد اختصاصی خود به عنوان پروتئین را از دست می‌دهد. بنابراین، می‌توان نتایج مشاهده شده در این پژوهش را مربوط به ساختار فیبریلاری پروتئین انسولین دانست (۱۲). 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، آمیلوئید تشکیل دهد (۲۰). در سال‌های ۲۰۱۲ و ۲۰۱۴، پژوهشگران در مطالعات جداگانه‌ای، تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی انسولین در pH خنثی و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد را بررسی کردند. نتایج بررسی‌ها، نشان دهنده تشکیل فیبریل آمیلوئیدی در شرایط مذکور بود (۵، ۳۰)، یافته‌های این پژوهش نیز نشان دهنده تشکیل فیبریل آمیلوئیدی در شرایط ذکر شده بود. درصد کمی از بیماری‌های

هدف این مطالعه بررسی اثرات ترانس چالکون بر تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی حاصل از انسولین رگولار بود. فیبریل‌های آمیلوئیدی، ساختارهای رشته-ای خود تجمع یافته‌ایی هستند که توسط پروتئین‌های محلول ایجاد می‌شوند، و دارای مقدار زیادی از صفحات بتا می‌باشند که در برابر تخریب مقاوم هستند و تجمع پیدا می‌کنند (۲۶). در حال حاضر، محققان به جنبه‌های مختلف تجمعات پروتئینی علاقه‌مند هستند. این تجمعات به دلیل کاربردهای بیوتکنولوژی و داروسازی در تولید فرآورده‌های پروتئینی و همچنین نقش آن‌ها در ایجاد بیماری‌های مختلف، در محدوده وسیعی از مطالعات قرار دارند (۶). در سال ۲۰۰۴، نتایجی که توسط Nguyen و همکاران به دست آمد، نشان داد که تغییرات ساختاری پروتئین‌ها می‌توانند بر عملکرد آن‌ها تأثیرگذار باشند. بر اساس گزارش‌های مختلف، پروتئین‌هایی که دارای تریپتوفان و فنیل‌آلانین فراوانی هستند، ساختاری مستعد برای تشکیل فیبریل دارند. زیرا این رزیدوهای آروماتیک، باعث تسهیل جهت‌دهی اجزای پروتئینی به سمت تشکیل تجمع می‌شوند. به همین دلیل، پیشنهاد شده

تحلیل برنده عصبی منشاء ژنتیکی دارند و با ایجاد جهش در پروتئین تشکیل‌دهنده تجمع یا پروتئین‌های مرتبط با آن، ایجاد می‌شوند. اما در بسیاری دیگر از موارد، عوامل محیطی می‌توانند سبب تغییر ساختار پروتئین‌ها و ایجاد تجمعات پروتئینی شوند. آمارها نشان می‌دهند که این گروه از بیماری‌ها در حال تشدید است و علت آن، افزایش طول عمر و تغییر در الگوهای زندگی، از جمله تغذیه نامناسب و آلودگی‌های زیست محیطی است. به دلیل اهمیت این بیماری‌ها، شناخت مکانیزم‌های تشکیل فیبریل‌ها و یافتن راه‌های درمانی و به خصوص راه‌های پیشگیری، می‌تواند در کاهش این نوع اختلالات بسیار مفید باشد. در این راستا، استراتژی‌های گوناگونی برای شناسایی مهارکننده‌های تشکیل تجمعات آمیلوئیدی وجود دارند (۱۴). یکی از استراتژی‌هایی که در این سال‌ها مورد توجه قرار گرفته است، مهار فیبریل‌اسیون با استفاده از مولکول‌های آلی کوچک حاوی یک، دو یا سه حلقه آروماتیک است (۲۵). تحقیقات صورت گرفته بر تأثیر ترکیبات شیمیایی از جمله ترکیبات فنولی و آروماتیک نشان دادند این ترکیبات به دلیل داشتن حلقه‌های آروماتیکی و ایجاد مداخله در میانکنش‌های هیدروفوبیک و  $\pi$ -Stacking، با قرار گرفتن در بین صفحات بتا منجر به کاهش تجمعات پروتئین‌ها و افزایش حلالیت آنها می‌شوند. از این رو، ترکیبات دارای حلقه‌های آروماتیکی می‌توانند ترکیبات افزودنی ارزشمندی در حفظ پایداری ساختاری و عملکرد بیولوژیک پروتئین‌ها و کاهش سمیت ناشی از تشکیل تجمعات پروتئینی باشند (۱۱)، (۲۱). تحقیقاتی در زمینه شناسایی مهارکننده‌های مختلف فرآیند تجمع و آمیلوئیدی‌شدن در انسولین صورت گرفته است که در این راستا مهارکننده‌هایی نظیر قطعات پپتیدی ویژه با توالی خاص، متالوپورفیرین‌ها و ... شناسایی شده‌اند (۹). تحقیقاتی

بر روی ترکیبات مهارکننده تجمع‌ها توسط Hecht و همکارانش صورت گرفته است که در شناسایی مکانیسم عمل و یافتن واکنش‌هایی که در تشکیل تجمع‌های پروتئینی موثر هستند، مفید است (۱۳). ترکیبات مولکولی کوچک حاوی حلقه‌های آروماتیک با آمینواسیدهای موجود در پروتئین‌ها ارتباط برقرار می‌کنند و از تعامل میان زنجیره‌های جانبی آنها - که موجب تشکیل هسته‌های هیدروفوبیک فیبریل‌های آمیلوئید می‌شوند - جلوگیری می‌کنند (۳). طبق مطالعات صورت گرفته مشخص شده است که تعدادی از ترکیبات فنولی بواسطه ساختارهای آروماتیکی که دارند می‌توانند بر روی تجمع‌های پروتئینی تأثیر مهاری داشته باشند. رزوراتول از جمله ترکیبات پلی فنولی است که به‌طور قابل توجهی باعث کاهش تشکیل پلاک‌های آمیلوئیدی در مغز حیوانات می‌گردد. این پلاک‌ها یکی از علل ایجاد بیماری آلزایمر می‌باشند (۱۶). Bahramikia و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که ترکیبات مولکولی کوچک حاوی حلقه‌های آروماتیک و گروه‌های هیدروکسیل (مانند پلی‌فنول‌ها) با برقراری ارتباط با آمینواسیدهای آروماتیک موجود در پروتئین‌ها، باعث جلوگیری از تعامل میان زنجیره‌های جانبی آمینواسیدها و همچنین مانع تشکیل هسته‌های هیدروفوبیک فیبریل‌های آمیلوئیدی می‌شوند و در نتیجه منجر به کاهش تجمعات آمیلوئیدی می‌شود (۳) و در سال ۲۰۱۳ ربیعی و همکارانش اثرات مهاری کورکومین بر روی تجمعات انسولین بررسی کردند (۲۷) و این امر حاکی از همراستا بودن این پژوهش‌ها با تحقیق حاضر می‌باشد.

#### نتیجه‌گیری

در این مطالعه توانایی ترانس‌چالکون در مهار تشکیل تجمعات آمیلوئیدی توسط پروتئین انسولین مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان دهنده توانایی

Manganese-Salen Derivatives as Anti-amyloidogenic and Fibril-destabilizing Agents Against Hen Egg-white Lysozyme Aggregation. *Chemical Biology and Drug Design*, 80(2):227-236.

4. Butler A., Janson J., Bonner-Weir S., Ritzel R., Rizza R., Butler P. 2003. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes*, 52:102-110.

5. Chinisaz M., Ebrahim-Habibi A., Yaghmaei P., Parivar K., Dehpour A.R., 2014. Generating local amyloidosis in mice by the subcutaneous injection of human insulin amyloid fibrils. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 8(2):405-408.

6. Chiti F., Dobson C.M. 2017. Protein misfolding, amyloid formation, and human disease: A summary of progress over the last decade. *Annual Review of Biochemistry*, 86:27-68.

7. D'Souza A., Theis J.D., Vrana J.A., Dogan A. 2014. Pharmaceutical amyloidosis associated with subcutaneous insulin and enfuvirtide administration. *The Journal of Protein Folding Disorders*, 21(2):71-75.

8. Dubrey S.W., Hawkins P.N., Falk R.H. 2010. Amyloid diseases of the heart: assessment, diagnosis, and referral. *Heart*, 97(1):75-84.

9. Ecroyd H., Carver J.A. 2008. Unraveling the mysteries of protein folding and misfolding. *IUBMB Life*, 60(12):769-774.

10. Ehrlich J.C., Ratner I.M. 1961. Amyloidosis of the islets of Langerhans. A restudy of islet hyalin in diabetic and non-diabetic individuals. *The American Journal of Pathology*, 38(1):49-59.

11. Feng S., Song X.H., Zeng C.M. 2012. Inhibition of amyloid fibrillation of lysozyme by phenolic compounds involves quinoprotein formation. *FEBS Letters*, 586(22):3951-5.

12. Gancar M., Kurin E., Bednarikova Z.,

بالای ترانس‌چالکون در مهار تشکیل تجمعات آمیلوئیدی در پروتئین انسولین می باشد. بر اساس نتایج بدست آمده از آزمایش های مختلف پیشنهاد می شود که ترانس‌چالکون از طریق اتصال به حدواسط های پیش فیبریلی و ممانعت از برهمکنش های آبریز بین آنها باعث مهار تشکیل تجمعات آمیلوئیدی می شود. بعبارتی اتصال ترانس‌چالکون به حدواسط های نسبی باز شده گونه های پروتئینی آنها را از مسیر تشکیل فیبریل های آمیلوئیدی منحرف و به سمت تشکیل تجمعات بی شکل سوق می دهد. نتایج حاصل از این مطالعه می تواند در درک بهتر مکانیسم های احتمالی مهار تشکیل تجمعات آمیلوئیدی توسط مولکول های کوچک طبیعی، از جمله پلی فنل ها، موثر باشد و ما را در انتخاب مهارکننده های موثر در رابطه با تاخوردگی ناصحیح و تجمع پپتیدها و پروتئین های مرتبط با بیماری های تحلیل برنده ی سیستم عصبی یاری نماید.

### تشکر و قدردانی

از کلیه کارکنان مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران که در انجام این پروژه تحقیقاتی ما را یاری نمودند، تقدیر و تشکر می نمایم.

### منابع

1. Albert S.G., Obadiah J., Parseghian S.A., Yadira Hurley M., Mooradian A.D. 2007. Severe insulin resistance associated with subcutaneous amyloid deposition. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 75(3):374-376.

2. Arora A., Ha C., Park C.B. 2004. Insulin amyloid fibrillation at above 100°C: New insights into protein folding under extreme temperatures. *Protein Science*, 13(9):2429-236.

3. Bahramikia S., Yazdanparast R., Gheysarzadeh A. 2012. Syntheses and Structure-Activity Relationships of Seven

- mesoscopic organisation, polymorphism, suprastructures, and biological consequences. *Biochimica et Biophysica Acta. Proteins and Proteomics*, 1867(11):140257.
20. Mauro M., Craparo E.F., Podestà A., Bulone D., Carrotta R., Martorana V., Tiana G., San Biagio P.L. 2007. Kinetics of different processes in human insulin amyloid formation. *Journal of Molecular Biology*, 366(1):258-274.
21. Morshedi D., Rezaei-Ghaleh N., Ebrahim-Habibi A., Ahmadian S., Nemat-Gorgani M. 2007. Inhibition of amyloid fibrillation of lysozyme by indole derivatives - Possible mechanism of action. *FEBS Journal*, 274(24):6415-6425.
22. Nguyen H.D., Hall C.K. 2004. Molecular dynamics simulations of spontaneous fibril formation by random-coil peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(46):16180-16185.
23. Nielsen L., Khurana R., Coats A., Frokjaer S., Brange J., Vyas S., Uversky V.N., Fink A.L. 2001. Effect of environmental factors on the kinetics of insulin fibril formation: Elucidation of the molecular mechanism. *Biochemistry*, 40(20):6036-6046.
24. Pérez-Garrido A., Helguera A.M., Morillas Ruiz J.M., Zafrilla Rentero P. 2012. Topological sub-structural molecular design approach: Radical scavenging activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 49:86-94.
25. Porat Y., Abramowitz A., Gazit E., 2006. Inhibition of amyloid fibril formation by polyphenols: Structural similarity and aromatic interactions as a common inhibition mechanism. *Chemical Biology and Drug Design*, 67(1):27-37.
26. Qiu T., Liu Q., Chen Y.X., Zhao Y.F., Li Y.M. 2015. A $\beta$ 42 and A $\beta$ 40: similarities and differences. *Journal of Peptide Sciences*, 21(7):522-529.
- Marek J., Mucaji P., Nagy M., Gazova Z. 2020. Amyloid Aggregation of Insulin: An Interaction Study of Green Tea Constituents. *Scientific Reports*, 10(1):9115.
13. Hecht M.H., Das A., Go A., Bradley L.H., Wei Y. 2004. De novo proteins from designed combinatorial libraries. *Protein Science*, 13(7):1711-23.
14. Hughes E., Burke R.M., Doig A.J. 2000. Inhibition of toxicity in the  $\beta$ -amyloid peptide fragment  $\beta$ -(25-35) using N-methylated derivatives. A general strategy to prevent amyloid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 275(33):25109-25115.
15. Jardim G.A.M., Guimarães T.T., Pinto M., Cavalcanti B., De Farias K.M., Pessoa C., Gatto C., Nair D.K., Namboothiri I., Júnior S., Eufânio N. 2015. Naphthoquinone-based chalcone hybrids and derivatives: Synthesis and potent activity against cancer cell lines. *MedChemComm*, 6(1):120-150.
16. Karuppagounder S.S., Pinto J.T., Xu H., Chen H.L., Beal M.F., Gibson G.E. 2009. Dietary supplementation with resveratrol reduces plaque pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*, 54(2):111-118.
17. Krebs M.R., Wilkins D.K., Chung E.W., Pitkeathly M.C., Chamberlain A.K., Zurdo J., Robinson C.V., Dobson C.M. 2000. Formation and seeding of amyloid fibrils from wild-type hen lysozyme and a peptide fragment from the  $\beta$ -domain. *Journal of Molecular Biology*, 300(3):541-549.
18. Langmuir I., Waugh D.F. 2023. Pressure-soluble and pressure-displaceable components of monolayers of native and denatured proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 62(10):2771-2793.
19. Lutter L., Serpell C.J., Tuite M.F., Xue W.F. 2019. The molecular lifecycle of amyloid- Mechanism of assembly,

33. Walsh D.M., Teplow D.B. 2012 . Alzheimer's disease and the amyloid  $\beta$ -protein. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 107:101-124.
34. Waterhouse S.H., Gerrard J.A. 2004. Amyloid fibrils in bionanotechnology. *Australian Journal of Chemistry*, 57(6):519-523.
35. Waugh D.F. 1946. Fibrous Modification of Insulin. I. The Heat Precipitate of Insulin. *Journal of the American Chemical Society*, 68(2):247-250.
36. Weyer C., Bogardus C., Mott D.M., Pratley R.E. 1999. The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Journal of Clinical Investigation*, 104(6):787-794.
37. Yakupova E.I., Bobyleva L.G., Vikhlyantsev I.M., Bobylev A.G. 2019. Congo Red and amyloids: History and relationship. *Bioscience Reports*, 39(1): 20181415.
38. Yoshihara H., Saito J., Tanabe A., Amada T., Asakura T., Kitagawa K., Asada S. 2016. Characterization of Novel Insulin Fibrils That Show Strong Cytotoxicity under Physiological pH. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105(4):1419-1426.
27. Rabiee A., Ebrahim-Habibi A., Ghasemi A., Nemat-Gorgani M. 2013. How curcumin affords effective protection against amyloid fibrillation in insulin. *Food Function*, 4(10):1474-1480.
28. Rhoades E., Agarwal J., Gafni A. 2000. Aggregation of an amyloidogenic fragment of human islet amyloid polypeptide. *Biochim Biophys Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1476(2):230-238.
29. Rudrapal M., Khan J., Bin Dukhyil A.A., Alarousy R.M.I.I., Attah E.I., Sharma T., Khairnar S.J. 2021. Chalcone scaffolds, bioprecursors of flavonoids: chemistry, bioactivities, and pharmacokinetics. *Molecules*, 26(23):1-23.
30. Selivanova O.M., Galzitskaya O.V. 2012. Structural polymorphism and possible pathways of amyloid fibril formation on the example of insulin protein. *Biochemistry*, 77(11):1237-1247.
31. Syam S., Abdelwahab S.I., Al-Mamary M.A., Mohan S. 2012. Synthesis of chalcones with anticancer activities. *Molecules*, 17(6):6179-6195.
32. Tomita S., Yoshikawa H., Shiraki K. 2011. Arginine Controls Heat-Induced Cluster-Cluster Aggregation of Lysozyme at Around the Isoelectric Point. *Biopolymers*, 95(10):695-701.

## Investigating The Effects of *Trans*-chalcone on Insulin Amyloid Fibrillation

Maria Omid shahsavandi<sup>1</sup>, Parichehra Yaghmaei<sup>1\*</sup>, Shahin Ahmadian<sup>2</sup>, Azadeh Ebrahim Habibi<sup>3</sup>

1- Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Tehran Biochemistry and Biophysics Research Center, University of Tehran, Tehran, Iran

3- Endocrine and Metabolism Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

### Abstract

Amyloid fibrils are string-like aggregates that form due to the disruption of natural structure and misfolding of various types of peptides and proteins. These amyloid aggregates are associated with some neurodegenerative and systemic diseases such as Alzheimer's, Parkinson's, and type 2 diabetes. The aim of this study was to investigate the inhibitory effects of *Trans*-chalcone on insulin fibrillation (as a model protein). In this study, insulin was incubated for 24 hours in the presence and absence of *Trans*-chalcone under amyloid formation conditions. The formed fibrils were analyzed using various techniques including Congo red absorption spectral changes by spectroscopy, electron microscopy images by TEM, and fluorescent staining of amyloid aggregates by fluorescent microscopy. Then, possible interactions between *Trans*-chalcone and insulin were analyzed using molecular docking method by AutoDock software. The results showed a significant reduction in amyloid fibril formation in the additive-containing sample compared to the control sample. This study provides evidence that *Trans*-chalcone has an inhibitory effect on insulin fibrillation and could be a potential therapeutic agent for amyloid-related diseases.

**Keywords:** Amyloid aggregates, *Trans*-chalcone, Insulin, Aromatic compounds, Congo red, Thioflavin S, Docking.