View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by shahrekord university of medical sciences

مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره ۱۶، شماره ۵/ آذر و دی ۱۳۹۳/ ۵۵-۴۴

مقاله پژوهشی

بررسی اثر عصاره اتانولی پروپولیس بر میزان گلایکیشن هموگلوبین انسانی در شرایط آزمایشگاهی

یونس صاحبی[۱]، عادله دیو سالار[۲*]، علی اکبر صبوری[۳]، نجمه پور ساسان[۳]

[۱]دانشجو، گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران؛ [۲]گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران؛
[۳]مرکز تحقیقات بیوشیمی- بیوفیزیک، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۱/۷ تاریخ پذیرش: ۹۳/۷/۳

چکیده:

زمینه و هدف: گلایکه شدن واکنش غیر آنزیمی اتصال قند به پروتئین می باشد که در افراد دیابتی با میزان قند خون بالا، افزایش می یابد. محصولات تولید شده در این واکنش باعث ایجاد و تشدید عوارض دیابت می شوند و نیز در بسیاری از بیماری ها دخیل هستند. پروپولیس (**Propolis**) از گذشته‌های دور به طور گسترده ای در طب سنتی به کار برده می شود و شواهد قابل توجهی وجود دارد که نشان می دهد پروپولیس دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بسیار قوی می‌باشد. این مطالعه با هدف بررسی اثر پروپولیس در کاهش میزان گلایکه شدن هموگلوبین در شرایط آزمایشگاهی انجام شده است.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، هموگلوبین تخلیص شده در حضور و عدم حضور قند گلوکز و عصاره اتانولی پروپولیس با سه غلظت مختلف به مدت ۵ هفته انکوبه گردید. میزان گلایکه شدن هموگلوبین به وسیله سنجش میزان آزاد سازی گروه هِم موجود در هموگلوبین و جابجایی باند سورت، تولید محصولات ناشی از تخریب هِم و بررسی ساختارهای آمیلوئیدی به کمک طیف سنجی مرئی- ماوراء بنفش و فلوئورسانس تعیین شد. همچنین از آسپیرین به عنوان ماده ضدگلایکه‌ی کنترل استفاده شد.

یافته ها: گلایکه شدن هموگلوبین در حضور عصاره پروپولیس با بالاترین غلظت به میزان ۵۰ درصد مهار گردید. دو غلظت کمتر عصاره میزان مهار پایین تری از گلایکه شدن نشان داد. همچنین بررسی های انجام شده در مورد محصولات ناشی از تخریب هِم و ساختار فیبریلار، نشان دهنده کاهش چشمگیر گلایکه شدن هموگلوبین در حضور عصاره پروپولیس می باشد.

نتیجه گیری: هموگلوبین در حضور گلوکز به شدت گلایکه شد و پروپولیس در یک روند وابسته به غلظت از این واکنش جلوگیری کرده و گلایکه شدن هموگلوبین را کاهش داد. احتمالاً پروپولیس به وسیله‌ی خاصیت آنتی اکسیدانی قوی خود گلایکه شدن پروتئین را مهار می نماید و از این‌رو می تواند در کاهش عوارض دیابت موثر باشد.

واژه های کلیدی: گلایکه شدن، هموگلوبین، پروپولیس، گلوکز، دیابت.

مقدمه:

در طی عمر یک پروتئین پایدار، تغییرات پس از ترجمه ای متنوعی مانند دآمیداسیون، اکسیداسیون، فسفریلاسیون، راسمیزاسیون، ایزومیزاسیون و گلایکه شدن (Glycation) برای آن اتفاق می افتد. گلایکه شدن پروتئین‌ها یکی از تغییرات پس از ترجمه‌ای است که به کاتالیز آنزیمی وابسته نبوده و به صورت عمومی در بین پروتئین‌ها اتفاق می افتد. گلایکه شدن آبشار پیچیده ای از تغییرات تراکم (Condensation)، باز آرایی (Rearrangement)، قطعه قطعه شدن (Degradation) و اکسیداسیون است که منجر به تولید محصولات ناهمگن شناخته شده همراه با تغییرات قابل توجه ساختاری در سطوح ساختاری دوم و سوم و متعاقب آن تغییر در ویژگی های عملکردی پروتئین می شود (۱). گلایکه شدن پروتئین‌ها توسط واکنش نوکلئوفیلی بین گروه

*نویسنده مسئول: تهران- دانشگاه خوارزمی- گروه علوم سلولی و مولکولی- تلفن: ۰۲۱-۶۱۱۱۳۳۸۱، E-mail: divsalar@khu.ac.ir

آمین آزاد از یک پروتئین و گروه کربونیل از یک قند احیاءکننده اتفاق می افتد و نتیجه این واکنش تولید بازشیف (Shiff base) می باشد. این واکنش در طی چندین ساعت اتفاق می افتد و به محض تشکیل، بازشیف ناپایدار با باز آرایی به کتوآمین یا همان محصول آمادوری (Amadori product) که پایداری بیشتری دارد تبدیل می شود. تشکیل محصول آمادوری در طی چندین روز و در یک مسیر برگشت ناپذیر صورت می گیرد (۲). عوامل متعددی همچون pH، دما، غلظت پروتئین، غلظت قند، مدت تماس پروتئین و قند و شرایط محیطی پیرامون گروه آمین در میزان گلایکه شدن موثر هستند. در موجود زنده از میان این متغیرها، pH، دما، غلظت پروتئین و شرایط محیطی پیرامون گروه آمین ثابت هستند،؛ ولی غلظت قند و مدت زمان تماس قند و پروتئین متغیرهایی هستند که از لحاظ بالینی اهمیت دارند، زیرا تنها این دو متغیر در موجود زنده تغییر می کنند (۳). پروتئین های گلایکه شده متحمل واکنش های دیگری مانند حلقوی شدن، باز آرایی، تراکم و آبدهی می‌شوند تا در نهایت به محصولات پیچیده تری که دارای اتصالات متقاطع و نشر فلوئورسانس هستند تبدیل شوند. این مشتقات، محصولات نهایی گلایکه شدن (Advanced Glycation End products, AGEs) نامیده می‌شوند (۴). ایجاد اتصالات متقاطع از طریق تشکیل AGE ها، خواص فیزیکو شیمیایی پروتئین‌ها را تغییر و از این طریق عملکرد آن ها را تحت تأثیر قرار می دهد (۵). نقش AGE ها در فرآیند پیری و بسیاری از بیماری ها از جمله رتینوپاتی، کاتاراکت، تصلب شرایین، نفروپاتی، آلزایمر و بیماری های قلبی – عروقی اثبات شده است (۶،۷). محصولات نهایی گلایکه شدن نقش مهمی در ایجاد عوارض دیابت دارند؛ بنابراین تلاش های زیادی در جهت جلوگیری از تشکیل آن ها و همچنین حذف آن ها صورت گرفته است (۵).

دیابت شیرین بیماری متابولیکی است که به دلیل نقص نسبی یا کامل در هورمون انسولین ایجاد و به وسیله ی افزایش سطح گلوکز ناشتای پلاسمای خون تا میزان $۳۰۰ mg/dL^{-1}$ مشخص می شود (۸). از آنجایی که ورود قند به گلبول های قرمز، وابسته به انسولین نمی باشد و پروتئین هموگلوبین به راحتی در مجاورت قند قرار می گیرد، افزایش غلظت قند در بیماران دیابتی می تواند منجر به افزایش گلایکه شدن هموگلوبین گردد. بررسی‌هایی که تاکنون بر روی گلایکه شدن هموگلوبین انجام شده، نشان دهنده‌ی این است که گلایکه شدن اثرات ساختاری و عملکردی بر روی هموگلوبین دارد که ممکن است این تغییرات عامل ایجاد عوارض پاتوفیزیولوژیکی در بیماران دیابتی باشند (۹). همچنین گلایکه شدن باعث کاهش و از بین رفتن پیک جذبی سورت در هموگلوبین می‌شود (۱۰). HbA1c که عمده ترین هموگلوبین گلایکه شده در خون می‌باشد، نسبت به هموگلوبین غیر گلایکه فعالیت استرازی بیشتر و پراکسیدازی کمتری نشان می‌دهد. این تغییر در میزان فعالیت آنزیمی، با افزایش میل به سوبسترا و افزایش سرعت واکنش صورت می گیرد. در مقابل HbA1c تمایل بالاتری نسبت به اکسیژن دارد (۱۱،۱۲).

پروپولیس (Propolis) ترکیب رزینی پیچیده ای از ترشحات گیاهان مختلف است که توسط زنبور عسل از جوانه برگ ها و شکاف های پوست درختان متنوع جمع آوری می شود. زنبورها پروپولیس اولیه را با موم و بتاگلوکوسیداز که در طی جمع آوری ترشح می کنند، مخلوط می کنند (۱۳). پروپولیس از گذشته های دور به طور گسترده ای در طب سنتی به‌کار برده می شود و شواهد قابل توجهی وجود دارد که نشان می دهد پروپولیس دارای خواص ضد عفونی کننده، ضد باکتریایی، ضد ویروسی، ضد التهاب، ضد سرطان و ضد اکسیدانی است. با وجود تفاوت های ممکن در ترکیب، اکثر نمونه های پروپولیس شباهت قابل توجهی در ماهیت شیمیایی دارند. بیش از ۱۶۰ جزء در نمونه های مختلف پروپولیس شناسایی شده است. به طور کلی ترکیب پروپولیس مستقیماً متناسب با نوع ترشحات جوانه ای است که توسط زنبور عسل از درختان متنوع جمع آوری می شود (۱۴). پروپولیس خام متشکل از ۵۰٪ رزین

(ترکیبی از فلاونوییدها و فنولیک اسیدهای مربوط، آروماتیک اسیدها و استرهای مربوطه، آلدئیدها و کتون ها که به عنوان بخش پلی فنولی در نظر گرفته می شود)، ۳۰٪ موم، ۱۰٪ روغن های ضروری، ۵٪ گرده و ۵٪ ترکیبات آلی دیگر (ترپن ها، استروئیدها، آمینواسیدها، پلی ساکاریدها، هیدروکربن ها، الکل، هیدروکسی بنزن و آب) است (۱۵). پروپولیس را نمی توان به صورت خام استفاده کرد و باید به وسیله عصاره گیری با حلال ها خالص شود. این فرآیند باید بتواند مواد خنثی را حذف و قسمت پلی فنولیک را حفظ نماید. یک عصاره گیری چند مرحله ای با اتانول برای به دست آوردن عصاره پروپولیس فاقد موم غنی از اجزای پلی فنولی مناسب است. در واقع این اجزا برای کمک بیشتر به اثرات درمانی مشاهده شده در نظر گرفته می شوند (۱۶). پیشنهاد شده است که وجود مقادیر زیادی از فلاونوئیدها، اسیدهای آروماتیک و ترکیبات فنلی مسئول اکثر فعالیت های زیستی و دارویی پروپولیس است. همچنین مطالعات نشان داده است که پروپولیس برای انسان و پستانداران سمی نیست؛ مگر آنکه در مقادیر بسیار زیاد مصرف شود (۱۷). با توجه به این که گلایکه شدن پروتئین ها در بیماران دیابتی که سطح قند خون در آن ها بالا است، افزایش یافته و با تغییر ساختار و فعالیت پروتئین های ساختمانی و عملکردی آن ها و تولید محصولات مختلف که می توانند استرس اکسیداتیو القا نمایند، باعث ایجاد و تشدید عوارض قلبی- عروقی و بیماری های بسیاری مانند رتینوپاتی، نفروپاتی، نوروپاتی در این بیماران می‌گردد (۱۸). از این رو کاهش و مهار این واکنش می‌تواند نقش مهمی در پیشگیری و کاهش عوارض دیابت داشته باشد. هدف از انجام این تحقیق، بررسی اثر مهار کنندگی عصاره پروپولیس که دارای خواص درمانی بسیار قوی است، بر میزان گلایکه شدن و تخریب هموگلوبین در شرایط آزمایشگاهی بود. نتایج مطالعه قبلی نشان داده است که آسپیرین می تواند گلایکه شدن هموگلوبین را مهار نماید (۱۹). به همین دلیل در این مطالعه از آسپیرین به عنوان کنترل استفاده و فعالیت عصاره پروپولیس در مقایسه با آن تفسیر گردید.

روش بررسی:

در این مطالعه تجربی، سدیم سیترات، NaCl، نمک های فسفاته، سولفات آمونیوم و گلوکز خریداری شده از شرکت مرک آلمان، الکل اتانول خریداری شده از شرکت سهامی خاص ایران، آسپیرین و تیوفلاوین خریداری شده از شرکت سیگمای آمریکا استفاده گردید. همچنین پروپولیس جمع آوری شده از مناطق اطراف جنوب تهران در خرداد ۱۳۹۱ در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت.

برای تهیه پروتئین هموگلوبین خالص، از افراد سالم و غیر سیگاری خون گیری شده و با استفاده از پروتوکل Austen Riggs به صورت زیر تخلیص گردید (۲۰). برای جلوگیری از انعقاد خون، محلول سدیم سیترات ۴ درصد به نسبت حجمی ۹ به ۱ به نمونه خون اضافه گردید. با استفاده از دستگاه سانتریفوژ (مدل Hitachi سری RX_2) با دور ۳۰۰۰، سرم از نمونه خون جدا شده و رسوب به دست آمده جهت شستشو با محلول سالین نه درصد به مدت ۱۵ دقیقه با دور۱۰۰۰۰ و پس از آن مجدداً با بافر فسفات ۰/۲ مولار به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۵۰۰۰ سانتریفوژ گردید. سپس جهت لیز شدن گلبول قرمز و رها شدن هموگلوبین، آب دو بار تقطیر و سرد اضافه و با دور ۱۸۰۰۰، ده دقیقه سانتریفوژ شده و پس از آن جهت رسوب پروتئین های اضافی، سولفات آمونیوم ۲۰ درصد اضافه شد. این محلول به مدت یک ساعت با دور ۱۴۰۰۰سانتریفوژ و در نهایت محلول رویی حاوی هموگلوبین به کیسه دیالیز منتقل و دیالیز علیه بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار در pH ۷/۴ و دمای ۴°C به مدت ۴۸ ساعت انجام گردید. محلول نهایی حاوی هموگلوبین خالص بوده که به وسیله ی روش

بردفورد (۲۱) که روش بسیار حساس و دقیق پروتئین سنجی است، تعیین غلظت شد (نتایج نشان داده نشده است).

به منظور عصاره گیری پروپولیس، وزن مشخصی از آن در الکل اتانول ۸۵ درصد به نسبت ۱۰ درصد وزنی/ وزنی حل شده و به مدت ۴۸ ساعت و در دمای ۳۷°C درجه سانتیگراد در شیکر انکوباتور (مدل IKA KS 4000i) با دور ۱۵۰rpm قرار داده شد. سپس محلول حاصل با کاغذ واتمن شماره ۴ برای جداسازی قطعات درشت صاف گردید و مواد باقیمانده مجدداً به صورت بالا عصاره گیری و صاف شد. محلول صاف شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴°C نگه داری شده و سپس به منظور جداسازی موم با کاغذ واتمن شماره یک صاف گردید (۲۲). محلول حاصل به وسیله دستگاه روتاری (Rotary evaporator) تبخیر شده و سپس غلظت های مختلف عصاره تهیه گردید.

نمونه های مختلف پروتئین هموگلوبین با غلظت ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر در حضور قند گلوکز با غلظت ۴۰ میلی مولار (مشابه با حالت دیابتی) در حضور و عدم حضور پروپولیس با سه غلظت مختلف ۱۰،۲۰ و ۴۰ میکروگرم در میلی لیتر (۱۴) و نیز به تنهایی به عنوان شاهد در بافر سدیم فسفات ۰/۴ میلی مولار انکوبه گردیدند. علاوه بر این، به گروهی از نمونه ها به جای پروپولیس، آسپیرین با غلظت ۲/۵ میلی مولار به عنوان ماده شناخته شده ضد گلایکه افزوده شد. نمونه ها به گروه های زیر تقسیم شده اند: گروه ۱ شامل پروتئین هموگلوبین به عنوان شاهد، گروه ۲ شامل هموگلوبین و قند گلوکز، گروه ۳ شامل هموگلوبین، گلوکز و عصاره پروپولیس با غلظت ۱۰µg/ml، گروه ۴ شامل هموگلوبین، گلوکز و عصاره پروپولیس با غلظت ۲۰µg/ml، گروه ۵ شامل هموگلوبین، گلوکز و عصاره پروپولیس با غلظت ۴۰µg/ml و گروه ۶ شامل هموگلوبین، قند و آسپیرین به عنوان کنترل. تمامی نمونه ها در دستگاه شیکر انکوباتور در دمای ۳۷°C و سرعت ۴۰rpm به مدت ۵ هفته انکوبه شده و در انتهای هر هفته (هفته ۰ تا ۵)، نمونه برداری انجام گردید. نمونه های برداشت شده تا زمان مطالعه در فریزر ۷۰°C- نگهداری شدند (۲۳).

مطالعات طیف سنجی مرئی- فرابنفش جهت بررسی میزان آزاد سازی هِم و جابجایی باند سورت و میزان تأثیر پروپولیس در گلایکه شدن هموگلوبین انکوبه شده در حضور گلوکز در طی زمان های مختلف انکوباسیون انجام شد. بدین منظور میزان جذب نمونه ها در طول موج های ۳۵۰ تا ۴۵۰ با فواصل یک نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروسکوپی (مدل شیمادزو) قرائت و طیف آن ها رسم گردید (۱۰).

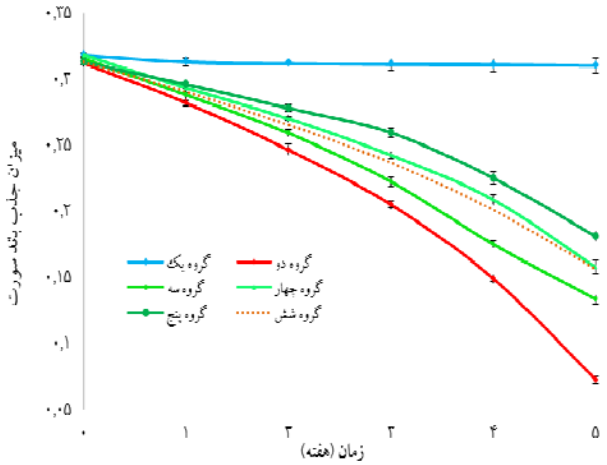
با استفاده از مطالعات فلوئورسانس میزان تولید محصولاتی که از تجزیه هِم در نتیجه گلایکه شدن هموگلوبین تشکیل می شوند و دارای نشر فلوئورسانس هستند، سنجیده شد. این محصولات می توانند به عنوان معیاری جهت تعیین میزان گلایکه شدن هموگلوبین در نظر گرفته شوند. نمونه های مختلف با استفاده از دستگاه فلوئورسانس (مدل کری) در طول موج ۴۶۰ نانومتر برانگیخته شده و میزان نشر آن ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر ثبت گردید (۲۴).

همچنین جهت تعیین وضعیت ساختار هموگلوبین گلایکه شده از تست تیوفلاوین تی (Thioflavin T) استفاده شد. تیوفلاوین تی یک رنگ شناساگر است که به فیبرهای آمیلوئیدی حاصل از تغییرات ساختاری هموگلوبین متصل می شود و با این اتصال دارای خاصیت نشر فلوئورسانس می گردد. شدت فلوئورسانس حاصل معیاری از میزان گلایکه شدن است. بدین منظور، نمونه های مختلف با تیوفلاوین تی به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شده و سپس میزان نشر فلوئورسانس آن

ها در طول موج ۴۹۰ نانومتر پس از تهییج در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه گیری شد (۲۵). تمامی آزمایشات به صورت سه بار تکرار انجام گردید. داده های به دست آمده با استفاده از نرم افزار Instat 3 و آزمون های آماری آنالیز واریانس یک طرفه و تست توکی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته ها:

تغییرات در باند سورت که مربوط به گروه هِم موجود در هموگلوبین است در هفته های مختلف انکوباسیون نشان می دهد، میزان جذب در نمونه هموگلوبینی که فقط با گلوکز انکوبه شده است (گروه ۲). با گذشت زمان به‌شدت کاهش یافته و در هفته پنجم به پایین ترین میزان رسیده است؛ اما در نمونه هایی که دارای عصاره الکلی پروپولیس بوده اند (گروه های ۳، ۴ و ۵)، از این کاهش جلوگیری شده است. این روند در غلظت های مختلف عصاره الکلی پروپولیس متفاوت بوده و با افزایش غلظت، میزان جذب افزایش می یابد و یک روند وابسته غلظت را نشان می دهد. همچنین آسپیرین که اثر ضد گلایکه بودن آن در مطالعات قبلی اثبات شده است؛ از کاهش میزان جذب جلوگیری کرده بود. این فعالیت تقریباً برابر با فعالیت عصاره پروپولیس با غلظت ۲۰µg/ml بوده و غلظت بالاتر عصاره ی پروپولیس قدرت بیشتری در جلوگیری از کاهش جذب نسبت به آسپیرین نشان داده است. در حالی که غلظت ۱۰µg/ml قدرت کمتری نسبت به آسپیرین در جلوگیری از کاهش جذب داشته است (نمودار شماره ۱).



نمودار شماره ۱: مقایسه میزان کاهش جذب ناحیه باند سورت در اثر گلایکه شدن هموگلوبین در نمونه های مختلف

گروه ۱ حاوی پروتئین هموگلوبین، گروه ۲ حاوی هموگلوبین و قند گلوکز، گروه ۳، ٤ و ۵ حاوی هموگلوبین، گلوکز و عصاره پروپولیس به ترتیب با غلظت های ۱۰، ۲۰ و ٤۰ ماکروگرم در میلی لیتر و گروه ٦ حاوی هموگلوبین، قند و آسپیرین. نتایج میانگین سه بار تکرار ± انحراف معیار است.

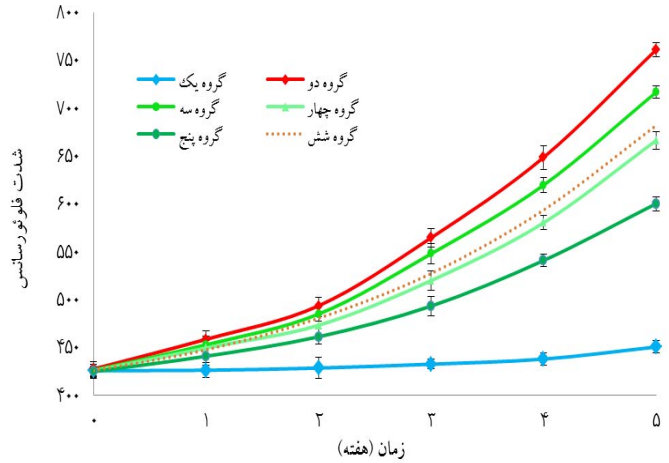
همچنین با گلایکه شدن هموگلوبین، روند جابجایی در طول موج جذبی در ناحیه باند سورت دیده شد. این جابجایی از ۴۱۴ نانومتر در نمونه هموگلوبین شاهد (گروه ۱) به ۴۰۸ نانومتر در نمونه حاوی گلوکز بوده است. در حالی که در نمونه های حاوی عصاره پروپولیس تغییر در طول موج ماکزیمم کمتر بوده است و متناسب با غلظت عصاره از جابجایی آن جلوگیری شده بود، به صورتی که این طول موج برای غلظت اول و دوم به ۴۰۹ نانومتر و برای غلظت سوم به ۴۱۱ نانومتر افزایش یافته بود (جدول شماره ۱).

جدول شماره۱: مقایسه طول موج جذبی و تغییر آن در نمونه های هموگلوبین در شرایط انکوباسیون مختلف

زمان (هفته)	گروه های مختلف					
	گروه ۱	گروه ۲	گروه ۳	گروه ٤	گروه ٥	گروه ٦
هفته صفر	٤١٤	٤١٤	٤١٤	٤١٤	٤١٤	٤١٤
هفته اول	٤١٤	٤١٣	٤١٤	٤١٤	٤١٤	٤١٤
هفته دوم	٤١٤	٤١٢	٤١٣	٤١٣	٤١٣	٤١٣
هفته سوم	٤١٤	٤١١	٤١٢	٤١٢	٤١٣	٤١٢
هفته چهارم	٤١٤	٤١٠	٤١١	٤١١	٤١٢	٤١١
هفته پنجم	٤١٤	٤٠٨	٤٠٩	٤٠٩	٤١١	٤٠٩

گروه ۱ حاوی پروتئین هموگلوبین، گروه ۲ حاوی هموگلوبین و قند گلوکز، گروه ۳، ٤ و ٥ حاوی هموگلوبین، گلوکز و عصاره پروپولیس به ترتیب با غلظت های ۱۰،۲۰ و ٤٠ ماکروگرم در میلی لیتر و گروه ٦ حاوی هموگلوبین، قند و آسپیرین.

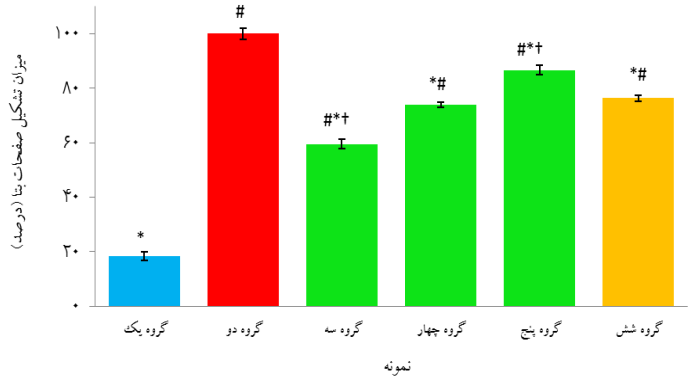
نتایج مطالعات فلوئورسانس جهت بررسی میزان تولید محصولات فلورسنت حاصل از تجزیه هِم در نتیجه گلایکه شدن هموگلوبین نشان داد، شدت نشر نمونه شاهد در طی انکوباسیون تغییر محسوسی نداشته و میزان آن در انتهای هفته پنجم ۴۵۰ واحد اختیاری (arbitrary unit) بوده است، در حالی‌که در نمونه های حاوی گلوکز (گروه ۲) با گذشت هر هفته شدت نشر افزایش یافته و در انتهای هفته پنجم به میزان ۷۶۱ رسیده است؛ اما در نمونه های حاوی عصاره و در نمونه حاوی آسپیرین این روند افزایش مهار گردیده است. به طوری که شدت نشر در انتهای هفته پنجم برای نمونه های حاوی عصاره با غلظت های اول تا سوم به ترتیب ۷۱۶ و ۶۶۶ و ۶۰۰ بوده است. این میزان برای نمونه حاوی آسپیرین ۶۸۲ می باشد که نزدیک به شدت نشر نمونه حاوی عصاره با غلظت دوم (گروه ۴) است. شدت نشر در نمونه حاوی عصاره با غلظت اول بیشتر از آسپیرین بوده و در نمونه حاوی عصاره با غلظت سوم شدت نشر کمتر می باشد (نمودار شماره ۲).



نمودار شماره ۲: مقایسه میزان تولید محصولات ناشی از تخریب هِم در نمونه های هموگلوبین در شرایط مختلف انکوباسیون

گروه ۱ حاوی پروتئین هموگلوبین، گروه ۲ حاوی هموگلوبین و قند گلوکز، گروه ۳، ٤ و ٥ حاوی هموگلوبین، گلوکز و عصاره پروپولیس به ترتیب با غلظت های ۱۰، ۲۰ و ٤٠ ماکروگرم در میلی لیتر و گروه ٦ حاوی هموگلوبین، قند و آسپیرین. نتایج میانگین سه بار تکرار ± انحراف معیار است.

نتایج تست تیوفلاوین نمونه ها در هفته پنجم به صورت درصد تشکیل ساختارهای آمیلوئیدی نشان می دهد، میزان ساختارهای بتا برای نمونه شاهد ۱/۷±۱۸/۳ درصد می باشد؛ در حالی که این میزان در نمونه حاوی گلوکز (گروه ۲) به ۲/۱±۱۰۰ درصد رسیده است که نشان دهنده افزایش تبدیل ساختارهای آلفا به ساختارهای رشته ای در نتیجه گلایکه شدن می باشد. از سوی دیگر، در نمونه های حاوی عصاره پروپولیس شدت نشر به طور معنی داری کاهش یافته است (P<۰/۰۵) و میزان ساختارهای بتا برای این نمونه ها به ۱/۷۰±۸۶/۷ (گروه ۵)، ۱±۷۴ (گروه ۴) و ۱/۷±۵۹/۴۵ (گروه ۶) درصد کاهش یافته است که نشان می دهد روند افزایش نشر مهار شده است؛ به صورتی که با افزایش غلظت عصاره میزان مهار نیز افزایش یافته است. در غلظت سوم عصاره پروپولیس بیشترین میزان مهار مشاهده می شود که در آن شدت نشر تا ۵۰ درصد نسبت به نمونه حاوی گلوکز کاهش یافته است. همچنین در نمونه کنترل حاوی آسپیرین میزان ساختارهای بتا به۱/۲±۷۶/۳ درصد کاهش یافته است (نمودار شماره ۳).



نمودار شماره ۳: میزان تشکیل صفحات بتا در شرایط انکوباسیون مختلف در هفته پنجم

*گروه ۱ حاوی پروتئین هموگلوبین، گروه ۲ حاوی هموگلوبین و قند گلوکز، گروه ۳، ٤ و ٥ حاوی هموگلوبین، گلوکز و عصاره پروپولیس به ترتیب با غلظت های ۱۰، ۲۰ و ٤۰ ماکروگرم در میلی لیتر و گروه ٦ حاوی هموگلوبین، قند وآسپیرین. نتایج میانگین سه بار تکرار ± انحراف معیار است. # تفاوت معنی دار با گروه ۱ (P<۰/۰۵)، * تفاوت معنی دار با گروه ۲ (P<۰/۰۵)، † تفاوت معنی دار با گروه ٦ (P<۰/۰۵).*

بحث:

ترکیب عصاره اتانولی پروپولیس در مطالعات قبلی شناسایی شده و نشان داده شده است که این عصاره حاوی مقادیر بالایی از فلاونوئیدها می باشد. این عصاره دارای اثرات متفاوتی از جمله اثرات ضد سرطانی، ضد التهابی، ضد باکتریایی، ضد ویروسی، ضد قارچی و ضد اکسیدانی می باشد که در مطالعات مختلف اثبات شده اند. این مطالعات نشان داده اند که این اثرات مربوط به بخش پلی فنلی این عصاره می باشد (۲۶،۲۷). همچنین در مطالعات مختلف که بر روی اثر مواد مختلف بر روی گلایکه شدن پروتئین ها انجام شده است؛ اثر ضد گلایکه بودن این مواد را مرتبط با خاصیت آنتی اکسیدانی آن ها می دانند (۴). اثر آنتی اکسیدانی قوی عصاره پروپولیس تهیه شده از مناطق مختلف که ممکن است دارای ترکیبات متفاوتی نیز باشند؛ در مطالعات مختلف نشان داده شده است. در این مطالعات بخش فلاونوییدی که به میزان بالایی در عصاره وجود دارد، مسئول ایجاد اثر آنتی اکسیدانی شناخته شده است (۲۸). Fuliang و همکارانش اثبات

نموده اند که عصاره پروپولیس در موش های دیابتی باعث کاهش قند خون شده و همچنین باعث سرکوب عوامل اکسیدان و نیز کاهش استرس اکسیداتیو می گردد. آن ها نشان داده اند که سطح فروکتوزآمین در موش های دیابتی تیمار شده با عصاره پروپولیس کاهش می یابد (۲۹). از آن جایی که این ماده اولین محصول در واکنش گلایکه شدن می باشد، می توان نتیجه گرفت که این عصاره می تواند باعث مهار این واکنش نیز گردد. Leandro و همکارانش نشان داده اند که پروپولیس از شکنندگی گلبول های قرمز جلوگیری می نماید. آن ها این اثر را مربوط به فعالیت آنتی اکسیدانی پروپولیس می دانند. همچنین مطالعه ای دیگر که به صورت بالینی انجام شده است تأییدکننده ی اثر پایدارکنندگی پروپولیس بر گلبول های قرمز می باشد. در این مطالعه نشان داده شده است که میزان اثر بخشی پروپولیس وابسته به زمان است و دوره های تیمار بلند مدت، اثرات پایدارتری دارد (۳۰).

گلایکه شدن باعث ایجاد تغییرات فعالیتی و ساختاری در هموگلوبین می شود. از جمله این تغییرات ساختاری، کاهش محتوای آلفا هلیکس و تضعیف اتصال بین هِم و پروتئین می باشد (۳۱). هِم در حالت اتصال محکم به گلوبین دارای جذب نوری در باند سورت است؛ اما با تضعیف این اتصال، میزان جذب کاهش یافته و همچنین با جابجایی هِم در ساختار پروتئین، ممکن است این باند به سمت طول موج های کوتاه تر تغییر نماید (۱۰). پیشرفت گلایکه شدن ممکن است باعث آزاد شدن هِم و تولید محصولات هِمی دارای نشر فلوئورسانس گردد. از این تغییرات ساختاری می توان جهت سنجش میزان گلایکه شدن به صورت کیفی استفاده نمود. در این مطالعه با استفاده از سنجش این تغییرات ساختاری، میزان گلایکه شدن هموگلوبین در حضور و عدم حضور عصاره اتانولی پروپولیس بررسی شد. نتایج به دست آمده حاکی از آن است که این ماده قادر به مهار گلایکه شدن هموگلوبین می باشد و در حضور غلظت های مختلف عصاره میزان مهار متفاوت بوده و با افزایش غلظت میزان مهار نیز افزایش یافته است.

Bose و همکاران نشان دادند که گلایکیشن هموگلوبین باعث افزایش رها سازی هِم و افزایش آهن آزاد می‌شود که می‌تواند باعث افزایش استرس اکسیداتیو ناشی از آهن گردد (۳۲). نتایج به دست آمده از مطالعات اسپکتروسکوپی نشان داد که عصاره پروپولیس قادر به مهار آزاد سازی هِم از پروتئین است و میزان مهار با افزایش غلظت افزایش یافته و در بالاترین غلظت، میزان مهار حدود ۵۰ درصد نسبت به گروه شاهد بود. علاوه بر این، نتایج نشان داد که حضور عصاره پروپولیس از جابجایی باند سورت در هموگلوبین طبیعی (۴۱۴) به سمت طول موج های کوتاه تر (۴۰۸) در هموگلوبین گلایکه جلوگیری می کند. از آنجایی که گلایکه شدن باعث جابجایی گروه هِم در هموگلوبین و همچنین کاهش جذب و جابجایی پیک جذبی به سمت طول موج‌های کوتاه‌تر می‌گردد (۱۰)، بنابراین احتمالاً پروپولیس با تداخل در واکنش گلایکیشن و کاهش گلایکه شدن هموگلوبین از ایجاد تغییرات ساختاری و در نتیجه جابجایی هِم جلوگیری نموده است. کاهش جابجایی در طول موج جذبی نیز به علت پیشگیری از جابجایی هِم در این پروتئین است. با افزایش در شدت جذب در نمونه‌های حاوی پروپولیس، از جابجایی طول موج جذبی نیز جلوگیری شده است که نشان دهنده پایدار شدن گروه هِم در هموگلوبین است که ناشی از کاهش گلایکه شدن و جلوگیری از تغییرات ساختاری در این پروتئین است. در مطالعات تولید محصولات هِمی در این پژوهش، حضور عصاره‌ی پروپولیس باعث کاهش تولید این محصولات گردید و در غلظت سوم میزان تولید این محصولات تا ۵۰ درصد کاهش یافت. محصولات هِمی از هِم آزاد شده از هموگلوبین به واسطه‌ی گلایکه شدن این پروتئین ایجاد می‌گردند. کاهش شدت فلوئورسانس محصولات هِمی نشان دهنده کاهش گلایکه شدن هموگلوبین، تغییرات ساختاری آن و رهاسازی هِم

هموگلوبین است. با افزایش غلظت پروپولیس قدرت آن در کاهش و جلوگیری از پیشرفت واکنش گلایکیشن افزایش یافته و به همین میزان از رها سازی و در نتیجه تولید محصولات هِمی جلوگیری می کند.

تیوفلاوین تی یک رنگ شناساگر است که به فیبرهای آمیلوئیدی متصل می شود و با این اتصال دارای خاصیت نشر فلوئورسانس می گردد. در مطالعه Bakhti و همکاران (۲۰۰۷) نشان داده شده است که گلایکه شدن تغییرات ساختاری در هموگلوبین ایجاد می کند و باعث کاهش ساختارهای آلفا هلیکس و افزایش میزان ساختارهای رشته ای می شود (۳۱). بنابراین با افزایش میزان گلایکه شدن، این تغییرات افزایش یافته و میزان بیشتری از ساختارهای آلفا به ساختارهای بتا تبدیل می شوند. همچنین در مطالعه Roy و همکاران (۲۰۱۰) نشان داده شد که گلایکیشن باعث افزایش هیدرو فوبیسیته در میوگلوبین و در نتیجه کاهش محتوای آلفا و افزایش ساختارهای بتا می گردد. در صورت جلوگیری از گلایکه شدن، میزان این تغییرات و تبدیل ساختارها نیز کاهش می یابد (۳۳). نتایج بررسی های ساختاری هموگلوبین در این مطالعه نشان دهنده کاهش تبدیل ساختارهای آلفا به ساختارهای آمیلوئیدی بتا در حضور عصاره پروپولیس است. در حضور پروپولیس میزان گلایکه شدن هموگلوبین کاهش یافته و از پیشرفت این واکنش جلوگیری می کند. در نتیجه با حفاظت از هموگلوبین در برابر گلایکه شدن، تغییرات ساختاری مهار شده و ساختارهای آلفای هموگلوبین حفظ می گردد و از تبدیل شدن ساختارهای آلفا به ساختارهای بتا جلوگیری شده است. افزایش غلظت پروپولیس موجب افزایش قدرت حفاظت در برابر گلایکه شدن می گردد و در نتیجه ایجاد ساختارهای بتا نیز کاهش می یابد.

در مجموع این نتایج نشان داد که عصاره الکلی پروپولیس در غلظت‌های مختلف قادر به کاهش فرایند گلایکه‌شدن هموگلوبین می‌باشد. تفاوت‌های دیده شده در میزان مهار در موارد مختلف که در این مطالعه سنجیده شده‌اند، ناشی از تفاوت در معیار سنجش در بخش‌های مختلف است که تفاوت در نتایج حاصل اجتناب ناپذیر است. همچنین در این مطالعه مشاهده شد که میزان گلایکه شدن هموگلوبین با گذشت زمان افزایش می یابد که این نتایج نشان دهنده و تأییدکننده این امر است که گلایکه شدن فرآیندی وابسته به زمان است و با گذشت زمان شدت می یابد. این امر می تواند ناشی از کنترل مثبت فرآیند گلایکه شدن باشد، به صورتی که محصولات تولید شده در این فرآیند خود باعث استرس اکسیداتیو گشته که منجر به تشدید گلایکه شدن می شوند (۳۴).

با توجه به این مطلب که استرس اکسیداتیو ایجاد شده توسط محصولات تولیدی ناشی از گلایکه شدن پروتئین ها، باعث تشدید این روند می شوند، کاهش عوامل اکسیداتیو می تواند منجر به کاهش گلایکه شدن پروتئین ها گردد. بنابراین عصاره پروپولیس که غنی از عوامل آنتی اکسیدان قوی است، احتمالاً با این مکانیسم از گلایکه شدن هموگلوبین جلوگیری می نماید. از طرف دیگر با گذشت زمان و تشدید میزان گلایکه شدن، میزان فعالیت عصاره پروپولیس نیز افزایش یافته و این روند را مهار می کند که نشان دهنده این مطلب است که عصاره پروپولیس با مکانیسمی وابسته به غلظت و زمان، فعالیت مهاری خود را القا می کند.

نتیجه گیری:

از نتایج حاصل از این مطالعه اثبات می شود که عصاره اتانولی پروپولیس می تواند گلایکه شدن هموگلوبین را در شرایط آزمایشگاهی مهار نماید. از آنجایی که محصولات AGE، خود می توانند باعث

تشدید این فرآیند شوند و همچنین در ایجاد استرس اکسیداتیو دخیل هستند، مهار این واکنش به ویژه در بیماران دیابتی، اهمیت بالایی دارد. بنابراین پروپولیس، می تواند به عنوان یک ماده ضدگلایکه شناخته شده و در صورت موفقیت در آزمایشات بالینی در طراحی دارو برای پیشگیری و کاهش عوارض دیابت استفاده گردد.

تشکر و قدردانی:

این مطالعه با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه خوارزمی و صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (INSF) انجام شده است.

منابع:

1. Suji G, Sivakami S. Glucose, glycation and aging. Biogerontology. 2004; 5(6): 365-73.
2. Meerwaldt R, Links T, Zeebregts C, Tio R, Hillebrands JL, Smit A. The clinical relevance of assessing advanced glycation endproducts accumulation in diabetes. Cardiovasc Diabetol. 2008; 7: 29.
3. Gil H, Vasquez B, Peña M, Uzcategui J. Effect of buffer carbonate and arsenate on the kinetics of glycation of human hemoglobin. J phys org chem. 2004; 17(6-7): 537-40.
4. Tsuji-Naito K, Saeki H, Hamano M. Inhibitory effects of Chrysanthemum species extracts on formation of advanced glycation end products. Food Chem. 2009; 116(4):854-59.
5. Glenn JV, Stitt AW. The role of advanced glycation end products in retinal ageing and disease. Biochim Biophys Acta. 2009 Oct; 1790 (10): 1109-16.
6. Daroux M, Prevost G, Maillard-Lefebvre H, Gaxatte C, D'Agati VD, Schmidt AM, et al. Advanced glycation end-products: implications for diabetic and non-diabetic nephropathies. Diabetes Metab. 2010 Feb; 36(1): 1-10.
7. Simm A. Protein glycation during aging and in cardiovascular disease. J Proteomics. 2013 Oct 30; 92: 248-59.
8. Montane J, Cadavez L, Novials A. Stress and the inflammatory process: a major cause of pancreatic cell death in type 2 diabetes. Diabetes Metab Syndr Obes. 2014; 7: 25-34.
9. Roy M, Sen S, Chakraborti AS. Action of pelargonidin on hyperglycemia and oxidative damage in diabetic rats: implication for glycation-induced hemoglobin modification. Life Sci. 2008 May 23; 82 (21-22): 1102-10.
10. Cussimanio BL, Booth AA, Todd P, Hudson BG, Khalifah RG. Unusual susceptibility of heme proteins to damage by glucose during non-enzymatic glycation. Biophys Chem. 2003 Sep; 105 (2-3): 743-55.
11. orti AS. Effect of nonenzymatic glycation on functional and structural properties of hemoglobin. Biophys Chem. 2005 Mar 1; 113 (3): 289-98.
12. Sen S, Bose T, Roy A, Chakraborti AS. Effect of non-enzymatic glycation on esterase activities of hemoglobin and myoglobin. ol Cell Biochem. 2007 Jul; 301 (1-2): 251-7.
13. Jasprica I, Mornar A, Debeljak Z, Smolcic-Bubalo A, Medic-Saric M, Mayer L, et al. In vivo study of propolis supplementation effects on antioxidative status and red blood cells. J Ethnopharmacol. 2007 Apr 4; 110 (3): 548-54.
14. Valente MJ, Baltazar AF, Henrique R, Estevinho L, Carvalho M. Biological activities of Portuguese propolis: protection against free radical-induced erythrocyte damage and inhibition of human renal cancer cell growth in vitro. Food Chem Toxicol. 2011 Jan; 49 (1): 86-92.
15. Beyraghdar Kashkooli O, Ebrahimi Dorcheh E, Mahboobi-Soofiani N, Samie A. Long-term effects of propolis on serum biochemical parameters of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Ecotoxicol Environ Saf. 2011 Mar; 74(3): 315-8.
16. Abo-Salem OM, El-Edel RH, Harisa GE, El-Halawany N, Ghonaim MM. Experimental diabetic nephropathy can be prevented by propolis: Effect on metabolic disturbances and renal oxidative parameters. Pak J Pharm Sci. 2009 Apr; 22 (2): 205-10.
17. Mohammadzadeh S, Shariatpanahi M, Hamedi M, Ahmadkhaniha R, Samadi N, Ostad SN. Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian propolis. Food Chem. 2007; 103(4):1097-1103.

18. Chondrogianni N, Petropoulos I, Grimm S, Georgila K, Catalgol B, Friguet B, et al. Protein damage, repair and proteolysis. Mol Aspects Med. 2014 Feb; 35: 1-71.
19. Divsalar A, Behroozi J, Saboury AA, Poursasan N. Preservative effects of Aspirin on human hemoglobin glycation in diabetic condition. Armaghane-danesh. 2013; 18(6): *453-61*.
20. Riggs A. Preparation of blood hemoglobins of vertebrates. Methods Enzymol. 1981; 76: 5-29.
21. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976 May 7; 72: 248-54.
22. Lu LC, Chen YW, Chou CC. Antibacterial activity of propolis against Staphylococcus aureus. Int J Food Microbiol. 2005 Jul 15; 102 (2): 213-20.
23. Yue DK, McLennan S, Handelsman DJ, Delbridge L, Reeve T, Turtle JR. The effect of salicylates on nonenzymatic glycosylation and thermal stability of collagen in diabetic rats. Diabetes. 1984 Aug; 33 (8): 745-51.
24. Nagababu E, Rifkind JM. Formation of fluorescent heme degradation products during the oxidation of hemoglobin by hydrogen peroxide. Biochem Biophys Res Commun. 1998 Jun 29; 247 (3): 592-6.
25. Schmitt A, Schmitt J, Munch G, Gasic-Milencovic J. Characterization of advanced glycation end products for biochemical studies: side chain modifications and fluorescence characteristics. Anal Biochem. 2005 Mar 15; 338 (2): 201-15.
26. Sforcin JM, Bankova V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? J Ethnopharmacol. 2011 Jan 27; 133 (2): 253-60.
27. Falcão SI, Tomás A, Vale N, Gomes P, Freire C, Vilas-Boas M. Phenolic quantification and botanical origin of Portuguese propolis. Ind Crop Prod. 2013; 49: 805-12.
28. Potkonjak NI, Veselinovic DS, Novakovic MM, Gorjanovic SZ, Pezo LL, Suznjevic DZ. Antioxidant activity of propolis extracts from Serbia: a polarographic approach. Food Chem Toxicol. 2012 Oct; 50 (10): 3614-8.
29. Fuliang HU, Hepburn HR, Xuan H, Chen M, Daya S, Radloff SE. Effects of propolis on blood glucose, blood lipid and free radicals in rats with diabetes mellitus. Pharmacol Res. 2005 Feb; 51 (2): 147-52.
30. Moreira LL, Dias T, Dias LG, Rogao M, Da Silva JP, Estevinho LM. Propolis influence on erythrocyte membrane disorder (hereditary spherocytosis): a first approach. Food Chem Toxicol. 2011 Feb; 49 (2): 520-6.
31. Bakhti M, Habibi-Rezaei M, Moosavi-Movahedi AA, Khazaei MR. Consequential alterations in haemoglobin structure upon glycation with fructose: prevention by acetylsalicylic acid. J Biochem. 2007 Jun; 141 (6): 827-33.
32. Bose T, Chakraborti AS. Fructose-induced structural and functional modifications of hemoglobin: implication for oxidative stress in diabetes mellitus. Biochim Biophys Acta. 2008 May; 1780 (5): 800-8.
33. Roy A, Sil R, Chakraborti AS. Non-enzymatic glycation induces structural modifications of myoglobin. Mol Cell Biochem. 2010 May; 338 (1-2): 105-14.
34. Ahmed N. Advanced glycation endproducts-role in pathology of diabetic complications. Diabetes Res Clin Pract. 2005 Jan; 67 (1): 3-21.

Journal of Shahrekord University of Medical Sciences
(J Shahrekord Univ Med Sci) 2014Dec, Jan; 16(5): 44-55.

Original article

In vitro evaluation of the effect of ethanolic extract of Propolis on human hemoglobin glycation, a laboratory study

Sahebi U[1], Divsalar A[2*], Saboury AA[3], Pourssan N[3]
[1]Student, Cell and Molecular Biology Dept., Kharazmi University, Tehran, I.R. Iran; [۲]Cell and Molecular Biology Dept., Kharazmi University, Tehran, I.R. Iran; [3]Expert of Institute of Biochemistry & Biophysics, University of Tehran, Tehran, I.R. Iran.
Received: 27/Jan/2014 Accepted: 25/Sep/2014

Background and aims: Glycation is a nonenzymatic reaction which sugar binds to proteins. It increases in diabetics with elevated blood sugar. The products produced from this reaction induce and exacerbate complications of diabetes, and are found in many diseases. Propolis has been used widely from ancient times in traditional medicine and there is remarkable evidence that it has very strong antioxidant properties because of flavonoids in its combination. The aim of present study was investigating the effects of Propolis extract on the decrease of hemoglobin glycation rate in a .laboratory study.

Methods: In this experimental study, purified human hemoglobin incubated for 5 weeks in the presence and absence of glucose and 3 different concentrations of ethanolic extract of Propolis. The rate of hemoglobin glycation determined by means of measurement of heme release amount in hemoglobin, Soret band shift, products resulting from the degradation of heme, and was determined of structure with the help of ultraviolet-visible spectroscopy and was designated evaluation of amyloids structures. Aspirin have been also used as a control since it is a known antiglycation agent.

Results: Glycation of hemoglobin was inhibited up to 50 percent in the presence of Propolis extract at the highest concentration. Two other concentrations showed a lower inhibitory effect. Studies on the heme degradation products and fibrillar structures also represent a significant reduction in glycation of hemoglobin in the presence of Propolis extract.

Conclusion: Hemoglobin was glycated extremely in presence of glucose and propolis was inhibited this reaction in a concentration dependent manner and decreased glycation of hemoglobin. Propolis probably inhibits glycation of protein by its antioxidant property and hence can be effective in decreasing diabetes complications.

Keywords: **Glycation, hemoglobin, Propolis, Glucose, Diabetes**.

Cite this article as: Sahebi U, Divsalar A, Saboury AA, Pourssan N. In vitro evaluation of the effect of ethanolic extract of Propolis on human hemoglobin glycation, a laboratory study. J Shahrekord Univ Med Sci. 2014; 16(5): 44-55.

[*]**Corresponding author:**
Cell and Molecular Biology Dept., Kharazmi University, Tehran, I.R. Iran; Tel:00982634579600, E-mail: divsalar@khu.ac.ir