*Original Article*

# Investigating the human hemoglobin fructation in the presence of propolis *in vitro*

**Sahebi U[1], Divsalar A[1*], Saboury AA[2]**

1- Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, I. R. Iran.
2- Institute of Biochemistry and Biophysics, University of Tehran, Tehran, I. R. Iran.

Received June 10, 2014; Accepted December 17, 2014

## Abstract:

**Background:** Propolis is a complex resinous mixture that is gathered and processed by honeybees from resin they collect from trees and plants. This substance has various biological properties. Glycation is a reaction, which occurs between a protein and a reducing sugar and finally causes structural alterations and destruction of proteins. The role of glycation has been approved in the development and aggravation of diabetic complications. This study aimed to examine the effect of ethanolic extract of propolis (EEP) on fructation and destruction of hemoglobin protein structure.
**Materials and Methods:** In this experimental study, purified hemoglobin was incubated alone and with fructose in the presence and absence of different concentrations of EEP (10, 20 and 40µg/ml) for 5 weeks. The extent of hemoglobin fructation was determined by measuring the amount of heme release, blue shift in soret band, releasing the products of heme destruction and assessing the amyloid structures using the UV-visible and fluorescence spectroscopy.
**Results:** Incubation of hemoglobin with fructose was led to the hemoglobin destruction and heme release. Hemoglobin fructation was inhibited up to 45% in the presence of EEP with a concentration of 40µg/ml. The two lower concentrations of EEP showed the lower degrees of inhibition. Moreover, fluorescence studies of products resulting from heme degradation and fibrillar structures are indicative of the reduction in hemoglobin fructation in the presence of EEP.
**Conclusion:** Hemoglobin is drastically glycated in the presence of fructose and EEP can decrease the hemoglobin fructation in a concentration-dependent manner.

**Keywords:** Fructation, Hemoglobin, Propolis, Antioxidant

* **Corresponding Author.**
**Email:** divsalar@khu.ac.ir
**Tel:** 0098 21 611 13381
**Fax:** 0098 21 664 04680

Conflict of Interests: ***No***

***Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, February, 2015; Vol. 18, No 6, Pages 553-563***

***Please cite this article as:*** Sahebi U, Divsalar A, Saboury AA. Investigating the human hemoglobin fructation in the presence of propolis *in vitro*. ***Feyz*** 2015; 18(6): 553-63.

# بررسی تاثیر پروپولیس بر فروکته‌شدن هموگلوبین انسانی در شرایط آزمایشگاهی

یونس صاحبی[۱]، عادله دیوسالار[۲*]، علی اکبر صبوری[۳]

**خلاصه:**

**سابقه و هدف:** پروپولیس ترکیب رزینی پیچیده‌ای از ترشحات گیاهان مختلف است که توسط زنبور عسل جمع‌آوری و فرآوری می‌شود؛ این ماده دارای خواص بیولوژیک متعددی است. گلایکه‌شدن واکنشی است که بین یک پروتئین و یک قند احیاءکننده اتفاق می‌افتد و در نهایت موجب تغییرات ساختاری و تخریب پروتئین می‌شود و نقش آن در ایجاد و تشدید عوارض دیابت تایید شده است. هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر عصاره‌ی اتانولی پروپولیس بر میزان فروکته‌شدن و تخریب ساختار هِم موجود در هموگلوبین در شرایط آزمایشگاهی است.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی هموگلوبین تخلیص‌شده به تنهایی و با فروکتوز در حضور و عدم‌حضور عصاره‌ی اتانولی پروپولیس با غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۴۰μg/ml به‌مدت ۵ هفته انکوبه گردید. سنجش میزان فروکته‌شدن هموگلوبین از طریق اندازه‌گیری میزان آزادسازی گروه هِم و جابه‌جایی باند سورت، تولید محصولات ناشی از تخریب هِم و نیز بررسی ساختارهای آمیلوئیدی به‌کمک روش‌های طیف‌سنجی مرئی-ماوراء بنفش و فلوئورسانس انجام شد.

**نتایج:** انکوباسیون هموگلوبین با فروکتوز باعث تخریب ساختار هموگلوبین و رهاسازی گروه هِم شد. درحضور عصاره‌ی پروپولیس با غلظت ۴۰μg/ml فروکته شدن هموگلوبین به میزان ۴۵ درصد مهار گردید. دو غلظت کمتر عصاره میزان مهار پایین‌تری را نشان دادند. هم‌چنین، بررسی‌های انجام‌شده در مورد محصولات ناشی از تخریب هِم و ساختار فیبریلار، نشان‌دهنده کاهش نسبی فروکته‌شدن هموگلوبین در حضور عصاره‌ی پروپولیس می‌باشد.

**نتیجه‌گیری:** هموگلوبین در حضور فروکتوز به شدت گلایکه می‌شود و عصاره‌ی اتانولی پروپولیس می‌تواند گلایکه شدن هموگلوبین را به‌صورت وابسته به غلظت کاهش دهد.

**واژگان کلیدی:** فروکته‌شدن، هموگلوبین، پروپولیس، آنتی‌اکسیدان

دو ماه‌نامه علمی- پژوهشی فیض، دوره هجدهم، شماره ۶، بهمن و اسفند ۱۳۹۳، صفحات ۵۶۳-۵۵۴

## مقدمه

پروپولیس ترکیب رزینی پیچیده‌ای از ترشحات گیاهان مختلف است که توسط زنبور عسل از تکه‌های صمغ تراوش شده از جوانه‌ی برگ‌ها و شکاف‌های پوست درختان متنوع نظیر اکالیپتوس، صنوبر، شاه‌بلوط، کاج، نارون، بید و سپیدار جمع‌آوری می‌شود. در حین جمع‌آوری، موم و بتاگلوکوزیداز، مترشحه از غدد بزاقی زیر حلقی، مقداری بزاق و سایر ترشحات زنبور با آن مخلوط می‌شود. ماده‌ی محصول توسط زنبورها برای مهر و موم کردن کندو، حفاظت در برابر مهاجمان خارجی و مومیایی کردن اجساد استفاده می‌شود؛ ضمن این‌که پروپولیس به واسطه‌ی اثر ضد عفونی کنندگی و دارا بودن ویژگی‌های ضد میکروبی، کلونی آن‌ها را از بیماری‌ها محافظت می‌کند [۱]. پروپولیس از گذشته‌های دور به‌طور گسترده‌ای در طب سنتی به‌کار برده می‌شود. شواهد قابل توجهی وجود دارد که نشان می‌دهد پروپولیس دارای خواص ضد عفونی کننده، ضد باکتریایی، ضد ویروسی، ضد التهاب، آنتی‌بیوتیک، ضد اکسیدان، ضد سمیت کبد، ضد زخم معده، ضد توموری و تحریک کننده‌ی سیستم ایمنی است [۲]. به‌طور کلی ترکیب پروپولیس مستقیما متناسب با نوع ترشحات جوانه‌ای است که توسط زنبور عسل از درختان متنوع جمع‌آوری می‌شود. پروپولیس خام متشکل از ۵۰ درصد رزین (ترکیبی از فلاونوییدها و فنولیک اسیدهای مربوطه، آروماتیک اسیدها و استرهای مربوطه، آلدئیدها و کتون‌ها)، ۳۰ درصد موم، ۱۰ درصد روغن‌های ضروری، ۵ درصد گرده و ۵ درصد ترکیبات آلی دیگر مانند ترپن‌ها، استروئیدها، ویتامین‌های مختلف، مواد معدنی و اسیدآمینه است [۴،۳]. اخیرا پروپولیس محبوبیت یافته است و به‌طور گسترده‌ای در نوشیدنی‌ها و غذاهای سالم برای ارتقاء سلامت و پیشگیری از بیماری‌هایی مانند التهاب،

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی

[۲] استادیار، گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی

[۳] استاد، مرکز تحقیقات بیوشیمی بیوفیزیک، دانشگاه تهران

* **نشانی نویسنده مسئول:**

تهران، دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی، گروه سلولی و مولکولی

**تلفن:** ۰۲۱ ۶۱۱۱۳۳۸۱ **دورنویس:** ۰۲۱ ۶۶۴۰۴۶۸۰

**پست الکترونیک:** divsalar@khu.ac.ir

**تاریخ دریافت:** ۹۳/۳/۲۰ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۹۳/۹/۲۶

بیماری‌های قلبی، دیابت، پیری و سرطان استفاده می‌شود. پیشنهاد شده است که وجود مقادیر زیادی از فلاونوئیدها، اسیدهای آروماتیک و ترکیبات فنولی مسئول اکثر فعالیت‌های زیستی و دارویی پروپولیس است [۵]. تغییرات پس از ترجمه‌ای پروتئین‌ها نقش مهمی در کنترل عملکرد آنها دارد. تغییر پروتئین به‌وسیله‌ی گلایکه شدن، توالی پیچیده‌ای از واکنش‌های پیاپی می‌باشد که در مجموع واکنش میلارد نامیده می‌شود. مرحله کلیدی در تغییر پروتئین‌ها توسط گلوکز، تشکیل باز شیف است که در نتیجه‌ی واکنش نوکلئوفیلی بین گروه آمین آزاد از یک پروتئین و گروه کربونیل از یک قند احیاءکننده اتفاق می‌افتد و به‌دنبال آن باز-آرایی‌های آمادوری انجام می‌شود که محصول آمادوری را تولید می‌کند [۶]. محصولات آمادوری متحمل واکنش‌های دیگری مانند حلقوی‌شدن، بازآرایی، تراکم، آب‌دهی و برش اکسیداتیو می‌شوند تا در نهایت به محصولات پیچیده‌تری که دارای اتصالات متقاطع و نشر فلوئورسانس هستند تبدیل شوند. این مشتقات، محصولات نهایی گلایکه شدن (AGEs) نامیده می‌شوند [۷]. نقش AGEها در فرآیند پیری و بسیاری از بیماری‌ها اثبات شده است. هم‌چنین، تغییرات غیرآنزیمی پروتئین‌ها با افزایش سطح قند خون در طی دوره‌های طولانی مدت در دیابت شیرین رابطه معنی دارد و نقش AGEها در ایجاد و تشدید عوارض دیابت تایید شده است [۸]. در میان مونوساکاریدهای احیاءکننده، فروکتوز اهمیت بسیاری دارد و ۷/۵ برابر قوی‌تر از گلوکز در فرآیند گلایکه شدن نقش دارد و ممکن است با عوارض دیابت مرتبط باشد. شنت گلوکز به فروکتوز از طریق مسیر پلی‌ال در شرایط دیابتی فعال‌تر می‌شود که منجر به افزایش غلظت فروکتوز می‌شود. بنابراین گلایکه شدن توسط فروکتوز که فروکتوزیلاسیون یا فروکته‌شدن (Fructation) نامیده می‌شود، فرآیندی محتمل‌تر در شرایط دیابتی به‌ویژه در بافت‌هایی مانند عدسی چشم، کلیه، قلب و اعصاب محیطی است که تنظیمی برای ورود قند وجود ندارد و قند آزادانه وارد سلول می‌شود، و مسیر پلی‌ال می‌تواند نقش‌هایی مهم در ایجاد عوارض پاتولوژیکی در این بافت‌ها بازی کند [۹]. در مقایسه با سطوح نرمال فروکتوز در اریتروسیت‌ها، غلظت این قند در اریترو-سیت‌های بیماران دیابتی تا چهار برابر افزایش می‌یابد و این امر می‌تواند باعث فروکته‌شدن هموگلوبین گردد. نشان داده شده است که فروکته شدن تغییرات ساختاری و عملکردی در هموگلوبین القا می‌کند و با تجزیه‌ی هِم، آهن به راحتی از هموگلوبین فروکته رها می‌شود و این آهن آزاد، استرس اکسیداتیو ناشی از رادیکال آهن و تخریب ساختارهای سلولی مختلف را افزایش می‌دهد. افزایش واکنش‌های رادیکال آهن آزاد به‌ویژه در بیماران دیابتی قابل توجه است، بنابراین ممکن است فروکته شدن هموگلوبین با افزایش استرس اکسیداتیو و عوارض ایجاد شده در بیماران دیابتی مرتبط باشد [۱۰]. از این‌رو، طراحی دارو و مهارکننده‌هایی برای پیشگیری از واکنش گلایکه شدن و کاهش عوارض ناشی از آن در بیماران دیابتی امری ضروری و مهم به نظر می‌رسد. تاکنون مواد شیمیایی و داروهای بسیاری مانند آسپیرین، دیکلوفناک و متفورمین مطالعه شده‌اند [۱۱] و نتایج برخی از آنها نیز مطلوب بوده است، اما از آنجایی‌که متاسفانه اکثر این مواد مطالعه شده دارای عوارض جانبی فراوانی بوده‌اند، در نتیجه تمایل به استفاده از مواد طبیعی که می‌توانند دارای عوارض بسیار کمتری باشند، افزایش یافته است. هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر عصاره اتانولی پروپولیس بر میزان گلایکه شدن و تخریب هموگلوبین در حضور فروکتوز به صورت آزمایشگاهی است.

## مواد و روش‌ها

### تخلیص هموگلوبین

به‌منظور تهیه‌ی پروتئین هموگلوبین، ابتدا از افراد سالم و غیرسیگاری خون‌گیری شده و سپس با استفاده از پروتوکل Austen Riggs به‌صورت زیرتخلیص گردید [۱۲]: ابتدا محلول سدیم سیترات ۴ درصد (مرک، آلمان) به نسبت حجمی ۹ به ۱ برای جلوگیری از انعقاد، به نمونه خون اضافه گردید. سپس، جهت جداسازی سرم نمونه‌ی خون با استفاده از دستگاه سانتریفوژ (مدل Hitachi) با دور ۳۰۰۰ سانتریفیوژ شده و در ادامه رسوب به‌دست آمده جهت شستشو، با محلول سالین ۹ درصد به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۰ هزار و پس از آن مجددا با بافر فسفات ۰/۲ مولار (مرک، آلمان) به‌مدت ۱۵ دقیقه با دور ۵۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. سپس، آب دوبار تقطیر و سرد، جهت لیز شدن گلبول قرمز و رها-شدن هموگلوبین به رسوب اضافه شده و با دور ۱۸۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و پس از آن جهت رسوب پروتئین‌های اضافی، سولفات آمونیوم ۲۰ درصد (مرک، آلمان) اضافه شد. این محلول به‌مدت یک ساعت با دور ۱۴۰۰۰ سانتریفیوژ گردید و در نهایت محلول رویی حاوی هموگلوبین به کیسه دیالیز منتقل شده و دیالیز علیه بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار در pH ۷/۴ و دمای °۴ سانتی‌گراد به‌مدت ۴۸ ساعت انجام گردید. جهت اطمینان از خالص بودن نمونه هموگلوبین، با استفاده از دستگاه اسپکتروفتو-متر، طیف مرئی- ماورابنفش از نمونه تهیه شده و عدم وجود ناخالصی تایید گردید (اطلاعات نشان داده نشده است). محلول نهایی حاوی هموگلوبین خالص بوده که به‌وسیله‌ی روش بردفورد [۱۳]، که روش بسیار حساس و دقیق پروتئین سنجی است، تعیین غلظت شد (نتایج نشان داده نشده است).

عصاره‌گیری پروپولیس

پروپولیس جمع‌آوری شده از مناطق اطراف جنوب تهران در خرداد ۱۳۹۱ در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. برای انجام عصاره‌گیری پروپولیس، ابتدا وزن مشخصی از قطعات خرد شده‌ی آن در الکل اتانول ۸۵ درصد به نسبت ۱۰ درصد وزنی/ وزنی حل شده و در دستگاه شیکر انکوباتور (مدل IKA KS 4000i) به‌مدت ۴۸ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد با دور RPM ۱۵۰ انکوبه شد. پس از آن محلول حاصل با کاغذ واتمن شماره ۴ برای جداسازی قطعات درشت صاف گردید و مواد باقیمانده مجددا به‌صورت بالا عصاره‌گیری و صاف شد. محلول صاف شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال به‌مدت ۲۴ ساعت نگه‌داری شده و سپس به‌منظور جداسازی موم با کاغذ واتمن شماره ۱ صاف گردید [۱۴]. محلول حاصل به‌وسیله دستگاه روتاری تبخیر شده و سپس غلظت‌های مختلف عصاره با استفاده از اتانول تهیه گردید.

انکوباسیون نمونه‌ها

جهت مطالعه‌ی آزمایشگاهی فروکته‌شدن هموگلوبین نمونه‌های پروتئینی با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در حضور قند فروکتوز (مرک، آلمان) با غلظت ۴۰ میلی‌مولار (مشابه با حالت دیابتی) در بافر سدیم فسفات ۰/۴ میلی‌مولار انکوبه گردیدند. هم‌چنین، به‌منظور بررسی اثر پروپولیس بر میزان فروکته-شدن هموگلوبین، سه غلظت مختلف ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم [۵] در میلی‌لیتر عصاره‌ی پروپولیس به برخی نمونه‌ها افزوده شد. آسپیرین (سیگما، آمریکا) نیز با غلظت ۲/۵ میلی‌مولار به‌عنوان کنترل به برخی نمونه‌ها اضافه گردید. نمونه‌ها به‌صورت گروه‌های زیر انکوبه شدند: گروه ۱ شامل پروتئین هموگلوبین تنها به‌عنوان شاهد، گروه ۲ شامل هموگلوبین و فروکتوز، گروه ۳ شامل هموگلوبین، فروکتوز و عصاره‌ی پروپولیس با غلظت ۱۰μg/ml، گروه ۴ شامل هموگلوبین، فروکتوز و عصاره‌ی پروپولیس با غلظت ۲۰μg/ml، گروه ۵ شامل هموگلوبین، فروکتوز و عصاره‌ی پروپولیس با غلظت ۴۰μg/ml و گروه ۶ شامل هموگلوبین، فروکتوز و آسپیرین به‌عنوان کنترل. تمامی نمونه‌ها به‌مدت ۵ هفته در شرایط استریل و تاریکی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در دستگاه شیکر انکوباتور با سرعت RPM ۴۰ انکوبه شده و در انتهای هر هفته نمونه‌برداری انجام گردید. نمونه‌های برداشت شده تا زمان مطالعه در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند [۱۵].

مطالعات طیف سنجی مرئی- فرابنفش

این مطالعات جهت بررسی میزان آزادسازی هِم و جابجایی باند سورت و میزان تاثیر پروپولیس در گلایکه‌شدن هموگلوبین انکوبه‌شده در حضور فروکتوز در طی زمان‌های مختلف انکوباسیون انجام شد؛ بدین منظور میزان جذب نمونه‌ها در طول موج‌های ۳۵۰ تا ۴۵۰ با فواصل یک نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروسکوپی (Shimadzu, Japan) قرائت شده و طیف آن‌ها رسم گردید [۱۶].

مطالعات فلوئورسانس

فروکته‌شدن هموگلوبین باعث تجزیه هِم و در نتیجه تشکیل محصولات هِمی می‌شود که دارای نشر فلوئورسانس هستند. با استفاده از مطالعات فلوئورسانس میزان تولید این محصو-لات سنجیده شد. این محصولات می‌توانند به‌عنوان معیاری جهت تعیین میزان گلایکه‌شدن هموگلوبین در نظر گرفته شوند. نمونه‌های مختلف با استفاده از دستگاه فلوئورسانس (مدل کری) در طول - موج ۴۶۰ نانومتر برانگیخته شده و میزان نشر آن‌ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر ثبت گردید [۱۷].

تست تیوفلاوین

جهت تعیین وضعیت ساختار هموگلوبین گلایکه‌شده از تست Thioflavin T استفاده شد. این ماده یک رنگ شناساگر است که به فیبرهای آمیلوئیدی حاصل از تغییرات ساختاری هموگلوبین متصل می‌شود و با این اتصال دارای خاصیت نشر فلوئورسانس می‌گردد. شدت فلوئورسانس حاصل معیاری از میزان گلایکه‌شدن است. بدین منظور، نمونه‌های مختلف با تیوفلاوین تی (سیگما، آمریکا) به‌مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شده و سپس میزان نشر فلوئورسانس آن‌ها در طول موج ۴۹۰ نانومتر پس از تهییج در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد [۱۸].

آنالیز آماری

تمامی آزمایشات به‌صورت سه بار تکرار انجام گردید و تمامی اطلاعات ارائه شده در این مقاله میانگین نتیجه‌ی سه تکرار می‌باشند. داده‌های به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار Instat 3 و آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه و تست توکی تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی‌داری زیر ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

## نتایج

### مطالعات طیف سنجی مرئی-ماوراءبنفش

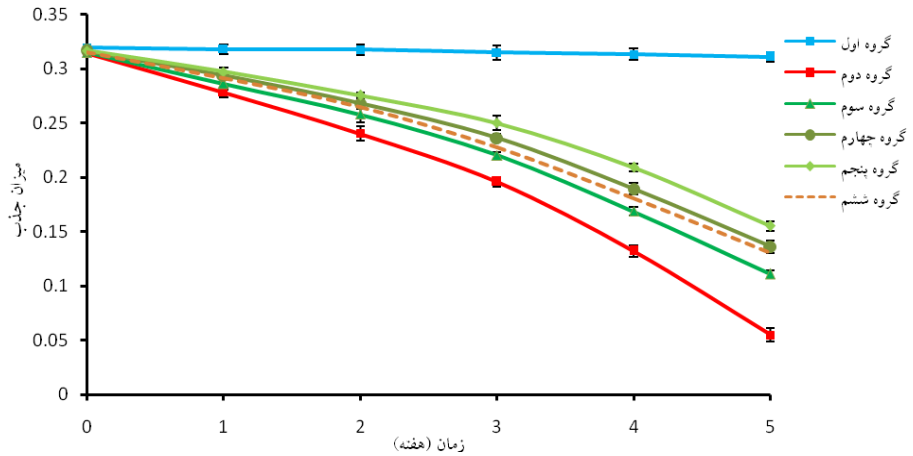
نتایج حاصل از مطالعات طیف سنجی مرئی- فرابنفش در نمودار شماره ۱ و جدول شماره ۱ نشان داده شده است. پیک ماکزیمم طیف هر نمونه در هر هفته مشخص شده و سپس به-صورت نمودار رسم شده است. نمودار شماره ۱ بالاترین میزان جذب نمونه‌های هموگلوبین مختلف در ناحیه باند سورت را نشان می‌دهد و همان‌طورکه مشاهده می‌شود میزان جذب هموگلوبین تنها (گروه ۱) در طی انکوباسیون تغییر محسوسی نداشته است (میزان جذب بین ۰/۳۱۹±۰/۰۰۳ تا ۰/۳۱۰±۰/۰۰۴)، درحالی‌که حضور فروکتوز (گروه ۲) باعث کاهش شدید میزان جذب در طی هفته‌های مختلف گردیده و در هفته‌ی پایانی میزان این جذب به پایین‌ترین مقدار یعنی ۰/۰۵۵±۰/۰۰۶ رسیده است. ازطرف دیگر حضور پروپولیس در نمونه‌های حاوی قند از کاهش میزان جذب جلوگیری نموده است. پروپولیس در بالاترین غلظت خود (μg-۴۰/ml) قویترین اثر را داشته و غلظت اول آن (۱۰μg/ml) دارای اثر کمتری بوده است، و میزان جلوگیری از کاهش جذب در حضور پروپولیس با غلظت ۲۰μg/ml تقریبا معادل با اثر آسپیرین می‌باشد. مقادیر جذب هفته‌ی پایانی نمونه‌های حاوی پروپولیس با غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌ترتیب برابر با ۰/۱۱۱±۰/۰۰۳و ۰/۱۳۶±۰/۰۰۵و ۰/۱۵۵±۰/۰۰۴ بوده است ($P<0/05$). همان‌گونه که جدول شماره ۱ نشان می‌دهد طول موج جذبی هموگلوبین در ناحیه باند سورت در طی انکوباسیون تغییری نکرده است و در تمامی هفته‌ها این طول موج ۴۱۴ نانومتر است؛ درحالی‌که این طول موج در نمونه‌ی حاوی فروکتوز در طی انکوباسیون به تدریج به سمت طول موج‌های آبی تغییر پیدا نموده و در هفته پایانی به طول موج ۴۰۵ نانومتر رسیده است. این در حالی است که در نمونه‌های حاوی پروپولیس از میزان این جابه-جایی کاسته شده است. در نمونه‌ی حاوی پروپولیس با غلظت ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، طول موج پیک جذبی در هفته‌ی پایانی به‌ترتیب برابر با ۴۰۸، ۴۰۸ و ۴۱۰ نانومتر است ($P<0/05$). طول موج پیک جذبی در نمونه‌ی حاوی آسپیرین نیز ۴۰۸ نانومتر است.

### مطالعات فلوئورسانس ذاتی

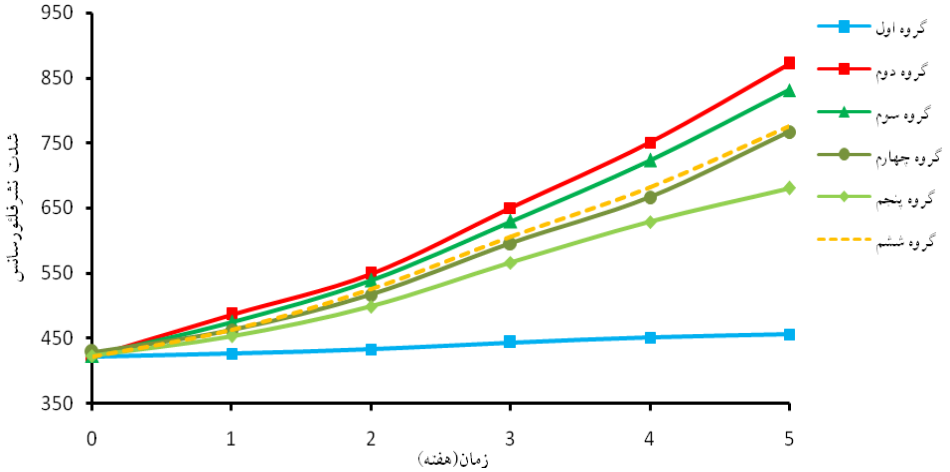
نتایج حاصل از بررسی میزان تولید محصولات فلورسنت حاصل از تجزیه هِم در نتیجه گلایکه‌شدن هموگلوبین در مطالعات فلوئورسانس نشان می‌دهد که انکوباسیون هموگلوبین در حضور فروکتوز باعث افزایش تدریجی شدت فلوئورسانس ناشی از محصولات هِمی در طی انکوباسیون می‌شود و با گذشت زمان از آغاز انکوباسیون شدت فلوئورسانس افزایش بیشتری یافته و در هفته‌ی پایانی به‌میزان ۸۷۱±۱۱ واحد اختیاری (Arbitrary Unit) رسیده است، در حالی‌که شدت فلوئورسانس نمونه هموگلوبین تنها تغییر محسوسی نداشته است و در هفته‌ی پنجم ۴۵۵±۱۲ واحد می‌باشد. از سوی دیگر حضور پروپولیس در نمونه‌های حاوی فروکتوز از افزایش شدت نشر در طی انکوباسیون جلوگیری نموده است؛ به‌صورتی‌که با افزایش غلظت پروپولیس شدت نشر کاهش یافته است. میزان شدت نشر در نمونه‌های حاوی پروپولیس با غلظت ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با نمونه‌ی حاوی فروکتوز در هفته‌ی پایانی به ۸۳۱±۱۲ و ۷۶۶±۱۴ و ۶۸۰±۱۱ واحد کاهش یافته است ($P<0/05$). این میزان برای نمونه‌ی حاوی آسپیرین ۷۷۶±۱۳ واحد می‌باشد که تقریبا نزدیک به میزان شدت نشر در نمونه‌ی حاوی پروپولیس با غلظت دوم می‌باشد (نمودار شماره ۲).

### مطالعات فلوئورسانس تیوفلاوین

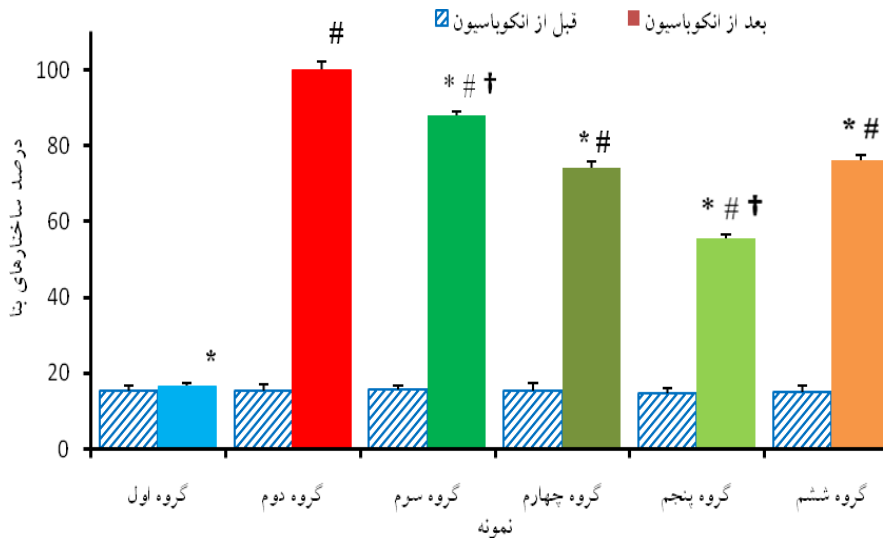
نتایج تست تیوفلاوین نمونه‌ها، قبل و بعد از انکوباسیون به‌صورت درصد تشکیل ساختارهای آمیلوئیدی در نمودار شماره ۳ رسم شده است. چنان‌که مشاهده می‌شود میزان ساختارهای بتا برای نمونه‌ی شاهد قبل و بعد از انکوباسیون به‌ترتیب ۱۵/۳۰±۱/۳ و ۱۶/۵۶±۰/۹۶ درصد می‌باشد، درحالی‌که در حضور فروکتوز (گروه ۲) این میزان به ۱۰۰ درصد رسیده است که نشان‌دهنده‌ی افزایش شدید فلوئورسانس تیوفلاوین است. از سوی دیگر، در نمونه‌های حاوی عصاره‌ی پروپولیس شدت نشر حاصل از تیو-فلاوین به‌طور معنی‌داری کاهش‌یافته است ($P<0/05$) و میزان درصد ساختارهای بتا در نمونه‌های حاوی عصاره پروپولیس با غلظت ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌ترتیب به ۸۷/۸۹±۱/۰ و ۷۴/۱۷±۱/۶ و ۵۵/۴۳±۱/۰ درصد کاهش یافته است ($P<0/05$) که نشان می‌دهد روند افزایش نشر مهار شده است؛ به‌صورتی‌که با افزایش غلظت عصاره میزان مهار نیز افزایش یافته است. در غلظت سوم عصاره پروپولیس بیشترین میزان مهار مشاهده می‌شود که در آن شدت نشر تقریبا ۴۵ درصد نسبت به نمونه حاوی فروکتوز کاهش یافته است. هم‌چنین، در نمونه کنترل حاوی آسپیرین میزان ساختارهای بتا به ۷۶/۲۱±۱/۴ درصد کاهش یافته است که اثری تقریبا برابر با غلظت ۲۰μg/ml عصاره داشته است.




نمودار شماره ۱- مقایسه‌ی میزان کاهش جذب ناحیه باند سورت در اثر فروکته‌شدن هموگلوبین در نمونه‌های مختلف؛ گروه ۱ حاوی پروتئین هموگلوبین، گروه ۲ حاوی هموگلوبین و فروکتوز، گروه ۳، ۴ و ۵ حاوی هموگلوبین، فروکتوز و عصاره‌ی پروپولیس به‌ترتیب با غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم در میلی لیتر و گروه ۶ حاوی هموگلوبین، فروکتوز و آسپیرین. با گذشت زمان میزان جذب نمونه در نمونه‌های گروه ۲ کاهش یافته است که نشان‌دهنده جابه‌جایی گروه هِم در ساختار طبیعی در اثر فروکته‌شدن می‌باشد؛ درحالی‌که در نمونه‌های گروه‌های حاوی پروپولیس از این کاهش جلوگیری شده است. با افزایش غلظت پروپولیس میزان مهار بیشتر می‌شود (به‌ترتیب گروه ۳، ۴ و ۵). نمونه حاوی هموگلوبین تنها تغییر محسوسی در طی انکوباسیون نداشته است. نتایج میانگین سه بار تکرار±SD و سطح معنی‌داری $P<۰/۰۵$ است.




نمودار شماره ۲- مقایسه‌ی میزان تولید محصولات ناشی از تخریب هِم در نمونه‌های هموگلوبین در شرایط مختلف انکوباسیون؛ گروه ۱ حاوی پروتئین هموگلوبین، گروه ۲ حاوی هموگلوبین و فروکتوز، گروه ۳، ۴ و ۵ حاوی هموگلوبین، فروکتوز و عصاره‌ی پروپولیس به‌ترتیب با غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و گروه ۶ حاوی هموگلوبین، فروکتوز و آسپیرین. با تخریب هِم به‌وسیله فروکته‌شدن، هِم آزاد شده باعث افزایش جذب شده است و با گذشت زمان و افزایش تخریب میزان شدت جذب افزایش یافته است (گروه ۲). در گروه‌های حاوی پروپولیس، روند افزایش جذب کاهش یافته که نشان‌دهنده مهار فروکته‌شدن و تخریب هم می‌باشد. با افزایش غلظت هموگلوبین، به‌ترتیب از گروه ۳ تا ۵، میزان مهار افزایش یافته است. آسپیرین به‌عنوان ماده ضد گلایکه کنترل نیز مهار نشان داده است. نتایج میانگین سه بار تکرار± SD و سطح معنی‌داری $P<۰/۰۵$ است.




نمودار شماره ۳- میزان تشکیل صفحات بتا در نمونه‌های مختلف، قبل و بعد از انکوباسیون در هفته پنجم. گروه ۱ حاوی پروتئین هموگلوبین، گروه ۲ حاوی هموگلوبین و فروکتوز ، گروه ۳، ۴ و ۵ حاوی هموگلوبین، فروکتوز و عصاره‌ی پروپولیس به‌ترتیب با غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و گروه ۶ حاوی هموگلوبین، فروکتوز و آسپیرین. افزایش ساختارهای بتا در نمونه گروه یک در مقایسه با هموگلوبین تنها (گروه ۱) نشان‌دهنده فروکته‌شدن هموگلوبین و تغییرات ساختاری آلفا به بتا است؛ این در حالی است که نمونه های گروه‌های ۳، ۴ و ۵ از روند افزایش ساختارهای بتا کاسته شده است که نشان می‌دهد حضور پروپولیس مانع گلایکه‌شدن هموگلوبین شده و در نتیجه تغییرات ساختاری آلفا به بتا را مهار نموده است. با افزایش غلظت پروپولیس میزان مهار افزایش یافته است. آسپیرین نیز میزان مهاری مشابه با نمونه‌ی حاوی پروپولیس با غلظت ۲۰ میکروگرم /لیتر نشان داده است. نتایج میانگین سه بار تکرار ± SD است. # تفاوت معنی‌دار با گروه اول ($P<۰/۰۵$)، * تفاوت معنی‌دار با گروه دو ($P<۰/۰۵$). † تفاوت معنی‌دار با گروه شش ($P<۰/۰۵$).

جدول شماره ۱- مقایسه‌ی طول موج جذبی و تغییر آن در نمونه‌های هموگلوبین در شرایط انکوباسیون مختلف.

| زمان (هفته) | گروه اول | گروه دوم | گروه سوم | گروه چهارم | گروه پنجم | گروه ششم |
|---|---|---|---|---|---|---|
| هفته صفر | ۴۱۴ | ۴۱۴ | ۴۱۴ | ۴۱۴ | ۴۱۴ | ۴۱۴ |
| هفته اول | ۴۱۴ | ۴۱۳ | ۴۱۴ | ۴۱۴ | ۴۱۴ | ۴۱۴ |
| هفته دوم | ۴۱۴ | ۴۱۲ | ۴۱۳ | ۴۱۳ | ۴۱۳ | ۴۱۳ |
| هفته سوم | ۴۱۴ | ۴۱۰ | ۴۱۲ | ۴۱۲ | ۴۱۲ | ۴۱۲ |
| هفته چهارم | ۴۱۴ | ۴۰۸ | ۴۱۰ | ۴۱۰ | ۴۱۱ | ۴۱۰ |
| هفته پنجم | ۴۱۴ | ۴۰۵ | ۴۰۸ | ۴۰۸ | ۴۱۰ | ۴۰۸ |

گروه ۱ حاوی پروتئین هموگلوبین، گروه ۲ حاوی هموگلوبین و فروکتوز، گروه ۳، ۴ و ۵ حاوی هموگلوبین، فروکتوز و عصاره‌ی پروپولیس به‌ترتیب با غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و گروه ۶ حاوی هموگلوبین، فروکتوز و آسپیرین. مقادیر جذب نشان می‌دهد که نمونه هموگلوبین بدون قند، در طول انکوباسیون تغییری نداشته است که نشان‌دهنده‌ی طول موج جذبی هموگلوبین در این ناحیه است؛ درحالی‌که در نمونه‌های حاوی قند طول موج جذبی در طی انکوباسیون به سمت طول موج‌های کوتاه‌تر جابه‌جا شده است که نشان‌دهنده تغییر در موقعیت هِم در اثر فروکته‌شدن می‌باشد. حضور پروپولیس باعث کاهش جابه‌جایی طول موج جذبی هِم شده است و با افزایش غلظت عصاره میزان جابه‌جایی به‌شدت کاهش یافته است (به‌ترتیب گروه‌های ۳، ۴ و ۵). آسپیرین به‌عنوان کنترل (گروه ۶)، به‌طور مشابه با نمونه حاوی پروپولیس با غلظت ۲۰ میکروگرم/میلی لیتر (گروه ۴) از جابه‌جایی طول موج جذبی جلوگیری نموده است.

## بحث

**نشان داده شده است که پروپولیس دارای اثرات مختلفی از جمله اثرات ضد سرطانی، ضد التهابی، ضد باکتریایی، ضد ویروسی، ضد قارچی و ضد اکسیدانی می‌باشد و این اثرات مربوط به بخش پلی‌فنولی این عصاره می‌باشد [۲۰،۱۹]. ترکیب عصاره‌ی پروپولیس ایرانی توسط محمدزاده و همکاران مشخص شده است. هم‌چنین، آنها بر روی اثر آنتی اکسیدانی این عصاره مطالعه نموده و نشان داده‌اند که عصاره‌ی اتانولی این ماده دارای**

خواص آنتی اکسیدانی قوی می‌باشد [۲۱]. عوارض دیابت شامل آسیب قلب، کلیه، عصب، عدسی چشم و شبکیه می‌باشد و درطی سال‌ها شواهدی فراهم شده است مبنی بر این‌که دیابت یک فاکتور خطر برای سایر بیماری‌های مرتبط با پیری مانند بیماری آلزایمر و انواع سرطان می‌باشد. اکثر این آسیب‌ها می‌توانند توسط گلایکه-شدن ایجاد شوند [۲۲]. چندین نوع ماده برای پیشگیری از گلایکه-شدن وجود دارد. آسپیرین احتمالا اولین مولکولی است که برای پیشگیری از گلایکه‌شدن استفاده شده است. به‌نظر می‌رسد که حفاظت در برابر گلایکه‌شدن توسط آسپیرین به‌وسیله‌ی استیلا-سیون گروه‌های آمینوی واکنش‌پذیر موجود در پروتئین‌ها است [۲۳]. در مطالعه قبلی نشان دادیم که آسپیرین گلوکه‌شدن هموگلوبین را مهار می‌کند [۲۴]. هم‌چنین، نشان داده شده است سایر داروهای ضد التهاب مانند ایبوپروفن و دیکلوفناک نیز گلایکه‌شدن را مهار می‌کنند [۱۱]. Fuliang و همکارانش در مطالعه‌ی خود بر روی موش‌های دیابتی مشاهده نمودند که عصاره‌ی پروپولیس باعث کاهش قند خون این موش‌ها گشته و هم‌چنین باعث سرکوب عوامل اکسیدان و کاهش استرس اکسیداتیو می‌گردد. آن‌ها نشان دادند که سطح فروکتوزآمین در موش‌های دیابتی تیمار شده با عصاره پروپولیس کاهش می‌یابد؛ از آن‌جایی‌که این ماده اولین محصول در واکنش گلایکه شدن می-باشد می‌توان نتیجه گرفت که این عصاره می‌تواند باعث مهار این واکنش نیز گردد [۲۵]. در مطالعه‌ای دیگر Leandro و همکارانش اثبات نمودند که پروپولیس از شکنندگی گلبول‌های قرمز جلو-گیری می‌نماید؛ آن‌ها نشان دادند که این اثر می‌تواند مربوط به فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروپولیس باشد [۲۶]. هم‌چنین، یک مطالعه‌ی بالینی دیگر تاییدکننده‌ی اثر پایدارکنندگی پروپولیس بر گلبول‌های قرمز می‌باشد. در این مطالعه نشان داده شده است که میزان اثربخشی پروپولیس وابسته به زمان است و دوره‌های تیمار بلند-مدت، اثرات پایدارتری دارند [۲۷]. ثامنی و همکاران نشان داده‌اند که این عصاره باعث افزایش وزن بدن و مهار افزایش سطح گلوکز خون، کلسترول، کراتینین و تری‌گلیسرید در موش‌های دیابتی می-شود [۲۸]. گلایکه‌شدن باعث ایجاد تغییرات فعالیتی و ساختاری در هموگلوبین از جمله کاهش محتوای آلفا هلیکس و تضعیف اتصال بین هِم و پروتئین می‌شود [۱۰]. گروه هِم به‌طور طبیعی اتصال محکمی به گلوبین دارد و در این حالت دارای جذب نوری در باند سورت است، اما چنانچه این اتصال ضعیف گردد میزان جذب در این ناحیه کاهش می‌یابد و هم‌چنین با تغییر موقعیت هِم در ساختار پروتئین، ممکن است پیک جذبی این گروه به سمت طول‌موج‌های کوتاه‌تر جابه‌جا شود [۱۶]. گلایکه‌شدن هموگلوبین منجر به تغییر ساختار زنجیره‌های گلوبین و در نتیجه تضعیف اتصال و جابه‌جایی گروه هِم می‌گردد که می‌تواند باعث کاهش جذب و جابه‌جایی پیک جذبی شود. هم‌چنین، پیشرفت گلایکه-شدن ممکن است باعث آزاد شدن هِم و تولید محصولات هِمی دارای نشر فلوئورسانس گردد. از این تغییرات ساختاری می‌توان جهت سنجش میزان گلایکه‌شدن به‌صورت کیفی استفاده نمود. در این مطالعه با استفاده از سنجش این تغییرات ساختاری میزان فروکته‌شدن هموگلوبین در حضور و عدم‌حضور عصاره اتانولی پروپولیس بررسی شد. Bose و همکاران نشان داده‌اند که گلایکه-شدن هموگلوبین باعث افزایش رهاسازی هِم و افزایش آهن آزاد می‌شود که می‌تواند باعث افزایش استرس اکسیداتیو ناشی از آهن گردد [۹]. نتایج به‌دست آمده حاکی از آن است که عصاره‌ی پروپولیس قادر به مهار نسبی فروکته‌شدن هموگلوبین است و میزان مهار بستگی به غلظت‌های مختلف عصاره داشته و با افزایش غلظت عصاره میزان مهار نیز افزایش یافته است. نتایج حاصل از مطالعات اسپکتروسکوپی مرئی- ماورابنفش نیز نشان داد که حضور فروکتوز باعث کاهش شدید جذب در ناحیه‌ی باند سورت می‌شود و با گذشت زمان میزان کاهش جذب تشدید می‌شود که نشان‌دهنده‌ی فروکته‌شدن هموگلوبین و تضعیف اتصال هِم می‌باشد. این در حالی‌است‌که حضور عصاره‌ی پروپولیس از کاهش جذب به‌طور نسبی جلوگیری کرده و روند کاهشی جذب را کند می‌کند که نشان‌دهنده‌ی جلوگیری از رهاسازی هِم از پروتئین است. هم‌چنین، اثر مهاری عصاره با افزایش غلظت عصاره افزایش یافته و در بالاترین غلظت عصاره، میزان جذب حدود ۴۵ درصد نسبت به گروه دارای قند افزایش یافته بود. علاوه بر این، نتایج نشان داد که حضور عصاره‌ی پروپولیس از جابه‌جایی باند سورت در هموگلوبین طبیعی (۴۱۴) به سمت طول موج‌های کوتاه‌تر (۴۰۸) در هموگلوبین گلایکه جلوگیری می‌کند. از آنجایی‌که گلایکه‌شدن باعث جابه‌جایی گروه هِم در هموگلوبین و هم‌چنین کاهش جذب و جابه‌جایی پیک جذبی به سمت طول موج‌های کوتاه‌تر می‌گردد، بنابراین احتمالا پروپولیس به‌وسیله‌ی تداخل در واکنش فروکته‌شدن و کاهش فروکته شدن هموگلوبین از ایجاد تغییرات ساختاری و در نتیجه جابه‌جایی هِم جلوگیری نموده است. کاهش جابه‌جایی در طول موج جذبی نیز می‌تواند به-علت پیشگیری از جابه‌جایی هِم در ساختار هموگلوبین باشد. هم-چنین، با افزایش در شدت جذب در نمونه‌های حاوی پروپولیس، از جابه‌جایی طول موج جذبی نیز جلوگیری شده است که نشان-دهنده‌ی پایدار شدن گروه هِم در هموگلوبین است که می‌تواند ناشی از کاهش گلایکه‌شدن و جلوگیری از تغییرات ساختاری در

این پروتئین باشد. در مطالعات تولید محصولات هِمی تولید شده به‌واسطه‌ی گلایکه‌شدن نیز مشاهده شد که وجود قند فروکتوز در مجاورت هموگلوبین باعث افزایش نشر فلوئورسانس ناشی از این محصولات می‌شود و با گذشت زمان میزان نشر به شدت افزایش می‌یابد که نشان‌دهنده‌ی افزایش تولید محصولات هِمی در نتیجه‌ی فروکته‌شدن هموگلوبین است؛ در صورتی‌که حضور عصاره‌ی پروپولیس منجر به کاهش نشر فلوئورسانس گردید؛ به‌طوری‌که با افزایش غلظت عصاره میزان نشر فلوئورسانس کاهش بیشتری داشته و در غلظت سوم عصاره میزان تولید این محصولات تا ۵۰ درصد کاهش یافت. این محصولات هِمی از هِم آزاد شده از هموگلوبین به‌واسطه‌ی گلایکه‌شدن این پروتئین تولید می‌شوند. کاهش نشر فلوئورسانس محصولات هِمی در حضور عصاره‌ی پروپولیس نشان‌دهنده‌ی کاهش فروکته‌شدن هموگلوبین، مهار تغییرات ساختاری آن و رهاسازی هِم هموگلوبین است. تیوفلاوین تی یک رنگ شناساگر است که به فیبرهای آمیلوئیدی متصل می‌شود و با این اتصال دارای خاصیت نشر فلوئورسانس می‌گردد. با استفاده از این رنگ می‌توان میزان نسبی ساختارهای آمیلوئیدی پروتئین‌ها را سنجید و با استفاده از آن ایجاد تغییرات ساختاری در پروتئین را شناسایی نمود. نشان داده شده است که گلایکه‌شدن تغییرات ساختاری در هموگلوبین القا می‌کند و باعث تبدیل ساختارهای آلفا به بتا می‌شود که منجر به کاهش ساختارهای آلفا هلیکس و افزایش میزان ساختارهای رشته‌ای بتا می‌گردد [۱۰]. بنابراین، با افزایش میزان گلایکه‌شدن پروتئین، ایجاد این تغییرات افزایش یافته و میزان بیشتری از ساختارهای آلفا به ساختارهای بتا تبدیل می‌شوند. گلایکه‌شدن به‌وسیله‌ی ایجاد تغییرات ساختاری باعث در معرض قرار گرفتن نواحی آب‌گریز پروتئین و در نتیجه افزایش هیدروفوبیسیته در میوگلوبین می‌گردد و کاهش محتوای آلفا و افزایش ساختارهای بتا را القا می‌کند [۲۹]. در صورت مهار گلایکه‌شدن، میزان این تغییرات و تبدیل ساختارها نیز کاهش می‌یابد. نتایج بررسی‌های ساختاری هموگلوبین به وسیله‌ی تست تیوفلاوین در این مطالعه نشان داد که نمونه‌ی هموگلوبین شاهد به‌طور طبیعی ساختار بتای بسیار کمی دارد و در طی انکوباسیون میزان این ساختارها تغییر محسوسی نمی‌کند، در حالی‌که حضور فروکتوز در مجاورت هموگلوبین باعث افزایش نشر ناشی از تیوفلاوین می‌شود که نشان‌دهنده اتصال میزان بیشتری از این رنگ به ساختار هموگلوبین است. از آنجایی‌که این رنگ به ساختارهای آمیلوئیدی متصل شده و نشر فلوئورسانس ایجاد می‌کند، از این‌رو این مساله نشان می‌دهد که فروکتوز به‌وسیله‌ی گلایکه‌نمودن هموگلوبین باعث القای تغییرات ساختاری و تبدیل ساختارهای آلفا به ساختارهای صفحه‌ای بتا شده است. این در حالی‌است‌که در حضور عصاره‌ی پروپولیس از افزایش نشر جلوگیری شده است که نشان‌دهنده‌ی کاهش تبدیل ساختارهای آلفا به ساختارهای آمیلوئیدی بتا و در نتیجه کاهش گلایکه‌شدن هموگلوبین است. حضور غلظت‌های مختلف پروپولیس میزان گلایکه‌شدن هموگلوبین را کاهش داده و از پیشرفت این واکنش جلوگیری نموده است؛ به‌طوری‌که با افزایش غلظت عصاره میزان نشر کاهش بیشتری یافته و ساختاری‌های آمیلوئیدی کمتری ایجاد شده است. در نتیجه با حفاظت از هموگلوبین در برابر گلایکه‌شدن، تغییرات ساختاری مهار شده و ساختارهای آلفای هموگلوبین حفظ می‌گردد و از تبدیل شدن ساختارهای آلفا به ساختارهای بتا جلوگیری شده است. با توجه به این مطلب که محصولات تولیدی ناشی از گلایکه‌شدن پروتئین‌ها باعث القای استرس اکسیداتیو می‌شوند و در نتیجه روند گلایکه‌شدن را تشدید می‌کنند، از این‌رو کاهش عوامل اکسیداتیو می‌تواند منجر به کاهش گلایکه‌شدن پروتئین‌ها گردد. بنابراین، مکانیسم توجیهی برای اثر مهاری عصاره پروپولیس می‌تواند بدین صورت باشد که این عصاره با توجه به آنکه غنی از عوامل آنتی‌اکسیدان قوی است، احتمالا به‌وسیله‌ی سرکوب عوامل اکسیدان و کاهش استرس اکسیداتیو از گلایکه‌شدن هموگلوبین جلوگیری می‌نماید. از سوی دیگر، با گذشت زمان میزان گلایکه شدن تشدید می‌یابد، درحالی‌که در نمونه‌های حاوی پروپولیس روند افزایشی فروکته‌شدن به‌طور نسبی مهار می‌شود؛ به‌طوری‌که با افزایش غلظت عصاره میزان فعالیت عصاره پروپولیس نیز افزایش یافته و این واکنش را به میزان بیشتری مهار می‌کند که نشان‌دهنده این مطلب است که عصاره پروپولیس با مکانیسمی وابسته به غلظت و زمان فعالیت مهاری خود را القا می‌کند.

## نتیجه‌گیری

نتایج فوق نشان می‌دهند که عصاره‌ی الکلی پروپولیس در غلظت‌های مختلف قادر به کاهش فرآیند فروکته‌شدن هموگلوبین در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد. تفاوت‌های مشاهده شده در میزان مهار در موارد مختلف که در این مطالعه سنجیده شده‌اند، ناشی از تفاوت در معیار سنجش در بخش‌های مختلف است، در نتیجه تفاوت در نتایج حاصل اجتناب‌ناپذیر است. هم‌چنین، در این مطالعه مشاهده شد که میزان فروکته شدن هموگلوبین با گذشت زمان افزایش می‌یابد که این نتایج نشان‌دهنده و تاییدکننده‌ی این امر است که گلایکه‌شدن فرآیندی وابسته به زمان است و با گذشت زمان شدت می‌یابد.

**تشکر و قدردانی**

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

## References:

[1] López BGC, Schmidt EM, Eberlin MN, Sawaya AC. Phytochemical markers of different types of red propolis. ***Food Chem*** 2014; 146: 174–80.

[2] Monzote L, Cuesta-Rubio O, Fernandez MC, Hernandez IM, Fraga J, Pérez K, et al. *In vitro* antimicrobial assessment of Cuban propolis extracts. ***Mem Inst Oswaldo Cruz*** 2012; 107(8): 978-84.

[3] Beyraghdar Kashkooli O, Ebrahimi Dorcheh E, Mahboobi-Soofiani N, Samie A. Long-term effects of propolis on serum biochemical parameters of rainbow trout (Oncorhynchusmykiss). ***Ecotox Environ Saf*** 2011; 74(3): 315–18

[4] Zia M, Mannani R, Mahmoodi M, Bayat M, Mohaghegh F. The Effects of Alcoholic Extract of Propolis Obtained from Iran Bee Hives on the Growth of Trichophyton Mentagrophytis, Trichophyton Rubrum and Trichophyton Verrucosum. ***J Isfahan Med Sch*** 2009; 27(95): 232-41. [in Persian]

[5] Falcãoa SI, Tomás A, Vale N, Gomes P, Freire C, Vilas-Boas M. Phenolic quantification and botanical origin of Portuguese propolis. ***Ind Crop Pro*** 2013; 49: 805–12.

[6] Ho SC, Wub SP, Lin SM, Tang YL. Comparison of anti-glycation capacities of several herbal infusions with that of green tea. ***Food Chem*** 2010; 122: 768–74.

[7] Li J, Liu D, Sun L, Lu Y, Zhang Z. Advanced glycation end products and neurodegenerative diseases: Mechanisms and perspective. ***J Neurol Sci*** 2012; 317(1-2): 1–5.

[8] Wei Y, Han CS, Zhou J, Liu Y, Chen L, He RQ. D-ribose in glycation and protein aggregation. ***Biochim Biophys Acta*** 2012; 1820(4): 488–94.

[9] Bose T, Chakraborti AS. Fructose-induced structural and functional modifications of hemoglobin: Implication for oxidative stress in diabetes mellitus. ***Biochim Biophys Acta*** 2008; 1780(5): 800–08.

[10] 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; 141(6): 827–33.

[11] Harding JJ, Ganea E. Protection against glycation and similar post-translational modifications of proteins. ***Biochim Biophys Acta*** 2006; 1764(9): 1436–46.

[12] Riggs A. Preparation of blood hemoglobins of vertebrates. ***Methods Enzymol*** 1981; 76: 5-29.

[13] 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; 72: 248-54.

[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; 49(1): 86–92

[15] 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; 33(8): 745-51.

[16] 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; 105(2-3): 743-55.

[17] Nagababu E, Rifkind JM. Formation of fluorescent heme degradation products during the oxidation of hemoglobin by hydrogen peroxide. ***Biochem Biophys Res Commun*** 1998; 247(3): 592-6.

[18] Schmitt A, Schmitt J, Münch G, Gasic-Milencovic J. Characterization of advanced glycation end products for biochemical studies: side chain modifcations and fluorescence characteristics. ***Anal Biochem*** 2005; 338(2): 201-15.

[19] Sforcina JM, Bankovab V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? ***J Ethnopharmacol*** 2011; 133(2): 253–60.

[20] Kumazawa Sh, Hamasaka T, Nakayama T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. ***Food Chem*** 2004; 84: 329–39.

[21] Yamagishi S, Matsui T. Advanced glycation end products, oxidative stress and diabetic nephropathy. ***Oxid Med Cell Longev*** 2010; 3(2): 101-8.

[22] 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): 1097-103.

[23] Shi Q, Yan H, Li MY, Harding JJ. Effect of a combination of carnosine and aspirin eye drops on streptozotocin - induced diabetic cataract in rats. ***Mol Vis*** 2009; 15: 2129-38.

[24] Divsalar A, Behroozi J, Saboury AA, Poursasan N. Preservative effects of Aspirin on Human Hemoglobin glycation in Diabetic Condition. ***Armaghan Danesh*** 2013; 18(6): 10. [in Persian]

[25] 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; 51(2): 147-52.
[26] Moreira LL, Dias T, Dias LG, Rogão M, Da Silva JP, Estevinho LM. Propolis influence on erythrocyte membrane disorder (hereditary spherocytosis): A first approach. ***Food Chem Toxicol*** 2011; 49(2): 520-6.
[27] Jasprica I, Mornar A, Debeljak Ž, Smolčić-Bubalo A, Medić-Šarić M, Mayer L, et al. In vivo study of propolis supplementation effects on antioxidative status and red blood cells. ***J Ethnopharmacol*** 2007; 110(3): 548-54.
[28] Sameni H, Ramhormozi P, Bandegi A, Taherian A, Safari M, Amjad M. Effects of hydroalcoholic extract of Iranian Propolis on blood serum biochemical factors in streptozotocin-induced diabetic rats. ***Koomesh*** 2014; 15(3): 388-95. [in Persian]
[29] Roy A, Sil R, Chakraborti AS. Non-enzymatic glycation induces structural modifications of myoglobin. ***Mol Cell Biochem*** 2010; 338(1-2): 105-14.