مقاله پژوهشی

بررسی اثر هم افزایی آسپیرین و زهر زنبور عسل در مهار گلایکه شدن در شرایط دیابتی

عادله دیوسالار[1]، جواد بهروزی[2]، علی اکبر صبوری[3]

[1] استادیارگروه سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

[2] کارشناس ارشد گروه سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

[3] استاد مرکز تحقیقات بیوشیمی بیوفیزیک، دانشگاه تهران، تهران، ایران

نشانی نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی، گروه سلولی و مولکولی، دکتر عادله دیوسالار

E-mail: divsalar@khu.ac.ir

وصول:۹۲/۱۲/۲۲، اصلاح:۹۲/۱۲/۲۶، پذیرش:۹۳/۱/۲۳

چکیده

سابقه و هدف: بیماری دیابت یکی از شایعترین بیماری‌های سیستم غدد درون ریز بدن می‌باشد. در این بیماری به دلیل افزایش سطح گلوکز خون میزان گلایکه‌شدن پروتئین‌ها نیز افزایش می‌یابد. گلایکه‌شدن پروتئین‌ها در دیابت منجر به عوارض جبران ناپذیری می‌شود. هدف از انجام تحقیق حاضر بررسی اثر هم‌افزایی زهر زنبور عسل و آسپیرین در میزان گلایکه‌شدن پروتئین هموگلوبین انسانی در حضور گلوکز بوده است.

مواد و روشها: در این مطالعه تجربی هموگلوبین (۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به مدت ۵ هفته در حضور و عدم حضور قند گلوکز (٤٠ میلی‌مولار)، آسپیرین (۲/۵ میلی‌مولار) و زهر زنبور (در غلظت‌های مختلف ۱۰، ۲۰ و ٤٠ میکروگرم در میلی‌لیتر) انکوبه گردید. میزان گلایکه شدن هموگلوبین از طریق بررسی تغییرات در باند سورت، میزان تخریب هم موجود در ساختمان هموگلوبین و تغییرات بوجود آمده در ساختمان دوم آن به ترتیب با استفاده از روشهای طیف سنجی مرئی- ماوراء بنفش، فلوریمتری و طیف سنجی دو رنگ نمایی حلقوی تعیین گردید. نتایج با استفاده از نرم‌افزار InStat 3 و آزمون های آماری آنالیز واریانس یک طرفه و تست توکی تجزیه و تحلیل شدند. مقادیر $p<۰/۰۵$ در هر مورد معنی‌دار تلقی گردید.

یافته‌ها: انکوباسیون هموگلوبین در حضور گلوکز باعث کاهش میزان جذب باند سورت، تخریب هم موجود در ساختار آن و افزایش مقدار صفحات بتا در ساختمان دوم هموگلوبین گردید. حضور هم‌زمان زهر زنبور و آسپیرین باعث کاهش ۳٦ درصدی در میزان تخریب گروه هم هموگلوبین ($p<۰/۰۰۱$) و کاهش ٥٤ درصدی در میزان تشکیل صفحات بتا شد ($p<۰/۰۰۱$). همچنین میزان تغییرات ساختاری و در نتیجه میزان گلایکه‌شدن هموگلوبین نیز کاهش چشمگیری نشان داد.

نتیجه‌گیری: زهر زنبور و آسپیرین دارای خاصیت ضد گلایکه‌کنندگی چشمگیری می‌باشند و استفاده همزمان از این دو ماده می‌تواند گلایکه‌شدن پروتئین‌ها را کاهش دهد.

واژه های کلیدی: *دیابت، گلایکه‌شدن، زهر زنبور، آسپیرین.*

مقدمه

بیماری دیابت یک اختلال متابولیسمی است که به دنبال کمبود کامل یا نسبی ترشح انسولین، یا اختلال در پاسخ‌دهی بافت‌های بدن به انسولین بوجود می‌آید (۱). طبق پیش‌بینی‌های سازمان بهداشت جهانی (WHO) تعداد مبتلایان به دیابت طی ۱۰ سال آینده از ۲٤٦ میلیون نفر به ۳۸۰ میلیون نفر خواهد رسید (۲). در ایران نیز شیوع بیماری صرفنظر از نوع آن حدود ۵ الی ٦ درصد می باشد و در حال حاضر حدود ٤ میلیون نفر در ایران دارای دیابت آشکار بوده و یا مستعد ابتلا به آن می باشند (۳).

علت اصلی دیابت نوع یک مشکل درتولید و ترشح انسولین از سلولهای بتاواقع در پانکراس می باشد در حالی که در دیابت نوع دو مقاومت به انسولین وجود دارد، بنابر این در هر دو نوع در ورود گلوکز به سلولها مشکل وجود دارد و گلو کز در خون تجمع می یابد. بالا رفتن گلوکز خون موجب گلایکه شدن پروتئین‌ها می شود که در نهایت باعث تشکیل محصولات نهایی گلایکه شدن (Advanced Glycation End-products) یا همان AGE ها می‌شود (٤).

گلایکه‌شدن واکنش غیراختصاصی و غیرآنزیمی قندها و پروتئین‌ها است و در هر جایی که پروتئین در تماس با قند باشد این واکنش اتفاق خواهد افتاد. البته میزان گلایکه شدن با افزایش سن ، افزایش میزان قند و همچنین با از دست رفتن عملکرد پروتئین افزایش می‌یابد.در افراد دیابتی میزان قند، وسعت گلایکه شدن و میزان آسیب‌ها به موازات هم افزایش می‌یابد (۵). ازدیاد مزمن قند خون نقش مهمی در آسیب‌زائی مشکلات دراز مدت این بیماران دارد، به طوری که بیمارانی که کنترل ضعیفی بر گلوکز خون دارند، بیشتر در خطر هستند (٦).

هموگلوبین از جمله پروتئین‌های با نیمه عمر بالاست که در افراد دیابتی به میزان افزایش یافته‌ای گلایکه می‌شود. بررسی‌هایی که تا کنون بر روی گلایکه‌شدن هموگلوبین انجام شده نشان دهنده‌ی این است که گلایکه‌شدن اثرات ساختاری و عملکردی بر روی هموگلوبین دارد که ممکن است این تغییرات مسبب عوارض پاتوفیزیولوژیکی دیابت باشند (۷). گلایکه‌شدن باعث کاهش و از بین رفتن پیک جذبی سورت در هموگلوبین می‌شود (۸). همچنین هموگلوبین گلایکه نسبت به هموگلوبین غیرگلایکه فعالیت پراکسیدازی کمتری دارد (۹, ۱۰). در مقابل HbA1c تمایل بالاتری نسبت به اکسیژن دارد (۱۱).

تغییرات ساختاری که در اثر گلایکه‌شدن در هموگلوبین اتفاق می‌افتد به این صورت گزارش شده اند که؛ HbA1c نسبت به حالت طبیعی محتوای مارپیچ آلفای کمتر، دسترسی کمتر رزیدوهای تریپتوفان، میزان دناتوراسیون دمایی بیشتر و اتصال هم به گلوبین ضعیف‌تری دارد (۱۲). همچنین گلایکه‌شدن باعث افزایش هیدروفوبیسیته هموگلوبین می‌شود و با کاهش محتوای مارپیچ آلفا و افزایش محتوای صفحات بتا شاهد تبدیل ساختار آلفا به بتا و متعاقب آن شکل‌گیری صفحات آمیلوئیدی بوده‌اند (۱۳).

آسپیرین یا همان استیل سالیسیلیک اسید که در حدود یک قرن پیش سنتز شد، بیشترین مصرف دارویی را در دنیا دارد. این دارو اغلب به صورت یک مسکن (Analgesic) دردهای خفیف را رفع نموده و به عنوان یک تب بر (Anti-pyretic)، تب را کاهش می‌دهد و به عنوان یک داروی ضد التهاب نیز عمل می‌نماید. مکانیسم عمل آن از طریق مهار کردن برگشت‌ناپذیر آنزیم سیکلو اکسیژناز۱ از اطریق استیلاسیون سرین ۵۲۹ آن صورت می‌گیرد و از تبدیل شدن آراشیدونیک اسید به ترومبوکسان A2 جلوگیری می‌کند (۱٤, ۱۵). مصرف آسپیرین میزان تشکیل آب مروارید را در بیماران دیابتی به صورت چشمگیری کاهش می دهد (۱٦). تصور بر این است که این عمل از طریق استیله کرده گروه های آمین موجود در پروتئین ها صورت می گیرد (۱۷).آزمایش های انجام شده کاهش کمی را در سطح گلوکز رت‌های دیابتی

تحت درمان با آسپیرین نشان داده است. همچنین تحقیقات انجام یافته بر روی رتهای دیابتی اثر آسپیرین بر میزان تشکیل AGE ها را به اثبات رسانده است (۱۸).

زهر زنبور از گذشته های دور به عنوان یک داروی سنتی برای درمان بیمارهای مختلفی مانند آرتریت روماتوئید، مولتیپل اسکلروزیس، نقرس، عفونت، سوختگیها، ترمیم زخمها و تسکین درد مورد استفاده بوده است (۱۹). این ترکیب دارای ۱۸ جزء فعال می‌باشد. این ماده حاوی پپتیدهای مختلفی ازجمله ملیتین، آپامین، آدولاپین، آنزیم‌هایی ازجمله هیالورونیداز و فسفولیپاز A2 (PLA2)، آمین‌های فعال بیولوژیکی نظیر هیستامین و اپی‌نفرین و اجزاء غیر پپتیدی با خواص دارویی فراوان می باشد (۲۰). ملیتین و PLA2 بعنوان دو جزء اصلی زهر زنبور (BV) در نظر گرفته می‌شوند (۲۱) خاصیت ضد گلایکیشن آسپیرین وهمچنین خاصیت آنتی اکسیدانی زهر زنبور در پژوهش های قبلی به اثبات رسیده است. از آنجا که مواد آنتی اکسیدان دارای خواص آنتی گلایکیشن نیز می باشند هدف از انجام تحقیق حاضر بررسی اثر هم افزایی آسپیرین و زهر زنبور در جلوگیری از گلایکه شدن پروتئین هموگلوبین انسانی است.

مواد و روش‌ها

آماده سازی و تعیین غلظت هموگلوبین

هموگلوبین از افراد سالم و غیرسیگاری طبق پروتوکل Austen Riggs استخراج گردید (۲۲) که در اینجا به طور خلاصه ارائه می شود. خون گرفته شده برای جلوگیری از لخته شدن با سدیم سیترات (خریداری شده از شرکت مرک) ٤ درصد به نسبت حجمی ۹ به ۱ مخلوط شد. سرم با استفاده از سانتریفوژ (مدل Hitachi) با دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ٤ درجه سانتیگراد جدا شد. رسوب باقیمانده با استفاده از سالین ۹ درصد چندین بار شستشو داده شد. با استفاده از آب سرد گلبول‌های قرمز لیز شده و قطعات غشایی و مواد زائد توسط سانتریفوژ با دور ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ٤ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه جدا شدند. با استفاده از آمونیوم سولفات (خریداری شده از شرکت مرک) ۲۰ درصد پروتئین‌های اضافی رسوب داده شدند، بدین ترتیب هموگلوبین خالص پس از یک ساعت سانتریفوژ با دور ۱٤۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ٤ درجه سانتیگراد در محلول رویی وجود خواهدداشت. در نهایت برای خالص سازی بیشتر و حذف مواد اضافه، دیالیز در برابر بافر فسفات به مدت ۷۲ ساعت و در دمای ٤ درجه سانتیگراد انجام شد. هموگلوبین استخراج شده، توسط روش برادفورد (۲۳)، و با کمک طیف سنجی مرئی-ماوراء بنفش (مدل شیمادزو) تعیین غلظت گردید.

انکوباسیون

در این تحقیق از هموگلوبین به عنوان پروتئین کنترل، از گلوکز(خریداری شده از شرکت مرک) به عنوان قند گلایکه کننده و از دو ماده آسپیرین (خریداری شده از شرکت سیگما) و زهر زنبور عسل (خریداری شده از دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات) به عنوان مواد ضد گلایکه شدن استفاده گردید. بدین منظور هموگلوبین با غلظت ۱۰ mg/ml در حضور و عدم حضور گلوکز با غلظت ٤۰ mM به مدت ۵ هفته در دمای ۳۷ درجه و دور شیکر ٤۰ دور در دقیقه انکوبه گردید. از زهر زنبور در سه غلظت ۱۰، ۲۰ و ٤۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به همراه آسپیرین در غلظت ۲/۵ میلی مولار جهت بررسی اثر هم افزایی آنها در جلوگیری از گلایکه شدن استفاده گردید.

بررسی میزان تخریب گروه هِم در هموگلوبین

میزان تخریب گروه هم موجود در هموگلوبین که به عنوان معیاری از گلایکه شدن می‌باشد توسط بررسی میزان تولید محصولات فلورسانس ناشی از تخریب سنجیده شد (٢٤). محصول تولیدی یک فلوروفور است که ساختار غیر پروتئینی دارد و به عنوان نتیجه نهایی گلایکه شدن هموگلوبین در نظر گرفته می شود. بدین منظور، نمونه ها با استفاده از دستگاه فلوئورسانس (مدل

cary) در طول موج ٤٦٠ نانومتر تحریک شده و میزان نشر آن در طول موج ٥٤٠ نانومتر ثبت شد.

بررسی وضعیت فیبریلار در هموگلوبین

با استفاده از روش بررسی وضعیت فیبریلار و با بررسی تغییرات نشر فلوئورسانس تیوفلاوین T (خریداری شده از شرکت سیگما)، میزان گلایکه‌شدن پروتئین‌ها در شرایط مختلف ارزیابی گردید. از آنجا که به هنگام گلایکه‌شدن پروتئین‌ها محتوای صفحات بتای آنها افزایش می یابد، می‌توان با استفاده از تیوفلاوین T که ترکیبی با توانایی اتصال به صفحات بتا می‌باشد میزان گلایکه‌شدن پروتئین‌ها را بررسی نمود. برای این کار از محلول تازه تهیه شده تیوفلاوین T استفاده گردید. غلظت تیوفلاوین در این محلول ١ mg/ml بود. ٤ میکرولیتر از محلول پروتئین (با غلظت ١٠ mg/ml) در داخل هر کدام از چاهک های پلیت ٩٦ خانه که در آن ها ٢٠٠ میکرولیتر بافر فسفات از قبل ریخته شده بود، اضافه شد. در نهایت ٢ میکرولیتر از محلول تیوفلاوین T به آن اضافه شد و تغییرات در نشر فلوئورسانس نمونه ها با تحریک در طول موج ٤٥٠ نانومتر و نشر در طول موج ٤٩٠ قرائت شد (٢٥).

بررسی میزان جذب و جابجایی باند سورت هموگلوبین

از طیف سنجی مرئی- ماوراء بنفش جهت بررسی وضیت هم موجود در هموگلوبین در حضور زهر زنبور و آسپیرین استفاده گردید. برای این کار نمونه پروتئینی با غلظت ٣٣μg/ml تهیه شد و جذب در ناحیه ٤٤٠-٣٨٠ نانومتر خوانده شد (٨).

بررسی ساختمان دوم پروتئین با استفاده از طیف سنجی دو رنگ نمایی حلقوی

برای بررسی ساختمان دوم پروتئین از اسپکتروپلاریمتر AVIV (ساخت کشور امریکا) استفاده شد. بدین منظور محلول پروتئینی با غلظت ٠/٢ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه گردید. برای عمل رقیق‌سازی از بافر - سالین استفاده شد. بررسی نمونه‌ها در ناحیه‌ی فرابنفش دور (طول موج‌های ١٩٠ تا ٢٦٠ نانومتر) انجام شد. در پایان از نرم‌افزار CDNN برای آنالیز داده‌ها استفاده گردید (٢٦).

در نهایت داده‌های بدست آمده از آزمایشات با استفاده از نرم افزار InStat 3 و آزمون های آماری آنالیز واریانس یک طرفه و تست توکی تجزیه و تحلیل شدند. مقادیر $p < ٠/٠٥$ در هر مورد معنی‌دار تلقی گردید.

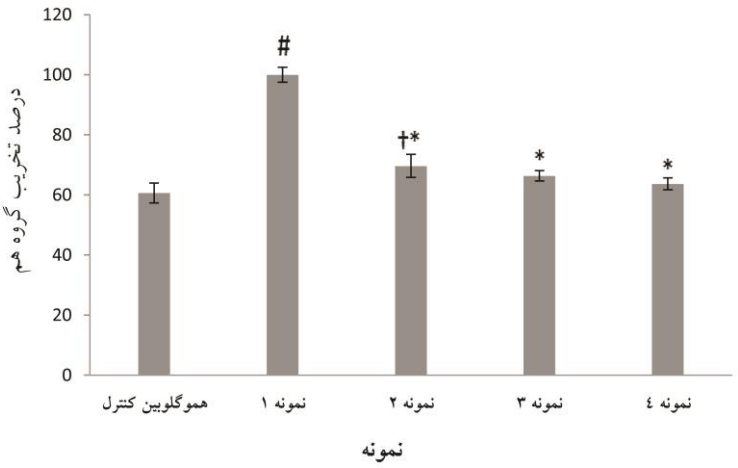
یافته‌ها

نتایج مربوط به بررسی میزان تخریب گروه هم موجود در هموگلوبین

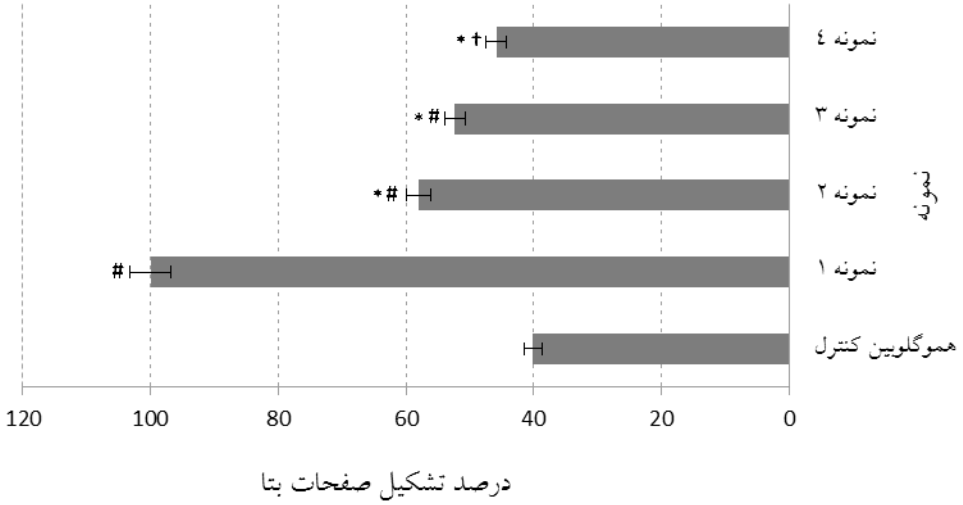
در طی گلایکه‌شدن هموگلوبین گروه هم (Heme) موجود در ساختار آن تخریب می‌گردد، در نتیجه می‌توان با اندازه گیری میزان تخریب گروه هم (Heme) میزان کلایگه شدن هموگلوبین را مشخص کرد. همانطور که در شکل ١ ملاحظه می شود انکوباسیون هموگلوبین در حضور گلوکز به مدت ٥ هفته باعث افزایش نشر فلوئورسانس محصولات ناشی از تخریب گروه هم شده است. حضور آسپیرین و زهر زنبور در غلظت‌های ١٠، ٢٠ و ٤٠ میکروگرم در میلی لیتر در محیط به ترتیب باعث کاهش ٣٠، ٣٤ و ٣٦ درصدی در میزان تخریب گروه هم و در نتیجه کاهش میزان گلایکه شدن گردید ($p <٠/٠٠١$). در حضور غلظت های ٢٠ و ٤٠ میکروگرم در میلی لیتر از زهر زنبور و غلظت ٢/٥ میلی مولار آسپیرین میزان تخریب گروه هم تفاوت معناداری با گروه هموگلوبین کنترل نداشت، بدین مفهوم که در غلظت های ذکر شده گلایکه شدن هموگلوبین مهار شده است ($p >٠/٠٥$).

نتایج مربوط به بررسی وضعیت فیبریلار در هموگلوبین

پس از ٥ هفته انکوباسیون هموگلوبین در حضور گلوکز میزان تیوفلاوین اتصال یافته به آن، نشر فلوئورسانس و در نتیجه میزان گلایکه شدن به طور قابل



شکل ۱: درصد تخریب گروه هم در شرایط مختلف انکوباسیون. نمونه ۱ (هموگلوبین در حضور گلوکز)، نمونه ۲ ،۳ و ٤ (هموگلوبین در حضور آسپیرین و غلظت های ۱۰، ۲۰ و ٤۰ میکروگرم در میلی لیتر از زهر زنبور). # تفاوت معنادار با گروه هموگلوبین کنترل (p <۰/۰۰۱)،† تفاوت معنادار با گروه هموگلوبین کنترل (p < ۰/۰۵)،* تفاوت معنادار با گروه نمونه ۱ (p <۰/۰۰۱).

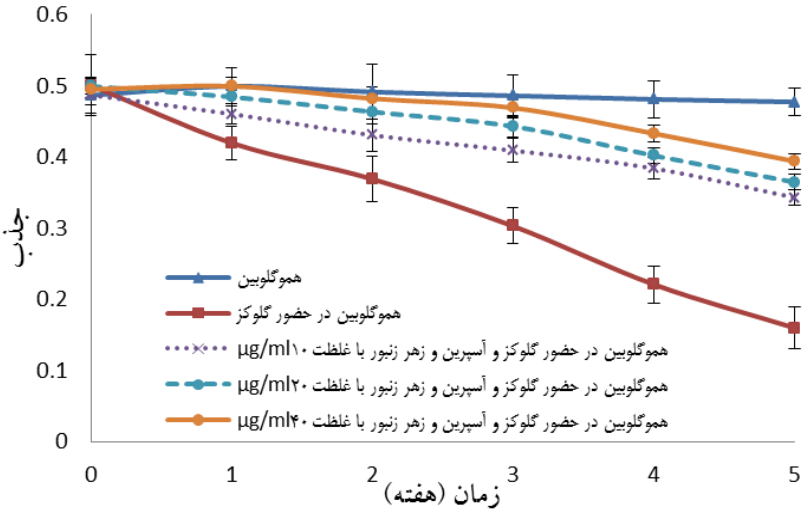


شکل ۲: میزان تشکیل صفحات بتا در شرایط مختلف انکوباسیون. نمونه ۱ (هموگلوبین در حضور گلوکز)، نمونه ۲ ،۳ و ٤ (هموگلوبین در حضور آسپیرین و غلظت های ۱۰، ۲۰ و ٤۰ میکروگرم در میلی لیتر از زهر زنبور). # تفاوت معنادار با گروه هموگلوبین کنترل (p <۰/۰۰۱)،† تفاوت معنادار با گروه هموگلوبین کنترل (p < ۰/۰۵)،* تفاوت معنادار با گروه نمونه ۱ (p <۰/۰۰۱).

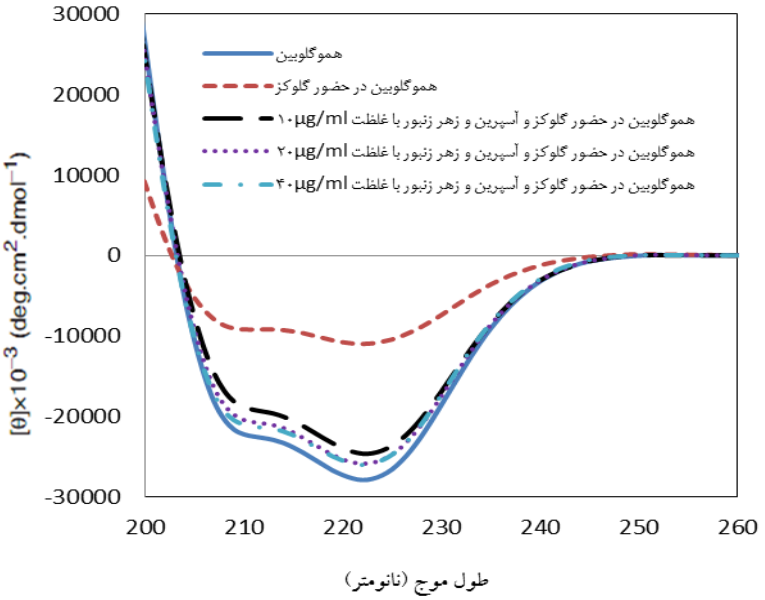
ملاحظه ای افزایش یافته است. همانطوری که نتایج موجود در شکل ۲ نشان می دهند، گلایکه‌شدن هموگلوبین باعث افزایش ٦۰ درصدی در میزان صفحات بتا در ساختمان دوم این پروتئین شده است (p <۰/۰۰۱). آسپیرین و زهر زنبور در غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ٤۰ میکروگرم در میلی لیتر تشکیل صفحات بتا و گلایکه شدن را به ترتیب به میزان٤۲، ٤۸ و ٥٤ درصد کاهش دادند (p <۰/۰۰۱). این کاهش در میزان گلایکه شدن وابسته به غلظت زهر زنبور می باشد.

نتایج مربوط به بررسی میزان جذب و جابجایی باند سورت هموگلوبین

گلایکه‌شدن باعث کاهش میزان جذب باند سورت هموگلوبین گردید. این کاهش در میزان جذب در طی هفته‌های پایانی انکوباسیون سرعت بیشتری نسبت به هفته های شروع انکوباسیون دارد (شکل ۳). عملکرد هم افزایی آسپیرین و زهر زنبور در جلوگیری از کاهش جذب هموگلوبین قابل توجه می باشد. بالاترین غلظت استفاده شده از زهر زنبور به همراه آسپیرین مانع از کاهش



شکل ۳: میزان کاهش جذب در ناحیه باند سورت (٤١٢ نانومتر) در اثر گلایکه‌شدن هموگلوبین انسانی در حضور گلوکز و اثر آسپیرین و غلظت های مختلف زهر زنبور



شکل ٤: طیف **CD** مربوط به هموگلوبین در شرایط مختلف انکوباسیون هموگلوبین انسانی با گلوکز در حضور و عدم حضور غلظت های مختلف زهر زنبور عسل وآسپیرین

جدول ۱: درصد مربوط به ساختارهای دوم هموگلوبین پس از ٥ هفته انکوباسیون در حضور و عدم حضور گلوکز با غلظت ٤٠ میلی‌مولار، حضور و عدم حضور آسپیرین با غلظت ۲/٥ میلی‌مولار و زهر زنبور با غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ٤٠ میلی‌گرم در میلی‌لیتر

نوع نمونه	ساختارهای دوم مختلف	مارپیچ آلفا (٪)	صفحه بتا (٪)	رندم کویل (٪)
هموگلوبین		۷۰/۳	۱۳/٥	۱۶/۲
هموگلوبین در حضور گلوکز		٤۱/٤	۳۱/۲	۲۷/٤
هموگلوبین در حضور گلوکز و آسپیرین و زهر زنبور با غلظت ۱۰μg/ml		۶۰/۲	۲۰/۳	۱۹/٥
هموگلوبین در حضور گلوکز و آسپیرین و زهر زنبور با غلظت ۲۰μg/ml		۶۶/۱	۱۸/٤	۱٥/٥
هموگلوبین در حضور گلوکز و آسپیرین و زهر زنبور با غلظت ٤٠μg/ml		۶۷/٤	۱٥/۹	۱۶/۷

میزان جذب در هفته اول و دوم شده اند. نتایج حاصل اثر هم افزایی زهر و آسپیرین در جلوگیری از گلایکه شدن را در یک روند وابسته به غلظت زهر زنبور نشان می دهند.

نتایج مربوط به بررسی ساختمان دوم پروتئین

در این پژوهش از مطالعات طیف سنجی دو رنگ نمایی حلقوی برای بررسی تغییرات بوجود آمده در اثر گلایکه‌شدن در ساختار هموگلوبین و همچنین اثر زهر زنبور و آسپیرین در این تغییرات، استفاده شد. شکل ٤

طیف CD هموگلوبین را در ناحیه فرابنفش دور و در شرایط مختلف انکوباسیون نشان می دهد. داده‌های حاصل از این طیف، از بین رفتن نسبی ساختار دوم پروتئین در حضور قند گلوکز را نشان دادند. گلایکه شدن باعث کاهش میزان بیضی واری در ناحیه ۲۱۰ تا ۲۳۰ نانومتر شد که به مفهوم کاهش میزان محتوای مارپیچ آلفا در پروتئین گلایکه شده می‌باشد، انکوباسیون در حضور زهر زنبور و آسپیرین مانع از کاهش میزان بیضی‌واری و در نتیجه مانع از گلایکه‌شدن گردید. مطالعات طیف سنجی دو رنگ نمایی حلقوی نشان داد زهر زنبور و آسپیرین در یک روند وابسته به غلظت مانع از تغییر در ساختار دوم هموگلوبین در طی گلایکه شدن می‌گردد.

جدول ۱ درصد ساختارهای مختلف هموگلوبین گلایکه و هموگلوبین در حضور آسپیرین و غلظت های مختلف زهر زنبور نشان می دهد. همانگونه که در این جدول ملاحظه می شود انکوباسیون هموگلوبین در حضور گلوکز منجر به کاهش چشمگیری در محتوای مارپیچ آلفا و متعاقبا افزایش قابل توجهی در محتوای صفحات بتا گردیده است. حضور هم زمان زهر زنبور و آسپیرین در محیط انکوباسیون درصدهای مختلف مربوط به ساختار دوم هموگلوبین را به هموگلوبین کنترل نزدیک کرده است که نشان از مهار گلایکه شدن هموگلوبین توسط این دو ماده می باشد.

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه مشخص گردید که زهر زنبور به همراه آسپیرین قادر به مهار گلایکه شدن هموگلوبین انسانی در حضورگلوکز می باشند. میزان مهار وابسته به غلظت زهر زنبور بوده و همراه با افزایش غلظت زهر زنبور میزان مهار گلایکه شدن نیز افزایش می یابد. مطالعات اوریوس و همکارانش اثر مهاری آسپیرین در گلایکه شدن کلاژن را به اثبات رسانده است (۲۷). همچنین تحقیقات یان و همکارانش خاصیت ضد گلایکه کنندکی آسپیرین بر روی پروتئین کریستالین را به اثبات رساند (۲۸). نتایج حاصل از تحقیقات ما در تطابق کامل با کارهای قبلی بوده و خاصیت ضد گلایکه کنندگی آسپیرین را تایید کرد.

بر اساس جستجوهای انجام شده در پایگاه های اطلاعاتی مختلف تا لحظه ارسال این مقاله در مورد اثرات ضد دیابت و ضد گلایکه کنندگی زهر زنبور گزارشی گزارشی مشاهده نشده است و لذا مطالعه ما اولین گزارش در مورد خاصیت ضد گلایکه کنندگی این ماده است. اما گزارش های مختلفی درباره سایر اثرات درمانی زهر زنبور صورت گرفته است. سن و همکارانش اثر چشمگیر زهر زنبور در مهار تکثیر انواع مختلفی از سلول‌های سرطانی مانند سلولهای سرطانی کلیوی، کبدی، ریوی، و لوکمی گزارش کرده اند (۲۰). همچنین ساح و همکارانش نشان دادند که زهر زنبور درمانی از طریق طب سوزنی در موشهای آرتریت روماتوئیدی القاء شده با کلاژن تیپ دو کاهش ۸۰ ٪ فعالیت پروتئازهای سیتوپلاسمی، لیزوزومی و ماتریکسی و همچنین کاهش چشمگیر سطح گونه های اکسیژن واکنشی را به دنبال دارد (۱۹).

در حالی که خاصیت ضد گلایکیشن آسپیرین هم در حیوانات مدل و هم در محیط in vitro به اثبات رسیده است، در مورد مکانیسم اثر آسپیرین در جلوگیری از گلایکه‌شدن دیدگاه های مختلفی وجود دارد. برخی مطالعات قبلی اثر کاهندگی قند خون توسط آسپیرین را از طریق کاهش جذب روده‌ای گلوکز، کاهش گلوکونئوژنز کبدی و کاهش پاک‌سازی انسولین در افراد سالم یا مقاوم به انسولین نشان داده است (۲۹). با وجود این، برخی محققین معتقد می‌باشند که آسپیرین به واسطه استیله کردن گروه‌های آمین پروتئین‌ها، به عنوان مهار کننده فرایند گلایکه‌شدن پروتئین‌ها شناخته شده است. از طرفی تعدادی از محققین نیز کاهش استرس اکسیداتیو و متعاقب آن، کاهش میزان گلایکه شدن را مکانیسم احتمالی می‌دانند (۲۷).

مطالعات قبلی نشان داده‌اند که زهر زنبور عسل از طریق جلوگیری از فعال شدن فاکتور هسته‌ای کاپا (NF-κB) خاصیت ضدالتهابی خود را نشان می‌دهد (۳۰). پپتید MCD (Mast cell degranulating peptide) موجود در زهر زنبور مسئول خاصیت ضدالتهابی زهر می‌باشد (۳۱). همچنین در تحقیقات رکا و همکارانش زهر زنبور عسل به صورت قابل ملاحظه‌ای مانع از پراکسیداسیون غیر آنزیمی لیپیدها گردید و خاصیت آنتی اکسیدانی این ماده را به اثبات رسانید. ولی از آنجایی که مطالعه حاضر اولین گزارش در مورد خاصیت ضد گلایکیشن زهر زنبور می باشد نمی توان به صورت قطعی در مورد مکانیسم عمل ضد گلایکه‌کنندگی این ماده اظهار نظر کرد. ولی با توجه به خاصیت آنتی اکسیدانی قوی این ماده مکانیسم احتمالی برای خاصیت ضدگلایکیشن، کاهش استرس اکسیداتیو در محیط و کاهش میزان گلایکه شدن از این طریق است (۳۲). در هر حال برای مشخص شدن مکانیسم دقیق نیاز به تحقیقات بیشتری می‌باشد.

مکانیسم ضد گلایکه کنندگی در ترکیبات مختلف متفاوت است. برخی از این ترکیبات گروه‌های آمین آزاد روی پروتئین ها را مسدود کرده و از گلایکه‌شدن آنها توسط قند جلوگیری می‌کنند (۳۳). عده‌ی دیگری از این ترکیبات گروه‌های کربونیل روی قندهای احیاءکننده و محصولات آمادوری را مسدود کرده و در نتیجه گلایکه‌شدن و تشکیل AGE را به طور مؤثر کاهش می‌دهند، این ترکیبات به دلیل اینکه عملکرد طبیعی پروتئین‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهند خود نیز دارای عوارض جانبی خواهند بود. در عمل ترکیباتی که از طریق کاهش میزان اکسیداسیون و یا از طریق مهار AGE باعث کاهش گلایکه‌شدن می‌شوند عوارض کمتری خواهند داشت (۳٤).

در بررسی‌های مربوط به میزان تخریب گروه هم (Heme) گروه کنترل نیز تخریب نسبتا بالایی را نشان می‌دهد. این موضوع با توجه به اینکه پروتئین ها دارای نیمه عمر محدود می‌باشند و در شرایط انکوباسیون تخریب گروه هم موجود در هموگلوبین کنبرل نیز صورت می‌پذیرد، منطقی بوده و در توافق کامل با آزمایشات قبلی می باشد. در مورد میزان تشکیل صفحات بتا در گروه کنترل نیز باید به این نکته توجه نمود که پروتئین هموگلوبین در حالت طبیعی دارای صفحات بتا در ساختار خود می‌باشد و حضور صفحات بتا در هموگلوبین کنترل ناشی از این امر می‌باشد (۱۳).

یافته های مطالعه حاضر نشان می دهد که گلایکه‌شدن هموگلوبین منجر به تغییر در ساختار دوم آن، تخریب گروه هم موجود در آن و کاهش میزان جذب باند سورت آن می شود. حضور آسپیرین و زهر زنبور در محیط هموگلوبین تا حد زیادی مانع از تغییرات القاء شده در اثر گلایکه شدن می شود. از آنجا که این مطالعه به صورت in vitro صورت گرفت، برای بررسی اثر زهر زنبور و آسپیرین در in vivo می توان از تزریق همزمان آسپیرین و زهر زنبور در موش های دیابتی بهره گرفت.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه خوارزمی بدلیل حمایت مالی از این پژوهش اعلام می‌داریم.

References

1. Matthaei S SM, Kellerer M, Häring H. Pathophysiology and Pharmacological Treatment of Insulin Resistance. Endocr Rev. 2000;21(6):585-618.
2. Niknam M, Paknahad Z. Association between High Doses Consumption of Niacin and Type 2 Diabetes. J Babol Univ Med Sci. 2012;14(6):45-54.[Persian]
3. Roghani M, Baluchnejadmojarad T, Roghani-Dehkordi F. Antihyperglycemic and hyperlipidemic effect of chronic administration of hesperetin in diabetic rats. J Babol Univ Med Sci. 2010;12(4):21-6.[Persian]

4. Ahmed N. Advanced glycation endproducts: role in pathology of diabetic complications. Diabetes Res Clin Pract 2005;67(1):3-21.
5. Harding J, Ganea E. Protection against glycation and similar post-translational modifications of proteins. Biochim Biophys Acta. 2006;1764(9):1436-46.
6. Srinivasan K, Ramarao P. Animal models in type 2 diabetes research: An overview. Indian J Med Res 2007;125(3):451-72.
7. Selvaraj N, Bobby Z, Sridhar MG. Increased glycation of hemoglobin in chronic renal failure: [corrected]potential role of oxidative stress. Arch Med Res. 2008;39(3):277-84.
8. 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.
9. Sen S, Bose T, Roy A, Chakraborti AS. Effect of non-enzymatic glycation on esterase activities of hemoglobin and myoglobin. Mol Cell Biochem. 2007; 301(1-2):251-7.
10. Kar M, Chakraborti AS. Effect of glycosylation on iron-mediated free radical reactions of hemoglobin. Current Science. 2001;80(6):770-3.
11. Pu LJ, Shen Y, Lu L, Zhang RY, Zhang Q, Shen WF. Increased blood glycohemoglobin A1c levels lead to overestimation of arterial oxygen saturation by pulse oximetry in patients with type 2 diabetes. Cardiovasc Diabetol. 2012;11:110.
12. Sen S, Kar M, Roy A, Chakraborti AS. Effect of nonenzymatic glycation on functional and structural properties of hemoglobin. Biophys Chem. 2005;113(3):289-98.
13. 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.
14. Khan M, Fraser A. Cox-2 inhibitors and the risk of cardiovascular thrombotic events. Ir Med J. 2012;105(4):119-21.
15. Fitzgerald R, Pirmohamed M. Aspirin resistance: effect of clinical, biochemical and genetic factors. Pharmacol Ther. 2011;130(2):213-25.
16. Jafarnejad A, Bathaie SZ, Nakhjavani M, Hassan MZ. Investigation of the mechanisms involved in the high-dose and long-term acetyl salicylic acid therapy of type I diabetic rats. J Pharmacol Exp Ther. 2008;324(2):850-7.
17. Shojaeian S, Bathaie SZ. The effect of aspirin on the interaction of H5 and H5-DNA. Physiol Pharmacol. 2003;7(2):157-67.
18. Jafarnejad A, Bathaie SZ, Nakhjavani M, Hassan M. Investigation of the mechanisms involved in the high-dose and long-term acetyl salicylic acid therapy of type I diabetic rats. J Pharmacol Exp 2008;324:850-7.
19. Suh SJ, Kim KS, Kim MJ, Chang YC, Lee SD, Kim MS, Kwon DY,Kim CH. Effects of bee venom on protease activities and free radical damages in synovial fluid from type II collagen-induced rheumatoid arthritis rats. Toxicol In Vitro. 2006;20(8):1465–71.
20. Son DJ, Lee JW, Lee YH, Song HS, Lee CK, Hong JT. Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. Pharmacol Ther. 2007;115(2):246-70.
21. Jang MH, Shin MC, Lim S, Han SM, Park HJ, Shin I, Lee JS, Kim KA,Kim EH, Kim CJ. Bee venom induces apoptosis and inhibits expression of cyclooxygenase-2 mRNA in human lung cancer cell line NCI-H1299. J Pharmacal Sci.2003;91(2):95-104.
22. Riggs A. Preparation of blood hemoglobin's of vertebrates. Methods Enzymol. 1981;76:5-29.
23. 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.
24. Nagababu E, Rifkind JM. Formation of fluorescent heme degradation products during the oxidation. Biochem Biophys Res Commun. 1998;247(3):592-6.
25. Schmitt A,Schmitt J, Münch G, Gasic-Milencovic J. Characterization of advanced glycation end products for biochemical studies: side chain modifications and fluorescence characteristics. Anal Biochem. 2005;338(2):201-15.
26. 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.
27. Urios P, Grigorova-Borsos AM, Sternberg M. Aspirin inhibit the formation of pentosidine, a cross-linking advanced glycation end product, in collagen. Diabetes Res Clin Pract. 2007;77(2):337-40.
28. Yan H, Guo Y, Zhang J, Ding Z, Ha W, Harding JJ. Effect of carnosine, aminoguanidine, and aspirin drops on the prevention of cataracts in diabetic rats. Mol Vis. 2008;14:2282-91.
29. Coe LM, Denison JD, McCabe LR. Low dose aspirin therapy decreases blood glucose levels but does not

prevent type i diabetes-induced bone loss. Cell Physiol Biochem. 2011;28(5):923-32.
30. Stuhlmeier KM. Apis mellifera venom and melittin block neither NF-κB-p50-DNA interactions nor the activation of NF-κB, instead they activate the transcription of proinflammatory genes and the release of reactive oxygen intermediates. J Immunol. 2007;179(1):655-64.
31. Li R, Zhang L, Fang Y, Han B, Lu X, Zhou T, Feng M, Li J. Proteome and phosphoproteome analysis of honeybee (Apis mellifera) venom collected from electrical stimulation and manual extraction of the venom gland. BMC genomics. 2013;14(1):766-78.
32. Rekka E, Kourounakis P, Kourounakis P. Antioxidant activity of and interleukin production affected by honey bee venom. Arzneimittelforschung. 1990;40(8):912-3.
33. Krautwald M, Munch G. Advanced glycation end products as biomarkers and gerontotoxins - A basis to explore methylglyoxal-lowering agents for Alzheimer's disease? Exp Gerontol. 2010;45(10):744-51.
34. Peng X, Ma J, Chen F, Wang M. Naturally occurring inhibitors against the formation of advanced glycation end-products. Food Funct. 2011;2(6):289-301.

Investigating the synergic effect of Bee venom and aspirin on inhibition of glycation in diabetic conditions

Adeleh Divsalar., Ph.D
Department of Cell and Molecular biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

Javad Behroozi., M.Sc
Department of Cell and Molecular biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

Ali Akbar Saboury., Ph.D
Institute of Biochemistry and Biophysics, University of Tehran, Tehran, Iran

Received:13/03/2014**, Revised:**17/03/2014**, Accepted:**12/04/2014

Correspondence author:
Department of Cell and Molecular biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran, Dr. Adeleh Divsalar
E-mail: divsalar@khu.ac.ir

Abstract

Background: Diabetes is one of the most common endocrine disorders. In this disease due to increased blood glucose levels, protein glycation increases. Protein glycation in diabetes leads to irreparable consequences. The aim of this study was to investigate the synergic effect of Bee venom and aspirin on human hemoglobin glycation in the presence of glucose.

Materials and Methods: In this experimental study, hemoglobin (10 mg/ml) was incubated in the presence and absence of glucose (40 mM), aspirin (2.5 mM) and Bee venom (in different concentrations of 10, 20 and 40 µg/ml) for 5 weeks. Amount of hemoglobin glycation was evaluated via investigation of changes in soret band, amount of hemoglobin heme degradation and alteration in secondary structure of protein using UV-visible spectroscopy, fluorometry and Circular Dichroism Spectropolarimetry methods. The data were analyzed using InStat 3 software and statistical tests including one way variance analysis and Tukey test. P values less than 0.05 were considered significant.

Results: Hemoglobin incubation in the presence of glucose led to reduction of soret band absorption, degradation of heme and increment of beta sheet value in secondary structure of hemoglobin. Simultaneous presence of Bee venom and aspirin reduced the rate of heme degradation ($p< 0.001$) up to 36%, and the beta sheet formation up to 54% ($p< 0.001$). Also, the amount of structural alteration and hemoglobin glycation significantly decreased.

Conclusion: Bee venom and aspirin have significant antiglycation properties and simultaneous use of them can decrease protein glycation.

Keywords: *Diabetes, Glycation, Bee venom, Aspirin*