Medical Science Journal of Islamic Azad University Vol. 31, No. 4, Winter 2022 ORIGINAL ARTICLE

# Role of Propolis as a pharmaceutical candidate on interleukin-1β proinflammatory cytokine expression in Alzheimer's rat

***Maryam Saeidi, Fatemeh Rouhollah***
*Department of Cellular and Molecular Sciences, Faculty of Advanced Sciences and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran*

## Abstract

**Background**: One of the important factors that play a key role in the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD) is inflammatory processes leading to impaired expression of inflammatory cytokines such as interleukin-6, TNF-α, and interleukin-1β (IL-1β). Propolis, as a therapeutic compound, has anti-inflammatory and antioxidant properties. Therefore, the aim of the present study was to investigate the effect of this compound on changes in IL-1β expression levels in AD rats.
**Materials and methods**: 42 adult male Wistar rats were divided into four groups, including control, sham, Alzheimer, and propolis. Cellular changes in brain tissue was evaluated by preparing histopathologic slides and effect of propolis on changes in IL-1β expression levels were investigated using Real-Time PCR method.
**Results**: Histopathologic investigations in the studied groups showed a significant difference between scopolamine-treated group compared to control and sham groups in terms of changes in the IL-1β expression levels and cellular damage; whereas there was no difference between the propolis-treated and scopolamine-treated groups in this regard; only-morphological difference in the organization of neurons were observed. The results of Real-Time PCR showed that the IL-1β expression level was significantly different in the propolis-treated group from the Alzheimer's group ($p<0.05$), indicating that propolis significantly decreased gene expression.
**Conclusion**: The results of the present study showed that propolis could be considered as an effective drug candidate for the AD treatment considering its anti-inflammatory property and effect on the decrease of IL-1β expression.
**Keywords**: *Alzheimer's disease, Interleukin-1 beta, Propolis, Wistar rats.*

**Cited as:** Saeidi M, Rouhollah M. Role of propolis as a pharmaceutical candidate on interleukin-1β proinflammatory cytokine expression in Alzheimer's rat. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2022; 31(4): **388-396.**

**Correspondence to:** Fatemeh Rouhollah
***Tel:*** *+98 9121941027*
***E-mail:*** Frouhollah@iautmu.ac.ir
**ORCID ID:** 0000-0001-5243-129x
**Received:** 27 Dec 2020; **Accepted:** 28 Aug 2021

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۳۱، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۰، صفحات ۳۸۸ تا ۳۹۶

Original Article

# بررسی نقش پروپولیس (بره موم) به عنوان یک کاندیدای دارویی در بیان ژن سیتوکین پیش التهابی اینترلوکین β-۱ درموش دچارآلزایمر

**مریم سعیدی، فاطمه روح الله**

گروه سلولی مولکولی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاداسلامی، تهران ، ایران

## چکیده

**سابقه و هدف**: *از عوامل مهمی که در پاتوژنز آلزایمر نقش دارد، فرایندهای التهابی است که از طریق اختلال در بیان سایتوکاین‌های التهابی ایجاد می‌شود. برای کاهش این فرآیندها و مهار عملکرد برخی از سایتوکاین های التهابی از ترکیبات دارویی مختلف استفاده می‌شود. پروپولیس خاصیت ضدالتهابی و آنتی اکسیدانی دارد. در این پژوهش تاثیر پروپولیس بر میزان بیان ژن اینترلوکین -۱ β (IL-1β) در موش‌های مبتلا بررسی شد.*

**روش بررسی**: *۴۲ سر موش بزرگ آزمایشگاهی ویستار نر در چهار گروه کنترل، شم، آلزایمر و گروه دریافت کننده داروی پروپولیس طبقه‌بندی شدند. برای القای بیماری از اسکوپولامین استفاده شد. اسکوپولامین در نمک (0.9 NaCl)در غلظت ۰/۲ میلی گرم در کیلوگرم حل شد و به صورت صفاقی تزریق شد. پروپولیس نیز بعد از آماده سازی در سه غلظت ۱۵، ۲۰ و ۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم استفاده شد. ارزیابی تغییرات سلولی بافت مغز از طریق لام‌های هیستوپاتولوژی و تاثیر پروپولیس بر بیان تغییرات ژن اینترلوکین-۱ بتا با Real-Time PCR انجام شد.*

**یافته‌ها:** *در بررسی هیستوپاتولوژیکی، تغییرات سلولی در گروه تیمار شده با اسکوپولامین نسبت به گروهای کنترل و شم مشهود بود اما باگروه دریافت کننده پروپولیس مشابه بود و تفاوت مورفولوژی درسازمان دهی سلول ها مشاهده شد. نتایج روش Real-Time PCR نشان داد، بیان ژن IL-1β در گروه تیمار شده با پروپولیس در مقایسه با گروه آلزایمر اختلاف معنی‌داری دارد ($p<0/05$) دارد.*

**نتیجه‌گیری**: *پروپولیس با کاهش بیان IL-1β می تواند به عنوان کاندید دارویی در درمان بیماری آلزایمر در نظر گرفته شود.*

***واژگان کلیدی:*** *بیماری آلزایمر، پروپولیس، اینترلوکین-۱بتا، موش های ویستار.*

## مقدمه

بیماری آلزایمر (Alzheimer disease) یک اختلال پیش رونده است و درمغز که حافظه و عملکرد شناختی را کنترل می‌کند اتفاق می‌افتد و به تدریج حافظه و توانایی یادگیری، تفکر، ارتباط برقرار کردن و انجام فعالیت‌های روزانه از بین می‌رود. این بیماری درسال ۱۹۰۷ توسط Alois Alzheimer مطرح شد و یکی از شایع‌ترین علت زوال عقل درسالمندان به شمار می‌رود (۱). در حال حاضر، ۴۴ میلیون نفر در سراسر جهان مبتلا به فراموشی هستند و تخمین زده شده که تا سال ۲۰۵۰ این آمار ۳ برابر افزایش یابد (۲). مهم‌ترین ریسک فاکتور در بیماری آلزایمر سن است. علاوه براین، فاکتورهای متعددی همچون وجود سابقه خانوادگی بیماری، اختلالات شناختی خفیف، بیماری‌های قلبی-عروقی، میزان تحصیلات، و همچنین آسیب‌های تروماتیک مغزی در احتمال بروز آن نقش دارند. شواهد حاکی از آن است که این بیماری لزوما ناشی از پیری و افزایش سن نیست و شانس تشخیص آن در افراد بالای ۸۵ سال یک نفر در هر سه نفر است. بسیاری از

**آدرس نویسنده مسئول: تهران** گروه سلولی مولکولی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاداسلامی، فاطمه روح الله (**email**: Frouhollah@iautmu.ac.ir)
**ORCID ID:** 0000-0001-5243-129x
**تاریخ دریافت مقاله:** ۹۹/۱۰/۷
**تاریخ پذیرش مقاله:** ۱۴۰۰/۶/۶

اختلالات مولکولی در بیماری آلزایمر تشخیص داده شده و بررسی‌ها نشان داده این بیماری ناشی از یک‌سری ضایعات مولکولی و ژنتیکی همچون اختلالات پروتئینی، اختلال سیناپتیک و التهاب است (۳، ۴). التهاب از عواملی است که نقش اساسی در بروز بیماری آلزایمر دارد و از دید پاتولوژیک در نواحی آسیب‌پذیر مغز در بیماری آلزایمر رخ داده به طوری که بافت‌های دژنره شده و رسوبات نامحلول غیرطبیعی مواد از محرک‌های کلاسیک التهاب به شمار می‌روند. به همین ترتیب، در مغز مبتلا به آلزایمر نورون‌ها، نوریت‌ها، پپتیدهای آمیلوئید β نامحلول و تنگل‌های نوروفیبریلی محرک‌های التهاب را فراهم می‌کنند (۵). اینترلوکین-۱بتا (IL-1β)، اینترلوکین-۶ و TNF-α از جمله سایتوکاین‌های التهابی هستند که در بروز التهاب نقش دارند. اینترلوکین-یک بتا یک سایتوکاین تنظیم‌کننده ایمنی است که بیش از حد در ناحیه قشری مغز آسیب‌دیده AD بیان می‌شود. IL-1β و پروتئین پیش‌ساز آمیلوئید β هر دو به طور قابل توجهی در افرادی که اختلال شناختی ناشی از صرع دارند افزایش می‌یابد، به طوری که ممکن است این افراد را در معرض بروز تغییرات پاتولوژیک زودرس آلزایمر قرار دهد (۷). امروزه از داروهای شیمیایی و طبیعی گوناگون برای کاهش التهاب و کنترل بیماری آلزایمر استفاده می‌شود. داروهای ضدالتهابی غیراستروییدی (NSAIDs) از طریق مهار آنزیم سیکلواکسیژناز (Cyclooxygenase(COX)) مانع از تولید ایکوزانوئیدها، ترکیباتی که نقش مهم در ایمنی و التهاب سلول‌ها ایفا می‌کنند، می‌شوند. مطالعات نشان داده که سطح mRNA پروتئینCOX به طور قابل توجهی در مناطق درگیر بافت مغز AD بالا است. در نتیجه دیده شده که NSAID ها با مهار این آنزیم، التهاب پایداری که در بافت مغز AD موجود است را کاهش می‌دهند. از طرف دیگر NSAID ها می‌توانند به طور مستقیم بر تولید پپتیدهای آمیلوئیدβ تاثیر بگذارند، اگرچه ترکیبات NSAID تاثیرات ضد التهابی قابل توجهی را در آزمایشات پایه‌ای نشان داده‌اند اما متاسفانه در آزمایشات بالینی در بیماران AD خیلی اثربخش نبودند (۱، ۸). در حال حاضر تنها داروی در دسترس تائید شده توسط سازمان غذا و داروی آمریکا مهارکننده های استیل کولین استراز شامل ریواستیگمین (Rivastigmine) و گالانتامین (Galantamine) و دونپزیل و رسپتور آنتاگونیستN–متیل D– آسپارتات (ممانتین) برای بهبود علائم آلزایمر استفاده می‌شوند (۱۲-۹). هوپرزین A (Huperzine A) یک آلکالوئید و ترکیب گیاهی است و مهارکننده انتخابی استیل کولین استراز است. هوپرزین-A بدون داشتن هیچگونه عوارضی می‌تواند اثرات سودمندی بر روی حافظه کوتاه-مدت گذاشته و به دنبال آن سبب بهبود عملکرد شناختی و حافظه در بیماران مبتلا به آلزایمر شود (۱۳). پروپولیس کلمه‌ای یونانی است که از دو بخش پرو به معنی جلو و پولیس به معنی دفاع تشکیل شده است که در کل به معنی دفاع از شهر است. این ماده توسط زنبورها از مواد صمغی گیاهان و درختان جمع‌آوری شده و برای دفاع در درون کندو زنبورها به کار می‌رود (۱۶). بیش از ۳۰۰ نوع ترکیب شیمیایی در پروپولیس وجود دارد که از جمله آن می‌توان به سینامیک اسید و مشتقات آن، استروئیدهای متنوع، آمینواسیدها، آلدئیدها و کتون‌ها اشاره کرد. علاوه براین مواد معدنی بسیاری نیز در پروپولیس شناسایی شده است. مطالعات گسترده‌ای بر روی پروپولیس صورت گرفته که نشان می‌دهد این ترکیب می‌تواند به عنوان یک ضد التهاب قوی بر علیه التهابات حاد و مزمن عمل کند. این ترکیب علاوه بر خاصیت ضدالتهابی، دارای خاصیت ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی نیز است. خاصیت ضد التهابی پروپولیس به دلیل حضور فلاونوئیدها در ساختار آن است که همان طور که گفته شد موجب مهار آنزیم COX، لیپواکسیژناز و همچنین کاهش رهاسازی پروستاگلاندین E2 و در نهایت مهار التهاب می‌شود (۱۷، ۱۸). از آنجایی که در بیماری آلزایمر التهاب نقش اساسی در پاتوژنز و تخریب نورونی دارد و همچنین یکی از عوامل ایجادکننده التهاب سایتوکاین‌های التهابی هستند، در این پژوهش میزان تغییرات IL-1β را به عنوان نماینده سایتوکاین‌های التهابی، در ۴ گروه آزمایشی روی موش بزرگ آزمایشگاهی و به کمک روش Real-time PCR و روش هیستوپاتولوژی مورد بررسی قرار دادیم. داروی ضد التهابی پروپولیس که بومی ایران است نیز جهت بررسی تاثیر خاصیت ضدالتهابی آن در بافت مغز موشهای مبتلا به آلزایمر استفاده شد و در نهایت تاثیر این دارو بر روند بیماری مورد بررسی قرارگرفت.

## مواد و روشها

### نحوه آماده سازی پروپولیس اتانولی و اسکوپولامین

جهت تهیه عصاره هیدرو الکلی پروپولیس، بره موم مورد استفاده از کندوهای زنبور عسل واقع در نواحی شمالی کوه های سبلان جمع آوری شد. سپس نمونه‌ها در اسرع وقت به آزمایشگاه دانشکده منتقل و تا زمان عصاره گیری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. مقدار ۲۵ گرم از آن در ۱۰۰

میلی لیتر اتانول ۸۰ درصد به مدت ۴۸ ساعت در یک ظرف دربسته و در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس محلول حاصل، در دمای اتاق دو بار فیلتر (کاغذ واتمن شماره ۴ برای جداسازی قطعات درشت) شد. مایع حاصله در دستگاه روتاری (تقطیر در شرایط خلا)، در انکوباتور ۳۸ درجه سانتی گراد قرار گرفت. سپس عصاره به دست آمده جهت تهیه دوز مورد نظر در این مطالعه با الکل ۱۰ درصد رقیق شد و تا زمان استفاده در ظرف شیشه‌ای تیره رنگ در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگه‌داری شد (۱۹).

**القای آلزایمر**

در مطالعه حاضر از اسکوپولامین هیدروبرومایـد (سیگما، آمریکا) استفاده شد. اسکوپولامین که آنتاگونیست گیرنده‌های موسکارینی است، باعث اختلال موقت در حافظه فضایی شده و مدلی شبیه بیماری آلزایمر ایجاد می‌کند. اسکوپولامین در نمک (NaCl 0.9٪) در غلظت های نهایی ۰/۲ میلی گرم در کیلوگرم حل شد و به صورت داخل صفاقی به مدت ۱۴ روز تزریق شد (۲۰).

**آماده سازی حیوانات**

دراین پژوهش از موش‌های نژاد ویستار (از حیوان خانه انستیتو پاستور واقع در گرمدره کرج خریداری شد) در محدوده وزنی ۲۸۰-۲۲۰ گرمی استفاده شد، که به تعداد ۷ عدد در هر قفس با یک برنامه ۱۲ساعت روشنایی- تاریکی و دمای حدود ۲۲ درجه سانتی گراد نگه داری شدند و حیوانات دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. موش‌ها یک هفته قبل از شروع آزمایش به طور تصادفی در چهار گروه (۷ نفر) به شرح زیر توزیع شدند:

۱. کنترل: بدون دریافت هیچ درمانی. در این گروه موش‌ها جهت تطابق با محیط به مدت دو هفته در محیط آزمایشگاه نگه داری شدند. سپس PAL training روی موش‌ها انجام شد و موش‌ها در شاتل باکس قرار گرفتند. پس از ۲۴ ساعت و انجام PALtest بافت مغز برای انجام مراحل بعدی برداشت شد.

۲. کنترل سرم نمکی (Sham): محلول نمکی دریافت شده (۱۸ میکرولیتر در هر گرم ۱۸۰ گرم موش صحرایی).

در این گروه نیز به مدت دو هفته در یک زمان مشخص به موشها نرمالین سالین تزریق می‌شود و بعد از دو هفته PAL training انجام شده و موش‌ها در شاتل باکس قرار می‌گیرند و ۲۴ ساعت بعد بافت مغز خارج می‌شود.

۳. گروه آزمایش ۰/۲ میلیگرم در کیلوگرم اسکوپولامین دریافت کرد (۰،۰۰۲ میلیگرم در کیلوگرم IP). در این گروه داروی اسکوپولامین به صورت داخل صفاقی روزانه (به مدت ۱۴روز) به موش‌ها تزریق شد. بعد از دو هفته مرحله PAL training و بعد از ۲۴ ساعت مرحله PAL Test (Passive Avoidance Learning Test و Locomotion Test انجام شده و بافت مغز در همان روز خارج می‌شود. در این مرحله اگر موش بر اثر تزریق دارو به آلزایمر مبتلا شده باشد به یاد نمی‌آورد که در محیط تاریک دچار شوک شده و دوباره در مرحله PAL Test از محیط روشن وارد محیط تاریک می‌شود.

۴. گروه آزمایش ۰/۲ میلیگرم در کیلوگرم اسکوپولامین دریافت شده (۰،۰۰۲ میلیگرم‌درکیلوگرمIP) + پروپولیس (۱۵- ۲۰ -۲۵ میلیگرم بر کیلوگرم رت). در این گروه تزریق اسکوپولامین در طی دوهفته انجام شد و طی این مدت از داروی پروپولیس به صورت خوراکی نیز برای بررسی اثر آن در بهبود بیماری استفاده شد. گروه ۴ دارای ۳ زیرگروه بود که در هر زیر گروه ۷ عدد موش رت ویستار بعد از دریافت اسکوپولامین تحت تیمار با پروپولیس با دوز مربوطه بودند.

همه آزمایشات در مرحله نور بین ساعت ۹:۰۰ تا ۱۵:۰۰ انجام شد. گروه‌های آزمایشی شامل ۷ حیوان بود و هرحیوان فقط یک بار آزمایش شد. تمام مراحل مطابق با دستورالعمل‌های نهادی برای مراقبت و استفاده از حیوانات انجام شده است (کداخلاق IR.IAU.PS.REC.1398.005).

**مطالعات هیستوپاتولوژیکی و بررسی‌های میکروسکوپی**

برای بررسی این که موش‌های ویستار، مبتلا به آلزایمر شده‌اند یا خیر از قسمت هیپوکمپ بافت مغز لام تهیه شد و با مشاهده تغییرات سلولی و مشاهده پلاک های آمیلوئیدی متوجه شدیم که موش‌ها مبتلا به شبه آلزایمر شده‌اند. نمونه بافت مغزی پس از کشته شدن حیوان با رعایت موازین اخلاقی جدا شد، سپس در یک فیکساتیو بافر، جهت فیکس شدن قرارداده شد. در نهایت بافت‌ها روی لام گذاشته شدند و رنگ آمیزی نمونه‌ها با روش هماتوکسیلن و ائوزین (H&E) انجام شد (۲۱). هرگونه تغییرسلولی در گروه‌های مختلف توسط میکروسکوپ نوری (Olympus BX51; Olympus, Tokyo, Japan) بررسی شد. مراحل به این ترتیب انجام شد: ۱- ثابت کردن: وقتی بافت زنده را درون فیکساتیو یا ثابت‌کننده قرار می‌دهیم. بلافاصله سلول‌ها می‌میرند و فرصتی برای فعالیت و عمل آنزیم‌ها باقی نمی‌ماند. در نتیجه ساختار طبیعی بافت حفظ می‌گردد. ۲- آبگیری: در طی این مرحله آب از بافت‌های ثابت شده برداشته می‌شود. ماده‌ای که از آن به عنوان گیرنده آب استفاده می‌شود اتانول است. ۳- پاساژ بافت: پس از ثابت کردن بافت‌ها و آبگیری، آن‌ها را برای آغشتگی در پارافین آماده می‌کنیم. پارافین می‌تواند سختی لازم را برای میکروتومی (برش) به بافت بدهد. ۴- شفاف سازی: برای شفاف سازی از زایلین بهره می‌گیریم. ۵- نفوذ و آغشتگی: بافت‌ها بعد از شفاف کردن به یک حمام پارافین مذاب برای نفوذ و آغشتگی

جهت قالب‌گیری منتقل می‌گردد. در این هنگام پارافینیه جای زایلین به داخل بافت انتشار می‌یابد. ۶- قالب‌گیری: در این مرحله بافت آغشته شده به پارافین توسط یک قالب سخت احاطه می‌شود. سپس این مجموعه در دمای اتاق قرار داده و پارافین داخل آن منجمد می‌شود. ۷- میکروتومی: این کار توسط دستگاه میکروتوم صورت می‌گیرد. این دستگاه برش‌هایی به ضخامت ۵ میکرون فراهم می‌کند. ۸- رنگ آمیزی: رنگ‌آمیزی برش‌ها برای تمایز ساختمان داخلی بافت‌ها و اجزای سلولی جهت تشخیص، همچنین مطالعات خصوصیات فیزیکی و ارتباط بافت‌ها و اجزای سلولی لازم است. لام‌های تهیه شده طبق فرآیند فوق هرکدام جداگانه بررسی شدند و هرگونه تغییرسلولی در گروه‌های مختلف بررسی شد.

### بررسی بیان IL-1β

در این مطالعه، RNA سلول‌های مغزی موش توسط محلول ترایزول به روش دستی استخراج شد. پس از استخراج RNA سنتز cDNA توسط کیت BioFact انجام شد. برای تکثیر هر قطعه ژنتیک جفت پرایمر اختصاصی برای هر ژن نیاز است که شامل پرایمر مستقیم (Forward) و معکوس (Reverse) است. ژن β-Actin به عنوان ژن کنترل و نرمالیزه کردن میزان بیان ژن‌های هدف انتخاب شد. هر کدام از این پرایمرها توسط نرم افزار Gene Runner V6.5 طراحی شدند. جهت آماده سازی نمونه‌ها Master Mix ساخته شد. ترکیب Reaction Mix به میکروتیوب‌های ۰/۲ انتقال داده شد و میکروتیوب‌ها کوتاه مدت spin شدند و آب دیونیزه و پرایمر ها اضافه شد و سپس با دستگاه ریل تایم سنجش انجام شد.

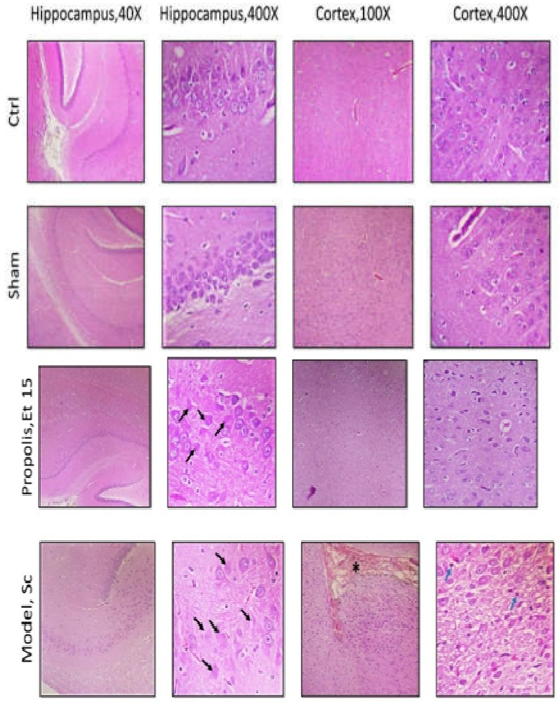
### تحلیل آماری

نتایج به دست آمده حاصل از مقایسه در گروه‌های مورد مطالعه، با استفاده از آزمون آماری One way ANOVA با استفاده از نرم افزار Prism نسخه ۸ تحلیل شد.

## یافته‌ها

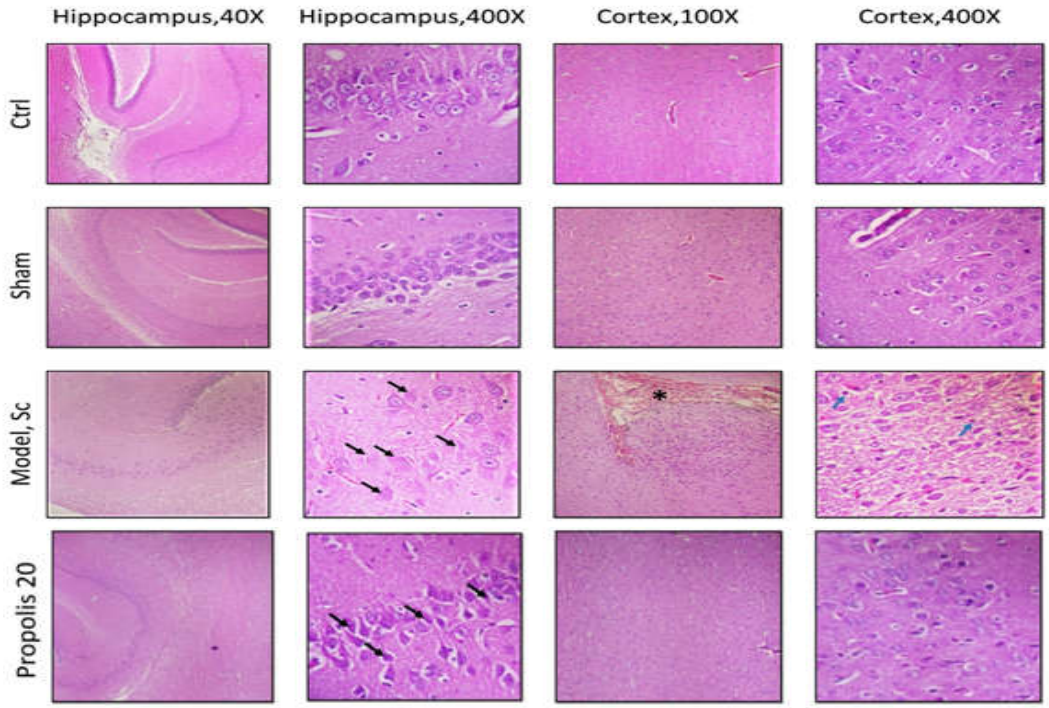
### بررسی هیستوپاتولوژیک بافت مغز

هیچ تغییرات هیستوپاتولوژیک قابل توجهی در گروه کنترل و شم دیده نشد. در حالی که در بررسی هیستوپاتولوژیک و ارزیابی تغییرات سلولی هیپوکمپ در گروه اسکوپولامین (مبتلا به آلزایمر)، علایم مرفولوژیک نکروز شامل تورم سیتوپلاسمی نورون‌ها، واکوئولاسیون متعدد و تعداد بیشماری سلول‌های تاریک و نکروتیک مشاهده شد. همچنین در کورتکس، پرخونی و خونریزی مننژال، اینفیلتراسیون سلول‌های التهابی و دمیلیناسیون مشهود بود. بررسی هیستوپاتولوژیک بافت مغز گروه دریافت کننده پروپولیس اتانولی با غلظت ۱۵میلی گرم همراه با دژنراسیون نورونی متعدد و نکروز ناحیه هیپوکمپ تشابه نزدیکی به گروه اسکوپولامین داشت و سلول‌های ناحیه CA1 نرمال بودند (شکل ۱).

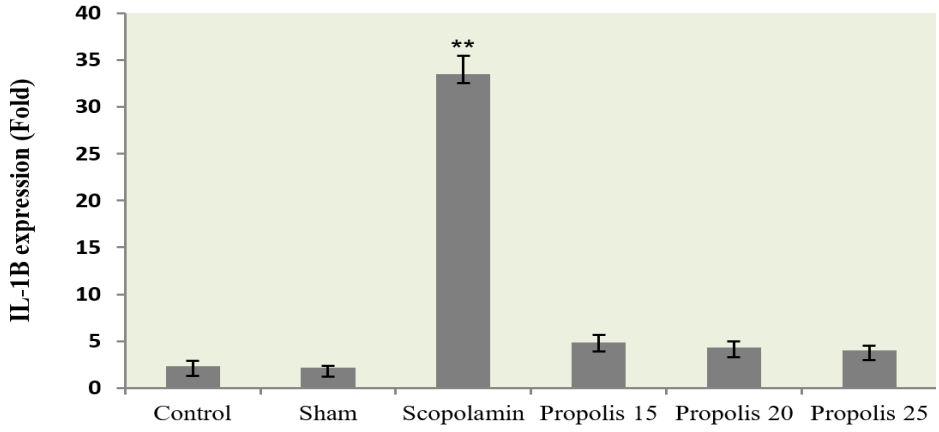



**شکل ۱.** بخش‌های هیستوپاتولوژی مغز در گروه‌های مختلف مورد مطالعه (ctrl کنترل، Sham، Sc اسکوپولامین، اسکوپولامین و پروپولیس ۱۵ mg/kg). و رنگ آمیزی شده با روش هماتوکسیلنو ائوزین؛ پیکان‌های باریک: عصب‌های پیرامیدال CA1: ستاره‌ها: هایپرمی و خون ریزی مننژ، پیکان‌های آبی: انفیلتراسیون سلول‌های التهابی.

ارزیابی اثر هیستوپاتولوژیک پروپولیس با غلظت ۲۰ میلی گرم همانند غلظت ۱۵ میلی‌گرم شباهت نزدیک به گروه Sc (اسکوپولامین) همراه بادژنراسیون نورونی متعدد و نکروز ناحیه هیپوکمپ را نشان داد (شکل ۲). در غلظت ۲۵ میلی‌گرم پروپولیس نیز نتایج مشابه با غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم مشاهده شد.




**شکل ۲.** بخش‌های هیستوپاتولوژی مغز در گروه‌های مختلف مورد مطالعه (ctrl کنترل، Sham، Sc اسکوپولامین، اسکوپولامین و پروپولیس ۲۰ mg/kg). و رنگ آمیزی شده با روش هماتوکسیلنو ائوزین؛ پیکان‌های باریک: عصب‌های پیرامیدال CA1: ستاره‌ها: هایپرمی و خون ریزی مننژ، پیکان‌های آبی: انفیلتراسیون سلول‌های التهابی.




**شکل ۳** . میزان تغییرات بیان ژن IL-1β(به دست آمده با روش Real time PCR ) در سه غلظت پروپولیس ۱۵- ۲۰ و ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به کمک تست One-Way-ANOVAدر نرم افزار Prism تحلیل شد و مقادیر به دست آمده (P<۰/۰۵) نشان دهنده معنی‌دار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه به گروه کنترل است.

### بررسی میزان بیان ژن IL-1β

میزان بیان ژن IL-1β در گروه اسکوپولامین بسیار بیشتر از گروه کنترل وگروه شم بود و اختلاف معنی داری بین گروه اسکوپولامین با گروه های شم وکنترل وجود داشت (p<۰/۰۵). این نتیجه نشان داد که میزان بیان این سایتوکاین تحت تاثیر آلزایمر القا شده در گروه سوم بر اثر فرایند التهابی افزایش یافته است. در حالی که نتایج گروه دریافت کننده پروپولیس با غلظت ۱۵ میلی گرم بر کیلوگرم نشان داد که میزان بیان IL-1β در این گروه نسبت به گروه اسکوپولامین کاهش قابل توجهی دارد. در نتیجه می‌توان گفت که پروپوپولیس با کاهش میزان بیان IL-1β خاصیت ضد التهابی خود را القا می‌کند. همچنین،

میزان بیان ژن IL-1β بین گروه دریافت کننده پروپولیس اتانولی ۱۵ میلی گرم بر کیلوگرم و گروهای شم و کنترل نیز بررسی شد و اختلاف معنی‌داری بین این گروه و گروه کنترل مشاهده نشد.

همچنین میزان بیان ژن IL-1β بین گروه دریافت کننده پروپولیس اتانولی با غلظت ۲۰ و ۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم نشان داد که غلظت بالاتر پروپولیس سبب کاهش میزان بیان IL-1β شده است، اما تفاوت معنی‌داری میان سه غلظت مشاهده نشد (شکل ۳).

## بحث

پروپولیس به دلیل اینکه غنی از ترکیبات فنولی است دارای خاصیت حفاظت کننده سیستم عصبی است و از نورون‌ها در برابر استرس اکسیداتیو و التهاب محافظت می‌کند و همچنین دارای خاصیت ضد التهابی و آنتی اکسیدانی است. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۸ توسط Tiyo و همکارانش تحت عنوان "ترکیب دو داروی دونپزیل و پروپولیس نسبت به مونوتراپی این داروها موجب بهبود حافظه در Drosophila melanogaster می‌شود" انجام گرفت، مشاهده شد که تیمار مگس‌های دروزوفیل با ترکیب Donepezil و Propolis موجب بهبود حافظه طولانی مدت و کوتاه-مدت می‌شود، به طوری که هریک از این داروها به تنهایی اثرات بهبودی خفیفی را نشان دادند (۲۱). همچنین، در مطالعه Sadhana در سال ۲۰۱۷ که بر روی تاثیر پروپولیس هندی رویموش های مبتلا به آلزایمر انجام شده بود، در بررسی‌های هیستوپاتولوژیک و رفتاری مشاهده شد که پروپولیس هندی سبب بهبود عملکرد رفتاری در مدل‌های موشی مبتلا به آلزایمر شده است. همچنین پروپولیس توانست به صورت وابسته به دوز سبب مهار آنزیم استیل کولین استراز و همچنین افزایش مونوآمینهای مغز در مقایسه با گروه کنترل شود (۲۲). در بررسی‌های هیستوپاتولوژیک و ارزیابی تغییرات سلول‌های بافت هیپوکمپ در این مطالعه، در گروه اسکوپولامین (مبتلا به آلزایمر)، علایم مورفولوژیکی مانند نکروز و تورم سیتوپلاسمی نورون‌ها، واکوئولاسیون متعدد و تعداد بیشماری سلول‌های تاریک و نکروتیک مشاهده شد. از طرف دیگر در کورتکس، پرخونی و خونریزی مننژال، اینفیلتراسیون سلولهای التهابی و دمیلیناسیون مشهود بود. بررسی هیستوپاتولوژیک بافت مغز گروه دریافت کننده پروپولیس اتانولی با غلظت ۱۵ میلی گرم بر کیلوگرم همراه با دژنراسیون نورونی متعدد و نکروز ناحیه هیپوکمپ مشابه گروه اسکوپولامین بود. در یافته‌های هیستوپاتولوژیک گروه پروپولیس اتانولی ۱۵ میلی گرم آسیب‌های مشابهی با گروه اسکوپولامین (گروه مبتلا به آلزایمر) مشاهده شد و در غلظت های ۲۰ و ۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم نیز آسیب‌های مشابهی وجود داشت. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۷ توسط Van صورت گرفت، فعالیت آستروسیت‌ها را که از مدل‌های موشی ترنس‌ژنیک مبتلا به آلزایمر استخراج شده بود، بررسی کردند. در این مطالعه مشاهده شد که میزان بیان IL-1β به عنوان یک سایتوکاین التهابی در این سلول‌ها در مقایسه با سلول‌های سالم افزایش یافته‌است. همچنین تیمار سلول‌ها با ترکیب پانتتین که دارای خاصیت ضدالتهابی و محافظت‌کننده عصبی است توانسته بود الگوهای پاتولوژیک را در آنها کاهش دهد (۲۳). نتایج حاصل از این پژوهش حاکی از این بود که میزان بیان IL-1β در گروه کنترل و گروه شم تفاوتی نداشته و نسبت به بیان ژن مرجع افزایش یا کاهشی را نشان نداده است. در حالی که میزان بیان IL-1β در گروه آلزایمر نسبت به گروه کنترل و شم افزایش چشمگیری داشته است که این نتیجه مطالعات مذکور را در این زمینه تایید می‌کند که در بیماری آلزایمر به دلیل افزایش فرایند التهابی میزان بیان سایتوکاین التهابی IL-1β در مغز افزایش می‌یابد. میزان بیان IL-1β در گروه‌هایی که دریافت کننده داروی پروپولیس اتانولی بودند به طور قابل توجهی کاهش یافته که نشان می‌دهد تحت تاثیر خاصیت ضدالتهابی پروپولیس میزان بیان سایتوکاین التهابی در این گروه کاهش یافته است.

نتایج مولکولی این پژوهش هم‌راستا با نتایج مطالعات فوق است، به طوری که آلزایمر توانسته سبب القای افزایش سایتوکاین التهابی IL-1β شده و داروهای ضدالتهابی مانند پروپولیس می‌توانند بیان ژن این سایتوکاین را به طور چشمگیری کاهش دهند. در نتیجه با توجه به نتایج به دست آمده در این پژوهش و همچنین مطالعات پیشین، می‌توان گفت ترکیبات مختلفی به ویژه ترکیبات گیاهی و ارگانیک با طیف وسیعی از خواص و ویژگی‌های خود در حیطه درمان بسیاری از بیماری‌ها به ویژه بیماری‌های نورودژنراتیو و عصبی می‌توانند به‌کار گرفته شوند (۲۴). پروپولیس نیز به عنوان یک ترکیب طبیعی خواص بیشماری دارد که از آن می‌توان به طور گسترده در حیطه درمان و پزشکی استفاده کرد. در مطالعه‌ای که به آن پرداخته شد نقش ضد التهابی پروپولیس و تاثیر آن بر سرکوب التهاب در بیماری آلزایمر از طریق کاهش سایتوکاین التهابی و کاهش تغییرات سلولی، قابل توجیه و

بسیار واضح است. هرچند که مطالعات بیشتری در این زمینه مورد نیاز است تا شاید بتوان در آینده‌ای نه چندان دور از این ترکیب در کنار ترکیبات موثر دیگر به عنوان یک رژیم درمانی مفید در بیماری آلزایمر بهره برد.

## *REFERENCES*


1. Rubio-Perez JM, Morillas-Ruiz JM. A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. ScientificWorldJournal 2012;2012:756357.

2.Prince M, Albanese E, Guerchet M, Prina M. World Alzheimer Report 2014: dementia and risk reduction: an analysis of protective and modifiable factors. Alzheimer's Disease International 2014.

3. Alzheimer's Association. 2015 Alzheimer's disease facts and figures. Alzheimer's & dementia: J Alzheimers Dis 2015;11:332-84.

4. Querfurth HW, LaFerla FM. Mechanisms of disease. N Engl J Med 2010; 362:329-44.

5. Schmid AW, Lynch MA, Herron CE. The effects of IL□1 receptor antagonist on beta amyloid mediated depression of LTP in the rat CA1 in vivo. Hippocampus 2009; 19:670-76.

6. Su F, Bai F, Zhang Z. Inflammatory cytokines and Alzheimer’s disease: a review from the perspective of genetic polymorphisms. Neurosci Bull 2016; 32:469-80.

7. Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, et al. Inflammation and Alzheimer’s disease. Neurobiol Aging 2000; 21:383-421.

8. Rao PP, Kabir SN, Mohamed T. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): progress in small molecule drug development. Pharmaceuticals (Basel) 2010;3:1530-49.

9. Anand R, Gill KD, Mahdi AA. Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future. Neuropharmacology 2014;76:27-50.

10. Alzheimer's Association. 2014 Alzheimer's disease facts and figures. Alzheimer's & dementia: J Alzheimers Dis 2014;10:e47-92.

11.Auld DS, Kornecook TJ, Bastianetto S, Quirion R. Alzheimer’s disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to β-amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. Prog Neurobiol 2002;68:209-45.

12. Farlow MR, Miller ML, Pejovic V. Treatment options in Alzheimer’s disease: maximizing benefit, managing expectations. Dement Geriatr Cogn Disord 2008; 25:408-22.

13.Simunkova M, Alwasel SH, Alhazza IM, Jomova K, Kollar V, Rusko M,et al. Management of oxidative stress and other pathologies in Alzheimer’s disease. Arch Toxicol 2019; 22:1-23.

14.Ha GT, Wong RK, Zhang Y. Huperzine a as potential treatment of Alzheimer's disease: an assessment on chemistry, pharmacology, and clinical studies. Chem Biodivers 2011;8:1189-204.

15.Polinsky RJ. Clinical pharmacology of rivastigmine: a new-generation acetylcholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. Clin Ther 1998;20:634-47.

16.Bemanian MH, Farhoudi A, Pourpak Z, Gharagozlou M, Movahedi M, Nabavi M, et al. Systemic and local reactions of bee venom immunotherapy in Iran. Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology (IJAAI) 2007;6:203-6.

17.Borrelli F, Maffia P, Pinto L, Ianaro A, Russo A, Capasso F, et al. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. Fitoterapia 2002;73:S53-63.

18.Farooqui T, Farooqui AA. Beneficial effects of propolis on human health and neurological diseases. Front Biosci (Elite Ed) 2012;4:779-93.

19. Lahouel M, B.K, Kebsa W, Alyane M. Polyphenolic fractions of Algerian propolis reverses doxorubicin induced acuterenal oxidative stress. African J Pharm Pharmacology (AJPP). 2010; 4: 712-720.

20. Lindner MD, Hogan JB, Hodges DB Jr, Orie AF, Chen P, Corsa JA, Leet JE, Gillman KW, Rose GM, Jones KM, Gribkoff VK. Donepezil primarily attenuates scopolamine-induced deficits in psychomotor function, with moderate effects on simple conditioning and attention, and small effects on working memory and spatial mapping. Psychopharmacology (Berl) 2006;188:629-40.

21. Cardiff RD, Miller CH, Munn RJ. Manual hematoxylin and eosin staining of mouse tissue sections. Cold Spring Harb Protoc 2014; 2: 655-8.

22. Ayikobua ET, Semuyaba I, Eze DE, Kalange M, Nansunga M, Okpanachi AO, et al. Combined Donepezil and Ethanolic Extract of Propolis Improved Memory Better Than Donepezil and Propolis Monotherapy in Wild Type Drosophila melanogaster. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (eCAM). 2018;2018.

23. Nanaware S, Shelar M, Sinnathambi A, Mahadik KR, Lohidasan S. Neuroprotective effect of Indian propolis in β-amyloid induced memory deficit: impact on behavioral and biochemical parameters in rats. Biomed Pharmacother 2017;93:543-53.

24. van Gijsel-Bonnello M, Baranger K, Benech P, Rivera S, Khrestchatisky M, de Reggi M, et al. Metabolic changes and inflammation in cultured astrocytes from the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease: alleviation by pantethine. PloS One 2017;12:e0175369.