[illegible]

in vitro [illegible]

صديقه عسگري*؛ غلامعلي نادري**؛ مژگان قاري پور***

چكيده :

سابقه و هدف: گلیکوزیلاسیون غیرآنزیمی پروتئین‌ها علت اصلی مشکلات دیابتی و همچنین اختلالات قلبی و عروقی، رتینوپاتی، نفروپاتی و نوروپاتی می‌باشد. به‌نظر می‌رسد آنتی‌اکسیدان‌ها تأثیرات بازدارندهٔ مؤثری بر گلیکوزیلاسیون پروتئین‌ها داشته باشند.

مواد و روش‌ها: چند نوع فلاونوئید از جمله روتین، کامفرول، کوئرستین، آپی‌ژنین، نارینجین، مورین، بیوچانین‌آ انتخاب شدند و تأثیرات آنتی‌اکسیدانی آن‌ها تحت شرایط in vitro *در گلیکوزیلاسیون هموگلوبین، آلبومین و انسولین مورد بررسی قرار گرفت . در ابتدا غلظت مطلوب گلوکز و نیز زمان انکوباسیون برای هر پروتئین تعیین‌گردید. سپس درصد مهار گلیکوزیلاسیون هر پروتئین در حضور سه غلظت مختلف (۱۰ μg/ml، ۵، ۰/۵) از هر فلاونوئید با روش اسپکتروفتومتریک تعیین گردید.*

یافته‌ها: نتایج به‌دست‌آمده نشان می‌دهد که بیوچانین‌آ بهترین باز دارنده گلیکوزیلاسیون انسولین و هموگلوبین است، به‌طوری که گلیکوزیلاسیون انسولین را ۱۰۰٪ و هموگلوبین را ۶۰٪ مهار می‌کند. گلیکوزیلاسیون آلبومین به میزان ۱۰۰٪ با بیوچانین‌آ و آپی‌ژنین مهار می‌گردد.

بحث: انتظار می‌رود فلاونوئیدها تأثیرات بازدارنده‌ای در عواقب بیماری دیابت داشته باشند و مصرف آن‌ها می‌تواند از بروز بسیاری از مشکلات در افراد دیابتی پیشگیری نماید.

کلیدواژه‌ها: فلاونوئید، گلیکوزیلاسیون پروتئین، آنتی اکسیدان، آلبومین، انسولین، هموگلوبین، بیوچانین‌آ .

---

* Ph.D فارماكوگنوزي ، دانشگاه علوم پزشكي اصفهان، مركز تحقيقات قلب و عروق اصفهان.

** Ph.D بيوشيمي باليني ، دانشگاه علوم پزشكي اصفهان، مركز تحقيقات قلب و عروق اصفهان.

*** M.Sc بيوشيمي باليني ، دانشگاه علوم پزشكي اصفهان، مركز تحقيقات قلب و عروق اصفهان.

* **عهده‌دار مكاتبات:** اصفهان، ميدان جمهوري اسلامي، خيابان خرم، مركز درماني تحقيقاتي صديقه طاهره(س)، صندوق پستي: ۸۱۴۶۵-۱۱۴۸
تلفن: ۳۳۵۹۶۹۶ و ۳۳۵۹۷۹۷- ۰۳۱۱، نمابر: ۳۳۷۳۴۳۵- ۰۳۱۱

Website: www.crc.mui.ac.ir
E-mail: crc@mui.ac.ir

مقدمه:

ديابت مليتوس يكي از شايع‌ترين بيماري‌هاي غدد درون‌ريز و يكي از عوامل چهارگانه مرگ در ايالات متحده با شيوع ۳ تا ۱۰% مي‌باشد(۱). درصد بالاي مرگ و مير در افراد ديابتي بر اثر عوارض ميكرو و ماكروواسكولار مي‌باشد كه منجر به نارسايي كليه، چشم، دستگاه قلب و عروق وسيستم عصبي مركزي مي‌گردد (۲و۳). شواهد به‌دست آمده از آزمايش هاي باليني و مطالعه مدل حيواني نشان داده‌اند كه هيپرگليسميای ديابتي اصلي‌ترين عاملي است كه در مشكلات پيش‌رونده و ثانويه ديابت شركت دارد (۳و٤). گليكوزيلاسيون غيرآنزيمي پروتئين‌هاي بدن از جمله هموگلوبين كه ناشي از هيپرگليسميای طولاني مي‌باشد، يكي از علل اصلي مكانيسم هاي پاتوفيزيولوژيك ديابت مي‌باشد(٦-۲). گليكوزيلاسيون سبب تغيير در ساختار و عملكرد شماري از پروتئين‌ها از جمله ليپوپروتئين‌هاي موجود در غشاء، پروتئين‌هاي غشاي اريتروسيت‌ها، پلاكت‌ها، پروتئين‌آلفا كريستالين عدسي چشم و نيز پروتئين هاي سرمي انسان مثل آلبومين، هموگلوبين، كلاژن، ميلين و انسولين مي‌گردد(۱۵-٥). انتظار مي‌رود آنتي‌اكسيدان ها، گليكوزيلاسيون پروتئين ها را با يك مكانيسم بازدارنده مهار نمايند. تاكنون بيش از ٤۰۰۰ نوع مادة بي‌نظير آنتي‌اكسيدان از اندام‌هاي گياهي از جمله ميوه‌ها، سبزيجات، مغزها، دانه‌ها، ريشه‌ها و گل‌ها و نيز از چاي و شراب جدا شده‌اند (۱٦). فلاونوئيدها كه داراي خواص آنتي‌اكسيداني مي‌باشند، به طور وسيعي در سبزيجات و سايرگياهان وجود دارند. مطالعات زيادي درخصوص ظرفيت اين دسته از مواد در به‌دام انداختن راديكال هيدروكسيل و پروكسيل انجام شده است(۱۷و۱۸). فلاونوئيدها يك دسته مهم از تركيبات گياهي مي‌باشند كه داراي فعاليت‌هاي

بيوشيميايي مختلف و نيز از تركيبات مهم آنتي‌اكسيدان مي‌باشند. از آنجا كه فلاونوئيدها از نظر ساختمان شيميايي داراي دستجات مختلف مي‌باشند و با توجه به ارتباط ساختمان شيميايي فلاونوئيدها با طرز عمل آن ها، در اين تحقيق سعي شده است از فلاونوئيدهاي مختلف استفاده گردد. تأثيرات بازدارنده روتين[1]، كوئرستين[2] و كامفرول[3] در گليكوزيلاسيون هموگلوبين تحت شرايط in vitro نشان داده شده است(۱۹). هدف اين مطالعه اندازه‌گيري تأثيرات مهاري هفت نوع فلاونوئيد خالص شامل روتين،كوئرستين، كامفرول، مورين[4]، آپيژنين[5]، نارينجين[6] و بيوچانين‌آ[7] درگليكوزيلاسيون آلبومين، هموگلوبين و انسولين تحت شرايط in vitro مي‌باشد.

مواد و روش‌ها:

براي بررسي اثرات مهاري هفت نوع فلاونوئيد خالص شامل روتين، كوئرستين، كامفرول، مورين، آپي ژنين، نارينجين و بيوچانين آ بر گيلكوزيلاسيون آلبومين، هموگلوبين و انسولين تحت شرايط invitro، ابتدا محلول‌هاي پروتئيني تهيه گرديدند و ميزان گيلكوزيلاسيون آنها در حضور غلظت‌هاي مختلف و

1. Rutin 2. Quercitin 3. Kaempferol 4. Morin
5. Apigenin 6. Naringin 7. Biochanin A

نيز زمان‌هاي مختلف مورد بررسي قرار گرفت و بعد از به‌دست آمدن شرايط بهينه جهت گيلكوزيلاسيون هر پروتئين، تأثير هريك از فلاونوئيدها (در غلظت‌هاي مختلف) به‌طور جداگانه تعيين گشت كه مراحل انجام آن به شرح زير است:

۱-تهيه محلول‌هاي پروتئيني:

روش تهيه هموگلوبين مشابه گزارش قبلي ما مي‌باشد. خون از افراد داوطلب نرمال تهيه و از EDTA به‌عنوان ماده ضدانعقاد استفاده‌شد (۱۹). سلول هاي‌گلبول قرمز سه‌بار با محلول NaCl ۰/۱۴M شسته شد و سپس ۱ ميلي‌ليتر از سوسپانسيون گلبول هاي قرمز ليزشده با ۲ ميلي ليتر از بافر فسفات M

۰/۰۱ با pH= ۷/٤ و نيز ۰/٥ ميلي‌ليتر CCl_4 مخلوط گرديد. سپس قسمت ليزشده با استفاده از سانتريفوژ جدا گشت. لاية فوقاني جدا و غلظت هموگلوبين با روش Drabkin تعيين گرديد (۲۰و۲۱).

آلبومين انساني (sigma ٥g) با ۱۰۰ ميلي‌ليتر بافر فسفات ۰/۰۱M با pH = ۷/٤ رقيق گرديد. همچنين انسولين گاوي نرمال (۱۰۰ Iu/ml) از كارخانه Lilly تهيه‌گرديد. سپس باافزودن ۰/٥ميلي‌ليتر از بافرفسفات ۰/۰۱M با pH= ۷/٤ به صورت محلول آماده گشت.

۲-تعيين شرايط بهينه براي گليكوزيلاسيون پروتئين‌ها:

محلول گلوكز در غلظت‌هاي۰، ٤، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ٤۰ و ٥۰ mg/ml در بافر فسفات ۰/۰۱M با pH=۷/٤ حاوي جنتامايسين (۲۰mg/۱۰۰/ml) تهيه‌گرديد. غلظت بهينه گلوكز و زمان انكوباسيون به طور جداگانه براي هر پروتئين تهيه‌شد. محلول‌هاي پروتئيني به مدت ۲٤، ۷۲، ٤۸ و ۹٦ ساعت انكوبه‌شدند. پس از انكوباسيون با ۱ ميلي‌ليتر تري‌كلرواستيك اسيد۲۰% دو بار شستشو و به كمك سانتريفوژ در دور rpm ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقيقه جدا شدند. ته‌نشين به‌دست‌آمده در ۱۰۰°C به مدت يك‌ساعت در حمام آب گرم با يك ميلي‌ليتر از بافر فسفاتM۰/۰۱ با pH= ۷/٤ و نيز ۰/٥ ميلي‌ليتر از اسيداگزاليك N ۰/۳ قرارگرفت. سپس در حرارت اطاق (۲٥°C) با ۰/٥ ميلي‌ليتر تري‌كلرواستيك اسيد

٤۰% توسط سانتريفوژ در دور rpm ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقيقه مجدداً رسوبات جدا گرديد. محلول رويي جدا شد و سپس در ٤۰°C به مدت ۳۰ دقيقه با ۰/٥ ميلي‌ليتر از تيوباربيتوريك‌اسيد ۰/۰٥M مخلوطگرديد. محصول نهايي در ٤٤۳nm با روش كالريمتري اندازه‌گيري گرديد(۲۲).

۳-تهيه محلول‌هاي فلاونوئيد:

محلول‌هاي استوك (۱mg/ml) فلاونوئيدهاي روتين، كوئرستين و كامفرول از كارخانه مرك، مورين، نارينجين و آپيژنين از كارخانه سيگما و بيوچانين‌آ از آلدريچ تهيه شدند. سپس در

اتانول حل و آنگاه غلظتهاي۱۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ µg/ml از هرفلاونوئيد به صورت جداگانه در ديمتيلسولفوكسايد آماده شدند.

٤- روش اندازه‌گيري:

۱ ميلي ليتر آلبومين (۵۰ mg/ml) ، ۱ ميليليتر هموگلوبين (۵۰mg/ml)و ۰/۵ ميليليتر از انسولين نرمال (۱۰۰ Iu/ml) با ۰/۵ ميليليتر از بافر فسفات ۰/۰۱M با pH= ۷/٤ به مدت ۷۲ ساعت به صورت جداگانه در حضورغلظتهاي مختلف فلاونوئيدها و ۱ ميلي ليتر از محلول حاوي گلوكز(براي انسولين وآلبومين ۳۰mg/ml و براي هموگلوبين۲۰mg/ml) حاوي جنتامايسين ۲۰mg/۱۰۰ml در بافر فسفات ۰/۰۱M با pH = ۷/٤ انكوبه گرديدند. همچنين در گروه كنترل كه حاوي همة مواد بجز فلاونوئيدها بودند، آزمايش ها تكرار گرديد. سپس درجه گليكوزيلاسيون در حضور محصولات مختلف و نيز در فقدان آنها با اسپكتروفتومتراندازه‌گيري شد(۲۰و۲۲).

يافته‌ها:

زمان انكوباسيون و غلظت بهينه گلوكز براي هريك از محلول هاي پروتئيني در نمودارهاي ۱تا ۳ نشان داده شده است. درصد مهار گليكوزيلاسيون پروتئين ها به‌عنوان معياري از اثر فلاونوئيدهاي تحت آزمايش مورداستفاده قرارگرفت(جدول ۱). براي هرغلظت از پروتئين هاي تحت بررسي ، ۳ بار هر آزمايش تكرارگرديد و اعداد گزارششده به‌صورت ميانگين سه بار آزمايش بيان‌شده اند. آزمون T تفاوت آماري مهمي را بين نمونه هاي آزمايش و كنترل در تمام موارد تحت آزمايش نشان داد (P<۰/۰۵). مقايسه بين توان مهاركنندگي هر يك از فلاونوئيدها (در غلظت حداكثر) براي گليكوزيلاسيون غيرآنزيمي پروتئين ها به صورت ذيل بيان شده است:

۱- روتين و كامفرول حداكثر قدرت‌مهاركنندگي را در گليكوزيلاسيون انسولين داشته‌اند. ترتيب مهاركنندگي

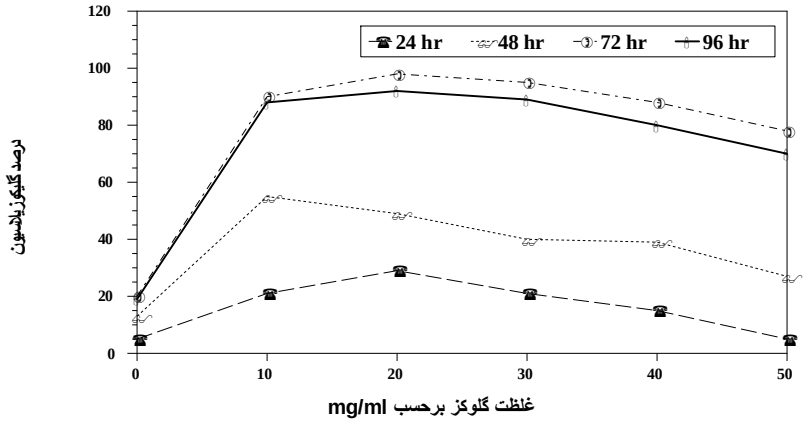
اين دو فلاونوئيد بر پروتئين‌هاي تحت آزمايش به شرح ذيل است:

هموگلوبين< آلبومين< انسولين.

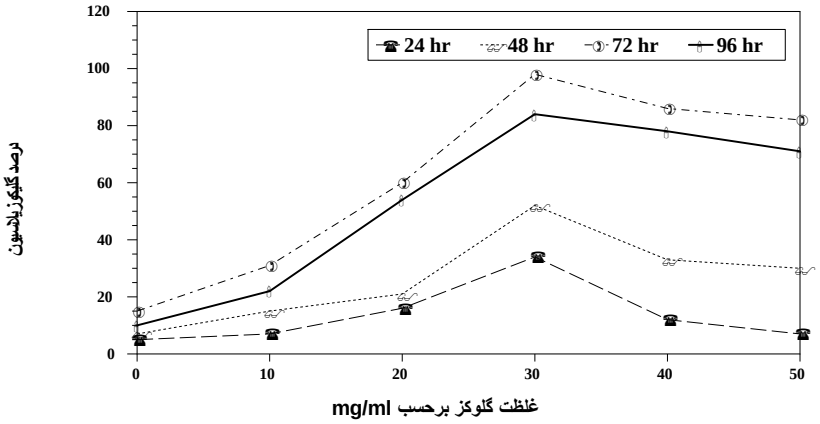
۲- كوئرسيتن داراي حداكثر اثر مهاري ۸۵% بر گليكوزيلاسيون آلبومين است. آپي‌ژنين حداكثر قدرت مهاركنندگي را بر گليكوزيلاسيون آلبومين (۱۰۰%) دارد. نارينجين گليكوزيلاسيون آلبومين را به ميزان ۹۷% مهار مي‌كند. مورين گليكوزيلاسيون آلبومين را به ميزان ۹۰% مهار مي‌كند.

بيوچانين‌آ نيز حداكثر اثر مهاري را بر گليكوزيلاسيون آلبومين و انسولين به ميزان ۱۰۰% دارد. ترتيب مهاركنندگي اين فلاونوئيدها بر پروتئين‌هاي موردآزمايش به شرح ذيل است:

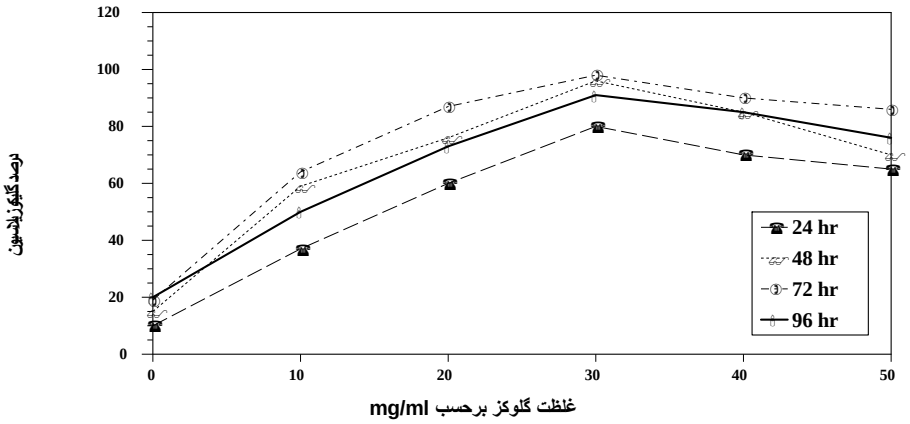
هموگلوبين < انسولين < آلبومين



ČZMNŽOZ- ميزان درصد گليكوزيلاسيون هموگلوبين در غلظت‌هاي مختلف گلوكز و زمان‌هاي مختلف انكوباسيون (P<۰/۰۵).



č3MÑÕZ - ميزان درصد گليكوزيلاسيون آلبومين در غلظت‌هاي مختلف گلوكز و زمان‌هاي مختلف انكوباسيون (P<۰/۰۵).



Ď3MÑÕZ - ميزان درصد گليكوزيلاسيون انسولين در غلظت‌هاي مختلف گلوكز و زمان‌هاي مختلف انكوباسيون (P<۰/۰۵).

ČğÞÝZ - درصد مهار گيلكوزيلاسيون هموگلوبين، آلبومين و انسولين توسط فلانوئيدهاي خالص.

پارامتر / غلظت* / تركيبات	هموگلوبين			آلبومين			انسولين		
	۰/۵	۵	۱۰	۰/۵	۵	۱۰	۰/۵	۵	۱۰
روتين	-	-	-	۸۳	۸۳	۹۳	۶۲	۸۳	۹۳
كوئرستين	-	-	-	۵۵	۶۵	۸۵	۴۵	۶۷	۷۹
كامفرول	-	-	-	۶۰	۷۰	۷۸	۶۲	۸۱	۹۳
مورين	۴۲	۵۰	۴۹	۷۲	۷۸	۹۰	۶۷	۷۷	۸۲
آپي ژنين	۲۹	۶۰	۶۴	۸۲	۹۹	۱۰۰	۴۲	۴۷	۶۱
ناريننجين	۳۹	۴۶	۵۹	۷۲	۷۹	۹۷	۶۴	۷۲	۷۲
بيوچانين آ	۴۷	۳۵	۶۶	۷۳	۹۷	۱۰۰	۷۰	۹۶	۱۰۰

* غلظت بر حسب(µg/ml)

بحث:

به رغم انسولين در ماني، در بيماران ديابتي مشكلات باليني خاصي براثرگلوكزبالاي‌خون وجود داردكه منجر به گليكوزيلاسيون غيرآنزيمي در پروتئين هاي عدسي چشم، پروتئين هاي غشاي سلولي، آلبومين، كلاژن هموگلوبين و ميلين مي‌گردد. در مطالعه Kampen تأثيرات بازدارنده فلاونوئيدهاي مختلف (۰/۵ µg/ml، ۵و ۱۰) در گليكوزيلاسيون هموگلوبين گزارش شده است. روتين به‌ميزان ۱۱، ۲۷ و ۴۲درصد، كوئرستين ۳، ۳۷و ۵۲ درصد و كامرول به‌ميزان

۱۰، ۱۲ و ۱۵ درصد گليكوزيلاسيون هموگلوبين را مهار مي نمايد(۱۹). در اين مطالعه آثار آنتي‌اكسيداني فلاونوئيدها و نيز قدرت مهاري آن‌ها بر گليكوزيلاسيون اكسيداتيو بررسي شده است.قدرت مهاري به صورت وابسته به غلظت در تمام حالات افزايش مي‌يابد. تغييرات گسترده‌اي كه در تأثيرات مهاري در گليكوزيلاسيون پروتئين‌ها مشاهده مي‌شود، احتمالاً ناشي از شركت بخش‌هاي مختلفي از گروه‌هاي عملكردي در واكنش‌هاي ملكول پروتئين مي‌باشد. غالباً ساختارمولكولي، اين تفاوت‌ها را توجيه مي‌كند؛ به‌طور مثال روتين در غلظت۰/۵μg/ml حداقل اثر مهاري را بر آلبومين نشان داده است(٦%)، در صورتي‌كه بر دو پروتئين ديگر اثر قابل‌ملاحظه‌اي داشته است. اين اثر ممكن است به‌طور جزئي بر اثر تفاوت در گونه‌ها و سايت‌هاي گروه‌هاي عملكردي و نيز ميزان فعاليت خود ملكول پروتئين باشد. به طور عمومي ساختار يك ملكول پروتئيني مي‌تواند اين‌تفاوت‌ها را توجيه كند. اين‌حقيقت‌كه گليكوزيلاسيون آلبومين به‌وسيله آپي‌ژنين (۱۰μg/ml) ۱۰۰% مهار مي‌گردد، مي‌تواند نقش احتمالي تأثير ساختار خواص شيميايي پروتئين را در چگونگي مهار گليكوزيلاسيون آن تقويت نمايد. از طرف ديگر، خواص ساختاري و شيميايي فلاونوئيدها مي‌تواند خود به‌تنهايي بيانگر اين تغييرات باشد(۲۳). نكته جالب توجه اينكه بيوچانين‌آ (۱۰μg/ml) كه داراي‌حداكثر اثر مهاري بر هر سه نوع پروتئين است، يك ايزوفلاون مي‌باشد، درحالي‌كه آپي‌ژنين كه تنها داراي خاصيت آنتي‌اكسيداني قابل‌توجهي برگليكوزيلاسيون آلبومين است، يك فلاون مي‌باشد. به نظر مي‌رسد ايزوفلاون‌بودن مولكول فلاونوئيد موجب افزايش خاصيت احياكنندگي يا الكترون‌دهندگي مولكول مي‌گردد و خاصيت آنتي‌اكسيداني آن را در مقايسه با ساير فلاونوئيدها در مهار گليكوزيلاسيون پروتئين‌ها افزايش مي‌دهد. از طرفي

ساختمان مولكولي آپيژنين(از دسته فلاونها) خاصيت الكترونده ندگي مولكول را در مقايسه با ساير فلاونوئيدها جهت مهار واكنش گليكوزيلاسيون آلبومين در رديف بيوچانين قرار ميدهد. در اين مورد نقش ساختمان مولكول آلبومين (در مقايسه با ساختمان مولكول انسولين و هموگلوبين) نيز در بروز اثر مهاري آپيژنين قطعاً مؤثر بوده است. يافته هاي مطالعه موجود نشان داده اندكه فلاونوئيدها، گليكوزيلاسيون آلبومين، هموگلوبين و انسولين را در شرايط in vitro مهار ميكنند. پيشنهاد ميشود كه اين آزمايشها بر مدلهاي حيواني و انساني انجام گيرد و با اطمينانيافتن از تأثير فلاونوئيدها بر مهار گليكوزيلاسيون پروتئينها در انسان از آنها به منظور پيشگيري و كنترل عواقب ناشي از گليكوزيلاسيون پروتئينها كه در تمامي سلول هاي بدن و حتي در سطح رسپتور انجام ميشود، استفاده نمود. مطالعات نشان داده است كه استرسهاي اكسيداتيو و نيز محصولات نهايي گليكوزيلاسيون عامل اصلي در پاتوژنز آتروا سكلروز، پيري و بسياري از بيماريها ميباشد و نيز مطالعاتاخير نشانداده است درصورتي كه از مواد cross-link breaker از قبيل ALT-711 استفاده شود، موجب بهبودي در وضعيت سيستم قلبي، عروقي و نيز كليوي در رتها خواهد شد(۲٤ و ۲٥).

References:

1. Vlassara H, Brownlee M, Cerami A. Non-enzymatic glycosylation of peripheral nerve protein in diabetes mellitus. Proc Natl Acad Sci USA 1981 Aug; 78(8):5190-2.
2. Chase HP, Jackson WE, Hoops SL, Cockerham RS, Archer PG, O'Brein D. Glucose control and the renal and retinal complications of insulin-dependent diabetes. JAMA 1989 Feb 24; 261(8): 1155-60.
3. The diabetes control and complications trial research group. The effect of intensive diabetes therapy on the development and progression of neuropathy. Am Intern Med 1995; 122:501-8.

4. Fox CJ, et al. Studies of unusual hemoglobin in patients with diabetes mellitus. Br Med J 1997; 2:605-7.
5. Friedman E, Rodby R, Cerami A, Bucala R. Hemoglobin-AGE: a circulating marker of advanced glycosylation. Science 1992 Oct 23; 258 (5082):651-3.
6. Bucala R, Cerami A. Advanced glycosylation: chemistry biology and implications for diabetes and aging. Adv Pharmacol 1992; 23:1-34.
7. Bunn HF. Evaluation of glycosylated hemoglobin in diabetic proteins. Diabetes 1981 Jul; 30(7): 613-7.
8. Nathan DM, Singer DE, Hurxthal K, Goodson JD. The clinical information value of glycosylated hemoglobin assay. N Engl J Med 1984 Feb 9; 310:341-346.
9. Bucala R, Makita Z, Koschinsky T, Cerami A, Valssara H. Lipid advanced glycosylation: Pathway for lipid oxidation in vivo. Proc Natl Acad Sci USA 1993 Jul 15; 90 (14): 6434-8.
10. Watala C, Witas H, Olszowska L, Piasecki W. The association between erythrocyte internal viscosity, protein non-enzymatic glycosylation and erythrocyte membrane dynamic properties in juvenile diabetes mellitus. Int J Exp Pathol 1992 Oct; 73(5): 655-63.
11. Bailey AJ, Robins SP, Tanner MJ. Reducible components in the proteins of human erythrocyte membrane. Biochim Biophys Acta 1976 May 20 ; 434(1):51-7.
12. Wolff SP. Diabetes mellitus and free radicals. Free radicals, transition metals and oxidative stress in the aetiology of diabetes mellitus and complications. Br Med Bull 1993 Jul; 49:645-652.
13. Liang JN, Chylack LT Jr. Change in the protein tertiary structure with non-enzymatic glycosylation of calf alpha-crystallin. Biochem Biophys Res Commun 1984 Sep 28; 123(3): 899-906.
14. Defronzo RA. Current therapy of diabetes mellitus. Philadelphia: Mosby, Inc; 1998, P.51-52.
15. Kohn RR, Cerami A, Monnier VM. Collagen aging in vitro by non-enzymatic glycosylation and browning. Diabetes 1984; 33:57-59.
16. Middlton E, Kandaswami C. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer: In: Harborne JB, editor. The flavonoid advances research science 1986. London: Chapman & Hall; 1994, P.619-652.

17. Afanas'ev IB, Dorozhko AI, Brodskii AV, Kostyuk VA, Potapovitch AI. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. Biochem Pharmacol 1989; 38 (11):1763-9.

18. Samuelsson G. Drugs of natural origin. 4th ed. Stockholm: Swedish Pharmaceutical Press; 1999, P.226-227.

19. Asgary S, Naderi GH, Sarraf-Zadegan N, Ghassemi N, Boshtam M, Rafie M, et al. Anti-oxidant effect of flavonoids on hemoglobin glycosylation. Pharm Acta Helv 1999 Feb; 73 (5): 223-226.

20. Burtis HF, Ashwood ER. Measurement of hemoglobin concentration in whole blood clinical chemistry: In: Burtis CA, A showed ER, editors. Tirtz text book of clinical chemistry 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders Co; 1994, P. 2020-2030.

21. Van Kampen EJ, Zijlstra WG. Determination of hemoglobin and its derivatives. Adv Clin Chem 1965; 8:141-187.

22. Fluckiger R, Winter halter KH. Biochemical and clinical aspects of hemoglobin abnormalities. Academic press, New York: Academic Press; 1978, P.208.

23. Mora A, Paya M, Rios JL, Alcaraz MJ. Structure-activity relationships of polymethoxyflavones and other flavonoids as inhibitors of non-enzymic lipid peroxidation. Biochem Pharmacol 1990 Aug 15; 40(4): 793-7.

24. Raj DS, Lim G, Levi M, Qualls C, Jain SK. Advanced glycation end products and oxidative stress are increased in chronic allograft nephropathy. Am J Kidney Dis 2004 Jan; 43(1):154-60.

25. Susic D, Varagic J, Ahn J, Frohlich ED. Cardiovascular and renal effects of a collagen cross-link breaker (ALT-711) in adult aged spontaneously hypertensive rats. Am J Hypertens 2004 Apr; 17(4): 328-33.