بررسی اثر پاپاورین بر فرآیند گلایکه شدن آلبومین سرم انسانی

علیرضا احمدزاده[1]*، محمد فیضی[2]، رضا غفارزادگان[3]

۱- دانشجوی دکتری پزشکی مولکولی، گروه پزشکی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران
۲- کارشناس ارشد اکولوژی، گروه علوم محیطی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه شهید چمران، اهواز
۳- کارشناس ارشد مهندسی داروسازی، گروه فارماکوگنوزی و داروسازی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، کرج
*آدرس مکاتبه: تهران، میدان ولیعصر، نرسیده به میدان فاطمی، خیابان میرهادی، مجتمع تخصصی شهید بیگ‌محمدی، پلاک ۹، کدپستی: ۱۴۱۵۸۹۴۱۸۱، تلفن: ۸۸۹۰۴۵۴۶ (۰۲۱)، نمابر: ۲۲۴۳۲۵۱۷ (۰۲۱)
پست الکترونیک: ali2@khayam.ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۰/۶/۲۰ **تاریخ تصویب:** ۹۱/۲/۹

چکیده

مقدمه: گلایکه شدن یک واکنش غیرآنزیمی است که با واکنش قند با گروه‌های آمین پروتئین شروع می‌شود. در مرحله اولیه گلایکه شدن سنتز ترکیبات حد واسط آمادوری رخ می‌دهد و در مرحله پایانی پس از یک سلسله واکنش‌های پیچیده و برگشت‌ناپذیر محصولات پیشرفته گلایکه شدن (AGE) ایجاد می‌شود.

هدف: بررسی اثر پاپاورین برفرایند گلایکه شدن آلبومین سرم انسانی.

روش بررسی: در این مطالعه آلبومین سرم انسان همراه با گلوکز و در حضور غلظت‌های مختلف پاپاورین به مدت ۴۲ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تیمار شد. همچنین HSA به تنهایی به عنوان نمونه کنترل و همراه با گلوکز به عنوان نمونه گلایکه و بدون قند در حضور غلظت‌های مختلف پاپاورین تحت همان شرایط نگهداری شد. سپس نمونه‌ها با دورنگنمایی دورانی، فلورسانس و اسپکتروسکوپی فرابنفش بررسی شد.

نتایج: گلایکه شدن آلبومین سرم با افزایش غلظت پاپاورین بیشتر می‌شود. نمونه‌های دارای پاپاورین و گلوکز تغییرات بیشتری در ساختار دوم، فلورسانس وابسته به محصولات AGE و تعداد لیزین آزاد نسبت به نمونه گلایکه و کنترل نشان می‌دهند.

نتیجه‌گیری: در گلایکه مارپیچ آلفا و صفحات بتا به ترتیب ۵/۷ درصد کاهش و ۳/۱ درصد افزایش نسبت به کنترل نشان می‌دهد. گلایکه ۱۴/۲ درصد فلورسانس بیشتر نسبت به کنترل نشان می‌دهد. تعداد لیزین آزاد برای گلایکه ۸ درصد نسبت به کنترل کاهش نشان می‌دهد. در نمونه‌های دارای پاپاورین و قند تمامی این موارد بیشتر تغییر می‌کند. به نظر می‌رسد پاپاورین با تغییر در آلبومین سبب شده لیزین‌های بیشتری با قند تماس پیدا کنند و لذا گلایکه شدن زیاد شود.

گل‌واژگان: گلایکه شدن، آلبومین، پاپاورین

www.SID.ir

مقدمه

پروتئین‌ها در بدن ممکن است به صورت گلیکوپروتئین تولید شوند مانند ایمنوگلوبولین‌ها. وجود قند در ساختار این گلیکوپروتئین‌ها برای فعالیت آنها ضروری است [۱،۲]. اضافه شدن قند به این گلیکوپروتئین‌ها به شکل آنزیمی است به این معنی که آنزیم به اسید آمین‌های سرین، ترئونین و یا آسپارژین در آنها قند اضافه می‌کند که این فرآیند گلیکوزیلاسیون نام دارد. اما در شرایط بیماری مانند دیابت که قند خون بالا است قند به شکل غیرآنزیمی با گروه ε- آمین اسید آمینه لیزین و گروه α- آمین در انتهای N- ترمینال پروتئین واکنش می‌دهد که این فرایند گلایکه شدن نام دارد. این واکنش در سال ۱۹۱۲ برای اولین بار توسط لوئیس میلارد کشف شد بنابراین به آن واکنش میلارد هم گفته می‌شود [۱،۲،۳،٤]. واکنش گلایکه شدن به دو مرحله تقسیم می‌شود: در مرحله اول قندهای احیاکننده مانند گلوکز با گروه‌های آمین آزاد در پروتئین واکنش داده سپس پیوند شیف باز تشکیل می‌دهند. این پیوند پایدار نیست و تشکیل آن برگشت‌پذیر است. در نتیجه نوآرایی ترکیبات حدواسط آمادوری تولید می‌شوند. در مراحل نهایی گلایکه شدن محصولات آمادوری به شکل آهسته و برگشت‌ناپذیر طی یک سلسله واکنش‌های پیچیده محصولات نهایی گلایکه شدن یا AGE (Advanced Glycation End Products) را ایجاد می‌کنند [٤،٥،٦]. محصولات نهایی گلایکه شدن شامل ترکیبات متنوعی می‌باشند با این وجود دارای ویژگی‌های مشترکی نیز می‌باشند. این ترکیبات برای بدن سمی بوده و به پروتئولیز مقاوم و دارای عمر طولانی هستند [٦،٧]. همچنین این محصولات دارای خاصیت فلورسانس بوده که از این ویژگی برای شناسایی آنها استفاده می‌شود [٦،٧،٨]. ساختار دوم پروتئین‌ها در اثر گلایکه شدن به شدت تغییر می‌کند میزان این تغییرات متناسب با میزان گلایکه شدن پروتئین‌ها می‌باشد. در بیشتر پروتئین‌ها پس از گلایکه شدن میزان مارپیچ آلفا کاهش ومیزان صفحات بتا در پروتئین افزایش می‌یابد. با توجه به هیدروفوب بودن صفحات بتا لذا محصولات نهایی گلایکه شدن تمایل به کنار هم قرار گرفتن و ایجاد ساختارهای آمیلوئیدی دارند که در آلزایمر هم دیده می‌شود [۹،۱۰،۱۱]. به خاطر واکنش قند با گروه آمین لذا گلایکه شدن با کاهش آمین آزاد در پروتئین همراه است. آلبومین سرم انسانی از جمله پروتئین‌هایی است که در معرض گلایکه شدن قرار دارد. گلوکز به طور عمده به گروه آمین لیزین‌های ۱۹۹، ۲۸۱، ٤۳۹ و ٥۲٥ در آلبومین سرم انسانی متصل می‌شود [۱۲]. پاپاورین یکی از آلکالوئیدهای تریاک است که از آن در درمان گرفتگی‌های رگی به ویژه رگ‌های قلب و مغز همچنین در درمان ناتوانی جنسی استفاده می‌شود. علاوه بر این پاپاورین سبب مهار آنزیم فسفو دی استراز و کاهش فعالیت پمپ سدیم – پتاسیم می‌شود [۱۳]. در این مطالعه هدف یافتن شواهدی مبنی بر نقش مثبت پاپاورین بر افزایش گلایکه شدن آلبومین سرم بود. در زمینه مطالعه عوامل افزایش دهنده گلایکه شدن مطالعات محدودی صورت گرفته و عوامل کمی مثل فسفات و گرما در این زمینه شناخته شده که با باز کردن ساختار پروتئین و افزایش تعداد لیزین‌های در تماس با قند سبب افزایش واکنش گلایکه شدن می‌شوند [۱٤،۱٥].

مواد و روش‌ها

آلبومین سرم انسانی و سدیم بیسینکونیک اسید از شرکت سیگما خریداری شد. فیلتر ۰/۲ میکرومتر، کیسه دیالیز ۱۰۰۰۰ MW، تری نیترو بنزن سولفونیک اسید یا TNBS، گلوکز، بافر فسفات، سدیم آزید و پاپاورین از شرکت مرک خریداری شد. همه محلول‌ها با آب دیونیزه تهیه شدند. برای آماده‌سازی نمونه‌ها آلبومین سرم انسانی ۱۰ میلی‌گرم در یک میلی‌لیتر در بافر فسفات ٥۰ میلی‌مولار؛ شامل آزیدسدیم ۱ میلی‌مولار برای جلوگیری از رشد قارچ و در حضور گلوکز ٤۰ میلی‌مولار؛ زمان گلایکه شدن دارای ارتباط مستقیمی با غلظت قند می‌باشد برای داشتن زمان کوتاه‌تر از این غلظت استفاده شده، و غلظت‌ها ٥۰۰، ۲٥۰، ۱۰۰، ۲٥ µM پاپاورین برای ٤۲ روز که حداقل زمان لازم برای رخداد گلایکه شدن می‌باشد و تحت دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. همچنین

Archive of SID

www.SID.ir

همان مقدار آلبومین سرم انسانی بدون هیچ افزودنی به عنوان کنترل یا H و در نمونه دیگری همراه با گلوکز ٤٠ میلی‌مولار به عنوان نمونه گلایکه یا H+G و همچنین همراه همان غلظت‌های پاپاورین بدون قند و در همان شرایط نگهداری شد. پس از ٤٢ روز نمونه‌ها در بافر فسفات سرد دیالیز و در دمای ٢٠- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس نمونه‌ها با کمک تست بیسینکونیک اسید تعیین غلظت شدند. این تست بر پایه توانایی این ماده در تشکیل کمپلکس با پیوند پپتیدی است که یک محصول بنفش رنگ را تولید می‌کند که در ٥٦٢ نانومتر حداکثر جذب را دارد. برای غلظت‌های مشخصی پروتئین جذب در حضور این ماده را اندازه می‌گیرند و با توجه به جذب نمونه مجهول در حضور این ماده و با تناسب غلظت مجهول را حساب می‌کنند [١٦]. با توجه به کاهش مارپیچ آلفا و افزایش صفحات بتا در نتیجه گلایکه شدن لذا از دورنگنمایی دورانی یا CD برای اندزه‌گیری تغییرات ساختار دوم آلبومین سرم٠/٢٠ میلی‌گرم در یک میلی‌لیتر با استفاده از دستگاه Aviv-215 در طول موج ٢٦٠ - ١٩٠ نانومتری استفاده شد [١٦]. با توجه به ایجاد خاصیت فلورسانس به دنبال تشکیل محصولات نهایی گلایکه شدن ایجاد فلورسانس در همه نمونه‌ها ١ میلی‌گرم در یک میلی‌لیتر با دستگاه فلورسانس Cary Eclipse در طول موج تحریکی – نشری ٥٤٠ - ٣٨٠/٣٩٠ نانومتر اندازه‌گیری شد [١٦]. گلایکه شدن کاهش گروه‌های امین مربوط به لیزین آزاد را به همراه دارد. برای تعیین گروه‌های آمین مربوط به ریشه‌های لیزین بی‌کربنات هیدروژن سدیم و TNBS ٠/١ درصد وزنی حجمی و ١٠ درصد سدیم دودوسیل سولفات و اسید کلریدریک ١ نرمال به نمونه‌های ٠/١ میلی‌گرم در یک میلی‌لیتر اضافه شد و بعد از یک ساعت جذب نمونه‌ها در ٣٣٥ نانومتری که نتیجه واکنش TNBS با گروه آمین آزاد است با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد [١٦]. سپس بر اساس جذب نمونه کنترل که تمام آمین‌های آزاد مربوط به لیزین در آن با TNBS واکنش می‌دهد و با توجه به اینکه آلبومین سرم دارای ٥٨ گروه آمین مربوط به لیزین است و بر اساس جذب دیگر نمونه‌ها با یک تناسب میزان گروه‌های آمین آزاد در نمونه‌های دیگر محاسبه شده است. همچنین با کمک دستگاه اسپکتروفتومتر و با دورنگنمایی دورانی اثر غلظت‌های ٥٠٠، ٢٥٠، ١٠٠، ٢٥ µM به تنهایی بر آلبومین سرم ١ میلی‌گرم در یک میلی‌لیتر در بافر فسفات ٥٠ میلی‌مولار در طول موج ٢٠٠ تا ٥٠٠ نانومتری مطالعه شد.

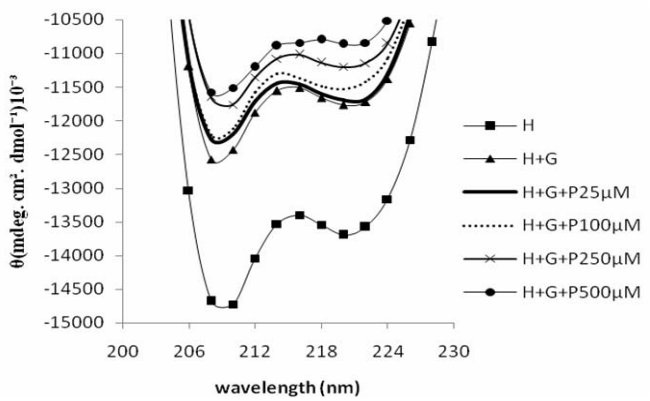
نتایج

بررسی اسپکترم دورنگنمایی دورانی شکل شماره ١ حضور دو کمینه منفی در ٢٠٨ و ٢٢١ نانومتری را در نمونه کنترل (H) نشان می‌دهد که نشان‌دهنده مارپیچ آلفا است برای نمونه گلایکه (H+G) این کمینه‌های منفی کاهش نشان می‌دهد. در نمونه‌هایی که علاوه بر گلوکز، پاپاورین نیز حضور دارد شدت این کمینه‌ها منفی بیشتر کاهش می‌یابد. جدول شماره ١ میزان مارپیچ آلفا و صفحات بتا نمونه‌های مختلف به دست آمده از دستگاه دورنگنمایی دورانی را نشان می‌دهد.

شکل شماره ٢ میزان تولید فلورسانس وابسته به محصولات نهایی گلایکه شدن را نشان می‌دهد. گلایکه شدن شدت فلورسانس وابسته به محصولات نهایی گلایکه شدن را زیاد می‌کند در نمونه‌هایی که علاوه‌بر گلوکز، پاپاورین هم حضور دارد شدت فلورسانس نسبت به نمونه گلایکه بیشتر افزایش نشان می‌دهد. شکل شماره ٣ ماکزیمم نشر فلورسانس در ٤٢٠ نانومتری را نشان می‌دهد.

شکل شماره ٤ جذب نمونه‌ها در ٣٣٥ نانومتری در حضور TNBS را نشان می‌دهد همانطور که دیده می‌شود نمونه کنترل بیشترین جذب را دارد. جذب در ٣٣٥ نانومتر نمونه گلایکه نسبت به کنترل کاهش دارد میزان جذب نمونه‌های همراه با پاپاورین و قند نسبت به نمونه گلایکه کاهش بیشتر دارد. جدول شماره ٢ هم میزان آمین آزاد مربوط به لیزین نمونه‌ها را نشان می‌دهد.

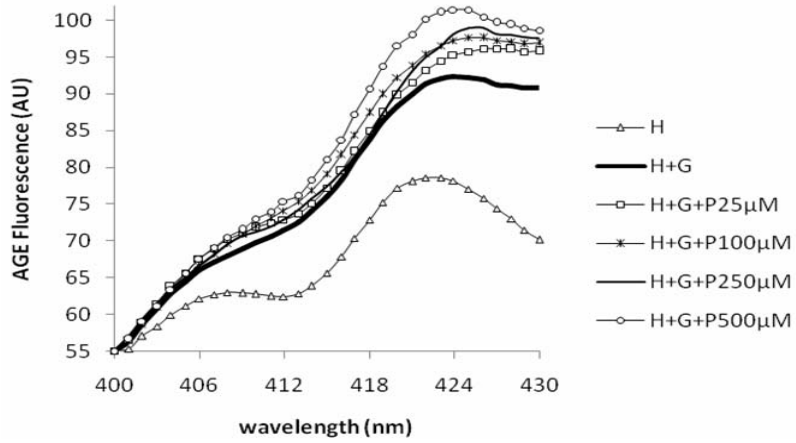
Archive of SID
www.SID.ir



شکل شماره ۱ – اسپکترم دورنگنمایی دورانی نمونه‌ها در بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار از چپ به راست به ترتیب نشان دهنده آلبومین، گلوکز، پاپاورین می‌باشد. P، G، H.

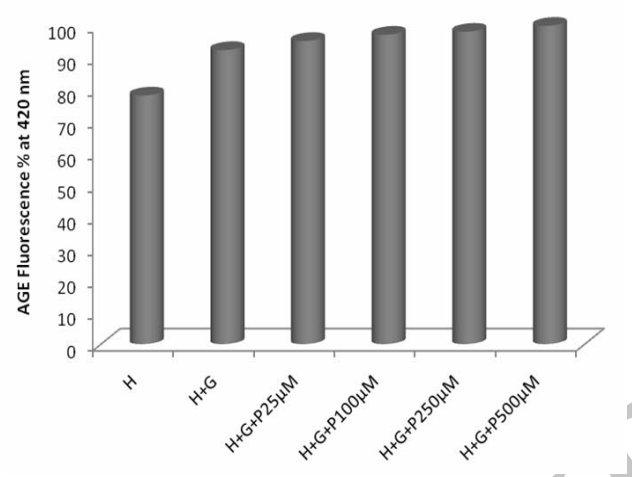
جدول شماره ۱– میزان آلفا هلیکس وصفحات بتا نمونه‌ها را نشان می‌دهد (به شکل شماره ۱ رجوع شود).

نمونه‌ها	درصد آلفا هلیکس	درصد صفحات بتا
H	٤٣/٦	١١٧
H+G	٣٧/٩	١٤/٨
H+G+P25µM	٣٦/٤	١٥/٧
H+G+P100µM	٣٦/٢	١٥/٩
H+G+P250µM	٣٥/٤	١٦/٢
H+G+P500µM	٣٥/١	١٦/٦

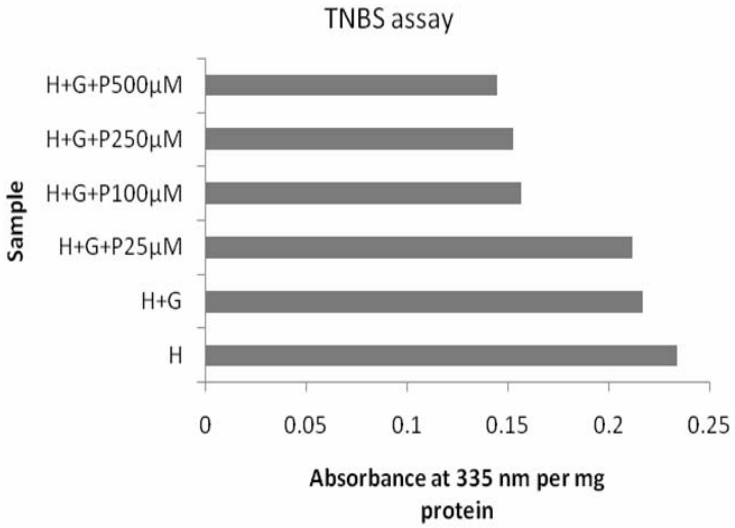


شکل شماره ۲ – میزان فلورسانس وابسته به محصولات نهایی گلایکه شدن نمونه‌ها (به شکل شماره ۱ رجوع کنید).

www.SID.ir



شکل شماره ۳- درصد فلورسانس نمونه‌ها که ماکزیمم آن در ٤٢٠ نانومتراست (به شکل شماره ۱ مراجعه شود)



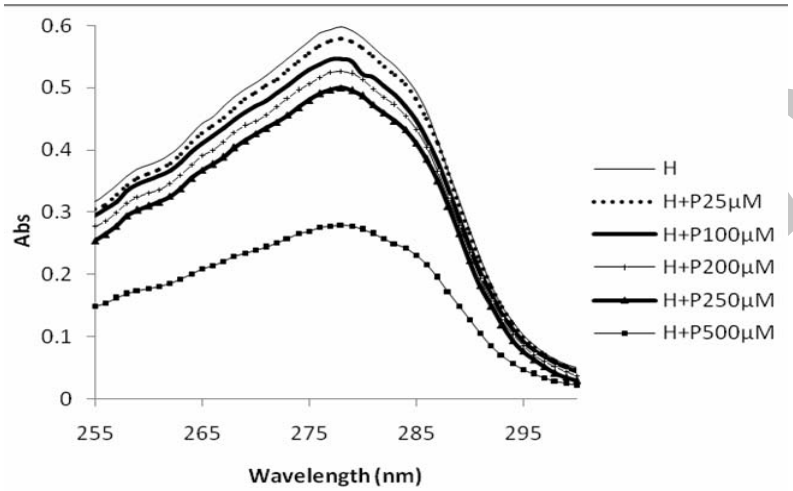
شکل شماره ٤ – میزان جذب در ۳۳۵ نانومتری نمونه‌ها (به شکل شماره ۱ رجوع کنید)

جدول شماره ۲- تعداد گروه آمین آزاد مربوط به ریشه لیزین (به شکل شماره ۱ رجوع کنید)

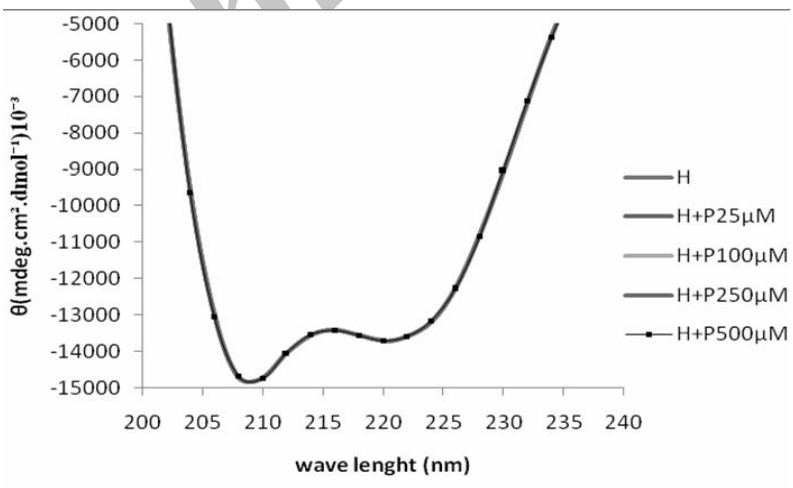
نمونه‌ها	تعداد لیزین آزاد
H	۵۸
H+G	۵۳
H+G+P25µM	۵۲
H+G+P100µM	۳۸
H+G+P250µM	۳۷
H+G+P500µM	۳۵

www.SID.ir

شکل شماره ۵ اثر غلظت‌های مختلف پاپاورین به تنهایی بر آلبومین سرم انسانی را نشان می‌دهد. این شکل نشان می‌دهد که پاپاورین جذب در ۲۸۰ نانومتری آلبومین را با افزایش غلظت خود کم کرده است. شکل شماره ٦ طیف دورنگنمایی آلبومین در حضور پاپاورین را نشان می‌دهد. این شکل نشان می‌دهد غلظت‌های مختلف پاپاورین در میزان آلفا هلیکس و صفحات بتا (که از اجزا ساختار دوم‌اند) نسبت به کنترل تغییری ایجاد نکرده است. لازم به ذکر است که آلبومین پروتئینی محلول، مونومریک و دارای سه دومین و ۵۸۵ اسید آمینه می‌باشد.



شکل شماره ۵- تأثیر غلظت‌های مختلف پاپاورین بر جذب ۲۸۰ نانومتری آلبومین سرم از چپ به راست به ترتیب نشان دهنده آلبومین، گلوکز، پاپاورین می‌باشد P، G، H.



شکل شماره ٦ – تأثیر غلظت‌های مختلف پاپاورین بر طیف دورنگنمایی دورانی آلبومین (به شکل شماره ٦ مراجعه کنید).

www.SID.ir

بحث

مهم‌ترین هدف این مطالعه به دست آوردن شواهدی برای بررسی اثر پاپاورین بر فرایند گلایکه شدن آلبومین سرم انسانی بود که این شواهد با مطالعات دورنگنمایی دورانی، فلورسانس وابسته به تولید محصولات نهایی گلایکه شدن، بررسی میزان آمین آزد مربوط به لیزین و طیف سنجی فرابنفش حاصل شد. گلایکه شدن با کاهش میزان مارپیچ آلفا و افزایش صفحات بتا همرا است [۹،۱۰،۱۱]. همانطور که در شکل شماره ۱ دیده می‌شود کمینه‌های ۲۰۸ و ۲۲۱ نانومتری که نشانگر مارپیچ آلفا است در نمونه گلایکه (H+G) نسبت به نمونه کنترل (H) کاهش نشان می‌دهد برای دیگر نمونه‌ها که پاپاورین و قند حضور دارد میزان کاهش نسبت به نمونه گلایکه بیشتر است. محاسبه میزان مارپیچ آلفا و صفحات بتا با نرم‌افزار cdnn و جدول شماره ۱ هم این مطلب را تائید می‌کند که با افزایش غلظت پاپاورین گلایکه شدن بیشتر اتفاق می‌افتد به طوری‌که در نمونه گلایکه فقط ۳/۱ درصد نسبت به کنترل صفحات بتا افزایش نشان می‌دهد اما در نمونه دارای قند و پاپاورین ۵۰۰ ماکرومولار این میزان به ٤/۹ درصد نسبت به کنترل می‌رسد همچنین در نمونه گلایکه مارپیچ آلفا ۵/۷ درصد نسبت به کنترل کاهش دارد اما در نمونه دارای قند و پاپاورین ۵۰۰ ماکرومولار این کاهش به ۸/۵ درصد نسبت به کنترل می‌رسد. به دنبال واکنش گلایکه شدن تولید محصولات نهایی گلایکه شدن اتفاق می‌افتد که دارای خاصیت فلورسانس می‌باشد [٦،۷،۸]. همان‌طور که در شکل شماره ۲ دیده می‌شود میزان فلورسانس برای نمونه گلایکه ١٤/٢ درصد نسبت به نمونه کنترل افزایش دارد و برای نمونه‌هایی که قند و پاپاورین حضور دارد با افزایش غلظت پاپاورین میزان فلورسانس بیشتر نسبت به نمونه گلایکه افزایش نشان می‌دهد به طوری‌که نمونه دارای قند و پاپاورین ۵۰۰ ماکرومولار دارای بیشترین فلورسانس می‌باشد که ماکزیمم آن در طول موج ٤۲۰ نانومتری می‌باشد (شکل شماره **۳**). به خاطر واکنش قند با گروه‌های آمین میزان آمین آزاد در پروتئین کاهش می‌یابد [۱۲،۱۸]. با کاهش آمین آزاد TNBS نمی‌تواند با گروه آمین واکنش دهد لذا جذب در ۳۳۵ نانومتری کاهش می‌یابد. همان‌طور که در شکل شماره ٤ و جدول شماره ۲ دیده می‌شود در نمونه گلایکه نسبت به نمونه کنترل میزان آمین آزاد کاهش دارد. برای نمونه‌هایی که قند و پاپاورین حضور دارد با افزایش غلظت پاپاورین میزان آمین آزاد نسبت به نمونه گلایکه بیشتر کاهش می‌یابد برای نمونه گلایکه میزان آمین آزاد ۸ درصد نسبت به کنترل کاهش دارد اما در نمونه دارای قند و پاپاورین ۵۰۰ ماکرومولار میزان آمین آزاد ۳۹/۷ درصد نسبت به کنترل کاهش نشان می‌دهد. جذب در ۲۸۰ نانومتر برای پروتئین‌ها در ارتباط با حضور اسید آمینه‌های تیروزین، فنیل آلانین و تریپتوفان می‌باشد [۱۹] هرگونه تغییر در وضعیت این ریشه‌ها با تغییر در جذب ۲۸۰ نانومتری همراه است. شکل شماره ۵ نشان می‌دهد در حضور پاپاورین وضعیت این ریشه‌ها در آلبومین تحت تأثیر قرار گرفته به عبارت دیگر پاپاورین به نحوی بر ساختار آلبومین اثر گذاشته است از طرفی شکل شماره ٦ نشان می‌دهد پاپاورین بر میزان آلفا هلیکس و صفحات بتا که از اجزا ساختمان دوم پروتئین‌اند اثری نداشته است. اما با توجه به شکل شماره ۵ نیز می‌توان گفت تغییر در جذب ۲۸۰ نانومتری که با تغییر در وضع ریشه‌های اروماتیک صورت گرفته نتیجه تغییراتی است که پاپاورین بر ساختار آلبومین وارد کرده است. به عبارت دیگر به نظر می‌رسد پاپاورین در ساختار سوم پروتئین تغییر ایجاد کرده است. در اینکه پاپاورین چگونه این تغییر را سبب شده می‌توان گفت همان‌طوری که می‌دانیم در شکل‌گیری ساختار سوم پروتئین بر همکنش‌های ضعیف داری اهمیت می‌باشند و از مهم‌ترین این برهمکنش‌ها پیوند هیدروژنی و برهمکنش هیدروفوب می‌باشد. پاپاورین به علت وجود گروه‌های متیل و حلقه‌های بنزنی برهمکش‌های هیدروفوبیک در آلبومین را تحت تأثیر قرار می‌دهد [۱۷]. از طرفی در ساختار پاپاورین نیتروژن و اکسیژن وجود دارد که قابلیت تشکیل پیوند هیدروژنی با آلبومین را دارند [۱۷،۱۹] در نتیجه پاپاورین در ساختار سوم

Archive of SID
www.SID.ir

آلبومین تغییر ایجاد کرده به گونه‌ای که لیزین‌های بیشتری در تماس با قند قرار گرفته و گلایکه شدن بیشتر اتفاق افتاده و در نتیجه واکنش گلایکه شدن ساختار دوم پروتئین (به صورت کاهش مارپیچ آلفا و افزایش صفحات بتا) تغییر می‌یابد که در شکل شماره ۱ دیده می‌شود. در واقع پاپاورین مانند گرما و فسفات [۱۴،۱۵] با مکانیسم اثرگذاری بر ساختار پروتئین سبب شده که لیزین‌های بیشتری با قند تماس پیدا کند و به دنبال آن گلایکه شدن بیشتر افزایش یابد.

نتیجه‌گیری

کلیه روش‌های استفاده شده در این مقاله اعم از مطالعات دورنگنمایی دورانی، فلورسانس وابسته به محصولات نهایی گلایکه شدن و محاسبه لیزین آزاد و طیف سنجی فرابنفش تائید می‌کند که حضور پاپاورین سبب افزایش فرایند گلایکه شدن آلبومین سرم انسانی شده است. به عنوان یک پیشنهاد برای بررسی بیشتر در این زمینه می‌توان این اثر پاپاورین بر روی گلایکه شدن آلبومین را در موش‌های دیابتی شده بررسی کرد.

منابع

1. Rohovec J, Maschmeyer T, Peter A. The structure of the sugar residue in glycated human serum albumin and its molecular recognation. *J. Chem*. 2003; 9: 2193 - 9.

2. Bijukumer G, Karmakar N, Anand S, Misra A. Auto fluorescence characterization of advanced glycation end product of hemoglobin. *J. Spectrochemica Acta* 2005; 61: 163 - 70.

3. Schalkwijk C, Stehouwer C, Hinsbergh V. Fructose mediated non enzymatic glycation sweet coupling or bad modification. *J. Diabets* 2004; 20: 369 - 82.

4. Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. A review advanced glycation end-products. *J. Diabetologia* 2002; 44: 129 – 46.

5. Vigneshwaran N, Bijukumar G, Karmakar N, Anand S, Misra A. Fluorescence and biochemical characterization of glycated hemoglobin. *J. Macromol. Symp*. 2003; 193: 119 - 27.

6. Kikuchi S, Shimpo K, Takeuchi M, Yamagishi S, Makita N. Glycation sweet temper for neuronal death. *J. Brain Research Rev*. 2003; 41: 306 - 23.

7. Schmitt A, Gasic Milenkovic J, Schmitt J. Characterization of advanced glycation end products mass changes in Correlation to side chain modification. *J. Anal. Biochem*. 2005; 10: 1016 - 21.

8. Yeargans G, Seidler N. Carnosine promotes the heat denaturation of glycated protein. *J. Biochem*. 2003; 300: 75 - 8.

9. Seidler N, Seible I. Glycation of aspartat aminotransferase and conformational flexibility. *J. Biochem*. 2000; 277: 47 - 50.

10. Seidler N, Kowalewski C. Methyl glyoxal induce glycation affects protein topography. *J. Biochem*. 2003; 410: 149 - 54.

11. Stitt A, Acad Y, Ann N .the millard reaction in eye disease. *J. Diabets* 2005; 1043: 585 - 97.

12. Iberg N, Fluckiger R.Nonenzymatic glycosylation of albumin in vivo. *J. Bio. Chem*. 1996; 29: 13542 - 5.

13. Asadi Karam G, Rashidinejad HR, Aghaee MM, Ahmadi. Opium can differently alter blood glucose, Sodium and Potassium in male and female Rat. *J. Pak. Pharm*. 2008; 21: 180 - 4.

14. Gil H, Salcedo D, Romero R.effect of phosphate buffer on the kinetics of glycation protein. *J. Physica. Org. Chem.* 2005; 10: 183 - 6.

15. Norbert W, George S. Effect of thermal denaturation on protein glycation. *J. Life of Sci.* 2002; 70: 1789 - 99.

16. Sattarahmady N, Khodagholi F, Moosavi Movahedi AA, Heli H, Hakimelahi GH. Alginate

Archive of SID

www.SID.ir

as an anti glycating agent for HAS. *J. Biologica. Macromolecules* 2007; 10: 1017 - 24.

17. Whiteled CG, Daya S. Protein-ligand interaction 6 nicotinic acetylcholine receptor agonist activity of Isoquinoline alkaloids. *J. Bioorganic & Med. Chem. Letter* 2001; 23: 2801 - 6.

18. Anil KUMAR P, Satish KUMAR M, Bhanuprakash REDDY G. Effect of glycation on α-crystallin structure and chaperone-like function. *J. Biochem*. 2007; 408: 251 – 8

19. Cheng-nong Y, Yun-feng S. Thermodynamic Study of Characteristics of the Binding Reaction of Papaverine with Bovine Serum Albumin (BSA). *J. Cnki*. 2004; 1001 - 4020.

Archive of SID

www.SID.ir