

مروری بر گلايکه شدن پروتئين‌ها؛ نگاهی بر ترموديناميك و تشكيل ساختار فيبريلي در آلبومين سرم انساني

علی اکبر موسوی موحدی^{۱*}، مهران حبیبی رضایی^۲، موسی بهلولی^۱، نغمه ستار احمدی^۴، احمد محمدی نژاد^۵، مسعودامانلو^۶، فرشته تقوی^۱

چکیده

مجاورت زمان دار قندها با پروتئين‌ها باعث گلايکه شدن غير آنزيمي شده و موجب ايجاد تغييرات ساختاری و عملکردی در پروتئين‌ها می‌شود. فرایند گلايکه شده پروتئين‌ها به بروز اختلالات زیادی از جمله بیماری‌های عصبی، کبدی، کلیوی و نیز پیری منجر می‌شود؛ به همین سبب تجمعات پروتئينی غير محلول ناشی از فرایند گلايکه شدن، از نشانه‌های تشخیصی بیماری‌های مربوط محسوب می‌گردد. در این مقاله، تغییرات ساختاری ايجاد شده در آلبومين سرم انساني در اثر گلايکه شدن با استفاده از روش‌های گوناگون مانند گرماسنجی روبش دمایی (DSC)، طیف سنجی‌های مرئی و نامرئی؛ دورنگ نمایی چرخشی (CD) و فلورسانس مورد مطالعه قرار گرفته است. اتصال گلوکز با آلبومين سرم انساني باعث بروز تغییر در ساختارهای دوم و سوم و ايجاد دمين‌های انرژتیک جدید به صورت وابسته به غلظت گلوکز می‌گردد. در صورت مجاورت آلبومين سرم انساني با گلوکز و سایر قندها در مدت‌های طولانی (۲۰ هفته)، به مرور مقدار مارپیچ‌های آلفا کاهش یافته و صفحات بتا افزایش می‌یابد. این فرایند در نهایت منجر به شکل‌گیری ساختارهای شبه آمیلوئیدی و فیبریلی می‌شود که توسط میکروسکوب الکترونی مورد عکسبرداری قرار گرفته است. در میان قندها، ریبوز بیشترین اثر و گلوکز کمترین اثر را در فیبریل‌زایی ایفا می‌نمایند.

واژگان کلیدی: گلايکه شدن، دمين انرژتیک، آلبومين سرم انساني، آمیلوئید، گرماسنجی روبش دمایی، فیبریل شدن، کاهش کشش سطحی، واسرشتگی، میکروسکوب الکترونی

۱- مرکز تحقیقات بیوشیمی بیوفیزیک، دانشگاه تهران

۲- قطب علمی بیو ترمودینامیک، دانشگاه تهران

۳- دانشکده زیست شناسی، دانشگاه تهران

۴- دانشگاه علوم پزشکی شیراز

۵- دانشگاه علوم پزشکی مشهد

۶- دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

* **نشانی:** تهران، خیابان ۱۶ آذن، سازمان مرکزی دانشگاه تهران، مرکز تحقیقات بیوشیمی بیوفیزیک دانشگاه تهران، تلفن: ۶۶۴۰۳۹۵۷، نمابر: ۶۶۴۰۴۶۸۰، پست الکترونیک: moosavi@ibb.ut.ac.ir

تعریف گلیکته شدن

گلیکته شدن^۱ یک واکنش تراکمی خودبخودی غیر آنزیمی بین گروه‌های آمین آزاد از بیومولکول‌ها بویژه پروتئین‌ها با گروه کربنیل از کربوهیدرات‌های احیا کننده از طریق ایجاد یک پیوند کووالانسی است. در اثر گلیکته شدن، محصولات متنوعی ایجاد می‌شود که این ترکیبات موجب بروز تغییرات ساختاری و عملکردی در پروتئین‌ها می‌گردد.

تاریخچه مطالعات گلیکته شدن

واکنش شیمیایی گلیکته شدن برای اولین بار به وسیله یک شیمیدان فرانسوی به نام Louis Camille Maillard در سال ۱۹۱۲ میلادی مطرح شد [۱]. او واکنش قهوه‌ای شدن در خلال واکنش بین آمینو اسید و کربو هیدرات‌های ساده را بیان کرد که به هنگام پختن غذا اتفاق می‌افتد. چهل سال بعد در سال ۱۹۵۳، Hodge مسیر شیمیایی این واکنش را توصیف نمود و بدین ترتیب واکنش میلارد به عنوان نقطه شروعی برای محققانی که در حوزه گلیکته شدن پروتئین کار می‌کردند، محسوب گردید [۲]. Wallenius و Kunkel در سال ۱۹۵۵، اولین پروتئین گلیکته شده را کشف کردند. این پروتئین‌ها دسته‌ای از هموگلوبین‌ها بودند که از طریق واکنش میلارد در جایگاه‌های مختلف آنها تغییراتی ایجاد شده بود [۳]. Cerami و Monnier در سال ۱۹۸۱، نقش واکنش میلارد در فرایند سالخوردگی را مطرح کردن [۴]. تئوری "پیری از طریق گلیکته شدن" با توجه به جذابیت موضوع باعث گسترش توجه به واکنش میلارد در شرایط *in vivo* گردید.

Brownlee و همکارانش در سال ۱۹۸۴، برای نام‌گذاری محصول نهایی فرایند گلیکته شدن اصطلاح "AGE"^۲ را بکار بردند [۵]. Ahmed و همکارانش در سال ۱۹۸۶، اولین ترکیب AGE در شرایط *in vivo* یعنی ان-کربوکسیل متیل لیزین^۳ (CML) را کشف نمودند [۶]. Dyer و همکارانش در سال ۱۹۹۱، اصطلاح "گلیکته اکسیداسیون"^۴ را در متون رایج نمودند که این واژه به اثر اکسیده شدن رادیکالی

در فرایند گلیکته شدن اشاره دارد [۷]. Requena و همکارانش در سال ۱۹۹۶، مسیر دیگری را برای تشکیل AGE، یعنی "محصول نهایی اکسیده شدن اسید چرب اشباع نشده"^۵ (ALE) یافتند که باعث افزایش AGE می‌گردید [۸]. سرامی و همکارانش [۹] از یک سو، و Koschinski و همکارانش [۱۰] از سوی دیگر در سال ۱۹۹۷، به طور همزمان سمی بودن AGE موجود در مواد غذایی را مطرح نموده و اصطلاح "گلیکته توکسین"^۶ را مرسوم ساختند. موسوی موحدی و همکاران در سال ۲۰۰۲ خواص ترمودینامیکی گلیکته شدن آلبومین سرم انسانی را مطالعه و دو مجموعه جایگاه اتصال را برای آن مطرح کردند [۱۱]. این گروه در سال ۲۰۰۷ بیان کردند که آلبومین سرم انسانی بعد از ۲۱ روز از مجاورت زمان‌دار با گلوکز حالت شبه "مولتن گلوبول" را ایجاد می‌نماید [۱۲]. ستار احمدی و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان دادند که گلیکته کردن طولانی HSA باعث توده‌ای شدن، فیبریل شدن و کاهش کشش سطحی آن می‌گردد و محصول حاصل نقش مواد فعال سطحی و مواد غیر طبیعی کننده را برای پروتئین ایفا می‌کند [۱۳]. خزاعی و همکاران در سال ۲۰۰۸ القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌های میکروگلیال به وسیله محصولات گلیکته شدن آلبومین را گزارش نموده و شواهد لازم در خصوص مشارکت گیرنده AGE موسوم به RAGE در بروز اثرات سمی فرآورده‌های مذکور را گزارش نمودند [۱۴]. ستار احمدی و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که خصوصیات بیوفیزیکی HSA گلیکته در شرایط *in vitro* و *in vivo* یکسان است و در هر دو حالت افزایش غلظت قند باعث کاهش ساختارهای آلفا، تعداد اسید آمینه‌های لیزین، کشش سطحی و افزایش محصولات AGEs و آمادوری می‌شود. تنها تفاوت شرایط *in vitro* و *in vivo*، تفاوت در تعداد آرژینین‌های آزاد و بیشتر بودن آن در شرایط *in vitro* است [۱۵]. جدول ۱ مروری از رویدادهای گلیکته شدن پروتئین‌ها را نشان می‌دهد.

5- Advanced Lipoxidation End-Products
6- Glycotoxine
7- Receptor of advance glycation end products

1- Glycation
2- Advanced Glycation End product
3- Carboxy methyl lysine (CML)
4- Glycoxidation

فرایند گلاایکه شدن و محصولات آن

این فرایند شامل سه مرحله است که با تشکیل برگشت‌پذیر پیوند از نوع باز شیف^۱ میان گروه [۶،۱۲] آلدئید (یا کتون) قند و گروه آمین زنجیره پروتئین آغاز می‌شود (شکل ۱). بازشیف به صورت برگشت‌ناپذیر متحمل نوآرانی آمادوری^۲ شده و محصولات کربونیل داری از جمله گلی اکسال^۳، متیل گلی اکسال^۴ و^۳-دی اکسی گلوکوسون^۵ تشکیل می‌شود.

مشتقات مزبور نسبت به قندهای اولیه خود، واکنش‌پذیرترند. در نتیجه برقراری اتصالات متقاطع با نواحی پروتئینی، متعاقباً مجموعه متنوعی از محصولات AGE از این مشتقات تولید می‌شود. برخی از محصولات مذکور بین دو اسید آمینه قرار دارند مانند فرولیمیدازول^۶، آلکیل فرمیل گلیکوسیل پیرو^۷ و برخی از آنها فقط به یک اسید آمینه متصل شده‌اند مانند پیرالین^۸، کربوکسی متیل لیزین و ایمیدازول^۹. با وجود ناهمگنی در ساختار ترکیبات AGE ها وجه مشترک در تشکیل آنها، ایجاد اتصالات کووالان است. پروتئین‌هایی که تحت تأثیر این فرایند قرار می‌گیرند به طور معمول پایدار و دارای عمر طولانی خواهند بود. همچنین این محصولات به پروتئولیز مقاوم بوده و نسبت به فرم طبیعی غیر محلول‌اند [۱۴].

بیش از دوازده نوع ترکیبات AGE در بافت‌های مختلف شناسایی شده‌اند که به طور کلی می‌توان آنها را در سه دسته اصلی تقسیم‌بندی نمود:

الف: ترکیباتی با اتصال عرضی و دارای خاصیت فلورسانس: پنتوزیدین^{۱۰} که اتصال عرضی میان باقیمانده‌های آرژنین و لیزین بوده و سطح آن در دیابت افزایش می‌یابد. کروس لین^{۱۱} که برای اولین بار در کلیه دیابتی موش مشاهده شد و می‌تواند در شرایط *in vivo* و *in vitro* تشکیل می‌گردد. ب: ترکیباتی با اتصال عرضی و فاقد خاصیت فلورسانس:

دی لیزین ایمیدازولیوم^{۱۲} که اتصال عرضی دو لیزین است. آلکیل فرمیل گلیکوسیل پیرو^{۱۳} (AFGP) که از واکنش دو قند و یک باقیمانده لیزین ایجاد می‌گردد (البته در شرایط *in vivo* اهمیت کمی دارد). همچنین آرژنین- لیزین ایمیدازول^{۱۴}.

پ: ترکیبات AGE بدون اتصال عرضی: پیرالین^{۱۵} که در پوست انسان، پلاسما و پلاک‌های مغزی مشاهده شده است. آن- کربوکسیل متیل لیزین (CML) از شکسته شدن اکسیداتیو محصول آمادوری ایجاد می‌شود و همین طور در خلال اکسیده شدن فلز، کاتالیز اسیدهای چرب اشباع نشده در حضور پروتئین ایجاد می‌گردد که از مهمترین ترکیبات AGE در شرایط *in vivo* می‌باشد [۱۷].

عوامل موثر بر گلاایکه شدن

واکنش گلاایکه شدن بدون دخالت آنزیم انجام می‌شود؛ به همین سبب در شرایط *in vivo* از طریق غلظت قند، غلظت پروتئین، طول عمر پروتئین، مقدار واکنش‌پذیری گروه آمین آزاد و نفوذپذیری دیواره سلولی نسبت به گلوکز کنترل می‌گردد [۱۶،۱۸]. عوامل مختلفی بر سرعت واکنش‌های گلاایکه شدن تأثیر می‌گذارند. عواملی چون گرما، فلزات واسطه مانند مس و آهن، رادیکال‌های آزاد و افزایش غلظت قند میزان گلاایکه شدن را افزایش می‌دهند. همچنین افزایش غلظت فسفات و pH محیط نیز بر شدت گلاایکه شدن اثری مستقیم دارند [۱۹].

بیماری‌های مرتبط با فرایند گلاایکه شدن

امروز بسیاری از تجمع‌های غیر طبیعی زیستی و بیوشیمیایی مرتبط با دیابت و سالخوردگی را (مثل سفت شدن رگ‌ها و مفصل‌ها، تنگ شدن رگ‌ها، تغییر برگشت‌پذیری پروتئین‌ها و سلول‌ها، ایجاد آب مروارید چشم) به گلاایکه شدن پروتئین‌ها نسبت می‌دهند. گزارش شده است که گلاایکه شدن پروتئین‌ها به غیر قابل هضم شدن پروتئین‌ها، عدم حالیت، افزایش مقاومت در برابر واسرشته شدن حرارتی و

- 1- Schiff-base
- 2- Amadori rearrangement
- 3- Glyoxal
- 4- Methylglyoxal
- 5- 3-deoxyglucosone
- 6- Furoylimidazole (FFI)
- 7- Alkyl Formyl Glycosyl Pyrrol (AFGP)
- 8- Pyrraline
- 9- Imidazolone
- 10- Pentosidine
- 11- Crosslines

- 12- Imidazolium dilysine
- 13- Alkyl formyl glycosyl pyrrole
- 14- Arginine-lysine imidazole
- 15- Pyrraline

گلیسرآلدئید، یوریدین دی فسفات گلوکز و ترکیبات دی کربونیل اشاره نمود [۳۰].

اثرات مولکولی گلايکه شدن

گلايکه شدن پروتئین‌ها منجر به تغییرات در سطح ساختارهای دوم و سوم در پروتئین‌ها می‌شود. ساختار دوم پروتئین‌ها در اثر گلايکه شدن به شدت تغییر می‌کند. میزان تغییر ساختار دوم متناسب با میزان گلايکه شدن پروتئین‌هاست. در بیشتر پروتئین‌ها پس از فرآیند گلايکه شدن، ساختارهای مارپیچ آلفا به صفحات بتا تبدیل می‌شود. سازوکار این تبدیل به این صورت است که ابتدا پروتئین در اثر گلايکه شدن تا حدی واسرشته می‌شود. سپس در اثر استرس‌های مکانیکی که گلايکه شدن بر ساختار پروتئین اعمال می‌کند، پروتئین با یک ساختار فضایی جدید بازتابیده می‌شود که از نظر انرژی صفحات بتا در آن ترجیح دارند. هنگامی که در پروتئین‌ها میزان صفحات بتا بالا می‌رود، این صفحات در مجاورت هم قرار می‌گیرند؛ سپس بر روی هم فشرده^۷ شده و در نهایت پروتئین‌ها تجمع پیدا کرده و رسوب می‌کنند. تشکیل رسوب‌ها به مقدار زیاد منجر به ساختارهای آمیلوئیدی می‌شود (شکل ۲) [۳۱].

گلايکه شدن پروتئین‌ها باعث تغییر در ساختار فضایی آنها می‌شود؛ از آنجاکه فعالیت پروتئین دارای رابطه مستقیم با ساختار آن است، بنابراین گلايکه شدن، عملکرد و فعالیت پروتئین‌ها را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهد. به علت اتصال گروه‌های غیر یکنواخت حلقوی^۸ ترکیبات AGE به سطح پروتئین‌ها و همچنین حذف گروه‌های قطبی (آمین آزاد) از سطح آنها، آب‌گریزی سطح پروتئین‌های گلايکه شده افزایش می‌یابد. همچنین این افزایش آب‌گریزی می‌تواند به علت افزایش میزان صفحات بتا در ساختار دوم پروتئین و انتقال اسیدهای آمینه آب‌گریز از نواحی درونی پروتئین به سطح آن نیز باشد. افزایش آب‌گریزی سطح خود عاملی برای افزایش تجمع پروتئین‌هاست [۳۳]. وضعیت ساختاری پروتئین‌های گلايکه شده نسبت به ساختار

تولید کروموفورهای (رنگسازهای) زرد و قهوه‌ای منجر می‌گردد [۲۰]. چنانچه مدت زمان مجاورت قند و پروتئین طولانی شود، فرایند گلايکه شدن به سمت ایجاد ساختارهای شبه آمیلوئیدی پیش می‌رود.

بر اساس شواهد موجود گونه‌های ساختاری محلول در روند فیبریل‌زایی موسوم به ساختارهای پره فیبریل^۱ پیش از تشکیل تجمعات فیبریلی، عامل اثرات سمی روی سلول‌ها و در نتیجه بیماری‌های تخریب عصبی^۲ از جمله آلزایمر^۳ و دیگر اختلالات عصبی، آسیب‌های بافت شبکه^۴ و آسیب‌های بافت کلیه^۵ محسوب می‌شود [۲۱].

اهداف مولکولی گلايکه شدن

گلايکه شدن بسیاری از پروتئین‌ها در شرایط *in vitro* گزارش شده است، از جمله این پروتئین‌ها آلبومین سرم گاوی (BSA) [۱۴] و انسانی (HSA)، میوگلوبین [۲۲]، هموگلوبین [۲۳]، فیبرینوژن [۲۴]، کلاژن [۲۵]، β_2 میکروگلوبولین [۲۶] و لیپوپروتئین با چگالی پایین [۲۷]، تریپسین، کیموتریپسین [۲۸]، گاما کریستالین و آلفا کریستالین [۲۰] است که تغییرات ساختاری و پایداری حرارتی آنها نیز مورد مطالعه قرار گرفته‌اند.

عوامل مولکولی گلايکه شدن پروتئین‌ها

هر چند گلوکز در پدیده گلايکه شدن از اهمیت قابل توجهی برخوردار است، با این حال، قدرت گلايکه کنندگی آن از قندهای دیگر ضعیف‌تر است. برای مثال گلیسرآلدئید حدود ۱۰۰ برابر، ریوز حدود ۵۰ برابر و فروکتوز حدود ۱۰ برابر نسبت به گلوکز دارای قدرت گلايکه کنندگی بیشتری است. قدرت گلايکه کنندگی قندهای فوق در صورتی که فسفریله باشند، بیشتر نیز خواهد بود [۲۹]. به علاوه قندهای دیگری نیز در گلايکه شدن ایفای نقش می‌کنند که از مهمترین آنها می‌توان فروکتوز، مانوز، گالاکتوز، ریوز،

- 1- Pre-fibril
- 2- Neuro-degenerative diseases
- 3- Alzheimer disease
- 4- Retinopathies
- 5- Nephropathies

- 6- Refold
- 7- Pack
- 8- Heterocyclic

همچنین تغییرات در سطح ساختار دوم نیز به روش‌های متنوع قابل پیگیری است. این روش‌ها شامل بررسی ساختار دوم نمونه‌ها به روش کونگو قرمز^۴ (کونگو قرمز، رنگ اختصاصی صفحات بتا می‌باشد) [۳۸]، به روش طیف سنجی دورنگ نمایی دورانی CD، با استفاده از طیف سنجی فلورسانس و رنگ تیوفلاوین T^۵ است (رنگ تیوفلاوین T به طور اختصاصی به ساختارهای بتا متصل شده و میزان نشر فلورسانس آن در اثر این اتصال افزایش می‌یابد). به علاوه بررسی و توصیف خصوصیات بیوفیزیکی پروتئین‌های گلائیکه شده نیز حایز اهمیت است. بررسی تجمع^۶ به روش‌های متنوع، تعیین و ارزیابی میزان پایداری گرمایی پروتئین به روش‌های مختلفی از جمله طیف‌سنجی روبش دمایی و اندازه‌گیری دانسیته نوری پروتئین در ۲۸۰ نانومتر یا استفاده از گرماسنجی روبشی دمایی^۷، بررسی تغییرات آب‌گریزی سطحی پروتئین‌ها با استفاده از ۸- آنیلینو-۱- نفتالن سولفونیک اسید^۸ (ANS) و ارزیابی خصوصیات کشش سطحی نمونه (تنسیومتری)، از جمله روش‌های تجزیه‌ای بررسی فرآورده‌های گلائیکه شدن پروتئین‌ها محسوب می‌گردد. مشاهده مستقیم فرآورده‌های حاصل از این رویداد مولکولی به صورت تجمعات پروتئینی به روش‌های میکروسکوپی بویژه روش‌های میکروسکوپ الکترونی عبوری^۹ و میکروسکوپی نیروی اتمی^{۱۰} از روش‌های مفید در ارزیابی محصولات مذکور است.

مروری بر پژوهش‌های مربوط به گلائیکه شدن آلبومین سرم انسانی

آلبومین سرم انسانی (HSA) به عنوان فراوان‌ترین پروتئین در خون، نقش مهمی در کنترل فشار اسمزی و pH خون داراست. همچنین HSA به عنوان یک منتقل‌کننده داخلی برای ملکول‌هایی مثل اسیدهای چرب، هیمین، بیلی‌روبین،

طبیعی در پروتئین‌های غیر گلائیکه شده از پایداری گرمایی بیشتری برخوردار است. در توصیف پایداری ساختاری پروتئین‌های گلائیکه شده، دمای ذوب (Tm) آنها افزایش می‌یابد [۳۴-۳۵]. از دیگر اثراتی که گلائیکه شدن بر پروتئین‌ها اعمال می‌کند می‌توان به افزایش مقاومت آنها به پروتولیز، کاهش pH پروتئین و کاهش انعطاف‌پذیری^۱ آنها اشاره کرد [۳۶].

سازوکار مولکولی مرگ برنامه‌ریزی شده سلول در تعامل با مولکول‌های گلائیکه شده

در حالت‌های *in vivo* و *in vitro* نشان داده شده است که ترکیبات AGE به طور شاخصی باعث القای آپاپتوز در فیبروبلاست‌ها می‌شود. این موضوع پیامد فعال‌سازی کاسپاز ۸ و ۹ توسط کاسپاز ۳ است. به علاوه تحریک ترکیبات AGE اثر غالبی بر روی افزایش بیان ژن‌های پروآپتوتیک دارد. ترکیبات AGE کاسپاز ۸ و به میزان کمتر ۹ را فعال می‌کنند، کاسپاز ۸ از طریق مسیر سیتوزولی و کاسپاز ۹ از طریق مسیر میتوکندریایی علامت (سیگنال) می‌فرستد. در ضمن نشان داده شده است که ترکیبات AGE گستره کاملی از ژن‌های آپاپتوتیک شامل لیگاندها، گیرنده‌ها، مولکول‌های آداپتور، پروتئین‌های میتوکندریایی و مولکول‌های شرکت‌کننده دیگر در آپاپتوز را القا می‌کنند. براساس شواهد منتشر شده مرگ برنامه‌ریزی شده می‌تواند وابسته به نیتریک اکسید (NO) باشد (شکل ۳) [۱۴].

روش‌های مطالعه و پیگیری فرایند گلائیکه شدن پروتئین‌ها

فرایند گلائیکه شدن و محصولات آن را می‌توان به روش‌های مختلف مورد ارزیابی و پیگیری قرار داد. از آن جمله می‌توان به تعیین میزان دانسیته نوری برای رنگ قهوه‌ای^۱، اندازه‌گیری میزان اتوفلورسانس وابسته به گروه‌های AGE، اندازه‌گیری میزان آمین آزاد نمونه‌ها با روش تری نیتروبنزوسولفونیک اسید^۳ [۳۷] اشاره نمود.

4- Congo Red Binding Assay

5- Thioflavin T

6- Aggregation

7- Differential scanning calorimetry

8- 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid

9- Transmission Electron Microscopy

10- Atomic Force Microscope

1- Flexibility

2- Brownish Color Absorbance

3- Trinitrobenzenesulfonic Acid

مجزا برای HSA در غلظت ۱۶/۵ میلی مولار گلوکز (شرایط دیابتی) دارد که به صورت مجزا واسرشت می‌شوند. پس از آنالیز این دیاگرام تعداد ۵ دمین انرژی‌تیک ظاهر می‌شود که هر کدام داری T_m و آنتالپی مخصوص به خود است. همچنین شکل (۵-ج) دو پیک مجزا را برای HSA در غلظت ۲۷/۵ میلی مولار گلوکز (دیابت مزمن) نشان می‌دهد که شامل چهار دمین انرژی‌تیک است [۳۴]. شایان ذکر است در صورت کمتر بودن مقدار قند خون از سطح دیابتی، تغییری در ساختار فضایی HSA ایجاد نمی‌شود. بنابراین دیاگرام DSC می‌تواند به عنوان تست تشخیصی در بیماری دیابت مورد استفاده قرار گیرد [۴۲].

طیف far-UV CD برای HSA در غلظت‌های مختلف گلوکز در شکل ۶ نشان داده شده است. همان طور که شواهد نشان می‌دهد، در طیف مربوطه برای ماریپچ آلفا، دو کمینه در حدود ۲۰۸ و ۲۲۲ دیده می‌شود.

بر اساس شکل ۶، در غلظت ۸/۲۵ میلی مولار (۱۴۸/۶ میلی گرم بر دسی لیتر) گلوکز در مقدار ماریپچ آلفا یک کاهش ایجاد می‌شود اما این کاهش در غلظت ۱۶/۵ میلی مولار (۲۹۷/۳ میلی گرم بر دسی لیتر) گلوکز جبران و باعث افزایش مقدار ساختارهای دوم می‌گردد. به هر حال غلظت ۲۷/۵ میلی مولار (۴۹۵/۵ میلی گرم بر دسی لیتر) گلوکز به کاهش مقدار ماریپچ آلفا در مقایسه با غلظت ۱۶/۵ میلی مولار (۲۹۷/۳ میلی گرم بر دسی لیتر) منجر می‌گردد. این مقدار نسبت به HSA طبیعی بیشتر است و بنابراین نمونه با غلظت ۱۶/۵ میلی مولار (۲۹۷/۳ میلی گرم بر دسی لیتر) گلوکز بیشترین ساختار دوم (ماریپچ آلفا) را در مقایسه با دیگر نمونه‌ها داراست [۳۵].

برای مطالعه تشکیل ساختارهای شبه آمیلوئیدی، نمونه‌های HSA در مجاورت فندهای مختلف و در زمان‌های ۲، ۴ و ۲۰ هفته نگهداری شده‌اند. افزایش جذب ۵۳۰ در حضور کنگو قرمز و نیز شدت فلورسانس تیوفلاوین T نشان دهنده تشکیل فیبریل آمیلوئیدی به هنگام مجاورت زمان دار HSA با قندهای مختلف است. درحالی که شدت فلورسانس تیوفلاوین نمونه‌ها بعد از ۲۰ هفته مجاورت با گلوکز و فروکتوز افزایش می‌یابد اما در مورد نمونه ریوز

داروها و تعدادی از فلزات و غیره است. مطالعات ساختاری HSA نشان می‌دهد که دارای سه دمین I، II و III و دو دسته جایگاه I و II است. جایگاه اتصال ۱ که شامل دمین I و بخشی از دمین II است می‌تواند به داروهای مختلف متصل گردد. تغییرات ساختاری HSA در اثر اتصال لیگاندها با روش‌های شیمی فیزیکی مختلفی از جمله X-ray و کریستالوگرافی (شکل ۴) مورد مطالعه قرار گرفته است. براساس این مطالعات، تغییرات ساختاری هنگام اتصال لیگاند به جایگاه I ایجاد شده و تصور می‌شود در ارتباط با عملکرد انتقالی آن باشد [۳۹].

آلبومین گلیکته شده؛ ۸۰٪ پروتئین‌های گلیکته شده در چرخش خون است و باعث بسیاری از عوارض جانبی بیماری دیابت می‌گردد. ترکیب آمادوری ناشی از افزایش گلوکز به HSA نشان داده شده که باعث تحریک تولید کلاژن نوع IV به وسیله سلول‌های مزون گلیال در محیط کشت می‌شود [۳۹]. گلیکته شدن غیر آنزیمی HSA در جایگاه‌های چند گانه اتفاق می‌افتد. گلوکز می‌تواند به لیزین‌های شمار ۱۹۹، ۲۸۱، ۴۳۹ و ۵۲۵ و علاوه بر این‌ها دیگر باقیمانده‌های لیزین و آرژینین، همچنین به باقیمانده N-ترمینال رنجیره پلی پپتید متصل گردد [۴۱]. از میان لیزین‌ها، لیزین ۵۲۵ بیشترین تمایل را برای گلیکته شدن دارد. به طور کلی دو دسته جایگاه برای گلیکته شدن روی HSA قرار دارد: دسته جایگاه اول دارای سه جایگاه اتصال بوده و رفتاری متعاون دارند؛ دسته جایگاه دوم شامل هشت جایگاه اتصال و به صورت غیر متعاون است [۴۱].

در پروتئین آلبومین سرم انسانی، گلیکته کردن در غلظت بالاتر فیزیولوژیکی باعث پایداری بیشتر می‌شود و مقدار ساختارهای ماریپچ آلفا کاهش و ساختارهای بتا افزایش می‌یابد. همچنین دمین‌های انرژی‌تیک جدیدی در آن ایجاد می‌شود (شکل ۵). ترموگرام، C_p^{excess} در مقابل دما را برای HSA در حضور گلوکز با غلظت‌های مختلف نشان می‌دهد.

شکل (۵-الف) یک زین اسبی کوچک (۳۲۵-۳۲۰ نانومتر) را برای آغاز متراکم شدن بخشی از پروتئین در اثر غلظت ۸/۲۵ میلی مولار گلوکز (غلظت آستانه دیابت) نشان می‌دهد در این حالت سه دمین انرژی‌تیک دیده می‌شوند. شکل (۵-ب) دو پیک اصلی را نشان می‌دهد که دلالت بر دو بخش

میلی مولار یا ۱۴۸/۶ میلی گرم بر دسی لیتر) سبب کاهش مارپیچ آلفا و کاهش پایداری HSA می‌گردد، در حالی که غلظت‌های بالای گلوکز (۱۶/۵ میلی مولار یا ۲۹۷/۳ میلی گرم بر دسی لیتر و ۲۷/۵ میلی مولار یا ۴۹۵/۵ میلی گرم بر دسی لیتر) باعث افزایش مارپیچ آلفا و افزایش پایداری HSA می‌شود. برهم کنش HSA با گلوکز موجب کاهش ارتباطات داخلی میان زیر دمین‌های بخش دم پروتئین شده، در صورتی که باعث فشردگی بیشتر بخش سر آن می‌گردد. از مقادیر دمای ذوب برای دمین‌های مختلف انرژی‌تیک می‌توان نتیجه گرفت که با رسیدن غلظت گلوکز به ۱۶/۵ میلی مولار یا ۲۹۷/۳ میلی گرم بر دسی لیتر، نسبت به حالت قبلی (۸/۲۵ میلی مولار یا ۱۴۸/۶ میلی گرم)، بخش سر HSA پایدارتر و بخش دم آن ناپایدارتر می‌گردد و با افزایش غلظت گلوکز به ۲۷/۵ میلی مولار یا ۴۹۵/۵ میلی گرم بر دسی لیتر بخش دم پایدارتر و بخش سر ناپایدار می‌گردد. بنابراین هر غلظتی از گلوکز می‌تواند اثر بخشی متفاوت روی ساختار و عملکرد HSA داشته باشد. این موضوع با تقدم و تأخر جایگاه‌های اتصال گلوکز در فرایند گلائیکه شدن مربوط است.

چنانچه مدت زمان نگهداری پروتئین با قند (آنکوبه کردن) طولانی‌تر گردد، مقدار ساختارهای بتا افزایش یافته و فرایند به سمت ایجاد فیبریل‌های آمیلوئیدی پیش می‌رود. نوع قند در سرعت و مقدار آمیلوئید ایجاد شده مؤثر است به طوری که ریپوز بیشترین اثر را در ایجاد آمیلوئیدی شدن دارد؛ اما گلوکز به عنوان قند غالب در بدن، کمترین اثر را در ایجاد آمیلوئیدی شدن داشته و همین‌طور اختلالات ناشی از آن کمتر می‌باشد.

در نهایت این مطالعه نشان می‌دهد که تغییرات ساختاری HSA از غلظت ۸/۲۵ میلی مولار، برابر ۱۴۸/۶ میلی گرم بر دسی لیتر خون، شروع می‌شود که با غلظت مطرح شده در کاربرد و نظام پزشکی مطابقت دارد. موضوع مهم دیگر کمترین اثر تخریبی قند گلوکز به عنوان قند اصلی بدن روی HSA است.

شدت فلورسانس تیوفلاوین کاهش می‌یابد. این مسأله تأیید کننده تجمع بی شکل نمونه ریپوز است.

برای مشاهده بهتر ظاهر شدن ساختار آمیلوئید و شکل‌های تجمع یافته، نمونه‌های HSA گلائیکه شده از طریق میکروسکوپ الکترونی TEM مورد مطالعه قرار می‌گیرد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی مربوط به HSA گلائیکه شده با قندهای مختلف وجود زنجیرهای جانبی تجمع کروی و تجمع دسته فیبریل‌های غیر منشعب در محلول را نشان می‌دهد. بر اساس تصاویر TEM می‌توان تصور کرد که مسیر تشکیل فیبریل، بعد از تشکیل شاخه‌های جانبی تجمعات کروی و تجمع فیبریل‌های بدون انشعاب رسوب شکل می‌گیرد. شکل ۷ تصاویر نمونه گلائیکه شده با ریپوز بعد از ۲۰ هفته مجاورت را نشان می‌دهد. این تصاویر به بخش‌های رسوب، شناور و نمونه شاهد مربوط است.

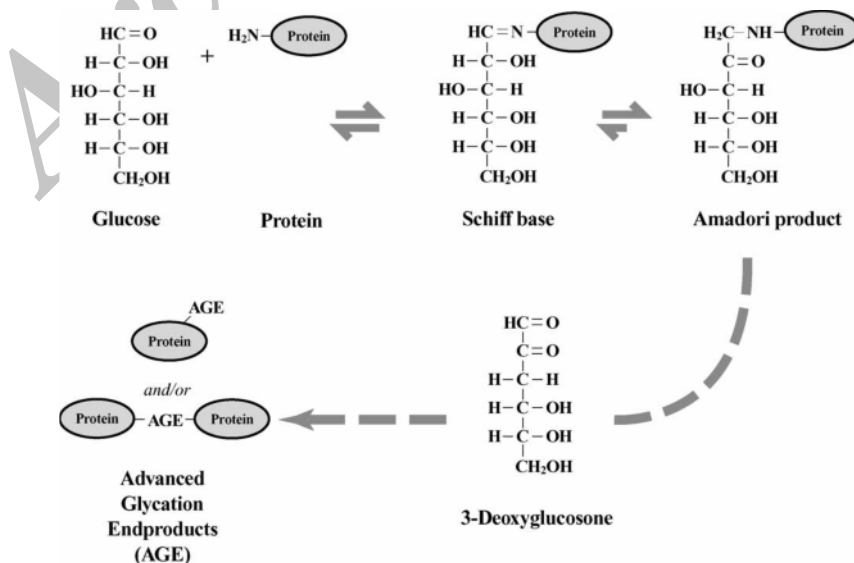
مطالعات کشش سطحی نشان می‌دهد که گلوکز، فروکتوز و ریپوز روی مقدار غلظت بحرانی تجمع (CAC) بعد از دو هفته مجاورت با آلبومین اثر مشابهی دارند. اما ریپوز در مقایسه با گلوکز و فروکتوز بعد از ۴ هفته مجاورت با آلبومین مقدار CAC را بیشتر کاهش می‌دهد. کشش سطحی HSA گلائیکه شده در حضور فروکتوز و ریپوز بعد از ۲۰ هفته مجاورت کاهش قابل ملاحظه‌ای را نشان می‌دهد. ماکرو ملکول HSA در حالت طبیعی به خاطر حضور گروه‌های آب دوست در سطح پروتئین در آب محلول‌اند. به علت برهمکنش برخی لیگاندها از جمله مواد فعال سطحی یک جذب سطحی قوی در سطح مشترک ناشی از حضور گروه‌های آب‌گریز سطحی ایجاد می‌شود که باعث تغییرات ساختاری در پروتئین‌ها می‌گردد. شبیه چنین رفتاری هنگام گلائیکه شدن پروتئین‌ها هم دیده می‌شود. مطالعات نشان می‌دهد که ریپوز بیشترین اثر و گلوکز کمترین اثر را در کاهش کشش سطحی دارد [۱۳،۴۲].

نتیجه‌گیری

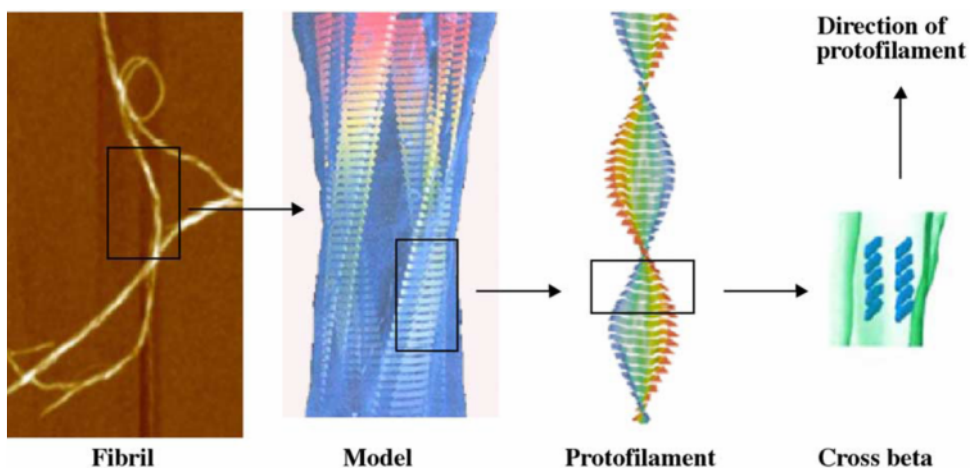
با مجاورت زمان‌دار آلبومین سرم انسانی در غلظت‌های مختلف گلوکز، تغییرات ساختاری در پروتئین ایجاد می‌گردد. مجاورت HSA در غلظت پایین گلوکز (۸/۲۵

جدول ۱- رویدادهای برجسته در تاریخ گلیکته شدن

تاریخ نشر (ه.ش.)	رویداد	نویسنده یا نویسندگان
۱۲۹۱	کشف واکنش گلیکته شدن	میلارد
۱۳۳۲	توصیف مسیر شیمیایی فرایند گلیکته شدن در صنایع	هوجز
۱۳۳۴	مشاهده اولین هموگلوبین گلیکوسیلته شده در خون فرد دیابتی که بعد ها به هموگلوبین گلیکته شده تغییر نام داد	کانکل و والنیوس
۱۳۴۷	کشف هموگلوبین گلیکته شده در خون فرد دیابتی	رابر
۱۳۶۰	کشف واکنش میلارد در <i>in vivo</i> و نقش آن در فرایند پیر شدن	مونیر و سرامی
۱۳۶۳	برای اولین بار اصطلاح AGE برای محصول نهایی گلیکته شدن به کار گرفته شد	برون لی ، ولاس سارا و سرامی
۱۳۶۵	کربوکسی متیل لیزین بعنوان اولین AGE در <i>in vivo</i> کشف	احمد ، ترپن و باینس
۱۳۶۵	آمینو گوانیدین به عنوان اولین مهار کننده فرایند گلیکته شدن مطرح شد	برون لی و همکارانش
۱۳۶۹	پنتوزیدین به عنوان اولین اتصال عرضی در واکنش میلارد در <i>in vivo</i> مطرح شد	سل و مونیر
۱۳۷۱	گیرنده های سلولی AGE ها (RAGE) کشف شدند	اشمیت و همکارانش
۱۳۷۱	کشف مسیر دیگری برای تولید AGE ، ایجاد محصول نهایی اسید های چرب اشباع نشده (ALE)	ری کونیا
۱۳۷۶	کشف قابلیت سمی بودن AGE های موجود در مواد غذایی (گلیکوتوکسین)	سرامی و همکاران و کوشین اسکی و همکاران
۱۳۸۱	یافتن دو دسته جایگاه اتصال متعاون و غیر متعاون روی آلبومین سرم انسانی	محمدی نژاد و موسوی موحدی
۱۳۸۶	کشف ایجاد حالت مولتن گلوبول در اثر گلیکته کردن پروتئین ها	ستار احمدی ، موسوی موحدی، فیضان احمد، حکیم الهی، حبیبی رضایی، صبوری، شیبانی
۱۳۸۷	کشف نقش ایجاد حالت مواد فعال سطحی و غیرطبیعی کنندگی در اثر گلیکته کردن	ستار احمدی ، موسوی موحدی و حبیبی رضایی
۱۳۸۷	کشف مشارکت RAGE در اثر القائی آلبومین گلیکته شده در بروز مرگ برنامه ریزی شده سلول های گلیال	خزاعی، حبیبی رضائی، کریمزاده، موسوی موحدی



شکل ۱- فرآیند گلیکته شدن پروتئین‌ها [۱۷]



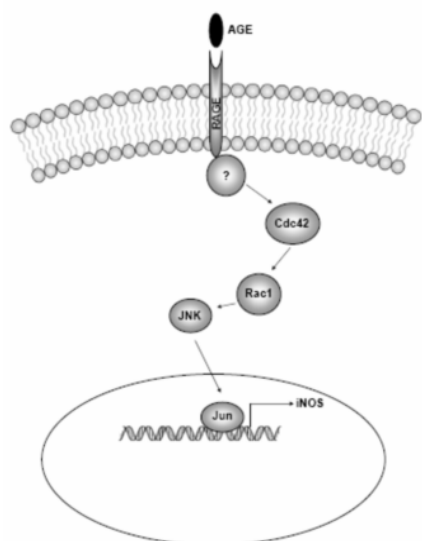
Fibril

Model

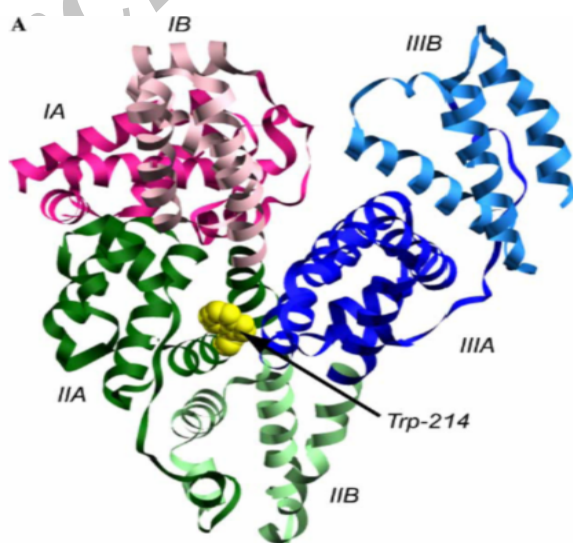
Protofilament

Cross beta

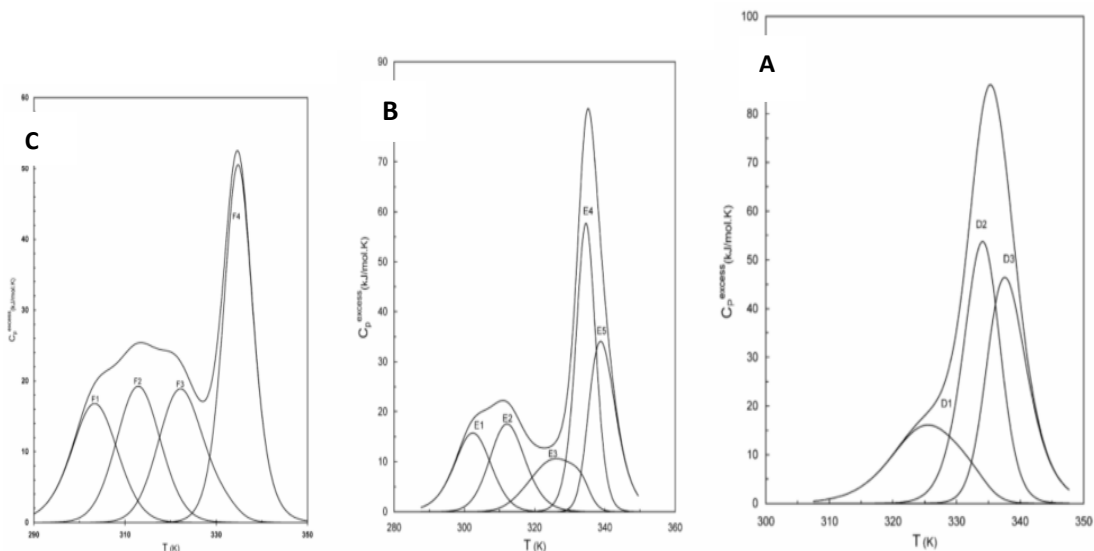
شکل ۲- نگاهی نزدیک به ساختار آمیلوئید فیبریلی [۳۲]



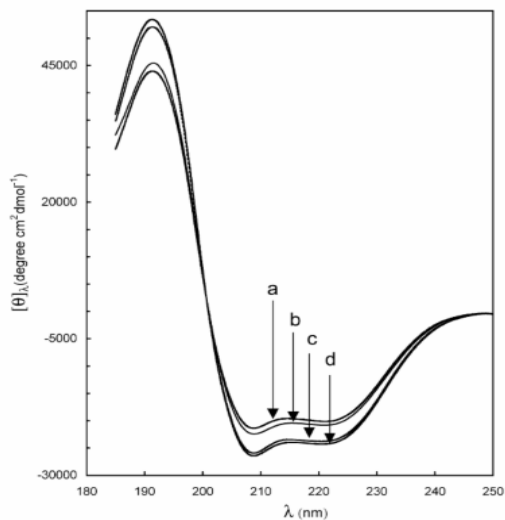
شکل ۳- سازوکار مرگ سلولی [۱۴]



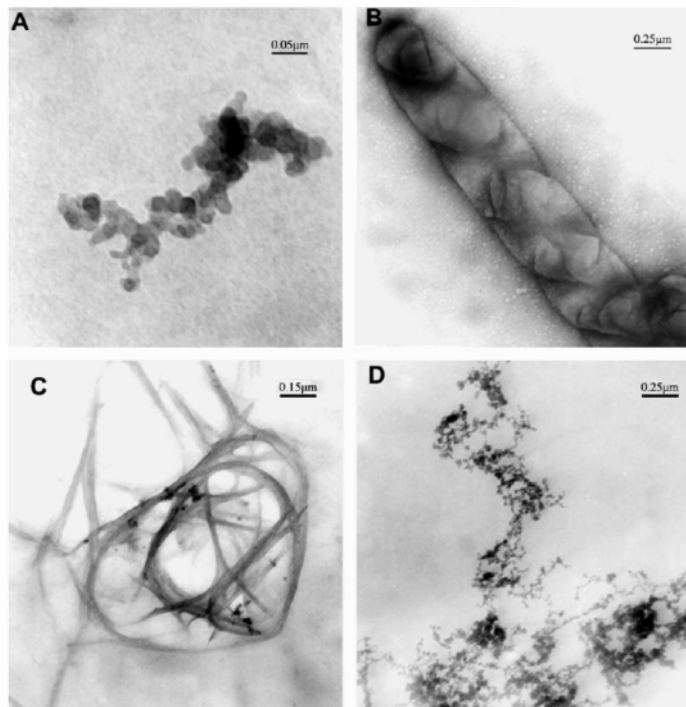
شکل ۴- ساختار ملکول آلبومین سرم انسانی [۴۰]



شکل ۵- دیاگرام DSC برای HSA در غلظت‌های مختلف گلوکز: (A) غلظت ۸/۲۵ میلی مولار یا ۱۴۸/۶ میلی گرم بر دسی لیتر گلوکز؛ (B) غلظت ۱۶/۵ میلی مولار یا ۲۹۷/۳ میلی گرم بر دسی لیتر گلوکز؛ (C) غلظت ۲۷/۵ میلی مولار یا ۴۹۵/۵ میلی گرم بر گلوکز [۳۵].



شکل ۶- بیضوی مولار HSA در برابر طول موج، (a) در غلظت ۸/۲۵ میلی مولار یا ۱۴۸/۶ میلی گرم بر دسی لیتر گلوکز (b) حالت طبیعی بدون حضور گلوکز (c) غلظت ۲۷/۵ میلی مولار یا ۴۹۵/۵ میلی گرم بر دسی لیتر گلوکز (d) غلظت ۱۶/۵ میلی مولار یا ۲۹۷/۳ میلی گرم بر دسی لیتر گلوکز در بافر فسفات ۲/۵ میلی مولار، pH = ۷/۴، دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و به مدت ۱ هفته نگهداری [۳۵].



شکل ۷- تصاویر TEM نمونه‌های AGE-HSA آنکوبه شده با ۵۰۰ میلی‌مولار به مدت ۲۰ هفته، بخش‌های رسوب (A-C) و بخش شناور محلول (D) [۱۳]. در تصاویر TEM از رسوب نمونه‌های ریبوز سه ساختار متفاوت مشاهده می‌شود. زنجیره‌های بزرگ شاخه‌دار تجمعات کروی با قطر متوسط ۲۵-۳۰ نانومتر (A)، ساختارهای صفحه مانند فیبری (۱۴۰ نانومتر) که به صورت استوانه‌ای تجمع یافته‌اند (B) و رشته‌های بلند و مستقیم فیبریل آمیلوئید با قطر متوسط ۱۵-۲۰ نانومتر (C). نمونه شناور که از مجاورت به مدت ۲۰ هفته با ریبوز به دست آمده‌اند (D)، فقط زنجیره‌های منشعب از تجمع کروی با قطر متوسط ۳۰ نانومتر را نشان می‌دهد.

سپاسگزاری

شورای پژوهشی دانشگاه تهران و صندوق حمایت از پژوهشگران کشور به پاس حمایت‌های همه جانبه تقدیر و تشکر می‌گردد.

مأخذ

- Horvat S, Jakas A, Peptide and Amino Acid Glycation: New Insights into the Maillard Reaction. *J Peptide Science* 2004; 10:119-137.
- Hodge JE, Chemistry of browning reactions in model systems. *J Agric Food Chem* 1953; 1: 928-43.
- Kunkel HG, Wallenius G, New hemoglobin in normal adult blood. *Science* 1955; 122:288.
- Monnier VM, Cerami A, Nonenzymatic browning in vivo: possible process for aging of long-lived proteins. *Science* 1981; 211:491-3.
- Brownlee M, Vlassara H, Cerami A, Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. *Ann Intern Med* 1984; 101:527-37.
- Ahmed MU, Thorpe SR, Baynes JW, Identification of N epsilon-carboxymethyllysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein. *J Biol Chem* 1986; 261:4889-94.
- Dyer DG, Blackledge JA, Katz BM, Hull CJ, Adkisson HD, Thorpe SR, et al, The Maillard reaction in vivo. *Z Ernährungswiss* 1991; 30: 29-45.
- Requena JR, Fu MX, Ahmed MU, Jenkins AJ, Lyons TJ, Thorpe SR, Lipoxidation products as biomarkers of oxidative damage to proteins during lipid peroxidation reactions. *Nephrol Dial Transplant* 1996; 11:48-53.
- Cerami C, Founds H, Nicholl I, Mitsuhashi T, Giordana D, Vanpatten S, et al., Tobacco smoke is a source of toxic reactive glycation products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:13915-20.
- Koschinsky T, He CJ, Mitsuhashi T, Bucala R, Liu C, Buening C, et al. Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): An environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 6474-9.
- Mohamadi-Nejad A, Moosavi-Movahedi AA, Hakimelahi GH, Sheibani N, Thermodynamic analysis of human serum albumin interactions with glucose: insights into the diabetic range of glucose concentration. *The International*

- Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2002; 34: 1115–1124.
12. Sattarahmady N, Moosavi-Movahedi AA, Ahmad F, Hakimelahi GH, Habibi-Rezaei M, Saboury AA, Sheibani N, Formation of the molten globule-like state during prolonged glycation of human serum albumin. *Biochimica et Biophysica Acta* 2007; 1770:933–942.
 13. Sattarahmady N, Moosavi-Movahedi AA, Habibi-Rezaei M, Ahmadian Sh, Saboury AA, Heli H, Sheibani N, Detergency effects of nanofibrillar amyloid formation on glycation of human serum albumin. *J Carbohydrate Research* 2008; 343: 2229–2234.
 14. Khazaei MR, Habibi-Rezaei M, Karimzadeh F, Moosavi-Movahedi AA, Sarrafnejhad AA, Sabouni F, Bakhti M. Microglial cell death induced by glycated bovine serum albumin: nitric oxide involvement. *J Biochem.* 2008; 144:197–206.
 15. Sattarahmady N, Moosavi-Movahedi AA, Habibi-Rezaei M, A biophysical comparison of human serum albumin to be glycated in vivo and in vitro. *J Med Biochem* 2011; 30 (1): 5-10.
۱۶. ستار احمدی ن، موسوی موحدی ع.ا، مروری کوتاه بر تغییرات ساختاری آلبومین سرم خون در اثر گلیکته شدن. مجله دیابت و لیپید ایران ۱۳۸۶؛ ۱۷(۱): ۲۲-۹.
17. Ahmed N, Advanced glycation endproducts-role in pathology of diabetic complications. *J Diabetes Research and Clinical Practice* 2005; 67: 3–21.
 18. Lapolla A, Traldi P, Fedele D, Importance of measuring products of non-enzymatic glycation of proteins. *J Clinical Biochemistry* 2005; 38:103– 115.
 19. Tessier F, Birlouez-Aragon I, Effect of pH, phosphate and copper concentration on the interaction of glucose with albumin. *Glycoconjugate Journal* 1998; 15: 571-574.
 20. Luthra M, Balasubramanians D, Nonenzymatic Glycation Alters Protein Structure and Stability. *J. Biological Chemistry* 1993; 268:18119-18127.
 21. Shao H, Jao S C, Ma K, Zagorski M G, Solution Structures of Micelle-bound Amyloid b-(1-40) and b-(1-42) Peptides of Alzheimer's Disease. *J. Mol. Biol.* 1999, 285, 755-773
 22. Roy A, Sil R, Chakraborti A S, Non-enzymatic glycation induces structural modifications of myoglobin. *Mol Cell Biochem* 2010; 338:105-114
 23. Samaja M, Melotti D, Carenini A, Pozza G, Glycosylated haemoglobins and the oxygen affinity of whole blood. *Diabetologia* 1982 Nov; 23(5):399-402.
 24. Hammer MR, John PN, Flynn MD, Bellingham AJ, Leslie RD, Glycated fibrinogen: a new index of short-term diabetic control. *Ann Clin Biochem* 1989 Jan; 26 (Pt 1):58-62.
 25. Reiser KM, Nonenzymatic glycation of collagen in aging and diabetes. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1991; 196(1):17-29.
 26. Miyata T, Oda O, Inagi R, Iida Y, Araki N, Yamada N, Horiuchi S, Taniguchi N, Maeda K, Kinoshita T, Beta 2-Microglobulin modified with advanced glycation end products is a major component of hemodialysis-associated amyloidosis. *J Clin Invest.* 1993; 92(3):1243-52.
 27. Ravandi A, Kuksis A, Shaikh N A, Glucosylated Glycerophosphoethanolamines are the Major LDL Glycation Products and Increase LDL Susceptibility to Oxidation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20:467-477.
 28. Pham V T, Ewing E, Kaplan H, Choma C, Hefford M A, Glycation Improves the Thermostability of Trypsin and Chymotrypsin. *J of Biotechnology and Bioengineering,* 2008; 101:452-459.
 29. Suarez G, Rajaram R, Oronsky AL, Gawinowicz MA, Nonenzymatic glycation of bovine serum albumin by fructose (fructation). Comparison with the Maillard reaction initiated by glucose. *J Biol Chem* 1989; 264(7):3674-9.
 30. Davis LJ, Hakim G, Rossi CA. Kinetics of the glycation of bovine serum albumin by mannose and fucose in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 160(1):362-6.
 31. Bouma B, Kroon-Batenburg LM, Wu YP, Brünjes B, Posthuma G, Kranenburg O, de Groot PG, Voest EE, Gebbink MF. Glycation induces formation of amyloid cross-beta structure in albumin. *J Biol Chem* 2003; 278(43): 41810-9.
 32. Stefani M, Protein misfolding and aggregation: new examples in medicine and biology of the dark side of the protein world. *J. Biochimica et Biophysica Acta* 2004; 1739: 5– 25.
 33. Yeagans GS, Seidler NW. Carnosine promotes the heat denaturation of glycated protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 300(1): 75-80.
 34. Seidler NW, Seibel I. Glycation of aspartate aminotransferase and conformational flexibility. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 277(1): 47-50.
 35. Mohamadi-Nejad A, Moosavi-Movahedi AA, Safarian S, The thermal analysis of nonenzymatic glycosylation of human serum albumin: differential scanning calorimetry and circular dichroism. *Thermochemica Acta* 2002; 389:141-151.
 36. Seidler NW, Yeagans GS, Morgan TG. Carnosine disaggregates glycated alpha-crystallin: an in vitro study. *Arch Biochem Biophys.* 2004; 427(1): 110-5.
 37. Habeeb AFSA, Determination of free amino groups in protein by trinitrobenzene sulfonic acid. *Anal. Biochem* 1966; 14: 328.
 38. Chiti F, Taddei N, White P M, Bucciantini M, Magherini F, Stefani M, Dobson C M, Mutational analysis of acylphosphatase suggests the importance of topology and contact order in protein folding. *The EMBO Journal* 2000; 19(7): 1441–1449,

39. Saito K, Hamano K, Nakagawa M, Yugawa K, Muraoka J, Kuba H, Furukawa K, Azuma T, Conformational analysis of human serum albumin and its non-enzymatic glycation products using monoclonal antibodies. *J Biochem* 2011; 149(5):569-580.
40. Mendez D L, Jensen RA, McElroy LA, The effect of non-enzymatic glycation on the unfolding of human serum albumin. *J. Archives of Biochemistry and Biophysics* 2005; 444: 92-99.
41. Ali Khan MW, Rasheed Z, Ali Khan W, Ali R, Biochemical, biophysical, and thermodynamic analysis of in vitro glycated human serum albumin. *J Biochemistry (Moscow)* 2007; 72:146-152.
42. Moosavi-Movahedi A A, Mohamadi-Nejad A., Sattarahmady N, Habibi-Rezaei M., Saboury A A, Bohlooli M, Structural Change and Amyloid Formation of Human Serum Albumin Due to Glycation under Diabetic Condition. *J. Iran. Chem. Soc.* 2011; 8(3): A52-A55.

Archive of SID