

مروری بر گلاایکه شدن پروتئین‌ها؛ نگاهی بر ترمودینامیک و تشکیل ساختار فیبریلی در آلبومین سرم انسانی

علی اکبر موسوی موحدی^{۱*}، مهراں 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 پروتئین‌ها باعث گلاایکه شدن غیر آنزیمی شده و موجب ایجاد تغییرات ساختاری و عملکردی در پروتئین‌ها می‌شود. فرایند گلاایکه شده پروتئین‌ها به بروز اختلالات زیادی از جمله بیماری‌های عصبی، کبدی، کلیوی و نیز پیری منجر می‌شود؛ به همین سبب تجمعات پروتئینی غیر محلول ناشی از فرایند گلاایکه شدن، از نشانه‌های تشخیصی بیماری‌های مربوط محسوب می‌گردد. در این مقاله، تغییرات ساختاری ایجاد شده در آلبومین سرم انسانی در اثر گلاایکه 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 آلبومین سرم انسانی باعث بروز تغییر در ساختارهای دوم و سوم و ایجاد دمین‌های انرژتیک جدید به صورت وابسته به غلظت گلوکز می‌گردد. در صورت مجاورت آلبومین سرم انسانی با گلوکز و سایر قندها در مدت‌های طولانی (۲۰ هفته)، به مرور مقدار ماریپچ‌های 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، ریوز بیشترین اثر و گلوکز کمترین اثر را در فیبریل‌زایی ایفا می‌نمایند.

واژگان کلیدی: گلاایکه شدن، دمین انرژتیک، آلبومین سرم انسانی، آمیلوئید، گرماسنجی روبش دمایی، فیبریل شدن، کاهش ککش سطحی، واسرشتگی، میکروسکوب الکترونی

۱- مرکز تحقیقات بیوشیمی بیوفیزیک، دانشگاه تهران

۲- قطب علمی بیو ترمودینامیک، دانشگاه تهران

۳- دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه تهران

۴- دانشگاه علوم پزشکی شیراز

۵- دانشگاه علوم پزشکی مشهد

۶- دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

* **نشانی:** تهران، خیابان ۱۶ آذر، سازمان مرکزی دانشگاه تهران، مرکز تحقیقات بیوشیمی بیوفیزیک دانشگاه تهران، تلفن: ۶۶۴۰۳۹۵۷.

نمابر: ۶۶۴۰۴۶۸۰، پست الکترونیک: moosavi@ibb.ut.ac.ir

تعريف گلايکه شدن

گلايکه شدن^۱ يك واكنش تراكمي خودبخودي غير آنزيمي بين گروه‌هاي آمين آزاد از بيوملكول‌ها بويژه پروتئين‌ها با گروه كربنيل از كربوهيدرات‌هاي احيا كننده از طريق ايجاد يك پيوند كووالانسي است. در اثر گلايکه شدن، محصولات متنوعي ايجاد مي‌شود كه اين تركيبات موجب بروز تغييرات ساختاري و عملكردي در پروتئين‌ها مي‌گردد.

تاريخچه مطالعات گلايکه شدن

واكنش شيميائي گلايکه شدن براي اولين بار به وسيله يك شيمييدان فرانسوي به نام Louis Camille Maillard در سال ۱۹۱۲ ميلادي مطرح شد [۱]. او واكنش قهوه‌اي شدن در خلال واكنش بين آمينو اسيد و كربو هيدرات‌هاي ساده را بيان كرد كه به هنگام پختن غذا اتفاق مي‌افتد. چهل سال بعد در سال ۱۹۵۳، Hodge مسير شيميائي اين واكنش را توصيف نمود و بدین ترتيب واكنش ميلارد به عنوان نقطه شروعي براي محققاني كه در حوزه گلايکه شدن پروتئين كار مي‌کردند، محسوب گرديد [۲]. Kunkel و Wallenius در سال ۱۹۵۵، اولين پروتئين گلايکه شده را كشف كردند. اين پروتئين‌ها دسته‌اي از هموگلوبين‌ها بودند كه از طريق واكنش ميلارد در جايگاه‌هاي مختلف آنها تغييراتي ايجاد شده بود [۳]. Monnier و Cerami در سال ۱۹۸۱، نقش واكنش ميلارد در فرايند سالخوردگي را مطرح كردن [۴]. تئوري "پيري از طريق گلايکه شدن" با توجه به جذابيت موضوع باعث گسترش توجه به واكنش ميلارد در شرايط *in vivo* گرديد.

Brownlee و همكارانش در سال ۱۹۸۴، براي نام‌گذاري محصول نهايي فرايند گلايکه شدن اصطلاح "AGE"^۲ را بكار بردند [۵]. Ahmed و همكارانش در سال ۱۹۸۶، اولين تركيب AGE در شرايط *in vivo* يعني ان-كربوكسيل متيل ليزين^۳ (CML) را كشف نمودند [۶]. Dyer و همكارانش در سال ۱۹۹۱، اصطلاح "گلايكو اكسيداسيون"^۴ را در متون رايج نمودند كه اين واژه به اثر اكسيده شدن راديكالي

در فرايند گلايکه شدن اشاره دارد [۷]. Requena و همكارانش در سال ۱۹۹۶، مسير ديگري را براي تشكيل AGE، يعني "محصول نهايي اكسيده شدن اسيد چرب اشباع نشده"^۵ (ALE) يافتند كه باعث افزايش AGE مي‌گرديد [۸]. سرامي و همكارانش [۹] از يك سو، و Koschinski و همكارانش [۱۰] از سوي ديگر در سال ۱۹۹۷، به طور همزمان سمي بودن AGE موجود در مواد غذايي را مطرح نموده و اصطلاح "گلايكو توكسين"^۶ را مرسوم ساختند. موسوي موحدی و همكاران در سال ۲۰۰۲ خواص ترموديناميكي گلايکه شدن آلبومين سرم انساني را مطالعه و دو مجموعه جايگاه اتصال را براي آن مطرح كردند [۱۱]. اين گروه در سال ۲۰۰۷ بيان كردند كه آلبومين سرم انساني بعد از ۲۱ روز از مجاورت زمان‌دار با گلوکز حالت شبه "مولتن گلبول" را ايجاد مي‌نمايد [۱۲]. ستار احمدی و همكاران در سال ۲۰۰۸ نشان دادند كه گلايکه كردن طولاني HSA باعث توده‌اي شدن، فيبريل شدن و کاهش كشنش سطحي آن مي‌گردد و محصول حاصل نقش مواد فعال سطحي و مواد غير طبيعي كننده را براي پروتئين ايفا مي‌كند [۱۳]. خزاعي و همكاران در سال ۲۰۰۸ القاي مرگ برنامه‌ريزي شده سلول‌هاي ميكروگليال به وسيله محصولات گلايکه شدن آلبومين را گزارش نموده و شواهد لازم در خصوص مشاركت گيرنده AGE موسوم به RAGE^۷ در بروز اثرات سمي فراورده‌هاي مذكور را گزارش نمودند [۱۴].

ستار احمدی و همكاران در سال ۲۰۱۱ نشان دادند كه خصوصيات بيوفيزيكي HSA گلايکه در شرايط *in vitro* و *in vivo* يكسان است و در هر دو حالت افزايش غلظت قند باعث کاهش ساختارهاي آلفا، تعداد اسيدآمینه‌هاي ليزين، كشنش سطحي و افزايش محصولات AGEs و آمادوري مي‌شود. تنها تفاوت شرايط *in vitro* و *in vivo*، تفاوت در تعداد آرژينين‌هاي آزاد و بيشتري بودن آن در شرايط *in vitro* است [۱۵]. جدول ۱ مروري از رويدادهاي گلايکه شدن پروتئين‌ها را نشان مي‌دهد.

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- Glycooxidation

فرایند گلاایک شدن و محصولات آن

این فرایند شامل سه مرحله است که با تشکیل برگشت‌پذیر پیوند از نوع باز شیف^۱ میان گروه [۶،۱۲] آلدهید (یا کتون) قند و گروه آمین زنجیره پروتئین آغاز می‌شود (شکل ۱). بازشیف به صورت برگشت‌ناپذیرمتحمل 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 پیرول^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:

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

دی لیزین ایمیدازولیوم^{۱۲} که اتصال عرضی دو لیزین است. آلکیل فرمیل گلیکوسیل پیرول^{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 گلاایک شدن

واکنش گلاایک 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 گلاایک شدن تأثیر می‌گذارند. عواملی چون گرما، فلزات واسطه مانند مس و آهن، رادیکال‌های آزاد و افزایش غلظت قند میزان گلاایک شدن را افزایش می‌دهند. همچنین افزایش غلظت فسفات و pH محیط نیز بر شدت گلاایک شدن اثری مستقیم دارند [۱۹].

بیماری‌های مرتبط با فرایند گلاایک 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 گلاایک شدن پروتئین‌ها نسبت می‌دهند. گزارش شده است که گلاایک شدن پروتئین‌ها به غیر قابل هضم شدن پروتئین‌ها، عدم حالیت، افزایش مقاومت در برابر واسرشته شدن حرارتی و

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 گلیکته شدن

گلیکته شدن پروتئین‌ها منجر به تغییرات در سطح ساختارهای دوم و سوم در پروتئین‌ها می‌شود. ساختار دوم پروتئین‌ها در اثر گلیکته شدن به شدت تغییر می‌کند. میزان تغییر ساختار دوم متناسب با میزان گلیکته شدن پروتئین‌هاست. در بیشتر پروتئین‌ها پس از فرآیند گلیکته شدن، ساختارهای مارپیچ آلفا به صفحات بتا تبدیل می‌شود. سازوکار این تبدیل به این صورت است که ابتدا پروتئین در اثر گلیکته شدن تا حدی واسرشته می‌شود. سپس در اثر استرس‌های مکانیکی که گلیکته شدن بر ساختار پروتئین اعمال می‌کند، پروتئین با یک ساختار فضایی جدید بازتاییده 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].

گلیکته شدن پروتئین‌ها باعث تغییر در ساختار فضایی آنها می‌شود؛ از آنجاکه فعالیت پروتئین دارای رابطه مستقیم با ساختار آن است، بنابراین گلیکته 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 گلیکته 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 گلیکته شده نسبت به ساختار

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

براساس شواهد موجود گونه‌های ساختاری محلول در روند فیبریلاژن موسوم به ساختارهای پره فیبریلاژن^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 گلیکته شدن

گلیکته 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 لیوپروتئین 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 گلیکته شدن پروتئین‌ها

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

- 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^۵ T 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

درحالت‌های *in vitro* و *in vivo* 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-naphtalenesulfonic 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 میلی‌مولار 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 میلی‌مولار 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. همان‌طور که شواهد نشان می‌دهد، در طیف مربوطه برای مارپیچ آلفا، دو کمینه در حدود ۲۰۸ و ۲۲۲ دیده می‌شود.

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

برای مطالعه تشکیل ساختارهای شبه آمیلوئیدی، نمونه‌های HSA در مجاورت قندهای 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. درحالی‌که شدت فلورسانس تیوفلاوین نمونه‌ها بعد از ۲۰ هفته مجاورت با گلوکز و فروکتوز افزایش می‌یابد اما در مورد نمونه ریبوز

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 آرژنین، 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 مارپیچ 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 میلی‌مولار 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 ماریچ آلفا و کاهش پایداری HSA می گردد، در حالی که غلظت های 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 ماریچ آلفا و افزایش پایداری HSA می شود. برهم کنش HSA با گلوکز موجب کاهش ارتباطات داخلی میان زیر دمین های بخش دم پروتئین شده، در صورتی که باعث فشردگی بیشتر بخش سر آن می گردد. از مقادیر دمای ذوب برای دمین های مختلف انرژی می توان 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 می گردد 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 می گردد. بنابراین هر غلظتی از گلوکز می تواند اثر بخشی متفاوت روی ساختار و عملکرد HSA داشته باشد. این موضوع با تقدم و تأخر جایگاه های اتصال گلوکز در فرایند گلابه شدن مربوط است.

چنانچه مدت زمان نگهداری پروتئین با قند (آنکوبه کردن) طولانی گردد، مقدار ساختارهای بتا افزایش یافته و فرایند به سمت ایجاد فیبریل های آمیلوئیدی پیش می رود. نوع قند در سرعت و مقدار آمیلوئید ایجاد شده مؤثر است به طوری که ریوز 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 همین طور اختلالات ناشی از آن کمتر می باشد.

در نهایت این مطالعه نشان می دهد که تغییرات ساختاری HSA از غلظت ۸/۲۵ میلی مولار، برابر ۱۴۸/۶ میلی گرم بر دسی لیتر خون، شروع می شود 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 می یابد. این مسأله تأیید کننده تجمع بی شکل نمونه ریوز است.

برای مشاهده بهتر ظاهر شدن ساختار آمیلوئید و شکل های تجمع یافته، نمونه های HSA گلابه شده از طریق میکروسکوپ الکترونی TEM مورد مطالعه قرار می گیرد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی مربوط به HSA گلابه شده با قندهای مختلف وجود زنجیرهای جانبی تجمع کروی و تجمع دسته فیبریل های غیر منشعب در محلول را نشان می دهد. بر اساس تصاویر TEM می توان تصور کرد که مسیر تشکیل فیبریل، بعد از تشکیل شاخه های جانبی تجمعات کروی و تجمع فیبریل های بدون انشعاب رسوب شکل می گیرد. شکل ۷ تصاویر نمونه گلابه شده با ریوز بعد از ۲۰ هفته مجاورت را نشان می دهد. این تصاویر به بخش های رسوب، شناور و نمونه شاهد مربوط است.

مطالعات کشش سطحی نشان می دهد که گلوکز، فروکتوز و ریوز روی مقدار غلظت بحرانی تجمع (CAC)^۱ بعد از دو هفته مجاورت با آلبومین اثر مشابهی دارند. اما ریوز در مقایسه با گلوکز و فروکتوز بعد از ۴ هفته مجاورت با آلبومین مقدار CAC را بیشتر کاهش می دهد. کشش سطحی HSA گلابه شده در حضور فروکتوز و ریوز بعد از ۲۰ هفته مجاورت کاهش قابل ملاحظه ای را نشان می دهد.

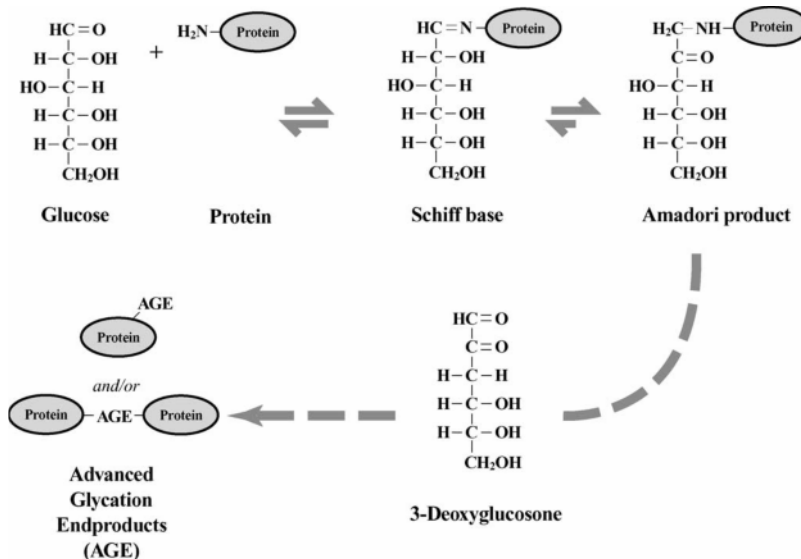
ماکرو ملکول HSA در حالت طبیعی به خاطر حضور گروه های آب دوست در سطح پروتئین در آب محلول اند. به علت برهمکنش برخی لیگاندها از جمله مواد فعال سطحی یک جذب سطحی قوی در سطح مشترک ناشی از حضور گروه های آب گریز سطحی ایجاد می شود که باعث تغییرات ساختاری در پروتئین ها می گردد. شبیه چنین رفتاری هنگام گلابه شدن پروتئین ها هم دیده می شود. مطالعات نشان می دهد که ریوز بیشترین اثر و گلوکز کمترین اثر را در کاهش کشش سطحی دارد [۱۳،۴۲].

نتیجه گیری

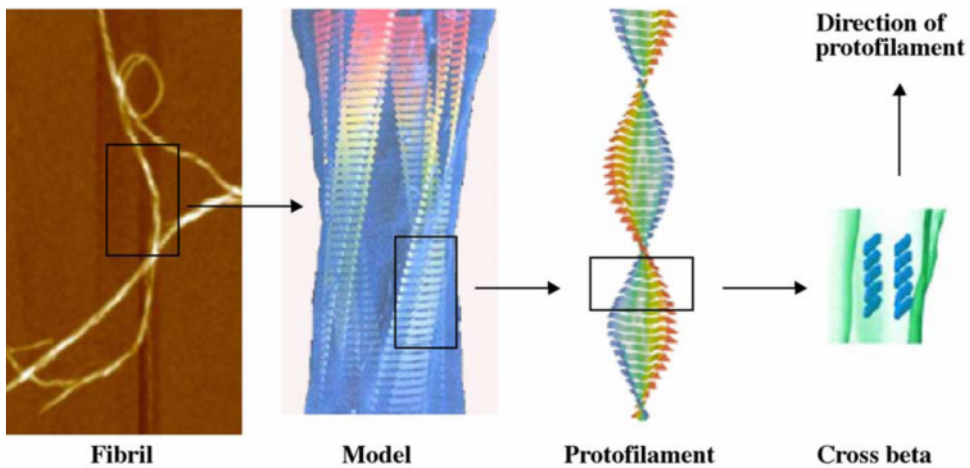
با مجاورت زمان دار آلبومین سرم انسانی در غلظت های مختلف گلوکز، تغییرات ساختاری در پروتئین ایجاد می گردد. مجاورت HSA در غلظت پایین گلوکز (۸/۲۵

جدول ۱- رویدادهای برجسته در تاریخ گلیکته شدن

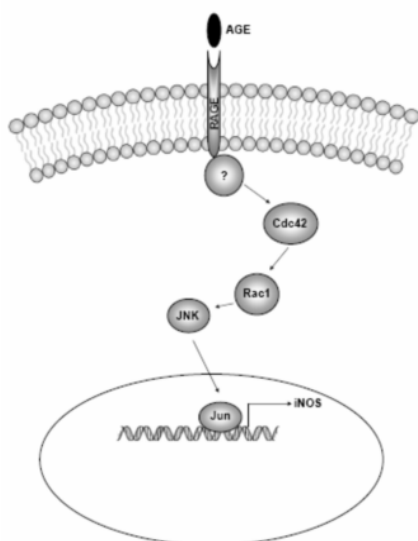
تاریخ نشر (ه.ش.)	رویداد	نویسنده یا نویسندگان
۱۲۹۱	کشف واکنش گلیکته شدن	میلارد
۱۳۳۲	توصیف مسیر شیمیایی فرایند گلیکته شدن در صنایع	هوجز
۱۳۳۴	مشاهده اولین هموگلوبین گلیکوسیل شده در خون فرد دیابتی که بعد ها به هموگلوبین گلیکته شده تغییر نام داد	کانکل و والنیوس
۱۳۴۷	کشف هموگلوبین گلیکته شده در خون فرد دیابتی	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



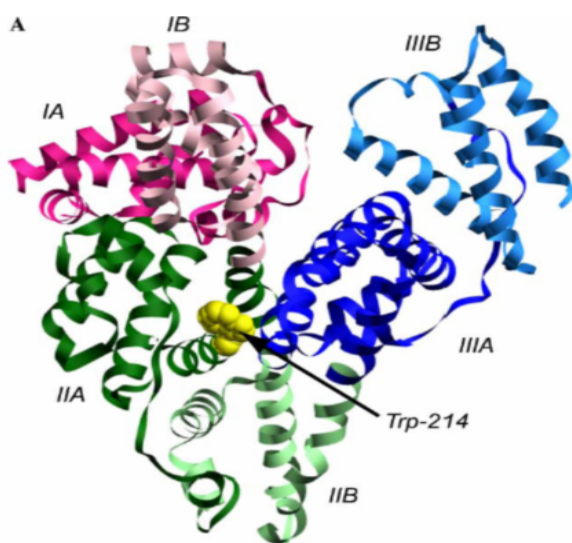
شکل ۱- فرآیند گلیکته شدن پروتئین‌ها [۱۷]



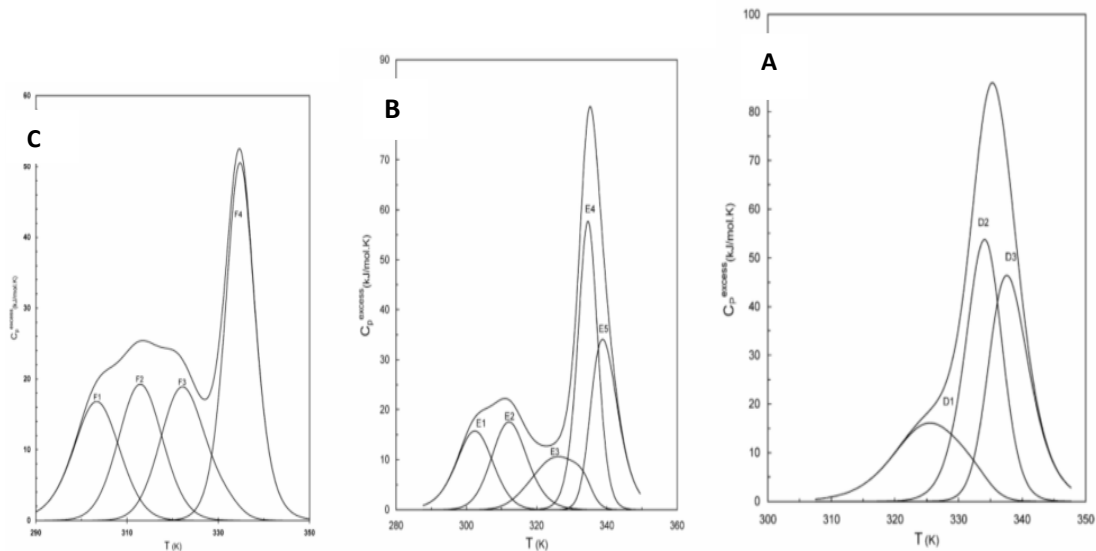
شکل ۲- نگاهی نزدیک به ساختار آمیلوئید فیبریلی [۳۲]



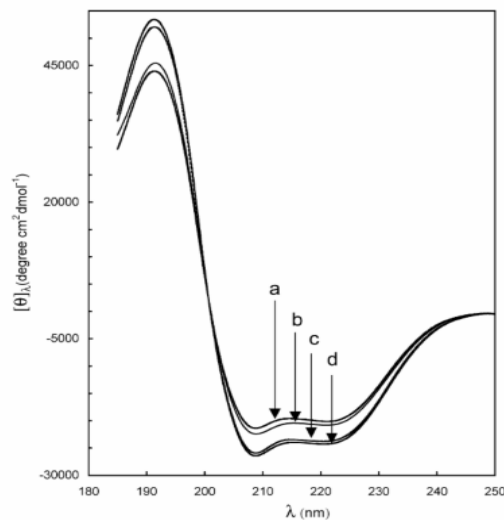
شکل ۳- سازوکار مرگ سلولی [۱۴]



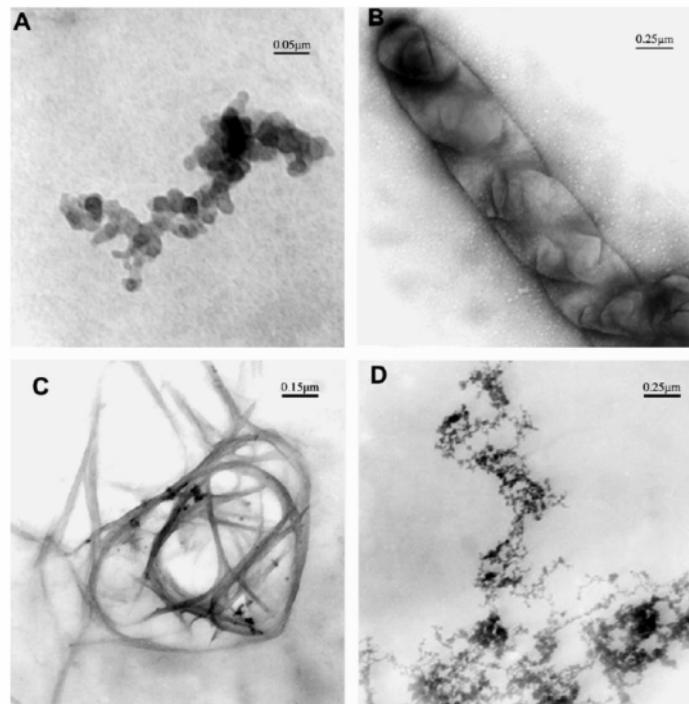
شکل ۴- ساختار ملکول آلبومین سرم انسانی [۴۰]



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 ۳۰-۲۵ 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 ۲۰-۱۵ 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.

مآخذ

- 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 Ernahrungswiss* 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, Bunting 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؛ ۷(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. Yeargans 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, Yeargans 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.