

مروری کوتاه بر تغییرات ساختاری آلبومین سرم خون در اثر گلاایکه شدن

نغمه ستاراحمدی^۱، علی اکبر موسوی موحدی^{۱*}

چکیده

اندرکنش قندهای احیا کننده با پروتئین‌ها منجر به ایجاد یک سری واکنش‌های آبشاری می‌شود که به واکنش گلاایکه شدن یا میلارد معروفند که نقش مهمی در ایجاد عوارض دیابت ایفا می‌کند. در این مرور کوتاه، تغییرات ساختاری آلبومین سرم خون گلاایکه شده (GHSA) توسط قندهای مختلف در زمان‌های گوناگون انکوبه شدن که در متون علمی گزارش شده به همراه مطالعات گروه ما گزارش می‌گردد. مطالعات گروه ما نشان می‌دهد آلبومین سرم انسانی (HSA)، در اثر گلاایکه شدن دستخوش تغییرات ساختاری می‌شود. در فرایند گلاایکه شدن آلبومین در روز ۲۱ انکوبه شدن، جدا شدن گلوکز از آلبومین گلاایکه شده موجب ایجاد مولتن گلوبول می‌شود که مقدمه‌ای برای بیماری‌های در ارتباط با مولتن گلوبول می‌تواند باشد. همچنین گلاایکه شدن طولانی مدت آلبومین سرم انسانی موجب توده‌ای شدن، تشکیل آمیلوئید و کاهش کشش سطحی آلبومین گلاایکه شده می‌شود و نقش مواد فعال سطحی و غیرطبیعی کننده را برای پروتئین ایفا می‌کند ما نشان دادیم آلزینات به عنوان یک پلیمر قندی می‌تواند گلاایکه شدن آلبومین را کاهش دهد. در نهایت مقایسه‌ای بین اندرکنش مصنوعی و آزمایشگاهی قندها با آلبومین و نمونه HSA بیماران دیابتی مورد مطالعه گروه ما قرار گرفت، تنها تعداد اسیدآمین‌های آرژینین در آلبومین بیماران دیابتی به میزان بیشتری تغییر یافته‌اند.

واژگان کلیدی: گلاایکه شدن، آلبومین سرم، فیبریل، مولتن گلوبول، آلزینات، تغییرات ساختاری

۱- مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران

***نشانی:** تهران، خیابان انقلاب، دانشگاه تهران، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک؛ تلفن: ۰۲۱-۶۱۱۱۳۳۸۰، نمابر: ۰۲۱-۶۶۴۰۴۶۸۰
پست الکترونیک: moosavi@ibb.ut.ac.ir

(HbA1c) نشانگر وضعیت گلیسمی بیمار در ۱۲۰ روز پیشین است. آلبومین سرم انسانی^۹ (HSA) با دوره واژگونی کوتاهتر بیانگر وضعیت گلیسمی خون در دوره کوتاهتر است و در مواردی که آزمایش HbA1c قابل اندازه گیری نیست (شرایط کم خونی) مورد استفاده است [۸]. HSA فراوانترین پروتئین سرم خون انسان، شامل ۵۸ لیزین است [۹-۱۴] و مناسب برای اتصال به قند های احیا کننده است. ۷-۱۰ درصد از آلبومین سرم به صورت گلاپیکه است. این میزان در افراد دیابتی افزایش و به ۲۰-۳۰ درصد می رسد و منجر به تغییرات ساختمانی و عملکردی پروتئین آلبومین می شود [۱۵]. این تغییرات به زمان و مرحله واکنش میلارد و غلظت قند بستگی دارد.

واکنش میلارد را می توان به سه مرحله تقسیم نمود: ابتدایی، حدواسط و مرحله انتهایی.

در مرحله ابتدایی، قند احیا کننده با گروه آمین آزاد در پروتئین ها، اسیدهای نوکلئیک و لیپیدها وارد واکنش می شود. در این واکنش در اثر حمله نوکلئوفیلی نیتروژن گروه آمین به C1 زنجیر باز قند، ترکیب ناپایدار آلدیمینی معروف به شیف باز^۱ حاصل می شود (شکل ۱). اصطلاح شیف باز به ترکیب مشتق از فشرده شدن آلدئید یا کتون با آمین های اولیه اطلاق می شود که تشکیل باز ضعیفی می دهد که با آب یا اسید قوی هیدرولیز می شود و ترکیبات کربنیلی و آمین ها را ایجاد می کند. این واکنش در طی چند ساعت اول رخ داده و محصول آن در تعادل با قند و مولکول اولیه است [۸].

سرعت گلاپیکه شدن تابعی از آنومریزاسیون قندها (تبدیل بین حالت آنومرهای آلفا و بتا) است، یعنی در صد بیشتر زنجیر باز قند نشانگر فعال تر بودن آن است. Bunn و Higgens بیان نمودند که فعالیت قند بستگی به پایداری ساختمان و تعادل بین حالت باز و بسته (حلقه) قند دارد. گروه کربنیل آلدئیدها، الکتروفیل تر از گروه کربونیل کتون ها می باشند، بنابراین فعالیت قند به کتون یا آلدئید بودن قند نیز بستگی دارد [۷].

شیف باز از طریق نوآرایی ساختاری و انتقال اتم هیدروژن از گروه هیدروکسیل مجاور پیوند دوگانه نیتروژن-کربن به

مولکول های کوچک و فعال مانند متابولیت ها و قندهای موجود در محیط بدون نیاز به آنزیم قابلیت واکنش با پروتئین ها را دارند [۱]. از آنجا که واکنش پروتئین با قندها نقش اصلی در عوارض بیماری دیابت دارد، از اهمیت بسزایی برخوردار بوده و تا امروز مورد تحقیقات گسترده ای قرار گرفته است.

واکنش گلاپیکه شدن

واکنش غیر اختصاصی پروتئین ها با قندها، گلاپیکه شدن^۱ یا واکنش میلارد^۲ نام دارد [۲]. اشتباه در استفاده از اصطلاح های گلیکوزیلاسیون^۳ یا گلاپیکه شدن در واکنش پروتئین و قندها در متن های علمی بسیار رایج است، زیرا از اصطلاح صحیح گلاپیکه شدن به عنوان "گلیکوزیلاسیون غیر آنزیمی" یاد می شود. حال آن که گلیکوزیلاسیون به اتصال کوالانی الیگوساکاریدها به پروتئین اطلاق می شود و اصطلاحاً گلیکوبیولوژی^۴ [۳،۴] یا گلیکومیکس^۵ [۵] نام دارد.

واکنش گلاپیکه شدن اولین بار توسط شیمیدان فرانسوی به نام لوئیس کامیل میلارد^۶ در قرن بیستم معرفی شد [۶]. به طور کلی این واکنش در هر مکانی که پروتئین با قند احیا کننده^۷ در تماس است در زمان رخ می دهد. بعضی از قندها فعالتر و یا بعضی از پروتئین ها مستعدترند [۱]. گلوکز که قند اصلی خون است، کمترین فعالیت را در این مسیر دارد [۷] و این موضوع منجر به نقش اصلی گلوکز در متابولیسم می شود. غلظت زیاد گلوکز در خون افراد دیابتی و افزایش سن سبب می شود این واکنش با سرعت بیشتری پیش رود [۸].

آزمایش های گلوکز خون و ادرار جوابگوی وضعیت گلیسمی^۸ بیمار در زمان های طولانی نمی باشند. اندازه گیری پروتئین های گلاپیکه شده می تواند روش جدیدی برای تعیین وضعیت گلیسمی باشد. هموگلوبین گلاپیکه

1- Glycation

2-Maillard

3 -Glycosylation

4-Glycobiology

5 -Glycomics

6-Louis Camil Maillard

7 -Reduced sugar

8 -Glycemia

9- Human serum albumin

10 - Schiff base

اندازه گیری محصولات واکنش گلايکة شدن به دو مفهوم است. از طرفی اندازه گیری آنها بسته به نیمه عمر پروتئین می تواند تخمینی از میزان قند در معرض پروتئین باشد و بنابراین در جهت کنترل قند استفاده شود. از طرفی می توان ارتباط بین این محصولات و تغییرات بافتی را بیان نمود [۴].

روش هایی که اساسا برای جدا نمودن پروتئین های گلايکة از غیر گلايکة استفاده می شود، بر اساس تفاوت در بار (کروماتوگرافی مبادله یونی^۸ توسط HPLC، کروماتوگرافی گازی/ طیف سنجی جرمی^۹) [۲۰-۱۷] یا ساختمانی (کروماتوگرافی تمایلی^{۱۰})، روش های رنگ سنجی (اتصال کتوآمین به رنگ نیترو بلوترازولیوم^{۱۱} (NBT) و تولید ماده رنگی دارای جذب ۵۲۵ نانومتر) و سنجش های ایمنی که در آنها آنتی بادی های مونوکلونال [۲۱] به طور اختصاصی اسیدهای آمینه گلايکة را شناسایی می کنند، می باشند. واکنش NBT با کتوآمین اختصاصی نیست، بلکه هر عامل احیا کننده دیگر مانند اسیدآسکوربیک، اسید اوریک و گلوکاتایون می تواند در این اندازه گیری دخالت کند. مواد دیگر نیز مانند بیلی روبین، تری گلیسیریدهای موجود در سرم در این طول موج جذب دارند. البته از آنجا که آلبومین فراوانترین پروتئین در سرم است، این اندازه گیری بیشتر شاخص میزان آلبومین گلايکة در سرم است [۲۲].

محصولات انتهایی گلايکة شدن به روش های طیف سنجی و فلوریمتری قابل اندازه گیری می باشند [۲۳، ۲۴]. اخیرا روش های ELISA و رادیویمونو آسی (RIA) نیز در تشخیص محصولات AGE استفاده می شوند [۲۵].

مهار گلايکة شدن پروتئین ها

در بدن روش های مختلفی جهت مقابله علیه گلايکة شدن و تشکیل AGE وجود دارند از جمله وجود آنزیم کبدی α -کتوگلوترآلدئیددهیدروژناز^{۱۲} که ۳-داکسی گلوکوزان (حد واسط مسیر گلايکة شدن) را غیر فعال

نیتروژن، منجر به تولید ترکیب جدید کتوآمین موسوم (محصول آمادوری^۱) می شود (شکل ۱). از آنجا که این واکنش به حضور آنزیم احتیاجی ندارد، غلظت قند و پروتئین، نیمه عمر پروتئین، فعال بودن گروه های آمین آزاد و نفوذپذیری سلول نسبت به قند تنظیم کننده های واکنش می باشند [۸]. در شرایط سلولی، محصول آمادوری پس از حدود ۲۰-۱۵ روز به تعادل رسیده و از طریق اتصالات برگشت ناپذیر روی پروتئین های تجمع می یابند. در مرحله حدواسط، محصول آمادوری از طریق واکنش های اکسیداسیون، دهیدراسیون تجزیه شده و به پهنه ای از ترکیبات کربونیلی مانند گلی اکسال^۲، متیل گلی اکسال^۳ و داکسی گلوکوزان^۴ تبدیل می شود. این ترکیبات بسیار فعال تر از قند اولیه ای هستند که از آنها مشتق شده اند [۱۶] و به عنوان انتشاردهنده^۵ در مرحله انتهایی، مجددا با گروه های آمین آزاد واکنش می دهند و از طریق اکسیداسیون، دهیدراسیون و قطعه شدن^۶، ترکیبات زرد-قهوه ای، اغلب فلورسانتی، غیر محلول و برگشت ناپذیر تولید می کنند که با نام کلی محصولات انتهایی گلايکة شدن پیشرفته^۷ (AGEs) شناخته می شوند (شکل ۱). این ترکیبات روی پروتئین ها تجمع یافته و موجب آسیب رساندن به آنها می شوند. طبیعت شیمیایی همه ترکیبات AGE به درستی شناخته نشده اند. ساختمان شیمیایی بعضی از این ترکیبات در شکل ۲ ارائه شده است [۸]. همچنین فرایند اکسیداسیون با کاتالیز فلزاتی مانند مس و آهن نقش مهمی در تولید این محصولات ایفا می کند. فلزات آزاد قادرند قندهای آزاد را در حضور اکسیژن اتواکسید نمایند و این منجر به تولید ترکیبات دی کربونیلی بسیار فعال میشود. همچنین محصول آمادوری ممکن است در حضور اکسیژن و فلزات آزاد اکسید شود و منشا تولید پروتئین - اندیول ها و پروتئین - دی کربونیل های بسیار فعال شود که در نهایت AGE را ایجاد می کنند (شکل ۳) [۴].

- 1- Amadori product
- 2 -Glyoxal
- 3 -Methylglyoxal
- 4 -Deoxyglucosone
- 5 -propagator
- 6 -fragmentation
- 7 -Advanced Glycation End Products

- 8- Ion exchange chromatography
- 9- Gas chromatography/ mass spectrometry (GC/MS)
- 10 -Affinity chromatography
- 11 -Nitro blue tetrazolium
- 12 - α -ketoglutaraldehyde dehydrogenase

ترتیب تغییرات سلولی و التهابی همراه با عوارض دیابت را سرکوب سازند.

از آنجا که عمل گلايکة شدن و تشکیل AGE خود به خود صورت می پذیرد، جهت مهار آن وجود مهار کننده قوی با نیمه عمر طولانی لازم است که هیچ سمی از تجویز و استفاده بلند مدت آن ایجاد نشود. برآورد شدن این جنبه‌ها مشکل است و استفاده از این ترکیبات و اثر آنها در سلول هنوز جای بحث و تحقیقات بیشتر دارد.

اخیرا نشان دادیم آلزینات (هتروپلی ساکارید آینیونی جلبک) در آزمایشگاه با پوشاندن گروه های آمین آلبومین سرم از گلايکة شدن آن جلوگیری می کند [۲۸]. ترکیب شیمیایی آلزینات (شکل ۳) شامل اتصالات متناوب ۱-۴-β-D-گلوکونیک اسید^۵ و α-L-گلوکونیک اسید^۶ است و به عنوان سازنده ژل در زیست فناوری و پزشکی کاربرد فراوان دارد [۲۹]. این ماده در بدن انسان نیز توسط باکتری سودوموناس آیروزینوس^۷ تولید می شود [۳۰]. مطالعات ساختمانی نشان داد که حضور آلزینات از تغییرات ساختمانی و انتقال هلیکس به صفحات β ناشی از فروکتیله شدن HSA و تشکیل AGE فلورسان جلوگیری به عمل می آورد [۲۸]. آلزینات پایداری بیشتر ساختمانی (افزایش هلیکس) HSA را سبب می شود [۲۸]. ایجاد هلیکس در پروتئین ها توسط قندها نتیجه پایین آمدن ثابت دی الکتریک محیط است. بنابراین آلزینات محیطی با قطیبت کمتر ایجاد می نماید که در آن رقابت حلال برای ایجاد پیوند هیدروژنی با اسکلت پپتیدی پروتئین کاهش می یابد [۳۱]. وجود دافعه الکتروستاتیکی نسبتاً قوی بین مولکول های HSA و زنجیر های منفی آلزینات [۳۲، ۳۳]، منجر به جدایی فاز می شود و باعث شده هیچ واکنشی بین آلزینات و آلبومین انجام نپذیرد. کربوهیدرات های غیر احیاء کننده مانند α-تره هالوز اثر پایدارسازی روی ساختمان پروتئین دارند. این ترکیبات به عنوان کمک حلال^۸ عمل می کنند و پروتئین ها را با افزایش کشش سطحی محیط پایدار می سازند [۳۴، ۳۵]. در واقع این ترکیبات جایگزین آب در محیط می شوند.

می سازد. گیرنده های ماکروفاژها پروتئین های AGE را با عمل آندوسیتوز خارج می سازند. سرولولوپلاسمین^۱ به فلزات انتقالی مانند مس متصل می شود و از شرکت آن در واکنش گلايکة شدن اتواکسیداتیو یا گلايکواکسیداسیون جلوگیری می کند. بازده این روش های طبیعی دفاعی در سلول ناشناخته است. روش کلیدی در درمان دیابت کاهش هایپرگلیسمی با تغییر در تغذیه است. تعداد بیشماری ترکیبات به عنوان ضد گلايکة شناسایی شده اند، اما کاربرد عملی آنها هنوز مورد تردید می باشد. نحوه عمل این ترکیبات در زیر خلاصه شده است [۲۶، ۲۷]:

- مسدود نمودن گروه آمین پروتئین ها ، هر چند اثرات زیستی کاهش آمین آزاد پروتئین ها ناشناخته است.
- مسدود نمودن گروه های کربنیلی قندهای احیا کننده و محصولات آمادوری و حدواسط های دی کربنیلی ، اثر کاهش گروه های کربنیلی در سلول نیز ممکن است مطلوب نباشد. بعضی دیگر از ترکیبات ممکن است به سادگی فرم زنجیر باز قندهای احیاکننده را از بین ببرند.
- مسدود نمودن محصولات آمادوری توسط آنتی بادی هایی اختصاصی ، که به لحاظ اختصاصی عمل نمودن نسبت به روش قبل سودمندتر است.
- شلات نمودن فلزات انتقالی که در ایجاد رادیکال های مشتق از گلايکة شدن نقش دارند، هر چند بسیاری از این فلزات انتقالی عملکردهای فیزیولوژیکی مهمی دارند و حذف کامل آنها نتایج مطلوبی ندارد.
- آنتی اکسیدان ها که با مقابله نمودن علیه رادیکال های آزاد ایجاد شده در این مسیر عمل خود را نشان می دهند.
- آنزیم هایی مانند آمادوری آزاها^۲ محصول آمادوری را دگلايکة و یا حدواسط ها را غیرفعال می سازند.
- شکننده های^۳ اتصالات عرضی AGE، که قدرت در برگشت عوارض دیابت دارند اگر چه سازوکار دقیق عمل آنها هنوز روشن نشده است.

- مسدود کننده های گیرنده های چند لیگاندی^۴ (RAGE) که می توانند اندرکنش AGE با RAGE را مهار و به این

5-α-L- glucuronic acid
6-β-D- mannuronic acid
7-Pseudomonas aeruginosa
8-Cosolvent

1-caeruloplasmin
2-Amadoriases
3-breakers
4-multi ligand receptor (receptors of AGE)

اولین اتصال لیزین ۱۹۵ با بیلی روبین اندرکنش الکتروستاتیکی دارد و علاوه بر آن پیوند هیدروژنی بین گلوتامات ۱۸۸ با بیلی روبین و لیزین ۱۹۵ در این اتصال نقش دارد [۴۲].

مطالعات Garlick و Mazer سال ۱۹۸۳ نشان داد محل اصلی گلاایکه شدن آلبومین، لیزین ۵۲۵ در دامنه II می باشد. تریپتوفان ۲۱۴ واقع در دامنه II بسیار تحت تاثیر گلاایکه شدن قرار گرفته و شدت فلورسانس ذاتی در آلبومین تغییر می کند. محل اتصال همین^۳ نیز در دامنه II (رزیدوهای ۱۹۸-۱۲۴) آلبومین قرار دارد، اما گلاایکه شدن روی اتصال آن تاثیری ندارد [۴۳]. مطالعات آزمایشگاهی گلاایکه شدن آلبومین، نشان داد که زیر واحد لیزین ۱۹۹ شرایط بهتری را برای گلاایکه شدن دارا می باشد. احتمالاً حذف اسیدهای چرب از آلبومین قبل از انکوبه شدن آن با گلوکز باعث شده این اسیدآمین که توسط اسیدهای چرب پوشانده شده، در معرض قند قرار گیرد. بررسی ساختمانی نشان داد که زیر واحد لیزین ۵۲۵ در شرایط سلولی، pK پایین تری داشته که کمک به اتصال گلوکز به آن می کند [۴۳]. مطالعات Iberg و Fluckiger توسط HPLC فاز معکوس روی نمونه های آلبومین سرم افراد دیابتی نشان داد که گلوکز می تواند به لیزین های ۱۹۹، ۲۸۱، ۴۳۹ و ۵۲۵ متصل شود. ۳۳٪ از گلاایکه شدن در مکان اصلی گلاایکه شدن لیزین ۵۲۵ رخ می دهد که در توالی لیزین-لیزین قرار دارد. مکان های دیگر گلاایکه شدن آلبومین نیز در توالی های لیزین-لیزین، لیزین-هیستیدین و یا لیزین-هیستیدین-لیزین و یا نزدیک به پل های دی سولفیدی واقع شده اند. پنج مکان دیگر گلاایکه شدن آلبومین، لیزین های ۲۳۳، ۳۱۷، ۳۱۵، ۱۲ و ۵۳۴ می باشند. با وجود pK کم لیزین ۱۹۹، تنها ۵٪ از کل گلاایکه شدن در این محل رخ می دهد. همچنین در گروه آمین انتهایی (آسپاراژین) با وجود pK پائین، گلاایکه شدن رخ نمی دهد. بنابراین میزان pK اسیدآمین ها، اهمیت کمی در میزان گلاایکه شدن آنها دارد. به نظر می رسد همسایگی این زیرواحدها با زیرواحدهای دارای بار مثبت (لیزین و هیستیدین) و همچنین مجاورت آنها با پل های دی سولفیدی در تعیین

بنابراین کمک حلال، پروتئین را در مقابل دهیدراسیون توسط افزایش پیوندهای هیدروژنی حفظ کرده و به این وسیله حالت طبیعی پروتئین را پایدار می کنند. آژینات که یک کربوهیدرات غیراحیاء کننده است نیز به عنوان کمک حلال در این محلول عمل کرده و ساختمان پروتئین را پایدار ساخته است.

تحقیقات انجام گرفته در مورد گلاایکه شدن آلبومین سرم خون

HSA به عنوان پروتئین مدل برای بررسی تغییرات گلاایکه شدن به کرات استفاده شده است. آلبومین حامل بسیاری از ترکیبات درون سرم است [۳۹-۳۶]، از این جهت مطالعه تغییرات کنفورماسیون و عملکرد ناشی از گلاایکه شدن آن اهمیت بسیاری دارد. این مطالعات به صورت آزمایشگاهی و در شرایط مختلف انکوبه شدن (مدت زمان انکوبه شدن، غلظت های مختلف آلبومین و قند و انواع مختلف قند) صورت گرفته و نتایج بسیاری در مورد نحوه و تاثیر گلاایکه شدن بر پایداری آلبومین ارائه شده است.

مطالعه گلاایکه شدن آلبومین قبل از سال ۲۰۰۰ به دنبال یافتن محل های گلاایکه شدن آلبومین با استفاده از روش های مختلف کروماتوگرافی و استفاده از مواد رادیواکتیو آغاز شد. Guthrow و همکارانش با استفاده از کروماتوگرافی CM- سلولز نشان دادند که در سرم افراد طبیعی ۸٪ از کل آلبومین در گردش به صورت گلاایکه است [۴۰]. Shaklai و همکارانش، نتایجی در مورد تغییر عملکرد HSA گلاایکه ارائه نمودند و نشان داد که اتصال بیلی روبین به فرم گلاایکه آلبومین نسبت به فرم غیر گلاایکه کاهش می یابد. [۱۵]. موسوی موحدی و همکاران تحقیقاتی در تعیین تعداد و محل اتصال بیلی روبین به HSA توسط طیف سنجی ماورای بنفش، کالریمتری تیتراسیون همدم^۱ [۴۱] و شبیه سازی دینامیک مولکولی^۲ [۴۲] انجام دادند. دو دسته جایگاه مختلف برای اتصال بیلی روبین به HSA وجود دارد، دسته اول دارای یک مکان اتصال و دسته دوم دو مکان اتصال دارد [۴۱]. محل دقیق

1 -Isothermal titration calorimetry
2 -Molecular dynamic simulation

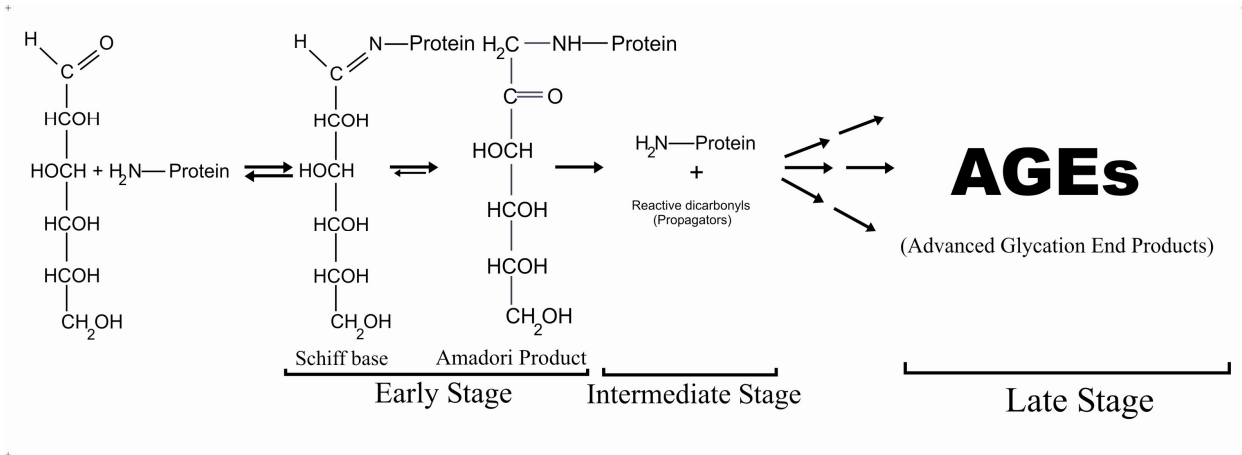
محل های گلاایکه شدن تاثیر بیشتری دارد [۴۴]. در هموگلوبین نیز مکان های گلاایکه شدن نزدیک به اسیدآمینو های بار مثبت قرار گرفته اند [۴۴]. مطالعات گسترده ای به صورت آزمایشگاهی روی گلاایکه شدن هموگلوبین صورت گرفته [۴۸-۴۵] که لازم است در مروری دیگر بررسی شود. اخیرا توسط گروه ما نیز بررسی هایی در این زمینه انجام شده که در آن فروکتوز به عنوان عامل گلاایکه کننده باعث تغییرات ساختمانی و کاهش هلیکس در هموگلوبین می شود [۴۹]. افراد دیابتی سطح بالایی از یون های مس و آهن آزاد در سرم دارند که قادرند رادیکال های آزاد را تولید نمایند. Cussons و همکارانش، گلاایکه شدن HSA را در حضور مس با استفاده از روش های آمینواسید آنالیزر^۱، کروماتوگرافی بورونات جهت اندازه گیری محصول آمادوری، طیف سنجی فلورسانس و دورنگ سنجی نمای بررسی نمودند. در این بررسی نشان داده شد انکوباسیون ۵۶ روزه آسیب های شدیدی در زنجیره های کناری اسیدآمینو های هیستیدین و تریپتوفان، شکست زنجیره اصلی و تغییر در ساختمانی دوم و سوم پروتئین ایجاد می کند [۵۰]. مطالعات گلاایکه شدن آلومین بعد از سال ۲۰۰۰ بیشتر در جهت شناسایی محصولات AGE و تغییرات ساختمانی ناشی از گلاایکه شدن در پروتئین است. این مطالعات به صورت آزمایشگاهی و در حضور قندهای مختلف با غلظت های متفاوت و روزهای انکوبه شدن متغیر است.

به علت فقدان مطالعات تاثیر گلاایکه شدن روی مسائل ساختاری و ترمودینامیکی، از سال ۲۰۰۲ کار روی گلاایکه شدن HSA را آغاز نمودیم. با استفاده از روش فلورسانس [۵۱] دو دسته جایگاه مختلف برای اتصال گلوکز به آلومین تشخیص داده شد: دسته اول دارای ۲ جایگاه اتصال و اتصال به صورت تعاونی و گرمازا است، دسته دوم دارای ۹ مکان اتصال و به صورت غیرتعاونی و گرماگیر می باشد که نشانگر انتقال گروه های هیدروفوب از درون پروتئین به سطح است. دسته جایگاه اول تمایل بیشتری نسبت به دسته جایگاه دوم برای اتصال به گلوکز نشان می دهد و این تاقیدی بر وجود دو مکان ارجح

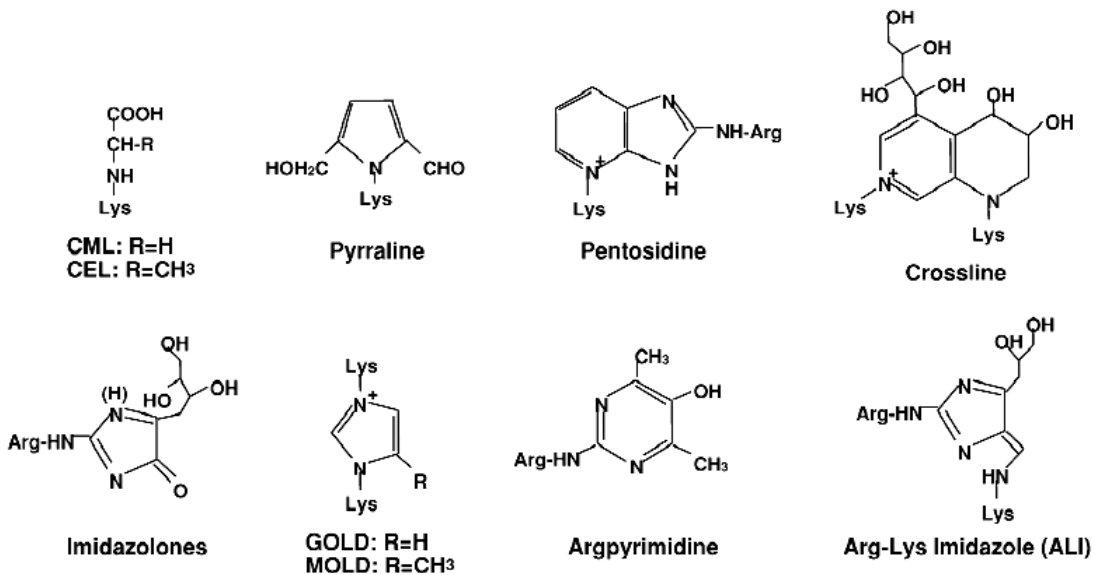
(لیزین ۵۲۵ و لیزین ۱۹۹) برای اتصال گلوکز در آلومین می باشد. همچنین مطالعاتی [۵۰] در روز ۷ انکوبه شدن و توسط روش طیف سنجی دو رنگ سنجی نمای ناحیه ماوراء بنفش - دور (Far-UV CD) انجام گرفت. نتایج نشان می دهد که گلاایکه شدن آلومین در برخورد اولیه به گلوکز در غلظت کم (۷ میلی مولار مربوط به افراد نرمال) باعث شوک ساختاری شده است. اما غلظت های بالاتر، از محدوده شروع دیابت تا دیابت مزمن (۱۶/۵-۱۰ میلی مولار) موجب پایداری و افزایش هلیکس، و غلظت مربوط به افراد دیابت حاد (۲۷/۵ میلی مولار) منجر به کاهش میزان هلیکس در آلومین می شوند. همچنین مطالعات کالریتری اسکن درجه حرارت (DSC) [۵۲] حاکی از تغییر کنفورماسیون HSA در اثر گلاایکه شدن است. اندرکنش HSA با گلوکز، ارتباط بین زیردین های موجود در قسمت دم HSA را کاهش، در حالی که قسمت سر فشرده می شود. HSA دارای دو بخش کاملا متمایز است. بخش اول یعنی سر دارای ساختار فشرده تری است از سه زیر دومین IA و IB و IIA تشکیل شده و بخش دوم که شل تر و کشیده تر است، دم آلومین و دارای سه زیردین IIB و IIIA و IIIB می باشد [۱۲]. مطالعات انجام گرفته توسط Mendez و همکارانش مبنی بر سنجش واسرشت شدن ساختمانی HSA گلاایکه و غیرگلاایکه در روز ۷ انکوباسیون نشان داد گلاایکه شدن، ساختمانی دوم و ساختار محلی اطراف تریپتوفان ۲۱۴ را پایدار می سازد و ازدست رفتن ساختمانی سوم قبل از ساختمانی دوم است. پایدار تر شدن نمونه گلاایکه باعث افزایش عمر آن شده و به این ترتیب مدت زمان بیشتری را در سیستم گردش خون افراد دیابتی باقی می ماند و این منجر به تجمع پروتئین های گلاایکه می شود [۵۳]. ادامه بررسی های ما در سال ۲۰۰۷ نشان داد که غلظت های کم گلوکز در روز هفت انکوبه شدن موجب کاهش هلیکس، انعطاف پذیری بیشتر و کاهش اتصال L-تریپتوفان به آلومین می شود. در حالی که غلظت های بالاتر گلوکز در حد افراد دیابتی موجب افزایش هلیکس، پایداری، تحرک کمتر و افزایش اتصال تریپتوفان را باعث می شود [۵۴]. این نتیجه با این

زنجیره پلی پپتیدی HSA دچار گلايکته شدن می شوند
[۲۴].

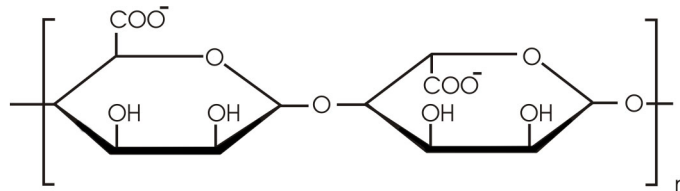
فرض که در غلظت های مختلف گلوکز، مکان ها و لیزین های متفاوتی درگیر گلايکته شدن می شوند قابل توجه است. مطالعات نشان داد که لیزین های موجود در بدنه HSA زودتر از لیزین های موجود در انتهای C و N



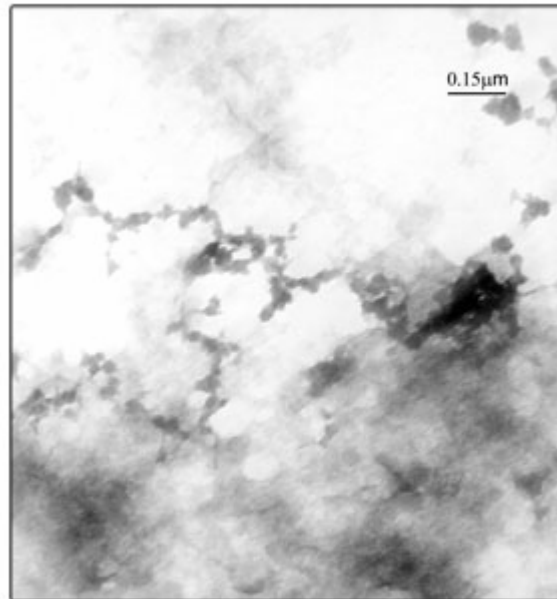
شکل ۱- مراحل واکنش گلايکته شدن [۵۴].



شکل ۲- ساختار برخی از محصولات AGE شناخته شده [۸].



شکل ۳- ترکیب شیمیایی آلزینات [۲۸].



شکل ۴- ساختار آمیلوئیدی ایجاد شده در اثر انکوباسیون HSA در حضور ریبوز ۵۰۰ میلی مولار به مدت ۲۰ هفته در دمای ۳۷ °C

تأثیر شاخص تری روی ساختمان HSA گذاشته است. این بررسی تأیید نمود که از دست رفتن ساختمان سوم در اثر گلايکۀ شدن قبل از ساختمان دوم است. ادامه انکوباسیون HSA با گلوکز در روز ۲۱ [۵۶] نشان می دهد محتوای ساختمان دوم HSA گلايکۀ در غلظت های فیزیولوژیکی گلوکز شبیه به HSA غیرگلايکۀ در شرایط مشابه انکوباسیون می باشد و نشانگر مرحله حدواسط فرایند گلايکۀ شدن است. همچنین نتایج مربوط به تشکیل محصول آمادوری تأیید می کند که محصول آمادوری در روز ۱۴ انکوباسیون ایجاد شده است و متعاقب آن میزان آن در روز ۲۱ انکوباسیون کاهش یافته و این نشان از ورود به مرحله حدواسط و ختم مرحله ابتدایی است. مشاهدات در این مرحله حاکی از جدا شدن قندهای اتصال یافته به صورت انشاردهندگان است. زیرا در بررسی تعداد مول گلوکزاتصال یافته به هر مول HSA، اعداد منفی به دست آمد که نشان دهنده جدا شدن گلوکزها از سطح پروتئین است [۵۷]. بنابراین این تصور پیش آمد که در این روز احتمال ایجاد حالت مولتن گلبول در غلظت های دیابتی گلوکز وجود دارد.

Dutta و همکارانش، گلايکۀ شدن HSA را در حضور گلیسرالدئید، گلوکوزامین و گلوکز در روز ۱۵ انکوباسیون بررسی نمودند. نتایج حاکی از آن بود که همه قندها اثر یکسانی روی پایداری پروتئین ندارند، بعضی مانند گلوکوزامین اثر پایدار کننده و بعضی مانند گلوکز و گلیسرالدئید، آلبومین را ناپایداری کنند [۵۵]. گلیسرالدئید سه کربنه به خاطر اندازه کوچکترش نسبت به زنجیر بازگلوکز، جهت یابی فضایی کاهش یافته ای در واکنش با گروه های آمین آزاد پروتئین دارد و در نتیجه فعالیت بیشتری نسبت به گلوکز دارد.

گلايکۀ شدن با افزایش یا کاهش پیوندهای هیدروژنی در ارتباط با گروه های آمین، کنفورماسیون و پایداری پروتئین تغییر می دهد. نتایج گروه ما [۵۲] و دوتا [۵۵] نشان داد افزایش مدت زمان انکوباسیون گلوکز با HSA منجر به کاهش ساختاری و ناپایداری HSA می شود. بررسی دیگر ما در مورد گلايکۀ شدن HSA طی زمان [۵۶] نیز این نتایج را در مورد اثر گلوکز روی HSA در روز ۷ و ۱۴ انکوباسیون تأیید می کند. به نظر می رسد گلايکۀ شدن HSA تحت این شرایط در روز ۱۴ انکوباسیون به مرحله تولید محصول آمادوری رسیده که

حالت مولتن گلبول شکل دناتوره شده و فشرده پروتئین با ساختمان سوم پروتئین انعطاف پذیر است. این حالت در سلول های موجودات زنده و در فرایندهای فیزیولوژی مختلفی در بدن به وجود می آید و می تواند علت بسیاری از بیماری های مرتبط با پروتئین ها باشد [۵۸]. پروتئین ها در شرایط آزمایشگاهی در pH های پائین می توانند به حالت مولتن گلبول درآیند [۵۸، ۵۹]. موسوی موحدی و همکاران اولین تحقیقات دال بر تشکیل این حالت در حضور سورفاکتانت ها [۶۰-۶۵] را گزارش نمودند. حالت مولتن گلبول در سیتوکروم c توسط قندها و پلی ال ها نیز ایجاد شده است [۶۶، ۶۷].

بر اساس اطلاعات Far-UV CD، HSA گلاایکه در روز ۲۱ انکوباسیون در حضور غلظت های فیزیولوژیکی گلوکز میزان ساختمان دوم شبیه به پروتئین غیر گلاایکه در همین شرایط انکوباسیون دارد. اما نتایج فلورسانس تغییر در ساختمان سوم این نمونه ها را نسبت به پروتئین غیر گلاایکه نشان می دهد. بنابراین در مرحله حدواسط، HSA می تواند ساختمانی شبیه به حالت مولتن گلبول ارائه دهد [۵۶]. جهت تأیید این مساله به دنبال یافتن ویژگی های دیگر این حالت، آزمایش های دیگری طراحی نمودیم. یک پارامتر کلیدی در تشخیص حالت مولتن گلبول، حجم بیشتر این ساختار نسبت به پروتئین طبیعی است [۶۱]. نتایج بررسی شعاع استوکس نشانگر فشردگی ساختمان HSA گلاایکه در حضور ۳۵ میلی مولار گلوکز در روز ۲۱ نسبت به زمان های دیگر انکوباسیون است. پس از ۱۴ و ۲۸ روز انکوباسیون با گلوکز، HSA گلاایکه به ترتیب در مرحله آمادوری و تشکیل AGE می باشد و بدیهی است در این حالات، HSA حجم بیشتری دارد [۵۶].

ویژگی دیگر مولتن گلبول در دسترس پذیرتر بودن بخش های هیدروفوبی پروتئین نسبت به پروتئین طبیعی است. در ساختمان پروتئین ها خوشه هایی از زنجیره های جانبی هیدروفوب وجود دارند که هسته هیدروفوبی پروتئین های گلوبولار را ایجاد می کنند. بعضی از پروتئین های طبیعی تمایل بالاتری برای اتصال به ANS نشان می دهند که نشانگر این است که بخش های هیدروفوب در این پروتئین ها بیشتر در معرض حلال هستند [۶۱].

فلورسانس ANS در HSA های گلاایکه با افزایش سطح گلاایکه شدن کاهش می یابد و این در تطابق با نتایج به دست آمده توسط زولنر و همکارانش می باشد [۲۴]. نتایج ما نشان داد که تمایل اتصال ANS به HSA گلاایکه شده در حضور ۳۵ میلی مولار گلوکز در روز ۲۱ انکوباسیون در مقایسه با دیگر زمان های انکوباسیون افزایش یافته است [۵۶]. بنابراین حالت مولتن گلبول در HSA گلاایکه شده در طی پیشرفت واکنش میلارد در روز ۲۱ انکوباسیون و در حضور غلظت ۳۵ میلی مولار گلوکز (۶۳۰ mg/dl)، شرایط دیابت حاد) ایجاد شده است. بنابراین پیدایش بیماری دیابت می تواند موجب ایجاد حالت مولتن گلبول در HSA شود و احتمالاً مقدمه ای برای ایجاد بیماری های در ارتباط با حالت مولتن گلبول شود. ادامه مدت انکوباسیون در روزهای ۲۸ و ۳۵ سبب اتصال مجدد و بیشتر قند و حدواسط های ایجاد شده روی پروتئین می شود که به موجب آن تغییرات ساختمانی و تولید محصولات AGE بیشتر و تغییر لیزین ها به میزان زیاد و تعداد کمی از آرژنین ها پیش می آید [۵۷].

مطالعات Bourdon و همکارانش نشان داد که خاصیت آنتی اکسیدانی آلبومین در افراد دیابتی کاهش می یابد [۶۸]. همچنین Nakajou و همکارانش نشان دادند گلاایکه شدن باعث کاهش اتصال دنسیل سارکوزین^۱ و فعالیت استرازی آلبومین می شود، اما تأثیری در اتصال وارفارین^۲ به آن ندارد [۶۹].

Schmitt و همکارانش با استفاده از روش های طیف سنجی جرمی و ماورای بنفش نشان دادند افزایش جرم پروتئین HSA گلاایکه در ارتباط با درجه تغییرپذیری پروتئین است. همچنین از طول موج ۳۶۰ نانومتر می توان برای نشان دادن تولید AGE استفاده نمود [۷۰].

انکوباسیون طولانی تر آلبومین با قندها در نهایت منجر به توده ای شدن^۳ و تشکیل آمیلوئید^۴ می شود. فیبریل های آمیلوئیدی، پلی پپتیدهای توده شده با ساختمان صفحات بتا هستند که در آن ها زنجیره های بتا عمود بر محور فیبریل و پیوندهای هیدروژنی اسکلت اصلی موازی با آن

1 - Dansylsarcosine

2 - warfarin

باشد [۷۷]. در محلول پاک کننده ها غلظتی از پاک کننده که در آن شیب تغییر کشش سطحی صفر می شود، به عنوان غلظت بحرانی تشکیل میسل^۳ (CMC) تعریف می شود که نمایانگر آن است که سطح محلول کاملاً با پاک کننده ها پوشانده شده است. در مورد پروتئین ها این غلظت اصطلاحاً غلظت بحرانی توده ای شدن^۴ (CAC) خوانده می شود [۷۸-۸۰]. CAC برای HSA طبیعی CAC حدود ۰/۹ میکرومولار و برای HSA کاملاً گلاایکه شده برابر ۰/۲۸ میکرومولار است. اندرکنش سورفاکتانت ها با پروتئین منجر به تغییرات کنفورماسیونی و باز شدن ساختمان پروتئین می شود، گروه های هیدروفوب در معرض محلول قرار می گیرد. این رفتار باعث شده حلالیت پروتئین کمتر و به سطح هوا / آب مهاجرت کند و به عبارتی باعث افزایش جذب سطحی شوند [۸۱-۸۳]. کاهش کشش سطحی در اثر افزایش غلظت HSA گلاایکه در حضور قندهای مختلف مشاهده می شود که به عنوان تغییر در ابعاد هندسی و ناحیه مولی^۵ پروتئین در حالت باز شده و تغییر هیدروفوبیسیته تفسیر می شود. نقطه CAC با افزایش زمان انکوباسیون و وجود قند مؤثرتر به سمت چپ یعنی غلظت های کمتر تغییر مکان می دهد. تغییر در ناحیه مولی متوسط یعنی تغییر در فضایی که توسط هر مولکول پروتئین اشغال می شود [۸۴]. Fainerman و همکارانش [۸۵] پیشنهاد نمودند که مولکول های پروتئینی ممکن است در حالات مجزا و مختلفی در لایه جذبی وجود داشته باشند، بنابراین فرایند گلاایکه شدن محصولات متفاوتی را تولید می نماید که نواحی مولی یا هیدروفوبیسیته مختلفی دارند.

به منظور مقایسه نتایج گلاایکه نمودن HSA در آزمایشگاه با آنچه در طبیعت رخ می دهد، آلبومین سرم از افراد نرمال و دیابتی با غلظت های مختلف قند، با روش کروماتوگرافی تمایلی سیباکرون بلو^۶ (لیگاند اختصاصی HSA) تهیه شد [۸۶-۸۹]. نتایج تغییر ساختمان، تشکیل فیبریل، محتوای محصول آمادوری، تغییر فعالیت سطحی و وجود AGE فلورسانسی با نتایج نمونه های

است [۷۱]. بیماری های وابسته به آمیلوئید ها شامل شرایط سخت پارکینسون، آلزایمر و دیابت نوع ۲ می باشند [۷۲،۷۳]. آبگریزی بالا، تبدیل ماریچ های آلفا به صفحات بتا و کاهش بار مؤثر پروتئین بر پدیده توده ای شدن و آمیلوئیدی شدن پروتئین تاثیر دارند [۷۴].

Bouma و همکارانش توسط میکروسکپ الکترونی (TEM)^۱، فلورسانس و ژل پلی آکریل امید نشان دادند که گلاایکه شدن آلبومین سرم گاوی (BSA) توسط گلوکز -۶- فسفات ۱ مولار در طی ۲۳ هفته منجر به تولید ساختارهای آمیلوئیدی می شود [۷۵]. سازوکار تشکیل آمیلوئید در پروتئین گلاایکه می تواند از طریق در معرض واقع شدن گروه های هیدروفوب و تا خوردن مجدد پروتئین از حالت گلوبولار به حالت فیبری باشد. بنابراین AGE های تولید شده در این مسیر احتمالاً مانند بازکننده ها^۲ عمل می کنند و توالی هایی را کنار هم قرار می دهند که تمایل به تشکیل ساختارهای بتا دارند.

Valenica و همکارانش [۷۶] گزارش نمودند که ریوز در غلظت ۵۰۰ میلی مولار بعد از یک هفته انکوباسیون منجر به بیشترین تغییر در گروه های آمینی در دسترس BSA و افزایش محتوای کربنیلی می شود، اما در همین شرایط گلوکز و فروکتوز تنها نیمی از گروه های آمین در دسترس را تغییر می دهند. ریوز به این علت که دارای بخش بیشتری زنجیر باز فعال است بسیار سریع تر و فعال تر از گلوکز و فروکتوز وارد عمل می شود. البته ادامه واکنش در هفته ششم نشان داد که کربوکسی متیل لیزین (CML) که یکی از ترکیبات AGE غیر فلورسنتی است در نمونه های فروکتوز و گلوکز بیش از ریوز است.

بررسی های ما روی HSA گلاایکه در حضور قندهای مختلف در زمان طولانی (۲۰ هفته) توسط فلورسانس تیوفلاوین T و اطلاعات میکروسکپ الکترونی (TEM) نشانگر تشکیل فیبریل های آمیلوئید (شکل ۴) می باشد [۷۷].

جهت تفسیر تشکیل آمیلوئید در طی گلاایکه شدن HSA، فعالیت سطحی نمونه ها بررسی شد. رفتار تغییر کشش سطحی HSA گلاایکه شده شبیه سورفاکتانت ها می

3 - Critical Micellar Concentration
4 - Critical Aggregation Concentration
5 - Molar area
6- Cibacron blue

1 - Transmission electron microscopy (TEM)
2 - Zipper

واکنش گلاایکه شدن در HSA باعث بازشدگی جزئی پروتئین در جهت انتقال ساختمان هلیکسی به ساختمان β و تشکیل آمیلوئید می شود. ترکیبات AGE مانند دترژنت اثر نموده و باعث ایجاد ساختمان های آمیلوئیدی می شوند.

آلژینات به عنوان یک بازدارنده فرایند گلاایکه شدن معرفی شد که با پوشاندن اسیدآمیننه های لیزین این عمل را اجرا می نماید. آلژینات به عنوان یک کمک حلال و پایدار کننده، از کاهش محتوای هلیکس HSA در حضور فروکتوز جلوگیری می کند.

بررسی آلبومین های سرم افراد دیابتی تأییدی بر نتایج گلاایکه نمودن HSA به صورت آزمایشگاهی می باشد. تنها تفاوت بارز تعداد بیشتر آرژینین های تغییر یافته در HSA افراد دیابتی می باشد.

سپاسگزاری

از پشتیبانی شورای پژوهشی دانشگاه تهران از طرح تحقیقاتی مصوب شماره ۶۴۰۱۰۱/۱/۰۱/۱/۰۱ تشکر و قدردانی می نماید.

گلاایکه آزمایشگاهی تطابق داشت. تنها تعداد آرژینین های تغییر یافته در آلبومین سرم افراد دیابتی نسبت به شرایط آزمایشگاهی بیشتر تغییر یافته است که به موجب آن احتمال حضور AGE حاصل از تغییر آرژینین مانند پنتوزیدین در خون این افراد بیشتر است.

نتیجه گیری کلی

نتایج تحقیق ما نشان داد گلاایکه شدن HSA در حضور غلظت های فیزیولوژیکی گلوکز، بر اساس تغییرات ساختمانی، تولید AGE، تولید محصول آمادوری و مقدار گلوکز پیوند یافته به هر مول HSA در سه مرحله رخ می دهد: ابتدایی (در روزهای ۱۴-۷ انکوبه شدن، قبل از تشکیل انتشار دهنده)، حدواسط (روز ۲۱، جدا شدن گلوکز پیوند یافته به HSA (مقدار منفی r)، عدم تشکیل AGE فلورسانس و تغییر نیافتن ساختمان دوم) و انتهایی (روزهای ۲۸ و ۳۵ انکوبه شدن، تولید AGE بیشتر).

مطالعات ساختمانی، شعاع استوک و میزان اتصال ANS در HSA گلاایکه شده در حضور غلظت ۳۵ میلی مولار گلوکز نشانگر ایجاد حالت مولتن گلبول است.

مآخذ

- Harding JJ, Nonenzymatic post-translational modification of proteins in vivo. *Adv Protein Chem* 1985; 37: 247-334.
- Millard LC, Gautier MA, Seances CR, Maillard browning reaction. *Acad Sci* 1912; 154: 66-68.
- Hatton MWC, Richardson M, Winocour PD, On glucose transport and non-enzymatic glycation of proteins in vivo. *J Theor Biol* 1993; 161: 481-490.
- Taylor ME, Drickamer K, Introduction to Glycobiology, 2nd edition, Oxford university press, 2003.
- Wikipedia, The Free Encyclopedia. <http://en.wikipedia.org/wiki/glycomics>. (access: 23 April 2007).
- Khalifah RG, Baynes JW, Hudson BG, Amadorins: novel post-Amadori inhibitors of advanced glycation reactions. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999; 257: 251-258.
- Bunn HF, Higgins PL, Reaction of monosaccharides with proteins: possible evolutionary significance. *Science* 1981; 213: 222-224.
- Lapolla A, Traldi P, Fedele D, Importance of measuring products of non-enzymatic glycation of proteins. *Clin Biochem* 2005; 38: 103-115.
- Kragh-Hansen U, Molecular aspects of ligands binding to serum albumin, *Pharmacol Reviews* 1981; 33(1): 17-35.
- Brown JR, Serum albumin: amino acid sequence. ed. by Rosenoer VM, Oratz M, Rothchild MA (editors). *Albumin structure, function and uses*, Pergamon Press Oxford; 1977. p. 27-51.
- Brown JR, Structure and evolution of serum albumin. In: albumin structure. Biosynthesis, Function. In: Peters T, Sjolholm I (editors). *11th FEBS Meeting*, Copenhagen; 1977. p. 1-10.
- Carter DC, He XM, Structure of human serum albumin. *Science* 1990; 249: 302-303.
- Peters TJ, Serum albumin. *Adv Protein Chem* 1985; 37: 161-245.
- Meloun B, Moravek L, Brown JR, Complete amino acid sequence of human serum albumin. *FEBS Lett* 1975; 58: 591-598.
- Shaklai N, Garlick RL, Bunn HF, Nonenzymatic glycosylation of human serum albumin alters its conformation and function. *J Biol Chem* 1984; 259(6): 3812-3817.
- Thornally PJ, Advanced glycation and the development of diabetic complications.

- Unifying the involvement of glucose, methylglyoxal and oxidative stress. *Endocrinol Metab* 1996; 3: 149-166.
17. Allen DW, Schroeder WA, Balog J, Observations on the chromatographic heterogeneity of normal adult and fetal human hemoglobin. *J Am Chem Soc* 1958; 80: 1628-1634.
 18. John WG, Glycated haemoglobin analysis. *Ann Clin Biochem* 1997; 34: 17-31.
 19. Schwartz JC, The role of glycohemoglobin and other proteins in diabetes management. *Diabetes Rev* 1995; 3(2): 269-287.
 20. Lapolla A, Fedele D, Senesi A, Arico NC, Reitano R, Favretto D, Seraglia R, Astner H, Traldi P, Advanced glycation end-products/peptides: a preliminary investigation by LC and LC/MS. *IL Farmaco* 2002; 57: 845-852.
 21. Arsie MP, Marchioro L, Lapolla A, Giacchetto GF, Bordin MR, Rizotti P, Fedele D, Evaluation of diagnostic reliability of DCA 2000 for rapid and simple monitoring of HbA1c. *Acta Diabetol* 2000; 37: 1-7.
 22. Lapolla A, Poli T, Barison A, Fedele D, Fructosamine assay: an index of medium term metabolic control parameters in diabetic disease. *Diabetes Res Clin Pract* 1998; 4: 231-235.
 23. Schmitt A, Schmitt J, Münch G, Gasic-Milencovic J, Characterization of advanced glycation end products for biochemical studies: side chain modifications and fluorescence characteristics. *Anal Biochem* 2005; 338: 201-215.
 24. Zoellner H, Hou YH, Hochgrebe T, Poljak A, Duncan MW, Golding J, Henderson T, Lynch G, Fluorometric and Mass Spectrometric Analysis of Nonenzymatic Glycosylated Albumin. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 284: 83-89
 25. Lin CY, Chen CS, Shieh MS, Wu CH, Lee HM, Development of an automated immunoassay for advanced glycosylation end products in human serum. *Clin Biochem* 2005; 35: 189-195.
 26. Ahmed N, Advanced glycation endproducts role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin PR* 2005; 67: 3-21.
 27. Harding JJ, Ganea E, Protection against glycation and similar post-translational modifications of proteins. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1764: 1436-1446.
 28. Sattarahmady N, Khodaghali F, Moosavi-Movahedi AA, Heli H, Hakimelahi G H, Alginate as an antiglycating agent for human serum albumin. *Int J Biol Macromol* 2007; In Press.
 29. George M, Abraham TE, Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan - a review. *J Controlled Release* 2006; 11(4): 1-14.
 30. Remminghorst U, Rehm BHA, Alg44, a unique protein required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett* 2006; 580: 3883-3888.
 31. Chan C., Burrows LL, Deber CM, Helix induction in antimicrobial peptides by alginate in biofilms. *J Biol Chem* 2004; 279 (37): 38749-38754.
 32. Harnsilawat T, Pongsawatmanit R, McClements DJ, Characterization of b-lactoglobulin-sodium alginate interactions in aqueous solutions: a calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study. *Food Hydrocolloids* 2006; 20: 577-585.
 33. Neiser S, Draget KI, Smidsrard O, Gel formation in heat-treated bovine serum albumin-sodium alginate systems. *Food Hydrocolloids* 1998; 12: 127-132.
 34. Kaushik JK, Bhat R, Why is trehalose an exceptional protein stabilizer? *J Biol Chem* 2003; 278(29): 26458-26465.
 35. Xie G, Timasheff SN, The thermodynamic mechanism of protein stabilization by trehalose. *Biophys Chem* 1997; 64: 25-43.
 36. Brodersen R, Andersen S, Vorum H, Nielson SU, Pedersen AO, Multiple fatty-acid binding to albumin in human blood plasma. *Eur J Biochem* 1990; 189: 343- 349.
 37. Emerson TE, Unique features of albumin-a brief review. *CRC Crit Care Med* 1989; 17: 690-694.
 38. Andersson LO, The heterogeneity of bovine serum albumin. *Biochim Biophys Acta* 1966; 117: 115-123.
 39. King TP, On the sulfhydryl group of human plasma albumin. *J Biol Chem* 1961; 236: PC 5.
 40. Guthrow CE, Morris MA, Day JF, Thorpe SR, Baynes JW, Enhanced nonenzymatic glycosylation of human serum albumin in diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76 (9): 4258-4261.
 41. Moosavi-Movahedi Z, Safarian S, Zahedi M, Sadeghi M, Saboury AA, Chamani J, Bahrami H, Ashraf-Modarres A, Moosavi-Movahedi AA, Calorimetric and binding dissections of HSA upon interaction with bilirubin. *Protein J* 2006; 25(3): 193-201.
 42. Moosavi-Movahedi Z, Bahrami H, Zahedi M, Mahnam K, Chamani J, Safarian S, Saboury AA, Moosavi-Movahedi AA, A theoretical elucidation of bilirubin interaction with HSA's lysines: First electrostatic binding site in IIA subdomain. *Biophys Chem* 2007; 125: 375-387.
 43. Garlick RL and Mazer JS, The principal site of nonenzymatic glycosylation of human serum albumin in vitro. *J Biol Chem* 1983; 258(10): 6142-6146.
 44. Iberg N, Fluckiger R, Nonenzymatic glycosylation of albumin in vitro (Identification of multiple glycosylated sites). *J Biol Chem* 1986; 261: 13542-13545.
 45. Dolhofer R, Wieland OH, In vitro glycosylation of hemoglobins by different sugars and sugar phosphates. *FEBS Lett* 1978; 85: 86-90.
 46. Haney, DN, Bunn HF, Glycosylation of hemoglobins in vitro: affinity labeling of

- hemoglobin by glucose-6-phosphate. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; 73: 3534-3538.
47. Makita Z, Vlassara H, Rayfield E, Cartwright K, Friedman E, Rodby R, Cerami A, Bucala R, Hemoglobin-AGE: a circulating marker of advanced glycosylation. *Science* 1992; 258: 651- 653.
 48. Shapiro R, Mc Manus MJ, Zalut G, Bunn HF, Sites of non enzymatic glycosylation of human hemoglobin A. *J Biol Chem* 1980; 255: 3120-3127.
 49. Bakhti M, Habibi-Rezaei M, Moosavi-Movahedi AA, Khazaei MR, Consequential alterations in hemoglobin structure upon glycation with fructose: prevention by acetylsalicylic acid. *J Biochem* 2007; In Press.
 50. Coussons PJ, Jacoby J, McKay A, Kelly SM, Price NC, Hunt JV, Glucose modification of human serum albumin: a structural study. *Free Radical Biol Med* 1997; 22: 1217-1228.
 51. 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. *Int J Biochem Cell Biol* 2002; 34: 1115-1124.
 52. Mohamadi-Nejad A, Moosavi-Movahedi AA, Safarian S, Naderi-Manesh MH, Ranjbar B, Farzami B, Mostafavi H, Larijani MB, Hakimelahi GH, The thermal analysis of nonenzymatic glycosylation of human serum albumin: differential scanning calorimetry and circular dichroism studies. *Thermochim Acta* 2002; 389: 141-151.
 53. Mendez DM, Jensen RA, McElroy LA, Pena JM, Esquerria RM, The effect of non-enzymatic glycation on the unfolding of human serum albumin. *Arch Biochem Biophys* 2005; 444: 92-99.
 54. Barzegar A, Moosavi-Movahedi AA, Sattarahmady N, Hosseinpour-Faizi MA, Aminbakhsh M, Ahmad F, Saboury AA, Ganjali MR, Norouzi P, Spectroscopic studies of the effects of glycation of human serum albumin on L-Trp binding. *Protein Pept Lett* 2007; 14: 13-18.
 55. Dutta U, Cohenford MA, Dain JA, Monitoring the effect of glucosamine and glyceraldehyde glycation on the secondary structure of human serum albumin and immunoglobulin G: an analysis based on circular dichroism, thermal melting profiles and UV-fluorescence spectroscopy. *Anal Chim Acta* 2005; 558: 187-194.
 56. 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. *Biochim Biophys Acta* 2007; In Press.
 57. Christensen H, Pain RH, Molten globule intermediates and protein folding. *Eur Biophys J* 1991; 19: 221-229.
 58. Timasheff SN, Protein-solvent preferential interactions, protein hydration, and the modulation of biochemical reactions by solvent components. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(15): 9721-9726.
 59. Ptitsyn OB, The molten globule state in protein folding. In: Creighton TE (editors). W.H. Freeman and Company, New York. 1992. p 243-300.
 60. Ghobadi S, Safarian S, Moosavi-Movahedi AA, Ranjbar B, Octyl glucoside induced formation of the molten globule-like state of glutamate dehydrogenase. *J Biochem* 2001; 130: 671-677.
 61. Moosavi-Movahedi AA, Chamani J, Goto Y, Hakimelahi GH, Formation of the molten globule-like state of cytochrome c induced by n-alkyl sulfates at low concentrations. *J Biochem* 2003; 133: 93-102.
 62. Moosavi-Movahedi AA, Chamani J, Ghourchian H, Shafiey H, Sorenson CM, Sheibani N, Electrochemical evidence for the molten globule states of cytochrome c induced by N-alkyl sulfates at low concentrations. *J Protein Chem* 2003; 22(1): 23-30.
 63. Moosavi-Movahedi AA, Chamani J, Gharanfoli M, Hakimelahi GH, Differential scanning calorimetric study of the molten globule state of cytochrome c induced by sodium n-dodecyl sulfate. *Thermochim Acta* 2004; 409: 137-144.
 64. Chamani J, Moosavi-Movahedi AA, Saboury AA, Gharanfoli M, Hakimelahi GH, Calorimetric indication of the molten globule-like state of cytochrome c induced by n-alkyl sulfates at low concentrations. *J Chem Thermodynamics* 2003; 35: 199-207.
 65. Moza B, Qureshi SH, Islam A, Singh R, Anjum F, Moosavi-Movahedi AA, Ahmad F, A unique molten globule state occurs during unfolding of cytochrome c by LiClO₄ near physiological pH and temperature: structural and thermodynamic characterization. *Biochemistry* 2006; 45(14): 4695-702.
 66. Kamiyama T, Sadahide Y, Nogusa Y, Gekko K, Polyol-induced molten globule of cytochrome c: an evidence for stabilization by hydrophobic interaction. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1434: 44-57.
 67. Davis-Searles PR, Morar AS, Saunders AJ, Erie DA, Pielak GJ, Sugar induced molten globule model. *Biochemistry* 1998; 37: 17048-17053.
 68. Bourdon E, Loreau N, Blache D, Glucose and free radicals impair the antioxidant properties of serum albumin. *FASEB J* 1999; 13: 233-244.
 69. Nakajou K, Watanabe H, Kragh-Hansen U, Maruyama T, Otagiri M, The effect of glycation on the structure, function and biological fate of human serum albumin as revealed by recombinant mutants. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1623: 88-97.
 70. Schmitt A, Gasic-Milenkovic J, Schmitt J, Characterization of advanced glycation end products: mass changes in correlation to side chain modifications. *Anal Biochem* 2005; 346: 101-106

71. Welland ME, Insights into amyloid diseases, what insight can nanoscience provide into amyloid diseases such as Alzheimer's, which are caused by nanowires of protein deposits? *Nanotoday* 2007; 2 (2): 58.
72. Pellarin R, Caflich A, Interpreting the aggregation kinetics of amyloid peptides. *J Mol Biol* 2006; In press.
73. Sunde M, Blake C, The structure of amyloid fibrils by electron microscopy and X-ray diffraction. *Adv Protein Chem* 1997; 50: 123–159.
74. Hashemnia S, Moosavi-Movahedi AA, Ghourchian H, Ahmad F, Hakimelahi GH, Saboury AA, Diminishing of aggregation for bovine liver catalase through acidic residues modification. *Int J Bioll Macromol* 2006; 40: 47–53.
75. Bouma B, Kroon-Batenburg LMJ, Wu YP, Brunjes B, Posthuma G, Kranenburg O, de Groot PG, Voest EE, Gebbink MFBG, Glycation induces formation of amyloid cross- β structure in albumin. *J Biol Chem* 2003; 278: 41810–41819.
76. Valencia JV, Weldon SC, Quinn D, Kirs GH, Degroot J, Tekoppele JM, Hughes T E, Advanced glycation end product ligands for the receptor for advanced glycation end products: biochemical characterization and formation kinetics. *Anal Biochem* 2004; 324: 68-78.
77. Sattarhmady N, Moosavi-Movahedi AA, Habibi-Rezaei M, Ahmadian S, Sheibani N, Detergency effect of amyloid formation on glycation of human serum albumin. *Arch Biochem Biophys* 2007; Submitted.
78. Kaushik JK, Bhat R, Thermal Stability of Proteins in Aqueous Polyol Solutions: Role of the Surface Tension of Water in the Stabilizing Effect of Polyols. *J Phys Chem B* 1998; 102: 7058-7066.
79. Peyrin E, Guillaume YC, Morin N, Guinchart C, Sucrose dependence of solute retention on human serum albumin stationary phase: hydrophobic effect and surface tension considerations. *Anal Chem* 1998; 70: 2812-2818.
80. Guzeya D, McClements DJ, Weissa J, Adsorption kinetics of BSA at air-sugar solution interfaces as affected by sugar type and concentration. *Food Res Int* 2003; 36: 649–660.
81. Berthold A, Schubert H, Brandes N, Kroh L, Miller R, Behaviour of BSA and of BSA-derivatives at the air/water interface. *Colloid Surf A-Physicochem Eng Asp* 2007; doi:10.1016/j.colsurfa.2006.11.054.
82. Moosavi-Movahedi AA, Thermodynamics of protein denaturation by sodium dodecyl sulfate. *J Iran Chem Soc* 2005; 2 (3): 189-196.
83. Moosavi-Movahedi AA, *Encyclopedia of Surface and Colloid Science*. New York. Marcel Dekker Inc; 2002. p 5344-5354.
84. Messina P, Prieto G, Doderio V, Cabrerizo-Vilchez MA, Maldonado-Valderrama J, Ruso JM, Sarmiento F, Surface characterization of human serum albumin and sodium perfluorooctanoate mixed solutions by pendant drop tensiometry and circular dichroism. *Biopolymers* 2006; 82(3): 261-271.
85. Fainerman VB, Lucassen-Reynders EH, Miller R, Adsorption of surfactants and proteins at fluid interfaces. *Colloid Surf A-Physicochem Eng Asp* 1998; 143: 141–165.
86. Ledden DJ, Feldhoff RC, Chan SK, Characterization of fragments of human albumin purified by Cibacron Blue F3GA affinity chromatography. *Biochem J* 1982; 205: 331-337.
87. Altintas EB, Denizli A, Efficient removal of albumin from human serum by monosize dye-affinity beads. *J Chromatogr B* 2006; 832: 216–223.
88. Leatherbarrow RJ, Dean PDG, Studies on the mechanism of binding of serum albumins to immobilized cibacron blue F3G A. *Biochem J* 1980; 189: 27-34.
89. Angal S, Dean PDG, The Effect of Matrix on the binding of albumin to immobilized cibacron blue. *Biochem J* 1977; 167: 301-303.