مقاله پژوهشی
مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال 15، شماره 8 (شماره پیاپی 67)، دی 1391، 8-1

اثر طولانی مدت استرس اکسیداتیو، بر ساختار فاکتور 8 انعقادی نوترکیب

هادی انصاری هادی پور[1*]، علی بهادری وطن خواه[2]، سعید زیرکی[2]، محمد صیادی[2]

1- استادیار، گروه بیوشیمی، تغذیه و ژنتیک و مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
2- دانشجوی کارشناسی علوم آزمایشگاهی، کمیته تحقیقات دانشجوئی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

تاریخ دریافت: 90/11/10 تاریخ پذیرش: 91/3/24

چکیده

زمینه و هدف: حضور عوامل اکسیدان، مقادیر زیادی از محصولات واکنش‌های رادیکال آزاد را در غشای گلبول‌های قرمز و پروتئین‌های سرم ایجاد می‌نماید. هدف ازمطالعه حاضر بررسی تغییرات اکسیداتیو در فاکتور 8 انعقادی انسان با روش آنالیز اسپکتروفتومتریک می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی،فاکتور 8 انعقادی نوترکیب انسانی در شرایط هوازی به مدت 4 تا 28 ساعت در سیستم اکسیداسیون فلزی، حاوی ویتامین ث و یون‌های فرو قرار داده شد. سنجش گروه‌های کربنیل به عنوان یک شاخص برای میزان اکسیداسیون پروتئین‌ها انجام شد. بدین منظور از معرف دی نیترو فنیل هیدرازین استفاده شد. واکنش این معرف با گروه‌های کربنیل، موجب تشکیل مشتقات دی نیتروفنیل هیدرازون می‌شود. غلظت این مشتقات با روش اسپکتروفتومتری تعیین گردید.

یافته‌ها: در حضور ویتامین ث و یون‌های فرو، میزان گروه‌های کربنیل در rHFVIII تغییر یافته بود. بررسی اثرات وابسته به دوز ویتامین ث نشان داد که با افزایش غلظت، میزان اکسیداسیون فاکتور 8 انعقادی نوترکیب انسانی کاهش می‌یابد، در حالیکه یون فرو موجب افزایش اکسیداسیون و تشکیل گروه‌های کربنیل در این پروتئین می‌شود.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل نشان می‌دهد که افزایش گروه‌های کربنیل در فاکتور 8 انعقادی نوترکیب انسانی، در ارتباط با تولید گونه‌های اکسیژن فعال است. هم‌چنین مکانیسم‌های آنتی اکسیدان به صورت وابسته به دوز و وابسته به زمان فعال می‌شوند.

واژگان کلیدی: گروه کربنیل، استرس اکسیداتیو، فاکتور 8 انعقادی نوترکیب انسان

***نویسنده مسئول:** اراک، میدان بسیج، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی، تغذیه و ژنتیک و مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی
Email: ansari@arakmu.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

در ایران هفت هزار نفر مبتلا به هموفیلی وجود دارد و سالانه 39 میلیون دلار برای کنترل این بیماری هزینه می‌شود(1). هموفیلی یک بیماری وابسته به کروموزوم جنسی X و مغلوب می‌باشد و معمولاً در افراد مذکر دیده می‌شود(2). در این بیماری طولانی شدن زمان انعقاد، موجب خونریزی‌های داخلی و التهاب به ویژه در مفاصل می‌شود که همراه با مشکلات حرکتی است. 85 درصد موارد هموفیلی از نوع A می‌باشد که به دلیل جهش در ژن F8C ایجاد می‌شود و منجر به کمبود فاکتور انعقادی 8 یا اختلال در عملکرد آن می‌گردد. بهترین روش برای کنترل هموفیلی A، تزریق فاکتور 8 است. در حال حاضر تقاضای جهانی برای فاکتور انعقادی 8 معادل پنج میلیارد واحد در سال است(3). از دهه 70، فاکتور 8 مشتق از پلاسما تهیه شده و مورد استفاده قرار گرفته است که خطر انتقال بیماری‌ها را به همراه دارد. به همین دلیل از سال 1992، فاکتور 8 نوترکیب (Recombinant factor VIII- rFVIII) از رده‌های سلولی پستانداران تهیه شد. فاکتور 8 نوترکیب و فاکتور 8 مشتق از پلاسما از نظر ساختار بیوشیمیایی، فعالیت انعقادی، پارامترهای فارماکوسینتیک و نیمه عمر، شباهت‌های قابل توجهی با یکدیگر دارند(3). البته فاکتور 8 نوترکیب گران بوده و هزینه زیادی را به دولت‌ها و بیماران تحمیل می‌کند. در ایران قیمت هر واحد فاکتور 8 مشتق از پلاسما، در حدود 0/3 دلار ولی قیمت هر میلی‌گرم فاکتور 8 نوترکیب حدود 680 دلار است(1). علاوه بر هزینه زیاد، استفاده از rFVIII مشکلاتی نظیر ایمنوژنیسیتی، ایجاد آنتی بادی اتصالی و آنتی بادی خنثی کننده یا مهاری (anti-FVIII inhibitory antibody) را به همراه دارد(4) و بدین ترتیب با مطرح شدن فرآیند مهارکنندگی، روند کنترل بیماری پیچیده‌تر شده است(5). فاکتور انعقادی 8 به صورت یک پروتئین با 2332 اسید آمینه و وزن مولکولی 300 کیلودالتون ساخته می‌شود(6) و دارای 25 جایگاه N گلیکوزیلاسیون است. اتصال این مولکول به سطح پلاکت‌های حاوی فسفاتیدیل سرین برای عملکرد آن ضروری است(7). فاکتور 8 دارای شش بخش اصلی (Domain) با ترتیب A1-A2-B-A3-C1-C2 است(6). بخش‌های A، همولوگ با فاکتور 5 و سرولوپلاسمین، بخش‌های B دارای زنجیره‌های کربوهیدراتی متصل به آسپارژین، بخش C1 دارای 153 اسید آمینه و بخش C2 دارای 160 اسید آمینه است(8). فاکتور 8 به صورت هترودیمر ترشح می‌شود و زیر واحدها توسط کاتیون‌های دوظرفیتی به هم متصل می‌شوند(6). یون‌های کلسیم و منگنز برای فعالیت فاکتور 8 ضروری هستند(9). مطالعات نشان داده است که بخش A1، دو جایگاه اتصال برای کلسیم دارد و منگنز نیز به طور ضعیفی به این جایگاه‌ها متصل می‌شود(8، 10). هم‌چنین اثرات یون مس بر میزان اتصال زیر واحدهای فاکتور 8 و تشکیل کنفورماسیون فضائی فعال(11) و اثرات کاتیون‌های آلومینیوم، تربیوم، کبالت و فریک بر rFVIII مورد بررسی قرار گرفته و نشان داده شده است که یون آلومینیوم، بیشترین اثرات را بر تغییر کنفورماسیون فاکتور 8 و غیر فعال شدن آن دارد(12). مسمومیت با جیوه نیز موجب اختلال در عملکرد فاکتور 8 می‌شود(13). از طرف دیگر نقش ترکیبات احیا کننده نظیر بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول، اسید آسکوربیک و ان استیل سیستئین در حفظ ساختار طبیعی فاکتور 8 مورد مطالعه قرار گرفته است(4). بر این اساس به نظر می‌رسد که استرس اکسیداتیو اثرات مهمی بر ساختار فاکتور 8 داشته باشد. مطالعات قبلی ما اثرات کاتیون‌های دوظرفیتی اکسیدکننده نظیر آهن و مس را بر ساختار هموگلوبین(14، 15) و پروتئین‌های پلاسمایی(16) نشان داده است. در این تحقیق اثرات یون‌های آهن و آسکوربات بر ساختار فاکتور 8 مورد بررسی قرار گرفته است. بدین منظور یک سیستم اکسیداسیون حاوی یون‌های فلزی (Metal catalyzed oxidation system) تهیه و فاکتور انعقادی 8 نوترکیب انسان (Recmbinant human cuagulation factor VIII-rHFVIII) تحت استرس اکسیداتیو قرار گرفت. سپس در فواصل زمانی 4 تا 28 ساعت میزان تغییر در گروه‌های کربنیل بررسی شد.

Archive of SID

www.SID.ir

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی کلیه مواد مورد استفاده با درجه خلوص آنالیتیک از شرکت مرک آلمان خریداری گردید و برای آنالیز طیفی از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Biochrom WPA Biowave II UV/Visible، ساخت انگلستان استفاده شد. هم‌چنین این مطالعه در شرایط آزمایشگاهی و در غلظت‌های متفاوت آسکوربات و آهن انجام شد و در کلیه موارد از نمونه‌های شاهد (بدون حضور آسکوربات و آهن) استفاده گردید. بدین منظور 10 میکرولیتر از نمونه‌های پروتئین در شرایط هوازی در محیط کشت حاوی سیستم اکسیداسیون فلزی حاوی غلظت‌های مختلف آسکوربات قرار داده شد. در نمونه‌های شاهد نیز، آسکوربات از محیط کشت حذف شد. در فواصل زمانی 4 تا 28 ساعت، با افزودن محلول 20 درصد تری کلرو استیک اسید، فرآیند استرس اکسیداتیو متوقف گردید و سپس با روش سانتریفوژ، پروتئین‌ها جداسازی شد. به منظور پرهیز از خطاهای احتمالی، بلافاصله پس از توقف استرس اکسیداتیو، سنجش گروه‌های کربنیل انجام گردید. بدین منظور از معرف 2 و 4 دی نیتروفنیل هیدرازین (2,4 – dinitrophenylhydrazine-DNPH) استفاده شد که پس از واکنش با گروه‌های کربنیل موجب تشکیل مشتقات دی نیتروفنیل هیدرازون (dinitrophenylhydrazone derivatives) می‌شود. حداکثر جذب نوری این مشتقات در طول موج 380 نانومتر بوده که با روش اسپکتروفتومتری قابل بررسی می‌باشد.

پس از اندازه‌گیری جذب نوری محلول نهایی و شاهد مربوطه (فقط حاوی اسید کلریدریک 2 مولار و پروتئین مورد مطالعه) طبق روابط زیر غلظت گروه‌های کربنیل بر حسب نانومول در هر میلی‌گرم از پروتئین نمونه به دست آمد:

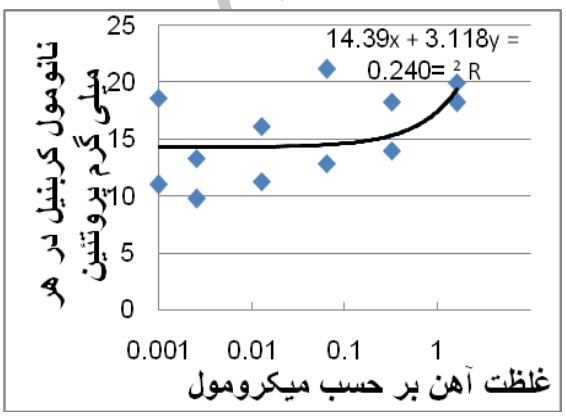
$$\text{Carbonyl concentration (nml/ml)} = \Delta A(355-390\,\text{nm}) \times 45.45$$

Carbonyl concentration (nmol/mg of protein)= nmol of carbonyl/protein concentration in mg/ml

برای اندازه‌گیری غلظت پروتئین، جذب نوری محلول‌ها در طول موج 280 نانومتر اندازه‌گیری شد سپس با استفاده از نمودار استاندارد، غلظت HFVIII در نمونه‌های مورد بررسی محاسبه گردید. جهت تجزیه و تحلیل آماری از شاخص‌های میانگین و انحراف معیار و آنالیز رگرسیون استفاده شد. این تحقیق با موافقت کمیته اخلاق در پژوهش‌های پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اراک و با کد 9-73-88 اجرا و در تمام مراحل تحقیق، اصول بیانیه هلسینکی مورد توجه قرار گرفت.

یافته‌ها

نمودارهای 1 و2 اثرات غلظت‌های مختلف آهن را بر میزان کربنیل در HFVIII نشان می‌دهد. نتایج به دست آمده نشان دهنده وجود یک رابطه خطی بین غلظت آهن و میزان کربنیل است. نمودار 1 نشان می‌دهد که متناسب با افزایش غلظت آهن (از صفر تا 1/6 میکرومولار)، مقدار گروه‌های کربنیل در HFVIII افزایش می‌یابد، به طوری که از 14/9±5/4 نانومول در هر میلی‌گرم پروتئین در نمونه‌های شاهد به 19/1±1/2 نانومول در هر میلی‌گرم از HFVIII در غلظت 1/6 میکرومولار از یون‌های آهن می‌رسد که از نظر آماری معنی‌دار است($p<0/05$). در این شرایط رابطه بین غلظت آهن با گروه‌های کربنیل از معادله $y=3/118x+14.39$ با $R^2=0/24$ تبعیت می‌کند.

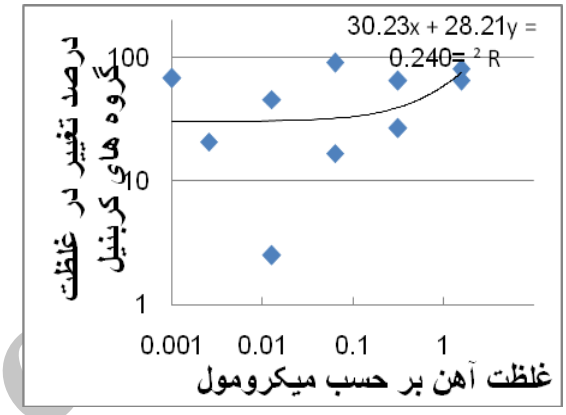


نمودار1. غلظت گروه‌های کربنیل در HFVIII، پس از انکوباسیون در غلظت‌های صفر تا 1/6 میکرو مولار آهن

Archive of SID

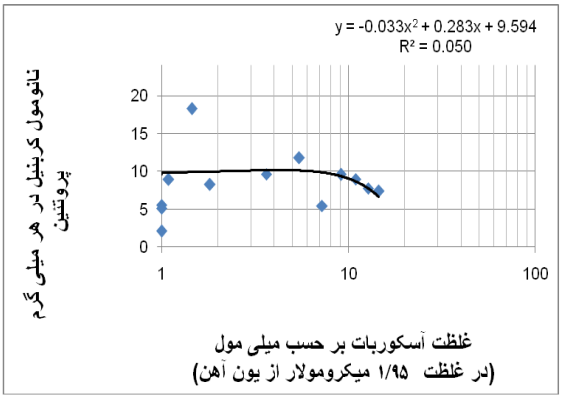
www.SID.ir

به منظور بررسی دقیق‌تر این نتایج، لازم بود که درصد تغییر در گروه‌های کربنیل نیز محاسبه گردد. همان طور که در نمودار 2 مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت آهن تا 1/6 میکرومول در لیتر، مقدار گروه‌های کربنیل در HFVIII تا میزان 73/15 درصد افزایش می‌یابد که از نظر آماری معنی‌دار است($p<0/05$) و به صورت معادله $y = 28/21x+30/23$ با $R^2=0/24$ است.



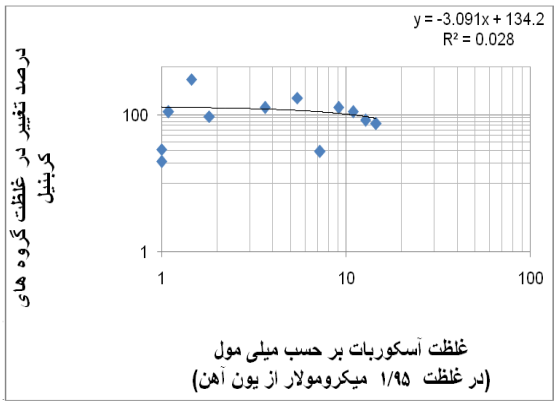
نمودار 2. درصد تغییر در گروه‌های کربنیل HFVIII، پس از انکوباسیون با غلظت‌های صفر تا 1/6 میکرومولار آهن

در ادامه این تحقیق، برای بررسی اثرات آسکوربات، HFVIII در معرض غلظت 7/8 میکرومولار آهن و مقادیر متفاوتی از آسکوربات قرار داده شد. با توجه به نمودار 3 مشخص می‌شود که با افزایش غلظت آسکوربات، میزان گروه‌های کربنیل در HFVIII از 4/23 به 18/25 نانومول در هر میلی‌گرم پروتئین افزایش و سپس به 7/37 نانومول در هر میلی‌گرم از HFVIII کاهش می‌یابد که این تغییرات از رابطه $y =-0/033 x^2+0/283x+9/594$ با $R^2=0/050$ تبعیت می‌کند و نشان‌دهنده اثرات اکسیداتیو آسکوربات تا غلظت 1/45 و سپس کاهش اثرات اکسیداتیو تا غلظت 14/54 میلی‌مولار است.



نمودار3. غلظت گروه‌های کربنیل در HFVIII، پس از انکوباسیون در غلظت‌های صفر تا 14/54 میلی مولار آسکوربات و حاوی 1.95 میکرومول یون آهن

به منظور تکمیل این نتایج، غلظت آهن به میزان 4 برابر افزایش داده شد و به 7/8 میکرومول در لیتر رسانده شد. نمودار 4 نیز نشان می‌دهد که میزان تغییر در گروه‌های کربنیل در HFVIII، معادل 332 درصد افزایش و سپس 74 درصد کاهش است. این تغییرات از معادله $y=-3/091x+134/2$ با $R^2 =0/028$ تبعیت می‌کند و از نظر آماری معنی‌دار است($p<0/05$).

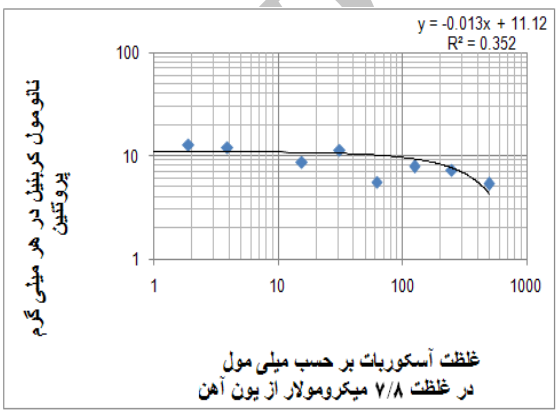


نمودار4. درصد تغییر در گروه‌های کربنیل، پس از انکوباسیون HFVIII در محلول حاوی 1/95 میکرومول آهن و غلظت‌های صفر تا 14/54 میلی مولار آسکوربات

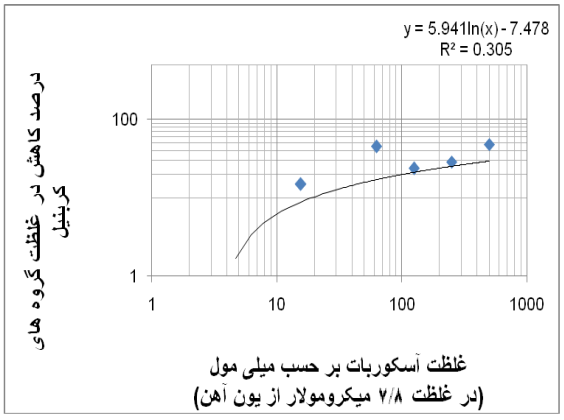
در این شرایط HFVIII در معرض غلظت‌های 0/05 تا 500 میلی‌مولار آسکوربات قرار داده شد. نمودار 5 نشان می‌دهد که با افزایش غلظت آسکوربات، میزان گروه‌های کربنیل در HFVIII از 8/97 نانومول در هر

www.SID.ir

میلی‌گرم پروتئین به 5/32 کاهش می‌یابد که این تغییرات از معادله $y=-0/013x+11/12$ با $R^2=0/352$ تبعیت می‌کند و نشان‌دهنده اثرات آنتی اکسیدان آسکوربات در غلظت‌های بالاتر آهن است. همان طور که نمودار 6 نشان می‌دهد، در این شرایط میزان گروه‌های کربنیل در HFVIII به میزان 48/2 درصد کاهش یافته است به طوری که از معادله $y=5/941\ln(x)-7/478$ با $R^2=0/305$ تبعیت می‌کند و از نظر آماری معنی‌دار است($p<0/05$).



نمودار5. غلظت گروه‌های کربنیل در HFVIII، پس از انکوباسیون در غلظت‌های صفر تا 500 میلی مولار آسکوربات و 7/8 میکرومول آهن



نمودار6. درصد تغییر در گروه‌های کربنیل، پس از انکوباسیون HFVIII در محلول حاوی 7/8 میکرومول آهن و غلظت‌های 0/05 تا 500 میلی‌مولار آسکوربات

بحث

در مطالعه حاضر، تغییرات ساختاری فاکتور 8 انعقادی نوترکیب انسان، در حضور غلظت‌های مختلف آسکوربات و آهن مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نمودارهای 3 و 5 مشخص می‌شود که آسکوربات دارای نقش محافظتی آنتی اکسیدان بر فاکتور 8 انعقادی نوترکیب انسان است، به طوری که اگر غلظت آسکوربات در محیط کشت از 100 میلی‌مولار بیشتر شود، کاهش قابل ملاحظه‌ای در مقدار گروه‌های کربنیل فاکتور 8 مشاهده می‌گردد و بیشترین اثرات حفاظتی آسکوربات در غلظت 500 میلی‌مولار حاصل می‌شود.

با توجه به این که ایجاد غلظت‌های 500 میلی‌مولار آسکوربات از نظر فارماکولوژیک مشکل به نظر می‌رسد و علاوه بر آسکوربات عوامل آنتی اکسیدان دیگری نیز وجود دارند که سدهای دفاعی متعددی را هم در سلول‌ها و هم در پلاسمای خون ایجاد کرده‌اند، پیشنهاد می‌شود که علاوه بر آسکوربات پارامترهای بیوشیمیایی دیگری نظیر گلوتاتیون، کاتالاز، پراکسیداز و NADPH نیز در تحقیقات بعدی مورد توجه قرار گیرد.

بخش دیگری از این تحقیق به بررسی اثرات اکسیداتیو یون آهن اختصاص یافته است. آهن از طریق فرآیندهای هابر–ویز و فنتون، قادر به تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن است که باعث اکسیداسیون بیومولکول‌ها و آسیب اکسیداتیو به بافت‌های بدن می‌شود. تحقیقات قبلی ما اثرات اکسیدان و پرواکسیدان آسکوربات را بر آلبومین سرم نشان داده است(17). آسکوربات در غلظت‌های کم، فلزات واسطه را احیاء کرده موجب تشکیل رادیکال آزاد می‌شود. در حالی که در غلظت‌های بالا قادر به جمع‌آوری رادیکال‌های هیدروکسیل و آنیون سوپر اکسید است(18). هم‌چنین آسکوربات در حضور فلزات واسطه نظیر مس و آهن، به عنوان پرواکسیدان عمل می‌کند و موجب تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) یا پروتئین‌های گلیکاته می‌شود(19). تجمع داخل سلولی اسید آسکوربیک، احتمالاً موجب مهار آپوپتوز ناشی از استرس اکسیداتیو می‌شود(20). هم‌چنین تحقیقات قبلی ما نشان داده است که آهن دارای اثرات اکسیداتیو بر هموگلوبین انسان است. استرس اکسیداتیو در گلبول‌های قرمز منجر به تغییر کنفورماسیون در هموگلوبین و کاهش میل ترکیبی آن با اکسیژن و هم‌چنین

Archive
www.SID.ir

تشکیل متهموگلوبین می‌شود(14). بر اساس نتایج این تحقیق، سنجش کربنیل در فاکتور 8 نشان می‌دهد که افزایش غلظت یون آهن، موجب تسریع در اکسیداسیون این پروتئین می‌گردد که در نهایت ممکن است باعث اختلال در عملکرد انعقادی آن شود.

در این تحقیق بررسی مکانیسم‌های مولکولی استرس اکسیداتیو توسط آهن و مطالعه نحوه تغییرات ساختاری در فاکتور 8 در شرایط آزمایشگاهی بوده است که به طور عمده سنجش گروه‌های کربنیل مورد توجه قرار گرفته است. ولی پیشنهاد می‌شود که برای بررسی اثرات فارماکولوژیک و نحوه تجویز دارو، پارامترهای استرس اکسیداتیو دیگری نظیر دی تیروزین، گروه‌های تیول و یا شکسته شدن رشته‌های پلی پپتیدی نیز بررسی شوند.

نتیجه گیری

وجود دوزهای بالای آهن در جریان خون، زمینه تشکیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن را فراهم می‌کند. در این شرایط فاکتور 8 انعقادی در معرض استرس اکسیداتیو قرار می‌گیرد. ادامه این فرآیند موجب اختلال در مکانیسم‌های انعقادی و در نهایت طولانی شدن زمان انعقاد خون می‌شود که زمینه خونریزی‌های داخلی را فراهم می‌کند. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که آنالیز طیفی و سنجش کربنیل در فاکتور 8 انعقادی انسان، روش دقیق و مناسبی برای پی‌گیری وضعیت سلامتی در مبتلایان به هموفیلی و افراد تحت درمان با فاکتور 8 انعقادی نوترکیب انسان است.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک و کمیته تحقیقات دانشجویی، با شماره 425 به ثبت رسیده و در کمیته اخلاق در پژوهش‌های پزشکی، با کد 9-73-88 مورد موافقت قرار گرفته و در گروه بیوشیمی و مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی به انجام رسیده است. بدینوسیله از مساعدت مسئولین محترم قدردانی می‌شود. هم‌چنین از کانون هموفیلی ایران و جناب آقای علی نیکدل برای در اختیار قراردادن فاکتور 8 انعقادی نوترکیب انسان، نهایت تشکر و قدردانی به عمل می آید.

منابع

1. Rasekh HR, Imani A, Karimi M, Golestani M. Cost-utility analysis of immune tolerance induction therapy versus on-demand treatment with recombinant factor VII for hemophilia A with high titer inhibitors in Iran. ClinicoEconomics and Outcomes Research: CEOR. 2011;3: 207-12.
2. Murray K, Rodwell V, Bender D, Botham KM, Weil PA, Kennelly PJ. Harper's Illustrated Biochemistry. 28: New York: McGraw-Hill; 2009.p.588.
3. Peng A, Gaitonde P, Kosloski MP, Miclea RD, Varma P, Balu-Iyer SV. Effect of route of administration of human recombinant factor VIII on its immunogenicity in Hemophilia A mice. Journal of pharmaceutical sciences. 2009; 98(12):4480-4.
4. Krudysz-Amblo J, Parhami-Seren B, Butenas S, Brummel-Ziedins KE, Gomperts ED, Rivard GE, et al. Quantitation of anti–factor VIII antibodies in human plasma. Blood. 2009; 113(11):2587-94.
5. Kosloski MP, Peng A, Varma PR, Fathallah AM, Miclea RD, Mager DE, et al. Immunogenicity and pharmacokinetic studies of recombinant Factor VIII containing lipid cochleates. Drug delivery. 2011;18(4):246-54.
6. Thompson AR, editor. Structure and function of the factor VIII gene and protein. Seminars in thrombosis and hemostasis; 2003; 29(1):11-22.
7. Kosloski MP, Miclea RD, Balu-Iyer SV. Role of glycosylation in conformational stability, activity, macromolecular interaction and immunogenicity of recombinant human factor VIII. The AAPS journal. 2009;11(3):424-31.
8. Fang H, Wang L, Wang H. The protein structure and effect of factor VIII. Thrombosis research. 2007;119(1):1-13.
9. Wakabayashi H, Zhen Z, Schmidt KM, Fay PJ. Mn2+ binding to factor VIII subunits and its effect on cofactor activity. Biochemistry. 2003; 42(1):145-53.

Archive of SID

www.SID.ir

10. Takeyama M, Nogami K, Okuda M, Sakurai Y, Matsumoto T, Tanaka I, et al. Selective factor VIII and V inactivation by iminodiacetate ion exchange resin through metal ion adsorption. British journal of haematology. 2008; 142(6):962-70.
11. Wakabayashi H, Koszelak ME, Mastri M, Fay PJ. Metal ion-independent association of factor VIII subunits and the roles of calcium and copper ions for cofactor activity and inter-subunit affinity. Biochemistry. 2001; 40(34): 10293-300.
12. Derrick TS, Kashi RS, Durrani M, Jhingan A, Middaugh CR. Effect of metal cations on the conformation and inactivation of recombinant human factor VIII. Journal of pharmaceutical sciences. 2004;93(10):2549-57.
13. Wierzbicki R, Prażanowski M, Michalska M, Krajewska U, Mielicki WP. Disorders in blood coagulation in humans occupationally exposed to mercuric vapors. The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine. 2002; 15(1):21-9.
14. Ansarihadipour H, Rostami S, Alhoseini M, Hashemi M, Azimi M, Mohammadi M, Ziafatikafi H. Spectrophotometric study on the iron-mediated oxidation and structural changes in human hemoglobin molecules. Iranaian Journal of Pediatric Hematology. 2010; 1(1): 36-36.
15. Ansarihadipour H, Foolad S. Spectral analysis and structural assessment of human hemoglobin during copper-mediated oxidative stress. Clinical Biochemistry. 2011; 44(13): S322-S3.
16. Ansarihadipour H, Folad S. Acute copper exposure induces oxidative stress and carbonyl modification in human plasma proteins. International Congress on Applied Biology. Mashhad, Iran. 2011.
17. Ansarihadipour H, Rostami S, Alhoseini M. Antioxidant and prooxidant effects of ascorbate during iron induced carbonyl formation in serum albumin. AMUJ. 2012.
18. Halliwell B, Gutteridge J. The antioxidants of human extracellular fluids. Archives of Biochemistry and Biophysics. 1990;280(1):1-8.
19. Duarte TL, Lunec J. Review: When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. Free radical research. 2005; 39(7):671-86.
20. Witenberg B, Kalir HH, Raviv Z, Kletter Y, Kravtsov V, Fabian I. Inhibition by ascorbic acid of apoptosis induced by oxidative stress in HL-60 myeloid leukemia cells. Biochemical pharmacology. 1999;57(7):823-32.

Archive of SID

www.SID.ir