

بررسی تأثیر آسکوربیک اسید بر واکنش گلیکاسیون آلبومین در شرایط برون تنی

زینب معمار^۱، ناهید مسعودیان^۲، فرشته بهمنی^{۳*}

تاریخ دریافت ۱۳۹۶/۰۱/۲۷ تاریخ پذیرش ۱۳۹۶/۰۳/۲۷

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: تشکیل محصولات نهایی گلیکاسیون پیشرفته (AGEs) در دیابت ملیتوس افزایش می‌یابد و منجر به مشکلات میکروواسکولار و ماکروواسکولار می‌گردد. اخیراً توجه زیادی به مهارکننده‌های طبیعی و سنتتیک شده که بتوانند شروع و پیشرفت دیابت و عوارض آن را به تأخیر بیندازند. در این مطالعه، مدل گلیکاسیون برون تنی شامل آلبومین به‌عنوان پروتئین هدف و گلوکز به‌عنوان عامل گلایکه کننده برای مطالعه اثر آنتی‌گلیکاسیونی آسکوربیک اسید (AA) مورد استفاده قرار گرفت.

مواد و روش کار: پروتئین سرم آلبومین گاوی (Bovine Serum Albumin (BSA)) با غلظت M5/0 گلوکز در حضور و بدون حضور AA با غلظت mM1 1000)) به مدت ۴ هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. برای تعیین گلیکاسیون پروتئین، تشکیل AGEs فلورسانس و جهت تعیین اکسیداسیون پروتئین سطوح پروتئین کربونیل و تیول اندازه‌گیری شد. گلیکاسیون موجب تشکیل تجمعات فیبریلی می‌شود. به‌منظور تعیین اثرات مهار AA بر تشکیل تجمعات فیبریلی آلبومین از رنگ‌های ویژه آمیلوئیدها، تیوفلاوین T (ThT) استفاده گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که AA به‌طور معنی‌داری موجب مهار تشکیل AGEs ($p < 0.05$)، مهار معنی‌دار اکسیداسیون پروتئین با کاهش گروه‌های کربونیل و مهار کاهش گروه‌های تیول می‌شود ($p < 0.05$). همچنین بر اساس نتایج به‌دست‌آمده AA پتانسیل مهار تشکیل تجمعات آمیلوئیدی شکل آلبومین و حفاظت از کانفورماسیون آلبومین را دارد.

بحث و نتیجه‌گیری: لذا بر اساس یافته‌های فوق AA دارای پتانسیل بالایی جهت کاهش گلیکاسیون و اکسیداسیون پروتئین‌ها بوده و ممکن است بتواند سبب تأخیر و یا مهار عوارض وابسته به AGEs در دیابت شود.

کلیدواژه‌ها: گلیکاسیون، دیابت، محصولات نهایی گلیکاسیون پیشرفته، آسکوربیک اسید، آلبومین

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و هشتم، شماره پنجم، ص ۳۷۲-۳۶۳، مرداد ۱۳۹۶

آدرس مکاتبه: کاشان، کیلومتر ۵ بلوار قطب راوندی، بلوار پزشک، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی بالینی، تلفن: ۰۹۱۲۴۲۳۷۵۴۲

Email: bahmani@kaums.ac.ir

مقدمه

افراد سالم می‌شود (۱). آمار هشداردهنده و رو به افزایشی برای دیابت نوع ۲ وجود دارد که این ارتباط تنگاتنگی با تعداد مبتلایان به عوارض دیابت مانند نفروپاتی، نوروپاتی، رتینوپاتی و بیماری‌های قلبی-عروقی دارند (۲). مطالعات متعدد نشان داده‌اند که عامل اصلی در پاتوژنز دیابت و عوارض ناشی از آن فرآیند گلیکاسیون می‌باشد (۳-۵). گلیکاسیون^۱ که واکنش میلارد^۲ نیز نامیده می‌شود از جمله واکنش‌های غیرآنزیمی آهسته‌ای است که با

دیابت از جمله شایع‌ترین بیماری‌های غدد اندوکرین بوده که در اثر نقص کامل یا نسبی در ترشح و یا عملکرد انسولین ایجاد و با هاپیرگلیسمی تشخیص داده می‌شود. بیماری‌های مزمن مانند دیابت ۱-۲ درصد جمعیت جهان را تحت تأثیر قرار داده‌اند و موجب ابتلا بیمار به عوارض مزمن شده و بسیاری از بافت‌های بدن را درگیر می‌کنند. این امر موجب کاهش طول عمر افراد دیابتی به دوسوم

^۱ کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دامغان، ایران

^۲ استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دامغان، ایران

^۳ استادیار، مرکز تحقیقات بیوشیمی و تغذیه در بیمارهای متابولیک، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران (نویسنده مسئول)

^۱ Glycation

^۲ Maillard reaction

احیاء نگه دارد (۱۴). در چند مطالعه‌ای که در زمینه نقش AA بر گلیکاسیون پروتئینی انجام شده نتایج ضدونقیضی به دست آمده است. در برخی مطالعات اشاره شده که AA دارای نقش آنتی گلیکاسیونی بوده و می‌تواند مانع از تشکیل محصولات نهایی گلیکاسیون پیشرفته شود و در برخی دیگر اشاره شده که این ترکیب دارای نقش پروگلیکاسیونی است و موجب تشدید گلیکاسیون می‌شود (۱۵-۲۲). با توجه به شرایط فوق و نتایج ضدونقیضی موجود، هدف از انجام این مطالعه تعیین نقش AA بر گلیکاسیون القاء شده با گلوکز در پروتئین آلبومین می‌باشد و سعی شده جهت روشن شدن موضوع، اثر AA بر واکنش گلوکز با پروتئین آلبومین از جنبه‌های مختلف گلیکاسیون، اکسیداسیون و ساختاری مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش کار

انکوباسیون آلبومین با گلوکز جهت تشکیل آلبومین

گلیک:ک

برای این منظور محلول پروتئینی آلبومین سرم گاوی (BSA) با غلظت ۱۰ mg/ml با گلوکز ۵۰۰ میلی مولار در بافر فسفات ۰/۱M با pH ۷/۴ به مدت ۴ هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در غیاب و حضور آسکوربیک اسید ۱ mM (۱۰۰۰ μM) در شیکر-انکوباتور (GFL 3031، آلمان) انکوبه شد. همچنین یک نمونه از محلول آلبومین بدون گلوکز به عنوان کنترل با شرایط مشابه تهیه شد. برای جلوگیری از آلودگی باکتریایی از سدیم آزاید ۰/۰۲ درصد استفاده و محلول آماده شده نمونه‌ها از فیلترهای مخصوص پروتئین ۰/۲۲ μm عبور داده شد. در پایان هر هفته از هر یک از لوله‌ها نمونه‌برداری شده و در فریزر ۷۰°C- نگه‌داری شد. پس از پایان مدت انکوبه شدن آنالیز نمونه‌ها با روش‌های زیر صورت گرفت.

اندازه‌گیری محصولات نهایی گلیکاسیون پیشرفته (AGEs):

اندازه‌گیری میزان AGEs به کمک فن فلوریمتری انجام شد. در این روش گروه‌های مورد آزمایش با بافر فسفات به نسبت ۱ به ۵۰ رقیق‌سازی شدند (۲۰ میکرولیتر نمونه در ۹۸۰ میکرولیتر بافر فسفات). میزان فلورسانس هر یک از محلول‌ها به کمک دستگاه فلوریمتر (PerkinElmer-LS55، آمریکا) در طول موج تحریکی ۳۷۰ نانومتر و نشری ۴۴۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید (۲۳).

اندازه‌گیری محتوای پروتئین کربونیل:

برای اندازه‌گیری میزان پروتئین کربونیل از روش Levine و همکاران استفاده شد (۲۴). اساس این روش واکنش بین ترکیب ۲ و ۴-دی نیترو-۵-فنیل هیدرازین (DNPH) و پروتئین کربونیل است.

اتصال گلوکز یا مشتقات آن به گروه‌های آمین آزاد پروتئین‌ها آغاز شده و منجر به محصولات ناپایدار به نام باز شیف^۳ می‌شود. در ادامه باز شیف به ترکیبات فروکتوزآمین (کتوآمین) پایدار تبدیل و با نوآرایی به محصولات آمادوری^۴ تبدیل می‌گردد. اکسیداسیون و نوآرایی‌های مولکولی بیشتر موجب تبدیل این محصولات که محصولات ابتدایی گلیکاسیون هستند به محصولات نهایی گلیکاسیون پیشرفته^۵ خواهد شد (۶-۷). چون فرآیند گلیکاسیون اغلب با اکسیداسیون همراه است آن را گلیکواکسیداسیون^۶ نیز می‌نامند.

گلوکز به عنوان فراوان‌ترین قند احیاء کننده خون نقش بسیار مهمی در واکنش گلیکاسیون و تشکیل محصولات AGEs دارد. این قند به‌ویژه در شرایط هایپرگلیسمی با پروتئین‌های مختلف سرم مانند آلبومین واکنش می‌دهد. آلبومین سرم انسان (HSA) که بیشترین پروتئین سرم است، حدود نیمی از محتوای پروتئینی خون را تشکیل داده، دارای ساختار گلوبولار با چندین دومن مشخص می‌باشد. این پروتئین چندکاره با وزن مولکولی ۶۶ kDa و ۵۸۵ اسیدآمین می‌باشد (۸-۹). در آلبومین سه دومن هومولوگ وجود دارد که در این دومن‌ها هفت جایگاه اتصال به اسیدچرب و دو جایگاه برای اتصال به لیگاندهای اختصاصی من جمله داروها وجود دارد. گلیکاسیون غیرآزمیزی آلبومین منجر به تغییرات ساختاری و عملکردی آن می‌شود و حضور ۵۹ اسیدآمین لیزین و ۲۴ آرژینین همراه با عامل آلفا آمین سایر رزیدوها این پروتئین را مستعد و کاندید برای گلیکاسیون به‌ویژه در شرایط هایپرگلیسمی می‌نماید (۱۰). فرم گلیک آلبومین به دلیل تغییرات ساختاری ایجاد شده در آن قدرت اتصال به لیگاندهای مختلف و خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود را از دست می‌دهد (۱۱). این فرم سایتوتوکسیسیته بالایی داشته، موجب القاء مسیرهای سیگنالینگ استرس اکسیداتیو شده و با تغییرات ساختاری سبب تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی می‌شود (۱۲-۱۳).

با توجه به نقش مهم گلیکاسیون و استرس اکسیداتیو در بروز و پیشرفت عوارض مختلف دیابت، به نظر می‌رسد ترکیباتی که خواص آنتی گلیکاسیونی و آنتی‌اکسیدانی دارند می‌توانند جهت پیشگیری و درمان دیابت مورد استفاده قرار گیرند. از جمله ترکیباتی که در این زمینه مورد توجه است ترکیب آسکوربیک اسید (Ascorbic acid AA) می‌باشد. AA از جمله مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های محلول در آب است که در پلاسما و سلول‌های بدن وجود دارد. در شرایط فیزیولوژیک به فرم دی‌هیدروآسکوربات وجود دارد و می‌تواند بسیاری از کوفاکتورهای فلزی را در حالت

⁵ Advanced glycation end products (AGEs)

⁶ Glycoxidation

³ Schiff base

⁴ Amadori product

دستگاه فلوریمتر (PerkinElmer-LS55، آمریکا) در طول موج تحریکی ۴۳۵ نانومتر و نشری ۴۸۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. **آنالیز آماری:**

برای تمامی نمونه‌ها هر تست سه بار در شرایط مشابه و یکسان تکرار شد و نتایج به صورت میانگین \pm SD گزارش گردید. تفاوت آماری نتایج آزمایشات مختلف از طریق تست‌های آماری آنوا یک‌طرفه ((one-way ANOVA و سپس آزمون‌های پس تعقیبی مشخص گردید. $p < 0.05$ به عنوان تفاوت آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بررسی تأثیر آسکوربیک اسید بر محصولات نهایی گلیکاسیون پیشرفته (AGEs):

میزان AGEs در گروه‌های آزمایش و کنترل طی چهار هفته متوالی اندازه‌گیری، متفاوت است. در جدول ۱ مقادیر متغیر AGEs در سه گروه مورد مطالعه طی چهار بار اندازه‌گیری نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود در نمونه کنترل حاوی BSA+Glc در اثر واکنش گلوکز با آلومین محصولات نهایی گلیکاسیون پیشرفته تشکیل شده که دارای فلورسانس می‌باشد. هر چه زمان انکوباسیون طولانی‌تر می‌شود تولید این محصولات و فلورسانس ناشی از آن افزایش می‌یابد به طوری که این میزان از مقدار $26/23 \pm 225/15$ در هفته اول به میزان $6077/95 \pm 38/74$ پس از چهار هفته انکوباسیون می‌رسد که تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل ۱ و گروه آزمایشی ۳ دارد.

DNPH پس از واکنش با پروتئین کربونیل با تشکیل باز شیف، مشتق هیدرازون مربوطه را تولید می‌کند که دارای جذب نوری در طول موج nm370 بوده و به کمک دستگاه اسپکتروفوتومتر (CECIL-CE2021، انگلیس) اندازه‌گیری گردید. غلظت پروتئین کربونیل با استفاده از ضریب جذب مولی آن محاسبه و برحسب نانو مول بر میلی‌گرم پروتئین بیان گردید.

اندازه‌گیری میزان گروه تیول:

اندازه‌گیری میزان گروه تیول بر اساس روش Ellman صورت گرفت (۲۵). در این روش واکنش گروه‌های SH سولفیدریل پروتئین با معرف Ellman یعنی ۵، ۵'-دی‌تیوبیس ۲-نیتروبنزواتیک اسید (DTNB) منجر به تولید یک مالون دی-سولفید متصل به پروتئین و یک مول آنیون نیتروبنزوات (۲-nitro-5 thiobenzoate) به ازای هر گروه پروتئین SH سولفیدریل می‌شود. آنیون نیتروبنزوات زرد رنگ بوده و در طول موج ۴۱۲ نانومتر دارای ماکزیمم جذب است که به کمک دستگاه اسپکتروفوتومتر (CECIL-CE2021، انگلیس) اندازه‌گیری شد. غلظت تیول آزاد با استفاده از منحنی استاندارد سیستمین محاسبه و برحسب نانو مول بر میلی‌گرم پروتئین بیان گردید.

اندازه‌گیری میزان فلورسانس تیوفلاوین T (ThT):

اندازه‌گیری میزان فلورسانس ThT به روش فلوریمتری انجام شد (۲۶). ThT مارکری جهت تشخیص ساختارهای β آمیلوئیدی است. از بافر فسفات ۰/۱ مولار به عنوان حلال ThT استفاده شد. میزان ۱۰۰ میکرولیتر از ThT با ۹۰۰ میکرولیتر نمونه مخلوط و پس از یک ساعت انکوباسیون در دمای اتاق میزان فلورسانس آن با

جدول (۱): میانگین مقدار محصولات نهایی گلیکاسیون پیشرفته (AGEs) در گروه‌های مورد مطالعه طی چهار هفته اندازه‌گیری

ردیف	گروه‌ها	فلورسانس AGEs (AU)			
		هفته اول	هفته دوم	هفته سوم	هفته چهارم
۱	BSA	$308/75 \pm 27/42$	$397/96 \pm 16/34$	$456/01 \pm 23/90$	$501/63 \pm 18/73$
۲	BSA+Glc	$2225/15 \pm 26/23^a$	$3858/97 \pm 46/07^a$	$5075/24 \pm 31/62^a$	$6077/95 \pm 38/74^a$
۳	BSA+Glc+AA	$1267/42 \pm 75/15^{a,b}$	$2543/40 \pm 48/28^{a,b}$	$4206/85 \pm 25/37^{a,b}$	$5652/01 \pm 38/48^{a,b}$

داده‌ها در جدول به صورت میانگین \pm SD بیان شده است. BSA: آلومین سرم گاوی، Glc: گلوکز، AA: آسکوربیک اسید یا ویتامین سی. a: $p < 0.05$ در مقایسه هر گروه با آلومین، b: $p < 0.05$ در مقایسه هر گروه با آلومین+گلوکز.

معنی‌داری با گروه‌های کنترل ۱ و ۲ دارد. محاسبات نشان می‌دهند که در پایان مدت انکوباسیون AA نسبت به گروه کنترل ۲ موجب مهار ۷ درصد تشکیل AGEs شده است. مقادیر AGEs

استفاده از AA موجب کاهش تولید محصولات گلیکاسیون پیشرفته و کاهش AGEs شد، به طوری که در مقایسه با گروه ۱ این میزان در گروه ۳ از مقدار $75/15 \pm 1267/42$ در هفته اول به میزان $5652/01 \pm 38/48$ پس از چهار هفته انکوباسیون رسید که تفاوت

به دست آمده برای گروه کنترل ۱ تفاوت معنی داری را با گذشت زمان نشان نداد.

بررسی تأثیر آسکوربیک اسید بر مقدار پروتئین کربونیل:

اندازه گیری میزان پروتئین کربونیل در گروه های آزمایش و کنترل طی چهار هفته متوالی، تفاوت بین گروه ها را نشان داد. در جدول ۲ مقادیر متغیر پروتئین کربونیل در سه گروه مورد مطالعه طی چهار بار اندازه گیری نشان داده شده است. همان طور که مشاهده می شود در نمونه کنترل حاوی BSA+Glc در اثر واکنش گلوکز با

آلبومین و فرآیند گلیکاسیون و استرس اکسیداتیو ناشی از آن گروه های کربونیل تشکیل می شود. هر چه زمان انکوباسیون طولانی تر می شود تولید این محصولات افزایش می یابد به طوری که این میزان از مقدار 0.17 ± 0.63 نانومول بر میلی گرم پروتئین در هفته اول به میزان 0.21 ± 0.41 نانومول بر میلی گرم پروتئین پس از چهار هفته انکوباسیون می رسد که تفاوت معنی داری با گروه کنترل ۱ و گروه آزمایشی ۳ دارد.

جدول (۲): میانگین مقدار پروتئین کربونیل در گروه های مورد مطالعه طی چهار هفته اندازه گیری

ردیف	گروه ها	پروتئین کربونیل (nmol/mg protein)		
		هفته اول	هفته دوم	هفته سوم
۱	BSA	0.22 ± 0.60	0.16 ± 0.78	0.23 ± 0.89
۲	BSA+Glc	$0.17^a \pm 0.63$	$0.15^a \pm 0.41$	$0.23^a \pm 0.41$
۳	BSA+Glc+AA	$0.9^{a,b} \pm 0.91$	$0.25^a \pm 0.43$	$0.16^{a,b} \pm 0.14$

داده ها در جدول به صورت میانگین \pm SD بیان شده است. BSA: آلبومین سرم گاوی، Glc: گلوکز، AA: آسکوربیک اسید یا ویتامین سی. a: $p < 0.05$ در مقایسه هر گروه با آلبومین، b: $p < 0.05$ در مقایسه هر گروه با آلبومین+گلوکز.

اکسیداتیو ناشی از آن گروه های تیول کاهش می یابند. با افزایش زمان انکوباسیون کاهش ایجاد شده در گروه های تیول پروتئین بیشتر می شود به طوری که این میزان از مقدار 0.07 ± 0.45 نانومول بر میلی گرم پروتئین در هفته اول به میزان 0.03 ± 0.20 نانومول بر میلی گرم پروتئین پس از چهار هفته انکوباسیون می رسد که تفاوت معنی داری با گروه کنترل ۱ و گروه آزمایشی ۳ دارد.

AA موجب حفاظت از اکسیداسیون گروه های تیول و کاهش آهسته تر محتوای تیول پروتئین شد، به طوری که این میزان در گروه ۳ نسبت به گروه ۲ از مقدار 0.02 ± 0.52 نانومول بر میلی گرم پروتئین در هفته اول به میزان 0.07 ± 0.28 نانومول بر میلی گرم پروتئین پس از چهار هفته انکوباسیون رسید که هر چند در هفته چهارم تفاوت معنی دار نبود اما این میزان در سایر زمان ها تفاوت معنی داری با گروه های کنترل ۱ و ۲ داشت. مقدار گروه تیول گروه کنترل ۱ با گذشت زمان اندکی کاهش داشت که این میزان تغییر، معنی دار نبود.

استفاده از AA موجب کاهش محتوای پروتئین کربونیل شد، به طوری که این میزان در گروه ۳ نسبت به گروه ۲ از مقدار 0.09 ± 0.91 نانومول بر میلی گرم پروتئین در هفته اول به میزان 0.28 ± 0.64 نانومول بر میلی گرم پروتئین پس از چهار هفته انکوباسیون رسید که در هفته های ۱، ۳ و ۴ تفاوت معنی داری با گروه های کنترل ۱ و ۲ دارد، اما این تفاوت در هفته ۲ معنی دار نیست. محاسبات نشان می دهند که در پایان مدت انکوباسیون AA نسبت به گروه کنترل ۲ موجب مهار ۱۲ درصد تشکیل پروتئین کربونیل شده است. مقدار پروتئین کربونیل گروه کنترل ۱ با گذشت زمان اندکی افزایش داشت که این میزان تغییر، معنی دار نبود.

بررسی تأثیر آسکوربیک اسید بر مقدار گروه تیول:

اندازه گیری میزان گروه تیول در گروه های آزمایش و کنترل طی چهار هفته متوالی، تفاوت بین گروه ها را نشان داد. در جدول ۳ مقادیر متغیر گروه تیول در سه گروه مورد مطالعه طی چهار بار اندازه گیری آورده شده است. در نمونه کنترل حاوی BSA+Glc در اثر واکنش گلوکز با آلبومین و فرآیند گلیکاسیون و استرس

جدول (۳): میانگین مقدار گروه نیول در گروه‌های مورد مطالعه طی چهار هفته اندازه‌گیری

ردیف	گروه‌ها	گروه نیول (nmol/mg protein)			
		هفته اول	هفته دوم	هفته سوم	هفته چهارم
۱	BSA	۰/۵۹ ± ۰/۰۲	۰/۵۱ ± ۰/۰۷	۰/۴۹ ± ۰/۰۷	۰/۴۶ ± ۰/۰۱
۲	BSA+Glc	۰/۴۵ ± ۰/۰۷ ^a	۰/۳۳ ± ۰/۰۱ ^a	۰/۲۶ ± ۰/۰۲ ^a	۰/۲۰ ± ۰/۰۳ ^a
۳	BSA+Glc+AA	۰/۵۲ ± ۰/۰۲ ^{a,b}	۰/۴۱ ± ۰/۰۷ ^{a,b}	۰/۳۶ ± ۰/۰۱ ^{a,b}	۰/۲۸ ± ۰/۰۷ ^a

داده‌ها در جدول به صورت میانگین \pm SD بیان شده است. BSA: آلبومین سرم گاوی، Glc: گلوکز، AA: آسکوربیک اسید یا ویتامین سی. a: $p < 0/05$ در مقایسه هر گروه با آلبومین، b: $p < 0/05$ در مقایسه هر گروه با آلبومین+گلوکز.

بررسی تأثیر آسکوربیک اسید بر مقدار فلورسانس تیوفلاوین T (ThT):

گلیکاسیون موجب تغییرات ساختاری پروتئین‌ها، تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی و تجمعات پروتئینی می‌شود. جهت بررسی میزان فیبریل‌های آمیلوئیدی و تغییرات ایجادشده در پروتئین از رنگ‌های ویژه آمیلوئیدها مانند تیوفلاوین T استفاده می‌شود. هر چه تشکیل این فیبریل‌ها بیشتر باشد اتصال این رنگ و فلورسانس ناشی از آن بیشتر خواهد شد. در جدول ۴ مقادیر متغیر ThT

سه گروه مورد مطالعه طی چهار بار اندازه‌گیری نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود در نمونه کنترل ۲ در اثر واکنش گلیکاسیون فیبریل‌های آمیلوئیدی تشکیل شده که دارای فلورسانس می‌باشد. با طولانی‌تر شدن زمان انکوباسیون فیبریل‌های پروتئین، اتصال تیوفلاوین T و فلورسانس ناشی از آن افزایش می‌یابد به طوری که این میزان از مقدار $16/68 \pm 471/44$ در هفته اول به میزان $59/92 \pm 1972/43$ پس از چهار هفته انکوباسیون می‌رسد که تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل ۱ و گروه آزمایشی ۳ دارد.

جدول (۴): میانگین مقدار فلورسانس تیوفلاوین T (ThT) در گروه‌های مورد مطالعه طی چهار هفته اندازه‌گیری

ردیف	گروه‌ها	فلورسانس ThT (AU)			
		هفته اول	هفته دوم	هفته سوم	هفته چهارم
۱	BSA	96/76 ± 7/94	109/06 ± 3/94	183/76 ± 13/62	210/95 ± 10/01
۲	BSA+Glc	471/44 ± 16/68 ^a	1192/89 ± 31/51 ^a	1708/72 ± 43/18 ^a	1972/43 ± 59/92 ^a
۳	BSA+Glc+AA	379/31 ± 25/67 ^{a,b}	1038/62 ± 18/04 ^{a,b}	1541/58 ± 23/84 ^{a,b}	1612/18 ± 31/48 ^{a,b}

داده‌ها در جدول به صورت میانگین \pm SD بیان شده است. BSA: آلبومین سرم گاوی، Glc: گلوکز، AA: آسکوربیک اسید یا ویتامین سی. a: $p < 0/05$ در مقایسه هر گروه با آلبومین، b: $p < 0/05$ در مقایسه هر گروه با آلبومین+گلوکز.

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه تأثیر AA بر واکنش گلیکاسیون پروتئین آلبومین در حضور گلوکز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که AA موجب مهار واکنش گلیکاسیون شده و به طور معنی‌داری مقدار AGEs فلورسانس را کم می‌کند. همچنین این ترکیب با کاهش گروه‌های کربونیل و مهار اکسیداسیون و کاهش گروه‌های تیول سبب مهار معنی‌دار اکسیداسیون پروتئین آلبومین می‌شود. مطالعه ساختاری پروتئین آلبومین در حضور رنگ ThT نیز نشان داد که

استفاده از AA موجب کاهش گلیکاسیون، کاهش فیبریل‌های پروتئین و فلورسانس ThT شد، به طوری که در مقایسه با گروه ۲ این میزان در گروه ۳ از مقدار $379/31 \pm 25/67$ در هفته اول به میزان $1612/18 \pm 31/48$ پس از چهار هفته انکوباسیون رسید که تفاوت معنی‌داری با گروه‌های کنترل ۱ و ۲ دارد. محاسبات نشان می‌دهند که در پایان مدت انکوباسیون AA نسبت به گروه کنترل ۲ موجب مهار ۱۸/۳ درصد فلورسانس ThT شده است. مقادیر فلورسانس ThT به دست آمده برای گروه کنترل ۱ تفاوت معنی‌داری را با گذشت زمان نشان نداد.

و نقش آن‌ها در فرآیند گلیکاسیون آلبومین تحقیقات زیادی صورت نگرفته و تنها گزارشات کمی در این زمینه وجود دارد.

Vinson & Howard در مطالعه‌ای به خاصیت آنتی‌گلیکاسیونی ویتامین سی و ممانعت از گلیکاسیون آلبومین توسط این ویتامین اشاره کردند (۳۲). اما برعکس در مورد پروتئین کریستالین لنز دیده شد که ویتامین سی باعث افزایش گلیکاسیون این پروتئین شده و مانند یک عامل گلیکس کننده به‌عنوان پیش‌سازی برای تولید پنتوزیدین که یکی از انواع محصولات نهایی گلیکاسیون پیشرفته است عمل می‌کند (۳۳-۳۴). برخلاف این مورد krone & Ely میزان هموگلوبین گلیکوزیله HbA1c را در افرادی که روزانه بیش از ۲ گرم ویتامین سی مصرف می‌کردند مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که به ازای هر ۳۰ میکروگرم افزایش در غلظت ویتامین سی پلاسما میزان HbA1c حدوداً ۰/۱ گرم در دسی‌لیتر کاهش می‌یابد (۳۵). همچنین در مطالعه‌ای دیگر کاهش گلیکاسیون انسولین و بهبود علائم سندرم متابولیک در موش‌های دریافت‌کننده مکمل ویتامین سی گزارش گردید (۳۶). در افرادی نیز که تحت مکمل یاری روزانه ۱۰۰۰ میلی‌گرم ویتامین سی قرار داشتند، کاهش قند خون ناشتا، TAG، LDL، HbA1c و انسولین سرم مشاهده شد (۳۷). Zafar و همکارانش نیز طی مطالعه‌ای نشان دادند که انکوباسیون آلبومین در حضور گلوکز و ویتامین سی باعث کاهش گلیکاسیون این پروتئین شده و مقدار محصولات نهایی گلیکاسیون نسبت به نمونه کنترل تا ۲۶ درصد کاهش یافته است (۳۸).

در بین پروتئین‌های پلاسمایی آلبومین ازجمله ضروری‌ترین ترکیبات آنتی‌اکسیدانی گردش خون محسوب می‌شود. این پروتئین مهم‌ترین منبع تیول پلاسماست و مقادیر زیاد رزیدوهای سیستمین، لیزین و آرژنین این پروتئین را نسبت به واکنش‌های گلیکواکسیداسیون حساس نموده است (۳۹). اسیدهای آمینه‌ای مانند سیستمین به‌طور خاص مستعد حمله اکسیداتیو رادیکال‌های آزاد بوده و واکنش ثانویه زنجیره‌های جانبی آمینواسیدها با ترکیبات فعال تولیدشده طی گلیکاسیون نیز منجر به ایجاد مشتقات پروتئینی با محتویات تیول پایین و کربونیل بالا می‌شود (۴۰-۴۱). به همین دلیل محتوای گروه‌های تیول و کربونیل پروتئین‌ها ازجمله پارامترهای اصلی جهت تعیین آسیب اکسیداتیو پروتئین‌ها طی واکنش گلیکاسیون می‌باشند. نتایج این مطالعه نشان داد که ویتامین سی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود مانع از کاهش گروه تیول و افزایش گروه کربونیل آلبومین در حضور قند گلوکز شد. واکنش گلیکاسیون پروتئین‌ها علاوه بر آسیب اکسیداتیو ازجمله مهم‌ترین عوامل در تشکیل تجمعات پروتئینی و ساختارهای بتا-آمیلوئیدی می‌باشد که علاوه بر ایجاد تغییرات در ساختار و

پتانسیل مهار تشکیل تجمعات آمیلوئیدی شکل آلبومین را دارد و می‌تواند اثرات محافظتی بر کانفورماسیون آلبومین داشته باشد.

واکنش قند با بیومولکول‌ها و تشکیل محصولات نهایی گلیکاسیون پیشرفته از مهم‌ترین عوامل ایجاد عوارض مزمن دیابت محسوب می‌شود. ترکیباتی با ویژگی آنتی‌گلیکاسیونی می‌توانند با مهار واکنش فوق در پیش‌گیری و کاهش عوارض دیابت مؤثر باشند. این ترکیبات به روش‌های مختلف مانند بلوکه کردن گروه‌های کربونیل در قندهای احیاکننده، به دام انداختن و حذف رادیکال‌های فعال اکسیژن (ROS) و شکستن ساختارهای حاوی پیوندهای عرضی (Cross-link) در محصولات نهایی گلیکاسیون پیشرفته اثرات مفید خود را اعمال می‌کنند (۲۷).

یکی از مهم‌ترین این مکانیسم‌ها به دام انداختن رادیکال‌های آزاد در طی واکنش گلیکاسیون است که در جلوگیری و مهار تشکیل محصولات نهایی گلیکاسیون پیشرفته بسزایی دارد (۲۸). از تجزیه محصولات آمادوری تولیدشده در مراحل اولیه واکنش گلیکاسیون، رادیکال‌های مختلفی تولیدشده که این رادیکال‌ها به دلیل واکنش‌پذیری بالا موجب پیشرفت واکنش گلیکاسیون و تشکیل انواع مختلف محصولات نهایی گلیکاسیون پیشرفته فلورسانس و غیرفلورسانس می‌شوند (۲۹). ترکیباتی که خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارند با حذف رادیکال‌های آزاد می‌توانند سرعت و کنش‌های گلیکاسیون را کاهش داده و جلوی تشکیل محصولات نهایی گلیکاسیون را بگیرند.

ویتامین سی ازجمله ترکیبات با خاصیت آنتی‌اکسیدانی است که مکانیسم اثر آن بر واکنش گلیکاسیون پروتئین‌ها چندبعدی و پیچیده است. برخی دلایل برای مؤثر بودن این ویتامین در ممانعت از واکنش گلیکاسیون مطرح است که علاوه بر خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن، یکی از مهم‌ترین دلایل حضور گروه کربونیل در ساختار این ویتامین است. ویتامین سی به دلیل داشتن گروه کربونیل تمایل زیادی به گروه‌های آمین پروتئین‌ها داشته و با گلوکز برای اتصال به گروه‌های آمین رقابت کرده و مانع از اتصال گلوکز و گلیکاسیون پروتئین می‌شود (۱۴). همچنین شکل دی‌کتوگلوونیک اسید آن با پروتئین‌ها واکنش داده و کتامین تشکیل می‌دهد (۳۰، ۳۱).

تحقیقات مختلف نشان می‌دهند که آلبومین در پلاسما می‌تواند تحت تأثیر فاکتورهای موجود در پلاسما قرار گرفته و تغییر کند. ازجمله بیومولکول‌های موجود در پلاسما ویتامین سی بوده که می‌تواند به آلبومین متصل گردد. نتایج این مطالعه نشان داد که ویتامین سی به‌طور معنی‌داری موجب کاهش فلورسانس ناشی از محصولات نهایی گلیکاسیون آلبومین می‌شود. در زمینه ریزمغذی‌ها

شده و با حفاظت از گروه‌های تیول و ممانعت از فرآیند اکسیداسیون، تشکیل گروه‌های کربونیل و ساختارهای بتا-آمیلوئیدی را کاهش می‌دهد. لذا به دلیل ارزان بودن و عدم سمیت به‌عنوان راهکاری جهت مقابله با عوارض مزمن دیابت می‌تواند مورد توجه قرار گیرد. انجام پروژه فوق با محدودیت خاصی همراه نبود، تنها در صورت امکانات مالی بیشتر پارامترهای بیشتری مورد بررسی قرار می‌گرفت. به همین دلیل در ادامه کار تحقیقاتی حاضر پیشنهاد می‌گردد جهت بررسی دقیق‌تر مکانیسم اثر AA در ممانعت از گلیکاسیون، محصولات اختصاصی گلیکاسیون مانند پنتوزیدین، فروکتوزآمین و N-کربوکسی متیل لیزین (CML) به تفکیک اندازه‌گیری شوند. همچنین بررسی ساختار دوم و سوم پروتئین آلبومین به کمک فن دورنگ نمایی دورانی (Circular Dichroism (CD)) می‌تواند اطلاعات ارزشمندی در زمینه تأثیر AA بر ساختار این پروتئین فراهم کند.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کاشان و دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان که در انجام این پروژه نهایت همکاری را داشتند تشکر و قدردانی می‌شود.

بایداری پروتئین‌ها، عملکرد آن‌ها را نیز مختل می‌نماید (۴۲-۴۳). گلیکاسیون موجب القاء آگریگیشن و فیبریلاسیون در پروتئین‌های گلوبولار مانند آلبومین می‌شود. واکنش گلیکاسیون با القاء تغییرات کانفورماسیونی در آلبومین موجب تبدیل ماریپچ آلفا به ساختارهای بتا می‌شود به طوری که مطالعات نشان دادند که محتوای ماریپچ آلفا از ۸۷ درصد در حالت نرمال به ۱۰ درصد در حضور گلوکز کاهش یافته است (۴۴). برای بررسی این فرآیند از رنگ‌های متصل شونده و ویژه برای آمیلوئیدها مانند تیوفلاوین T استفاده می‌شود (۴۴). در این مطالعه کاهش اتصال رنگ تیوفلاوین T و فلورسانس ناشی از آن در حضور ویتامین سی مشاهده شد.

شواهد زیادی در زمینه تأثیر ویتامین سی بر آسیب اکسیداتیو آلبومین و تشکیل تجمعات پروتئینی و ساختارهای بتا-آمیلوئیدی وجود ندارد. تنها در مطالعه‌ای که Tupe & Agte انجام دادند نشان داده شد که انکوباسیون BSA با گلوکز و آسکوربیک اسید به‌طور معنی‌داری موجب حفاظت از گروه‌های تیول آلبومین می‌شود هرچند که تأثیر این ویتامین بر میزان محتوای پروتئین کربونیل و فیبریل‌های آمیلوئیدی معنی‌دار نبود (۴۵).

در مجموع به نظر می‌رسد که ویتامین سی به‌طور مؤثر موجب مهار تشکیل محصولات نهایی گلیکاسیون پیشرفته توسط گلوکز

References:

1. Rahman A, Choudhary MI, Basha FZ, Abbas G, Khan SN, Shah SA. Science at the interface of chemistry and biology: Discoveries of α -glucosidase inhibitors and anti-glycation agents. *Pure Appl Chem* 2007; 79: 2263-8.
2. Vlassara H, Uribarri J. Advanced Glycation End Products (AGE) and Diabetes: Cause, Effect, or Both? *Curr Diabetes Rep* 2014; 14: 013-0453.
3. Bodiga VL, Eda SR, Bodiga S. Advanced glycation end products: role in pathology of diabetic cardiomyopathy. *Heart Fail Rev* 2014; 19: 49-63.
4. Bucala R, Clin J. Diabetes, aging, and their tissue complications. *Invest* 2014; 124: 1887-8.
5. Vlassara H, Striker GE. AGE restriction in diabetes mellitus: a paradigm shift. *Nat Rev Endocrinol* 2011; 7: 526-39.
6. Cohen MP. Intervention strategies to prevent pathogenetic effects of glycated albumin. *Arch Biochem Biophys* 2003; 419: 25-30.
7. Cohen MP, Shea E, Chen S, Shearman CW. Glycated albumin increases oxidative stress, activates NF-kappa B and extracellular signal-regulated kinase (ERK), and stimulates ERK-dependent transforming growth factor-beta 1 production in macrophage RAW cells. *J Lab Clin Med* 2003; 141: 242-9.
8. Simard JR, Zunszain PA, Hamilton JA, Curry S. Location of high and low affinity fatty acid binding sites on human serum albumin revealed by NMR drug competition analysis. *J Mol Biol* 2006; 361(2): 336-51.
9. Ghuman J, Zunszain PA, Petitpas I, Bhattacharya AA, Otagiri M, Curry S. Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. *J Mol Biol* 2005; 353: 38-52.
10. Arasteh A, Farahi S, Habibi-Rezaei M, Akbar A, Movahedi M. Glycated albumin: an overview of the in vitro models of an in vivo potential disease marker. *J Diabetes Metabol Disord* 2014; 13: 49.

11. Baraka-Vidot J, Guerin-Dubourg A, Dubois F, Payet B, Bourdon E, Rondeau P. New insights in to deleterious impacts of in vivo glycation on albumin antioxidant activities. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1830: 3532–41.
12. Bhattacharya M, Jain N, Mukhopadhyay S. Insights into the mechanism of aggregation and fibril formation from bovine serum albumin. *Phys J Chem* 2011; 115: 4195–205.
13. Li XH, Du LL, Cheng XS, Jiang X, Lv BL, Liu R, et al. Glycation exacerbates the neuronal toxicity of β -amyloid. *Cell Death Dis* 2013; 4: 673.
14. Murry RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. *Harpers Biochemistry*. 24th ed. London Appleton & Longe; 1996.P. 612-3.
15. Bensch KG, Fleming JE, Lohmann W. The role of ascorbic acid in senile cataract. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82(21): 7193–6.
16. Grandhee SK, Monnier VM. Mechanism of formation of the Maillard protein cross-link pentosidine. Glucose, fructose and ascorbate as pentosidine precursors. *J Biol Chem* 1991; 266(18): 11649–53.
17. Vinson JA, Howard TB. Inhibition of protein glycation and advanced glycation end products by ascorbic acid and other vitamins and nutrients. *J Nutr Biochem* 1996; 7(12): 659–63.
18. Jacques PF, Taylor A, Hankinson SE, Willett W, Mahnken B, Lee Y, et al. Long-term vitamin supplement use and prevalence of early age related lens opacities. *Am J Clin Nutr* 1997; 66(4): 911–6.
19. Hegde KR, Varma SD. Protective effect of ascorbate against oxidative stress in themouselens. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1670(1): 12–8.
20. Fan X, Reneker LW, Obrenovich ME, Strauch C, Cheng R, Jarvis SM, et al. VitaminC mediates chemical aging of lens crystallins by the Maillard reaction in a humanized mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(45).
21. Linetsky M, Shipova E, Cheng R, Ortwerth BJ. Glycation by ascorbic acid oxidation products leads to the aggregation of lens proteins. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1782(1): 22–34.
22. Tupe RS, Agte VV. Role of zinc along with ascorbic acid and folic acid during long-term invitro albumin glycation. *Br J Nutr* 2010; 103(3): 370–7.
23. Bigger SW, Ghiggino KP, Meilak GA, Verity B. Illustration of the principles of fluorimetry. An apparatus and experiments specially designed for the teaching laboratory. *J Chem Educ* 1992; 69(8): 675.
24. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1990; 86: 464-78.
25. Habeeb A. Reaction of protein sulfhydryl groups with Ellman's reagent. *Methods Enzymol* 1972; 25: 457.
26. LeVine H. Quantification of beta-sheet amyloid fibril structures with thioflavin T. *Meth Enzymol* 1999;309:274–84.
27. Price DL, Rhett PM, Thorpe SR, Baynes JW. Chelating activity of advanced glycation end-product inhibitors. *J Biol Chem* 2001; 276: 48967–72.
28. Rout S, Banerjee R. Free radical scavenging, anti-glycation and tyrosinase inhibition properties of a polysaccharide fraction isolated from the rind from *Punica granatum*. *Bioresour Technol* 2007; 98: 3159–63.
29. Peyroux J, Sternberg M. Advanced glycation end products (AGEs): pharmacological inhibition in diabetes. *Pathol Biol* 2006; 54: 405–19.
30. Mc-Farland K, Catalano JF, Thrope SR and Baynes JW. Nonenzymatic glucosylation of serum proteins in diabetes mellitus. *Diabetes* 2005; 28: 1011-4.
31. Padayatty SJ and Levine M. New insights into the physiology and pharmacology of vitamin C. *CMAJ* 2001; 164: 353-5.

32. Vinson JA, Howard TB. Inhibition of protein glycation and advanced glycation end products by ascorbic acid and other vitamins and nutrients. *J Nutr Biochem* 1996; 7: 659–63.
33. Fan X, Reneker ME, Obrenovich C. Vitamin C mediates chemical aging of lens crystallins by the Maillard reaction in a humanized mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 16912–7.
34. Grandhee SK, Monnier VM. Mechanism of formation of the Maillard protein cross-link pentosidine: glucose, fructose, and ascorbate as pentosidine precursors. *J Biol Chem* 1991; 266: 11649–53.
35. Krone CA, Ely JT. Ascorbic acid, glycation, glycohemoglobin and aging. *Med Hypotheses* 2004; 62: 275–9.
36. Abdel-Wahab YH, O'Harte FP, Mooney MH. Vitamin C supplementation decreases insulin glycation and improves glucose homeostasis in obese hyperglycemic (ob/ob) mice. *Metabolism* 2002; 51: 514–7.
37. Afkhami-Ardekani M, Shojaoddiny-Ardekani A. Effect of vitamin C on blood glucose, serum lipids, serum insulin in type 2 diabetes patients. *Indian J Med Res* 2007; 126: 471–4.
38. Zafar H, Sheikh MA, Hussain F, Maan MA. Inhibition of protein glycation and advanced glycation end products by ascorbic acid. *Afr J Biotechnol* 2012; 11(51): 11309-14.
39. Vetter SW, Indurthi VS. Moderate glycation of serum albumin affects folding, stability, and ligand binding. *Clin Chim Acta* 2011; 412: 2105–16.
40. Zeng J, Davies MJ. Protein and low molecular mass thiols as targets and inhibitors of glycation reactions. *Chem Res Toxicol* 2006; 19: 1668–76.
41. A'cimović JM, Stanimirović BD, Mandić LM. The role of the thiol group in protein modification with methylglyoxal. *J Serb Chem Soc* 2009; 74: 867–83.
42. Bouma B, Kroon-Batenburg LM, Wu YP, Brünjes B, Posthum, G, Kranenburg O, et al. Glycation induces formation of amyloid cross-structure in albumin. *J Biol Chem* 2003; 278: 41810–19.
43. Luthra M, Balasubramanian D. Non-enzymatic glycation alters protein structure and stability. A study of two eye lens crystallins. *J Biol Chem* 1993; 268: 18119–27.
44. Awasthi S, Saraswathi NT. Vanillin restrains non-enzymatic glycation and aggregation of albumin by chemical chaperone like function. *Int J Biol Macromol* 2016; 87: 1–6.
45. Tupe RS, Agte VV. Role of zinc along with ascorbic acid and folic acid during long-term in vitro albumin glycation. *Br J Nutr* 2010; 103: 370–7.

EVALUATION OF THE EFFECTS OF ASCORBIC ACID ON GLYCATION REACTION OF ALBUMIN ON IN VITRO CONDITION

Zeinab Meamar¹, Naheid Masoudiyan², Fereshteh Bahmani^{3*}

Received: 16 Apr, 2017; Accepted: 17 June, 2017

Abstract

Background & Aims: Advanced glycation end products (AGEs) formation is increased in diabetes mellitus, leading to microvascular and macrovascular complications. Recently, much attention has been focused on natural and synthetic inhibitors to delay the onset or progression of diabetes and its comorbidities. In this study, an in vitro glycation model containing albumin as a model protein together with glucose as glycating agent was used to study antiglycation activity of AA.

Materials & Methods: Bovine serum albumin was incubated with 0.5 M of glucose with or without AA in 37°C for 4 weeks. The formation of fluorescent AGEs was determined to indicate protein glycation, whereas the level of protein carbonyl content and thiol group were examined for protein oxidation. Glycation is known to induce aggregation and fibrillation of proteins. To determine the inhibitory effect of AA on aggregation and fibrillation of albumin, amyloid specific dyes such as Thioflavin T was used.

Results: The results found that AA significantly inhibited the formation of fluorescent AGEs ($P < 0.05$) and significantly prevented protein oxidation manifested by reducing protein carbonyl and the depletion of protein thiol groups ($P < 0.05$). Moreover, our results indicated the inhibitory potential of AA toward amyloid like aggregation of albumin and protective effect of AA on albumin native conformation.

Conclusion: Thus, these findings indicated that AA has high potential for decreasing protein glycation and oxidation that may delay or prevent AGEs-related diabetic complications.

Keywords: Glycation, Diabetes, Advanced glycation end products, Ascorbic acid, Albumin

Address: Research Center for Biochemistry and Nutrition in Metabolic Diseases, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran

Tel: +98 9124237542

Email: bahmani@Kaums.ac.ir

SOURCE: URMIA MED J 2016; 28(5): 372 ISSN: 1027-3727

¹ MSc in Biochemistry, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran

² Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran

³ Assistant Professor, Research Center for Biochemistry and Nutrition in Metabolic Diseases, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran (Corresponding Author)