Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2012; 15(61): 17-26

Antioxidant and prooxidant effects of ascorbate during iron-induced carbonyl formation in serum albumin

Ansarihadipour H(PhD)[1*], Alhoseini M(B.Sc)[2], Rostami S(B.Sc)[2], Farahani N(B.Sc)[2], Hashemi M(B.Sc)[2]

1- Department of Biochemistry, Nutrition, and Genetics, Medical and Molecular Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
2- Faculty of Paramedics, Student Research Committee, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

Received: 23 May 2011 , Accepted: 28 Jun 2011

Abstract

Background: The aim of this study is to assess antioxidative and pro-oxidative efficacy of ascorbate on serum albumin during iron-induced oxidative stress.

Materials and Methods: In this experimental study, albumin was placed in the oxidative system containing iron ions and different concentrations of ascorbate. To monitor albumin degradation, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis was performed according to Laemmli procedure. Oxidative modification of albumin was demonstrated using a method for determination of carbonyl groups by 2,4-dinitrophenylhydrazine**.**

Results: By applying the carbonyl assay, ascorbate showed a dual effect: initial pro-oxidative effect on albumin changed to an antioxidant one in a dose-dependent manner. Our findings showed prooxidant effects for ascorbate in low concentrations (0-100 μM) and antioxidant effects in higher concentrations (100-300 μM). Also, electrophoretic pattern of plasma proteins showed significant protein aggregations in the range of 35 to 45 kDa of MW and protein degradations in the range of 115 to 180 kDa.

Conclusion: Ascorbate can produce reactive oxygen species and can also inhibit the production of these oxidants in the presence of iron ions as well. These findings may be directly applicable to oxidative states during the administration of ascorbate and may be important in preventing oxidative modifications of proteins in blood circulation and other biological fluids.

Keywords: Albumin, Antioxidant, Ascorbate, Carbonyl groups, Iron, Prooxidant

*Corresponding author:
Address: Department of Biochemistry, Nutrition, and Genetics, Medical and Molecular Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
Email: ansari@arakmu.ac.ir

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال 15، شماره 2 (شماره پیاپی 61)، خرداد و تیر 1391، 26-17

اثرات آنتی اکسیدان و پرواکسیدان آسکوربات در هنگام ایجاد گروه های کربنیل در آلبومین سرم توسط آهن

هادی انصاری هادی پور[1*]، مریم السادات الحسینی[2]، سهیلا رستمی[2]، نرگس فراهانی[2]، محیا هاشمی[2]

1- استادیار، دکترای تخصصی بیوشیمی بالینی، گروه بیوشیمی، تغذیه و ژنتیک، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

2- دانشجوی کارشناسی علوم آزمایشگاهی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

تاریخ دریافت: 90/3/3 تاریخ پذیرش: 90/4/8

چکیده

زمینه و هدف: هدف این مطالعه بررسی اثرات آنتی اکسیدان و پرواکسیدان آسکوربات بر آلبومین سرم در طی استرس اکسیداتیو توسط آهن می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، آلبومین در یک سیستم اکسیداتیو حاوی یون‌های آهن و غلظت‌های مختلف آسکوربات قرار داده شد. برای بررسی تجزیه آلبومین، الکتروفورز در ژل پلی آکریل آمید در حضور سدیم دودسیل سولفات و طبق روش لاملی انجام شد. تغییرات اکسیداتیو در آلبومین، با روش سنجش گروه‌های کربنیل و با استفاده از معرف 2 و 4 دی نیتروفنیل هیدرازین نشان داده شد.

یافته‌ها: با استفاده از روش سنجش کربنیل، آسکوربات اثرات دوگانه‌ای نشان داد: ابتدا اثر پرواکسیدان بر آلبومین مشاهده شد، سپس به صورت وابسته به دوز به اثر آنتی اکسیدان تغییر یافت. آسکوربات در غلظت‌های کم (صفر تا 100 میکرومول) دارای اثرات پرواکسیدان ولی در غلظت‌های بالا (100 تا 300 میکرومول) دارای اثرات آنتی اکسیدان است. هم‌چنین طرح الکتروفورتیک پروتئین‌های سرم نشان‌دهنده به هم پیوستن قابل توجه پروتئین‌ها در محدوده وزن مولکولی 35 تا 45 کیلودالتون و تجزیه پروتئین‌ها در محدوده وزن مولکولی 115 تا 180 کیلو دالتون است.

نتیجه گیری: آسکوربات می‌تواند در حضور یون‌های آهن، گونه‌های اکسیژن فعال را تولید کند و هم‌چنین قادر است از تولید این ترکیبات اکسید کننده جلوگیری نماید. این نتایج ممکن است در شرایط استرس اکسیداتیو در هنگام تجویز آسکوربات کاربرد داشته باشد و یا می‌تواند برای جلوگیری از تغییرات اکسیداتیو پروتئین‌ها در گردش خون و سایر مایعات بیولوژیک ارزشمند باشد.

واژگان کلیدی: آسکوربات، آلبومین، آنتی اکسیدان، آهن ، پرواکسیدان، گروه‌های کربنیل

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

مقدمه

یکی از مباحث جالب در سم شناسی، اثرات اکسیژن است. متابولیسم هوازی دارای مزایای فراوانی است. اکسیژن برای تنفس سلولی و تولید انرژی ضروری است. هم‌چنین بیوترانسفورماسیون ترکیبات گزنوبیوتیک به طور عمده از طریق واکنش‌های اکسیداسیون انجام می‌شود ولی در طی این فرایندها ترکیباتی نظیر پراکسید هیدروژن (H2O2)، رادیکال هیدروکسیل $^{\bullet}(OH)$ و آنیون سوپراکسید $^{-\bullet}(O_2)$ نیز ایجاد می‌شود که گونه‌های اکسیژن فعال (Reactive oxygen Species- ROS) نامیده می‌شوند. چنانچه سیستم‌های دفاع آنتی اکسیدان، کارآیی لازم را نداشته باشند، مقادیر زیادی ROS در بدن تجمع می‌یابد و استرس اکسیداتیو رخ می‌دهد که منجر به تغییر ساختار بیومولکول‌هایی نظیر چربی‌ها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌شود. در هنگام وقوع استرس اکسیداتیو، ساختار ریشه‌های آمینو اسیدی در پروتئین‌ها دستخوش تغییر می‌گردد که میزان آسیب وارده بستگی به ماهیت و غلظت عوامل اکسیدان، میزان کارآئی سیستم آنتی اکسیدان و منابع رادیکال‌های آزاد دارد (3-1). مهم‌ترین تغییرات اکسیداتیو عبارتند از تبدیل متیونین به متیونین سولفوکسید، تیروزین به دی تیروزین، O تیروزین، نیتروتیروزین(4)، تشکیل 5 هیدروکسی 2 آمینووالریک اسید(5)، تغییر در میزان گروه‌های تیول پروتئین‌ها(6)، شکسته شدن رشته پلی پپتیدی (Fragmentation) یا ایجاد اتصالات عرضی جدید در یک رشته پروتئینی یا بین رشته‌های پلی پپتیدی مختلف و تجمع پروتئین‌ها (Aggregation)(9-7). تجمع بیومولکول‌های اکسید شده موجب بیماری‌هایی نظیر آترواسکلروز(10)، سرطان(11)، اختلالات عصبی(12)، بیماری‌های قلبی(13)، آلزایمر(14)، آرتریت و کاتاراکت(15) می‌شود. در حال حاضر اندازه‌گیری میزان گروه‌های کربنیل، به عنوان یک شاخص اساسی برای بررسی میزان اکسیداسیون پروتئین‌ها، مورد تأکید اکثر محققین قرار گرفته است(19-16).

آلبومین به عنوان یک شاخص پروتئینی مهم در سلامت و بیماری محسوب می‌شود و هر گونه تغییر در ساختار فضائی آن موجب اختلال در فعالیت بیولوژیک پلاسما می‌گردد زیرا آلبومین مهم‌ترین و عمده‌ترین جزء پروتئینی در پلاسما است که نقش اصلی در تنظیم فشار انکوتیک، انتقال ترکیبات غیر قطبی، ذخیره آمینواسیدها و انتقال متابولیت‌های هورمون‌ها را برعهده دارد، بنابر این لازم است که در استرس اکسیداتیو مورد توجه قرار گیرد. در این طرح تحقیقاتی اثرات غلظت‌های متفاوت آسکوربات بر ساختار آلبومین از طریق سنجش گروه‌های کربونیل و الکتروفورز پروتئین‌ها بررسی شده است. آسکوربات در رژیم غذایی ضروری است. این ویتامین در واکنش‌های هیدروکسیلاسیون پروتئین‌ها در بافت‌های مختلف نظیر بافت همبند و غضروف و استخوان نقش دارد. در بسیاری از بیماری‌ها، آسکوربات به صورت فرم‌های دارویی تجویز می‌شود. در حالی که تحقیقات جدید نشان داده است که آسکوربات هم به عنوان پرواکسیدان(23-20) و هم آنتی اکسیدان(24، 25) عمل می‌کند. در این تحقیق، در شرایط آزمایشگاهی، آسکوربات با غلظت‌های 6/25 تا 300 میلی مولار به نمونه‌های پروتئین اعم از آلبومین یا سرم انسان افزوده شد. سپس به منظور بررسی تغییرات اکسیداتیو، میزان گروه‌های کربنیل در پروتئین‌ها اندازه‌گیری شد. هم‌چنین تغییرات ساختمانی پروتئین‌ها با روش الکتروفورز، مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع تجربی و مبتنی بر مطالعه اکسیداسیون پروتئین‌های پلاسما و تغییر در طرح الکتروفورتیک آنها است. بنابر این نمونه‌های مورد استفاده، خون داوطلبین بوده که برای انجام آزمایشات، مورد استفاده قرار می‌گیرد. با توجه به تحقیقات قبلی ما در زمینه اکسیداسیون پروتئین‌ها و سنجش کربنیل، میزان خطای 0/18 قابل تحمل است و با پیش فرض‌های ضریب اطمینان 95 درصد و q=p=0/5 و z=1/96، طبق فرمول کوکران

($n=z^2pq/d^2$)، حجم نمونه مورد نیاز برای گروه‌های آزمون و کنترل معادل 60 مورد به دست آمد. کلیه مواد مورد استفاده در این تحقیق با درجه خلوص آنالیتیک از شرکت مرک آلمان خریداری گردید. برای آنالیز طیفی از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل بیوکروم ساخت انگلستان و برای الکتروفورز از دستگاه مدل عمودی ساخت شرکت بیوراد استفاده شد. پس از انتخاب افراد به صورت تصادفی، خون‌گیری از ورید با سرنگ انجام شد. با توجه به این که اثرات اکسیداتیو آسکوربات در آلبومین مد نظر بود، کلیه نمونه‌ها از افراد سالمی که دارو مصرف نمی‌کردند و دچار بیماری‌های مرتبط با استرس اکسیداتیو نبودند، تهیه گردید. هم‌چنین کلیه نمونه‌های خون مشکوک به همولیز، از مطالعه خارج شدند. این تحقیق در شرایط آزمایشگاهی در غلظت‌های 6/25، 12/5، 25، 50، 100، 150، 200، 250 و 300 میلی مولار آسکوربات انجام شد و در کلیه موارد از نمونه‌های شاهد (بدون حضور آسکوربات) استفاده گردید. بدین منظور 10 میکرولیتر از نمونه های پروتئین در شرایط هوازی در محیط کشت حاوی سیستم اکسیداسیون فلزی (metal catalyzed oxidation system-MCO) حاوی غلظت‌های مختلف آسکوربات قرار داده شد. در نمونه های شاهد، آسکوربات از محیط کشت حذف شد. در فواصل زمانی 4 تا 24 ساعت، فرآیند استرس اکسیداتیو متوقف شد. بدین منظور در هنگام سنجش کربنیل، از محلول 20 درصد تری کلرو استیک اسید استفاده و سپس با روش سانتریفوژ، پروتئین‌ها جدا شد ولی برای اجرای الکتروفورز، توقف استرس اکسیداتیو با افزودن بافر حاوی سدیم دودسیل سولفات و بتامرکاپتواتانل به نمونه‌های پروتئین و انکوباسیون در بن ماری جوش به مدت نیم ساعت انجام شد. در کلیه موارد، به منظور پرهیز از خطاهای احتمالی، بلافاصله پس از توقف واکنش، سنجش گروه‌های کربنیل و الکتروفورز انجام گردید.

برای سنجش کربنیل در آلبومین از روش پیشنهادی اوانس استفاده شد(26). در این تحقیق از معرف 2 و 4 دی نیتروفنیل هیدرازین (2,4 – dinitrophenylhydrazine: DNPH) استفاده شد که پس از واکنش با گروه‌های کربنیل موجب تشکیل مشتقات 2 و 4 دی نیتروفنیل هیدرازون (2,4 – dinitrophenylhydrazone) می‌شود:

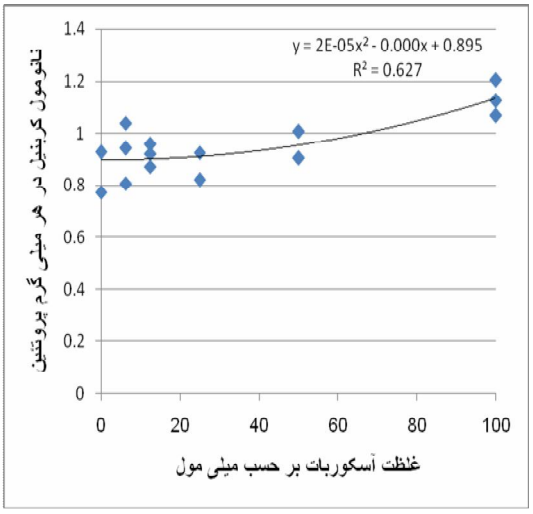
$$\mathrm{Protein}-C=O \xrightarrow{H_2N-NH-2,4-DNP} \mathrm{Protein}=N-NH-2,4-DNP+H_2O$$

جذب نوری این محصولات با روش اسپکتروفتومتری قابل اندازه گیری می‌باشد. بدین منظور حداکثر جذب نوری محلول نهایی و شاهد مربوطه (فقط حاوی اسید کلریدریک 2 مولار و پروتئین مورد مطالعه)، در محدوده طول موج 355 تا 390 نانومتر به دست آمد و سپس در ضریب 45/45 ضرب شد و نتیجه نهائی برحسب نانومول کربنیل در هر میلی‌گرم از پروتئین محاسبه گردید. برای سنجش پروتئین از روش برادفورد استفاده شد که از سرعت، سهولت و حساسیت بیشتری نسبت به سایر روش‌ها برخوردار است. در این تکنیک از رنگ کوماسی آبی G.250 استفاده شد که در محلول ارتوفسفریک اسید به فرم کاتیونی است و ماکزیمم جذب نوری آن در طول موج 470 نانومتر می باشد ولی پس از اتصال به پروتئین به فرم آنیونی تبدیل می‌شود که ماکزیمم جذب نوری کمپلکس حاصل در طول موج 595 نانومتر است(27). به منظور بررسی اثرات آسکوربات بر ساختار پروتئین‌های سرم و آلبومین، تکنیک الکتروفورز به روش SDS-PAGE در شرایط احیایی و بر اساس روش لاملی، با اندکی تغییرات اجراء گردید(28). الکتروفورز در سیستم بافری ناپیوسته تریس – گلیسین در ژل متراکم کننده 5 درصد با pH= 6/8 و ژل جداکننده 10 درصد با pH= 8/8 انجام شد. پس از تفکیک پروتئین‌ها در میدان الکتریکی 90 ولت (شدت جریان 15 الی 25 میلی‌آمپر) و رنگ آمیزی با کوماسی آبی یا نیترات نقره، باندهای حاصل مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. جهت تجزیه و تحلیل آماری از شاخص‌های میانگین، انحراف معیار و آنالیز

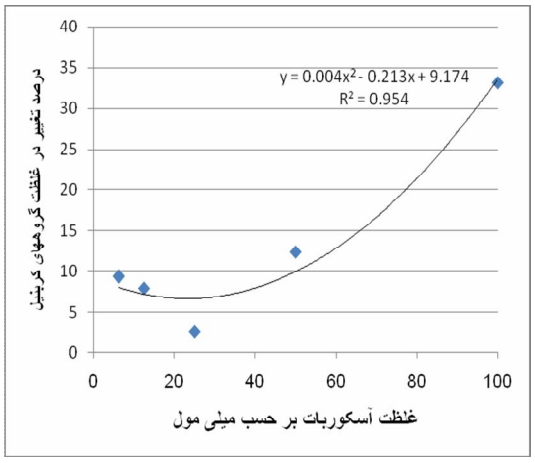
رگرسیون با استفاده از برنامه نرم افزاری Excel استفاده شد. این تحقیق با موافقت کمیته اخلاق در پژوهش‌های پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اراک اجرا و در تمام مراحل تحقیق، اصول بیانیه هلسینکی مورد توجه قرار گرفت.

یافته ها

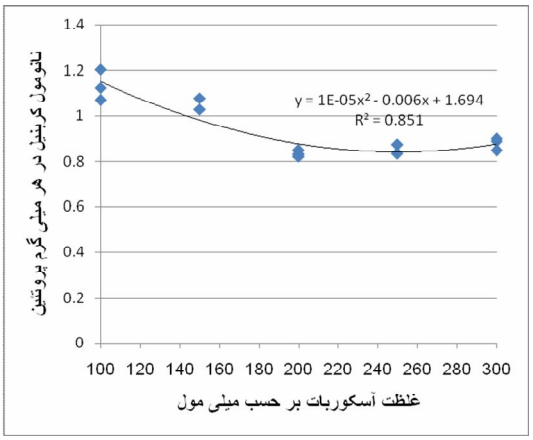
نمودارهای 1 تا 4 اثرات غلظت‌های مختلف آسکوربات را بر میزان کربنیل در آلبومین نشان می‌دهد. نتایج به دست آمده مبین وجود یک رابطه خطی بین غلظت آسکوربات و میزان کربنیل است. نمودار 1 نشان می‌دهد که متناسب با افزایش غلظت آسکوربات (از 6/25 تا 100 میلی‌مولار)، مقدار گروه‌های کربنیل آلبومین نیز افزایش می‌یابد، به طوری که از میزان 0/85±0/052 نانومول در هر میلی‌گرم پروتئین در نمونه‌های شاهد به 1/13±0/07 می‌رسد که از نظر آماری معنی‌دار است ($p<0/05$). در این شرایط رابطه بین غلظت آسکوربات با گروه‌های کربنیل از معادله $y=0/00002\ x^2 -0/000\ x +0/895$ با $R^2 =0/627$ تبعیت می‌کند. همان طوری که در نمودار 2 مشاهده می‌شود، در غلظت 100میلی مولار آسکوربات، مقدار گروه‌های کربنیل در آلبومین به میزان 33/2 درصد افزایش می‌یابد که از نظر آماری معنی‌دار است ($p<0/05$) و به صورت معادله $y =0/004\ x^2 -0/213\ x +9/174$ با $R^2 =0/954$ است. با توجه به نمودار 3 مشخص می‌شود که چنانچه غلظت آسکوربات از 100 میلی مولار بیشتر شود، بر خلاف نتایج قبلی، کاهش قابل ملاحظه‌ای در مقدار گروه‌های کربنیل آلبومین رخ می‌دهد. در غلظت 100 میلی مولار آسکوربات، مقدار کربنیل 1/13±0/07 نانومول در هر میلی‌گرم پروتئین است ولی در حضور غلظت 300 میلی مولار آسکوربات این مقدار به 0/89±0/03 می‌رسد که معادل 21/2 درصد کاهش در گروه‌های کربنیل آلبومین نسبت به گروه کنترل است. نمودار 4 نشان می‌دهد که در غلظت 300 میلی‌مولار آسکوربات، مقدار گروه‌های کربنیل آلبومین به میزان 3/41 درصد نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است که از نظر آماری معنی‌دار نیست ($p<0/05$).



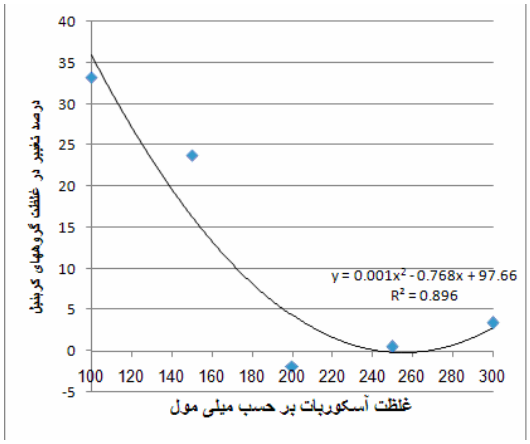
نمودار1. غلظت گروه های کربنیل در آلبومین سرم پس از انکوباسیون با غلظت های 6/25 تا 100 میلی مولار آسکوربات



نمودار2. درصد تغییر در گروه های کربنیل آلبومین سرم، پس از انکوباسیون با غلظت های 6/25 تا 100 میلی مولار آسکوربات

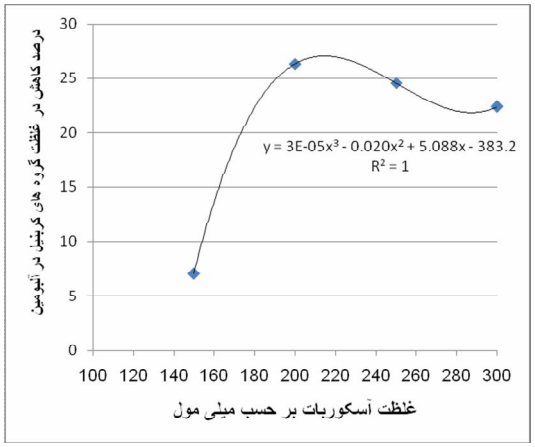


نمودار3. غلظت گروه های کربنیل در آلبومین سرم پس از انکوباسیون با غلظت های 100 تا 300 میلی مولار آسکوربات

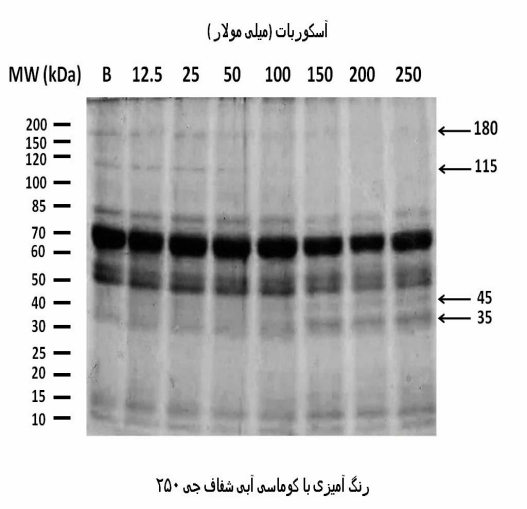


نمودار4. درصد تغییر در گروه های کربنیل آلبومین سرم، پس از انکوباسیون با غلظت های 100 تا 300 میلی مولار آسکوربات

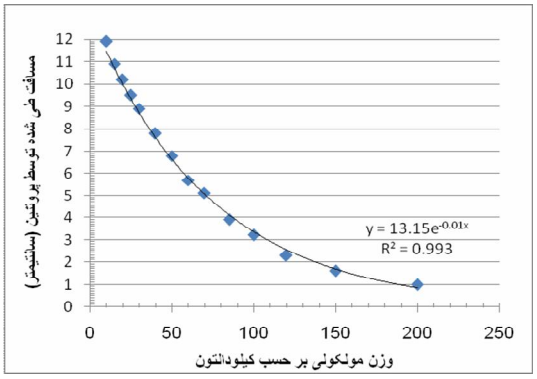
برای بررسی اثرات آنتی اکسیدان آسکوربات، درصد کاهش در کربنیل آلبومین در غلظت‌های 150 تا 300 میلی مولار آسکوربات نسبت به گروه‌های تحت انکوباسیون با غلظت 100 میلی مولار آسکوربات مقایسه شده است. همان طوری که در نمودار 5 مشاهده می‌شود، بیشترین اثر حفاظتی در غلظت‌های 220 تا 260 میلی مولار آسکوربات حاصل می‌شود. در این طرح تحقیقاتی برای بررسی بیشتر و دقیق‌تر، علاوه بر سنجش کربنیل، از روش الکتروفورز نیز استفاده شده است. شکل1 طرح الکتروفورتیک پروتئین‌های پلاسما را پس از انکوباسیون با غلظت‌های متفاوت آسکوربات نشان می‌دهد. برای به دست آوردن وزن مولکولی پروتئین‌ها، از نمودار استاندارد استفاده شد. بدین منظور رابطه بین وزن مولکولی پروتئین‌های مارکر و میزان حرکت در ژل الکتروفورز در نمودار 6 ارائه شده است. بر این اساس وزن مولکولی پروتئین‌های مورد مطالعه به دست می‌آید. با توجه به شکل 1 مشخص می‌شود که در غلظت 100 تا 250 میلی مولار آسکوربات، کاهش مقدار پروتئین‌ها در محدوده وزن مولکولی 115 تا 180 کیلودالتون اتفاق افتاده است که مبین تخریب پروتئین‌ها است. از طرف دیگر در محدوده وزن مولکولی 35 تا 45 کیلودالتون افزایش مقدار پروتئین‌ها مشاهده می‌شود.



نمودار5. درصد کاهش کربنیل در آلبومین سرم نسبت به نمونه هائی که تحت انکوباسیون با غلظت 100 میلی مولار آسکوربات قرار داشته اند



شکل1. طرح الکتروفورتیک پروتئین های سرم پس از انکوباسیون با غلظت های متفاوت آسکوربات



نمودار6. میزان حرکت پروتئین های استاندارد در ژل ده درصد SDS-PAGE. این نمودار رابطه بین وزن مولکولی و مسافت طی شده توسط پروتئین ها را نشان می‌دهد

بحث

اکسیژن برای تنفس سلولی و تولید انرژی ضروری است. هم‌چنین بیوترانسفورماسیون ترکیبات گزنوبیوتیک عمدتاً از طریق واکنش‌های اکسیداسیون انجام می‌شود ولی طی این فرایندها محصولات سمی نظیر پراکسید هیدروژن($H2O2$)، رادیکال هیدروکسیل $(OH)^{\bullet}$ و آنیون سوپراکسید $(O_2)^{-\bullet}$ ایجاد می‌شود که گونه‌های اکسیژن فعال نامیده می‌شوند. چنانچه سیستم‌های دفاع آنتی اکسیدان، کارآئی لازم را نداشته باشند استرس اکسیداتیو رخ می‌دهد. در هنگام وقوع استرس اکسیداتیو، ساختار ریشه‌های آمینو اسیدی در پروتئین‌ها دست‌خوش تغییر می‌گردد(29) که میزان آسیب وارده بستگی به تعادل بین عوامل اکسیدان و سیستم‌های آنتی اکسیدان دارد(1، 2 ،30). در اثر استرس اکسیداتیو گروه‌های کربنیل در ریشه‌های آمینواسیدی شکل می‌گیرد. هم‌چنین پروتئین‌های اکسید شده تمایل دارند که تجمع یافته اتصالات عرضی کووالانس تشکیل دهند. این اتصالات ممکن است در یک رشته پروتئینی یا بین رشته‌های پلی پپتیدی مختلف ایجاد شود. در سلول‌های پستانداران، اکسیداسیون پروتئین‌ها نهایتا منجر به تجزیه آنها می‌شود(31). علیرغم وجود سدهای دفاعی متعدد، محافظت در برابر ROS کامل نیست و اختلالات متعددی در بافت‌های بدن ایجاد می‌شود(32، 33). مطالعات قبلی ما نشان داده است که فرم‌های مختلف ویتامین K باعث تشکیل لیپیدپراکسید در پلاسما و آسیب به کبد(34)، اکسیداسیون چربی‌ها در گلبول‌های قرمز(35)، اکسیداسیون پروتئین‌های غشائی در گلبول‌های قرمز(36) و تشکیل گروه‌های کربنیل در پروتئین‌های پلاسما(37) می‌شود. در این طرح تحقیقاتی اثرات آسکوربات بر آلبومین سرم مورد بررسی قرار گرفته است. آسکوربات علاوه بر نقش کوفاکتوری، در فرایندهای اکسیداسیون-احیا نیز شرکت دارد. این ویتامین در غلظت‌های کم، فلزات واسطه را احیاء کرده موجب تشکیل رادیکال آزاد می‌شود. هم‌چنین در حضور فلزات واسطه نظیر مس و آهن، به عنوان پرواکسیدان عمل می‌کند (38) و موجب تولید ROS (39) یا پروتئین‌های گلیکاته(39) می‌شود. آسکوربات در میکروزوم‌های کبد موش صحرائی باعث اکسیداسیون گروه‌های تیول پروتئین‌ها می‌شود(40). به نظر می‌رسد که یک متالوپروتئین در وزیکول‌های میکروزومی وجود دارد که موجب تبدیل آسکوربات به دهیدروآسکوربات می‌گردد(41). دهیدروآسکوربات پس از ورود به فضای لومن در شبکه آندوپلاسمی(42) باعث اکسید شدن سایر مولکول‌های آسکوربات و در نهایت اکسید شدن گروه‌های تیول در پروتئین‌های مختلف می‌شود که این فرایند برای تشکیل کنفورماسیون طبیعی آنها ضروری است(43). به همین دلیل اثرات پرواکسیدان آسکوربات می‌تواند برای موجود زنده مفید نیز واقع گردد. از طرف دیگر آسکوربات در غلظت‌های بالا قادر به جمع‌آوری رادیکال‌های هیدروکسیل و آنیون سوپر اکسید است. به همین دلیل به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل آنتی اکسیدان محلول در مایعات بیولوژیک و سیتوزول سلول نیز محسوب می‌شود. این ویتامین الکترون در اختیار رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن قرار می‌دهد، سمی کینون‌ها و کینون‌ها را احیاء می‌کند، اسیدهای نوکلئیک و چربی‌ها را در مقابل آسیب اکسیداتیو محافظت می‌کند و موجب احیاء شدن رادیکال‌های توکوفریل و جلوگیری از اثرات تخریبی پراکسید می‌شود(44). تجمع داخلی سلولی اسید آسکوربیک احتمالاً موجب مهار آپوپتوز ناشی از استرس اکسیداتیو می‌شود(45، 46). بسیاری از ترکیبات خارجی که آنزیم‌های میکروزومی را فعال می‌کنند سبب افزایش بیوسنتز اسید آسکوربیک نیز می‌گردند. خواص آنتی اکسیدان آسکوربات کاربرد وسیعی در درمان بیماری‌ها دارد(49-47). در این تحقیق اثرات آنتی اکسیدان آسکوربات نیز مورد توجه قرارگرفته است. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که چنانچه غلظت آسکوربات در محیط کشت از 100 میلی مولار بیشتر شود، کاهش قابل ملاحظه‌ای در مقدار گروه‌های کربنیل آلبومین رخ می‌دهد، به طوری که در غلظت 300 میلی مولار مقدار کربنیل در آلبومین به میزان 21/2 درصد کاهش می‌یابد. هم‌چنین مشخص شد که بیشترین اثر حفاظتی آسکوربات در

غلظت‌های 200 تا 220 میلی مولار حاصل می‌شود. نتایج حاصل از الکتروفورز به روش SDS-PAGE نشان داد که در غلظت 100 تا 250 میلی مولار آسکوربات، کاهش مقدار پروتئین‌ها در محدوده وزن مولکولی 115 تا 180 کیلودالتون اتفاق افتاده است که مبین تخریب پروتئین‌ها است. در این محدوده پروتئین واکنش‌گر C، سرولوپلاسمین، IgG، IgA و پروتئین C3 به ترتیب با وزن مولکولی 115، 132، 144، 160 و 180 کیلودالتون قرار دارند. از طرف دیگر در محدوده وزن مولکولی 35 تا 45 کیلودالتون افزایش مقدار پروتئین‌ها وجود دارد. این امر نشان دهنده تخریب پروتئین‌های بزرگ‌تر و تشکیل قطعات پروتئینی کوچک‌تر با وزن مولکولی 35 تا 45 کیلودالتون است.

نتیجه گیری

اگرچه آسکوربات بخشی از سیستم آنتی اکسیدان سرم است، ولی در غلظت‌های پائین، به ویژه در حضور یون‌های فلزی نظیر آهن و مس، زمینه تشکیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن را فراهم می‌کند. در این شرایط پروتئین‌ها در معرض استرس اکسیداتیو قرار می‌گیرند. ادامه این روند، زمینه ساز اختلالات بیوشیمیائی است. نتایج این تحقیق نشان دهنده اثرات پرواکسیدان و آنتی اکسیدان آسکوربات بر تشکیل گروه‌های کربنیل در آلبومین سرم است. برای بررسی این اثرات، از روش سنجش کربنیل استفاده شده است. با توجه به این که تحقیقات متعدد نشان داده است که میزان گروه‌های کربنیل به عنوان شاخص معتبری برای بررسی اکسیداسیون پروتئین‌ها محسوب می‌شود و تجهیزات مورد نیاز در تمام آزمایشگاه‌های بیوشیمی وجود دارد، پیشنهاد می‌شود که مطالعات بیشتری در این زمینه انجام شود و ارزش بالینی این تکنیک‌ها در تشخیص بیماری‌ها، ارزیابی اثرات ویتامین‌ها و نقش یون‌های فلزی در استرس اکسیداتیو مورد توجه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله منتج از طرح تحقیقاتی تحت عنوان "مطالعه نقش آسکوربات در تشکیل گروه‌های کربنیل در آلبومین سرم" با شماره ثبت 453 و با کد 4-81-89 از شورای اخلاق است که با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک، در گروه بیوشیمی، تغذیه و ژنتیک و مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی انجام شده است. بدین وسیله از مساعدت مسئولین محترم در اجرای این طرح تحقیقاتی، قدردانی می‌شود.

منابع

1. Lesgards JF, Gauthier C, Iovanna J, Vidal N, Dolla A, Stocker P. Effect of reactive oxygen and carbonyl species on crucial cellular antioxidant enzymes. Chem Biol Interact. 2011;190(1):28-34.
2. Kaufman RJ, Back SH, Song B, Han J, Hassler J. The unfolded protein response is required to maintain the integrity of the endoplasmic reticulum, prevent oxidative stress and preserve differentiation in β-cells. Diabetes Obes Metab. 2010;12 Suppl 2:99-107.
3. Ugarte N, Petropoulos I, Friguet B. Oxidized mitochondrial protein degradation and repair in aging and oxidative stress. Antioxid Redox Signal. 2010;13(4):539-49.
4. DiMarco T, Giulivi C. Current analytical methods for the detection of dityrosine, a biomarker of oxidative stress, in biological samples. Mass Spectrom Rev. 2007;26(1):108-20.
5. Pietzsch J, Bergmann R. Measurement of 5-hydroxy-2-aminovaleric acid as a specific marker of metal catalysed oxidation of proline and arginine residues of low density lipoprotein apolipoprotein B-100 in human atherosclerotic lesions. J Clin Pathol. 2003;56(8):622-3.
6. Agarwal S, Sohal RS. Relationship between susceptibility to protein oxidation, aging, and maximum life span potential of different species. Exp Gerontol. 1996;31(3):365-72.
7. Tabner BJ, El-Agnaf OM, German MJ, Fullwood NJ, Allsop D. Protein aggregation, metals and oxidative stress in neurodegenerative diseases. Biochem Soc Trans. 2005;33(Pt 5):1082-6.
8. Norris EH, Giasson BI. Role of oxidative damage in protein aggregation associated with

Parkinson's disease and related disorders. Antioxid Redox Signal. 2005;7(5-6):672-84.
9. Squier TC. Oxidative stress and protein aggregation during biological aging. Exp Gerontol. 2001;36(9):1539-50.
10. Uno K, Nicholls SJ. Biomarkers of inflammation and oxidative stress in atherosclerosis. Biomark Med. 2010;4(3):361-73.
11. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? Free Radic Biol Med. 2010;49(11):1603-16.
12. Essick EE, Sam F. Oxidative stress and autophagy in cardiac disease, neurological disorders, aging and cancer. Oxid Med Cell Longev. 2010;3(3):168-77.
13. Gella A, Durany N. Oxidative stress in Alzheimer disease. Cell Adh Migr. 2009; 3(1): 88-93.
14. Matyska-Piekarska E, Łuszczewski A, Łacki J, Wawer I. [The role of oxidative stress in the etiopathogenesis of rheumatoid arthritis]. Postepy Hig Med Dosw (Online). 2006;60:617-23.
15. Kottler UB, Dick HB, Augustin AJ. [Is a cataract avoidable? Current status with special emphasis on the pathophysiology of oxidative lens damage, nutritional factors, and the ARED study]. Ophthalmologe. 2003;100(3):190-6.
16. Burcham PC. Modified protein carbonyl assay detects oxidised membrane proteins: a new tool for assessing drug- and chemically-induced oxidative cell injury. J Pharmacol Toxicol Methods. 2007;56(1):18-22.
17. Shibamoto T. Analytical methods for trace levels of reactive carbonyl compounds formed in lipid peroxidation systems. J Pharm Biomed Anal. 2006;41(1):12-25.
18. Stefek M, Trnkova Z, Krizanova L. 2,4-dinitrophenylhydrazine carbonyl assay in metal-catalysed protein glycoxidation. Redox Rep. 1999; 4(1-2):43-8.
19. Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. Methods Enzymol. 1994; 233: 357-63.
20. Chen Q, Espey MG, Sun AY, Pooput C, Kirk KL, Krishna MC, et al. Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(32):11105-9.
21. Courtois F, Delvin E, Ledoux M, Seidman E, Lavoie JC, Levy E. The antioxidant BHT normalizes some oxidative effects of iron + ascorbate on lipid metabolism in Caco-2 cells. J Nutr. 2002;132(6):1289-92.
22. Rózanowski B, Burke J, Sarna T, Rózanowska M. The pro-oxidant effects of interactions of ascorbate with photoexcited melanin fade away with aging of the retina. Photochem Photobiol. 2008;84(3):658-70.
23. Ozgová S, Hermánek J, Gut I. Different antioxidant effects of polyphenols on lipid peroxidation and hydroxyl radicals in the NADPH-, Fe-ascorbate- and Fe-microsomal systems. Biochem Pharmacol. 2003;66(7):1127-37.
24. Drew KL, Tøien Ø, Rivera PM, Smith MA, Perry G, Rice ME. Role of the antioxidant ascorbate in hibernation and warming from hibernation. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2002;133(4):483-92.
25. Barbehenn RV, Bumgarner SL, Roosen EF, Martin MM. Antioxidant defenses in caterpillars: role of the ascorbate-recycling system in the midgut lumen. J Insect Physiol. 2001; 47(4-5): 349-57.
26. Evans P, Lyras L, Halliwell B. Measurement of protein carbonyls in human brain tissue. Methods Enzymol. 1999;300:145-56.
27. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976;72:248-54.
28. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;227(5259):680-5.
29. Stadtman ER. Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. Annu Rev Biochem. 1993;62:797-821.
30. Halliwell B, Gutteridge JM. The antioxidants of human extracellular fluids. Arch Biochem Biophys. 1990;280(1):1-8.

31. Grune T, Reinheckel T, Davies KJ. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. FASEB J. 1997;11(7):526-34.
32. Bánhegyi G, Benedetti A, Csala M, Mandl J. Stress on redox. FEBS Lett. 2007; 581(19): 3634-40.
33. Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Münzel T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. Circulation. 2001; 104(22):2673-8.
34. Ansari Hadipour H, Allameh A, Kazemnejad A. Relationship between antioxidant power of plasma with lipid peroxide formation in plasma and liver damages caused by overdose of vitamin K1 in adult and weanling rats. Acta Medica Iranica. 2003;41(4):207-13.
35. Ansarihadipour H, Allameh A. Relationship between lipid peroxide formation and antioxidant capacity in erythrocytes taken from adult and suckling rats treated with phylloquinone. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 2003; 41: 534.
36. Ansarihadipour H. Allameh A. Vitamin K1 effects on lipid and protein oxidation in erythrocyte membrane and total antioxidant capacity of plasma in developing rats. Proceeding of 18th European workshop on drug metabolism; 2002; Valencia, Spain.
37. Ansarihadipour H, Allameh A, Jalali Mashayekhi F. Formation of plasma protein carbonyl groups and lipid peroxide in adult and sucking rats treated with menadione. Proceeding of 7th Iranian congress of toxicology and poisoning & new medical and paramedical sciences; 2002; Isfahan, Iran.
38. Buettner GR, Jurkiewicz BA. Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid. Radiat Res. 1996; 145(5): 532-41.
39. Duarte TL, Lunec J. Review: When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. Free Radic Res. 2005;39(7):671-86.
40. Csala M, Braun L, Mile V, Kardon T, Szarka A, Kupcsulik P, et al. Ascorbate-mediated electron transfer in protein thiol oxidation in the endoplasmic reticulum. FEBS Lett. 1999;460(3):539-43.
41. Szarka A, Stadler K, Jenei V, Margittai E, Csala M, Jakus J, et al. Ascorbyl free radical and dehydroascorbate formation in rat liver endoplasmic reticulum. J Bioenerg Biomembr. 2002; 34(4): 317-23.
42. Csala M, Mile V, Benedetti A, Mandl J, Bánhegyi G. Ascorbate oxidation is a prerequisite for its transport into rat liver microsomal vesicles. Biochem J. 2000;349(Pt 2):413-5.
43. Nardai G, Braun L, Csala M, Mile V, Csermely P, Benedetti A, et al. Protein-disulfide isomerase- and protein thiol-dependent dehydroascorbate reduction and ascorbate accumulation in the lumen of the endoplasmic reticulum. J Biol Chem. 2001;276(12):8825-8.
44. Meister A. On the antioxidant effects of ascorbic acid and glutathione. Biochem Pharmacol. 1992; 44(10): 1905-15.
45. 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. Biochem Pharmacol. 1999; 57(7):823-32.
46. Asmis R, Wintergerst ES. Dehydroascorbic acid prevents apoptosis induced by oxidized low-density lipoprotein in human monocyte-derived macrophages. Eur J Biochem. 1998; 255(1): 147-55.
47. Li Y, Schellhorn HE. New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. J Nutr. 2007;137(10):2171-84.
48. Linster CL, Van Schaftingen E. Vitamin C. Biosynthesis, recycling and degradation in mammals. FEBS J. 2007;274(1):1-22.
49. Birlouez-Aragon I, Tessier FJ. Antioxidant vitamins and degenerative pathologies. A review of vitamin C. J Nutr Health Aging. 2003; 7(2):103-9.