

## **The effect of long-term exposure to oxidative stress on the structure of recombinant human coagulation factor VIII**

Ansarihadipour H(PhD)<sup>1\*</sup>, Bahadorivatankhah A(B.Sc)<sup>2</sup>, Ziraki S(B.Sc)<sup>2</sup>, Saiadi M(B.Sc)<sup>2</sup>

1- Department of Biochemistry, Nutrition and Genetics, Molecular and Medical Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

2- Student Research Committee, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

Received: 29 Jan 2012, Accepted: 13 Jun 2012

### **Abstract**

**Background:** The presence of oxidant agents yields higher levels of free radical reaction products in erythrocyte membrane proteins and serum proteins. The aim of this study is to investigate the oxidative modifications of recombinant human coagulation factor VIII (rHFVIII) by spectrophotometric analysis.

**Materials and Methods:** In this experimental study, rHFVIII was incubated aerobically with vitamin C and ferro ions in metal catalyzed oxidation (MCO) system for 4 to 28 hr. Carbonyl assay was used as an index of protein oxidation. For this purpose, 2,4-dinitrophenyl hydrazine (DNPH) was used. Reaction of this reagent with carbonyl groups produces dinitrophenylhydrazone derivatives that their concentration was estimated by spectrophotometry.

**Results:** Carbonyl groups in rHFVIII changed in the presence of vitamin C and ferro ions. Dose-dependent effects of vitamin C showed a decrease in carbonyl groups of rHFVIII while ferro ions increased oxidation and carbonyl group formation in this protein.

**Conclusion:** These findings indicate that changes in carbonyl groups in rHFVIII are related to the generation of reactive oxygen species. Also, antioxidant mechanisms are activated in a dose- and time-dependent manner.

**Keywords:** Carbonyl group, Oxidative stress, Recombinant human coagulation factor VIII

\*Corresponding author:

Address: Department of Biochemistry, Nutrition, and Genetics, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

Email: ansari@arakmu.ac.ir

## اثر طولانی مدت استرس اکسیداتیو، بر ساختار فاکتور 8 انعقادی نو ترکیب

هادی انصاری هادی پور<sup>1\*</sup>، علی بهادری وطن خواه<sup>2</sup>، سعید زیر کی<sup>2</sup>، محمد صیادی<sup>2</sup>

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 دانشجویی، 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 از مطالعه حاضر بررسی تغییرات اکسیداتیو در فاکتور 8 انعقادی انسان با روش آنالیز اسپکتروفتومتریک می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی، فاکتور 8 انعقادی نو ترکیب انسانی در شرایط هوایی 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 نیترو فنیل 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 نو ترکیب 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 نو ترکیب 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 نو ترکیب انسان

\*نویسنده مسئول: اراک، میدان بسیج، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی، تغذیه و ژنتیک و مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی

Email: ansari@arakmu.ac.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 نو ترکیب سلولی پستانداران تهیه شد. فاکتور 8 نو ترکیب 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 نو ترکیب 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 میلی گرم فاکتور 8 نو ترکیب حدود 680 دلار است(1). علاوه بر هزینه زیاد، استفاده از rFVIII مشکلاتی نظیر ایمنوژنسیستی، ایجاد آنتی بادی اتصالی و آنتی بادی خنثی کننده یا مهارتی (anti-FVIII inhibitory antibody) را به همراه دارد(4) و بدین ترتیب با مطرح شدن فرآیند مهارکنندگی، روند کنترل بیماری پیچیده تر شده است(5). فاکتور انعقادی 8 به صورت یک پروتئین با 2332 اسید آمینه و وزن مولکولی 300 کیلو دالتون 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 هترو دایمر ترشح می‌شود و زیر واحدها توسط کاتیون‌های دو ظرفیتی 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). هم چنین اثرات یون مس بر میزان اتصال زیر واحدهای فاکتور 8 و تشکیل کنفورماسیون فضائی فعال(11) و اثرات کاتیون‌های آلومینیوم، تریوم، کبالت و فربیک 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 بوتیلید هیدروکسی آیزول، اسید آسکوربیک و ان استیل سیستین 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 دو ظرفیتی اکسید کننده 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 نو ترکیب انسان (Recombinant 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.

## 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 سانتیفرژ، 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 نیترو فنیل هیدرازین (2,4-dinitrophenylhydrazine-DNPH) استفاده شد که پس از واکنش با گروه‌های کربنیل موجب تشکیل مشتقات دی نیترو فنیل 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:

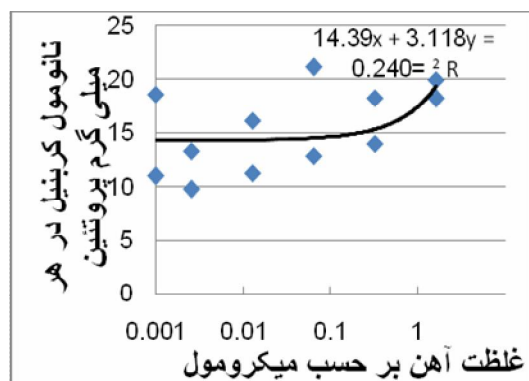
$$\text{Carbonyl concentration (nmol/ml)} = \Delta A(355-390\text{nm}) \times 45.45$$

$$\text{Carbonyl concentration (nmol/mg of protein)} = \text{nmol of carbonyl/protein concentration in mg/ml}$$

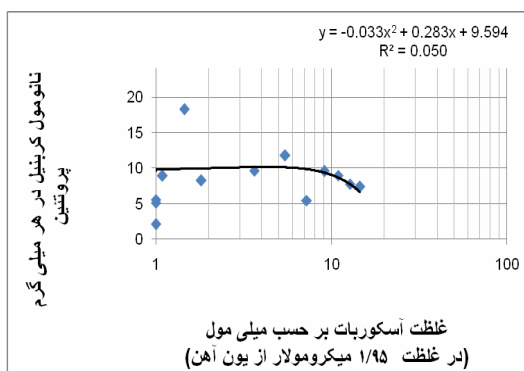
برای اندازه‌گیری غلظت پروتئین، جذب نوری محلول‌ها در طول موج 280 نانومتر اندازه‌گیری شد سپس با استفاده از نمودار استاندارد، غلظت HFVIII در نمونه‌های مورد بررسی محاسبه گردید. جهت تجزیه و تحلیل آماری از شاخص‌های میانگین و انحراف معیار و آنالیز رگرسیون استفاده شد. این تحقیق با موافقت کمیته اخلاق در پژوهش‌های 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 و 2 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  $14/9 \pm 5/4$  نانومول در هر میلی‌گرم پروتئین در نمونه‌های شاهد به  $19/1 \pm 1/2$  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.

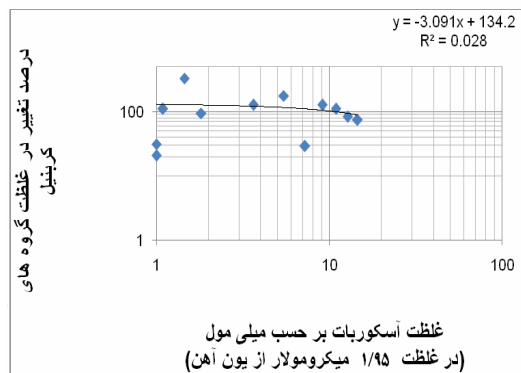


نمودار 1. غلظت گروه‌های کربنیل در HFVIII، پس از آنکوباسیون در غلظت‌های صفر تا 1/6 میکرو مولار آهن



نمودار 3. غلظت گروه‌های کربنیل در HFVIII، پس از انکوباسیون در غلظت‌های صفر تا 14/54 میلی مولار آسکوربات و حاوی 1,95 میکرومول یون آهن

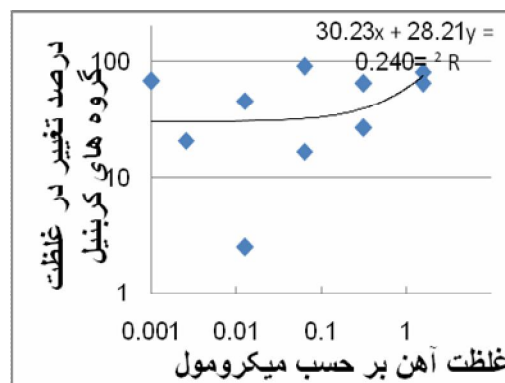
به منظور تکمیل این نتایج، غلظت آهن به میزان 4 برابر افزایش داده شد و به 7/8 میکرومول در لیتر رسانده شد. نمودار 4 نیز نشان می‌دهد که میزان تغییر در گروه‌های کربنیل در HFVIII، معادل 332 درصد افزایش و سپس 74 درصد کاهش است. این تغییرات از معادله  $y = -3/091x + 134/2$  با  $R^2 = 0/028$  تبعیت می‌کند و از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



نمودار 4. 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 میلی مولار آسکوربات قرار داده شد. نمودار 5 نشان می‌دهد که با افزایش غلظت آسکوربات، میزان گروه‌های کربنیل در HFVIII از 8/97 نانومول در هر میلی گرم

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 میکرومول آهن

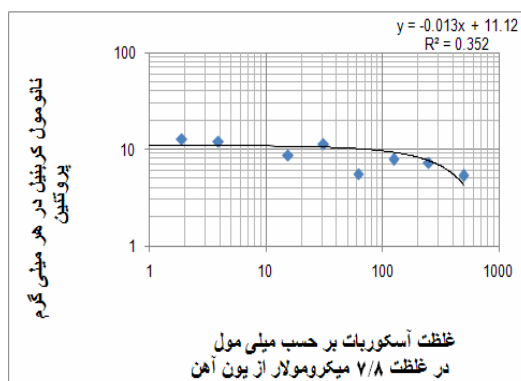
در ادامه این تحقیق، برای بررسی اثرات آسکوربات، HFVIII در معرض غلظت 7/8 میکرومولار آهن و مقادیر متفاوتی از آسکوربات قرار داده شد. با توجه به نمودار 3 مشخص می‌شود که با افزایش غلظت آسکوربات، میزان گروه‌های کربنیل در HFVIII از 4/23 به 18/25 نانومول در هر میلی گرم پروتئین افزایش و سپس به 7/37 نانومول در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

نمودارهای 3 و 5 مشخص می‌شود که آسکوربات دارای نقش محافظتی آنتی اکسیدان بر فاکتور 8 انعقادی نو ترکیب انسان است، به طوری که اگر غلظت آسکوربات در محیط کشت از 100 میلی مولار بیشتر شود، کاهش قابل ملاحظه‌ای در مقدار گروه‌های کربنیل فاکتور 8 مشاهده می‌گردد و بیشترین اثرات حفاظتی آسکوربات در غلظت 500 میلی مولار حاصل می‌شود.

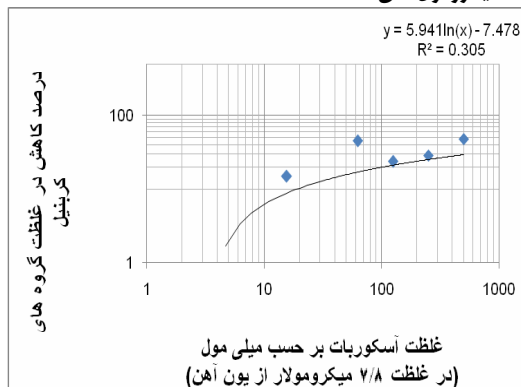
با توجه به این که ایجاد غلظت‌های 500 میلی مولار آسکوربات از نظر فارماکولوژیک مشکل به نظر می‌رسد و علاوه بر آسکوربات عوامل آنتی اکسیدان دیگری نیز وجود دارند که سدهای دفاعی متعددی را هم در سلول‌ها و هم در پلاسمای خون ایجاد کرده‌اند، پیشنهاد می‌شود که علاوه بر آسکوربات پارامترهای بیوشیمیایی دیگری نظیر گلوکاتایون، 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

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. همان‌طور 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 ( $p < 0.05$ ).



نمودار 5. غلظت گروه‌های کربنیل در HFVIII، پس از انکوباسیون در غلظت‌های صفر تا 500 میلی مولار آسکوربات و 7/8 میکرومول آهن



نمودار 6. درصد تغییر در گروه‌های کربنیل، پس از انکوباسیون HFVIII در محلول حاوی 7/8 میکرومول آهن و غلظت‌های 0/05 تا 500 میلی مولار آسکوربات

## بحث

در مطالعه حاضر، تغییرات ساختاری فاکتور 8 انعقادی نو ترکیب انسان، در حضور غلظت‌های مختلف آسکوربات و آهن مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به

آقای علی نیکدل برای در اختیار قرار دادن فاکتور 8 انعقادی نو ترکیب 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. Mn<sup>2+</sup> binding to factor VIII subunits and its effect on cofactor activity. Biochemistry. 2003; 42(1):145-53.

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

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

### نتیجه گیری

وجود دوزهای بالای آهن در جریان خون، زمینه تشکیل رادیکال های آزاد اکسیژن را فراهم می کند. در این شرایط فاکتور 8 انعقادی در معرض استرس اکسیداتیو قرار می گیرد. ادامه این فرآیند موجب اختلال در مکانیسم های انعقادی و در نهایت طولانی شدن زمان انعقاد خون می شود که زمینه خونریزی های داخلی را فراهم می کند. نتایج این تحقیق نشان می دهد که آنالیز طیفی و سنجش کربنیل در فاکتور 8 انعقادی انسان، روش دقیق و مناسبی برای پی گیری وضعیت سلامتی در مبتلایان به هموفیلی و افراد تحت درمان با فاکتور 8 انعقادی نو ترکیب 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 پژوهش های پزشکی، با کد 88-73-9-98 مورد موافقت قرار گرفته و در گروه بیوشیمی و مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی به انجام رسیده است. بدینوسیله از مساعدت مسئولین محترم قدردانی می شود. هم چنین از کانون هموفیلی ایران و جناب

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. *Iranian 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.