بررسی اثر گلوکز بر ساختار آلبومین سرم انسانی

مونا زمانیان عضدی[۱]، سمیرا گیلانچی[۱*]، پونه امینی گرام[۲]، سعیده حاج حسینی[۲]، کریمه حقانی[۳]

۱) مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران

۲) دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران

۳) گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

تاریخ دریافت: ۹۲/۳/۸ تاریخ پذیرش: ۹۲/۶/۶

چکیده

مقدمه: با توجه به نقش حیاتی آلبومین سرم انسانی در بدن انسان، مطالعه و بررسی این پروتئین دارای اهمیت است. یکی از ویژگی های شاخص این مولکول در برقراری اتصالات لیگاندی است که در این مطالعه، این ویژگی با بکارگیری سورفاکتانت سدیم دودسیل سولفات به عنوان لیگاند تحت شرایط دمایی نرمال و پاتولوژیک در غلظت های نرمال و دیابتی قند مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش ها: در این مطالعه از روش طیف سنجی فرابنفش برای آنالیز آلبومین سرم انسانی در غلظت های مختلف گلوکز در شرایط غلظت نرمال، بحرانی و دیابتی با حضور سورفاکتانت آنیونی سدیم دودسیل سولفات با غلظت های ۲، ۱/۵، ۱، ۰/۵ میلی مولار به عنوان معیاری برای سنجش اتصالات لیگاندی در شرایط نرمال دمایی و تب در نظر گرفته شد.

یافته های پژوهش: پروتئین آلبومین سرم انسانی در حضور غلظت های مختلف قند در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد دچار تغییرات ساختاری می شود. غلظت ۴۰۰ میلی گرم بر دسی لیتر گلوکز موثرترین عامل نسبت به سایر غلظت های گلوکز در تغییر ساختار آلبومین است.

بحث و نتیجه گیری: در این مطالعه علاوه بر این که نشان داده شد در حضور غلظت نرمال(فیزیولوژیک) قند تب می تواند ساختار آلبومین را دستخوش تغییر نماید، مشخص شد که غلظت های بالای گلوکز(شرایط حاد دیابتی) تاثیرات شدیدی بر ساختار و عملکرد آلبومین دارد.

واژه های کلیدی: آلبومین سرم انسانی، اتصالات لیگاندی، تغییرات ساختاری، سدیم دودسیل سولفات(SDS)، طیف سنجی فرابنفش، دیابت

*نویسنده مسئول: مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران

Email: samira.guilanchi@gmail.com

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-17]

مقدمه

آلبومین حجیم ترین پروتئین پلاسما، یک مولتی دومین ماکرومولکول و شامل ۳ دومین هومولوگ، تک رشته، قلبی شکل، همراه با ۵۸۵ اسیدآمینه با وزن مولکولی ۶۷/۵ کیلودالتون است که حفظ فشار انکوتیک و برقراری تعادل در حفظ مایعات بدن و دما در بخش های مختلف سیستم بدن انسان از جمله وظایف اصلی این تنظیم کننده است و از سلول های کبدی ترشح می شود،(۱،۲). نقش این مولکول در برقراری فشار اسمزی تا ۸۰ درصد شناخته شده است،(۳). بر اساس مطالعات انجام شده ژن این پروتئین روی کروموزوم شماره ۴ واقع است،(۴). از جمله خواص ویژه آن می توان به قابلیت برقراری اتصال به طور برگشت پذیر به مولکول های دیگر که به اصلاح اتصالات لیگاندی که در بخش های هیدروفوبی ساب دومین است، نام برد،(۵،۶). این اتصالات کووالانی گذرا به طور معمول با یکسری ترکیبات اگزوژن و اندوژن برقرار می شود که گرایش آلبومین برای برقراری این گونه اتصالات بسته به میزان K_d بسیار بالا است،(۷). لیگاندها نقش به سزایی در تغییرات ساختار فضایی مولکول آلبومین دارند که با اتصال به جایگاه های مختلف آلبومین منتقل می شوند و این تغییرات همراه با تغییرات ساختار دوم پروتئین است. در واقع آلبومین از جمله انتقال دهنده اصلی اسیدهای چرب، داروها و یون هایی از قبیل Cu^{+2} و Zn^{+2} ،(۸،۹)، کاهنده خواص سمی بسیاری از متابولیت ها، نشان دهنده خواص آنزیمی و در برگیرنده خواص آنتی اکسیدانی پلاسما است. آلبومین نیز می تواند روی خواص فارموکینتیک داروها اثرگذار باشد،(۱۰). به علاوه آلبومین می تواند به عنوان یک بیومارکر برای بسیاری از بیماری ها نظیر سرطان، هیپرگلیسمی، ایسکمی، چاقی، رماتوئید آرتریت و بررسی عملکرد کبد در حیطه پزشکی مورد استفاده قرار گیرد،(۱۳-۱۱). به علت ارزان قیمت بودن این پروتئین، مطالعات بیوشیمیایی زیادی روی آن صورت گرفته است،(۱). این پروتئین نانوحامل هم چنین نقش مهمی درکشف دارویی دارد،(۱۴،۱۵)، که می توان با استفاده از روش های نشان دار کردن و مهندسی، اثرات داروها و هورمان های متصل شونده به آن را ردیابی کرد. از جمله این موارد می توان به تحقیقات انجام شده در رابطه با هورمون انسولین اشاره کرد که به طور تزریقی در بیماران دیابتی مصرف می شود و می توان با انجام تغییرات ساختاری در انسولین تمایل این دارو پپتیدی را به آلبومین بالا برد و اثرات بیولوژیک و نیمه عمر آن را در این بیماران افزایش داد،(۱۶). مطالعات کریستالوگرافی X، اسپکتروسکوپیک و آلبومین های نوترکیب، اطلاعات مهمی را در رابطه با خواص اتصالات لیگاندی به ما داده است که در زمینه تمایل این مولکول حیاتی با داروها می توان به دست آورد. به طوری که این اتصالات نقش مهمی را در خواص فارماکوکینتیک دارو از جمله نیمه عمر آن بازی می کنند،(۱۸،۱۹). بر اساس مطالعات گذشته، تغییرات دما بر تغییرات نیروهای الکترواستاتیک اثرگذار است و باعث تغییر در بارهای سطحی شده و موجب کاهش فعالیت های عملکردی آلبومین مانند نقش آن در تنظیم فشار اسمزی در شرایط پاتولوژیک می شود،(۱۷). به علاوه به دلیل نقش حیاتی این مولکول در اتصالات لیگاندی، بررسی اثر سورفاکتنت سدیم دو دسیل سولفات به عنوان ترکیب با بار منفی با خواص لیگاندی تحت شرایط مختلف فیزیولوژیک قندی، بحرانی و دیابتی در دمای نرمال و تب روی آلبومین دارای اهمیت است.

مواد و روش ها

آلبومین سرم انسانی و سدیم دو دسیل سولفات از شرکت سیگما تهیه شد. سایر مواد از شرکت مرک تهیه گردید. طیف سنجی فرابنفش با دامنه طول موج nm ۴۰۰-۲۰۰ توسط دستگاه اسپکتروفتومتر UNICO مورد مطالعه قرار گرفت. مکانیسم ردیابی در طیف سنجی فرابنفش به این صورت است که در آن هر چه تعداد مولکول های جاذب نور با طول موج معین بیشتر باشد، مقدار جذب نور نیز افزایش می یابد که به میزان حساسیت آن مولکول در طول موج معین بستگی دارد. فرمولی که در این رابطه است به این ترتیب است:

قانون بیر- لامبرت

$$A= \log (I0/I)$$

A=میزان جذب نور

I0=شدت نور ورودی به سلول محتوی نمونه

I=شدت نور خروجی از سلول محتوی نمونه

C=غلظت مولاری حل شونده

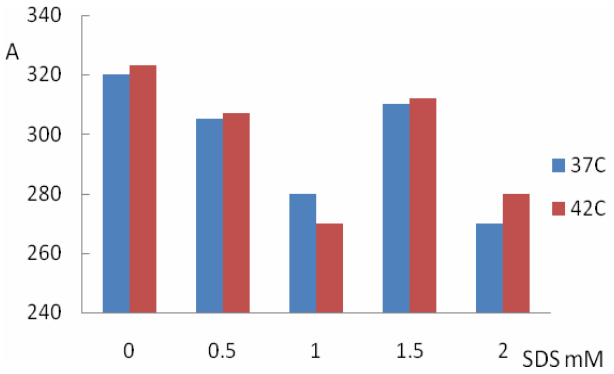
از غلظت های مختلف سدیم دو دسیل سولفات شامل ۲، ۱/۵، ۱، ۰/۵ میلی مولار مورد استفاده واقع شد. ۰/۸ میلی لیتر از محلول آلبومین ۰/۳ میلی گرم بر میلی لیتر در دو دمای ۳۷ و ۴۲ درجه سانتی گراد در غلظت های مختلفی از سدیم دو دسیل سولفات استفاده شد. میزان جذب نمونه ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر مورد بررسی واقع شد،(۲۰). میزان جذب در ۲۸۰ نانومتر نماینده میزان جذب

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-17]

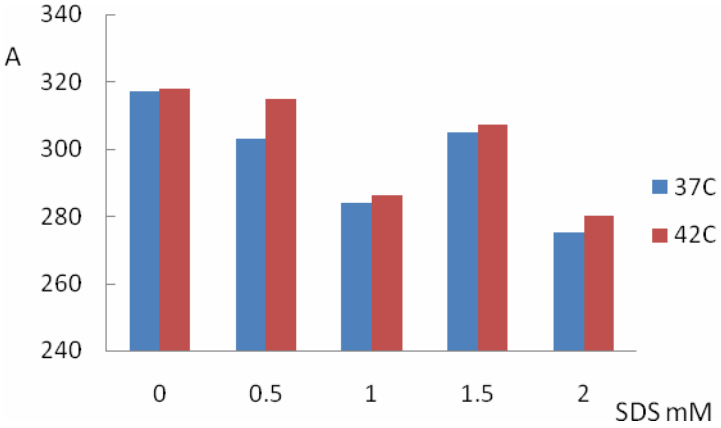
در هر دما، بر اساس میزان تغییرات ساختاری آلبومین در حضور غلظت های مختلف از سدیم دو دسیل سولفات در غلظت های مختلفی از گلوکز شامل ۴۰۰ و ۱۷۵، ۱۰۰ میلی گرم بر دسی لیتر نشان داده شده است. در واقع این مقادیر دو حالت اخیر از گلوکز نشان دهنده شرایط بحرانی و دیابتی است. لازم به ذکر است این آزمایشات ۳ بار تحت شرایط بالا تکرار شد، میانگین گزارش گردید و معنی دار بودن تغییرات بررسی شده است.

یافته های پژوهش

نتایج تغییرات جذب نوری در ۲۸۰ نانومتر شرایط قند نرمال(۱۰۰ میلی گرم بر دسی لیتر)، بحرانی(۱۷۵میلی گرم بر دسی لیتر) و ۴۰۰ میلی گرم بر دسی لیتر با تغییرات میزان سورفاکتانت سدیم دو دسیل سولفات از ۰ تا ۲ میلی مولار در دو دمای ۳۷ و ۴۲ درجه سانتی گراد در نمودارهای شماره ۱ تا ۳ نمایش داده شده است.

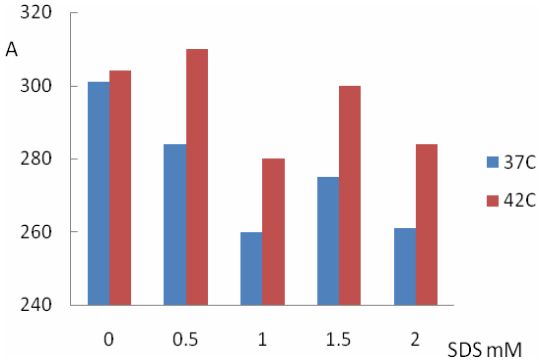


نمودار شماره ۱. تغییر میزان جذب آلبومین در غلظت های مختلف سدیم دو دسیل سولفات ۲، ۱/۵، ۱، ۰/۵ میلی مولار در دو دمای ۳۷ و ۴۲ درجه سانتی گراد در حضور غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر دسی لیتر گلوکز. در غلظت های ۱ و ۲ میلی مولار SDS اختلاف جذب در دو دما(P<0.05) معنادار است.



نمودار شماره ۲. تغییر میزان جذب آلبومین در غلظت های مختلف سدیم دو دسیل سولفات ۲، ۱/۵، ۱، ۰/۵ میلی مولار در دو دمای ۳۷ و ۴۲ درجه سانتی گراد در حضور غلظت ۱۷۵ میلی گرم بر دسی لیتر گلوکز. در غلظت نیم میلی مولار SDS اختلاف جذب در دو دما(P<0.05) معنادار است

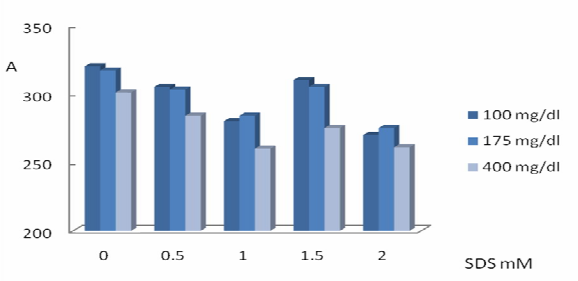
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-17]



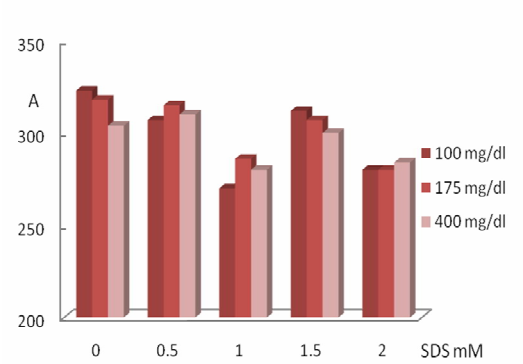
نمودار شماره ۳. تغییر میزان جذب آلبومین در غلظت های مختلف سدیم دو دسیل سولفات ۲، ۱/۵، ۱، ۰/۵ میلی مولار در دو دمای ۳۷ و ۴۲ درجه سانتی گراد در حضور غلظت ۴۰۰ میلی گرم بر دسی لیتر گلوکز. نمودارها در دو دما در حضور کلیه غلظت های SDS اختلاف جذب با معنادار(P<0.05) دارند.

با توجه به این که تحقیقات انجام شده نشان داده است که آلبومین تحت شرایط دمایی بالا به تغییرات غلظت گلوکز واکنش نشان نمی دهد و این امر نشانه بروز تغییرات ساختاری وسیع این مولکول در شرایط حاد دمایی مانند تب است،(۲۰)، بدین منظور در نمودارهای شماره ۴ و ۵ تغییرات جذب آلبومین در حضور غلظت های مختلف قند در دماهای ۳۷ و ۴۲ درجه سانتی گراد با تغییرات غلظت SDS از۰ تا ۲ میلی مولار نشان داده شده است

.



نمودار شماره ٤. تغییرات جذب آلبومین در حضور غلظت های۴۰۰ و ۱۷۵، ۱۰۰ میلی گرم بر دسی لیتر قند در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در حضور SDS. نمودارها در حضور غلظت ۴۰۰ میلی گرم بر دسی لیتر قند با دیگر نمودارها اختلاف معنادار(P<0.05) دارند.



نمودارشماره ۵. تغییرات جذب آلبومین در حضور غلظت های۴۰۰ و ۱۷۵، ۱۰۰ میلی گرم بر دسی لیتر قند در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد در حضور SDS. نمودارها در حضور غلظت مختلف قند با یکدیگر تفاوت معناداری(P>0.05) ندارند.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-17]

بحث و نتیجه گیری

آلبومین سرم انسانی یکی از ماکرومولکول های مهم در حفظ هوموستاز بدن است،(۲۱)، بررسی این عملکرد مولکول در شرایط تغییرات فیزیولوژیک حائز اهمیت است. شرایط هموستازی در بدن با ایجاد یک سری فرایندهای انتقال مواد در بدن ایجاد می شود. آلبومین مواد اندوژن و داروها را طی فرایند موسوم به اتصال لیگاند در بدن جا به جا می نماید. از جمله این جا به جایی ها، اتصال به بسیاری از مواد سمی وارد شده در خون و دفع موثر آن ها است. این مولکول حیاتی یکی از ظرفیت های اصلی آنتی اکسیدانی به دو صورت مستقیم و غیرمستقیم در بدن انسان است،(۲۲). همان طور که در نمودار شماره ۱ مشخص است در حضور غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر دسی لیتر گلوکز که مشابه شرایط فیزیولوژیک در بدن می باشد و نیز در شرایط غلظتی ۱ و ۲ میلی مولار SDS، تغییر معناداری بین جذب نور در طول موج ۲۸۰ در دو دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۴۲ درجه سانتی گراد مشاهده می شود. در مطالعات انجام شده بدون لحاظ حضور قند، تاثیر دمای ۴۲ درجه سانتی گراد بر ساختار و عملکرد آلبومین بررسی و تایید شده است،(۲۳). نمودار شماره ۲ که به بررسی جذب نور آلبومین در طول موج ۲۸۰ نانومتر در حضور غلظت ۱۷۵ میلی گرم بر دسی لیتر گلوکز می پردازد نشان می دهد که تغییرات محسوس جذب نور در غلظت پایین SDS یعنی غلظت نیم میلی مولار رخ می دهد گر چه اختلاف دما در غلظت های دیگر SDS تاثیرگذار نمی باشد. علت این که غلظت های بالای SDS نمی توانند اختلاف ساختار آلبومین را در دو دمای مورد مطالعه نشان دهند، می توانند به این شرح باشد الف: غلظت ۱۷۵ میلی گرم بر دسی لیتر گلوکز اختلاف خواص آلبومین را در دو دما از بین می برد. ب: غلظت های بالای SDS چنان برهمکنش پیچیده ای با آلبومین ایجاد می نمایند که تغییرات ظریف ساختار آلبومین ناشی از افزایش دما قابل بررسی نمی باشند. برهمکنش دوگانه SDS با ماکرومولکول ها قبلاً گزارش شده است،(۲۳). در نمودارشماره ۳، اختلاف معناداری بین جذب نور نمونه ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۴۲ درجه سانتی گراد در کلیه غلظت های SDS در حضور غلظت ۴۰۰ میلی گرم بر دسی لیتر گلوکز وجود دارد که نشان دهنده تغییر شدید ساختار فضایی آلبومین و احتمالاً به تبع آن عملکرد مولکول در دمای بالا در شرایط حاد دیابتی است. در نمودار شماره ۴ تغییرات جذب نور آلبومین در طول موج ۲۸۰ نانومتر در حضور سه غلظت مورد نظر قند و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نشان داده شده است. با توجه به نمودار شماره ۴، جذب نور آلبومین در غلظت ۴۰۰ میلی گرم بر دسی لیتر قند با دیگر نمودارها تفاوت معناداری دارد. بنا بر این می توان چنین نتیجه گرفت که غلظت های بالای گلوکز تاثیر شدید ساختاری و عملکردی بر آلبومین سرم انسانی دارد. با توجه به نمودار شماره ۵ از سوی دیگر همین مطالعه تحت شرایط تب(در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد) نشان می دهد که این اختلاف اثرگذاری وابسته به غلظت قند مشاهده نمی شود. به عبارت دیگر افراد دیابتی بیشتر از این که از دیابت در هنگام تب آسیب ببینند در واقع از افزایش دمای بدن آسیب دیده اند. می توان چنین نتیجه گرفت که در افراد سالم و دیابتی، آلبومین افراد مبتلا به تب نسبت به افراد سالم دستخوش تغییر ساختاری می گردد که این یافته با مطالعات قبلی در خصوص تاثیر تب بر آلبومین در انطباق است،(۱۷). بنا بر این در شرایط افزایش دمای بدن سایر عملکردهای آلبومین می تواند تحت تاثیر قرار گیرد که این شرایط برای افراد مبتلا به دیابت می تواند توسط قند تشدید شوند. هم چنین مشخص گردید که غلظت بالای گلوکز تاثیرات بسیار شدیدتری را اعمال می کند. در این مطالعه SDS توانست به عنوان پروب نقش مهمی در آنالیز یافته ها ایفا نماید. با توجه به یافته های این پژوهش پیشنهاد می شود که بیماران دیابتی در شرایط تب تحت مراقبت ویژه باشند و در راستای مطالعات تکمیلی، مطالعات در شرایط In vivo بررسی شود.

سپاسگزاری

بدین وسیله از مرکز تحقیقات پروتئومیکس به خاطر حمایت از اجرای این پروژه قدردانی می گردد

References

1-Carter DC, Chang B, Ho JX, Keeling K, Krishnasami Z. Preliminary crystallographic studies of four crystal forms of serum albumin. Eur J Biochem 1994;226:1049-52.

2-Zergani F, Roohizadeh R, Dayer M-R, Namdari M, Farokhnia A, Sobhany Y, et al. In silico study of global structure of human serum albumin. Int J Green Nanotechnol 2012;4:511-5.

3-Miller TY, He X-m, Carter DC. A comparison between protein crystals grown with vapor diffusion methods in microgravity

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-17]

and protein crystals using a gel liquid-liquid diffusion ground-based method. J Crystal Growth 1992;122:306-9.
4-Murray JC, Demopulos CM, Lawn RM, Motulsky AG. Molecular genetics of human serum albumin: restriction enzyme fragment length polymorphisms and analbuminemia. Proc Nat Acad Sci 1983;80:5951-5.
5-He XM, Carter DC. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. Nature 1992; 358: 209-215.
6-Fanali G, di Masi A, Trezza V, Marino M, Fasano M, Ascenzi P. Human serum albumin: from bench to bedside. Mol Aspect Med 2012;33:209-90.
7-Ohlson S, Shoravi S, Fex T, Isaksson R. Screening for transient biological interactions as applied to albumin ligands: A new concept for drug discovery. Analyt Biochem 2006; 359:120-3.
8-Hesami TS, Rezaei TM, Kalantari S, Amir BM, Mahdavi SM. Co-amoxiclav effects on the structural and binding properties of human serum albumin. Iran J Pharm Res 2010; 4:251-7.
9-Hein KL, Kragh-Hansen U, Morth JP, Jeppesen MD, Otzen D, Møller JV, et al. Crystallographic analysis reveals a unique lidocaine binding site on human serum albumin. J Structur Biol 2010;171:353-60.
10-Fasano M, Curry S, Terreno E, Galliano M, Fanali G, Narciso P, et al. The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. IUBMB Life 2005;57:787-96.
11-Kragh-Hansen U, Minchiotti L, Galliano M, Peters Jr T. Human serum albumin isoforms: Genetic and molecular aspects and functional consequences. Bioch Biophys Acta 2013;21:469-73.
12-Klammt S, Brinkmann B, Mitzner S, Munzert E, Loock J, Stange J, et al. Albumin binding capacity (ABiC) is reduced in commercially available human serum albumin preparations with stabilizers. Zeitschrift für Gastroenterologie 2001;39:24-7.
13-Guthrow CE, Morris MA, Day JF, Thorpe SR, Baynes JW. Enhanced nonenzymatic glucosylation of human serum albumin in diabetes mellitus. Proc Nat Acad Sci 1979; 76:4258-61.
14-Bunschoten A, Buckle T, Kuil J, Luker GD, Luker KE, Nieweg OE, et al. Targeted non-covalent self-assembled nanoparticles based on human serum albumin. Biomaterials 2012;33:867-75.
15-Barelier S, Pons J, Gehring K, Lancelin J-M, Krimm I. Ligand specificity in fragment-based drug design. J Med Chem 2010;53:5256-66.
16-Kurtzhals P, Havelund S, Jonassen I, Kiehr B, Larsen U, Ribel U, et al. Albumin binding of insulins acylated with fatty acids: characterization of the ligand-protein interaction and correlation between binding affinity and timing of the insulin effect in vivo. Biochem J 1995;312:725-31.
17-Mahdavi S, Rezaei TM, Moghadamnia S, Saki K. [The effect of fever on the role of human serum albumin on the blood pressure]. J Ilam Uni Med Sci 2005;5:34-41.(Persian)
18-Kragh-Hansen U, Chuang VTG, Otagiri M. Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin. Biol Pharm Bull 2002;25:695-704.
19-Buttar D, Colclough N, Gerhardt S, MacFaul PA, Phillips SD, Plowright A, et al. A combined spectroscopic and crystallographic approach to probing drug–human serum albumin interactions. Bioorganic Med Chem 2010;18:7486-96.
20-Zamanian-Azodi M, Rezaei-Tavirani M, Vafaee R. Critical concentration of Glucose changes human serum albumin conformation: Circular Dichroism (CD) and UV Spectroscopyapproaches. J Param Sci 2013;4:2008-978.
21- Rezaei-Tavirani M, Moghaddamnia SH, Ranjbar B, Amani M, Marashi S. Conformational study of human serum albumin in pre-denaturation temperatures by differential scanning calorimetry, circular dichroism and UV spectroscopy. J Biochem Mol Biol 2006;39:530-9.
22-Rezaei-Tavirani M, Tadayon R, Mortazavi SA, Medhet A, Namaki S, Kalantari S, et al. Fluoxetin Competes with Cortisol for Binding to Human Serum Albumin. Iran J Pharm Res 2011;11:325-30.
23-Rezaei-Tavirani M, Moghaddamnia SH, Ranjbar B, Namaki S, Zolfaghari P. The Effects of acetaminophen on human serum albumin (HSA). Iran J Pharm Res 2010; 4:239-44.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-17]

Evaluating the Effect of Glucose on Structure of Human Serum Albumin

Zamanian Azodi M[1], Gilanchi S[1], Amini Geram P[2], Haj Hosseini S[2], Karimeh H[3]*

(Received: 4June, 2013 Accepted: 22August, 2013)

Abstract

Introduction: Given the importance of human serum albumin, evaluation of the protein is invaluable. One of the characteristics of the protein is to create ligand bindings. The trait was assessed by application of the surfactant, sodium dodecyl sulfate (SDS), as a ligand under normal and pathologic temperatures and normal and diabetic concentration of glucose.

Material & Methods: UV spectroscopy was the method used in this experiment. Human Serum albumin was evaluated in the presence of different concentrations of glucose and the following conditions: SDS at the concentrations, 2, 1.5, 1, and 0.5mM as indices for ligand binding assay, and normal and fever temperatures.

Findings: The high temperature 42°C and different concentrations of glucose created structural changes in albumin. This effect was more significant at 400 mg/dl concentration of glucose.

Discussion & Conclusion: Human Serum Albumin structure was highly affected by increment of temperate which was more evident in diabetic condition.

Keywords: Human serum albumin, ligand binding, conformation changes, sodium dodecyl Sulfate (SDS), UV spectroscopy, diabetes

1.Proteomics Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Theran, Iran
2.Research and Science Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
3.Dept of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran
**Corresponding author*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-05-17]