

بررسی ارتباط متابولیسم منگنز و آهن در Rat (مطالعات In vivo)

تقی حسن زاده قصبه^۱، دکتر سید علی اصغر مشتاقی^۲

چکیده

مقدمه: منگنز (Mn)، از عناصر کمیاب می باشد که کمبود آن در انسان به ندرت دیده می شود در حالی که مسمومیت با آن در موارد متعددی گزارش شده است. مسمومیت با منگنز در افرادی که در معرض غلظت های بالایی از این عنصر قرار دارند (مانند کارگران کارخانه های باتری خشک) مشاهده می شود. این مسمومیت و در دوران نوزادی از اهمیت ویژه ای برخوردار است.

تصور بر این است که منگنز به علت شباهت های شیمیایی با آهن می تواند در متابولیسم این عنصر تداخل نماید. ارتباط منگنز با آهن، با توجه به نقش بیوشیمی این دو عنصر، از اهمیت ویژه ای برخوردار می باشد. هدف از انجام این تحقیق بررسی و تعیین تداخلی منگنز با متابولیسم آهن به وسیله آزمایش های In vivo است.

مواد و روش: این مطالعه، بر روی موش های Rat انجام گردیده است. به منظور تزریق منگنز به حیوانات از نمک کلرور منگنز $4H_2O MnCl_2$ استفاده شد، به نحوی که غلظت Mn در آن ۱۰۰ میلی گرم در میلی لیتر بود. هفت گروه پنج تایی Rat بر انتخاب و تزریق داخل صفتانی کلرور منگنز با مقادیر مختلف روی موش ها انجام شد. پس از سپری شدن مدت لازم در هر گروه نمونه گیری از موش ها انجام گردید و مقادیر آهن سرم، TIBC، UIBC منگنز سرم و ترانسفرین اندازه گیری شد.

نتایج: نتایج این بررسی نشان می دهد که متعاقب تزریق داخل صفاقی دوزهای مختلف منگنز، فاکتورهای خونی اندازه گیری شده تغییراتی را متحمل می گردند. مقدار آهن سرم، TIBC، UIBC و ترانسفرین بر اساس نوع گروه آزمایش بین ۹ تا ۴۰ درصد کاهش می یابند، در حالی که مقدار منگنز سرم به مقدار قابل توجهی افزایش می یابد. نتایج این بررسی نشان می دهد که منگنز می تواند در مسیرهای متابولیسم آهن تداخل نماید.

بحث: به طور کلی نتایج به دست آمده در این تحقیق مشخص می نماید که منگنز به علت شباهت های شیمیایی که با آهن دارد قادر است در متابولیسم این عنصر اختلال ایجاد نموده، مکانیسمی جهت ایجاد کم خونی فقر آهن در افرادی که مسمومیت با این عنصر را دارند، نشان دهد.

کل واژه گان: منگنز، آهن، عناصر کمیاب

مقدمه

این با به کار بردن روش‌های مختلف بیوشیمیائی شامل Western blot و fast protein liquid chromatography و هم‌چنین SDS-PAGE، اتصال منگنز به ترانسفرین سرم انسان تایید شده است (۱۱). اتصال این عنصر به ترانسفرین می‌تواند در متابولیسم آهن اختلال ایجاد نماید (۱۲).

ما نیز در مطالعاتی پیش از این نشان دادیم که منگنز می‌تواند هم در جذب روده‌ای آهن (۱۳) و هم در انتقال پلاسمایی آن (۱۴) تداخل نماید.

در پروژه حاضر، به منظور اثبات نتایج به دست آمده از مطالعات *In vitro* قبلی، تداخل راه متابولیسمی آهن و منگنز به صورت *In vivo* بررسی شده است.

مواد و روش

حیوانات آزمایشگاهی جهت آزمایش‌های *In vivo*، روش تزریق و نمونه‌گیری:

در این پروژه، از موش‌های صحرایی (*Rat*) با نام علمی *Rattus Norvegicus Allivius* که از نژاد *Wistar* بودند استفاده گردید. رات‌ها از انستیتو پاستور تهران تهیه و در اطاق حیوانات نگهداری و تکثیر شدند. محیط و قفسه‌های حیوانات را با محلول فنل ۵ در هزار ضد عفونی کرده تا از عفونی شدن حیوانات جلوگیری شود. برای تغذیه حیوانات از مواد غذایی که در کارخانه‌های فرآورده غذایی آماده و به صورت قرص‌های استاندارد در اختیار دانشگاه قرار گرفته بود، استفاده شد.

حیوانات از جنس نر و با وزنی حدود ۲۵۰-۲۰۰ گرم انتخاب و در گروه‌های پنج تایی دسته‌بندی و علامت‌گذاری شدند. برای تهیه محلول تزریق شده، ۳/۶۵ گرم از نمک کلرور منگنز به فرمول $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ را در مقداری سرم فیزیولوژی استریل حل کرده، سپس به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده می‌شود. غلظت این محلول ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر است.

در مراکز تحقیقاتی دنیا مطالعات زیادی بر روی عناصر کمیاب (*trace element*) و نقش متابولیسمی آنها در بدن در حال انجام می‌باشد. عناصر کمیاب اگر چه به مقدار جزئی در ساختمان پروتئین‌ها و آنزیم‌های مختلف بدن وجود دارند ولی افزایش سطح سرمی این عناصر می‌تواند موجب بروز اختلالات متعدد شده و بعضاً در اعمال یکدیگر تداخل نمایند. عنصر منگنز (*Mn*)، یکی از این عناصر می‌باشد که از یک طرف به عنوان یک عنصر سمی اثرات خود را در واکنش‌های مختلف در بدن انجام می‌دهد (۱). این عنصر در ساختمان برخی از متالوآنزیم‌ها شامل منگنز سوپر اکسید دسموتاز (*Mn-SOD*) و گلیکوزیل ترانسفراز شرکت می‌نماید (۲، ۳) و فعالیت آنزیم ۵-آمینولولینات سنتتاز را در نواحی مختلفی از مغز رات به ویژه در مخچه، مغز میانی و قشر مغز مهار می‌کند (۴).

کمبود منگنز در انسان به ندرت مشاهده می‌شود در حالی که مسومیت با منگنز در افرادی که در معرض غلظت‌های بالای این عنصر یا ترکیبات آن قرار دارند (کارگران کارخانه‌های باتری خشک) مشاهده می‌شود و در دوران نوزادی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۵، ۶). تحقیقات نشان می‌دهد مسومیت با منگنز تشکیل هموگلوبین را کاهش داده باعث ظهور کم‌خونی می‌شود. اثرات سمی این عنصر همچنین در موارد مختلف از جمله در: *degeneration, neuronal cerebellar damage* و *ganglionic disorder* و پارکینسون مورد توجه قرار گرفته است (۷). منگنز پس از جذب، از روده‌ها به جریان خون وارد شده و توسط پروتئین‌های مختلف به خصوص ترانسفرین به سلول‌های هدف اصلی می‌رود. ترانسفرین یک بتا-گلوبولین با وزن ملکولی ۸۰ کیلو دالتون است (۸). تعداد زیادی از یون‌های فلزی از قبیل آلومینیوم (۸)، کروم (۹) و روی (۱۰) می‌توانند با اتصال به ترانسفرین، متابولیسم آهن را مختل نمایند. پیش از

انتخاب شده و پس از سپری شدن مدت تزریق، نمونه‌گیری از آنها به روش Decapitation انجام گردید.

پس از نمونه‌گیری مقادیر آهن سرم، TIBC، UIBC، منگنز سرم و ترانسفرین (Pure Transferrin) اندازه‌گیری شد.

نتایج این مرحله در جدول‌های ۱ و ۲ خلاصه شده است. از جدول‌های مذکور چنین استنباط می‌گردد که متعاقب تزریق داخل صفاقی دوزهای مختلف منگنز، فاکتورهای خونی اندازه‌گیری شده تغییراتی را متحمل می‌گردند. این تغییرات به‌طور خلاصه عبارتند از:

الف - در گروه اول دوز حاد (۱۰ mg/kg) مقدار آهن سرم، TIBC، UIBC و ترانسفرین خالص به ترتیب ۱۹/۵، ۱۷/۸، ۱۶/۵ و ۱۷/۷ درصد کاهش را نشان می‌دهند، ولی در گروه دوم دوز حاد (۱۵ mg/kg) کاهش فاکتورهای فوق به ترتیب برابر با ۲۲، ۲۰/۶، ۲۰ و ۲۱ درصد می‌باشد.

ب - مقدار آهن سرم، TIBC، UIBC و Pure Transferrin، در گروه اول دوز مزمن (۱۵ روزه)، به ترتیب ۱۱، ۹/۸، ۹ و ۹/۸ درصد، در گروه دوم (۳۰ روزه) دوز مزمن ۲۳، ۲۵، ۲۴ و ۲۵ درصد، در گروه سوم دوز مزمن (۴۵ روزه) ۲۶، ۲۷، ۲۸ و ۲۷/۶ درصد و در نهایت در گروه چهارم، دوز مزمن (۶۰ روزه) به ترتیب ۴۰، ۳۲، ۲۸/۳ و ۳۳ درصد کاهش را نشان می‌دهند.

همان طوری که در جدول مشاهده می‌گردد، مقدار منگنز سرم متعاقب تزریق داخل صفاقی این عنصر به مقدار قابل توجهی افزایش می‌یابد. نتایج مطالعات *in vivo* ضمن تأیید نتایج حاصل از آزمایش‌های *in vitro*، نشان می‌دهد که منگنز علاوه بر محل جذب آهن در سایر مسیرهای متابولیسم آهن نیز تداخل می‌نماید.

در این پروژه ۷ دسته پنج تایی رات نر انتخاب و با توجه به وزن آنها و مطالعات قبلی (۱۶، ۱۵)، تزریق داخل صفاقی به‌نحو زیر انجام گرفت:

الف - گروه کنترل که روزانه ۲۰۰ میکرو لیتر سرم فیزیولوژیکی استریل دریافت کردند.

ب - دو گروه پهنج تایی که به ترتیب ۱۰ mg/kg (۱۵) و ۱۵ mg/kg (۱۶) منگنز برای مدت دو روز به‌صورت داخل صفاقی به آنها تزریق گردید (حاد).

ج - چهار گروه پنج تایی که ۲ mg/kg (۱۶) منگنز برای مدت ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ روز به آنها تزریق شد (مزمن).

پس از تزریق در زمان معین رات‌ها از اطاق نگهداری به محوطه آزمایشگاه تحقیقاتی منتقل شدند و بعد از آگاهی کامل از سلامتی آنها توسط روش Decapitation نمونه‌گیری انجام شد. نمونه‌ها در لوله‌های آزمایش برچسب‌دار که از قبل روی تک تک آنها اتیکت نصب شده بود ریخته شد. پس از گذشت نیم ساعت که تشکیل لخته کامل گردید، سرم آنها با استفاده از سانتریفوژ به دقت جدا و برای آزمایش‌های بعدی در فریزر نگهداری شد.

نتایج

به‌منظور بررسی اثرات *In vivo* منگنز بر متابولیسم آهن در بدن، اثرات دوزهای حاد (۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به مدت دو روز) و اثرات دوزهای مزمن (۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به مدت ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ روز) به‌صورت تزریق داخل صفاقی در رات مورد بررسی قرار گرفت. برای هر گروه مورد مطالعه پنج رات نر با وزن مناسب (حدود ۲۰۰ گرم)

Mn	Pure Transterrin	UIBC	TIBC	Fe	فاکتورهای خونی
$\mu\text{g}/100$	$\mu\text{g}/100$	$\mu\text{g}/100$	$\mu\text{g}/100$	$\mu\text{g}/100$	حیوانات
$2/6 \pm 0/2$	264 ± 11	228 ± 6	377 ± 16	149 ± 11	گروه کنترل
$24/3 \pm 2$	217 ± 8	190 ± 4	310 ± 11	120 ± 10	گروه یک (10 mg/kg)
$26/9 \pm 1/5$	209 ± 4	182 ± 3	299 ± 5	117 ± 2	گروه دو (15 mg/kg)

جدول شماره ۱: تغییرات فاکتورهای خونی متعاقب تزریق داخل صفاقی دوز حاد منگنز.

Mn	Pure Transferrin	UIBC	TIBC	Fe	فاکتورهای خونی
$\mu\text{g}/100$	$\mu\text{g}/100$	$\mu\text{g}/100$	$\mu\text{g}/100$	$\mu\text{g}/100$	حیوانات
$2/6 \pm 0/2$	271 ± 6	247 ± 5	387 ± 9	140 ± 5	گروه کنترل
$5/36 \pm 0/4$	244 ± 7	224 ± 4	349 ± 9	125 ± 5	گروه ۱ (۱۵ روزه)
$14/2 \pm 0/7$	203 ± 5	$187/4 \pm 6$	290 ± 7	$106/6 \pm 6$	گروه ۲ (۳۰ روزه)
$19/6 \pm 0/9$	$196 \pm 5/5$	178 ± 6	208 ± 8	102 ± 8	گروه ۳ (۳۰ روزه)
$25/2 \pm 1$	183 ± 4	177 ± 8	261 ± 5	84 ± 7	گروه ۴ (۶۰ روزه)

جدول شماره ۲: تغییرات فاکتورهای خونی متعاقب تزریق داخل صفاقی دوزهای مزمن منگنز.

بحث

است که کمبود آهن ایجاد شده از طریق رژیم غذایی در مقایسه با کمبود آهن ناشی از خونریزی مکانیسم انتقال روده‌ای منگنز را بیشتر فعال می‌نماید. اختلاف مشاهده شده بین این دو نوع کمبود آهن به علت تفاوت در مسیرهای جذبی نمی‌باشد بلکه به علت اختلاف در درجه تاثیر آنها روی فرآیندهای جذبی می‌باشد (۲۰).

از طرف دیگر گزارش شده که افزایش آهن جذب منگنز را مهار کرده و غلظت‌های بافتی این عنصر را کاهش می‌دهد (۲۱). تغییرات غلظت منگنز نیز تغییراتی را در جذب آهن بوجود می‌آورد. گزارش شده که آهن (به میزان ۵ میلی مولار) جذب منگنز (۵mm) جذب آهن را فقط کم می‌نماید. تمام این گزارش‌ها مویید این موضوع است که منگنز برای جایگاه‌های اتصال روی پروتئین‌های جذبی در روده کوچک، با آهن رقابت می‌نماید (۲۲).

Thamson و همکارانش چنین گزارش نمودند که Km در روده برای آهن ۱/۵ mM و برای منگنز ۴/۵ mM می‌باشد و این بدین معنی است که آهن در روده بهتر جذب می‌شود. ما نیز در تحقیقاتی نشان دادیم که منگنز می‌تواند در جذب روده‌ای آهن (۱۳) و همچنین در انتقال پلاسمایی این عنصر (۱۴) تداخل نماید.

نتایج مطالعات *In vivo* در پروژه حاضر، نشان می‌دهد که فاکتورهای خونی مربوط به متابولیسم آهن از قبیل آهن سرم، Pure transferrin، UIBC، TIBC، متعاقب تزریق داخل صفاقی منگنز به رات‌ها، کاهش یافته بود. برای توجیه این تغییرات می‌توان موارد زیر را ذکر کرد:

الف - کاهش آهن سرم به دلیل جایگزینی منگنز به جای این عنصر در ترانسفرین و دفع آهن آزاد از بدن می‌باشد.
ب - تغییرات مشاهده شده در سایر پارامترهای خونی نشان دهنده این است که منگنز علاوه بر تداخل در جذب روده‌ای آهن و انتقال پلاسمایی آن، احتمالاً سنتز ترانسفرین را نیز تحت تاثیر قرار می‌دهد.

عنصر منگنز در غلظت‌های بالا نروتوکسیک بوده و می‌تواند اختلالات برگشت ناپذیری را در CNS ایجاد نماید. مسمومیت مزمن با این عنصر سندرمی را ایجاد می‌نماید که مشابه با پارکینسون بوده و به درمان با L-DOPA پاسخ می‌دهد. مسمومیت ناشی از منگنز تا حدودی از اثرات آن روی سیستم‌های نروتوانسمیتر به ویژه دوپامینورژیک (Basal Ganglia) ناشی می‌گردد (۱۷). مکانیسم‌های بیوشیمیایی که باعث ایجاد مسمومیت منگنز می‌گردند به درستی مشخص نشده است؛ اما به طور کلی این مکانیسم‌ها با تولید رادیکال‌های آزاد، اکسیداسیون دوپامین به مواد سمی از قبیل کینون‌ها و ۶- هیدروکسی دوپامین و اثرات مستقیم منگنز روی مکانیسم‌های آنزیمی عصبی، در ارتباط می‌باشد.

مسمومیت با عنصر منگنز می‌تواند متابولیسم سایر عناصر کمیاب را تحت تاثیر قرار دهد. تداخل این عنصر با مسیر متابولیسمی آهن، با توجه به نقش بیوشیمیایی این دو عنصر، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. این دو عنصر می‌توانند در فرآیندهای جذب روده‌ای، انتقال پلاسمایی، ورود به سلول و حتی جایگزینی در برخی آنزیم‌های سیتوپلاسمی و میتوکندریایی (به ویژه آنزیم سوپر اکسید دسموتاز) با یکدیگر رقابت نمایند.

در پروژه حاضر تاثیر و ارتباط تداخلی متابولیسم منگنز با آهن به وسیله آزمایش‌های *In vivo*، بررسی شده است. این تداخل در گذشته به وسیله مطالعات متعدد *in vitro* گزارش شده است (۱۸).

Johnson و همکارانش نشان دادند که کمبود آهن چه از طریق رژیم غذایی و چه به واسطه خونریزی ایجاد شده باشد، جذب Mn را افزایش می‌دهد و زمینه ایجاد مسمومیت با این عنصر را فراهم می‌نماید (۱۹). در یک مطالعه نشان داده شده

References

- 1- Scheuhammer AM, Cherian MG: Binding of manganese in human and rat plasma. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1985, 840: 163-169.
- 2- Wayne F, Beyer JR, Ivwin F: In vivo competition between iron and manganese superoxide dismutase of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 1991, 266: 303-308.
- 3- Guglielmo DR, Carl LK, Roland ML, et al: Regulation of superoxide dismutase activity by dietary manganese. *J Nutr*, 1980, 110: 795-804.
- 4- Maines DM: Regional distribution of the enzymes of haem biosynthesis and the inhibition of 5-amino laevulinate synthase by manganese in the rat brain. *Biochem J*, 1980, 190: 315-321.
- 5- Bolonner D, Carl LK, Lucille S: Manganese binding proteins in human and cow's milk. *Am J clin Nutr*, 1985, 41: 550-559.
- 6- Emara AM, Ghawabi SH, Madkour OI, et al: Chronic manganese poisoning in the dry battery in dusty. *Br J Industr Med*, 1971, 28: 78-82.
- 7- Darab KD, Daya KM, Raghavendran KV: Distribution and fate of ⁵⁴Mn in the monkey: studies of different parts of the central nervous system and other organs. *J Clin Invest*, 1971, 50: 9-20.
- 8- Moshtaghie AA, Ani M, Bazrafshan M: Comparative binding study of aluminium and chromium to human transferrin. *Biol Trace Elem Res*, 1992, 32: 39-46.
- 9- Ani M, Moshtaghie AA: The effect of chromium on parameters related to iron metabolism. *Biol Trace Elem Res*, 1992, 32: 57-64.
- 10- Moshtaghie AA, Badii A: Comparative binding studies of zinc and iron to human serum transferrin. *Iranian J Sci Tech*, 1996, 20: 177-188.
- 11- Leana D, Bolonner D, Brittmarie S, et al: Identification of transferrin as the major plasma carrier protein for manganese introduced orally or intravenously or after in vitro addition in the rat. *J Nutr*, 1989, 119: 1461-1464.
- 12- Matrone G, Hartman RH, Clawson AJ: studies on manganese-iron Antagonism in the nutrition of rabbits and baby pagis. *J NUTR*, 1959, 67: 309-317.
- ۱۳- حسن‌زاده‌قصبه‌تقی: بررسی تداخل منگنز با جذب روده‌ای آهن. *مجله پزشکی ارومیه*، پاییز ۱۳۷۹، سال یازدهم شماره ۳، ص ۲۰۶.
- 14- Moshtaghie AA, Badii A, Hassanzadeh T: Role of ceruloplasmin and ethanalamine in

- manganese binding to human serum apo-transferrin. Iranian J sci Tech, 1997, 21(2): 157-168.
- 15- Christopher M, Weiss B: Persistent effects of manganese on effortful responding and their relationship to manganese accumulation in the primate globus. pallidus. Toxicol Appl pharmacol, 1992, 113: 87-97.
- 16- Sanchez DJ, Dommingo JL, Liobet JM, Keen CL: Maternal and developmental toxicity of manganese in the mouse. Toxicol lett, 1993, Jul, 69(1): 45-52.
- 17- Rabin O, Hegedus L, bourre JM, et al: Rapid brain uptake of manganese (II) Across the blood brain barrier. J Neurochem, 1993, 61: 509-517.
- 18- Lu-cille S, Keen CL, et al: Aspects of trace element interactions during development. Federatoin proc, 1983, 42: 1735-1739.
- 19- Phyllis EJ, korynta ED: Effect of copper, iron and ascorbic acid on manganese availability to rats. P S E B M, 1992, 199: 470-480.
- 20- Flannagan P R, et al: Comparative effects of iron deficiency induced by bleeding and a low-iron diet on the intestinal absorptive interactions of iron, cobalt, manganese, zinc, leadd and cadmium. J Nutr, 1980, 110: 1754-63.
- 21- Davis C D, Ney DM, Greger JL: Manga nese, iron and lipid interactions in rats. J Nutr, 1990, 120: 507-13.
- 22- Scheuhammer A M, Cherin M G: The distribution and excretion of manganese: The effects of manganese dose, L-DOPA and pretreatment with zinc. Toxicol Appl pharmacol, 1982, 65: 203-13.

INTERRELATION BETWEEN MANGANESE AND IRON METABOLISM IN RAT (IN VIVO STUDIES)

T Hassanzadeh Ghasabeh¹, M.Sc.; A A Moshtaghi², Ph.D.

Abstract

Introduction : *Manganese is an essential trace element. There is a little evidence for deficiency of manganese in human. Whereas its toxicity has been reported in several cases. Manganese toxicity occurs in humans exposed to high environmental concentrations (for example workers in the dry battery industries) and may be particularly important in the neonatal period. The chemical similarities between manganese and iron, may lead to the disturbances of iron metabolism. Therefore, the interference of Mn with Fe metabolism by In vivo studies, has been investigated.*

Methods & Material : *In the present project, we used rats. Injection of manganese was carried out by using $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, with concentration 100 mg/ml. Seven group of male rats were selected, so that each group included five rat and manganese injected in their peritoneum.*

Results : *The data of this study indicate that factors such as serum iron; TIBC; UIBC and pure transferrin reduced to 9-40 percent, whereas serum manganese significantly elevated. Thus, manganese can interfere with iron metabolism.*

Discussion : *The data that has been presented in this article elucidated the probable mechanism by which Mn interference with Fe metabolism; which result in the appearance of anemia.*

Key words: *Manganese, Iron, Trace elements*

Address: *Department of Biochemistry, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran.*

Source : *UMJ 2003; 13(3): 205 - 212 . ISSN: 1027-3727.*

1- Instructor of Biochemistry, Hamedan University of Medical Sciences.

2- Professor of Biochemistry, Esfahan University of Medical Sciences.