

تغییرات پارامترهای وابسته به متابولیسم آهن سرم متعاقب تزریق ایندیوم در رات

دکتر سید محمدعلی غفاری * - دکتر سید علی اصغر مشتاقی **

* استادیار گروه بیوشیمی - دانشکده پزشکی - دانشگاه علوم پزشکی اهواز

** استادیار گروه بیوشیمی - دانشکده پزشکی - دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

مقدمه

اصلی (III a) جدول تناوبی است که در صنایع به عنوان نیمه هادی و همچنین برای پوشش دادن دیگر فلزات جهت ممانعت از پوسیدگی و در نتیجه استحکام بخشیدن به آنها مصرف می‌شود (۹). این عنصر به صورت ^{111}In همچنین در پزشکی جهت تعیین نوع و محل تورموهای بدخیم (۱۰) و درمان آنها (۱۱) استفاده می‌شود. گزارشی مبنی بر اثرات سمی در معرض قرارگیری با ایندیوم در انسان در دست نیست، اما مطالعه روی حیوانات نشان داده که ایندیوم یکی از سمی‌ترین فلزات است (۱۰ و ۱۲)، به طوری که آثار سمی آن بر بافت کبد (۱۰) و همچنین کلیه مشخص شده است (۱۳). تاکنون ساز و کارهای متفاوتی جهت تجمع ایندیوم در بافت‌های سرطانی و اثرات مہاری آن بر رشد سلولی پیشنهاد شده است. یکی از این ساز و کارها، جلوگیری از شرکت آهن در فرآیندهای متابولیسم سلولی آهن (در فرآیندهای متابولیسم سلولی وابسته به آهن) است (۱۴). با توجه به مطالب فوق و اینکه ایندیوم از نظر خصوصیات فیزیکی و شیمیائی مشابه با آهن است احتمالاً می‌تواند با متابولیسم آهن تداخل نماید، به همین جهت در این طرح اثرات کوتاه و دراز مدت این عنصر بر پارامترهای بیوشیمیایی مربوط به متابولیسم آهن در رات مورد مطالعه قرار گرفت.

آهن در مهره‌داران پس از جذب روده‌ای به طور اختصاصی توسط آپوترانسفرین یا سیدروفیلین در پلاسمانتقال می‌یابد. آپوترانسفرین گلیکوپروتئینی ست از دسته بتا-گلوبولین‌های سرم، که وزن ملکولی آن حدود هشتاد کیلو دالتون است. این گلیکوپروتئین پلاسمائی دارای دو لوب N و C بوده که توسط پیوندهای دی‌سولفیدی بین زنجیره‌ای پایدار می‌شوند. هر لوب به دو قلمرو (Domain) با اندازه‌ی مشابه تقسیم می‌شود. در شکاف بین این دو قلمرو محل و جایگاه اتصال آهن فریک (Fe^{+3}) است (۱). درحالت عادی تنها یک سوم جایگاه‌های آپوترانسفرین توسط آهن فریک اشغال شده است، در نتیجه به میزان بالائی قدرت پذیرش آهن را دارا می‌باشد (۲). طی تحقیقات انجام شده مشخص گردیده که مکان‌های اتصال آهن در آپوترانسفرین می‌تواند توسط تعداد زیادی از فلزات دیگر (همانند مس، کروم، کبالت، منگنز، وانادیوم، آلومینیم، کادمیوم، روی و نیکل) نیز اشغال شود که نتیجه‌ی آن ایجاد اختلالات بالینی خواهد بود (۳-۷). به عنوان مثال مطالعات انجام شده نشان داده که عوارض بالینی ناشی از مسمومیت با آلومینیم در بیماران دیالیزی عمدتاً در ارتباط با اتصال آن به ترانسفرین می‌باشد (۸).

ایندیوم جزو فلزات سنگین غیر ضروری گروه سه عناصر

مواد و روش‌ها

دو گروه مورد آزمایش و شاهد با آزمون Student's t-test (با استفاده از نرم افزار SPSS) مقایسه شد.

در قسمت دوم این تحقیق با استفاده از تکنیک ایمنوآفینیتی کروماتوگرافی، ترانسفرین از سرم راتهای شاهد و مورد آزمایش (که به مدت ۶۰ روز مورد تزریق دوز ۳۵mg/kg /۰ کلرید ایندیوم بودند) جدا گردید. در این کروماتوگرافی از ستونی به ابعاد ۸/۰ × ۱۱ سانتی متر، حاوی ژلسفراز 4B (فعال شده با سیانوژن بروماید) متصل شده به آنتی ترانسفرین استفاده شد. برای انجام این کروماتوگرافی از بافر فسفات سیترات (اسید سیتریک ۰/۱ مولار و 4 Na 2 ۰/۲ مولار) با pHهای ۷/۲ و ۲/۸ استفاده شد.

نتایج

اثرات ایندیوم بر پارامترهای مربوط به متابولیسم آهن در سرم: نتایج حاصل نشان داده است که تزریق داخل صفاقی ایندیوم به صورت کلرید ایندیوم با دوز ۲/۱ mg/kg به مدت ۱۰ روز موجب کاهش معنی دار مقدار آهن، TIBC (Total iron binding capacity)، هموگلوبین و هماتوکریت سرم به ترتیب به مقدار ۵۸، ۶۶، ۵۰ و ۴۸ درصد نسبت به گروه شاهد شده است ($P < ۰/۰۰۲$ و $n=۵$). این نتایج نشان می دهد که درصد اشباع ترانسفرین و نیز ترانسفرین سرم نسبت به گروه شاهد به مقدار حدود ۱۸ و ۴۶ درصد کاهش یافته است [درصد اشباع ترانسفرین و غلظت ترانسفرین سرم به ترتیب از طریق روابط $Tf = \frac{TIBC}{TIBC \times 100} \%$ و $Tf = \frac{TIBC}{TIBC} \times 100$ (جدول ۱) محاسبه گردید].

جدول شماره ۱: مقایسه اثر کوتاه مدت (۱۰ روزه) ایندیوم بر فاکتورهای خونی مربوط به متابولیسم آهن، نسبت به گروه شاهد

فاکتورها	حیوانات	
	مورد ۱۰ روزه	شاهد ۱۰ روزه
درصد کاهش		

در این مطالعه از موش های صحرایی نر (Rat) با نام علمی Rattus Norvegicus Allivius از نژاد Wistar استفاده شد. حیوانات از حیوانخانه ی دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان دریافت و در همان مکان با شرایط استاندارد (نور، درجه حرارت و تغذیه) نگهداری شدند. با تعیین LD50 برای ایندیوم (۱۶-۱۵) مقدار LD50 در این پروژه برای یون ایندیوم ۴/۲ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن حیوان به دست آمد، بنابراین مقدار تجویز شده سمی غیر کشنده حدود ۲/۱ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن حیوان خواهد بود، به همین علت این عنصر در فرم ملح کلرید ایندیوم و به صورت داخل صفاقی در دو دوره ی کوتاه مدت ۱۰ روزه، به مقدار ۲/۱ mg/kg وزن بدن (روزانه) و دوره های بلندمدت ۳۰ و ۶۰ روزه به مقدار ۰/۳۵mg/kg وزن بدن (روزانه) تزریق شد. کلرید ایندیوم در محلول سرم فیزیولوژی (۰/۹ درصد) تهیه و در گروه شاهد فقط از سرم فیزیولوژی استفاده شد. تعداد رات ها در گروه های شاهد و مورد آزمایش ۵ عدد بود. پس از پایان تزریقات، حیوانات با اثر بیهوش شده و خون مستقیماً از قلب آنها گرفته شد. پس از لخته شدن خون، سرم آن توسط سانتریفوژ معمولی (مدل Kubota KN-70) با دور ۲۰۰۰r pm به مدت ۱۰ دقیقه جدا شده و جهت اندازه گیری پارامترهای بیوشیمیایی مربوطه بررسی شد. مقدار آهن و TIBC با استفاده از روش Fairbanks (۱۷) توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Bush and lamb spectronic 501) اندازه گیری شد. اندازه گیری هماتوکریت با استفاده از خون تام و دستگاه میکروهماتوکریت (مدل Adams autocrit centrifuge) انجام گرفت.

فراکسیون های حاوی ترانسفرین در سرم رات های شاهد و مورد آزمایش (تحت تزریق دوز بلندمدت ۶۰ روزه) به روش ایمنو آفینیتی کروماتوگرافی (Immunoaffinity chromatography) جداسازی (۱۸)، و غلظت آنها توسط روش لوری تعیین گردید (۱۹). اختلاف بین میانگین مقادیر به دست آمده در

آنتی ترانسفرین جدا شده و در فراکسیون‌های مربوطه به دست می‌آید (نمودار ۱ سمت راست). نتایج حاصل نشان داد که مقدار ترانسفرین در سرم رات مورد آزمایش نسبت به شاهد کمتر است (نمودار ۱ سمت راست). نتایج حاصل از اندازه‌گیری غلظت این پروتئین (توسط روش لوری) مشخص نمود که غلظت ترانسفرین در فراکشن‌های سرم رات شاهد 170 mg/dl بوده در حالی که در فراکشن‌های سرم رات مورد آزمایش 110 mg/dl است، که حدود ۳۵ درصد کاهش غلظت در نمونه‌های مورد تزریق مشاهده شد.

۴۸	$31 \pm 3^*$	60 ± 5	% هماتوکریت
۵۰	$10 \pm 1^*$	20 ± 2	هموگلوبین (gr/dl)
۵۸	$69 \pm 5^*$	165 ± 9	آهن ($\mu\text{g/dl}$)
۴۶	$237 \pm 21^*$	438 ± 26	TIBC ($\mu\text{g/dl}$)
۳۸	$169 \pm 27^*$	237 ± 24	UIBC ($\mu\text{g/dl}$)
۴۶	$166 \pm 16^*$	307 ± 18	ترانسفرین (mg/dl)
۱۸	$31 \pm 2^{**}$	38 ± 2	% اشباع ترانسفرین

به رات‌های مورد آزمایش ایندیوم در فرم کلرید ایندیوم به مدت ۱۰ روز ($2/1 \text{ mg/Kg}$) روزانه و به صورت داخل صفاقی تزریق شد ($n=5$)، درحالی‌که به رات‌های شاهد سرم فیزیولوژی (۰/۰/۹) در مدت زمانهای مربوطه تزریق گردید ($n=5$).
 $p < 0/005 = **$ و $p < 0/04 = *$ (از لحاظ آماری معنی دار می باشد).

تزریق داخل صفاقی ایندیوم به صورت کلرید ایندیوم با دوز $0/35 \text{ mg/kg}$ به مدت ۳۰ روز باعث کاهش آهن، TIBC، هموگلوبین و هماتوکریت سرم به ترتیب به مقدار ۳۵، ۳۱، ۳۲ و ۲۸ درصد گردیده ($n=5$ و $P < 0/005$) و به مدت ۶۰ روز باعث کاهش فاکتورهای فوق در سرم به ترتیب به مقدار ۴۶، ۴۰، ۴۰ و ۳۶ درصد گردیده است ($n=5$ و $P < 0/002$). در صد اشباع ترانسفرین و همچنین مقدار آن در سرم گروه‌های مزمن نیز کاهش یافته است (جدول شماره ۲).

جداسازی ترانسفرین از سرم راتها: برای جداسازی ترانسفرین سرم، یک میلی لیتر سرم نمونه با یک میلی لیتر بافر فسفات سیترات ($pH = 7/2$) رقیق شد و سپس روی ستون قرار گرفت و مرتب ستون با این بافر شستشو گردید و فراکشن‌های مربوطه در حجم‌های ۱ میلی لیتر جدا گردیدند (سرعت خروج بافر $0/4 \text{ ml/min}$)، در $pH = 7/2$ ترانسفرین سرم به آنتی ترانسفرین موجود در ستون متصل گشته در حالیکه سایر پروتئین‌های سرم از ستون خارج می‌گردند (نمودار ۱ سمت چپ). در مرحله بعد با تغییر pH (بافر فسفات سیترات $pH = 2/8$) ترانسفرین اتصال یافته به

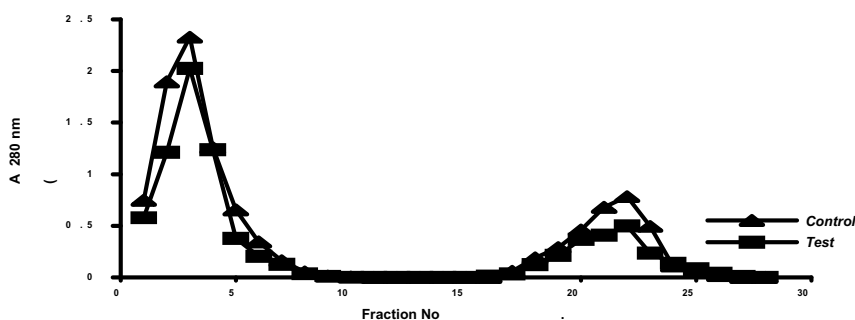
جدول شماره ۲: مقایسه اثر دراز مدت (۳۰ و ۶۰ روزه) ایندیوم بر فاکتورهای خونی مربوط به متابولیسم آهن، نسبت به گروه شاهد

فاکتورها	حیوانات					
	شاهد ۳۰ روزه	مورد ۳۰ روزه	درصد کاهش	شاهد ۶۰ روزه	مورد ۶۰ روزه	درصد کاهش
٪ هماتوکریت	۵۶±۶	*۴۰±۴	۲۸	۵۸±۶	*۳۷±۲	۳۶
هموگلوبین (gr/dl)	۱۹±۲	*۱۳±۱	۳۲	۲۰±۲	*۱۲±۱	۴۰
آهن (µg/dl)	۱۵۴±۳	*۱۰۰±۳	۳۵	۱۸۷±۶	*۱۰۰±۵	۴۶
TIBC (µg/dl)	۴۵۲±۳۸	*۳۱۲±۲۸	۳۱	۴۹۰±۳۳	*۲۹۳±۲۰	۴۰
UIBC (µg/dl)	۲۹۸±۳۹	*۲۱۱±۲۷	۲۹	۳۰۳±۲۸	*۱۹۳±۱۹	۳۶
ترانسفرین (mg/dl)	۳۱۶±۲۶	*۲۱۸±۲۰	۳۱	۳۴۳±۲۳	*۲۰۵±۱۴	۴۰
٪ اشباع ترانسفرین	۳۴±۳	**۳۲±۳	۶	۳۸±۲	**۳۴±۳	۱۱

به رات های مورد آزمایش ایندیوم در فرم کلرید ایندیوم به مدت ۳۰ و ۶۰ روز (0.35 mg/Kg) روزانه و به صورت داخل صفاقی تزریق شد ($n=5$)، در حالیکه به رات های شاهد سرم فیزیولوژی (۰/۰۹٪) در مدت زمانهای مربوطه تزریق گردید ($n=5$).
 $p < 0.005 = *$ و $p < 0.002 = **$ (از لحاظ آماری معنی دار می باشد). $p < 0.04 = ***$ (از لحاظ آماری بی معنی می باشد).

PH=7.2

PH= 2.8



نمودار شماره ۱: جدا سازی توتال پروتئین (سمت چپ) و ترانسفرین (سمت راست) از سرم راتهای شاهد (▲) و مورد آزمایش (■) طی کروماتوگرافی تمایلی (Immuno affinity chromatography).

[سرعت خروج بافر = 0.5 ml/min ، دما = 4°C ، طول موج = 280 nm]

بحث و نتیجه گیری

می باشد (۴ و ۸). نتایج حاصل از این تحقیق اثرات تداخلی ایندیوم با متابولیسم آهن را نشان می دهد. نتایج مندرج در جداول ۱ و ۲ حاکی از کاهش فاکتورهای خونی مربوط به متابولیسم آهن، نظیر آهن، TIBC، هموگلوبین و هماتوکریت در سرم رات های تست که به صورت حاد و مزمن مورد تزریق داخل صفاقی با ایندیوم بوده اند. کاهش آهن سرم به دنبال تزریق ایندیوم به احتمال زیاد مربوط

مطالعات نشان داده که عناصر قادرند با اتصال به ملکول های حیاتی و یا به علت شباهت ساختمانی با عناصر کمیاب ضروری با جانشین شدن به جای آنها، مسیرهای سوخت و سازی مربوطه را مختل کنند (۲۰) تأثیر متقابل برخی از این عناصر نظیر آلومینیم و کادمیوم بر فرآیندهای متابولیسمی حاکی از ارتباط مستقیم آنها با بیماری های استخوانی، عصبی و آنمی در بیماران مزمن کلیوی

آنزیم‌های شرکت کننده در متابولیسم آهن اثر گذاشته و بیوستت آن را مختل کند. مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم فروسلاتاز میتوکندریایی که یکی از آنزیم‌های کلیدی در بیوستت «هم» می‌باشد، توسط برخی عناصر، همانند کبالت، روی، سرب و منگنز مهار می‌شود (۲۱). دیگر مطالعات انجام شده در این مورد نیز نشان داده که در موجودات زنده ایندیوم موجب تغییر سلولی متابولیسم «هم» در کبد پستانداران می‌شود که این عمل ایندیوم از طریق القاء سریع سنتز «هم» اکسیژناز میکروزومی و همچنین به طور هم‌زمان مهار آنزیم آمینولولینیک اسید سنتاز (اولین آنزیم مسیر بیوستت «هم» است) صورت می‌گیرد (۲۲).

نتایج حاصل از آزمایشات کروماتوگرافی در این مطالعه تمایلی نشان داد که در فراکسیون‌های سرم رات مورد تزریق ایندیوم، مقدار ترانسفرین حدود ۳۵ درصد کمتر از ترانسفرین رات شاهد است که این احتمالاً حاکی از اثر ایندیوم بر میزان سنتز کبدی این پروتئین است. به طور کلی نتایج حاصل از این تحقیق بیانگر اثرهای تداخلی ایندیوم بر متابولیسم خونی آهن می‌باشد. با این وجود، برای پی بردن به ساز و کار دقیق این اثرها نیاز به تحقیقات بیشتری خصوصاً در سطح پلاسما و داخل سلول می‌باشد.

به تداخل ایندیوم با متابولیسم آهن در سطح پلاسما می‌باشد. به طوری که احتمالاً ایندیوم پس از ورود به خون به ترانسفرین متصل شده و جایگاه‌های اتصال آهن را در آن اشغال می‌کند (۱۱). در نتیجه آهن به صورت آزاد و یا کمپلکس با مولکول‌هایی با وزن ملکولی پائین در می‌آید که سریعاً از طریق کلیه‌ها دفع می‌شوند. با وجود آن‌که معمولاً کاهش آهن سرم همراه با افزایش غلظت TIBC می‌باشد، نتایج حاصل از این تحقیق حاکی از کاهش توأم آهن و TIBC است (جداول ۱ و ۲). کاهش هم‌زمان آهن و TIBC احتمالاً بخاطر اثرات ایندیوم بر میزان سنتز پروتئین در کبد می‌باشد. از طرفی با وجود این که مقدار آهن سرم کاهش یافته، باید در نظر داشت که مقدار آهن قابل فیلتر بیشتر شده و احتمالاً همین افزایش ممکن است به صورت پس نورد منفی موجب کاهش سنتز ترانسفرین شود. کاهش هموگلوبین و هماتوکریت متعاقب مصرف ایندیوم در دوره‌های کوتاه مدت و بلند مدت نیز نشان از تداخل ایندیوم بر متابولیسم آهن در محل سنتز «هم» است (جداول ۱ و ۲). این نتایج بیانگر آن است که تغییرات ایجاد شده وابسته به دوز و زمان تجویز ایندیوم می‌باشد. البته کاهش آهن سرم خود موجب کاسته شدن سنتز و در نتیجه کاهش مقدار هموگلوبین می‌شود. با این وجود ممکن است ایندیوم مستقیماً بر سنتز

منابع

- Hiros M. The Structural Mechanism for Iron Uptake and Release by Transferrins. *Biosci Biotechnol* 2000; 64(7): 1328-1336.
- Helmut A, Huebers C, Finch A. The Physiology of Transferrin and Transferrin Receptors. *Physiol Rev* 1987; 67(2): 520-582.
- Moshtaghie AA, Ani M. The Effect of Chromium on Parameters Related to Iron Metabolism. *Biol Trace Elem Res* 1992; 32: 57-64.
- Moshtaghie AA, Taghikani M, Sandughchic M. Cadmium Interaction with Iron Metabolism: In Vitro and in Vivo Studies. *Clin Chem Enzym Comm* 1997; 7: 307- 316.
- Moshtaghie AA, Ani M, Bazrafshan MR. Comparative Binding Study of Al^{+3} to Human Transferrin. *Biol Trace Elme Res* 1992; 32: 39-46.
- Moshtaghie AA, Badii A. Comparative Binding Studies of Zinc and Iron to Serum Human Transferrin. *Iran J Sci Techn* 1996; 20(2):177-188.
- Moshtaghie AA, Taghikani M, Sandughchic M. Role of Intestinal Cell Transferrin in Cadmium Intereference with Iron Absorption by E.G.S. *Clin Chem Enzym Comm* 1996; 6: 177-185.
- Moshtaghie AA, Alminum Toxicity: A Review in Relation to Chronic Renal Failure Patients Maintained on Regular Hemodialysis. *Med JIRI* 1993; 7: 63-71.

9. Blazka ME, Dixon D, Haskins E, Rosenthal GJ. Pulmonary Toxicity to Intratracheally Administered Indium Trichloride in Fischer 344 Rats. *Fundam Appl Toxicol* 1994; 22: 231-239.
10. Guo X, Ohno Y, Kawanishi T, Sunouchi M, Takanaka A. Indiuminhibits Gap Junctional Communication Between Rat Hepatocytes in Primary Culture. *Toxicology Letters* 1992; 60: 99-106.
11. Maran PL, Seligman PA. Effects of Transferrin-Indium on Cellular Proliferation of a Human Leukemia Cell Line. *Cancer Res* 1989; 49(15): 4237-4241.
12. Nakajima M, Takashashi H, Sasaki M, Kobayashi Y, Ohno Y, Usami M. Comparative Developmental Toxicity Study of Indium in Rats and Mice. *Teratog Carcinog Mutagen* 2000; 20(4): 219-227.
13. Sipes G, Mc Queen CA, Gandolfi AJ. *Comprehensive Toxicology*. Pergamon 1997: 7: 659-657.
14. Hoyes KP, Morris ID, Hendry JH, Sharma HL. Transferrin- Mediated Uptake of Radionuclides by the Testis. *J Nucl Med* 1996; 37(2): 336-340.
15. Frank P, Castronovo JR, Henry N, Wagner Jr. Comparative Toxicity and Pharmacodynamics of Oonic Indium Chloride and Hydrated Indium Oxide. *J Nucl Med* 1973; 14: 677-682.
16. Miller LC, Tainter ML. Estimation of the LD₅₀ and its Error by Mean of Logarithmic Probit Graph Papper. *Proc Soc Exp Biol Med* 1944; 57: 261-264.
17. Fairbanks VF. Laboratory Testing for Iron Status. *Hosp Pract* 1991; 26: 17-24.
18. Moshtaghie AA, Jahromi M. Identification of Transferrin in Cytosolisolated from Intestinal Mucosal Cells. *Biochem Soc Trans* 1992; 21: 71-74.
19. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein Measurment with the Folin- Phenol Reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
20. Tsukkamoto Y. Disturbances of Trace Element Concentration in Plasma of Patients with Chronic Renal Failure. *Nephron* 1980; 26: 174-179.
21. Labbe RF, Hubbard N. Properties of the Fe-Protoporphyrin Chelating Enzyme. *BBA* 1991; 52: 130-135.

