مقاله پژوهشی

بررسی ارتباط منگنز و آهن در اتصال به آپوـ ترانسفرین

تقی حسن زاده قصبه *

چکیده:

منگنز (Mn) یکی از عناصر کمیاب می باشد که کمبود آن در انسانها بندرت دیده می شود در حالیکه مسمومیت با آن در موارد متعددی گزارش شده است. مسمومیت با منگنز در افرادیکه در معرض غلظتهای بالائی از این عنصر قرار دارند(کارگران کارخانه های باطری خشک) مشاهده می شود و در دوران نوزادی از اهمیت ویژه ای برخوردار است. تصور بر اینست که منگنز بعلت شباهتهای شیمیایی با آهن میتواند در متابولیسم این عنصر تداخل نماید. ارتباط با آهن ، با توجه به نقش بیوشیمیایی این دو عنصر ، از اهمیت ویژه ای برخوردار می باشد ، لذا هدف از انجام این پروژه بررسی و تعیین نقش تداخلی منگنز در یکی از مراحل متابولیسم آهن (یعنی انتقال پلاسمایی آن) می باشد.

در کار تحقیقاتی حاضر سعی شده تداخل منگنز و آهن در انتقال پلاسمائی آنها بوسیله تکنیکهای دیالیز تعادلی ، کروماتوگرافی میل ترکیبی ، تیتراسیون اسپکتروفتومتری و الکتروفورز مورد مطالعه قرار گیرد.

در یکسری از آزمایشات اثر منگنز در انتقال پلاسمائی آهن از طریق تیتراسیون اسپکتروفتومتری مطالعه گردید و مشاهده شدکه میزان اتصال آهن به پروتئین های سرم انسانی در حضور ۲۰۰ و ٤۰۰ و۸۰۰ میکرو گرم منگنز بر لیتر پلاسما به ترتیب ۸٪، ۱۲/۵٪ و۲۳٪کاهش می یابد. سپس با استفاده از تکنیک کروماتوگرافی میل ترکیبی و بوسیله آنتی ترانسفرین ،آپو ترانسفرین سرم انسانی تخلیص گردید و آزمایش فوق با ترانسفرین خالص انسانی تکرار شد و نتایج مشابه بدست آمد. اتصال آهن و منگنز به ترانسفرین در قسمت دیگر این پروژه از طریق تکنیک دیالیز تعادلی نیز موردبررسی قرار گرفت و اقدام به تعیین میزان ثابت باند شدن این دو فلز به ترانسفرین شد. ثابت اتصال (ka) منگنز به آپوترانسفرین M^{-1} $۱۰^{۹}$ × ۳/۱ بدست آمد. نتایج فوق از طریق الکتروفورز نیز به تایید رسید.

به طور کلی نتایج بدست آمده در پروژه حاضر مشخص می نماید که منگنز به علت شباهتهای شیمیایی که با آهن دارد قادر است در متابولیسم این عنصر اختلال ایجاد نموده و مکانیسمی جهت ایجاد کم خونی فقر آهن در افرادی که مسمومیت با این عنصر را دارند ، ارائه دهد.

کلید واژه ها: آپوترانسفرین / آهن / کم خونی کم رنگ / منگنز

مقدمه :

در مراکز تحقیقاتی دنیا مطالعات زیادی برروی عناصر کمیاب (trace element) و نقش متابولیسمی آنها در بدن در حال انجام می باشد . عناصر کمیاب اگر چه به مقدار جزئی در ساختمان پروتئین ها و آنزیم های مختلف بدن وجود دارند ولی افزایش سطح سرمی این عناصر می تواند موجب بروز اختلالات متعدد شده و بعضاً در اعمال یکدیگر تداخل می نمایند .

منگنز (Mn) یکی از این عناصر می باشد که از یک طرف به عنوان یک عنصر کمیاب و از طرف دیگر به عنوان یک عنصر سمی اثرات خود را در واکنشهای مختلف در بدن انجام می دهد(۱). این عنصر در ساختمان برخی از متالوآنزیمها شامل منگنز سوپراکسید دسموتاز (MN-SOD) و گلیکوزیل ترانسفراز شرکت می نماید(۲،۳)

* عضو هیأت علمی گروه بیوشیمی و تغذیه دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان

و فعالیت آنزیم ۵- آمینولوولینات سنتتاز را در نواحی مختلفی از مغز رات بویژه در مخچه ، مغز میانی و قشر مغز مهار می کند (۴).

کمبود منگنز در انسان بندرت مشاهده می شود در حالی که مسمومیت با این عنصر در موارد متعددی گزارش شده است (۵).مسمومیت با منگنز در افرادی که در معرض غلظتهای بالائی از این عنصر یا ترکیبات آن قرار دارند (کارگران کارخانه های باطری خشک) مشاهده می شود و در دوران نوزادی از اهمیت ویژه ای برخوردار است (۵،۶). تحقیقات نشان میدهد مسمومیت با منگنز تشکیل هموگلوبین را کاهش داده باعث ظهور کم خونی میشود. اثرات سمی این عنصر همچنین در موارد مختلف از جمله در :cerebellar damage و neuronal degeneration وganglionic disorder و پارکینسون مورد توجه قرار گرفته است (۷). منگنز پس از جذب از روده ها به جریان خون وارد شده و توسط پروتئین های مختلف خصوصاً ترانسفرین به سلولهای هدف می رود . 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) می توانند با اتصال به ترانسفرین متابولیسم آهن را مختل نمایند. پیش از این با بکار بردن تکنیکهای مختلف بیوشیمیائی شامل western blot و fast protein liquid chromatography و همچنین SDS-PAGE اتصال منگنز به ترانسفرین سرم انسان تائید شده است (۱۱). اتصال این عنصر به ترانسفرین می تواند در متابولیسم آهن اختلال ایجاد نماید (۱۲). سایر مطالعات انجام شده با روشهای متفاوت و صرفاً با استفاده از حیوانات آزمایشگاهی انجام شده است. حتی با مطالعاتی که تا امروز نیز انجام شده ، پروتئینهای ناقل منگنز در سرم انسان به طور قطع و یقین مشخص نشده است و محققان سه پروتئین Transferrin ، Transmanganin و Albumin را معرفی کرده اند. لذا هدف از انجام این پژوهش ، بررسی و تعیین نقش تداخلی منگنز در یکی از مراحل متابولیسم آهن (یعنی انتقال پلاسمایی آن) می باشد.

روش کار:

۱- تکنیک اسپکتروفتومتریک: برای مطالعه و مقایسه اتصال Mn^{2+} و Mn^{3+} به ترانسفرین موجود در سرم و هم چنین تأئید فعالیت سرولوپلاسمین تخلیص شده ، از این تکنیک استفاده گردید(۱۳). ترانسفرین از کارخانه sigma تهیه و پس از عمل دیالیز به صورت خالص درآمد(۱۴). عمل دیالیز با استفاده از محلولهای بافر استات (۵۰ میلی مولار و pH=۵/۲) و کلرید سدیم (۰/۱۵ میلی مولار) ، بیکربنات سدیم (۰/۰۲ مولار) در محلول کلرید سدیم (۰/۱۵ مولار) و نهایتاً بافر تریس ـ هیدروکلراید ـ بیکربنات (۱۰۰ میلی مولار و pH=۷/۴) انجام شد(۱۴،۱۵). با استفاده از محلول آپوترانسفرین خالص (۵mg/ml) که در بافر تریس ـ هیدروکلراید ـ بیکربنات با pH=۷/۴ تهیه شده طیف جذبی آپوترانسفرین و ترانسفرین اشباع شده با منگنز بررسی و ماکزیمم طول موج (λmax) کمپلکس منگنز ـ ترانسفرین بوسیله دستگاه اسپکتروفتومتریک از نوع Perkin-Elmer 5515 uv/vis Recorder 561 تعیین گردید .

۲- تکنیک کروماتوگرافی میل ترکیبی : سرولوپلاسمین سرم انسان با استفاده از تکنیک کروماتوگرافی میل ترکیبی (affinity chromatography) استخراج گردید (۱۸-۱۶). ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی که در این پروژه تهیه شد، ستون سفارز حاوی آنتی سرولوپلاسمین می باشد. آنتی سروپلاسمین از کارخانه سیگما خریداری گردید. جهت انجام این قسمت از پروژه مقدار یک میلی لیتر از سرم انسانی که حاوی سرولوپلاسمین است را در دو میلی لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH=۷/۲ رقیق کرده و روی ستون اضافه می شود . ابتدا از بافر فسفات باpH=۷/۲ و سپس جهت جدا شدن سرولوپلاسمین از آنتی سرولوپلاسمین متصل شده به سفارز از بافر فسفات سیترات با pH=۲/۸ استفاده گردیده. پس از خروج پروتئین های اضافی و سرولوپلاسمین تمام لوله ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر قرائت گردید و منحنی مربوطه رسم شد .

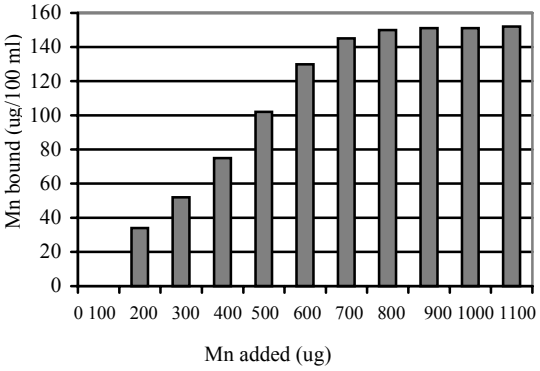
۳- تکنیک دیالیز تعادلی : اتصال منگنز و آهن به ترانسفرین موجود در سرم انسان بوسیله تکنیک دیالیز تعادلی نیز مورد بررسی قرار گرفت (۱۱). با این روش می توان ثابت اتصال هر مولکول به لیگاند اختصاصی آن را محاسبه نمود که از نظر بالینی فوق العاده با ارزش خواهد بود. اساس این تکنیک عبور مولکولهایی با وزن مولکولی کم از غشاء نیمه تراوا به طرف ماکرومولکول

می باشد. دستگاه دیالیز شامل یک دسیکاتور معمولی با درب شیشه ای سوراخ دار می باشد. سوراخها جهت ورود جریان گاز ، نمونه برداری و یا افزودن مواد به داخل کیسه دیالیز می باشند. در داخل دسیکاتور یک ظرف پلاستیکی در باز قرار دارد که از بافر تریس ـ هیدروکلراید ـ بیکربنات ۰/۰۰۵ مولار با pH=۷/۴ پر شده است و کیسه دیالیز درون این بافر معلق خواهد شد. از pH خارج کیسه دیالیز در طول آزمایش بوسیله جریان گازی شامل ۹۵درصد اکسیژن و۵ درصد دی اکسید کربن ثابت نگه داشته می شود . با استفاده از اطلاعات بدست آمده از این تکنیک، منحنی scatchard را رسم نموده ثابت اتصال (ka)منگنز به آپوترانسفرین را محاسبه می کنیم .

۴- تکنیک الکتروفورز: تغییرات الگوی الکتروفورتیکی آپوترانسفرین متعاقب متصل شدن Mn^{2+},Mn^{3+} به آن ، به وسیله تکنیک الکتروفورز(electrophoresis) بررسی و مقایسه شد. برای انجام این مرحله از آزمایشها ابتدا یک محلول ۵mg/ml از آپوترانسفرین در بافر تریس ـ هیدروکلراید ـ بیکربنات تهیه گردید . تعدادی لوله دآیونیزه شده انتخاب و به تمامی آنها ۰/۵ میلی لیتر از محلول آپوترانسفرین فوق اضافه گردید. در لوله های فوق به طور جداگانه غلظتهای مختلفی از Mn^{3+},Mn^{2+} (در حضور سرولوپلاسمین و یا در حضور اتانول آمین) را فراهم کرده ، به مدت لازم در محیط آزمایشگاه انکوبه شدند. سرولوپلاسمین یا اتانول آمین در این مرحله به عنوان اکسید کننده عمل می کنند. پس از انکوباسیون ، با روش urea-polyacryl amide gel electrophpresis نمونه های مذکور را الکتروفورز کرده و تغییرات الگوی الکترفورتیکی آپوترانسفرین متعاقب اتصالش با Mn^{2+},Mn^{3+} بررسی گردید. در این مرحله الکتروفورز به طریق continous انجام شد (۱۴).

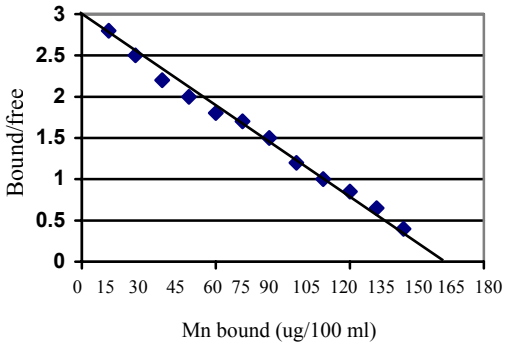
نتایج :

در این تحقیقات ابتدا طیف جذبی (λ max) ترانسفرین، کمپلکس آهن ـ ترانسفرین و کمپلکس منگنز ـ ترانسفرین تهیه گردید که پس از مقایسه این طیف ها ماکزیمم جذب کمپلکس آهن- ترانسفرین در طول موج ۴۶۵ نانومتر و کمپلکس منگنز ـ ترانسفرین در طول موجهای ۴۱۰ و ۳۴۰ نانومتر تعیین گردید. اثرات منگنز بر اتصال آهن به ترانسفرین سرم انسان نیز مورد مطالعه قرار گرفت. افزودن منگنز(۱/۵ µg/ml) به مخلوط واکنش شامل آهن و ترانسفرین ، اتصال Fe به ترانسفرین را به میزان۲۰ درصد ، در مقایسه با کنترل ، کاهش داده است. اتصال منگنز به آپوترانسفرین بوسیله تکنیک دیالیز تعادلی نیز تأیید گردید (نمودار ۱).



نمودار ۱: برداشت منگنز توسط آپوترانسفرین با استفاده از دیالیز تعادلی

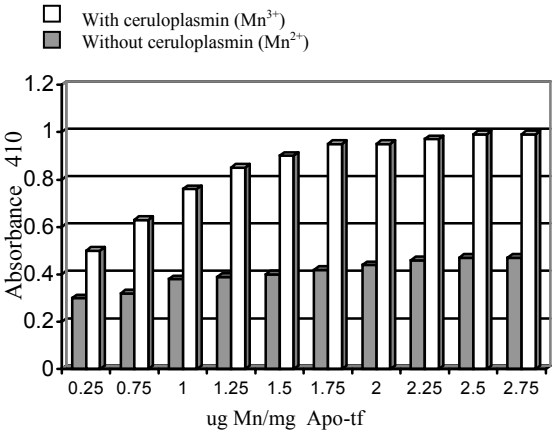
با استفاده از نمودار scatchard و اطلاعات نمودار۱، ثابت اتصال(ka) منگنز به آپوترانسفرین تقریبا $۳/۱ \quad ۱۰^{۹} \; M^{-۱}$ محاسبه گردید (نمودار ۲).



نمودار ۲: منحنی scatchard plot باند شدن منگنز به آپوترانسفرین و محاسبه ثابت اتصال

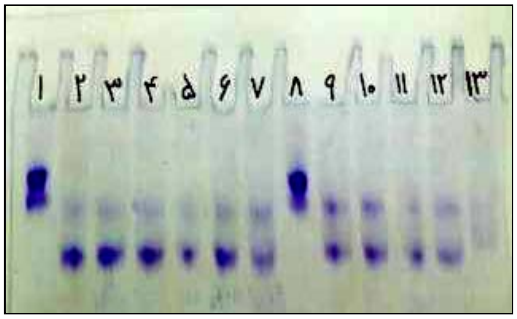
در مطالعاتی که پیش از این انجام شده احتمال بهتر باند شدن منگنز III به ترانسفرین به صورت یک فرضیه گزارش شده است (۱). بدین منظور (تهیه Mn^{3+}) ، در این پروژه سرولوپلاسمین به عنوان یک عامل اکسید کننده بوسیله تکنیک کروماتوگرافی میل ترکیبی تخلیص گردید . ابتدا طیف جذبی (λ max) کمپلکس Mn^{3+} ترانسفرین تهیه و با طیف جذبی(λ max)کمپلکس Mn^{2+} ترانسفرین مقایسه شد. نتایج نشان دهنده این است که طیف جذبی این دو کمپلکس مشابه یکدیگر

بوده و هر دو در طول موجهای ۴۱۰ و۳۴۰ نانومتر دارای ماکزیمم جذب می باشند. سپس اثر سرولوپلاسمین بر اتصال Mn^{2+} به آپوترانسفرین بررسی شد. نتایج حاصل نشان میدهد که اتصال Mn^{2+} در حضور سرولوپلاسمین به میزان قابل توجهی افزایش می یابد (نمودار ۳).



نمودار ۳: مقایسه اتصال Mn^{2+} و Mn^{3+} به آپوترانسفرین. برای تهیه منگنز (III) از سرولوپلاسمین خالص شده استفاده گردید.

در قسمت دیگری از پروژه تغییرات الگوی الکتروفورتیکی آپوترانسفرین متعاقب باند شدن Fe^{3+} ، Mn^{3+}،Mn^{2+} به آن ، بررسی و مقایسه شده است . نتایج حاصل از این مرحله در تصویر ۱ ارائه شده است .



تصویر ۱ : بررسی مقایسه ای الگوی الکتروفورتیکی آپوترانسفرین، Mn^{2+}ـ ترانسفرین و Mn^{3+}- ترانسفرین

۱= Apotransferrin

۸= Apotransferrin + Mn^{2+}

۱۳و۱۲و۱۱و۱۰و۹و۷و۶و۵و۴و۳و۲ = Apo + Mn^{3+} (درحضور سرولوپلاسمین)

باند شدن Mn^{2+} به ترانسفرین تغییری در الگوی الکتروفورتیکی آن ایجاد نمی نماید در حالیکه اتصال Mn^{3+} به ترانسفرین الگوی الکتروفورتیکی آن را تغییر می دهد. آپوترانسفرین به صورت یک باند منفرد مشاهده می شود ولی متعاقب اتصال Mn^{3+} یا Fe^{3+} به ترانسفرین دو باند مجزا از یکدیگر در الگوی مذکور دیده می شود. نتایج مطالعات الکتروفورزی ضمن تأیید نتایج مراحل اسپکتروفتومتری ، اتصال بهتر Mn^{3+}، در مقایسه با Mn^{2+}، به آپوترانسفرین را نیز ثابت می نماید . مقایسه خصوصیات شیمیایی Mn^{2+} ، Mn^{3+} و Fe^{3+} نیز مؤید این موضوع می باشد .

بحث:

تداخل منگنز با سایر عناصردر مطالعات متعددی گزارش شده است (۱۹،۲۰) . اگر چه منگنز به عنوان یک عنصر واسطه با سایر عناصر کمیاب دارای تداخل می باشد ، ولی تداخل آن با آهن ، با توجه به نقش بیوشیمیائی این دو عنصر، از اهمیت ویژه ای برخوردار است. در گزارشات منتشره درباره ماهیت پروتئین های ناقل منگنز در سرم اختلاف نظر وجود دارد. Foradori و همکارانش نشان دادند که تقریباً ۸۰ درصد از منگنز اضافه شده به پلاسما بصورت in vitro به یک بتا ـ گلوبولین متصل می گردد. Cotzias و همکارانش پیش از این گزارش کردند که این پروتئین نمی تواند ترانسفرین باشد ، چون منگنز متصل شده به پروتئین مذکور با آهن معاوضه نمی شود. این محققان یک پروتئین اختصاصی ناقل منگنز در پلاسما تحت نام Transmanganin را معرفی نمودند (۲۱). Keefer و همکارانش ثابت کردند که در سرم Rat یک پروتئین منفرد به هر دو عنصر آهن و منگنز متصل می گردد . نقطه ایزوالکتریک این پروتئین ۵/۷ تعیین شد که به نقطه ایزوالکتریک ترانسفرین انسانی (۵/۹) بسیار نزدیک می باشد (۲۲). Davis نشان داد که منگنز پس از ترک روده به آلبومین یا یک پروتئین شبیه به آلبومین متصل می شود (۲۳). بنابراین با توجه به مطالعاتی که پیش از این انجام شده ۳ پروتئین Transmanganin (۲۱) ، Transferrin (۱،۲۲) و Albumin (۱۶،۲۳،۲۴) به عنوان مهمترین ناقلهای منگنز در سرم معرفی شده اند.

در پروژه حاضر تأثیر و ارتباط تداخلی متابولیسم آهـن با منگنز مورد توجه قرار گرفته است . در این زمینه ابتدا طیف جذبی(λ max) آپوترانسفرین، کمپلکس آهن ـ ترانسفرین و کمپلکس منگنز ـ ترانسفرین تهیه گردید. پس از مقایسه سه طیف چنین نتیجه گیری می شود که کمپلکس آهن ـ ترانسفرین در طول موج ۴۶۵ نانومتر و کمپلکس منگنز - ترانسفرین در طـــول

موجهای ۴۱۰ و ۳۴۰ نانومتر دارای ماکزیمم جذب می باشند. جذب در ناحیهUV احتمالاً به علت دخالت اسید آمینه تریتپوفان و یا تیروزین در اتصال فلز به ترانسفرین می باشد. در مطالعاتی که پیش از این انجام شده ماکزیمم جذب کمپلکس منگنز ـ ترانسفرین در طول موجهای ۴۳۰ و۳۳۰ نانومتر گزارش شده که اختلاف مشاهده شده بین این نتایج با نتایج پروژه حاضر احتمالاً به علت استفاده از بافرهای مختلف می باشد (۱).

وقتی اثر منگنز بر میزان برداشت آهن توسط ترانسفرین سرم انسان وآپوترانسفرین بررسی و مقایسه شد قاعدتاً انتظار داشتیم که منگنز برداشت آهن توسط آپوترانسفرین را بیشتر تحت تأثیر قرار دهد. ولی نتایج بدست آمده خلاف این را نشان داد به گونه ای که این عنصر برداشت آهن توسط سرم انسانی را بیشتر مهار می نمود . بنابراین نتیجه گرفته شد که بایستی در سرم عاملی وجود داشته باشد که تغییراتی در منگنز ایجاد نموده و باعث اتصال بهتر منگنز به ترانسفرین گردد. در مطالعات قبلی نیز احتمال بهتر پیوند شدن Mn^{3+} به ترانسفرین بصورت یک فرضیه گزارش شده است (۱). این احتمال وجود دارد که در حضور یک عامل اکسید کننده در سرم Mn^{2+} به Mn^{3+} تبدیل شده و سپس به ترانسفرین متصل گردد. این عامل می تواند سرولوپلاسمین و یا اکسیژنهای ملکولی سرم باشد. بدین منظور در قسمت دیگری از این پروژه سرولوپلاسمین سرم انسانی تخلیص گردید و اثر آن بر اتصال Mn^{2+} به آپو ـ ترانسفرین بررسی شد. نتایج حاصل نشان می دهد که اتصال Mn^{2+} در حضور سرولوپلاسمین به میزان قابل توجهی افزایش می یابد و این موضوع خود ثابت کننده اتصال بهتر Mn^{3+} به ترانسفرین می باشد.

اثر منگنز بر برداشت آهن توسط آپوترانسفرین از طریق تکنیک دیالیز تعادلی نیز بررسی شد و مشخص گردید که در حضور منگنز اتصال آهن به این پروتئین ۲۵٪ کاهش می یابد که نتایج حاصل از آزمایشات اسیکتروفتومتری را تأیید می نماید . این موضوع در آزمایشات الکتروفورز به اثبات رسیده است همانگونه که در نتایج بیان شده اتصال Mn^{3+} به ترانسفرین به حدی است که الگوی الکتروفورتیکی آپو ـ ترانسفرین را تغییر میدهد در حالیکه اتصال Mn^{2+} به ترانسفرین روی الگوی الکتروفورتیکی آن اثری ندارد .

به طور کلی نتایج بدست آمده از آزمایشات مطالعه حاضر مشخص می نماید که منگنز از طریق تداخل در انتقال پلاسمایی آهن متابولیسم این عنصر را تحت تأثیر قرار داده میتواند حتی مکانیسمی جهت ایجاد کم خونی در افرادی که مسمومیت با منگنز را دارند ارائه دهد.

منابع :

1. Scheuhammer AM , Cherian MG. Binding of manganese in human and rat plasma. Biochimica Biophysica Acta 1985; 840:163-169.
2. Wayne F, Beyer JR , Irwin 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. 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. BO lonner 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. Chronic manganese poisoning in the dry battery in dustry. Br J Indastr Med 1971;28:78-82.
7. Darab KD, Daya KM, Raghavendran KV. Distribution and fate of 54 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.

Identification of transferrin as the major plasma carrier protein for manganese introduced orally or intravenously or after in vitro addition in the rat. J Nutr1989;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.
13. Takahashi N, Putnam FW. Single chain structure of human ceruloplasmin. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 1984;81: 390-349.
14. Skllien AW , Moshtaghie AA. The binding of aluminium by human transferrin and effect of desferrioxamine in : AL and other trace element in renal disease (de.taylor.A.,). London : Bailliere Tindall 1986: 81-85.
15. Skillen AW , Moshtaghie AA. Binding of Aluminium to transferrin and lactoferrin. Biochem Soc Trans 1986;14:916-917.
16. Gibbons RA , Dixon SN , Hallis K. Manganese metabolism in cow's and goats. Biochimica Biophysica Acta 1976; 444: 1-10.
17. Pharmacia . Manual affinity chromatography principles and methods Pharmacia fine chemical AB s-75164 upsala 1, Sweden , 1979.
18. Moshtaghie AA , Skillen AW. Desferrioxamine in aluminium overloab paitents. An aluminium binding study . Indian J Pharm 1991;23:75-80.
19. Phyllis EJ, Eugene DK. Effects of copper, iron , and ascor bic acid on manganese avilability to rats. P.S.E.B.M. 1992;199: 470-480.
20. Schrauzer GN . Lithium in scalp hair of adults , students and violent criminals: Effects of supplementation and evidence for interaction of lithium with vitamin B12 and with other trace element. Biol Trace Elem Res 1992; 34: 161-176.
21. Cotzias GC , Bertinchamps AJ. Transmanaganin the specific manganese – carryin protein of human plasma . J Clin Invest 1960; 39: 979.
22. Keefer RC , Barak AJ , Boyett JD. Binding manganese and transferring in rat serum. Biochem Biophys Acta 1970 ; 221 : 390-3.
23. Davis CD , Zech L , Greger JL. Manganese metabolism in rats. Proc Soc Exp Biol Med 1993 ; 202(1): 103-8.
24. Nadedkar AKN , Nurse CE. Mn^{++} binding by plasma proteins . Int J Pept Protein Res 1973 ; 5: 279-81.