ORIGINAL ARTICLE

The Effect of Probiotic Bacteria (Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium lactis) on ReducingTissue Cadmium Induced in the Rat Gastrointestinal Tract

Roghayeh Zare[1],
Mehran Mohseni[2],
Seyed Mohammad Mazloomi[3],
Mohammadreza Eskandari[4],
Koorosh Kamali[5]

[1] MSc Student in Food Safety and Hygiene, School of Health, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Food and Drug Control, School of Pharmacy, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran
[3]Assistant Professor, Department of Food Hygiene and Quality Control, School of Nutrition and Food Sciences, Food Sciences Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
[4]Assistant Professor, Department of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmacy, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran
[5]Assistant Professor, Department of Food Safety and Hygiene, School of Health, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

(Received October 27, 2014; Accepted January 4, 2015)

Abstract

Background and purpose: Cadmium (Cd) is a toxic metal with a long half-life that usually accumulates in liver and kidney. This study assessed the effect of two probiotic bacteria (*Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis*) on gastrointestinal cadmium elimination and accumulation of cadmium in rats' liver within 4 weeks.

Materials and methods: Experimental animals in three groups received daily bacterial oral solution before cadmium exposure while the animals in another group were only exposed to cadmium ($CdCl_2$) daily. At the end of the second and fourth week, liver from each sacrificed rat were dissected out and cadmium concentration in samples was determined using polarography system.

Results: Second week sampling revealed higher amount of cadmium in the groups receiving probiotics compared to that of the group that received only Cd. In fourth week, liver cadmium concentration in the groups that received probiotic was lower than the cadmium alone group. But this difference was only significant in the group that received *Bifidobacterium*.

Conclusion: This study showed *Bifidobacterium* BB12 as the most effective in reducing the concentration of cadmium in liver. Therefore, considering the physiological benefits of probiotic bacteria, this strain could be used as a supplementary in probiotic products to protect against heavy metal toxicity.

Keywords: *Bifidobacterium lactis*, Cadmium, Lactobacillus acidophilus, Liver, Probiotic

J Mazandaran Univ Med Sci 2015; 24(120): 283-294 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و چهارم شماره ۱۲۰ دی سال ۱۳۹۳ (۲۹۴-۲۸۳)

تعیین اثر کاهش کادمیوم بافتی به‌وسیله باکتری‌های پروبیوتیک (لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدو باکتریوم لاکتیس) القاء شده در دستگاه گوارش موش‌های صحرایی

رقیه زارع[۱]
مهران محسنی[۲]
سید محمد مظلومی[۳]
محمدرضا اسکندری[۴]
کورش کمالی[۵]

چکیده

سابقه و هدف: کادمیوم فلزی سمی با نیمه عمری طولانی است که عمدتاً در کبد و کلیه‌ها تجمع می‌یابد. این مطالعه به بررسی اثر دریافت خوراکی دو گونه باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم لاکتیس به‌طور جداگانه و ترکیب با هم، بر حذف کادمیوم در سیستم گوارشی و تجمع آن در کبد موش‌های صحرایی طی چهار هفته پرداخته است.

مواد و روش‌ها: سه گروه از حیوانات آزمایشگاهی روزانه قبل از مواجهه خوراکی با محلول کادمیوم (CdCl2)، با محلول‌های باکتریایی گاواژ شدند و در گروهی دیگر حیوانات تنها با کلرید کادمیوم مواجهه شدند. در پایان هفته دوم و چهارم نمونه‌گیری از کبد حیوانات انجام شده و غلظت کادمیوم در آن‌ها پس از اندازه‌گیری به‌وسیله دستگاه پلاروگراف، مورد بررسی آماری قرار گرفت.

یافته‌ها: بررسی داده‌های هفته دوم نشان داد، غلظت کادمیوم در گروه‌های دریافت‌کننده باکتری پروبیوتیک از گروه دریافت‌کننده کادمیوم به‌تنهایی بیشتر است؛ در نتایج هفته چهارم دیده شد که غلظت کادمیوم در تمامی گروه‌های پروبیوتیکی از گروه کادمیوم به‌تنهایی کمتر است و این تفاوت تنها در گروه بیفیدوباکتریوم معنادار دیده شد.

استنتاج: به‌طور کلی با توجه به مشاهده تأثیر بهتر در گروه دریافت‌کننده بیفیدوباکتریوم و ضعیف بودن عملکرد دیگر گروه‌ها، همچنین با توجه به اثرات فیزیولوژیکی مفید حاصل از مصرف این باکتری‌ها از جمله خواص آنتی‌اکسیدانی به نظر می‌رسد، استفاده از گونه بیفیدوباکتریوم لاکتیس BB12 در تولید فرآورده‌های پروبیوتیک با هدف کاهش آسیب‌های ناشی از مواجهه با کادمیوم مفید باشد.

واژه های کلیدی: کادمیوم، پروبیوتیک، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، بیفیدوباکتریوم لاکتیس، کبد.

مقدمه

فلزات سنگین مخاطرات گوناگونی را در بدن انسان و حیوان، حتی در مقادیر کم مواجهه، موجب می‌شوند (۱). کادمیوم فلزی سنگین با ظرفیت سرطان‌زایی آشکار است (۲). این فلز با نیمه عمری طولانی در حدود دو تا سه دهه در بدن تجمع می‌یابد و می‌تواند موجب سمیت در ریه، کبد، کلیه، سیستم قلبی

مولف مسئول: مهران محسنی- زنجان، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، دانشکده داروسازی، گروه کنترل غذا و دارو Email: mohsenim@zums.ac.ir
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد بهداشت و ایمنی مواد غذایی، دانشکده بهداشت و پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، ایران
۲. استادیار گروه کنترل غذا و دارو، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، ایران
۳. استادیار گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، مرکز تحقیقات و دانشکده تغذیه و علوم غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، ایران
۴. استادیار گروه فارماکولوژی و سم‌شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، ایران
۵. استادیار گروه بهداشت و ایمنی مواد غذایی، دانشکده بهداشت و پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۳/۸/۵ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۳/۹/۱۰ تاریخ تصویب : ۱۳۹۳/۱۰/۱۴

عروقی، استخوان و سیستم ایمنی شود (۳). مواجهه در انسان بیشتر از راه‌های تنفسی و خوراکی در نتیجه موقعیت‌های محیطی یا شغلی ایجاد می‌شود. سیگار کشیدن همچنین می‌تواند منبع مهم مواجهه با کادمیوم باشد (۲). با این حال تجمع کادمیوم در افراد غیر سیگاری که مواجهه شغلی ندارند، در درجه اول با مصرف غذا ایجاد می‌شود (۴، ۵). این فلز تقریباً در همه انواع مواد غذایی با غلظت‌های گوناگون حضور دارد. غذاهای گیاهی بیشترین غلظت کادمیوم را در مقایسه با گوشت، تخم‌مرغ، لبنیات و ماهی دارند (۶).

پروبیوتیک‌ها، طبق تعریف سازمان بهداشت جهانی (WHO) میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که وقتی در مقادیر کافی مصرف شوند، فواید سلامتی برای میزبان به همراه می‌آورند (۷). علاوه بر فواید فیزیولوژیکی زیادی که مصرف این باکتری‌ها برای انسان فراهم می‌کند (۸-۱۰)، مطالعات اخیر نشان می‌دهند، برخی از پروبیوتیک‌ها توانایی اتصال و حذف فلزات سنگین از جمله کادمیوم را در محیط‌های آزمایشگاهی دارند (۱۱-۱۴). بنابراین به نظر می‌رسد این باکتری‌ها می‌توانند عوامل خوبی برای کاهش جذب گوارشی و سمیت ناشی از کادمیوم در بدن باشند. با این حال مطالعات انجام شده برای بررسی این فرضیه بسیار محدود بوده و اخیراً تنها یک مطالعه، توانایی باکتری‌های پروبیوتیک را در کاهش «سمیت حاد» کادمیوم در موجود زنده برای مدت زمان کوتاه موردبررسی قرار داده است (۱۵)؛ اما تاکنون پژوهشی در خصوص این فرآیند در بلندمدت بر روی موجود زنده انجام نشده است. به همین دلیل مطالعه حاضر به بررسی اثر دریافت خوراکی دو گونه باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس LA5 و بیفیدوباکتریوم لاکتیس BB12 که به‌طور گسترده در تولید فرآورده‌های پروبیوتیک مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۶) به‌طور جداگانه و ترکیب با هم بر حذف کادمیوم گوارشی و تجمع این فلز در کبد موش‌های صحرایی به مدت چهار هفته پرداخته است. برای کنترل مواجهه کلی یا به‌عنوان شاخصی برای میزان کادمیوم بدن، غلظت این فلز در بافت کبد احتمالاً بهترین مقیاس است. کبد تقریباً نیمی از میزان کادمیوم بدن را انباشته می‌کند. همچنین میزان کادمیوم در این بافت بسیار پایدار است و بر خلاف کلیه، کبد معمولاً در برابر سمیت کادمیومی مقاوم است (۱۷).

مواد و روش‌ها

حیوانات آزمایشگاهی

۶۴ سر موش صحرایی نر از نژاد ویستار با میانگین وزنی ۱۸۰-۱۵۰ گرم از مرکز حیوانات آزمایشگاهی انستیتوپاستور تهران خریداری و به محل نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی زنجان منتقل شد. حیوانات در قفس‌های مجهز به جایگاه آب و غذا، در دمای ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۵±۵۵ درصد و سیکل روشنایی و خاموشی ۱۲ ساعته در طول دوره‌های انطباق و آزمایش نگهداری می‌شدند و دسترسی آزاد به آب و غذا در تمام دوره برای آن‌ها فراهم بود.

پس از طی دوره انطباق به مدت یک هفته، موش‌ها به‌طور تصادفی به هشت گروه به شرح زیر تقسیم شده و به مدت چهار هفته مورد مطالعه قرار گرفتند:

گروه ۱: موش‌های صحرایی دریافت‌کننده رژیم غذایی استاندارد و آب سالم (کنترل)؛

گروه ۲: موش‌های صحرایی دریافت‌کننده رژیم غذایی استاندارد همراه با محلول لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم لاکتیس با هم و آب آشامیدنی سالم؛

گروه ۳: موش‌های صحرایی دریافت‌کننده رژیم غذایی استاندارد همراه با محلول شیر پس چرخ[1] و آب

[1] Skim milk

آشامیدنی سالم؛

گروه ۴: موش‌های صحرایی دریافت‌کننده رژیم غذایی استاندارد همراه با محلول کلرید کادمیوم ($CdCl_2$)؛

گروه ۵: موش‌های صحرایی دریافت‌کننده رژیم غذایی استاندارد همراه با محلول لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و محلول کلرید کادمیوم؛

گروه ۶: موش‌های صحرایی دریافت‌کننده رژیم غذایی استاندارد همراه با محلول بیفیدوباکتریوم لاکتیس و محلول کلرید کادمیوم؛

گروه ۷: موش‌های صحرایی دریافت‌کننده رژیم غذایی استاندارد همراه با محلول لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم لاکتیس با هم و محلول کلرید کادمیوم؛

گروه ۸: موش‌های صحرایی دریافت‌کننده رژیم غذایی استاندارد همراه با محلول حاوی شیر پس چرخ و محلول کلرید کادمیوم.

تهیه محلول‌های باکتریایی و کلرید کادمیوم

از آنجا که محصولات لبنی پروبیوتیک باید در زمان مصرف حداقل حاوی 10^{6}-10^{7} cfu/ml (Colony Forming Unit) از این باکتری‌ها باشند (۱۸، ۱۹)، برای تهیه محلول‌های باکتریایی در هر روز از این مطالعه به ازای هر موش صحرایی، ۰/۰۱ گرم پودر کشت خشک شده در شرایط انجماد[1] باکتری‌های مذکور (Hanssen Denmark, DVS: L.acidophilus LA5 & B.lactis BB12) که مستقیماً در تهیه محصولات پروبیوتیک مورد استفاده قرار می‌گیرند و معمولاً حاوی بیش از 10^{11} cfu/g میکروارگانیسم هستند (۲۰)، در 1ml نرمال سایلین حل و به گروه‌های دریافت‌کننده پروبیوتیک خورانده شد.

[1] Freeze-dried

شمارش کلی میکروبی (cfu در گرم) بسته‌های حاوی پودر باکتریایی، در ابتدای هفته اول، پایان هفته دوم و پایان هفته چهارم با کشت بر روی MRS آگار (De Man Rogosa Sharpe Agar) و گرمخانه گذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت در شرایط بی‌هوازی محاسبه و میانگین آن‌ها به‌عنوان cfu/g نهایی پودر هر کدام از باکتری‌ها در نظر گرفته شد (در بخش یافته‌ها به نتایج این بخش اشاره شده است).

از آنجا که پودر باکتری‌های پروبیوتیک خشک شده به روش انجماد دارای ماده زمینه‌ای شیر پس چرخ است، برای حذف اثر احتمالی این ماده، در گروه ۸ این مطالعه حیوانات روزانه ۰/۰۱ گرم شیر پس چرخ[2] محلول در یک سی‌سی نرمال سایلین قبل از محلول کلرید کادمیوم دریافت کردند.

میزان LD_{50} کادمیوم در موش‌های صحرایی برای تهیه محلول کادمیومی، ۵۰۰۰- ۴۰۰۰ میلی‌گرم برای هر کیلوگرم در نظر گرفته شد (۲۱) و در گروه‌های مواجهه با کادمیوم بر پایه مطالعه‌ای مرتبط، هر یک از موش‌های صحرایی روزانه با یک سی‌سی آب مقطر حاوی ۲۰۰ppm کلرید کادمیوم[3] گاواژ می‌شدند (۲۲). دریافت کادمیوم حدود یک ساعت پس از محلول باکتریایی یا شیر پس چرخ صورت می‌گرفت.

نمونه‌گیری و سنجش میزان کادمیوم در کبد

برای نمونه‌گیری، کبد حیوانات در پایان هفته دوم (از سه موش صحرایی در هر گروه) و پایان هفته چهارم (از تمامی موش‌هایی صحرایی باقی‌مانده در گروه‌ها) تحت شرایط بیهوشی جداسازی شد. سپس برای هضم نمونه‌ها طبق دستورالعمل دستگاه هاضم[4] ۰/۲ گرم از کبد به ۸ میلی‌لیتر HNO_3 ۶۵% و یک میلی‌لیتر H202

[2] Quelab, Canada
[3] Merck, Germany
[4] Sino-MDS-10, China

جدول ۱: ترکیب زمان و دمای بکار رفته در دستگاه هضم

مرحله	زمان (دقیقه)	دما (°C)	قدرت (W)
۱	۱۰	۱۳۰	۴۰۰
۲	۵	۱۵۰	۴۰۰
۳	۱۰	۱۸۰	۴۰۰

۳۵% در سل دستگاه هاضم اضافه شده و طی سه مرحله گرمایی با مشخصات زیر (جدول شماره ۱) هضم انجام شد.

نمونه‌های هضم شده تا زمان اندازه‌گیری میزان کادمیوم آن‌ها، در لوله‌های آزمایشگاهی در بسته و در یخچال نگهداری شدند.

برای سنجش غلظت کادمیوم کبد از دستگاه پلاروگراف[1] استفاده شد که غلظت ترکیبات و عناصر را به روش ولتامتریک اندازه‌گیری می‌کند. این روش یکی از حساس‌ترین روش‌های اندازه‌گیری کمی است که قادر به اندازه‌گیری عناصر و ترکیبات در غلظت‌های خیلی کم، تا حد قسمت در میلیون و حتی قسمت در بیلیون است (محدوده قابل تشخیص فلز کادمیوم در دستگاه پلاروگراف از ۰/۱μg/L تا ۵۰mg/L است). پس از آماده‌سازی نمونه‌ها طبق دستورالعمل دستگاه، غلظت کادمیوم آن‌ها به روش ASV (Anodic Stripping Voltammetry) و سه بار تکرار اندازه‌گیری شد.

در روش ASV از روش افزودن استاندارد داخلی برای بررسی صحت داده‌ها استفاده می‌شود. در این شیوه برای هر نمونه به‌صورت جداگانه نمودار کالیبراسیون رسم می‌شود که دقت آن را افزایش می‌دهد. برای این منظور محلولی تحت عنوان «محلول استاندارد» از عنصر مورد نظر (کادمیوم) تهیه و در سه مرحله (3 addition) پس از اندازه‌گیری اولیه نمونه، با اعلام دستگاه به نمونه اضافه شد. اندازه‌گیری در هر مرحله دو بار (2 replication) تکرار شد.

[1] Metrohm 797, Swiss

جدول ۲: مقادیر گزارش شده از محلول استاندارد توسط دستگاه پلاروگراف

مقدار Cd استاندارد	۲ppm	۱ppm	۰/۵ppm	۰/۲۵ppm
مقدار گزارش شده	۲۱۴۰/۲±۶۳	۹۸۸/۲±۱۶	۵۰۰/۳±۱۰/۹	۲۴۲/۴±۲
توسط دستگاه (μg/l)	(۲/۱۴ppm)	(۰/۹۸ppm)	(۰/۵ppm)	(۰/۲۴ppm)

برای بررسی دقت داده‌های گزارش شده توسط دستگاه، غلظت‌های مختلفی از محلول استاندارد تهیه و به‌وسیله دستگاه مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. همان‌طور که در جدول شماره دو مشاهده می‌شود، اعداد اعلام شده توسط دستگاه به اعداد واقعی بسیار نزدیک بوده که نشان‌دهنده دقت دستگاه در اعلام نتایج است.

در این مطالعه، الکترود کار دستگاه از نوع قطره جیوه آویزان (HMDE)، سرعت همزن[2] برابر ۲۰۰۰ دور در دقیقه، مدت زمان هوادهی به‌وسیله نیتروژن برای اکسیژن زدایی محلول[3] برابر ۳۰۰ ثانیه، پتانسیل احیاء الکترولیت‌ها بر سطح الکترود[4] برابر V ۱/۱۵- و مدت‌زمان آن[5] برابر ۹۰ ثانیه، زمان لازم برای توزیع یکنواخت الکترولیت‌ها بر سطح الکترود[6] ۱۰ ثانیه، پتانسیل شروع[7] برابر V۱/۱۵-، پتانسیل پایانی[8] V ۰/۰۵ و پتانسیل اکسید فلز کادمیوم V ۰/۵۶- است.

تجزیه و تحلیل آماری

نتایج به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار ۱۱/۵ SPSS و آزمون آنالیز واریانس ANOVA به روش Post Hoc (LSD) و در موارد لازم با استفاده از روش‌های ناپارامتریک مورد ارزیابی قرار گرفت. اختلاف آماری کمتر از ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد.

[2] Stirrer/RDE
[3] Purge time
[4] Deposition potential
[5] Deposition time
[6] Equilibration time
[7] Start potential
[8] End potential

جدول ۳: مقادیر cfu/g باکتری‌های استفاده شده در این مطالعه

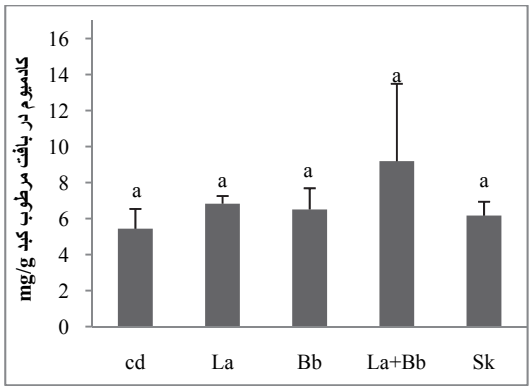
باکتری (cfu/g)	ابتدای هفته اول	پایان هفته دوم	پایان هفته چهارم	میانگین
لاکتوباسیلوس LA5	۷×۱۰^{۱۱}	$۱/۴۶\times۱۰^{۱۱}$	$۱/۵\times۱۰^{۱۱}$	$۳/۵\times۱۰^{۱۱}$
بیفیدوباکتریوم BB12	$۲/۸\times۱۰^{۱۲}$	$۳/۶\times۱۰^{۱۱}$	$۸/۵\times۱۰^{۱۱}$	$۱/۳\times۱۰^{۱۲}$

یافته ها

مقادیر سلولی محلول‌های باکتریایی

نتایج حاصل از شمارش کلی میکروبی cfu/g پودر باکتری‌های مورد استفاده در سه نوبت کشت در جدول شماره ۳ آمده است:

بدین ترتیب با توجه به اینکه ۰/۰۱ گرم از پودر باکتری برای تهیه محلول استفاده می‌شد، هر یک از موش‌های صحرایی در گروه دریافت‌کننده لاکتوباسیلوس روزانه cfu/ml $۳/۵\times۱۰^{۹}$، گروه دریافت‌کننده بیفیدوباکتریوم لاکتیس cfu/ml $۱/۳\times۱۰^{۱۰}$ و گروه دریافت‌کننده ترکیب دو باکتری روزانه مجموع این دو مقادیر را با هم دریافت کردند.



نمودار ۱: غلظت کادمیوم در گروه‌های مواجهه- هفته ۲. مقادیر بیانگر میانگین ± انحراف معیار است. متفاوت بودن حروف معنی‌دار بودن نتایج (P< ۰/۰۵) را بین گروه‌ها پس از آزمون تعقیبی (LSD) آنالیز واریانس نشان می‌دهد. Cd: گروه دریافت‌کننده کادمیوم به‌تنهایی. La: گروه دریافت‌کننده لاکتوباسیلوس و کادمیوم. Bb: گروه دریافت‌کننده بیفیدوباکتریوم و کادمیوم. La+Bb: گروه دریافت‌کننده ترکیب دو باکتری و کادمیوم. Sk: گروه دریافت‌کننده شیر پس چرخ و کادمیوم.

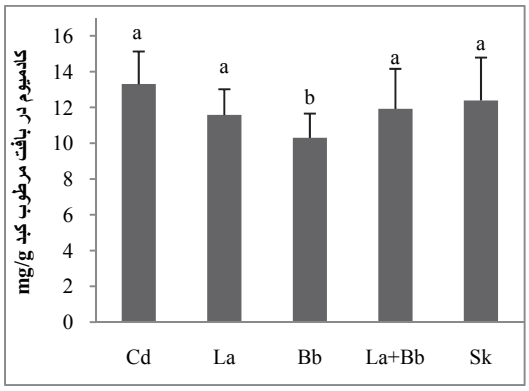
جدول ٤: میانگین ± انحراف معیار غلظت کادمیوم کبد در گروه‌ها (mg/g) و p value به دست آمده از مقایسه گروه‌ها در دو نوبت نمونه‌گیری

گروه‌های مطالعه	هفته دوم	هفته چهارم	p value
NC	۰/۰۳ ± ۰/۰۳	۰/۱۰ ± ۰/۲۲	۰/۵۷
PC	۰/۰۷ ± ۰/۰۴	کمتر از حد تشخیص	۰/۰۱
SC	۰/۰۶ ± ۰/۰۴	۰/۰۴ ± ۰/۰۶	۰/۶۵
Cd	۵/۴۴ ± ۱/۱۰	۱۳/۳۱ ± ۱/۸۲	۰/۰۲
La+Cd	۶/۸۳ ± ۰/۴۳	۱۱/۵۸ ± ۱/۴۴	۰/۰۳
Bb+Cd	۶/۵۱ ± ۱/۱۸	۱۰/۳۰ ± ۱/۳۶	۰/۰۳
La+Bb+Cd	۹/۱۹ ± ۴/۳۰	۱۱/۹۲ ± ۲/۲۴	۰/۲۸
Sk+Cd	۶/۱۷ ± ۰/۷۷	۱۲/۳۹ ± ۲/۴۰	۰/۰۲

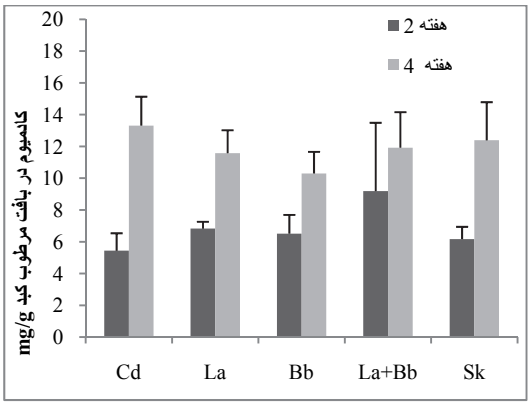
NC: گروه کنترل نرمال، PC: گروه کنترل پروبیوتیکی، SC: گروه کنترل شیر پس چرخ، Cd: گروه دریافت‌کننده کادمیوم به‌تنهایی، La+Cd: گروه دریافت‌کننده لاکتوباسیلوس و کادمیوم، Bb+Cd: گروه دریافت‌کننده بیفیدوباکتریوم و کادمیوم، La+Bb+Cd: گروه دریافت‌کننده پروبیوتیک ترکیبی و کادمیوم، Sk+Cd: گروه دریافت‌کننده شیر پس چرخ و کادمیوم.

نتایج حاصل از سنجش کادمیوم کبدی

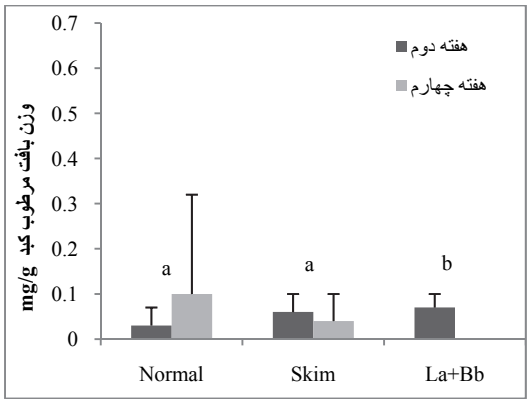
جدول شماره ۳ نتایج حاصل از سنجش میزان کادمیوم نمونه‌های کبدی کلیه گروه‌ها را در دو نوبت نمونه‌گیری و مقادیر p value حاصل از مقایسه داده‌های گروه‌های مشابه را نشان می‌دهد. تعداد نمونه‌های هفته دوم در هر گروه سه عدد و در هفته چهارم در هر گروه



نمودار ۲: غلظت کادمیوم در گروه‌های مواجهه، هفته ۴. مقادیر بیانگر میانگین ± انحراف معیار است. متفاوت بودن حروف معنی‌دار بودن نتایج (P< ۰/۰۵) را بین گروه‌ها پس از آزمون تعقیبی (LSD) آنالیز واریانس نشان می‌دهد. Cd: گروه دریافت‌کننده کادمیوم به‌تنهایی. La: گروه دریافت‌کننده لاکتوباسیلوس و کادمیوم. Bb: گروه دریافت‌کننده بیفیدوباکتریوم و کادمیوم. La+Bb: گروه دریافت‌کننده ترکیب دو باکتری و کادمیوم. Sk: گروه دریافت‌کننده شیر پس چرخ و کادمیوم.



نمودار ۳: مقایسه غلظت کادمیوم در گروه‌های مواجهه، هفته ۲ و ۴. مقادیر بیانگر میانگین ± انحراف معیار است. Cd: گروه دریافت‌کننده کادمیوم به‌تنهایی. La: گروه دریافت‌کننده لاکتوباسیلوس و کادمیوم. Bb: گروه دریافت‌کننده بیفیدوباکتریوم و کادمیوم. La+Bb: گروه دریافت‌کننده ترکیب دو باکتری و کادمیوم. Sk: گروه دریافت‌کننده شیر پس چرخ و کادمیوم.



نمودار ٤: مقایسه غلظت کادمیوم در گروه‌های کنترل، هفته ۲ و ۴. مقادیر بیانگر میانگین ± انحراف معیار است. Normal: گروه دریافت‌کننده غذای استاندارد، La+Bb: گروه دریافت‌کننده ترکیب دو باکتری و کادمیوم، Skim: گروه دریافت‌کننده شیر پس چرخ و کادمیوم.

پنج عدد است (به‌جز در گروه‌های ۲، ۵، ۶ و ۷ که در هر کدام یک عدد ریزش وجود داشت). تجزیه و تحلیل آماری داده‌های این جدول نشان داد، میزان کادمیوم کبد در گروه‌های مواجهه با این فلز نسبت به گروه‌های کنترل، در هر دو نوبت نمونه‌گیری افزایش معنی‌داری دارد (P<۰/۰۵). همچنین میزان این فلز در گروه‌های مواجهه در پایان هفته چهارم نسبت به هفته دوم به‌جز در گروه ۷ که همان گروه پروبیوتیک ترکیبی است، به‌طور معنی‌داری بیشتر است (۰/۰۵ >P). با مقایسه گروه‌های کنترل در دو نوبت نمونه‌گیری، مشاهده می‌شود که غلظت کادمیوم گروه پروبیوتیکی در هفته چهارم نسبت به هفته دوم کاهش معنی‌داری دارد (P< ۰/۰۵).

بررسی نتایج نمونه‌گیری هفته دوم نشان می‌دهد، میزان کادمیوم در هر سه گروه پروبیوتیکی مواجهه با این فلز از گروه کادمیوم به‌تنهایی بیشتر است (نمودار شماره ۱) و در بین گروه‌های پروبیوتیکی گروه بیفیدوباکتریوم کمترین میزان را نشان می‌دهد، اما این تفاوت‌ها از نظر آماری معنی‌دار نبود (P> ۰/۰۵).

اما در نمونه‌های هفته چهارم (نمودار شماره ۲) مشاهده می‌شود، غلظت کادمیوم در گروه دریافت‌کننده بیفیدوباکتریوم از دیگر گروه‌های پروبیوتیکی کمتر است و کاهش معنی‌داری را در مقایسه با گروه کادمیوم به‌تنهایی نشان می‌دهد (P<۰/۰۵).

غلظت کادمیوم در گروه دریافت‌کننده شیر پس چرخ همراه با کادمیوم در مقایسه با گروه کادمیوم به‌تنهایی در هر دو نوبت نمونه‌گیری تفاوت آماری معناداری در برنداشت (P> ۰/۰۵).

نمودار شماره ۳ گروه‌های مواجهه با کادمیوم و نمودار شماره ۴ گروه‌های کنترل مطالعه را در دو نوبت نمونه‌گیری در کنار هم نشان می‌دهد. همان‌طور که در نمودار شماره ۳ مشاهده می‌شود، گروه کادمیوم به‌تنهایی بیشترین افزایش غلظت کادمیوم را در هفته چهارم نسبت به هفته دوم نشان می‌دهد و کمترین میزان افزایش مربوط به گروه ترکیبی و بعد از آن گروه بیفیدوباکتریوم است. در نمودار شماره ۴ دیده می‌شود، میزان کادمیوم کبد در گروه کنترل پروبیوتیکی در هفته چهارم به شکل معنی‌داری نسبت به هفته دوم مطالعه کاهش یافته است (P<۰/۰۵).

بحث

مطالعه حاضر برای اولین بار اثر دو گونه باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم لاکتیس را به‌صورت جداگانه و ترکیب با هم، به مدت طولانی بر تجمع کبدی کادمیوم در موجود زنده مورد بررسی قرار داده است. بررسی داده‌های این مطالعه در پایان دوره نشان داد که غلظت کادمیوم کبدی در هر سه گروه پروبیوتیکی مواجهه با کادمیوم از گروه کادمیوم به‌تنهایی کمتر است، اما این کاهش تنها در گروه بیفیدوباکتریوم معنی‌دار دیده شد. اثر گونه بیفیدوباکتریوم لاکتیس در کاهش تجمع کادمیوم کبدی در مطالعه حاضر، با نتیجه مطالعه ژای[1] و همکاران (۱۵) که دریافت پروبیوتیک‌ها، به‌ویژه گونه لاکتوباسیلوس پلانتاروم، را موجب کاهش غلظت کادمیوم بافتی در مواجهه حاد می‌داند، همخوانی دارد؛ آن‌ها در مطالعه خود نشان داده‌اند، دریافت باکتری به‌صورت زنده پس از مواجهه با کادمیوم (در مقایسه با گروه دریافت‌کننده پروبیوتیک قبل از مواجهه با کادمیوم)، موجب کاهش بیشتری در جذب روده‌ای کادمیوم و تجمع بافتی آن و همچنین بهبود استرس اکسیداتیو در کبد و کلیه و بهبود تغییرات بافت‌شناسی می‌شود. آن‌ها بیان کرده‌اند، دریافت این‌گونه باکتری در سمیت حاد با کادمیوم به دلیل عملکردهای فیزیولوژیکی خاص آن مؤثرتر از درمان با آنتی‌اکسیدان‌هاست.

همچنین تأثیر بیشتر بیفیدوباکتریوم لاکتیس در این مطالعه با نتایج مطالعه هالتونن[2] و همکاران (۱۴) در شرایط آزمایشگاهی که این‌گونه را یکی از مؤثرترین گونه‌های مورد بررسی در اتصال و حذف کادمیوم در شرایط آزمایشگاهی می‌داند، مطابقت دارد. اما گونه لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بکار رفته در این مطالعه نتوانست کاهش معنی‌داری در غلظت کادمیوم کبدی در گروه‌های مواجهه با این فلز پس از طی چهار هفته ایجاد کند.

کادمیوم پس از جذب از سیستم گوارشی، این فلز به پروتئین‌های خون اتصال می‌یابد، به کبد منتقل شده و در آنجا به متالوتیونین (MT) که پروتئینی با وزن مولکولی پایین و غنی از سولفیدریل است (۱۷، ۲۳) متصل می‌شود. کمپلکس کادمیوم- متالوتیونین (Cd-Mt) ساخته شده در کبد، در چرخه خونی آزاد و به‌وسیله سلول‌های مجاری پروکسیمال کلیوی جذب می‌شود. هنگامی که ساخت MT برای اتصال به همه یون‌های کادمیوم در کبد ناکافی باشد، کادمیوم‌های غیر متصل به متالوتیونین موجب آسیب کبدی می‌شوند (۲۴). در واقع تولید MT به دنبال مواجهه با کادمیوم یک مکانیسم حفاظتی در برابر میزان‌های کم مواجهه با این فلز سمی است (۲۵).

در بین روش‌های مختلف مورد بررسی در سال‌های گذشته برای کاهش سمیت ناشی از کادمیوم، استفاده از باکتری‌های پروبیوتیک توجه خاصی را به خود معطوف کرده است؛ چرا که این باکتری‌ها جزئی از فلور طبیعی لوله گوارشی بوده و به دلیل استفاده گسترده در مواد غذایی، جزء ترکیبات بی‌خطر (GRAS) دسته‌بندی شده‌اند (۱). مطالعات مختلف نشان می‌دهند، پروبیوتیک‌ها از جمله لاکتیک اسید باکتری‌ها و بیفیدوباکتریوم‌ها، عوامل مؤثری در اتصال سریع به فلزات سمی از جمله کادمیوم در محیط‌های آزمایشگاهی هستند (۱، ۱۱-۱۴) و احتمالاً می‌توانند گزینه مناسبی برای حذف بیولوژیکی این سموم باشند.

در مطالعات مختلف برای فرآیند جذب فلزات به‌وسیله باکتری‌ها در محیط آزمایشگاهی، مکانیسم‌هایی گوناگونی از جمله تشکیل کمپلکس، تبادل یونی، جذب، چنگالی کردن و رسوب ذره‌ای پیشنهاد شده است (۱۲، ۱۴).

[1] Zhai
[2] Halttunen

سطح لاکتیک اسید باکتری‌ها، همانند دیگر باکتری‌های گرم مثبت، از لایه ضخیمی از پپتیدوگلیکان، (لیپو) تیکوئیک اسید، پروتئین و پلی ساکارید تشکیل شده است که ساختارهای مذکور حاوی انواع مختلف گروه‌های باردار نظیر گروه‌های کربوکسیل، هیدروکسیل و فسفات هستند. بنابراین این باکتری‌ها دارای تعداد زیادی از باندهای مختلف با ظرفیت اتصال به یون‌های کاتیونی نظیر کادمیوم و سرب هستند (۱۴). بعلاوه نشان داده شده است که باکتری‌های گرم مثبت دارای بار الکتریکی منفی در اطراف خود هستند که این ویژگی می‌تواند عامل اتصال سطحی این باکتری‌ها به یون‌های دارای بار مثبت باشد (۱۳، ۱۴).

بررسی نمونه‌های هفته دوم مطالعه نیز نشان داد، میزان کادمیوم کبد در هر سه گروه پروبیوتیکی مواجهه با این فلز از گروه کادمیوم به‌تنهایی بیشتر است. گرچه کمترین میزان کادمیوم را در بین گروه‌های پروبیوتیکی، گروه بیفیدوباکتریوم نشان داد اما تفاوت آماری معنی‌داری دیده نشد.

نتایج به دست آمده در هفته دوم با یافته‌های موجود مبنی بر مؤثر بودن باکتری‌های پروبیوتیک در اتصال و حذف کادمیوم در شرایط آزمایشگاهی و همچنین نتایج مطالعه ژای (۱۵) متناقض است. این تناقض ممکن است به دلیل تفاوت در نوع باکتری‌های پروبیوتیک مورد استفاده و در نتیجه عملکرد متفاوت آن‌ها در موجود زنده باشد. از طرفی مطالعه هالتونن و همکاران (۲۰۰۸) نشان می‌دهد، روند جذب کادمیوم و سرب به‌وسیله دو گونه لاکتوباسیلوس فرمنتوم و بیفیدوباکتریوم لانگوم در محیط آزمایشگاهی در کنار دیگر عوامل محیطی، به‌ویژه حضور کاتیون‌های فلزی از جمله روی (Zn)، آهن (Fe)، کلسیم (Ca) و منیزیم (Mg) با اختلالاتی همراه است و می‌تواند ظرفیت اتصال یون‌های فلزی به‌خصوص کادمیوم را به باکتری‌ها به‌طور معناداری کاهش دهد که این فرایند به رقابت بین این فلزات بر سر جایگاه‌های اتصال باکتریایی نسبت داده شده است. مطالعه وی همچنین بیان می‌کند، اتصال بین یون کادمیوم و سطح باکتری اتصال ضعیفی است و علاوه بر برگشت‌پذیر بودن، شستشوی توده‌های متشکل از باکتری و فلز، به‌وسیله آب مقطر، محلول اسیدی رقیق یا محلول رقیق EDTA (به‌عنوان عامل چنگالی کننده) می‌تواند به‌راحتی این اتصالات را از بین ببرد. این در حالی است که ظرفیت جذب دوباره فلز به‌وسیله باکتری نیز به شکل قابل‌ملاحظه‌ای کاهش می‌یابد (۱۲). از طرفی مطالعات متعدد از جمله مطالعه ابراهیم و همکاران نشان می‌دهند، اتصال و حذف فلزات به‌وسیله باکتری‌ها یک روند وابسته به pH بوده که اغلب با افزایش pH از ۴ تا ۷ به‌صورت خطی افزایش می‌یابد (۱۳)؛ بنابراین ممکن است pH پایین و نیز وجود دیگر یون‌ها در سیستم گوارشی موجب اختلال در عملکرد پروبیوتیک‌ها برای کاهش تجمع بافتی کادمیوم در موجود زنده و توجیهی بر اثربخشی کم آن‌ها در مطالعه حاضر باشد. به نظر می‌رسد فاصله زمانی موجود بین اتصال کادمیوم و باکتری تا دفع آن از سیستم گوارشی نیز می‌تواند، فرصت لازم را برای تأثیر عوامل مختلف از جمله عوامل عنوان شده در مطالعه هالتونن (۱۲) فراهم کرده و موجب از بین رفتن احتمالی این اتصال شود.

از سوی دیگر طبق نظریه ژای مقدم بودن دریافت محلول باکتریایی بر دریافت کادمیوم، همان‌گونه که در مطالعه ما انجام شده است، می‌تواند سبب کاهش تأثیرگذاری پروبیوتیک‌ها در اتصال به کادمیوم شود، چراکه توانایی اتصال و لانه‌گزینی[1] باکتری‌ها درون لوله گوارشی، در فاصله زمانی ایجاد شده تا مواجهه با کادمیوم می‌تواند از تعداد سطوح آزاد برای اتصال و

[1] Colonization

دفع این فلز از بدن بکاهد (۱۵). در این مطالعه موجود زنده به‌صورت متوالی و طولانی‌مدت باکتری‌های پروبیوتیک را دریافت کرده و به‌طور روزانه تحت تأثیر مواجهه با فلز سنگین (کادمیوم) قرار گرفته است که این شرایط مشابه دریافت معمول پروبیوتیک‌ها از مواد غذایی و مواجهه انسان با کادمیوم است. این روش می‌تواند فرصت کافی برای لانه گزینی پروبیوتیک‌ها در سیستم گوارشی ایجاد کند و به نظر می‌رسد شباهت و تطابق بیشتری با روند طبیعی مواجهه در انسان دارد.

عدم تفاوت آماری معنادار در سطح کادمیوم بافتی در گروه لاکتوباسیلوس پس از طی چهار هفته را می‌توان این‌گونه توجیه کرد که احتمالاً با توجه به نبود شواهد کافی در محیط آزمایشگاهی، این باکتری در اتصال به کادمیوم عملکرد ضعیفی دارد یا اینکه ممکن است برای تأثیر این باکتری پروبیوتیک بر غلظت کادمیوم کبدی به مدت‌زمان بیشتری از مداخله نیاز باشد.

نتایج هفته دوم این مطالعه نشان داد، بکار بردن ترکیب دو باکتری با هم با مکانیسم نامشخصی موجب افزایش بیشتر جذب گوارشی کادمیوم و تجمع بیشتر آن نسبت به دو گروه پروبیوتیکی دیگر در کبد می‌شود که این مسئله می‌تواند نشان‌دهنده تداخل کاری بین دو باکتری در اتصال به کادمیوم باشد؛ اما مقایسه داده‌های گروه‌های مشابه در دو نوبت نمونه‌گیری نشان می‌دهد، گروه دریافت‌کننده کادمیوم به‌تنهایی بیشترین و گروه ترکیبی کمترین افزایش غلظت کادمیوم را در هفته چهارم نسبت به هفته دوم دارد؛ به‌طوری که برخلاف دیگر گروه‌های مواجهه، سطح کادمیوم هفته چهارم گروه ترکیبی نسبت به هفته دوم افزایش معناداری را نشان نمی‌دهد. عملکرد بهتر گروه ترکیبی در پایان دوره نسبت به هفته دوم ممکن است به دلیل غالب شدن گونه مؤثرتر یعنی بیفیدوباکتریوم نسبت به لاکتوباسیلوس با گذشت زمان باشد. همچنین بهبود روند کاهش جذب گوارشی کادمیوم در هفته چهارم این مطالعه، به‌خصوص در گروه دریافت‌کننده بیفیدوباکتریوم و گروه ترکیبی، می‌تواند به دلیل تطابق بیشتر باکتری‌های پروبیوتیک در سیستم گوارشی موجود زنده با گذشت زمان باشد.

از طرفی با بررسی گروه‌های کنترل این مطالعه که گروه‌های بدون دریافت کادمیوم هستند، دیده شد که میزان کادمیوم کبد در گروه پروبیوتیکی کاهش معنی‌داری را در پایان هفته چهارم نسبت به هفته دوم نشان می‌دهد. این احتمال وجود دارد که پروبیوتیک‌ها در غلظت‌های پایین کادمیوم با تحریک تولید متالوتیونین، سبب انتقال کادمیوم از کبد به کلیه‌ها شده و در نتیجه موجب کاهش تجمع کادمیوم کبدی شوند. بنابراین به نظر می‌رسد باکتری‌های پروبیوتیک در دوزهای کمتر کادمیوم تأثیر بهتری در اتصال و کاهش جذب گوارشی این فلز و در نتیجه کاهش تجمع بافتی دارند.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد، فرایند حذف کادمیوم به‌وسیله پروبیوتیک‌ها در سیستم گوارشی موجود زنده احتمالاً با اختلالاتی همراه است و ممکن است تحت تأثیر عوامل مختلفی از جمله گونه باکتریایی یا شرایط خاص سیستم گوارشی قرار گیرد و در نتیجه نقش این باکتری‌ها را در کاهش تجمع بافتی کادمیوم کمرنگ کند؛ اما به‌طور کلی با توجه به مشاهده تأثیر بهتر در گروه دریافت‌کننده بیفیدوباکتریوم و ضعیف بودن عملکرد دیگر گروه‌ها، همچنین با توجه به اثرات فیزیولوژیکی مفید حاصل از مصرف این باکتری‌ها از جمله خواص آنتی‌اکسیدانی که ممکن است موجب کاهش عوارض استرس اکسیداتیو ناشی از مواجهه با فلزات سنگین شود، به نظر می‌رسد استفاده از گونه بیفیدوباکتریوم لاکتیس BB12 در تولید فرآورده‌های

پروبیوتیک با هدف کاهش آسیب‌های ناشی از مواجهه با کادمیوم می‌تواند مفید باشد.

سپاسگزاری

این مقاله از پایان‌نامه مقطع کارشناسی ارشد مصوب دانشگاه علوم پزشکی زنجان استخراج شده است. محققین این مطالعه بدین‌وسیله از همکاری معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی زنجان، همچنین از همکاری صمیمانه دانشگاه علوم پزشکی شیراز و همه دوستانی که ما را در انجام این پژوهش یاری کردند، کمال تشکر را اعلام می‌دارند.

References

1. Kinoshita H, Sohma Y, Ohtake F, Ishida M, Kawai Y, Kitazawa H, et al. Biosorption of heavy metals by lactic acid bacteria and identification of mercury binding protein. Res Microbiol. 2013; 164(7):1-9.
2. Person RJ, Tokar E, Xu Y, Orihuela R, Olive Ngalame NN, Waalkes MP. Chronic cadmium exposure in vitro induces cancer cell characteristics in human lung cells. Toxicol Appl Pharmacol. 2013; 273(2):281-288.
3. Templeton DM, Liu X. Multiple roles of cadmium in cell death and survival. Chem Biol Interact. 2010;188(2):267–275.
4. Benoff S, Auborn K, Marmar JL, Hurley IR. Link between low-dose environmentally relevant cadmium exposures and asthenozoospermia in a rat model. Fertil Steril. 2008; 89(2 Suppl):73-79.
5. Filipic M. Mechanisms of cadmium induced genomic instability. Mutat Res. 2012; 733(1-2):69–77.
6. Monachese M, Burton JP, Reid G. Bioremediation and Tolerance of Humans to Heavy Metals through Microbial Processes: a Potential Role for Probiotics?. App Environ Microbiol. 2012;78(18):6397–6404.
7. Savard P, Lamarche B, Paradis M, Thiboutot H, Laurin E, Roy D. Impact of Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB-12 and, Lactobacillus acidophilus LA-5-containing yoghurt, on fecal bacterial counts of healthy adults. Int J Food Microbiol. 2011;149(1):50-57.
8. Hathout AS, Mohamed SR, El-Nekeety AA, Hassan NS, Aly SE, Abdel-Wahhab MA. Ability ofLactobacillus caseiandLactobacillus reuterito protect against oxidative stress in rats fed aflatoxins-contaminated diet. Toxiocn. 2011;58(2):179-186.
9. Andersson U, Bränning C, Ahrné S, Molin G, Alenfall J, Önning G, et al. Probiotics lower plasma glucose in the high-fat fed C57BL/6J mouse. Benef Microbes. 2010;1(2):189-196.
10. Ejtahed HS, Mohtadi-Nia J, Homayouni-Rad A, Niafar M, Asghari-Jafarabadi M, Mofid V. Probiotic yogurt improves antioxidant status in type 2 diabetic patients. Nutrition. 2012; 28(5):539–543.
11. Bhakta JN, Ohnishi K, Munekage Y, Wei MQ. Characterization of lactic acid bacteria-based probiotics as potential heavy metal sorbents. J App Microbiol. 2012;112(6):1193–206.

12. Halttunen T, Salminen S, Meriluoto J, Tahvonen R, Lertola K. Reversible surface binding of cadmium and lead by lactic acid and bifidobacteria. Int J Food Microbiol. 2008;125(2):170–175.
13. Fandi I, Halttunen T, Tahvonen R, Salminen S. Probiotic bacteria as potential detoxification tools: assessing their heavy metal binding isotherms. Can J Microbiol. 2006;52(9):877-885.
14. Halttunen T, Salminen S, Tahvonen R. Rapid removal of lead and cadmium from water by specific lactic acid bacteria. Int J Food Microbiol. 2007; 114(1):30–35.
15. Zhai Q, Wang G, Zhao J, Liu X, Tian F, Zhang H, et al. Protective Effects ofLactobacillus plantarumCCFM8610 against Acute Cadmium Toxicity in Mice. App Environ Microbiol. 2012;79(5):1508–1515.
16. Nybom SMK, Salminen S, Meriluoto J. Specific strains of probiotic bacteria are efficient in removal of several different cyanobacterial toxins from solution. Toxicon. 2008;52(2):214–220.
17. Scheuhammer AM. The Chronic Toxicity of Aluminium, Cadmium, Mercury, and Lead in Birds: A Review. Environ Pollut. 1987;46(4):263-95.
18. Meng XC, Stanton C, Fitzgerald GF, Daly C, Ross RP. Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. Food Chemistry. 2008;106(4):1406–1416.
19. Medic M, Vinderola CG, Perdigon G. Gut mucosal immunomodulation by probiotic fresh cheese. International Dairy Journal. 2004;14(7):611–8.
20. Saarela M, Mogensen G, Fonde´n R, Ma¨tto J, Mattila-Sandholm T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties, Review article. J Biotechnol. 2000;84:197 – 215.
21. WHO. Cadmium in Drinking-water. 2011.
22. Chukwuemeka RN, Magdalene IN, Imaria A, Joshua O, Damian CU, Bukola O, et al. Comparative analysis on the effect of Lycopersicon esculentum (tomato) in reducing cadmium, mercury and lead accumulation in liver. Food ChemToxicol. 2012;50(6): 2070–2073.
23. Nordberg GF. Historical perspectives on cadmium toxicology. Toxic App Pharmacol. 2009; 238(3): 192–200.
24. Akerstrom M, Barregard L, Lundh T, Sallsten G. The relationship between cadmium in kidney and cadmium in urine and blood in an environmentally exposed population. Toxic App Pharmacol. 2013;268(3): 286–293.
25. Bracken WM, Sharma RP, Kleinschuster SJ. Cadmium accumulation and subcellular distribution in relation to cadmium chlorid induced cytotoxicity in vitro. Toxicology. 1984 ;33(2):93-102.