ORIGINAL ARTICLE

Effects of Cadmium on Oxidative Stress Markers, and Insulin Secretion and Content in Pancreatic Isolated Islet of Rats

Mojtaba Sargazi[1],
Fatemeh Zal[2],
Narges Karbalaei[3]

[1] MSc Student in Physiology, Faculty of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.
[2] Associate Professor, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
[3] Assistant Professor, Histomorphometry and Stereology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

(Received July 1, 2017 Accepted September 25, 2017)

Abstract

Background and purpose: Cadmium is a highly toxic industrial and environmental pollutant that is known as an important risk factor for developing diabetes. Oxidative stress is reported to be highly associated with diabetes and its complications. The aim of this study was to evaluate the effects of cadmium on oxidative stress response and secretory function of islets of Langerhans from rat pancreas.

Materials and methods: Male Sprague-Dawley rats weighing 260-230 g, were divided into two groups, including a control and an experimental group that received cadmium chloride. After intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) on day 30, the animals were deeply anesthetized and the pancreas was removed for pancreatic islet isolation. Oxidative stress, islet insulin content and secretion were also evaluated in pancreas.

Results: The findings showed a significant increase in blood glucose concentration and significant decreases in body weight, blood insulin level, insulin content, and secretion of pancreatic islet in response to glucose concentrations in cadmium exposed group compared with those of the control group ($P< 0.05$). We found that the effects of cadmium on the parameters of oxidative stress led to a significant increase in level of MDA and significant decrease in GSH and activity of antioxidant enzymes in pancreas tissue ($P< 0.05$).

Conclusion: In this study, cadmium led to increase in oxidative stress which can be an important factor in the decreased *insulin* synthesis and secretion from pancreatic beta cells.

Keywords: cadmium, insulin secretion, oxidative stress, pancreatic isolated islet, rat

J Mazandaran Univ Med Sci 2018; 27 (158): 1 - 14 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و هفتم شماره ۱۵۸ اسفند سال ۱۳۹۶ (۱۴-۱)

اثر کادمیوم بر روی مارکرهای استرس اکسیداتیو، محتوا و ترشح انسولین در جزایر لانگرهانس جدا شده از پانکراس موش صحرایی

مجتبی سرگزی[1]
دکتر فاطمه زال[2]
دکتر نرگس کربلایی[1]

چکیده

سابقه و هدف: کادمیوم یکی از آلاینده‌های زیست محیطی و صنعتی بسیار سمی است که به عنوان یک ریسک فاکتور مهم برای ایجاد دیابت شناخته شده است. نشان داده شده است که استرس اکسیداتیو به میزان زیادی با ایجاد دیابت و عوارض ناشی از آن در ارتباط می‌باشد. بنابراین هدف از مطالعه حاضر، ارزیابی تاثیر کادمیوم بر پاسخ استرس اکسیداتیو و عملکرد ترشحی جزایر لانگرهانس پانکراس در موش‌های صحرایی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: موش‌های نر نژاد Sprague-Dawley در محدوده وزنی ۲۶۰-۲۳۰ گرم، به دو گروه کنترل و دریافت کننده کلرید کادمیومی تقسیم شدند. پس از انجام تست تحمل گلوکز داخل صفاقی (IPGTT) در روز ۳۰، در پایان آزمایش پس از بیهوش کردن عمیق حیوانات، پانکراس آن‌ها جهت ایزوله کردن جزایر لانگرهانس جدا گردید و پارامترهای استرس اکسیداتیو، محتوای انسولینی و عملکرد ترشحی جزایر مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: افزایش معنی‌داری در گلوکز خون و کاهش معنی‌داری در وزن بدن، انسولین خون، محتوا و ترشح انسولین جزایر پانکراس در پاسخ به غلظت‌های مختلف گلوکز در گروه دریافت کننده کادمیوم نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید ($p<۰/۰۵$). یافته‌های مربوط به پارامترهای استرس اکسیداتیو نشان داد که کادمیوم منجر به افزایش معنی‌داری در سطح بافتی MDA و کاهش معنی‌داری در GSH و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان در بافت پانکراس شد ($p<۰/۰۵$).

استنتاج: این داده‌ها نشان داد که کادمیوم منجر به افزایش استرس اکسیداتیو در بافت پانکراس گردیده است که می‌تواند یکی از عوامل موثر در کاهش سنتز و ترشح انسولین در سلول‌های بتای پانکراس باشد.

واژه های کلیدی: کادمیوم، ترشح انسولین، استرس اکسیداتیو، جزایر لانگرهانس، موش صحرایی

مقدمه

کادمیوم، یکی از آلاینده‌های زیست محیطی بسیار سمی شناخته شده است که اثرات سوء در بهداشت و سلامت انسان دارد. فعالیت‌های کشاورزی و صنعتی منجر به ورود کادمیوم به خاک و آب آشامیدنی شده و رژیم غذایی گیاهی و به میزان کم‌تر محصولات گوشتی می‌تواند یکی از منابع اصلی قرار گرفتن انسان در معرض کادمیوم باشد(۲،۱). افزایش تدریجی کادمیوم در بافت‌های مختلف انسان ممکن است اختلالاتی را در عملکرد بعضی ارگان‌ها ایجاد کند. چنان‌که گزارشاتی مبنی بر وجود ارتباط بین کادمیوم و

مولف مسئول: نرگس کربلایی- شیراز، خیابان زند، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی Email: karbalai@sums.ac.ir
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
۲. دانشیار، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
۳. استادیار، گروه فیزیولوژی، مرکز تحقیقات هیستومورفومتری و استریولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۴/۱۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۶/۵/۲۵ تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۷/۳

اختلالاتی مانند نارسایی کلیه، فشار خون نامنظم، تغییر ساختار استخوان و پوکی استخوان، التهاب راه‌های هوایی، بیماری‌های قلبی و عروقی، بیماری‌های عصبی، دیابت و سرطان وجود دارد(۳،۴). نشان داده شده است که بعضی از آلاینده‌های زیست محیطی، منجر به کاهش حساسیت به انسولین و یا اختلال در تولید انسولین در سلول بتا می‌گردند که این عوامل می‌توانند در پاتوژنز دیابت نقش داشته باشند(۵). بعضی از مطالعات اپیدمیولوژیک در انسان، ارتباط احتمالی بین در معرض قرار گرفتن کادمیوم و ابتلا به دیابت را نشان داده است، چنان‌که در سرم خون کارگرانی که در کارخانه ذوب فلزات کار می‌کنند و در معرض کادمیوم قرار می‌گیرند، افزایش سطح قند خون و کاهش سطح انسولین پلاسمایی در مقایسه با گروه شاهد، مشاهده شده است(۴). در یک مطالعه دیگر نشان دادند که بین افزایش سطح کادمیوم در ادرار و اختلال گلوکز ناشتا و دیابت قندی ارتباط وجود دارد(۶). تعدادی از مطالعات حیوانی نیز نشان داده است که کادمیوم می‌تواند باعث افزایش گلوکز، کاهش بیان پروتئین ناقل گلوکز GLUT4 در سلول‌های چربی، افزایش عدم تحمل گلوکز، افزایش فعالیت آنزیم و گلوکونئوژنیک شود(۷،۵).

مطالعات اندکی، اثرات کادمیوم را بر پانکراس بررسی کرده‌اند. این مطالعات نشان دادند که کادمیوم می‌تواند در پانکراس تجمع یابد و بر بیان ژن انسولین اثر بگذارد. هم‌چنین کادمیوم منجر به کاهش بقا و افزایش آپوپتوز سلولی، سرکوب ترشح انسولین در یک رده سلولی از سلول‌های بتای پانکراس به نام RIN-m5F cell و توکسیتی پانکراس شده است(۸،۹).

همان‌طورکه می‌دانیم، استرس اکسیداتیو به عنوان یک عامل خطر مهم برای بسیاری از واکنش‌های بیولوژیکی نامطلوب و آسیب عملکردی سلول شناخته شده است که می‌تواند در طیف گسترده‌ای از فرآیندهای بیماری، از جمله بیماری‌های عصبی و دیابت دخیل باشد. بعضی از مطالعات نشان دادند که عامل اصلی اختلال در عملکرد بسیاری از سلول‌ها، بافت‌ها و ارگان‌هایی که در معرض فلزات سنگینی مانند جیوه، آرسنیک، نیکل و کادمیوم قرار گرفته‌اند، تولید مقادیر بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و القای استرس اکسیداتیو است(۱۰). از آن‌جایی که سلول‌های بتای جزایر لانگرهانس پانکراس بسیار مستعد به آسیب ناشی از استرس اکسیداتیو هستند، استرس اکسیداتیو می تواند یک عامل مهم در اختلال عملکرد ترشحی سلول‌های بتای جزایر لانگرهانس پانکراس و احتمال بروز دیابت باشد.

با توجه به مطالعات مبنی بر ارتباط بین کادمیوم و کاهش انسولین پلاسمایی، افزایش گلوکز و هم‌چنین احتمال اختلال عملکرد پانکراس، این سوال مطرح می‌شود که آیا کادمیوم می‌تواند با القای استرس اکسیداتیو منجر به اختلال در عملکرد ترشحی پانکراس شود و آیا کادمیوم بر سنتز و محتوای انسولینی پانکراس تاثیر دارد؟ بنابراین هدف مطالعه حاضر این است که اثر کادمیوم را بر القای استرس اکسیداتیو از طریق اندازه گیری میزان مالون دی آلدئید (MDA) و میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی به عنوان شاخص‌های استرس اکسیداتیو و هم‌چنین تاثیر این فلز را بر میزان ترشح و محتوای انسولینی در جزایر لانگرهانس ایزوله شده پانکراس در موش صحرایی مورد مطالعه قرار دهیم.

مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی، از موش‌های صحرایی نر نژاد اسپراگو -داولی در محدوده وزنی ۲۶۰- ۲۳۰ گرم که از مرکز پرورش حیوانات دانشگاه علوم پزشکی شیراز تهیه گردیدند، استفاده شد. این حیوانات در دمای ۳± ۲۲ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۶±۲۰ درصد و چرخه روشنایی-تاریکی ۱۲ ساعته و بدون محدودیت دسترسی به آب و غذا نگهداری می‌شدند. پس از دو هفته سازگاری حیوانات با محیط آزمایشگاه، ۴۰ سر

موش آزمایشگاهی به طور تصادفی به دو گروه ۲۰ تایی کنترل و دریافت‌کننده ۰/۲ گرم در لیتر(ppm ۲۰۰) کلرید کادمیوم تقسیم شدند.

در طول آزمایش، حیوانات وزن گردیدند و پس از انجام تست تحمل گلوکز در روز ۳۰ آزمایش، حیوانات هر گروه به دو زیر گروه تقسیم گردیدند. در زیرگروه اول، جهت اندازه‌گیری میزان ترشح و محتوای انسولینی، حیوان با تزریق داخل صفاقی داروی پنتوباربیتال (۱۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) بیهوش گردیدند و پانکراس آن‌ها جهت ایزوله کردن جزایر لانگرهانس جدا شدند. در زیرگروه دوم، پانکراس حیوانات جهت سنجش غلظت کادمیوم و هم‌چنین میزان متابولیت GSH و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی و میزان MDA در بافت جدا گردیدند. طول مدت مطالعه ۳۵ روز بود.

برای انجام تست تحمل گلوکز داخل صفاقی، حیوان به مدت ۸ تا ۱۲ ساعت ناشتا نگه داشته شد. بعد از بیهوش کردن حیوان با تزریق داخل صفاقی داروی پنتوباربیتال (۶۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن)، اولین نمونه خون (زمان صفر) از طریق ورید دمی تهیه گردید و پس از آن محلول گلوکز ۵۰ درصد (۲ گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن) به طریق داخل صفاقی تزریق شد. سپس در فواصل ۱۵، ۳۰، ۴۵، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه پس از تزریق محلول گلوکز، از حیوان خون‌گیری (۰/۳ میلی‌لیتر) به عمل آمد. قابل ذکر است که حیوان در طول مدت تست تحمل گلوکز و خون‌گیری بیهوش بود. سرم تهیه شده از نمونه‌های خونی تا زمان اندازه‌گیری هورمون‌های انسولین و گلوکز در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

جهت ایزوله کردن جزایر لانگرهانس پس از گرفتن تقریباً تمامی خون از طریق قلب، جدار شکم برش داده شد و با مشخص کردن محدوده پانکراس، مجرای دئودنومی و صفراوی با فورسپس مسدود گردید. پس از کانول گذاری مجرای پانکراسی، حدود ۱۰ میلی‌لیتر از محلول کربس سرد حاوی آنزیم کلاژناز (۰/۵میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به داخل مجرای پانکراس تزریق شد. سپس پانکراس جدا گردید و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد. پس از اتمام مدت زمان انکوبه، لوله به مدت یک دقیقه با دست به شدت تکان داده شد. پس از سه مرحله شستشو، جزایر لانگرهانس را در زیر استریو میکروسکوپ (Kyowa Optical ،)مدلSDZ-TR-PL ، ژاپن (مشاهده و به کمک یک پی‌پت پاستور، دست چین شد(۱۱). برای بررسی ترشح انسولین جزایر جدا شده پانکراس در پاسخ به گلوکز، جزایر ایزوله شده به صورت تصادفی در گروه‌های ۱۰ تایی به چاهک‌های ظروف کشت منتقل شدند. سپس به ظروف کشت حاوی جزایر محلول انکوباسیون بافر بیکربنات کربس با دو غلظت گلوکز ۲/۸ یا ۱۶/۷ میلی مولار، اضافه گردید. ظروف کشت به داخل انکوباتور منتقل گردید و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار Co2 ۵ درصد به مدت ۶۰ دقیقه انکوبه شدند. در پایان آزمایش، نمونه‌ای از محلول انکوباسیون حاوی جزایر جهت اندازه‌گیری انسولین برداشته شد. برای تعیین محتوای انسولین، جزایر لانگرهانس در گروه ۱۰ تایی به لوله‌های آزمایش منتقل شدند و سپس ۱ میلی‌لیتر محلول اسید اتانول (الکل ۷۵ درصد و اسید کلریک ۰/۱۵ مولار) به آن‌ها اضافه گردید و سپس با دستگاه سونیکاتور به مدت ۳۰ ثانیه هموژنیزه شدند. سپس جهت استخراج کامل محتوای انسولین، جزایر در دمای ۴-۰ درجه به مدت یک شبانه روز در یخچال نگهداری شدند و پس از سانتریفوژ (۱۳۰۰ g) محلول رویی جهت اندازه‌گیری محتوایات انسولین مخصوص موش صحرایی و میزان پروتئین جزایر کاملاً جدا گردید. میزان انسولین جزایر به روش الایزا توسط کیت سنجش انسولین سنجیده شد. میزان پروتئین جزایر نیز به روش برادفورد تعیین گردید(۱۲).

مدل ارزیابی هموستازیس (Homeostasis model assessment ; HOMA-IR) یک روشی برای

اندازه‌گیری مقاومت به انسولین می‌باشد. مدل ارزیابی هموستازیس بر اساس قند خون ناشتا و انسولین حالت ناشتا طبق رابطه زیر به دست می‌آید(۱۳):

HOMA-IR = {[fasting insulin (μU/ml)]× [fasting glucose (mmol/l)]} /22.

اندازه‌گیری کاتالاز به روش بیان شده در مطالعه گوت و همکاران و بر اساس میزان تجزیه H2O2 در طول موج nm240 در درجه حرارت ۲۰ درجه سانتی‌گراد انجام گردید(۱۴). اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز (SOD) و گلوتاتیون پراکسیداز (GPx) و هم‌چنین متابولیت آنتی اکسیدان گلوتاتیون(GSH) به ترتیب از کیت‌های مخصوص اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌هایSOD ، GPx و تعیین میزان GSH استفاده شد. تعیین پراکسیداسیون لیپیدی با اندازه‌گیری میزان مالون دی آلدئید (MDA) در بافت پانکراس هموژنیزه با استفاده از روش کالریمتری انجام گردید. اساس واکنش به این صورت است که محصول پراکسیداسیون لیپیدها (MDA) با معرف تیوبابیتوریک اسید (TBA) ایجاد کمپلکس رنگی می‌کند که میزان جذب نوری این کمپلکس در طول موج ۵۳۲ نانومتر خوانده می‌شود(۱۵).

غلظت کادمیوم در بافت پانکراس و پلاسما با روش flame atomic absorption spectrometry اندازه‌گیری شد و غلظت کادمیوم برحسب میکروگرم در هر گرم وزن خشک بافت پانکراس و میکروگرم در هر لیتر پلاسما محاسبه گردید.

به منظور بررسی نتایج از نرم افزار آماری (GraphPad Prism version7, California USA) استفاده شد. تمامی نتایج به صورت میانگین ±خطای استاندارد بیان گردید. جهت مقایسه نتایج در بین دو گروه از آزمون t استفاده گردید. به منظور بررسی وجود اختلاف در بین گروه‌های کنترل و آزمایش در ارزیابی اختلاف غلظت‌های گلوکز و انسولین پلاسما در زمان‌های مختلف در آزمایش تحمل گلوکز از آزمون تحلیل واریانس با اندازه‌گیری مکرر (ANOVA with repeated measure) استفاده شد و برای بررسی تغییرات درون گروهی، از تست تعقیبی Bonferroni استفاده شد. p<۰/۰۵ به عنوان سطح معنی‌دار بودن برای تمامی آنالیزها در نظر گرفته شد.

یافته ها

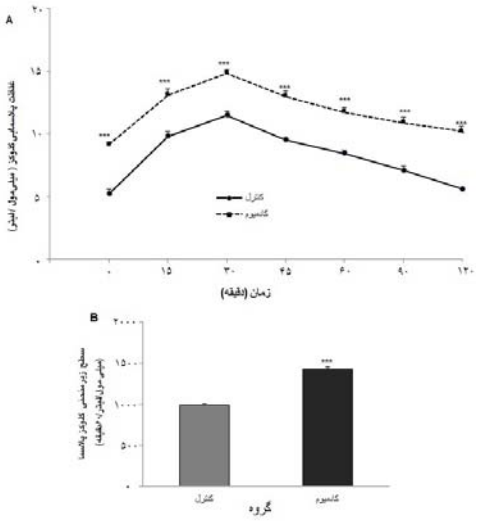
نتایج مربوط به وزن اولیه و نهایی حیوانات و وزن پانکراس در گروه‌های آزمایشی مختلف در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. همان‌طورکه در جدول مربوطه مشاهده می‌گردد، تفاوتی در وزن اولیه حیوانات در گروه‌های آزمایشی مختلف مشاهده نمی‌گردد (p=۰/۴۸) در طول مدت ۳۵ روز آزمایش، وزن حیوانات در تمام گروه‌های آزمایشی افزایش نشان داد، اما درصد افزایش وزن در گروه کادمیومی (۱۳ درصد) به طور معنی‌داری (p=۰/۰۰۳)کم‌تر از گروه کنترل (۲۷ درصد) بود، چنان که در وزن نهایی بین حیوانات گروه کادمیومی و گروه کنترل تفاوت معنی‌داری مشاهده گردید) (p=۰/۰۰۳) هرچند وزن پانکراس در گروه کادمیومی افزایش نشان داد، ولی این افزایش از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. هم‌چنین غلظت کادمیوم در بافت پانکراس گروه دریافت کننده کادمیوم به طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل بود (p<۰/۰۰۱).

جدول شماره ۱: وزن اولیه و نهایی حیوان، وزن پانکراس و غلظت کادمیوم در بافت پانکراس در گروه کنترل و کادمیومی

	وزن اولیه (گرم)	وزن نهایی (گرم)	افزایش وزن (درصد)	وزن پانکراس (گرم)	غلظت کادمیوم در بافت پانکراس (میکروگرم بر گرم وزن خشک)
گروه کنترل	۲۴۹/۸±۱/۸	۳۱۶/۹±۳/۸	۲۷	۱/۳۴±۰/۰۵	۰/۳۰±۰/۰۰۷
گروه کادمیومی	۲۴۷/۱±۱/۳	*۲۸۰/۰±۳/ ۱	*۱۳	۱/۳۴±۰/۰۵	*۴/۵۲ ±۰/۳۰

نتایج به صورت میانگین± خطای استاندارد بیان می‌شود. اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون t مستقل سنجیده شد. p<۰/۰۵ * نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه کنترل است، (n=۱۰).

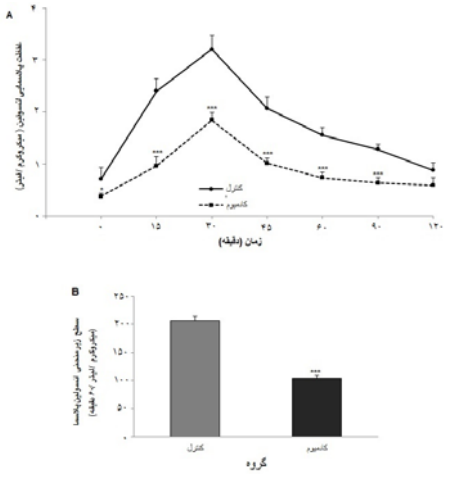
میانگین غلظت پلاسمایی گلوکز تمام گروه‌های آزمایشی در نمودار شماره ۱ قسمت A نشان داده شده است. مقایسه نتایج تحلیل واریانس با اندازه‌گیری مکرر نشان داد که میانگین غلظت پلاسمایی گلوکز در زمان ناشتا (زمان صفر) در گروه کادمیومی به طور معنی‌داری (p<۰/۰۰۱) بیش‌تر از گروه کنترل است و این افزایش معنی‌دار پس از تزریق داخل صفاقی گلوکز (۲ گرم بر کیلوگرم وزن بدن) در سراسر طول تست تحمل گلوکز (IPGTT) در گروه کادمیومی نسبت به گروه کنترل وجود داشت. نمودار سطح زیر منحنی غلظت پلاسمایی گلوکز در نمودار شماره ۱ قسمت B نیز نشان می‌دهد که سطح زیر منحنی غلظت پلاسمایی گلوکز در طی آزمایش تحمل گلوکز در گروه کادمیومی در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری بیش‌تر است (p<۰/۰۰۱)



نمودار شماره ۱: (A) تحلیل واریانس با اندازه‌گیری تکراری و تست تعقیبی Bonferoni جهت مقایسه مقادیر گلوکز پلاسما در طی آزمایش تحمل گلوکز بین گروه کنترل و گروه کادمیومی. (B) مقایسه سطح زیر منحنی غلظت پلاسمایی گلوکز بین گروه کنترل و گروه کادمیومی توسط آزمون t مستقل سنجیده شد. هر نقطه بیان‌گر میانگین ± خطای استاندارد می‌باشد، (n=۱۰).

p<۰/۰۰۱*** نشان دهنده اختلاف معنی دار بین گروه کادمیومی با گروه کنترل است.

نمودار شماره ۲ قسمت A، میانگین غلظت پلاسمایی انسولین را در تمام گروه‌های آزمایشی نشان می‌دهد. مقایسه نتایج تحلیل واریانس با اندازه‌گیری مکرر بین گروه کادمیومی با گروه کنترل نشان داد که میانگین غلظت پلاسمایی انسولین در زمان ناشتا (زمان صفر) در گروه کادمیومی به طور معناداری کم‌تر از گروه کنترل است و این کاهش معنی‌دار پس از تزریق داخل صفاقی گلوکز (۲ گرم بر کیلوگرم وزن بدن) در طی IPGTT در گروه کادمیومی نسبت به گروه کنترل هم‌چنان وجود داشت. نمودار سطح زیر منحنی غلظت پلاسمایی انسولین در نمودار شماره ۲ قسمت B نیز نشان می‌دهد که سطح زیر منحنی غلظت پلاسمایی انسولین در طی آزمایش تحمل گلوکز در گروه کادمیومی در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری کم‌تر است (p<۰/۰۰۱)



نمودار شماره ۲- (A): تحلیل واریانس با اندازه‌گیری تکراری و تست تعقیبی Bonferoni جهت مقایسه مقادیر انسولین پلاسما در طی آزمایش تحمل گلوکز بین گروه کنترل و گروه کادمیومی. (B) مقایسه سطح زیر منحنی غلظت پلاسمایی انسولین بین گروه کنترل و گروه کادمیومی توسط آزمون t مستقل سنجیده شد. هر نقطه و ستون بیان‌گر میانگین ± خطای استاندارد می‌باشد (n=۱۰).

p<۰/۰۰۱*** نشان دهنده اختلاف معنی دار بین گروه کادمیومی با گروه کنترل است.

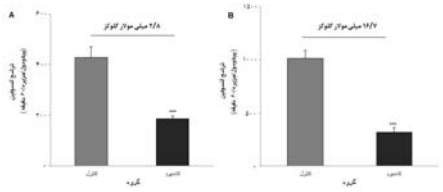
آنالیز آماری انسولین ناشتا، محتوای انسولین جزایر و شاخص HOMA-IR با آزمون t نشان داد که در گروه کادمیومی به طور معنی‌داری سطح گلوکز ناشتا بیش‌تر (p<۰/۰۰۱) و میزان انسولین پلاسما (p=۰/۰۱) و نسبت محتوای انسولین به گرم پروتئین جزایر کم‌تر از گروه کنترل است (p<۰/۰۰۱) اما این دو گروه از نظر شاخص HOMA-IR تفاوت معنی‌داری را نشان ندادند (P=۰/۴۴) (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۲: محتوای انسولین جزایر و شاخص HOMA-IR در دو گروه کنترل و کادمیومی

کمیت	گلوکز ناشتا (میلی مول بر لیتر)	انسولین ناشتا (میکرو یونیت برمیلی لیتر)	محتوای انسولین (پیکومول/ میلی گرم پروتئین)	شاخص HOMA-IR
گروه کنترل	۵/۲±۰/۲	۱۲/۷±۰/۹	۱۴۰۷/۱±۱۸۷/۳	۲/۹±۰/۲
گروه کادمیومی	*۹/۱±۰/۴	*۵/۵۲±۰/۳	*۶۵۸/۰۶±۹۱/۱	۲/۵±۰/۱

نتایج به صورت میانگین± خطای استاندارد بیان می‌شود. اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون t مستقل سنجیده شد. p<۰/۰۵* نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه کنترل است ، (n=۱۰).

میزان ترشح انسولین از جزایر ایزوله شده پانکراس موش صحرایی در حضور دو غلظت مختلف گلوکز (۱۶/۷، ۲/۸ میلی‌مولار (در گروه‌های مختلف آزمایشی مورد بررسی گردید. نتایجی که در نمودار شماره ۳ نمایش داده شده، کاهش معنی‌داری را درمقدار ترشح انسولین از جزایر لانگرهانس هم در حضور غلظت پایه گلوکز یعنی ۲/۸ میلی‌مولار (نمودار شماره ۳ قسمتA) و هم در حضور غلظت بالای ۱۶/۷ میلی مولار گلوکز (نمودار شماره ۳ قسمتB) در گروه کادمیومی نسبت به گروه کنترل، نشان می‌دهد (p<۰/۰۰۱).



نمودار شماره ۳: ترشح انسولین از جزایر ایزوله شده پانکراس در محیط دارای غلظت ۲/۸ میلی مولار (A) و غلظت ۱۶/۷ میلی مولار (B) گلوکز در گروه کنترل و گروه کادمیومی. مقایسه بین دو گروه توسط آزمون t مستقل سنجیده شد. هر ستون بیانگر میانگین ± خطای استاندارد می‌باشد، (n=۱۰).

p<۰/۰۰۱*** نشان دهنده اختلاف معنی دار بین گروه کادمیومی با گروه کنترل است.

نتایج مطالعه در ارتباط با شاخص‌های مربوط به استرس اکسیداتیو شامل GPX، SOD، GSH،CAT و MDA برای هر یک از دو گروه کنترل و کادمیومی در جدول شماره ۱ ارایه شده است. غلظت مالون‌دی‌آلدئید به عنوان ایندکسی از پراکسیداسیون لیپیدی در بافت پانکراس گروه کادمیومی نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری (p<۰/۰۰۱) افزایش یافته است. نتایج آماری نشان داد که اختلاف میانگین دیگر شاخص‌های مربوط به استرس اکسیداتیو که در جدول شماره ۳ ارایه شده است، در دو گروه مختلف آزمایش از نظر آماری معنی دار بوده است (p<۰/۰۵) ، چنان‌که میزان فعالیت آنزیم‌های استرس اکسیداتیو کاهش یافته است.

جدول شماره ۳: پارامترهای استرس اکسیداتیو در بافت پانکراس موش صحرایی نر در دو گروه کنترل و کادمیومی

کمیت	GPx یونیت/ میلی‌گرم پروتئین	SOD یونیت/ میلی- گرم پروتئین	CAT یونیت/ میلی‌گرم پروتئین	GSH میکرومول/ میلی‌گرم پروتئین	MDA نانومول/ میلی- گرم پروتئین
گروه کنترل	۰/۳۸±۰/۰۴	۳۴/۸±۲/۱	۰/۴۴±۰/۰۴	۲/۳±۰/۲	۰/۶۲±۰/۰۶
گروه کادمیومی	*۰/۱۴±۰/۰۱	*۱۳/۷±۰/۸	*۰/۱۳±۰/۰۱	*۰/۸۹±۰/۰۶	*۱/۸±۰/۰۴

نتایج به صورت میانگین± خطای استاندارد بیان می‌شود. اختلاف معنی‌دار براساس آزمون t مستقل سنجیده شد. p<۰/۰۵ * نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه کنترل است،(n=۸).

بحث

مطالعه حاضر نشان داد که موش‌هایی که در معرض کادمیوم قرار گرفتند، رشد وزنی کم تری نسبت به گروه کنترل داشتند. هم‌چنین گروه دریافت کننده کادمیوم، غلظت‌های پلاسمایی گلوکز بیش‌تر و انسولین کم‌تری در طی آزمایش تحمل گلوکز نسبت به گروه کنترل نشان دادند. هم‌چنین جزایر لانگرهانس پانکراس

در حضور هر دو غلظت کم و بالای گلوکز در مقایسه با گروه کنترل، انسولین کم‌تری ترشح کردند. هم‌چنین یافته‌های ما نشان داد کادمیوم با افزایش استرس اکسیداتیو و اثر کاهشی بر سیستم آنزیمی و غیر آنزیمی آنتی اکسیدان، نیز باعث کاهش ذخایر و محتوای انسولین جزایر در مقایسه با گروه کنترل گردید.

وزن حیوانات در همه گروه‌ها در شروع مطالعه، تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند. در طی دوره آزمایش، افزایش وزن در همه گروه‌ها در طول آزمایش مشاهده گردید، که درصد رشد وزنی در گروه کادمیومی (۱۳ درصد) به مراتب کم‌تر از حیوانات در گروه کنترل (۲۷ درصد) بود، به طوری‌که در پایان آزمایش، وزن حیوانات در گروه کادمیومی به طور معنی‌داری از گروه کنترل کم‌تر بود. کاهش رشد وزنی در گروه کادمیومی مطابق با برخی از گزارشات منتشر شده قبلی بود(۱۷، ۱۶)، Vodelaو همکارانش نیز نشان دادند که آب‌های آلوده به کادمیوم منجر به کاهش مصرف غذا و رشد وزنی در جوجه‌های گوشتی می‌گردد(۱۸). مطالعات دیگر نشان داده که کاهش وزن می‌تواند به دلیل کاهش مصرف مواد غذایی و یا افزایش تخریب کلی لیپیدها و پروتئین در بافت‌های بدن در نتیجه تاثیرات کادمیوم باشد(۱۹).

مطالعه ما نشان داد که مصرف کادمیوم در موش‌های صحرایی، منجر به افزایش قابل توجهی در غلظت پلاسمایی و هم‌چنین غلظت کادمیوم در بافت پانکراس گردیده است که این نشان دهنده افزایش تجمع این فلز در بافت پانکراس است که می‌توان افزایش وزن پانکراس را در گروه کادمیومی، به تجمع کادمیوم در پانکراس ارتباط داد. مطابق با نتایج ما، Erdogan و همکاران نیز این افزایش تجمع کادمیوم را در بافت پانکراس موش‌های آزمایشی که میزان ۲۵ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم را به مدت ۴۲ روز دریافت می‌کردند، گزارش کردند(۱۹).

یافته‌های ما نشان داد که مصرف کادمیوم در موش‌های صحرایی منجر به اختلال در تحمل گلوکز و کاهش مقادیر انسولین پلاسما در موش‌های گروه کادمیومی نسبت به گروه کنترل شد. اختلال تحمل گلوکز می‌تواند به دلیل افزایش مقاومت به انسولین، کاهش ترشح انسولین و یا وجود هم‌زمان هر دو مورد باشد. در یک مطالعه دیگر، Lei و همکارانش نشان دادند که مصرف روزانه ۰/۵ تا ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم کادمیوم منجر به عدم تحمل گلوکز و افزایش قابل توجهی در سطح قند خون موش‌های صحرایی گردید که این امر با تجمع قابل توجهی از کادمیوم در خون و پانکراس نیز همراه بود(۹). نتایج برخی مطالعات اپیدمیولوژیک در مقایسه با افراد سالم نشان داد که سطح خونی و ادراری کادمیوم به طور قابل توجهی در بیماران دیابتیک بالاتر است و هم‌چنین ارتباط مثبت قابل توجهی بین کادمیوم ادراری و شیوع اختلال در گلوکز ناشتا وجود داشته است(۴، ۲۰). در این مطالعه نشان داده شد که محتوای ذخیره‌ای انسولین و هم چنین ظرفیت ترشحی جزایر لانگرهانس ایزوله شده پانکراس در پاسخ به دو غلظت کم و زیاد گلوکز، در موش‌های گروه کادمیومی به طور معنی‌داری کم‌تر از گروه کنترل بود. بنابراین بر اساس این نتایج می‌توان فرض کرد که یکی از دلایل اختلال تحمل گلوکز و در نتیجه افزایش گلوکز پلاسما می‌تواند ناشی از کاهش سنتز انسولین و نیز کاهش ترشح انسولین توسط جزایر لانگرهانس پانکراس باشد. هرچند مکانیسم اصلی چگونگی اثر کادمیوم بر عملکرد جزایر لانگرهانس پانکراس کاملاً مشخص نشده است، اما از نقطه نظر بیولوژیکی، کادمیوم در بیولوژی ترشح انسولین از سلول‌های بتای پانکراس به دلیل خواص مشترک و شباهتش به فلز روی (Zn) و اهمیت روی در فیزیولوژی سلول بتا، مورد توجه قرار گرفته است. نشان داده شده است که در بعضی از سلول‌ها، کادمیوم جهت اتصال به برخی از پروتئین‌ها و ترانسپورترها با روی رقابت می‌کند(۲۲، ۲۱). مطالعات نشان داده که فلز روی نقش کلیدی در سنتز، ذخیره سازی و ترشح انسولین از سلول‌های بتای

پانکراس دارد، چنان که سلول‌های بتا غلظت درون سلولی بالایی از فلز روی را به ویژه در وزیکول ترشحی دارند، این فلز نقش مهمی در پردازش پروانسولین به انسولین بالغ و بسته بندی انسولین به فرم هگزامر خود دارد(۲۴، ۲۳). نشان داده شده است که کاهش سطح پلاسمایی فلز روی، تاثیرات بسیار بدی روی توانایی سلول‌های جزایر لانگرهانس در تولید و ترشح انسولین می‌گذارد(۲۷، ۲۵). بنابراین با توجه به نتایج، حدس زده می‌شود که کادمیوم با تجمع در سلول‌های بتای پانکراس و رقابت با فلز روی، منجر به کاهش تولید انسولین از جزایر گردیده است. در یک مطالعه نشان داده شد که اضافه کردن کادمیوم به محیط کشت یک رده سلولی بتای پانکراسی به نام RIN-m5F cell منجر به سرکوب ترشح انسولین، اختلالات میتوکندریایی، افزایش آپوپتوز و کاهش بقا و افزایش تولید ROS در این سلول‌ها می‌گردد(۸). هم‌چنین مطالعاتی نشان داده است که قرار گرفتن در معرض کادمیوم باعث تجمع فلز در پانکراس، آتروفی جزایر و کاهش تعداد جزایر و سلول‌های بتا پانکراس می‌گردد(۲۹، ۲۸، ۲۰). شاید یکی از دلایلی که کادمیوم منجر به کاهش محتوای و ترشح انسولین از پانکراس و در نتیجه هیپرگلیسمی در موش‌های دریافت کننده کادمیوم شده است، از طریق کاهش تعداد جزایر لانگرهانس و هم‌چنین کاهش تعداد سلول‌های ترشح کننده انسولین باشد.

نشان داده شده است که استرس اکسیداتیو نقش بسیار مهمی در اختلال عملکرد سلول‌های بتای پانکراس، شروع و پیشرفت دیابت بازی می‌کند(۳۰). با توجه به این که سلول‌های بتای پانکراس، کم‌ترین سطح دفاع آنتی اکسیدان ذاتی و هم‌چنین کم‌ترین فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز را در مقایسه با سایر بافت‌های متابولیک مانند کبد، کلیه، عضلات اسکلتی و بافت چربی دارند، بنابراین این سلول‌ها بسیار مستعد به استرس اکسیداتیو هستند(۳۲، ۳۱). مطالعات متعدد نشان داده است استرس اکسیداتیو، یکی از مکانیسم‌های مؤثر برای اثرات توکسیته کادمیوم است. در مطالعه حاضر، موش صحرایی گروه کادمیومی به طور قابل توجهی، افزایشی در سطوح مارکرهای استرس اکسیداتیو مانند افزایش پراکسیداسیون چربی (افزایش غلظت MDA در پلاسما و بافت پانکراس) و کاهش در سطح GSH و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان مانند SOD، CAT و GPX نشان داد. اثرات کادمیوم بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در بافت‌های مختلف دوگانه است. از یک سو، کادمیوم می‌تواند استرس اکسیداتیو را از طریق القای مهار آنتی‌اکسیدان‌ها ایجاد کند، اما از سوی دیگر به دلیل حفظ تعادل ردوکس آشفته از طریق مسیر سیگنال متفاوت، ممکن است باعث فعال شدن اجزای مختلف آنتی‌اکسیدانی شود(۳۳). مطالعات مختلف، اثرات کادمیوم را بر سطح فعالیت SOD ، CAT و GPX متفاوت نشان دادند؛ این تناقضات ممکن است به دلیل غلظت کادمیوم، شرایط و مدت زمان متفاوت قرار گرفتن در معرض کادمیوم (کوتاه مدت یا دراز مدت) و هم‌چنین به نوع بافت مورد مطالعه وابسته باشد که نتایج مختلف را در بر داشته است(۳۴). از آن‌جاکه SODشامل روی و مس در جایگاه فعالش است، کاهش در فعالیت این آنزیم در پانکراس موشی که در معرض کادمیوم قرار گرفته ممکن است، به دلیل رقابت و تعامل بین Cd و Zn در جایگاه فعال آنزیم SOD است(۳۵). سم زدایی پراکسید هیدروژن با هر دو آنزیم کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز انجام می‌شود.

در مورد اثر کادمیوم بر فعالیت کاتالاز، مطالعات مختلف، اثرات متناقضی را گزارش کردند که افزایش و یا کاهش فعالیت CAT را در بر داشته است(۳۳). در مطالعه ما نشان داده شد که مصرف کادمیوم در دراز مدت، اثر کاهشی بر فعالیت این آنزیم داشته است. به خوبی شناخته شده است که حضور کادمیوم در بافت‌هایی مانند کلیه و کبد، سطح آهن را در این بافت‌ها کاهش داده است(۳۵). از آن‌جا که آهن در

مرکز فعالیت آنزیم CAT است، کاهش فعالیت این آنزیم در پانکراس موش‌هایی که در معرض کادمیوم قرار گرفتند، ممکن است در نتیجه کمبود آهن و تعامل کادمیوم با واحد کاتالیتیک این آنزیم باشد که دارای گروه هم است.

GPX دارای ایزوفرم‌های مختلف است. ایزوفرمی که در اکثر پستانداران وجود دارد، در جایگاه فعال خود دارای یک سلنوسیستئین می‌باشد(۳۳). همانند آنزیم CAT ، تفاوتی در گزارشات از اثر کادمیوم بر فعالیت GPX در بافت‌های مختلف بیان شده است که احتمالاً علت تفاوت ممکن است به دلیل تفاوت در نوع بافت، مدت زمان و شرایط قرار گرفتن در معرض کادمیوم باشد(۳۶،۳۷). مطالعه ما نیز نشان داد که قرار گرفتن موش‌های صحرایی به مدت ۵ هفته منجر به کاهش قابل توجهی از این آنزیم در پلاسما و بافت پانکراس می‌گردد. یون سلنیوم در ساختمان GPX نقش حیاتی را در عملکرد آنتی اکسیدانی این آنزیم بازی می‌کند و نشان داده شده است که مصرف سلنیوم در موش صحرایی از کاهش فعالیت آنزیم GPX توسط کادمیوم در کلیه جلوگیری کرد(۳۸،۳۹). بنابراین کاهش در فعالیت GPX در بافت پانکراس نیز ممکن است به دلیل رقابت بین کادمیوم و سلنیوم در جایگاه فعال آنزیم GPX و کاهش یون سلنیوم باشد. مطالعه ما نیز نشان داد که متابولیت‌های غیر آنزیمی آنتی اکسیدان مانند GSH نیز در بافت پانکراس کاهش یافته است. از آن‌جایی‌که کادمیوم تمایل زیادی به گروه تیول دارد و GSH مهم‌ترین متابولیت آنتی اکسیدان تیول‌دار داخل سلولی است، بنابراین GSH یکی از ترکیبات مورد هدف یون‌های کادمیوم است(۳۳). بنابراین کادمیوم می‌تواند از طریق حمله به گروه تیول(SH) ، منجر به کاهش ذخایر GSH شود.

مطالعه حاضر نشان داد که پراکسیداسیون لیپیدی، که به صورت غلظت MDA نشان داده شد، به طور قابل توجهی در بافت پانکراس موش‌های دریافت کننده کادمیوم در مقایسه با گروه کنترل، بالا بود. مطالعات نشان داده‌اند که چندین منبع ممکن است پس از مواجهه با کادمیوم، منبع تولیدROS باشد. ممکن است سلول‌های فاگوسیتوز، یک منبع مهم تولید ROS در پاسخ به یون کادمیوم باشند. علاوه بر این، کادمیوم می‌تواند با آهن در جایگاه‌های اتصالی آن در دیگر ترکیبات آهن‌دار جابجا شود که این منجر به توزیع مجدد آهن و تولید ROS از طریق واکنش فنتون و در نهایت منجر به پراکسیداسیون لیپیدی (افزایش غلظت MDA) شود(۳۹،۴۰). از آن‌جاکه آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از طریق حذف گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) می‌توانند بافت‌ها را از اثر آسیب رسان آن محافظت کنند، هرگونه کاهش در میزان یا فعالیت این آنزیم‌ها می‌تواند باعث تجمع ROS و افزایش پراکسیداسیون لیپیدی در بافت گردد. بنابراین افزایش غلظت MDA در بافت پانکراس حیوانات دریافت کننده کادمیوم ممکن است در نتیجه کاهش فعالیت‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در این بافت باشد که مطالعه حاضر به خوبی این کاهش را نشان داد.

در کل، یافته‌های مطالعه ما نشان داد که که مسمومیت با کادمیوم باعث اختلال تحمل گلوکز و کاهش محتوا و ترشح انسولین از جزایر پانکراس می‌گردد. به نظر می‌رسد افزایش استرس اکسیداتیو ناشی از کادمیوم که منجر به تولید بیش‌تر رادیکال‌های آزاد اکسیژن و کاهش فعایت آنزیم‌های آنتی اکسیدان در بافت پانکراس گردیده است، می‌تواند یکی از عوامل موثر در اختلال متابولیسم گلوکز، کاهش ترشح انسولین و یا کاهش بیوسنتز انسولین در سلول‌های بتای پانکراس باشد.

سپاسگزاری

این مقاله نتایج مربوط به طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی شیراز (شماره طرح: ۹۷۷۷) و

قسمتی از پایانامه مجتبی سرگزی دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی می‌باشد. از تمام کسانی که در انجام این پروژه با ما همکاری کرده‌اند، کمال تقدیر و تشکر را داریم.

References

1. Satarug S. Long-term exposure to cadmium in food and cigarette smoke, liver effects and hepatocellular carcinoma. Curr Drug Metab. 2012; 13(3): 257-271.
2. Satarug S, Garrett SH, Sens MA, Sens DA. Cadmium, environmental exposure, and health outcomes. Environ Health Perspect. 2010; 118(2): 182-190.
3. Messner B,Bernhard D. Cadmium and cardiovascular diseases: cell biology, pathophysiology, and epidemiological relevance. Biometals 2010; 23(5): 811-822.
4. Schwartz GG, Il'yasova D, Ivanova A. Urinary cadmium, impaired fasting glucose, and diabetes in the NHANES III. Diabetes Care 2003; 26(2): 468-470.
5. Khan AR, Awan FR. Metals in the pathogenesis of type 2 diabetes. J Diabetes Metab Disord. 2014; 13(1): 1-6.
6. Swaddiwudhipong W, Limpatanachote P, Mahasakpan P, Krintratun S, Punta B, Funkhiew T. Progress in cadmium-related health effects in persons with high environmental exposure in northwestern Thailand: a five-year follow-up. Environ Res 2012; 112: 194-198.
7. Han JC, Park SY, Hah BG, Choi GH, Kim YK, Kwon TH, et al. Cadmium induces impaired glucose tolerance in rat by down-regulating GLUT4 expression in adipocytes. Arch Biochem Biophys. 2003; 413(2): 213-220.
8. Chang KC, Hsu CC, Liu SH, Su CC, Yen CC, Lee MJ, et al. Cadmium induces apoptosis in pancreatic beta-cells through a mitochondria-dependent pathway: the role of oxidative stress-mediated c-Jun N-terminal kinase activation. PLoS One 2013; 8(2): e54374.
9. Lei LJ, Jin TY, Zhou YF. Insulin expression in rats exposed to cadmium. Biomed Environ Sci 2007; 20(4): 295-301.
10. Sharma B, Singh S, Siddiqi NJ. Biomedical implications of heavy metals induced imbalances in redox systems. Biomed Res Int 2014; 2014: 640754.
11. Godini A, Ghasemi A, Karbalaei N, Zahediasl S. The effect of thyroidectomy and propylthiouracil-induced hypothyroidism on insulin secretion in male rats. Horm Metab Res. 2014; 46(10): 710-716.
12. Welsh N,Sjoholm A. Polyamines and insulin production in isolated mouse pancreatic islets. Biochem J .1988; 252(3): 701-707.
13. Farrokhfall K, Khoshbaten A, Zahediasl S, Mehrani H, Karbalaei N.

Improved islet function is associated with anti-inflammatory, antioxidant and hypoglycemic potential of cinnamaldehyde on metabolic syndrome induced by high tail fat in rats. J Funct Foods .2014; 10: 397-406.

14. Goth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. Clin Chim Acta 1991; 196(2-3): 143-151.
15. Karbalaei N, Noorafshan A, Hoshmandi E. Impaired glucose-stimulated insulin secretion and reduced β-cell mass in pancreatic islets of hyperthyroid rats. Exp Physiol .2016; 101(8): 1114-1127.
16. Layachi N, Kechrid Z. Combined protective effect of vitamins C and E on cadmium induced oxidative liver injury in rats. Afric J Biotechnol. 2012; 11(93): 16013-16020.
17. Horiguchi H, Sato M, Konno N, Fukushima M. Long-term cadmium exposure induces anemia in rats through hypoinduction of erythropoietin in the kidneys. Arch Toxicol .1996; 71(1-2): 11-19.
18. Vodela JK, Renden JA, Lenz SD, Mcelhenney WH, Kemppainen BW. Drinking water contaminants (arsenic, cadmium, lead, benzene, and trichloroethylene). 1. Interaction of contaminants with nutritional status on general performance and immune function in broiler chickens. Poult Sci 1997; 76(11): 1474-1492.
19. Erdogan Z, Erdogan S, Celik S, Unlu A. Effects of ascorbic acid on cadmium-induced oxidative stress and performance of broilers. Biol Trace Elem Res 2005; 104(1): 19-32.
20. Chen YW, Yang CY, Huang CF, Hung DZ, Leung YM, Liu SH. Heavy metals, islet function and diabetes development. Islets 2009; 1(3): 169-176.
21. Antala S, Dempski RE. The human ZIP4 transporter has two distinct binding affinities and mediates transport of multiple transition metals. Biochemistry 2012; 51(5): 963-973.
22. Dalton TP, He L, Wang B, Miller ML, Jin L, Stringer KF, et al. Identification of mouse SLC39A8 as the transporter responsible for cadmium-induced toxicity in the testis. Proc Natl Acad Sci U S A .2005; 102(9): 3401-3406.
23. Lemaire K, Ravier MA, Schraenen A, Creemers JW, Van De Plas R, Granvik M, et al. Insulin crystallization depends on zinc transporter ZnT8 expression, but is not required for normal glucose homeostasis in mice. Proc Natl Acad Sci U S A .2009; 106(35): 14872-1487.
24. Chimienti F, Devergnas S, Pattou F, Schuit F, Garcia-Cuenca R, Vandewalle B, et al. In vivo expression and functional characterization of the zinc transporter ZnT8 in glucose-induced insulin secretion. J Cell Sci .2006; 119(20): 4199-4206.
25. Kazi TG, Afridi HI, Kazi N, Jamali MK, Arain MB, Jalbani N, et al.

Copper, chromium, manganese, iron, nickel, and zinc levels in biological samples of diabetes mellitus patients. Biol Trace Elem Res .2008; 122(1): 1-18.

26. Wijesekara N, Dai FF, Hardy AB, Giglou PR, Bhattacharjee A, Koshkin V, et al. Beta cell-specific Znt8 deletion in mice causes marked defects in insulin processing, crystallisation and secretion. Diabetologia 2010; 53(8): 1656-1668.
27. Rungby J. Zinc, zinc transporters and diabetes. Diabetologia .2010; 53(8): 1549-1551.
28. Kurata Y, Katsuta O, Doi T, Kawasuso T, Hiratsuka H, Tsuchitani M, et al. Chronic cadmium treatment induces islet B cell injury in ovariectomized cynomolgus monkeys. Jpn J Vet Res 2003; 50(4): 175-183.
29. Demir H, Kanter M, Coskun O, Uz YH, Koc A, Yildiz A. Effect of black cumin (Nigella sativa) on heart rate, some hematological values, and pancreatic beta-cell damage in cadmium-treated rats. Biol Trace Elem Res .2006; 110(2): 151-162.
30. Rains JL, Jain SK. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. Free Radic Biol Med .2011; 50(5): 567-575.
31. Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Tanaka Y, Takahashi H. Glucose toxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. Diabetes 2003; 52(3): 581-587.
32. Lenzen S. Oxidative stress: the vulnerable beta-cell. Biochem Soc Trans .2008; 36(3): 343-347.
33. Cuypers A, Plusquin M, Remans T, Jozefczak M, Keunen E, Gielen H, et al. Cadmium stress: an oxidative challenge. Biometals 2010; 23(5): 927-940.
34. Lopez E, Arce C, Oset-Gasque MJ, Canadas S, Gonzalez MP. Cadmium induces reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in cortical neurons in culture. Free Radic Biol Med. 2006; 40(6): 940-951.
35. Jurczuk M, Brzoska MM, Moniuszko-Jakoniuk J, Galazyn-Sidorczuk M, Kulikowska-Karpinska E. Antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to cadmium and ethanol. Food Chem Toxicol 2004; 42(3): 429-438.
36. Ognjanovic BI, Pavlovic SZ, Maletic SD, Zikic RV, Stajn AS, Radojicic RM, et al. Protective influence of vitamin E on antioxidant defense system in the blood of rats treated with cadmium. Physiol Res .2003; 52(5): 563-570.
37. Ognjanovic BI, Markovic SD, Pavlovic SZ, Zikic RV, Stajn AS, Saicic ZS. Effect of chronic cadmium exposure on antioxidant defense system in some tissues of rats: protective effect of selenium. Physiol Res 2008;57(3): 403-411.
38. Patra RC, Rautray AK, Swarup D. Oxidative stress in lead and cadmium

in rat kidney. Biol Trace Elem Res .2009; 130(2): 152-161.

40. Nair AR, Degheselle O, Smeets K, Van Kserkhove E, Cuypers A. Cadmium-Induced Pathologies: Where Is the Oxidative Balance Lost (or Not)? Int J Mol Sci. 2013; 14(3): 6116-6143.

toxicity and its amelioration. Vet Med Int .2011; 2011: 457327.

39. Messaoudi I, El Heni J, Hammouda F, Said K, Kerkeni A. Protective effects of selenium, zinc, or their combination on cadmium-induced oxidative stress