

بررسی اثر عنصر روی بر فعالیت آنزیم استیل کولین استراز و میزان کاتکول آمین‌های نواحی سه گانه مغز در رات‌های مسموم شده با کادمیوم

دکتر سید علی اصغر مشتاقی^۱، دکتر محسن آبی^۲، دکتر رحمت‌الله علیزاده^۳، عصمت آقداود^۴، مینو مشتاقی^۵

تاریخ دریافت ۸۴/۰۳/۳۰، تاریخ پذیرش ۸۵/۰۹/۰۸

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: امروزه مطالعات زیادی بر روی مواد سمی و تداخل آنها با عناصر ضروری بدن در حال انجام است که یکی از این مواد کادمیوم است و بسیاری از اثرات سمی آن ناشی از تداخل آن با عناصر ضروری بدن از قبیل روی می‌باشد. روی به دلیل شباهت ساختمانی با کادمیوم و توانایی مشابه که برای القای سنتز متالوتیونین دارد قادر به ایجاد تداخل در عمل سمی کادمیوم می‌باشد. در این پروژه به بررسی امکان اثر محافظتی روی بر اثرات سمی کادمیوم در رابطه با پارامترهای مغزی فعالیت استیل کولین استراز و میزان کاتکول آمین در نواحی مختلف مغز پرداخته شده است.

مواد و روش کار: تمام مواد لازم در طرح مذکور از شرکت شیمیایی Sigma (آلمان) تهیه شد و در تمام مدت اجرای طرح از آب دیونیزه استفاده گردید. ابتدا چهار گروه ۵ تایی رات‌نر شامل گروه‌های کادمیوم (۱mg/kg)، کادمیوم و روی (۰/۵mg/kg)، روی و یک گروه به عنوان شاهد، (سرم فیزیولوژی) انتخاب گردید.

یافته‌ها: رات‌ها به صورت داخل صفاقی تحت درمان طی دوره‌های ۳۰ و ۶۰ روزه قرار گرفتند پس از دوره درمان ۳۰ روزه مشخص شد که فعالیت آنزیم استیل کولین استراز قشر مغز در گروه‌های کادمیوم، روی-کادمیوم و روی به ترتیب ۲۱/۳٪، ۵/۷٪ و ۱۶/۲٪ و در مغز میانی به ترتیب ۸/۹٪، ۴/۹٪ و ۳/۵٪ و در ناحیه مخچه ۱۱٪، ۴/۵٪ و ۷/۹٪ نسبت به گروه کنترل کاهش یافت.

در دوره ۶۰ روزه فعالیت آنزیم در قشر مغز به ترتیب ۴۰/۸٪، ۲۵/۹٪ و ۸/۸٪ در مغز میانی ۲۰/۲٪، ۵/۸٪ و ۳/۷٪ و در مخچه ۴۰/۴٪، ۸/۱٪ و ۴/۹٪ نسبت به گروه کنترل کاهش یافت.

همچنین در دوره ۳۰ روزه میزان کاتکول آمین‌ها در ناحیه قشر مغز در گروه‌های کادمیوم (۱mg/kg)، کادمیوم- روی (۰/۵mg/kg)، روی به ترتیب ۱۳/۷٪، ۱۰/۳٪ و ۵/۳٪ در ناحیه مغز میانی ۲۱/۶٪، ۱۸/۱٪ و ۱۰/۶٪ نسبت به گروه کنترل کاهش یافت. در ناحیه مخچه در گروه‌های کادمیوم، کادمیوم- روی میزان کاتکول آمین‌ها به ترتیب ۹/۸٪ و ۸/۹٪ نسبت به گروه کنترل کاهش یافت در حالی که در گروه روی ۷/۱٪ میزان کاتکول آمین‌ها نسبت به گروه کنترل افزایش یافت.

بحث و نتیجه‌گیری: در دوره ۶۰ روزه میزان کاتکول آمین‌های قشر مغز در گروه‌های مربوطه به ترتیب ۳۲/۲٪، ۲۳٪ و ۸/۹٪ در ناحیه مغز میانی ۳۷٪، ۱۲/۸٪ و ۹/۴٪ و در ناحیه مخچه ۱۹/۶٪، ۱۰/۱٪ و ۵/۷٪ نسبت به گروه کنترل کاهش یافت. نتایج حاصل حاکی از امکان اثر محافظتی روی بر برخی جنبه‌های سمیت کادمیوم در مغز می‌باشد.

کلید واژه‌ها: کادمیوم، روی، متالوتیونین، استیل کولین استراز، کاتکول آمین

مجله پزشکی ارومیه، سال هفدهم، شماره چهارم، ص ۳۱۴-۳۱۰، زمستان ۱۳۸۵

آدرس مکاتبه: اصفهان- دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده داروسازی، گروه بیوشیمی بالینی، دکتر علی اصغر مشتاقی

^۱ استاد گروه بیوشیمی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان (نویسنده مسؤل)

^۲ استاد گروه بیوشیمی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

^۳ دکترای داروسازی

^۴ دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی

^۵ دانشجوی رشته مهندسی محیط‌زیست دانشکده منابع طبیعی دانشگاه اصفهان

بررسی اثر عنصر روی بر فعالیت آنزیم استیل کولین استراز و میزان کاتکول آمین‌های نواحی سه گانه مغز در رات‌های مسموم شده با کادمیوم

مقدمه

کادمیوم یکی از مهم‌ترین آلوده کننده‌های خطرناک محیطی و شغلی است و به عنوان یک عامل سمی برای انسان و حیوان شناخته شده است (۱).

اساس سمیت کادمیوم ناشی از اثر منفی آن بر سیستم آنزیمی بدن است کادمیوم جایگزین یون‌های فلزی نظیر روی، مس، کلسیم در متالوآنزیم‌ها می‌شود و بدین طریق باعث کاهش عملکرد آنزیم‌ها می‌گردد (۲).

بسیاری از اثرات سمی کادمیوم در نتیجه تداخل آن با میکروالمنت و ماکروالمنت‌ها به خصوص کلسیم، روی، مس، آهن و سلنیوم می‌باشد (۳) براساس تحقیقات کادمیوم در مراحل مختلف جذب، توزیع و دفع بیوالمنت‌ها تداخل ایجاد می‌کند (۱).

این تداخل می‌تواند در اثر شباهت ساختمانی کادمیوم با عناصر دو ظرفیتی نظیر روی ایجاد شود. در سیستم‌های بیولوژیک روی توسط گروه‌های سولفیدریل به متالوتیونین‌ها متصل می‌شود در حالیکه تمایل کادمیوم به گروه‌های سولفیدریل بیشتر از روی می‌باشد (۳) لذا بین کادمیوم و روی بر سر اتصال به متالوتیونین‌ها و انتقال آن به داخل سلول و اتصال به جایگاه‌های داخل سلولی رقابت ایجاد می‌شود، بدین ترتیب کادمیوم جایگزین روی در بسیاری از پروسه‌های بیولوژیکی می‌گردد (۴). براساس مطالعات مصرف روی به صورت هم‌زمان، قبل و یا بعد از کادمیوم می‌تواند تا حد قابل ملاحظه‌ای اثرات سمی کادمیوم را کاهش دهد (۵) از طرفی کادمیوم باعث تغییر سیستم catecholaminergic transmission، serotoninergic transmission و همین طور تغییر سیستم cholinergic transmission می‌شود این اثرات به نظر می‌آید در رابطه با تغییر متابولیسم داخل سلولی کلسیم و تغییر عملکرد کلسیم به عنوان یک پیام رسان ثانویه در CNS است چرا که کادمیوم می‌تواند جایگزین کلسیم در کالمودولین گردد و بدین ترتیب باعث کاهش میزان کلسیم داخل سلولی و همین طور تغییر اعمال فیزیولوژیک سلول که کلسیم در آن نقش مهمی دارد از جمله اتصال سلول‌ها، signal trasduction و neurotransmission می‌گردد، به عبارت دیگر کادمیوم به علت تغییر در هموستاز کلسیم در مراحل neurotransmission تداخل ایجاد می‌کند، بدین ترتیب کادمیوم می‌تواند در میزان آزادسازی نوروترانسمیترها تأثیر زیادی بگذارد و از جمله این نوروترانسمیترها می‌توان استیل کولین و کاتکول آمین‌ها را نام برد (۶).

هدف از اجرای طرح مذکور کاهش اثرات سمی کادمیوم بر نوروترانسمیترهای مغزی است.

مواد و روش کار

تمام مواد لازم در طرح مذکور از شرکت شیمیایی Sigma (آلمان) تهیه شد و در تمام مدت اجرای طرح از آب دیونیزه استفاده گردید.

ابتدا چهار گروه رات‌نر از نژاد wistar (در هر گروه پنج عدد) با وزن ۲۵۰gr-۲۰۰ انتخاب شد. گروه‌ها شامل کادمیوم ۱mg/kg، کادمیوم-روی (۰/۵mg/kg) روی و گروه کنترل (سرم فیزیولوژیک) بودند.

گروه‌های مذکور روزانه به صورت داخل صفاقی دوز دارو مربوطه را دریافت کردند پس از پایان هر دوره تزریق (۳۰ روزه و ۶۰ روزه) رات‌ها کشته و پس از جدا کردن سر آنها با برداشتن پوست و جمجمه، مغز حیوان خارج گردید و نواحی مختلف مغز با استفاده از روش (Glowinsky Iversen 1996) جدا گردید.

هر ناحیه از مغز به دو نیمه جهت تعیین کاتکول آمین به روش فلوریمتری و نیمه دیگر مغز جهت اندازه‌گیری فعالیت استیل کولین استراز به روش اسپکتروفوتومتری تقسیم شد.

تعیین فعالیت استیل کولین استراز: ابتدا نمونه مغزی جدا شده با ۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۱۵ میلی‌مولار با pH=۷/۴ و در حضور تریتون ۱۰۰ x توسط دستگاه هموژنایزر با دور ۱۲۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه هموژنیزه شد.

محصول به دست آمده توسط دستگاه سانتریفوژ یخچال‌دار (سوروال) با دور ۱۰/۰۰۰rpm به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ C سانتریفوژ شد سپس محلول فسفات روی جهت اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم استیل کولین استراز جدا گردید. اصول اندازه‌گیری فعالیت ویژه آنزیم براساس روش Ellman و با استفاده از بافر متانترو فنل بود (۷). در متد مذکور اسیداستیک تولید شده از هیدرولیز آنزیم استیل کولین استراز سبب کاهش رنگ معرف متانترو فنل می‌گردد. جهت اندازه‌گیری میزان پروتئین نمونه‌ها از روش lowry استفاده شد (۸).

برای اندازه‌گیری میزان کاتکول آمین‌های نواحی مختلف مغز ابتدا بافت مغز را در حضور ۱۰ میلی‌لیتر اسید پرکلریک ۰/۱ مولار و EDTA ۰/۱ با استفاده از دستگاه هموژنایزر به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰rpm هموژنیزه گردید.

دکتر سید علی اصغر مشتاقی، دکتر محسن آنی، دکتر رحمت الله علیزاده، عصمت آفاداد، مینو مشتاقی

نتایج حاصل از دوره ۳۰ روزه، در قشر مغز و مغز میانی و مخچه حاکی از کاهش میزان پارامترها نسبت به گروه کنترل می باشد که با تزریق کادمیوم به ترتیب کاهش در میزان کاتکول آمین به میزان ۱۳/۷، ۲۱/۶ و ۹/۸ درصد و کاهش ۲۱/۳، ۸/۹ و ۱۱ درصدی در مقدار فعالیت آنزیم استیل کولین استراز نواحی سه گانه مغز ملاحظه شد. با تزریق توأم کادمیوم و روی کاهش مقدار کاتکول آمین نواحی سه گانه قشر مغز، مغز میانی و مخچه به ترتیب ۱۰/۳، ۱۸/۱ و ۸/۹ درصد بوده و به میزان ۵/۷، ۴/۹ و ۴/۵ درصد کاهش در فعالیت آنزیم استیل کولین استراز به دست آمد.

نتایج بدست آمده در پایان آزمایشات مربوط به دوره ۶۰ روزه تزریق نیز به شرح زیر است:

کاهش ۳۲/۲ و ۳۷ و ۱۹/۶ درصدی مقدار کاتکول آمین و کاهش ۴۰/۸ و ۲۰/۲ و ۴۰/۴ درصدی در فعالیت آنزیم استیل کولین استراز به دنبال تزریق کادمیوم و به ترتیب در نواحی قشر و مغز میانی و مخچه حیوانات مورد بررسی حاصل شد.

تغییرات در گروه تزریق توأم نیز به صورت کاهش در میزان پارامترها و به میزان ۲۲ و ۱۳/۸ و ۱۰/۱ درصد برای کاتکول آمین و ۲۵/۹ و ۵/۸ و ۸/۱ درصد کاهش برای فعالیت آنزیم به ترتیب در قشر مغز میانی و مخچه حیوانات به ثبت رسید.

بررسی نتایج حاصل نشان می دهد که در دوره ۳۰ روزه اختلاف مقادیر آنزیم استیل کولین استراز و گروه تحت درمان^۳ در مقایسه با گروه کادمیوم نسبت به کنترل کمتر بوده و از لحاظ آماری نیز معنی دار نمی باشد. البته در مورد کاتکول آمین در گروه توأم^۴ اگر

آنگاه مخلوط حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در دور ۱۰/۰۰۰rpm با اولتراسانتریفوژ یخچال دار در دمای ۴ C سانتریفوژ شد سپس محلول شفاف روی به دقت جدا شد و کاتکول آمین های موجود در سوپرناتانت با استفاده از اکسید آلومینیم^۱ استخراج گردید. روش کار به این صورت بود که پس از آن که pH سوپرناتانت به حدود ۹ رسید به آن ۲/۵ گرم اکسید آلومینیم^۲ اضافه گردید سپس نمونه ها به مدت ۲۰ دقیقه به طور کامل ورتکس شدند، پس از سانتریفوژ، آلومینا موجود دوبار و هر بار با آب دوبار تقطیر سرد شسته شد و آنگاه با دور ۱۰۰۰g به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید به رسوب حاصل ۱۰ ml اسید استیک ۱٪ جهت آزادسازی کاتکول آمین ها از آلومینا اضافه شد و بعد از ۵ دقیقه ورتکس، نمونه ها به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰g سانتریفوژ گردید.

میزان کاتکول آمین ها براساس متد مصری پور و حددادی ۱۹۸۸ تعیین شد (۹) جهت محاسبات آماری، نتایج به دست آمده در این پایان نامه به صورت $Mean \pm SD$ گزارش شد و ارزش اختلاف بین گروه ها با گروه کنترل با استفاده از نرم افزار کامپیوتری SPSS و به وسیله تجزیه و تحلیل واریانس یکطرفه on-way ANOVA محاسبه گردید.

اختلاف ما هنگامی معنی دار در نظر گرفته شد که $p < 0.05$ باشد.

یافته ها

برای بررسی نتایج از درصد تغییرات پارامترهای اندازه گیری شده در گروه های مورد تزریق با کلرید کادمیوم و کلرید روی و نیز گروه توأم نسبت به گروه کنترل استفاده شد.

جدول شماره ۱: بررسی فعالیت آنزیم استیل کولین استراز برحسب میکرومول اسیداستیک تولید شده بر میلی گرم پروتئین موجود برحسب

دقیقه (fomole. AA/mg protein/min) در دو دوره ۳۰ و ۶۰ روزه

رویه	مدت	روی-کادمیوم	مدت	کادمیوم	مدت	کنترل	مدت
قشر مغز	۳۰	۸/۰۴±۰/۶۴	۳۰	۶/۷۱±۲/۱۳*	۳۰	۸/۵۳±۰/۴۶	۳۰
	۶۰	۶/۲۱±۰/۲۸*	۶۰	۴/۹±۰/۳۲*	۶۰	۸/۲۸±۰/۳۷	۶۰
مغز میانی	۳۰	۱۵/۱±۰/۴۸	۳۰	۱۴/۴۶±۰/۵۲*	۳۰	۱۵/۸۷±۰/۴۳	۳۰
	۶۰	۱۴/۰۳±۰/۵۲*	۶۰	۱۱/۸۸±۰/۵۱*	۶۰	۱۴/۸۹±۰/۴۵	۶۰
مخچه	۳۰	۱۵/۵۴±۰/۴۱	۳۰	۱۴/۴۹±۱/۲۲*	۳۰	۱۶/۲۸±۱/۲۲	۳۰
	۶۰	۱۴/۰۷±۰/۵۶*	۶۰	۹/۵۴±۰/۵۳*	۶۰	۱۶±۰/۴۷	۶۰

اختلاف نسبت به گروه کنترل با در نظر گرفتن $p < 0.05$ محاسبه گردید.

^۳ دریافت دارنده روی + کادمیوم

^۴ تحت درمان

^۱ آلومینیم فعال شده

^۲ Al₂O₃

بررسی اثر عنصر روی بر فعالیت آنزیم استیل کولین استراز و میزان کاتکول آمین‌های نواحی سه گانه مغز در رات‌های مسموم شده با کادمیوم
جدول شماره ۲: بررسی میزان کاتکول آمین‌ها در نواحی سه گانه مغز رات در گروه‌های مذکور میزان کاتکول آمین برحسب نانوگرم بر

میلی گرم پروتئین نمونه سنجیده شد در دو دوره ۳۰ و ۶۰ روزه

مغز	مدت	روی-کادمیوم	مدت	کادمیوم	مدت	کنترل	مدت
قشر مغز	۳۰	۵۶/۰۷±۲/۲۸	۳۰	۵۱/۰۷±۲/۱۳*	۳۰	۵۹/۱۶±۵/۷۵	۳۰
	۶۰	۴۶/۳۱±۱/۷۱*	۶۰	۳۴/۴۶±۲/۱۴*	۶۰	۵۰/۸۱±۲/۷۶	۶۰
مغز میانی	۳۰	۶۵/۵۴±۱/۸۹*	۳۰	۵۷/۳۴±۱/۸۹*	۳۰	۷۳/۱۷±۳/۷۶	۳۰
	۶۰	۵۲/۸۸±۱*	۶۰	۳۷/۴۸±۱/۵۲*	۶۰	۵۹/۴۵±۳/۶۲	۶۰
مخچه	۳۰	۱۶۶/۲۲±۰/۸۷*	۳۰	۱۳۹/۹۹±۲/۳۱*	۳۰	۱۵۵/۲۲±۵/۲۴	۳۰
	۶۰	۱۳۷/۰۲±۰/۶۶*	۶۰	۱۱۶/۷۴±۰/۸۴*	۶۰	۱۴۵/۲۳±۲/۴۲	۶۰

اختلاف نسبت به گروه کنترل با در نظر گرفتن $p < 0/05$ محاسبه گردید.

چه اختلاف نسبت به کنترل در مقایسه با کادمیوم کمتر می‌باشد ولی از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری می‌باشد. بعد از ۶۰ روز، اختلاف پارامترهای در تمام نواحی مغزی مورد مطالعه گروه تحت درمان و نیز گروه مسموم با کادمیوم نسبت به کنترل معنی‌دار بوده است اگر چه اختلاف گروه دریافت‌دارنده روی و کادمیوم (توأم) در مقایسه با گروه مسموم با کادمیوم نسبت به گروه کنترل کمتر می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج دوره ۳۰ روزه نشان می‌دهد که در گروه مسموم با کادمیوم فعالیت آنزیم استیل کولین به طور قابل ملاحظه‌ای در تمامی نواحی مغز کاهش یافت در حالی که در گروه توأم کادمیوم- روی میزان کاهش فعالیت آنزیم کمتر مشاهده شد. به عبارت دیگر می‌توان گفت در دوره کوتاه مدت روی می‌تواند نقش حفاظتی مؤثری در جلوگیری از اثرات سمی کادمیوم بر فعالیت آنزیم استیل کولین استراز ایفا نماید.

بعد از دوره ۶۰ روزه میزان فعالیت آنزیم در گروه مسموم با کادمیوم نسبت به گروه ۳۰ روزه کاهش بیشتری را نشان می‌دهد و این کاهش به ویژه در ناحیه مغز میانی و مخچه دیده می‌شود از طرفی اگر چه مصرف توأم کادمیوم- روی در دوره ۶۰ روزه تا حدودی می‌تواند مانع از کاهش شدید فعالیت آنزیم گردد ولی میزان کاهش پارامتر مذکور از لحاظ آماری معنی‌دار بوده و لذا روی در دوره بلند مدت نمی‌تواند اثرات محافظتی قابل ملاحظه‌ای در برابر مسمومیت با کادمیوم ایفا نماید.

میزان کاتکول آمین در هر دو گروه مسموم با کادمیوم و دریافت‌دارنده توأم روی-کادمیوم نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌دار

داشت اگر چه تغییرات گروه توأم نسبت به گروه مسموم کمتر بود. بعد از دوره ۶۰ روزه کاهش پارامتر مربوطه در گروه مسموم با کادمیوم شدیدتر بود. از طرفی کاهش میزان کاتکول آمین در گروه دریافت‌کننده توأم روی و کادمیوم نیز از لحاظ آماری معنی‌دار بود.

لذا می‌توان گفت روی در دوره بلند مدت نمی‌تواند اثرات محافظتی مؤثری در جلوگیری از اثرات سمی کادمیوم بر سیستم دو پامینرژیک ایفا نماید.

مطالعات متعدد نشان می‌دهد که تداخلات بین کادمیوم و روی به میزان زیادی نتیجه تمایل این دو فلز به متالوتیونین و توانایی آن‌ها برای القای سنتز آن می‌باشد بسیاری از محققان نشان داده‌اند که متالوتیونین یک نقش حفاظتی مهم در پیشگیری از سمیت فلزات سنگین نظیر کادمیوم و جیوه با تشکیل ترکیبات فلز-متالوتیونین ایفا می‌کند. کادمیوم به دلیل تمایل بالاتر برای اتصال به متالوتیونین می‌تواند روی را از موانع اتصال سیستئینی موجود بر روی این پروتئین جابه‌جا کند لذا افزایش غلظت یون‌های آزاد روی باعث القای بیشتر سنتز ملکول‌های جدید متالوتیونین می‌شود (۴) تجویز روی به صورت همزمان، قبل و یا بعد از قرارگیری در معرض کادمیوم، تجمع کادمیوم را در گونه‌های مختلف حیوانات آزمایشگاهی کاهش می‌دهد.

در حیواناتی که کادمیوم به تنهایی دریافت داشته‌اند، میزان زیادی از این عنصر در سیتوزول تجمع می‌نماید در حالی که در حیوانات پیش درمانی شده با روی عمده کادمیوم متصل به متالوتیونین بوده لذا در نتیجه اتصال عمده کادمیوم به متالوتیونین، قسمت کمتری از آن فرصت اتصال به ماکرو ملکول‌ها را می‌یابند و به این طریق روی می‌تواند اثرات حفاظتی خود را اعمال نماید (۱۰).

References:

01. Brozoska M, Monicuszko-jakoniuk J. The influence of calcium content in diet on cumulation and toxicity of cadmium in the organism. *Archives of Toxicology* 1998; 72: 63-73 .
02. Jacobsen KB, Turner JE. The interaction of cadmium and certain other metal ions with proteins and nucleic acids. *Toxicology* 1980; 16: 1-37 .
03. Elinder CG, Nordberg M, Palm B, Bjork L. Cadmium, zinc and copper in rabbit kidney metallothionein relation to kidney toxicity. *Environmental Research* 1987; 42: 553-562 .
04. Klaasen CD, Liu J, Choudhuri S. Metallothionein an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 1999; 39, 267-71 .
05. Webb M. Protection by zinc against cadmium toxicity. *Biochemical Pharmacology* 1972; 21: 67-71 .
06. Teresa Ma, Corredor L. Study of the activity of several brain enzymes like marker of the neurotoxicity induced by perinatal exposure to lead and cadmium. *Toxicology Letters* 2003; 143: 331-340 .
07. Roppaport F, Fisch J, Pinto N. Estn of cholinesterase activity in serum. *Clin Chem* 1959; 4: 227-230 .
08. Lowry OH, Rosembrough NJ, Farral Randall RJ. Protein measurement with foline reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275 .
09. Messripour M, Haddady H. Effect of ascorbic acid administration on copper-induced changes in rat barrin hypothalamic catecholamine contents. *Acta Neurol Scand* 1988; 77: 481-485 .
10. Kelly EJ, Quaiife CJ, Palmiter RD. Metaothionein I and II protect against zinc deficiency and zinc toxicity in mice. *J Nutrition* 1996; 126: 1783-1790.