دور الخارصين والنحاس على بعض المتغيرات الكيموحيوية وقابلية الإصابة بداء السكر المستحدث بالألوكسان في الجرذان

مطاع عبد المطلب عبد

فرع الفسلجة / كلية الطب البيطري

جامعة الموصل

الاستلام	القبول
٢٠٠٨ / 06 / 09	٢٠٠٨ / ١٢ / ٠١

Abstract

This study was conducted to evaluate the effect of diet supplementation with zinc and copper on some biochemical parameters in rats and susceptability to induction of diabetes by alloxan, and there effect to delay diabetes induced by alloxan. Albino male rats divided randomly into several groups.group one served as control. Group two and three given diet contain 15, 25 mg zinc /kg diet respectively, group four and five recieved 1,3 mg copper /kg diet respectively, for two weeks of treatment. Other group induced diabetes and let without treatment and considered as a diabetic control group. Results Showed a significant decrease in both serum glucose and cholesterol levels in comparing with control group, with an a significant increase in levels of both malondialdehyde and glutathione, the results also showed that both zinc and copper treatment delayed the induction of diabetes by alloxan. We conclude from this work that both zinc and copper have important effect on studied parameters and on susceptability of diabetes induced by alloxan.

الخلاصة

أجري هذا البحث لمعرفة تأثير كل من عنصري الخارصين والنحاس على قابلية الإصابة بداء السكر المستحدث بالألوكسان في الجرذان، حيث استع ملت جرذان، وقسمت عشوائياً إلى عدة مجاميع، جرذان المجموعة الأولى وعدت مجموعة سيطرة. بينما المجموعة الثانية والثالثة

اعطيت علف يحتوي الكيلوغرام الواحد منه على ١٥ و٢٥ ملغم من عنصر الخارصين على التوالي. أما المجموعة الرابعة والخامسة فاعطيت علف يحتوي الكيلوغرام الواحد منه على ١ و٣ ملغم من عنصر النحاس على التوالي. لمدة أسبوعين من المعاملة. وتم استحدث داء السكر في مجموعة اخرى اذ تم اعتبارها مجموعة سيطرة.

أظهرت نتائج التحليل الإحصائي انخفاض معنوي ($p \leq 0.05$) لمستوى الكلوكوز (وبالأوقات المختلفة) والكوليستيرول وبشكل في المجاميع التي عوملت بالخارصين والنحاس مع زيادة معنوية في مستوى المالونديالديهايد والكلو تاثايون . نستنتج من هذه ا لدراسة أن للزنك والنحاس تأثيراً مهماً على المقاييس الكيميائية الحياتية ودوراً في تأخير الاصابة بداء السكر المستحدث بالالوكسان.

المقدمة

يعد النحاس (Cu^{+2}) أحد أهم العناصر النادرة في جسم الانسان والحيوان، إذ يدخل في تركيب وعمل العديد من الانزيمات مثل Amine oxidase و copper dependent superoxide dismutase وcytochrome oxidase وtyrosinase حيث يستقبل ويمنع النحاس الالكترونات وبذلك يدخل في عملية الـ oxidation وhydroxylation وdismutation (1). ويتوزع النحاس داخل الجسم بالنسب الآتية : 50% في العضلات و20% في العظام و 18% في الكبد والباقي في مكونات الجسم المختلفة الأخرى مثل كريات الدم الحمر والبلازما (2). ويلاحظ نقص مستوى النحاس في الجسم عموماً في الحالات التي تسبب نقص مستوى بروتين الدم Hypoproteinemia أما الزيادة فتلاحظ في الكثير من الأمراض المزمنة (3).

أما الخارصين (Zn+2) Zinc فهو يعد أيضاً من العناصر النادرة المهمة داخل الجسم ويعد مهماً لنمو معظم الكائنات الحية وتبرز أهمية الخارصين من دوره الأساسي في عمل جزيئة الانسولين، كما يدخل في تركيب بعض الإنزيمات مثل : carbonic anhydrase وphosphatase وuricase وDehydrogenase وkinase Protein (3). كما يعد الخارصين مانع أكسدة Antioxidant (4).

ويعرف داء السكر بأنه حالة مزمنة ناتجة عن عوامل وراثية وبيئية، ويتسم بارتفاع مستوى سكر الدم بسبب نقص في مستوى الأنسولين المطلق أو الجزئي، او وجود خلل معين يمنع الأنسولين من أن يعطي تأثيره الفعال (5). كما يتميز داء السكر بارتفاع مستوى الكوليستيرول والكليسيردات الثلاثية في الدم (6).

أما المالوندايالديهايد (MDA) Malondialdehyde فيعرف بأنه الناتج النهائي من عملية بيروكسدة الدهون والتي يتم من خلالها تحويل بيروكسيدات الدهون للاحماض الامينية متعددة الأواصر المزدوجة الى مالوندايالديهايد (7). وتتحفز عملية تكوين بيروكسيدات الدهون وانتاج المالوندايالديهايد خلال الاكسدة الذاتية للكاتيكول أمين والثايولات ومركبات الكوينون، لذا فان قياس مستوى المالوندايالديهايد في الدم والأ نسجة يعكس مدى تعرض دهون الجسم للاذى (الاجهاد التأكسدي) (8).

ويعرف الكلوتاثايون GSH بأنه ببتيد ثلاثي tripeptide ويتواجد داخل وخارج الخلايا ، حيث يبنى داخل خلايا الكبد من السستين والكلايسين وحامض الكلوتاميك ولذلك فهو يختلف عن مضادات الأكسدة غير الأنزيمية مثل فيتامين E,C,A. ويشكل الكلوتاثايون خزيناً حيوياً بصفته مادة مانعة للأكسدة ضد أصناف الأوكسجين الفعالة والسموم الغريبة Xenobiotics عن طريق التفاعلات المحفزة بأنزيمات Glutathione-S-transferase (3).

ان الهدف من الدراسة هو معرفة تأثير الخارصين والنحاس على المقاييس الكيميائية الحياتية وعلى قابلية الاصابة بداء السكر.

المواد وطرائق العمل

الحيوانات المختبرية :

استعملت الجرذان المختبرية البيضاء (60 جرذاً) وتراوحت أعمارها ما بين 2–3 أشهر وأوزانها ما بين 140–294 غم واخضعت لظروف مختبرية قياسية : فترة الإضاءة 10 ساعات، ودرجة الحرارة 22±2ْم وتهوية جيدة .وضعت الجرذ ان في أقفاص خاصة وتم تزويدها بالماء والعلف بشكل متواصل طيلة فترة التجربة .قسمت الجرذان على المجاميع الآتية (6 جرذان لكل مجموعة):

١) مجموعة جرذان أعطيت عنصر الخارصين بتركيز 15 ملغم/كغم علف ولمدة (2) أسبوع.
٢) مجموعة جرذان أعطيت عنصر الخارصين بتركيز 15 ملغم/كغم علف ولمدة (2) أسبوع واستحدث فيها داء السكر بعد نهاية الأسبوع الثاني.
٣) مجموعة جرذان أعطيت عنصر الخارصين بتركيز 25 ملغم/كغم علف ولمدة (2) أسبوع.
٤) مجموعة جرذان أعطيت عنصر الخارصين بتركيز 25 ملغم/كغم علف ولمدة (2) اسبوع واستحدث فيها داء السكر بعد نهاية الأسبوع الثاني.
٥) مجموعة جرذان أعطيت عنصر النحاس بتركيز 1 ملغم/كغم علف ولمدة (2) أسبوع.
٦) مجموعة جرذان أعطيت عنصر النحاس بتركيز 1 ملغم /كغم علف ولمدة (2) اسبوع واستحدث فيها داء السكر بعد نهاية الأسبوع الثاني.

٧) مجموعة جرذان أعطيت عنصر النحاس بتركيز 3 ملغم/كغم علف ولمدة (2) أسبوع.
٨) مجموعة جرذان أعطيت عنصر النحاس بتركيز 3 ملغم /كغم علف ولمدة (2) أسبوع واستحدث فيها داء السكر بعد نهاية الأسبوع الثاني.
٩) مجموعة جرذان تركت من دون معاملة ب الخارصين والنحاس وعد ت مجموعة سيطرة للمجاميع كافة.
١٠) مجموعة جرذان استحدث فيها داء السكر بالالوكسان تركت من دون معاملة وعدت مجموعة سيطرة.

المواد الكيميائية المستخدمة :

الخارصين : تم استعمال خلات الخارصين $(CH_2COO)_2Zn_2H_2O$ Zinc acetate التي تجهزه شركة (GPR).

النحاس : تم استعمال اوكسيد النحاس (CuO) Cupric oxide التي تجهزه شركة (BDH) الانكليزية.

استحداث داء السكر : بعد تصويم الجرذان لمدة (48) ساعة تم استحداث داء السكر بحقنها تحت الجلد بمادة الالوكسان (Alloxan monohydrate) التي تجهزه شركة (molekula – UK) وبتركيز ١٠٠ ملغم / مل من محلول الملح الفسلجي و بجرعة نهائية بتركيز ١٠٠ ملغم/كغم وزن الجسم باستخدام محقنة طبية سعة ١ مل (9).

جمع عينات الدم: تم سحب الدم من زاوية العين الداخلية للجرذان (وريد منظمة العين Retro-ocular vein) باستخدام أنبوبة شعرية تحتوي على الهيبارين وذلك بعد نهاية الاسبوع الأول والثاني من إعطاء كل من عنصري النحاس والخارصين بكلا الجرعتين، كما تم سحب الدم بعد مرور (٢ و ٤ و ٦ و ٢٤) ساعة من الحقن بالالوكسان ، تم فصل مصل الدم باستخدام الطرد المركزي وبسرعة 3500 دورة / دقيقة ولمدة (15) دقيقة.

التحليلات الكيميائية الحياتية :

تم قياس مستوى كلوكوز الدم باستخدام عدة التحليل الجاهزة (Kit) والتي تصنعها شركة (Bicon) الألمانية . وتم قياس مستوى الكوليست يرول في مصل الدم باستخدام عدة التحليل الجاهزة (Kit) والمصنعة من شر كة (Syrbio). أما قياس مستوى المالوندايالديهايد فتعتمد الطريقة على التفاعل بين بيروكسيدات الدهون (وبشكل رئيس المالوندايالديهايد) وبين حامض الثايوباربيتوريك Thiobarbituric acid (TBA) مكوناً ناتج ملون (10).وتم تقدير مستوى

الكلوتاثيون في مصل الدم باستخدام الطريقة المحورة المتبعة من قبل (2) وتعتمد الطريقة على استخدام محلول إلمان Ellmans reagent الحاوي على كاشف DTNB.

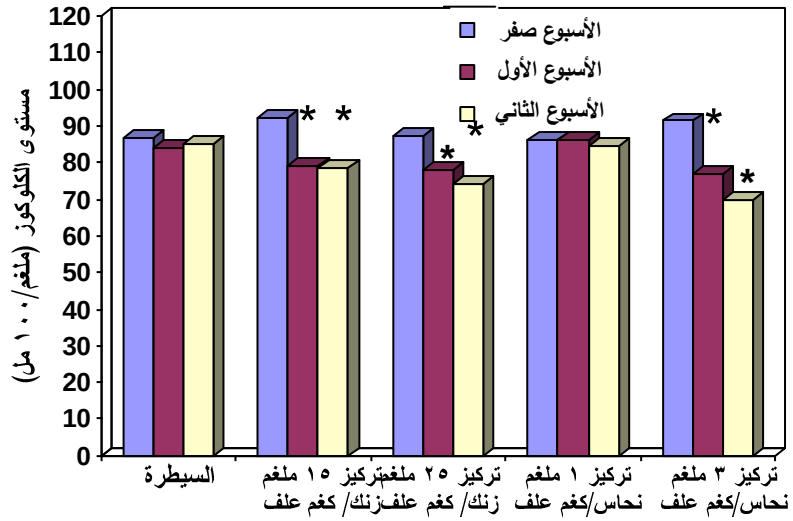
التحليل الإحصائي :

تم استخدام تحليل ا لتباين (ANOVA) لإيجاد المعدل والخطأ القياسي (Mean ± S.E) وكذلك اختبار دنكن Duncan لإيجاد الفروقات المعنوية عند مستوى احتمالية $P \leq 0.05$ (11) .

النتائج

١. تأثير المعاملة بالخارصين والنحاس على مستوى كلوكوز الدم :

يوضح الشكل (١) ان اعطاء الخارصين بالتركيز ١٥ و٢٥ ملغم/كغم علف أدى الى خفض معنوي في مستوى كلوكوز الدم في الاسبوعين الاول والثاني وذلك عند مقارنتهما مع مجموعة السيطرة، على حين لم يؤد اعطاء النحاس بالتركيز ١ ملغم/كغم علف الى تغير معنوي في كلا الأسبوعين، إما إعطاء النحاس بالتركيز ٣ ملغم/كغم فقد أدى الى انخفاض معنوي في مستوى الكلوكوز في الاسبوع الاول والثاني عند المقارنة مع مجموعة السيطرة.

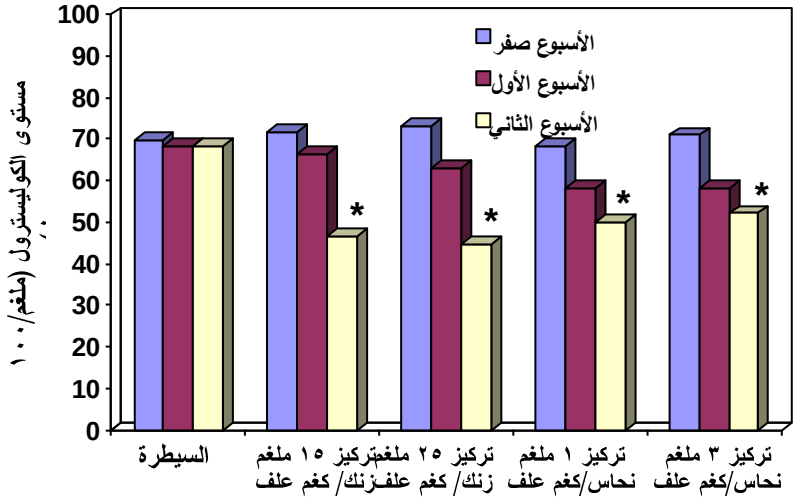


* تعني فرقاً معنوياً عند مقارنتها مع الوقت صفر لنفس المجموعة عند مستوى احتمالية $p \leq 0.05$

الشكل (١): تأثير المعاملة بالزنك والنحاس على مستوى كلوكوز الدم

٢. تأثير المعاملة بالخارصين والنحاس على مستوى كوليستيرول الدم :

نلاحظ من الشكل (٢) أن أعطاء الخارصين وبالتركيزين ١٥ و٢٥ ملغم /كغم علف والنحاس بالتركيزين ١ و٣ ملغم/كغم علف أدى إلى انخفاض معنوي في مستوى كوليستيرول الدم في الأسبوع الثاني فقط مقارنة مع مجاميع السيطرة لكل معاملة.

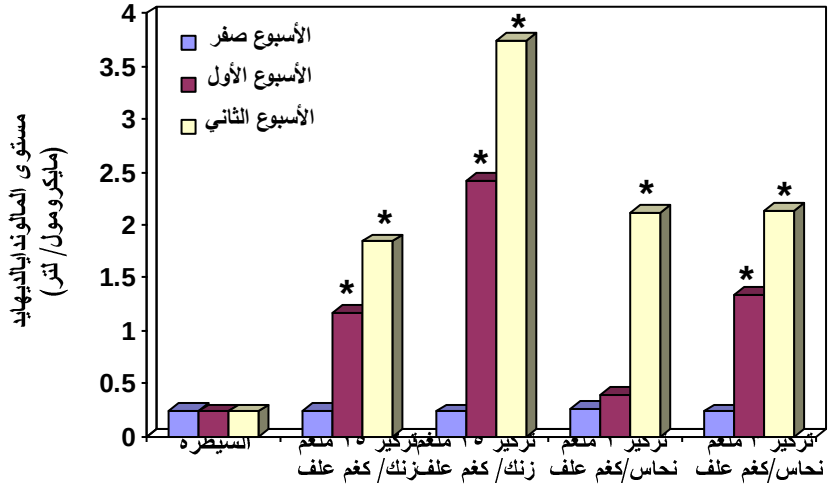


* تعني فرقاً معنوياً عند مقارنتها مع الوقت صفر لنفس المجموعة عند مستوى

الشكل (٢) تأثير المعاملة بالخارصين والنحاس على مستوى الكوليستيرول في مصل الجرذان.

٣. تأثير المعاملة بالخارصين والنحاس على مستوى المالونديالديهايد في مصل الدم:

يبين الشكل (٣) إن المعاملة بالخارصين وبالتركيزين ١٥ و٢٥ ملغم/كغم علف وكذلك بالنحاس وبالتركيز ٣ ملغم /كغم علف أدت إلى زيادة معنوية في مستوى المالونديالديهايد في مصل الدم في الأسبوع الأول والثاني أما المعاملة بالنحاس وبالتركيز ١ ملغم/كغم علف ادى إلى زيادة معنوية في مستوى المالونديالديهايد في الاسبوع الثاني فقط .

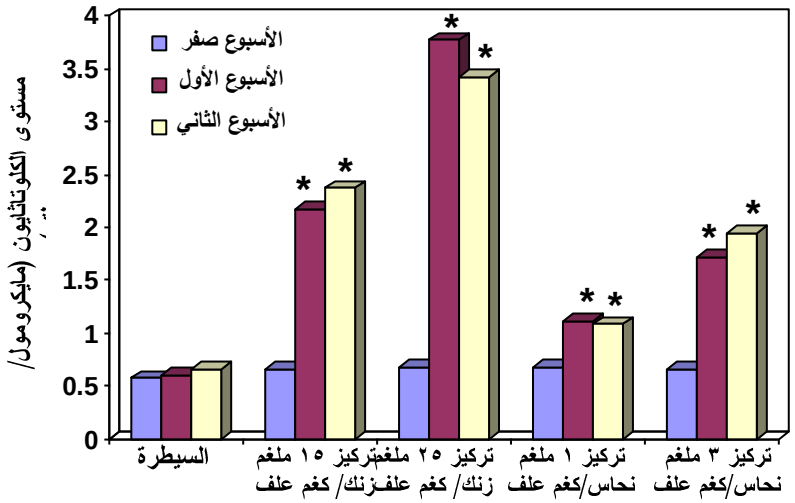


* تعني فرقاً معنوياً عند مقارنتها مع الوقت صفر لنفس المجموعة عند مستوى احتمالية

الشكل (٣): تأثير المعاملة بالخارصين والنحاس على مستوى المالونديالديهايد في مصل الجرذان.

٤. تأثير المعاملة بالخارصين والنحاس على مستوى الكلوتاثايون في مصل الدم :

نلاحظ من الشكل (٤) إن المعاملة بالخارصين وبالتركيزين ١٥ و٢٥ ملغم/كغم علف وبالنحاس وبالتركيزين ١ و٣ ملغم/كغم علف أدت الى زيادة معنوية في مستوى كلوتاثايون مصل الدم في الأسبوعين الأول والثاني مقارنة مع مجاميع السيطرة لكل معاملة.



* تعني فرقاً معنوياً عند مقارنتها مع الوقت صفر عند مستوى احتمالية $p \leq 0.05$

الشكل (٤) تأثير المعاملة بالخارصين والنحاس على مستوى الكلوتاثيون في مصل الجرذان .

ومن الجدول (١) يلاحظ إن حقن الالوكسان ادى الى ارتفاع معنوي ($p \leq 0.05$) في مستوى الكلوكوز في الاوقات ٢، ٤، ٦، ٢٤ ساعة بعد الحقن في مجموعة الجرذان التي تم استحداث داء السكر فيها . اما مجموعة الجرذان السليمة والمعاملة ب الخارصين بالتركيزين ٢٥،١٥ ملغم/كغم علف فلم يظهر أي تغير معنوي في مستوى كلوكوز الدم في الاوقات ٢،٤،٦ ساعة مقارنة مع تلك المصابة بداء السكر ضمن المجموعتين أنفسهما حيث لوحظ ارتفاع معنوي في مستوى كلوكوز الدم في الوقت (٢٤) ساعة فقط.

وفيما يخص مجموعة الجرذان المعاملة بالنحاس فقد لوحظ عدم حدوث تغير معنوي في مستوى كلوكوز الدم في مجموعة الجرذان السليمه وبكلا التركيزين ٣،١ ملغم/كغم علف، وكذلك لم تظهر زيادة معنوية في مستوى الكلوكوز في الجرذان التي تم استحداث داء السكر فيها ضمن المجموعتين المعاملتين بالنحاس وبالتركيزين ٣,١ ملغم/كغم علف وفي جميع الاوقات.

الجدول (١): تأثير المعاملة بالخارصين والنحاس على مستوى كلوكوز الدم بالأوقات المختلفة في الجرذان السليمة والمصابة بداء السكر المستحدث بالالوكسان

المعاملات		التركيز (ملغم/١٠٠ مل)				
		صفر	الوقت بعد المعاملة (ساعة)			
			٢	٤	٦	٢٤
مجموعة سليمة (سيطرة)		٣.٤٨ ± ٨٨.٥٥	٦.٤٤ ± ٨٣.٤٢	٥.٢٣ ± ٨٦.٧٦	٣.٨٨ ± ٨١.٢٢	٦.٤٨ ± ٨٠.٠٨
مجموعة مصابة بداء السكر المستحدث بالالوكسان		٤.٤٥ ± ٨٤.٨٣	٤٢٥.٦٧ ± ٣٣.٨١*	٤٦٤.٥ ± ٢٤.١*	٤٨٨.٢ ± ١٤.١٢*	٣٤٧.٦٧ ± ٥٨.١٥*
١٥ ملغم زنك/ كغم علف	سليمة (سيطرة)	٤.١٧ ± ٧٨.٤	٧٥.٠ ± ٥٨.١٣	٨٢.٠ ± ٣.٠٦	٧٦.٦٧ ± ٦.١٧	٧٩.٦٧ ± ١.٤٥
	استحدث فيها داء السكر	٤.١٧ ± ٧٨.٤	٨٩.٥ ± ١٠.٠٧	٩١.٠ ± ١١.٥٢	٨٨.٧٥ ± ١٣.٢٩	١٨٦.٥ ± ٢٥.٤٦*
٢٥ ملغم زنك/ كغم علف	سليمة (سيطرة)	٣.٨٤ ± ٧٤.٢	٨٠.٧٥ ± ٣.٠١	٧٣.٧٥ ± ٤.٧	٧٥.٢٥ ± ٣.٥	٧٩.٧٥ ± ٣.٩٧
	استحدث فيها داء السكر	٣.٨٤ ± ٧٤.٢	٨٩.٢ ± ٧.٤١	٩٣.٦ ± ١٧.٧٣	٩٥.٨ ± ٩.٨٧	١٥٠.٦ ± ٢٨.٥٣*
١ ملغم نحاس/ كغم علف	سليمة (سيطرة)	٨.١٨ ± ٨٤.٨	٨٢.٧٥ ± ١.٧	٨٨.٧٥ ± ١١.٥٢	٨٣.٧٥ ± ٥.٧٦	٨٧.٧٥ ± ٤.٦٦
	استحدث فيها داء السكر	٨.١٨ ± ٨٤.٨	٩٠.٢ ± ١٤.٣٣	٩٤.٤ ± ٣١.٦٦	١٠٠.٦ ± ١٤.٤٧	١١٦.٢ ± ٧.٦٧
٣ ملغم نحاس/ كغم علف	سليمة (سيطرة)	٥.١٤ ± ٦٩.٨	٧٥.٧٥ ± ٦.٣٣	٧٧.٠ ± ٥.٣٢	٧٣.٠ ± ٦.٦	٧٧.٧٥ ± ٣.٣
	استحدث فيها داء السكر	٥.١٤ ± ٦٩.٨	٧٢.٠ ± ١١.٠٣	٦٨.٥± ٤.٢١	٦٦.٢± ٦٥.٦٣	٧١.٠ ± ٨.٠٥

* تعني فرقاً معنوياً عند مقارنتها مع الوقت صفر في نفس المجموعة عند مستوى احتمالية $p \leq 0.05$

القيم معبر عنها بالمعدل ± الخطأ القياسي

المناقشة

١. تأثير المعاملة بالخارصين والنحاس على مستوى كلوكوز الدم:

أن الانخفاض في مستوى كلوكوز الدم في الجرذ ان المعاملة بالخارصين والنحاس قد يعزى إلى دور الخارصين في أنتاج الأنسولين (12,13,14)، حيث من المعروف إن الأنسولين يساعد على إدخال الكلوكوز الى داخل الخلايا من خلال زيادة عدد نواقل الكلوكوز ومعدل تحريكها خلال الغشاء البلازمي (15).كما ان أعطاء الخارصين يؤدي إلى تحسين استجابة الأنسجة للأنسولين (16).أما الانخفاض في مستوى الكلوكوز في الجرذان المعاملة بال نحاس فقد يعود السبب إلى أن للنحاس تأثيرات مفيدة على الدهون والكلوكوز في الدم حيث أشار الباحث (17) إلى أن أعطاء النحاس للأشخاص البالغين أدى إلى خفض معنوي في مستوى كلوكوز الدم.

وعند أعطاء الخارصين بالتركيزين ١٥ و٢٥ ملغم/كغم علف في المجموعتين اللتين استحدث فيهما داء السكر بواسطة الالوكسان أدى إلى تأخير ارتفاع كلوكوز الدم إلى الوقت ٢٤ ساعة وقد يعزى ذلك الى ان للزنك دور اً في تأخير أو منع حدوث داء السكر (14 ,21).

أما عند أعطاء النحاس بالتركزين ١ و٣ ملغم/كغم علف في المجوعتين اللتين استحدث فيهما داء السكر كان للنحاس دور في تأخير او منع حدوث داء السكر في جميع الأوقات وقد يعزى ذلك للدور المفيد للنحاس على مستوى كلوكوز الدم (17).

٢. تأثير المعاملة بالخارصين والنحاس على مستوى كوليستيرول الدم :

أظهرت النتائج إن المعاملة بالخارصين وبالتركيزين ١٥ و٢٥ ملغم/كغم علف وكذلك المعاملة بالنحاس وبالتركيزين ١ و٣ ملغم /كغم علف أدت إلى خفض معنوي في مستوى كوليستيرول الدم في الأسبوع الثاني فقط مقارنة مع مجاميع السيطرة . وقد يعزى ذلك الى الدور الذي يلعبه الخارصين في أنتاج وإفراز الأنسولين من خلايا بيتا (12,13) ومن المعروف عن الأنسولين إنه يعمل على خفض مستوى كوليستيرول الدم (22,23,24) وكذلك الدور الذي يسهم به النحاس في خفض مستوى كوليستيرول الدم كما أشار إلى ذلك الباحث (17) حيث أوضح أن النحاس يعمل على خفض مستوى كوليستيرول الدم للأشخاص البالغين، وهذا يتفق مع النتائج التي تم الحصول عليها في هذا البحث.

٣. تأثير الخارصين والنحاس على مستوى المالونديالديهايد في مصل الدم :

أظهرت النتائج زيادة معنوية في مستوى المالونديالديهايد في مصل الدم في المجاميع التي عوملت بالخارصين و النحاس وبالتركيزين المذكورين آنفاً لكل منهما، وقد يعزى سبب ذلك إلى ان للزنك والنحاس قابلية كبيرة على تحفيز مضادات الاكسدة في الحيوانات(25,26).

٤. تأثير الخارصين والنحاس على مستوى الكلوتاثايون في مصل الدم :

تبين من النتائج إن مستوى ا لكلوتاثايون في مصل الدم ازداد وبشكل معنوي في كلا الأسبوعين في المجاميع التي عوملت ب الخارصين والنحاس وبالتركيزين المستعملين في هذا البحث وقد يعود السب الى ان للزنك والنحاس قابلية على زيادة فعالية الكلوتاثايون في مصل الدم (26,27) كما ان للزنك والنحاس دوراً مهماً في نشاط وفعالية عمل انزيمات الكلوتاثايون (27).

أدى حقن الالوكسان الى زيادة معنوية في مستوى كلوكوز الدم في جميع الاوقات وهذا يتطابق مع (18,19) ويعود السبب الى إن الالوكسان يقوم بمهاجمة وتحطيم خلايا بيتا البنكرياسية مؤدياً بذلك إلى إعاقة إنتاج الانسولين (20).

المصادر

1) Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A., Rodwell V. W.: Harper's illustrated Biochemistry 26th ed., McGraw Hill Co., pp. 588–589 (2003).

2) Tietz N. W.: Fundamental of Clinical Chemistry, 5th ed., pp. 929–933. (1999).

3) Berg J. M., Tymoczko J. L., Stryer L.: Biochemistry, 5th ed., Freeman, pp. 503–506. (2002).

4) Ho E., Quan N., Tsai Y. H., Lai W., Bray T. M.: Exp. Biol. Med. 226 (2): 103–111 (abstract). (2001).

5) World Health Organization. Manual on diabetes mellitus in primary health care .WHO.(1995).

6) Arsalan S. H. and AL-Saad, K. M. J. Vet .Sc. 10:49-52. (1997).

7) Slatter D. A., Botton C. H. and Baily A. J. Diabetiologia, 43(5): 550–557. (2000).

8) Duckic N. M. Atherosclerosis, 15(2): 423–611. (2003).

9) Atta, A. H., Shalaby, M. A. A., Shokry, I. M. and Ahmed, A. A. Vet. Med. J. B., 31(1): 11–18. (1983).

10) Wysocka R. W., Wysocki H., Zozulinsky D., Wykentowiccz A. and Kazmierczak M. Diab. Res. Clin. Prac. 27: 193–197. (1995).

11) Steel, R. G. D. and Torrie, J. H. Principles and procedures of Statistics 2nd ed. New Yourk: Mc Graw-Hill book Co., inc. (1980).

12) Hadrzynski C. Diabetes and trace elements. J. Trace Elem. Exp. Med. 12: 367–374. (1999).

13) Wong, C. about.com (internet Alternative Medicine Site). (2007).

14) Chausmer, A. B. Journal of American College of Nutrition. 17(2): 109–115. (1998).

15) Ashcroft, F. M. and Aschcroft, S. J. H. Insulin: molecular biology. IRL. Press.(1992).

16) Kadim H. M., Ismail S. H., Hussein K. I., Bakir I. H., Sahib A. S., Kalaf B. H., Hussain S. A. Journal of Pineal Research. 41(2):189–193. (2006).

17) Herman J., Chung H., Arquitt A., Goad C., Burns M., Chan B. Journal of Nutrition for the Elderly. 18(1): 27–45. (1999).

18) Pounchan, P. T., Paulose, C. S. and Panikkar. R. J. Exp. Diol. 31:345-347. (1993).

19) fortes, Z. B., Seivol Letto, Rand eme, j. G. Gen. Pharmacol. 20:(6):615-620.(1989).

20) Cohen, G. Oxy- radical production in alloxan induced diabetes: (1st ed) Raven Press, New York, (1984).

21) Topia M. H., Zdanowicz, M. M., Wingertzahn, M. A, McHeffy-Atkinson, B., Slonim A. E., Wapnin, R. A. Molecular Genetics and Metabolisim:63:(3):205-213.(1998) .

22) محمد، إسماعيل حسن. رسالة ماجستير. كلية الطب البيطري، جامعة الموصل. (١٩٩٨).

23) Godin, D. V. Wohaieb, S. A.,Granett, M. E.and Goumemioub, A. D. J. Mol. Cell. Biochem. 84:223-231.(1988).

24) Partida–Hermandez G., Arreola F., Fenton B., Cabeza M., Roman–Ramos R., Revilla–Monsalve M.C. Biomedicine and Pharmacotherapy. 60(4): 161–168. (2006).

25) Jing, M. Y., Sun J. Y., Zi N. T., Sun W., Qian L. C., and Weng X. Y. Ann. Nutr. Metab. 51(4): 345-351..(2007).

26) Rukgauer M., Neugebauer R. J., and Plecko T. Journal of trace element in medicine and biology. 15(2-3):73-78. (2001).

27) DiSlivestro, R. A. The FASEB Journal. 21(5): 227. (2007).