

Effect of Chlorella on Metallothionein Synthesis and Binding Capacity of Cadmium in Cadmium Poisoned Rat Liver and Kidney

Yoo-Kyeong Hwang¹, Hyun-Jin Choi¹, Meng Nan¹, Jai-Du Yoo² and Yong-Ho Kim^{1,3*}

¹Department of Biohealth Products Research Center, Inje University, Gimhae 621-749, Korea.

²Department of Clinical Pathology, Masan College, Masan 100, Korea.

³Department of Biohealth Products Research Center, Inje University, Gimhae 621-749, Korea

The rate of metallothionein synthesis on cadmium-poisoned rats reflects the level of toxicity, and also it reduces the toxicity which is caused by the uptake of cadmium. Chlorella supplementation in the diets of the cadmium-poisoned rats decreased the concentration of cadmium in blood and urine compared with the control group. Although the liver and kidneys of rats are major target organs of cadmium and coherence of metallothionein and cadmium, no previous study has determined the correlation between the rate of metallothionein synthesis in the liver and kidneys of rats and dietary supplementation of chlorella with cadmium uptake. This study analyzed total metallothionein level on the tissue of the liver and kidneys, the concentration of cadmium bound to the metallothionein, and the total concentration of cadmium on the tissue of the liver and kidneys after dietary supplementation with 1%, 5%, and 10% dried chlorella and 40 ppm of cadmium to 46 male SD rats (mean weight: 150±20 g) for 4 weeks. According to the data analysis of the total rate of metallothionein synthesis in the liver and kidneys, the group of SD rats on the supplementation with 1% chlorella and 40 ppm of cadmium showed a rate of 93.2±8.9 ng/g, a significant decrease of 58.8% compared to that of the control group of SD rats on the supplementation with cadmium only, which showed a rate of 227.3±32.5 ng/g ($P=0.0001$). In contrast, no significant difference was observed through the changing of chlorella concentrations between 5% and 10% chlorella supplementation with cadmium. The group supplemented with 1% or greater chlorella levels represented a greater decrease in the total cadmium concentration of the kidney and liver tissues, the amount of total metallothionein synthesis, the amount of metallothionein with binding to cadmium, and the concentration of free cadmium without binding to metallothionein. Consequently, the supplementation of 1% and 5% chlorella was effective in reducing the synthesis of metallothionein for cadmium uptake, but increased the rate of binding of cadmium to metallothionein.

Key Words: Chlorella, Metallothionein, Binding capacity, Cadmium

서 론

카드뮴은 세포 기능에 다양한 영향을 미치는 전신성 독성 물질로서 일단 생체 내에 유입되면 생체의 산화, 환원, 알킬화 등과 같은 일반적인 직접 대사 과정을 거치지 않고 albumin, metallothionein (MT)과 같은 단백질이나 다른 분자의 음이온기 특히 -SH기와 결합하여 천천히 배설되나 독성이 매우 강하여 급성 중독시에는 간장, 고환 그리고 만성 중

독시에는 신장이 중요한 표적 장기가 된다 (Casalino et al., 2002).

그러나 생체는 이러한 카드뮴 독성을 경감시킬 수 있는 몇 가지 생체 방어 기전이 있으며 그 중 가장 중요한 것이 카드뮴을 포함하는 중금속 등의 생체 내 유입에 의하여 생성되는 MT이며, MT는 카드뮴과 강한 친화력을 가진 cysteine이 풍부한 단백질이다 (Hagino and Kimura, 1975). 생체 내의 MT 생성량은 카드뮴과 같은 중금속에 의한 생체 중독 정도를 반영하며, MT와 결합된 카드뮴의 결합률은 생체 내로 유입된 카드뮴의 생체 내 동태와 독성 평가에 중요한 지표가 된다 (Goering and Klaassen, 1984).

녹조류에 속하는 클로렐라는 단백질이 풍부한 고영양성 기능성 식품 (Kay, 1991)으로 살아 있거나 죽은 조류 세포는 중금속을 축적시킬 수 있고, 카드뮴에 중독된 흰쥐에게 클로

* 논문 접수: 2006년 2월 20일

수정재접수: 2006년 3월 15일

† 교신저자: 김용호, (우) 621-749 경남 김해시 어방동 607번지, 인제대학교 임상병리학과

Tel: 055-320-3481, Fax: 055-334-3426

e-mail: mlskimyh@inje.ac.kr

Table 1. Experimental design for supplementation of *Chlorella* and Cadmium to basic diet

Group	Number	CdCl ₂ ppm in drinking water	<i>Chlorella</i> % in basic diet
Control	6	-	-
Cadmium	10	40	-
1% Ch + Cd ¹⁾	10	40	1
5% Ch + Cd	10	40	5
10% Ch + Cd	10	40	10

¹⁾ *Chlorella* + Cadmium

All groups were fed on 4 weeks with basic diet

렐라를 투여한 결과 혈액, 뇨 중 카드뮴 농도가 클로렐라를 전혀 투여하지 않은 대조군에 비하여 현저하게 낮았으며 (Kim et al., 2003), Itai Itai 병에서도 현저한 치료 효과가 있었다는 임상 보고가 있었다 (Hagino and Kimura, 1975). 그러나 카드뮴에 중독된 흰쥐에게 클로렐라 식이를 투여할 경우 간장, 신장 조직 중의 MT 형성력에 미치는 영향에 대한 연구 보고는 없다. 본 연구는 음용수 중에 카드뮴을 혼합시키고 클로렐라를 일정기간 동안 식이와 함께 투여한 후 카드뮴 중독에 의하여 손상을 받기 쉬운 간장, 신장 조직 중의 MT 형성률, MT와 카드뮴 결합력을 분석하여 클로렐라 식이가 카드뮴에 의한 간장, 신장 조직 손상에 대한 방어적 효과를 평가하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험 설계

실험적으로 카드뮴을 식이와 함께 클로렐라를 동시에 일정기간 동안 투여시킨 흰쥐의 간장 및 신장 조직 중의 MT 형성률에 대한 실험을 하고자 체중 150±20 g의 Sprague-Dawley 중 수컷 46마리를 5군으로 나누어 Table 1과 같이 실험하였다. 실험조건은 온도 24±3℃, 습도 55~60%를 유지하고 모든 사료와 물은 자유급식시켰다. 무기물질 오염방지를 위하여 사육 cage, 사료통, 물통을 0.4% ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) 용액에 24시간 동안 담근 후 증류수로 세척한 다음 건조시켜 사용하였다.

2. 실험 식이

기본 실험식은 단백질 21.1% 이상, 지방질 3.5% 이상, 섬유질 5.0% 이하, 회분 8.0% 이하, 칼슘 0.6% 이상, 인 0.4% 이상의 조성비율로 제조된 표준 고품사료 (삼양사)와 클로렐라 동시 투여군은 표준 고품사료의 1%, 5% 및 10%가 되도록 클로렐라 분말을 파쇄시킨 고품사료에 각각 혼합 후 다시 성형하여 식이시켰다.

3. 시료의 채취 및 분석

1) 혈액의 채취

실험동물은 4주 동안 실험사육 시킨 후 단두로 희생시켜 즉시 경정맥 (jugular vein)으로부터 heparine 처리 주사기로 혈액을 10.0 ml씩 취하고 잘 혼합하여 분석 전까지 냉장 보관하였다.

2) 장기의 채취

실험동물을 단두로 희생시키고 혈액을 채취한 다음 즉시 개복하여 간장, 신장을 절취하여 petridish에 넣어 분석 전까지 -70℃에 동결보존 시켰다.

3) MT 및 MT 결합형 카드뮴의 분석

(1) Sprague-Dawley rat 적혈구 용혈액의 제조

Heparine 처리 혈액 10.0 ml에 1.15% KCl 20 ml를 첨가하고 잘 혼합 후 3,000 ×g에서 15분간 10℃에서 원심분리시켜 상층액을 제거시키고 동일한 조작을 2회 반복하였다.

침전물인 세척 적혈구에 0.03 M Tris-HCl 완충액 (pH 8.0) 20 ml를 첨가하여 재부유시킨 다음 실온에서 10분 동안 방치 후, 9,000 ×g에서 10분간 원심분리 하여 상층액을 취하여 냉동보존 후 사용하였다.

(2) MT의 분리 · 분석

MT 분석은 Cd-saturation / Cd-hemoglobin method로 실시하였다. -70℃ 동결보존 하였던 간장, 신장 조직을 각각 1 g씩 절취한 다음 0.25 M sucrose 4 ml을 tissue grinder에 함께 넣어 파쇄 시킨 다음 18,000 ×g에서 20분간 4℃에서 원심분리하여 상층 0.4 ml을 취하고 0.03 M Tris-HCl 완충액 (pH 8.0) 으로 2.4 ml이 되도록 희석한 다음 10 ppm의 CdCl₂ 1.0 ml을 넣고 실온에 3분 동안 방치하였다. 이어서 흰쥐 적혈구 용혈액 0.2 ml를 첨가하여 혼합하고 100℃에서 1분 동안 방치한 다음 1,000 ×g에서 5분간 원심분리하고 이 과정을 3회 반복하여 최종 상층액을 취하여 2회 반복하여 카드뮴 함량을 분석하고 그 평균값을 취하여 MT 한 분자는 7 g 원자의 Cd²⁺와 결합하는 것을 기초로 Total metallothionein (T-MT)의 농도를 산출하였다.

(3) MT 결합형 카드뮴의 분석

-70℃에 동결보존 하였던 간장 및 신장 조직에 대하여 4배의 0.25 M sucrose를 가한 다음 균질화시켜 18,000 ×g에서 20분 동안 4℃에서 원심분리 시켜 얻은 상층액 0.4 ml을 취하여 0.03 M Tris-HCl 완충액 (pH 8.0) 3 ml씩 첨가하고 잘 혼합하여 실온에 5분 동안 방치하였다. 이어서 rat 적혈구 용혈액을 0.2 ml을 첨가한 다음 100℃에서 1분 동안 가온한 다음 1,000 ×g에서 5분 동안 원심분리 한다. 위와 동일한 과정을 4회 반복하여 실시한 다음 최종 상층액을 시료로 하여 2회 반복 측정하여 그 평균값을 MT-카드뮴의 농도를 분석값으로 하였다.

Table 2. Cadmium levels in MT in liver

Group	unit: ng/g	
	Mean ± S.D.	Mean rank
Control	6.8±5.9	3.5
Cadmium	929.7±80.4	34.3
1% Ch + Cd ¹⁾	667.7±105.3	17.9
5% Ch + Cd	668.5±128.6	18.4
10% Ch + Cd	663.1±161.2	19.5

one-way ANOVA: $F_{(4,33)} = 60.290, P=0.0001$

Kruskal-Wallis Test: $\chi^2 = 26.789, df=4, P=0.0001$

¹⁾Chlorella + Cadmium: a given dose of chlorella + 40 ppm Cd

(4) 조직 중의 카드뮴 분석

간장, 신장 조직을 도가니에 넣고 무게를 측정된 다음 90℃에서 5시간 정도 건조시킨 후 탄화시키고, 회화로 (Thermolyne F26735, USA)에서 450℃, 12시간 동안 회화시킨 후 온도가 충분히 낮아진 다음 50% 질산 마그네슘 용액 1~2 ml 처리 후, 다시 450℃, 8시간 동안 재 회화시킨 후 2~4 ml의 농황산을 가하여 회분을 용해시켜 건조시킨 다음 0.5 N 질산 10 ml로 현탁시키고 여과한 다음 Zeeman A.A.S 5100ZL을 이용한 flameless 방법으로 228.8 nm에서 2회 반복하여 분석하고 그 평균값을 취하였다.

4) 자료처리

본 실험에서 얻어지는 모든 자료는 mean ± S.D를 구하였고 one-way ANOVA 분석과 SAS program을 이용하여 각 군간의 평균값 분석, 유의성 검정을 하였다.

결 과

1. 체중, 식이섭취량, 물 및 카드뮴 섭취량

실험 전 150±20 g SD rats의 체중이 실험기간 중 가장 심하게 변화된 실험군은 카드뮴 투여군으로 202.0±29.3 g이었으며 가장 작은 체중 변화를 보인 것은 대조군으로 162.5±34.8 g이었다. 평균 식이 섭취량은 21.5~26.0 g 사이의 섭취량을 보여 비슷한 결과를 나타내었으며 1% 클로렐라 투여군에서 가장 높은 섭취량인 26.0 g을 보였다. 음용수 섭취량은 카드뮴 양성 대조군 32.2 ml/day이었으며, 평균 카드뮴 섭취량은 24.3~25.0 ppm/day로 실험군 사이의 섭취량의 차이는 매우 근소하였다.

2. MT 결합형 카드뮴의 분석

간장 조직 중의 MT 결합형 카드뮴 함량을 분석한 결과 카드뮴 단독 처리군이 1% 클로렐라와 카드뮴 동시 처리군에 비하여 28.1%가 높았고 클로렐라 농도가 1%, 5% 및 10% 간 유의할만한 차이는 보이지 않았다 (Table 2). 신장 조직 중의 MT 결합형 카드뮴 함량은 간장 조직 중의 함량에 비하여

Table 3. Cadmium levels in MT in kidney

Group	unit: ng/g	
	Mean ± S.D.	Mean rank
Control	17.7±11.1	3.5
Cadmium	1000.3±80.0	34.5
1% Ch + Cd ¹⁾	628.3±99.0	19.0
5% Ch + Cd	564.9±107.4	15.9
10% Ch + Cd	640.4±94.4	20.6

one-way ANOVA: $F_{(4,33)} = 107.412, P=0.0001$

Kruskal-Wallis Test: $\chi^2 = 27.962, df=4, P=0.0001$

¹⁾Chlorella + Cadmium: a given dose of chlorella + 40 ppm Cd

7.5%가 높았으며, 1% 클로렐라와 카드뮴 동시 처리군에 비하여는 37.1%가 높아 간장 조직에 비하여 신장 조직 중의 MT 결합형 카드뮴 농도가 높았다. 1%, 5% 및 10% 간 클로렐라 농도에 대하여는 간장 조직에서의 유사한 경향으로 농도 의존적 변화를 보이지는 않았으나 다소간 차이를 보이고 있다 (Table 3).

3. 총 MT 및 카드뮴 결합형 MT 분석

간장 조직의 최종 상층액으로부터 분석된 T-MT는 카드뮴 단독 투여 대조군은 간장조직에서는 227.3±32.5 ng/g이었으며 신장 조직에서는 260.2±23.7 ng/g으로 신장 조직에서 12.6%가 높았다.

1% 클로렐라와 카드뮴 동시 투여군은 간장 조직에서는 카드뮴 단독 투여군보다 58.8% 낮은 93.5±8.9 ng/g이었고, 신장 조직에서는 카드뮴 단독 투여군보다 48.6%가 낮았다. 5% 클로렐라 카드뮴 동시 투여군에서는 1% 클로렐라 동시 투여군과 유사하였으나 10% 클로렐라 투여군에서는 1% 클로렐라 군에 비하여 간장, 신장 조직 중에서 각각 14.3%, 16.8%가 낮은 현저한 변화를 보였다 (Tables 4, 5). MT 결합형 카드뮴으로부터 산출한 카드뮴 결합형 MT (Cd-MT)는 카드뮴 단독 투여군에서는 간장보다 신장 조직에서 7.0% 높은 결과를 보였고 간장 조직 중의 클로렐라 카드뮴 동시 투여군은 클로렐라 농도별 변화에는 크게 차이가 없었으나 카드뮴 단독 투여군과 1% 클로렐라 카드뮴 동시 투여군과의 차이는 30.5%가 클로렐라 동시 투여군이 낮았다.

신장 조직에서는 간장 조직보다 낮은 카드뮴 단독 투여군에 비하여 1% 클로렐라 카드뮴 동시 투여군에서는 37.1%가 낮았다 (Tables 4, 5).

4. Cd-MT / T-MT 비율 분석

간장과 신장 조직 중의 총 MT에 대한 카드뮴 결합 MT의 비율을 계산해보면 대조 및 실험군에서 간장 조직이 높다. 카드뮴 단독 투여군 58.4%, 54.9%에 비하여 1% 클로렐라 투여군의 간장 및 신장 조직은 98.6%, 67.2%로 간장 조

Table 4. Levels of T-MT and Cd-MT in liver

Group	unit: ng/g	
	T-MT Mean ± S.D.	Cd-MT* Mean ± S.D.
Control	1.5±1.0	1.0±0.8
Cadmium	227.3±32.5	132.8±11.5
1% Ch + Cd ¹⁾	93.5±8.9	92.2±22.4
5% Ch + Cd	99.0±26.5	95.5±18.4
10% Ch + Cd	126.0±43.4	94.8±23.0

T-MT : one-way ANOVA: $F_{(4,33)} = 54.541$, $P=0.0001$
Kruskal-Wallis Test: $\chi^2 = 29.225$, $df = 4$, $P=0.0001$

Cd-MT: one-way ANOVA: $F_{(4,38)} = 48.994$, $P=0.0001$
Kruskal-Wallis Test: $\chi^2 = 29.799$, $df = 4$, $P=0.0001$

*: The amount Cd-bound MT was calculated as $(MT-Cd) \div 7$
¹⁾Chlorella + Cadmium: a given dose of chlorella + 40 ppm Cd

Table 5. Levels of T-MT and Cd-MT in kidney

Group	unit: ng/g	
	T-MT Mean ± S.D.	Cd-MT* Mean ± S.D.
Control	0.3±0.8	2.5±1.6
Cadmium	260.2±23.7	42.9±11.4
1% Ch + Cd ¹⁾	133.6±22.4	89.8±14.1
5% Ch + Cd	117.9±23.8	80.7±15.3
10% Ch + Cd	177.4±44.8	91.5±13.5

T-MT : one-way ANOVA: $F_{(4,33)} = 77.973$, $P=0.0001$
Kruskal-Wallis Test: $\chi^2 = 30.516$, $df = 4$, $P=0.0001$

Cd-MT: one-way ANOVA: $F_{(4,38)} = 107.751$, $P=0.0001$
Kruskal-Wallis Test: $\chi^2 = 29.799$, $df = 4$, $P=0.0001$

*: The amount Cd-bound MT was calculated as $(MT-Cd) \div 7$
¹⁾Chlorella + Cadmium: a given dose of chlorella + 40 ppm Cd

직의 카드뮴은 Cd-MT 형으로 많이 존재하고, 신장 조직에는 유리 카드뮴 형으로 많이 존재함을 나타낸다. 그러나 10% 클로렐라 카드뮴 동시 투여군은 1%, 5% 클로렐라 카드뮴 동시 투여군에 비하여 현저하게 낮은 비율을 보여 혼합 비율의 부적절성을 보여주었다 (Fig. 1).

고 찰

생체 내 카드뮴 축적에 영향을 미치는 중요한 인자로는 아연, 셀레늄, 시스테인과 같은 식이인자와 MT, EDTA, diethylenetriamine pentaacetic acid 등과 같은 킬레이드 인자이다 (Cantilena, 1980). MT는 주로 신장, 간장에서 중금속의 유입에 의하여 합성되는 cystein이 30% 이상 차지하는 정상 동물 조직의 세포질 내 단백질로써 카드뮴, 유해 중금속과 높은 결합 친화력을 가지고 있으며 이외에도 중금속의 흡수, 저장, 해독 및 수송에 관여한다 (Bernard et al., 1986).

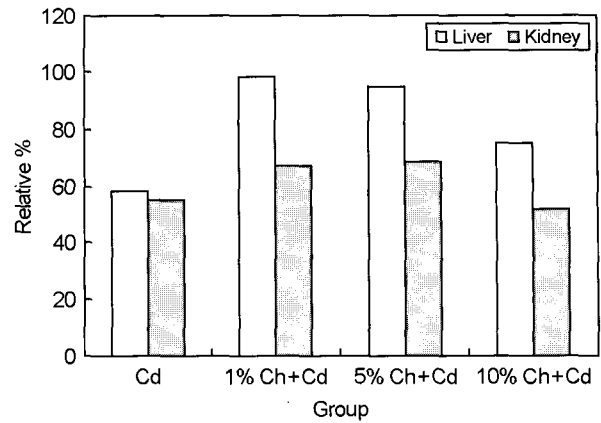


Fig. 1. Comparison of the Cd-MT/T-MT values in kidney and liver. Cd: Cadmium, Ch + Cd: Chlorella + Cadmium.

카드뮴은 체내에서 비교적 안정되어 타금속에 비하여 15~30년의 긴 반감기를 가지고 있기 때문에 유리 상태로 간장 신장 등에 존재할 때는 세포 손상을 초래할 수 있다 (Tsuchiya, 1976). 그러나 카드뮴의 생체 내 유입은 MT 생성을 유도하게 되고 MT 생성량은 생체에 유입된 카드뮴의 용량 투여기간 등에 따라 증가하게 된다 (Park et al., 1994).

클로렐라 투여군의 총 카드뮴 량에 비하여 카드뮴 단독 투여군의 총 카드뮴 함량이 간장과 신장에서 각각 28.1%, 37.1%가 높았으며 총 MT 생성량은 이보다 높은 간장에서 58.8% 신장에서 48.6%가 높아 생체 내 카드뮴 총량의 증가에 따라 총 MT 생성량이 증가된다고 한 Park 등 (1994)의 결과와 일치하였다.

카드뮴 단독 투여 대조군에서는 간장 조직에 비하여 신장 조직에서 총 카드뮴 함량이 7.5%가 높았고 총 MT 생성량도 12.6%가 신장 조직에서 높아 Gunn과 Gould (1957)의 연구 결과와 유사한 경향을 보였으나 클로렐라와 카드뮴을 동시에 투여한 실험군에서는 카드뮴을 단독 투여한 대조군에 비하여 만성적 노출임에도 불구하고 총 카드뮴 함량은 간장에서 5.9% 신장 조직에 비하여 높았고, 총 MT 생성량은 간장에 비하여 30.0%가 신장 조직 함량이 높아서 카드뮴 축적량, MT 생성량이 Gunn과 Gould 등 (1957)의 연구 결과와 서로 다른 결과를 보였다.

그러나 클로렐라 농도별 차이에 의한 영향은 농도 의존적으로 변화되지 않았고, 1%, 5%에서는 매우 근소한 차이를 보였고 10% 클로렐라 투여에서는 신장 조직 중의 총 카드뮴 함량, 간장 및 신장 조직 중의 총 MT 함량은 1%, 5% 클로렐라 투여군에 비하여 증가하였다.

총 카드뮴 함량에 대한 카드뮴 결합 MT량의 비율은 모두 14.2%의 수평적인 일정한 값을 보여 수평적인 관계에 있는 경우 중금속의 체내 축적량과 MT 형성량이 서로 비례한다고 한 Goering와 Klaassen (1984)의 연구 결과와 일치된 경

향을 보였다.

카드뮴 결합 MT량에서 카드뮴 단독 투여군은 간장 조직에서보다 신장 조직에서 7.0% 증가된 경향을 보여 총 카드뮴 량, 총 MT량과 유사하였고, 1%, 5% 클로렐라와 카드뮴 동시 투여군에서는 간장 조직에서 2.6%, 15.4%의 신장 조직에서의 결합력에 비하여 높은 값을 보여 클로렐라 투여가 간장 조직에서 카드뮴의 활발한 대사를 유도하는 것으로 생각된다. Goyer 등 (1989)은 신장이나 간장 조직의 손상은 총 카드뮴 함량보다는 유리 카드뮴 함량에 좌우된다고 하였다. 본 연구 결과에서는 총 MT 생성량에 대한 카드뮴 결합 MT 비율을 구한 결과 카드뮴 단독 투여군에서는 간장, 신장에서 각각 58.4%, 54.9%를 나타내어 MT와 결합하지 못한 유리 카드뮴 함량이 각각 41.6%, 45.1%로 매우 높았으나 1%, 5% 클로렐라 투여군에서는 간장 조직에서 유리 카드뮴 함량이 각각 1.4%, 3.5%를 나타내었고 신장 조직에서의 유리 카드뮴 함량은 각각 32.8%, 31.8%를 나타내어 간장 조직에 비하여 신장 조직 중의 유리 카드뮴 함량이 매우 높게 나타나 반감기가 길고 매우 안전한 카드뮴의 장기 노출에 따른 신장의 유리 카드뮴 축적량이 증가된 것으로 밝혀져 총 카드뮴 함량 및 카드뮴 결합 MT에서 보인 결과와는 상반된 결과를 나타내고 있었다. 그러나 총 MT 생성 경향은 신장에서의 유리 카드뮴 함량의 증가와 일치되는 경향을 보이고 있다. 클로렐라와 카드뮴 동시 투여군에서 카드뮴 단독 투여군에 비하여 낮은 혈액 내 카드뮴 농도와 뇨 중 배설량에서 보인 결과와 같이 간장과 신장 조직 중에서의 총 카드뮴 함량, 총 MT 생성량, 카드뮴 결합 MT량 및 MT와 결합되지 못한 유리 카드뮴 함량에 이르기까지 모두 현저하게 낮은 경향을 보여 클로렐라 투여가 카드뮴 유입에 의한 간장, 신장 조직의 손상을 현저하게 감소시킬 수 있는 것으로 밝혀졌고 1%, 5% 클로렐라 투여가 적절한 것으로 생각된다.

REFERENCES

- Bernard, A. Foulkes, Ernest C. Cadmium: Handbook of experimental pharmacology. 1986. pp 303-74. Springer. Berlin, Germany.
- Cantilena LR, JR. Klaassen CD. Comparison of the effectiveness of several Chelators after single administration on the toxicity, excretion, and distribution of cadmium. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1980. 53: 510-514.
- Casalino E, Calzaretti G, Sblano C, Landriscina C. Molecular inhibitory mechanisms of antioxidant enzymes in rat liver and kidney by cadmium. *Toxicology* 2002. 179: 37-50.
- Goering PT, Klaassen CD. Tolerance to cadmium-induced hepatotoxicity following cadmium pretreatment. *Toxicol Appl pharmacol.* 1984. 74: 308-313.
- Goyer RA, Miller CR, Zhu S, Viteru W. Non-metallothionein-bound cadmium in the pathogenesis of cadmium nephrotoxicity in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1989. 101: 232-244.
- Gunn SA, Gould TC. Selective accumulation of ¹¹⁵Cd by cortex of rat kidney. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1957. 96: 820-823.
- Hagino N, Kimura S. Effect of Chlorella on fecal and urinary cadmium excretion in "Itai-Itai" disease. *Nippon Eiseigaku Zasshi.* 1975. 30: 77.
- Kay RA. Microalgae as food and supplement. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1991. 30: 555-573.
- Kim YH, Hwang YK, Lee YW, Yun JY, Yoo JD. Effect of Chlorella diet supplementation cadmium levels in cadmium poisoned Rats. *J Biomed Lab Sci.* 2003. 9: 133-137.
- Park JD, Choi BS, Hong YP, Chang IW. Time-dependent pattern of cadmium (Total-, MT bound- and free-) distribution in liver and kidney. *Chung-Ang J of Med.* 1994. 19: 279-291.
- Tsuchiya K, Sugita M, Seki Y. Mathematical derivation of the biological half-time of cadmium in human organs based on the accumulation of the metal in the organs. *Keio J Med.* 1976. 25: 73-82.

Bernard, A. Foulkes, Ernest C. Cadmium: Handbook of experi-