المملكة العربية السعودية
جامعة الملك سعود
كلية العلوم- الرياض
قسم علم الحيوان

# " السمية الوراثية وموت الخلايا المبرمج المستحدثان بواسطة الكادميوم والدور الوقائي المحتمل لمضاد الأكسدة المصنع بيوتيلاتيد هيدروكسي تولوين "

# "Genotoxicity and Apoptosis Induced By Cadmium and The Possible Protective Role of The Synthetic Antioxidant Butylated Hydroxytoluene "

قدمت هذه الرسالة استكمالاً لمتطلبات درجة الماجستير في العلوم
تخصص (بيولوجيا الخلية والوراثة والأنسجة)
قسم علم الحيوان – كلية العلوم
جامعة الملك سعود – الرياض

**إعداد الطالب**

**إبراهيم بن عمر برناوي**

**إشـــراف**

الأستاذ الدكتور / **محمد أكمل بن عبدالرحيم الغر** - مشرف رئيسي

الأستاذ الدكتور / **فيصل بن محمد أبو طربوش** – مشرف مساعد

**الفصل الدراسي الثاني ١٤٢٤/ ١٤٢٥ هـ - ٢٠٠٣/ ٢٠٠٤ م**

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

# المحتـويـات

# Contents

**إهداء** ..... أ

**شكر وعرفان** ..... ب

**الملخص باللغة العربية** ..... د

**الفصل الأول : المقدمة والهدف من الدراسة** ..... ١

**الفصل الثاني : الدراسات السابقة** ..... ٥
**٢. ١. علم السمية الوراثية** ..... ٥
٢. ١. ١. اختبار النواة الدقيقة ..... ٦
٢. ١. ٢. اختبار السيادة المميتة ..... ٨
**٢. ٢. علم السمية الخلوية** ..... ١٠
٢. ٢. ١. موت الخلايا المبرمج ..... ١١
- اختبار سلم الدنا ..... ١٣
**٢. ٣. مضادات الأكسدة** ..... ١٤
٢. ٣. ١. بيوتيلاتيد هيدروكسي تولوين ..... ١٦
**٢. ٤. المعادن الثقيلة** ..... ١٨
٢. ٤. ١. الكادميوم ..... ٢١
٢. ٤. ٢. السمية الوراثية للكادميوم ..... ٢٩
٢. ٤. ٣. الكادميوم وموت الخلايا المبرمج ..... ٣٧

**الفصل الثالث : المواد والطرق** ..... ٣٩
**٣. ١. حيوانات التجارب** ..... ٣٩
**٣. ٢. المواد الكيميائية المستخدمة** ..... ٤٠
٣. ٢. ١. كلوريد الكادميوم ..... ٤٠
٣. ٢. ٢. بيوتيلاتيد هيدروكسي تولوين ..... ٤٤
**٣. ٣. طريقة المعاملة المستخدمة** ..... ٤٥
**٣. ٤. اختبار النواة الدقيقة** ..... ٤٥
٣. ٤. ١. الجرعات المستخدمة ..... ٤٥
٣. ٤. ٢. برنامج المعاملة ..... ٤٥
٣. ٤. ٣. إعداد الشرائح ..... ٤٩
٣. ٤. ٤. الصبغ ..... ٤٩
٣. ٤. ٥. الفحص ..... ٥١
٣. ٤. ٦. التحليل الإحصائي ..... ٥٢

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

**٣. ٥. اختبار السيادة المميتة..... ٥٣**
٣. ٥. ١. الجرعة المستخدمة من كلوريد الكادميوم..... ٥٥
٣. ٥. ٢. نموذج تسجيل النتائج..... ٦٠
٣. ٥. ٣. التحليل الإحصائي..... ٦٢
**٣. ٦. اختبار سلم الدنا..... ٦٢**
٣. ٦. ١. عزل الدنا..... ٦٢
٣. ٦. ٢. قياس تركيز ونقاوة الدنا..... ٦٥
٣. ٦. ٣. الفصل الكهربائي لدنا على الهلام..... ٦٦

**الفصل الرابع : النتـــائج..... ٦٩**
**٤. ١. اختبار النواة الدقيقة..... ٦٩**
٤. ١. ١. المعاملة بالكادميوم منفرداً..... ٧٠
٤. ١. ٢. المعاملة المشتركة بالكادميوم وبيوتيلاتيد هيدروكسي تولوين. ٧١
**٤. ٢. اختبار السيادة المميتة..... ٨١**
٤. ٢. ١. المعاملة بالكادميوم منفرداً..... ٨١
٤. ٢. ٢. المعاملة المشتركة بالكادميوم وبيوتيلاتيد هيدروكسي تولوين ٨٢
٤. ٣. ١. اختبار سلم الدنا..... ٨٨

**الفصل الخامس : المنـــاقشة..... ٩٠**
**٥. ١. المعاملة بالكادميوم منفرداً..... ٩١**
٥. ١. ١. السمية الوراثية في الخلايا الجسدية..... ٩١
٥. ١. ٢. السمية الوراثية في الخلايا التناسلية..... ١٠١
٥. ١. ٣. السمية الخلوية..... ١٠٩
**٥. ٢. المعاملة المشتركة بالكادميوم وبيوتيلاتيد هيدروكسي تولوين.... ١١٣**
٥. ٢. ١. السمية الوراثية..... ١١٣
٥. ٢. ٢. السمية الخلوية..... ١١٦
**٥. ٣. استنتاجات..... ١١٧**

**المراجع**
**المراجع العربية..... ١١٩**
**المراجع الأجنبية..... ١٢١**
**الملخص باللغة الإنجليزية..... ١٤٩**

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

# الإهداء

**أهدي هذا الرسالة :**

إلى كل من تربطني به صلة رحم و أخص منهم من ربياني صغيراً أمي وأبي .

إلى من سهرت معي لإنجاز هذا الرسالة زوجتي العزيزة والغالية.

إلى من وقف معي وأخذ بيدي إلى الأمام من دكاترة و أساتذة .

إلى كل طالب علم مجتهد حاول الاستفادة من هذا الرسالة .

وأخيراً اسأل الله - عز وجل - أن ينفع بها و يجعلها خالصةً لوجهه الكريم . آمين

أبو أحمد

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

# شكـر وعـرفـان

الحمد لله أولاً وأخيراً على أن منَ علىَ بإتمام هذه الرسالة وإخراجها بالشكل المناسب ، وأسأله – عز وجل – التوفيق والسداد وأن ينفع بها كل من اطلع عليها .

يطيب لي أولاً أن أتقدم بالشكر الجزيل والعرفان لأستاذي الفاضل ومعلمي الخيرِّ ، سعادة الأستاذ الدكتور محمد أكمل عبدالرحيم الغر ، الذي لم يأل جهداً في المتابعة والإشراف علىَ والذي كان له الفضل - بعد الله سبحانه وتعالى- في هذه الرسالة حيث كان لي مشرفاً معلماً وأباً مربياً وصديقاً مخلصاً وأقول له جزاك الله عني خيرا ، كما أشكر سعادة الأستاذ الدكتور فيصل محمد ابوطربوش المشرف المساعد على هذه الرسالة والذي حثني على أكمال الدراسة منذ مرحلة البكالوريوس ، وفتح لي قلبه قبل صدره ومعمله وكان دليلاً لي في خطوة من خطوات دراستي الجامعية . والشكر موصولاً لسعادة الدكتور سعود العريفي على ما قدم وما يقدمه لي من توجيه ومساعدة في هذه الرسالة .

ولا يفوتني في هذا المقام أن أشكر – بعد الاعتراف بالفضل لله أولاً - سعادة الدكتور حسين سر الختم ، حيث كان من أوائل من شجعني على موصلة الدراسات العليا ، ولا أنس الأستاذ كمال عطية الذي قدم لي جميع الخدمات لإكمال دراساتي العليا.

كما أجد نفسي عاجزاً عن شكر كل من شاركني بالرأي أو النصيحة أو بذل الوقت والجهد وتذليل الصعوبات حتى تخرج هذه الرسالة بالشكل المناسب ، وهم :

- أ.د. نوري الطيب .
- أ.د. عبدالعزير الصالح
- أ.د. أحمد الحميدي
- أ.د. خالد الرشيد
- أ.د. علي العقل
- أ.د.محمد اليوسف
- أ.د. محمد بشطر
- د. ابراهيم الهزاع
- د. محمد مبارك

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

- د. حسن عشماوي - د. محمد عبد الصمد - أ. محمد نبهان
- أ. سعود نعيم

وأتقدم بالشكر الجزيل للسادة أعضاء هيئة التدريس ومعيدين وفنيين بقسم علم الحيوان وبخاصةٍ رئيس قسم علم الحيوان الدكتور عثمان الدوخي الذي فتح لي قلبه قبل سمعه و مكتبه قبل بابه .

كما لا أنس أن اشكر في هذا المقام زملاء في الدراسات العليا الذين كان لهم الأثر العظيم هذه الرسالة وفي نفسي ، وبخاصة :

- أ. أحمد الشمري - أ. صالح الفراج - أ. عبد الحكيم الدوسري
- أ. قاسم ابوطويل - أ. عبد الحكيم التركي - أ. مساعد الفره
- أ. عبد الهادي العوفي - أ. حسن الرديني - أ. عبد السلام الخالدي
- أ عبد الغني الشهري - أ. سعد القحطاني - أ. محمد المرزوق
- عبد الهادي العنزي - أ. علي الغامدي - أ. ناصر الصمعاني
- أ. بشار الحواري - أ. عبدالرحمن اليحي

وأنا مدين بالشكر للدكتور إسماعيل خضر خلف الله من - كلية اللغة العربية - على ما قام به من جهد مبذول في تحكيم الرسالة لغوياً .

كما اشكر مدينة الملك عبد العزيز للعلوم والتقنية ممثلة في مركز البحوث الذي قدم لي جميع ما طلبته من أبحاث ومراجع ، وكذلك الشكر لوزارة التربية والتعليم ممثلة في كلية المعلمين بالمدينة المنورة على منحي فرصة إكمال الدراسات العليا، وكذلك عمادة الدراسات العليا بجامعة الملك سعود .

و الشكر موصولاً لمركز البحوث بكلية العلوم - جامعة الملك سعود- على الدعم المادي لهذه الرسالة عن طريق المشروع البحثي **رقم ZOO/1422/16** .

وختاماً أتقدم بالشكر والتقدير والعرفان إلى كل من كانت له أيادي بيضاء في هذه الرسالة . و أسال الله لهم التوفيق والسداد في الدنيا والآخرة .

**الباحث**

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

## الفصل الأول

## المقدمة والهدف من الدراسة

## Introduction and Aim of The Study

أدى التقدم السريع للصناعات والتكنولوجيا في هذا العصر إلى أن أصبح الإنسان معرضاً لكثير من الأخطار نتيجة لتعرضه إلى مدى واسع من الملوثات البيئية سواءً الطبيعية أو المستحدثة ، وبالأخص الملوثات الكيميائية التي قد تصل إلى جسم الإنسان عن طريق العديد من الطرق .

إن الملوثات البيئية ، سواءً الصناعية أو الطبيعية ، قد تكون ملوثات سامة Toxic و/أو مسرطنة Carcinogenic و/أو مطفرة Mutagenic و/أو مشوهة Teratogenic و/أو مكسرة للكروموسومات Clastogenic ، ولهذا أصبح من الضروري دارسة تأثير مثل تلك المواد لمعرفة تأثيراتها الضارة ومحاولة فهم آليات عملها وكيفية الوقاية منها . ولعل من أخطر هذه المواد ، ماله خاصية التراكم في جسم الكائن الحي حيث يصعب التخلص منه ويسبب الكثير من الأضرار في الأعضاء التي يتراكم بها ، كما يمكن أن تستمر هذه الأضرار لفترات طويلة ( Gossel and Bricker ,1994 ) .

هناك أكثر من ٤٠ مادة صنفت على أنها معادن والكثير منها يمثل ملوثات بيئية تحدث تسمماً للكائنات الحية خاصة ما يعرف بالمعادن الثقيلة Heavy metals . والجدير بالذكر أن المعادن الثقيلة استخدمت في مجالات كثيرة تهم جميع جوانب

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

حياة الإنسان ، مثل العقاقير الطبية أو المبيدات ( Klaassen ,1992 ) , كما أنها تنتشر في الطبيعة بشكل واسع جداً ويتفاوت مدى نفعها أو خطورتها من مركب إلى آخر ، وبعض هذه المعادن يمكن أن ينتقل من خلال الهواء أو الماء أو التربة بالترسيب ومنها إلى النباتات ثم الإنسان ( العمر، ٢٠٠٠ ) .

ومن أهم الملوثات البيئية الأكثر انتشاراً في العالم- في الوقت الحاضر- معدن أبيض فضي لامع قابل للسحب والطرق ويرمز له بالرمز الكيميائي Cd ، ذلك هو معدن الكادميوم ( Patnaik ,1992 ) . ومن خطورة هذا المعدن أنه يمكن أن يمتص بسهولة عن طريق الجهازين الهضمي والتنفسي حيث يتراكم داخل الجسم ويتركز في الكبد والكلى بشكل أساسي ( Torra *et al*., 1995 ) .

أوضحت نتائج العديد من الدراسات ( Friberg *et al*., 1986 ; Zhang and Yang, 1994 ) أن تراكم الكادميوم في أجساد الكائنات الحية يؤدي إلى تأثيرات سامة خطيرة , لكن نتائج الدراسات التي أجريت للكشف عن سميته الوراثية باستخدام طرق واختبارات كشف مختلفة ، قد أوضحت بعض التناقضات . ففي حين صنفت بعض الدراسات الكادميوم،على أنه مادة ذات سمية وراثية في فئران التجارب *in vivo* ( Mukherjee *et al*., 1988a ; Marrazzini *et al*., 1994 ; Fahmy and Aly, 2000 ) , لكن نتائج دراسات أخرى وباستخدام نفس الاختبارات أوضحت عدم قدرة مركبات الكادميوم على إحداث سمية وراثية ( Brue and Heddle, 1979 ; Volkova and Karpliuk, 1990 ; Osipov *et al*., 2000). بالإضافة إلى ذلك ، فإن القليل من المعلومات متوفر حول قدرة الكادميوم على زيادة معدل الموت الخلوي

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

المبرمج ، كأحد المؤشرات على السمية الخلوية ، والذي يصاحب عادة التسمم الكبدي بالعديد من الكيماويات .

إن بيئة الإنسان تزداد يوماً بعد يوم تلوثاً بالمعادن الثقيلة وبغيرها من الملوثات ، وحتى يتمكن الإنسان من التغلب على هذا التلوث البيئي , فإنه من المناسب و المهم جداً البحث عن وسائل ومواد للوقاية من التأثيرات الضارة لتلك الملوثات .

ففي السنوات الأخيرة احتلت مضادات الأكسدة ، الطبيعية والمصنعة ، مكاناً هاماً كواقيات للخلية من الكثير من الأضرار التي تتعرض لها نتيجة لزيادة انبعاث أنواع الأكسجين النشطة كإحدى آليات التأثيرات السامة للملوثات المختلفة ، بما فيها مركبات الكادميوم . أحد مضادات الأكسدة المصنعة واسعة الاستخدام والذي يعتبر كأحد المواد الحافظة للأغذية هو المركب الفينولي بيوتيلاتيد هيدروكسي تولوين والذي أوضحت بعض الدراسات قدرته - كمضاد للأكسدة - على الوقاية من التأثيرات المطفرة والمسرطنة لبعض المركبات ( Ochi and Ohsawa, 1985 ; Hocman, 1988 , Grillo *et al*., 1999 ; Williams *et al*., 1999 ) .

تم تصميم الدراسة الحالية لتقييم السمية الوراثية للكادميوم في الخلايا الجسدية والتناسلية للفأر الحي . وقد استخدم اختبار الأنوية الدقيقة للكشف عن سميته الوراثية في الجسدية ( خلايا نخاع العظام ) واختبار السيادة المميتة للكشف عن سميته الوراثية في الخلايا التناسلية لذكور الفئران ومحاولة تحديد أكثر مراحل عملية تكوين الحيوان المنوي حساسية للكادميوم . أما اختبار سلم الدنا , فقد استخدم للكشف عن الموت الخلوي المبرمج في أكباد الحيوانات المعاملة كأحد المؤشرات على السمية الخلوية .

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ومن أجل إلقاء المزيد من الضوء على آليات السمية الوراثية والخلوية للكادميوم ، فقد استخدمت المعاملة المشتركة بكلوريد الكادميوم ومضاد الأكسدة المصنع بيوتيلاتيد هيدروكسي تولوين لتقييم الدور الذي تلعبه أنواع الأكسجين النشط في آليات السمية الوراثية والخلوية للكادميوم .

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

# الفصل الثالث

# المـــواد والطـرق

# Materials and Methods

## ٣. ١- حيوانات التجارب : Experimental animals

استخدم في هذا البحث فئران التجارب البيضاء ( إناث وذكور ) من السلالة النقية SWR/J تراوحت أعمارها مابين ٨-١٠ أسابيع ، وأوزانها بين ٢٠- ٣٥ جم ، وهي معروفة علمياً باسم *Mus musculus domesticus* . تم الحصول عليها من بيت الحيوان – كلية الصيدلة – جامعة الملك سعود بالرياض .

تمت التربية والمحافظة على تلك الحيوانات في غرفة خاصة بقسم علم الحيوان – كلية العلوم – جامعة الملك سعود بالرياض بلغت درجة حرارتها ٢٢± ١ ْم ورطوبتها النسبية ٤٥ ± ٥ ٪ ودورات إضاءة/ ظلام ١٤/١٠ ساعة . تم وضع تلك الفئران في أقفاص بلاستيكية مغطاة بشبك معدني مطلي بالكروم لمنع الصدأ . الأقفاص المستخدمة كانت على نوعين هما :

١- أقفاص كبيرة ( ٢٤× ٢٥× ١٥ سم ) استعملت لتربية وجمع الفئران وتوالدها .

٢- أقفاص صغيرة ( ٢٥× ١٧,٥× ١٤ سم ) استعملت لعملية التزاوج بين الذكور والإناث بواقع ١ : ٢ .

تم غسل تلك الأقفاص مرتين أسبوعياً بالماء والمطهر لمنع نمو البكتريا والفطريات وغيرها من الكائنات الدقيقة . كما استخدمت كمية من نشارة الخشب كفرش

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

لهذه الأقفاص في كل صندوق ، وذلك لتسهيل عملية التنظيف ولتقريب البيئة الطبيعية لحيوانات التجارب .

وزودت تلك الفئران بعلف خاص ( جدول ١ ) على شكل قطع اسطوانية تم الحصول عليها من المؤسسة العامة لصوامع الغلال ومطاحن الدقيق ( الرياض المملكة العربية السعودية ) . كما زودت تلك الحيوانات بالماء في قوارير زجاجية نظيفة، وقدم الغذاء والماء لتلك الحيوانات بطريقة مستمرة ولحد الكفاية ، كما تم وضع بطاقة ورقية بيضاء مستطيلة الشكل (١٢,٥× ٧,٥ سم ) في قطعة معدنية مثبتة على جانب من جوانب الأقفاص ، وذلك لتسجيل البيانات المتعلقة بالحيوانات والملاحظات اليومية الأخرى .

قتلت الفئران المستخدمة في البحث باستخدام طريقة التنخيع ( Cervical dislocation ) المتمثلة في فصل فقرات العنق عن الجمجمة .

## ٣. ٢. المواد الكيميائية المستخدمة :

### ٣. ٢ .١. كلوريد الكادميوم :

**Cadmium chloride [CAS#10108-64-2]**

تم شراء كلوريد الكادميوم من شركة RIEDEL ( ألمانيا ) على هيئة مسحوق أبيض نقي ليس له رائحة ، صيغته الجزيئية $CdCl_2.H_2O$ . تم إعداد محلول كلوريد الكادميوم المستخدم في الدراسة الحالية بإذابته في الماء المقطر .

**الجدول ١ . يوضح محتويات علف حيوانات التجارب***

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

| النسبة المئوية | المـــــادة | |
|---|---|---|
| ٪ ٢٠ | Crude protein | بروتين خام |
| ٪ ٤ | Crude fat | دهن خام |
| ٪ ٣ | Crude fibers | ألياف خام |
| ٪ ٦ | Ash | رماد |
| ٪ ١ | Calcium | كالسيوم |
| ٪ ٠,٥ | Salts | أملاح |
| ٪ ٠,٦ | Phosphorus | فوسفور |
| ٢٠ وحدة دولية/جم | Vitamin A | فيتامين أ |
| ٢٠ وحدة دولية/جم | Vitamin B | فيتامين ب |
| ٢,٢ وحدة دولية/جم | Vitamin E | فيتامين هـ |

العناصر المعدنية النادرة المضافة :

- نحاس Copper وكوبلت Cobalt .
- يود Iodine وحديد Iron .
- منجنيز Manganese وزنك Zinc .

*** [ عن ( النشرة المرفقة مع أكياس الغذاء من المؤسسة العامة لصوامع الغلال ومطاحن الدقيق )] .**

**- تحديد الجرعة المحتملة القصوى لكلوريد الكادميوم :**

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

الجرعة المحتملة القصوى ( Maximum tolerated dose ( MTD والمكافئة للجرعة المميتة لـ ٥ ٪ من الحيوانات ( $LD_5$ ) تم تحديدها لكلوريد الكادميوم في معملنا طبقاً للخطوات التالية :

١- استخدم في هذه التجربة خمسون من ذكور الفئران من السلالة SWR/J تم تقسيمها إلى خمس مجموعات كل منها تتكون من عشرة حيوانات .

٢- حقنت كل مجموعة في التجويف البطني بجرعة مختلفة من محلول كلوريد الكادميوم ( ٦، ٨، ١٠، ١٢، ١٥ مجم/ كجم من وزن الجسم ) .

٣- تركت الحيوانات لمدة ٢٤ساعة ، ثم تم تسجيل عدد الحيوانات الحية والميتة المقابلة لكل جرعة .

٤- باستخدام برنامج ميكروسوفت أكسل Microsoft excel تم الحصول على خط ومعادلة الانحدار للعلاقة بين لوغاريتم الجرعات وعدد الحيوانات الميتة المقابلة لكل جرعة ( شكل ١ ) ومنها تم حساب الجرعة المحتملة القصوى :

معادلة الانحدار $y = 25.58\ X - 19.473$

∴ الجرعة المحتملة القصوى **( MTD ) = $LD_5$ = ٦ مجم/ كجم** من وزن الجسم .

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

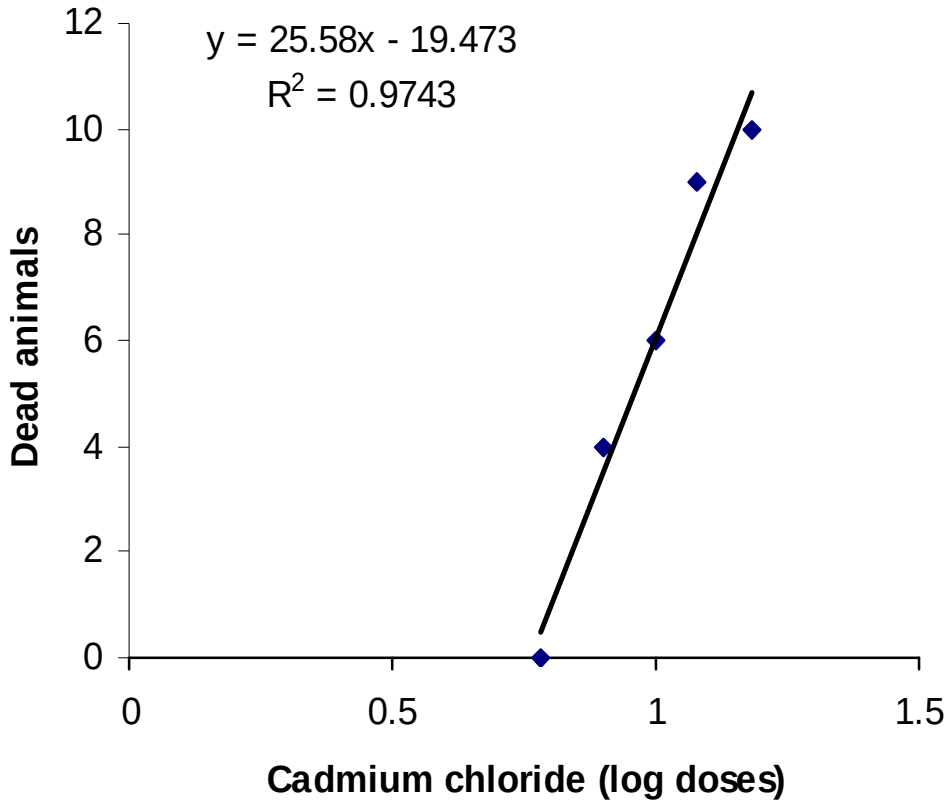


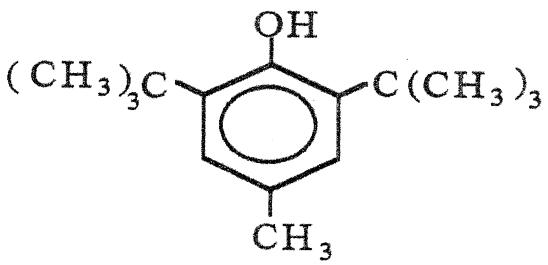

**Fig. 1 :** Determination of the intraperitoneal maximum tolerated dose ( $LD_5$ ) of cadmium chloride in SWR/J mice .

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

### ٣. ٢ .٢. بيوتيلاتيد هيدروكسي تولوين :

**Butylated hydroxytoluene (BHT) [CAS#128-37-0 ]**

تم شراء بيوتيلاتيد هيدروكسي تولوين من شركة سيجما بالولايات المتحدة الأمريكية ( Sigma , USA ) على صورة بلورات بيضاء صلبة عديمة الرائحة ، أو ذات رائحة عطرية ضعيفة . صيغته الجزيئية $C_{15}H_{24}O$ ، ووزنه الجزيئي 220.4 واسمه الكيميائي 4-methyl-2,6-ditertiary-butyl-phenol أو 2,6-Ditertiary-butyl-p-cresol ، وتركيبه الكيميائي :




( BHT )

تم إعداد بيوتيلاتيد هيدروكسي تولوين للحقن باستخدام المذيب العضوي توين ٨٠ ( Tween 80 ) من شركة BDH- إنجلترا - طبقاً للطريقة التي تم وصفها بواسطة ( Vanyushin *et al.*,1998 ). في جميع مراحل التجربة تمت المعاملة بالجرعة ٢٠٠مجم/كجم من وزن الجسم من BHT قبل ٦ ساعات من المعاملة بكلوريد الكادميوم ( Hocman ,1988 ) .

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

### ٣. ٣. طريقة المعاملة المستخدمة :

في جميع مراحل الاختبارات المختلفة المستخدمة في هذا البحث تمت معاملة حيوانات التجارب بالمواد الكيميائية المختلفة عن طريق الحقن في التجويف البطني ( Intraperitoneal , i.p. ) بواقع **٠,٢مل/ ١٠جم** من وزن الجسم .

### ٣. ٤. اختبار النواة الدقيقة : Micronucleus test

تم تصميم هذا الاختبار بالاستعانة بالتوصيات التي وردت في تقرير برنامج السمية الوراثية للوكالة الأمريكية لحماية البيئة ( Heddle *et al.* ,1985 ) .

#### ٣. ٤. ١. الجرعات المستخدمة :

استخدم في هذا الاختبار ثلاث جرعات من كلوريد الكادميوم هي :

- ٢ مجم/ كجم من وزن الجسم وتمثل ٣/١ من الجرعة المحتملة القصوى ( 1/3MTD ) .
- ٤ مجم/ كجم من وزن الجسم وتمثل ٣/٢ من الجرعة المحتملة القصوى ( 2/3MTD ) .
- ٦ مجم/ كجم من وزن الجسم وتمثل الجرعة المحتملة القصوى ( MTD ) .

#### ٣. ٤. ٢. برنامج المعاملة : Treatment schedule

استخدمت في هذا الاختبار ذكور وإناث السلالة SWR/J من فئران التجارب .

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

تم تقسيم الفئران إلى ١٤ كل مجموعة تحتوي على ٨ حيوانات ( ٤ ذكور و ٤ إناث ) ، وعوملت كما يلي :

- **المجموعة رقم ١ ( -ve Control ) :**

حقنت هذه المجموعة بالماء المقطر ( ٠,٢مل/١٠جرام من وزن الجسم ) حيث استخدمت كمجموعة ضابطة سالبة لجميع المجموعات التالية ( Tice and Shelby 1994, ) . قتلت هذه الحيوانات بعد ٢٤ساعة من المعاملة .

- **المجموعة رقم ٢ ( $CdCl_2$ ) :**

عوملت بالجرعة ٢مجم/كجم من وزن الجسم من كلوريد الكادميوم . قتلت الحيوانات بعد ٢٤ساعة من المعاملة .

- **المجموعة رقم ٣ ( $CdCl_2$ ) :**

عوملت بالجرعة ٤مجم/كجم من وزن الجسم من كلوريد الكادميوم . قتلت الحيوانات بعد ٢٤ساعة من المعاملة .

- **المجموعة رقم ٤ ( $CdCl_2$ ) :**

عوملت بالجرعة ٦مجم/كجم من وزن الجسم من كلوريد الكادميوم . قتلت الحيوانات بعد ٢٤ساعة من المعاملة .

- **المجموعة رقم ٥ ( $CdCl_2$+BHT ) :**

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

عوملت بالجرعة ٢٠٠مجم/ كجم من وزن الجسم من BHT قبل ٦ ساعات من المعاملة بالجرعة ٢مجم/ كجم من وزن الجسم من كلوريد الكادميوم . قتلت الحيوانات بعد ٢٤ساعة من المعاملة بكلوريد الكادميوم .

- **المجموعة رقم ٦( $CdCl_2$+BHT ) :**

عوملت بالجرعة ٢٠٠مجم/ كجم من وزن الجسم من BHT قبل ٦ ساعات من المعاملة بالجرعة ٤مجم/ كجم من وزن الجسم من كلوريد الكادميوم . قتلت الحيوانات بعد ٢٤ساعة من المعاملة بكلوريد الكادميوم .

- **المجموعة رقم ٧ ( $CdCl_2$+BHT ) :**

عوملت بالجرعة ٢٠٠مجم/ كجم من وزن الجسم من BHT قبل ٦ ساعات من المعاملة بالجرعة ٦مجم/ كجم من وزن الجسم من كلوريد الكادميوم . قتلت الحيوانات بعد ٢٤ساعة من المعاملة بكلوريد الكادميوم .

- **المجموعة رقم ٨ ( $CdCl_2$ ) :**

عوملت بالجرعة ٢مجم/ كجم من وزن الجسم من كلوريد الكادميوم . قتلت الحيوانات بعد ٤٨ساعة من المعاملة .

- **المجموعة رقم ٩ ( $CdCl_2$ ) :**

عوملت بالجرعة ٤مجم/ كجم من وزن الجسم من كلوريد الكادميوم . قتلت الحيوانات بعد ٤٨ساعة من المعاملة .

- **المجموعة رقم ١٠ ( $CdCl_2$ ) :**

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

عوملت بالجرعة ٦مجم/كجم من وزن الجسم من كلوريد الكادميوم . قتلت الحيوانات بعد ٤٨ساعة من المعاملة .

- **المجموعة رقم ١١ ( BHT ) :**

عوملت بالجرعة ٢٠٠مجم/كجم من وزن الجسم من BHT - منفرداً - . قتلت الحيوانات بعد ٢٤ساعة من المعاملة .

- **المجموعة رقم ١٢ ( BHT ) :**

عوملت بالجرعة ٢٠٠مجم/كجم من وزن الجسم من BHT – منفرداً-. قتلت الحيوانات بعد ٣٠ساعة من المعاملة لتماثل المجموعات التي عوملت معاملة مشتركة بكلوريد الكادميوم وBHT حيث قتلت بعد ٣٠ساعة من تعرضها لـ BHT .

- **المجموعة رقم ١٣ ( Tween 80 ) :**

عوملت بمذيب BHT ( تـوين ٨٠ ) - منفرداً - بناءً على القاعدة التي سبق ذكرها والتي اتبعت في جميع المعاملات وهي ٠,٢مل/١٠جم من وزن الجسم . قتلت الحيوانات بعد ٣٠ ساعة من المعاملة .

- **المجموعة رقم ١٤ ( +ve Control - CP ) :**

عوملت بالجرعة ٥٠ مجم/كجم من وزن الجسم من المادة المطفرة المعروفة فوسفاميد الحلقي (CP) Cyclophosphamide ، واستخدمت كمجموعة ضابطة موجبة للتأكد من سلامة الطريقة المستخدمة من حيث طريقة المعاملة والكيماويات المستخدمة وطريقة تحضير الشرائح وصبغها ودقة الفحص . قتلت الحيوانات بعد ٢٤ساعة من المعاملة .

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

### ٣. ٤. ٣. إعداد الشرائح : Slide preparation

١- قتلت الحيوانات بطريقة التنخيع ثم شرحت واستخرجت منها عظمتي الفخذ Femur ونظفت جيداً من الأنسجة المحيطة ، ثم قطع طرفا العظمتين .

٢- استخرجت خلايا نخاع العظام بواسطة حقنة بها مصل جنين العجل Foetal Calf Serum ( FCS ) على شريحة جافة ونظيفة .

٣- خلطت خلايا نخاع العظام مع FCS جيداً فوق الشريحة بواسطة رأس الإبرة نفسها .

٤- تم عمل سحبة لخلايا نخاع العظام على الشريحة نفسها باستخدام شريحة أخرى أو غطاء شريحة بزاوية مائلة بمقدار ٤٥° تقريباً .

٥- تركت الشرائح في درجة حرارة الغرفة حتى جفت .

٦- ثبتت الخلايا بوضع الشرائح في كحول اثيلي مطلق لمدة ٥ دقائق ثم تركت في درجة حرارة الغرفة حتى جفت .

### ٣. ٤. ٤. الصبغ : Staining

تم صبغ الخلايا باستخدام محلول ماى جرونوالد/ جمسا May-Grunwald / Giemsa solution ( Gimmler-Luz *et al*. ,1999 ) والمتكون من :

- ٣ مل من محلول جمسا الذي تم تحضيره بالمعمل كما هو موضح فيما بعد .
- ١٢ مل من محلول ماى جرونوالد الجاهز للصبغ ( ٠,٢٥ ٪ في ميثانول - شركة سجما - الولايات المتحدة الأمريكية ) .

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

- ٢ مل من محلول ٠,١مولر فوسفات الصوديوم ثنائي القاعدة

. Sodium phosphate dibasic ( 0.1M $KH_2PO_4$ )

- ٤,٥ مل من محلول ٠,١مولر فوسفات البوتاسيوم أحادي القاعدة

. Potassium phosphate monobasic ( 0.1M $KH_2PO_4$ )

- ٥١ مل ماء مقطر .

- **خطوات العمل :**

أ- وضعت الشرائح في وعاء الصبغة المحتوي على محلول ماى جرونوالد/ جمسا والذي سبق تحضيره وتركت لمدة ٢٠دقيقة .

ب- أزيلت الصبغة الزائدة بغمس الشرائح في الماء المقطر .

ج- تركت الشرائح لتجف تماماً ، ثم تم تحميلها باستخدام محلول DPX ثم غطيت بغطاء زجاجي وتركت لتجف .

د- فحصت الشرائح بعد ذلك بواسطة المجهر الضوئي .

- **تحضير محلول جمسا : Giemsa solution**

أ- تم وضع ٥ جم من بودرة صبغة ( جمسا ) في قارورة مظلمة سعة ١ ليتر .

ب- أضيف ٣٣٠ مل من الجلسرين إلى الصبغة .

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ج- مزج الخليط باستخدام جهاز المزج المغناطيسي Magnetic stirrer ، ثم وضع في فرن درجة حرارته ٦٠ ْم لمدة ساعتين مع الرج كل نصف ساعة .

د- تركت القارورة بعد ذلك في درجة حرارة الغرفة لمدة ساعة على الأقل ليبرد الخليط ثم اضيف ٣٣٠ مل من الميثانول إليه مع الرج جيداً .

هـ- تركت القارورة في مكان مظلم لمدة ٢٤ساعة ، بعد ذلك تم ترشيح المحلول بواسطة ورق الترشيح ، وترك في مكان مظلم واستخدمت الصبغة بعد اسبوع من الترشيح .

### ٣. ٤. ٥. الفحص : Scoring

في حالة المعاملة بالحقن في التجويف البطني , فإنه يوصى باستخدام ثمانية حيوانات في كل مجموعة وأن تفحص ٥٠٠ خلية دم حمراء متعددة الصبغة $PCE_s$ لكل حيوان ( Heddle *et al*., 1985 ) . وبناءً على ذلك ، فقد تم في الدراسة الحالية فحص ٥٠٠ كرة دم حمراء متعددة الصبغة Polychromatic erythrocyte ( $PCE_s$ ) لكل حيوان ، وتقدير عدد الخلايا التي تحتوي على أنوية دقيقة Micronucleated polychromatic erythrocyte ($MNPCE_s$) وعدد كريات الدم الحمراء متعادلة الصبغة Normochromatic erythrocyte ($NCE_s$) سواءً تلك التي تحتوي على أنوية

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

دقيـــقة ( $MNNCE_s$ ) Micronucleated normochromatic erythrocyte ، أوتلك التي لا تحتوي على أنوية دقيقة .

نسبة كريات الدم الحمراء التي تحتوي على أنوية دقيقة ( $MNPCE_s$ و $MNNCE_s$ ) استخدمت كمؤشر على حدوث تغيرات كروموسومية ، أما النسبة بين عدد $PCE_s$ وعدد $NCE_s$ ($PCE_s$ / $NCE_s$ ratio) أو $PCE_s$ % ) فقد استخدمت كمؤشر للسمية الخلوية ( Garcia *et al*.,2002 ) .

**٣. ٤. ٦. التحليل الإحصائي :**

تم إجراء التحليل الإحصائي باستخدام برنامج SPSS ,Chicago ,IL ( Statistical package for the Social sciences ),USA . استخدم اختبار مان ويتني Mann-Whitney U-test لمقارنة النتائج المتحصل عليها من المجموعات المعاملة ومن المجموعة الضابطة السالبة ( Adler *et al* .,1991 ; Gimmler – Luz *et al* .,1999 ) .

## ٣. ٥. اختبار السيادة المميتة : Dominant lethal test

تم تصميم هذا الاختبار بالاستعانة بالتوصيات التي وردت في تقرير برنامج السمية الوراثية للوكالة الأمريكية لحماية البيئة ( Green *et al*., 1985 ) طبقاً للخطوات التالية :

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

١- تم حقن ١٥من ذكور الفئران في التجويف البطني بجرعة منفردة من كلوريد الكادميوم .

٢- مباشرة بعد الحقن ، تم توزيع الذكور على أقفاص التزاوج بواقع ١ ذكر : ٢ أنثى عذراء بالغة غير معاملة لتبدأ بذلك فترة التزاوج الأولى .

٣- اعتبر يوم وضع الذكور مع الإناث في الأقفاص اليوم صفر ( day 0 ) للحمل.

٤- استمرت فترة التزاوج لمدة أسبوع تم بعدها عزل الإناث ووضعت إنثيان جديديان مع الذكر للبدء في فترة التزاوج الثانية والتي استمرت كذلك لمدة اسبوع ثم عزلت الإناث .

٥- تكررت عملية التزاوج ( كما ذكر في الخطوات ٢- ٤ ) حتى تم الوصول إلى فترة التزاوج الثامنة .

٦- تم قتل الإناث التي عزلت بعد انتهاء كل فترة من فترات التزاوج الثمانية عند اليوم ١٨ من بداية الحمل ، ثم شرحت ، وتم فحص قرني الرحم للحصول على المعلومات التالية :

أ- عدد الإناث الحوامل :

استخدمت النسبة المئوية للإناث الحوامل بعد كل فترة تزاوج ، كمؤشر على خصوبة الذكور ( Dalton *et al.*, 1996 ) .

ب- العدد الكلي للأجنة المنغرسة ( الحية والميتة ) :

Total number of implantation

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

الحركة الطبيعية والتلقائية ولون الجسم الأحمر و/أو الحركة الناشئة عن طريق الضغط اللطيف بالملقط على عنق الأجنة هي المعايير التي استخدمت لتحديد الأجنة الحية [( رسالة العتيبي .٢٠٠٣).بتصرف ].

ج- الأجنة الميتة : Dead implantation

العدد الكلى للأجنة الميتة هو عدد أماكن الانغراس الفارغة ( Deciduomata or Empty implantation sites ) بالإضافة إلى عدد العلقات الميتة Dead implants . وقد تم تقسيم الأجنة أو العلقات الميتة إلى نوعين هما :

النوع الأول : الفقد قبل الانغراس Pre-implantation loss

ويتميز بوجود نمو في الرحم عند موضع انغراس العلقة التي فشلت في الانغراس أو فشلت في النمو بعد الانغراس .

النوع الثاني :الفقد بعد الانغراس Post-implantation loss

ويتميز بوجود نمو جنيني إلى مرحلة متقدمة نسبياً قبل الوفاة ويظهر بحجم أصغر من المعتاد وشاحب أو أبيض اللون ، مما يعكس فشل أو انهيار الدورة الدموية .

**٣. ٥. ١. الجرعة المستخدمة من كلوريد الكادميوم :**

كما هو الحال في اختبارات السمية الوراثية ، فإنه يوصى باستخدام ثلاث جرعات من المادة تحت الاختبار . إلا أنه في حالة التقييم المبدئي لقدرة المركبات على إحداث السيادة المميتة Dominant lethality فإنه يكتفى بجرعة واحدة غير مؤثرة على خصوبة الذكور ( OPPTS, 1998 ) .

**- الجرعة ٢مجم/ كجم من وزن الجسم :**

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

تم في البداية اختيار الجرعة ٢مجم/كجم من وزن الجسم ( ١/٣الجرعة المحتملة القصوى ) من كلوريد الكادميوم لإجراء اختبار السيادة المميتة .

حقنت مجموعة من ١٥ ذكراً في التجويف البطني وتم توزيعها على ١٥ قفصاً مع الإناث العذارى بنسبة ١ : ٢ كما سبق إيضاحه في صفحة ٥٣ . تم تسجيل النتائج المتحصل عليها من الإناث بعد فترات التزاوج الأولى والثانية والثالثة ، واعتباراً من فترة التزاوج الرابعة لوحظ انخفاض شديد في عدد الإناث الحوامل واستمر هذا الانخفاض حتى فترة التزاوج الثامنة حيث لم يحدث حمل لأي من الإناث التي شاركت في هذه المرحلة.

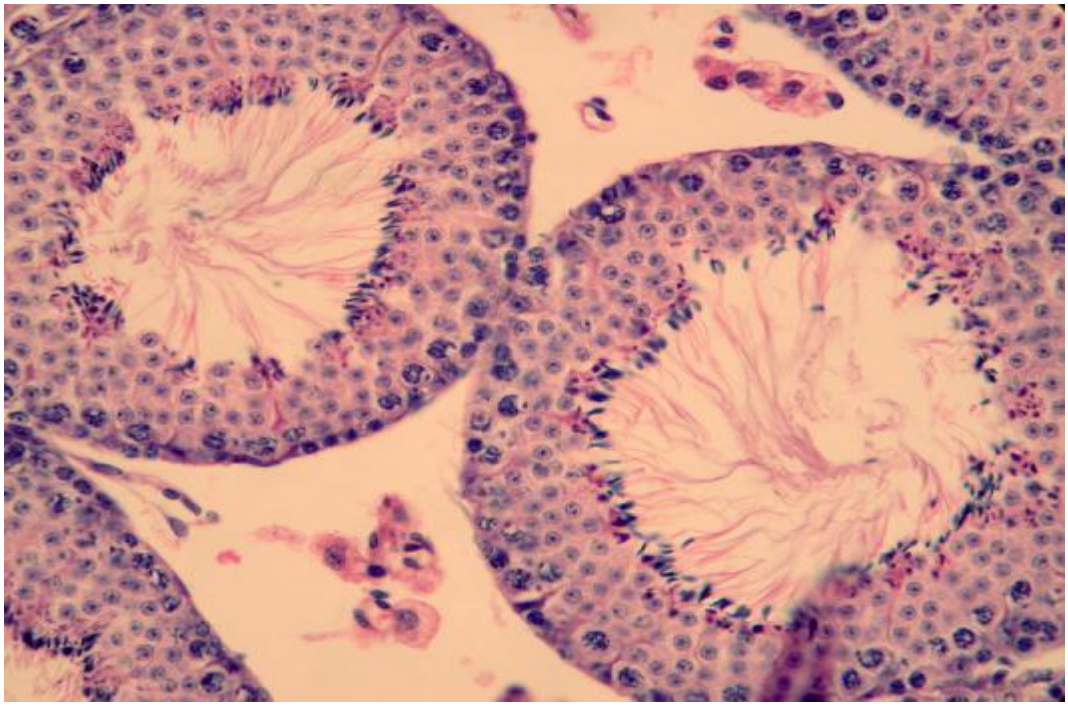
هذا الانخفاض الشديد في عدد الإناث الحوامل - اعتباراً من الفترة الرابعة للتزاوج - صاحبها صغر ملحوظ في حجم الخصيات مما أعطى تفسيراً للانخفاض الشديد في عدد الإناث الحوامل ، والذي يعود إلى الانخفاض الشديد في خصوبة الذكور بعد الحقن بجرعة منفردة قدرها ٢مجم/كجم من كلوريد الكادميوم . ولقد استمر تأثير هذه الجرعة في التزايد إلى أن أدى إلى عقم كامل للذكور .

تم تحضير قطاعات شمعية من خصى ذكور المجموعة الضابطة ( شكل ٢ ) والمعاملة بكلوريد الكادميوم ( أشكال ٣، ٤، ٥، ٦ ) ، ثم صبغها بالإيوسين والهيماتوكسلين وفحصها تحت المجهر . الإشكال ٣ , ٤ , ٥ , ٦ تمثل قطاعات في خصى ذكور الفئران التي عوملت بجرعة منفردة من كلوريد الكادميوم قدرها ٢مجم/كجم من وزن الجسم بعد أسبوعين ، أسابيع ، ٦ أسابيع ، ٨ أسابيع من الحقن ،

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

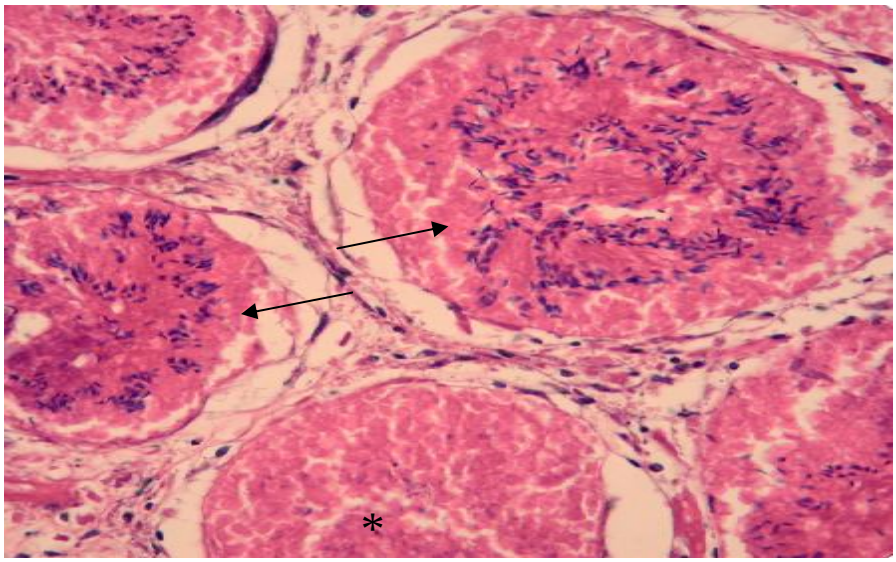
على التوالي . وسوف يكتفى بالتعليق المصاحب لتلك القطاعات لتوضيح التأثيرات المختلفة .

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

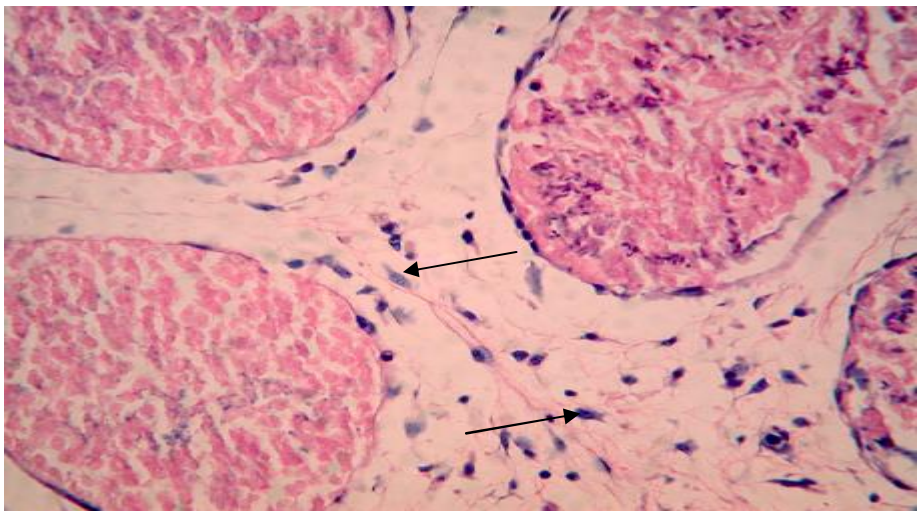


**شكل ٢ :** أنيبيبات منوية من خصية فأر من المجموعة الضابطة يظهر فيها الترتيب الطبيعي والكامل لمراحل تكوين الحيوانات المنوية. صبغة هيماتوكسيلين وإيوسين .X٢٥٠ .

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

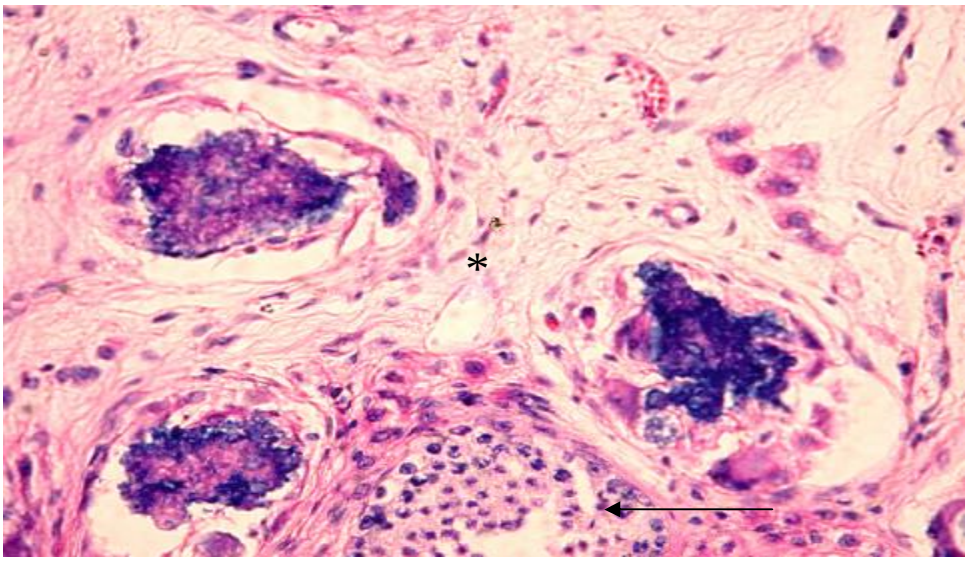


**شكل ٣ :** تتكرز داخل الأنيبيبات المنوية ( الأسهم ) من خصية فأر معامل بالجرعة ٢مجم/كجم من وزن الجسم من كلوريد الكادميوم ويلاحظ الطلائية التناسلية المتكرزة والتي تشغل تجويف الأنيبيبة ( * ) . اسبوعان بعد المعاملة . صبغة هيماتوكسيلين وإيوسين .X٢٥٠ .

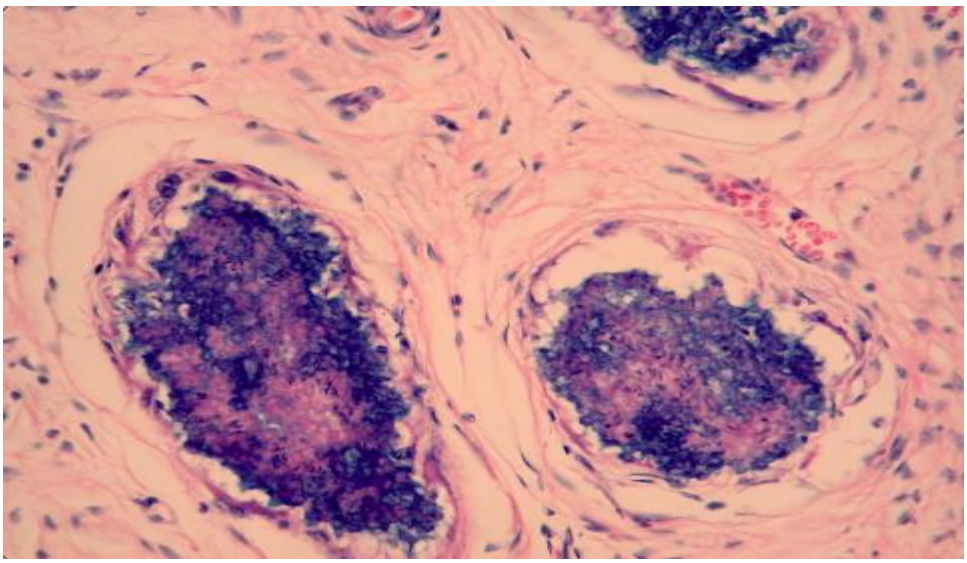


**شكل ٤ :** تتكرز تحللي لعدد من الأنيبيبات المنوية من خصية فأر معامل بالجرعة ٢مجم/كجم من وزن الجسم من كلوريد الكادميوم ويلاحظ الخلايا الليفية المتكاثرة ( الأسهم ) والمنتشرة بين الأنيبيبات في النسيج البيني . ٤ أسابيع بعد المعاملة . صبغة هيماتوكسيلين وإيوسين .X٢٥٠ .

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com



**شكل ٥ :** تليف بعد تنكرز الأنيبيبات المنوية من خصية فأر معامل بالجرعة ٢مجم/كجم من وزن الجسم من كلوريد الكادميوم . لاحظ المساحة التي تشغلها الأنيبيبات المنوية المنكرزة بالنسبة للنسيج البيني الذي يحتوي على خلايا ليفية متكاثرة ( * ) . كما أن هناك بقايا من أنيبيبات منوية غير متليفة ( السهم ) . ٦ أسابيع بعد المعاملة. صبغة هيماتوكسيلين وإيوسين .X٢٥٠ .



**شكل ٦ :** تليف وتكلس في أنيبيبات منوية سبق تنكرزها وأصبحت الآن مطمورة في نسيج ليفي كولاجيني كثيف من خصية فأر معامل بالجرعة ٢مجم/كجم من وزن الجسم من كلوريد الكادميوم . ٨ أسابيع بعد المعاملة . صبغة هيماتوكسيلين وإيوسين .X٢٥٠ .

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

وحيث إن من شروط اختبار السيادة المميتة أن تستخدم جرعة من المادة تحت الاختبار لا يكون لها تأثير على خصوبة الذكور ( Anderson, 1984 ) ، فقد قررنا إعادة الاختبار باستخدام جرعة منخفضة من كلوريد الكادميوم .

- **الجرعة ٠,٦مجم/ كجم من وزن الجسم :**

استخدمت الجرعة ٠,٦مجم/ كجم من وزن الجسم من كلوريد الكادميوم في إعادة إجراء اختبار السيادة المميتة وهي تمثل ١٠٪ من الجرعة المحتملة القصوى التي تم تحديدها في معملنا كما أوضحنا سابقاً .

تم إجراء الاختبار - كما ذكر سابقاً - ولم يلاحظ تأثر خصوبة الذكور بالمعاملة بتلك الجرعة ٠,٦مجم / كجم ، واتضح ذلك من عدم حدوث انخفاض ملحوظ في عدد الإناث الحوامل مع استمرار فترات التزاوج الثمانية .

**٣. ٥. ٢- نموذج تسجيل النتائج :**

تم تسجيل النتائج التي تحصلنا عليها من الإناث بعد فترات التزاوج الثمانية في نماذج أعدت خصيصاً لهذا الغرض . انظر صورة لهذا النماذج في الصفحة رقم ٦١ .

**اختبار السيادة المميتة Dominant lethal test**

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

حيوانات التجربة : **فــأر SWR/J**
تاريخ بداية التزاوج : **/ / ١٤٢هـ**
تاريخ ذبح الإناث: **/ / ١٤٢هـ**

نتــائج تلقيـح الأسبـوع
(     )
من تاريخ حقن الذكور

المادة المستخدمة : **كلوريــد الكــادميوم**
المذيب : **المــاء المقـطر**
الجرعة : **٠,٦ مجم/كجم من وزن الجسم**
تاريخ حقن الذكور: **/ / ١٤٢هـ**

| الإناث | الحمل | العدد الكلي للأجنة المنغرسة (الحية والميتة) | عدد الأجنة الحية | عدد الأجنة مبكرة الوفاة (الفقد قبل الانغراس) | عدد الأجنة متأخرة الوفاة (الفقد بعد الانغراس) | العدد الكلي للأجنة الميتة | المشاهدات |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ١ | | | | | | | |
| ٢ | | | | | | | |
| ٣ | | | | | | | |
| ٤ | | | | | | | |
| ٥ | | | | | | | |
| ٦ | | | | | | | |
| ٧ | | | | | | | |
| ٨ | | | | | | | |
| ٩ | | | | | | | |
| ١٠ | | | | | | | |
| ١١ | | | | | | | |
| ١٢ | | | | | | | |
| ١٣ | | | | | | | |
| ١٤ | | | | | | | |
| ١٥ | | | | | | | |
| ١٦ | | | | | | | |
| ١٧ | | | | | | | |
| ١٨ | | | | | | | |
| ١٩ | | | | | | | |
| ٢٠ | | | | | | | |
| ٢١ | | | | | | | |
| ٢٢ | | | | | | | |
| ٢٣ | | | | | | | |
| ٢٤ | | | | | | | |
| ٢٥ | | | | | | | |
| ٢٦ | | | | | | | |
| ٢٧ | | | | | | | |
| ٢٨ | | | | | | | |
| ٢٩ | | | | | | | |
| ٣٠ | | | | | | | |
| المجموع | | | | | | | |

عـــدد الإنـــاث الحـــوامــــل = ..........................................

النسبة المئوية للإناث الحوامل = ..........................................

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

### ٣. ٥. ٣. التحليل الإحصائي :

تم إجراء التحليل الإحصائي باستخدام برنامج

Statistical Package for the Social Sciences (SPSS ,Chicago ,IL ,USA ) .

استخدم اختبار مان ويتني Mann-Whitney U-test لمقارنة النتائج المتحصل عليها من المجموعات المعاملة ومن المجموعة الضابطة السالبة

( Soares and Sheridan ,1977 ; Teramoto *et al* .,1980 ; Laefere *et al*., 2000 ) .

## ٣. ٦. اختبار سلم الدنا : DNA Ladder test

### ٣. ٦. ١. عزل الدنا : DNA extraction

تم عزل دنا الجينوم ( Genomic DNA ) من خلايا أكباد الفئران التي عوملت بكل من الجرعات الأربع من كلوريد الكادميوم التي استخدمت لإجراء اختبار السيادة المميتة ( ٠,٦مجم/كجم من وزن الجسم ) واختبار النواة الدقيقة ( ٢, ٤, ٦مجم / كجم من وزن الجسم ) . تم قتلت الفئران بعد ١٥ ساعة من المعاملة بكلوريد الكادميوم واستخراج الدنا باستخدام ( Ohtsuka *et al*., 1997 )

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

طاقم عزل الدنا الجينوم من الخلايا والأنسجة ( شركة أمرشام ، الولايات المتحدة الأمريكية )

( GenomicPrep cells and Tissue DNA Isolation Kit , Amersham Biosciences , USA ) .

ولدراسة تأثير المعاملة المشتركة بكلوريد الكادميوم و BHT , حقنت الحيوانات بـ BHT قبل ٦ ساعات من المعاملة بكلوريد الكادميوم ثم قتلت بعد ١٥ساعة من المعاملة بكلوريد الكادميوم .

لكل من المعاملات السابقة ، استخدم ذكران من فئران التجارب لتأكيد النتائج المتحصل عليها ، وكما استخدم ذكران لكل من المجموعة الضابطة السالبة غير المعاملة والمعاملة بـ BHT و بالمذيب توين ٨٠ ( Tweer 80 ) .

وذلك طبقاً للخطوات التالية ، والموصى بها من الشركة المصنعة :

**أ- تحليل الخلية : Cell lysis**

تضاف قطعة من الكبد تزن ١٠- ٢٠ ملجم إلى أنبوبة ابندورف Eppendorf tube سعة ١,٥ مل تحتوي على ٦٠٠ ميكروليتير من محلول تحليل الخلية المبرد على الثلج والذي يحتوي على :

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

Tris [ hydroximethyl ] aminomethane ethylene diaminetetraacetic acid and sodium dodecyl sulfate . Cat .No. 27-5237-01A .

وبسرعة تم طحن النسيج بواسطة جهاز الطحن Homogenizer وحضن المتحلل lysate عند ٦٥° م لمدة ٤٥ دقيقة .

**ب- إضـــافة RNase :**

أضيف إلى المتحلل ٣ ميكروليتير من محلول RNase A ( Cat. No. 27-5236-01D ) وتم الخلط بقلب الأنبوبة ٢٥ مرة باليد والحضن عند ٣٧° م لمدة ٤٥دقيقة ، لتخلص من الرنا.

**ج- ترسيب البروتين : Protein precipitation**

بردت العينة إلى درجة حرارة الغرفة ، وأضيف ٢٠٠ ميكروليتير من محلول ترسيب البروتين ( Ammonium acetate .Cat. No. 27-5237-01B ) ثم خلط بشدة vortex لمدة ٢٠ ثانية . تم طرد العينة مركزياً عند سرعة 13000-16000xg لمدة ٣ دقائق لترسيب البروتين .

**د- ترسيب الدنا : DNA precipitation**

سكب المحلول العلوي في أنبوبة نظيفة سعة ١,٥مل تحتوي على ٦٠٠ميكروليتر من ١٠٠٪ ايزوبروبانول Isopropanol . خلطت العينة بالقلب

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

بلطف ٥٠ مرة حتى ظهرت خيوط الدنا البيضاء . ولترسيب الدنا تم طرد العينة مركزياً عند سرعة 13000-16000xg لمدة دقيقة واحدة .

تم التخلص من المحلول العلوي وجففت الأنبوبة بقلبها على ورقة ترشيح ، ثم أضيف إليها ٦٠٠ميكروليتر من ٧٠ ٪ ايثانول Ethanol وتم تقليب الأنبوبة عدة مرات لغسل راسب الدنا ، ثم طردها مركزياً عند سرعة 13000-16000xg لمدة دقيقة واحدة ، ثم تم التخلص من الايثانول بحذر، وجففت الأنبوبة تماماً بقلبها على ورقة ترشيح لمدة ١٠- ١٥ دقيقة .

**هـ- تعليق الدنا : DNA hydration**

أضيف ١٠٠ ميكروليتر من محلول إذابة الدنا والذي يحتوي على :

Tis [ hydroximethyl ]aminomethane and ethylenediamin tetraacetic acid . Cat. No. 27-5237-01D .

إلى راسب الدنا وتركت الأنبوبة حتى اليوم الثاني عند درجة حرارة الغرفة . تم حفظ محلول الدنا عند ٢ م˚- ٨˚ م .

**٣. ٦. ٢. قياس تركيز ونقاوة الدنا :**

تم قياس تركيز الدنا باستخدام جهاز قياس الطيف الضوئي المرئي ( GeneQuant pro , Amersham , USA ) .

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

تم تخفيف محلول الدنا ٥٠٠ مرة باستخدام ماء مقطر ومعقم وقياس تركيز الدنا في المحلول بقياس الكثافة الضوئية Optical density عند الطول الموجي ٢٦٠نانوميتر مع استخدام وحدة القياس ميكروجرام/ ميكروليتر . نقاوة محلول الدنا تم قياسها بمقارنة النسبة المئوية بين قراءة الكثافة الضوئية عند ٢٦٠ و ٢٨٠ نانومتير . ويعتبر المحلول نقياً عندما لا تتجاوز هذه النسبة القيمة ١,٨ .

### ٣. ٦. ٣. الفصل الكهربائي للدنا على الهلام :

**DNA gel electrophoresis**

**أ- تحضير هلام الاجاروز : Preparation of agarose gel**

لتحضير ١٪ هلام أجاروز ، تم إذابة ٠,٧ جم أجاروز ( Agarose LE ) في ٧٠ مل من المحلول المنظم (1x) TAE ( طريقة تحضيره في نهاية هذا الجزء ) بالتسخين في فرن أمواج قصيرة Microwave oven لمدة دقيقتين لإذابة الاجاروز تماماً و الحصول على محلول متجانس .

ترك محلول الهلام ليبرد حتى ٥٥° م ثم أضيف إليه محلول بروميد الايثيديوم Ethidium bromide ليصل تركيزه النهائي إلى ١ ميكروجرام/ مل من محلول الاجاروز .

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

**ب- صَـبّ الهلام : Casting the gel**

تم صَبّ الهلام في القالب المخصص لذلك ( ١٠× ٧ سم ) وفي وجود مشط به ثمانية أسنان ( ٦,٥×١,٥مم ) وترك الهلام حوالي نصف ساعة ليتصلب . تم نزع المشط بعد ذلك ووضع قالب الهلام في جهاز الفصل الكهربائي ( Hoeffer HE 33 Mini Submarine Electrophoresis Unit ) المحتوي على المحلول المنظم TAE (1x) .

**ج- الفصل الكهربي للدنا : DNA electrophoresis**

تم وضع ١٠ – ٢٠ ميكرولتير عينات الدنا المختلفة بواقع ١٠ميكروجرام في كل حفرة well من الهلام وأضيف إليها ٢ ميكرولتير من صبغة التحميل Loading dye التي تكشف عن الدنا أثناء الفصل الكهربائي ( طريقة التحضير في نهاية هذا الجزء ) ، ثم شغل جهاز الفصل الكهربائي لمدة ساعة واحدة عند فرق جهد ٧٥ فولت ، مع ملاحظة تغطية الهلام بمحلول الفصل عند بداية الفصل .

**د- فحص وتصوير الدنا :**

تم فحص الدنا باستخدام السطح المضاء بالأشعة فوق البنفسجية ( UV-transilluminator ) ثم تصوير الهلام بواسطة كاميرا التصوير الفوري ( Polaroid Camera ) .

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

*** تحضير المحاليل :**

**- المحلول المنظم ( 50x ) TAE :**

| | |
|---|---|
| Tris base | 242 g |
| Acetic acid | 57 ml |
| EDTA ( 0.5M ) | 100 ml |
| Deionized $H_2O$ | to 1000 ml |

يضبط الـ pH عند ٦,٨ .

**- محلول ( 0.5M ) EDTA :**

| | |
|---|---|
| 18.6 g | EDTA |
| 70 ml | Deionized $H_2O$ . |

يضبط الـ pH عند ٨ بواسطة محلول هيدروكسيد الصوديوم ( 1M ) NaoH

ثم يستكمل المحلول إلى ١٠٠سم$^3$ بالماء المقطر .

**- محلول صبغة التحميل : Loading dye solution**

| | |
|---|---|
| 0.1g | Sodium dodecyl sulfate ( SDS ) . |
| 25 mg | Bromophenol blue . |
| 7 ml | Dist. $H_2O$ . |
| 3 ml | Glycerol . |

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

# الفصل الرابع

# الـنـتـــائـج

# Results

تم تصميم هذه الدراسة لتقييم السمية الوراثية للكادميوم وقدرته على إحداث موت خلوي مبرمج في فئران التجارب الحية . استخدم اختبار السيادة المميتة لتقييم السمية الوراثية في الخلايا التناسلية ، أما اختبار النواة الدقيقة فلتقييم تلك السمية في الخلايا الجسدية . كما استخدم اختبار سلم الدنا كمؤشر على حدوث الموت الخلوي المبرمج في خلايا أكباد الفئران المعاملة .

وبالإضافة إلى ما سبق ، فقد تمت دراسة التأثير الوقائي المحتمل لمضاد الأكسدة المصنع بيوتيلاتيد هيدروكسي تولوين من التأثير السمي الوراثي والمحدث للموت الخلوي المبرمج للكادميوم .

## ٤. ١. اختبار النواة الدقيقة :

كما ذكرنا في الفصل الثالث ( المواد والطرق ) فقد استخدمت ذكور وإناث فئران السلالة SWR/J لإجراء اختبار النواة الدقيقة . كل من ١٤ مجموعة التي استخدمت كانت عبارة عن ٤ ذكور و ٤ إناث .

داخل المجموعة الواحدة ، تم - إحصائياً - مقارنة النتائج المتحصل عليها من الذكور مع تلك المتحصل عليها من الإناث . أوضحت تلك المقارنة تجانس النتائج بين الجنسين حيث لم تكن هناك اختلافات ذات أهمية إحصائية بين نتائج الجنسين . وبناءً

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

على ذلك فقد تم تجميع نتائج الذكور والإناث داخل كل مجموعة والتعامل معها في سائر التحليلات الإحصائية باعتبارها مجموعة واحدة تتكون من ثمانية حيوانات .

فحصت شرائح نخاع العظام المحضرة لتسجيل عدد الخلايا متعددة الصبغة المحتوية على الأنوية الدقيقة $MNPCE_s$ ( شكل ٧ ) ضمن ٥٠٠ خلية متعددة الصبغة لكل حيوان وكذلك الخلايا المتعادلة الصبغة المحتوية على الأنوية الدقيقة $MNNCE_s$ ( شكل ٨ ) ضمن عدد الخلايا المتعادلة الصبغة التي تم رصدها أثناء تسجيل الـ ٥٠٠ خلية المتعددة الصبغة .

**٤. ١. ١. <u>المعاملة بالكادميوم منفرداً</u> :**

يتضح من الجدول ٢ أن المجموعات الثلاث التي فحصت بعد ٢٤ساعة من المعاملة بكل من الجرعات الثلاث من كلوريد الكادميوم المستخدمة في هذه الدراسة ( ٢، ٤، ٦ مجم/ كجم من وزن الجسم ) ، قد ازداد بها عدد الخلايا متعددة الصبغة المحتوية على أنوية دقيقة $MNPCE_s$ من بين كل ١٠٠٠خلية متعددة الصبغة ( $MNPCE_s$ ‰ ) ووصلت هذه الزيادة إلى مستوى ذو أهمية إحصائية ( $p<0.05$ ) بعد المعاملة بكل من الجرعات الثلاث ، مقارنة بالقيم المسجلة من المجموعة الضابطة السالبة .

من ناحية أخرى ، فإن عدد الخلايا متعادلة الصبغة المحتوية على أنوية دقيقة $MNNCE_s$ من بين كل ١٠٠٠ خلية متعادلة الصبغة ( $MNNCE_s$ ‰ ) قد ازداد بعد المعاملة بالجرعات الثلاث ولكن هذه الزيادة وصلت إلى مستوى ذو أهمية إحصائية

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

( $p<0.05$ ) فقط بعد المعاملة بالجرعة المتوسطة ( ٤مجم/ كجم من وزن الجسم ) عند مقارنتها بنتائج المجموعة الضابطة السالبة .

الزيادة التي لوحظت في $MNPCE_s$ ‰ ، $MNNCE_s$ ‰ في المجموعات التي عوملت لمدة ٢٤ ساعة بالكادميوم - منفرداً - لم تكن زيادة معتمدة على الجرعة Dose-dependant حيث وصلت إلى أقصى مستوى لها بعد المعاملة بالجرعة المتوسطة ( ٤مجم/ كجم من وزن الجسم ) ثم انخفضت بعد المعاملة بالجرعة المحتملة القصوى ( ٦مجم/ كجم من وزن الجسم ) ( جدول ٢ وشكل ٩ ) .

باستخدام معاملي الارتباط والانحدار وخط الانحدار المقابل لهما ، تم تقييم العلاقة بين جرعة الكادميوم والزيادة في النسبة المئوية لكل من $MNPCE_s$ ( $\%MNPCE_s$ ) و $MNNCE_s$ ( $\%MNPCE_s$ ) لكل حيوان ( الشكلان ١٠ ، ١١على التوالي ) . يتضح من الشكلين السابقين أن الزيادة في $\%MNPCE_s$ ( $R^2 = 0.045$ ) و $MNNCE_s$ % ( $R^2 = 0.1359$ ) هي زيادة غير معتمدة على الجرعة.

عند أخذ العينات بعد ٤٨ساعة من المعاملة بكل من الجرعات الثلاث من كلوريد الكادميوم ، لم تلاحظ أية زيادة ذات أهمية إحصائية في عدد أي من $MNPCE_s$ ‰ أو $MNNCE_s$ ‰ مقارنة بالمجموعة الضابطة السالبة ( جدول ٢ ) لهذا لم نجد ما يدعو إلى دراسة تأثير المعاملة المشتركة مع BHT على نتائج هذه المجموعات . الشكلان ١٢ و ١٣ يوضحان متوسط النسبة المئوية ( $\pm$ SE % ) لكل

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

من $MNPCE_s$ و $MNNCE_s$ على التوالي بعد ٢٤ ساعة و ٤٨ ساعة من المعاملة بكلوريد الكادميوم منفرداً.

النسبة المئوية للخلايا متعددة الصبغة ( $PCE_s$ % ) ضمن العدد الكلي لخلايا الدم الحمراء ($PCE_s + NCE_s$) انخفضت انخفاضاً ذا أهمية إحصائية فقط بعد المعاملة بالجرعة المحتملة القصوى ( ٦مجم/ كجم من وزن الجسم ) في المجموعتين اللتين تم فحصهما بعد ٢٤ساعة أو ٤٨ ساعة من المعاملة .

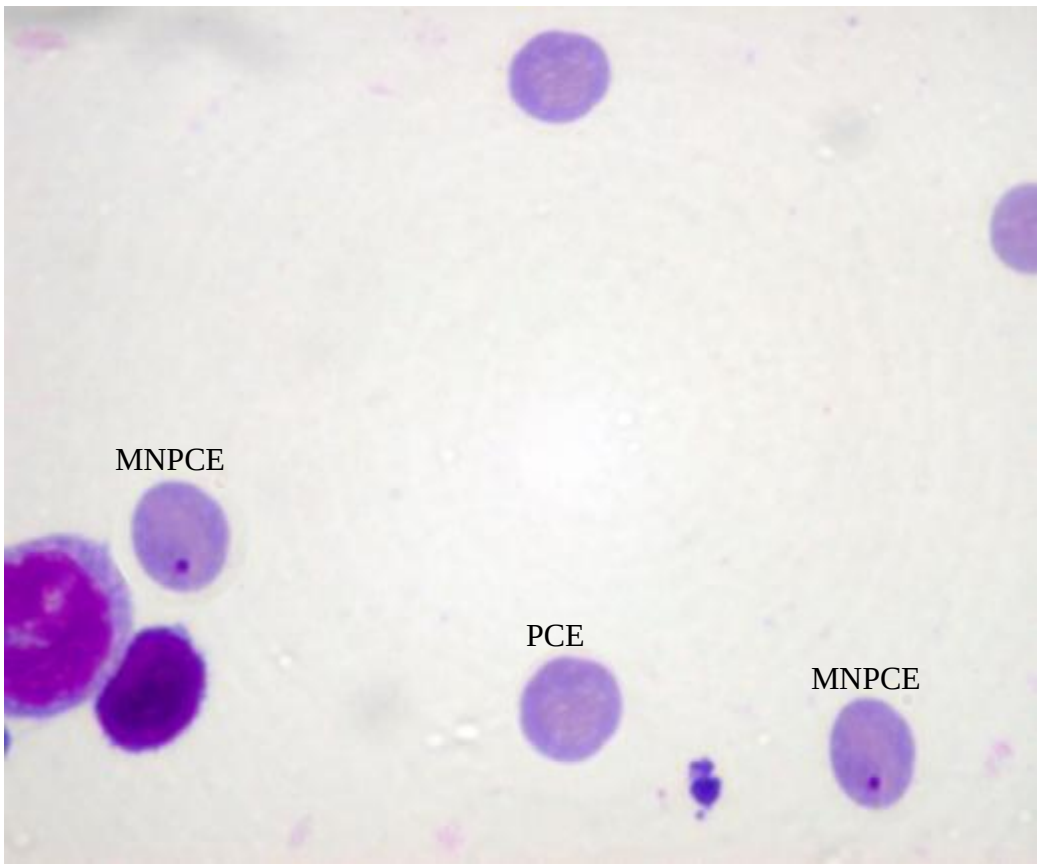
**٤. ١. ٢. المعاملة المشتركة بالكادميوم وبيوتيلاتيد هيدروكسي تولوين :**

المعاملة بالجرعة ٢٠٠مجم/ كجم من وزن الجسم من بيوتيلاتيد هيدروكسي تولوين ( BHT ) قبل ٦ساعات من المعاملة لمدة ٢٤ ساعة بكل من الجرعات الثلاث من كلوريد الكادميوم أدت إلى انخفاض واضح في $MNPCE_s$ ‰ و $MNNCE_s$‰ بحيث أصبحت القيم المسجلة قريبة من مستوى القيم المسجلة من المجموعة الضابطة السالبة ( جدول ٢ وشكل ٩ ) . المعاملة المشتركة بكلوريد الكادميوم وBHT أدت إلى تحسن $PCE_s$ % بعد ٢٤ ساعة من المعاملة بحيث لم يعد هناك اختلاف ذو أهمية إحصائية بينها وبين القيمة المتحصل عليها من المجموعة الضابطة السالبة ( جدول ٢ ) .

المجموعة الضابطة الموجبة والتي عوملت بالفوسفاميد الحلقي Cyclophosphamide ( CP ) ( ٥٠ مجم/ كجم من وزن الجسم ) والتي قتلت بعد ٢٤ ساعة من المعاملة ، ازداد بها عدد $MNPCE_s$ ‰ و $MNNCE_s$ ‰ زيادة

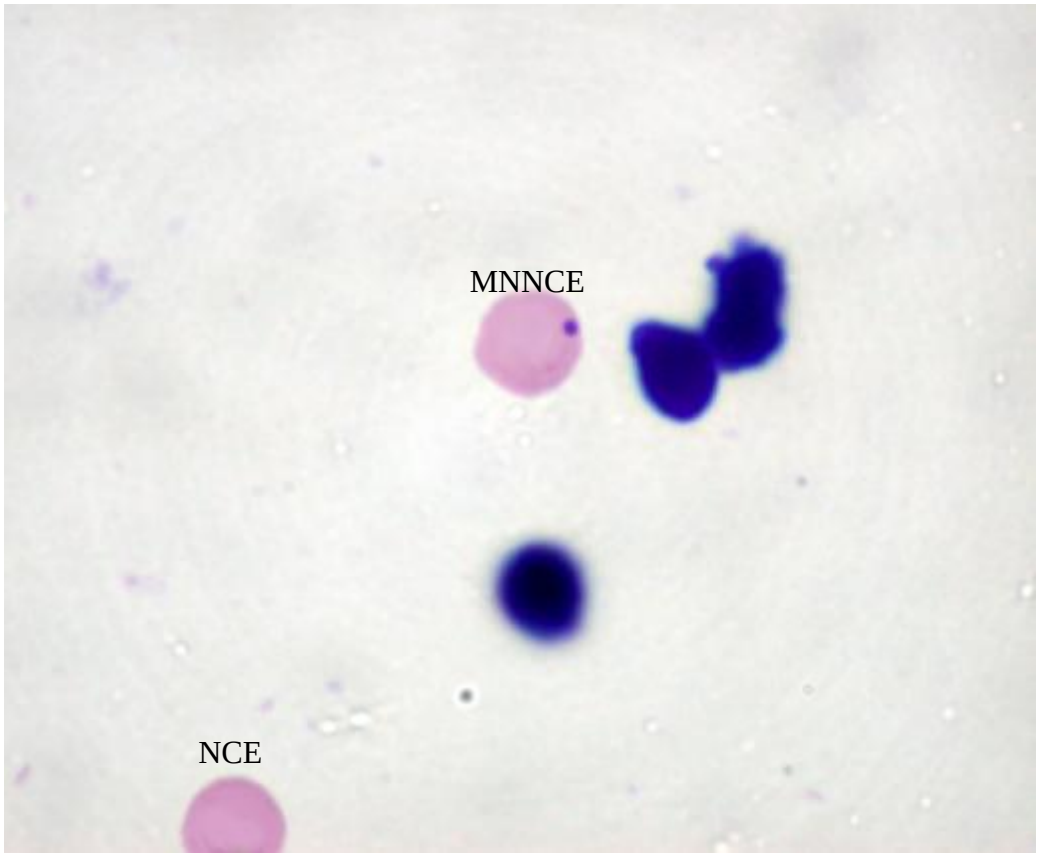
PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ذات أهميــة إحصــائية وكــذلك النســبة المئويــة للخلايــا متعــددة الصــبغة $\%PCE_s$ ( جدول ٢ ) .




**شكل ٧ :** سحبة نخاع عظام من فأر توضح كرات دم حمراء متعددة الصبغة ( $PCE_s$ ) وكرات دم حمراء متعددة الصبغة محتوية على نواة دقيقة ( $MNPCE_s$ ) .

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com




**شكل ٨ :** سحبة نخاع عظام من فأر توضح كرة دم حمراء متعادلة الصبغة ( NCE ) و كرة دم حمراء متعادلة الصبغة محتوية على نواة دقيقة ( MNNCE ) .

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

**Table 2** : Effect of cadmium chloride ( $CdCl_2$ ) alone or in combination with butylated hydroxytoluene ( BHT ) on micronucleus induction in bone marrow cells of SWR/J mice .

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

| ɔups | Test substance | Dose (mg/kg) | Sampling time (h) | Number of examined $PCE_s$ | $\%PCE_s$ | Micronucleated cells per 1000 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | $PCE_s$ | $NCE_s$ |
| 1 | -ve control | 0 | 24 | 4000 | 44.0 | 1.00 | 1.38 |
| 2 | $CdCl_2$ | 2 | 24 | 4000 | 37.9 | 2.50* | 2.29 |
| 3 | $CdCl_2$ | 4 | 24 | 4000 | 40.9 | 14.75* | 10.90* |
| 4 | $CdCl_2$ | 6 | 24 | 4000 | 17.0* | 6.25* | 6.05 |
| 5 | $CdCl_2$+BHT | 2+200 | 24 | 4000 | 42.3 | 1.25 | 1.65 |
| 6 | $CdCl_2$+BHT | 4+200 | 24 | 4000 | 39.0 | 1.50 | 2.24 |
| 7 | $CdCl_2$+BHT | 6+200 | 24 | 4000 | 38.0 | 1.75 | 1.56 |
| 8 | $CdCl_2$ | 2 | 48 | 4000 | 52.5 | 1.75 | 2.21 |
| 9 | $CdCl_2$ | 4 | 48 | 4000 | 58.9 | 1.00 | 0.36 |
| 10 | $CdCl_2$ | 6 | 48 | 4000 | 32.8* | 0.25 | 0.24 |
| 11 | BHT | 200 | 24 | 4000 | 45.0 | 1.25 | 1.43 |
| 12 | BHT | 200 | 30 | 4000 | 49.3 | 0.25 | 0.73 |
| 13 | Tween 80 | - | 30 | 4000 | 43.2 | 0.50 | 2.47 |
| 14 | +ve control (CP) | 50 | 24 | 4000 | 67.8* | 39.00* | 11.59* |

$PCE_s$ : Polychromatic erythrocytes .
$NCE_s$ : Normochromatic erythrocytes .
BHT : Butylated hydroxytoluene .
CP : Cyclophosphamide .
* : Significant difference from the control group at $p < 0.05$ .

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

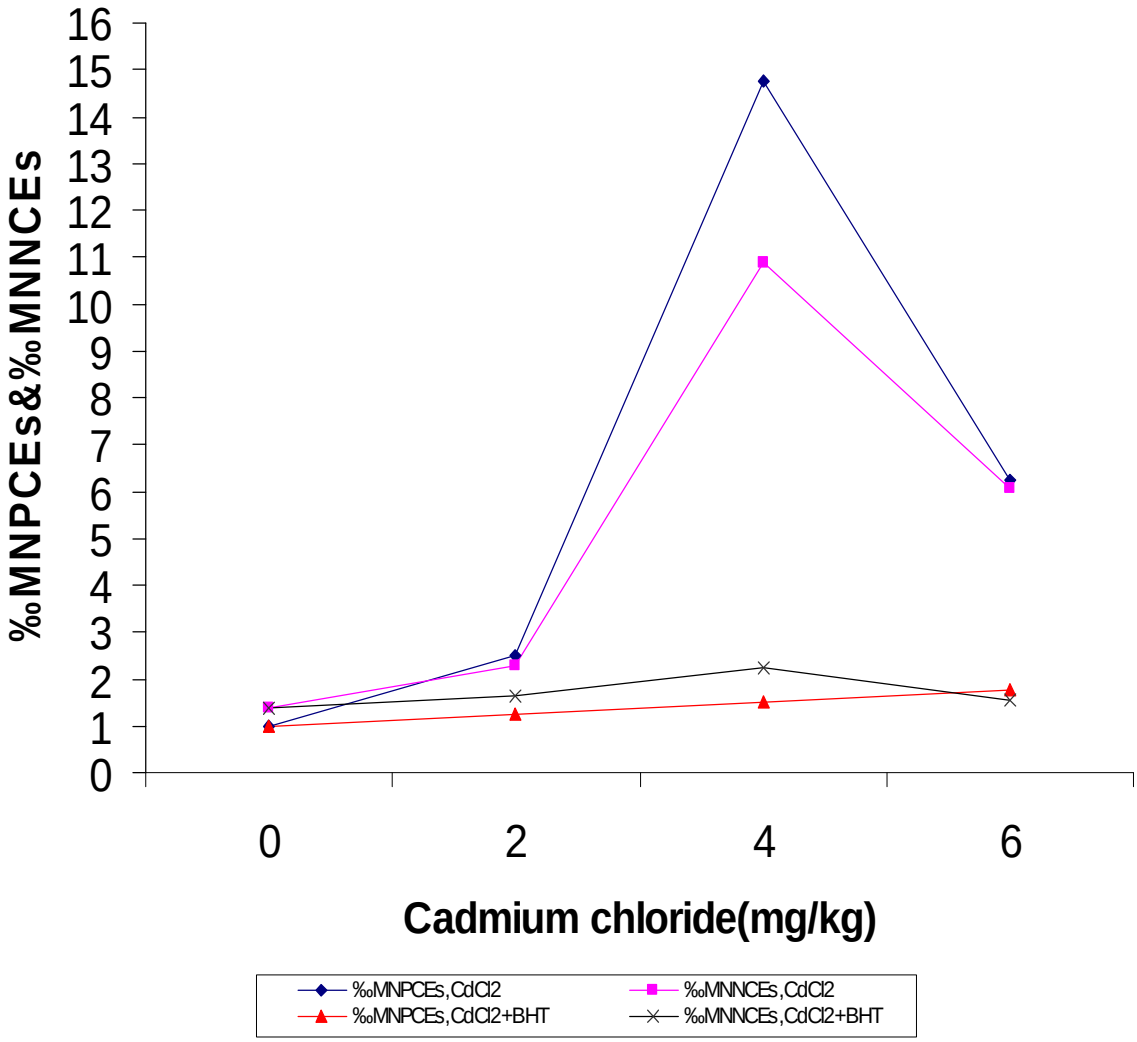



**Fig . 9 :** Dose response curve for cadmium chloride ( alone or in combination with butylated hydroxytoluene, BHT ) induction of micronuclei in $PCE_s$ ( $MNPCE_s$ ) and $NCE_s$ ( MNNCEs ) .

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

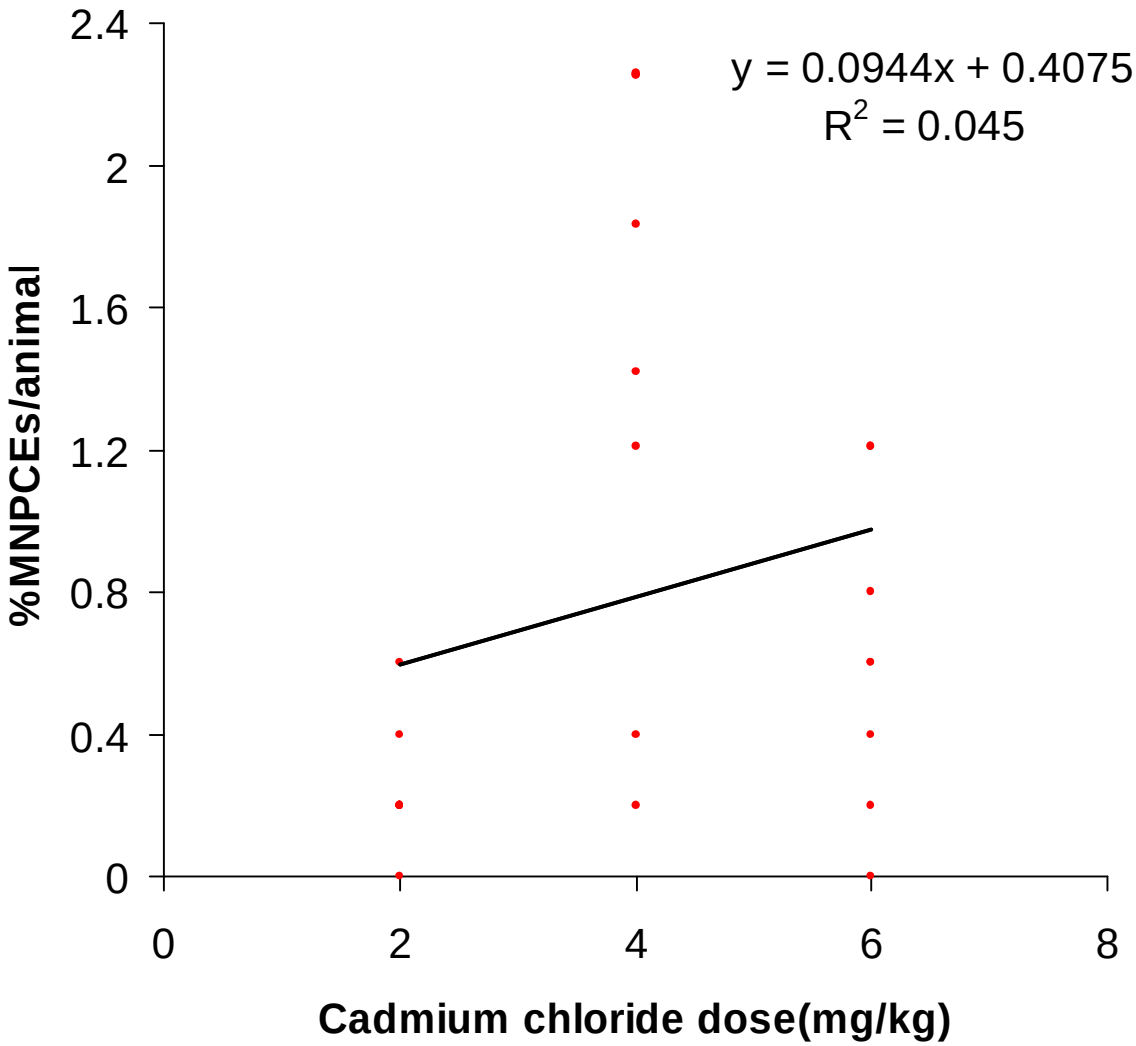



**Fig . 10:** Correlation coefficient and regression line of groups treated with cadmium chloride alone ( % $MNPCE_s$ ) .

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

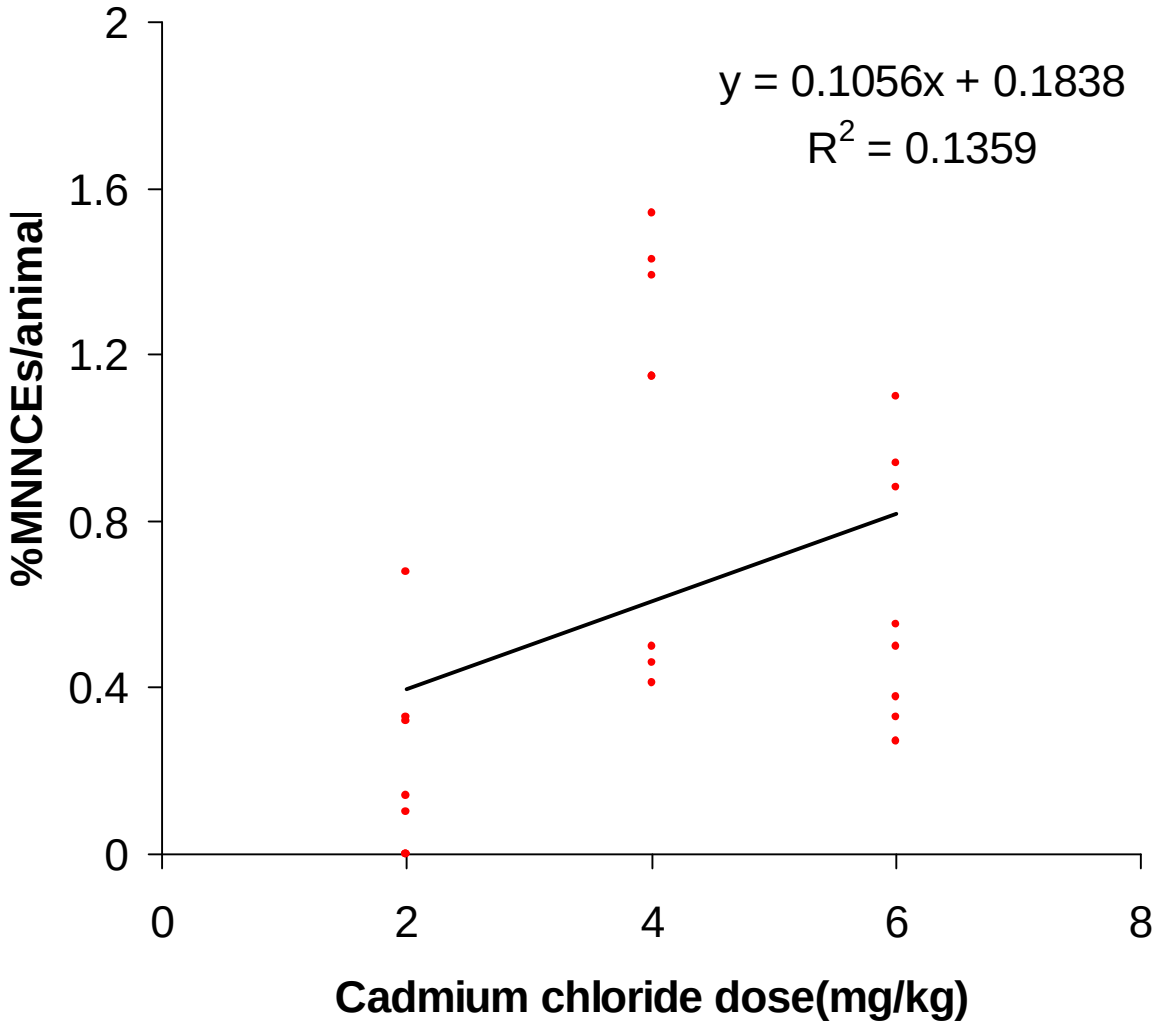
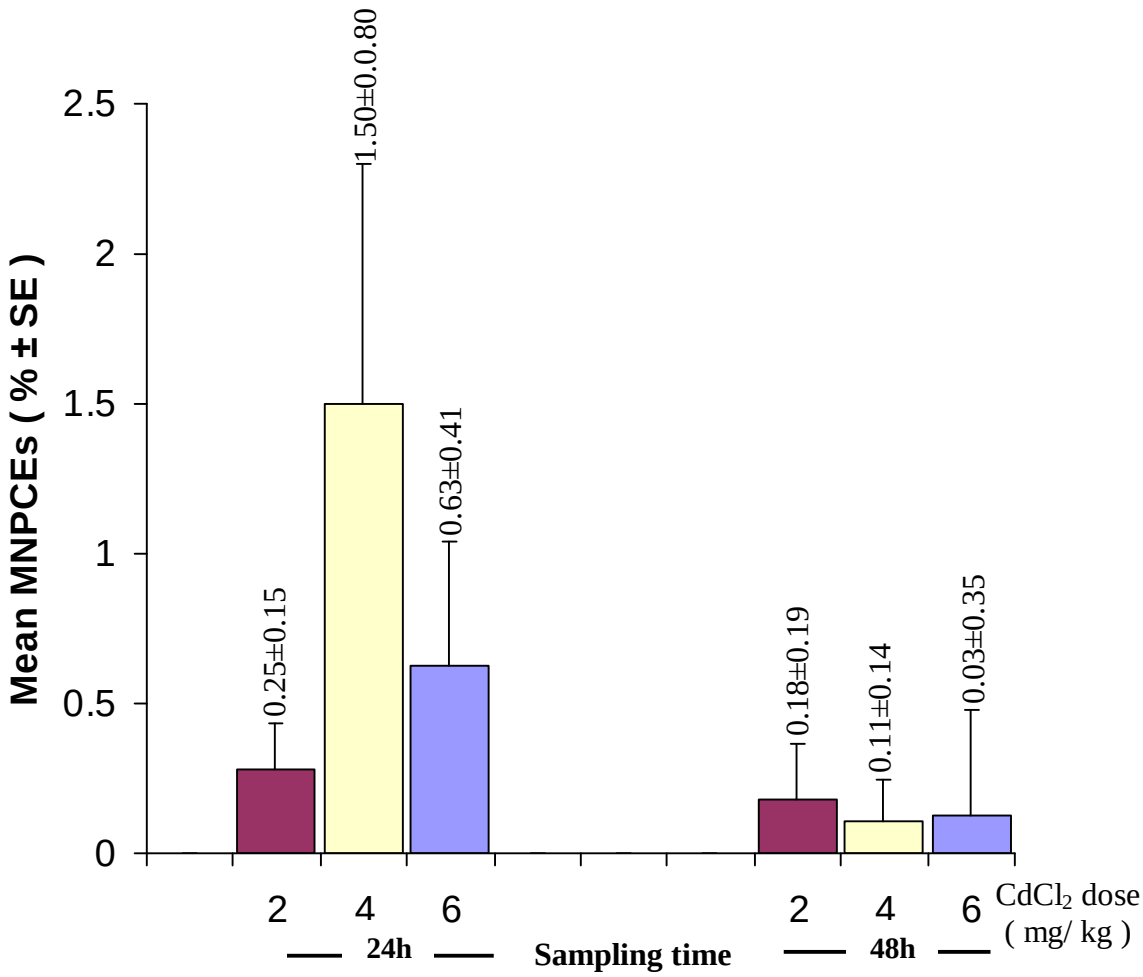



**Fig. 11 :** Correlation coefficient and regression line of groups treated with cadmium chloride alone ( % $MNNCE_s$ ) .

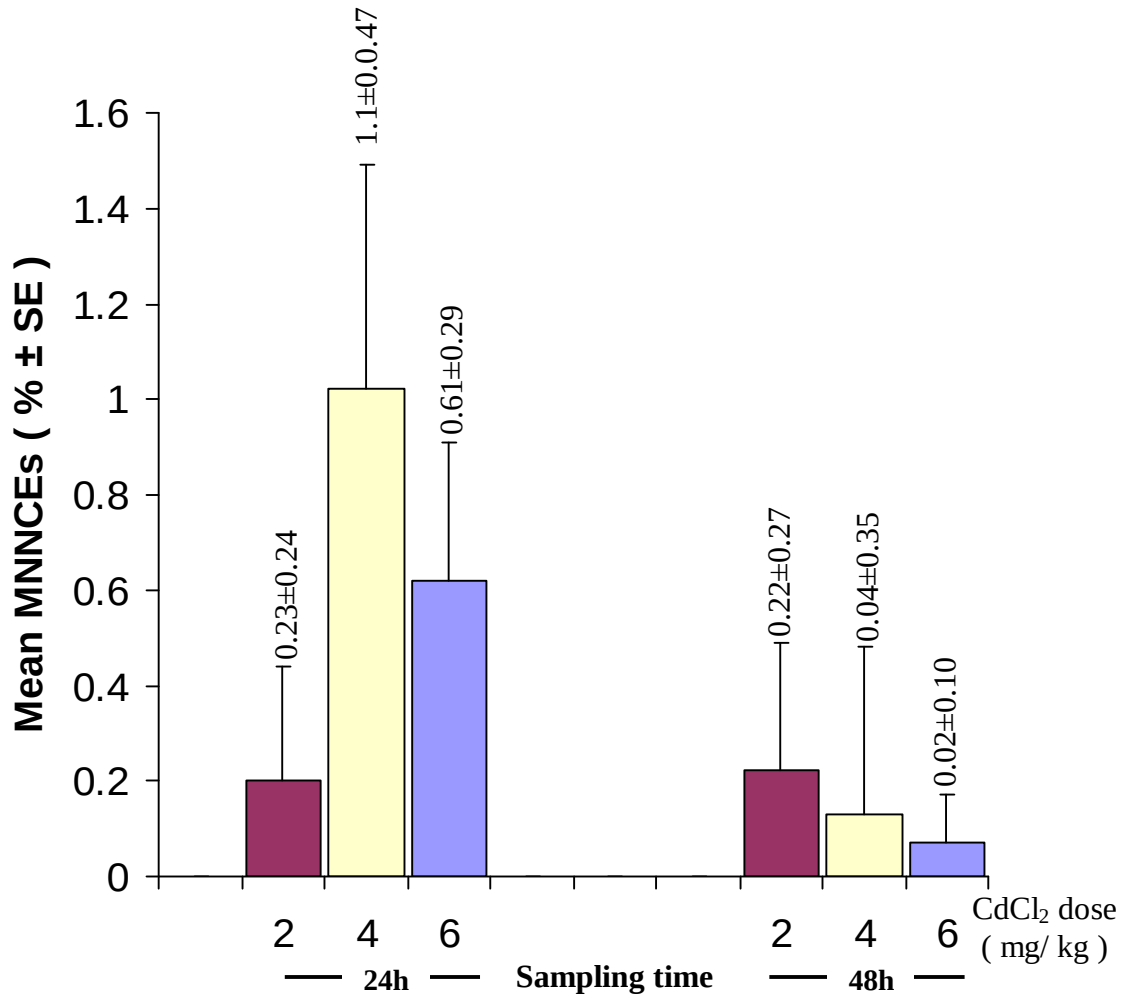
PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com




MNPCEs: micronucleated polychromatic erythrocytes.

**Fig. 12 :** Effect of sampling time on the induction of micronuclei in polychromatic erythrocytes ( $MNPCE_s$ ) of bone marrow cells of mice treated with different doses of cadmium chloride ( $CdCl_2$ ) .

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com




MNNCEs: micronucleated normochromatic erythrocytes .

**Fig. 13 :** Effect of sampling time on the induction of micronuclei in normochromatic erythrocytes ( $MNNCE_s$ ) of bone marrow cells of mice treated with different doses of cadmium chloride ( $CdCl_2$ ) .

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

**٤. ٢. اختبار السيادة المميتة :**

**٤. ٢. ١. المعاملة بالكادميوم منفرداً :**

تم إجراء اختبار السيادة المميتة باستخدام ذكور الفئران SWR/J عوملت بجرعة منفردة من كلوريد الكادميوم قدرها ٠,٦ مجم/كجم من وزن الجسم ، والتي تزاوجت مع إناث عذارى بالغة ، غير معاملة لثماني فترات تزاوج مدة كل منها أسبوع. تم تسجيل الأرقام الأصلية المتحصل عليها ثم حساب المعدل لكل أنثى حامل Per pregnant female .

يوضح الجدول ٣ تأثير المعاملة بكلوريد الكادميوم على خصوبة الذكور ، كما تشير إلى ذلك النسبة المئوية للإناث الحوامل. ويتضح من الجدول ٣ أن نسبة الإناث الحوامل انخفضت انخفاضاً ذا أهمية إحصائية عند فترة التزاوج الثانية ( w2 ) فقط ، حيث بلغت ٤٠ ٪ مقارنة بنسبة ٧٦,٦ ٪ في المجموعة الضابطة .

الجدولان ٤ ، ٥ يوضحان النتائج المتحصل عليها بعد المعاملة بكلوريد الكادميوم . فالجدول ٤ يوضح حدوث انخفاض ذي أهمية إحصائية في معدل عدد العلقات لكل أنثى حامل في المجموعات المعاملة ، مقارنة بالمجموعة الضابطة عند فترات التزاوج الأولى ( w1 ) والثانية ( w2 ) والخامسة ( w5 ) والسادسة ( w6 ) والثامنة ( w8 ) . ويلاحظ من هذا الجدول أن أقصى انخفاض تم تسجيله بعد فترة التزاوج الثانية ( w2 ) . ارتفع معدل عدد العلقات التي فقدت في مرحلة ما قبل الانغراس(Pre-implantation loss ) ارتفاعاً ذا أهمية إحصائية عند فترة التزاوج السادسة( w6 ) فقط .

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

أما الجدول ٥ فيوضح أن معدل عدد العلقات الحية لكل أنثى حامل انخفض معنوياً بعد فترات التزاوج الأولى ( w1 ) والثانية ( w2 ) و الخامسة ( w5 ) والسادسة ( w6 ) والثامنة ( w8 ) مع أقصى انخفاض عند الفترة الثانية ( w2 ). الزيادة في معدل عدد العلقات المفقودة لكل أنثى حامل في مرحلة ما بعد الانغراس ( Post-implantation loss ) وصلت إلى مستوى ذي أهمية إحصائية فقط عند فترتي التزاوج الثانية ( w2 ) والثالثة ( w3 ) . أما معدل العدد الكلى للعلقات المفقودة في مرحلة ما قبل وما بعد الانغراس Pre- and Post- loss implantation فقد ازداد زيادة ذات أهمية معنوية إحصائياً فقط عند فترة التزاوج السادسة ( w6 ) .

**٤. ٢. ٢. المعاملة المشتركة بالكادميوم وبيوتيلاتيد هيدروكسي تولوين : ( BHT )**

من النتائج التي سبق عرضها ، والتي تحصلنا عليها بعد معاملة الذكور بكلوريد الكادميوم - منفرداً - لوحظ أن المؤشرات المهمة للدلالة على السيادة المميتة ( فقد العلقات قبل أو بعد الانغراس بالإضافة إلى الفقد في العدد الكلي للعلقات بالنسبة لعددها الكلي ( D/T أو Dead / Total ) ) قد ارتفعت ارتفاعاً ذا أهمية إحصائية بعد فترات التزاوج السادسة (w6) للفقد قبل الانغراس Pre-implantation والثانية ( w2 ) والثالثة ( w3 ) للفقد بعد الانغراسPost-implantation . أما النسبة المئوية للعلقات المفقودة بالنسبة للعدد الكلى للعلقات ( % D/T ) فسجلت أعلى قيم لها بعد فترات التزاوج الثانية ( ١٢٪ ) والسادسة ( ١١,٨٣٪ ) . ومما سبق

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

نجد أن أكثر فترات التزاوج تأثراً بالمعاملة بالكادميوم - منفرداً - هي فترتا التزاوج الثانية ( w2 ) والسادسة ( w6 ) . وبناءً على ذلك ، فقد تقرر دراسة تأثير المعاملة بمضاد الأكسدة المصنع BHT قبل ٦ساعات من المعاملة بالكادميوم على مؤشرات فترتي التزاوج الثانية والسادسة فقط .

الجدول ٦ يوضح أن المعاملة بـ BHT قبل ٦ساعات من المعاملة بالكادميوم قد أدت إلى تحسن جميع المؤشرات التي درست بعد فترتي التزاوج الثانية والسادسة مقارنة بمؤشرات نفس فترتي التزاوج بعد المعاملة بالكادميوم منفرداً .

نتائج فترة التزاوج الثانية أظهرت تحسناً في معدل عدد العلقات ومعدل عدد العلقات الحية لكل أنثى حامل ، إلا أن هذه المؤشرات ظلت منخفضة عن مستوى المجموعة الضابطة انخفاضاً ذا أهمية إحصائية . معدل عدد العلقات المفقودة بعد الانغراس تحسن تحساً ذا أهمية إحصائية ليصل إلى مستوى المجموعة الضابطة.

النتائج التي تحصلنا عليها بعد فترة التزاوج السادسة ، أوضحت أن جميع المؤشرات قد اقتربت من مؤشرات المجموعة الضابطة ولم يعد هناك اختلافات ذات أهمية إحصائية بين أي من مؤشرات المجموعتين . معدل عدد العلقات المفقودة قبل الانغراس ومعدل العدد الكلي للأجنة المفقودة انخفضا انخفاضاً ذا أهمية إحصائية في المجموعة التي عوملت بالكادميوم و BHT معاً عند مقارنتها بالمجموعة المعاملة بالكادميوم منفرداً .

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

**Table 6:** Dominant lethal test at mating periods 2 and 6 weeks post-treatment of male SWR/J mice with 0.6mg/kg cadmium chloride alone or in combination with 6h pretreatment with 200 mg/kg butylated hydroxytoluene (BHT) .

| Average no. of total implantation loss / pregnant female | Average no. of post-implantation loss / pregnant female | Average no. of pre-implantation loss / pregnant female | Average no. of living implantations / pregnant female | Average no. of implantations / pregnant female | Treatment | Mating Period (weeks ) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 0.70 | 0.00 | 0.70 | 12.65 | 13.34 | control | |
| 1.09 | 0.18* | 0.91 | 8.00* | 9.10* | $CdCl_2$ | W2 |
| 0.57 | 0.00[a] | 0.57 | 9.86* | 10.43* | $CdCl_2$+BHT | |
| 1.41* | 0.14 | 1.27* | 10.50* | 11.91* | $CdCl_2$ | W6 |
| 0.63[b] | 0.07 | 0.56[b] | 11.89 | 12.52 | $CdCl_2$+BHT | |

* : Significant difference from the control group at $P < 0.05$ .

a : Significant difference from $CdCl_2$ ( week $_2$ ) at $P < 0.05$ .

b : Significant difference from $CdCl_2$ ( week $_6$ ) at $P < 0.05$ .

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

**Table 4 :** Dominant lethal test after single i.p. treatment of male SWR/J mice with 0.6 mg/kg cadmium chloride-**Pre-implantation loss.**

| | Stem cells | Stem cells | Spermatogonia | Early spermatocytes | Late spermatocytes | Early spermatids | Late spermatids | Epididymas sperms | Germ cell stages and corresponding mating periods Parameters scored |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| control | w8 | w7 | w6 | w5 | w4 | w3 | w2 | w1 | |
| 307 | 201 | 212 | 262 | 270 | 303 | 262 | 100 | 189 | Total no. of implantations |
| 13.34 | 10.58* | 12.47 | 11.91* | 11.25* | 13.17 | 13.10 | 9.10* | 10.50* | Average number of implantations / pregnant female |
| 16.00 | 19.00 | 16.00 | 28.00 | 15.00 | 13.00 | 9.00 | 10.00 | 9.00 | Total no. of pre – implantation loss |
| 0.70 | 1.00 | 0.94 | 1.27* | 0.63 | 0.57 | 0.45 | 0.91 | 0.50 | Average number of pre - implantation loss / pregnant female |

* : Significant difference from control group at $P < 0.05$

.

w : week .

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

**Table 5 :** Dominant lethal test after single i.p. treatment of male SWR/J mice with 0.6 mg/kg cadmium chloride-**Post- implantation loss .**

| Germ cell stages and corresponding mating periods Parameters scored | Epididymas sperms | Late spermatids | Early spermatids | Late spermatocytes | Early spermatocytes | Spermatogonia | Stem cells | Stem Cells | control |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | w1 | w2 | w3 | w4 | w5 | w6 | w7 | w8 | |
| Total no. of living implantations | 180 | 88 | 247 | 288 | 254 | 231 | 195 | 182 | 291 |
| Average number of living implantations / pregnant female | 10.00* | 8.00* | 12.35 | 12.52 | 10.58* | 10.50* | 11.47 | 9.58* | 12.65 |
| Total no. of post – implantation loss | 0.00 | 2.00 | 6.00 | 2.00 | 1.00 | 3.00 | 1.00 | 0.00 | 0.00 |
| Average number of post-implantations loss / pregnant female | 0.00 | 0.18* | 0.30* | 0.09 | 0.04 | 0.14 | 0.06 | 0.00 | 0.00 |
| Total no. of implantation loss (pre - and post-) | 9.00 | 12.00 | 15.00 | 15.00 | 16.00 | 31.00 | 17.00 | 19.00 | 16.00 |
| Average number of implantation loss (pre -and post-) / pregnant female | 0.50 | 1.09 | 1.25 | 0.65 | 0.67 | 1.41* | 1.00 | 1.00 | 0.70 |
| Dead implantations/Total implantations D/T ( % ) | 9/189 ( 4.76 ) | 12/100 ( 12 ) | 15/262 ( 5.73 ) | 15/303 ( 4.95 ) | 16/270 ( 5.93 ) | 31/262 ( 11.83 ) | 17/212 ( 8.02 ) | 19/201 ( 9.45 ) | 16/307 ( 5.21) |

* : Significant difference from control group at $P < 0.05$ .

w : week .

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

**Table 6:** Dominant lethal test at mating periods 2 and 6 weeks post-treatment of male SWR/J mice with 0.6mg/kg cadmium chloride alone or in combination with 6h pretreatment with 200 mg/kg butylated hydroxytoluene (BHT) .

| Average no. of total implantation loss / pregnant female | Average no. of post-implantation loss / pregnant female | Average no. of pre-implantation loss / pregnant female | Average no. of living implantations / pregnant female | Average no. of implantations / pregnant female | Treatment | Mating Period (weeks ) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 0.70 | 0.00 | 0.70 | 12.65 | 13.34 | control | |
| 1.09 | $0.18^{*}$ | 0.91 | $8.00^{*}$ | $9.10^{*}$ | $CdCl_2$ | W2 |
| 0.57 | $0.00^{a}$ | 0.57 | $9.86^{*}$ | $10.43^{*}$ | $CdCl_2$+BHT | |
| $1.41^{*}$ | 0.14 | $1.27^{*}$ | $10.50^{*}$ | $11.91^{*}$ | $CdCl_2$ | W6 |
| $0.63^{b}$ | 0.07 | $0.56^{b}$ | 11.89 | 12.52 | $CdCl_2$+BHT | |

* : Significant difference from the control group at $P < 0.05$ .

a : Significant difference from $CdCl_2$ ( week $_2$) at $P < 0.05$ .

b : Significant difference from $CdCl_2$ ( week $_6$) at $P < 0.05$ .

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

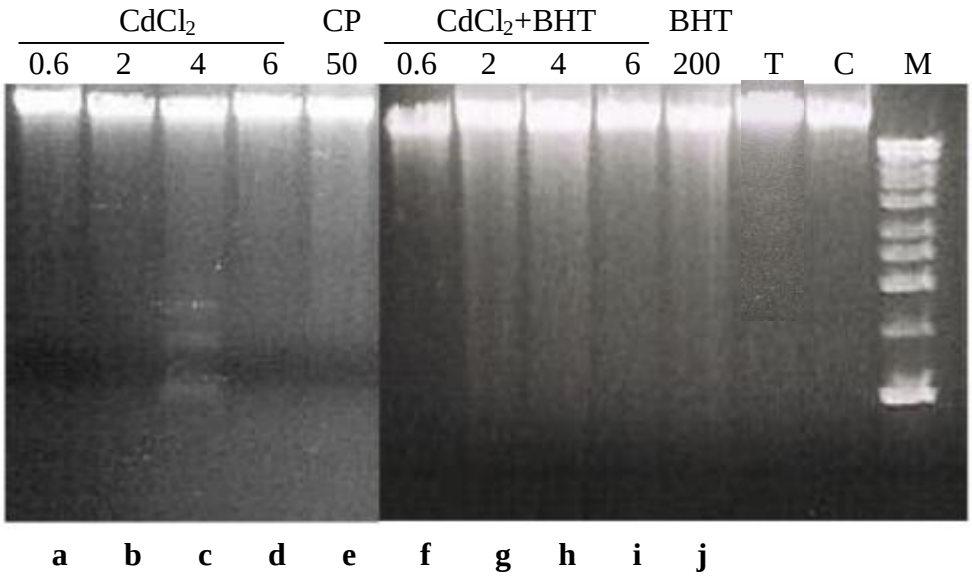
**٤. ٣. <u>اختبار سلم الدنا</u> :** نتائج اختبار سلم الدنا تم تجميعها في الشكل ١٤ لتسهيل المقارنة بين المعاملات المختلفة .

أدت المعاملة بالجرعات الثلاث ٢، ٤ ، ٦ مجم/كجم من وزن الجسم من كلوريد الكادميوم - منفرداً - إلى زيادة الموت الخلوي المبرمج المتمثلة في زيادة تجزئة الدنا، مقارنة بدنا الحيوانات المجموعة الضابطة السالبة ( شكل ١٤. b – d ) . وظهرت تجزئة الدنا كحزم متتالية الأطوال بعد المعاملة بالجرعة ٤ مجم/كجم من وزن الجسم ( شكل ١٤ – c ) وعلى صورة سحبة Smear بعد المعاملة بكل من الجرعتين ٢، ٦مجم/كجم من وزن الجسم ( شكل ١٤ . b و d ) . المعاملة بالجرعة الأقل من الكادميوم ( ٠,٦مجم/كجم ) لم تسبب تغيراً في تجزئة الدنا مقارنة بدنا الحيوانات غير المعاملة ( المجموعة الضابطة السالبة ) ( شكل ١٤ – a ) .

لم تؤد المعاملة المشتركة بكل من الجرعات ٢، ٤، ٦ مجم/كجم من كلوريد الكادميوم و BHT إلى تثبيط الموت الخلوي المبرمج ، بل يبدو أنها استحثته كما يظهر من زيادة تجزئة دنا ( شكل ١٤ . g - i ) مقارنة بالمعاملة بالكادميوم منفرداً . وهذه الزيادة في تجزئة الدنا تبدو مشابهة لتلك التي أحدثتها المعاملة بمضاد الأكسدة BHT منفرداً ( شكل ١٤- j ) .

المعاملة المشتركة بـ BHT و الجرعة ٠,٦مجم/كجم من وزن الجسم من كلوريد الكادميوم ( شكل ١٤- f ) والمعاملة بالمذيب Tween 80 ( شكل ١٤- T ) لم تظهر اختلافاً في معدل الموت الخلوي المبرمج مقارنة بالحيوانات غير المعاملة ( المجموعة الضابطة السالبة ) ( شكل ١٤- C ) .

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com




**شكل ١٤ :** الفصل الكهربائي على هلام الأجاروز للدنا المستخلص من خلايا أكباد الفئران المعاملة بجرعات مختلفة من كلوريد الكادميوم منفرداً ( a – d ) . دنا حيوان معامل بـ( CP) المجموعة الضابطة الموجبة ( e) . أو مشتركاً مع مضاد الأكسدة بيوتيلاتيد هيدروكسي تولوين BHT ( f-i ) و BHT منفرداً ( j ) والمذيب توين ٨٠ Tween 80 ( T ) . دنا حيوان غير معامل ( المجموعة الضابطة السالبة ) ( C ) ومؤشر جزيئي( M ) . الأرقام أعلى الهلام تمثل الجرعات المستخدمة (مجم/كجم ).

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

# الفصل الخامس

# المنـــاقشة

# Discussion

أجريت العديد من الدراسات لتقييم السمية الوراثية للكادميوم , حيث تم اختبار سميته الوراثية في البكتيريا والنباتات والحشرات وخلايا الثدييات ، بما فيها خلايا الإنسان ، سواءً خارج الجسم *in vitro* أو داخله *in vivo* .

نتائج تلك الدراسات جاءت إما سالبة تنفي سمية الكادميوم الوراثية ، أو إيجابية تؤكد تلك السمية [ الفصل الثاني: الدراسات السابقة ، ص ٢٩ قسم ٢. ٤. ٢. ] . ولقد أدت تلك النتائج إلى إعطاء صورة غير واضحة أو مبهمة للسمية الوراثية للكادميوم وقد يعزى سبب ذلك إلى استخدام اختبارات مختلفة، وغالباً طرق وخطط عمل مختلفة.

تم تصميم الدراسة الحالية بهدف إلقاء مزيدٍ من الضوء حول التأثيرات الوراثية والخلوية الضارة للكادميوم في الخلايا الجسدية والتناسلية داخل جسم الفأر الحي . فقد استخدمت خلايا نخاع العظام لدراسة التأثيرات السمية الوراثية في الخلايا الجسدية عن طريق اختبار النواة الدقيقة واختبار السيادة المميتة لدراسة السمية الوراثية للكادميوم في الخلايا التناسلية بخصي الذكور الحية .

وبالتوازي مع تقييم السمية الوراثية للكادميوم ، استخدمت الزيادة في معدل الموت الخلوي المبرمج كمؤشر على سميته الخلوية وذلك بالكشف عن تجزئة الدنا أو ما يعرف بسلم الدنا ( DNA Ladder ) في خلايا أكباد الفئران الحية .

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

وبالإضافة إلى ما سبق ، ولإلقاء المزيد من الضوء على آليات السمية الوراثية والخلوية للكادميوم ، تمت دراسة تأثير المعاملة المشتركة بالكادميوم ومضاد الأكسدة المصنع بيوتيلاتيد هيدروكسي تولوين ( BHT ) على تلك التأثيرات السامة الوراثية والخلوية للكادميوم .

**٥. ١. المعاملة بالكادميوم منفرداً :**

**٥. ١. ١. السمية الوراثية فى الخلايا الجسدية :**

تتبع أهمية تقييم قدرة الكيماويات المختلفة على إحداث أضرار كروموسومية من المعلومات التي تراكمت عبر العديد من السنوات والعديد من الدراسات التي أوضحت أن معظم - إن لم يكن كل- السرطانات تتميز بتغيرات كروموسومية تكون مرتبطة عادةً بنوع معين من أنواع السرطانات . ولهذا فإن المادة الكيميائية التي يمكن أن تؤدي إلى إحداث أضرار كروموسومية في الخلايا الجسدية ، ربما تمثل خطراً من حيث إمكانية تسببها في الإصابة بالسرطان و/أو خطر إحداث أضرار بالخلايا التناسلية.

اختبار النواة الدقيقة Micronucleus test هو أحد أكثر اختبارات السمية الوراثية انتشارًا للكشف عن الأضرار التي تحدثها المادة موضع الاختبار بالكروموسومات أو خيوط المغزل وذلك بفحص كريات الدم الحمراء في نخاع العظام أو في دم الحيوان وخاصة القوارض . ويهدف هذا الاختبار إلى تحديد المواد

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

التـي تسـبب أضـراراً ينـتج عنهـا تكـون أنويـة دقيقـة تمثـل قطـع كروموسـومية أو كروموسومات كاملة .

وفي الدراسة الحالية ، تم استخدام اختبار النواة الدقيقة للكشف عن السمية الوراثية للكادميوم في خلايا نخاع عظام الفئران الحية . عوملت الحيوانات بثلاث جرعات من كلوريد الكادميوم هي ٢، ٤، ٦مجم/كجم من وزن الجسم والتي تمثل ٣/١، ٣/٢، الجرعة المحتملة القصوى ( MTD ) التي تم تحديدها بمعملنا ( الفصل الثالث ). تم جمع عينات نخاع العظام بعد ٢٤، ٤٨ ساعة من المعاملة وتم إحصاء كريات الدم الحمراء متعددة الصبغة ومتعادلة الصبغة المحتوية على أنوية دقيقة $MNPCE_s$ و $MNNCE_s$ على التوالي في جميع مجموعات الحيوانات المعاملة بالإضافة إلى المجموعتين الضابطتين السالبة والموجبة . ويلاحظ أن عدد $MNPCE_s$ هي المؤشر الرئيسي في اختبار النواة الدقيقة بعد المعاملة بجرعات منفردة ( Hayashi *et al.*, 1994 ) وفي هذه الحالة فإن عدد $MNNCE_s$ يمثل معلومة إضافية حول تأثير المادة موضع الاختبار . أما في حالة المعاملة المتكررة لمدة ٤أسابيع ( تقريباً فترة حياة كريات الدم الحمراء ) أو أكثر فإن عدد $MNNCE_s$ يمكن اعتباره المؤشر الرئيسي في اختبار النواة الدقيقة ( Hayashi *et al.*, 1994 ) .

المعاملة بكل من الجرعات الثلاث من كلوريد الكادميوم أدت إلى زيادة ذات أهمية إحصائية في عدد $MNPCE_s$ في المجموعات التي فحصت بعد ٢٤ ساعة من المعاملة مقارنة بالمجموعة الضابطة السالبة ، والزيادة التي لوحظت في

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

$MNPCE_s$ بلغت أعلى مستوى لها بعد المعاملة بالجرعة ٤ مجم/ كجم من وزن الجسم ( 14.75 ‰ ) ثم انخفضت بعد المعاملة بالجرعة الأعلى ٦ مجم/ كجم من وزن الجسم ( 6.25 ‰ ) . الزيادة في عدد $MNNCE_s$ متطابقة مع ما لوحظ مع $MNPCE_s$ ، أي أن الزيادة وصلت أقصاها بعد المعاملة بالجرعة ٤ مجم/ كجم من وزن الجسم ( 10.90 ‰ ) ثم انخفضت بعد الجرعة الأعلى ( 6.05 ‰ ) . وفي حالة $MNNCE_s$ لم تصل الزيادة إلى مستوى ذي أهمية إحصائية إلا في المجموعة التي عوملت بالجرعة ٤ مجم/ كجم من وزن الجسم مقارنة بالمجموعة الضابطة السالبة .

بعد حوالي ٢٤ ساعة من المعاملة ، فإنه من المتوقع أن تكون الخلايا $PCE_s$ التي تم فحصها قد تعرضت للمادة موضع الاختبار في فترة S من دورتها الخلوية الأخيرة وقبل خروج النواة . أما الخلايا $NCE_s$ الموجودة على نفس الشريحة الزجاجية فتكون قد تعدت هذه الفترة وقت المعاملة ، ولهذا فإن زيادة عدد $NCE_s$ المحتوية على أنوية دقيقة $MNNCE_s$ قد يشير إلى أن المادة موضع الاختبار قد أثرت على الخلايا أثناء فترة $G_2$ أو أثناء الانقسام الميتوزي ( M ) من دورتها الأخيرة ( Adler, 1984 ) .

وبالنظر إلى الزيادة ذات الأهمية الإحصائية في عدد $MNPCE_s$ باعتبارها المؤشر الرئيسي في اختبار النواة الدقيقة بعد المعاملة المنفردة ( Hayashi *et al.*, 1994 ) ، فإنه يمكن القول بأن الكادميوم قد أحدث سمية وراثية في خلايا نخاع عظام الفئران الحية عند جميع مستويات الجرعات المستخدمة . أما المجموعات التي

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

عوملت بـ BHT - منفرداً - وفحصت بعد ٢٤، ٣٠ ساعة من المعاملة ، وكذلك التي عوملت لمدة ٣٠ ساعة بالمذيب Tween 80 - منفرداً - لم يظهر بها أي تأثير مختلف عن المجموعة الضابطة السالبة على أي من المؤشرات التي تمت دراستها ( جدول ٢ ) .

تتوافق نتائج الدراسة الحالية مع نتائج العديد من الدراسات السابقة التي أوضحت قدرة الكادميوم على إحداث تغيرات كروموسومية وأنوية دقيقة في خلايا نخاع عظام الفئران

( Mukherjee *et al*., 1988a ; Han *et al*., 1992 ; Jagetia and Adiga ,1994 ; Marrazzini *et al*., 1994 ; ١٩٩٥ , عالم ; Privezentsev *et al*., 1996 ; Fahmy and Aly, 2000 ; Datta *et al*., 2001 ) .

ومن ناحية أخرى ، فإن نتائج الدراسة الحالية تبدو متعارضة مع نتائج بعض الدراسات السابقة أيضاً ، والتي أفادت أن معاملة فئران التجارب بجرعات مختلفة من الكادميوم لم تؤد إلى زيادة في معدلات التغيرات الكروموسومية أو الأنوية الدقيقة في خلايا نخاع العظام

( Bruce and Heddle , 1979 ; Deknudt and Gerber, 1979 ; Watanabe *et a*l., 1982 ; Volkova and Karpliuk , 1990 ; Adler *et al*., 1991 ; Leopardi *et al*., 1993 ; Osipov *et al*., 2000 ) .

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

هذا التعارض في النتائج حول السمية الوراثية للكادميوم عزاه بعض الباحثين إلى الاختلافات في حساسية أنواع الاختبارات التي استخدمت و/أو الطريقة والمذيب الذين استخدموا عند المعاملة بالكادميوم ( Han *et al*., 1992 ) .

نتائج الدراسة الحالية أوضحت أن الزيادة التي لوحظت في أعداد كل من $MNPCE_s$ و $MNNCE_s$ بعد المعاملة بجرعات الكادميوم المختلفة هي زيادة غير معتمدة على الجرعة كما اتضح من زيادة هذه الأعداد بعد المعاملة بالجرعتين ٢، ٤مجم/كجم من وزن الجسم ثم انخفاضها بعد المعاملة بالجرعة الأعلى ( ٦مجم/كجم من وزن الجسم ) . من تحليل النتائج إحصائياً ، أوضح معامل الارتباط ضعف العلاقة بين جرعة كلوريد الكادميوم والزيادة في كل من $MNPCE_s$ ( $Rr^2 = 0.045$ - شكل ١٠ ) و $MNNCE_s$ ( $R^2 = 0.1359$ - شكل ١١ ) .

والتأثير السمي الوراثي للكادميوم غير المعتمد على الجرعة ذكر في دراسات سابقة ، سواءً داخل أو خارج الجسم . فالدراسة التي قام بها ( Adler *et al* 1991 ) أوضحت أن حقن الفئران في التجويف البطني بالجرعة المنفردة ١مجم/كجم ، أدى بعد ٢٤ ساعة إلى زيادة عدد $MNPCE_s$ ، بينما لم تؤد المعاملة بالجرعتين الأعلى ٥ ، ١٠مجم/كجم إلى اختلاف في أعداد $MNPCE_s$ ، مقارنة بالمجموعة الضابطة السالبة. كذلك فإن معاملة مزارع خلايا الدم البشرية بجرعات مختلفة من كلوريد الكادميوم لمدة ٣ ساعات أوضحت أن الزيادة التي حدثت في عدد الخلايا المحتوية على أنوية دقيقة كانت زيادة غير معتمدة على الجرعة ( Rozgaj *et al*., 2002 ) .

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

من ناحية أخرى ، وكما هو الحال مع نتائج السمية الوراثية للكادميوم ، فقد أوضحت نتائج بعض الدراسات الأخرى أن معاملة الفئران الحية بجرعات مختلفة من الكادميوم تسببت في زيادة معتمدة على الجرعة في أعداد $MNPCE_s$ ( Han *et al*., 1992 ; Jagetia and Adiga, 1994 ; Fahmy and Aly, 2000 ) .

على أية حال ، فإن ما لوحظ في الدراسة الحالية من انخفاض أعداد $MNPCE_s$ بعد المعاملة بالجرعة المحتملة القصوى ( ٦مجم/ كجم من وزن الجسم ) مقارنة بالجرعة الأقل ( ٤مجم/ كجم من وزن الجسم ) ، يمكن تفسيره بناءً على ما لوحظ من أن هذا الانخفاض بعد المعاملة بالجرعة ٦مجم/ كجم من وزن الجسم ، كان مصحوباً كذلك بانخفاض حاد في النسبة المئوية لكريات الدم الحمراء متعددة الصبغة ( $\%\ PCE_s$ ) حيث بلغت هذه النسبة ١٧٪ من العدد الكلي لكريات الدم الحمراء مقارنة بنسبة ٤٠,٩٪ بعد المعاملة بالجرعة ٤ مجم/ كجم من وزن الجسم ، أي تقريباً في مستوى النسبة التي سجلت في المجموعة الضابطة السالبة ( ٤٤٪ ) ( جدول ٢ ) . هذا الانخفاض في $\%\ PCE_s$ هو مؤشر على السمية الخلوية للكادميوم ( Garcia *et al*., 2002 ) عند الجرعة المحتملة القصوى ( ٦مجم/ كجم من وزن الجسم ) مما أدى إلى تثبيط إنتاج كريات الدم الحمراء غير الناضجة ($PCE_s$) في نخاع العظام ( Jagetia and Reddy, 2002 ) وهذا بدوره أثر عكسياً على المحصلة النهائية للكريات المحتوية على أنوية دقيقة ( Adler, 1984 ) .

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

التأثير السمي الخلوي للكادميوم استمر بعد ٤٨ ساعة من المعاملة بنفس الجرعة المحتملة القصوى ( ٦مجم/كجم من وزن الجسم ) وإن كان أقل حدة عما كان عليه بعد ٢٤ ساعة حيث ارتفعت $PCE_s$ % لتصل إلى ٣٢,٨ ٪ لكنها ظلت منخفضة انخفاضاً ذا أهمية إحصائية مقارنة بالمجموعة الضابطة السالبة . إلا أن هذا التسمم الخلوي بعد ٤٨ ساعة من المعاملة ، لم يكن مصحوباً بزيادة في أعداد $MNPCE_s$ ، سواءً في المجموعة التي عوملت بالجرعة ٦مجم/كجم من وزن الجسم، أو المجموعات التي عوملت بأي من الجرعات المستخدمة مقارنة بالمجموعة الضابطة السالبة . ويمكن أن يستنتج من هذه النتائج أن الكادميوم لا يتراكم في نخاع العظام ، بل يتم التخلص منه وبالتالي من تأثيراته السمية الوراثية والخلوية مع مرور الوقت . وتتوافق نتائج الدراسة الحالية مع نتائج الدراسة التي قام بها Adler *et al.*(1991) حيث أدى الحقن في التجويف البطني بجرعة منفردة من كلوريد الكادميوم قدرها ٥ مجم/كجم من وزن الجسم إلى انخفاض في النسبة المئوية لكريات الدم الحمراء متعددة الصبغة ( $PCE_s$ % ) بعد ٢٤ ، ٤٨ ساعة من المعاملة وإن تحسن قليلاً بعد ٤٨ ساعة . أيضاً لم يذكر في المراجع المختلفة أن نخاع العظام هو أحد الأعضاء المفضلة لتراكم الكادميوم ، فكما سبق أن ذكرنا ( الدراسات السابقة ) فإن الكادميوم يتوزع على جميع أنسجة الجسم عن طريق الدم ولكنه يتراكم بشكل رئيسي في كل من الكبد والكلى ، كما يمكن أن يتراكم كذلك في العظام والبنكرياس والغدد الكظرية والمشيمة ( Torra *et al.*, 1995 ; Pope and Rail , 1995 ) .

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

حساسية اختبار النواة الدقيقة ودقة النتائج التي تحصلنا عليها بعد المعاملة بالكادميوم يمكن تقييمها على ضوء نتائج المجموعة الضابطة الموجبة والتي عوملت فيها الفئران بالمطفر المعروف الفوسفاميد الحلقي ( CP ) وذلك بالحقن في التجويف البطني بالجرعة المنفردة ٥٠ مجم/ كجم . فقد أدت المعاملة بـ CP بعد ٢٤ ساعة إلى زيادة كبيرة ذات أهمية إحصائية في عدد $MNPCE_s$ ( 39.00 ‰ ) ولكن ، وعلى العكس مما لوحظ بعد المعاملة بكلوريد الكادميوم ، فإن المعاملة بـ CP أدت إلى زيادة ذات أهمية إحصائية في $PCE_s$ % بلغت 67.8 % . وهذه الزيادة في عدد $PCE_s$ تشير إلى زيادة النشاط الانقسامي في نخاع العظام لإنتاج مزيد من $PCE_s$ لتعويض الفقد الذي حدث في كريات الدم الحمراء الناضجة $NCE_s$ بعد المعاملة بـ CP ( Adler, 1984 ) ، مما يدل أن هذه المادة ذات سمية خلوية ووراثية .

الدراسة التي قام بها Herbold *et al* ( 2001) أوضحت انخفاضاً كبيراً في $PCE_s$ % بعد ٧٢ ساعة من المعاملة بـ ٥٠ مجم/ كجم من CP ، مما يشير إلى أن ظهور التأثير السام والمثبط لـ CP على خلايا نخاع العظام ، يحتاج إلى فترة أطول من ٢٤ ساعة .

ويستخلص مما سبق ، أن المعاملة المنفردة بجرعات مختلفة من الكادميوم أدت إلى زيادة ذات أهمية إحصائية في عدد كريات الدم الحمراء المحتوية على أنوية دقيقة $MNPCE_s$ بعد ٢٤ ساعة من المعاملة . أعداد $MNPCE_s$ عادت إلى معدلاتها الطبيعية بعد ٤٨ ساعة من المعاملة . التأثير السمي الخلوي لكلوريد

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

الكادميوم على معدل انقسام خلايا نخاع العظام لوحظ بشكل حاد بعد ٢٤ ساعة من المعاملة ثم بشكل أقل حدة بعد ٤٨ ساعة كما اتضح من الانخفاض في $PCE_s$ % بعد ٢٤ ساعة ( ١٧,٠ ٪ ) وبعد ٤٨ ساعة ( ٣٢,٨ ٪ ) مقارنة بالمجموعة الضابطة السالبة ( ٤٤,٠ ٪ ) .

لم يتم حتى الآن - وبشكل قاطع - تحديد آلية أو آليات السمية الوراثية للكادميوم وإن كان هناك العديد من الآليات المقترحة التي تم طرحها ودراستها. اشتملت تلك الآليات على اقتراح أن الارتباط المباشر بين الكادميوم والدنا يؤدي إلى كسور في خيط الدنا المنفرد

( Hartwig , 1994 ; Privezentsev *et al*., 1996 ; Misra *et al*., 1998 ; Lopez-Ortal *et al*., 1999 ; Watanabe and Suzuki, 2002 ) .

وإلى التداخل في عمليات إصلاح الدنا مما يؤدي إلى زيادة السمية الوراثية ( Hartwig , 1994 ;1995 ; Jin *et al*., 2003 ) وتكوين موصلات Adducts بين شريطي الدنا ( Hossan and Huq , 2002 ) وروابط تقاطعية Crosslinks بين الدنا- البروتين وهي آليات يمكن بالإضافة إلى كسور خيط الدنا أن تكون سبباً في السمية الوراثية للكادميوم ( Misra *et al*., 1998 ) .

وبالإضافة إلى الآليات السابق ذكرها ، فإن آليات التأثيرات المطفرة للكادميوم شملت زيادة انبعاث أنواع الأكسجين النشط ( Reactiove oxygen species ROS ) ( Stohs and Bagchi, 1995 ;

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

McMurray and Tainer, 2003 ) والتي يرجع إليها أكبر الأثر في إحداث مظاهر الضرر والتسمم للجزيئات الخلوية بما فيها الدنا ( Bagchi *et al*., 1995 ) . والجدير بالذكر أنه في الحالة الطبيعية ، وبدون التعرض لأي مركبات سامة فقد تتكون أنواع الأكسجين النشط داخل الخلية . ولكن من جهة أخرى ، فقد وجد أن الخلية بها من المقومات والوسائل ما يحميها من الفعل الضار الناتج عن تلك الأنواع من الأكسجين النشط .

وسائل الحماية هذه تشمل مجموعة من الإنزيمات الموجودة بالميتوكوندريا، والتي تحتوي في تركيبها على بعض المعادن ولذلك تعرف بالإنزيمات المعدنية . يعرف عن الكادميوم قدرته على أن يحل محل الزنك في بعض هذه الإنزيمات المعدنية ( Pope and Rail, 1995 ; Hartwig, 2000 ) أو السيلينيوم في إنزيم الجلوتاثيون بيرأوكسيديز ( Rossman *et al*., 1992 ) ، أي أن الكادميوم يثبط نشاط بعض الإنزيمات التي تمثل خط دفاع طبيعي ضد التأثير الضار لأنواع الأكسجين النشط وبالتالي ، وبطريقة غير مباشرة ، يتسبب الكادميوم في زيادة انبعاث أنواع الأكسجين النشط وزيادة الأضرار بدنا الخلية . يمكن مما سبق أن يستنتج أن السمية الوراثية والخلوية للكادميوم قد تعود إلى آليات مباشرة وأخرى غير مباشرة تشترك معاً في إحداث أضرار الدنا الناتجة عن التعرض للكادميوم وبالتالي في إحداث تأثيراته السمية الوراثية ( Fatur *et al*., 2002 ) .

### ٥. ١. ٢. السمية الوراثية في الخلايا التناسلية :

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

تمثل عملية تكوين الحيوانات المنوية Spermatogenesis جزءاً أساسياً في عملية تناسل الإنسان . فهذه العملية الدائمة الحركة تنتج يومياً ملايين الحيوانات المنوية في الإنسان الصحيح دعماً لاستمرارية الحياة . ورغم أهمية هذه العملية ، فإن آلية إنتاج الحيوانات المنوية قد تتعرض للاختلال بتأثير مواد كيميائية معينة . وبناءً على بعض الدلائل ، فقد ظهر اقتراح بأن التلوث البيئي بالكيماويات قد يكون مشاركاً في الخفض الذي لوحظ في متوسط عدد الحيوانات المنوية بين الأفراد . والفهم الصحيح لاحتمالية تداخل الملوثات البيئية في عملية إنتاج الحيوانات المنوية يكتسب أهميته في ضوء البحوث التي تشير إلى ازدياد عقم الذكور ، وإلى أن سبب هذا العقم لا يمكن التعرف عليه بشكل محدد في حوالي ٣٠ ٪ من الرجال المصابين بالعقم وكذلك للمحدودية الكبيرة للمعلومات المتوفرة حول أخطار ملوثات البيئة على الصحة الإنجابية للذكور وعدم توفر تلك المعلومات بالنسبة للعديد من المواد الكيميائية ( Betka and Callard ,1999 ) .

إلا إن تعقيد عملية تكوين الحيوانات المنوية ، يجعل من الصعب دراسة العلاقة بين التأثير الملاحظ وسبب هذا التأثير . فهناك العديد من الهرمونات والعمليات الكيمياحيوية والأحداث الخلوية التي تحدث أثناء تكوين الحيوانات المنوية . فهذه العملية تشمل - من بين ما تشمل - العديد من المراحل التي تعطي فيها الخلية التناسلية خلايا بنوية والتي بدورها تتمايز إلى خلية منوية عالية التخصص . عملية تكوين هذه الخلية المنوية تشمل كذلك أنواع من الخلايا لا توجد إلا في الخصي مثل

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

خلايا سيرتولي والتي تنتج عدداً من البروتينات المهمة لنجاح عملية إنتاج وتكوين الحيوانات المنوية .

يدخل الكادميوم البيئة عن طريق العديد من الأنشطة والصناعات ( الفصل الثاني ) . وكما هو معروف عن الكادميوم من طول فترة بقائه في الجسم ، فإنه يعد أحد الأمثلة الجيدة على الملوثات البيئية ذات التأثيرات التراكمية السامة . فمعظم الكائنات الحية قد تتأثر بالتعرض لمستويات منخفضة من الكادميوم ولكن لفترات طويلة ( Klaassen and Wong, 1982 ) .

وأحد التأثيرات السامة للكادميوم تتمثل فيما ذكر في العديد من الدراسات حول قدرته على خفض خصوبة ذكور الإنسان والقوارض

( Thomas and Brogan , 1983 ; Cullen *et al*., 1984 ; Danielsson *et al*., 1984 ; Schrag and Dixon , 1995 ) .

وقد تركزت العديد من الدراسات الحديثة حول تحديد المراحل والخلايا المستهدفة بشكل خاص بواسطة الكادميوم أثناء عملية تكوين الحيوانات المنوية ( Betka and Callard, 1999 ) لمحاولة فهم آلية أو آليات خفضه للخصوبة .

إذا تم تطبيق اختبار السيادة المميتة باستخدام فترات تزاوج أسبوعية تغطي فترات تكوين الحيوانات المنوية بالكامل ، فإنه يمكن تحديد المرحلة أو المراحل الأكثر حساسية للمادة موضع الاختبار من بين مراحل تكوين الحيوانات المنوية ( Anderson , 1984 ). وقد تم في الدراسة الحالية تطبيق هذه القواعد

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

حيــث استخدمت فترات تزاوج مدة كل منها أسبوع ، وامتدت لمدة ثمانية أسابيع وهي الفترة التي تستغرقها عملية تكوين الحيوانات المنوية في الفئران.

نتائج الدراسة الحالية بعد إجراء اختبار السيادة المميتة باستخدام ذكور فئران عوملت بجرعة منفردة من كلوريد الكادميوم ( ٠,٦مجم/كجم من وزن الجسم ) ، تشير إلى عدة مؤشرات ايجابية مهمة تلفت الانتباه إلى قدرة الكادميوم ، عند مستوى الجرعة المستخدمة ، على اختراق أنسجة الخصى و إحداث أضراراً في الخلايا التناسلية .

وبشكل عام ، فإن النقص الذي لوحظ في معدل عدد العلائق لكل أنثى حامل بعد فترات التزاوج المختلفة مقارنة بالمجموعة الضابطة ، والذي وصل إلى مستوى ذي أهمية إحصائية بعد العديد من فترات التزاوج ( جدول ٤ ) ، يشير إلى فقد للعلقات قبل مرحلة الانغراس ( OPPTS, 1998 ) . هذا الفقد للعلقات قبل مرحلة الانغراس هو بدوره أحد المؤشرات على حدوث الطفرات المميتة السائدة ( Green *et al.*,1984 ).

ويمكن أن يستنتج من نتائج الدراسة الحالية أن أكثر مراحل تكوين الحيوانات المنوية تأثراً بالكادميوم ، هما مرحلتا الطلائع المنوية المتأخرة Late spermatids ( فترة التزاوج الثانية ) وأمهات المني Spermatogonia ( فترة التزاوج السادسة ).

فبعد فترة التزاوج الثانية ازداد معدل عدد العلقات المفقودة لكل أنثى حامل بعد مرحلة الانغراس ، زيادة ذات أهمية إحصائية ( جدول ٥ ) . وقد تدعمت هذه النتيجة

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

بالزيادة التي لوحظت في النسبة المئوية للعلقات الميتة بالنسبة للعدد الكلي للعلقات ( D/T % ) حيث بلغت ١٢٪ أي أكثر من ضعف النسبة المسجلة في المجموعة الضابطة ( ٥,٢١ ٪ ) ( جدول ٥ ) ، وقد اعتبرت زيادة هذه النسبة مؤشراً على قدرة المادة موضع الاختبار على التسبب في فقد العلقات بعد مرحلة الانغراس ( OPPTS ,1998 ) .

أما النتائج التي تحصلنا عليها بعد فترة التزاوج السادسة فإنها تشير إلى العديد من التأثيرات المهمة . فالزيادة ، ذات الأهمية الإحصائية ، التي لوحظت في معدل عدد العلقات المفقودة قبل مرحلة الانغراس لكل أنثى حامل ( جدول ٤ ) ، هي من المؤشرات المهمة ، كما سبق أن ذكرنا ، على حدوث الطفرات المميتة السائدة ( Green *et al.*, 1985 ) . والتقرير الصادر عن الوكالة الأمريكية لحماية البيئة ( Green *et al.*, 1985 ) توصل إلى أن المعدلات الطبيعية لمعدل عدد العلقات الميتة لكل أنثى حامل بالنسبة للفئران تتراوح ما بين ٠,٤ - ٠,٨ ولا تتعدى ١,٠ . زيادة هذا المعدل عن معدل المعدلات الطبيعية يمثل مؤشراً رئيساً على زيادة نسبة الطفرات المميتة السائدة ( Green *et al.*, 1985 ; Adler *et al.*, 2002 ) . وعلى ذلك فإن ما لوحظ في الدراسة الحالية من ارتفاع معدل العدد الكلي للعلقات المفقودة لكل أنثى حامل ( جدول ٥ ) إلى ضعف القيمة المسجلة للمجموعة الضابطة ( ١,٤١ بعد الأسبوع السادس و ٠,٧ للمجموعة الضابطة ) يشير إلى ارتفاع نسبة الطفرات المميتة السائدة . بالإضافة إلى ذلك ، كما هو الحال بعد فترة التزاوج الثانية ، فالنسبة المئوية ( D/T % ) زادت إلى ١١,٨٣ ( جدول

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

٥ ) أي تعدت ضعف القيمة المسجلة للمجموعة الضابطة ( ٥,٢١ ٪ ) مما يشير إلى قدرة الكادميوم على إحداث فقد للعلقات بعد مرحلة الانغراس أيضاً ( OPPTS 1998, ) .

النتائج التي توصل إليها ( Betka and Callard ( 1999 تشير إلى أن هناك تخصصاً في سمية الكادميوم من حيث المرحلة وطرز الخلايا . استخدم الباحثان الكادميوم المشع لدراسة أماكن تراكمه في أنسجة خصى سمك القرش Squalus acanthias على اعتبار أن مراحل تكوين الحيوانات المنوية هي نفسها بشكل أساسي في جميع الفقاريات . تم تحديد تواجد الشطر الأكبر من الكادميوم في المناطق التي تحتوي على خلايا تناسلية في مرحلة ما قبل الانقسام الاختزالي Premeiotic germ cells بينما وجدت كميات قليلة في مناطق الخصية المحتوية على خلايا تناسلية في مراحل أكثر نضجاً . بالإضافة إلى ذلك أوضحت نتائج تلك الدراسة أن الكادميوم أحدث زيادة في الموت الخلوي المبرمج Apoptosis في الخلايا التناسلية في مرحلة ما قبل الانقسام الاختزالي وليس في خلايا سيرتولي في نفس المراحل أو في الخلايا التناسلية أو خلايا سيرتولي في مراحل الانقسام الاختزالي أو ما بعدها . كما أن التعرض العابر لمستويات منخفضة من الكادميوم يمكن أن يخفض من عدد الخلايا التناسلية التي ستدخل في الانقسام الاختزالي . استنتج الباحثان أن التأثير السمي للكادميوم على الخلايا التناسلية يتم عن طريق تراكمه خلال المراحل المبكرة لعملية تكوين الحيوانات المنوية ومن خلال هذا التأثير على مولدات المني ، فإنه يؤثر على المراحل المختلفة لتكوين الحيوانات المنوية .

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

على الجانب الأخر ، نتائج ( 1999 ) Bench *et al* عارضت النظرية القائلة بتراكم الكادميوم وباندماجه مع كروماتين الحيوان المنوي أو الطلائع المنوية حيث أثبتت تلك النتائج عدم تواجد الكادميوم في تلك المراحل بعد معاملة الفئران بجرعات منخفضة متكررة من الكادميوم ( ٠,١مجم/كجم من وزن الجسم ) أو بجرعة عالية منفردة ( ٦,٧٥مجم/كجم من وزن الجسم ) . وهكذا فإن نتائج الدراسة الحالية - بالإضافة إلى ما سبق ذكره من نتائج Betka and Callard (1999) ونتائج Bench *et al* ( 1999 ) - تشير بشكل كبير إلى أن خلايا مولدات المني Spermatogonia هي الخلايا الأكثر استهدافاً بالكادميوم .

التغيرات الكروموسومية العددية والتركيبية في الخلايا التناسلية هي أحد أسباب التشوهات الخلقية للأجنة ووفاتها والعقم في الإنسان والحيوان .

وتشير نتائج الدراسة الحالية إلى أن المعاملة بالجرعة ٠,٦مجم/كجم من وزن الجسم من كلوريد الكادميوم من الممكن أن تكون قد أحدثت تغيرات كروموسومية تركيبية أو عددية في خلايا أمهات المني أو في الطلائع المنوية المتأخرة ، وأن هذه التغيرات قد انتقلت عبر المشيج الذكري إلى العلقات المتكونة وأدت إلى موت تلك العلقات سواءً قبل أو بعد انغراسها في جدار الرحم . هذه النتائج تدعم العديد من الدراسات التي أجريت باستخدام مواد مطفرة ، والتي أوضحت وجود علاقة وارتباط بين التغيرات الكروموسومية في انقسامات التفلج المبكرة والإماتة السائدة ( Brewen *et al*., 1975 ; Anderson , 1984 ) .

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

أشارت عدة دراسات سابقة إلى قدرة الكادميوم على إحداث تغيرات كروموسومية في الخلايا المنوية Spermatocytes لذكور الفئران ( Watanabe and Endo , 1982 ; Selypes *et al*., 1992 ; Fahmy and Aly , 2000 ) . ونتائج تلك الدراسات لا تتعارض - كما قد يبدو - مع ما تشير إليه نتائج الدراسة الحالية من حساسية مرحلة أمهات المني للكادميوم . فعندما يؤثر الكادميوم على خلايا أمهات المني والتي ستقوم بعد ذلك بالانقسامات الميتوزية أو غير المباشرة Mitosis والميوزية أو الاختزالية Meiosis ، فإن تأثيره سيمتد ليشمل جميع المراحل التالية في عملية تكوين الحيوانات المنوية ، مروراً بالخلايا المنوية ، وصولاً إلى مرحلة الحيوان المنوي ( Betka and Callard, 1999 ) .

الدراسات السابقة التي استخدمت اختبار السيادة المميتة أوضحت عدم حدوث طفرات مميتة سائدة بعد معاملة الفئران بالكادميوم

( Epstein *et al*., 1972 ; Gilliavod and Leonard , 1975 ; Suter , 1975 ; عالم , ١٩٩٥ )

ويبدو للوهلة الأولى أن نتائج هذه الدراسات لا تتوافق مع نتائج الدراسة الحالية . إلا أنه قبل التوصل إلى تصور محدد حول التأثير السمي الوراثي للكادميوم على الخلايا التناسلية فإنه يجب أن يوضع في الاعتبار ما يلي :

أولاً ) تمت الدراسة الحالية باستخدام جرعة واحدة ، أي أنها دراسة أولية يجب أن تتبعها دراسات أخرى باستخدام عدة جرعات خاصة ، وأن نتائج هذه الدراسة أعطت ، وكما سبق أن أوضحنا ، عدة مؤشرات مهمة على حدوث الطفرات

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

المميتة السائدة ولفتت الانتباه إلى مراحل أكثر حساسية من غيرها للمعاملة بالكادميوم

.

ثانياً ) النتيجة السالبة المتحصل عليها من أي اختبار للسمية الوراثية ليس بالضرورة دليلاً نهائياً على الطبيعة غير المطفرة للمادة تحت الاختبار ، وبالطبع لا يستثنى من ذلك نتائج اختبار السيادة المميتة ( Green *et al.*, 1985 ) .

ثالثاً ) الجرعة أو الجرعات المستخدمة لإجراء الاختبار - بالإضافة إلى طريقة تقييم الاختبار - يلعبان دوراً هاماً في النتائج المتحصل عليها .

أحد الاختبارات السابقة على سبيل المثال التي قام بها عالم ( ١٩٩٥ ) استخدم جرعة من كلوريد الكادميوم أثرت بوضوح على خصوبة الذكور بعد ثلاثة أسابيع من المعاملة فاكتفى الباحثون بنتائج الأسابيع الثلاثة الأولى كمؤشرات على حدوث أو عدم حدوث الطفرات المميتة السائدة عن طريق حساب نسبة العلقات الميتة إلى نسبة العلقات الكلية ( % D/T ) واستخلصوا أن النتائج بعد المعاملة بالكادميوم لا تختلف معنوياً عن نتائج العينة الضابطة السالبة . هذه الدراسة لم تضع في الاعتبار اثنتين من القواعد واللتين يجب مراعاتهما عند إجراء السيادة المميتة . الأولى هي استخدام جرعة أو جرعات لا يكون لها تأثير على خصوبة الذكور ، حتى لا يتداخل هذا التأثير مع تأثير الطفرات المميتة السائدة. والثانية هي ضرورة استمرار فترات التزاوج الإسبوعية لتغطي جميع مراحل تكوين الحيوانات المنوية حتى يمكن التأكد من سلبية النتائج (Green *et al.*,1985 ). وقد ورد في تقرير برنامج السمية الوراثية للوكالة الأمريكية لحماية البيئة ( Green *et al.*, 1985 ) أنه عند إعداد

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

التقرير تم استبعاد العديد من البحوث نتيجة لعدم استخدام الجرعات المناسبة أو للتقييم الضعيف للدراسة .

### ٥. ١. ٣. السمية الخلوية :

استخدم زيادة معدل الموت الخلوي المبرمج Apoptosis في الدراسة الحالية كمؤشر على السمية الخلوية للكادميوم . وللكشف عن قدرة الكادميوم على زيادة معدل الموت الخلوي المبرمج في خلايا أكباد الفئران المعاملة ، استخدمت تقنية سلم الدنا DNA Ladder والتي تعبر عن ظاهرة تجزئة الدنا التي تصاحب دائماً الموت الخلوي المبرمج ، حيث أمكن ملاحظتها في الثدييات والديدان والدروسوفيلا والنباتات ( Nagata *et al*., 2003 ) .

عند التعرض للكادميوم لفترات طويلة وبجرعات منخفضة فإنه يتراكم بشكل رئيس في الكبد والكلى ( Shaikh and Lucis , 1972 ; Kotsonis and Klaassen, 1977 ) أما في حالة التعرض الحاد أي بجرعة عالية ولفترة قصيرة كما هو الحال في الدراسة الحالية ، فإن الكادميوم يتراكم أساساً في الكبد ( Kotsonis and Klaassen, 1977 ) . ولهذا فإنه من المتوقع أن يكون الكبد هو العضو المستهدف للتسمم الحاد بالكادميوم ( Dudley *et al*., 1982 , 1984 ) . ورغم أن الموت الخلوي المبرمج يصاحب عادة التسمم الكبدي بالعديد من الكيماويات وقد يسبق التنكرز Necrosis ( Ledda-Columbano *et al*., 1991 ) أو يحدث بالتوازي معه ( Reynolds *et al*., 1984 ) ، إلا أن القليل من المعلومات متوفر الآن حول الموت الخلوي المبرمج نتيجة للتسمم الكبدي بعد

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

المعاملة الحادة بالكادميوم ( Habeebu *et al.*, 1998 ) . وحيث إن جزئ الدنا هو غالباً ما يكون المستهدف بواسطة السموم المختلفة وأن الأضرار بدنا يعتقد أنه يمثل الخطوة الأولى والرائدة لحث عملية الموت الخلوي المبرمج ( Corcoran *et al.*, 1994 ) ، فقد تم اختيار الكبد للكشف عن الموت الخلوي المبرمج بعد المعاملة بالكادميوم وباستخدام اختبار سلم الدنا DNA Ladder test .

أوضحت نتائج الدراسة الحالية ( شكل ١٤ ) أن معاملة الحيوانات الحية بالكادميوم أدت إلى زيادة تجزئة دنا خلايا أكباد هذه الحيوانات . تأثير المعاملة بالكادميوم لم يظهر بعد المعاملة بالجرعة الأقل ( ٠,٦ مجم/ كجم من وزن الجسم ) وإنما بدأ في الظهور بعد المعاملة بالجرعة ٢مجم/ كجم من وزن الجسم وازداد مع الجرعة ٤مجم/ كجم من وزن الجسم ، والتي ظهر فيها سلم الدنا متمثلاً في حزم دنا متتالية الأطوال. بعد المعاملة بالجرعة الأعلى ( ٦مجم/ كجم من وزن الجسم ) ظهر الدنا المتجزئ في صورة مسحة Smear مقاربة في كثافتها للمسحة التي ظهرت بعد المعاملة بالجرعة ٤مجم/ كجم من وزن الجسم ولكن دون أن تظهر حزم الدنا .

بشكل عام ، المعاملة بالجرعات ٢، ٤، ٦ مجم/ كجم من كلوريد الكادميوم أدت إلى زيادة تجزئة دنا الحيوانات المعاملة مقارنة بدنا الفئران غير المعاملة ( المجموعة الضابطة السالبة ) . معاملة الفئران بالمادة المطفرة الفوسفاميد الحلقي CP ( ٥٠ مجم/ كجم ) أدت إلى تجزئة الدنا كما هو متوقع ، والذي ظهر في صورة سحبة الدنا( المجموعة الضابطة الموجبة ) وهو ما عكس صلاحية وكفاءة الطريقة المستخدمة للكشف عن تجزئة الدنا . تتوافق نتائج الدراسة الحالية مع

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

الدراسات القليلة التي تمت على الحيوانات الحية والتي أوضحت قدرة الكادميوم على إحداث موت خلوي مبرمج ( Xu *et al*., 1996 ; Yan *et al*., 1997 ; Habeebu *et al*., 1998 ) .

لوحظ في الدراسة الحالية أنه بعد المعاملة بالجرعة ٤ مجم/ كجم من كلوريد الكادميوم ظهر سلم الدنا بشكل واضح ( شكل ١٤ – C ) بينما بعد المعاملة بالجرعة الأعلى ٦مجم/ كجم من كلوريد الكادميوم ، اختفى هذا السلم مما يشير إلى انخفاض معدل حدوث الموت الخلوي المبرمج عند الجرعة الأعلى . نتائج مماثلة تم تسجيلها ولكن في المزارع الخلوية أي خارج الجسم *in vitro* حيث أدت معاملة خلايا ٢٩٣ ( 293 cells ) بالجرعة الأعلى من كلوريد الكادميوم ( 100 µM ) إلى اختفاء سلم الدنا الذي كان واضحاً عند المعاملة بالجرعة الأقل 25 µM من كلوريد الكادميوم . هذه النتائج قد يمكن تفسيرها على ضوء ما أورده ( 1998 ) Habeebu *et al* من أن الموت الخلوي المبرمج يكون سائداً عند الجرعات المنخفضة بينما يسود التنكرز Necrosis عند الجرعات الأعلى حيث يلعب الموت الخلوي المبرمج دوراً مفيداً بالعمل مبكراً على التخلص من الخلايا المصابة بشدة وبالتالي من المادة السامة الموجودة في تلك الخلايا كما أنه يمثل الوسيلة المناسبة للتخلص من الخلايا المصابة دون الإخلال بتركيب أو وظيفة النسيج .

وكما هو الحال بالنسبة لآليات السمية الوراثية للكادميوم ، فإن آلية أو آليات إحداث الموت الخلوي المبرمج بواسطة الكادميوم ليست معروفة على وجه الدقة حتى الآن ( Stinson *et al*., 2003 ) . ولكن من الآليات المقترحة لتفسير قدرة

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

الكادميوم على إحداث الموت الخلوي المبرمج ما ذكر من أن التعرض للكادميوم يؤدي إلى نضوب الجلوتاثيون مما ينتج عنه زيادة في أنواع الأكسجين النشط ( ROS ) والتي تؤدي بالتالي إلى زيادة الأضرار بالدنا وإلى الموت الخلوي المبرمج ( Stohs *et al*., 2001 ; Watjen and Beyersmann, 2004 ) . وكما سبق أن ذكرنا ( الدراسات السابقة ) فإن الكادميوم يرتبط في الكبد مع ميتالوثيونين وهو أحد البروتينات الكاسحة Scavenger المضادة للأكسدة ويصبح الكادميوم بذلك غير ضار لمحتويات الخلية ، أما الكادميوم الزائد الموجود في صورة حرة ، فهو الذي يرتبط بعضيات الخلية بما فيها النواة ويسبب اختلالاً في وظائفها . الدراسة الحديثة التي قام بها ( Koizumi and Yamada , 2003 ) أوضحت أن الكادميوم يحفز تعبير الجينات التي لها وظائف الحماية من الضرر ، وكذلك جينات التحكم في هذا الضرر والتي تشمل الجينات المسؤولة عن تصنيع ميتالوثيونين والبروتينات المضادة للأكسدة وكذلك الجينات المسؤولة عن تحطيم البروتينات التي أصابها ضرراً لا يمكن إصلاحه وبشكل عام ، فإن التعرض لجرعات مرتفعة من الكادميوم يحفز تعبير الجينات التي تميل إلى تثبيط النمو والموت الخلوي المبرمج . هذه النتائج قد تفسر ولو جزئياً الموت الخلوي المبرمج الذي يصاحب التسمم بالكادميوم .

### ٥. ٢. المعاملة المشتركة بالكادميوم ومضاد الأكسدة BHT :

#### ٥. ٢. ١. السمية الوراثية :

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن المعاملة المشتركة بالكادميوم ومضاد الأكسدة BHT أدت إلى خفض واضح في السمية الوراثية للكادميوم في كل من الخلايا الجسدية والتناسلية .

معاملة الفئران بجرعة منفردة من BHT قدرها ٢٠٠مجم/ كجم من وزن الجسم قبل ٦ ساعات من المعاملة بكل من جرعات كلوريد الكادميوم التي استخدمت في اختبار الانوية الدقيقة ( ٢، ٤، ٦ مجم/ كجم من وزن الجسم ) ، أدت إلى انخفاض واضح في عدد $MNPCE_s$ ‰ حيث وصلت النسبة إلى مستوى المجموعة الضابطة السالبة ( جدول ٢ ) . كما انخفضت نسبة $MNNCE_s$ ‰ إلى القيم المسجلة في المجموعة الضابطة السالبة . أيضاً كان التحسن واضحاً على القدرة الانقسامية لخلايا نخاع العظام ، حيث ارتفعت النسبة المئوية لكريات الدم الحمراء متعددة الصبغة ( $PCE_s$ % ) بعد المعاملة المشتركة بمضاد الأكسدة BHT والجرعة ٦مجم/ كجم من كلوريد الكادميوم إلى ٣٨ ٪ بعد انخفاضها الحاد إلى ١٧ ٪ بعد المعاملة بكلوريد الكادميوم منفرداً ( جدول ٢ ) .

تأثير المعاملة المشتركة بالكادميوم و BHT على السمية الوراثية في الخلايا التناسلية ، تمت دراسته بعد فترتي التزاوج الثانية والسادسة في اختبار السيادة المميتة ومقارنة النتائج المتحصل عليها بنتائج فترات التزاوج نفسها بعد المعاملة بالكادميوم منفرداً . بعد المعاملة المشتركة لوحظ تحسن في جميع المؤشرات التي تمت دراستها بعد فترتي التزاوج ، وإن ظل معدل عدد العلقات ومعدل عدد العلقات الحية لكل أنثى حامل بعد فترة التزاوج الثانية أقل مقارنة بالمجموعة الضابطة .

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

جميع المؤشرات بعد فترة التزاوج السادسة عادت إلى مستوى المجموعة الضابطة السالبة ( جدول ٦ ) .

التأثير المثبط للاطفار Antimutagenic لمضاد الأكسدة BHT سبق ذكره في عدة دراسات استخدمت مواد مطفرة معروفة سواءً داخل الجسم أو خارجه ( Ochi and Ohsawa, 1985 ; Ochi *et al*., 1987 ;Waters *et al*., 1990 ; Ebringer *et al*.,1996; Grillo and Duiout, 1997 ; Grillo *et al*.,1999).

أما تأثير BHT كمثبط للسمية الوراثية للكادميوم فقد ورد في عدة دراسات باستخدام مزارع خلايا مبيض الهامستر الصيني CHO cells ( Ochi and Ohsawa, 1985 ; Grillo *et al*., 1999 ) وخلايا V79 للهامستر الصيني ( Ochi *et al*., 1987 ) . ورغم أن الدراسة الحالية تمت باستخدام الحيوانات الحية إلا أن نتائجها تتوافق مع نتائج الدراسات السابقة حول القدرة المثبطة للاطفار لـ BHT .

كما سبق أن ذكرنا فإن هناك عدة آليات مقترحة للتأثير الضار للكادميوم على الخلية ، والذي يمكن أن يعبر عنه في صورة تأثيراته السمية الوراثية . إحدى هذه الآليات هو الدور الذي يلعبه الكادميوم في زيادة انبعاث أنواع الأكسجين النشط (ROS) وما يمكن أن تسببه من أضرار بمحتويات الخلية . الانخفاض الملحوظ في السمية الوراثية للكادميوم في الدراسة الحالية بعد المعاملة المسبقة بمضاد الأكسدة

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

BHT تدعم بقوة دور هذه الآلية وأهميتها في إحداث سمية الكادميوم الوراثية والخلوية .

هناك ثلاثة أنواع من الأكسجين النشط وهي الجذر فوق المؤكسد ( Superoxide $O_2^{-}$. ) وفوق أكسيد الهيدروجين ( $H_2O_2$ ) وجذر الهيدروكسيل ( OH. ) . الدراسة التي قام بها ( Ochi and Ohsawa ( 1985 باستخدام مزارع خلايا مبيض الهماستر الصيني أوضحت أن المعاملة بمضاد الأكسدة BHT وبأنزيم كاتاليز Catalase أدت إلى خفض كلي أو جزئي في عدد التغيرات الكروموسومية التي أحدثت بواسطة كلوريد الكادميوم بينما المعاملة بكاسحات Scavengers الجذر فوق المؤكسد والأكسجين المنفرد لم تؤثر على معدل التغيرات الكروموسومية . استنتج الباحثان من ذلك أن $H_2O_2$ و OH يشاركان في السمية الوراثية الخلوية للكادميوم . وفي مرحلة أخرى من الدراسة ، أوضح الباحثان أنه في وجود مثبط الكاتاليز ، لوحظت زيادة في معدل التغيرات الكروموسومية مما يدعم مشاركة $H_2O_2$ بشكل رئيس في السمية الوراثية للكادميوم .

لم يتضح من الدراسة الحالية أن لمضاد الأكسدة BHT أية تأثيرات سمية وراثية حيث لم تؤد المعاملة المنفردة به إلى زيادة $MNPCE_s$ ‰ أو $MNNCE_s$‰. وتتوافق هذه النتائج مع نتائج الدراسة التي قام بها Bruce and Heddle ( 1979 ) والتي أوضحت عدم قدرة BHT على زيادة عدد الأنوية الدقيقة في خلايا نخاع عظام الفئران الحية . كما تدعم نتائج الدراسة الحالية العديد من الدراسات المختلفة من أن BHT لا يعتبر بشكل عام مادة ذات نشاط سمي

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

وراثي ( Lanigan and Yamarik, 2002 ) رغم نشر القليل من الدراسات التي أشارت إلى قدرته على إحداث أضرارٍ كروموسومية ( Grillo and Dulout, 1995 ) .

**٥. ٢. ٢. السمية الخلوية :**

على العكس من التأثير الواضح في الدراسة الحالية للمعاملة بمضاد الأكسدة BHT في خفض السمية الوراثية للكادميوم ، فإن BHT لم يكن له تأثير كعامل مثبط للموت الخلوي المبرمج المستحدث بواسطة الكادميوم ، بل إنه على العكس يبدو كما لو كان قد استحث زيادة معدل الموت الخلوي المبرمج .

بجانب الآليات التي سبق ذكرها والتي يقوم BHT عن طريقها بنشاطه كمضاد للأكسدة لحماية الخلايا من التأثير الضار لأنواع الأكسجين النشط ، فإنه وبالتوازي مع هذا النشاط ، فقد ذكرت عدة دراسات قدرة BHT وتحت ظروف معينة على تكوين الجذر فوق المؤكسد $O_2^-$ في كل من الخلايا النباتية والحيوانية ( Smirnova *et al*., 2002 ; Zamyatnina *et al*., 2002 ) مما قد يوفر تفسيراً مناسباً لما ذكر عن قدرة BHT على إحداث أضراراً بدنا ( Sasaki *et al*., 2002 ) وعدم منع ، بل واستحثاث تجزئة الدنا في نبات القمح النامي ( Zamyatnina *et al*., 2002 ) .

ورغم أن الموت الخلوي المبرمج يعتبر مؤشراً على السمية الخلوية ، إلا أنه يعد أيضاً مؤشراً على بداية التخلص من الخلايا التي أصيبت بأضرار شديدة ( Habeebu *et al*., 1998 ) . وبناءً على ذلك فإن ما لوحظ في الدراسة الحالية

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

من زيادة أو حث للموت الخلوي المبرمج بعد المعاملة المشتركة بالكادميوم و BHT ، يمكن اعتباره مؤشراً على قدرة الكبد على التخلص مبكراً ، عن طريق الموت الخلوي المبرمج ، من الخلايا المصابة وذلك في محاولة للمحافظة على كفاءته من ناحية التركيب والوظيفة . حيث لوحظ هذا النشاط بعد المعاملة بالكادميوم منفرداً مصحوباً بازدياد تجدد وانقسام خلايا الكبد ( Habeebu *et al*., 1997 ) .

## ٥. ٣. استنتاجات : Conclusions

يمكن من نتائج الدراسة الحالية التوصل إلى بعض الاستنتاجات فيما يتعلق بالسمية الوراثية والخلوية للكادميوم وآليات إحداثها ، والتي يمكن تلخيصها في النقاط التالية :

١-أظهر الكادميوم تأثيراً سمياً وراثياً واضحاً على الخلايا الجسدية ويمكن تصنيفه كمادة ذات سمية وراثية Genotoxic substance .

٢- لم يكن التأثير السمي الوراثي للكادميوم على الخلايا الجسدية تأثيراً معتمداً على الجرعة وقد يشير ذلك إلى أن التعرض لجرعات منخفضة من الكادميوم يمكن أن يؤثر سلباً على المادة الوراثية .

٣- أدت المعاملة بالجرعة المحتملة القصوى فقط من الكادميوم ( ٦مجم/كجم من وزن الجسم ) إلى تأثير سمي خلوي تمثل في الانخفاض الحاد لقدرة خلايا نخاع العظام على الانقسام ، بينما لم تؤد الجرعات الأقل إلى مثل هذا التأثير . أي أن التأثير السمي الوراثي للكادميوم يمكن أن يحدث عند جرعات غير سامة خلوياً .

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

٤- تقترح نتائج الدراسة الحالية أن أمهات المني هي أكثر مراحل تكوين الحيوانات المنوية حساسية للكادميوم . ونقترح مستقبلاً إجراء دراسات حول التغيرات الكروموسومية في أمهات المني بعد التعرض للكادميوم .

٥- تلعب أنواع الأكسجين النشط دوراً مهماً وأساسياً كأحد آليات السمية الوراثية للكادميوم ، بينما لا تلعب هذه الأنواع الدور المهم والأساس نفسه كآلية لإحداث الموت الخلوي المبرمج .

٦- يلعب مضاد الأكسدة المصنع BHT دوراً وقائياً جيداً من السمية الوراثية للكادميوم بالرغم من أنه قد يتسبب في بعض التأثيرات الخلوية السامة التي قد يكون لها دور مفيد في حث زيادة معدل الموت الخلوي المبرمج الذي قد يمثل وسيلة فاعلة ومبكرة للتخلص من الخلايا المصابة .

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

## المـراجع العربيــة

**بنـات ، خالـد محمـد ؛ بـاحفظ الله ، أحمـد عبـد القـادر . ١٩٩٢.** *التلـوث المـائـي* . دار المطبوعـات الحديثة ، جدة .

**الجميلـي ، السـيد ؛ الجميلـي ، حمـدي . ١٩٩٩.** *تلـوث البيئـة* : مصـادره – أخطـاره – وسـائل العلاج . الطبعة الأولى . دار الأمين للنشر و التوزيع .

**الحفـار ، سـعيد محمـد . ١٩٨٦.** التلـوث البيئـي بالكيميائيـات عامـة والمسـرطنات منهـا خاصـة . *وقائع ندوة البيئة و حمايتها من التلوث فـي أقطـار الخليج العربـي* . مكتب التربيـة العربـي بدول الخليج ، إدارة العلوم .

**الشايجي ، نعيمـة عبـدالرحمن . ١٩٨٨.** تلـوث البيئـة البحريـة فـي المـدن السـاحلية فـي الكويـت . *مجموعة دراسات وأبحاث المؤتمر الرابع لمنظمة المدن العربية* ، المعهد العربـي لإنمـاء المدن ، بغداد .

**الشمري ، أحمـد مهجـع .١٩٩٨.** توزيـع بعض المعـادن الثقيلـة فـي أنسـجة كبـد وكلـى الجـرذان *Rattus norvegicus* . رسـالة ماجسـتير ، قسـم علـم الحيـوان –كليـة العلـوم – جامعـة الملك سعود بالرياض. المملكة العربية السعودية .

**الصـطوف ، عبدالالـه الحسـين . ١٩٩٥.** *التلـوث البيئـي* : مصـادره - آثـاره – طـرق الحمايـة . منشورات جامعة سبها . الجماهيرية العربية الليبية الشعبية الاشتراكية العظمى .

**الطيب ، نـوري ؛ جرار ، بشـير . ١٩٩٤.** الأطفال و التلوث البيئي . كتاب الرياض ١١، مؤسسـة اليمامة الصحفية ، الرياض .

**عبد المجيد ، زيدان هندي ؛ عبد المجيد ، محمد إبراهيم . ١٩٩٦.** *الملوثات الكيميائية و البيئة* . الدار العربية للنشر والتوزيع .

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

**عبدالخالق ، علاء الدين بيومي .٢٠٠٠.** الملوثات البيئة والتسمم الخلوي . الطبعة الأولى . دار هبة النيل للنشر والتوزيع . الجيزة .

**العتيبي ، محمد كديميس .٢٠٠٣.** التأثيرات المشوهة والسمية والمضادة للخصوبة والوراثية الخلوية لعقار الكاربوربلاتين في فئران السلالة SWR/R . رسالة ماجستير ، قسم علم الحيوان –كلية العلوم – جامعة الملك سعود بالرياض. المملكة العربية السعودية .

**عالم ، شاهينه جمشيد . ١٩٩٥.** بعض الدراسات الوراثية للتأثير الطفوري لمركب كلوريد الكادميوم على الفئران . مجلة عالم الكتب . المجلد السادس . العدد الأول . دار ثقيف للنشر والتأليف . جدة .

**العمر ، مثنى عبد الرزاق . ٢٠٠٠.** *التلوث البيئي* . الطبعة الأولى . وائل للنشر والتوزيع .

**غرايبة ، سامح ؛ الفرحان ، يحي . ١٩٩١.** *المدخل إلى العلوم البيئية* . ط٣ ، دار الشرق للنشر والتوزيع ، عمان .

**غزالي ، كمال شرقاوي . ١٩٩٦.** *من أجل بيئة أفضل . التلوث البيئي العقدة والحل* . مؤسسة شباب الجامعة ، الإسكندرية .

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

## المراجع الأجنبية

## References

**Adler, I.D. 1984.** Cytogenetic tests in mammals, In: Mutagenecity Testing. A Practical Approach ( Venitt, S. and Parry, J. M. eds ), IRL Press, Oxfoed, pp.275-306.

**Adler, I.D., Kliesch, U., van Hummelen, P. and Kirsch-Volders, M. 1991.** Mouse micronucleus tests with known and suspect spindle poisons: results from two laboratories. Mutagenesis, 6(1):47-53.

**Adler, I.D., Kliesch, U., Jentsch, I. and Speicher, M.R. 2002.** Induction of chromosomal aberrations by dacarbazine in somatic and germinal cells of mice. Mutagenesis, 17(5):383-389.

**Alessio, L., Apostoli, P., Forni, A. and Toffoletto, F. 1993.** Bioiogical monitoring of cadmium exposure-an Italian experience. Scand. J. Work Environ. Health, 19(1):27-33.

**Amacher, D.E. and Paillet, S.C. 1980.** Induction of trifluorothymidine-resistants mutants by metal ions in L5178Y/TK+/-cells. Mutation. Res., 78:279-288.

**Anderson, D. 1984.** The Dominant Lethal Test in Rodents, In: Mutagenecity Tsting , A Practical Approach ( Venitt, S. and Parry, J.M., eds ), IRL Press, oxford, pp. 307.

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

**ATSDR. 1993.** Toxicological Profile for cadmium. Rep. TP-92/06. U.S. Department of Health and Human Services, Puplic Health Service, Agency for Toxic substances and Disease Registry, Atlanta.

**ATSDR. 1997.** Toxicological Profile for cadmium, Draft for public comment ( update ). U. S. Department of Health and Human Services, Puplic Health Service, Agency for Toxic substances and Disease Registry, Atlanta.

**ATSDR. 1999.** Toxicological Profile for arsenic. U. S. Department of Health and Human Services, Puplic Health Service, Agency for Toxic substances and Disease Registry, Atlanta.

**Babich, H. and Borenfreund, E. 1990.** Cytotoxic effects of food additives and pharmaceuticals on cells in culture as determined with the neutral red assay. J. Pharm. Sci., 79(7):592-594.

**Bagchi, D., Bagchyi, M., Hassoun, E.A. and Stohs, S.J. 1995.** *In vitro* and *in vivo* generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. Toxicology, 104(1-3):129-140.

**Bassendowska-Karska, E. and Zawadzka-Kos, M. 1976.** Cadmium sulfate does not induce sister chromatid exchanges in human lymphocytes *in vitro*. Toxicol. Lett., 37:173-175.

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

**Bateman, A.J. and Epstein, S.S. 1971.** Chemical Mutagens: Principles and Methods for their Detection ( Hollaender, A. ed ), Plenum Press, New York : pp. 541..

**Bauchinger, M., Schmid, E. and Einbrodt, H.J. 1976.** Chromosome aberrations in lymphocytes after occupational exposure to lead and cadmium . Mutation. Res., 49:57-62.

**Bench, G., Corrzett, M.H., Martinelli, R. and Balhorn, R. 1999.** Cadmium concentrations in the testes, sperm and spermatids of mice subjected to long-Term cadmium chloride exposure. Cytometry, 35:30-36.

**Betka, M. and Callard, G.V. 1999.** Stage-dependent accumulation of cadmium and induction of metallothionein-like binding activity in the testis of the dogfish shark Squaius acanthias. Biology of Reproduction, 60:147-157.

**Bruce, W.R. and Heddle, J.A. 1979.** The mutagenic activity of 61 agents as determined by the micronucleus, salmonella, and sperm abnormality assays. Can. J. Genet. Cytol., 21:319-334.

**Bui, T.H., Lindsten, J. and Nordberg, G.J. 1975.** Chromosome analysis of lymphocytes from cadmium workers and Itai-Itai patients. Environ. Res., 9:187-195.

**Casalino, E., Calzaretti, G., Sblano, C. and Landriscina, C. 2002.** Molecular inhibitory mechanisms of antioxidant enzymes in rat liver and Kidney by cadmium. Toxicology, 179: 37-50.

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

**Cohen, J.J. 1994.** Apoptosis: physiological cell death. J. Lab. Clin. Med., 124:761-765.

**Cohen, J.J. and Duke, R.C. 1992.** Apoptosis and programmed cell death in immunity. Ann. Rev. Immunol., 10:267-293.

**Corcoran, G.B., Fix, L., Jones, D.P., Moslen, M.T., Nicotera, P., Oberhammer, F.A. and Buttyan, R. 1994.** Apoptosis: Molecular control point in toxicity. Toxicol. Appl. Pharmacol., 128:169-181.

**Cullen, M.R., Kayne, R.D. and Robins, J.M. 1984.** Endocrine and reproductive dysfunction in men associated with occupational inorganic lead intoxication. Arch. Envion. Health, 39:431-440.

**Dalton, T., Fu, K., Enders, G.C., Palmiter, R.D. and Andrews, G.K. 1996.** Analysis of the effects of overexpression of metallothionein-I in transgenic mice on the reproductive toxicology of cadmium. Environ. Health Perspect., 104(1):68-76.

**Danielsson, B.R.G., Denker, L., Lindgren, A. and Tjalve, H. 1984.** Accumulation of toxic metals in male reproductive organs. Arch. Toxicol. ( suppl. ), 7:177-180.

**Datta, S.S., Mallick, P.P. and Khuda-Bukhah, A.A. 2001.** Comparative efficacy of two microdoses of a potentized homoeopathic druy, Cadmium Sulphoricum, in reducing genotoxic effects produced

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

by cadmium chloride in mice: a time course study. BMC Complementary and Alternative Medicine, 1:9-15.

**Deaven, L.L. and Campdell, E.W. 1980.** Factors affecting the induction of chromosomal aberrations by cadmium in Chinese hamster cells. Cytogenet. Cell. Genet., 26:251-260.

**Deknudt, G. and Leonard, A. 1975.** Cytogenetic investigations on leucocytes of workers from a cadmium planet. Environ. Physiol. Biochem., 5:319-327.

**Deknudt, G. and Deminatti, M. 1978.** Chromosome studies in human lymphcytes after *in vitro* exposure to metal salts. Toxicology, 10:67-75.

**Deknudt, G. and Gerber, G.B. 1979.** Chromosomal aberrations in bone marrow cells of mice given a normal or a calcium-deficient diet supplemented with various heavy metals. Mutation. Res., 68:163-168.

**Deknudt, G., Leonard A. and Ivanov, B. 1973.** Chromosome aberrations in male workers occupationally exposed to lead. Environ. Physiol. Biochem., 3:132-138.

**DeLaFueute, H., Portales-Peraz, D., Baranda, L., Diaz-Barriga, F., Saavedra-Alanis, V., Layseca, E. and Gonzalez-Amaro, R. 2002.** Effect of arsnic, cadmium and lead on the induction of apoptosis of normal human mononuclear cells. Clinical and Experimental Immunology, 129(1):69-81.

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

**Denizeau, G. and Meminatti, M. 1978.** Chromosome studies in human lymphocytes after *in vitro* exposure to metal salts. Toxicology, 10:67-75.

**Denizeau, F. and Marion, M. 1989.** Genotoxic effects of heavy metals in rat hepatocytes.Cell Biol. Toxicol., 5:15-26.

**Devi, K.D., Banu, B.S., Mahboob, M., Jamil, K., and Grover, P. 2001.** *In vivo* genotoxic effect of cadmium chloride in mice leukocytes using comet assay. Teratog. Carcinog. Mutagen., 21(5):325-333.

**Dudley, R., Sroboda, D. and Klaassen, C. 1982.** Acute exposure to cadmium causes severe liver injury in rats. Toxicol. Appl. Phamacol., 65:302-313.

**Dudley, R., Sroboda, D. and Klaassen, C. 1984.** Time-course of cadmium-induced ultrastructural changes in rat liver. Toxicol. Appl. Phamacol., 76:150-160.

**Duffus, J. 2001.** Heary Metals-A Meaningless Term. Chemistry International. 23(6):361-368.

**Ebringer, L., Dobias, J., Krajcovoic, J., Polonyi, J., Krizkova, L. and Lahitova, M. 1996.** Antimutagens reduce afloxacin-induced bleaching in Euglena-gracilis. Mutation Res., 359(2):85-93.

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

**EL-Azzouzi, B., Tsangaris, G. T., Pellegrini, O., Manuel, Y., Benveniste, J. and Thomas, Y. 1994.** Cadmium induces apoptosis in a human T cell line. Toxicology, 88:127-139.

**Epstein, S.S., Arnold, E. and Andrea 3. 1972.** Detection of chemical mutagens by the dominant lethal assay in the mouse. Toxicol. Appl. Pharmacol., 23:288-325.

**Ercal, N., Gurer-Orhan, H. and Aykin-Burns, N. 2001.** Toxic metals and oxidative strees part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. Curr. Top. Med. Chem., 1: 529-539.

**Fahmy, M.A. and Aly, F. A. 2000.** *In vivo* and *in vitro* studies on the genotoxicity of cadmium chloride in mice. J. Appl. Toxicol., 20(3):231-239.

**Fatur, T., Tusele, M., Falnoga, I., Sancar, J., Lah, T. and Filipic, M. 2002.** DNA damage and metallothionein synthesis in human heptoma cells ( Hep $G_2$ ) exposed to cadmium-Cell Chem. Toxicol., 40(8):1069-1076.

**Fleig, I., Rieth, H., Stocker, W.G. and Thiess, A.M. 1983.** Chromosome investingations of workers expoed to cadmium in the manufacturing of cadmium stabilizers and pigments. Ecotoxicol. Environ. Saf., 7:106-110.

**Foulkes, E.C. 1990.** The concept of critical levels of toxic heavy metals in target tissues. Toxicology, 20:327-339.

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

**Fowler, B.A. 1978.** General subcellular effects of lead, mercury, cadmium, and arsenic. Environ. Health Perspect., 22: 3741.

**Fox, S. 1988.** Nutritional factors that may influence bioavailability of cadmium. J. Environ. Qual., 17: 175-180.

**Garcia, V.A.P., Lacava, L.M., Kückelhaus, S., Azevedo, R.B., DaSilva, M.F., Mora's, P.C., De Cuyper, M. and Lacava, Z.G.M. 2002.** Magnetoliposome evaluation using cytometry and micronucleus test. Eur. Cells and Materials, 3(2):154-155.

**Gasiorek, K. and Bauchinmer, M. 1981.** Chromosome changes in human lymphocytes after separate and combined treatment with divalent salts of lead, cadmium, and zinc. Environ. Mutagen. 3:531-518.

**Gimmler-Luz, M.C., Cardaso, V.V., Sardiglia, C.U. and Widholzer, D.D. 1999.** Transplacental inhibitory effect of carrot juice on the clastogenicity of cyclophosphamide in mice. Genet. Mol. Biol., 22(2):107-119.

**Gilliavod, N. and Leonard, A. 1975.** Mutagenicity tests with cadmium in the mouse. Toxicology, 5:43-47.

**Gossel, T.A. and Bricker, J.D. 1994.** Principles of Clinical Toxicology. 3rd ed. Raven Press. New york.

**Green, S., Auletta, A., Fabricant, J., Kapp, R., Manandhar, M., Sheu, C., Springer, J. and Whitfield, B. 1985.** Current status of

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

bioassays in genetic toxicology-the dominant lethal assay. Report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutation Res., 154:49-67.

**Grillo, C.A. and Dulout, F.N. 1995.** Cytogenetic evaluation of butylated hydroxytoluene. Mutation Res., 345:73-78.

**Grillo, C.A. and Dulout, F. N. 1997.** The effect of butylated hydroxytoluene on the chromosomal damage indudced by bleomycin in Chinese hamster ovary cells. Mutation Res., 375:83-89.

**Grillo, C.G., Seoane, A.I. and Dulout, F.N. 1999.** Protective effect of butylated hydroxyltoluene ( BHT ) against the clastogenic activity of cadmium chloride and potassium dichromate in Chinese hamster ovary cells. Genet. Mol. Biol., 22(1):19-24.

**Habeebu, S., Liu, M., Liu, Y. and Klaassen, C. 1997.** Metallothionein-I/II Knock-out mice are vulnerable to chronic $CdCl_2$-induced hepatotoxicity. The Proceedings of the Fourth International Metallothionein Meeting, abstract No. 147.

**Habeebu, S.S. M., Liu, J. and Klaassen, C.D. 1998.** Cadmium-Induced Apoptosis in Mouse Liver. Toxicol. Appl. Pharmacol., 149:203-209.

**Hamada, T., Tanimoto, A. and Sasaguri, Y. 1997.** Apoptosis induced by cadmium . Apoptosis, 2:359-367.

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

**Hammond, P.B. and Beliles, R.P. 1980.** Metals. In: Casarett and Doull's Toxicology the Basic Science of Poisons ( Doull, J. Klaassen, C.D. and Amdur, M.O. eds ) , 2nd Edit. Macmillan Publishing Company, New York, pp. 409-467.

**Han, C., Wu, G., Yin, Y. and Shen, M. 1992.** Inhibition of germanium oxide of the mutagenicity of cadmium chloride in various genotoxicity assays. Food Chem. Toxicol., 30:521-524.

**Hartwig, A. 1994.** Role of DNA repair inhibition in lead-and cadmium genotoxicity: a review. Environ. Health Perspect., 102(3):45-50.

**Hartwig, A. 1995.** Current aspects in metal genotoxicity. Biometals, 8(8):3-11.

**Hartwig, A. 2000.** Recent advances in metal carcinogenicity. Pure Appl. Chem., 72(6):1007-1014.

**Hayashi, M., Tice, R., MacGregor, J., Anderson, D., Blakey, D., Kirsh-Volders, M., Olsen, F., Pacchierotti, F., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. 1994.** *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. Mutation Res., 312:293-304.

**Hebbe, J.A., Salamone, M.F., Hite, M., Kirkhat, B., Mavournin, K., MacGregor, J.G. and Newell, G.W. 1983.** The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity. Mutation Res., 123:61-118.

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

**Herber, D. 1994.** Nutrition in the prevention of chemical carcinogenesis. J. Nat. Cancer Inst., 60:11-18.

**Herold, B., Brendler-Schwaab, S. and Ahr, H. 2001.** Ciprofloxacin: *in vivo* genotoxicity studies. Mutation Res., 498:193-205.

**Hirose, M., Masuda, A., Imaida, K., Kagawa, M., Tsuda, H. and Ito, N. 1987.** Induction of forestomach lesions in rats by oral administrations of naturally occurring antioxidants for 4 weeks. Jpn. J. Cancer Res., 78:317-321.

**Hocman, G. 1988.** Chemoprevention of cancer: phenolic antioxidants (BHT, BHA ). Int. J. Biochem. 20(7):639-651.

**Hodgman, C.D., Weast, R.C., Shankland, R.S. and Selby, S.M. 1961.** Handbook of chemistry and Physics. 43rd Edition. Chemical Rubbber publishing Company, Cleveland.

**Hollstein, M.J., MaCann, J., Angelosanto, F.A. and Nichols, W.W. 1979.** Short-term tests for carcinogens and mutagens. Mutation, Res. 65:173-226.

**Hossain, Z. and Huq, F. 2002.** Studies on the interaction between Cd (2+) ions and DNA. J. Inorg. Biochem., 90(3-4):85-96.

**Imaida, K., Fukushima, S., Shirai, T., Masui, T., Ogiso, T. and Ito, N. 1984.** Promoting activites of butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene and sodium 1-ascorbate on forestomach and

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

urinary bladder carcinogenesis initiated with methylnitrosourea in F344 male rats. Gann. 75:769-775.

**Ishido, M., Homma, S.T., Leung, P.S. and Tohyoma, C. 1995.** Cadmium-induced DNA fragmentation is inhibitable by zinc in porcine kidney LLC-PK1 cells. Life Sci., 56:L351-L356.

**Ishido, M., Homma-Takeda, S., Tohyama, C. and Suzuki, T. 1998a.** Apoptosis in rat renal proximal tubular cells induced by cadmium. J. Toxicol. Environ. Health, 55:1-12.

**Ishido, M., Tohyama, C. and Suzuki, T. 1998b.** c-myc is not involved in cadmium-elicited apoptotic pathway in porcine kidney LLC-PK1 cells. Life Sci., 63:1195-1204.

**Ishido, M., Suzuki, T., Adachi, T. and Kunimoto, M. 1999a.** Zinc stimulated DNA synthesis during its antiapoptotic action independently with increments of an antiapoptotic protein, Bcl-2, in porcine kidney LLC-PK(1) cells. J. Pharmacol. Exp. Ther., 290:923-928.

**Ishido, M., Tohyama, C. and Suzuki, T. 1999b.** Cadmium-bound metallothioein induces apoptosis in rat kidneys but not in cultured kidney LLC-PK1 cells. Life sci., 64:797-804.

**Jagetia, G.C. and Adiga, S.K. 1994.** Cadmium chloride induces dose-dependent increaseses in the frequeucy of micronuclei in mouse bone marrow. Mutation Res., 306(1):85-90.

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

**Jagetia, G.C. and Reddy, T.K. 2002.** The grapefruit flavanone naringin protects against the radiation-induced genome instability in the mice bone marrow: a micronucleus study. Mutation Res., 519 (1-2):37-48.

**Jin, Y., Clark, A., Slebos, R., Taylor, J., Kunkel, T., Resnick, M. and Gordenin, D. 2003.** Cadmium is a mutagen that acts by inhibiting mismatch repair. Nature Genetics, 34:326-329.

**Kanematsu, N., Hara, M. and Kada, T. 1980.** Rec assy and mutagenicity studies on metal copmounds. Mutation Res., 77:109-116.

**Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H. and Currie, A.R. 1972.** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wibe-ranging implication in tissue kinetics. Br. J. Cancer. 26:239-257.

**Klaassen, C.D. 1992.** Heavy metals and heavy-metal antagonists. In: Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics., vol.2, 8th Edition.

**Klaassen, C.D. and Wong, K.L. 1982.** Cadmium toxicity in the newborn rat . Canadian Journal of Physiology and pharmacology., 60: 1027-1036.

**Klaassen, C.D., liu J. and Choudhuri, C. 1999.** Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. Ann. Rev. pharmacol. Toxicol., 39: 267-294.

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

**Koizumi, S. and Yamada, H. 2003.** DNA microarray analysis of altered gene expression in cadmium-exposed human cells. J. Occup. Health, 45:331-114.

**Kotsonis, F. and Klaassen, C. 1977.** Toxicity and distribution of cadmium administered to rats at sublethal doses. Toxcol. Appl. Phamacol., 41:667-680.

**Lafere, J., Hens, L., Tournaye, H. and Van Steirteghem, A. 2000.** Cadmium and reproductivity: Changes in litter size after exposure of male mice to $CdCl_2$ for 6months. Andrologia, 32:187-194.

**Lanigan, R. and Yamarik, T. 2002.** Final report on the safety assessment of BHT ( 1 ). Int. J. Toxicol., 21(2):19-94.

**Latinwo, L. M., Ikediobi, C.O., Singh. N.P., Sponhltz, G., Fasanya, C. and Riley. 1997.** Comparative studies of in vivo genotoxic effects of cadmium chloride in rat brain, Kidney and liver cells. Cell. Mol. Biol. 43(2):203-210.

**Ledda-Columbano, G., Coni, P., Curto, M., Giacomini, L., Faa, G., Oliverio, S., Piacentini, M. and Columbano, A. 1991.** Indction of two different modes of cell death, apoptosis and necrosis in rat liver after a single dose of thioacetamide. Am. J. Pathol., 139:1099-1109.

**Leopardi, P., Zijno, A., Bassanin, B. and Pacchierotti, F. 1993.** *In vivo* studies on chemically induced aneuploidy in mouse somatic and germinal cells. Mutation Res., 287(1):119-130.

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

**Liu, J., Liu Y., Michalska, A., Choo, K. and Klaassen, C. 1996.** Distribution and retention of cadmium in metallothionein I and II null mice . Toxicology and Applied Pharmacology, 136:260-268.

**Lohmann, R.D. and Beyersmann, D. 1994.** Effect of zinc and cadmium on apoptotic DNA fragmentation in isolated bovine liver nuclei. Environ. Health Perspect. 102 ( Suppl 3 ), 269-271.

**Lopez-Ortal, P., Souza, V., Bucio, L., Gonzalez, E. and Gutierrez-Ruiz, M.C. 1999.** DNA damage produced by cadmium in a human fetal hepatic line. Mutation Res., 439(2):301-306.

**Mailhes, J.B., Preston R.J. and Yuan, Z.P. 1988.** Analysis of mouse metaphase II oocytes as an assay for chemically induced aneuploidy. Mutation. Res., 198:145-152.

**Mandel, R. and Ryser, H.J.P. 1984.** Mutagenicity of cadmium in Salmonella typhimurium and its synergism with two nitrosamines. Mutation. Res., 138:9-16.

**Margeli, A., Theocharis, S., Skaltsas, S., Skopelitou, A., Kittas, C., Mykoniatis, M. and Varonos. 1994.** Effect of cadmium pretreatment on liver regeneratiom after partial hepatectomy in rats . Archives of Toxicology, 68: 85-90.

**Marrazzini, A., Betti, C., Bernacchi, F., Barrai, I. and Barale, R. 1994.** Micronucleus test and metaphase analysis in mice exposed

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

to known and suspected spindle poisons. Mutagenesis, 9(6):505-515.

**Martin, J.J., Martin, R., Codesal, J., Fraile, B., Paniaguam R., and Santamaria, L. 2001.** Cadmium chloride-induced dysplastic changes in the ventral rat prostate: an immunohistochemical and quantitative study. Prostate, 46(1):11-20.

**McCann, J. and Ames, B.N. 1978.** The salmonella / micorsome mutagenicity test: Predictive value for animal carcinogenicity. In: Mutagenesis, ( Flamm, W. C. and Mehlman, M.A. eds), Hemisphere, Washington DC.

**Mckenna, I.M., Bare, R.M. and Waalkes, M.P. 1996.** Metallothionein gene expression in testicular interstitial cells and liver of rats treated with cadmium. Toxicology, 107: 121-130.

**McMurray, C.T. and Tainer, J. A. 2003.** Cancer, cadmium and genome integrity. Nature Genetics, 34(3):239-241.

**Milvy, P. and Kay, K. 1978.** Mutagenicity of 19 major graphic arts and printing dyes. J. Toxicol. Environ. Health., 4:41-36.

**Misra, R.R., Smith, G.T. and Waalkes, M.P. 1998.** Evaluation of the direct genotoxic potential of cadmium in four different rodent cell lines. Toxicolory, 126(2):103-114.

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

**Mukherjee, A., Giri A.K. and sharma, A. 1988a.** Relative efficacy of short-term tests in detecting genotoxic effects of cadmium chloride in mice in vivo. Mutation. Res., 206:285-295.

**Mukherjee, A., Sharma, A. and Talukder, G. 1988b.** Effect of selenium on cadmium-induced chromosomal abrrations in bone marrow cells of mice. Toxicol. Lett., 41:23-29.

**Nagata, S., Nagase, H., Kawane, K., Mukae, N. and Fkuyama, H.F. 2003.** Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. Cell Death and Differetiation, 10(1):108-116.

**Nat'l Academies Press, Toxicologic Assessment of the Army's Zinc Cadmium Sulfide Dispersion Tests,. 1997.** Toxicity and Related Data on Selected Cadmium compounds. The National Academies Press, Washington DC.

**Nayak, B.N., Ray, M. and Persayd T.V. 1989.** Embyotoxicity and *in vivo* cytogenetic changes following maternal exposure to cadmium chloride in mice. Exp. Pathol., 36:75-80.

**Nehez, M., Lorencz, R. and Desi, I. 2000.** Simultaneous action of cypermethrin and two enviromental pollutant metals, cadmium and lead, on bone marrow chromosomes of rats in subchronic administration. Ecotoxicol. Environ. Saf., 45(1):55-60.

**Nishioka, H. 1975.** Mutagenic activities of metal compounds in bacteria. Mutation. Res., 311:185-189.

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

**Nordberg, G.E., Kjellstrom, T. and Nordberg, M. 1985.** Kinetics and metabolism. In: Cadmium and Health: A. Toxicological and Epidemiological Appraisal ( Friberg, L., Elinder, C.G., Kjellstrom, T, eds ), Vol.1: Exposure, Dose and Metabolism. CRC Press , Boca Raton. pp.103-178.

**Oberly, T.J., Piper, C.E. and McDonald, D.S. 1982.** Mutagenecity of metal salts in the L5178Y mouse lymphoma assay. J. Toxicol. Environ. Health., 9:367-376.

**Ochi, T. and Ohsawa, M. 1985.** Participation of chromosomal aberrations by cadmium chloride in cultured Chinese hamster cells. Mutation Res., 143:137-142.

**Ochi, T., Mogi, M., Watanabe, M. and Ohsawa, M. 1984.** Induction of chromosomal aberrations in cultured Chinese hamster cells by short-term treatment with cadmium chloride. Mutation Res., 137:103-109.

**Ochi, T., Takahashi, K. and Ohsawa, H. 1987.** Indirect evidence for the induction of a preoxidant state by cadmium chloride in cultured mammalian cells and a possible mechanism for the induction. Mutation Res., 180(2):257-266.

**Ohtsuka, R., Doi, K. and Itagaki, S. 1997.** Histological Characteristics of Respiratory System in Brown Norway Rat. Exp. Anim. 46(2):127-133.

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

**Olabarrieta, I., L'Azou, B., Yuric, S., Cambar, J., and Cajaravlle, M.P. 2001.** *In vitro* effects of cadmium on two different animal cell models. Toxicol. In Vitro, 15:511-517.

**OPPTS .1998(August).** Rodent Dominant Lethal Assay. In: EPA 712-C-98-227.

**O'Riordan, M.L., Hughes, E.G. and Evans, H.J. 1978.** Chromosomal studies on blood lymphocytes of men occupationally exposed to cadmium. Mutation. Res., 58:305-311.

**Osipov, A.N., Grigorv, M.V., Sypin, V.D., Pomerantseva, M.D., Ramaiia, L. and Shevchehenko, V.A . 2000.** The effect of chronic exposure to cadmium and gamma radiation at low doses on the genetic structures in mice. Radiat. Biol. Radioecol., 40(4):373-377.

**Patnaik, P. 1992.** "A Comprehensive Guide to the Hazardous Properties of Chemical Substances, "Van Nostrand Reinhold , New York, 763 p.

**Paton, G.R., and Allison, A.C. 1972.** Chromosome damage in human cell culture induced by metal salts. Mutation. Res., 16:332-336.

**Patrick, L. 2003.** Toxic metals and antioxidants: part II, the role of antioxidants in arsenic and cadmium toxicity. Alternative Medicine Review.

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

**Pope, A. and Rail D.E.,. 1995.** Environmental Medicine: Integrating a Missing Element Into Medical Education. National Academy press, pp. 230 Washington DC .

**Privezentsev, K.V., Sirota, N.P. and Gaziev, A.I. 1996.** The genotoxic effects of cadmium studied in vivo. Tsitol. Genet., 30(3):45-51.

**Reynolds, E., Kanz, M., Chieco, P. and Moslen, M. 1984.** 1,1-Dichloroethylene: an apoptotic hepatotoxin? Envron. Health Perspect., 57:313-320.

**Risso-de Faverney, C., Devauxm A., Lafaurie, M., Girod, J. P., Bailly, B. and Rahmani, R. 2001.** Cadmium induces apoptosis and genotoxicity in rainbow trout hepatocytes through generation of reactive oxygen species. Aquat. Toxicol., 53(1):65-76.

**Rohr, G. and Bauchinger M. 1976.** Chromosome analysis in cell cultures of the Chinese hamster after application of cadmium sulfate. Mutation. Res., 40:125.

**Rossman, T., Roy, N. and Lin, W. 1992.** Is cadmium genotoxic? IARC Sci. Publ., 118:367-375.

**Rozgaj, R., Horvat, D., Racic, J., Bauman, A. and Pisl, Z. 1983.** Cytogenetic effects of lwo dose ionizing radiation and heavy metals on cells in culture. Period. Biol., 85:367-375.

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

**Rozgaj, R., Kasuba, V. and Fucic, A. 2002.** Genotoxicity of cadmium chloride in human lymphocytes evaluated by the comet assay and cytogenetic tests. J. Trace Elem. Med. Biol., 16:187-192.

**Saplakoglu, U. and Iscan, M. 1998.** Sister chromatid exchanges in human lymphocytes treated in vitro with cadmium at $G_0$ and S phase of their cell cycle. Mutation Res., 412:109-114.

**Sasaki, Y.F., Kawaguchi, S., Kamaya, A., Ohshita, M., Kabasawa, K., Iwama, K., Taniguchi, K., Tsuda, K., S. 2002.** The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currenthy used food additives. Mutation Res., 519(1-2):103-109.

**Schrag, S.D. and Dixon, R.L. 1995.** Occupational exposures associated with male reproductive dysfunction. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 25:567-592.

**Seane, A.I. and Dulout, F.N. 1994.** Use of the anaphase-telophase test to detectaneugenic compounds: effects of propionaldehide and cadmium chloride. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 53:924-929.

**Selypes, A., Serenyi, P., Boldog, II., Bokros, F., and Takacs, S. 1992.** Acute and longterm genotoxic effects of $CdCl_{sub}$ (2) on testes of mice. J. Toxicol. Environ. Health, 36(4):401-409.

**Shaikh, Z. and Lucis, O. 1972.** Biological differences in cadmium and zinc turnover. Arch. Environ. Health, 24:410-418.

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

**Shen, H.M., Dong, S.Y., Ongm, C.N. 2001.** Critical role of calcium overloading in cadmium-induced apoptosis in mouse thymocytes. Toxicol. Appl. Pharmacol., 171(1):12-19.

**Shiraishi, Y., Yoshida, T.H. 1972.** chromosomal abnormalities in cultured leucocyte cells from Itai-itai disease patients. Proc. Japan. Acad., 48:248-251.

**Shiraishi, Y., Kurahashi, H. and Yoshida, T.H. 1972.** Chromosomal aberrations in cultured human leucocytes induced by cadmium sulfide. Proc. Japan. Acad., 84:133-137.

**Shiraishi, N., Rehm, S. and Waalkes, M.P. 1994.** Effect of chlorpromazine pretreatment on cadmium toxicity in the male Wistar ( WF/NCr ) rat . Journal Toxicology and Environmental Health., 42: 193-208.

**Smirnova, E., Lyubimov, Yu., Malinina, T., Lyubimova, E., Alexandrushkina, N., Vanyushin, B., Koloesva, G. and Yaduzhinsky, L. 2002.** Ionol ( BHT ) produces superoxide Anion. Biochemistry ( Moscow ), 67(11):1271-1539.

**Soares, E.R. and Sheridan, W. 1977.** Triethyl-enemelamine induced dominant lethals in mice-comparisons of oral versus intraperitoneal injection. Mutation Res., 43:437-442.

**Sokal, R.R. and Rohlf, F.J. 1981.** Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research. W.H. Freeman and Company , San Francisco, 859 p.

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

**Stohs, S. J. and Bagchi D. 1995.** Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. Free. Radic. Biol. Med. 2:321-336.

**Stohs, S., Bagachi D., Hassoun, E. and Bagachi, M. 2001.** Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol., 20(2):77-88.

**Stinson, L., Damon, A., Dagnino, L. and D;Souza, S. 2003.** Delayed apoptosis post-cadmium injury in renal proximal tubule epithelial cells. Am. J. Nephrol., 23:27-37.

**Sudo, J., Hayashi, T., Kimura, S., Kakuno, K., Terui, J., Takashima, K. and Soyama, M. 1996.** Mechanism of nephrotoxicity induced by repeated administration of cadmium chloride in rats . Journal of Toxicology and Environmental Health., 48: 333-348.

**Suter K.E. 1975.** Studies on the dominant-lethal and fertility effects of the heavy metal compounds methylmercuric hydroxide, mercuric chloride, and cadmium chloride in male and female mice. Mutation. Res., 30:365-374.

**Sutou S., Yamamoto, K. and Sendota H. 1980.** Toxicity, fertility, teratogenicity, and dominant lethal tests in rats administered cadmium subchronically .III. Fertility, teratogenicity, and dominant lethal tests. Ecotoxicol. Environ. Safety., 4:51-56.

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

**Tang, X.M., Chen, X.Q. and Zhang J.X. 1990.** Cytogenetic investigation in lymphocytes of people living in cadmium-polluted areas. Mutation. Res., 241:243-249.

**Teamoto, S., Saito, R., Aoyama, H. and Shirasu, Y. 1980.** Dominant lethal mutation induced in male rats by 1,2-dibromo-3-chloropropane ( DBCP ). Mutation Res., 77:71-76.

**Thomas, J.A. and Brogan, W.C. 1983.** Some actions of lead on the sperm and on the male reproductive system. Am. J. Int. Med., 4:127-183.

**Thompson, D. and Moldeus, P. 1988.** Cytotoxicity of butylated hydroxyanisole and butylatedhydroxytoluene in isolated rat hepatocytes. Biochem. Pharmacol., 37(11):2201-2207.

**Tice, R.R. and Shelby, M.D. 1994.** Report of in vivo subgroup. Mutation Res., 312:287-292.

**Torra, M., Figueras, J., Rodamilans, Brunet, M. and Corbella J. 1995.** Cadmium and zinc relationships in the liver and kidney of humans exposed to environmental cadmium. The Science Of the Total Environment,170: 53-57.

**Valverde, M., Fortoul, T.I., Diaz-Barriga., F., Mejia, J. and del Castillo, E.R. 2000.** Induction of genotoxicity by cadmium chloride inhalation in several organs of C1 mice. Mutagenesis, 15(2):109-114.

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

**Vanyushin, B.F., Lopatina, N.G., Wise, C.K., Fullerton, F.R., and Poirier, L.A. 1998.** Butylatedhydroxyltoluene modulates DNA methylation in rats. Eur. J. Biochem. 256:518-527.

**Volkova, N.A. and Karpliuk, I.A. 1990.** The mutagenic activity of cadmium in peroral uptake. Vopr. Pitan., 1:74-76.

**Wang, X. and Witschi, H. 1995.** Mutation of the ki-ras protooncogene in 3-methylcholanthrene and urethane-induced and butylatedhydroxytoluene promoted lung tumors of strain A/J and SWR mice. Cancer Lett., 91:33-39.

**Wasowicz, W., Gromadzinska, J. and Rydzynski, K. 2001.** Blood concentration of essential trace elements and heavy metals in workers exposed to lead and cadmium, Int J. Occup. Med. Emviron. Health., 14: 223-229.

**Watanabe, M. and Endo, A. 1982.** Chromosomal analysis of preimplantation embryos after cadmium treatment of oocytes at meiosis. I. Environ. Mutagen., 4:563-567.

**Watanabe, M. and Suzuki, T. 2002.** Involvement of reactive oxygen stress in cadmium-induced cellular damage in Euglena gracilis. Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol., 131(4):491-500.

**Watanabe, M., Shimada, T. and Endo, A. 1979.** Mutagenic effects of cadmium on mammalian occyte chromosomes. Mutation. Tes. 67:349-356.

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

**Watanabe, M., Honba, S., Hayashi, M. and Matsuda, T. 1982.** Mutagenic effects of combinations of chemical carcinogens and environmental pollutants in mice as shown by the micronucleus test. Mutation Res., 67(1):43-48.

**Waters, M.D., Brady, A.L., Stack, H.F. and Broxkman, H.E. 1990.** Antimutagenic profiles for some model compounds. Mutation Res., 238:75-85.

**Watjen, W. and Beyersmann, D. 2004.** Cadmium induced apoptosis in C6 glioma cells: influence of oxidative stress. Biometals, 17(1):65-78.

**Wattenberg, L.W. 1978**. Inhibition of chmical carcinogenesis. J. Nat. Cancer. Inst., 60:11-18.

**Weast, R.C., Astle, M.J. and Beyer, eds. 1988.** CRC Handbook of Chemistry and Physics, 69th Edition. Chemical Rubker Publishing Company, Boca Raton.

**Williams, G.M., Iatropoulos, M.J. and Whysner, J. 1999.** Safety assessment of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene as antioxidant food additives. Food Chem. Toxicol. 37(9-10):1027-1038.

**Wischi, H.R. and Morse, C.C. 1983.** Enhancement of lung tumor formation in mice by dietary butylated hydroxyltoluene: dose-

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

time relationships and cell kinetics. J. Natl. Cancer. Inst., 71:859-866.

**Wong, P.K. 1988.** Mutagenicity of heavy metals. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 40:597-603.

**Xu, C., Johnson, J.E., Singh, P.K., Jones, M.M., Yan, H., and Carter, C.E. 1996.** *In vivo* studies of cadmium-induced apoptosis in testicular tissue of the rat and its modulation by a chelating agent. Toxicology, 107:1-8.

**Yamamoto, K.I. and KiKuchi, Y. 1980.** A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. Mutation Res., 71:127-131.

**Yan, H., Carter, C.E. and Xu, C. 1997.** Cadmium induced apoptosis in the urogenital organs of the male rat and its suppression by chelation. J. Toxicol. Environ. Health., 52:149-168.

**Zamyatnina, A.V., Bakeeva, L.E., Aleksandrushkina, N.T. and Vanyushin, B.F. 2002.** Apoptosis in the Initial leaf of Etiolated Wheat Seedlings: Influence of the Antioxdant Ionol ( BHT ) and Peroxides. Biochemistry ( Moscow ), 67(2):212-253.

**Zenick, H., Hastings, L., and Goldsmith, M. 1982.** Chronic cadmium exposure: Relation to male reproductive toxicity and subsequent fetal outcome. J. Toxicol. Environ. Health., 9:377-387.

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

**Zimmerhackl, L.B., Momm, F., Wiegele, G., Brandis, M. 1998.** Cadmium is more toxic to LLC-PK1 cells than to MDCK cells acting on the cadherin-catenin complex. Am. J. Physiol., 275:F143-F153.

PDF created with FinePrint pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com