دراسة تأثير كلوريد الكادميوم على بعض المعايير الوراثية الخلوية في الجرذ الامهق

ظافرة جعفر عبد علي * كرار سليم زايد الشبلي**

*كلية التربية للبنات، جامعة الكوفة
**كلية العلوم، جامعة الكوفة

الخلاصة:

أجريت الدراسة الحالية في البيت الحيواني لكلية الطب / جامعة الكوفة ومختبرات الأنسجة المرضية ومختبر الدراسات العليا في كلية التربية للبنات للفترة من 2008/10/25 ولغاية 2009/3/19. تضمنت الدراسة تقويماً للجرعة الحادة لكلوريد الكادميوم (75 ملغم / كغم) من وزن الجسم والتجريع تحت المزمن الفموي (10 ، 20 ، 30) ملغم / لتر كلوريد الكادميوم في ماء الشرب لمدد (3 ، 6 ، 9) أسابيع في بعض المعايير الوراثية الخلوية والتي شملت مناطق التنظيم النووي AgNOR في الاثنى عشر والكبد والكلية وفحص النوى الصغيرة Micronuclei (MN) في الخلايا الحمر متعددة التلوين لنخاع العظم .

تشير نتائج التأثيرات الحادة وتحت المزمنة لكلوريد الكادميوم في هذه المعايير الوراثية الخلوية الى وجود زيادة معنوية في معدل عدد مناطق التنظيم النووي في الكلية ومعدل تردد النوى الصغيرة عند التعرض للجرعة الحادة من كلوريد الكادميوم مقارنةً بمجموعة السيطرة في حين أشارت نتائج التجريع تحت المزمن الى ارتفاع معنوي في معدل عدد مناطق التنظيم النووي في الكبد والكلية في التركيز 30 ملغم$CdCl_2$/ لتر والمدة 9 أسابيع وزيادة في معدل تردد النوى الصغيرة في تركيزي (20 ، 30) ملغم $CdCl_2$/ لتر من ماء الشرب والمدة الأخيرة (9 أسبوع) وكان للتداخل بين عاملي التركيز والمدة أهمية معنوية في رفع هذه المعايير.

Study the effects of Cadmium chloride on some cytogenetic parameters in albino rat

Dhafera Jafar Abd-Ali * Karrar S. Z. Al-Shebli**

*College of Education for Girls, University of Kufa
** College of Sciences, University of Kufa

Abstract:

The current study was carried out in the animal house of the College of Medicine in University of Kufa. It was conducted also in the laboratories of histopathology and biochemistry in Al-sadir Educational Hospital and Higher Education laboratory in the College of Education for girls / Kufa University, during the period 25/10/2008 – 19/3/2009. It was designed to demonstrate the influence of acute dose of Cadmium Chloride (75mg/kg) and oral subchronic administration (10,20,30) mg $CdCl_2$/L with drinking water for the periods (3,6,9) weeks in some cytogenetic parameter which include Argyrophilic Nucleolar Organizing Region (AgNOR) in duodenum, liver and kidney and the Micronuclei (MN) in Polychromatic Erythrocytes (PCE) of bone marrow.

It is found that the effect of acute and subchronic administration in some of the cytogenetic parameters has reveal significant elevation in the mean of AgNOR of kidney and MN in PCE exposure to $CdCl_2$ in acute administration compared with the control group, while in subchronic administration the significant increase happened in AgNOR of kidney and liver tissues at the concentration 30 mg $CdCl_2$/L and period 9 weeks, in addition to significant elevation of MN which was affected by the elevation of dosing level (20,30) mg $CdCl_2$/L from drinking water, prolonged of duration (9 weeks) and the interaction between these two factors.

المقدمة:

واكب التقدم الصناعي والتكنولوجي استخدام مئات المركبات الكيمياوية في شتى المنتجات الصناعية التي يعتمد عليها بشكل كبير في الحياة اليومية كالمنظفات الكيمياوية والمعقمات ومستحضرات التجميل والمواد الحافظة والأصباغ والمنتجات البلاستيكية وملطفات الجو ومبيدات الحشرات وغيرها من المنتجات التي أصبحت عنوانا للحضارة والتقدم والرقي والرفاهية، وكثيرٌ من هذه المنتجات تحوي على طائفة كبيرة من المركبات والعناصر الكيمياوية التي قد يمثل بعضها خطرا حقيقيا على صحة وسلامة من يتعرض لها ولاسيما أن كثيراً منها تمتلك خواصا سمية وتراكمية تؤثر على أجهزة جسم الإنسان خلال مدة زمنية طويلة (1)، ويعد الكادميوم من المعادن الثقيلة Heavy metals السامة إذ تزيد كثافته على خمسة أضعاف كثافة الماء (2,3,4,5) وهو من العناصر النزرة غير الضرورية للجسم Non essential trace metal ويوجد بكميات ضئيلة جدا في الجسم وفقدانه لا يؤثر في فعالياته الحيوية (6) وان وجوده بتراكيز عالية يلوث البيئة ويهدد الحياة لما يمتلك من قابلية على تعطيل التبادل الايوني مغيراً بذلك نفاذية الغشاء الخلوي (7).

هناك تأثيرات شديدة للكادميوم على أنسجة الجسم (8) إذ يمتلك عمر نصف يتراوح بين 15-35 سنة في جسم الإنسان مما يزيد خطورته التراكمية (9) ويخزن في الكبد والكليتين (10، 11) ويتوزع في مختلف الأنسجة والأعضاء كالرئة والقلب والدماغ والعظام والعضلات والأعضاء التناسلية (12) مما يسبب التلف الكبدي(13) والكلوي (14)ونخر وخزب الخصى (15) وارتفاع ضغط الدم (16) وتلف مخاطية المعدة(3,8) ،وعلى الرغم من إن الجسم له القدرة على إصلاح الخلل الذي يعتريه عند تعرضه لبعض السموم الكيمياوية الخطيرة إلا أن هذه القدرة الإصلاحية الذاتية لا يمكن أن تنجح في حال التعرض الحاد أو المزمن لبعض الجرعات من المواد السامة إذ إن الكادميوم من المواد التي لها القابلية على حث التحطم الكروموسومي وتكسير شريط الدنا DNA وهو من المواد المسرطنة التي تسبب سرطان الرئة والبروستات والخصى والكلية (17,18) ونظراً لخطورة الكادميوم وتأثيراته السلبية على صحة الإنسان اذ يدخل في العديد من الصناعات ذات الصلة بالإنسان فقد تم اختيار هذه الدراسة لمعرفة بعض تأثيراته الوراثية الخلوية والنسجية والكيموحيوية في اناث الجرذ الامهق.

المواد والطرائق:

الحيوانات:

ربيت الجرذان المستخدمة في الدراسة الحالية في البيت الحيواني التابع لكلية الطب /جامعة الكوفة و أجريت طرائق العمل في مختبر الدراسات العليا في قسم علوم الحياة /كلية التربية للبنات ومختبر الأنسجة المرضية في مستشفى الصدر التعليمي للفترة من 2008/10/25 ولغاية 2009/3/19.

في هذه الدراسة استخدم (94) حيوانا من اناث الجرذ الامهق Albinus rats والمعزولة عن الذكور قبل ثلاثة أسابيع من بدء العمل وتزن 160 ± 16غم وبأعمار متقاربة

تتراوح بين 6 - 8 أسابيع، وزعت على مجاميع ووضعت في أقفاص مخصصة لها وهيئت الظروف المناسبة من تهوية ودرجة حرارة (25±2) مْ واعتمدت الإضاءة الطبيعية وأعطيت الجرذان الماء و العليقة المركزة المكونة من 34% حبوب الحنطة، 34 % حبوب الذرة، 20% فول الصويا، 10% بروتين و 2% معادن وفيتامينات.

تأثير التجريع الحاد داخل المعدي لكلوريد الكادميوم في اناث الجرذ :

تحضير كلوريد الكادميوم (7.5ملغم/مل/ 100غم) :

حُضر بإذابة 75 ملغم في 10 مل من ماء الحنفية.

طريقة العمل:

أُختيرت 10 من اناث الجرذ تزن 14 ± 170 غم بعمر8 - 10 أسابيع لدراسة تأثير الجرعة الحادة لكلوريد الكادميوم وقًسمت الحيوانات على مجموعتين(5 جرذ / مجموعة) جرعتا بوساطة الانبوب داخل المعدي، المجموعة الأولى جرعت ماء الحنفية كمجموعة سيطرة وجرعت الثانية (75 ملغم $CdCl_2$/كغم من وزن الجسم). ضُحي بالحيوانات بعد 24 ساعة من التجريع باستخدام الكلوروفورم وبعدها شرحت الحيوانات وأخذت عينات من الاثنى عشر والكبد والكلية لجميع الحيوانات وغسلت بالمحلول الملحي Normal saline (0.9 %) ثم ثبتت في محلول 10% فورمالين لمدة (24-48) ساعة واستخدمت لفحص مناطق التنظيم النويي (AgNOR). واستأصل كلا فخذي كل حيوان و أزيلت عنها الأنسجة واستخرج نخاع العظم لفحص النواة الصغيرة (MN) فيه.

تأثير التجريع تحت المزمن لكلوريد الكادميوم مع ماء الشرب في اناث الجرذ:

تحضير خزين كلوريد الكادميوم(1 ملغم/1مل):

حضر الخزين بإذابة 1غم من $CdCl_2$ في 1 لتر من ماء الشرب (1ملغم / 1مل) وحضرت التراكيز (10 ، 20 ، 30) ملغم /لتر من سحب (10 ، 0 ، 30) مل من محلول الخزين على التتالي وأكمل الحجم الى 1 لتر.

طريقة العمل :

استخدم 60 من اناث الجرذ تزن 180± 11غم بعمر 10-12أسبوعاً لدراسة الجرع ذات التعرض تحت المزمن لكلوريد الكادميوم، إذ قسمت الحيوانات اعتمادا الدراسات البحثية السابقة على أربع مجاميع (15 جرذ / مجموعة) جرعت الأولى ماء الشرب الذي استخدم كمذيب للتراكيز المستخدمة بوصفها مجموعة سيطرة أما بقية المجاميع فقد جرعت (10 ، 20 ، 30) ملغم $CdCl_2$ / لترمن ماء الشرب والمكافئة الى 6.1 ، 12.2 ، 18.3 ملغم Cd/لتر من ماء الشرب وقد قسمت كل مجموعة من المجاميع الرئيسة الأربعة الى ثلاث مجاميع ثانوية (5 جرذ / مجموعة) اعتمادا على المدد التي عرضت الحيوانات فيها الى كلوريد الكادميوم التي هي (3 ، 6 ، 9) أسبوع وفي نهاية كل مدة تجريع يضُحى بمجموعة ثانوية (5 جرذ / مجموعة) من المجاميع الأربعة الرئيسة باستخدام الكلوروفورم واستخدمت العينات ذاتها كما في فقرة التجريع الحاد السابقة لأغراض الدراسات الوراثية الخلوية .

تحضير الانسجة :

اتبعت طريقة Drury و Wallington(1980)) لغرض الدراسة النسجية واستخدمت عينات الاثنى عشر والكبد والكلية المثبتة في الفورمالين بعد أن غسلت في ماء الحنفية الجاري لمدة 24 ساعة بغية التخلص من المثبت ثم نكزت العينات Dehydration وذلك بتمريرها بسلسلة من التراكيز المتصاعدة من الكحول الاثيلي (70% ، 80% ، 90% ، 95% ، 100%) ولمدة ساعتين في كل منها ثم روقت Clearing باستخدام الزايلين لمدة (1 – 1.5) ساعة ثم شربت Infiltration بشمع البرافين المنصهر بدرجة (56 – 58 مْ) مرتين(1 – 1.5 ساعة / مرة) وأخيراً طمرت Embedding الأنسجة في شمع البرافين المنصهر وتركت لتتصلب بعدها قطعت العينات بوساطة جهاز المشراح الدوار Rotary Microtomeوبسمك 5 مايكروميتر وثبتت النماذج على شرائح زجاجية باستعمال لاصق

أح مايـر Meyer's albumin ، وحضرت الشرائح النسجية للتلوين بملونة نترات الفضة (19) .

تجربة مناطق التنظيم النويي AgNORs assay:

استعملت المجموعة الأخرى من الشرائح النسجية المحضرة في الفقرة السابقة لدراسة AgNOR طبقا لطريقة Ploton وجماعته (1986) مع إجراء بعض التعديلات عليها إذ لونت المقاطع بعد انكازها وذلك بغمرها بـ (7-5) قطرات من ملونة نترات الفضة المحضرة آنيا، غطيت النماذج بأغطية زجاجية Cover slips وحضنت لمدة 45 دقيقة بدرجة حرارة 45مْ وغسلت الشرائح بالماء المقطر بعد أن أزيلت الأغطية الزجاجية ثم مررت في سلسلة من التراكيز التنازلية للكحول الاثيلي (100%، 95% ، 90% ، 80 % ، 70% ، 50%) مرتين في كل منها (2 دقيقة / مرة) بعدها غسلت بماء الحنفية ثم غمست بسرعـة بالماء المحمض بقطرتين من HCl ثم مررت بتراكيز متصاعدة من الكحول الاثيلي (50% ، 70% ، 80% ، 90% ، 95%) ثم غمرت بالزايلول للمدة ذاتهـا وحملـت المقاطـع Mounting بالـ DPX وغطيت بالغطاء الزجاجي Cover slip وبعدها فحصت باستعمال المجهر الضوئي نـــوع Olympus باستخدام العدسة الزيتية (1000x) للمجهر الضوئي وعدت مناطق التنظيم النويي NOR في 100 نواة بشكل عشوائي من كل شريحة (20).

تجربة النوى الصغيرة MN assay :

اعتمدت طريقة Schmid (1979) لتحضير النوى الصغيرة في نخاع العظم التي تتضمن الخطوات الآتيـــة (21):

A- استخراج نخاع العظم Extraction of bone marrow :

استأصل عظمي الفخذ من كل حيوان وأزيلت الأنسجة المحيطة بهما وفتحت نهايتيهما بوساطة مقص حاد ثم انزل نخاع العظم مباشرة الى أنبوبة اختبار بزرق 0.5 مل من مصل دم الإنسان داخل عظم الفخذ، مزجت المحتويات جيداً ونبذت بجهاز الطرد المركزي بقـوة 1000xg لمــدة 3 دقائق، سكب الرائق و أبقيت قطرة واحدة فوق الراسب فرشت على شريحتين زجاجيتين لكل حيوان وتركت لتجف بعيدا عن الغبار.

B- تلوين الشرائح Slide staining :

ثبتت الشرائح في كحول الميثانول المطلق لمدة 2 دقيقة ثم جففت في الهواء، لونت بملونة لشمان لمدة 4 دقائق ثم خففت الملونة على الشريحة بالماء المقطر وتركت لمدة 5 دقائق ثم غسلت لإزالة الملونة الزائدة، تركت لتجف بالهواء ثم فحصت بالمجهر الضوئي Olympus باستخدام العدسـة (400x).

C- فحص الشرائح Slide checkup :

اختيرت 1000 خلية من الخلايا الحمر متعددة التلوين (PCE) بشكل عشوائي لكل شريحة لغرض عد النوى الصغيرة التي ظهرت على شكل أجسام صغيرة كروية تقبلت اللون البنفسجي لملونة اللشمان.

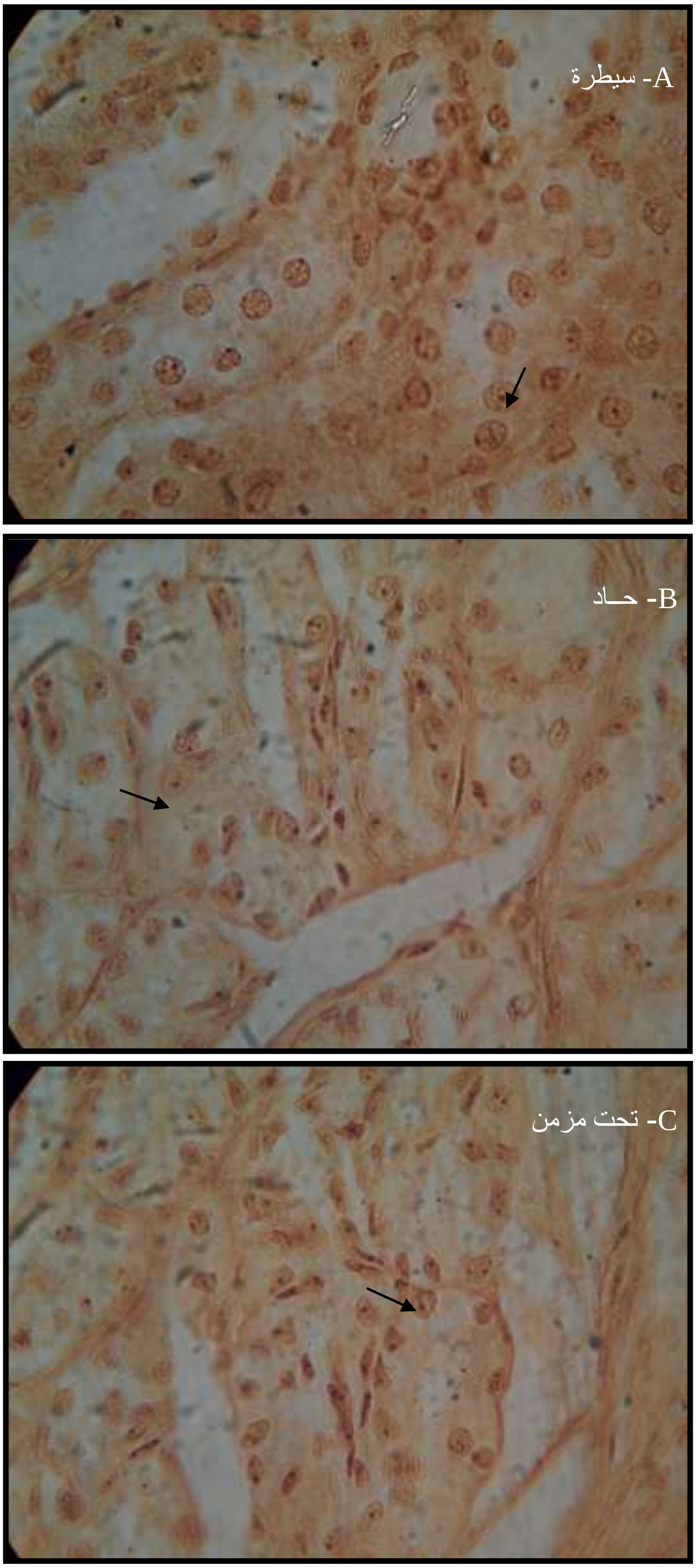
النتائـــج :

تأثير كلوريد الكادميوم على عدد مناطق التنظيم النويي في أنسجة اناث الجرذ :

تأثير التجريع داخل المعدي الحاد (75 ملغم $CdCl_2$ / كغم من وزن الجسم) على عدد مناطق التنظيم النويي في الاثنى عشر والكبد والكلية لاناث الجرذ :

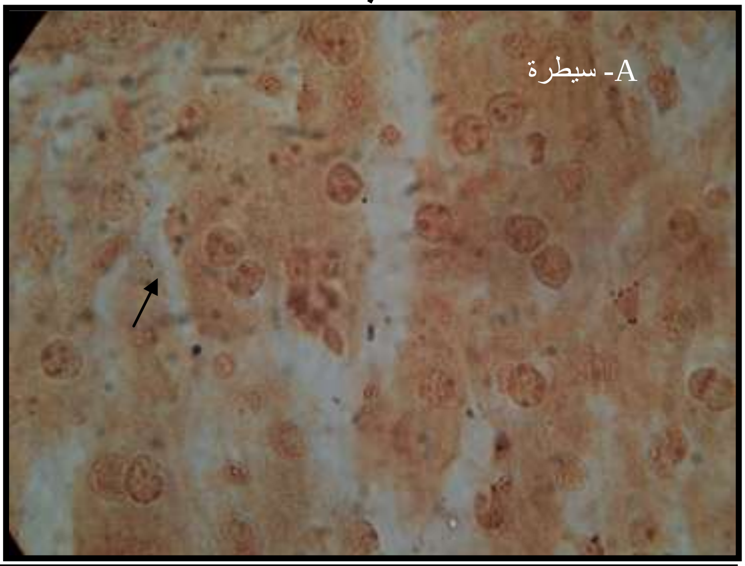
بينت نتائـــج تأثيــر الجرعــة الحـــادة (75 ملغـم $CdCl_2$ / كغـم مـن وزن الجسـم) علــى معدل عـدد منـاطق التنظـيم النـويي فـي الاثنــى عشـر (صـورة 1 A ، B) والكبـد (صـورة 2 A ، B) والكليـة(صـورة 3 A ، B) باسـتخدام T-test (جـدول 1) لـم يُظهـر الارتفـاع الطفيـف لمنـاطق التنظـيم النـويي فـي الاثنـى عشـر والكبـد أهميــة معنويــة فـي حين أظهـرت الكليـة زيـادة معنويـة (P<0.01) فـي معدل عـدد منـاطق التنظيم النـويي في مجموعـة الحيوانـات المعاملـة بالجرعـة الحـادة م2 مقارنـةً مــــع مجموعــــــة الســــــيطرة م1 (س).

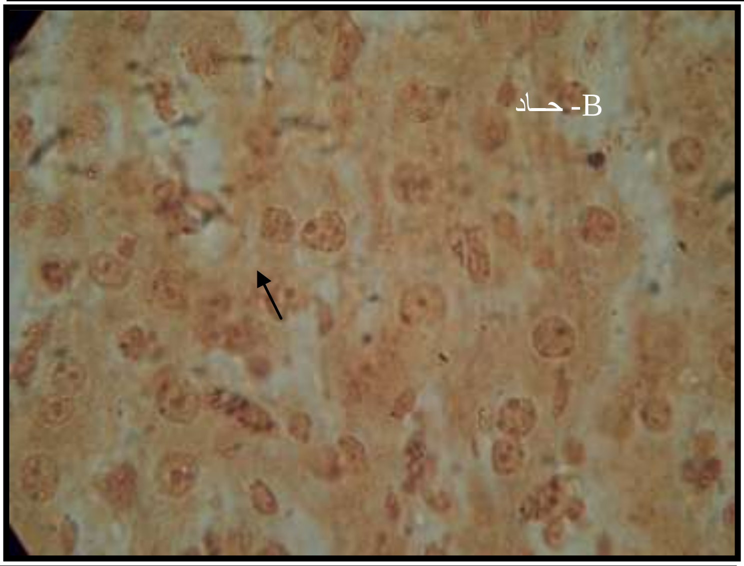
الاثنى عشر

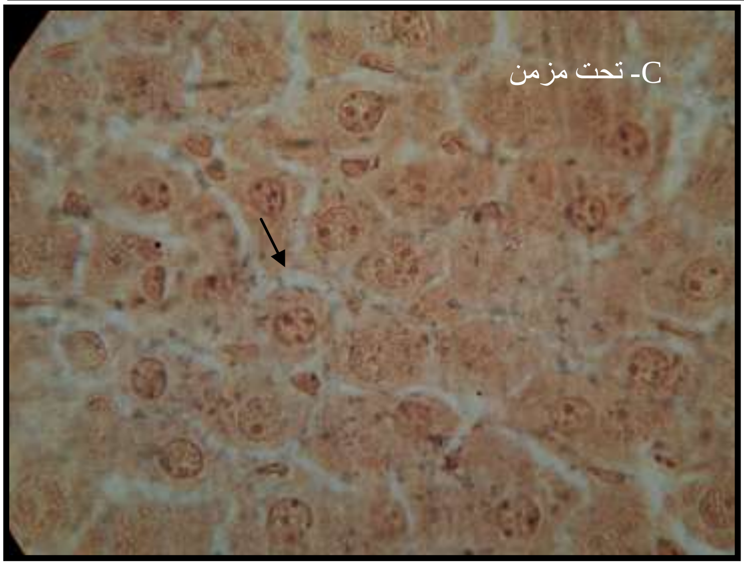


صورة (1) مناطق التنظيم النووي AgNOR (السـهم) داخل انويـــة الخلايــا في الاثنى عشــر لانـاث الجرذ (A- السيطـرة B- التجريع الحـاد C- تحت المزمـن) لكلوريد الكادميوم.(x 1000)

الكبد

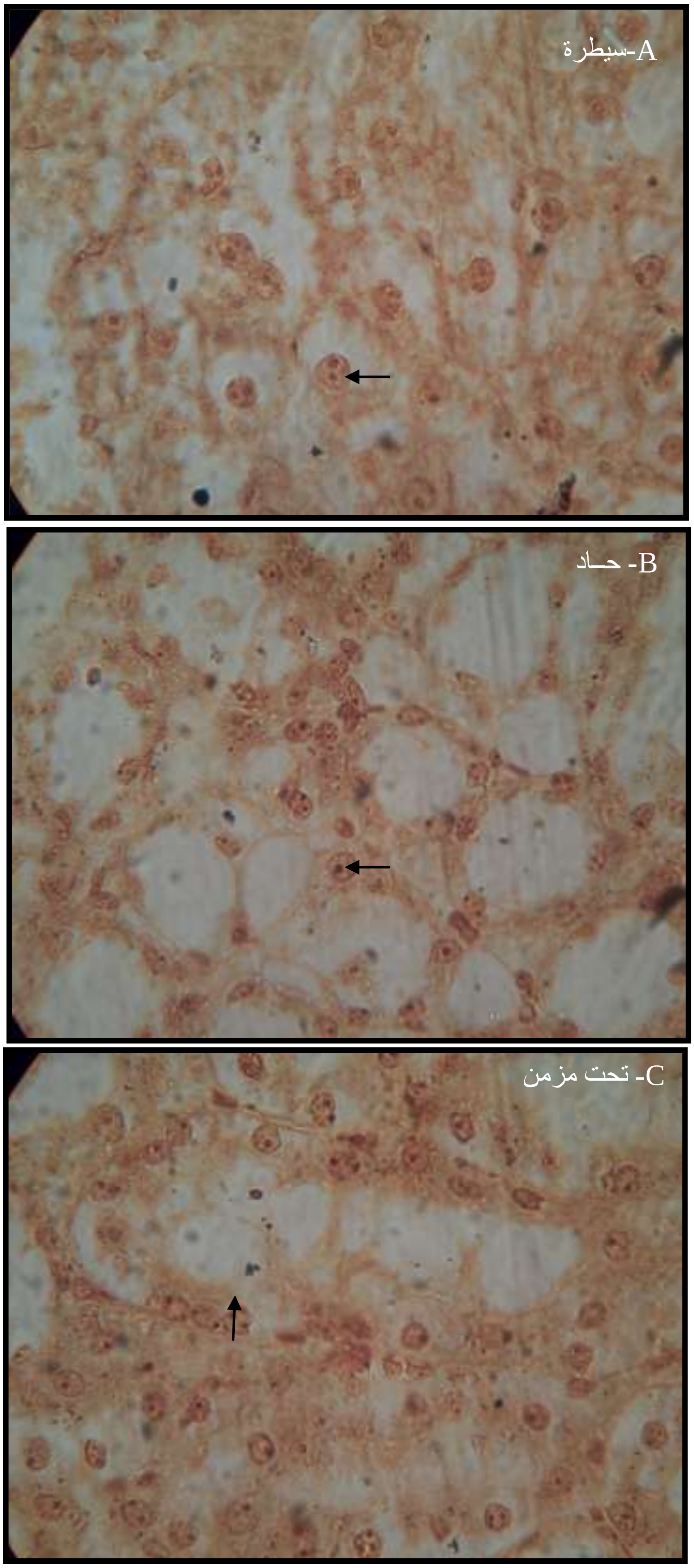






صورة (2) مناطق التنظيم النووي AgNOR (السهم) داخل انوية الخلايا في الكبـد لانـاث الجرذ (A- السيطرة B- التجريع الحاد C- تحت المزمن) لكلوريد الكادميوم. (x 1000)

الكلية



صورة (3) مناطق التنظيم النووي AgNOR (السهم) داخل انوية الخلايا في الكليـة لانـاث الجرذ (A- السيطرة - B التجريع الحاد C- تحت المزمن) لكلوريد الكادميوم. (x 1000)

جدول (1) تأثير التجريع داخل المعدي الحاد (75ملغم $CdCl_2$/كغم من وزن الجسم) على عدد مناطق التنظيم النويي في الأثنى عشر والكبد والكلية لاناث الجرذ :

الأعضاء	المجموعة	جرعة$CdCl_2$ (ملغم/كغم)	معدل NOR/نواة ± SD	أقل قيمة - أعلى قيمة	الاحتمالية
الاثنى عشر	م$_1$ (س)	0 (ماء الشرب)	0.01 ± 1.17	1.19 -1.15	
	م$_2$	75	0.07 ± 1.18	1.20 - 1.18	N.S
الكبد	م$_1$ (س)	0 (ماء الشرب)	0.01 ± 1.20	1.22 -1.18	
	م$_2$	75	0.01 ± 1.21	1.23-1.20	N.S
الكلية	م$_1$ (س)	0 (ماء الشرب)	0.01 ± 1.21	1.25 -1.19	
	م$_2$	75	0.08 ± 1.25	1.26 -1.24	0.01

م$_1$(س) : سيطرة.
م$_2$: مجموعة المعاملة.
SD : الانحراف القياسي.
N.S : غير مهم معنوياً.
عدد الحيوانات : 5 حيوانات / مجموعة.

تأثير التجريع تحت المزمن لتراكيز مختلفة من كلوريد الكادميوم في ماء الشرب على عدد مناطق التنظيم النويي في الاثنى عشر والكبد والكلية لاناث الجرذ :

أظهرت نتائج (جدول 2) تجريع اناث الجرذ لتراكيز مختلفة من كلوريد الكادميوم مع ماء الشرب على عدد مناطق التنظيم النويي في الاثنـى عشر (صورة 1 A ، C) عدم وجود أهمية معنوية للزيادة في معدل عدد مناطق التنظيم النويي في مجاميع المعاملة مقارنةً مع مجموعة السيطرة.

أما الكبد (صورة 2 A ، C) فقد أظهرت المجموعة الرابعة زيادة معنوية ($P<0.01$) في معدل عدد مناطق التنظيم النويي عند مقارنتها بمجموعة السيطرة و المجموعة الثانية في حين أظهرت الزيادة في معدل عدد مناطق التنظيم النويي في الكلية (صورة 3 A ، C) زيادة معنوية ($P<0.01$) في مجموعة الحيوانات المعرضة لتركيز 30 ملغم $CdCl_2$/لتر (المجموعة الرابعة) عند مقارنتها مع مجموعة السيطرة والمجموعة الثانية والمجموعة الثالثة على التتالي ولم تلحظ أهمية معنوية للزيادة في معدل عدد مناطق التنظيم النويي عند مقارنة بقية المجاميع المعاملة فيما بينها.

جدول (2) تأثير التجريع تحت المزمن لتراكيز مختلفة من كلوريد الكادميوم في مـاء الشرب على عدد مناطق التنظيم النووي في الأثنى عشر والكبد والكلية لاناث الجرذ:

الأعضاء	المجموعة	تركيز $CdCl_2$ (ملغم/لتر)	معدل NOR/ نواة SD±	أقل قيمة – أعلى قيمة
الاثنى عشر	م$_1$ (س) م$_2$ م$_3$ م$_4$	0 10 20 30	0.004 ±1.18 0.005 ± 1.18 0.007 ± 1.18 0.007 ± 1.19	1.19-1.18 1.19-1.18 1.20-1.18 1.21-1.18
الكبد	م$_1$ (س) م$_2$ م$_3$ م$_4$	0 10 20 30	0.01 ± 1.20 0.007 ± 1.20 0.01 ±1.21 0.02 ± 1.22 ab	1.21 -1.19 1.23 -1.19 1.23 - 1.20 1.25 -1.20
الكلية	م$_1$ (س) م$_2$ م$_3$ م$_4$	0 10 20 30	0.005 ± 1.25 0.007 ± 1.25 0.007 ± 1.26 0.02 ± 1.27 abc	1.26-1.24 1.26-1.24 1.27-1.25 1.31-1.25

م$_1$ (س) : سيطرة.
م$_2$ ، م$_3$ ، م$_4$: المجاميع المعاملة (10 ، 20 ، 30) ملغم $CdCl_2$ / لتر على التتالي.
SD : الانحراف القياسي.
a : فرق معنوي بين المجاميع المعاملة ومجموعة السيطرة.
b : فرق معنوي بين م$_4$ و م$_2$.
c : فرق معنوي بين م$_4$ و م$_3$.
عدد الحيوانات : 15حيواناً / مجموعة.

تأثير المدد المختلفة للتجريع تحت المزمن لكلوريد الكادميوم مع ماء الشرب على عدد مناطق التنظيم النووي في الاثنى عشر والكبد والكلية لاناث الجرذ :

أوضح تحليل التباين (جدول 3) عدم وجود أهمية معنوية للارتفاع الطفيف في معدل مناطق التنظيم النووي في الاثنى عشر في حين تتضح أهمية مدة التجريع لكلوريد الكادميوم في اناث الجرذ في المجموعة المجرعة لمدة 9 أسابيع (المدة الثالثة) في كل من الكبد والكلية إذ أظهرت زيادة معنويـة (P<0.01) في معدلات أعداد مناطق التنظيم النووي في كل منهما حيث بلغت (1.22 ± 0.01 ، 1.27± 0.02) مقارنةً بمجموعة السيطرة (1.20 ± 0.01 ، 1.25 ± 0.01) على التتالي.

وأوضح تحليل التباين ثنائي الطريقة عدم وجود تأثير للتداخل بين عاملي التركيز والمدة

على عدد مناطق التنظيم النووي في الاثنى عشر في حين كان هناك تأثير معنوي ($P<0.01$ و $P<0.01$) للتداخل بين العاملين على عدد مناطق التنظيم النووي في الكبد والكلية على التتالي.

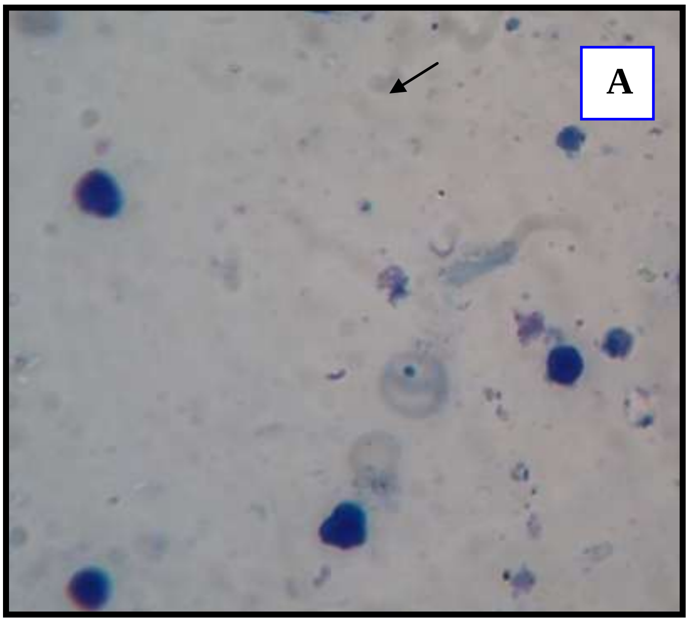
جدول (3) تأثير المدد المختلفة للتجريع تحت المزمن لكلوريد الكادميوم مع ماء الشرب على عدد مناطق التنظيم النووي في الاثنى عشر والكبد والكلية لاناث الجرذ :

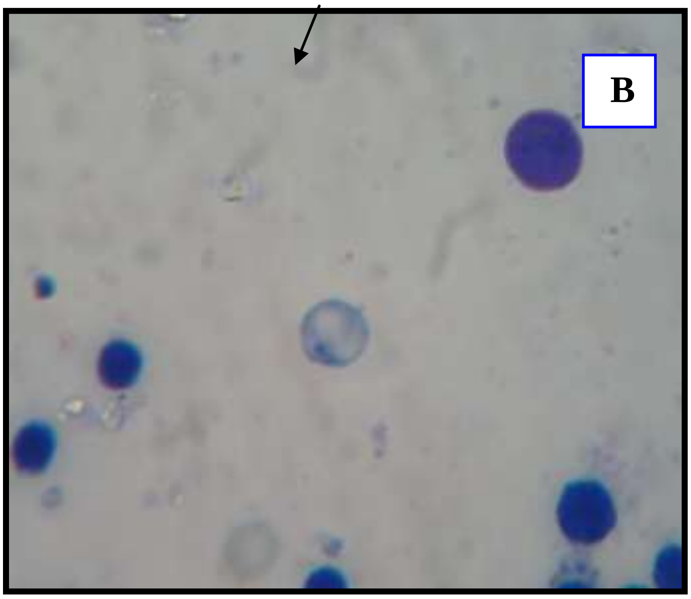
الأعضاء	المجموعة	المدة (أسبوع)	معدل NOR/ نواة ±SD	أقل قيمة ـ أعلى قيمة
الاثنى عشر	م1 م2 م3	3 6 9	0.004 ± 1.18 0.006 ± 1.19 0.007 ± 1.19	1.19-1.18 1.20-1.18 1.21-1.18
الكبد	م1 م2 م3	3 6 9	0.01 ± 1.20 0.009 ± 1.21 0.01 ± 1.22 a	1.23-1.19 1.23-1.20 1.25-1.20
الكلية	م1 م2 م3	3 6 9	0.01 ± 1.25 0.01 ± 1.26 0.02 ± 1.27 a	1.28-1.24 1.30-1.25 1.31-1.25

م1 ، م2 ، م3 : مجاميع الحيوانات المجرعة لمدة (3 ، 6 ، 9)أسبوع على التتالي.
SD : الانحراف القياسي.
a : وجود فرق معنوي بين م3 و م1 .
عدد الحيوانات : 15 حيواناً/ مجموعة.

<u>تأثير كلوريد الكادميوم على عدد النوى الصغيرة في نخاع عظم اناث الجرذ :</u>

أوضحت نتائج تلوين نخاع العظم بملونة اللشمان في الجرذ إن النوى الصغيرة (صورة 4 A و B) تظهر باللون الأزرق الغامق بشكل نواة صغيرة في الخلايا الحمر متعددة التلوين إذ إن شكل النواة الصغيرة ممكن أن يختلف بالحجم قليلا وتتواجد النوى الصغيرة بذات الشكل في كل من الأنسجة المعاملة وغير المعاملة ويظهر الفرق بين المعاملات في أعدادها.





صورة (4) A ، B : مسحة في نخاع العظم توضح النواة الصغيرة MN (السهم) في الخلايا الحمر متعددة التلوين PCE في اناث الجرذ.(x 400).

تأثير التجريع داخل المعدي الحاد (75 ملغم $CdCl_2$ / كغم من وزن الجسم) على عدد النوى الصغيرة في الخلايا الحمر متعددة التلوين في نخاع عظم اناث الجرذ :

توضح النتائج (جدول 4) إن الجرعة الحادة لكلوريد الكادميوم قد أدت الى زيادة معنوية (P<0.005) معدل تردد النوى الصغيرة (0.83 ± 5.20) في خلايا الدم الحمر متعددة التلوين في نخاع العظم إذا ما قورنت بمجموعة السيطرة (0.54 ± 3.40).

جدول(4) تأثير التجريع داخل المعدي الحاد (75 ملغم $CdCl_2$ / كغم من وزن الجسم) على عدد النوى الصغيرة في الخلايا الحمر متعددة التلوين في نخاع عظم اناث الجرذ :

المجموعة	جرعة $CdCl_2$ (ملغم/كغم)	معدل PCE1000 /MN ± SD	أقل قيمة - أعلى قيمة	الاحتمالية
م 1 (س)	0 (ماء الشرب)	0.54 ± 3.40	4.00 -3.00	
م2	75	0.83 ± 5.20	6.00 -4.00	0.005

م 1 (س): السيطرة.
م2 : مجموعة المعاملة.
SD : الانحراف القياسي .
عدد الحيوانات : 5 حيوانات/ مجموعة.

<u>تأثير التجريع تحت المزمن لتراكيز مختلفة من كلوريد الكادميوم في ماء الشرب على عدد النوى الصغيرة في الخلايا الحمر متعددة التلوين في نخاع عظم اناث الجرذ :</u>

تُبين نتائج التجريع تحت المزمن (جدول 5) لتراكيز مختلفة من كلوريد الكادميوم في ماء الشرب في اناث الجرذ ارتفاع في معدل تردد النوى الصغيرة من (3.20 ± 0.44) في مجموعة السيطرة الى (5.23 ± 0.96) في المجموعة الرابعة إذ كان الارتفاع معنويا (P<0.001) عند مقارنة كل من المجموعة الثالثة و المجموعة الرابعة بكل من مجموعة السيطرة و المجموعة الثانية في حين لم تُظهر المجموعة الثانية زيادة معنوية إذا ما قورنت بمجموعة السيطرة.

جدول (5) تأثير التجريع تحت المزمن لتراكيز مختلفة من كلوريد الكادميوم في ماء الشرب على عدد النوى الصغيرة في الخلايا الحمر متعددة التلوين في نخاع عظم اناث الجرذ :

المجموعة	تركيز $CdCl_2$ (ملغم/لتر)	معدل PCE 1000/MN ± SD	اقل قيمة- أعلى قيمة
م 1 (س)	0	0.44 ± 3.20	4.00 -3.00
م2	10	0.51 ± 3.41	4.00 - 3.00
م3	20	0.65 ± 4.66 ab	6.00 - 4.00
م4	30	0.96 ± 5.23 ab	7.00 - 4.00

م 1 (س): سيطرة.
م2 ، م3 ، م4 : المجاميع المعاملة (10 ، 20 ، 30) ملغم $CdCl_2$/ لتر على التتالي.
SD : الانحراف القياسي .
a : فرق معنوي بين (م3 ، م4) و م 1 (س) .
b : فرق معنوي بين (م3 ، م4) و م2 .
عدد الحيوانات : 15حيواناً / مجموعة.

تأثير المدد المختلفة للتجريع تحت المزمن لكلوريد الكادميوم مع ماء الشرب على عدد النوى الصغيرة في الخلايا الحمر متعددة التلوين في نخاع عظم اناث الجرذ:

أظهرت نتائج تأثير المدد الزمنية (جدول 6) إن تأثير المدة الثالثة (9 أسبوع) أدى الى زيادة معنوية (P<0.01) في معدل تردد النوى الصغيرة (5.00 ± 1.27) إذا ماقورنت بالمدة الاولى (3 أسبوع) (3.91 ± 0.66) في حين لم تظهر كل من المدة الثانية (6 أسبوع) و المدة الثالثة (9 أسبوع) زيادة معنوية عند مقارنتهما بكل من المدة الاولى (3 أسبوع) و المدة الثانية (6 أسبوع) على التتالي.

وعند إجراء تحليل التباين ثنائي الطريقة لمعرفة تأثير التداخل بين عاملي التركيز والمدة وجد إن هناك تأثيراً معنوي (P<0.001) للتداخل بين هذين العاملين في زيادة معدل تردد النوى الصغيرة.

جدول (6) تأثير المدد المختلفة للتجريع تحت المزمن لكلوريد الكادميوم مع ماء الشرب على عدد النوى الصغيرة في الخلايا الحمر متعددة التلوين في نخاع عظم اناث الجرذ :

المجموعة	المدة (أسبوع)	معدل PCE1000 /MN ± SD	اقل قيمة- أعلى قيمة
م 1	3	0.66 ± 3.91	5.00 - 3.00
م2	6	0.90 ± 4.41	6.00 - 3.00
م3	9	1.27 ± 5.00 a	7.00 - 3.00

م1 ، م2 ، م3 : مجاميع الحيوانات المجرعة لمدة (3 ، 6 ، 9)أسبوع على التتالي.
SD : الانحراف القياسي.
a : وجود فرق معنوي بين م3 و م1 .
عدد الحيوانات : 15 حيواناً / مجموعة.

المناقشة:

تأثير التجريع الحاد وتحت المزمن لكلوريد الكادميوم على عدد مناطق التنظيم النووي في الاثنى عشر والكبد و الكلية لاناث الجرذ:

استخدمت تقنية AgNOR للتعبير عن التغيرات الوراثية الخلوية الناتجة من تجريع كلوريد الكادميوم الحاد وتحت المزمن لاناث الجرذ إذ إنها استخدمت من قبل العديد من الباحثين كمؤشر لبداية الأورام والتقدير الكمي لمراحل تطورها (22) وفي تشخيص فرط التنسج Hyperplasia في مراحله الأولى وصولا الى مرحلة الأورام الخبيثة Malignant tumor(23).

إن التعرض الحاد للكادميوم في الدراسة الحالية يؤدي الى ارتفاع معدل مناطق التنظيم النووي في الكلية مقارنةً بمجموعة السيطرة أما التجريع تحت المزمن فقد أوضحت النتائج إن لزيادة التركيز والمدة أثراً في زيادة معدل مناطق التنظيم النووي في كل من الكبد والكلية إذا ماقورنا مع مجاميع السيطرة وباقي المعاملات في حين لم يظهر الاثنى عشر زيادة معنوية في الحالتين وهذا يوضح إن الفعالية التكاثرية لخلايا الاثنى عشر هي اقل تأثرا من العضوين الآخرين في حين إن الكلية أظهرت بأنها أكثر تأثرا في كلتا الحالتين يليها الكبد وقد وجد تأثيراً للتداخل بين عاملي التركيز والمدة على معدل مناطق التنظيم النووي في الكبد و الكلية.

وقد يعزى ذلك الى أن الكادميوم يحث حالة ما قبل الأكسدة Pro-oxidant state من خلال تنضيبه الكلوتاثيون Glutathione وانه يعمل على المستوى الجزيئي ويؤدي الى تغيرات جينية ويثبط أجهزة إصلاح الدنا DNA ولذلك فان بإمكانه أن يعمل مع مطفرات معينة ويحث تكوين الأورام الخبيثة (24,25) وانه يحث على زيادة الانقسامات النووية لخلايا الكبد والكلية في المزرعة النسجية (26,27) وتعزز نتائج

ماتوصلت اليه هذه الدراسة باستخدام تقنية AgNOR ما أوضحه Waalkes وجماعته (1999) في إن الكادميوم يزيد من الفعالية التكاثرية لخلايا الكليـة والكبـد في الجـرذان عنـد التراكيـز المختلفـة في مـاء الشـرب (28).

تأثير التجريع الحاد وتحت المزمن لكلوريد الكادميوم على عدد النوى الصغيرة في الخلايا الحمر متعددة التلوين في نخاع عظم اناث الجرذ:

أظهرت نتائج التحليل الإحصائي لتأثير كل من الجرعة الحادة والتجريع تحت المزمن لكلوريد الكادميوم مع ماء الشرب لاناث الجرذ إن هناك زيادة معنوية في معدل تردد النوى الصغيرة مقارنةً بمجاميع السيطرة. وقد أظهرت الدراسة الحالية اتفاقا مع كثير من الدراسات المماثلة على الرغم من اختلاف طريقة التجريع ومقدار الجرعة ومدة التعرض ونوع الحيوان المعرض (30,31,32,33).

إن تكوين النوى الصغيرة في نخاع العظم قد يعزى الى التفاعل المباشر للكادميوم مع الدنا DNA أو حث الكادميوم على إنتاج الأوكسجين الفعال Reactive oxygen species الذي يعمل على تحطيم الدنا وتثبيط أجهزة إصلاحه (34) ويعزى تثبيط أجهزة إصلاح الدنا الى تدمير أو إيقاف فعاليتي أنزيمي Nuclease و DNA-glicosilase (35) إن قابلية الكادميوم على حث تحطيم الكروموسومات يؤدي الى تكوين قطع لامركزية أو قد يؤثر على جهاز المغزل إذ يؤدي الى تخلف كروموسوم كامل أو أكثر وفي كلتا الحالتين فان القطع الناتجة أو الكروموسومات الكاملة المتخلفة تفشل في أن تكون ضمن إحدى النواتين للخليتين البنويتين (32,36,37) وعند تطور ونضج أرومة كريات الدم الحمر erythroblast الى خلايا الدم الحمر متعددة التلوين Polychromatic erythrocytes في نخاع العظم في أثناء الانقسام الخيطي فان النواة الرئيسة تقذف (extruded) في حين تتخلف النـــواة الصغيـــرة في السايتوبلازم وقد تتواجد واحدة منها أو أكثر (38).

المصـــــــادر:

1-Environmental Protection Agency (EPA). (2007). Protection of environment. U.S. Government printing office via. GPO Access. P: 1-8.

2-Cikrt M. , Blaha K. , Nerudora J. and Bittnerova D. (1992). Distribution and excretion of cadmium and nickel after simultaneous exposure and the effect of N. benzyl . D – glucamine dithiocarbamate on their biliary and urinary excretion . J. Toxicol. Environ . Health . 35:211-220.

3-Word Health Organization (WHO). (1992, a) . Cadmium . Environmental Health Criteria 134 ,Cadmium International Program on Chemical Safety (IPCS) monograph ,Geneva.

4-World Health Organization (WHO) . (1992, b) . Cadmium . WHO food Additives Series 24. P:1-39 .

5-Poule M. and Payne M. (2005). Oral chelating and nutritional replacement therapy for heavy metal toxicity and cardiovascular conditions. Manus cript ,University of Michigan Res. P: 15-30.

in the liver and kidneys of mice .Briti . J. Nutr. 80:205-221.

12-Fasitsas C. , Theocharis S. , Zoulas D. and Chrissimou S. (1991) . Time – dependent cadmium – neurotoxicity in rat brain synapt-osomal plasma membranes . Comp. Pharmacol. Toxicol. 100:271-275.

13-Kotsonis F. and Klaassen C. (1977) . Toxicity and distribution cadmium administrated to rats sublethal dose . Toxicol. Appl. Pharmacol. 41:667-680.

14-Shaikh Z. and Smith L. (1984) . Biological indicators of cadmium exposure and toxicity . Exper. Toxicolo. J. 40:36-43

15-Waalkes M. , Rehm S. and Devor D. (1997) . The effects of continuous testosterone exposure on spontane-ous and cadmium – induced tumors in the male Fischer (F344 / Ncr) rat : Loss of testicular response . Toxicol. Appl. Pharmacol. 142:40-46.

16-Goyer R. (1986) . Toxic effect of metal. In : Klaassen C. , Amdur M. , Doull J. (eds.) Casarett and Doull's toxicology . 3th ed. Macmillan publishing Co. NewYork . P:582-635.

17-Department for Environment Food and Rural Affairs (DEFRA) and Environment Agency (EA) . (2000) . Contaminates in soil . Collation of toxicological data and

6-Minkoff E. and Baker P. (2001). Biology today: Anissuse. 2nd edition. published by garland publishing,a member of America. P:701-718.

7-Bougnegnea J. and Gilles R. (1979) : Lipid peroxidation and its role in toxicology , In : Reviews in biochemical toxicology Hodgson E. , Bend J. and Philpot P.(eds), Elsevier Amsterdam . P:125-129.

8-National Research Council (NRC) . (1980) . Mineral tolerance of domestic animals . National Acade-my of Science , Washington D.C. P:93-130

9-Massany P. , Toman R. , Valent M. and Cupka P. (1995) . Evaluation of selected parameters of metabolic profile and levels of cadmium in reproductive organs of rabbits after an experimental administration . Acta. Physiolo.Hungarica. 83:267-273.

10-Bagchi D. , Bagchi M. , Hassoun E. and Stohs S. (1996) . Cadmium – induced excretion of urinary lipid metabolites , DNA damage , glutathione depletion and hepatic lipid peroxidation in Sprague – Dawley rats . Biol. Trace.Elem.Res.52:143-154.

11-Lind Y. , Engman J. , Jorhem L. and Glynn A. (1998) . Accumulation of cadmium from wheat bran , suger fiber , carrot and cadmium chloride

carcinoma of the lung . Chest. 111:110-114.

24-Aoki K. , Skamoto M. and Hirohashi S. (1994) . Nucleolar organizer regions in small nodular lesions representing early stages of human hepato carcinogenesis.J. Cancer.73(2):289-293.

25-Romanczuk W. , Steplewska – Masur K. and Korczowski R. (2000) . Lewis antigens and argyrophilic nucleolar organizing regions staining for assessment of potential malignancy of adenomatous polyps of the gastrointestinal tract in children .Hybridoma. 19:296-76.

26-Ishido M. , Tohyama C. and Suzuki T. (1991) . Cadmium – bound metallothionein induces apoptosis in rat kidneys but not in cultured kidney LLC–PK , cells . J. Life Sci. 64(9):797-804.

27-Tchounwou P. , Ishaque A. and Schneider J. (2001) . Cytotoxicity and transcriptional activation of stress genes in the human liver carcinoma cells (HePG2) exposed to cadmium chloride . Molec. and Cellular Biochem .222:1-2.

28-Waalkes M. , Anver M. and Diwan B. (1999) .Chronic toxic and carcinogenic effects of oral cadmium in the Noble (NBL / Cr) rat : Induction of neo plastic and proliferative lesions of the adrenal , kidney , prostate and testes .J.

intake values for humans . Cadmium . R and D publication TOX3 .

18-Waisberg M. (2003) . Molecular and cellular mechanism of cadmium carcinogenesis. J. Toxicol. 192(2-3):95-117.

19-Drury R. and Wallington D. (1980). Caletons histological technique.5thed.Oxford,NewYork.Toronto.

20-Ploton D. , Menager M . and Jeannsson P. (1986) . Improvement in the staining and the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level . Histochem. J . 18 : 5-14 .

21-Schmid W. (1979).The micronucleus test . Hand book of mutagenicity test procedures , Elisevier , North-Holand , Biochemical press, Netherland P:236-242.

22-Chern H., Lee Y., Yang M., Chang C. and Perng R.(1997) . Usefulness of argyrophilic nucleolar organizing region score to differentiate suspicious malignancy in pulmonary cytology. Chest. 111(6):1591-1596.

23-Antonangelo L., Bernardi F. and Capelozzi V. (1997) . Evaluation of argyerophilic nucleolar organizer region (AgNOR) is useful in predicting long-term survival in

Toxicol. and Environ .Health , Part A .28(4):199-214.

29-Vilena K. , Ruzica R. , Matex S. and Maja B. (2002) . Evaluation of genotoxic damage of cadmium chloride in peripherial blood of suckling Wistar rats . J. Appl. Toxicol. Zegreb , Croatia . 22(4): 217-277.

30-Yalin S. (2005) . A study on the investigation of cadmium chloride genotoxicity in rat bone marrow using micronucleus test and chromosome aberration analysis . Toxicol. and Industral Health . 21(9):243-248.

31-Jahangir T. , Khan T. and Prasad L. (2006) . Reversal of cadmium – chloride induced oxidative stress and genotoxicity by *Adhatoda Vasica* extract in Swiss albino mice .Biolo.Trace Element Res. 111 (1-3): 217-228.

32-Lewinska D. , Arkusz J. , Stanczyk M. , Palus J. , Dziubaltowska E. and Stepnik M. (2007) . Comparison of the effect of arsenic and cadmium on benzo (a) pyrene – induced micronuclei in mouse bone marrow . Mutat. Res. Genetic Toxicol. and Environ . Mutagenesis . P:1383-5718.

33-Ayla C. , Belgin B. , Burak C. and Bahar T. (2008) . Assessment of cadmium genotoxicity in peripheral blood and bone marrow tissue of male Wistar rats . J. Toxicol. Mechanism and Method , Mersin ,Turkey. 3: 1-2.

34-Filipic M. , Fatur T. and Vudrag M. (2006) . Molecular mechanisms of cadmium induced mutagenicity . Human Exper. Toxicol. 25(2):67-77.

35-Privezentsev K., Sirota N. and Gaziev A. (1996) . The genotoxic effects of cadmium studied in vivo . Tsitol Genetic J. 30(3): 45-51.

36-Mavournin K. , Blakey D. , Cimino M. and Salamone M. (1990) . The vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral . blood A report of the U. S. Environmental Protection Agency Genotoxic Program . Mutat. Res. 239:80-92.

37-Frieauff W. and Romagna F. (1994) . Technical aspects of automatic micronucleus analysis in rodent bone marrow assays . J. Cell Biol. and Toxicol10:5-6.

38-Kliesch U. , Danford N. and Adler I. (1981) . Micronucleus test bone marrow chromosome analysis . A comparison of 2 methods in vivo for evaluating chemically induced chromosomal alteration . Mutat. Res. 80:321-332.