مقاله تحقیقی

بررسی آثار کادمیوم بر فراساختار فتورسپتورها و سلولهای گانگلیونی شبکّیه چشم جنین موش سوری

امرا...روزبهی.Ph.D **، سحر الماسی ترک .M.Sc*، عباس پیرائی.M.Sc *، ✉ یوسف صادقی.Ph.D *

* دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، بخش علوم تشریح و مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی

** دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، دانشکده پزشکی، بخش علوم تشریح

تاریخ وصول: مرداد ماه ۸۴، تاریخ پذیرش: شهریور ماه ۸۴

چکیده

هدف: بررسی آثار کادمیوم بر فراساختار فتورسپتورها و سلولهای گانگلیونی شبکّیه چشم جنین موش سوری

مواد و روشها: تعداد ۳۰ سر موش سوری سه ماهه انتخاب و در ۳ گروه کنترل، آزمایشی I و II تقسیم شد. در روز ۹ بارداری کلرید کادمیوم را به گروه آزمایشی I به میزان ۳ mg/kg و به گروه آزمایشی II، ۵ mg/kg و برای گروه کنترل آب مقطر به روش داخل صفاقی تزریق شد. در روز ۱۵ بارداری جنینها باعمل سزارین خارج شدند. میزان جذب جنینها بررسی و بعد از توزین و اندازه‌گیری قد آنها، آمادش بافتی روی سر جنینها با توجه به روش میکروسکوپ الکترونی ترانمیشن انجام شد.

یافته‌ها: در بررسیهای کیفی، هسته‌های آپوپتتیک، هتروکروماتین بودن هسته، از بین رفتن غشای هسته، مشخص نبودن هستک، تغییرات میتوکندری سلولهای آپوپتتیک در گروههای آزمایشی نسبت به گروه کنترل مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: کادمیوم عامل ایجاد تغییرات منتهی به آپوپتوز در هسته و میتوکندری سلولهای فتورسپتورو گانگلیونی است.

کلید واژه‌ها: کادمیوم، فراساختار، شبکیه، میکروسکوپ الکترونی ترانسمیشن، موش سوری

مقدمه

آلودگیهای زیست محیطی کادمیوم به دلیل استفاده از این فلز در صنعت و تهیّه کودهای کشاورزی است. آلودگیهای سطحی زمین توسط آبهای جاری شسته شده و به داخل رودخانه‌ها و دریاچه‌ها منتقل می‌شود. همچنین آبهای آلوده برای آبیاری محصولات کشاورزی به کار می‌رود.

از زمانی که مطالعات محققین تاثیرات منفی فلزات سنگین مانند کادمیوم، مس، کرومیوم و سرب، بر سلامتی انسانها همچنین تجمع بیولوژیک آنها در بدن موجودات زنده و ورود آنها به زنجیره غذائی را اثبات کرد، توجه مجامع بین‌المللی دفاع از محیط زیست به این موضوع معطوف شده است [۲،۱]. کادمیوم از طریق دستگاه گوارش، پوست، و از راه استنشاق جذب می‌شود [۲]. پس از جذب وارد خون شده و از آنجا به سایر بافتهای بدن منتقل می‌شود. در خون به یک پروتئین با وزن مولکولی کم به نام متالوتیونین(MT) باند می‌شود. این پروتئین در کبد، روده و قشر کلیه‌ها ساخته می‌شود و کادمیوم

✉آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۱۹۸۳۵۳۵۵، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح Email: yousefsadeghi@yahoo.com

سنتز آن را تشدید می کند [۱، ۲و ۳].

زمانی که سلولهای مهره داران و بی مهره گان عالی با فلزات سنگین مواجه می‌شوند، سیستمهای دفاعی در پیش می‌گیرند که از آن جمله ساخت پروتئینهای باند شونده به فلزات MT و heat shock proteins را می توان نام برد. این پروتئینها در سلولهای بسیاری از جانداران از جمله نماتودها، دروزفیلا، اسفنجها و سلولهای انسانی دیده می شود [۲].

کادمیوم یک فلز پایدار است و توسط باکتریها تجزیه نمی‌شود. علاوه بر آن در بدن دارای خاصیت تجمعی است [۲، ٤و٥]. پس از تجویز یک دوز واحد۲ میلی گرم در کیلوگرم از کادمیوم رادیواکتیو، ابتدا بیشترین مقدار آن وارد کبد می‌شود (جذب اولیه کبدی) و بعد از این مرحله یک توزیع مجدد از کبد به سایر بافتها صورت می‌گیرد که عمده ترین این بافتها کلیه‌ها هستند [۳و ٦]. عمده ترین مسیر دفع کادمیوم جذب نشده از طریق مدفوع است و کادمیوم جذب شده نیز بعد از پیوند شدن با متالوتیونین به وسیله سیستم گلومرولی کلیه‌ها پالایش شده و اغلب از طریق ادرار دفع می شود [٦].

از میان فلزات سنگین که سلامتی موجودات زنده را تهدید می‌کند، کادمیوم به طور وسیع مورد توجه و مطالعه قرار گرفته است چرا که تأثیرات موتاژنی، مسمومیتهای جنینی و خاصیت تراتوژنی آن به اثبات رسیده است [۲، ۳ و ۷].

اختلال در تکامل جنین با افزایش میزان کادمیوم رابطه مستقیم دارد. این مسئله نشان می دهد که کادمیوم یک مسموم کننده موثر در روند میتوز(mitotic poison) است که در مرحله کلیواژ اثر تخریبی دارد و باعث مهار مرفوژنتیک در جنین می‌شود [۱ و۱۱-۸]. کادمیوم نرخ باروری گونه‌هایی از جانداران را کاهش می‌دهد [٤ و ١٤-١٢]. همچنین باعث تغییرات خواص Zona radiata و افزایش نفوذپذیری آن می‌شود. بنابراین خطر ورود مواد و ارگانیسمهای مضر به درون فضای Perivittelline افزایش می‌یابد [٤]. در تحقیقاتی که تأثیر کادمیوم بر سیستم عروقی جنین را بررسی کرده است، مشخص شده که تمام جنینهای در معرض قرار گرفته دچاز اختلال تکامل عروقی در آئورت پشتی، عروق مغزی، عروق سگمنتال و شبکه ی عروقی کیسه زرده بوده‌اند [۹، ۱۰ و ۱۵]. تستو (Testuo) و همکاران طی مطالعاتی نشان دادند که فعل و انفعال مستقیم کادمیوم با DNA موجب کاهش ۳H-thymidine در هسته سلولهای تیموسی می‌شود و سطح DNA را به میزان ۷٦ درصد کاهش می‌دهد [١٦]. بیان ژن C-myc می‌تواند باعث ایجاد آپوپتوزیس شود ولی کادمیوم برای القای آپوپتوزیس نیازی به فعالیت C-myc ندارد [۱۷]. کادمیوم در یک سیستم بدون کلسیم فرگمانتاسیون DNA را به شکل قابل توجهی بالا می برد [۲، ۱۸و ۱۹]. کادمیوم می تواند بیان ژن را تغییر داده و فرایند آپوتپوز را القاء کند [۲].

تشکیل میکرو توبولها و همچنین توزیع آنها در سلولهایی که در معرض کادمیوم قرار گرفته اند تغییر می کند [۲۰]. مطالعات دیگری در ارتباط با تأثیر تراتوژنی کادمیوم بر سیستم اسکلتی، لولهٔ عصبی، شکل گیری اندامها، کلیه، قلب، سیستم ایمنی و کبد وجود دارد [۲، ٤، ۸، ۱۳ و ۲٦-۲۱].

با توجه به تأثیرات تراتوژنیک کادمیوم بر سیستم عصبی به احتمال زیاد این ماده روی قسمتهای عصبی و بخشهای غیر عصبی چشم که تحت القای بخش عصبی هستند تأثیر خواهد گذاشت (۲۷). پژوهش حاضر در ادامه مطالعات مذکور تأثیر تراتوژنیک کادمیوم را بر فراساختار فتورسپتورها و سلولهای گانگلیونی شبکیه چشم جنین موش سوری بررسی نموده است.

مواد و روشها

این تحقیق به روش تجربی روی ۳۰ سر موش سوری ماده سه ماهه صورت گرفت. موشهای نر و ماده به وزن ٢٤ تا ۳۵ گرم به نسبت یک موش نر با سه موش ماده در یک قفس و در شرایط مناسب (آب و غذای کافی، دمای ۲۵ درجه سانتیگراد، ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی) نگهداری شدند. مشاهده پلاک واژینال در صبح روز بعد نمایانگر عمل جفت گیری بود و روز صفر بارداری در نظر گرفته شد. حیوانات به طور تصادفی در سه گروه آزمایشی I، آزمایشی II و کنترل

قرار گرفتند. در روز نهم بارداری محلول کلرید کادمیوم به‌صورت داخل صفاقی به ترتیب با دوز۳mg/kg و 5mg/kg تزریق شد. موشهای گروه کنترل فقط آب مقطر دریافت کردند.

در روز پانزدهم بارداری موشها توسط اتر بیهوش شده، سپس با عمل سزارین جنینها خارج و سر آنها جدا شد و در تثبیت کننده کارنوسکی قرار داده شد. چهار جنین از هر گروه به‌صورت تصادفی انتخاب شده و برای بررسی با میکروسکوپ الکترونی ترانسمیشن به ترتیب زیر آماده سازی شدند [۲۸].

ثبوت اولیه با گلوتار آلدئید ۲/۵ درصد در دمای ۴° سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت و ثبوت ثانویه با تترواکسیداسمیوم ۱درصد به مدت ۲ ساعت انجام شد. برای آبگیری از غلظتهای رو به افزایش استن (۳۰ تا ۱۰۰ درصد) و برای آغشتگی نمونه‌ها و سپس قالب گیری از رزین ۸۱۲ Epon استفاده شد. نمونه‌ها به شکلی در قالبها قرار گرفتند که مقاطع کاملی از کره چشم تهیه شود.

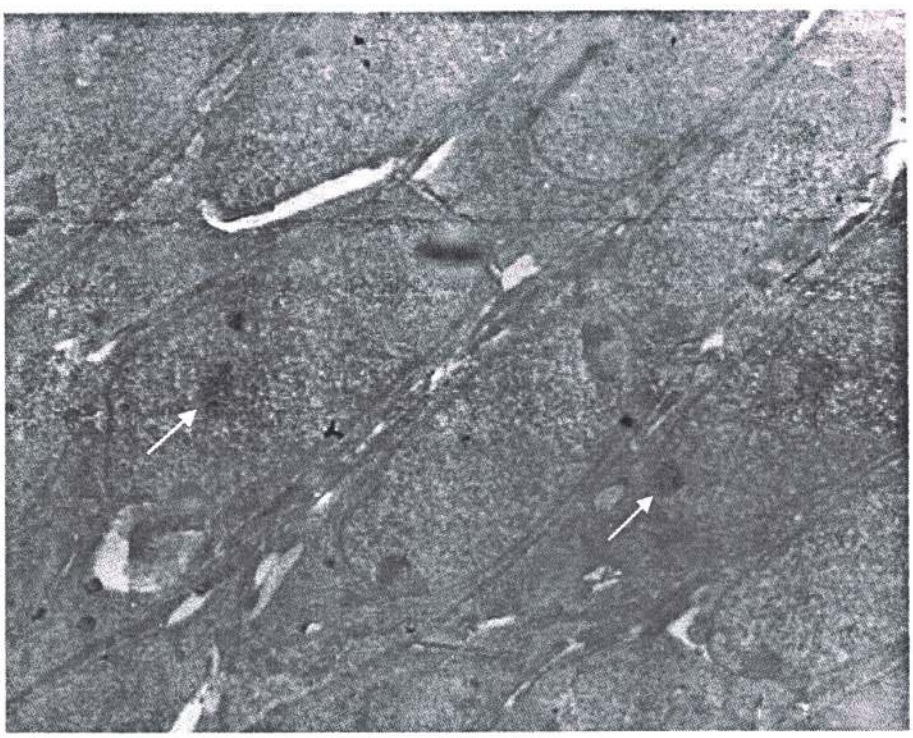
برشهای نیمه نازک با ضخامت ۵۰۰ nm با تولوئیدین بلو رنگ‌آمیزی شده و با میکروسکوپ نوری مشاهده شدند. پس از تشخیص لایه‌های شبکیه در نمونه‌های مورد نظر برشهایی به ضخامت۷۰-۵۰ nm تهیه شد و روی گریدهای ۲۰۰ مشی منتقل شد. نمونه‌ها ابتدا با اورانیل استات ۰/۵ درصد رنگ آمیزی شدند. گریدهای حاوی نمونه‌های رنگ آمیزی شده توسط TEM مدل Zeiss EM 900 مشاهده شد.

از محلهای مورد نظر با استفاده از فیلم Kodak TMX 120 عکسبرداری کرده و روی کاغذ IL Ford، hard چاپ شد. تصاویر تهیه شده بررسی و تفسیر شدند.

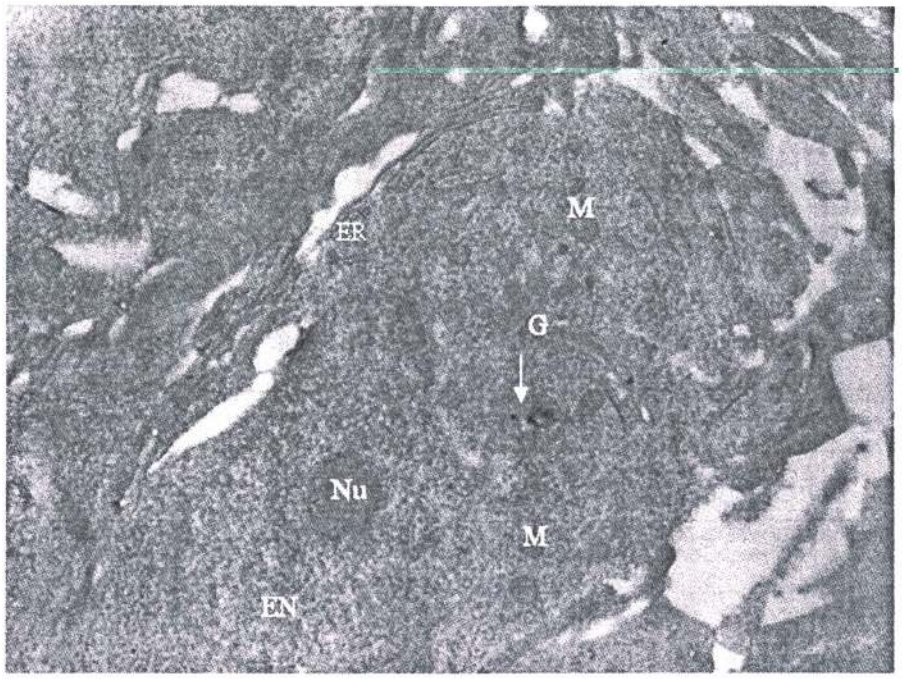
یافته‌ها

ویژگیهای فرا ساختمانی سلولهای گانگلیونی و فتور سپتورها از جمله هسته، میتوکندری و شبکه آندوپلاسمیک آنها بررسی و موارد زیر مشاهده شد:

در گروه کنترل، فتورسپتورها و سلولهای گانگلیونیک مشخصات یک نورون تیپیک را نشان می دادند. به نحوی که دارای هسته یوکروماتین، یک یا دو هستک واضح و سیتوپلاسم فعالی بودند (شکلهای ۱ و ۲).

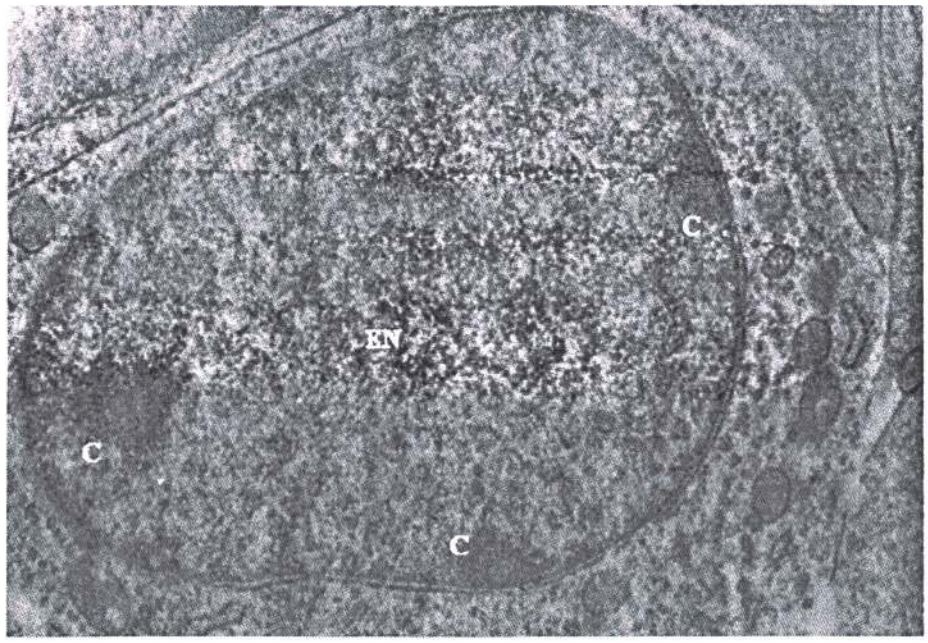


شکل ۱ هسته‌های منظم و موازی فتورسپتورها در گروه کنترل که هر کدام دارای یک یا دو هستک (پیکان) هستند. بزرگنمایی: ۴۴۰۰ ×

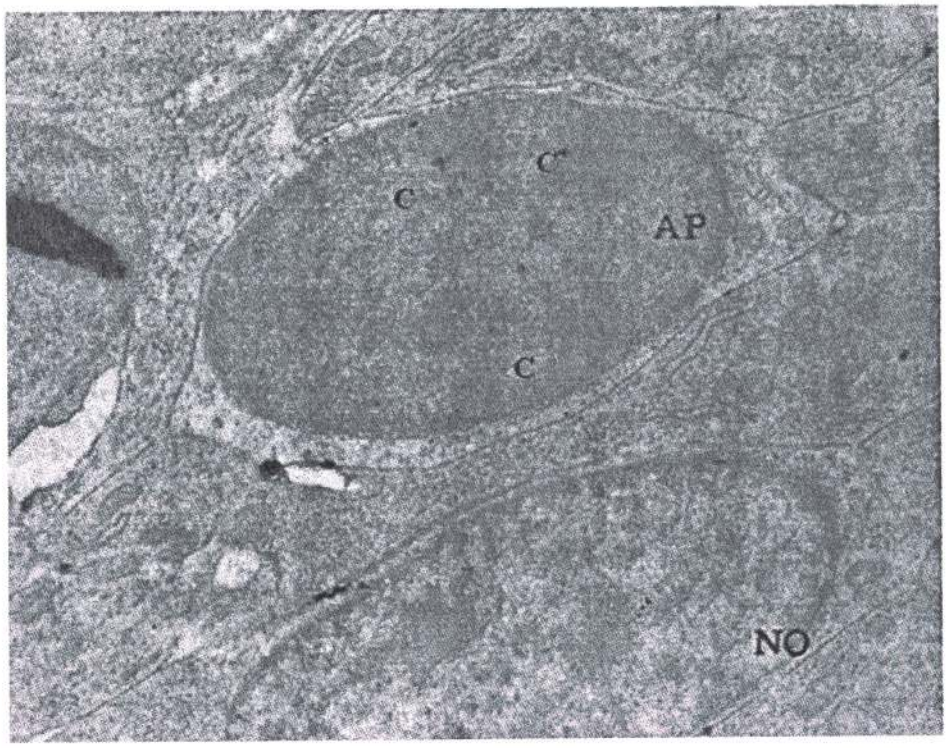


شکل ۲ الکترون میکروگراف گروه کنترل یک سلول گانگلیونی سالم که دارای هسته یوکروماتین (EN)، هستک مشخص (Nu) و مقاطعی از میتوکندری (M)، رتیکولوم اندوپلاسمیک (ER) ، گلـــژی (G) و ریبوزومهای آزاد (پیکان) است، مشاهده می‌شود. بزرگنمایی: ۷۰۰۰×

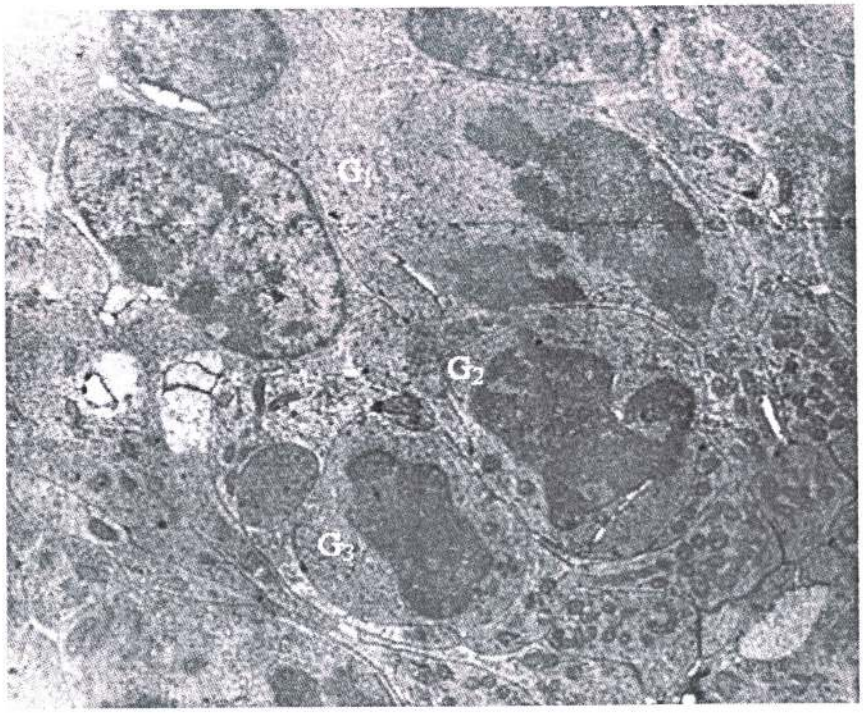
در گروه آزمایشی I سیتوپلاسم سلولهای گانگلیونیک تغییر خاصی را نشان نمی داد امّا افزایش دانسیته هسته مشاهده شد. همچنین کروماتین در برخی نواحی در زیر غشای هسته در حال متراکم شدن(clumping) بود (شکل ۳).



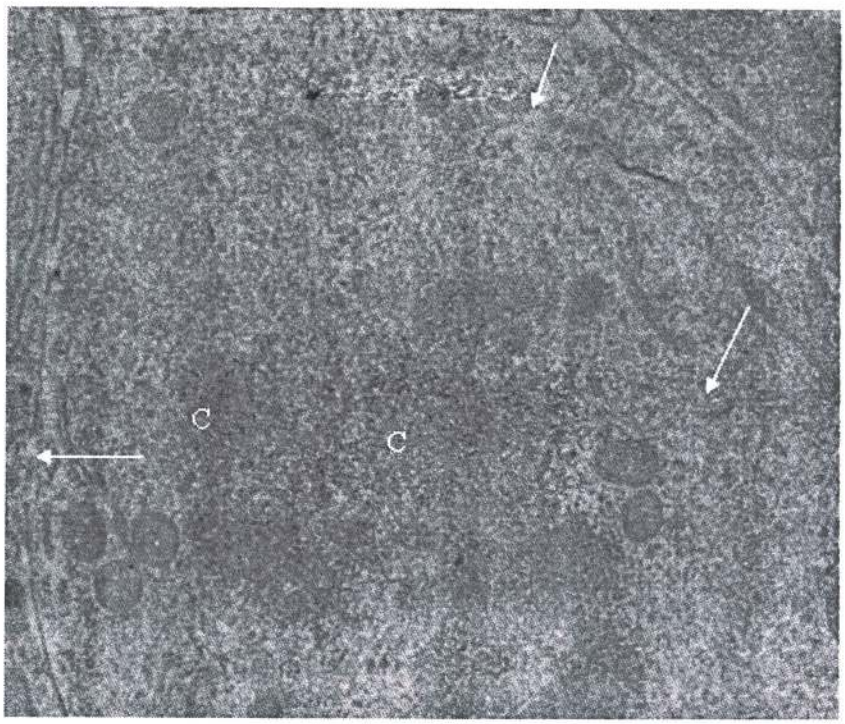
شکل ۳ الکترون میکروگراف سلول گانگلیونیک گروه آزمایشیI که در آن هسته یوکروماتین (EN) و سیتوپلاسم یکنواخت دیده می شود. همانطور که مشاهده می شود، در سه ناحیه کروماتین (C) متراکم شده و برخی از شبکه های آندوپلاسمیک متورم شده اند. بزرگنمایی: ۱۲۰۰۰×



شکل ٤ یک هسته سالم (NO) و یک هسته آپوپتوتیک (AP) در فتورسپتورهای گروه آزمایشیI . بخشهایی از کروماتین متراکم شده (C)که نشان دهنده مراحل اولیه تغییرات آپوپتوتیک است، دیده می‌شود بزرگنمایی: ۷۰۰۰×



شکل ٥ الکترون میکروگراف گروه آزمایشی II: سه سلول گانگلیونیک که به ترتیب G1، G2، G3 مراحل اولیه تا پیشرفته آپوپتوز را نشان می‌دهند، دیده می‌شود بزرگنمایی: ٤٤۰۰ ×



شکل ٦ الکترون میکروگراف از یک فتورسپتور آپوپتوتیک در گروه آزمایشی II . در این تصویر خوشه کروماتین متراکم (C) در مرکز سلول مشاهده می‌شود، همچنین غشای هسته پاره شده (پیکان) و کاملا از بین رفته و سیتوپلاسم و نوکلئوپلاسم با هم یکی شده‌اند.
بزرگنمایی: ۱۲۰۰۰×

در سلولهای فتورسپتور تغییرات چشمگیرتر بوده به نحوی که هسته برخی از آنها مراحل مختلف آپوپتوزیس را نشان می‌داد. همچنین، شبکه آندوپلاسمیک در برخی نواحی کاملا متورم شده بود [٤ و ٥]. در گروه آزمایشی II تغییرات هسته و روند آپوپتوزیس با وضوح بیشتری هم در فتورسپتورها و هم در سلولهای گانگلیونیک، مشخص بود. در برخی سلولهای گانگلیونیک و فتورسپتورها هسته‌ها کاملا متراکم شده، رفته رفته غشای خود را از دست داده و سر انجام به صورت قطعات متراکم فاقد پوشش در سیتوپلاسم در آمدند. همچنین ماتریکس اغلب میتوکندریها دنس شده و کریستاهای آنها متورم شده است (شکلهای ٥ و ٦).

بحث

با بررسی فتورسپتورها و سلولهای گانگلیونی در گروههای آزمایشی تعدادی ازاین سلولها دارای سیتوپلاسم و کروماتین متراکم بودند. تغییرات هسته‌ای که مراحل مختلف آپوپتوزرا نشان می‌داد نیز مشاهده شد. در این سلولها غشای هسته پیوستگی خود را از دست داده و قطعاتی از کروماتین به شکل جوانه‌هائی از بقیه هسته جدا می‌شوند. همچنین مشاهده شد که غشای سلول چین خوردگیهای عمیقی پیدا کرده و قطعاتی از سلول به شکل حبابچه‌هایی از بقیه سلول جدا شده‌اند. کادمیوم باعث مهار مرفوژنتیک در جنین می‌شود. بدین صورت که با باند شدن به گروههای Sulfhydryl آنزیمهای جنین و به هم زدن تعادل آب و یونها باعث اختلال متابولیسم می‌شود [۲]. کادمیوم هموستاز کلسیم در بدن را مختل می‌کند و این درحالتی است که یونهای کلسیم نقش مهمی در مراحل تکامل جنینی از جمله میتوز، ارگانزایی، انسجام سلولها و پروسه‌های مرفوژنتیکی ایفا می‌کند. کادمیوم می‌تواند اختلالاتی در دینامیک کانالهای کلسیمی و انتقالات داخل سلولی کلسیم ایجاد کند. همچنین نفوذپذیری غشای سلول را به کلسیم تغییر می‌دهد. کادمیوم و کلسیم دو یون رقیب هستند و وقتی سلول در معرض یونهای کادمیوم قرار می‌گیرد، فرصت دریافت کلسیم را

از دست می‌دهد. از طرفی کادمیوم در بدن موجود زنده خاصیت تجمعی دارد. این موضوع نیز به نوبه خود کاهش میزان کلسیم دریافتی را شدیدتر می‌کند. کادمیوم در یک سیستم بدون کلسیم فرگمانتاسیون DNA را به شکل قابل توجهی بالا می‌برد [۱، ۲، ۵، ۱۳و ۱۸].

به علت فعالیت شدید تقسیم سلولی که طی تکامل صورت می‌گیرد، جنینها مستعد به آسیبهای DNA هستند. از طرف دیگر خود سلولها دارای مکانیزمهایی هستند که آسیبهای DNA را در اسرع وقت ترمیم کرده و بدین ترتیب از وقوع اشتباهات نسخه برداری، موتاسیون و مرگ سلولی جلوگیری می‌شود. در جنینهایی که در معرض کادمیوم قرار گرفتند آسیبهای DNA پایدار مانده، در نتیجه نواقص تکاملی و موتاسیون و مرگ سلولی بیشتر دیده می‌شود [۲و ۱۹].

میکروتوبولها در تقسیمات سلولی، انتقال وزیکولها از جمله وزیکولهای حاوی کلسیم، در حرکت سلولی و ساختمان اسکلت سلولی شرکت می‌کنند. کادمیوم می‌تواند عامل مخرّبی در تمام پدیده‌های ذکر شده باشد. بدین صورت که توزیع پروتئین آلفا – توبولین (یکی از هترودیمرهای میکروتوبول) در این سلولها یکنواخت دیده نمی‌شود، درنتیجه تشکیل میکروتوبولها در سلول با مشکل مواجه می شود [۲۰].

تعداد زیادی از مطالعات انجام شده تأثیرات سوء کادمیوم بر تکامل قسمتهای مختلف جنین را به دلیل مهار انتقال مواد غذایی به جنینها اثبات می‌کنند و اختلالات تکامل دستگاه عروقی بدن را به عنوان عامل فیزیولوژیک اصلی در مسمومیتهای کادمیوم می‌دانند. در مطالعه‌ای که سلولهای اندوتلیال عروق نافی انسان را کشت دادند تأثیر مهاری کادمیوم بر تکثیر، مهاجرت و تشکیل لوله عروقی را اثبات کردند. کادمیوم باعث می‌شود که در یکپارچگی و نفوذپذیری اندوتلیوم عروق تغییرات صورت گیرد. جنینهای در معرض کادمیوم قرار گرفته، دچار اختلالات تکامل عروقی در آئورت پشتی، عروق مغزی، عروق سگمنتال و شبکه عروقی کیسه زرده بودند. شبکه عروقی آنها مختصرتر از گروههای کنترل بود و آناستوموزهای عروق مغزی و تعداد شاخه‌های عروقی مغز و توزیع عروق نواحی مغزی - صورتی دچار اختلال شده بود [۹، ۱۰ و ۱۵].

در تحقیق حاضر با بررسی فرا ساختمان سلولهای فتورسپتورو گانگلیونی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی تعدادی میتوکندری کاملا بزرگ دیده شد که کریستاهای آنها کم شده و واکوئولهایی در آنها وجود داشت. همچنین میتوکندریهای کوچک و متراکم نیز قابل مشاهده بودند.

گزارش شده است که در مرحله کروماتولیز و قبل از شروع آپوپتوزیس، میتوکندریهای فعال افزایش یافته و در نزدیکی هسته سلول تجمع می‌یابند. ولی در مراحل بعدی که آپوپتوزیس شروع می شود، میتوکندریها به طور فزاینده ای آسیب می بینند که از بین رفتن فعالیت اکسیدازی سیتوکروم C، تورم و کریستولیز میتوکندریها همزمان باوقایع سیتوپلاسمی آپوپتوزیس مشاهده می شود.

میتوکندریها می‌توانند منبعی از رادیکالهای آزاد اکسیژن و فاکتورهای فعال کننده پروتئازهای آپوپتوتیک باشند که به DNA آسیب می‌رسانند [۳۱-۲۹]. بسیاری از دانشمندان عقیده دارند کادمیوم میتوکندری را هدف قرار می دهد و باعث افزایش نفوذپذیری غشای داخلی میتوکندری می‌شود ولی از مکانیزم اثر این پدیده هنوز اطلاعی در دست نیست [۲ و ۷].

تقدیر و تشکر

این مقاله نتیجه طرح تحقیقاتی مصوب مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی و معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی است که بدینوسیله نویسندگان مراتب قدردانی و تشکر خود را از ایشان اعلام می‌دارند.

References

1. **Gomot A.** Toxic Effects of Cadmium on Reproduction, Development, and Hatching in the Fresh water snail lymnaea stagnalis for water Quality Monitoring. Ecotoxicol Environ safety

1998; 22: 288-97.

2. **Roccheri M, Agnello M, Bonaventura R, Matranga V**. Cadmium induced the expression of specific stress proteins in Sea Urchin embryo. Biochem Biophys Rese commun 2004; 321:80-7.
3. **Ishido M, Homma-Takeda Sh, Tohyama Ch, Suzuki T**. Apoptosis in Rat renal proximal tubular cells induced by cadmium. Toxicol Environ Health 1998; 55: 1-12.
4. **Gonzales - Doncel M, Larrea M, Sanchez-Fortun S, Hinton D.E**. Influence of water hardening of the chorion on cadmium accumulation in Medaka eggs. Chemosphere 2003; 52:75-83
5. **Meinelt T, Playle RC, Pietrock M, Durnison BK, Wienke A, Stainberg CF**. Interaction of Cadmium toxicity in embryos and larvae of Zebrafish with Calcium and Humic substances. Aquatic Toxicol 2001; 54:205-15.
6. **Orlowski C, Piotrowski J, K Subdys JK, Gross A.** Urinary cadmium as indicator of renal cadmium in humans: an autopsy study. Human Exp toxicol 1998; 17: 302-6.
7. **Biagioli M, Watjen W, Beyersmann D, Zoncu R, Cappellini C, Ragghianti M, Cremis F, Bucci S.** Cadmium - in duced apoptosis in murine fibroblasts is suppressed by Bcl- 2. Arch Toxicol 2001; 75:313-20.
8. **Kobayashi N, Okamura H**. Effects of heavy metals on Sea Urchin embryo development. Tracing the cause by the effects. Chemosphere 2004; 55:1403-12.
9. **Cheng SH, Chan PK, WU RSS**. The use of microangiography in detecting aberrant vasculature in Zebrafish embryos exposed to cadmium. Aquatic Toxicol 2001; 52:61-71.
10. **Kertesz V, Fancsi T**. Adverse effects of Cd, Cr and Pb on the embryogenesis of the Mallard. Aquatic Toxicol 2003; 65:425-33.
11. **Witeska M, Jezierska B, Chaber J**. The influence of cadmium on common carp embryos and larvae. Aquaculture 1995; 1299, (1-4): 129-132.
12. **Reichelt- Brushtt A.J, Harrison P.L**. The effect of Copper, Zinc, Cadmium on fertilization success of Gametes from Scleractinian Reef Corals. Marin Pollution Bulletin 1999; 38, (3):182-187.
13. **Vaschenko M.A, Zhang Z.P, Lam P.K.S, WU R.S.S**. Toxic effects of Cadmium on fertilizing capability of Spermatozoa, Dynamics of the First Cleavage and Pluteus Formation in the Sea Urchin. Marine Pollution Bulletin 1999; 38, (12):1096-1104.
14. **Bellas J, Vazques E, Beiras R**. Toxicity of Hg, CU Cd and Cr on early developmental stages of Ciona intestinalis with Potential application in marine water quality assessment. Wat Res 2001; 35 (12): 2905-12.
15. **Chan PK, Cheng SH**. Fractal analysis of vascular complexity in Cadmium- treated Zebrafish embryos. Aquatic Toxicol 2003; 63:83-7.
16. **Tetsuo Y, Mitsutu S, tsutomu N**. Comparative effects of repeated administration of cadmium on kidney, spleen, thymus & bone marrow in 2-4 and 8- month old male wister rats. Toxicol Sci 1998;46: 393-402.
17. **Ishio M, Tohyama C, Suzuki T**. C-myc is not involved in cadmium – elicited apoptotic pathway in porcine kidney LLC- PK1 cells. Life Sci 1998; 63: 1195-204.
18. **Lohmann RD, Beyersmann D**. Cadmium & zinc mediated changes of the ca 2t dependent endonuclease in apoptosis. Biochem Biophys Res Commun 1993; 190: 1097-103.
19. **Hook SE, Lee RF**. Interactive effects of UV, benzo pyrene, and Cadmium on DNA damage and repair in embryos of the grass Shrimp. Marine Environ Res 2004; 58:735-39.
20. **Mattingly KS, Beaty BJ, Mackie RS, Carlson JO, Rayms-Keller A**. Molecular cloning and

characteriztion of a metal responsive Chironomus Tentans alpha- tubulin ₍DNA. Aquatic Toxicol. 2001; 54:249-60.

21. **Stohs S.J, Bagchi D, Hassoun E, Bagchi M.** Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium & cadmium ions. Environ Pathol Toxicol Oncol 2001; 20(2): 77-88.
22. **Fukumoto M, Kujiraoka T, Hara M, Shibasaki T.** Effect of cadmium on gap junctional intercellular communication in primary cultures of rat renal proximal tubular cells. Life Sci 2000; 69(3): 247-54.
23. **Dan G, Lall SB, Rao DN.** Humoral and cell mediated immune response to cadmium in mice. Drug Chem Toxicol 2000; 23(2): 344-60.
24. **Krocova Z, Macela A, Kroca M.** The immunomodulatory effect of lead and cadmium on the cells of immune system in vitro. Toxicol Vitr 2000; 14(1): 33-40.
25. **Kaji T, Takata M, Miyahara T, Kozuka H, Koizumi F.** Interaction between Cadmium and Copper on ossification of embryonic chick bone in tissue culture. Toxicol Let 1991; 55, 3:255-62.
26. **Hallare AV, Schirling M, Luckenbach T, Kohler HR, Triebskorn R.** Combined effects of temperature and Cadmium on developmental parameters and biomarker responses in Zebrafish embryos. J Thermal Biol 2004; 52, 456-72.
27. **Larson WJ.** Human embryology. Chirchil Livingston, London, Chap 12, Edit 2 nd, 1997, pp 375- 84.
28. **Bancraft JD, Gamble M.** Theory and practice of Histology Techniques, Churchil Livingstone, Fifth edition 2002, pp679-699.
29. **Riggio M, Filosa S, Parisi E, Scudiero R.** Changes in Zinc, Copper and Metallothioneine contents during oocyte growth and early development of the teleost Danio rerio. Comparative Biochem. Physiol 2003; 135:191-96.
30. **AL Abdulla NA, Martin LJ.** Apoptosis of retrogradely degenerating neurons occures in association with the accumulation of perikaryal mitochondria and oxidative damage to the nucleus. Am J Pathol 1998; 153: 447-56.
31. **Martin LJ.** Mechanisms for neuronal degeneration in amyotrophic lateral sclerosis and in models of motor neuron death (review). Int J Mol Med 2000; 5: 3-13.
32. **Shapiro J, Gordon.** The neurotoxicity of cadmium. J chem 2000; 31.