

بررسی نقش حفاظتی تورین در برابر آثار ناهنجاری زایی کلرید کادمیوم بر روی اسپریماتوزنز موش‌های نر نژاد NMRI، بالغ و نابالغ

مهناز آذرینیا، پروین رستمی، عباس شکور، پریدخت فرهنگ: دانشگاه تربیت معلم تهران

چکیده

کادمیوم از جمله فلزهای سنگین محیطی است که در همه جا یافت می‌شود و القاکننده اختلالات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و ساختاری است. این ماده در صنایع باتری‌سازی و نظامی کاربرد دارد. در مطالعه اخیر نقش پاتولوژیک کلرید کادمیوم و اثر حفاظتی تورین روی بیضه موش‌های نر نژاد NMRI مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه کلرید کادمیوم با دوز ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم و تورین با دوز ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت تیمار طولانی مدت (Chronic)، به مدت ۳۰ روز (هفته‌ای دو مرتبه) به صورت درون صفاقی مورد استفاده قرار گرفتند و تغییرات در پارامترهایی نظیر: وزن نسبی بیضه، تغییرات وزنی حیوانات، ضخامت غلاف سفید بیضه، قطر لوله منی‌ساز، تعداد سلول‌های اسپریماتوگونی نوع A، تعداد سلول‌های اسپریماتوگونی نوع B، تعداد سلول‌های اسپریماتوسیت اولیه، تعداد سلول‌های اسپرم، تعداد سلول‌های سرتولی مورد مطالعه قرار گرفت و مشاهده شد که به دنبال استعمال کلرید کادمیوم، پارامترهایی نظیر ضخامت غلاف سفید، وزن نسبی بیضه افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد داشتند، درحالی که بقیه پارامترها از کاهش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد برخوردار بودند. به علاوه در برخی از نمونه‌های تجربی حالت چروکیدگی لوله‌های منی‌ساز و رهاشدن اسپریماتوسیت‌های اولیه و اسپریماتیدها به مرکز مجاری لوله‌ها مشاهده شد. از سوی دیگر در گروهی که از ترکیب آنتی‌اکسیدان تورین استفاده نمودیم، هیچ گونه افزایش یا کاهش معنی‌داری در میزان پارامترهای ذکر شده نسبت به گروه شاهد مشاهده نکردیم. بنا بر این می‌توان چنین نتیجه گرفت که استفاده از کلرید کادمیوم در دوز ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم به دو صورت تیمارهای کوتاه مدت (Acute) و دراز مدت (Chronic) آثار پاتولوژیک بر روی بیضه دارد و در تیمار طولانی مدت این آثار شدیدتر است. استفاده از آنتی‌اکسیدانی نظیر تورین قادر است آثار سمی کادمیوم را در بیضه کاهش داده و خنثی نماید.

مقدمه

کادمیوم در جوامع امروزی پراکندگی گسترده‌ای دارد و آثار سمی این فلز سنگین بر دستگاه تولید مثلی به اثبات رسیده است [۱]. در پژوهشی نشان داده شد که غلظت پایین کادمیوم به طور قابل ملاحظه‌ای سبب تخریب

کلمات کلیدی: تورین، کلرید کادمیوم، ناهنجاری زایی، اسپریماتوزنز.

بیضه‌ها می‌شود [۲]. مطالعه روی میمون رزوس^۱ و موش رت^۲ آشکار ساخت که کلرید کادمیوم باعث تخریب سلول‌های اسپرماتوگونی و مهار رشد و نمو اسپرماتوسیت‌های اولیه می‌شود [۴]، [۳]. همچنین، تیمار با کادمیوم در زمان جنینی باعث کاهش تعداد اسپرماتوگونی‌ها در موش پیش از بلوغ می‌شود [۵]. کادمیوم، تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن را در سلول القا می‌کند و افزایش می‌دهد. از سوی دیگر، با کاهش آنتی‌اکسیدان‌های درون سلول و برهم زدن تعادل بین آنتی‌اکسیدان‌ها و عوامل اکسیدکننده سلولی، به مولکول‌های حیاتی با ارزش، همانند آنزیم، پروتئین و لیپید غشایی آسیب می‌رساند [۶]. بهترین راه مقابله با آن، افزایش ترکیبات آنتی‌اکسیدان در سلول و افزایش زمان حیات سلول نسبت به مسمومیت با کادمیوم است. به نظر می‌رسد که عوامل آنتی‌اکسیدان با اتصال به کادمیوم در خون باعث مهار این ماده می‌شود و یا با بلوکه کردن فعالیت کادمیوم درون سلول از آثار تخریبی آن می‌کاهد [۷]. تورین باعث فعال شدن متالوتیونین‌ها می‌شود و نقش محوری این ترکیبات در اتصال با فلزها سنگین درون سلول است. برهم کنش^۳ متالوتیونین‌ها و روی باعث فعالیت پایانه‌های SH تورین می‌شود. متالوتیونین‌ها تمایل بیشتری برای اتصال با روی (Zn) دارند، زیرا به راحتی از غشا عبور می‌کنند [۹]. افزون بر این، تعدادی از متالوتیونین‌ها برای حفاظت از DNA در برابر عوامل آنتی‌اکسیدان و تخریب شیمیایی و قطعه‌قطعه شدن از سیتوزول وارد هسته می‌شوند [۱۰]. تورین با القای متالوتیونین‌ها آثار اکسیدکنندگی بسیاری از فلزها سنگین (کادمیوم) را خنثی می‌کند [۱۱]. تورین در سیتوپلاسم آنزیم گلوکوتاتیون پراکسیداز را مهار می‌کند و میزان گلوکوتاتیون را برای اعمال آنتی‌اکسیدانی افزایش می‌دهد. در مجموع، آثار آنتی‌اکسیدانی تورین، با افزایش نسبت آنتی‌اکسیدان‌ها به عوامل اکسیدکننده و کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز، همراه است [۱۲].

مواد و روش‌ها

جانوران

این مطالعات روی موش نر نژاد ((NMRI))، به وزن ۱۹-۱۶ گرم انجام گرفت. موش‌ها به پنج گروه دختایی (n=۱۰) تقسیم و در شرایط استاندارد (۲۵ درجه سانتیگراد) نگهداری و آزادانه از غذا (به صورت پلت)^۴ و آب عاری از یون (دیونیزه)^۵ استفاده کردند.

داروها

کلرید کادمیوم، سالین و تورین (از شرکت Merck، به شکل پودر). موارد نامبرده در سالین حل

۱- Rhesus monkey.

۲- Rattus.

۳- Interaction.

۴- pellet.

۵- Deionized.

شده، کلرید کادمیوم به مقدار ۰/۰۲ واحد به ازای هر گرم وزن حیوان توسط سرنگ همیلتون و تورین به مقدار تزریق ۰/۴ واحد به ازای هر گرم وزن حیوان، به موش‌های نر نژاد ((NMRI)) تزریق شد [۲].

روش انجام آزمایش

پیش از شروع آزمایش، تمامی حیوانات با ترازوی دیجیتالی (با دقت ۰/۰۱ گرم) توزین شدند (W_1). گروه (۱) به موش‌های شاهد هیچ ماده‌ای تزریق نشد و فقط از غذای موش (پلت) و آب دیونیزه استفاده کردند. گروه (۲) به موش‌های گروه شم^۱ تنها محلول سالین به صورت درون صفاقی تزریق شد. گروه (۳) به این گروه از موش‌ها محلول کلرید کادمیوم به صورت درون صفاقی تزریق گردید. گروه (۴) این گروه محلول تورین به صورت درون صفاقی دریافت کردند. گروه (۵) برای مطالعه اثر حفاظتی تورین و کلرید کادمیوم به این گروه از موش‌ها ۱۵ دقیقه پیش از تزریق کلرید کادمیوم، محلول تورین به صورت درون صفاقی تزریق گردید. مدت تیمار گروه تجربی و حفاظتی حدود ۳۰ روز و هر سه روز یک بار بود. ۴۸ ساعت بعد از آخرین تزریق، موش‌های مورد آزمایش وزن شدند (W_2) و سپس با استفاده از اتر، آن‌ها را بیهوش کرده از ناحیه شکمی، بیضه‌ها خارج گشته و پس از شستشو با سرم فیزیولوژیک، توزین و در محلول بوئن تثبیت (فیکس) شدند. برای مطالعه ساختار بافتی، برش‌های عرضی میکروسکوپی (۶ میکرون) تهیه گردید. پس از رنگ‌آمیزی با روش H&E، تغییرات بافت‌شناختی بیضه بررسی میکروسکوپی شد.

تجزیه و تحلیل آماری

با استفاده از آزمون مقایسه میانگین‌ها، انحراف معیار، آنالیز واریانس یک عاملی و آزمون T، نتایج به دست آمده از گروه تجربی، حفاظتی، شم و کنترل مقایسه شدند. برای تهیه هیستوگرام‌ها از نرم افزار Excel استفاده گردید.

نتایج

براساس بررسی‌های انجام شده، تعداد اسپرماتوگونی‌های نوع A، اسپرماتوگونی‌های نوع B، سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه، سلول‌های اسپرم، سلول‌های سرتولی، ضخامت غلاف سفید بیضه، وزن نسبی بیضه و تغییرات وزنی حیوانات پنج گروه مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل از بررسی گروه‌های کنترل شم، تجربی و حفاظتی نشان دادند که در گروهی که کلرید کادمیوم دریافت کرده بودند تعداد اسپرماتوگونی‌های نوع A و B، سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه، سلول‌های اسپرم، دستخوش تغییر شده بودند (شکل‌های ۱، ۲، ۳، ۴). بر

۱- Sham

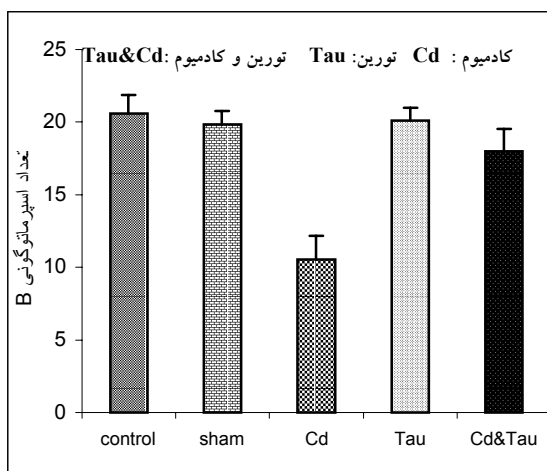
اساس آنالیز آماری داده‌ها، تعداد اسپرمتوگونی‌های نوع A، اسپرمتوگونی‌های نوع A و B، سلول‌های اسپرمتوسیت اولیه و سلول‌های اسپرم نسبت به گروه کنترل از کاهش معنی‌داری برخوردار است ($P < 0/05$)، در حالی که تعداد سلول‌های سرتولی با توجه به کاهش نسبت به گروه کنترل مقدار معنی‌داری را نشان نمی‌دهد. در گروه شم و حفاظتی تغییرات قابل توجهی نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد (جدول ۱).

جدول ۱- تعداد اسپرمتوگونی‌های نوع A، اسپرمتوگونی‌های نوع B، سلول‌های اسپرمتوسیت اولیه، سلول‌های اسپرم. ($\bar{X} \pm SE$)

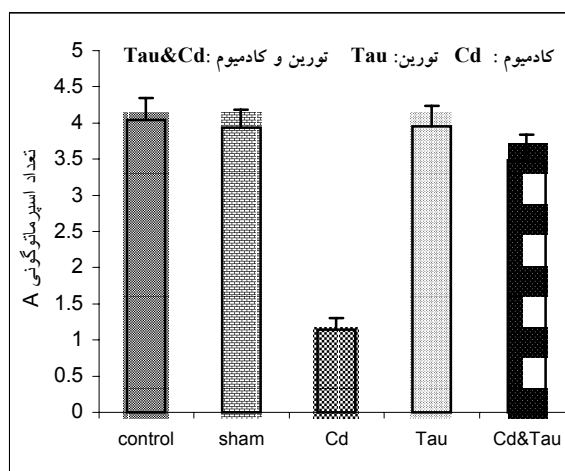
تیمار	کنترل	شم	کلرید کادمیوم	تورین	حفاظتی
تعداد اسپرمتوگونی‌های نوع A	۴/۰۴ ± ۰/۳۰	۳/۹۴ ± ۰/۲۴	۱/۱۴ ± ۰/۱۸*	۳/۹۵ ± ۰/۲۹	۳/۴۸ ± ۰/۳۶
تعداد اسپرمتوگونی‌های نوع B	۲۰/۶ ± ۱/۲۶	۱۹/۸۶ ± ۰/۹۲	۱۱/۵۴ ± ۱/۵۲*	۲۰/۱ ± ۰/۸۹	۱۷/۹۸ ± ۱/۵۶
تعداد اسپرمتوسیت اولیه	۴۸/۷۹ ± ۴/۵۶	۴۷/۹۶ ± ۳/۸۹	۲۲/۵۶ ± ۳/۲۵*	۴۷/۶۷ ± ۳/۳۴	۳۹/۹۸ ± ۴/۳۱
تعداد سلول‌های اسپرم	۰/۶۳ ± ۰/۱۹	۰/۶۸ ± ۰/۱۳	۲/۰۶ ± ۰/۲۶*	۰/۵۸ ± ۰/۱۲	۰/۹۵ ± ۰/۱۵

* $P < 0/001$

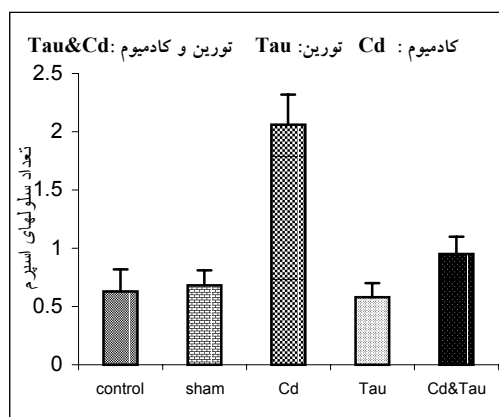
N= 50



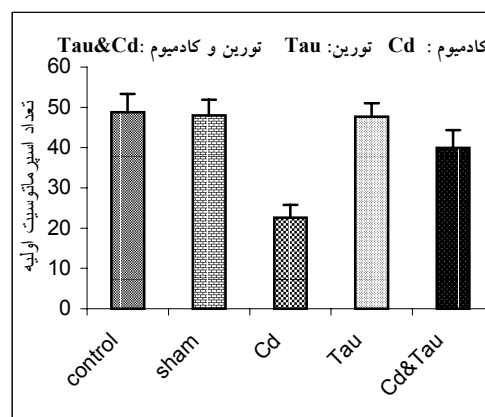
شکل ۲- مقایسه تعداد سلول‌های اسپرمتوگونی B



شکل ۱- مقایسه تعداد سلول‌های اسپرمتوگونی A



شکل ۴- مقایسه تعداد سلولهای اسپرم



شکل ۳- مقایسه تعداد اسپرمتوسیت‌های اولیه

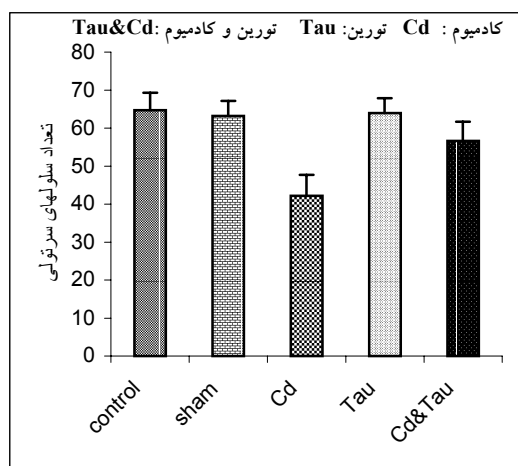
افزون بر عوامل فوق، در تیمارهای تجربی، بیضه‌ها دچار خونریزی شدید شدند، و بسیار کدر به نظر می‌رسیدند، علت این امر پاره شدن غشا مویرگ‌های بیضه می‌باشد اما در گروه کنترل و تیمار حفاظتی بیضه‌ها شفاف بوده و خونریزی مشاهده نگردید.

در بررسی ضخامت غلاف سفید بیضه از گروه‌های کنترل، شم، تجربی و حفاظتی مشخص شد که ضخامت غلاف سفید بیضه گروه تجربی نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری ($P < 0.001$) از خود نشان می‌دهد (جدول ۲)؛ این افزایش در گروه حفاظتی نسبت به گروه شاهد معنی‌دار نبود (شکل ۵)؛ همچنین، با توجه به کاهش تعداد سلول‌های سرتولی گروه تجربی نسبت به گروه کنترل معنی‌دار نبود (جدول ۲).

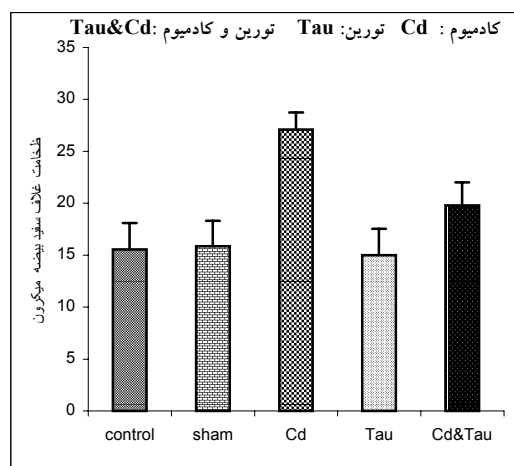
جدول ۲. ضخامت غلاف سفید بیضه و تعداد سلول‌های سرتولی ($\bar{X} \pm SE$)

تیمار	کنترل	شم	کلرید کادمیوم	تورین	کادمیوم و تورین
ضخامت غلاف سفید بیضه (میکرون)	104 ± 30	94 ± 24	$114 \pm 38^*$	95 ± 29	148 ± 36
تعداد سلول‌های سرتولی	647 ± 55	$2 \pm 3/95$	$42/2 \pm 5/5^*$	$64 \pm 3/85$	$56/6 \pm 5/05$

* $P < 0/001$
N=50



شکل ۶ - مقایسه تعداد سلول‌های سرتولی.



شکل ۵ - مقایسه ضخامت غلاف سفید بیضه

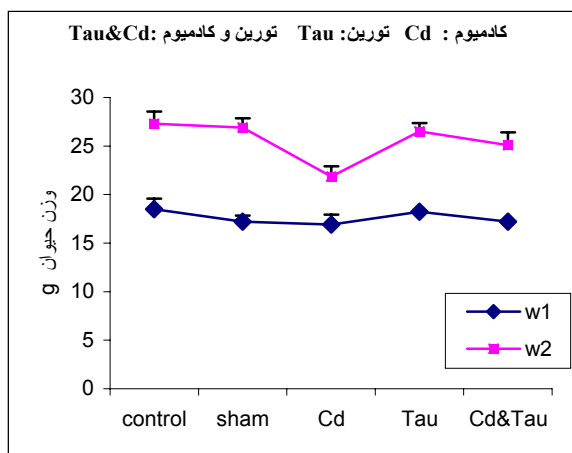
وزن نسبی بیضه در نمونه‌هایی که به آن‌ها کلرید کادمیوم تزریق شده بود، نسبت به گروه کنترل از کاهش معنی‌داری برخوردار بود ($P < 0.001$) (جدول ۳).

وزن نسبی بیضه گروه حفاظتی نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری نداشت (شکل ۷). نتایج حاصل از تغییرات وزن حیوانات تحت تیمار کلرید کادمیوم، کاهش شدیدی نسبت به گروه کنترل نشان دادند ($P < 0.001$). این کاهش در گروه حفاظتی نسبت به گروه کنترل نیز معنی‌دار نبود (شکل ۸).

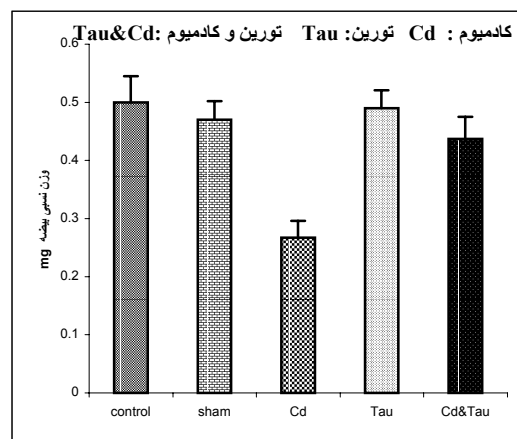
جدول ۳- وزن نسبی بیضه و تغییرات وزنی حیوانات ($\bar{X} \pm SE$)

تیمار	کنترل	شم	کلرید کادمیوم	تورین	کادمیوم و تورین
وزن نسبی بیضه (میلی‌گرم)	0.5 ± 0.045	0.47 ± 0.032	$0.26 \pm 0.029^*$	0.49 ± 0.031	0.43 ± 0.038
تغییرات وزنی ^۱ (گرم)	W1: 18.5 ± 1.09 W2: 27.3 ± 1.25	W1: 17.2 ± 0.62 W2: 26.9 ± 0.95	W1: 16.9 ± 1.05 W2: 21.85 ± 1.07 *	W1: 18.23 ± 0.6 W2: 26.5 ± 0.85	W1: 17.2 ± 0.7 W2: 25.1 ± 1.32

$P < 0.001$ *
N=50



شکل ۸ - مقایسه تغییرات وزنی حیوانات



شکل ۷ - مقایسه وزن نسبی بیضه

مورد دیگری که به صورت میکروسکوپی در گروه‌های مختلف مشاهده می‌شد تغییرات ضخامت جداره مویرگ‌های خونی است. در تیمار تجربی ضخامت جداره مویرگ‌های خونی حالت طبیعی نداشت و آشفتگی شدیدی در غشای آن مشاهده می‌شود. در حالی که در گروه کنترل دیواره مویرگ‌ها تک سلولی بود و انسجام سلولی واضحی مشاهده می‌شود، در تیمار حفاظتی نیز حالت طبیعی در مویرگ‌ها مشاهده می‌شود.

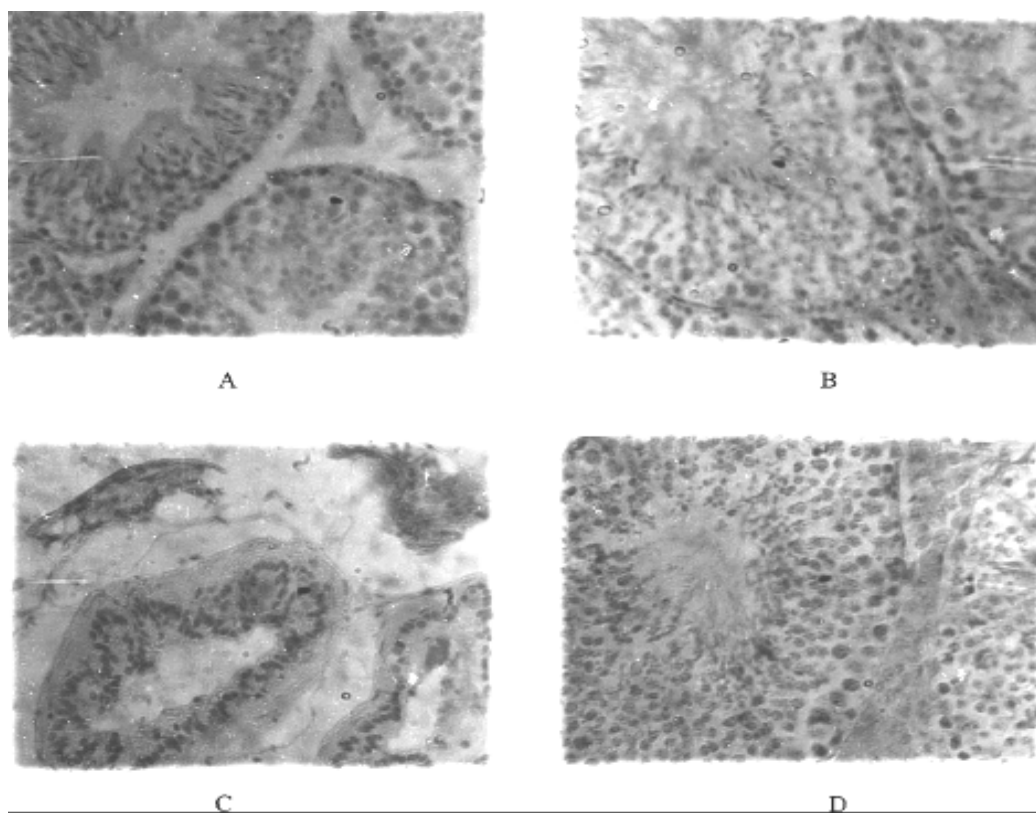
بحث

همان گونه که نتایج نشان دادند، تزریق کلرید کادمیوم به موش نر نژاد NMRI در ساختار بافتی و ریخت‌شناختی بیضه، کاهش تعداد اسپرماتوگونی‌های نوع A و B، کاهش تعداد اسپرماتوسیت‌های اولیه، کاهش تعداد اسپرم‌ها، افزایش ضخامت غلاف سفید بیضه، افزایش نسبی وزن بیضه و کاهش وزن بدن حیوانات اثر دارد.

ضایعات شدید بافت بیضه، به دنبال کاربرد کلرید کادمیوم (با دوز پایین و تیمار طولانی) به اثبات رسیده است [۲]. تخریب لوله‌های اسپرم ساز بیضه در گروه‌های تجربی به وفور دیده شده است. در گروه حفاظتی، تخریب در لوله‌های اسپرم ساز بیضه کاهش یافته، زیرا عوامل آنتی‌اکسیدان (تورین) با مهار رادیکال‌های آزاد مانع از فعالیت آن‌ها در سلول شده و از تخریب بافتی جلوگیری می‌کنند.

تورین به عنوان ترکیبی آنتی‌اکسیدان عوامل اکسیدکننده را از بین برده، از ضایعات ایجاد شده محافظت به عمل می‌آورد با توجه به نتایج به دست آمده، احتمالاً تورین از دو طریق باعث مهار کادمیوم در بدن می‌شود [۱۵].

1. weight exchange : $W1$:At start. $W2$: At sacrifice.



شکل ۹- تصاویری از برش‌های بیضه موش که با روش H&E رنگ آمیزی شده است. بزرگنمایی ۲۵۰*
 (A) برشی از بافت بیضه سالم در گروه کنترل که فرآیند اسپرماتوژنز طبیعی در آن مشاهده می‌شود.
 (B) برشی از بافت بیضه در گروه تیماری روی که مشابه گروه کنترل است.
 (C) برش بیضه تحت تیمار کادمیوم، نکروزه شدن بافت و جدایی اسپرماتوسیت‌ها از اطراف غشا پایه کاملاً مشهود است.
 (D) تیمار کادمیوم/ تورین، در این برش لوله‌های اسپرم سازهای پلازما نشان می‌دهند و تقریباً بیشتر اسپرم‌ها مشابه گروه کنترل هستند.

(۱) پیش از رسیدن کادمیوم به بافت‌های نرم بدن (بیضه)، در درون خون با آن پیوند یافته و آثار تخریبی را خنثی می‌کنند؛ (۲) بعد از ورود کادمیوم به داخل سلول، تورین با فعال کردن متالوتیونین‌ها قادر است آثار کادمیوم را مهار کند، زیرا کادمیوم به طور مستقیم روی سلول‌های اسپرماتوگونی اثر می‌گذارد و یا به طور غیرمستقیم (با تولید رادیکال‌های آزاد) می‌تواند حتی آثاری به جا بگذارد همانند تخریب لیپیدهای غشایی و افزایش فرایند پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی، تخریب پروتئین‌ها و افزایش فرایند اکسیداسیون پروتئین‌ها و آمینواسیدها و حتی آثار تخریبی بر DNA و افزایش فرایند اکسایش (اکسیداسیون) اسیدهای نوکلئیک و نوکلئوتیدها و نیز عوامل آنتی‌اکسیدان، را با غیرفعال کردن و مهار رادیکال‌های آزاد خنثی کند [۱۵].

فلزها سنگینی مانند کادمیوم از انواع فلزاتی هستند که با گروه سولفوئیدریل، تورین واکنش نشان می‌دهند و به راحتی از غشای سلولی عبور می‌کنند؛ بنا براین، ساختارهای رادیکالی را در سلول افزایش داده و با کاهش فلزاتی ضروری (مانند مس و روی) که در ساختار برخی پروتئین‌ها، آنزیم‌ها و حتی متالوتیونین‌ها شرکت دارند، تولید فراورده‌های زیان‌باری همانند لیپید پراکسیداز و رادیکال‌های هیدروکسیل را افزایش می‌دهند؛ لیپید پراکسیدازها باعث تغییر ساختار غشای سلولی و هسته شده و عملکرد میتوکندری را مختل می‌کنند [۱۶]. گاهی در اثر اتصال فلزها سنگین با ترکیبات آنتی‌اکسیدان، گروه‌های SH آزاد می‌شوند، این گروه‌ها با اتصال مستقیم به تعدادی از پروتئین‌های مهم، باعث تخریب ساختار پروتئین‌های آنزیمی Na/K ATP_{ase} می‌شوند [۱۷].

از پاسخ‌های دیگر حفاظتی در برابر آثار سمی کادمیوم، سنتز متالوتیونین‌هاست. متالوتیونین‌ها، پروتئین‌های درون سلولی (با وزن مولکولی اندک) هستند که خود مخزنی برای روی و مس بوده و می‌توانند فضای درون سلول را از فلزهای واکنش دهنده با گروه‌های تیولی پاک کنند. در ساختار متالوتیونین‌ها حدود ۳۰ درصد سیستئین مشاهده می‌شود که به راحتی با فلزهای سنگین اتصال برقرار می‌کند [۱۸]. پس از اتصال به متالوتیونین‌ها و مهار شدن، کادمیوم با همکاری این ترکیبات وارد میتوکندری می‌شود. در این زمان یون روی (Zn^{+2}) آزاد می‌شود. اگر غلظت یون روی آزاد افزایش یابد، سمی است. بنابراین یون روی به ناحیه پیشبرنده (پروموتور) ژن متالوتیونین متصل شده، سبب افزایش سنتز متالوتیونین‌ها می‌شود و میزان یون روی آزاد سلولی را کاهش می‌دهد؛ و از سوی دیگر، باعث افزایش اتصال متالوتیونین‌ها با فلزهای سنگین شده، آن‌ها را مهار می‌کند (اثر حفاظتی)؛ در این هنگام حضور یون روی بسیار ضروری است (اثر عمل‌کردی) [۱۷].

با توجه به اثر شدید کلرید کادمیوم (۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و ایجاد ضایعات بافتی در تیمارهای طولانی‌مدت این آثار بسیار شدیدتر است. از سوی دیگر، این ضایعات را می‌توان با استفاده از موادی که دارای خواص آنتی‌اکسیدانی

هستند، کاهش داد. نتایج حاصل نشان می‌دهند که استفاده از تورین نقش حفاظتی داشته و از تخریب بافتی و تومورزایی تا حد زیادی می‌کاهد.

منابع

1. Rom WN. Mt Sinai J Med, 43: 542–552 (1976).
2. Brigitte Lefe`vre. Reproductive Toxicology, 15: 385–391 (2001).
3. Vermande Van Eck, GJ. Meigs JW. Fertil Steril, 11: 223–34 (1960).
4. Stowe, HD. Moore, RA. Fertil Steril, 22: 755–60 (1971).

5. Wide M. *Teratology*, 32: 375– 80 (1985).
6. Gurer, H. Ercal, N. *Toxicology*, 128: 181-189(2000).
7. Ercal, N. Gurer, H. *Free Radical Biology & Medicine*, 29: 927-945(2000).
8. Kagi, R. H. J. Schaffer, A. *Bio-chemistry*, 27: 8509 –8515 (1988).
9. Hamer, D. H. *Ann. Rev. Biochem*, 55: 913–951(1986).
10. Cherian, M.G. Howell, S.B. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 126: 1-5(1994).
11. Mocchegiani, E. Giacconi, R. Cipriano, C. *Brain Research*, 55: 147– 153 (2001).
12. Moldeus, P. *Methods in Enzymology*, 234: 482-492 (1994).
13. Zwain, I. Amato. P. *Experimental Cell Research*, 257: 101-110 (2000).
14. Naray, I. Gati, I. Rajczyk, K. *Toxicology and Environmental Health.*, 58: 359-366 (2001).
15. Ercal, N. Terese, C. Lutz, P. J. *Toxicology*, 108: 57-64 (1996).
16. Halliwall, B. A personal view. *Nutr*, 52: 253-265 (1994).
17. Quig, D. *Altern Med Rev*, 3: 262-270 (1998).
18. Burnam, D.M. Palmiter, R.D. *EXS*, 52: 457-463 (1987).
19. Blaky, D.H. Bayly, J.M. Douglas, G.R. *Mutat. Res*, 298: 1-7(1992).