

The effect of chronic exposure to X-ray on some blood parameters and P53 gene on the heart in female albino rats

تأثير التعرض المزمن للأشعة السينية X-ray على بعض المعايير الدموية ومستوى التعبير الجيني لجين P53 على القلب في اناث الجرذان البيضاء

ندى عبد الحسين محمد مهدي الخفاجي أ.م.د وفاق جبوري محمد البازي

جامعة كربلاء/كلية التربية للعلوم الصرفة

* بحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الاول

الخلاصة

أجريت الدراسة الحالية لمعرفة تأثير التعرض المزمن للأشعة السينية X-Ray على القلب . قسمت عشوائيا 30 من اناث الجرذان البيضاء الى ثلاثه مجاميع (10 حيوانات /مجموعة) ولمدة شهرين متتاليين ، اعتبرت المجموعة الأولى (T1) كمجموعة سيطرة والمجموعة الثانية (T2) عرضت الى الأشعة السينية (80 KV) على بعد متر واحد/يويا ولمدة شهر كذلك هو الحال للمجموعة الثالثة (T3) تم تعريضها لمدة شهرين ، وبعد جمع عينات الدم قبل وبعد انتهاء التجربة لوحظ حدوث انخفاض معنوي ($P < 0.05$) في RBC , PCV , Hb والصفائح الدموية Platelet ، وارتفاع معنوي ($P < 0.05$) في WBC في المجموعة المعرضة لمدة شهر T2 والمجموعة المعرضة لمدة شهرين T3 بالمقارنة مع مجموعة السيطرة T1، اما بالنسبة للتغيرات المرضية النسيجية للقلب لوحظ حدوث انسلاخ في طبقة الخلايا الطلائية وتحطم الغضروف الزجاجي واحتقان دموي في مجموعة الجرذان المعرضة لمدة شهر T2 ولمدة شهرين T2 مقارنة مع مجموعة السيطرة T1، كما اشارت الدراسة الوراثية الى زيادة التعبير الجيني لجين P53 لنسيج الرئة في المجموعة المعرضة لمدة شهر T2 والمجموعة المعرضة لمدة شهرين T3 بالمقارنة مع مجموعة السيطرة T1. يستنتج من الدراسة الحالية ان التعرض المزمن للأشعة السينية تؤدي الى حصول تغييرات في المعايير الدموية ووجود تأثيرات مرضية في نسيج القلب بالإضافة لزيادة في التعبير الجيني P53 لنسيج القلب.

Summary

The present study was conducted to investigate the chronic effect of X-ray on the heart. Randomly divided 30 female albino rats into three groups (10 animals / group) for a period of two consecutive months , considered the first group (T1) as a group control and the second group (T2) exposed to X-rays (80 KV) within one meter / day for a month as well as is the case for the third group (T3) were subjected to a period of two months , After collecting blood samples before and after the experiment was observed significant decrease ($0.05 > P$) in RBC, PCV, Hb and platelet, and high moral ($0.05 > P$) in WBC in the exposed group for a month T2 and the group exposed for two months T3 compared with the control group T1, As for changes in sick textile Heart observed incidence of alienation in the epithelial cell layer and crash cartilage glass and congestion hematoma in rats exposed group for a month T2 and for two months T2 compared with the control group T1, as genetic study indicated increased gene expression for gene P53 to the fabric of the lung in animals exposed for month and T2 Group exposed for two months T3 compared with the control group T1.

Inferred from the current study that chronic exposure to x-rays lead to get changes in the standards and the presence of Doll satisfactory effects in heart tissue as well as an increase in the P53 gene expression of cardiac tissue .

المقدمة :

شهدت البلاد خلال الخمسين عام الماضية ازديادا ملحوظا في حجم التلوث الإشعاعي فبعد ان كانت مصادر الإشعاع مقصورة على الأشعة الكونية والمصادر الطبيعية الأخرى مثل الأشعة المنبعثة من الصخور والأشعة المنبعثة من العناصر الطبيعية تدخلت يد الإنسان لتضيف كماً هائلا من الإشعاعات التي تعمل على تلويث الهواء والماء والغذاء من خلال صناعة القنابل النووية والنفايات المشعة (المعادن الثقيلة) (1) .

استخدمت الأشعة السينية كما تستخدم النظائر المشعة الطبيعية دون الوعي بمخاطر الإشعاع، لهذا فقد تعرض عدد كبير من العاملين الأوائل بالإشعاع للحروق الإشعاعية ولأمراض متعددة من أهمها مرض السرطان وبلغ عدد الهالكين منهم بسبب الإشعاع 336 فردا، وقد قامت العديد من الهيئات واللجان الوطنية والدولية بدراسة التأثيرات الاحيائية للإشعاع الذري (2) اذ بدأ الانسان يدرك اهمية هذه الإشعاعات وتأثيرها في الكائنات الحية ومحاولة الاستفادة منها في شتى المجالات (3).

ان استخدام الأشعة في علاج الأشخاص الذين يعانون من امراض معينة تتطلب هذا النوع من العلاج (4) وتسليطها على منطقة جدار الصدر سوف تظهر عليهم إختلالات بالجهاز التنفسي مثل الضمور في حجم الرئتين و تليف الأنسجة الرئوية Fibrosis (5) وأيضا نشوء التهابات الأنسجة الرئوية أو الالتهاب الرئوي Pneumonitis (6) ، ومن الجدير بالذكر أن تعقيدات الجهاز التنفسي يمكن أن تظهر حتى بعد مرور عدة سنوات عقب التعرض للإشعاع (7) .

مع تطور التطبيقات العلمية للأشعة السينية وانتشار استخدامها في المراكز الصحية وخاصة في التطبيقات الطبية المستخدمة في التشخيص والعلاج الإشعاعي والتعقيم لذلك كان لا بد من معرفة مخاطر الأشعة السينية على جسم الانسان، حيث أشار (8) أي انها تساهم في تشخيص العديد من الامراض و لا يمكن الاستغناء عنها وبسبب ظهور أعراض متأخرة على الأشخاص العاملين في مجال الأشعة السينية في المراكز الصحية والمستشفيات الناتج من التعرض المستمر وبجرع مختلفة لذا هدفت هذه الدراسة الى دراسة تأثير التعرض للأشعة السينية على المعايير الدمية مثل عدد كريات الدم الحمراء RBC ، عدد كريات الدم البيضاء WBC ، الهيموغلوبين Hb، الصفائح الدموية Platelet ومعدل حجم مكداس الدم PCV، ودراسة وراثية باستخدام تقنية الـ (Real time) لمعرفة مستوى تأثير التعرض المزمن للأشعة السينية X-Ray على الجين (P53) في نسيج الرئة في إناث الجرذان البيضاء.

المواد وطرائق العمل

استخدمت في هذه الدراسة (15) من إناث الجرذان البيضاء التي تم الحصول عليها من مختبر كلية الصيدلة – جامعة كربلاء بمعدل اعمار تتراوح بين(8-9) أسابيع واوزان تتراوح ما بين (200-250)غم وقسمت هذه الحيوانات الى ثلاثة مجاميع المجموعة الأولى هي مجموعة سيطرة (T1) تركت دون تعريض للأشعة السينية أما المجموعة الثانية (T2) فعرضت يوميا للأشعة السينية بدرجة (80) kv لمدة شهر واحد فقط والمجموعة الثالثة (T3) عرضت يوميا للأشعة السينية بدرجة (80) kv ولمدة شهرين متتاليين على بعد متر واحد.

تم تخدير الحيوانات وسحب الدم من القلب مباشرة عن طريق طعنة القلب للحصول على اكبر كمية من الدم لغرض اجراء الفحوصات الفسلجية الدموية لقياس حجم مكداس الدم (PCV) (9) ، وتركيز الهيموغلوبين (HB) حسب الطريقة الموصوفة من قبل (10)، واعداد خلايا الدم الحمراء (RBC) (11) واعداد خلايا الدم البيض الكلية (WBC) وقياس الصفائح الدموية (platelete) حيث تم حساب أعداد الصفائح الدموية حسب الطريقة الموصوفة من قبل (12).

التقطيع النسيجي:

تم تحضير المقاطع النسيجية حسب الطريقة الموصوفة من قبل (13).

الدراسة الجزيئية:

* فحص تفاعل سلسلة البلمرة في الوقت الحقيقي الكمي (الاستنساخ العكسي)

(Quantitative Reverse Transcription Real-Time PCR (RT-qPCR)

تم اجراء فحص تفاعل سلسلة البلمرة في الوقت الحقيقي الكمي (الاستنساخ العكسي) وذلك لقياس المستويات الكمية الحمض النووي المرسل (mRNA) لدلالة على مقدار التعبير الجيني Gene expression لجين (P53) المسؤول عن الاصابة بمرض السرطان في عينات دم حيوانات التجربة، وكذلك تم استخدام جين ال (B-actin) كجين منظم قياسي لحساب التعبير الجيني حيث تم اجراء هذا الفحص حسب الطريقة الموصوفة من قبل (14) وتم تحليل البيانات الناتج من هذا الفحص من خلال استخدام طريقة livak method الموصوفة من قبل (15).

التحليل الاحصائي statistical analysis

تم تحليل النتائج احصائياً وفق التصميم العشوائي الكامل (CRD) لدراسة تأثير المجاميع والمدة في الصفات المدروسة وقررت الفروق بين المتوسطات باختبار اقل فرق معنوي (LSD) .(16).

النتائج والمناقشة

يلاحظ من الجدول (1) إن هنالك انخفاض معنوي ($P < 0.05$) في معدل اعداد كريات الدم الحمراء RBC والهيموغلوبين Hb ومعدل حجم مكداس الدم PCV وزيادة في كريات الدم البيضاء WBC واعداد الأقرص الدموية Platelets في مجموعة الحيوانات المعرضة للأشعة السينية X-ray وبشكل مزم مع مقارنة مع مجموعة السيطرة وكانت هذه النتيجة متفقة مع (17) (18) (19) .

ان سبب الزيادة في اعداد كريات الدم البيضاء WBC هو حدوث انقسام او انشطار غير طبيعي Abnormal Fission في الخلايا المسؤولة عن تكوين الـ WBC في نخاع العظم مؤديا الى كثرة انتاجها وهذا بدوره يؤثر على إنتاجية الخلايا المولدة

لكريات الدم الحمراء وبالتالي سوف يؤدي الى قلة تركيز الهيموغلوبين (20)، أما سبب التغيير في اعداد كريات الدم البيضاء WBC وكريات الدم الحمراء RBC هو الخلل الحاصل في مستوى انتاجها من قبل نخاع العظم Bone marrow (21)

الجدول (1) تأثير التعرض المزمن لأشعة X-Ray على بعض المعايير الدموية في إناث الجرذان البيضاء.

المعايير المعاملات	الهيموغلوبين Hb غم/100مل	معدل حجم مكداس الدم %P.C.V	الصفائح الدموية Platelets	كريات الدم الحمراء R.B.C	كريات الدم البيضاء W.B.C
T1	A 11.30 ±0.39	A 37.00 ±1.14	A 357.20 ±18.40	A 6.82 ±0.12	A 7.54 ±0.16
T2	B 9.46 ±0.30	BC 31.40 ±0.92	A 392.80 ±47.04	B 6.00 ±0.14	B 8.44 ±0.16
T3	C 8.52 ±0.35	C 28.60 ±1.03	B 632.20 ±30.55	C 4.86 ±0.10	C 9.24 ±0.12
L.S.D _{0.05}	0.68	3.19	105.02	0.38	0.46

*المعدل ± الخطأ القياسي، n=5 / مجموعة .

الحروف الكبيرة المختلفة بالاتجاه العمودي تدل على وجود فروقات معنوية بمستوى (P<0.05).

T1= مجموعة حيوانات السيطرة .

T2= مجموعة الحيوانات المعرّبة للأشعة السينية لمدة شهر واحد .

T3= مجموع الحيوانات المعرّبة للأشعة السينية لمدة شهرين .

كما ذكر (22) إن نقص إنتاج الهيموغلوبين ومعدل مكداس الدم PCV وزيادة إنتاج كريات الدم البيضاء WBC والصفائح الدموية سوف يؤثر بشكل مباشر على نخاع العظم وقابليته على إنتاج الكريات الدموية خاصة كريات الدم الحمراء RBC.

أشار (23) ان عمل الجذور الحرة هو مهاجمة وتحطيم أغشية الكريات الحمراء وتأكسد الدهون الموجودة في هذه الأغشية وتؤدي الى تفكيكها او انحلالها ، وان هذا الضرر الذي يصيب الكريات الحمراء يتم من خلال اكسدة ايونات الحديد الثنائية الحديدوز (Fe+2) في جزيئة الهيموغلوبين وتحولها الى الحديدك (Fe+3).

ومن التفسيرات الأخرى التي تبين سبب النقصان الحاصل في تركيز الهيموغلوبين وال PCV وعدد كريات الدم الحمراء الناتج من التعرض للأشعة السينية X- Ray هي الدراسة التي اجراها (25) والتي بينوا ان تكوين الجذور الحرة من نوع H₂O₂ تعمل على اكسدة مجموعة الثايول (SH-) في سلسلة الببتايد Peptide chain الموجودة في بروتين الهيموغلوبين وتكوين أو اصر كبريتية ثنائية Disulfide bonds وتحويل (Fe+2) الى (Fe+3).

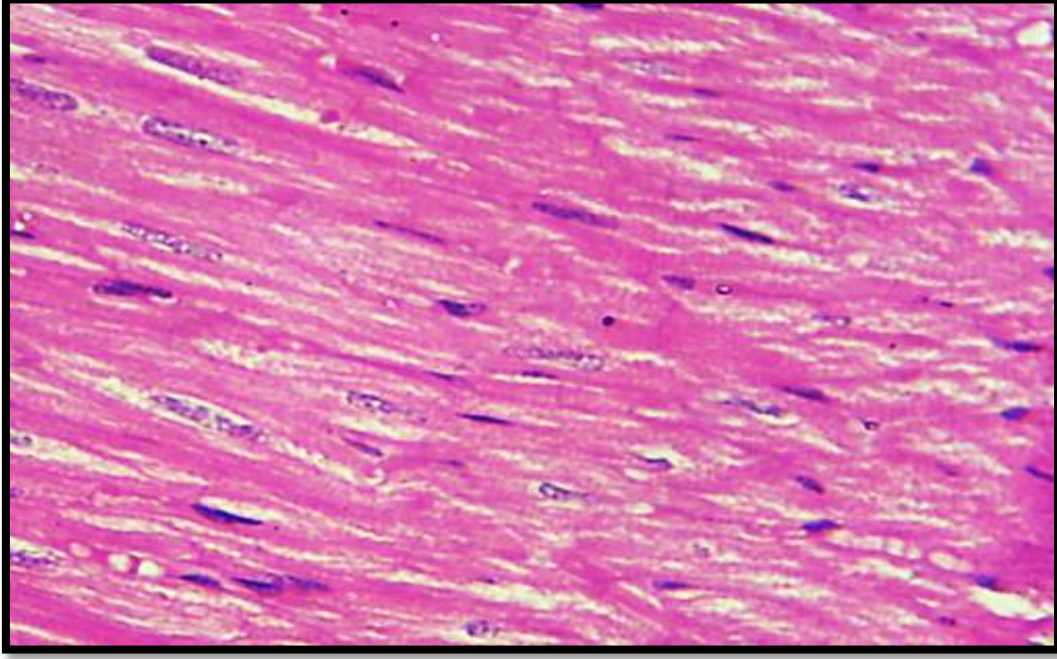
أن تعرض مساحات واسعة من نخاع العظم للإشعاع يؤدي الى خفض معدل كريات الدم الحمراء وخطر فقر الدم المتكون نتيجة لهذا النقص ، إضافة الى سهولة حدوث النزف وفقد القدرة على التأم الجروح او التمزقات بأي موضع من الجسم (26)، أما (27) فقد بينوا ان خلال فترة هبوط معدلات كريات الدم الى مستويات حرجة سوف يكون المريض عرضة لعدة مخاطر اهمها ضعف في الجهاز المناعي ، وان حدوث أي خلل في هذا الجهاز يؤدي الى سهولة انتقال العدوى المختلفة دون القدرة على مقاومتها (28).

أظهرت نتائج الدراسة الحالية ظهور حالة التهاب بسيط مع نزف دموي في المقطع النسجي لعضلة القلب بعد مرور شهر واحد من التعرض المزمن للأشعة السينية كما موضح في الصورة (2) بالمقارنة مع مجموعة السيطرة صورة (1) .

ويلاحظ في الصورة (3) مقطع نسجي لنسيج القلب الذي تم تصبغه بصبغة الهيماتوكسولين والايوسين، عند استمرار التعرض المزمن للأشعة السينية ولمدة شهرين متواصلين ظهرت حالة من الاحتقان الدموي الشديد Sever blood congestion في نسيج عضلة القلب إضافة الى حدوث النزف الدموي مقترنا مع ارتشاح التهابي Infiltration مع تليف واضح عند التصبغ بصبغة الترايكروم وظهور الخلايا الالتهابية مثلما موضح في الصورة (4 ، 5) وهذا يتفق مع (29) .

كما تبين وجود تحطم في طبقة الخلايا الطلائية للقصبه الهوائية ووجود الاحتقان الدموي في الغدد المخاطية وتحطم في الغضروف الزجاجي بشكل واضح وحدث الارتشاح الالتهابي وكما لوحظ في المقاطع النسجية للقصبه الهوائية المصبغة بصبغة الترايكروم ووجود الانسلاخ في طبقة الخلايا الطلائية مع وجود التليف Fibrosis والذي يعتبر من احد الامراض المتأخرة الذي يظهر التأثير المزمن من التعرض للأشعة السينية، فقد أشار (30) ان الايوانات الناتجة من التعرض المزمن للأشعة السينية سوف تعمل على زيادة الاجهاد التأكسدي الذي يعمل على زيادة الجذور الحرة Free radical حيث تقوم هذه الجذور بتحطيم جدران الخلايا الطلائية الموجودة في القصبه الهوائية وكذلك تقوم بالتأثير المباشر على نواة الخلايا خاصة المادة الوراثية الـ DNA مما ينتج عنها تلف للكروموسومات ومن ثم حدوث إعاقه في انقسام الخلايا وتلفها وتدميرها .

أما (31) فقد أوضحوا ان الاشعة السينية تؤثر على سلسلة العمليات التي يتم من خلالها فقدان الوظائف البيولوجية المهمة والتي بدورها تسيطر على جينات معينة وتفقدتها وظيفتها ، ومن العمليات الأخرى هو التحول في الخلايا Cell Transformation بسبب تلف الاغشية المكونة لها وحدث عملية اكسدة الدهون Lipid peroxidation ، وكأجراء احتياطي تقوم الخلايا بتحفيز جينات أخرى للسيطرة على هذا الضرر الحاصل حيث تعمل هذه الجينات على الموت المبرمج لهذه الخلايا المصابة .

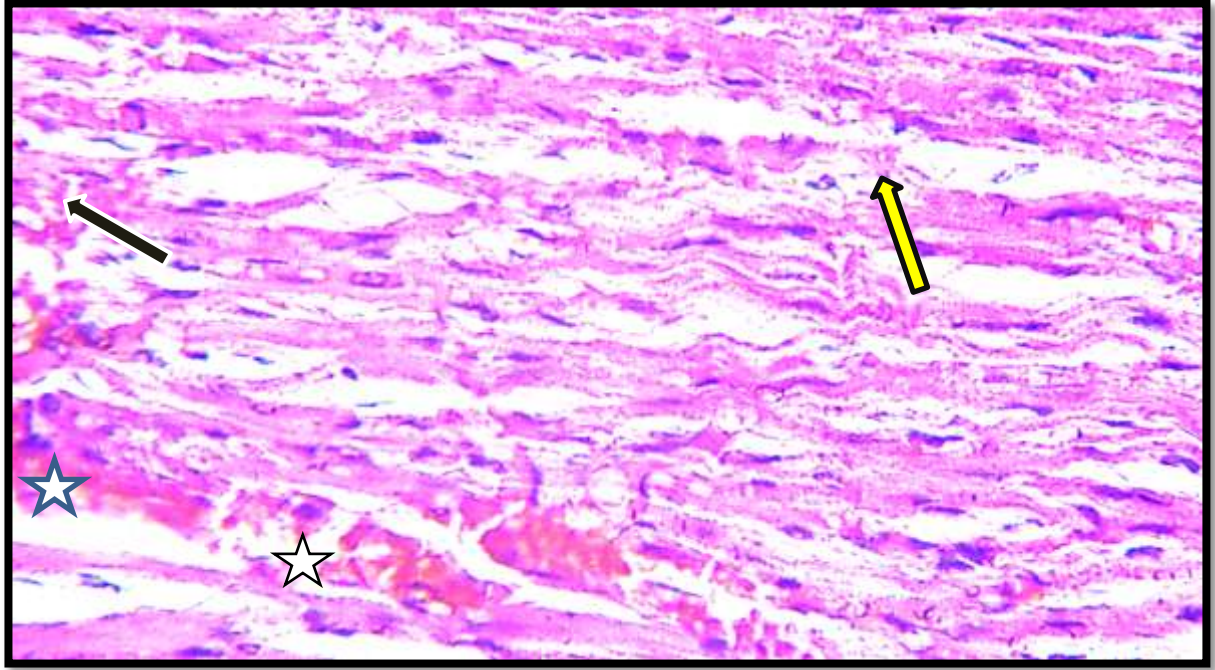


الصورة (1) : مقطع نسجي لنسيج من عضلة القلب لمجموعة حيوانات السيطرة (H & E 100X).

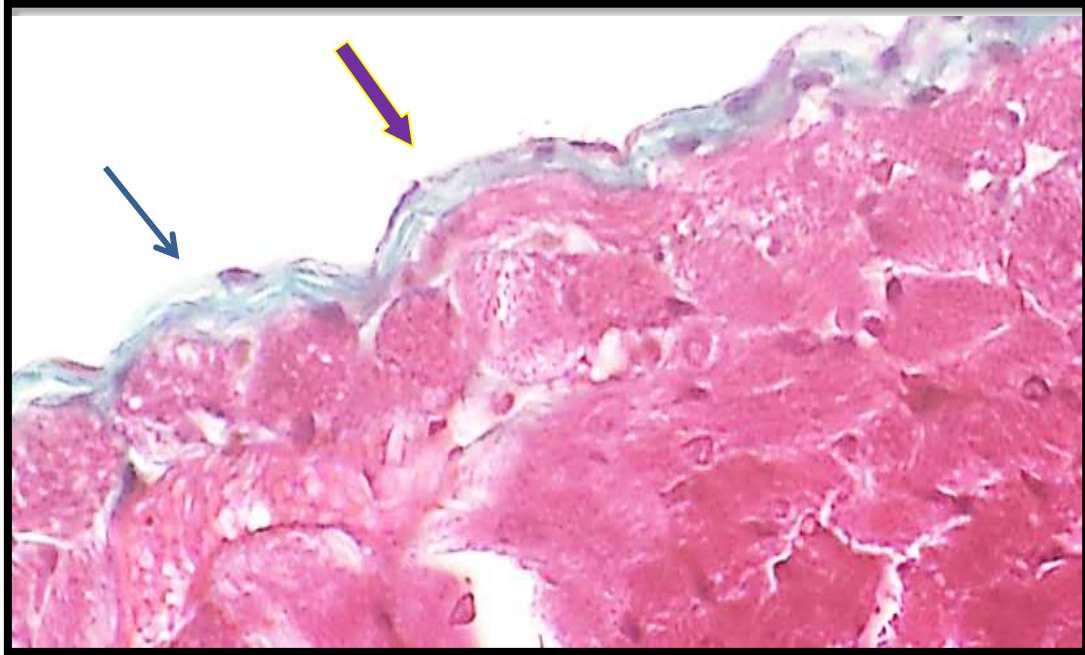


الصورة (2) : مقطع نسجي لنسيج القلب لمجموعة الجرذان المعرضة للأشعة السينية بجرعة 80 KV على بعد واحد متر ولمدة شهر

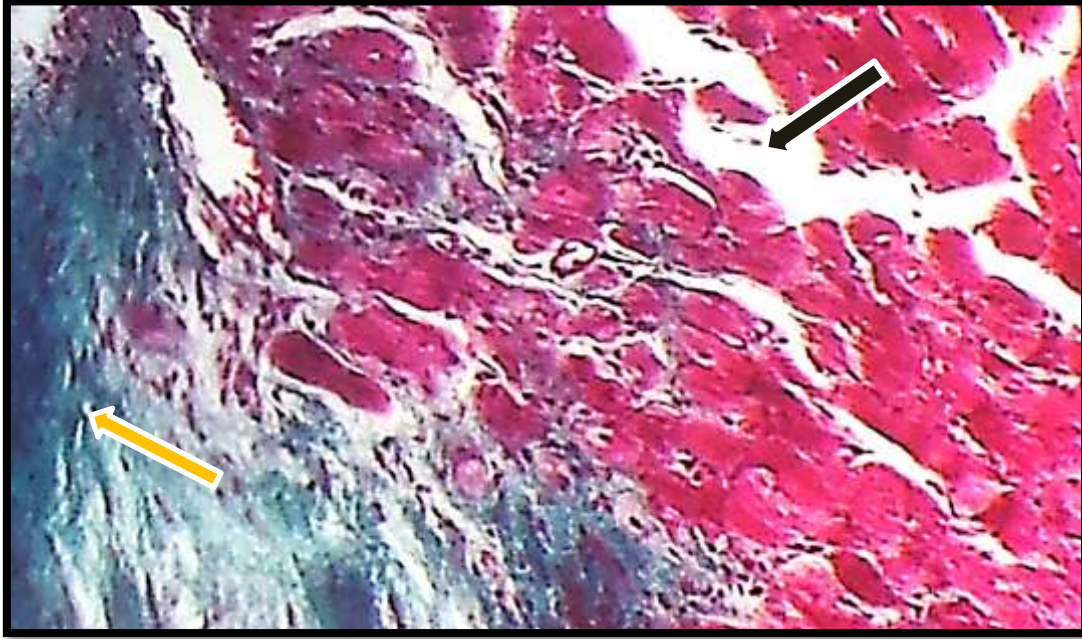
واحد حيث يلاحظ وجود النزف Haemorrhage ← ارتشاح التهابي بسيط Infiltration (H & E 40X). ←



الصورة (3) : مقطع نسجي لنسيج القلب لمجموعة الجرذان المعرضة للأشعة السينية بجرعة KV 80 على بعد متر واحد يوميا ولمدة شهرين يلاحظ النزف الدموي Haemorrhage ← واحتقان دموي Congestion ★ وتحطم الخلايا ←.(H & E 100X).



الصورة (4) : مقطع نسجي لنسيج القلب لمجموعة الجرذان المعرضة للأشعة السينية بجرعة KV 80 على بعد متر واحد يوميا ولمدة شهرين ويلاحظ وجود التليف في غشاء التامور → ووجود الخلايا الليفية Fibrocyte (Trichrome 100X). →



الصورة (5) : مقطع نسيجي لنسيج القلب لمجموعة الجرذان المعرضة للأشعة السينية بجرعة 80 KV على بعد متر واحد يومياً لمدة شهرين يلاحظ وجود التليف Fibrosis ← مع تحطم في الخلايا القلبية (Trichrome 100X). ←

التغيرات الجزيئية لجين P53 في أنسجة القلب

نتائج الفحص الجزيئي Molecular Techniques results

تم استخدام جهاز خاص للكشف عن الحمض النووي RNA المستخلص من العينات وهو الـ Nanodrop (spectrophotometer (THERMO. USA) وذلك من خلال تحديد تركيز الحمض النووي ng\ul RNA والثاني قياس نقاوة الحمض النووي RNA من خلال قراءة الامتصاصية عند طول موجي 260-280 nm.

نتائج التعبير الجيني في نسيج القلب Gene expression results in heart tissue

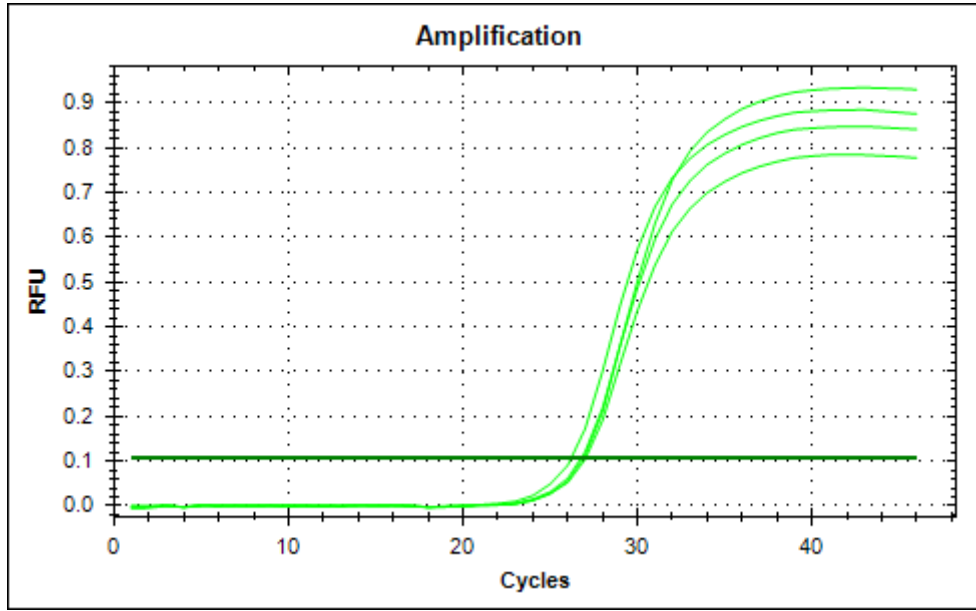
تم الحصول على نتائج التعبير الجيني لجين P53 المستخلص من نسيج القلب لمجموعة الجرذان المعرضة للأشعة السينية لمدة شهر واحد T2 والمعرضة لمدة شهرين T3 ومجموعة السيطرة T1 باستخدام فحص تفاعل سلسلة البلمرة في الوقت الحقيقي الكمي qRT-PCR.

تم إجراء العد النسبي Relative quantification باستخدام طريقة Livak Method ($2^{-\Delta\Delta CT}$) والتي تعتمد على عملية التصحيح (Normalization) باستخدام الجين المحافظ (B- Actin Housekeeping gene) لحساب التعبير الجيني (Gene expression) في جين P53 لمجموعة الحيوانات المعرضة للأشعة السينية T2 و T3 ومجموعة T1 في أنسجة القلب.

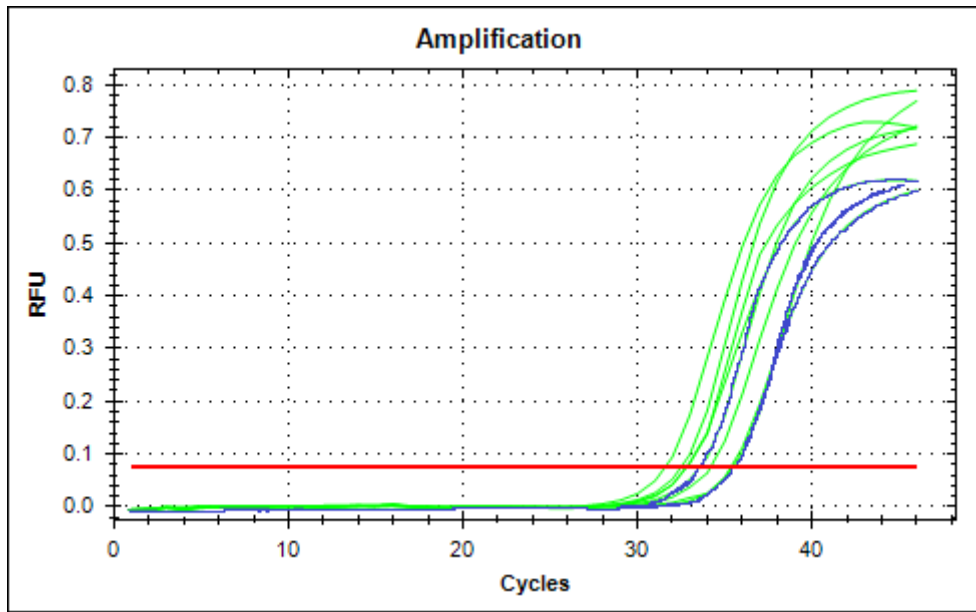
وتم تحليل قيم الـ qPCR CT value لكل جين من جينات الهدف مع استخدام قيم الـ CT value للجين المحافظ في كل معاملات التجربة ومجموعة السيطرة لتمام عملية تصحيح normalization في التعبير الجيني.

بينت نتائج التعبير الجيني للجينات المستخدمة في نسيج القلب وجود فروقات واضحة في مستويات التعبير الجيني في جين P53 لمجموعة الجرذان المعرضة للأشعة السينية X-Ray لمدة شهر واحد من التعريض T2 ولمدة شهرين T3 ومجموعة السيطرة T1، حيث أظهرت نتائج التعبير الجيني للجين المستخدم P53 في مجموعة T2 وجود ارتفاع واضح (تنظيم مرتفع UP regulation)، حيث كانت مرتفعة بمقدار (6.63 ± fold change) وكذلك ارتفاع في مجموعة الجرذان المعاملة في T3 بمقدار (16.17 ± fold change) مقارنة مع نتيجة التعبير الجيني لمجموعة السيطرة التي تعادل تعبير جيني حسب طريقة Livak بمقدار (1fold change) كما هو موضح في الجدول (2).

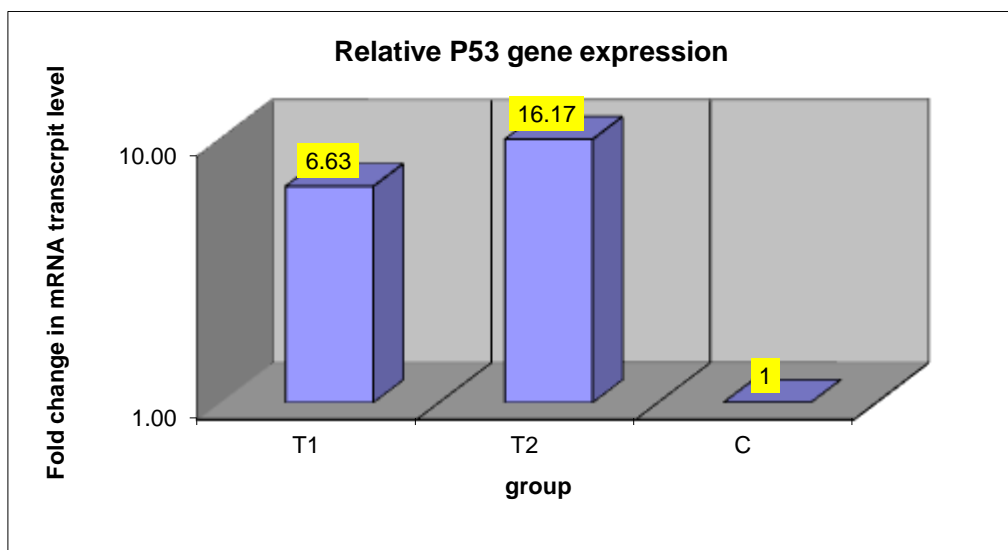
وأوضحت نتائج الدراسة الحالية للجين P53 وجود فرق معنوي ($P < 0.05$) واضح بين مجموعة الجرذان المعرضة للأشعة السينية المزمّن في T2 و T3 ومجموعة السيطرة T1 لنسيج القلب، شكل (1).



الشكل (1) : منحنى التضخم Amplification plot للعينات الجين المحافظ B-Actin gene في فحص qRT-PCR لنسيج القلب .



الشكل (2) : منحنى التضخم Amplification plot للعينات الجين p53 في فحص qRT-PCR حيث تمثل منحنيات اللون الاخضر عينات مكررات المعاملة واللون الأزرق عينات مكررات السيطرة.



الشكل (3): الشكل البياني التعبير الجيني النسبي Relative gene expression لجين (P53) لمجموعة الحيوانات المعرضة للاشعة السينية T2 و T3 نسبتا الى مجموعة السيطرة لنسيج القلب .

الملحق (1) : تحليل نتائج التعبير الجيني في نسيج القلب باستخدام طريقة ($2^{-\Delta\Delta CT}$ Livak method) للجين (P53)

Experimental replicate	CT P53	CT B-Actin	ΔCT (Test)	ΔCT (contr)	$\Delta\Delta CT$	Fold change ($2^{-\Delta\Delta CT}$)	Mean \pm St. error
T2	30.13	26.34	3.79	6.82	-3.03	8.15	6.63 \pm 0.62
T2	31.86	26.12	5.74	6.82	-1.08	2.11	
T2	31.18	26.73	4.45	6.82	-2.37	5.16	
T2	31.06	26.40	4.66	6.82	-2.16	4.47	
T3	29.44	26.65	2.79	6.82	-4.03	16.33	16.17 \pm 3.36
T3	30.80	26.48	4.32	6.82	-2.50	5.67	
T3	29.20	26.31	2.89	6.82	-3.93	15.28	
T3	29.81	26.48	3.33	6.82	-3.49	11.24	

T2 : Treatment for one month.

T3: Treatment for two month.

($2^{-\Delta\Delta CT}$ Livak method) as following: First, the CT of the target gene was normalized to that of the reference (ref) 16SrRNA gene, for both the test isolates and the control isolates group.

$$\Delta CT(\text{test}) = CT(\text{target, test}) - CT(\text{ref, test})$$

$$\Delta CT(\text{control}) = CT(\text{target, control}) - CT(\text{ref, control})$$

Second, the ΔCT of the test isolates were normalized to the ΔCT of the control:

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT(\text{test}) - \Delta CT(\text{calibrator})$$

References

1. Fajardo, L.F. ; Berthrong, M. and Anderson, R.E. (2001). Radiation Pathology. Oxford University Press., New York.
2. Stevens, G., Joiner, M., Joiner, B. et al., 1991. Early detection of damage following 8336 bilateral renal irradiation in the mouse. *Radiother. Oncol.* 20, 124-131.
3. Ma, Y.; Nie, H.; Sheng, C.; Chen, H.; Wang, B.; Liu, T.; Shao, J.; He, X.; Zhang, T.; Zheng, C.; Xia, W. and Ying, W. (2012). Roles of oxidative stress in synchrotron radiation X- ray induced testicular damage of rodents. *J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* 4(2):108-114.
4. Bentzen, S.M.; Skoczytas, J.Z and Bernier, J. (2000). Quantitative clinical radiobiology of early and late lung reactions. *Int. J. Radiat. Biol.* 76(4):453-462.
5. Aleman, B.M. ; Van den Belt-Dusebout, A.W. Klokman, W.J. ; Van't Veer, M.B.; Bartelink, H. and van Leeuwen, F.E. (2003). Long-term cause-specific mortality of patients treated for Hodgkin's disease. *J. Clin. Oncol.* 21(18):3431-3439
6. Arpin, D.; Perol, D.; Blay, J.Y.; Falchero, L.; Claude, L.; Vuillermoz-Blas, S.; Martel-Lafay, I.; Ginestet, C.; Alberti, L.; Nosov, D.; Etienne-Mastroianni, B.; Cottin, V.; Perol, M.; Guerin, J.C.; Cordier, J.F. and Carrie, C.. (2005). Early variations of circulating interleukin-6 and interleukin-10 levels during thoracic radiotherapy are predictive for radiation pneumonitis. *J. Clin. Oncol.* (23):8748-8756.
7. Bowers, D.C. ; McNeil, D.E.; Liu, Y. ; Yasui, Y.; Stovall, M.; Gurney, J.G.; Hudson, M.M.; Donaldson, S.S.; Packer, R.J.; Mitby, P.A.; Kasper, C.E.; Robison, L.L. and Oeffinger, K.C.. (2005). Stroke as a late treatment effect of Hodgkin's Disease: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *J. Clin. Oncol.* 23(27):6508-6515
8. Guskova, A.K., Gusev, L.A., Okladnikova, N.D., 2002. Russian concept of chronic 7220 radiation disease in man. *Br. J. Radiol. Suppl.* 26, 19-23.
9. Hillman ,R.S.&Ault ,K.A.(2002). *Haematology in clinical practice* .3rd ed ., McGraw - Hill , companies , New York .
10. سود، رمينك (1992). تقنية المختبر الطبي : طرائق وتفسيرات. ترجمة د.صالح خميس حيدر ، د.عبد الرزاق جبار، د.ياقر عبيس. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي- بغداد – العراق.
11. Gregg, L. V. (2000). *Hematology Techniques And Concepts for Veterinary Techniques*. 1st (ed). Iowa State Univ. Press. 97-100.
12. فرهاد، اكرم داو ودزقنبر ،سروي علي .(1989).التقنية الطبية.وزارة التعليم العالي والبحث .مؤسسة المعاهد الفنية.دار التقني للطباعة والنشر.ص 45-66
13. Presnell, J.K. and Schreibman, M.P. (1997). *Humason's animal tissue techniques*, 5th edn., John Hopkins Univ. Press, Baltimore, 546.
14. Prasanthi, J. R. P.; Larson, T.; Schommer, J. and Ghribi, O. (2011). Silencing GADD153/CHOP Gene Expression Protects against Alzheimer's Disease-Like Pathology Induced by 27-Hydroxycholesterol in Rabbit Hippocampus. *PLoS One.* 6(10).
15. Livak, J. K., Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_t$ method, *Methods* 25 p402-408.
16. SAS. 2004. *SAS Users Guide for personal Computers*. Release 6.12.SAS institute Inc. NC. USA.
17. Al- Nia'emi, S.H.; Yacoob, M.B.; Younis, N. T. (2001). Effect of radio- Frequencies on some blood contents and enzymes in rats. *J. Educ. Sci.*, 53, 73- 85.
18. Hashem, M. A. and El- Sharkawy, N. I. (2009). The effects of low electromagnetic field and lead acetate combination on some hemato- biochemical and immunotoxicological parameters in mice. *Turk. J. Hematol.*, 26:181- 189.
19. Abdel Aziz, H.; Shabat, M.; Khitam, E.; Osman, A. (2010). Effect of EMF on body weight and blood indices in Albino rats and the therapeutic action of vitamin C, E. *Rmanian J. Biophys.*, 20, 235- 244.

20. Seeley. R. R.; Stephens, T. D.; Tase, P. (1992). "Anatomy physiology". 2nd ed. Mosby- Year Book. Inc. USA.
21. Jandova, A.; Mhamdi, M.; Nedbalova, M.; Cocek, A.; Trojan, S.; Dohnalova, A.; Pokorny, J. (2005). Effects of magnetic field (0.1) and (0.05) mT on leukocyte adherence inhibition. *Electro. Bio. Med.*, 24, 283- 292.
22. Coskun, H.; Ozlem, Er.; Tanriverdi, F.; Altinbas, M. (2003). Hypereosinophilia as a preclinical sign of tongue squamous cell cancer in a gastric cancer patient with complete remission. *Turk. J. Hametol.*, 20, 107- 110.
23. Christopher, M.; White, J.; Eaton, J. (1990). Erythrocyte pathology and mechanisms of Heinz body- mediated hemolysis in cats. *Vet. Pathol.*, 27, 299- 310.
24. Desnoyers, M. (2000). Anemias associated with Heinz bodies. "Schalm's Veterinary hematology". 5th ed. Feldman B. F., Zinkl J. G., Jain N. C. Baltimore, Lippincott Williams and wilkins, PP. 178- 180.
25. Courtade, M., Caratero, A., Jozan, S., et al., 2001. Influence of continuous, very low-dose 6909 gamma-irradiation on the mouse immune system. *Int. J. Radiat. Biol.* 77, 587-592.
26. Chen, J. (2004). Senescence and functional failure in hematopoietic stem cells. *Experimental Hematology* 32(11):1025-1032.
27. Akleyev, A.V. and Varfolomeyeva, T.A. (2007). The state of hemopoiesis under long-term radiation exposure of bone marrow in residents of the Techa riverside villages. *Radiation Biology. Radioecology* 47(3):307-321.
28. UNSCEAR, 2008. Effects of ionizing radiation. Annex D: Effects of ionizing radiation on the immune system. In: United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. Report to the General Assembly. New York.
29. Pischon , T. ; Girman, C. ; Saks, F. ; Rifai, N. and Rimm, E. (2005) .Non-high-density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein B in the prediction of coronary heart disease in men . *Circulation*, 112(22):3375-3383.
30. Brooks A., Bao S., Rithidech K., couch LA. And Barby LA.(2001). Relative effectiveness of X-Ray radiation for the induction of cytogenetic damage in vivo. *Radiat Res.* Feb; 155(2): 353 – 9.
31. Jean –Luc Poncy, Carole K., Francoisee T. and Isabelle B. (2002). In vitro radiation – induced effects on Rat tracheal Epithelial cells, II. Different preneoplastic cell transformation. *J. Radiat. Res.*, 43,35 – 42.