

การศึกษาถึงฤทธิ์ เจริงพิษของแคด เมียมคลอไรด์  
ที่มีต่อ เอ็มบริโอของหนูถีบจักรซึ่งอยู่ในระยะหลังจากฝังตัวกับผนังมดลูก



นายวิโรจน์ สุ่มใหญ่

วิทยุภณนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา เกสัชศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชา เกสัชวิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

พ.ศ. ๒๕๒๗

ISBN 974-563-371-2

013143

17377712

STUDY ON THE TOXICITY OF CADMIUM CHLORIDE  
IN THE POSTIMPLANTED MOUSE EMBRYO

Mr. VIROJ SUMYAI

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Pharmacy

Department of Pharmacology

Graduate School

Chulalongkorn University

1984

Thesis Title. Study on the Toxicity of Cadmium Chloride in the  
Postimplanted Mouse Embryo.

By Mr. Viroj Sumyai

Department of Pharmacology

Thesis Advisors. Assistant Professor Withaya Janthasoot

Assistant Professor Pornpen Pramyothin Ph.D.



Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in  
Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree.

.....*S. Bunnag*..... Dean of Graduate School  
(Associate Professor Supradit Bunnag, Ph.D.)

Thesis Committee

.....*Vilailag Im-Udom*..... Chairman  
(Associate Professor Vilailag Im-Udom, Dr. en Pharm.)

.....*Prasan Dhummaupakorn*..... Member  
(Associate Professor Prasan Dhumma-Upakorn, Ph.D.)

.....*Pornpen Pramyothin*..... Member  
(Assistant Professor Pornpen Pramyothin, Ph.D.)

.....*Withaya Janthasoot*..... Member  
(Assistant Professor Withaya Janthasoot, M.Sc.)

Copyright of Graduate School, Chulalongkorn University.

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การศึกษาถึงฤทธิ์ เชิงพิษของแคดเมียมคลอไรด์ที่มีต่อ เอ็มบริโอของหนูถีบจักร  
ซึ่งอยู่ในระยะหลังจากฝังตัวกับผนังมดลูก

ชื่อนิสิิต นายวิโรจน์ ลุ่มใหญ่

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์วิทยา จันทสุตร

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พรเพ็ญ เปรมโยธิน

ภาควิชา เกษัชวิทยา

ปีการศึกษา ๒๕๒๖



### บทคัดย่อ

การศึกษาถึงความ เป็นพิษต่อ เอ็มบริโอของแคดเมียมคลอไรด์ได้กระทำกับหนูถีบจักรสีขาว พันธุ์สวิส ซึ่งการทดลองในหลอดแก้วเพื่อตรวจสอบผลที่เกิดกับ เอ็มบริโออันเนื่องมาจากความเป็นพิษ โดยตรงของแคดเมียมคลอไรด์ เอ็มบริโอของหนูถีบจักรพร้อมไข่แดงได้รับการผ่าแยกออกมาจาก มดลูกในวันที่ ๔ ของการตั้งครรภ์แล้วนำไปเลี้ยงให้เจริญต่อเป็นเวลา ๔๔ ชั่วโมงในอาหารเลี้ยง ตัวอ่อนที่มีแคดเมียมคลอไรด์ (๐.๕-๓.๐ ไมโครโมลาร์) ผลสมอยู่ พบว่ามีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ของการเจริญเติบโตควบคู่ไปกับความผิดปกติทางโครงสร้างของร่างกายเกิดขึ้นกับเอ็มบริโอ ลักษณะ ผิดปกติของ เอ็มบริโอที่เด่นชัดที่สุดคือเกิดการไม่เชื่อมปิดของนอร์ลทิวบ์บริเวณกระโหลกศีรษะและการ เจริญบริเวณสมองส่วนปลายมีน้อยกว่าปกติ ความผิดปกติอันเนื่องมาจากแคดเมียมคลอไรด์ที่เกิดขึ้นนี้ จะเกิดขึ้นที่ระดับความเข้มข้นของแคดเมียมคลอไรด์ซึ่งไม่ทำให้เกิดความผิดปกติกับระบบหมุนเวียน โลหิตของไข่แดงที่สัง เกตได้ สักย เกี่ยวกับพิษต่อ เอ็มบริโอของแคดเมียมคลอไรด์ในตัวสัตว์ทดลอง ที่มีชีวิตได้รับการทดสอบในหนูถีบจักรสีขาวพันธุ์สวิสหลังจากได้รับแคดเมียมคลอไรด์ฉีดเข้าภายใน ช่องท้องหนึ่งครั้งในขนาด ๔ ม.ก.ก. ในวันที่ ๗, ๗.๕ หรือ ๘.๕ ของการตั้งครรภ์ แคดเมียมคลอไรด์ไม่ทำให้เกิดความผิดปกติกับสัตว์ทดลองตัวแม่ที่ตั้งครรภ์ การสูญเสีย เอ็มบริโอที่ฝังตัวแล้วใน สัตว์กลุ่มทดลองจะสูงกว่าในสัตว์กลุ่มควบคุม เมื่อสัตว์ทดลองตัวแม่ที่ตั้งครรภ์ได้รับการฉีดแคดเมียมคลอไรด์ให้ในวันที่ ๗ ของการตั้งครรภ์ ลูกที่เกิดจากแม่ที่ฉีดแคดเมียมคลอไรด์จะมีขนาดเล็กกว่าลูกที่เกิด จากแม่ในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ลูกซึ่งเกิดจากแม่ที่ได้รับแคดเมียมคลอไรด์จะมีความวิรูปหรือผิดส่วน เกี่ยวกับโครงกระดูกและรูปร่างภายนอกปรากฏให้เห็น การเกิดวิรูปทางรูปร่างของลูกสัตว์จากกลุ่มทดลองจะมีมากกว่าจากกลุ่มควบคุม เมื่อสัตว์ทดลองตัวแม่ที่ตั้งครรภ์ได้รับการฉีดแคดเมียมคลอไรด์ให้

ในวันที่ ๗ หรือ ๗.๕ ของการตั้งครรภ์ ลักษณะวิรูปทางรูปร่างที่พบคือ ลูกสัตว์ที่เกิดมาจะมีสมองอยู่นอกกระดูกศีรษะ (exencephaly) และตาไม่ปิด การเกิดวิรูปทางโครงกระดูกของลูกสัตว์จากกลุ่มทดลองจะมีมากกว่าจากกลุ่มควบคุม เมื่อสัตว์ทดลองตัวแม่ที่ตั้งครรภ์ได้รับการฉีดแคดเมียมคลอไรด์ ในวันที่ ๗.๕ หรือ ๘.๕ ของการตั้งครรภ์ ลักษณะวิรูปของโครงกระดูกที่พบคือกระดูกซี่โครงหลอมรวมกัน (fuse ribs) กระดูกซี่โครงสั้นกว่าปกติ (short rib) กระดูกซี่โครงขาดหายไป (missing rib) กระดูกซี่โครงแตกแขนง (bifurcated rib) กระดูกซี่โครงไม่เจริญเต็มที่ (rudimentary and flying rib) กระดูกโค้งของข้อกระดูกสันหลังหลอมรวมกัน (fused vertebral arches) กระดูกโค้งของข้อกระดูกสันหลังหายไปครึ่งซีก (hemivertebral arch) และกระดูกศีรษะเจริญเป็นกระดูกแข็งช้ากว่าปกติ (poorly ossified skull) การศึกษา ลูกสัตว์ทดลองภายหลังเกิดแสดงให้เห็นว่าไม่มีความผิดปกติในการทำหน้าที่ของอวัยวะเกิดขึ้นกับ ลูกสัตว์ทดลองที่เกิดจากแม่ที่ฉีดแคดเมียมคลอไรด์ในวันที่ ๘.๕ ของการตั้งครรภ์

ผลการทดลองต่าง ๆ ในหลอดแก้วที่ได้สนับสนุนสอดคล้องกับผลการศึกษาในร่างกายที่มีชีวิต ซึ่งแสดงถึงฤทธิ์โดยตรงของแคดเมียมคลอไรด์ที่ทำให้เกิดบกพร่องของพัฒนาการเจริญเติบโตทางกายของ เอ็มบริโอในครรภ์ของหนูถีบจักร.

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis Title Study on the Toxicity of Cadmium Chloride in the  
Postimplanted Mouse Embryo.

Name Mr. Viroj Somyai

Thesis Advisor Assistant Professor Withaya Janthasoot  
Assistant Professor Pornpen Pramyothin Ph.D.

Department Pharmacology

Academic Year 1983



#### ABSTRACT

An embryotoxicity study on cadmium chloride was carried out in Swiss Albino mice. The *in vitro* experiments were performed to investigate the direct toxic effects of cadmium chloride on the developing embryo. Mouse's embryo within their yolk-sacs were explanted from the uterus on gestation day 8 and cultured in the presence of cadmium chloride (0.5-3.0  $\mu\text{M}$ ) for 48 hours. There was significant reduction in growth accompanied by a variety of dysmorphogenic effects. Non-closure of the cranial neural tube region and stunted telencephalic hemispheres were most evident. These were observed at concentrations of cadmium chloride with no apparent adverse effects on the yolk sac circulatory system. The *in vivo* embryotoxic potential of cadmium chloride was evaluated in Swiss Albino mice after intraperitoneal administration of a single dose of 4  $\text{mg kg}^{-1}$  on gestation day 7, 7.5 or 8.5. Significant effects of cadmium chloride were not observed on the dams. Resorption of implants was higher in the treated animals than controls when dams were treated

on day 7 of gestation. Fetuses from dams given cadmium chloride were significantly smaller than those from controls. Skeletal and gross malformations were found in fetuses born to mothers which received cadmium chloride. The incidence of gross malformations were higher in treated animals than controls when dams were treated on day 7 or 7.5 of gestation. Major gross malformation were exencephaly and open eyes. The incidence of skeletal malformations were higher in treated animals than controls when dams were treated on day 7.5 or 8.5 of gestation. Skeletal malformation were fused ribs, short rib, missing rib, bifurcated rib, rudimentary and flying rib, fused vertebral arches, hemivertebral arch and poorly ossified skull. Postnatal study revealed no functional impairment in fetuses born to mothers which were treated with cadmium chloride on day 8.5 of gestation.

Those *in vitro* effects appear to be comparable to the *in vivo* observations and suggest a direct teratogenic action of cadmium chloride on the developing mouse embryo.

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## ACKNOWLEDGEMENT

At this time I wish to express my thanks to my respected teachers, Ass. Prof. Withaya Janthasoot and Ass. Prof. Dr. Pornpen Pramyothin, for their able guidance, constant interest, encouragement, and advice during the course of this work.

Further, I am extremely grateful to Assoc.Prof.Dr. Vilailak Im-Udom, Head of department of Pharmacology, for her valuable suggestions and helpful discussions throughout the course of this study.

I am very much obliged to Assoc. Prof. Dr. Prasan Dhumma-upakorn for stimulating me to publish the results of this study, and for his valuable criticism of the manuscript.

My thanks are also extended to Dr. Beat P. Schmid and Dr.Sigrid Brüggemann for their valuable guidance and friendly collaboration at the section of Reproductive Toxicology, Preclinical Research Laboratory, Basel. I will remember our period of collaboration as a pleasant and fruitful one.

Finally, I gratefully acknowledge my indebtedness to Chulalongkorn University Graduate School for granting me partial financial support, to conduct this study.

ศูนย์เวชศาสตร์พิษวิทยา  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





## CONTENT

	Page
THAT ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	vi
ACKNOWLEDGEMENT.....	viii
CONTENT.....	ix
LIST OF TABLE.....	xiii
LIST OF FIGURE.....	xiv
ABBREVIATION AND SYMBOLS.....	xvii
CHAPTER	
I GENERAL REVIEW OF THE LITERATURE	
Introduction.....	1
Natural Occurrence of Cadmium.....	2
Industrial Use of Cadmium.....	2
Source of Environmental Pollution.....	3
Cadmium in Plants.....	4
Pathological Effects of Acute Intoxication .....	5
Pathological Effects of Chronic Intoxication .....	6
Cadmium and Testicular Changes.....	8
Cadmium and Ovarian Changes.....	9

Placental Transfer of Cadmium.....	9
Pathological Effects of Cadmium on the Placenta .....	11
Teratogenic Effects of Cadmium.....	13
Problem and Outline of Plan.....	14

## II MATERIALS AND METHODS

Materials.....	15
Methods.....	16
1. Feeding and Housing of Animals.....	16
2. Mating Procedure.....	16
3. Preparation of Culture Medium.....	16
4. Explantation of Mouse's Embryo.....	17
5. Experimental Part I: In Vitro Studies	
5.1 Assessment of Mouse's Embryonic Development in Utero.	17
5.2 Assessment of Mouse's Embryonic Development in Vitro.....	18
5.3 Determination of the Embryonic Lethality Doses of Cadmium Chloride.....	20
5.4 Assessment of Embryotoxic Potential of Cadmium Chloride in Vitro.....	21

6. Experimental Part II: In Vivo	
Studies .....	22
6.1 Determination of Adult	
Lethality Doses of Cadmium	
Chloride .....	22
6.2 Assessment of the Embryotoxic	
Potential of Cadmium Chloride	
in Vivo .....	23
7. Experimental Part III: Postnatal	
Studies .....	26
III RESULTS .....	29
Comparison of Swiss Albino Mouse Embryonic	
Development in Vivo and in Vitro .....	29
The Dose Response Curve for Embryo lethality	
of Cadmium Chloride in Mouse Embryos Cultured	
in Vitro .....	32
Effects of Cadmium Chloride on the Development	
of 8 Days Mouse Embryos in Vitro .....	32
The Adult Lethality Curve of Cadmium Chloride .....	40
The Embryotoxic Potential of Cadmium Chloride	
in Vivo .....	42
Postnatal Growth and Development of Fetuses	
Exposed to Cadmium Chloride in Utero .....	51

IV DISCUSSION.....	70
V CONCLUSION.....	76
REFERENCES.....	78
APPENDIX.....	87
VITA.....	101



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## LIST OF TABLES

Table	Page
1. Comparison of Swiss Albino Mouse Embryonic Development in Vivo and in Vitro.....	30
2. Pregnancy Outcome Following Intraperitoneal Administration of Cadmium Chloride to Pregnant Mice....	44
3. Effects of Maternal Exposure to Cadmium Chloride (4 mg/kg body weight), Intraperitoneal Injection, on Gross External and Skeletal Morphology of Fetuses...	48
4. First Appearance of Physical Features.....	67
5. The Results of Functional and Behavioral Test.....	69

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## LIST OF FIGURES

Figure	Page
1. (A) Photomicrograph of Unfixed in Utero Embryo of 33 Somites, Developmental Age 10 Days; (B) Photomicrograph of Unfixed Embryo Cultured for 48 hours in Vitro, Developmental Age 10 Days.....	31
2. The Embryonic Lethality Curve of Cadmium Chloride in 8 Days Mouse Embryos Maintained in Whole-Embryo Culture for 48 Hours.....	33
3. The Relationship Between Doses of Cadmium Chloride and Total DNA Contents of Embryos Maintained in Whole-Embryo Culture for 48 Hours.....	35
4. The Relationship Between Doses of Cadmium Chloride and Yolk Sac Diameters, Crown-Rump Lengths and Head Lengths of Embryos Maintained in Whole-Embryo Culture for 48 Hours.....	36
5. The Relationship Between Doses of Cadmium Chloride and Number of Somites and Morphological Score Points of Embryos Maintained in Whole-Embryo Culture for 48 Hours.....	38
6. Photomicrograph of (A) Controlled Embryo and (B) Embryo Treated for 48 Hours with 3.0 $\mu$ M Cadmium Chloride.....	39

7.	The Adult Lethality Curve of Cadmium Chloride in Pregnant Mice Following Single Intraperitoneal Administration of Cadmium Chloride on Day 8.5 of Pregnancy.....	41
8.	The Relationship Between Day of First Exposure to Cadmium Chloride and Absolute weight Gain of Dams During the Entire Period of Pregnancy.....	43
9.	The Relationship Between the Day of First Exposure to Cadmium Chloride and Crown-Rump Lengths of Viable Fetuses.....	46
10.	The Relationship Between Day of First Exposure to Cadmium Chloride and Weight of Fetuses and Placentae.....	47
11.	Lateral View of 18.5 Day Mouse Fetuses from Groups of Pregnant Mice Treated with 4 mg CdCl <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> on days 7.0 or 7.5 of Gestation.....	49
12.	Lateral View of 18.5 Day Mouse Fetuses from a Group of Pregnant Mice Treated with 4 mg. CdCl <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> on Day 8.5 of Gestation.....	50
13(A).	Distal Fused Ribs.....	52
13(B).	Proximal Fused Ribs.....	53
13(C).	Central Fused Ribs.....	54

13 (D).	Central & Distal Fused Ribs.....	55
14 (A).	Short Rib.....	56
14 (B).	Short Rib.....	57
15.	Missing Rib.....	58
16 (A).	Skull: Normal Ossification.....	59
16 (B).	Skull: Retarded Ossification.....	60
17.	Bifurcated Ribs.....	61
18.	Rudimentary and Flying Rib.....	62
19.	Fused Vertebral Arches.....	63
20.	Hemivertebral Arch.....	64
21.	Postnatal Weight Development of the Offsprings of Mice Exposed to Cadmium Chloride in Utero on Day 8.5 of Gestation.....	66





## ABBREVIATION AND SYMBOLS

a.c.	alternating current	mA	milliampere
p.m.	after noon	mm.	millimeter
a.m.	before noon	µg.	microgram
cm.	centimeter	%	percent
°c	degrees celsius	day <sup>-1</sup>	per day
e.g.	for example	m <sup>-3</sup>	per cubicmeter
g.	gram	g <sup>-1</sup>	per gram
Hz	hertz	ml <sup>-1</sup>	per milliliter
hrs.	hours	kg <sup>-1</sup>	per kilogram
i.p.	intraperitoneal	p.c.	post coitus
i.v.	intravenous	rpm.	revolutions per minute
km.	kilometer	<	less than
ml.	milliliter		
min.	minute		
mg.	milligram		
µM.	micromolar		

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย