مجلة ام سلمة للعلوم **مجلد 6(1) 2009**

تاثير المبيد Chlorothalonil في بعض مؤشرات الوراثة الخلوية للخلايا اللمفاوية للدم المحيطي للانسان

بشير اسماعيل عزاوي* ***ناهي يوسف ياسين*****
زهرة محمود الخفاجي** ***سرى نبيل حميد******

تاريخ قبول النشر 2008/9/2

الخلاصة:

شملت الدراسة تبيان تاثير تراكيز مختلفة من المبيد الفطري Chlorothalonil في بعض مؤشرات الوراثة الخلوية للخلايا اللمفاوية للدم المحيطي للانسان . استعملت التراكيز (0.1 و 0.5 و 5 و25 و 50) × 10^{-5} مولاري في بعض مؤشرات الوراثة الخلوية ، منها تحديد السمية الوراثية بحساب عدد التشوهات الكروموسومية لبعض انواعها ، وكذلك حساب النوى الصغيرة المستحثة بالمبيد ، اضافة الى دراسة السمية الخلوية بتحديد معامل انقسام الخلايا . اظهرت النتائج عن ان المبيد يؤدي الى زيادة التشوهات بزيادة التراكيز وبمعامل ارتباط موجب ($r = + 0.964$) وكانت التراكيز ذات فروق معنوية فيما بينها ($P<0.01$) . لوحظت الكسور الكروموسومية كمظهر عام في التراكيز 0.5 و 5 و 25 و 50 ، في حين خلت المعاملة بالتركيز 0.1 من أي نوع من التشوهات . ظهرت تشوهات من النوع الكروموسومات ثنائية المركز والكروموسومات الحلقية (1 ± 0.06) عند التركيز 25 وازدادت بشكل معنوي عند مضاعفة التركيز، فضلا عن ظهوراجزاء من الكروموسومات عديمة المركز عند التركيز العالي (50) .

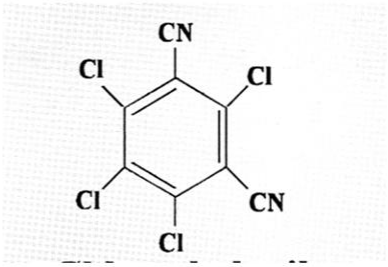
ازدادت نسبة النوى الصغيرة وبمعامل ارتباط موجب بين التراكيز وعدد الانوية الصغيرة ($r = + 0.901$) ولكنها لم تفرق عن معاملة السيطرة عند التركيز الاوطأ المستعمل (0.1) . ادت التراكيز المستعملة الى خفض معامل انقسام الخلايا ولكن ليس بشكل كبير وان كانت بعض القيم المسجلة تفرق معنويا عن معاملة السيطرة ($P<0.01$) .

كلمات مفتاحية: المبيدات، الوراثة الخلوية، الخلايا اللمفاوية، Chlorothalonil.

المقدمة

تستورد وزارة الزراعة العراقية الالاف المبيدات لغرض زيادة الانتاج الزراعي ، وتختلف انواع المبيدات ، فهي قد تكون مبيدات حشرية او مبيدات ادغال او مبيدات فطرية او غيرها من الانواع [1] ، ولكن لا تجرى عليها فحوص السمية او دراسة التاثيرات الجانبية . ومبيد Chlorothalonil من المبيدات الفطرية ينتمي الى مجموعة (Nitril) بالصيغة الجزيئية $C_2Cl_4N_2$ الموضح تركيبه في الشكل الاتي:

*معهد الهندسة الوراثية والتقنية الحيوية للدراسات العليا / جامعة بغداد / العراق
**المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية / الجامعة المستنصرية / بغداد – العراق
*** العنوان الحالي : قسم علوم الاغذية / كلية الزراعة / جامعة الموصل / العراق
**** قسم البايولوجي الجزيئي /مركز بحوث التقنيات الاحيائية / جامعة النهرين / بغداد– العراق
مستل من رسالة ماجستير للباحث الاول



اي مبيد من المبيدات الحاوية على التركيب الحلقي ، وتتصل بالحلقة الاساسية اربع ذرات من الكلور ومجموعتين من السايانيد ، ويستعمل في مكافحة البياض الدقيقي على العنب واللفحة المبكرة على الطماطة [1] .

تعد المبيدات من المطفرات القوية [2] وتؤدي الى حث السرطان وان كان الاخير يعد مرضا وراثيا الا ان النواحي الوراثية او الاسباب الوراثية لا تشكل الا 5 % من السرطانات ، الا ان الزيادة الكبيرة في السرطانات تنشأ من التداخل البيئي ومواده المضرة مع النواحي الوراثية [3] ، فقد سجل في عام 1995 ان هناك حوالي 80000 من المواد الكيماوية ، 10 % منها مواد مسرطنة والبقية لم تحدد سميتها ، اما في عام 1999 فقد سجلت ثلاث ملايين حالة تسمم بالمبيدات للانسان وان هناك 220000 حالة وفاة انسان تسجل سنويا نتيجة التعرض [3 و 4] . فضلا عن اكتشاف ارتباط حالات من السرطانات نتيجة التعرض للمبيدات .

لذلك تكاثفت الجهود لدراسة سميتها الوراثية ، ومثل هذه الدراسات قليلة في الدول النامية [5] وافضل الطرق هي تسجيل الواسمات الحيوية في الانسان باستعمال الخلايا اللمفاوية ، نظرا لامكانية اجراء الفحص ، كما ان الخلايا في حالة هجوع أي في مرحلة G_0 من دورة الخلية ، كما انها تتعرض للمواد السامة التي تصل الى الجسم بطرق مختلفة ، فضلا عن سهولة تحضير كروموسوماتها للدراسة [6 و 7] .

وهدفت الدراسة الحالية توضيح تاثير المبيد الفطري Chlorothalonil على بعض مؤشرات الوراثة الخلوية للانسان باستعمال لمفاويات الدم المحيطي وقياس مؤشرات السمية الوراثية مثل التشوهات الكروموسومية وتكوين النوى الصغيرة ودراسة معامل الانقسام كدليل على السمية الخلوية.

مواد البحث وطرائقه

اجريت الدراسة في المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية / الجامعة المستنصرية / بغداد – العراق .

مبيد Chlorothalonil : تم الحصول عليه من شركة Germany / Sengenta . استعمل المبيد بتراكيز (0.1 و 0.5 و 5 و 25 و 50) × 10^{-5} مولاري وهي التراكيز المستعملة لاختبار المواد السامة في مزارع الخلايا اللمفاوية.

مزارع الخلايا اللمفاوية : تم جمع 3 عينات من الدم المحيطي لاشخاص غير مدخنين ولا يتعاطون الكحول وغير متعرضين للمبيدات وزرعت النماذج وفق طريقة Fenech 1993 [8] وتم زراعة ست مكررات لكل نموذج واضيفت تراكيز المبيد المذكورة بعد 24 ساعة من نمو الخلايا ، ثم اكملت عملية الحضن لمدة 72 ساعة، واكمل تحضير الخلايا وصبغ كروموسوماتها ودراستها وفق الطريقة المذكورة .

تقنية التحزيم G – Banding technique : استعملت في صبغ الكروموسومات وفق طريقة Benn و Perle 1992 [9] لتحديد بعض التشوهات الكروموسومية .

فحص التشوهات الكروموسومية : تم الفحص المجهري باستخدام المجهر الضوئي باستعمال العدسة الزيتية (100 X) والعدسة العينية (16 X) حيث تم فحص كل كروموسوم بشكل تفصيلي وميزت الحزم لكل كروموسوم وحسب عدد التغيرات في (100) خلية في الطور الاستوائي (Metaphase) من انقسام الخلية واستخرج المعدل [10].

فحص معامل الانقسام : حسب من النسبة المئوية بين عدد الخلايا اللمفأوية المنقسمة الى عدد الخلايا الكلي المفحوصة إذ تم فحص (1000) لكل خلية ، وتم حساب معامل الانقسام باستخدام المعادلة الآتية :-

معامل الانقسام (MI) = (عدد الخلايا المنقسمة / العدد الكلي للخلايا)× 100

[11]

فحص وحساب الانوية الصغيرة : اجري الفحص وفق طريقة Tawn و Holdsworth 1992 [12]. حسب عدد الانوية الصغيرة في (1000) خلية لكل نموذج واستخرجت النسبة المئوية لها عن طريق المعادلة الاتية:-

النسبة المئوية للانوية الصغيرة = (عدد الخلايا التي تحتوي على الانوية الصغيرة / 1000) ×100

التحليل الإحصائي : حللت نتائج البيانات إحصائيا باستخدام التصميم العشوائي التام (CRD) وحسب النموذج الإحصائي الاتي :-

$$Yij = M + Ti + eij$$

حيث تمثل Yij : الصفة المدروسة

M : المتوسط العام

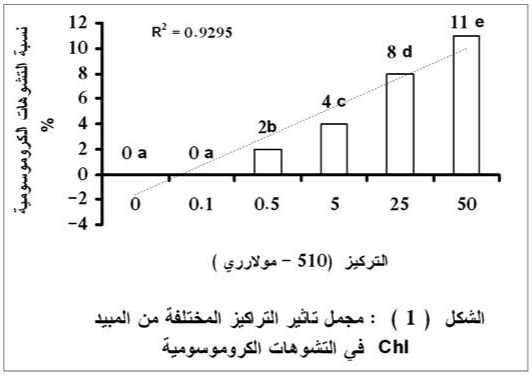
Ti : تاثير المعاملة (C = 1-5)

eij : الخطا العشوائي

باستخدم البرنامج الإحصائي الجاهز (SPSS) (SPSS ، 1998) . واختبرت معنوية الفروق بين المعاملات باستخدام اختبار دانكن متعدد المديات وتحت مستوى احتمالية (0.01) [13].

النتائج والمناقشة

نظرا لثبوت علاقة المبيدات بحالات السرطان المتزايدة نشطت الدراسات في مختلف انحاء العالم، وتركزت حول تحديد الواسمات الحيوية [4 و 7 و 5] ، ولعل اهم الواسمات هو تسجيل اعداد وانواع التشوهات الكروموسومية . لم تلاحظ تشوهات عددية في الكروموسومات ولكن التشوهات التي سجلت هي تشوهات تركيبية فقط ويوضح الشكل (1) تاثير التراكيز المختلفة من مبيد Chlorothalonil في حث التشوهات الكروموسومية في خلايا الانسان اللمفاوية المزروعة .



الشكل (1) : مجمل تاثير التراكيز المختلفة من المبيد Chl في التشوهات الكروموسومية

وتشير النتائج الى ان المبيد بالتركيز الواطيء (0.1×10^{-5} مولاري) لم يؤد الى حدث أي تشوهات ولكن بدأت نسب التشوهات بالزيادة مع زيادة التركيز ، مما يشير الى سميتها الوراثية [3] ، وقد وصلت الى اعلى القيم عند التركيز الاعلى المستعمل اذ بلغت 11 % ، وكانت الزيادة في عدد التشوهات مرتبطا ارتباط وثيقا بزيادة التركيز ($r = + 0.964$)، وقد اختلفت القيم في المعنوية فيما بين التراكيز ، ويوضح الجدول (1) انواع التشوهات الكروموسومية المسجلة في خلايا الدم اللمفاوية

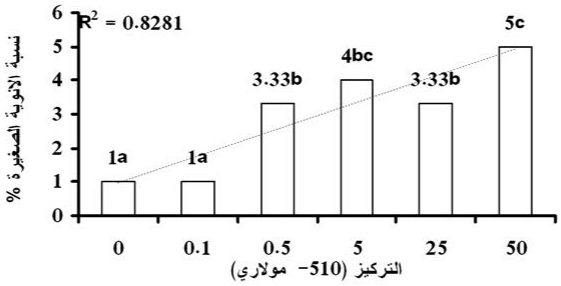
الجدول (1) تاثير التراكيز المختلفة من مبيد كلوروثيانيل (Chlorothionil) في استحثاث التشوهات الكروموسومية في خلايا الدم اللمفاوية

التشوهات الكروموسومية Chromosomal Aberration (CA)%								
التركيز $X\ 10^{-5}$ M	التضاعف	الانتقال	الانقلاب	الحلقي	الحذف	عديم المركز	الكروموسوم ثنائي المركز	الكسور الكروموسومية
السيطرة	a 0±0	a 0±0	a 0±0	a 0±0	a 0±0	a 0±0	a 0±0	a 0±0
0.1	a 0±0	a 0±0	a 0±0	a 0±0	a 0±0	a 0±0	a 0±0	a 0±0
0.5	a 0±0	a 0±0	a 0±0	a 0±0	a 0±0	a 0±0	a 0±0	b 2± 0.12
5	a 0±0	a 0±0	a 0±0	a 0±0	a 0±0	a 0±0	a 0±0	c 4± 0.14
25	a 0±0	a 0±0	a 0±0	b 1± 0.06	a 0±0	a 0±0	b 1±0.06	d 6± 0.24
50	a 0±0	a 0±0	a 0±0	c 2± 0.12	a 0±0	b 1± 0.06	c 2± 0.12	d 6± 0.24

الحروف المتشابهة تدل على عدم وجود فروقات معنوية بين تراكيز المبيد على مستوى احتمالية ($P \leq 0.01$).

واغلب التشوهات الظاهرة هي الكسور الكروموسومية ، وفي التراكيز العالية (25 و 50 × 10^{-5} مولاري) ظهرت كروموسومات ثنائية المركز واخرى حلقية وظهور كروموسومات عديمة المركز عند التركيز الاعلى المستعمل ، ولم تظهر التشوهات الاخرى التي تم التحري عنها وهي الانقلاب والحذف والانتقال او التضاعف الكروموسومي . وتشير الدراسات الاخرى الى ان مبيد Chlorothalonil لا يؤثر في DNA ، اذ لم يظهر المبيد نتائج ايجابية في فحوص التطفير باستعمال سلالات Ames [4] ، ولكن اعطاء المبيد بتراكيز عالية ولمدة طويلة ادى الى توليد الاورام السرطانية في الفئران والجرذان [15] وباستعمال المركب المشع منه ^{14}C- Chlorothalonil وجد انه لا يرتبط بـ DNA في خلايا الكلية التي تسبب في حث السرطان فيها واشير الى ان حثه للسرطان في خلايا الكلى يعود الى سمية المواد الناتجة من تايض المبيد [15] ، ولكن باستعمال طرق اكثر حساسية مثل Comet assay وجد انه يسبب تلف للـ DNA في الخلايا اللمفاوية النائية النامية خارج الجسم[16]، ومما يشير الى سميته الوراثية هو حصول زيادة في نسبة التبادل الكروماتيدي الشقيقي SCE في عمال الحدائق المتعرضين للمبيد مقارنة بمجموعة السيطرة [17].

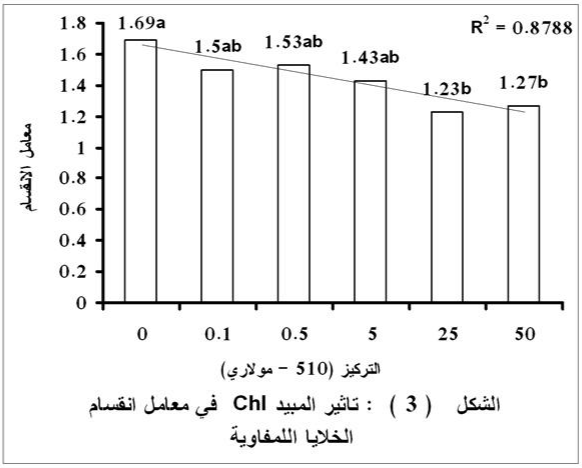
يوضح الشكل (2) المؤشر الاخر الذي تناولته الدراسة وهو قياس حث تكون النوى الصغيرة.



الشكل (2) : تاثير المبيد Chl في استحثاث الانوية الصغيرة في الخلايا اللمفاوية

والملاحظ ان هناك زيادة في عدد الانوية الصغيرة بزيادة التراكيز والتي تعكسه حالة حدوث التشوهات الكروموسومية ، وذلك لان قياس النوى الصغيرة يسجل تاثيرات السمية الوراثية والخلوية (السمية التي تؤثر على الكروموسومات) [7].

اما تاثير المبيد كمواد سامة خلوية فقد سجل بقياس معامل انقسام الخلايا الموضح في الشكل (3)



الشكل (3) : تاثير المبيد Chl في معامل انقسام الخلايا اللمفاوية

ويلاحظ ان معامل الانقسام لم يسجل انحدارا شديدا مع زيادة التراكيز ، كما ان الفروق لم تكن كبيرة بين التراكيز ومعاملة السيطرة (فروق غير معنوية)، وهذه الفروق او النقصان يدل على موت الخلايا او توقفها في مرحلة من مراحل دورة الخلية في الطور البيني ، وفي العموم فان انخفاض MI متوقع ومتوافق مع الدراسات الاخرى [18 و 19] . والدراسة الحالية واغلب الدراسات الاخرى ركزت على التشوهات الكروموسومية وذلك لان حدوث التشوهات يمكن ان يحدث في مناطق محددة خاصة بالمبيدات مثل 14q11 و 7p13 و 7p15 [20] ، وقد تكون هناك مناطق اخرى عرضة لتاثير المبيدات ويمكن ان تضم جينات مسئولة عن سلامة الخلية وعمليات إصلاح DNA وغيرها من الفعاليات [21] مما قد يكون تفسيرا لكثرة السرطانات المسجلة بتاثير المبيدات .

ومن جهة ثانية قد يكون المبيد اكثر تاثيرا من غيره خاصة وانه مركب حلقي وهذه الصفة يمكن ان تؤهله للارتباط بالمستلمات الخاصة بالمركبات الحلقية الموجودة على الخلايا Aromatic hydrocarbon receptors (Ah R) والتي تساعد وتؤثر في العديد من الفعاليات الايضية للمواد الدخيلة [3] . وللمبيدات عموما تاثيرات في الجهاز المناعي التي يجب ان تؤخذ بنظر الاعتبار [22].

ويمتاز مبيد Chlorothalonil باحتياجه الى مدة طويلة ليتحلل ويمكن تناول الاغذية النباتية المعاملة بعدها خاصة النباتات التي تزرع في البيوت الزجاجية [23].

ومن الدراسة أعلاه وغيرها من الدراسات يمكن اقتراح تحسين طرق التعامل مع المبيدات للاشخاص اللذين يتعرضون لها او يكونوا بتماس معها كالمهندسين والفلاحين ، وبما ان الاشخاص تختلف طرزهم الوراثية فيمكن التحري عن ذلك وابعاد الاشخاص اللذين تشير طرزهم الوراثية الى انهم عرضة للإصابة بالأمراض والأخطار نتيجة التعامل مع المبيدات .

المصادر:

1. الجبوري ، ابراهيم جدوع ،وهاشم ابراهيم عواد و صلاح مجيد كسل (2002) . المبيدات المسجلة في الزراعة والصحة

العامة في العراق . اللجنة الوطنية لتسجيل واعتماد المبيدات . وزارة الزراعة / العراق .

2. Gabbianelli , R . ; C . Nasuti ; G . Falcioni and F . Cantalamessa 2004 . Lymphocyte DNA damage in rates exposed to pyrethroids : effect of supplementation with vitamins E and C . Toxicology 203 : 17 – 26 .
3. Carpenter , D . ; K . Arcaro and D . Spink 2002 . Understanding the human effects of chemical mixtures . Environ . Health Perspect . 110 : 25 -42 .
4. Au , W . ; H . Sierro – Torres ; N . Cajas-Salazar ;B . Shipp and M . Legator 1999 . Cytogenetic effect from exposure to mixed pesticides and the influence from genetic susceptibility . Environ . Health Perspect . 107 : 501 – 505 .
5. Bhalli , J ; Q . Khan ; A . Haq ; A . Khalid and A . Nasim 2006. Cytogenetic analysis of Pakistani individuals occupationally exposed to pesticides in a pesticide production industry . Mutagenesis 21 : 143 – 148 .
6. Paz-y-Mino , C . ; G . Bustamante ; M . Sanchz and P . Leone 2002 . Cytogenetic monitoring in a population occupationally exposed to pesticides in Ecudor . Environ . Health Perspect . 110 : 1077 – 1080 .
7. Pastor , S . ; A . Creus ; T . Parron ; A . Cebulska-Wasilewska ; C . Siffel ; S . Piperakis and R . Marcos 2003 . Biomonitoring of four European populations occupationally exposed to pesticides : use of micronuclei as a biomarkers . Mutagenesis 18 : 249 – 258 .
8. Fenech , M . 1993 . The Cytokinesis – blocked micronucleus technique : a detailed description of the method and its application to genetoxicity studies in human population . Mut . Res . 285 : 35 – 44 .
9. Benn , P . and Perle , A . 1992 . Chromosome Staining and Banding Technique . In " Human Cytogenetics " D . Rooney and B . Czpulkowski (Eds .) . Oxford University Press : UK .
10. Bauchinger, M. ; E. Schmid, and J. Dresp 1983. Quantitative analysis of chromosome damage at first division of human lymphocytes after radiation . Rad. Environ Biophys. 22: 225-229..
11. Gohosh, B.; G. Taluker and A. Shorma 1991. Effect of culture media on spontaneous incidence of mitotic index, chromosomal aberration, SCE, and cell cycle in peripheral blood lymphocytes of male and female donors. Cytogenetic . 67: 71-75.
12. Tawn , E . and D . Holdsworth 1992 . Mutagen Induced Chromosome damage in Human Lymphocytes In " Human Cytogenetics " . D . Rooney and B. Czepulkowski . (Eds.) . Oxford University Press : UK .
13. Duncan , D. 1955 . Multiple range and multiple F- test . Biometric 11 : 1 - 42 .
14. WHO . 1995 . Chlorothalonil , Health and Safety Guide . Geneva.
15. Lodovici , C ; C . Casalini ; C . Briani and P . Dolara 1997 . Oxidative liver DNA damage in rats treated with pesticide – exposed greenhouse sprayers . Scand . J . Work Environ . Health 21 : 283 – 2899 .
16. Cox . C . 1997 . Chlorothalonil . J . Pest . Reform . 17 : 4 – 10 .
17. Lander , F . and M . Ronne 1995 . Frequency of SCE and hematological effects in pesticides exposed greenhouse sprayers . Scand . J . Work Environ . Health

to non- Hodgkin's lymphoma . Cancer Epidemiol . Biomarkers & Prevent . 5 : 11 – 16.
21. Goldman , R . and Shields 2003 . Food Mutagens . J . Nutr. 133 : 965 –973 .
22. McCue , J . ; K . Link ; S . Eaton and B . Freed 2000 . Exposure to cigarette tar inhibits ribonucleotide reductase and blocks lymphocyte proliferation . J . Immunol . 165 : 6771 – 6775 .
23. Johansson , M . ; N . Johansson and B . Lund 2005 . Xenobiotcs and the glucocorticoid receptor : additive antagonistic effects on tyrosine aminotransferase activity in rat hepatoma cells . Basic Clin . Pharmacol . Toxicol . 96 : 309 – 315 .
19 : 283 – 289 .
18. Rupa , D . ; P . Reddy ; K . Sreemannaravana and O . Reddy 1991 . Frequency of sister chromatid exchange in peripheral lymphocytes of male pesticides applicators . Environ . Mol . Mutagen . 18 : 136 – 138 .
19. Pasquini , R . ; G . Seassellati-Sforzolini ; G . Angeli ; C . Fatigoni ; S . Manorca ; L . Beneventi ; A . DiGiulio and F . Bauleo 1996 .Cytogenetic biomonitoring of pesticide – exposed farmers in central Italy . J . Environ . Pathol . Toxicol . Oncol . 15 : 29 -39 .
20. Garry , V . ; R . Tarone ; L . Long ; J . Kelly and B . Burroughs 1996 . Pesticide appliers with mixed pesticide exposure : G – banded analysis and possible relationship

Effect Of Chlorothalonil On Some Cytogenetic Parameters Of Human Peripheral Blood Lymphocytes

*Basheer I. Azawei** *Nahi Y. Yassein***
*Zahra M . Al-Khafaji**** *Sura N. Hamed*****

*Genetic Engineering & Biotechnology Institue for Postgraduate Studies / Baghdad University / IRAQ
**The Iraqi Center for Cancer research & Medical Genetics / Al- Mustansyria University /Baghdad / IRAQ
***Present address : Dept of Food Science /College of Agriculture /University of Mosul / IRAQ
**** Dept of Molecular Biology/Biotechnology Research Center/Al-Nahrain University /Baghdad / IRAQ

Abstarct:

The study aimed to investigate the effect of fungicides chlorothalonil at different concentrations (0.1 , 0.5 , 5 , 25 , 50) $\times 10^{-5}$ M on some cytogenetic parameters of human peripheral blood lymphocytes . The genotoxicity parameters were estimated by the number of chromosomal aberrations (CAs) and their types and by estimating the induced micronuclei (Mn) . Cytotoxic effect recorded by estimating the mitotic index (MI) . Results revealed that the fungicide increased the CAs in dose – response pattern with positive correlation coefficient (r = + 0.964) , there was a significant differences among the concentrations ($P<0.01$) . The major CAs records chromosomal breakage at concentrations. 0.5 , 5 , 25 , and 50 , while the lowest concentration (0.1) showed no abnormalities . Dicentric and ring chromosomes appeared at high concentration (25) and were (1 ± 0.06) which increased significantly upon duplication of concentration (i.e., 50) in which another abnormality appeared and this was acentric chromosomes .

Mn increased propotionally with increasing concentrations with positive correlation coefficient (r = + 0.91) , but the value recorded for the lowest concentration (0.1) was non significant compared to control treatment .

The percentage of MI were lower by increasing chlorothalonil concentration with a significant difference ($P<0.01$) although the decrease was not strongly