دراسة الوراثة الخلوية للمجاميع المتعرضة للمبيدات في بغداد

Cytogenetic studies on groups exposed to pesticides in Baghdad

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

مركز بحوث التقنيات الاحيائية / جامعة النهرين
*المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية / الجامعة المستنصرية
**معهد الهندسة الوراثية والتقنية الحيوية للدراسات العليا / جامعة بغداد

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

Biotechnology Research Center/Al-Nahrain University
*Genetic Engineering & Biotechnology Institute for Postgraduate Studies /Baghdad University
**The Iraqi Center for Cancer research & Medical Genetics / Al-Mustansyria University

المستخلص:

تؤثر المبيدات في الوراثة الخلوية للإنسان بشكل سلبي ، ويمكن قياس التأثيرات بدراسة الخلايا اللمفاوية للدم المحيطي للمجاميع التي تتعرض للمبيدات . تم دراسة تأثير المبيدات المختلطة في الوراثة الخلوية لمجاميع كلهم من الرجال ، والمجاميع هي الفلاحين ، بائعي المبيدات ، وعمال مصنع الطارق لانتاج المبيدات الزراعية (25 شخص لكل مجموعة) باعتبارهم مجاميع خطر ، مقارنة بمجموعة السيطرة (25 شخص) من العاملين في جامعة بغداد . تمثلت المؤشرات الوراثية التي درست بحساب التشوهات الكروموسومية وانواعها ، وحث تكوين النوى الصغيرة وحساب معامل الانقسام . اوضحت النتائج ان التشوهات الكروموسومية التلقائية هي اقل من 1 % (مجموعة السيطرة) ، وتدرجت المجاميع تصاعديا : فلاحون ، بائعي المبيدات ، عمال مصنع الطارق ، اذ كانت النسب المئوية للتشوهات في الشخص الواحد 1.48 ، 2.86 ، 3.42 % على التوالي . وقد اتخذ تكون الانوية الصغيرة نمطا مشابها ، اذ انه يمثل معطى مباشر او غير مباشر للتشوهات الكروموسومية . اما معامل الانقسام فقد كانت مجموعة الفلاحين لا توجد بينهم فروقات معنوية ($P<0.01$) عن مجموعة السيطرة في حين انخفض الى 1.35 % في بائعي المبيدات الذي كان 1.71 % في مجموعة السيطرة وبفارق معنوي ، وانخفض الى مستوى ادنى (1.2 %) في مجموعة عمال مصنع الطارق .

Abstract

Pesticides effect human cytogenetic parameters adversely. This negative effect can be monitored in peripheral blood lymphocytes. The study conducted to investigate the effect of pesticides (mixture) on some cytogenetic parameters in risk groups represented by farmers, pesticide sellers and pesticide manufacture workers (all of them were men), each group involved 25 person in addition to control group (25 men) from Baghdad university staff. The cytogenetic parameters studied were; estimation of chromosomal aberrations (CA), induction of micronuclei (Mn) and mitotic index (MI). Results showed that the chromosomal aberrations spontaneous was less than 1% (Control group), then these abnormalities increased in farmer,

البحث جزء من رسالة ماجستير للباحث الاول

sellers and pesticides workers (1.48 % , 2.86 % , 3.42 % respectively) . Mn profile was similar to CA as represented direte or indirect parameter. MI in farmers was with no significance compared to control group (1.72) (P<0.01), but it was lowred to 1.35 in sellers, and to 1.2 in workers with significant difference (P<0.01).

المقدمة :

تمثل المبيدات مجموعة متباينة من الكيمياويات والتي صممت للقضاء على آفات المزروعات وذلك لرفع كفاءة الانتاج ، وقد ساهمت بشكل فاعل في تحسين الإنتاج النباتي [1] . وهناك اكثر من 1000 مادة كيماوية صنفت على انها من المبيدات تتوزع على آلاف المبيدات ومعظمها تبقى في البيئة لعدد من السنين [1] . وتطلق المبيدات الى البيئة نظرا لاستعمالها المكثف في الأغراض الزراعية . وبالرغم من فوائد المبيدات الا ان لها أضرار وأخطار على صحة الانسان ، اذ تؤدي الى تغييرات وراثية يمكن ان تقود الى العديد من الأمراض وأهمها الأورام [2] . وقد سجل ارتباط بين التعرض للمبيدات وبين حدوث السرطانات في مواقع مختلفة من الجسم وكذلك الدم ، كما انها تؤثر على العملية التكاثرية والخصوبة في الإنسان [2,1] . وهناك مجاميع من المجتمعات تعد مجاميع خطر (Risk groups) بالنسبة للتعرض للمبيدات ، ومنهم اللذين تتطلب أعمالهم التعامل مع المبيدات سواءا في عمليات التحضير او اثناء الاستخدام من قبل المزارعين. وقد اجريت دراسات عديدة على مثل هذه المجاميع في مناطق مختلفة من العالم ([7,6,5,4,3] ، ولكن مثل هذه الدراسات قليلة في الدول النامية [2] .

ويدرس تأثير المبيدات بقياس حث الانوية الصغيرة Micronuclei (Mn) والتشوهات الكروموسومية Chromosomal aberrations ، وقياس معامل الانقسام الخلوي Mitotic index (MI) في الخلايا اللمفاوية للدم المحيطي للانسان Human peripheral lymphocytes ، اذ يمثل الدم افضل النماذج للدراسات البشرية حيث من السهولة الحصول عليه [6,5] . وهدفت الدراسة الحالية الى تحديد بعض مؤشرات الوراثة الخلوية في مجاميع من المجتمع في مدينة بغداد اللذين يتعرضون للمبيدات .

المواد وطرق العمل :

اجريت الدراسة في المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية / الجامعة المستنصرية / بغداد / العراق للفترة 2006-2005 .

مجاميع الدراسة : شملت الدراسة مجموعات من المتعرضين للمبيدات (رجال) وهم الفلاحون (25 شخص) ، بائعي المبيدات (25 شخص) ، عمال مصنع الطارق لصناعة المبيدات الزراعية / بغداد (25 شخص) .

مجموعة السيطرة : اختيرت من كادر جامعة بغداد والساكنين في مدينة بغداد ، من غير المدخنين ولا المتعاطين للكحول (25 شخص) . تم جمع البيانات العامة لكل شخص وفق استمارة استبيان خاصة بالمركز وتركزت الاستبيانات حول العمر والتدخين وتعاطي الكحول ومدة التعامل مع المبيدات ، تراوحت أعمارهم من 20 – 48 سنة .

عينات الدم وزراعتها : جمعت عينات الدم ، وزرعت الخلايا اللمفاوية وصبغت بصبغة كمزا (Geimsa) ودرست الكروموسومات وفق طريقة Fenech [8] . اما تقنية التحزيم G – banding technique فتمت باستعمال طريقة Benn و Perle [9] .

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

فحص النواة الصغيرة : تمت وفق طريقة Fenech [11] . حسبت عدد الانوية الصغيرة في (1000) خلية واستخرجت النسبة المئوية وفق المعادلة الاتية:-

النسبة المئوية للانوية الصغيرة = (عدد الخلايا التي تحتوي على الانوية الصغيرة / 1000) ×100 [11]

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

معامل الانقسام (MI) = (عدد الخلايا المنقسمة / العدد الكلي للخلايا)× 100 [12]

التحليل لاحصائي : تم تحليل نتائج البيانات احصائيا باستخدام التصميم العشوائي التام (CRD) وحسب النموذج الاحصائي الاتي :-

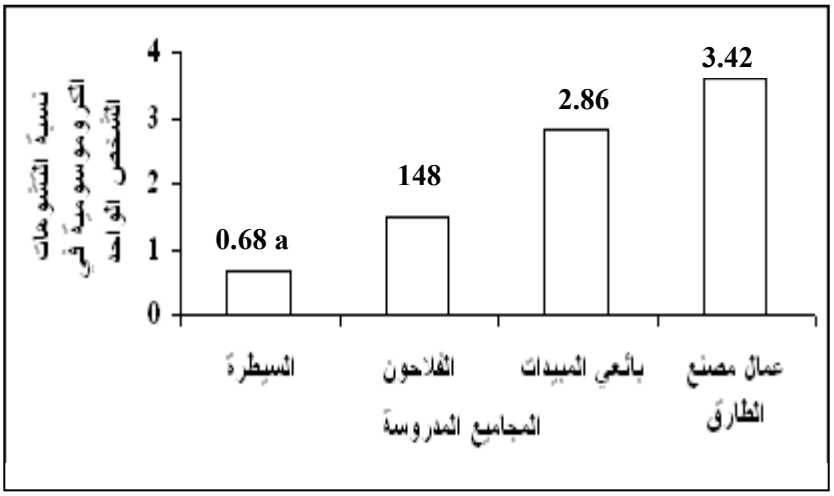
$$Yij = M + Ti + eij$$

حيث تمثل Yij : الصفة المدروسة
M : المتوسط العام
Ti : تاثير المعاملة (C = 1-5)
eij : الخطا العشوائي

وباستخدام البرنامج الإحصائي الجاهز (SPSS) . واختبرت معنوية الفروق بين المعاملات باستخدام اختبار دنكن متعدد المديات وتحت مستوى احتمالية (0.01) .

النتائج والمناقشة :

تسبب اكثر المواد المسرطنة تشوهات كروموسومية والتي تعتبر واسمات حيوية (Biomarkers) ملائمة لأنها تمثل مرحلة متوسطة لعملية التسرطن [13] . وتعد الخلايا اللمفاوية في الدم الدائر او المحيطي في جسم الانسان من الخلايا الملائمة وتستعمل بشكل تقليدي وذلك لان الخلايا تكون في مرحلة غير متكاثرة أي في G_0 من مراحل دورة الخلية ، كما ان لها عمر نصفي (Half life) طويل يصل الى ثلاث سنوات [6] ، فضلا عن انها تتعرض لكل المواد التي تصل الجسم من كل المداخل نظرا لطبيعتها الدائرة في الجسم وكذلك لسهولة تحضير كروموسوماتها . واوضحت نتائج الدراسة الحالية ان المجاميع المدروسة لم تظهر فيها تشوهات كروموسومية عددية وإنما كانت التشوهات تركيبية ويوضح الشكل (1) النسب المئوية لمستوياتها في المجاميع المدروسة



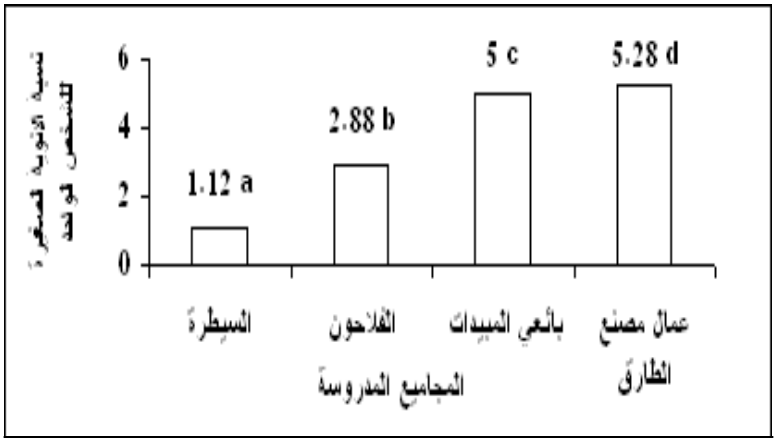
شكل (1) التشوهات الكروموسومية للمجاميع المتعرضة للمبيدات

ويلاحظ ان الترتيب التصاعدي للمجموعات هو الفلاحون اللذين ارتفعت عندهم النسبة الى اكثر من ضعفي مجموعة السيطرة ، ثم تلتها مجموعة بائعي المبيدات ، اذ ارتفعت النسبة المئوية للتشوهات الكروموسومية الى حوالي اربعة اضعاف ، اما مجموعة عمال مصنع الطارق فمثلت الفئة الاكثر تضررا اذ ارتفعت النسبة الى اكثر من خمس اضعاف مجموعة السيطرة التي اختيرت بشكل دقيق ليكونوا من غير المتعرضين للمبيدات الزراعية ، لان عدم العناية باختيار مجموعة السيطرة يمكن ان يؤدي الى انحراف في النتائج نتيجة لارتفاع القيم الاساسية (Baseline) وبالتالي الى عدم صحة الاستنتاجات . وزيادة القيم في مجموعة السيطرة يمكن ان يشير الى تلوث عام في المنطقة [14] . ومفصل التشوهات الكروموسومية موضحة في الجدول (1)

الجدول (1) التشوهات الكروموسومية التركيبية المسجلة في كل من المجموعات المتعرضة للمبيدات

التشوهات الكروموسومية Chromosomal Aberrations (CA)%								
المجاميع	التضاعف الكروموسومي	الانتقال الكروموسومي	الانقلاب الكروموسومي	الكروموسوم الحلقي	الحذف الكروموسومي	الكروموسوم 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 0.68± 0.03
الفلاحين	a 0±0	a 0±0	a 0±0	a 0±0	b 0.04± 0.004	b 0.2± 0.012	b 1.24± 0.08	
بائعي المبيدات	a 0±0	a 0±0	a 0±0	b 0.08± 0.004	a 0.2± 0.012	b 0.04±0.004	c 0.5±0.02	c 2.04± 0.08
عمال مصنع الطارق	a 0±0	a 0±0	a 0±0	c 0.24± 0.014	a 0.16± 0.006	c 0.2±0.02	d 0.72± 0.02	d 2.28± 0.06
مستوى المعنوية	N.S	N.S	N.S	P≤0.01	P≤0.01	P≤0.01	P≤0.01	P≤0.01

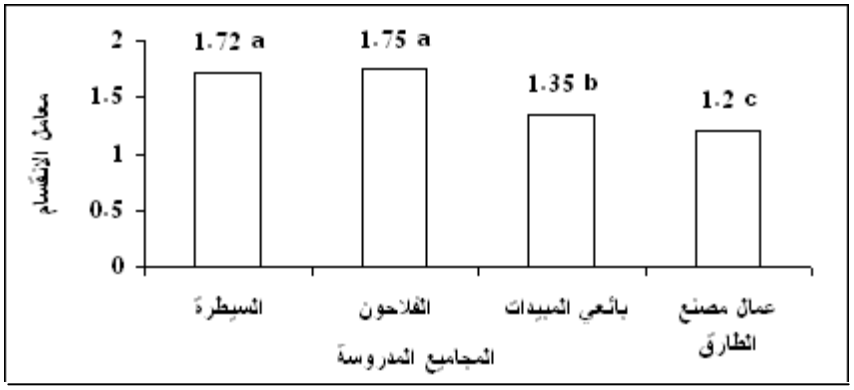
الحروف المتشابهة تدل على عدم وجود فروقات معنوية بين االمجاميع المتعرضة للمبيدات على مستوى احتمالية (P≤0.01) . والتشوهات التي سجلت في مجموعة السيطرة هي شكل أساسي كسور كروموسومية ، وعادة توجد الكسور الكروموسومية في عموم الناس بمستوى حوالي 1 % ولكنه يزداد في مجاميع السيطرة للمناطق الملوثة [14] . في حين لوحظ ظهور الكروموسومات عديمة المركز والأخرى ثنائية المركز في مجاميع الفلاحين ، اضافة الى تضاعف نسبة كسورالكروموسومية. اما بائعي المبيدات فقد ظهرت عندهم تشوهات لم تسجل في المجاميع المذكورة اعلاه ، مثل الكروموسوم الحلقي والحذف الكروموسومي اضافة الى زياد نسبة كسورالكروموسمات التي وصلت الى ثلاث اضعاف مجموعة السيطرة ، والتشوهات التي ظهرت لدى عمال مصنع الطارق كانت مشابهة من حيث الانواع لمجموعة البائعين ولكنها زادت في نسبة حدوثها وكذلك الحال مع الكسور الكروموسومية التي ارتفعت بأكثر من ثلاث اضعاف ، وبالفروق المعنوية الموضحة في الجدول .



شكل (2) نسبة الانوية الصغيرة في المجاميع المتعرضة للمبيدات

ويلاحظ انه في مجموعة السيطرة كانت القيم 1.12 في حين ازدات في مجموعة الفلاحين الى اكثر من ضعفين ونصف وفي بائعي المبيدات ازدادت قليلا عن اربعة اضعاف ، اما في مجموعة عمال مصنع الطارق فقد ازدادت اكثر من ذلك (4.7) وكانت تفرق معنويا عن مجموعة السيطرة السالبة اضافة الى وجود الفروق المعنوية بين المجاميع على مستوى احتمال (P<0.01) . ويعد فحص النواة الصغيرة من اكثر الفحوص استعمالا في الخلايا اللمفاوية [7] ، اذ

تعد الانوية الصغيرة من الواسمات الحيوية المهمة التي تتركها المواد السامة بعد تعرض الخلايا لها[15] ، وظهور الانوية الصغيرة يعني ان الخلايا قد تعرضت الى عوامل تحدث كسور في الكروموسومات Clastogenic واخرى تؤثر في مواقع غير المواد الوراثية مثل خيوط المغزل [6] .



شكل (3) تاثر معامل انقسام الخلوي للمجاميع المتعرضة للمبيدات

وكانت أعلى القيم المسجلة في مجموعة السيطرة تلتها مجموعة الفلاحين واظهرت ارتفاعا قليلا ولم يكن ذو اهمية معنوية ($P<0.01$) ، ولكن في مجموعة بائعي المبيدات انخفض معامل الانقسام الى 1.35 (أي بنسبة 21 % عن مجموعة السيطرة) ، وانخفض المعامل الى مستويات اقل في مجموعة عمال مصنع الطارق (نسبة الانخفاض 30 % عن المستوى الطبيعي لمجموعة السيطرة) . ويدرس معامل الانقسام او التكاثر في الخلايا اللمفاوية لمعرفة السمية الخلوية للمواد وهو عادة يتأثر بشكل سلبي بوجودها ، وقد سجل في العديد من الدراسات انخفاضا في معامل الانقسام للناس اللذين يتعرضون للمبيدات [3,2] ومن مجمل النتائج أعلاه يتضح ان المبيدات تؤثر على المادة الوراثية كما يتمثل في حث التشوهات الكروموسومية وكذلك سمية خلوية كما يتضح كجزء من ظهور الانوية الصغيرة وكذلك تأثر معامل انقسام الخلايا سلبا . وفي هذة الدراسة تتعرض المجاميع المدروسة لخليط من المواد والتي يمكن ان تؤثر على أهداف مختلفة في الخلايا وتكون التأثيرات اكثر وضوحا عندما تتأثر بها الجينات المسئولة عن سلامة الخلية وتنظيم دورتها وفعالياتها [15] أي ان الضرر يكون اكبر عندما تتضرر مجموعة جينات Caretaker genes المسئولة عن عمليات اصلاح DNA المتضرر وكذلك مجموعة جينات Gatekeeper المسئولة عن تنظيم دورة الخلية ونقل الإشارات فيها . وقد وجد ان بعض الحزم الكروموسومية تحوي جينات مسئولة عن عمليات تنظيم نمو الخلايا وتكاثرها والتي تكون حساسة وتتأثر بالمبيدات . كما ان المبيدات قد يكون لها تاثيرا متخصصا او مواقع محددة على الكروموسومات يمكن ان تؤثر فيها اكثر من غيرها مثل بعض حزم الكروموسوم السابع (7p13 , 7p15) وكذلك الكروموسوم الرابع عشر (14q11)[16] .

وتشير الدراسة الحالية الى ان مجموعة الفلاحين هي الأقل تضررا من باقي المجاميع المدروسة وذلك يعود الى ان هذه المجموعة تتعرض للمبيدات في بيئة مفتوحة مما يقلل وطأة تعرضها للمبيدات [15] ، كما ان المجموعة يكون غذائها مكون بشكل أساسي من المواد النباتية الطازجة والتي تقلل من الإجهاد التأكسدي الذي ينتج من مركبات الأوكسجين الفعالة Reactive oxygen species (ROS) التي تنتج من المواد السامة مثل المبيدات [17,15]) .

المصادر :

1. Bolognesi , C . (2003) . Genotoxicity of pesticides : a review of human biomonitoring studies . Mutant . Res . 543 : 251 -272 .
2. 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 .

3. 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 .
4. Bolognesi , C . ; M . Parrini ; S . Bonassi ; G . Ianello and A . Salanitto (1993) . Cytogenetic analysis of a human population occupationally exposed to pesticides . Mutant . Res. 285 : 239 -249 .
5. Hoyos , L . ; S . Carvajal ; L . Solano ; J . Rodriguez ; L . Orozco ; L . Yanneth and W . Au (1996) . cytogenetic monitoring of farmers exposed to pesticide in Colombia . Environ . Health Perspect . 104 : 535 – 538 .
6. Pastor , S . ; S . Gutierrez ; A . Creus ; A . Xamena ; S . Piperakis and R . Marcos (2001) . Cytogenetic analysis of Greek farmers using the micronucleus assay in peripheral lymphocytes and buccal cells . Mutagenesis 16 : 539 – 545 .
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 : adetailed description of the method and its application to genetoxicity studies in human population . Mutant . Res . 285 : 35 – 44 .
9. Benn , P . and Perle (1992) . Chromosome Staining and Banding Technique . *In* " Human Cytogenetics " . D . Rooney and B . Czepulkowski (Eds.). Oxford University Press : UK .
10. Bauchinger, M. ; E. Schmid, and J. Dresp (1983). Quantitative analysis ofchromosome damage at first division of human lymphocytes after radiation . Rad. Environ Biophys. 22: 225-229.. Fenech , M . (2000) . The *IN vitro* micronucleus technique. Mut. Res.455:81-95.
11. Gohosh, B.; Taluker, G. and Shorma, A. (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. Cysto. 67: 71-75.
12. Hagmar , L . ; U . Stromberg ; H . Tinnerberg ; Z . Mikoczy (2001) . The usefulness of cytogenetic biomarkers as intermediate endpoints in carcinogenesis . Int . J . Hyg . Environ . Health 204 : 43 – 47 .
13. 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 .
14. Carpenter , D . ; K . Arcaro and D . Spink (2002) . Understanding the human effects of chemical mixtures . Environ . Health Perspect . 110 : 25 -42 .
15. Garry , V . ; R . Tarone ; L . Long ; J . Kelly and B . Burroughs (1996) . Pesticide appliers with mixed pesticide exposure : G – banded analysis and possible relationship to non- Hodgkin's lymphoma . Cancer Epidemiol . Biomarkers & Prevent . 5 : 11 – 16 .
16. Ames , B . ; L . Gold and W . Willett (1995) . The causes and prevention of cancer . Proc . Natl . Acad . Sci . 92 : 5258 – 5265 .