تاثير المبيد Oxamyl في الوراثة الخلوية للخلايا اللمفاوية للدم المحيطي في الانسان

Effect of Oxamyl on Cytogenetics of human peripheral lymphocytes

بشير اسماعيل عزاوي زهرة محمود الخفاجي * ناهي يوسف ياسين**

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

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

Biotechnology Research Center/ Al- Nahrain University
*Institue of Genetic Engineering and Biotechnology for Postgraduate Studies / University of Baghdad
**The Iraqi Center for Cancer Research and Medical Genetics / University of Mustansseryia

المستخلص

درس تأثير احد مبيدات الكاربامات وهو Oxamyl على بعض مؤشرات الوراثة الخلوية في لمفاويات الدم المحيطي للانسان . وتضمنت المؤشرات قياس التشوهات الكروموسومية وحث النوى الصغيرة ، فضلا عن دراسة تاثير المبيد على معامل انقسام اللمفاويات . استعمل المبيد بتراكيز(0.1 و 0.5 و 5 و 25 و 50) × 10^{-5} مولاري ، ضيفت الى مزارع الخلايا اللمفاوية . أوضحت النتائج ان التراكيز المتزايدة تؤثر في حث التشوهات الكروموسومية وكان معامل الارتباط موجب القيمة (r = + 0.904) . ظهرت في معاملة السيطرة الكسور الكروموسومية بشكل رئيس ، وزادت هذه الكسور بازدياد تركيز المبيد وبشكل معنوي (P<0.01) ، اذ كانت في معاملة السيطرة 1 % ثم ارتفعت الى 2 ، 4 ، 4 ، 10 ، 18 على التوالي للتراكيز اعلاه . ظهرت تشوهات كروموسومية مثل الكروموسوم ثنائي المركز (2) والكروموسوم الحلقي (2) عند التركيز 25 × 10^{-5} مولاري وارتفعت الى 4 % لكلا التشوهين عند التركيز 50 × 10^{-5} مولاري ، فضلا عن ظهور كروموسومات عديمة المركز بنسبة 1 % وكانت بفروق معنوية (P<0.01) . ازداد عدد النوى الصغيرة المستحثة بازدياد التركيز المستعمل وبمعامل ارتباط موجب القيمة (r = + 0.983) ، اذ وصلت اعلى قيمة 6.66 عند التركيز 50 × 10^{-5} مولاري . قياس معامل الانقسام لم يظهر فروق معنوية (P>0.01) عند التراكيز الواطئة (0.1 و 0.5) × 10^{-5} مولاري عن المعاملة الضابطة ، ولكن بدأ بالانخفاض عند التراكيز (5 و 25 و 50 × 10^{-5} مولاري ، اذ كانت القيم 1.77 ، 1.5 ، 1.33 على التوالي مقارنة بقيمته في المعاملة الضابطة 2.5 وباختلاف معنوي (P<0.01) .

Abstract

The effect of of carbamate pesticides (Oxamyl) on some parameters of cytogenetics of human peripheral blood lymphocytes was studied. These parameters were induction of chromosomal aberrations (CAs) and it's types; and formation of Micronuclei (Mn); in addition to estimating the mitotic index (MI) of cultured cells. The concentrations used were (0.1, 0.5, 5, 25, 50) × 10^{-5} M which

were added to lymphocyte cultures. Results indicated that the concentrations induced the CAs as the concentrations increased with positive correlation coefficient (r = + 0.904). Abnormalities in the control treatment were mainly as chromosomal breaks , these increased to 2 , 4 , 4 , 10 , 18 respectively and were with significant differences compared to control treatment (P<0.01) . Dicentric chromosomes appeared with 2 % level at concentration 25 × 10^{-5} M , the latter abnormality raised to 4 % at concentration 50 × 10^{-5} M in addition to the appearance of acentric chromosomes (1 %), all of them were with significant differences (P<0.01). Micronuclei (Mn) increased in cells as the concentrations increased with positive correlation coefficient (r = + 0.983), and the highest value recorded at concentration 50 × 10^{-5} M (6.66 %). MI had no significant difference from the control treatment (P>0.01), but started to decline at concentrations 5, 25, 50 × 10^{-5} M and the values were 1.77, 1.5, 1.33 respectively compared to control treatment (2.5) with significant difference (P<0.01).

المقدمة

للمبيدات اثر كبير في تحسين الانتاج النباتي وزيادته لمواجهة الزيادة السكانية ، وهي تستعمل في معظم مناطق العالم ، الا انها تشكل اهم مشاكل التلوث البيئي ، وقد اشارت إحصائيات منظمة الصحة العالمية WHO وغيرها من الجهات المسئولة الى ان اكثر من 56 % من المبيدات هي مواد مسرطنة في الحيوانات ، وقامت المنظمة بتصنيف المبيدات اعتمادا على خطورتها [1] ، وبالرغم من ذلك فان العديد منها لا يزال قيد الاستعمال [2] . وقد اشارت العديد من الدراسات الى ارتباط التعرض للمبيدات بالعديد من الامراض منها السرطانات المختلفة و Alzhemier و Parkinson واضطراب عمليات التكاثر والاضطرابات العقلية والنفسية [3] . وهناك العديد من المواد السامة التي تترك واسمات حيوية يمكن ان تستعمل للاستدلال عليها [3] ومنها المبيدات لتبيان خطرها .

فضلا عن ذلك يلاحظ ان عدد المبيدات في ازدياد والتي تحاول استهداف مواقع معينة في الآفات الزراعية للتغلب على المقاومة التي تنشأ في الآفات [4,5] ، والمبيدات يمكن ان تبقى في البيئة لمدة طويلة اعتمادا على طبيعة المبيد التركيبية والظروف البيئية [6,7] .

ومبيد Oxamyl من مجموعة Oxim carbamates له الصيغة الجزيئية $C_7H_{13}N_3O_3S$ ويكون بشكل سلسلة مستقيمة كما موضح في الشكل التالي ، ولا يحوي على تركيب حلقي [8] .

ويستخدم بشكل رئيس لمكافحة ديدان الجذور في الطماطة . ومجموعة الكاربمات تؤثر في انزيم

$$(CH_3)_2NCOC(SCH_3)=NOCONHCH_3$$

Acetylcholine esterase للحشرات [4] . ويستورد مبيد Oxamyl من قبل وزارة الزراعة العراقية [8] ولكن دون اجراء الفحوص اللازمة لسلامة استعماله .

وهدفت الدراسة الحالية الى توضيح تاثير المبيد على الانسان وذلك بدراسة التاثيرات في بعض مؤشرات الوراثة الخلوية للخلايا اللمفاوية في الدم المحيطي للانسان .

المواد وطرائق البحث

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

مبيدOxamyl: تم الحصول عليه من شركة Italy / DuPont . 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 لأشخاص غير مدخنين ولا يتعاطون الكحول وغير متعرضين للمبيدات وزرعت النماذج وفق طريقة Fenech [9] 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[10] 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 وحسبت عدد التشوهات في (100) خلية في الطور الاستوائي (Metaphase) من انقسام الخلية واستخرج المعدل [11] .

حساب 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] .

فحص وحساب الانوية الصغيرة : تم الفحص وفق طريقة [13] . حسب عدد الانوية الصغيرة في (1000) خلية واستخرجت النسبة المئوية لها عن طريق المعادلة الاتية:-

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

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

$$Yij = M + Ti + eij$$

حيث تمثل Yij : الصفة المدروسة

M : المتوسط العام

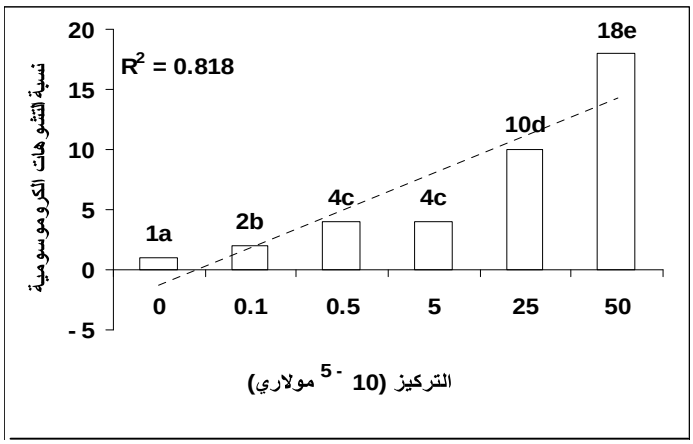
Ti : تاثير المعاملة (C = 1-5)

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) [14] .

النتائج والمناقشة

تعد دراسة الواسمات الحيوية Biomarkers التي تتركها المواد السامة وراثيا من الوسائل الجيدة لتقدير السمية الوراثية نتيجة التعرض للمبيدات واهمها التشوهات الكروموسومية لانها تعد واسمة حيوية مهمة لحث السرطانات [15,2] . ويوضح الشكل (1) تاثير التراكيز المختلفة من مبيد Oxamyl في حث التشوهات الكروموسومية



الشكل (1) : تاثير مبيدoxa في استحثاث التشوهات الكروموسومية في الخلايا اللمفاوية

ويلاحظ ان زيادة التركيز ادت الى زيادة التشوهات وبفروق معنوية ($P<0.01$) ، اذ بلغت 18 % عند التركيز العالي (50×10^{-5} مولاري) مقارنة بمعاملة السيطرة (1 %) ولذلك كان معامل الارتباط ذات قيمة موجبة عالية ($r = + 0.904$) ، وهذه النتائج تشير الى وجود سمية وراثية حيث ظهرت استجاب متزايدة بزيادة التراكيز (Dose- response) [3]. اما الجدول (1) فيوضح انواع التشوهات المسجلة في الخلايا نتيجة المعاملة بالمبيد .

الجدول (1): تاثير التراكيز المختلفة من مبيد اوكساميل (Oxamyl) في استحثاث التشوهات الكروموسومية في خلايا الدم اللمفاوية

التشوهات الكروموسومية Chromosomal Aberration (CA)%								
التركيز $M \times 10^{-5}$	التضاعف	الانتقال	الانقلاب	الحلقي	الحذف	عديم المركز	ثنائي المركز	الكسور
السيطرة	a 0±0	a 0±0	a 0±0	a 0±0	a 0±0	a 0±0	a 0±0	a 1±0.06
0.1	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
0.5	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
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 2±0.12	a 0±0	a 0±0	b 2±0.12	d 6±0.24
50	a 0±0	a 0±0	a 0±0	c 4±0.14	a 0±0	b 1±0.06	c 4±0.14	e 9±0.2

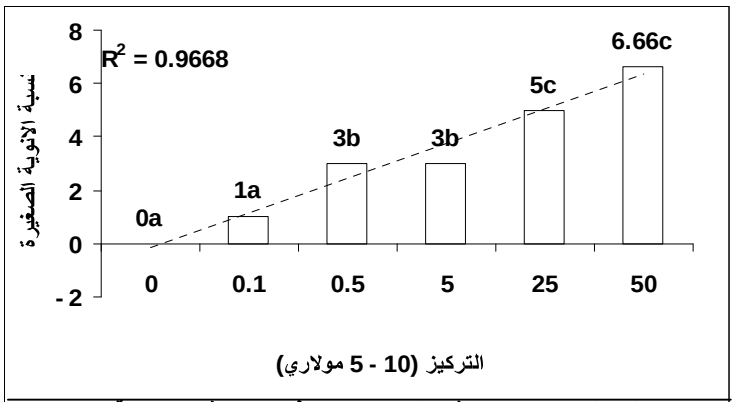
الحروف المتشابهة تدل على عدم وجود فروقات معنوية بين تراكيز المبيد على مستوى احتمالية ($P \leq 0.01$).

ففي معاملة السيطرة كانت التشوهات محددة بالكسور الكروموسومية وكذلك الحال عند التراكيز الواطئة ولكن عند التراكيز العالية (25 و 50 $\times 10^{-5}$ مولاري) لوحظ ظهور تشوهات اخرى ، منها ما ظهر عند التركيز 25 وهي الكرومسومات ثنائية المركز واسوأ حالات التشوه وهي الكروموسومات الحلقية ، وبالتركيز (50) ظهرت الكسور الكروموسومية والكروموسومات ثنائية المركز والكروموسومات الحلقية وبقيم تفرق معنويا عن التركيز الذي يسبقه ($P<0.01$) وظهرت كذلك كروموسومات عديمة المركز.

ويلاحظ انها لم تظهر تشوهات عددية للكروموسومات وانما كانت التشوهات تركيبية فقط . والتشوهات التي ظهرت في معاملة السيطرة تمثل التشوهات الاصيلة Constitutional abnormalities وهذه يمكن ان توجد في معظم خلايا الجسم وليس لخلايا اللمفاوية فقط وهي عادة تنتج من عمليات الإصلاح الخاطئ للكروموسومات المكسرة [16] ، وذلك لان الكسور الكروموسومية تنتج من ضرر في DNA بواسطة العوامل الخارجية او كجزء من آليات التأشب Recombination والكسور التي تحدث في مرحلة G2 والتي تكون الكروموسومات عندها مكونة من كروماتيدين لذلك يطلق عليها الكسور الكروماتيدية ولكن هذه لم تسجل في هذه الدراسة وإنما سجلت الكسور الكروموسومية التي تحدث في G1 من دورة الخلية والتي تكون عندها الكروماتيدين قد تأثرت [16] ، وفي دراسات اخرى وباستعمال مبيدات اخرى وجد ان الكسور الكروماتيدية هي اكثر من الكسور الكروموسومية وهذا يعني ان تاثير المبيدات المستعملة يكون معتمدا على طور التخليق (S phase) من دورة الخلية [2] ، ولكن مثل هذه الكسور لم تسجل في الدراسة الحالية وذلك يعود الى اختلاف الطبيعة التركيبية للمبيد المستعمل .

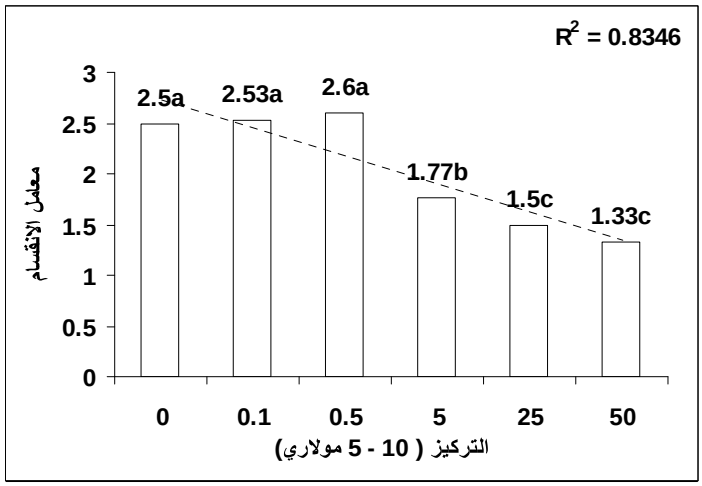
وتعد دراسة الحزم الكروموسومية وسيلة فاعلة في تحديد تاثير المبيدات على المستوى الجزيئي [17] ، وذلك لان بعض الحزم تحوي على بعض جينات الورم Oncogenes مثل الحزم (2p23-24 و 14q32) واخرى تحوي على الجينات الكابحة للاورام Tumor suppressor genes مثل 13q14 وعليه فان الكسور او الضرر يمكن ان يحدث في مجموعة الجينات المسئولة عن التسرطن مثل Gatekeeper genes او Caretaker genes وبالتالي تؤدي الى نمو الاورام [17,18] ، وهذا يشير الى ان للمبيدات مواقع محددة داخل الانظمة الحية تعمل عليها كما هو الحال مع المواد الكيمياوية المختلفة ، لذلك كانت دراسة التشوهات الكروموسومية وسيلة لحدس حدوث السرطانات [19] .

ونتائج تكون النوى الصغيرة في الخلايا اللمفاوية موضحة في الشكل (2).



الشكل (2): تاثير مبيد oxa في استحثاث الانوية الصغيرة في الخلايا اللمفاوية

ويلاحظ عدم ظهور الانوية في معاملة السيطرة ولكنها ظهرت عند استعمال اقل التراكيز (0.1×10^{-5} مولاري) ولكن لم تفرق معنوية عن معاملة السيطرة ($P<0.01$) ، وبدأت النسب بالازدياد بازدياد التراكيز المستعملة وبفروق معنوية وكان معامل الارتباط موجب القيمة ($r = + 0.983$) . ومن المعروف ان الانوية الصغيرة تنتج من قطع من الكروموسومات المكسرة او من الكروموسومات الكاملة التي تفشل للانضمام الى النواة وبذلك فهي تمثل نتيجة تاثيرات سمية وراثية واخرى خلوية [20] . وتشير الدراسات الى وجود ترابط قوي بين التشوهات الكروموسومية والانوية الصغيرة باعتبار الاخيرة احد المظاهر النهائية لحدوث الكسور الكروموسومية [21] وهو ما يلاحظ من الشكل(1 , 2) الخاصة بهذه الدراسة . وفي الدراسة الحالية لوحظ انخفاض في معامل انقسام الخلايا كما موضح في الشكل (3)



الشكل (3): تاثير مبيدoxa في معامل انقسام الخلايا في الخلايا اللمفاوية

والملاحظ ان التراكيز الواطئة (0.1 و 0.5×10^{-5} مولاري) لم تؤثر في معامل الانقسام وبقيت الفروق غير معنوية ($P<0.01$) ، ولكن التراكيز العالية (5 و 25 و 50×10^{-5} مولاري) قد ادت الى نقصان المعامل بنسبة 29 % و 40 % و 47 % على التوالي من القيمة الاصلية لمعاملة السيطرة وكان معامل الارتباط سالب القيمة ($r = - 0.914$) . والتاثير على معامل الانقسام يعكس السمية الخلوية في الغالب [15] ، والتعرض للمبيدات يؤدي غالبا الى خفض معامل انقسام الخلايا اللمفاوية [22,23] .

ولقد وجد ان المبيدات مثل مجموعة الكاربامات التي ينتمي اليها المبيد قيد الدراسة تقتل الخلايا القاتلة الطبيعية NK من مكونات الجهاز المناعي [24] ، وهذا احد الاسباب التي تضاف الى كون المبيدات من المسرطنات ، فضلا عن ان السرطانات ترتبط بحدوث الطفرات في الجينات العاملة في السيطرة عن النمو وكذلك المسئولة عن انظمة اصلاح DNA - كما ذكر اعلاه - وبزيادة الطفرات يزداد حدوث السرطانات [18,25] .

المصادر

1. WHO (2001). The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 2000 – 2002. Geneva: World Health Organization. Programme on Chemical safety.
2. Paz-y-Mino, C.; G. Bustamante; M. Sanchz and P. Leone (2002). Cytogenetic monitoring in a population occupationally exposed to pesticides in Ecuador. Environ. Health Perspect. 110: 1077 – 1080.
3. Carpenter, D.; K. Acaro and D. Spink (2003). Understanding the human health effects of chemical mixtures. Environ. Health Perspect. 110: 25 – 42.
4. شعبان ، عواد ونزار الملاح (1993) . المبيدات . دار الكتب للطباعة والنشر . الموصل / العراق .
5. Cox, C. (1999). Do pesticides contaminate our reviers, streams and wells? J. Pesti . Reform. 19: 6 – 8.
6. Andrade, M.; M. Reyzbal; E. Couelo and F. Vega (2005). Organochlorine pesticides in soils of the horticultural. Can. J. Soil Sci . 85: 273 – 282.
7. Baily , P ; D . Waite; L. Abbott and B. Repley (2005). Residues of DDT and other selected organochlorine agricultural. Can. J. Soil Sci . 85: 256 – 271.
8. 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 .
9. Fenech , M . (2000). the *in vitro* micronucleus technique. Mut . Res. 455: 83 – 93.
10. Benn, P. and A. Perle (1992). Chromosome Staining and Banding Technique. *In* "Human Cytogenetics" D. Rooney and B. Czpulkowski (Eds .) . Oxford University Press: UK.
11. 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.
12. 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.
13. Tawn , E . and D. Holdsworth (1992). Mutagen Induced Chromosome Damage in Human Lymphocytes. *In* "Human Cytogenetics" . D. Rooney and B. Czpulkowski (Eds .) . Oxford University Press: UK .
14. Duncan, D. (1955) . Multiple range and multiple F- test. Biometric 11 : 1 - 42
15. 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 .
16. Strachan , T . and A . Read (1999) . Human Molecular Genetics . BIOS Scientific Publishers , Ltd .
17. 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 .
18. Goldman , R . and Shields (2003) . Food Mutagens . J . Nutr. 133 : 965 – 973 .
19. Hagmar , L . ; S . Bonassi ; U . Stromberg ; A . Brogger ; L . Knudsen ; H . Norrpa and C . Reuterwell (1998) . Chromosomal aberrations in lymphocytes predict

human cancer : a report from the European study group on cytogenetic biomarkers and health . Cancer Res . 58 : 4117 – 4121 .

20. Fenech, M. (1993). The Cytokinesis – blocked micronucleus technique : a detailed description of the method and it's application to genetoxicity studies in human population . Mut . Res . 285 : 35 – 44 .
21. Meng , Z . and B . Zhang (1997). Chromosomal aberrations and micronuclei in lymphocytes of workers at a phosphate fertilizer factory. Mut. Res. 393: 283–288 .
22. 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 .
23. 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 .
24. Whalen, M.; B. Longanathan; N. Yamashita and T . Saito (2003) . Immunomodulation of human natural killer cell cytotoxic function by triazine and carbamate pesticides, Chem . Biol. Interact. 145: 311 – 319.
25. Berg, J. ; J. Tymoczko and L. Stryer (2002). Biochemistry. 5th edition. W .H. Freeman and Company. Oxford, UK.