مجلة تكريت للعلوم الصرفة، 21 (4) 2016
ISSN: 1813 – 1662 (Print)
E-ISSN: 2415 – 1726 (On Line)

دراسة التأثير السمي الوراثي والخلوي للمبيد الفطري Propamocarb-HCl في الفئران البيض

ضحى صلاح نوري[1] ، وجدي صبيح صادق[2] ، عادل فوزي شهاب[2]

[1]كلية الزراعة ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

[2]قسم علوم الحياة ، كلية العلوم ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

الملخص

صممت الدراسة بهدف تقييم السمية الوراثية والسمية الخلوية للمبيد الفطري Propamocarb- HCl إستخدام الفئران البيض السويسرية *Mus musculus*. تم تقدير تأثير المعاملة بالجرعتين 1355 و 2439 ملغم\كغم وزن جسم من المبيد باعتماد المؤشرات الوراثية (النوى الصغرى في خلايا نقي العظم, تقدير تلف الدنا في خلايا الكبد ونقي العظم بإستخدام تقنية تقدير الهالة).

اظهرت نتائج الدراسة زيادة معنوية في عدد النوى الصغرى عند مستوى $p\leq0.05$ تتناسب مع زيادة مدة التعرض فبلغت 420.40 ± 12.21عند المعاملة بالجرعة 1355ملغم\كغم وزن جسم وهي جرعة مكررة مقارنة بالسيطرة السالبة 4.80 ± 2.10 و 592.60 ± 5.83 عند المعاملة بالجرعة 2439 ملغم\كغم وزن جسم وهي جرعة منفردة. وكذلك فقد لوحظ تغير في النسبة المئوية لكريات الدم الحمر غير الناضجة في نقي العظم اذ ازدادت مع زيادة مدة المعاملة اذ بلغت 11.23% عند المعاملة بالجرعة 1355 ملغم\كغم وزن جسم و 10.62% عند المعاملة بالجرعة 2439 ملغم\كغم وزن جسم مقارنة مع 9.71 % في السيطرة السالبة. اما بالنسبة لعدد كريات الدم الحمر غير الناضجة الحاوية على النوى الصغرى فقد وجدت زيادة معنوية تتناسب مع زيادة مدة المعاملة فبلغت 310.60 ± 1.36 مع الجرعة 1355 ملغم\كغم وزن جسم و 243.60± 5.29 مع الجرعة 2439 ملغم\كغم وزن جسم مقارنة بالسيطرة السالبة 2.80 ± 1.06.

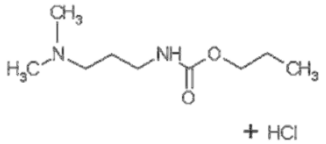
كما تسبب المبيد Propamocarb-HCl بحدوث تلف في دنا خلايا الكبد وخلايا نقي العظم اذ بلغت قيمة OTM لخلايا نقي العظم 2.01± 58.40 عند المعاملة بالجرعة 2439 ملغم\كغم وزن جسم بينما بلغت 0.66±3.20 في السيطرة السالبة. اما في خلايا الكبد فقد بلغت قيمة OTM 61.80 ± 7.57 عند المعاملة بالجرعة 2439 ملغم\كغم وزن جسم بينما بلغت 8.00± 1.38 في السيطرة السالبة. وكانت النسبة المئوية للخلايا ذات الدنا المتضرر 25.88 % في نقي العظم و 30.62 % في الكبد.

الكلمات المفتاحية: النوى الصغرى, تقنية تقدير الهالة, المبيد الفطري Propamocarb- HCl.

المقدمة

تعد المبيدات مركبات كيميائية تساعد في السيطرة على الآفات الزراعية. وينتج عن استخدامها تأثيرات جانبية ذات خطر كبير على البيئة وصحة الانسان. وتتنوع المبيدات المستعملة في مجال الزراعة لغرض القضاء على الآفات الزراعية المختلفة(2) ويمكن ان يحدث التعرض غير المقصود للمبيدات عند إستعمال هذه المركبات(1). وقد ثبت ان للكثير من الامراض علاقة وثيقة بالتعرض للمبيدات(3-5). كما ان المبيدات تؤثر في الخصوبة وتسبب الاجهاض او انجاب اطفال ذوي تشوهات في الانسان(6). ويزداد تأثير المبيدات بزيادة مدة التعرض اذ يزداد التأثير السمي نتيجة الفعل التراكمي(7). وتعد المبيدات الفطرية مبيدات مهمة واسعة الإنتشار في البيئة(8), وإن سمية المبيدات الفطرية غير مقتصرة على الآفة الزراعية اذ تتعدى ذلك الى الثدييات(9) ومن ضمنها الإنسان(10).

والمبيد الفطري Propamocarb- HCL واسمه الكيميائي Propyl (dimethylamino) propyl carbamate monohydrochloride [3] – وهو مبيد فطري جهازي بحالة سائلة يصنف ضمن مجموعة كارباميت Carbamate ويحتوي على المادة الفعالة Previcur – N(11), ويستخدم في السيطرة على الفطريات من الانواع *Pythium spp.* و *Phytophthora spp.* على أوراق النباتات والأجزاء الخشبية منها(12). والصيغة الكيميائية لهذا المبيد هي $C_9H_{21}CLN_2O_2$ (13) ووزنه الجزيئي 224.73 دالتون والصيغة التركيبية للمبيد الفطري Propamocarb- HCL هي



شكل (1) يوضح الصيغة التركيبية للمبيد الفطري Propamocarb-HCL (14)

تهدف هذه الدراسة الى تقدير السمية الخلوية والسمية الوراثية للمبيد الفطري Propamocarb-HCL بإستخدام اختبار النواة الدقيقة Micronucleus test وتقنية تقدير الهالة Comet assay في الفئران المختبرية البيضاء.

المواد و طرق العمل

– الحيوانات المختبرية المستخدمة:

تم استخدام ذكور الفئران البيض السويسرية *Mus musculus* بعمر 8-12 اسبوع ووزان يتراوح بين 20-30 غم في الدراسة الحالية, تم الحصول على الحيوانات من المركز الوطني للبحوث والرقابة الدوائية – بغداد, العراق, وتم وضع الحيوانات في أقفاص من البلاستيك مغطاة بمشبك سلكي في غرفة مكيفة لغرض التأقلم وتم تجهيز الفئران بالماء

والعليقة المصنعة محلياً من قبل الشركة العامة لصناعة الأدوية و المستلزمات الطبية – سامراء, العراق.

– المواد الكيميائية:

تم الحصول على المبيد من السوق المحلي في مدينة تكريت, العراق. واستخدم العقار (MTX) Methotrexate كسيطرة موجبة وتم حساب الجرعة المعطاة من العقار MTX حسب جداول Paget and Barnes(15) كما تم استخدام زيت الذرة كسيطرة سالبة.

تم تحضير المحاليل الخاصة باختبارات الوراثة الخلوية حسب طريقة Yassen وجماعته (16,17) والكواشف والمحاليل الخاصة بتقنية تقدير الهالة حسب طريقة Dhawan و جماعته(20).

– طرق العمل:

*** حساب الجرعة المميتة النصفية median lethal dose LD50 للمبيد Propamocarb HCl**

تم تحديد الجرعة المميتة النصفية LD_{50} median lethal dose للمبيد Propamocarb HCl حسب طريقة Dixon(18) و كانت قيمتها 2710 ملغم /كغم وزن الجسم .

*** إختيار الجرع و طريقة التجريع**

تم اختيار الجرعتين (1335 ملغم /كغم وزن الجسم) 50% من قيمة LD_{50} بهيئة جرعة منفردة لأربع أيام متتالية من كل اسبوع و لمدة اربعة اسابيع و(2349 ملغم /كغم وزن الجسم) 90% من قيمة LD_{50}بهيئة جرعة منفردة لمرة واحدة. واعطيت مجموعة السيطرة السالبة زيت الذرة المستخدم في اذابة المبيد. وتم تجريع الحيوانات عن طريق الفم باستخدام محقنة تم تحويرها لهذا الغرض(44).

*** اختبار تقدير النوى الدقيقة في كريات الدم الحمر غير الناضجة PCEs في نقي العظم للفأر الأبيض**

اجري الاختبار حسب طريقة Schmid(19)

*** تصبيغ الشرائح**

تم تلوين الشرائح بملون May-Gruenwald لمدة 7 دقائق ثم بالجمزا لمدة 3 دقائق.

*** فحص وحساب النوى الدقيقة**

تم الفحص المجهري بإستخدام المجهر الضوئي باستعمال العدسة العينية (40X) ثم تم تسجيل كريات الدم الحمراء غير الناضجة الحاوية على النوى الدقيقة وذلك من خلال فحص 500 خلية لكل شريحة (2000 خليةاحيوان) وحساب نسبة كريات الدم غير الناضجة من المجموع الكلي للخلايا.

*** دراسة تأثير المبيد الفطري Propamocarb Hydrochloride في دنا الخلايا الكبدية ونقي العظم في الفئران البيض باستخدام تقنية Comet assay (SCGE)**

تحضير الشرائح للترحيل:

* تم تحضير الأكاروز منخفض درجة الذوبان (Low Melting Point Agarose) LMPA 0.5 % بإذابة 0.1 غم من LMPA في 20 مل من PBS (PH=7.4) خالي من (Ca++,Mg++).

* تم تحضير LMPA 0.1 % باذابة 0.2 غم من LMPA في 20 مل من PBS خالي من(Ca++,Mg++).

* تم تحضير الأكاروز اعتيادي درجة الذوبان NMA 1% (Normal Melting point Agarose) بإذابة 500 ملغم من NMA في 50 مل من ddw وسخن حتى الغليان. غطست الشرائح النظيفة والمجمدة لحد ثلثها العلوي في الأكاروز المغلي ورفعت برفق. وتم مسح الجهة السفلى من الشريحة لإزالة الاكاروز ثم وضع غطاء الشريحة ووضعت في صحن على سطح مستوي لتبرد ويمكن أن تجفف الشريحة بالهواء أو تسخن إلى درجة 50 °م للتجفيف الأسرع. تم تحضير الشرائح قبل استعمالها بيوم واحد وتم وضع العلامات عليها قبل الاستعمال.

طريقة العمل

تم إجراء الدراسة حسب طريقة Dhawan وجماعته(20).

التصبيغ

أضيف 30 مايكروليتر من 1X Ethydium bromid (EtBr), تركت لمدة خمس دقائق وغمرت بماء مقطر مبرد لإزالة الصبغة الزائدة. أعيد بعدها غطاء الشريحة وجرى تسجيل الشريحة مباشرة.

فحص وحساب الخلايا ذات الدنا التالف

أجريت ملاحظة ألدنا المصبغ بالـ EtBr باستعمال العدسة 40X من خلال مجهر تألقي Fluorescent microscope. وتم استخدام نظام تحليل صور الهالة الخماسي, اذ جرى اختيار صور 100 خلية منتقاة عشوائيا (50 خلية من كل من الشريحتين المكررة) لكل حيوان وحللت بالطريقة التي وصفها Collins و جماعته(21).

التحليل الاحصائي:

تم استخدام برنامج الحقيبة الإحصائية للعلوم الاجتماعية (SPSS) Statistical Package Social Science (17.5) في مستوى $P\leq0.05$ و $P\leq0.01$ كما استخدم الاختبار التائي (t-test).

النتائج

اظهرت نتائج الدراسة الحالية زيادة النسب المئوية لكريات الدم الحمر غير الناضجة في نقي عظم الفئران البيض المعاملة بالجرعتين 1355 و 2439 ملغمكغم وزن جسم من المبيد الفطري Propamocarb HCl اذ بلغت11.23 و 10.62 على التوالي (الجدول 1), وهذا يشير الى تأثير الجرعتين المذكورة من المبيد في حث الخلايا المولدة لكريات الدم الحمر على زيادة في انقسامها لإنتاج خلايا أكثر وتعويض الخلايا المفقودة نتيجة التأثير السمي للمبيد في الحيوان المعامل. وقد يكون للمبيد دورا في حث عملية تمايز الخلايا وإنتاج خلايا دموية تعمل على زيادة تجهيز الاوكسجين الضروري في عملية إزالة السمية, ويبدو ذلك أكثر وضوحا مع الجرعة 1355 ملغمكغم وزن جسم وهذا يعد منطقيا لاحتمال قدرة الجسم في إزالة سمية الجرعة الأصغر من المبيد. كذلك يبين الجدول (1) وجود زيادة معنوية عند مستوى $p\leq0.05$ في كريات الدم الحمر غير الناضجة المحتوية على النوى الدقيقة اذ بلغت 1.36 ± 310.60 و 243.60 ± 5.29 مع الجرعتين 1355 و 2439

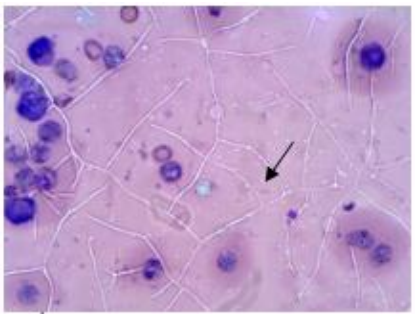
ملغم\كغم وزن جسم على التوالي مقارنة مع السيطرة السالبة ± 1.06 2.80 وزيادة معنوية في النوى الدقيقة في كريات الدم الحمر غير الناضجة التي بلغت 420.40 ± 12.21 و 592.60 ± 5.83 مع الجرعتين 1355 و 2439 ملغم\كغم وزن جسم على التوالي مقارنة مع السيطرة السالبة اذ بلغت 4.80±2.10 وذلك قد يشير الى احتمالية وجود تأثير سمي وراثي أو\ و تأثير سمي خلوي ويبدو ان هذا التأثير يتناسب عكسيا مع الجرعة وهذا يعزز الاعتقاد ان الجرعة 1355 اكثر سمية من الجرعة 2439 وان الجرعة الأخيرة تقود الى خفض أعداد الخلايا القادرة على الانقسام بسبب موت تلك الخلايا.

جدول(1) النسب المئوية لكريات الدم الحمر غير الناضجة ومتوسطات كريات الدم الحمر غير الناضجة ذات النوى الدقيقة ومتوسطات النوى الدقيقة في نقي عظم فئران السيطرة السالبة والسيطرة الموجبة والفئران المعاملة بجرعتين مختلفة من المبيد الفطري Propamocarb HCl.

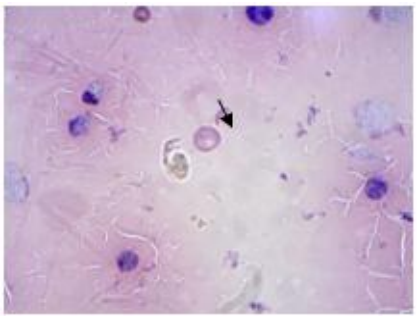
المعاملة / الجرعة ملغم/كغم وزن الجسم	عدد الحيوانات	الخلايا المفحوصة المتوسط الحسابي ± الخطأ القياسي	كريات الدم الحمراء غير الناضجة PCE_S %	كريات الدم الحمراء غير الناضجة ذات النوى الدقيقة المتوسط الحسابي ± الخطأ القياسي	النوى الدقيقة المتوسط الحسابي ± الخطأ القياسي
السيطرة السالبة	5	199.99 ± 20666.00	9.71	1.06 ± 2.80	2.10 ± 4.80
MTX 12.5	5	160.39 ± 10452.60	19.29	** 8.66 ± 463.20	**22.75 ± 912.60
Propamocarb HCl 1355	5	267.63 ± 17901.00	11.23	* 1.36 ± 310.60	** 12.21 ± 420.40
Propamocarb HCl 2439	5	207.30 ± 18928.00	10.62	** 5.29 ± 243.60	** 5.83 ± 592.60

***معنوي عند مستوى P≤0.05 (Paired – samples t-test)**

****معنوي عند مستوى P≤0.01 (Paired – samples t-test)**



الشكل (2) كرية دم حمراء غير ناضجةPCE لفأر من مجموعة السيطرة السالبة



شكل(3) كرية دم حمراء غير ناضجة PCE محتوية على نواة صغرى

ويبين الجدولين 2 و 3 مستويات التلف في دنا خلايا نقي العظم والنسب المئوية للخلايا ذات الدنا المتضرر في مجموعة السيطرة السالبة المعاملة بزيت الذرة ومجموعة السيطرة الموجبة المعاملة بالعقار ميثوتركسيت والمجموعة التي تمت معاملتها بالجرعة 2439 ملغم\كغم وزن جسم من المبيد الفطري Propamocarb HCl ويبدو فيها ارتفاع النسبة المئوية للخلايا ذات الدنا المتضرر في مجموعة الفئران المعاملة بالمبيد اذ بلغت 30.62 % مقارنة بالسيطرة السالبة 1.16%. كما تبين وجود فروق معنوية عند مستوى p≤0.05 في قيم OTM اذ بلغت 56.40 ± 2.01 في مجموعة الفئران المعاملة بالمبيد مقارنة بالسيطرة السالبة 3.20 ± 0.66. ويبين الجدول 3 مستويات التلف في دنا خلايا الكبد والنسب المئوية للخلايا ذات الدنا المتضرر في مجموعة السيطرة السالبة المعاملة بزيت الذرة ومجموعة السيطرة الموجبة المعاملة بالعقار ميثوتركسيت والمجموعة التي تمت معاملتها بالجرعة 2439 ملغم\كغم وزن جسم من المبيد الفطري Propamocarb HCl ويبدو فيها ارتفاع النسبة المئوية للخلايا ذات الدنا المتضرر في مجموعة الفئران المعاملة بالمبيد اذ بلغت 30.62 % مقارنة بالسيطرة السالبة 3.25 %. كما تبين وجود فروق معنوية عند مستوى p≤0.05 في قيم OTM اذ بلغت 61.80 ± 7.57 في مجموعة الفئران المعاملة بالمبيد مقارنة بالسيطرة السالبة 1.38 ± 8.00. وتظهر نتائج الجدولين 2 و 3 ان هناك اختلافا في النسب المئوية للخلايا ذات الدنا المتضرر ومستويات التلف في دنا كل من خلايا نقي العظم وخلايا الكبد, اذ يبدو ان النسبة المئوية للخلايا ذات الدنا المتضرر ومستويات التلف تكون اعلى في خلايا الكبد مقارنة مع خلايا نقي العظم وهذا امر متوقع والسبب ان عمليات ازالة السمية تتم في نسيج الكبد وان الدم المحمل بالمواد السامة يمر بالكبد ولا يمر في نقي العظم.

جدول (2) يوضح مستويات التلف في دنا خلايا نقي العظم للفئران البيض لفئران السيطرة السالبة والسيطرة الموجبة MTX والفئران المعاملة بجرعتين مختلفتين من المبيد Propamocarb- HCl

المعاملة / الجرعة ملغم\كغم وزن جسم	عدد الحيوانات	العدد الكلي للخلايا المفحوصة	النسبة المئوية للخلايا ذات التلف	Olive Tail Moment (OTM) المتوسط الحسابي ± الخطأ القياسي
السيطرة السالبة	5	517	1.16	0.66 ± 3.20
Methotrexate 12.5	5	516	38.76	**3.32 ± 93.80
Propamocarb- HCl 2439	5	514	25.88	**2.01 ± 58.40

*معنوي عند مستوى إحتمالية P≤0.05 (Paired – samples t-test)

** معنوي عند مستوى إحتمالية P≤0.01 (Paired – samples t-test)

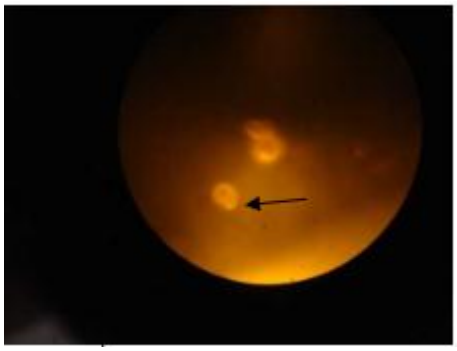
جدول (3) النسب المئوية للخلايا ذات التلف و قيم OTM في دنا خلايا كبد الفئران البيض لمجموعة السيطرة السالبة والسيطرة الموجبة MTX والفئران المعاملة بجرعتين مختلفتين من المبيد الفطري Propamocarb HCl

المعاملة / الجرعة ملغم\كغم وزن جسم	عدد الحيوانات	العدد الكلي للخلايا المفحوصة	النسبة المئوية للخلايا ذات التلف	Olive Tail Moment (OTM) المتوسط الحسابي ± الخطأ القياسي
السيطرة السالبة	5	529	3.25	1.38 ± 8.00
Methotrexate 12.5	5	513	43.86	**3.16 ± 107.60
Propamocarb- HCl 2439	5	494	30.62	**7.57 ± 61.80

* معنوي عند مستوى إحتمالية P≤0.05 (Paired – samples t-test) ** معنوي عند مستوى إحتمالية P≤0.01 (Paired – samples t-test)

الشكل (4) دنا طبيعي لخلية من نقي العظم لفأر من مجموعة السيطرة السالبة

الشكل (6) يوضح دنا غير طبيعي (ذيل اكبر من قطر الرأس) لخلية من نقي العظم لفأر من المجموعة المعاملة بالمبيد



الشكل(5) دنا غير طبيعي (ذيل يساوي قطر الرأس) لخلية من نقي العظم لفأر من المجموعة المعاملة بالمبيد

المناقشة

- السمية الوراثية والتسرطن

تصنف المواد الكيميائية التي تزيد خطر الاصابة بالسرطان الى مواد ذات خواص سمية وراثية ومواد غير سامة وراثيا, وهي عملية لها تأثير في مجال تنظيم اسلوب التعامل مع المواد الكيميائية. وقد عرف Butter-Worth, `1990 العامل السام وراثيا بانه المادة كيميائية او المتأيض الذي يكون فعله البيولوجي الابتدائي متمثلا بتغيير المعلومة المشفرة في الدنا. ويمكن عادة التعرف على المركبات الكيميائية التي تظهر مثل هذا الفعل عن طريق طرق التقدير التي تقيس قدرة التفاعل مع الدنا, مثل حث الطفرات, حث اصلاح الدنا, او التأثيرات الوراثية الخلوية. وقد عد الكثير من طرق التقدير المذكورة بانها تساعد على

التنبؤ بالقدرة التسرطنية. اما المواد الكيميائية غير السامة وراثيا فانها تفتقر للسمية الوراثية كفعل بيولوجي ابتدائي. ورغم ان هذه العوامل قد تسبب احداث سمية وراثية كنتيجة ثانوية, مثل فرط النمو الخلوي, الا ان فعلها الابتدائي لا يتضمن التفاعل مع الدنا Dougla Mc Gregor,.

– دراسة تأثير المبيد Propamocarb HCl في إستحداث تكوين النوى الصغرى (MN) في ذكور الفئران البيض

يبين الشكل (1) كرية دم حمراء غير ناضجة PCE طبيعية من نقي عظم للفأر من مجموعة السيطرة السالبة والشكل (2) كرية دم حمراء غير ناضجة PCE محتوية على نواة صغرى من نقي عظم للفأر من مجموعة معاملة بالمبيدPropamocarb-HCl. ويبين الجدول (1) النوى الصغرى في خلايا نقي عظم الفئران البيض بعد المعاملة بالجرع المختلفة من المبيد Propamocarb-HCl والسيطرة السالبة والسيطرة الموجبة (MTX).

استخدم هذا الاختبار في الدراسة الحالية لتقييم السمية الخلوية والسمية الوراثية للمبيد الفطري Propamocarb-HCl ويظهر الجدول (1) زيادة في النسبة المئوية لكريات الدم الحمراء غير الناضجة polychromatic erythrocytes (PCE_S) في نقي عظم ذكور الفئران البيضاء عند المعاملة بالجرعة 1355 ملغم\كغم وزن جسم اذ بلغت 11.23% وعند المعاملة بالجرعة 2439 ملغم\كغم وزن جسم كانت الزيادة اقل اذ بلغت 10.62% وهي نتائج ذات تغيير قليل عن السيطرة السالبة البالغة 9.71% وهذا يوضح بان المبيد المذكور قد يكون ذو سمية خلوية لانه أثر على النسبة المئوية لكريات الدم الحمراء غير الناضجة في نقي عظم ذكور الفئران البيضاء وهذه النتائج تتفق مع ما توصل اليها الباحثين Aydemir و Bilaloglu عند إختبارهم للمبيد نفسه على الفئران البيض السويسرية لمعرفة مدى السمية الخلوية للمبيد وتوصلا من خلال بحثهما الى ان هناك إحتمالية للسمية الخلوية للمبيد لانه اثر على نسبة كريات الدم الحمراء غير الناضجة والناضجة Normochromatic erythrocytes وانه أثر على معامل الانقسام الخيطي Mitotic Index في خلايا نقي العظم للفئران البيض(11).

اظهرت كذلك نتائج الجدول (1) ان المتوسط الحسابي لعدد النوى الصغرى مع الجرعة 1355 ملغم\كغم وزن جسم وهي جرعة مكررة بلغ 12.21±420.40 وهي ذات دلالة معنوية عند مستوى $p\leq0.05$ مقارنة بالسيطرة السالبة 2.10±4.80 وكان المتوسط الحسابي مع الجرعة المنفردة 2439 ملغم\كغم وزن جسم 5.83±592.60 وهي ذات دلالة معنوية عند مستوى $p\leq0.05$ مقارنة بالسيطرة السالبة 2.10±4.80 ايضاً. وهذا يدل على إن المبيد قد يكون ذو سمية وراثية لانه تسبب في زيادة تكرار الانوية الصغرى وهذه الزيادة ذات علاقة تتناسب مع زيادة مدة التعرض, ان هذه النتائج تتوافق مع ما أكدت عليه دراسات أجريت على جماعات سكانية متعرضة الى المبيدات فقد اوضحت تلك الدراسات بوجود علاقة بين تكرار النوى الصغرى ومدة التعرض الى المبيدات اذ كلما زادت مدة التعرض كلما زاد تكرار النوى الصغرى (33,32,31,30,29,28).

وبينت نتائج الجدول (1) بأن المتوسط الحسابي لعدد كريات الدم الحمر غير الناضجة الحاوية على النوى الصغرى عند المعاملة بالجرعة 2439 ملغم\كغم وزن جسم كانت ذات دلالة معنوية عند مستوى معنوية $p\leq0.05$ فقد بلغت 5.29±243.60 بينما كانت المعاملة بالجرعة 1355 ملغم\كغم وزن جسم ذات دلالة معنوية اقل 1.36±310.60 وذلك بالمقارنة مع السيطرة السالبة 1.06±2.80 وهذا يقود الى افتراض وجود سمية وراثية للمبيد عند التراكيز العالية وذلك بقابليته على إستحداث نوى صغرى في كريات الدم الحمراء الغير الناضجة وهي الميزة التي تمتاز بها المواد السامة وراثياً(34) وهذا لا يتفق مع ما توصل اليه Meerts عند معاملة فئران بيض بتراكيز مختلفة من المبيد Propamocarb-HCl اذ تشير نتائج بحثه الى عدم وجود سمية وراثية للمبيد بمختلف التراكيز في خلايا نقي العظم للفئران البيض (35).

كما تم أستخدام العقار (MTX) Methotrexate في التجربة كسيطرة موجبة وقد حصل على اعلى دلالة معنوية في جميع البيانات المذكورة في الجدول (1) بالمقارنة مع السيطرة السالبة وذلك يعود الى ان العقار يحث تكوين النوى الصغرى بشكل كبير وهذا ما اكدت عليه الدراسات بقدرة العقار على استحداث النوى الصغرى (36). وتعد تقنية النوى الصغرى طريقة مراقبة حيوية للسمية الوراثية وتستخدم بصورة واسعة لتقييم خطورة التعرض الى المبيدات (23,22). وهي تقنية بسيطة وحساسة لإكتشاف الكروموسومات المتكسرة والكروموسومات الكاملة التي لم تشترك بالانقسام الخلوي وكذلك الفعالية الكلاستوجينية Clastogenic activity والفعالية الانيوجينية Aneugenic activity(25,24) تنشأ الاتوية الصغرى من قطع كروموسومية او كرموسومات كاملة لم تشترك في الانقسام الخلوي كتسلسل مكمل للمادة الوراثية وهذا يمثل الاصل الكلاستوجيني Clastogenic origin أو انها تنشأ من تغير في الجهاز الخيطي وهذا يمثل الاصل الانيوجيني Aneugenic origin (37,19, 38). كما اكدت دراسات عن وجود علاقة وطيدة بين الشذوذ الكروموسومي وتكوين النوى الصغرى (27,26).

– تقدير حث تلف الدنا في خلايا نقي العظم و الكبد لذكور الفئران البيض بإستخدام تقنية تقدير الهالة Comet assay

يبين الشكل (3) دنا طبيعي لخلية من نقي العظم لفأر من مجموعة السيطرة السالبة و تبين الاشكال (4) و (5) مستويات مختلفة من تلف الدنا في خلايا نقي العظم لفأر من المجموعة المعاملة بالمبيد Propamocarb-HCl, ويوضح الجدول (2) النسب المئوية للخلايا ذات التلف وقيم OTM في دنا نقي عظم الفئران البيض المعاملة بالمبيد والسيطرة السالبة والسيطرة الموجبة (MTX). كما يبين الجدول (3) النسب المئوية للخلايا ذات التلف وقيم OTM في دنا كبد الفئران البيض المعاملة بالمبيد والسيطرة السالبة والسيطرة الموجبة (MTX).

تعد تقنية تقدير الهالة Comet assay وتسمى ايضا Single Cell Gel Electrophoresis تقنية مهمة لدراسات الرصد البايولوجي للكائنات الحية في الكشف عن كسور السلسلة المفردة للدنا والتلف المعلم القواعد ومواضع الإصلاح بالقص. وتعد تقنية الهالة سريعة وحساسة لتحديد الأضرار التي تسببها بعض العوامل في المادة الوراثية على مستوى الخلية المفردة. إن دنا الخلايا المتضررة يظهر زيادة في الهجرة من النواة مكونا شكل المذنب (40, 39) .وتعتمد قدرة الدنا على الهجرة على حجم وعدد الكسور في الجزيئة نتيجة تأثير عامل معين(45), وعند تطبيق هذه التقنية لتقييم مستوى الضرر الحاصل في دنا المجاميع السكانية المتعرضة الى المبيدات أعطت نتائج موجبة (47,46).

يتطلب إجراء تقنية تقدير الهالة الحصول خلايا ذات عيوشية عالية المستوى التي تقارب 95 % وقد وجدت مستويات واطئة من تلف الدنا في مجموعة السيطرة السالبة خلال التجربة.

وبينت نتائج الجدول (2) النسبة المئوية للخلايا ذات ذيول الهالة والتي تمثل الخلايا ذات الدنا المتضرر لكل من السيطرة السالبة والموجبة والمعاملة بالجرعة 2439 ملغم\كغم وزن جسم من المبيد Propamocarb-HCl في خلايا نقي العظم اذ بينت النتائج زيادة في النسب المئوية للخلايا ذات الدنا التالف لكل من مجموعة السيطرة الموجبة (المعاملة بالعقار MTX) والمجموعة المعاملة بالمبيد. كما اظهرت نتائج الجدول (2) قيم Olive Tail Moment (OTM) (حاصل ضرب طول الذيل مع كثافته (41) في دنا خلايا نقي العظم لذكور الفئران البيض فقد اوضحت النتائج بأن المعاملة بالمبيد Propamocarb-HCl كانت ذات دلالة معنوية عند مستوى $p\leq0.05$ اذ بلغت 2.01±58.40 مقارنة مع السيطرة السالبة 0.66±3.20. وهذا يشير الى ان المبيد قد يكون عامل محطم للدنا ومسبب لتلفه, وان ما توصل اليه Capriglione وجماعته عند إجرائهم لتقنية SCGE لتقدير مستوى تلف الدنا للمبيد الفطري Thiophanate – methyl على الحيوان الفقري *Podarcis sicula* يبين زيادة معنوية في طول ذيل الهالة في خلايا الحيوانات المتعرضة للمبيد (42).

وأظهرت نتائج الجدول (3) التلف الحاصل في دنا خلايا كبد الفئران البيض اذ كانت النسبة المئوية للخلايا ذات التلف أعلى مما هي عليه في دنا نقي العظم في كل من السيطرة السالبة والموجبة والمعاملة بالجرعة 2439 ملغم\كغم وزن جسم من المبيد Propamocarb-HCl. كذلك فإن قيم OTM كانت ذات دلالة معنوية عند مستوى $p\leq0.05$ عند المعاملة بالجرعة المذكورة فقد بلغت 7.57±61.80 مقارنة مع السيطرة السالبة 1.38±8.00. وهذه القيم اعلى مما في دنا نقي العظم, وهذا يعني أن كلا من النسبة المئوية للخلايا ذات ذيول الهالة والتلف الحاصل في دنا خلايا الكبد اعلى منها في خلايا نقي العظم وقد يرجع ذلك الى ان جهاز إزالة السمية يوجد في الكبد وهو الجهاز المايكروسومي الذي يعد جزء من الجهاز الدفاعي للجسم اذ يتم ايض معظم المواد داخل الكبد فهو يقوم بتحويلها من خلال إدخال تغيرات كيميائية عليها بحيث يمكن إتلافها والتخلص من مفعولها السام وإبرازها في عدة عمليات كمادة ايضية غير نافعة.

ان نتائج الجدولين (2) و (3) بالنسبة للمعاملة بالعقار MTX كانت ذات دلالة معنوية عند مستوى $p\leq0.05$ بالنسبة لدنا خلايا الكبد ودنا خلايا نقي العظم وقد بين Deng وجماعته عند في دراستهم تأثير العقار MTX على دنا الخلايا اللمفاوية للدم المحيطي لمجموعة من العمال المعرضين للعقار MTX بأن معدل طول الذيل (MTL) Mean Tail Length للدنا كان ذو دلالة معنوية عند مستوى $p\leq0.01$ (43).

المصادر

1. Albert, R.; Baker, S.; Doull, S.; Butler, G.; Nelson, N.; Peakall, D.; Pimentel, D.; Tardiff, R.G. (1992) Introduction, general conclusion and recommendations. In: Tardiff, R.G. (Ed.), Methods to assess adverse effects of pesticides on non-targe organisms. Wiley, New York, pp. 3–13.

2. Gabbianelli, R.; C. Nasuti; G. Falcioni and F. Cantalamessa (2004) Lymphocytes DNA damage in rats exposed to pyrethroids: effect of supplementation with vitamins E and C. Toxicology 203: 17-26 .

3. شعبان,عواد ونزار الملاح (1993). المبيدات. دار الكتب للطباعة و النشر. الموصل / العراق.

4. Pastor, S; A. Cerus; N. Xamena; C. Siffel and R. Marcos (2002) Occupational exposure to pesticides and cytogenetic and damage: results of Hungarian population study using the micronucleus assay in lymphocytes and buccal cells. Environ. Mol. mutagen . 40 : 101 – 109 .

5. Hagmar, L.; S. Bonassi; U. Stromberg; 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 .

6. Strachan, T. and A. Read (1999) Human Molecular Genetics . BIOS Scientific Publishers, Ltd.

7. Bolognesi, C.; Parrini, M.; Merlo, F. & Bonassi, S. (1993) Frequency of micronuclei in lymphocytes from a group of floriculturists exposed to pesticides. Journal of Toxicology and Environmental Health 40 (2-3): 405-411, ISSN: 1528-7394

8. Flodstrom, S.; Hemming, H.; Warngard, L.; Ahlborg, V.G. (1990) Promotion of altered hepatic foci development in rat liver cytochrome P450 enzyme induction and inhibition of cell–cell communication by DDT and some structurally related organohalogen pesticides. Carcinogenesis 11, 1413–1418.

9. Belpoggi F; Soffritti M; Minardi F; Bua L; Cattin E; Maltoni C. (2002) Results of long-term carcinogenicity bioassays on *tert*-amyl-methyl-ether

(TAME) and di-isopropyl-ether (DIPE) in rats. Ann NY Acad Sci:982:70–86.
10. Mendes, O.J.; Domingues, M.O.; Mendes da Costa, A. (2005). Waveletanalysis applied to magnetograms, Journal of Atmospheric andSolar-Terrestrial Physics, COLAGE speci issue.
11. Aydemir N. and Bilaloglu R. (2004) The investigation of the genotoxic effects of fenarimol and propamocarb in mouse bone marrow in vivo . Toxicology *L* . 147 : 73 – 78 .
12. Environmental Protection Agency (EPA) (1995) Pesticides And Toxic Substances 738-F-95-031.Propamocarb Hydrochloride, USA, pp:1-10 .
13. Bayer Crop Science, (2006). Propamocarb Hydrochloride . USA. Version 2. pp: 1-8.
14. Material Saftey Data Sheet . (2013). Propamocarb Hydrochloride .USA. Version 1. pp: 1-7.
15. Paget GE and Barnes JM. (1964) Toxicity tests. In: Evaluation of drug activities pharmacometrics. Laurence DR, Bacharach AL, editors. London and New York: Academic Press;. pp. 134–166.
16. Yaseen, N. Y. Humadi, A.A. Tawfiq, M.S. and Estivan, A.G. (1998) Cytogenetic studies on patients with chronic myelocytic leukemia. Med.J. Tikrit Univ., Vol 4 pp: 5- 9.
17. Yaseen, N. Y.(1990) Cytogenetic study on human colorectal cancer cell. Ph.D. thesis, Univ. of Sheffield.
18. Dixon W.J.(1965) The Up and Down Method for Small Samples . *American Statistical Association J*. Vol. 60, pp:967-978.
19. Schmid, W. (1975) The micronucleus test. Mutat. Res., Vol 31.pp.9-15.
20. Dhawan, A. N. Mathur, P. K. Seth (2001) The effect of smoking and eating habits on DNA damage in Indian population as measured in the Comet assay. Mutation Res 474(1-2):121-8.
21.Collins, A. R.; Ai-guo, M. and Duthie, S. J. (1995) The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutat. Res.*, Vol 366.pp. 69-77.
22. Bonassi, S.; Ugolini, D.; Kirsch-Volders M.; Stromberg, U.; Vermeulen, R. & Tucker, J.D.(2005) Human population studies with cytogenetic biomarkers: review of the literature and future prospectives. Environmental and Molecular Mutagenesis 45 (2-3): 258-270, ISSN:0267
23. Bonassi, S.; Znaor, A.; Ceppi, M.; Lando, W.P.; Chang, W.P.; Holland, N.; Kirsch-Volders, M.; Zieger, E.; Ban, S.; Barale, R.; Bigatti, M.P.; Bolognesi, C.; Cebulska-Wasilewska,A.; Fabianova, E.; Fucic, A.; Hagmar, L.; Joksić, G.; Martell, A.; Migliore, L.; Mirkova, E.; Scarfi, A.; Zijno, A.; Norppa, H. & Fenech, M. (2007) An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. Carcinogenesis 28 (3): 625-631, ISSN: 0143-3334
24.Landolt, ML. and Kokan, RM. (1983).Fish cell cytogenetics: a measure of Genotoxic effects of environmental pollutants . In: Nriagu JO(ed)Aquatic toxicology. Wiley, New York , pp:335-352.
25.Al-Sabti, K. and Metcalfe, CD. (1995) Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water . Mutat Res 323:121-135 .
26.Abramsson Zetterberg, L.(1997)Chromosome aberration detectied by the flow cytometer based micronucleus assay . Acta Univ.Ups.278 pp:109-113.
27. Bonassi, S.;Neri, M.; Lando, C.; Ceppi, M.; Lin, Y.-P.; Chang, W.P.; Holland, N.; Kirsh-Volders, M.; Zeiger, E.; Fenech, M.; (2003) Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the human Micronucleus project. Mutat. Res. 543, 155–166.
28. Joksić, G.; Vidaković, A. & Spasojević-Tišma, V. (1997) Cytogenetic monitoring of pesticide sprayers. Environmental Research 75 (2): 113-118, ISSN: 0013-9351
29. Pasquini, R.; Scassellati-Sforzolini, G.; Angeli, G.; Fatigoni, C.; Monarca, S.; Beneventi, L.; DiGiulio, A.M. & Bauleo, F. (1996) Cytogenetic biomonitoring of pesticide-exposed
farmers in central Italy. Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology
15 (1): 29-39, ISSN: 0731-8898
30. Falck, G.C. M.; Hirvonen, A.; Scarpato, R.; Sirkku, T.; Saarikoski, S.; Migliore, L. & Norppa,H. (1999) Micronuclei in blood lymphocytes and genetic polymorphism GSTM1,GSTT1 and NAT2 in pesticide exposed greenhouse workers. Mutation Research 441 (2): 225-237, ISSN: 1383-5718
31. Bolognesi, C.; Perrone, E. & Landini, E. (2002) Micronucleus monitoring of a floriculturist population from western Liguria, Italy. Mutagenesis 17 (5): 391-397, ISSN 0267-8357.
32.Bhalli, J.A.; Khan, Q.M.; Haq, M.A.; Khalid, A.M. & Nasim, A. (2006) Cytogenetic analysis of Pakistani individuals occupationally exposed to pesticides in a pesticide production industry. Mutagenesis 21 (2): 143–148, ISSN 0267-8357.
33. Costa, C.; Teixeira, J.P.; Silva, S.; Roma-Torres, J.; Coehlo, P.; Gaspar, J.; Alves, M.; Laffon, B.; Rueff, J. & Mayan, O. (2006) Cytogenetic and molecular biomonitoring of a
Portuguese population exposed to pesticides. *Mutagenesis* 21 (5): 343-350, ISSN: 0267-8357
34. Carpenter, D.; K. Acaro and D. Spink (2003) Understanding the human health effects of chemical mixture . Environ . Health Perspect . 110:25-42.
35.Meerts, I.A.T.M. (2001) Micronucleus test in bone marrow cells of the mouse with Proplant (propamocarb HCL 722g/l). Unpublished report No.295561 from Notox, s-Hertogenbosch, Netherlands. Submitted to WHO by Chimac Agriphar, Ougree, Belgium.
36. lARC Monographs(1987) Suppl. 6, 372-374.
37. Heddle, J.A., M.C. Cimino, M. Hayashi, R. Romagna,. M.D. Shelby, J.D. Tuker, P.Vanparys and J.T. Mac Gragor, (1991) Micronucleus and index of

damage:. past, present and future. Environ. Mol. Mutatgen., 18:277-291
38. Norppa, H. and C.M. Flack, (2003) What do human micronuclei contain? Mutagenesis, 18:221-233.
39. Fairbairn, D.W.; Olive, P.L. & O'Neill, K.L. (1995) The comet assay: a comprehensive review. Mutation Research 339 (1): 37-59, ISSN: 1383-5718.
40. Singh, N.P.; McCoy, M.T.; Tice, R.R. & Schneider, E.L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Experimental Cell Research 175 (1): 184-191, ISSN: 0014-4827
41.Collins R.A., (2004) The Comet Assay for DNA Damage and Repair. Molecular Biotechnology. Vol. 26pp:249-261.
42.Capriglione T.; De Iorio S.; Gay F.; Capaldo A.; Vaccaro M. C.; Morescalchi M. A. and Laforgia V. (2011) Genotoxic effects of fungicide thiophanate-methyl on *Podarcis sicula* assessed by micronucleus test, comet assay and chromosome analysis. Ecotoxicology J. Vol.20. pp:885-891.
43. Deng, H.; Zhang, M.; He, J.; Wu, W.; Jin, L.; Zheng, W.; Lou, J.; and Wang, B. (2005) Investigating genetic damage in workers occupationally exposed to methotrexate using three genetic end-points. Mutagenesis, 20, 351–35746(3):1034-1041.
44. حسن، مفيد قائد احمد (2001) تثبيط الأثر السمي الوراثي لبعض المسرطنات الكيميائية باستخدام مستخلصات نباتية. أطروحة دكتوراه.كلية العلوم ,جامعة بابل .
45.Garaj-Vrhovac, V. and Zeljezic, D. (2001) Cytogenetic monitoring of a Croation population occupationally exposed to a complex mixture of pesticides. Toxicology, 165, 153–162.
46. Remor, A.L.; Caprini Totti, C.; Alves Moreira, D.; Pimentel Dutra, G.; Dahlstrom Heuser, V. & Boeira J.M. (2009) Occupational exposure of farm workers to pesticides: biochemical parameters and evaluation of genotoxicity. Environment International 35 (2): 273-278, ISSN: 0160-41206
47. Rohr, J.R.; Romansic, J.M.,& Raffel, T.R. (2010) Linking global climate and temperature variability to widespread amphibian declines putatively caused by disease. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107, 8269–8274.

Study Genotoxic and Cytotoxic effect of the fungicide Propamocarb- HCl in Albino mice

Dhuha Salah Noori[1] , Wajdi Sabeeh Sadek[2], Adel Fawzi Shehab[2]
[1] *Agriculture College , Tikrit University , Tikrit , Iraq*
[2] *Biology department , College of Science , Tikrit University , Tikrit , Iraq*

Abstract
The study was designed to evaluate genotoxicity and cytotoxicity of the fungicide probamocarb- HCl using Swiss white mice *Mus musculus* .
The evaluation of treatment effects with the dosage 1355 and 2349 mg/kg .bw of the fungicide was depended on genomarkers (Micronuclei in bone- marrow cells, evaluation of DNA damage in liver and bone-marrow cells using comet assay).
The results showed significant linear increase at $p \leq 0.05$ between time of treatment and micronuclei which reached 420.40 ± 12.21 with replicate treatment of the dosage 1355 mg/kg.bw of the fungicide compared with 4.80 ± 2.10 for negative control and 592.60±5.83 with single dosage of 2493 mg/kg. bw of the fungicide. Change in the percentage of polychromatic erythrocytes also observed which have increased in linear manner with the increased time of treatment. It reached 11.23% with replicate treatment of the dosage 1355 mg/kg.bw of the fungicide and 10.62% with the single treatment of the dosage 2493 mg/kg.bw. compared with 9.71 for negative control. The number of micronucleated polychromatic erythrocytes was significantly increased in linear manner with the replicate treatment of the dosage 1355 mg/kg.bw of the fungicide which reached 310.60 ± 1.36 and 243.60 ± 5.29 with the single dosage of 2493 mg/kg.bw of the fungicide compared with 2.80 ± 1.06 for negative control.
Treatment with Propamocarb-HCl induced damage in DNA of liver and bone-marrow cells. The value of OTM reached 58.40 ± 2.01 in bone-marrow cells with the single dosage of 2493 mg/kg.bw compared with 3.20 ± 0.66 for negative control. While it reached 61.80 ± 7.57 compared with 8.00 ± 1.38 for negative control in liver cells. The percentage of cells with damaged DNA reached 25.88% in bone-marrow and 30.62% in liver.