تاثير مبيد السايبرمثرين في المحتوى الوراثي في الاغنام

سعد محمد ندا* تمارة قاسم محمد** جلال ايليا القس**

الملخص

اجريت هذه الدراسة بهدف اختبار القوة التطفيرية لمبيد السايبرمثرين المستعمل في القضاء على الطفيليات الخارجية عن طريق تغطيس الاغنام في محلول هذا المبيد. تم اخذ نماذج دم سبعة كباش بعمر 3 سنوات (مجموعة سيطرة)، ومن ثم غطست هذه الكباش بمبيد السايبرمثرين وبتركيز 0.75 مل/لتر وهي الجرعة الموصى بها واخذت نماذج الدم منها بعد مرور 24 و48 ساعة، 7 و14 يوماً من التغطيس. زرعت خلايا الدم اللمفاوية فلوحظ ان عملية التغطيس بالمبيد قد سببت زياده في التبادل الكروماتيدي الشقيقي وانخفاضاً في معامل تضاعف الخلايا بعد 24 و48 ساعة من التغطيس في حين بدأت قيم التبادل الكروماتيدي الشقيقي بالانخفاض وقيم معامل التضاعف بالارتفاع بعد 7 ايام من التغطيس واقتربت من الحالة الطبيعية بعد اسبوعين من التغطيس, كما سبب المبيد تثبيطاً غير معنوي في معدل معامل انقسام الخلايا اللمفية في الاغنام.

المقدمة

تعد الطفيليات الخارجية من المشاكل التي تواجه الثروة الحيوانية وتطورها نتيجة لتثبيط النمو وخفض انتاجها واحتمالية كونها واسطة لانتقال بعض الامراض الخطرة الى الحيوان (2).

لذا فان السيطرة على الطفيليات والحد من انتشارها قد فسح المجال امام شركات الصناعات الكميائية لانتاج انواع مختلفة من المبيدات مما يستوجب على جهات البحث العلمي بيان التاثيرات الجانبية لتلك المبيدات من حيث سميتها للبيئة والانسان والحيوان ومن هذه المبيدات مبيد السايبرمثرين.

ينتمي مبيد السايبرمثرين **Cypermethrin** الى مجموعة البرثرويد **Pyrthroids** والذي يوجد بصورة طبيعية في زهرة الاقحوان (***Chrysanthemum cineraria***) بنسبة **0.1-2%**. حيث استعملت مجموعة **Pyrthroid** بشكل واسع في الاونة الاخيرة كبديل عن مبيد **Organophosphates** وذلك لكون المجموعة الاولى اقل سمية من المبيد الاخير فيما اذا استعمل ضمن الحدود المسموح بها (23).

اوضحت منظمة الصحة العالمية **WHO** سنة 1992 (24) ان لمبيد السايبرمثرين تاثيراً سمياً وراثياً على الكائنات المتعرضة له وتتباين شدة هذا التاثير باختلاف تركيز المبيد ومدة التعرض له.

يعود مبيد السايبرمثرين لمجموعة مبيدات **Pyrethroid** الذي يعد الاكثر فعالية واستعمالا من بين المبيدات التي تستعمل للقضاء على الطفيليات الخارجية لحيونات المزرعة من اغنام وابقار (15), علاوة على استعماله بطريقة الرش على بعض اشجار الفواكه كاشجار الجوز والتفاح، ولبعض المحاصيل مثل القطن والحنطة والذرة والخضراوات، لحمايتها من الحشرات المتطفلة عليها (23) كما و يستعمل عند انشاء المنازل والابنية حيث يوضع في اسس البناء او حول الجدران للقضاء على الصراصر (**Cockroaches**)، العناكب (**Spider**) والنمل الابيض (**Termite**) والقضاء على ذباب المنزل (**House flies**) (6).

لوحظ في العديد من الابحاث ان لهذا المبيد مردوداً عكسياً لغير الهدف المراد القضاء عليه حيث ادى الى الفعل السمي للفقريات واللافقريات (1، 4، 11، 16، 19). تظهر الدراسات ان تلوث الماء بنسبة قليلة جداً من

* معهد الهندسة الوراثية والتقانات الاحيائية– جامعة النهرين– بغداد، العرق.

** كلية الزراعة، جامعة بغداد، بغداد، العراق.

السايبرمثرين كان مردوده واضحا في احداث تغيرات بايوكيميائية في الدنا DNA، الرنا RNA وانزيم ATPase في عضلات الجسم والكبد والجهاز العصبي للاسماك (8).

اما تعرض الانسان لهذا المبيد فقد سبب اعراضاً سمية وراثية. فقد اشار He (13) الى ان العاملين في رش مبيد السايبرمثرين قد ظهرت لديهم حرقة في الجلد ودوار وفقدان في الشهية وغثيان. وفي حالة تعرضهم الشديد يظهر عليهم الارتعاش والغيبوبة مع العجز في السيطرة على المثانة.

المواد وطرائق البحث

تم اجراء التجربة على ذكور اغنام بعمر 3 سنوات في مزرعة اللطيفية التابعة لوزارة العلوم والتكنولوجيا وذلك خلال شهر ايار 2004 حيث استعملت 7 كباش في هذه التجربة، تم سحب نماذج الدم منها عن طريق الوريد الوادجي في انابيب اختبار حاوية على الهيبارين قبل اجراء عملية الغطس واعتبرت مجموعة سيطرة، بعدها غطست هذه الحيوانات بمبيد السايبرمثرين بتركيز 0.75 مل/لتر واعيد سحب نماذج الدم منها بعد 24 و48 ساعة، 7 و14 يوماً.

زرعت نماذج الدم على وسط زرعي RPMI 1640 وتم تحضير الكروموسومات حسب طريقة (7) في المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية، والتي تتلخص بما ياتي:

تمت سحب نماذج الدم من الحيوانات الداخلة في التجارب عن طريق الوريد الوادجي في انابيب اختبار حاوية على الهيبارين (25 I.U/ل دم). تمت اضافة 0.5 مل من الدم الى انابيب الزرع المحضرة وحضنت بدرجة حرارة 37م لمده 72 ساعة. لاجل ايقاف الانقسام في الطور الاستوائي اضيف 0.1 مل من ماده الكولشسين المحضر قبل انتهاء مده الزرع بثلاثة ساعات واكملت مدة الحضن بدرجة الحرارة نفسها. اجريت عملية الطرد المركزي Centrifuged بسرعة 1800 دورة/دقيقة ولمده 10 دقائق واخذت الخلايا واهمل الراشح.

تمت اضافة 5 مل من محلول ناقص التقوى Hypotonic (0.075 M Kcl) الى الخلايا وحضنت بدرجة حرارة 37 م لمده 40 دقيقة.

عوملت الخلايا بعد الطرد المركزي بالمثبت Fixative المحضر انياً حيث غسلت الخلايا بالمثبت ثلاث مرات متتالية. تم تحضير الشرائح لغرض الفحص المجهري حيث قسمت الشرائح الى قسمين صبغت المجموعة الاولى بصبغة جميزا لاجراء فحص نسبة انقسام الخلايا والمجموعة الاخرى صبغت بصبغة دابي DAPI لغرض اجراء فحص SEC وRI مستخدمين لذلك المجهر التالقي Fluorescent microscope.

بعدها اجريت الاختبارات التالية لدراسة السمية الوراثية لهذا المبيد. لاختبارات الخاصة بالتحليلات الكروموسومية:

معامل انقسام الخلايا (M.I)

تم حساب معامل انقسام الخلايا حسب طريقة Carolinecox (4)، إذ يقسم عدد الخلايا على العدد الكلي للخلايا (1000) خلية كما في المعادلة الاتية:

$$\text{معامل انقسام الخلايا (M.I)} = \frac{\text{عدد الخلايا المنقسمة}}{\text{العدد الكلي للخلايا}} \times 100$$

حساب دالة معامل التضاعف (R.I)

تم حساب 50 خلية مارة في الاطوار الانقسامية الثلاثة M1، M2 و M3 ثم استخرجت نسبها المئوية لادخالها في قانون معامل تضاعف الخلايا كما يأتي (18):

$$R.I = \frac{(M_1\% \times 1) + (M_2\% \times 2) + (M_3\% \times 3)}{100}$$

التبادل الكروماتيدي الشقيق (SCEs)

تم حساب (SCEs) في 50 خلية في طور الانقسام الثاني (M2) اخذت عشوائيا ثم اخذ المعدل (22).

التحليل الاحصائي

تم تحليل نتائج البيانات احصائيا باستعمال التصميم العشوائي التام (CRB) وحسب النموذج الاحصائي الأتي:

$$Yij = M + Ti + eij$$

ولتحليل البيانات استخدم النموذج الاحصائي الجاهز (SPSS, 1998) ولاختبار معنوية الظروف بين المعاملات استخدم اختبار دنكن المتعدد الحدود (10).

النتائج والمناقشة

معامل الانقسام الخلوي

يعد معامل الانقسام احد اختبارات السمية الخلوية اللمفاوية Lymphocyte cytotoxicity وهو يعبر عن النسبة المئوية لقدرة الخلية على الانقسام، حيث تمتلك الخلية القدرة على اجراء التنظيم الذاتي لنفسها من اجل الحفاظ على ثبات بيئتها الداخلية من اجل السماح لها بالبقاء على قيد الحياة ومواصلة انقسامها عندما يتطلب الامر ذلك. اما اذا تعرضت للمواد السامة بما يزيد على الحد الحرج فان تأثير تلك المادة يبدأ بالظهور ومن هنا تكون الماده السامة قد استطاعت ان تتغلب على عملية التنظيم الذاتي للخلية وتثبيط انقسامها لذلك تشير نتائج التجربة في الجدول (1) الى ان ماده السايبرمثرين قد احدثت انخفاضاً في معدل انقسام الخلايا (MI) للخلايا اللمفية للاغنام في المجموعات المختبرة بعد 24 و48 ساعة و7 ايام من التغطيس مقارنة مع معدل الانقسام الخلوي التلقائي (السيطرة) ولكن هذا الانخفاض لم يصل الى مستوى المعنوية احصائيا في حين ارتفع معدل التقارب مجموعة السيطرة في الحيوان بعد 14 يوما بعد التغطيس . وتتقارب هذه النتيجة مع ما اشارت اليه بعض نتائج البحوث الى ان منتجات مبيد Pyrothroed التي لها تاثير تثبيطي لانقسام الخلايا اللمفية في الانسان (5، 21).

جدول 1: تاثير مبيد السايبرمثرين في استحثاث التبادل الكروماتيدي الشقيق ومعامل انقسام الخلايا في الخلايا اللمفية للاغنام (القيم تمثل المعدل ± الخطا القياسي)

المعاملة	عدد لحيوانات	معامل نقسام الخلايا	التبادل الكروماتيدي اشقيقي
السيطرة	5	a 0.31 ± 2.36	a 0.15 ± 2.29
بعد 24 ساعة	5	a 0.16 ±.68	b 0.45 ± 3.06
بعد 48 ساعة	5	a 0.32 ± 1.96	b 0.15 ± 3.08
بعد 7 ايام	5	a 0.26 ± 1.86	a 0.45 ± 2.84
بعد 14 يوما	5	a 0.29 ± 2.12	b 0.21 ± 2.46
المجموع	25	0.12 ± 1.99	0.14 ±2.74

الحروف المختلفة ضمن العمود الواحد تعني وجود فروق معنوية ($p < 0.05$).

التبادل الكروماتيدي الشقيقي

اما بالنسبة الى تاثير السايبرمثرين على ظاهرة التبادل الكروماتيدي الشقيقي (SCE) فان جدول (1) يوضح ذلك, حيث تشير النتائج الى ان المستوى التلقائي SCE في الخلايا اللمفاوية للاغنام 2.29 ارتفع الى 3.06 و3.08 بعد 24 و48 ساعة من التغطيس على التوالي. وهذا يشير الى التاثير الضار لهذا المبيد من خلال قدرته على النفاذ (penetration) واحداث فعله الضار على كروموسومات الخلية , حيث ان لهذه الماده القدرة على الارتباط بالحمض

النووي (DNA) بالصورة التي ينتج عنها اضطرابات واستبدالات فيما بين الكروماتيدات الاشقة, وهذه النتيجة جاءت متقاربة مع ما لاحظه العديد من الباحثين عند دراسة تاثير هذا المبيد على الخلايا اللمفية لكائنات اخرى. فقد اشار Puig وجماعته (17) الى ان المبيدان Cypermethrin و Fenvalered سبباً زياده معنوية لمستوى (SCE) في الخلايا اللمفية للانسان في الجرع التي تجاوزت 10 مايكروغرام/مل كما اشار Giri وجماعته (12) ان مادة السايبرمثرين له قدره قوية في زياده مستوى (SCE) في نخاع عظم الفئران اما بعد مرور 7 و14 يوما من المعاملة فان النتائج تشير كما في جدول (1) الى اقتراب قيم (SCE) من مجموعة السيطرة ويعود ذلك الى قدرة الخلية على توفير بعض الاليات المتخصصة لاصلاح الضرر الناشئ عن المبيد بوساطة انظمة اصلاح الدنا بعد زوال المسبب (22).

دورة تقدم الخلية Cell Cycle Progression (CCP) ومعامل تضاعف الخلايا Replicative Index (R.I)

تبين النتائج في الجدول (2) وشكل (1) ان نسبة الخلايا في الحالة الطبيعية في الدورة الانقسامية الاولى (M_1) بلغ 30%، واخذ بالارتفاع ليصل الى 71% لدى مجموعة المعاملة بعد 24 ساعة من التغطيس, بينما كانت الخلايا في المرحلة الانقسامية الثانية (M_2) لمجموعة السيطرة 46%، قد اخذت بالانخفاض لتصل الى 22% في مجموعة 24 ساعة من التغطيس، بينما كانت الخلايا في المرحلة الانقسامية الثالثة (M_3) 24% ثم انخفضت لتصل الى 7%.

جدول 2: تأثير مبيد السايبرمثرين في استحثاث مراحل تقدم الخلية CCP ومعامل تضاعف الخلايا (القيم تمثل المعدل ± الخطأ القياسي)

المعاملة	الدورة الانقسامية الأولى % M_1	الدورة الانقسامية الثانية % M_2	الدورة الانقسامية الثالثة % M_3	معدل تضاعف الخلايا
السيطرة	30	46	24	a 0.025 ± 1.94
بعد 24 ساعة	71	22	7	c 0.02 ±1.36
بعد 48 ساعة	46	42	12	b 0.02 ±1.66
بعد 7 أيام	41	44	15	ab 0.006 ± 1.74
بعد 14 يوما	36	38	26	a 0.006 ±1.90

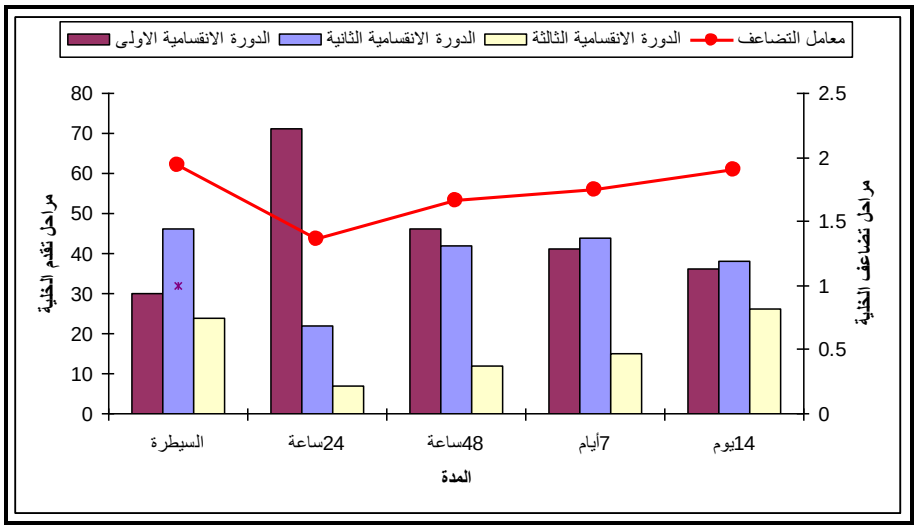
الحروف المختلفه ضمن العمود الواحد تعني وجود فروق معنوية ($p< 0.05$)

لقد دلت نتائج التحليل الاحصائي الى ان معامل تضاعف الخلايا (R.I) قد انخفض معنويا ($p<0.005$) ي المجموعات بع 24 و 48 ساعة و7 ايام من التغطي.

يتضح من هذه النتائج ان مبيد السايبرمثرين ذو تاثير سمي واضح في الخلايا اللمفاوية للاغنام وخاصة بعد مرور 24 ساعة من التغطيس بحيث تستطيع الخلية احداث انقسامها الاول وعدم تمكنها من مواصلة الاستمرار في الانقسام للدورة الثانية والثالثة وهذا يعود الى ان الفعل السام لمركب السايبرمثرين قد اثر في النظام الايضي للخلية وتثبيط توالدها الخلوي وبذلك انخفض معدل معامل تضاعف خلايا وهذه النتيجة جاءت متطابقة مع العديد من الدراسات الجارية حول استعمال مجموعة مبيدات Pyrothroid.

لقد اشار Dianovsky وSivikova (9)، Sivikova وDianovsky (20) الى ان زراعة الخلايا اللمفية للاغنام في وسط زرعي حاو على مبيد السايبرمثرين من شانه ان يخفض الخلايا في الدورة الانقسامية الثانية والثالثة مما يؤدي الى انخفاض معدل معامل تضاعف الخلية (R.I). كما وجد ان معدل معامل تضاعف الخلايا كان يتناقص بزيادة جرعة المبيد عند حقنه في غشاء البريتون (3). وعدت مادة السايبرمثرين مادة مطفرة من شانها ان تثبط الاستمرار في انقسام الخلايا اللبائن القابلة للانقسام (12).

ومن الجدول (2) يتضح عودة الخلية الى قابليتها في الانقسام لدى المجموعات المعاملة بعد 7 و14 يوما من التغطيس عند مقارنتها بمجموعة السيطرة وتشير الدراسات الى ان للجسم القدرة على ازاله المبيدات بوساطة انزيمات معينة ويتم التخلص منها مع الفضلات وخاصة البول, اما في حالة تعرض الكائنات للمبيد لعدة مرات وبمدد متقاربة يؤدي الى صعوبة طرحها لهذه المواد مما يؤدي الى ترسبها في انسجة الجسم الدهنية ويصبح من الصعب التخلص منها ويستمر تاثيره التطفيري الى 30 يوماً بعد زوال المسبب (6) ونستنتج من هذه الدراسة الى ان مبيد السايبرمثرين مطفر خفيف ضمن التراكيز الموصى باستعمالها ويزول تاثيره السمي الوراثي لدى تعرض الاغنام له خلال مدى زمني يتراوح بين اسبوع الى اسبوعين لذلك ينصح بعدم جزر الاغنام المغطسة الا بعد مرور المده الزمنية المشار اليها.



شكل 1: تأثير مبيد السايبرمثرين في اعداد الخلايا في الدورات الانقسامية الثلاث M_1، M_2 وM_3 ومعامل تضاعف الخلايا RI في الخلايا اللمفاوية للأغنام.

المصادر

1- Akhtar, M. H.; C. Danis and K.E. Hartin (1992). Deltamethrin residues in milk and Tissues of lactating dairy cows. J. Environ. Sci. Health, 1327: 235-253.
2- Altaif, K.I. and J.D. Darhie (1978). Genetic resistance to helminthes. The influence Breed and hemoglobin type on the response of sheep to primary infection With *Haemonchus contortus.* Parasitol, 77.
3- Amer, S.M.; A.A. Ibrahim and K. M. Sherbeny (1993). Induction of chromosomal Aberrations and sister chromotid exchange *in vivo* and *in vitro* by the nsecticide cypermethrin. Appl Toxicol, 5:341-350.
4- Carolinecox (1996). Cyperethrin. Journal of pesticide, 16:42 – 65.
5- Carbonell, E.M.; Puig; N. Xamena; A. Creus and R. Marcos (1989). Mitotic arrest Induced by fenvalerate in human lymphocyte cultures. Toxicol. Lett., 48: 45-48
6- Crafton, K.M., L. S. Kehn and M.E. Gilbert (1995). Vehicle and route dependent Effects of a pyrethroid insecticide, deltamethrin on motor function in the Rat. Neurotoxicol Teratol, 17: 489-495.
7- Crossen P. E. (1982). SCE in lymphocytes. In sister chromatid exchange. Sandbery A. A. (Ed.) new York, p: 174.
8- As, B.K and S.C. Mukherjee (2003). Toxicity of cypermethrin in biochemical, Enzymatic and hematological consequences. Comp. Bio. Chem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol, 134: 109-121.
9- Dianovsky, J.; K. Sivikova (1995). *In vivo and in vitro* cytogenetic effect of Suspermethrin, Biomed Environ Sci., 4: 359-66.
10- Duncan, B.D. (1995). Multiple ranse and multiple F-test Biometrics, 11: 1-42.

11- Ghosh, A.K.; A. Sharma and G. Talukder (1992). Cytotoxic effects of Sumicidin A type II synthetic pyrethroid, on mice In vivo at 6, 12 and 2u h after Exposure. Cytobios, 71 (285): 85 -91.
12- Giri, S.A.; G.D. Sharma and S.B. Prasad (2003). Introduction of sister Chromatid exchange by cybermethrin in bone marrow cells of mice In vivo. Mutagenesis, 18: 53 – 58.
13- He. F (1989). Clinical manifestations and dignosis of a cute pyrethroid poison Arch. toxicol, 63: 54 – 58.
14- King, M.T.; K. Wild and K. Eckardt (1982). 5- Brdurd tablets with improved Depot effect for analysis *in vivo* in bone marrow. Mut. Res., 97: 117 – 129.
15- Madder, D.J. and G.A. Surgeoner (1979). Effect of permethrin, cypermethrin And chlor pyrifos on louse population of beef cattle. Proc. Entom. Soc., 110: 29 – 34.
16- Majmunder, D.; A. K. Chakraborty; T. K. Mandal; A. Bhattacharya and Basak (1994). Subacute toxicitynof fenvalerate in broiler chicks. Indian. Exp. Biol., 32: 752 – 756.
17- Puig, M.; E. Carbonell; N. Xamena; A. Creus and R. Marcos (1989). Analysis of cytogenetic damage induced in cultured human lymphocytes by the pyrthroid insecticides cypermethrin and fenvalerate. Mutagenesis, 4: 72 –74.
18- Schneider, E.J. Lewis (1982). Comparison of the *in vivo and vitro* SCEs induction Mut. Res., 10: 85 – 90.
19- Sibley, P. K and N. K. Kaushik (1991). Toxicity of Microencapsulated permethrin To selected non target inverte–bartes. Arch. Environ. Contom. Toxicolg, 20: 168 – 176.
20- Sivikova K. and J. Dianovsky (1997). Cytogenetic effects of the herdicide Chloridazon in cultured sheep lymphocytes. Actavet Hung, 45:6 –11.
21- Surralles, J.E.; M. Carbonell; N. Puig; A. Xamena; Creus and R. Marcos (1990). Insecticide fenvalerate in cultured human lymphocytes. Toxicol. Lett., 45: 151-155 (Abstract).
22- Tucker, J.; J. Xu and J. Stewart (1989). Detection of SCE in human Peripheral lymphocyte induced by EDB Vapor. Mutant Res., 138: 93–98.
23- U.S Dept. of Agriculture. National Agricultural statistics service (1995). Economic Research service. Agricultural chemical usage. Washington, D.C. (March). (Internet file).
24- World Health Organization (WHO) (1992). Alpha cypermwthrin. Environ mental Health criteria 142:112. (Internet file).

EFFECT OF CYPERMETHRIN TREATMENT ON THE GENETIC CONTENT IN SHEEP

S. M. Nada* T. K. Mohammed J. E. Alkass****

ABSTRACT

The purpose of the present study was to test mutagenic potential of Cypermethrin, which has been used widely for the treatment of parasitic infection of rams at different intervals from dipping. Blood samples were collected from 7 rams aged 3 years (control group) then the rams were dipped using Cypermethrin solution of a 0.75 ml/L concentration. After dipping, blood sample were collected at 24 and 48 hours and 7 and 14 days.

Results show that Cypermethrin caused an increase in SCE and decrease in R.I. was noticed after 24 and 47 hrs after dipping. However, values of SCE while R.I. increased at 7 days, the obtained result were almost similar to normal values at 14 days, also a non – significant effect of treatment was noticed on M.I.

*** Research Center for Biotechnology, Al-Nahrain Univ., Baghdad, Iraq.**
****College of Agric., Baghdad Univ., Baghdad, Iraq.**