تقييم بعض التأثيرات الوراثية الخلوية للمبيد الحيوي البكتري Bt -ASF-1 في خلايا نخاع عظم الفئران المختبرية

د. علي شهاب أحمد* و د. عباس عبدالله محمد*

تاريخ التسلم:30/9/2010
تاريخ القبول:5/5/2011

الخلاصة

هدفت الدراسة الى الكشف عن التأثير السمي الخلوي والوراثي للمبيد الحيوي الخام (Bt-ASF-1) والمتمثل بعالق سبورات بكتريا *Bacillus thuringiensis*، والمعطى بطريقة التغذية الفمويـــة،على تثبـــيط الفعـــل التطفيـــري للعقـــار المســـرطن سايكلوفوســـفوأمايد Cyclophosphoamide(CFA) في الخلايا الجسمية (خلايا نقي العظم) في الفئران المختبرية *Mus musculus* . اعتمدت التحليلات الوراثية الخلوية لتحديد مؤشر الأنقسام الخيطي للخلايا الجسمية وتشكيل النوى الصغيرة والتجمع المركزي للكروموسومات , والتغيرات الكروموسومية . لقد أظهرت النتائج أنعدام التأثيرات السمية والتطفيرية للمبيد . كما اظهرت النتائج الكفاءة التثبيطية للمبيد الحيوي لخفض التأثيرات السمية والتطفيرية للعقار CFA قبل تناول العليقة الحاوية على المبيد الحيوي .

Evaluation of Some Cytogenetic Effects of Bt.ASF.1 in Lab.mice

Abstract

This study was amid to detection the genotoxicity ffect of biocide (Bt-ASF-1) producing from *Bacillus thuringiensis* (by oral nutrition) in inhibition of the Cyclophosphoamide drug in mice (*Mus musculus*) . Cytogenetical tests were used to determination of the mitotic index ,micronuclei , chromosomal central association and chromosomal aberration . The results revealed the absence of toxicity and mutagenicity effects of biocide and its inhibition efficiency to prevent the toxicity and mutagenicity effects of CFA drug before feeding with biocide .

Keywords : Genotoxic effects of Bt-ASF-1

1- المقدمة

المبيدات الحيوية هي منتجات مصدرها احياء مجهرية ذات قابلية على الفتك بالحشرات الضارة التي تصيب المحاصيل الزراعية . ويستخدم المبيد الحيوي في الوقت الحاضر وبتزايد كبديل جديد عن المبيدات الكيميائية ذات الاثر الضار على الانسان والبيئة . يستخدم المبيد الحيوي Bt والذي مصدره بكتريا *B. thuringiensis* في مكافحة العديد من عوائل الحشرات الحرشفية وغمدية الأجنحة . يعمل المبيد الحيوي على الحشرات ذات الأمعاء القاعدية وليس الحامضية كما هو الحال بالنسبة للنبات والحيوانات في سلم التطور . لذلك أشارت جميع الدراسات الطبية و التطبيقية والنوعية الى عدم تأثيرة على الأنسان عند تناوله عن طريق الفم ، بينما نجد أن 1 مايكروغم من المبيد الجاف يؤدي الى قتل 1غم من اليرقات الجافة للحشرات الحرشفية قاعدية الامعاء [1] .

بينت دراسات محددة جداً الى ان النتائج المختبرية لفحص دور المبيد في معالجة حالات بعض السرطانات أعطت نتائج أولية مشجعة [2] . ولغرض التوسع في الدراسة فقد تم أختيار المبيد الحيوي المنتج في مختبر المشاريع البحثية في فرع التقنيات الأحيائية لهذا الغرض .

2- المواد وطرائق العمل

2- 1- المبيد الحيوي (Bt-ASF-1) :

* قسم العلوم التطبيقية / الجامعة التكنولوجية / بغداد

https://doi.org/10.30684/ etj.29.7.20
University of Technology-Iraq, Baghdad, Iraq/2412-0758
This is an open access article under the CC BY 4.0 license http://creativecommons.org/licenses/by/4.0

تـم أجـراء التقـيم الحيـوي للمبيـد -Bt ASF-1 المجهـز مـن مختبـر المشـاريع البحثيـة التـابع لفـرع التقنيـات الأحيائيـة / قسـم العلـوم التطبيقية / الجامعة التكنولوجية . وتضمنت المادة الفعالـــة للمبيـــد معلـــق ســـبورات بكتريـــا *B.thuringiensis* المعزولة والمشخصة محلياً وبعدد 1.0 X 10^8 سبور/ مل في محلول ملحي فسيولوجي [3] .

2-2- تحضير عليقة التغذية

وهـي عليقـة تغذيـة جافـة (Pellets) خاصـة بالفئران مجهزة من مختبرات الصحة المركزية . وقسمت حسب المعاملات وكما يلي:

أ - عليقـة جافـة بـدون أضـافة المبيـد الحيـوي استخدمت كسيطرة سالبة (Negative control) .

ب - عليقـة جافـة خاصـة بـالفئران (Pellets) مضاف اليها المبيد الحيوي بعدد سبورات$10x1^7$ / غم عليقة .

تم أجراء اضـافة عـالق السبورات بطريقـة الرش علـى العليقـة فـي حاويـة مغلقـة مـع المـزج الجيد لضمان توزيع العالق بشكل متساوي . تم وضع العلائـق الغذائيـة فـي أقفـاص الفئـران وحسـب المعاملات اللاحقة .

أسـتخدمت فئـران مختبريـة ضـرب Balb/c مجهزة من البيت الحيواني / مختبرات الصحة المركزية في بغداد بعمر12-15 أسبوع وبمعدل وزن 25 غم . أستخدمت في التجربة (25) فأراً قسمت الى خمسة مجاميع وزعت بالشكل التالي:

1- المجموعة الأولى(5 فئران) أعطيت العليقة والماء وأستعملت كسيطرة سالبة .

2- المجموعة الثانية (5 فئران) غذيت بعليقة حاوية على المبيد الحيوي بعدد سبورات $10x1^7$ / غم عليقة جافة خاصة بالفئران وتمثل سيطرة موجبة رقم (1) .

3- المجموعة الثالثة (5فئران) حقنت بـ 0.002 ملغم/كغم من Cyclophosphoamide لمرة واحدة تحت الغشاء البريتوني والتي عدت كسيطرة موجبة رقم (2) .

4- المجموعة الرابعة (5 فئران) تم تغذيتها بعليقة جافة حاوية على $10x1^7$ سبور/ غم عليقة جافة عن طريق الفم يومياً لمدة أسبوع قبل الحقن بعقار سايكلوفوسفوأمايد . تم اجراء الفحص بعد اليوم الثامن بعد تشريح الفئران .

5- المجموعة الخامسة (5 فئران) جرعت أيضاً بـ 1 x 10^7 سبور/ غم عليقة تغذية بعد حقن عقار السايكلوفوسفوأمايد مباشرة وتركت لمدة سبعة أيام تم تشريحها بعد ذلك.

وللحصول على كروموسومات خلايا نقي العظم أعتمدت طريقة [4] ، وبعد تحضير الشرائح تم تصبيغها بصبغة كمزا [5] . جرى حساب معامل الأنقسام الخيطي وفق المعادلة التالية

$$MI = \frac{\text{عدد الخلايا المنقسمة}}{\text{العدد الكلي للخلايا}} \times 100$$

(المنقسمة وغير والمنقسمة)

جرى حساب تشكيل النوى الصغيرة مع أجراء بعـض التحـويرات البسـيطة [6] ، وتـم حسـاب النسبة المئوية لتشكيل النوى الصغيرة والتجمع المركزي للخلايا (وجود أكثر من خليتين في موقع معين) في100 خلية، وحسبت التغيرات الكروموسومية (ممثلة بالكسر الكروموسومي والكروماتيدي والقطع الكروموسومية) في 100 خلية في الطور الأستوائي والحاوية على 20 زوج من الكروموسومات والمفصولة بشكل جيد [7] .

أعتمد النظام الأحصائي.S.P.S.S على وفق النمـوذج الأحصـائي لتحليـل التبـاين بأتجـاه واحـدANOVA ، بينمـا قورنـت المعـدلات المختلفة بأستخدام طريقة أقل فرق معنوي LSD وعلى مستوى معنوية 5%، لأيجاد أهم الفروق بين المعاملات [8] .

3- النتائج والمناقشة

3-1- أختبار مؤشر انقسام الخلايا

يتضـح مـن جـدول (1) حصـول تثبـيط فـي معامل أنقسام الخلايا الجسمية Somatic cells المـأخوذة مـن نخـاع العظـمBone marrow لفئران السيطرة الموجبة رقم (2) المعاملة بعقار السايكلوفوسـفوأمايد مقارنـة بفئـران السـيطرة السالبة(غير المعاملة) والموجبة رقم (1) اللتان كانتا متطابقتان في نتائج التشريح والفحص . وقد أكـد تحليـل التبـاين وجـود فـرق معنـوي بـين السيطرة اموجبة (1) والسالبة عند مستوى $p<0.05$وكذلك الحال بين السيطرة الموجبة (1) و (2) . أن عقارCFA معروف كمضاد للأورام كونـه يقـوم بتفتيـت هيكليـة الحـامض النـووي الدناDNA , ويؤثر على أغلب العمليات الأيضية داخـل الخليـة وبالتـالي يوقـف فعاليـات الأنقسـام الخلوي أو قد يؤدي الى خلل في تركيب خيوط المغزل Spindle microtubules بتأثيرة على البروتينات Tubulins او قد يؤثرعلى أنزيمات بلمـرة الـدناDNA(DNApolymerases) وبالتالي توقف عمليات الأنقسام الخلوي لذا يعتبر مـن المـواد ذات القابليـة السـمية الخلويـة Cytotoxic [9، 10 ، 11] .

أما عند تغذية الفئران بعليقة جافة ملوثة بالمبيد الحيوي البكتيري Bt-ASF-1 بعدد سبورات1 x 10^7 سبور/غم عليقة لمدة 7 أيام قبل تجريعها العقار CFA فأنه رفع معنوياً ($p<0.05$) قيمة مؤشر الأنقسام مقارنة بالسيطرة الموجبة رقم (2) . في حين لم يلاحظ وجود أختلاف معنوي في مؤشرأنقسام الخلايا في الفئران المجرعة بالمبيد الحيوي فمويا مع العليقة بعد التجريعها عقار CFA .

2-3 – تشكيل النوى الصغيرة

يظهر الجدول (1) النسبة المئوية لتشكيل النوى الصغيرة في خلايا نخاع عظم الفئران لكل من السيطرة (السالبة والموجبة رقم - 2 والمعاملات اذ ظهر وجود زيادة ($p<0.05$) في معدل تشكيل النوى الصغيرة في الفئران المعاملة بعقار CFA قياسا بالسيطرة السالبة والموجبة -1 (شكل -1) وسجل أنخفاض معنوي ($p<0.05$) في نسبه تشكيل النوى الصغيرة في المجموعة الرابعة في حين لم تظهر فروق معنوية في نسبة تشكيل النوى الصغيرة للمجموعة الخامسة قياساً بمجموعة السيطرة الموجبة -2 ، في حين أظهرت المجموعة الخامسة أرتفاعاً معنوي ($p<0.05$) مقارنة بالعينة القياسية السيطرة السالبة والموجبة-1 .

3-3 - التجمع المركزي للكروموسومات

يوضح الجدول (1) معدل تجمع المركزي للكروموسومات في خلايا نخاع عظم الفئران السيطرة السالبة و الموجبة (1 و2) ، أذ يلاحظ حصول زيادة في معدل حالات التجمع المركزي لأكثر من خليتين في الخلايا الجسمية (نخاع العظم) بأختلاف معنوي ($p<0.05$) بين السيطرة السالبة والموجبة -2 ، في حين ظهر أنخفاض غير معنوي ($p>0.05$) في التأثير السلبي للعقار CFA في حالة أعطاء العليقة المعاملة بالمبيد الحيوي البكتيري قبل وبعد أعطاء العقار CFA مقارنة بالسيطرة الموجبة -2 .

4-3 – التغيرات الكروموسومية

لتحديد مقدار تأثير معاملة الفئران بالمبيد الحيوي البكتيري أجري أختبار التغيرات الكروموسومية لخلايا نخاع عظم الفئران ممثلاً (الكسرالكروماتيدي والكروموسومي والقطع الكروموسومية (شكل-2)، فقد أظهر جدول رقم (2) قابلية عالية للعقار CFA على أستحثاث التغيرات الكروموسومية مقارنة مما هو عليه في الفئران غير المعاملة في السيطرة السالبة والموجبة رقم (1) والتي تمثل الحالة الطبيعية . لقد أشارت نتائج المقارنة بينهما الى وجود فرق معنوي بمستوى أقل من 0.05 ، في حين نتج من تغذية الفئران عليقة تحتوي تركيز $10x1^8$ سبور/ 10غم عليقة لمدة 7 أيام قبل التجريع بالعقار ادى الى أنخفاض معنوي في نسبة ظهور التغيرات الكروموسومية ممثلة (الكسر الكروموسومي والكسر الكروماتيدي والقطع الكروموسومية) قياساً بالسيطرة الموجبة رقم (2) ، واظهرت تغذية الفئران بعليقة تحتوي تركيز $10x1^7$ سبور/ غم عليقة تغذية من المبيد الحيوي بعد تجريعها عقار CFA أنخفاض (غير معنوي) النسبة المئوية لظهور التغيرات الكروموسومية ، لكنها لم تصل الى المستوى الكسر الكروموسومي مقارنة بالسيطرة الموجبة رقم (2) (الفئران المعاملة بعقار CFA لوحدة) . وحول تأثير المبيد الحيوي في العليقة قبل او بعد اعطاء العقار CFA فان العليقة المعاملة بالمبيد الحيوي البكتيري ادت الى حماية عملية الأنقسام الخلوي وأنخفاض تأثير العقار المسرطن CFA من خلال أنخفاض تشكيل النوى الصغيرة وأنخفاض ظهور التجمع المركزي للكروموسومات وكذلك أنخفاض معدل التغيرات الكروموسومية . وكما يلاحظ ان فعاليةالمبيد الحيوي التثبيطية في العليقة المستخدمة أعطت نتائج مشجعة عند أستعمالها قبل المطفر والمسرطن CFA وكانت أفضل من فعاليتها عند أستعمالها بعد العقار، لذا يمكن أن تصنف كعامل مضاد للتطفير داخل الخلية الحية Bioantimutagen وهذا يتفق مع ماوجده كل [11] و[12] . لقد بينت النتائج أن المبيد الحيوي المنتج من بكتريا *B.thuringiensis* لم يظهر أي تأثير مسرطن على الفئران عند تغذيتها بأعداد عالية من السبورات أوأستخدام تراكيز وصلت الى24000 ملغم/كغم ولفترات تغذية طويلة وهذا ماأكدته جميع المصادر ذات العلاقة [13] . كما بينت الدراسات الحديثة أن أحد مكونات البروتين البلوري Parasporin(ps) المنتج من أحد ضروب البكتريا *B.thuringiensis* له تأثير قاتل وفعال ضد مختلف أنواع سرطانات الخلايا البشرية وليس له أي تأثير جانبي على بنية الخلايا الطبيعية [14] ، والتي يمكن أن تنطبق نتائج البحث في أحدى جوانبها عند الأطعام (الحيوانات) بعد أحداث الحقن بالمادة المسرطنة فضلاً عن نتائج الأطعام قبل الحقن ويمكن من خلال ذلك أن نستنتج ان عليقة المبيد الحيوي البكتيري Bt-ASF-1 لا تملك القدرة على التطفير بل لها خصائص مضادة للتطفير والقدرة على تقليل التشوهات او التغيرات الكروموسومية الوراثية الحاصلة بفعل بعض المواد المسرطنة والمطفرة مثل CFA ويلاحظ من النتائج أن

الفعالية التثبيطية للمبيد الحيوي عند أستعماله قبل المطفر أفضل من فعاليته عند الأستعمال بعد المطفر، لذ يعتبر من المثبطات التي تعمل داخل الخلية .

References

[1]McClintock, J.T.,Schaffer,C.R. and Siobolad,R.D.(1995) A Comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis* based pesticides.Pestic.Sci. 45:95-105

[2]Ohba,M.;Mizuki,E. and Uemori,A. (2009) .Parasporin a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis* . Anticancer research ,29:427-434

[3] Ahmed ,A. S. , Kadim , S. , Sajet , F. M. , Juwaed , J. A. , Hamdy , A. , Atyia , I. and Alhamid ,S .A. . 2010 . General evaluation of biocide (Bt – ASF -1) produced from local Iraqi isolate of *Bacillus thuringiensis* . Under publication (J. Agri.Sci. and Technology).

[4]Schedl ,W.(1971) . Karyotype of the mouse . Chromosoma(Berl)36:111-126

[5] -Tarkowski, A.(1966).An air-drying method for chromosome preparations from mouse . Cytogenetics. 5: 394-400

[6] Schmid ,W. (1975). The micronucleus test . Mut. Res. 31:9-15

[7]Ohno, M.(1965). Human chromosome technology.2nd ed .New York. Academic Press,pp.166.

[8] – **الراوي**، خاشع محمود ، و خلف الله ، عبد العزيز(1981) . تصميم وتحليل التجارب الزراعية . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. دار الكتب للطباعة والنشر/ جامعة الموصل صفحة 488 .

[9]Kornberg, R.D.(2005) .Mediator and the mechanism of transcriptional activation. Trends. Biochemical Sci.,30: 235-239.

[10]**Lopus**,M. and Panda,D. (2006) .The enzophena thridine alkaloid sanguinarine perturbs microtubule assembly dynamic through tubulinbinding.A possible mechanism for its antiproliferative activity. J.FEBS(10):2139-5010.

[11]Ahmed ,A., Abbas,A.;Heba,H.andAmir,H.(2009) .Study the biological activities of *Tribulus terrestris* extracts .World academy of science.57:433-435

[12] حسن ، مفيد قائد أحمد(2002) تثبيط الأثر السمي الوراثي لبعض المسرطنات الكيمياوية باستعمال مستخلصات نباتية ، أطروحة دكتوراة ، جامعة بابل .

13,Barla,A.;Gulacti,T.,Sevil,O.,Gulendam,T. and avid,G.(2007)Identification of cytotoxic sesquiterpenes from Laurus nobilis L. Food Chemistry .104(4):1478-1484.

14-Environmental Protection Agency .(2010). *Bacillus thuringiensis*.Technical Fact Sheed. www.NPTN.com.

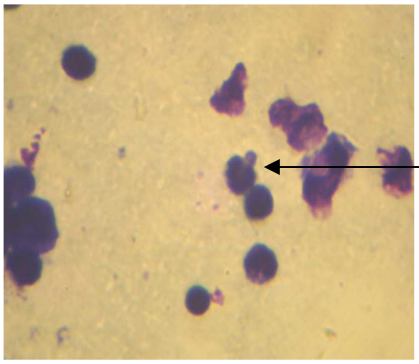
الجدول – 1 : تأثير مؤشر أنقسام الخلايا وتشكيل النوى الصغيرة والتجمع المركزي للكروموسومات في خلايا نخاع العظم الفئران المختبرية المغذاة بعليقة حاوية على المبيد الحيوي

المعاملة	MI % *	MN %	CCA%
	SE ± Mean	± Mean SE	Mean SE±
المجموعة الاولى والثانية :العينات القياسية(مجموعة السيطرة السالبة + مجموعة السيطرة الموجبة رقم (1) .	0.05±14.43	0.03±0.05	0.05±0.07
المجموعة الثالثة العينة القياسية (مجموعة السيطرة الموجبة –2)	0.07± 5.23	0.08±3.22	0.62±3.53
(المجموعة الرابعة) : عليقة مع المبيد الحيوي (1 X 10 ^{7} سبور / غم عليقة جافة) قبل CFA .	0.06± 9.24	0.42±1.12	0.22±2.65
(المجموعة الخامسة) : عليقة مع المبيد الحيوي (1X 10 ^{7} سبور / غم عليقة جافة) بعد CFA .	0.08±6.51	0.51±2.62	0.18±2.68

MI=mitotic index, MN=micronuclei, CCA=chromosomal central association *

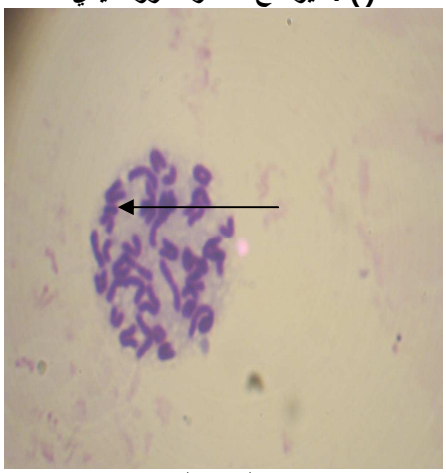
الجدول – 2 : تأثير تغذية الفئران المختبرية بعليقة حاوية على المبيد الحيوي في التغيرات الكروموسومية في خلايا نخاع العظم .

المعاملة	الكسر الكروموسومي%	كسر كروماتيدي%	قطع كروموسومية%
	SE ± Mean	SE ± Mean	SE ± Mean
المجموعة الاولى والثانية :العينات القياسية(مجموعة السيطرة السالبة + مجموعة السيطرة الموجبة رقم (1) .	0.05±0.06	0.04±0.07	0.05±1.05
المجموعة الثالثة العينة القياسية (مجموعة السيطرة الموجبة -2)	0.08±1.54	0.05±2.23	0.05±2.72
(المجموعة الرابعة) : عليقة مع المبيد الحيوي (1 X 10 ^{7} سبور / غم عليقة جافة) قبل CFA .	0.05±0.65	0.06±1.12	0.05±1.08
(المجموعة الخامسة) : عليقة مع المبيد الحيوي (1X 10 ^{7} سبور/ غم عليقة جافة) بعد CFA .	0.05±0.86	0.05±2.22	0.08±2.52



شكل – 1 : تشكيل النوى الصغيرة Micronuclei لخلية من نخاع العظم في احد الفئران المختبرية المعاملة بالسايكلوفوسفوامايد (Giemsa,100×).

(أ) : يوضح الكسر الكروماتيدي



(ب): يوضح الكسر الكروموسومي

الشكل – 2 (أ ، ب) : التغييرات الكروموسومية لخلايا نخاع العظم في الفأران المعاملة بالسايكلوفوسفوامايد .