

الكشف عن التأثير السمي لمبيد الأميدوكلوبرايد باستخدام اجنة الدجاج المحلي

إيمان حسن الأتباري¹، سراب سلمان كاظم²، رواء جميل توما²، رسل بهاء الدين محسن²، سلمى اكرم خزعل¹

كلية الزراعة - جامعة بغداد - بغداد - العراق.

وزارة العلوم والتكنولوجيا - العراق.

الملخص

هدف الدراسة الكشف عن الاثر السلبي والضرار لمبيد الأميدوكلوبرايد على النظم الحية. استخدمت اجنة الدجاج المحلي لدراسة تأثيره على نسبة البقاء والنمو وتطور الأجنة وعلى مستوى انزيمات الكبد التخصصية فيها. استخدم في هذا البحث عدد 90 بيضة دجاج محلي بمتوسط وزن 40-45 جم. استخدم منها 30 بيضة لحساب الجرعة القاتلة للمبيد (LD50) والتي بلغت 12.5 ملغم/بيضة. قسم البيض المتبقي الى ست معاملات بمعدل 10 بيضة/ معاملة مع السيطرة ثم حضنت، وبعد مرور 72 ساعة حقنت مجاميع البيض اعلاه بتركيز مختلفة من مبيد الملاثيون بمعدل 15:10:5:0، 20 و40 ملغم /بيضة على التوالي وبواقع 0.1 مل/ بيضة ولمرة واحدة ثم بعمر 16 يوم كسر البيض المعامل وحسبت نسبة البقاء للاجنة وكذلك مستوى انزيمات الكبد.

اوضحت نتائج التحليل الاحصائي ارتفاع نسبة البقاء كلما انخفض تركيز المبيد المعامل حيث اعطت المعاملة الاولى السيطرة نسبة بقاء 100% في حين بلغت 0% في المعاملة السادسة ذات التركيز 40 ملغم/بيضة، وسجل مستوى انزيم GOT ارتفاعا معنويا ($P>0.05$) في المعاملة الثالثة مقارنة بمجموعة السيطرة التي سجلت قيمة منخفضة لمستوى الانزيم، كما ارتفعت قيمة مستوى انزيم GPT بشكل معنوي ($P>0.05$) في اجنة المعاملة الثانية والثالثة مقارنة باجنة مجموعة السيطرة. كما ارتفع مستوى انزيم ALP ارتفاعا معنويا ايضا ($P>0.05$) في المعاملة الثانية والثالثة الا انها انخفضت في اجنة المعاملة الخامسة على الرغم من انها لم تصل الى قيمتها في مجموعة السيطرة في حين نلاحظ ان قيم متوسطات فعالية انزيم ADA المناعي قد سجلت قيمة معنوية ($P>0.05$) في مجموعة السيطرة والمعاملة الثانية وحتى الثالثة الا انها انخفضت في المعاملة الرابعة والخامسة وكانت قيمتها متوسطة في اجنة المعاملة الثالثة على التوالي. نستنتج من الدراسة ان مبيد الأميدوكلوبرايد له تأثير مباشر وضرار على البيئة انعكس من خلال تأثيره المباشر في خفض نسبة البقاء واحداث تشوهات وتوقف نمو الأجنة المعاملة ودوره في التأثير على مستوى انزيمات الكبد التخصصية في اجنة الدجاج المحلي والتي اعتبر استخدامها في هذا البحث كمؤشر بايولوجي للكشف عن الاثر الضار للتلوث البيئي بالمبيدات الكيميائية.

كلمات دالة: اجنة الدجاج المحلي، التأثير السمي، مبيد الأميدوكلوبرايد وانزيمات الكبد.

المقدمة

يعتبر مبيد الأميدوكلوبرايد من ضمن المبيدات الزراعية التي استحدثت وانتجت في ألمانيا على نطاق واسع في عام 1992 وكانت اعلى نسبة مبيعات له في 2001-2002 كمبيد حشري قوي وسام أذ تعتمد سميته على نقاوة المنتج وتختلف الجرعة القاتلة له بين الفئران والطيور وحتى الانسان وبين الجنسين ايضا وان استعماله بتركيز قريبة من الجرعة القاتلة يؤثر على الجهاز المناعي والعصبي مما يؤدي الى الشلل بنفس الدرجة التي يؤثر بها غاز الخردل على الانسان (WHO, 2005). ويعتبر الأميدوكلوبرايد مادة سامة للطيور الا ان اعلى سمية لللافقرات مثل النحل فقد لوحظ انه يعمل على احداث طفرات مميتة لحشرة الدروسفلا مختبريا وقد اعتبر هذا المبيد من المواد المسرطنة الا انه ليس له القدرة على استحداث السرطان للانسان (kumar وجماعته, 2014). وانه ذو خاصية ضعيفة على الانسان الا ان دخوله الجسم بصورة مباشرة او غير مباشرة ومن ثم امتصاصه وتايضه داخل الجسم الى مركبات اخرى تعتبر الاكثر سمية من المبيد نفسه وتظهر اعراضه على الجسم بعد (3-5) يوم من التعرض للمبيد. دراسة اخرى حقنت فيها اجنة الدجاج بنوعين من المبيدات الزراعية التجارية هما spinosol و chloropyrifos الذي له علاقة بنوع من البكتريا الموجودة في التربة Actinomycetes تعمل على رفع فاعليته بان تحدث فيه تخمر. غرض الدراسة كان لمعرفة قابلية مبيد الملاثيون والأميدوكلوبرايد على احداث تشوهات على الاجنة ودراسة اثارها السمية خلال فترة النمو الجنيني واستمراره ودراسة الشكل للاجنة فقد لوحظ ان المادتين اختلفتا في قابليتهما في التأثير على الصفات المدروسة باختلاف التركيز المستعمل لكل مبيد (Gowrik وجماعته, 2010). يعتبر الأميدوكلوبرايد واحد من المبيدات التي لها علاقة بالآفات المرضية التي تصيب الحلقة الرئيسية في السلسلة الغذائية للانسان وهو النباتات وعلى الخصوص تلك التي تشكل حلقة مهمة له وحتى الحيوانات الاخرى مثل الأرز، عباد الشمس، الذرة، القطن، فول الصويا وغيرها، وفي الموسوعة العلمية (The free encyclopedia 2014) اضافت انه صنف من المبيدات التي يتركز اسلوب عملها في التأثير المباشر على مركز الجهاز العصبي لأنه neurotoxic effect حيث يرتبط بقوة مع المستقبلات العصبية للحشرات اكثر من ارتباطه معها في اللبائن وان طبيعة الارتباط اي الbinding affinity هي Agonist مع مستقبل الاستيل كولين بأسلوب عمل مماثل لتأثير المبيدات الحاوية على مركبات ال chlonnjcotinyl التابع لمجموعة المبيدات الحشرية neonicotinoid insecticide التي تؤثر علمستقبل النبضة العصبية مسببة الشلل للحشرات، وانشار (Suchall وجماعته 2001) ان هذا المبيد يتأبض في جسم اللافقرات الى مركبات سامة اهمها 4,5 dihydroxy Imidocloprid and 5hydroxy- Imidocloprid -مسببة زيادة عصبية مطردة neurotoxicity as neurotoxicity Hyper responsiveness من نوعية وجوده وكمية المنتجات الزراعية ورغم تحديد نوعية المبيد الا ان تأثير المبيدات التي تستعمل كان يتعدى ماتوثر عليه (الحشرات فقط) بل تعداه ليظهر تأثيرها الغير مباشر على الكائنات الاخرى غير الهدف على وجه الخصوص الفقريات فقد خلقت المبيدات المستعملة بيئات كيميائية لها تأثير مباشر

او غير مباشر ضار لصحة الإنسان والكائنات الأخرى معه من هذا وغيره كثير اعتبرت المبيدات هي المسبب الرئيسي الأول في احداث التلوث لبيئة الإنسان خاصتا والكائنات المحيطة به بشكل عام من خلال استقرارها ليس فقط في البيئة بلشمل تواجدها وتجمعها في اغذية الإنسان حتى، ففي دراسة اجراها Ahmed وجماعته 2010 على بعض المبيدات اتضح من النتائج استقرار نسب من تلك المبيدات في وحدات الدراسة التي كانت البيض ولحم الدجاج ايضا، لذا وللكشف المبكر عن الأثار الضارة للمبيدات الزراعية وحتى عندما يبراد اجراء الاختبارات عليها وما يعكسه التعرض المباشر او غير المباشر الحاد الدائم او البسيط للمبيدات فإن الوحدات التجريبية الحية التي تستخدم لمثل هذه الدراسات تعتبر مهمة لأنها دائما تسلط الضوء علميكتيكيات ذلك التأثير وبالتالي فإنه سوف يستفاد منها للربط مع ماتسببه للإنسان من اثار ضارة من هذا فقد اشير الى استخدام الطيور الداجنة لهذا الغرض فيما يخص لكشف المبكر عن المبيدات الزراعية فقد اشار Cerik وجماعته 2004 و (Burt, 2007) الى اهمية استخدام الدواجن لهذا الغرض لما تمتاز به من عدة صفات جعلت منها نموذج عضوي حيوي مهم ليس فقط في مجال دراسة العلاقات التطورية Phylogenetic وعلم الاجنة Embryology في مجال الزراعة والطب بل اعتبارها اداة جيدة في مختلف للدراسات ذات العلاقة التي تتطلب تطبيقها على النظم الحية لذلك فقد استخدمت الطيور الداجنة بشكل عام واجنتها بشكل خاص كنظم حية تنفع لاجراء فحوصات الكشف الحيوي للمبيدات الزراعية وللمواد الداخلة في تصنيعها حيث اشار Sobti & Sharma 1987 الى سهولة استخدامها لدراسة قدرة العديد من المواد الكيميائية الزراعية على احداث تأثيرات خلوية وراثية Cytogenetic او تأثيرات خلوية حركية Cytokinetic على الانزيمات المسؤولة عنها سواء كانت In vivo داخلها النظم الحية او بشكل In vitro خارجها كما ادخلت اجنة الطيور الداجنة في عدة دراسات منها كان لتحديد درجة سمية بعض الكيمياءات وشدة تأثيرها على الاجنة واستمرارها (Joseph وجماعته 2004) او عند دراسة التأثير الغير مباشر لبعض المبيدات الزراعية على الإنسان من خلال تأثير تلك المبيدات على النمو الجنيني لفترتين من التعرض في اليوم 7 و 12 بعد الحضن وما احداثته من تغيرات على الهيكل العظمي بأن لم يحصل فيه تعظم في بعض المناطق كما سببت تشوه للتناظر الخارجي لشكل الجنين (AL-Asmari & Mobark 2011) وكان Kotwani في 1998 قد اوضح عن اهمية استخدام الاجنة هو سهولة وبساطة الحصول عليها اضافة لسهولة مراقبة نظامها الداخلي عندما يتم استزراعها خارج البيضة مما يوفر فرصة للكشف المباشر عن التداخل بين تلك المواد الزراعية المصنعة وتأثيرها على النظام الوراثي والمورفولوجي للأجنة، ولدراسة الأثار الجانبية والسامة لبعض الانواع من المبيدات فقد اشار Gowrik وجماعته 2010 انها سببت لها تشوهات وانحرافات مورفولوجية ادت الى هلاك اجنة المعاملة. ولغرض الكشف السريع لواحد من تلك المبيدات والذي هو الأميدوكولورايد وللكشف المبكر عن الأضرار التي يسببها على اجنة الطيور الداجنة ليس فقط على نموها الجنيني بل ارتأينا دراسة تأثيره على أنزيمات الكبد التخصصية فيها والتي هي كل من (GOT) (ALP)، (GPT)، وكذلك الانزيم المناعي (ADA) فقد ارتأينا في هذا البحث دراسة مستوى تلك الانزيمات في كبد اجنة الدجاج بعد تعرضها لتراكيز مختلفة من المبيد اضافة الى دراسة نسبة البقاء والنمو وتطور تلك الاجنة ومقارنتها مع مجموعة السيطرة الغير معاملة واعتبرناها كأحد المؤشرات البيولوجية التي تعكس مقدار ومخاطر تأثير التلوث البيئي الحاصل بالمبيدات الكيميائية والكشف عن تواجدها بشكل سهل وسريع باستخدام اجنة الدجاج المحلي.

المواد وطرق العمل

اجري الجزء المختبري من البحث في مركز معالجة الملوثات/قسم الكشف الحيوي التابع لدائرة البيئة والمياه في وزارة العلوم والتكنولوجيا. فقد تم جلب 90 بيضة ملقحة لدجاج محلي من مركز إباء للابحاث الزراعية - ابو غريب، وكانت بمتوسط وزن 40-45 غم، استخدم منها 30 بيضة حضنت وحقنت في منطقة الفسحة الهوائية بتراكيز مختلفة من مبيد الأميدوكولورايد لتحديد الجرعة القاتلة النصفية LD₅₀ والموضحة في شكل (1) وحسبت الجرعة القاتلة النصفية LD₅₀ باستخدام المعادلة التالية:

$$LD_{50} = \frac{10 - 15}{2} = 12.5 \text{ mg/egg}$$

حيث يمثل الرقم 10 الجرعة التي ادت الى هلاك اقل من نصف العدد والرقم 15 يمثل الجرعة التي ادت الى هلاك اعلى من نصف العدد. اما الجزء المتبقي من البيض تم وضعه في حاضنة بدرجة حرارة 37 (±0.5) سيليزية ورطوبة 60% مع التقليب المستمر كل اربع ساعات بعده حضرت 5 تراكيز من المبيد باستعمال الماء المقطر المعقم للتخفيف واعتمادا على قيمة ال LD₅₀ كالاتي: 0, 5, 10, 15, 20, 40 ملغم/ بيضة ثم قسم البيض الى 6 معاملات بواقع 10 بيضة/ معاملة ومن ضمنها مجموعة السيطرة (المقارنة) وحسب بطريقة Fletcher & Duna (1969) وباستخدام حقنة خاصة (1 inch long no21) تم حقن الاجنة في المعاملات بعد مرور 72 ساعة من الحضن وباجراء الفحص الضوئي للتأكد من وجود نمو جنيني فقد تم حقن البيض بالتراكيز اعلاه في منطقة الفسحة الهوائية بواقع 0.1 مل/بيضة اما مجموعة السيطرة فقد حقنت بالماء المقطر والمعقم DDW بعد ذلك غطيت الفتحات باستعمال البارافين واستمر حضن البيض المعامل وبعد 16 يوم من بداية الحضن تم كسر البيض لحساب نسبة البقاء وجمعت الاجنة من كل معاملة واخذت عينات الكبد ثم وزنت وهرست مع محلول داري الفوسفات PBS باستخدام جهاز مجانس الانسجة Tissue Homogenizer ثم وضعت نماذج الكبد المهروس بجهاز الطرد المركزي بسرعة 5000 د/د لمدة 20 دقيقة بدرجة حرارة 10° ثم اخذ الراشح لقياس تراكيز الانزيمات التخصصية (GOT, GPT, ALP) باستخدام عدة تشخيصية خاصة لكل انزيم، اما انزيم ADA فقد تم حساب تركيزه حسب طريقة Giust (1981) التي تتضمن اولا قياس الفعالية الحجمية للانزيم بقياس كمية البروتين الكلي في نفس العينة ومن ثم حسبت الفعالية النوعية للانزيم من قسمة الفعالية الحجمية/حجم البروتين الكلي للعينة .

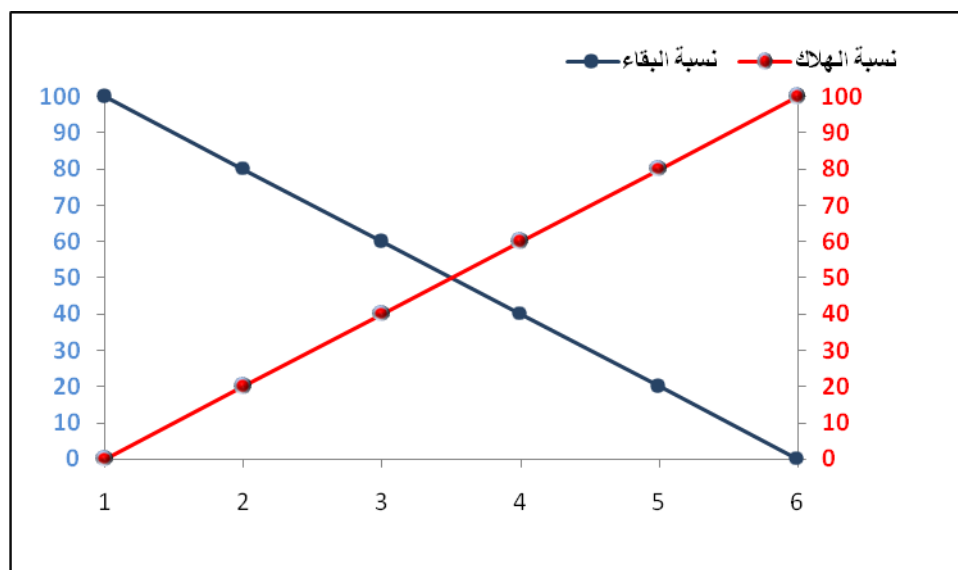
تم تحليل نتائج البيانات الاحصائية باستخدام التصميم العشوائي الكامل (C.R.D) لقياس تأثير تركيز المبيد في الصفات المدروسة وحسب النموذج الاحصائي التالي:

$$Y_{ij} = M + T_i + e_{ij}$$

واستخدم لتحليل النتائج البرنامج الاحصائي الجاهز (SAS 2004) ولدراسة معنوية الفروقات بين المعاملات استخدم اختبار Duncan (1955) متعدد المديات.

النتائج والمناقشة

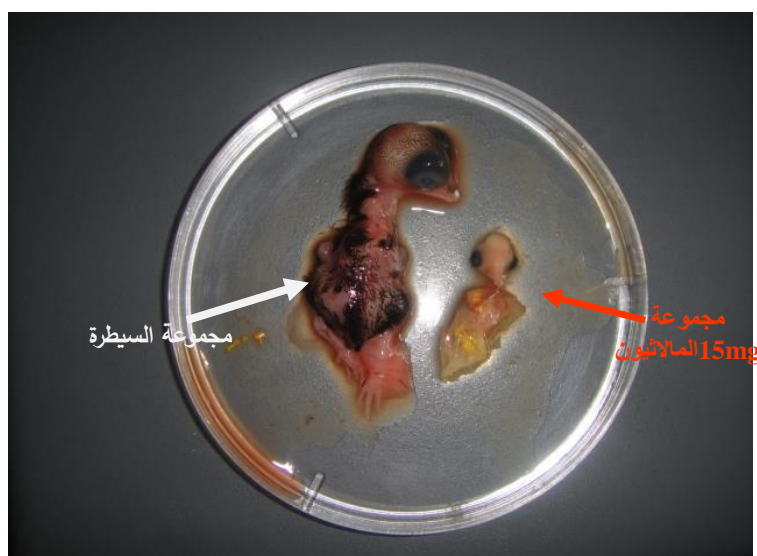
تبين النتائج الموضحة في الشكل (1) تأثير التراكيز المختلفة من مبيد الأميديوكولوبرايد ان نسبة بقاء الاجنة قد انخفضت بشكل معنوي $P > 0.05$ مع استمرار ارتفاع نسبة تركيز مبيد الأميديوكولوبرايد في كل معاملة فقد كانت نسبة البقاء في مجموعة السيطرة مرتفعة بشكل معنوي $P > 0.05$ ونسبة قدرها 100% لكل الاجنة ضمن هذه المعاملة فيما لو قورنت هذه النسبة (البقاء) مع قيمها للمعاملات الخمس الأخرى وبالخصوص المعاملة السادسة التي كان تركيز المبيد فيها 40mg حيث سجلت هذه المعاملة نسبة بقاء بلغت فيها 0% مما يعني هلاك كافة اجنة المعاملة ان هذا يؤكد ان المبيد المستعمل هو مادة سامة سببت هلاك اجنة المعاملات الأخرى بنسب متفاوتة كما ان المقارنة بين اجنة المعاملات ذات التراكيز المختلفة يظهر انها اعطت نسبة بقاء تناسبت بشكل عكسي مع كل زيادة في تركيز جرعة المبيد قيد الدراسة فالمعاملة الثانية كانت نسبة بقاء الاجنة لها 75% وللمعاملة الثالثة 62.5% وبلغت هذه النسبة قيمة مقدارها 37.5% و25% للرابعة والخامسة على التوالي ثم بلغت 0% للمعاملة السادسة وكما هو واضح عند المقارنة بين هذه المعاملات والمعاملات ذات التراكيز الاقل في الشكل البياني (1) والتي اظهرت نسبة بقاء منخفضة معنويًا $P > 0.05$. ان هذا قد يتفق مع ما اشار له (Lucp وجماعته 2012) بأن الأميديوكولوبرايد يعتبر مادة سامة وقاتلة للحشرات ومميتة Lethal او شبه مميتة Sub-lethal للفقرات التي تتعرض له موضعا عمل المبيد انه وكخطوة اولى يحصل تداخل وارتباط بين المركب السام نفسه او المركبات التابعة له مع الوزن الجزيئي للمادة الوراثية لخلايا الهدف التي يعمل عليها المبيد وهنا بشكل محدد مع مستقبل الأستيل كولين AChR للخلية كما يجب ان لا ننسى ان الاجنة جميعها قد تم معاملة في نفس الوقت حتى العمر 16 من الحضن اي ان التعرض كان للمدى البعيد وان عملية حقن المبيد عندما كان عمر الاجنة 3 يوم فقط اي في مرحلة تضاعف الخلايا وبداية تخصصها الى انسجة ومن ثم اجهزة مميزة فقد يكون السبب الذي ادى الى هلاك اجنة المعاملات الخمسة مقارنة بالسيطرة ان تراكيز المبيد احدثت صدمة وتوقف في استقبال الأيعازات العصبية خصوصا انه وكما ذكر Romanoff 1960 ان هناك تباين في النسب المئوية لأوزان الأنسجة الجنينية النامية بالنسبة لوزن الجنين بشكل عام وخاصة لعضلة القلب والدماع وحتى كرة العين. كما ان هذا لا يختلف عما اشار له (Mobarak & AL-Asmari 2011) بان هناك بعض المبيدات التابعة لمجموعة مركبات الفسفور العضوية (OPs) مثل مبيد المالاتون فأنها لا تشكل خطرا فقط عند استخدامها للقضاء على الحشرات بل ان استخدامها بجرعات عالية يشكل خطرا على الانسان والحيوان ايضا.



شكل رقم (1) يوضح قياس LD50 لمبيد الأميديوكولوبرايد في اجنة الدجاج المحلي.

تظهر نتائج النمو الجنيني ان هناك نقص او توقف في حجم ونمو الاجنة وتطورها وصل الى نصف الحجم الطبيعي لاجنة السيطرة والصورة (1) توضح ذلك حيث يظهر فيها حجم الجنين في المعاملة الثالثة الذي كان تركيز المبيد فيه 15 ملغم/بيضة اي انه اعلى بقليل من قيمة ال LD₅₀ التي حسبت للمبيد والتي كانت 12.5 ملغم/بيضة اذا ما قورنت مع الحجم الطبيعي لاجنة السيطرة وكان Romanoff 1960 قد اشار ان اجنة الدجاج كلما تتقدم في العمر فأنه من المتوقع ان نلاحظ زيادة مطردة في كمية الدم الواصلة الى الجسم ويرافقها زيادة وارتفاع في معدل انقسام الخلايا The Mitotic rate غير ان الأختلاف الواضح بين حجم الجنين لا بد وان يكون سببه تأثير المبيد المستعمل الذي ظهر دوره من خلال انحراف معدل انقسام الخلايا Mitotic Index لاجنة المعاملة مقارنة مع مستواه الطبيعي الذي تظهره اجنة السيطرة. وقد يكون تأثير المبيد انه اوقف او ثبت الخلايا من الاستمرار في انقسامها او قدرتها على اصلاح الضرر الحاصل بسبب المبيد قد يكون لقدرة بعض الأنواع من المبيدات علنا الارتباط مع السايكوكينات الحركية داخل الخلية مما يمنعها من التخلص سواء من المبيد نفسه او من المواد الناتجة عن تأييضه داخلها وهذا بدوره اوقف عمل الأنزيمات التي تشارك في عملية انقسام الخلية او كما اشار Arias 1995, 1996 ان المبيدات قد تسبب حدوث عبور تصالبي لخيطي الدنا مما اوقف ومنع الخلايا من الاستمرار بالانقسام الاعتيادي الضروري لاستمرار النمو وزيادة حجم الجنين. وقد اضاف كل من (Souza & Natekar, 2012) وكذلك (Khurshid, 2003) الى ان بعض المواد الكيميائية قد تسبب توقف النمو Stunted growth, انحراف المنقار beak deformities وانحراف البراعم النامية limb

deformities وقصر الأجنحة وغياب بعض الريش. وكان (Muktyaz وجماعته 2014) قد اشاروا في دراسة مماثلة عن هذا المبيد وبنفس نسب التراكييز المستخدمة هنا على 240 بيضة لكهورن ملفحة استنتج منها ان جميع التراكييز تلك قد اثرت بشكل مطرد مع كل ارتفاع في نسبة تركييز المبيد المستخدم للدراسة على نمو الأجنة جميعها فقد لوحظ ان الأجنة المعاملة قد حدث فيها انحرافات مورفولوجية غير طبيعية شملت ارتفاع حجم الرأس مقارنة بجسم الجنين الذي حصل فيه انخفاض ملحوظ في الحجم مع توقف النمو. كما ان هذا لا يختلف عن ما اشار له (Mobarak & AL-Asmari 2011) في اختبار مبيد Endosulfane على اجنة الطيور الداجنة انه قد سبب لها انحرافات عن الشكل الطبيعي للأجنة المعاملة وسبب هلاك الاجنة وانخفاض حجمها مقارنة بالطبيعي وعدم اكتمال الهيكل العظمي لها. وقد اوضحت AL-Anbari, 1999 في دراستها على اجنة الدجاج المحلي من خلال قياس دالة انقسام الخلايا MI وتضاعفها RI واستمرار دورة الخلية CCP ان هذه الدوال ترتفع بشكل ملحوظ حتى عمر 15 يوم من النمو الجنيني مقارنة بقيم تلك الدوال في الساعات الأولية او اليوم الأول بعد الحضن كما اضافت الباحثة نفسها ان قيم تلك الدوال جميعها قد انخفضت بشكل واضح لدى الأجنة الناتجة من امهات حقنت بمادة مطفرة هي ال MMC خفضت قيم تلك الدوال وحدثت تشوه واختلال وهلاك الاجنة فقد انتقلت بصورة غير مباشرة تلك المادة اثناء تكون البيضة وتركزت في الصفار ثم الجنين واثرت عليه بشكل لا يختلف عن تأثير المبيدات فيما لو تعرضت لها الامهات بشكل مباشر او عندما تتعرض له بشكل بسيط وقليل لكنه دائم يحدث تراكمه داخل جسم الكائن الحي اثار ضارة تسبب في خفض استمرار دورة الخلية مما يعني خفض كل من انقسام وتضاعف الخلايا وبالتالي موت الأجنة المعاملة. وازداد (Lary وجماعته 2001) ان انخفاض حجم الجسم قد يعود لانخفاض تصنيع وتحويل DNA الى RNA ومن ثم بروتين وان هذا من دون شك يعني وجود ضرر damage للخلايا الحية مما اثر على قابلية الخلايا على الاصلاح والمروء بمرحلة دوراتها الأقسامية الأربعة, G1, S, M, G2 وهذا هو عمل اغلب المبيدات الزراعية pestisid والحشرية insictesid لأنها مواد سامة.



صورة (2). يبين الفرق بين التطور الجنيني لمجموعة السيطرة ومجموعة المعاملة بمبيد الأميدوكلوبريد ذي التركيز 15mg/egg

وبالنسبة لنتائج متوسط قيم مستويات انزيمات الكبد التخصصية المدروسة والتي اولها انزيم GOT ففي المعاملة الثالثة التي حقنت فيها الأجنة بتركيز 15 ملغم من المبيد فقد ارتفع تركيز الأنزيم بشكل عالي المعنوية $P > 0.05$ بالمقارنة مع قيمته في مجموعة السيطرة التي لم تحقن بالمبيد حيث بلغت نسبة الانزيم GOT فيها 6.6 وحدة/ملغم مقارنة مع قيمتها المعنوية المرتفعة للمعاملة الثالثة حيث كانت 30.8 وحدة/ملغم وقد تفاوتت نسب تركيز الأنزيم بين المعاملات الأخرى بمستوى كانت جميعها اعلى من قيمتها في معاملة السيطرة و اقل من اعلى قيمة الثالثة فكانت المعاملة الرابعة والخامسة والثانية بنسب انزيم بلغت 26.6 و 20.2 و 15.2 على التوالي. وبمقارنتها بمعاملة السيطرة قد يكون الاختلاف في مستوى تركيز الأنزيم عن معاملة السيطرة يعود لطبيعة الأنسجة التي يتواجد ويتمركز فيها الأنزيم والتي هي القلب والكبد والعضلات الهيكلية حيث ترتفع نسبته عن الحد الطبيعي في حالة واحدة فقط وهي عند حدوث امراض او اصابات او اي سبب اخر يؤدي الى حدوث ضرر الخلايا التي يتواجد فيها الأنزيم مما يؤدي الى نضوحه (الأنزيم) الى مجرى الدم فترتفع نسبته عند قياسها في البلازما. من هنا فقد استخدم مستوى وتركيز الأنزيم كدالة لتشخيص حالات عدة تعكس مدى تعرض الكبد الى الأصابة والضرر كما اشار لذلك (Charle, 2002) لذا فإن ارتفاع نسبته في اجنة المعاملات بالمبيد قد اعطى مؤشرا واضحا عكس مقدار الضرر الحاصل لخلايا الكبد مع زيادة تركيز المبيد حتى اذا قورنت المعاملات الخمسة جميعها مع السيطرة فالأرقام تشير الى ارتفاع واضح لقيم المعاملات وكان (Dempsey & McDaniel, 1964) قد اشاروا ان ارتفاع مستوى هذا الأنزيم في دم الإنسان يعطي اشارة انه قد يكون سبب هذا الارتفاع واحد من الحالات الآتية اما liver toxemia, pericarditis myocardial infarct or pancreatitis. وازداد (Hull & Scott, 1972) ان نسبة الأنزيم تستخدم للطيور الداجنة كدليل على الأصابة بمرض ومنها عند حدوث مرض ضمور العضلات، كما ترتفع نسبته بسبب امراض الكبد وان نسبة الأنزيم ثابتة بين الجنسين وفي الحالة الطبيعية. بالنسبة لانزيم GPT فجدول (1) يشير ان تركيز هذا الأنزيم قد ارتفع بشكل عالي المعنوية $P > 0.05$ واضح لكل الوحدات التجريبية المعاملة مقارنة بالسيطرة على الرغم من الاختلاف في مستوى المعنوية الا ان قيمتها كانت في جميعها اعلى من قيمته لمجموعة السيطرة.

جدول (1). تأثير تراكيز مختلفة من مبيد المالاتيونعلي تراكيز انزيمات الكبد في اجنة الدجاج المحلي.

المجموعة	عدد الهلاكات	عدد الاحياء	نسبة الهلاك (%)	نسبة البقاء (%)	GOT (U/L)	GPT (U/L)	ALP (U/100ml)	ADA (U/mg)
control	0	10	0	100	6.6	10.1	10.2	0.273A
5 mg	2	8	20	80	15.2	46.4	66.7	0.234A
10 mg	4	6	40	60	30.8	39.6	59.3	0.067B
15 mg	6	4	60	40	26.6	38.3	35.5	0.027C
20 mg	8	2	80	20	20.2	31.9	23.7	0.015C
40 mg	10	0	100	0	-	-	-	-

فقد كانت قيمة الانزيم لمجموعة السيطرة بدون معاملة U/L 10.1 فيما كان اعلى تركيز له في المعاملة الثانية 46.4 U/L وكان 39.6 U/L للثالثة و38.3 والرابعة و31.9 للمعاملة الخامسة قد يعود سبب هذا الارتفاع لقيم تركيز الانزيم سببه المبيد المستعمل للمعاملات مع الأخذ بنظر الاعتبار ان جميع ظروف التجربة واحدة للجمع، فإن هذا ليس بعيد عن الأسباب التي ادت الى ارتفاع نسبة الانزيم السابق GOT مقارنة بقيمته في السيطرة لذا فإنه لابد ان يكون نوعية المبيد المدروس او تراكيزه المستعملة قد سببت اضرار في نسيج وخلايا الكبد التي تتواجد فيها هذه الانزيمات. اشار Lary وجماعته، 2001 ان تحطم الكبد يعني موت خلاياه اي Liver damage = Liver dath وهذا هو السبب الرئيسي الذي اعطى قيمة مرتفعة لتركيز الانزيم لأن الانزيمات تلك التي مركزها الكبد سوف تنتضح خارج الخلية الى الدم وهذا احد الأسباب التي مكنت للاستفادة من نسبة الانزيم للكشف المبكر عن الحالة الصحية للكبد والكشف عن مدى تأثير الكبد حتى عند الانسان. وبالنسبة لأنزيم ALP فإن جدول (1) يظهر ان نسبة الانزيم هذا قد ارتفعت بشكل عاليا المعنوية $P > 0.05$ في المعاملة الثانية والثالثة بمتوسط بلغ U/100ml 66.7 و 59.3 U/100ml على التوالي فيما كانت قيمته لمجموعة السيطرة منخفضة حيث بلغت U/100ml 10.2 وكانت قيمته وسطية للمعاملتين الرابعة والخامسة اذ بلغت 35.2 و 23.7 U/100ml قد يكون السبب في تباين القيم لهذا الانزيم ان المبيد المستخدم قد اثر على تايض مجموعة الفوسفات التي يعمل عليها ولذلك انخفضت قيمته في مجموعة السيطرة التي لم تحقق كما اننا نلاحظ انه على الرغم من ان تركيز المبيد في المعاملة الثانية كان 5 ملغم وهي اقل نسبة استعملت للحقن الا انها اعطت اعلى نسبة مرتفعة معنويا لتركيز الانزيم حتى عند مقارنتها مع المعاملة الثالثة التي سجلت قيمة مرتفعة ايضا الا انها كانت اقل منها حسابيا 59.3 U/100ml فقد يكون السبب هنا ان الجرعة للمعاملة الثانية رغم انها بهذا القدر البسيط الا انها احدثت ضرر لخلايا الكبد واثرت على تايض مجموعة الفوسفات التي يعمل عليها مما سبب ضرر لخلايا الكبد وامكان تواجد الانزيم وكان (Sabatcov وجماعته، 2007) قد اشارو ان ALP هو انزيم فوسفاتيز قلوي ينشأ ويتركز ويتواجد في العظام حيث ان له دور في عملية التعميم (Calcification) وتكوين البيضة من خلال دوره في نقل مجموعة الفوسفات التي يعمل عليها وبعد الكبد وسايتم بلازم الخلايا واغشيتها والأمعاء المصدر الرئيسي في انتاجه كما ان له دور في عملية انتقال المواد الغذائية عبر الأغشية وقد اشار الى وجود علاقة بين نسبة انزيم ALP في الاجنة من عمر 11 يوم وحتى عمر 60 يوم بعد الفقس وازداد ان هذا الانزيم وبسبب تواجده في انسجة كثيرة فإن نسبته في السيرم ستكون خليط من اماكن نشأته وهذا ما يطلق عليه شبيهات الانزيم ممكن تحديدها بالفصل الكهربائي كما اشارو ان تركيز الانزيم ترتفع عند حدوث امراض او التهابات في الكبد او في حالة تسمم الكبد ببعض المركبات الكيميائية وحتى الادوية. وكان (Auto & Quejz, 2007) قد افاد بوجود علاقة بين تركيز كل من انزيم GPT, GOT والـ ALP في الكبد وقد علل ذلك بان الخلية تحتوي على الانزيمات الضرورية لوظيفتها الا انه عندما تتأثر الخلية لسبب او اخر فان مكوناتها سوف تطرح الى المصلوالم وهذا يمكن اتخاذ نسبتها كدليل جيد يعكس حالة الخلايا حيث ان التحوير في فعالية الانزيم ونسبته تظهر عند موت الخلية كما اضافوا انه بما ان الكبد يعتبر مركز تايض أغلب الكيمياء فان تحطم خلاياه سوف يظهر اختلاف وتباين في تركيز اغلب انزيماته التخصصية منها. وازداد Khurshid, 2003 لدراسة انزيمات الكبد التخصصية لاجنة الدجاج باستعمال مبيد cypermethrim ان هذا المبيد وبالتراكيز المرتفعة قد سبب رفع لكل من انزيم GPT, GOT في حين انخفض تركيز انزيم ALP وعلل ذلك ان الجرعة المرتفعة من المبيد المستعمل قد سببت موت الخلايا اما على شكل necrosis او موت مبرمج apoptosis وبالاثان معا. كما اشار Sato & Nakamura, 2008 انه بالامكان الاستعانة بقيمة تركيز انزيمات الكبد من اجل تقدير مدى الضرر الحاصل للكبد واعتبارها مقياس مهم وخاصة للانسان ممكن الحصول على النتيجة خلال 10-48 ساعة فقط. وبالنسبة لانزيم ADA المناعي فنلاحظ ارتفاع قيمته بشكل معنوي $P > 0.05$ في مجموعة السيطرة 0.273 U/mg وكذلك المعاملة الثانية ليصل الى 0.234 U/mg على الرغم من انها كانت اقل نسبة مبيد استعمل لذا فإن قيمتها كانت مقاربة لقيمته في مجموعة السيطرة بشكل عالي المعنوية $P > 0.05$ في حين ان تراكيز الانزيم ADA في معاملات المبيد الاخرى الثالثة 0.067 والرابعة 0.027 قد سجلت انخفاضا ملحوظا كان اوطأها للمعاملة الخامسة اذ بلغ بها نسبة الانزيم 0.015 وحدة/ملغم بروتين قد يعود السبب في تفاوت هذه القيم للاجنة بعمر 16 يوم ان الانزيم ADA هو انزيم مناعي يدخل في مسلك تصريف القواعد البيورينية وقد سجل قيمة مرتفعة للمعاملة الثانية اكثر بقليل من قيمته في مجموعة السيطرة رغم انها اقل منها بقليل الا انها تعتبر مرتفعة قد يكون السبب انه يعتبر خط دفاعي للخلية باعتبار ان هذا الانزيم له علاقة بالمناعة بتواجده في الجهاز المناعي وخلاياه وان زيادة قيمته يعني تصنيعه بشكل اكبر للدفاع عن الخلية واصلاحها لاستمرار انقسامها حيث ان له علاقة بتوفير ATP الأندوسين ثلاثي الفوسفات الضروري لدخول الخلية في مراحل الانقسام وتصنيع الدنا اما القيم المنخفضة التي ظهرت مع زيادة تركيز المبيد فانها تعطي دليل على ان المبيد المستخدم قد احدث توقف للخلايا مما سبب عطل او defect في تصنيع الانزيم وهذا بدوره ادى الى تراكم المواد التي يعمل على تصريفها الانزيم وعدم تحويل dAMP الى dATP فاصبح لها تاثيرات عالية السمية Lymphotoxicity وعلى الخصوص في الخلايا المناعية التي تعرضت الى التركيز المرتفع من المبيد وكان Weqelin وجماعته، 1978 قد اشار ان فعالية انزيم ADA تكون مرتفعة في نسيج الكبد مقارنة مع فعاليته في الانسجة الاخرى وان له دور في مسلك تصريف القواعد البيورينية كما ان هذا لا يختلف عما وجده (Varshneya وجماعته، 1986) حول تأثير مبيد مثل المالاتون على الجهاز المناعي على الانزيمات والبروتينات الموجودة في الكبد لاجنة الطيور الداجنة حيث لوحظ حصول انخفاض في قيمها عند اعطاء جرع من هذا المبيد مع العلائق في تغذية الطيور ادت الى حدوث انخفاض في وزن الجسم كما ان محتوى الكبد من البروتينات المناعية supermatal للـ ADA قد انخفض مقارنة بمجموعة البيضغير المعامل. قد يكون السبب الذي انخفضت فيه قيمة الانزيم ADA مع ارتفاع تركيز المبيد الاخير

سببه عجز الخلايا في قدرتها على تصنيع الانزيم مما يسبب تراكم المواد التي يعمل عليها deoxy Adenin & deoxy Adenosin حيث سببت تثبيط عمليات بناء وتصنيع الدنا وبالتالي فشل الخلية وموتها. نستنتج من هذا ان زيادة تركيز مبيد الأميديوكلوبرايد المستعمل قد سبب زيادة مطرد في نسبة هلاك الأجنة الذي انعكس تأثيره على نسبة البقاء وبالتالي على مستوى انزيمات الكبد التخصصية والمناعية عند المقارنة بين المعاملات مع مجموعة السيطرة ان هذا يدل على مدى تضرر حالة النسيج الكبدى وتأثيره على عملية التأيض والفلتره للتخلص من السموم داخل الكبد الذي انعكس بصورة غير مباشرة على تقلص حجم الجنين وبما ان المبيدات لاتسبب الهلاك المباشر للإنسان خاصة او للفقرات بشكل عام الا أن اثرها التجميى قد يظهر بعد فترة لذا فأن هذا البحث يدعو الى اعتماد اجنة الدجاج ضمن نظم الاختبارات السريعة في مجالات تقبيس المنتج سواء كان بيض/ لحم الدجاج وحتى المبيدات واختبار سميتها ودرجة تأثيرها على البيئة ليتم الحد من استعمالها او تقليل درجة سميتها صناعيا.

المصادر

- Ahmed, R.; N.M. Salem and H. Estaitich (2010). Occurrence of organochlorine Pesticides residues in eggs, chicken meat in Jordan. *Chemosphere*, 78(6):667-671.
- Al-anbari, Eman Hasan Hadi (1999). Effect of different kinds of concentrate proteins to induce mutation on local chick embryos. Thesis of Master / College of Agriculture. /Baghdad Univ., Iraq.
- Arias, E. (1995). Cytogenetic and cytokinetic effects of 2, 4-DMCPA on B-Lymphocytes during development of the chick embryo in vitro. *Toxicology* 8:65-69.
- Arias, E. (1996). Effect of the phenoxy Herbicide MCPA on SCE frequency and cell kinetics in developing chick Embryo. *Eco. Toxi. Cology and Environmental safety*, 33:25-29.
- Burt, D.W. (2007). Emergence of the chicken as a model organism: Implications for Agriculture and Biology. *Poultry Sci.*, 86(7):1460-1471.
- Cerik, A.T.; L. Akdogan and E. Adigvze (2004). Shell-Less culture of the chick Embryo as a model system in the study of developmental neurotoxicology. *Neuroanatomy*, 3:8-11.
- Charle, E.O. (2003). Diagnostic serum enzymes. *Virtual Chemi. Book*, Elmhurst College.
- Duna, J.F. and W.W. Fletcher (1969). An investigation of the toxicity of insecticides to bird eggs using the egg-injection technique. *Annals of applied Biology*, 64 (3):409-423.
- Duncan, D.B. (1955). Multiple range and multiple F-test. *Biometric*. 11: 1-42.
- European food safety Authority. 2013. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance clothianidin. *EFSA. Journal*, (1):30-66.
- Giust, G. (1981). Adenosine de aminase in: *Methods of Enzymatic Analysis*. ed. By: H. U. Bergmeyer. florida. verlaye chemie. International 2nd ed.:1092-1099.
- Gowrik, U.; V.P. Parabhudos and S.B. Krishnan (2010). Embryotoxic and teratogenic effects of pesticides in chick embryos: A comparative study using two commercial formulations. *Environmental toxicology*, 27 (3):166-174.
- Itull, S.J. and M.J. Scott (1972). A study of the relationship of plasma Glutamic Oxaloacetate Transaminase activity to nutritied muscular dystrophy in the chicken. *The journal of nutrition*, 102:1367-1376.
- Joseph, M.H.; M. Jean-Pieure; M.J. Verrette; M.K. Mutchler and O.G. Fitzhugh (2004). The injection of chemicals in to the yolk sac of fertile eggs prior to incubation as toxicity test. *Toxicology and applied pharmacology*, 5(6):760-771.
- Khurshid, A. (2003). Cypermethrin, pyrethroid insecticides induces terato Logical and biochemical changes in young chick embryo. *Pak. j. Biol. Sci.*, 6:1698-1705.
- Kotwani, A. (1998). Use of chick embryo in screening for teratogenicity. *Ind. J. Phamacol*, 42(2):189-204.
- Kumar, Ajay; Monika Tomar and Sudhir kumar Kataria (2014). Effect of sub-lethal doses of Imidacloprid on histological and biochemical parameters on female albino mice. *J. of Environmental science Toxicology and food technology*, 8(1):9-15.
- Lary, D.S.; C. Ogg and F.V. Edward (2001). Sign and Symptoms of pesticide poisoning. *Pesticides*, 4:6: 2.
- Luc, P. Belzunces; Sylvic Tenamitchian and Jem Lve Buiast (2012). Honey bee Apidologic., 43:348-370.
- Mobarak, Y.M. and M.A. AL- Asmari (2011). Endosulfane impacts on the developing chick embryos: Morphological, Morphometric and skeletal changes. *Inter. J. of Zoological research*, 7:107-127.
- Muktyaz Hussein; Vishram Singh; M.A. Hassan; A.K. Singh and B. Yadar (2014). Malformations and Teratogenic effects of Imidocloprid on chick embryo. *SJAMS Sci.*, 2(IA): 67-72.
- Nakamura, M. and Satos (2008). Establishment of long term monitoring systemic for blood chemistry data by the national health and nutrition survey in Japan. *J. Atheratscter. Thramb.*, 15(5):244-249.
- Natekar, P.E.; F.M. De Souza (2012). Experimental Induction of teratogenic effect in chick embryos. *Anatomica Karnataka*, 6(3):76-80.
- Nauen, R.; Ebbinghaur, Kintscher U. and R. Schmuck (2001). Toxicity and nicotinic acetylcolline receptor interaction of Imidocloprid and its metabolites in Apis mellifera. *Pest. Manag. Sci.*, 57(7):577-586.

- Oquejj, E.O. and J. Auto (2007).The effects of sub- lethal dose of lambda – Cyhalothrin on some Biochemical Characteristics of the African Cat fish. Research Article, 11:1473-1477.
- Romanoff, A.L. (1960). The avian embryo structural and functional development.The Mac Million Co. New York.
- Sabatcov, O. E., Paraskevakov;S.T. Balafouta and E. Patsouvis(2007).Hestochemical study of Alkaline Phosphotease activity in chicken intestine.Bulgarian. J. of Veterinary Medicine, 10(2):83–93.
- SAS (2004).Statistical Analysis System, users Guide. Statistical.Version 7th ed. SAS. Inst. Inc. Cary. N.C., USA.
- Sharma, G.P. and R.C. Sobti(1987).Cytotoxic, Lytkinetic and Cytogenetic Effect of agricultural chemical in vitro and in vivo.Gent. Toxicol, 3(3):167.
- Suchall, S.; D. Guez and L.P. Belzunes (2001).Discrepancy between acute and chronic toxicity by Imidacloprid and its metabolites in Apis mellifera. Environ Toxicol chem., 20(11):2482-2486.
- Sully, M. Williamson; Sarah, J. Willisan and Geraldine A. Wright (2014). Exposure of neonicotinoids influences the motor function of adult worker honey bees. Ecotoxicology, 23(8):1409-1418.
- Varshneya, C.; H.S. Bahqa and C.D. Shama (1986).Effect of dietary malathion on hepatic macro some on the leghorn cookers. Toxicol lett., 13 (2):107-111.
- Weqelin, I.; G. Pane and F.A. Manzoli (1978). Enzymes involved in Adenine Nucleotide metabolism of developing chick embryo.Comp. Biochem-Physiol., 6(2):327-329.
- WHO (2005). The Recommended classification of pesticides by hazard and Guide live to classification. World Health Organization.
- Wikipedia, The free encyclopedia (2014).

DETECT THE TOXIC EFFECTS OF IMIDACLOPRID PESTICIDE BY USING LOCAL CHICK EMBRYOS.

SUMMARY

The study aimed to detect the side hazard effects of imidacloprid pesticide on living organism. The aim of this experiment was to study its effectson the survival rate and the level of specific liver enzymes on local chick embryos. Ninety fertile local eggs were used with 40-45gm average weight. Thirty eggs were used to determine the imadocloprid LD₅₀ and it was 12.5mg/egg. Then the other 60 eggs were divided into six treatment groups (10 egg/ treatment) then incubated. Three days later, treatment eggs injected with different concentrations of malathion which was respectively (0.5, 10, 15, 20, 40) mg/egg (0.1ml/egg). After 16 days eggs where broken and the rate of survival embryos were calculated and also liver enzymes (GOT) Glutamic Oxaloacetic Transaminas ,(GPT) Glutamic Pyruvate Transaminase, (ALP) Alkaline Phosphates& (ADA) Adenosine De Aminaseconcentrations.

From the statistical analysis for survival rate and liver enzymes concentrations we found that the rate of survival embryos was increasing significantly $P>0.05$ as malathion concentration decreased. The first treatment control shows 100% rate of survival, while it was 0% of sixth treatment with 40% mg/egg imadocloprid, we found that the concentration of GOT enzymes was increase significantly $P>0.05$ in third and fourth treatment respectively when compared with control group which gave the lowest value.

The GPT enzyme was highly increased significantly $P>0.05$ on the second embryos treatment when compared with the control and the ALP enzyme value was highly increased significantly $P>0.05$ on second treatments but was decreased in the fifth treatment but it was not the same value as in the control treatment, while the mean values of ADA the immunity enzyme was increasing significantly $P>0.05$ on control group and the 2nd treatment while it declined in the fifth treatment but it was medium on third and fourth treatments respectively.

We can conclude that the imidacloprid pesticide has direct harmful effect on environment by proved its direct effect on reducing survival rate and caused different levels on liver specific enzymes in local chicken embryos which used in this research as a biological indicator to detect the harmful effects of environment pollution with chemical pesticides.

Keywords: *local chick embryos, imidacloprid pesticide, liver enzymes, environment pollution*