وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة القادسية

كلية العلوم

قسم علوم الحياة

دراسة نسجية و جزيئية لتأثير مبيد Chlorpyrifos التجاري على ذكور الجرذان البالغة

رسالة مقدمة إلى

مجلس كلية العلوم _ جامعة القادسية

وهي من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة / علم الحيوان

من الطالب/محمد علي مطلب الحجيمي

بكالوريوس علوم حياة/1994

إشراف

أ. م. د . وجدان ثامر مهدي التميمي

ذوالحجة 1437 هـ **أيلول 2016 م**

أجريت الدراسة الحالية بهدف معرفة تأثير جرع مختلفة من مبيد Chlorpyrifos على ذكور الجرذان البالغة ،أجريت الدراسة الحالية في البيت الحيواني والمختبرات التابعة لكلية العلوم جامعة القادسية للمدة من 8-12-2015 لغاية 29 -1-2016 (ملاحظة :هذة الفترة تتضمن فقط مايتعلق بحيوانات التجربة لحين القتل واخذ العينات منها) وتحديد تأثير المبيد في وزن الجسم والوزن النسبي لبعض الاعضاء(الكبد والكلية والدماغ) ودراسة فسلجية شملت التغيرات في النطف من حيث تركيزالنطف وحيويتها والتشوهات التي تعتريها وكذالك دراســـــة معامل الانقسام للخلايا الجسمية في نخاع العظم والتشوهات الكروموسومية وتمت دراسة الدنا (DNA) الجينومي للأعضاء المدروسة اعلاه وكذالك دراسة التغيرات النسجية المرضية للأعضاء المختارة في الدراسة . استخدم في التجربة48 من ذكور الجرذان وبعمر تراوح بين 10-12 أسبوعاً ،ومعـــدل أوزانها 170-200 غرام ،وكانت التجربة لمدتين هما سبعة أيام و أربعة عشر يوماً قسمت حيوانات كل فترة على أربع مجاميع بواقع 6 حيوانات لكل مجموعة ،مجموعة السيطرة ،جرعت بالمحلـــول الملحي الفسلجي Normal saline والمجاميع الأولى والثانية والثالثة عوملت بجرع وبتركيز 1/10,1/20,1/30 ملغم / كغم من الجرعة القاتلة على التوالي . وبواقع 0.1 ملغم /كغم من وزن الجسم يومياً لمدة 21 يوماً .تم وزن الحيوانات قبل المعاملة وبعدها ولمدتي أسبوع وأسبوعين وكذالك سجلت جميع التغيرات العيانية والسلوكية وأخذت الأعضاء المختارة بالدراسة وسجلت التغيرات العيانية ووزنت وتم حفظ نصفها بالفورمالين لحين إجراء الدراسة النسجية والنصف الثاني صعق بالنتروجين السائل وحفظ في التجميد لحين إجراء دراسة الدنا الجينومي Genomic DNA للأعضاء المختارة. تم أخذ منطقة ذيل البربخ لدراسة تركيز ومعالم النطف وكذالك تم استئصال عظام الفخذ وعظمة القصبة للساق لحيوانات التجربة لغرض دراسة معامل الانقسام الخلوي والتشوهات الكروموسومية لنوى خلايا نقي العظم.بينت النتائج حدوث انخفاض معنوي في معدل وزن الجسم للحيوانات المعاملة بالمبيد وبجرع 1/0,1/20 ملغم /كغم من وزن الجسم وللفترة 14 يوم من مبيد الكلوربيرفوس في حين لوحظ انخفاض في معدل الكسب الوزني للمجموعة المعاملة بجرعة 1/30ملغم /كغم من وزن الجسم وللمدة نفسها عند مستوى احتمالية(P<0.05).لوحظ حدوث انخفاض معنوي في معدل النسبة المئوية لوزن الكبد والكلية للمجاميع الثانية والثالثة والمعاملة بمبيد الكلوربيرفوس لمدة 14 يوماً وكذالك عدم تأثر معدل أوزان الكلية للمجاميع كافة لمدة 7 أيام ولوحظ وجود ارتفاع غير معنوي بمستوى احتمالية P>0.05 لوزن الدماغ للمجاميع الأولى والثانية لمدة 14 يوماً . أظهرت نتائج الدراسة النسجية للأعضاء المدروسة وجود احتقان في الوريد المركزي للكبد مع انحلال الخلايا المحيطة بالوريد ووجود نزف بجوار الوريد المركزي مع حدوث احتقان في الوريد البابي الكبدي وكذالك حدوث تنخر وتغير واضح في الشكل العام لنسيج الكبد .وبين الفحص المجهري لكبد حيوانات المجموعة الثالثة ،حدوث احتقان شديد في الوريد المركزي مع فقدان الترتيب الشعاعي للخلايا الكبدية ،إذ ظهرت الخلايا الكبدية متفجةVacuolated مع تنخر واضح فيها إذ شوهدت بعض الخلايا خالية من الانوية(متحللة Karyolysis) وبعضها الأخر ذات أنويه متغلضة Pyknotic كذالك توسع في الجيبانيات الكبدية والقناة الصفراوية فيها فرط تنسج واضح مع احتقان في المعاملة لمدة 7 أيام.اظهر الفحص المجهري لكبد حيوانات المجموعة الثالثة(T3) لمدة 14 يوماً احتقاناً واضحاً وفرط تنسج في القناة الصفراوية والوريد المركزي محتقناً مع وجود الترتيب الشعاعي للخلايا الكبدية التي تظهر متنكسة مع الشكل الانقسامي النووي بشكل واضح مع توسع قليل بالجيبانيات الكبدية و وجود نزف في نسيج الكبد .اظهر الفحص المجهري لكلية الحيوانات في المجموعة الثانية(T2) أن هناك توسعاً في النبيبات الملتوية الكلوية مع احتقان في النسيج الكلوي ،الكبيبات تظهر متوسعة ومستديرة

وطبيعية ،الخلايا المبطنة للنبيبات الكلوية تظهر متنكسة ويظهر انسلاخ فيها لمدة 7 أيام.حين لوحظ تجمع مادة جيلاتينية شفافة (التنكس الزجاجي hyaline degeaeration)مع احتقان واضح ونزف شديد في النسيج الكلوي ،النبيبات الملتوية الكلوية تظهر متوسعة وذات بطانة متحطمة إذ نلاحظ تنكس الخلايا المبطنة لهذه النبيبات.هذا عند الفحص المجهري لنسيج الكلية لحيوانات المجموعة الثالثة،لمدة 7 أيام . وبينت الدراسة ظهور واضح بانخفاض معنوي في معدلات معامل الانقسام لمجاميع الحقن كافة لمدة 14 يوماً ولوحظ عدم وجود فرق معنوي بمستوى معنوية P<0.05 بين مجاميع الدراسة الأولى والثانية مع مجموعة السيطرة لمدة 7 أيام وكذالك وجود فرق غير معنوي بين المجموعة الثالثة للحقن مقارنة مع مجموعة السيطرة لمدة 7 أيام.وعند فحص الشرائح المأخوذة من نخاع العظم وبينت النتائج حدوث تشوهات كروموسومية وقلة عددالكروموسومات و اضمحلال كروموسومي وحالات التصاق وكرموسوم حلقي وتضاعف كروموسومي .أظهرت النتائج أن معدلات إعداد النطف أقل معنوية لمجاميع الحقن كافة لمدة 7 أيام ولوحظ انخفاض معنوي P<0.05 في معدلات النطف ولمجاميع الحقن كافة للفترة 14 يوماً .وبينت النتائج إن معدلات النسب المئوية لحركة النطف ومعدلات النسب المئوية للنطف السوية ولمجاميع الحقن كافة للفترة 14 يوم أقل معنوية P<0.05 مقارنة مع السيطرة وكذالك معدلات النسب المئوية لحيوية النطف معنوياً لم تتأثر في مجاميع الحقن(1/30) لمدة 7 أيام وبينت النتائج انخفاضاً معنوياً(P<0.05) لمعدلات النسب المئوية للنطف العيوشة والسوية وحركتها ومعدلاتها ولمجاميع الحقن كافة لمدة 14 يوماً .وبينت الدراسة حدوث تشوهات في النطف إذ حدثت حالات التصاق ،التفاف ذيل النطفة مقارنة مع النطف الطبيعية..وبينت الدراسة الجزيئية حدوث طفرة في جين Nephrin promoter gene تم ذالك باستخدام عملية تفاعل البلمرة التسلسلي PCR واستخدمت طريقة التشكل الموافق للخيط المفرد (PCR-SSCP).نستنتج من هذه الدراسة أن المبيد يتسبب بتأثيرات سلبية واضحة في سلوك حيوانات التجربة ويحدث تأثير في أوزان الجسم وأوزان الأعضاء المدروسة ويحدث خللا في العديد من الأنسجة المدروسة وكذالك يسبب تغيرات في الخلايا الوراثية الجسمية والجنسية ويسبب كذالك طفرات وراثية في الدنا الجينومي للأعضاء المدروسة.

المبيدات جزء مهم في القطاع الزراعي ولاسيما بعد التزايد السكاني الهائل الحاصل في عصرنا الحاضر وحاجة هذه الزيادة السكانية للغذاء جعل من هذه المركبات أداة رئيسة ومهمة لمكافحة الآفات الزراعية وضرورة ملحة في الجانب الزراعي وكذلك الجوانب الصحية الأخرى وجوانب تطبيقية مهمة في حياتنا إذ أن لهذه المبيدات أنواعاً عديدة قسم منها ينتمي الى مجموعة تضم في مكوناتها عنصر الفسفور وهي المبيدات العضوية الفسفورية Organophosphoric pesticides وقد انتشرت بنطاق واسع في المجالات الزراعية والصحة العامة والمجالات الإنشائية السكنية (لطرش، 2011). تستعمل هذه المبيدات لمكافحة افاتالتي تصيب الفواكه والخضروات الحقلية وكذلك لمقاومة الحشرات الماصة كالمن والتربس والذبابة البيضاء والحلم ومكافحة آفات القطن ودودة ثمار الطماطة (العامري، 2004). ومكافحة النمل الأبيض والبعوض والديدان (Npic, 2010).

والمبيدات قد تكون مواد حيوية أو كيمائية طبيعية أو صناعية حيث تعمل إما على قتل الآفات وتسمى Pesticide أو تقوم على وقف تكاثرها والزيادة في عدد إفرادها وعند ذلك يطلق عليها Pestistatic(شعبان والملاح .،1993) تمثل المبيدات العضوية الفسفورية (opsi) نصف أو كثر المبيدات المستعملة حاليا ويسبب التعرض لها الكثيرمن المشاكل الصحية الخطيرة وخصوصا"العاملين في تصنيعها وإعدادها والمزارعين والأشخاص الذين يستعملونها في المكافحة من المزارعين والأشخاص والذين يجهلون مضارها عند عدم تقيدهم بالتحضيرات لمكوناتها على الصحة والبيئة ومن جهة أخرى هي متبقيات المبيدات على المنتجات الزراعية من الفواكه والخضر(العتابي ، 2006).صنع المبيدات العضوية الفسفورية أول مرة العلماء الكيميائيون الألمان عام 1937م بما تحويه من عنصر الفسفور (بيومي وأخرون ، 2005). ان تأثير هذه المبيدات العضوية الفسفورية على العوالق الحيوانية والمحتوى البروتيني لها إذ أظهرت تأثيرها في كثافة العوالق وتوزيعها ومن ثم تأثيرها على السلسلة الغذائية في البيئة المائية(جاويش وآخرون, 2012) .تعد المبيدات واحدة من أهم الملوثات التي يتعرض لها الكائن الحي والمسببة على استحداث العديد من الأضرار الوراثية وتكوينها حيث لها تأثيرعلى الخلية الجسمية فهي قادرة على الإضرار بالحشوة الدهنية في الخلية مكونة للأنواع الفعالة للأوكسجين ROS (Reactive oxygen species) وتنشيط الجهد التأكسدي (Oxidative stress)، إنَ المكونات المتزايدة والمستمرة للـ ROS والمتولدة من التعرض المزمن للتراكيز المنخفضة من المبيدات يؤدي إلى استنفاذ مـضادات الأكسدة الداخلية (Endogenous antioxidant) مثل (Glutathione , Superoxide dismutase , Glutathione S-transferase) مما يؤدي إلى التحور التأكسدي (Oxidative modification) للجزيئات الكبيرة في الخلية كالبروتينات والدهون والـ DNA (Piperakis *et al*., 2006) .

المبيد العضوي الفسفوري الكلوربيرفوس Chlopyrifos (CPF) هو الأكثر استعمالا"في نطاق واسع من العالم لمكافحة الآفات الزراعية الضارة وكذالك المنزلية وفي الأماكن الصحية والمناطق السكنية الإنشائية لما لهُ من من قدرة كبيرة على إحداث السمية وتعد مبيدات غير ثابتة وتتميز بدور أساسي في تثبيط الإنزيمات المهمة في الجهاز العصبي للحشرات واللبائن ومنها أنزيم AchE ومما يؤدي إلى تراكم مادة الاستيل كولين الذي يتداخل مع الاتصال العصبي – العضلي مسببا" عدم وصول الإشارة العصبية (جورج ، 2003).

ان التعرض لمبيد CPF يؤدي إلى خلل وظيفي ونسجي في الكبد والكلى وتغير نسبة ليوريا والمحتوى البروتيني للبلازما وتأثيره على إنزيمات GOT,GPTمن حيث تغير تركيزهما الطبيعي في الدم (مجدي واخرون، 2008). كما و يوثر الـ (CPF) على الجهاز التناسلي الذكري مما يسبب انخفاضاً معنوياً في مستويات هرمون التستوستيرون(Testosterone hormone)(TH) مع انكماش الأنابيب المنوية وانخفاض في وزن الخصيتين وتغير ملحوظ في دهون الخصية (T.K.Mandal *et al*, 2012).ان متبقيات CPF تزيد السرطان في الأغذية النباتية وتراكم مخلفاتها يسبب خللاً في الغدد الصم وجهاز المناعة وتدهور الرئتين (Benzidane & Dahamna .,2013).

الهدف من الدراسة:

في ضوء ماتقدم وبسبب الاستعمال الواسع لمبيد CPF هدفت الدراسة الحالية إلى معرفة التأثير على الجرذان من خلال :

1-التعرف على الجرعة المؤثرة للمبيد العضوي الفسفوري CPF.

2-التغيرات العيانية للحيوانات المعاملة بمبيد الكلوربيرفوس(CPF).

3-التعرف على التغيرات الوزنية في أوزان الأعضاء المدروسة ووزن الجسم والمعاملة بـCPF.وبالجرع (1/10 , 1/20 , 1/30) ملغم / كغم من وزن الجسم من الجرعة القاتلة LD50 .

4- معرفة التغيرات النسجية في.الكبد والكلية والدماغ والمعاملة بمبيد CPF . بـCPF.بجرع (, 1/30 1/10 , 1/20) ملغم / كغم من وزن الجسم من الجرعة نصف المميتة LD50 .

5-الدراسة الوراثية لمعرفة معامل الانقسام للخلايا الجسمية في نخاع العظم والتشوهات الكروموسومية لهذه الخلايا،والتغيرات في تركيز النطف في ذيل البربخ ومعاملها والمعاملة بمبيد الـ CPF.بجرع (1/10 , 1/20 , 1/30) ملغم / كغم من وزن الجسم من الجرعة المميتة لنصف العدد لحيوانات التجربة LD50 .

6- دراسة جزيئية لـلدنا الجينومي Genomic DNA للأعضاء المدروسة والمعاملة بمبيد الـ CPF بجرع (1/10 , 1/20 , 1/30) ملغم / كغم من وزن الجسم من الجرعة القاتلة LD50.

2- استعراض المراجع Review of literature

2-1 المبيدات الحشرية العضوية الفسفورية Organophosphorus Insecticides (OPIs)

تمثل المبيدات(OPIs) 85% من مجموع المبيدات المستخدمة في مكافحة الحشرات أو ألآفات ألضارة ورغم وجود بعض الخصائص الايجابية مثل سرعة تحللها في البيئة وعدم بقائها لمدد طويلة في المحيط البيئي لكن قد تسبب وفي الحالات السمية الحادة الوفاة لبعض اللبائن وتعد من ا لمؤثرات السلبية بصورة تثبيطية على أنزيم أستيل كولين أستريز Anti-cholinesterase وهو الهدف الرئيسي من هذه المبيدات حيث ترتبط به وتثبطه و تؤدي إلى تراكم Ach في المشابك العصبية مسببا زيادة في التنبيه لمستقبلات الاستيل كولين بأنواعها Muscariniqueln,Nicotinquew(عائشة، 2011) ان الآلية التي تعمل بها هذه المبيدات على الحشرات والآفات هي الآلية نفسها التي تؤثربها على الثدييات بارتباطها مع أنزيم أستيل كولين أستريز وتحوله إلى أنزيم مفسفر ويصبح غير قادر على تحلل الاستيل كولين الموجود في النهايات العصبية ومن ثم يؤدي حدوث هذا إلى ارتجاف وارتعاش تنتهي بتراكم المبيد في الجسم (بيومي وأخرون، 2005).ازدادت الأهمية للمبيدات العضوية الفسفورية في الآونة الأخيرة لمكافحة الآفات ألحشرية لأمرين هما تفككها بسرعة وقلة تراكمها في المحيط البيئي وبالمقابل هناك قلق من تلويثها البيئة المائية لانحلاليتها العالية في الماء واستعمالها المكثف في المجال الزراعي ومكافحة الآفات الزراعية وكذلك ازداد العمل بها على نطاق واسع بسبب الكشف عن مقاومة المبيدات العضوية الكلورية للتفكك وأظهرت OPSI تلوثاً للبيئة بسبب تأثيرها السام المباشر على الكائنات غير المستهدفة في البيئة المائية والبرية (Nadd *et al*., 2000).يعد CPF من المبيدات العضوية الفسفورية المستعملة على نطاق واسع في المجال الزراعي والانشائي السكني كما يستعمل للحد من اليرقات الحشرية المائية التي تقوم بافتراس يرقات الأسماك (Fanta *et al* ., 2003.

الكلوربيرفوس مبيد حشري عناكبي فسفوري عضوي ويؤثر عن طريق المعدة وله تأثير بالملامسة والأبخرة وهو سريع المفعول وذو سمية لمكافحة الحشرات التي تصيب أشجار الفاكهة والخضروات والكروم والقطن والتبغ والبقوليات وكذالك المحاصيل العلفية ونباتات الزينة وذو فعالية عالية للحشرات الثاقبة والماضغة وفعال ضد البعوض (سابا، 2015).ان متبقيات هذه المبيدات على المنتجات الزراعية تكون مسرطنة وتؤثر على نشاط أنزيم أستيل كولين الموجود في كريات الدم الحمر RBC وفي بلازما الدم وفي الاطراف العصبية والجهاز العصبي نتيجة لارتباط المبيد به وبذلك يتوقف عمله نتيجة التكرار وتواصل الحركة بالنسبة للإشارة الكهربائية وبشكل غير متحكم به الأمر الذي يؤدي إلى ارتعاشات سريعة ومكررة وغير متحكم بها لبعض العضلات وصعوبة في التنفس وتشنجات عضلية وارتجافات تصل أحيانا إلى الوفاة وقـــــد يسبب التعرض للمبيدات OPIs تشوهات جينية (وراثية) وخللاً في النشاط الهرموني وقد ينتج العقم وتسمم الجنين في النساء الحوامل وتشوهات خلقية وتعطيل الجهاز المناعي وإتلاف العظم النخاعي وخلايا الدم البيض WBC والسائل المنوي وأضرار جينية أخرى (ج .ك ،افاق البيئة والتنمية، 2009). لمبيد CPFتأثير على اللبائن والطيور إذ يسبب تسمم الكبد حيث أكدت بعض الدراسات حصول ارتفاعا" معنويا في أنشطة الإنزيمات النازعة لمجموعة الامين ومالات ديهيدروجينيز ،غلوتامت ديهيدروجينيز،وربيتول ديهيدروجينيز ،وغاما غلوتاميل ديهيدروجينيز و كولين استريز كما يسبب زيادة في حجم الكبد عند اللبائن وتأثيرات بنيوية ووظيفية على كبد الطيور(Dohamnia sleha &Colin weliker ., 2004).

ان CPF تأثير على الذكور الفئران البيض حيث يسبب خفض وزن الخصيتين وزيادة في وزن الغدة الكظرية وتغيرات تشريحية في الدماغ والكبد والبربخ ان زيادة جرع المبيد تؤثر على مستويات الهيموكلوبين وعدد الحيوانات المنوية(Nahid A K htar *et al*, 2009). للمبيدات العضوية الفسفورية ومنها CPF تأثيرات سمية وجينية حيث تحدث نقصا معنويا في معدل الانقسام الخلوي ويحدث زيادة معنوية في النسب المؤية لمجموع الشذوذات الكلية في الخلايا المكونة للحيوانات المنوية في الخصية وزيادة معنوية في محتوى الكبد من DNA (Mustaf *et al*., 2005).

والمبيدات العضوية الفسفورية سميت بهذا الاسم لاحتوائها على ذرة فسفور ووجود مجاميع مرتبطة بها.

2- 2 مبيد الكلوربيرفوس (CPF) Chlorpyrifos pesticide .

مادة كيميائية تنتمي لمجموعة المبيدات العضوية الفسفورية OPIs الذي يعمل بصورة رئيسة على تثبيط أنزيم الاستيل كولين أستريز Anti-cholinesterase ومنع هذا الإنزيم الذي يسيطر على نقل الرسائل التي تنتقل بين الخلايا العصبية وعندها يتم حظر هذا الأنزيم ومن ثم قتل الآفة وقد سجل هذا المبيد لأول مرة بوصفه مبيداً حشرياً عام 1965 م من وكالة حماية البيئة في الولايات المتحد الأمريكية (EPA USA) وسجل في عام (2006). CPFمبيد من بين المبيدات الحشرية العضوية الفسفورية الأكثر استخداما وفي نطاق واسع من العالم في مكافحة الآفات الزراعية وحشرات المنازل والصراصر والنمل الأبيض وحشرة الأرضة في المنازل والمباني السكنية ومجالات الصحة العامة (جورج وير ،2003).

2– 3 الأسماء التجارية للـ - (CPF) Chlorpyrifos .

يحمل الكلوربيرفوس أسماء تجارية عديدة منها Bordan,chlorpyrifos-ethyl, Dursban, Lorsban,piridane.(IUPAC, 2015).

2- 4 الخصائص الفيزياوية والكيماوية للـ (CPF)

المادة النقية صلبة بلورية بيضاء اللون تنصهر في درجة حرارة 41.5-43.5 C وله وزن جزيئي 350.58gm/moL ويذوب في معظم المذيبات العضوية مثل chloroform,Acetonitrile,ethyl acetate وقليل الذوبان في الماء (العامري ، 2004).

2- 6 الصيغة الكيمياوية للـ (CPF)

[o,o-diethylo-(3,5,6-Trichloro-2-pyridyl phosphorothiate]

2- 7 الصيغة الجزيئية للـ (CPF)

C9H11CL3NO3PS

2- 8 الوزن الجزيئي للـ (CPF) 350.6 gm / moL

(john p. Giesy *et al* ., 2014).

2- 9 : تأثيرات الكلوربيرفوس CPF Chlorpyrifos effects

2- 9 - 1 التأثيرات العصبية Neurological effects

تعد المبيدات العضوية الفسفورية بما فيها CPF محبة للذوبان في الدهون وبذلك تعبر بسهولة من خلال الحواجز البيولوجية حيث ترتبط بصورة تكافئية بـ AchE التشابك العصبية وألياف الجهاز العصبي المركزي ويرتبط بـ أنزيم AchE كريات الدم الحمر (AchE-Er) وPseudocholinesterases,Butyrylcholinesterases (أنواع الاستريز الحقيقي لكاذب الكبدي والبلازمي هذان الأنزيمان أقل تخصصاً لكنهما حساسين جدا حيث أن اختراق جزء صغيرمن الحاجز الدموي – الدماغي Hematoencephalique عمليا كاف لتثبيط كل نشاط AchE (عائشة، 2011).

أن التعرض لمبيد CPF يسبب تضخمات عديدة في تلافيف المخ لدى الأطفال الذين تعرضوا قبل ولادتهم لجرعات مرتفعة من هذا المبيد وهذه التلافيف يتوقف عليها الكثير من القدرات المعرفية والسلوكية للأطفال وكذلك ثبتت هذه الحالة مع تجارب سابقة على الحيوانات (علوم وتكنولوجيا، 2012).

تعرض النساء الحوامل لمبيد CPF –ethul يؤدي إلى تغيرات دائمة في الدماغ تؤدي إلى تأخر في النمو وقارن الباحثون بين 20 طفلا تراوحت أعمارهم 11-5 سنة تعرضت أمهاتهم لنسبة عالية من المبيد المذكور و20 آخرين تعرضوا إلى نسبة اقل فلاحظوا اعاقة كبيرة لدى المجموعة الأولى وأن المدة ما قبل الولادة أساسية لنمو الجنين وأن التعرض لهذه المواد السامة (المبيد) في تلك المرحلة يؤثر على نمو الدماغ وعلى المهام السلوكية. (مجلة الكترونية سيدة الامارات ، 2015). التعرض للمبيدات العضوية الفسفورية يمكن أن يسبب خللاً وظيفياً حاداً في الجهاز العصبي(السمبثاوي) وضعف العضلات وغيبوبة وفشلاً في الجهاز التنفسي وتعتمد هذه الاعراض على الجرعة والسمية

النسبية للتراكيب.(Allister vale , 2015). ان تأثير CPF على الخ والمخيخ خلال مدة الرضاعة حيث تم اعطاء إناث جرذان من سلالة ويستار 1-0.2غم/لتر
في مياه الشرب أي ما يعادل 40ملغم/ كغم من وزن الجسم حتى 10أيام أدى إلى انخفاض نشاط (BuChE)البلازما بنسبة 70% في المخ والمخيخ تم انخفاض (Acetyl-chE)بنسبة -71 75%وكذالك
انخفاض وزن الصغار بنسبة 28% من وزن الجسم نتيجة انتقال CPF من حليب الأمهات وكذلك انخفاض محتوى بروتين المخ والمخيخ بنسبة 36-38% وتغيرات نسجية في المخيخ في الجرذان المعاملة.
(Amira Mahjoub *et al*., 2005).
ان التأثير السمي لهذه المبيدات والتي ينتمي لها CPF لها المقدرة على تثبيط الاستيل كولين استريز (AchE) والأخير مهم في تحليل الاستيل كولين وتؤثر في ظهور اعراض سريريه توسع الأوعية الدموية وانخفاض ضغط الدم وبطء خفقان القلب وتؤثر على الجهاز العصبي وخمول الأجهزة التي تقع تحت تأثير هذا الجهاز (القماز ، 2003).

2- 9 -2 : التأثيرات المسرطنة لمبيد CPF Carcinogenic effects

ان التعرض بجرع لمبيد CPF له علاقة بسرطان الرئة ويعتمد ذلك على مدة التعرض حيث أشار إلى هناك علاقة بين استعمال الكلوربيرفوس والإصابة بسرطان الرئة ., Wonjin Lee *et al* (2004).
ان المبيدات OPIs ومنها CPF في ارتفاع مستويات H2O2 والنتريت– NO2 والنترات -NO3 في الدماغ والكبد وتعد هذه المواد جذوراً حرة تسبب في حدوث حالات التسرطن فيؤدي إلى اضرار خلوية وجزيئية مسببة الأكسدة اللبيدية وطفرات في الجينات المثبطة للأورام Tumor suppressor gene أو الجينات المتحكمة في الإنزيمات المضادة للأكسدة و أن هناك مؤشرات تدل على أن CPF قد تكون مسببة للسرطان وخاصة سرطان الرئة والمستقيم و البروستات وكذلك أنه يسبب طفرات وراثية تسبب السرطان واضطرابات في الغدد الصم ومن ثم تؤدي إلى سرطان الثدي. (Anugya *et al* ., 2009).

2- 9 - 3 :السمية الجينية لمبيد CPF Genotoxicity

2-9- 3 -1 الطفرة الجينية gene mutation

أشارت دراسة سابقة إلى ان معاملة فطر خميرة الخباز سلالة D7 بالمبيدCP كان لها اثر واضح في حدوث طفرة مرتدة وتحول جيني وعبور وراثي جسمي عن هذه السلالة (العريشي ، 2005). ان تعرض نوع من الأسماك في المياه السطحية في الهند لـCPF وبجرع 1/20,1/10,1/5 بحسب الـ LD50 (0.44 mg/l) ثم أخذت عينات الدم في أيام من 2إلى 35 يوماً وخلصت إلى أن CPF هو مبيد سام للجينات ويسبب التشوهات النووية (Anta Bhatnagar *et al* ., 2016).
ان الزيادة في تركيب الجذور الحرة تؤدي إلى احداث أضرار خلوية وجزيئية ومسببة الأكسدة اللبيدية وطفرات في الجينات المثبطة للأورام أو الجينات المتحكمة في الانزيمات المضادة للأكسدة(Anugya *et al*.,2009).

2-9- 3- 2 :الانحراف الكروموسومي chromosomal aberration

ان اعطاء مبيد الكلوربيرفوس عن طريق الفم لمدة ثلاثة أشهر للفئران البالغة يسبب زيادة كبيرة في مجموع التشوهات الكروموسومية في كل من الخلايا الجسمية والجنسية
(Kamilia Badrakhan Abad elaziz *et al* .,2010) .

2-9-3- 3 ضرر وإصلاح الحامض الرايبي منقوص الأوكسجين Damage and repair of DNA

ان التعرض الحاد للمركبات العضوية الفسفورية ومبيد CPF يسبب خللا في عمليات الأكسدة ومن ثموتكوين الجذور الحرة ومن ثم يسبب ضررا للجزيئات الحيوية ومنها DNA واظهرت النتائج ان هذا التعرض الحاد يسبب تأثيراً ملحوظاً بشكل كبير في تلف DNA لأنسجة الكبد والكلى والدماغ والطحال بعد ٢٤ ساعة من الجرعة لكن بعد٤٨، ٧٢ ساعة من المعالجة تم اصلاح الضرر جزئيا فـي DNA(Anupama ojha *et al* ., 2011) .ان المبيدات فئة غير متجانسة من المواد الكيميائية وهي

تمتلك خصائص مطفرة وتؤثر في انحراف الكروموسومات وتلف DNA وتعتمد على الجرعة ومدة التعرض وشدته (Claudia Bolognesi, 2001).

ان تعرض بذر نبات الشعير من خلال المعالجة مع CPF وبنسب 0.05%, 0.1% ، 0.5 % ولمدة 6 ساعات أظهرت النتائج أن قمة الجذر للخلايا انخفضت بصورة كبيرة في نسبة الانبات وزيادة نسبية في التشوهات الكروموسومية وكذلك الانحرافات الكروموسومية (Pragyan *et al* ., 2015).

التعرض للـ CPF لجرعة طويلة المدة لنوع من الأسماك في المياة السطحية حيث التعرض 96 ساعة من LD50 من CPF سبب تلفاً في الحامض النووي في اليوم 5 وكذلك انخفاض في الخلايـــــــــا اللمفاوية (Daud Aip NS Nagpure *et al* ., 2008).

التعرض لبعض المبيدات ومنها CPF يحدث ضرراً كبيراً للمادة الوراثية وظهور عديد من الطرز الكروموسومية الشاذة بصورة معنوية خاصة الفجوة والشظية وكان المبيد CPF أشد المبيدات احداثا للتأثير الطفري وكذلك قدرة هذه المبيدات على زيادة في تكرار طفرات النويات الصغيرة بمستويات عالية المعنوية ومرتبطة بالجرعات .(EL-Bendary , 2010).

2-9- 4 : التأثيرات البايوكيميائية لمبيد CPF Biochemical effectsان

تعرض جرذان سلالة ويستار من الإناث إلى CPF وعن طريق الفم 5 ملغم/كغم يوميا" لمدة 21 يوماً حيث حدد توزيع المبيد في مختلف أجهزة الجسم الكبد والدماغ والقلب والرئة والكلى والمبيض والأنسجة الدهنية والعضلات والهيكل العظمي وتم تقويم الكمية من المبيد وتحديدها في أنسجة و0.22% في الدماغ و 0.10% في الكلى' و 0.03% في المبيض و نلاحظ ان اكثر تجمع للمبيد في الأنسجة الدهنية والكبد وزيادة في ALP وزيادة في مستويات البيليروبين وانخفاض في مستويات البروتين والدهون (E M Tanvir *et al* ., 2015).

ان التعرض لمبيد CPF أدى ألي زيادة طفيفة في alanine aminotransferase والبيليروبين الكلي في المصل مقارنة مع السيطرة وأن التعرض للمبيد يسبب اضطراباً في استقلاب الطاقة والأحماض الدهنية في مايتوكوندريا الكبد في الجرذان حتى لو كان التعرض لجرعة منخفضة (Hui-ping *et al* ., 2009). تعرض البيئة المائية ومنها نوع من الإحياء المائية (الاسماك الوحشية)ZebraFish لذكور واناث لـ 200 ميكروغرام /لتر لمدد زمنية,٢٤و٤٨و٧٢و٩٦ ساعة وسمية على الكبد فأظهرت النتائج أضراراً هيكلية في الكبد وتشكل فجوات وضرر نسيجي واضح في الكبد (Bangeppagari & Gundala., 2015).

2- 9- 5 : التأثير على الأعضاء (الكبد) . Liver effectان

أعطاء مبيد CPF بجرعة تحت الحادة لذكور الجرذان لمجموعتين وبجرعتين 3.1 و6.2 من وزن الجسم وخلال 4أسابيع أدى إلى تغير في أنسجة الكبد وزيادة كريات الدم البيض وزيادة كبيرة في الصفائح الدموية وكريات الدم الحمر نتيجة لتنشيط خلايا نخاع العظم من المبيد (Ezzil *et al* ., 2016).

اظهرت بعض الدراسات أن تعريض ذكور الجرذان لمبيد CPF بجرعة 13.5 ملغم /كغم من وزن الجسم أدى إلى تثبيط وباحتمالية (P<0.001) في أستيلكو أستريز مصل الكبد وبعد8 أسابيع وزيادة كبيرة في أنزيمات الكبد ALT,AST,ALP وكذلك انخفضت تركيزات الحديد في مصل الدم بعد الجرعة وعكس ذلك ارتفعت مستويات النحاس بزيادة P<0.01 (A.Goel *et al*., 2000).

أن التعرض للمبيدات العضوية الفسفورية (CPF) تؤثر وبصورة متمايزة من عضو إلى أخر وأن الكبد يعد أول الأعضاء المستهدفة سواء في الجرعة الحادة أو تحت المزمنة وتؤثر في انخفاض PchE الكبدي بوصفه المصدر الرئيس للإنزيم الذي يوجد في مصل الدم وكذلك ارتفاع في المستويات الإنزيمية الكبدية AST,ALT في الدم والأخيران يعدان أنزيمين يدخلان بوصفهما عاملين مساعدين في نقل مجاميع الأمين من الأحماض الامينية L-Aspartate ,L- Alanine. وأشار التعرض لجرعة أقل LD50 يظهر تغيراً في محتوى

Protein Carbonyl الذي يعد مؤشراً لحدوث الاجهاد التأكسدي وأكسدة البروتينات وهذه لاتظهر في باقي الأنسجة مما يدل على حساسية الكبد وتأثره بصورة كبيرة عن باقي الأنسجة لما يمثله الكبد من ازالة السمية مما يضعه في مواجهة الخطر للتعرض العالي للمبيدات ونواتجها (possamai *et al* ., 2010).

2-9- 6 :التأثير على الكلية Kidney effect

تسبب الجرع من مبيد CPF في احداث ضرر نسيجي على مستوى الكلية ممثلاً في تصلب الكبيبة وتليف الأوعية الدموية واحتقانها Glomerular Sclerosis وتسبب أيضا تثبيطاً يصل إلى الموت في بعض المواضع مسببة موتاً موضعياً بؤرياً أنبوبياً Focal tubular necrosis وانحلالاً في الطبقة الأنبوبية الظهارية (عائشة، 2011).

ان التعرض لجرعة 5 ملغم/ كغم يوميا لحيوانات التجربة لمدة 21يوماً فكانت نسبة توزيع المبيد في الكلية 0.10% من الكمية المجرعة والموزعة في أنحاء الجسم ويسبب أثاراً سلبية وضارة في وظيفة الكلية وزيادة في مستويات اليوريا والكرياتين في البلازما . (Tanvir *et al* ., 2015).

هناك تأثير واضح على الكلى، عند التعرض للكلوربيرفوس إذ جرت الجرع على الجرذان سلالة ويستار ومن كلا الجنسين وزنها 165-124 غم وأعطيت جرع 5 ملغ /كغم من وزن الجسم و10 ملغم/كغم من وزن الجسم وتم التضحية بها لمدد متفاوتة بين 1 أسبوع إلى الأسبوع الثامن لمعرفة درجة التأثير من الأسبوع 8-2 كان هناك انكماش كبيبي في المراحل الأولى من الجرع واتساع أنبوبي وتضخم في الخلايا الطلائية وانحلال في الأنابيب الكلوية وكان هناك مرور خلايا لمفاوية في النسيج الخلالي وزيادة الأوعية الدموية وحدوث تليف فيها وهذه تدل على التهاب كبيبات الكلى ونخر أنبوبي حاد والتهاب الكلى الخلالي مما يؤدي إلى فشل كلوي مزمن مع زيادة المدة للتعرض للمبيد CPF . (ReKha& Sajad , 2013)

2-9-7 التأثيرعلى الدماغ لمبيد CPF Brain effect

لمبيد CPF تاثيرعلى المخ والمخيخ خلال فترة الرضاعة حيث تم معاملة إناث جرذان من سلالة ويستار 1-0.2غم/لتر في مياه الشرب أي ما يعادل 40ملغم/ كغم من وزن الجسم حتى 10أيام أدى إلى انخفاض نشاط (Buche)البلازما بنسبة 70% في المخ والمخيخ تم انخفاض (Acetyl-chE)بنسبة 75-71%وكذالك انخفاض وزن الصغار بنسبة 28% من وزن الجسم وكذلك سبب انخفاض في مستوى بروتين المخ والمخيخ بنسبة 38%-36 واحدث تغيرات نسجية في المخيخ في الجرذان المعاملة(Amira–Samet, 2005).

ان سمية المبيدات الحشرية العضوية الفسفورية التي ينتمي لها CPF تتسبب في تثبيط الاستيل كولين أستريز (AchE) والأخير مهم في تحليل الاستيل كولين وتؤثر في ظهور اعراض سريريه منها توسع الأوعية الدموية وانخفاض في ضغط الدم وبطء في ضربات القلب وخمول عام في الجسم للحيوانات المعاملة او المعرضة للمبيد CPF (القماز ، 2003).

2- 9 - 8 :التأثيرات على الجهاز التناسلي .

2- 9 -8 -1 :التأثيرات النسجية و الفسلجيه على الخصية.

لمبيد CPFتاثير على ذكور الفئران البالغة بجرع5,15,25 ملغم/كغم لمدة 4 أسابيع قبل التزاوج مع الإناث غير المعالجة بالمبيد أدت المجموعة المعالجة بـ 15,25 ملغم/كغم ظهور اثار تثبيط على الاستيل كولينيز أستريز الدماغ والعضلات الهيكلية ومع انخفاض في عدد الأجنة الحية وزيادة عدد الأجنة الميتة في 25 ملغم/كغم وكذالك تغيرات في معالم النطف(Amina T. Farag *et al* ., 2010).ان معاملة مجموعة من ذكور الجرذان سلالة ويستر لجرع من مبيد CPF بتراكيز 7.5 و 12.5و 17.5 ملغم /كغم من وزن الجسم لمدة 30 يوم لوحظ انخفاض كبير في وزن الخصيتين وانخفاض ملحوظ في وزن البربخ وعدد الحيوانات المنوية وانخفاض في تركيز هرمون التستوستيرون في الدم وهناك تغيرات نسجية في الأنابيب المنوية وتم اختبار الخصوبة وأظهرت النتائج سلبية في حين ارتفع مستوى البروتين والكوليسترول بحد كبير وهذه التأثيرات ترتفع عند جرع أكبر من المبيد وهذا يؤثر على خصوبة الإنسان بسبب التغيرات في الحيوانات المنوية وعددها(Suresh *et al*., 2007) .

كما وجد عند تعرض ذكورالجرذان لجرع من المبيد بتركيز 3,6,9 ملغم/كغم لمدة 90 يوم في الجرعة الاخيرة أظهرت انخفاضاً في وزن الخصيتين وزيادة وزن الغدة الكظرية وأظهرت أيضا"تغيرات تشريحية مرضية في

الخصية والبربخ ولوحظ أنة لم يكن هناك تغيير في الحيوانات المنوية بالنسبة للحركة والشكل باستثناء انخفاض عدد الحيوانات المنوية. (Nahid *et al*., 2009).

لمعرفة الكفاءة التناسلية للذكور الجرذان اعتمد تقدير هرمون التستوستيرون في الدم مؤشراً لتقويم خصوبة الجرذان الذكور بعد التجريع بالـ CPF وكذلك دراسة معدل إنتاج الحيوانات المنوية وكذلك القدرة على الحركة والشكل وقدرتها على البقاء وحيث جرعت مجموعتان الأولى سيطرة تعطى مياه طبيعية والمجموعة الثانية 9 ملغم /كغم من وزن الجسم من المبيد CPF ولمدة 70 يوم وأظهرت النتائج تشوهاً وتحطماً خلوياً في الخلايا الجرثومية داخل الأنبوب الناقل للمني وتشوه الجدران من الأنابيب المنوية مع انخفاض في سمك طبقات الظهارة الجرثومية وكذلك كان هناك نقص في أعداد النطف وازدياد كبير في أشكال النطف المشوهة وهذا ما ظهر في الرأس والذيل مع وجود قطرات حشوية على الذيل ومن ثم تؤثر على خصوبة

الذكر(EL-Mazoudy & Rede., 2011). أن تعرض الجرذان من سلالة Albino Rats بجرع متفاوتة 5,10 ملغم/كغم من وزن الجسم لمبيد CPF لوحظ انخفاض في هرمون التستوستيرون و LH,FSH مع انكماش في الأنابيب المنوية وتغير في الخلايا الجرثومية وعند التعرض لجرعات 20,30 ملغم/كغم من وزن الجسم تم ملاحظة ارتفاع بيروكسيد الدهون للخصية وزيادة الإنزيمات المضادة للأكسدة وزيادة نشاط الإنزيمات الستيرويدية وأظهرت النتائج عند وجود جرعات عالية من مبيد CPF تقوم الخصيتان في الجرذان بتحريك آلياتها الدفاعية الطبيعية لتصحيح مسارات تخليق أنزيمات الدفاع المضادة للأكسدة والهرمونات الستيرويدية والغدد النخامية على وفق آليات التغذية المرتدة الهرمونية (T.K.Mandal & Das., 2012) .

2-9 -8- 2 : التأثير على الإنجاب .

ان تعرض اناث الجرذان نوع ويستار لمبيد CPF قبل الحمل واثناءه يؤثر في المعايير السلوكية في اجنتها قبل 4أشهر من الحمل بمبيد CPF وبجرعات 5,10,15 ملغم /كغم من وزن الجسم يومياً لمدة 30 يوماً في حين تلقت مجموعة واحدة جرعة 30 ملغم /كغم من وزن الجسم في يوم الحمل كان نسل الجرذان التي عرضت قبل الحمل اظهرت معدل نشاط أعلى بكثير من مجموعة السيطرة وأظهرت أثاراً حركية ونشاطاً مفرطاً وكذلك صعوبة في اختبارات استقراء الهروب وأظهرت أداء الذاكرة قصيراً ومثبطاً ولوقت طويل والتعرض قبل الحمل يسبب عواقب سلوكية في النسل (Sofia & Yuriy., 2015) .

ان تعرض الأطفال قبل الولادة أو مدة الولادة الأولى لمبيد CPF وتقويم المعايير الإنمائية من الولادة وحتى 18 سنة من العمر اذ تم العثور على العجز المعرفي (المتعلقة بالذاكرة العاملة)في عمر 7 سنوات والعجز السلوكي (الانتباه) في الأطفال الصغار والعجز الحركي أي ردود أفعال غير طبيعية في حديثي الولادة (Maria *et al* ., 2013).

تم العثور على اثار CPF في تفاعلات الأكسدة في النهاية القمية في المراحل التنموية في الأجنة(ذروة النمو الجنيني) وتأثيره على النشاط الجيني لنسخ AchE والنشاط في أجنة الحيوانات المعرضة نوع Zebrafish(نوع من الاسماك) بعد التعرض 72 ساعة وتم دراسة إناث الفئران بعد تعرضها للمبيد CPF وبجرع 40,80 ملغم/ كغم من وزن الجسم وتحديد وقت كل يوم قبل الغرس بعد تعرض الآم وفي 3 يوم الحمل تم جمع الكيسيات الاريمية من أجل التشكل الإجمالي و انخفاض في عدد خلايا الجنين في الجرعة 80 ملغم/كغم وهذا يدل على وضع غير تنموي للجنيين (Rodriguez *et al*., 2015).

ان تعرض الإناث من جرذان فيشر لجرع 5,15,20 ملغم/ كغم من مبيد CPF يوميا" وفي أيام الحمل ثم تقويم الأجنة في يوم الحمل 21 والعلامات العيانية لوحظت في الجرع 15,25ملغم/كغم انخفاض وزن الجنيين

وزيادة في وفيات الاجنة وزادت الاختلافات الحشوية والهيكل العظمي وكذلك ظهرت أثار سامة للجنيين في الجرع 25 ملغم/كغم وكذالك أنتجت سمية للأمهات أيضا"(Amina *et al* ., 2003).

عند اعطا الفئران الحوامل مجموعة من الجرع 1/10,1/30 من الجرعة القاتلة عند اليوم 18 من الحمل وأظهرت النتائج أن المبيد CPF انتقل عبر المشيمة وتسبب انخفاضاً في AchE في المخ وبلازما الدم بالفئران الحوامل وزيادة في الجلوتاثيون الكلي في الكبد وانخفاضاً في محتواة في المشيمة وكبد الأجنة وكذلك حدثت تغيرات في أنزيم ATPase في مخ الأجنة. (بيومي وآخرون، 2003).

2-9- 9 :تأثير المبيد على جهاز المناعة .

ان مبدأ عمل الجهاز المناعي هو قابليته على معرفة الميزات ا لموجودة على سطح الجزيئات الغريبة عن أجزاء جسم الكائن الحي ويطلق على هذه المواد التي تتعرف بهذه الطريقة اسم Antibodies والأجسام الغريبة Antigens (Dean *et al*., 1986).

بما أن المبيدات العضوية الفسفورية ومنها الـ CPF وزنها الجزيئي أقل من 5000 دالتون فهي ترتبط مع البروتينات لكي تصبح فعالة على تحفيز المناعة (AL-Rubae, 2001).

أن التأثير المباشر لمبيدات الحشرات CPF يكون مباشراً عبر تثبيط انزيمات serine hydrolases أوesterases في مكونات الجهاز المناعي من خلال الضرر ألتأكسدي للأجهزة المناعية أو من خلال تغيير مسارات نقل الإشارات السيطرة للجهاز المناعي ووظائفه والتأثيرات غير المباشرة تتمثل بتغيير الاشارات الصادرة من الجهاز العصبي و الآثار المزمنة للتغيير في التمثيل الغذائي وتأثيرها على المناعة والسمية المناعية متنوعة وتشمل أمراض الأجهزة المناعية وانخفاض المناعة الخلطية أو المناعة الخلوية وانخفاض المقاومة وفرط الحساسية والمناعة الذاتية (Tamara & Richard , 2003) .

ان المبيدات لها دور تثبيطي على الاستجابة المناعية الخلطية والخلوية وهذا التأثير يختلف باختلاف نوع الحيوان ونوع المستضد له ونوع المبيد وهناك آليات لدراسة القصور المناعي نتيجة الإصابة عن طريق التعرض للجرع للمبيد مثل قياس اختلاف التعاون بين (الخلايا التائية والبائية) التي هي اساس الجهاز المناعيفي الكائن الحي وكذالك الخلايا البلعمية لما لها من دور مناعي في الجسم من خلال تثبيط وظيفة الرسل الكيميائية بين تلك الخلايا (Banerjee *et al*., 1999).

2- 9 - 10 :التأثير في تكوين الجذور الحرة.

المبيدات العضوية الفسفورية ومنها CPF تسبب في ارتفاع مستويات بيروكسيد الهايدروجين H202 ،النتريت NO2 والنترات -NO3 في الدماغ والكبد نتيجة التعرض للسمية الحادة والمزمنة ويعد H2O2 من أكثر الجذور الحرة قياسا بسبب ثباته وهو من أكثر نواتج الأوكسجين خطرا بسبب فعاليته العالية في اختراق الأغشية الحيوية (Anuga *et al* ., 2009).ان دور الـ CPF في تثبيط المواد المضادة للأكسدة التي تساهم في دور ايجابي للتخلص من اثار المبيد إذ هو بدوره أي المبيد يولد اثار سلبية على حث الأكسدة من خلال توليد الجذور الحرة (Chidiebere Uchendu *et al* ., 2012).

يعدH202 من النواتج التفاعلية الاوكسجينية الخطرة اذ يساعد في بناء جذور هيدروكسيلية وتسبب المبيدات في زيادة تركيب الجذور النتروجينية (RNS) وتعد مكونات سمية جينية خطيرة وتتفاعل الجذور الحرة مع المكونات الخلوية وهي تستهدف الاحماض الدهنية المتعددة عديمة التشبع وتسبب أكسدتها وتكوين الدهيديات سامة MDA وهذا الأخير هو مركب نهائي للأكسدة اللبيدية وكذلك لايتوقف دور الجذور الحرة على هذه المواد فهي تسبب في أكسدة البروتينات مؤدية إلى تكوين مشتقات Protein carbonyl وهي مركبات سريعة التشكل وأكثر استقرارا"وتتحرر إلى الدورة الدموية وينتج من تداخل الجذور الحرة مع مختلف الجزيئات الخلوية عدة اضطرابات وظيفية منها التغيرات في مستويات الإنزيمات والمعايير الدموية والبيوكيمياوية الضرورية لثبات الوسط الداخلي (عائشة، 2011).

3-1 الأجهزة والأدوات

3-3 تحضير المحاليل

1 - محلول دارئ الفوسفات Buffer P.B.S

حضر المحلول بإذابة8 غم من NaCl و0.2 gm من KCl و0.015gmمن NaH_2PO_4 و 0.2gmمن KH_2PO_4 في 500ml من الماء المقطر المعقم ثم أكمل الحجم إلى 1000ml وعدّل pH المحلول 7.2 وحفظ في الثلاجة بدرجة 4 م° لوقت التجربة (Cruickshank *et al.*, 1975)

2- محلول الكولجسين Colchicine Solution

حضر المحلول بإذابة 1 قرص من الكولجسين بتركيز 0. 5m/g في 0.5ml من الماء المقطر، حقن كل حيوان 0.1 ml من المحلول في التجويف الخلبي (Intra pretonialy) (Allen *et al.*, 1977).

3 - محلول كلوريد البوتاسيوم Potassium Chloride S.

حضر المحلول بإذابة 0.579gmمن KCl في 50ml من الماء المقطر المعقم للحصول على محلول واطئ الشد بتركيز0.075molary ويستعمل آنيا (Allen *et al.*,1977) .

4 - المحلول المثبت Fixative Solution

حضر المحلول بإضافة حجم 1 من حامض الخليك الثلجي إلى 3 حجوم من الميثانول المطلق ويستعمل آنيا بدرجة 4C (Allen *et al.*,1977).

5- محلول صبغة كمزا Giemsa stain solution

لتحضير محلول خزين صبغة كمزا (Stock Solution):

- اذابة 3.8. من مسحوق ملون كمزا في25 ml من محلول الكلسيرين Glycerin.
- يوضع المحلول في حمام مائي (60 مْ) لمدة 2 ساعة مع رج مستمر.
- نترك المحلول بحرارة 37 مْ لمدة نصف ساعة، ثم نضيفُ له 75 ml من الكحول المثيلي المطلق بصورة تدريجية ومع الخلط المستمر.
- نرشح المحلول ونحفظه في قنينة معتمة بدرجة حرارة (37 مْ) يستعمل خزيناً لملون كمزا (Allen *et al.*, 1977)

ويستعمل عند الحاجة لصبغ الشرائح بملون كمزا مزجت المواد التالية:

- 1 ml من محلول خزين ملون كمزا.
- 1.15 ml من الكحول المثيلي المطلق.
- 0.5 ml محلول P.B.S 100 ml (Allen *et al.*, 1977).

6- صبغة الأيوسين Eosin stain

نأخذ 5gm من مسحوق الآيوسين ونضيف إليه 95ml من الماء المقطر ونضع عليه قليلاً من البلورات من الثايمول لمنع التعفن ثم يتم ترشيح المحلول ويحفظ لحين الاستعمال (Humason , 1997)

7- صبغة الهيماتوكسلين Haematoxylin stain

حضرت بإذابة 1gm من مسحوق الهيماتوكسلين في 5ml من الكحول المطلق وأضيف 20gm من مادة شب الامونيا نذوبها في 200ml من الماء المقطر المغلي ،تم نغلي المزيجين لمدة 1 دقيقة ، بعدها يرفع عن النار ونضيف إلية 0.5gm من اوكسيد الزئبقيك إلى المزيج ، يترك ليبرد ونضيفُ إليه بعض قطرات من حامض الخليك الثلجي (Humason , 1997).

8- دارئ Tris-borate EDTA buffer (TBE)

حضر بوصفه خزيناً بتركيز 10X بإذابة 162gm من Tris - base و 27.5gm من حامض البوريك (boric acid) و 40ml من EDTA بتركيز 0.5M في 900ml من الماء المقطر ،عدّل PH إلى 8.3 ثم أكمل الحجم إلى 1000ml بالماء المقطر ويعقم بالأوتوكليف ويحفظ بدرجة 4 م° .(Sambrook *et al.*, 1989)

9- محلول ملون بروميد الأثيديوم Ethidium bromide stain S.

حضر المحلول بإذابة 0.25gm من بروميد الأثيديوم في 50ml/l من الماء المقطر للحصول على تركيز نهائي 5 mg/ml (Sambrook *et al.*, 1989).

10- دارئ التحميل Loading buffer

نحضر 10 ml منه بإذابة 0.25gmمن صبغة البروموفينول الزرقاء 4gm من السكروز في 5ml ماء مقطر وأكمل الحجم إلى 10ml(Sambrook *et al.*, 1989).

11– تحضير محاليل الهلام الاكريلامايد (Sambrook.J & Russell.D.W, 2001).

1 - يتم تحضير المحلول Acrylamide +bis- acrylamide

تتم إذابة 37.5 gm من مادة 1gm + Acrylamide من Bis- acrylamide ويتم ذلك بالتدريج في 100ml ماء مقطر (PCR Water)بعد ذالك يرشح ويخزن في عبوة معتمة في الثلاجة .

2– نحضر المحلول (Ammonium persulfate 10 %)

يتم ذالك بأذابة 10gm من Ammonium persulfate (APS) في 100ML من الماء المقطر (PCR-Water)تخزن في قنينة معتمة في الثلاجة.

3-4 حيوانات الدراسة Study animals

استعمل في هذه الدراسة 48 جرذاً سويسرياً ابيض (Albino rats) سلالة (*Rattus ratus*) بمعدل أوزانها يتراوح بين (170-200`)غرام تم الحصول عليها من كلية الطب البيطري جامعة القادسية وضعت الحيوانات في ظروف مختبريه متشابهة في جميع مراحل التجربة من ناحية الإضاءة 12 ساعة إضاءة ودرجة الحرارة مابين (22-25 مْ) في البيت الحيواني التابع لكلية الطب البيطري وتركت في بداية الأمر لمدة أسبوعين للتأقلم بعد ذلك استعملت الحيوانات في أجراء التجارب ،تم تقديم العليقة والماء للحيوانات بصورة حرة adibitum. وكانت العناية بنظافة الأقفاص وتعقيمها

بالمطهرات ويتم استبدال فرشة الأقفاص (نشارة الخشب) بشكل دوري وتوفر ساحبة هواء ومدفأة ذات مقياس لتنظيم درجة الحرارة. وأعطيت الحيوانات العليقة الغذائية المختبرية القياسية بنسبة 19% من البروتين و3000 سعره حرارية للطاقة (الملحق رقم 1) والماء بصورة حرة .

5-3 المبيد المستعمل **pesticide used**

استعمل محلول الكلوربيفوس Chlorpyrifos 48% لتحضير ثلاثة تراكيز تجريبية (1/30) mg /kgb.w /day (1/20)(1/10) من LD50 (McCollister *et al* .,1974)ان LD50 من CPF للجرذان للإناث 135ملغم/كغم والذكور 163ملغم/كغم .

6-3 تصميم الدراسة **Study design**

تصميم الدراسة:-أجريت الدراسة الحالية بتجربتين تضمنت كل منها 24 جرذ وزعت عشوائيا على أربع مجاميع على النحو التالي :-

1- التجربة الأولى :- تم اختيار 24 جرذا" من الذكور البالغة بعمر 2-3 أشهر وقسمت هذه الجرذان على أربع مجاميع بواقع ستة حيوانات لكل مجموعة وكان الحقن يوميا وكما مبين في أدناه:-

1- مجموعة السيطرة Control جرعت 0.1 مل لكل 100غم بالمحلول الملحي الفسيولوجي (Normal saline 0.9%) لمدة 7 أيام .

2- مجموعة المعاملة الأولى (T1) (Treated group) حقنت 0.1 مل لكل100 غم من وزن الجسم في IP لمدة 7 أيام وبتركيز(1/30) ملغم /كغم CPF من الجرعة القاتلة.

3- مجموعة المعاملة الثانية(T2)(Treated group) حقنت بـ 0.1 مل لكل 100 غم من وزن الجسم لمدة 7 أيام . وبتركيز(1/20) ملغم /كغم CPF من الجرعة القاتلة.

4- مجموعة المعاملة الثالثة(T3)(Treated group) حقنت بـ 0.1 مل لكل100 غم من وزن الجسم لمدة 7أيام. وبتركيز(1/10) ملغم /كغم CPFمن الجرعة القاتلة.

2- التجربة الثانية :- تم اختيار العدد والعمر مثل ما في التجربة الأولى و تركيز الجرعة كذالك

وقسمت على أربع مجاميع بواقع ستة حيوانات لكل مجموعة وكان الحقن يوميا وكما مبين أدناه:

1- مجموعة السيطرة(Group Control) جرعت بـ 0.1 ملغم/غم بالمحلول الفسيولوجي (saline Normal 0.9%) ولمدة 14 يوماً.

2- مجموعة المعاملة الأولى (T 1) حقنت في IP بـ 0.1 ملغم لكل 100 غم من وزن الجسم لمدة 14 يوماً وبتركيز(1/30) ملغم /كغم CPF من الجرعة القاتلة

3- مجموعة المعاملة الثانية (T2) حقنت في IP بـ 0.1 ملغم لكل 100 غم من وزن الجسم لمدة 14 يوماً. وبتركيز(1/20) ملغم /كغم CPF من الجرعة القاتلة .

4- مجموعة المعاملة الثالثة (T3) حقنت في IP بـ 0.1 ملغم لكل 100غم من وزن الجسم لمدة 14 يوماً. وبتركيز(1/10) ملغم /غم CPF من الجرعة القاتلة.

7-3 قياس وزن الجسم **Measurement of body weight**

تم قياس وزن الجسم قبل المعاملة بالحقن للمبيد وبعده باستعمال الميزان الحساس .

8-3 التضحية بالحيوانات **Animal sacrifice**

بعد أن قمنا بتسجيل أوزان الحيوانات في كل مجموعة في نهاية التجربة . تم التضحية بالحيوانات بشكل متلاحق من كل مجموعة بعد (3) ساعة من أخر جرعة بعد تخديرها بالكلوروفورم Chloroform. .(التميمي ، 1999).

9-3 المعايير المدروسة

1 - قياس النسب المئوية لوزن الأعضاء إلى وزن الجسم **Relative weight**

بعدها فتح التجويف البطني بواسطة مشرط ومقص حاد تم أخذ الأعضاء قيد الدراسة (الكبد، الكلية،الدماغ، ذيل البربخ،عظمة الفخذ وعظمتي الساق) ووضعت في طبق بتري Petri dish حاوٍ على محلول الملح الفسيولوجي حتى لاتجف ،بعد ذلك يتم وضعها على ورق ترشيح لتجفيفها من

المحلول الفسيولوجي ،وزنت الأعضاء (الكبد،الكلية ، الدماغ) باستعمال ميزان حساس وحسبت نسبة وزن العضو إلى وزن الجسم (الخزاعي، 2013)ويتم ذلك بحسب المعادلة :

النسبة المئوية لوزن العضو=وزن العضو (بالغرام)/وزن الجسم (بالغرام)×100

بعدها حفظت الأعضاء في محلول الفورمالين بتركيز 10%لمدة تصل إلى 48 ساعة لأخذ مقاطع نسيجية منها والقسم الاخر من الأعضاء صعقت بالنتروجين السائل وحفظ في درجة -5 م، لغرض أستعمالة بعد ذالك للدراسة الجزيئية، وأستعمل ذيل البربخ لأغراض دراسة معايير النطف والمتضمنة ،حساب تركيز النطف ،النسبة المؤوية للنطف المتحركة والنسبة المؤوية لحيوية النطف والنسبة المؤوية للنطف اللاسوية.

3-10 الدراسة النسجية Histological Study

تم اعتماد طريقة (Bancroft and stevens.,1982)حيث أخذت العينات المحفوظة في الفورمالين 10% وتم غسلها بماء الحنفية الجاري لمدة 30 دقيقة للتخلص من المثبت الزائد.

واتبعت الخطوات التالية:

1-الأنكاز Dehydration

إذ تمرر العينات بتراكيز تصاعدية من الكحول الاثيلي (100,95,90,80,70)% ويتم ذالك بوقت ساعة ونصف لكل تركيز .

2- الترويق Cleanring

يتم الترويق للعينات بالزايلين Xylene مرتين وبوقت ساعة ونصف في كل مرة .

3- التشرَب infiltration

يتم تشرَب العينات بواقع مرتين بشمع البرافين المنصهر ذي درجة حرارة 55-60 درجة مئوية ولمدة من الوقت تحدد بساعة ونصف في كل مرة.

4- الطمر Embedding

يتم طمر العينات في قوالب حديدية تحوي شمع البرافين ويتم تعليمها Labelled وتترك لتتصلب إلى اليوم التالي .

5- التقطيع Sectioning

نستعمل جهاز المشراح الدوارRotary Microtomeفي تقطيع المقاطع النسجية وبسمك 5 مايكرومتر بعدها تنشر المقاطع النسجية في حمام مائي 50 درجة مؤية لدقيقتين .

6- التصبيغ Staining

استعملت صبغة الهمياتوكسيلين Harris Haematoxylin وصبغة الأيوسين الكحولي Eosin وكما يلي:-

1- أزيل الشمع بواسطة استعمال الزايلول Xylole إذ توضع الشرائح في مرحلتي زايلول لمدة 15 دقيقة إلى أن يزال الشمع بالكامل .

2- وضعت الشرائح في الايثانول بتراكيزتنازلية dissending

(100% ,90% ,80% ,70% ,50%)كل منها لمدة 5 دقائق وغسل السلايد بالماء المقطر .

3- تصبغ أو تلون المقاطع بالهمياتوكسيلين لمدة 2 دقيقة ثم تغسل بالماء الجاري لمدة 15 دقيقة ثم بالماء المقطر.

4- تصبغ المقاطع بالايوسين لمدة 15 دقيقة وبعدها وضعت في تدرج تصاعدي من الكحول الاثيلي يبدأ من 50% إلى 90% لمدة خمس دقائق لكل تركيز وبعدها توضع بمرحلتين من الكحول المطلق كل مرحلة 5 دقائق ،توضع بعد ذلك في الزايلول لمدة 15 دقيقة.

7- التحميل Mounting

تثبت المقاطع بواسطة استعمال مادة DPX أوبلسم كندا Canada balsam وتوضع أغطية الشرائح Cover Slips عليها وتترك لتجف.

8- الفحص والتصوير للشرائح Diagnosis & Photographing يتم فحص المقاطع النسجية لمختلف التراكيزعلى القوى التكبيريةالمختلفة لملاحظة التغيرات النسجية المرضية Histophathological.

11-3 الدراسة الوراثية

1 - التحليلات الوراثية الخلوية Cytogenetic analysis

في هذه الدراسة استعمل اختبار معامل الانقسام Mitotic Index (MI)ضمن التحليلات الوراثية إذ أن معامل الانقسام يستعمل دليلاً للكشف عن التأثير السمي الوراثي للعوامل الفيزيائية والكيميائية في الخلايا أذ أن المواد التي تسبب حدوث طفرة أو تسرطن غالبا" ما يؤثر على عدد الانقسامات وهذا يتم بحساب معامل الانقسام بوصفه نسبةً بين عدد الخلايا المنقسمة في المراحل الانقسامية المختلفة إلى العـــدد الكلي للخلايا في عينة تضم 1000 خلية بحسب المعادلة :

MI =عدد الخلايا المنقسمة /العدد الكلي للخلايا المنقسمة +الغير منقسمة X 100.

(Shubbar & AL-Allake., 1986).

2- دراسة تأثير تراكيز مختلفة من مبيد الكلوربيرفوس على معامل انقسام الخلايا و دراسة التشوهات والانحرافات الكروموسومية في الخلايا الجسمية (نخاع العظم).

الحصول على كروموسومات خلايا نقي العظم اتبعت طريقة (التميمي ، 1999).

1- تحقـن الجـرذان بـــ ml 0.1 مـن عقـار الكولجسـين بتركيـز(1 ملغـم /مـل) فـي التجويـف الخلبـي (*Intraperitoneal*) قبل 3 ساعات من عملية القتل للحصول على كروموسومات الطور الاستوائي ومنع الخلايا من إكمال الانقسام الخلوي.

2- يوضع الجرذ على الجهة الظهرية فوق طبق التشريح وتمسح جهته البطنية ومناطق الفخذ بالكحول الأثيلي 70% .

3- تقص منطقة الجلد ونزيل عظام الساق الخلفية (عظم الفخذ وعظم القصبة) بقطع العظم من الكاحل وقرب الحوض قدر الإمكان.

4- يتم ازالة العضلات والانسجة الاخرى من العظام قدر الإمكان وذلك بوضعها في صحن بتري يحوي محلول P.B.S .

5- نفصل العظمين بالقطع خلال مفصل الركبة.

6-يجب أن تفتح كلتا النهايات في تجويف نخاع العظم لكل عظم .

7- بعد ذالك تنفذ الخطوات التالية :

*** بعد تحضير محلول KCL بمولارية (0.075)ووضعه في Water bath بدرجة 37C يؤخذ 2 ml من KCL .**

*** نحقن العظام بمحلول KCL بواسطة محقنه طبية نبيذة معقمة ويغسل ويتم إنزال جميع محتويات نقي العظم وتكرر العملية حتى يصبح العظم أبيضاً لخلوة من محتوياته الخلوية.**

8- يتم جمع نقي العظم من عظمة الفخذ والساق بواسطة ماصة باستور وببطء حتى يكون المعلق الناتج تقريبا متجانساً خلويا" وتوضع في أنبوبة اختبار ويعلم عليها .

9-يحضن معلق الخلايا لمدة 15 دقيقة عند 37 مْ في الحاضنة أو يحمل الأنبوب باليد لمدة 15 دقيقة .

10- ينبذ معلق الخلايا بجهاز الطرد المركزي لمدة 10 دقيقة 2000 دورة/دقيقة .

11- يجب أن يكون هناك تجمع من الخلايا أسفل أنبوبة الاختبار ،تتم ازالة أكثر وليس كل المعلق بواسطة الماصة بدون بعثرة الخلايا.ويبقى حوالي 0.5 ml

12- يضاف للراسب قطرات من المحلول المثبت (كحول أيثانول :حامض الخليك الثلجي)بنسبة (1:3)على التوالي على جدران الأنبوبة ويترك لمدة 15 دقيقة في الثلاجة للمرة الأولى.

13- توضع الأنابيب في جهاز الطرد المركزي (الراسب +المثبت)لمدة 10 دقيقة و2000 دورة /دقيقة.

14- يزال الرائق في المحلول ويثبت مرة ثانية بمحلول التثبيت ويوضع في جهاز الطرد المركزي center fuage 2000 دورة /دقيقة ولمدة 10 دقيقة وتعاد العملية السابقة مرتين قبل الانتقال للخطوة 15 .- بعد إزالة الرائق للمرة الأخيرة ،يؤخذ الراسب ويتم تقطير 2-4 قطرة لكل شريحة معلمة إذ توضع الشرائح على مسافة معينة لضمان توزيع الخلايا بشكل متجانس .

16- توضع الشرائح المهجرية بشكل عمودي على ورق تجفيف ليتحرك السائل خارجا".لايتم مسح الشرائح باليد وتترك الشرائح تجف بالهواء.

17- يتم صبغ الشرائح إذ توضع في حامل داخل علبة التصبيغ الحاوية على محلول صبغة كمزا 2% لمدة 10 دقيقة ومن ثم تغسل ببفر P.B.S لإزالةالزائد من الصبغة .
18- يتم فحص الشرائح تحت العدسة الزيتية .(Tolliver & Robbins.,1991) .آذيتم فحص1000 خلية وبعدها ثم حساب الخلايا المنقسمة والخلايا غير المنقسمة ويحسب معامل الانقسام MI(Mitotic Index) بحسب المعادلة الآتية
معامل الانقسام = عدد الخلايا المنقسمة ÷ العدد الكلي للخلايا × 100 .
3- دراسة تأثير تراكيز مختلفة من مبيد الكلوربيرفوس على معالم النطف وتشوهاتها وتركيزالنطف ونسبةالنطف العيوشة والميتة في ذكور الجرذان البالغة.(دراسة بعض معايير معالم النطف).
يتم استئصال ذيل البربخ ويسجل وزنة وبعد عزلة يوضع في زجاجة ساعة موضوعة على صفيحة ساخنة وبدرجة حرارة 37 م ه يغمر بمحلول ملحي فسلجي 1ml (8.9 غم كلوريد الصوديوم مذابا في 1000 مل ماء مقطر)إذ يقطع ذيل البربخ بمقص أو شفرة حادة إلى أكثر من 200 قطعة لغرض تحرير النطف الموجودة فيه .وهذا يتم على الصفيحة الساخنة بدرجة 37 م ه لتجنب حدوث الصدمة للنطف نتيجة البرودة (Hinting, 1989).وتم دراسة المعالم التالية :
1- حركة النطف
تم حساب النسبة المئوية للحيوانات المنوية المتحركة بحسب طريقة (عجام وجماعته ,.1989)إذ تم أخذ قطرة من خليط نطف البربخ بعد الخلط الجيد بواسطة ماصة باستور زجاجية دقيقة وتوضع على شريحة زجاجية جافة ودافئة وغطيت بغطاء الشريحة يتم عد مالا يقل عن 250 نطفة لكل شريحة ونستعمل قوة تكبير 40X آذ يتم استخراج النسبة المئوية للنطف المتحركة وبحسب المعادلة :
النسبة المئوية للنطف المتحركة= عدد النطف المتحركة/العدد الكلي للنطف ×100 .
2-عيوشة النطف
لتمييز النطف الحية عن الميتة اعتمدت طريقة(Hinting, 1989)حيث تم أخذ قطرة من خليط النطف ووضعت بالقرب من نهاية الشريحة الزجاجية دافئة يضاف لها قطرة من صبغة الأيوسين- نكروسين تخلط جيدا" لثلاث ثوان وتحضر مسحة تترك لتجف بعد ذلك يتم حساب النطف المتحركة تحت قوة تكبير 40X إذ تظهر رؤوس النطف الميتة مكتسبة للصبغة وتبقى رؤوس النطف الحية غير مصطبغة بالصبغة أعلاه وتم حساب 200 نطفة على طول المسحة أو الشريحة ووفق المعادلة التالية يتم حساب النسبة المؤوية لعيوشة النطف .وكما يلي:-
النسبة المؤوية للنطف العيوشة =عدد النطف الحية (غير المصبوغة)/العدد الكلي للنطف ×100 .
3- تركيز النطف
أخذت قطرة من خليط نطف ذيل البربخ لحساب تركيز النطف على أساس حساب عدد النطف الموجود في 1 مل من السائل المنوي (نطفة /ملليتر) ويتم حساب عدد النطف في 10 حقول مجهريه اختيرت بشكل متعرج وقوة تكبير 40X ثم حساب تركيز النطف بحاصل ضرب المعدل الحسابي للحقول الـ 10 المحسوبة X العامل المضاعف1 مليون.(Hinting, 1989).
4-حساب النطف السوية :
تم عمل عينة بالطريقة التي استعملت في حساب النطف الحية وتم الفحص تحت المجهر وعند قوة تكبير 40X وعد ان النطف التي تكون مختلفة في الشكل عن المظهر السوي للنطف بأنها نطف غير سوية .(Sigmund, 1979) وتم حساب حوالي 400 نطفة على الأقل من كلا المسحتين واستخرجت النسبة المئوية للنطف السوية بحسب المعادلة:
النسبة المئوية = عدد النطف السوية /العدد الكلي للنطف المحسوبة x 100 .
12-3- الدراسة الجزيئية :
1 -استخلاص الدنا الجينومي Genomic DNA للأعضاء المدروسة ،الكبد والكليةوالدماغ
تم استخلاص الحامض النووي DNA باستعمال Kit خاص والمجهز من شركة FAVORGEN الكورية ولقد تم العمل بهذا العدة بحسب تعليمات الشركة المصنعة مع بعض التعديلات :
1- اخذ 0.025 g من العينات الكبد والكلية والدماغ باستعمال مقص معقم والمصعوقة بالنتروجين السائل ثم توضع في أنابيب ابندورف epindorf tube كلُ على حده ثم يتم إضافة 200 ميكروليتر منFATG1 Buffer يسحق بواسطة المدقات الصغيرة micrpestle أو Pipette tip لسحق النسيج.

2 - إضافة 20 ميكروليتر من محلول انزيم بروتينيز (k)proteinase k((20mg/ml إلى الخليط وتمزج بواسطة vortexing لمدة 5 ثوانٍ.
3- تحضن في درجة 60C مئوية حتى تتحلل الأنسجة تماماً .ويرج بواسطة vortex كل 15-10 دقيقة أثناء مدة الحضن لضمان تفريق عينة الأنسجة .
4- تدور الانابيب لمدة1 دقيقة في centrifuge .
5 – إضافة 200 ميكروليتر من FATG2 Buffer إلى مزيج الخلايا المتحللة وتمزج بواسطة vortexلمدة 5 ثوان وحضن المزيج بدرجة 60م مئوية لمدة 10 دقيقة باستعمال الحمام المائي.وتدور لمدة 1 دقيقة بواسطة centrifuge .
6 - يضاف 200 ميكروليترمن الكحول أيثانول ethanol (100%-96)إلى المزيج المتحلل وتمزج بواسطة vortex لمدة 10 ثوانٍ.ثم تدور الانابيب بسرعة لمدة قصيرة .
7- ينقل الخليط من أنبوبة الابندورف إلى أنابيب جمع collection tubes قياس 2 مل التي تحوي على أعمدة يوجد فيها مصفى لتنقية الحامض النووي GD filter colum المجهزة من ضمن العدة.
8 - توضع أنابيب الجمع مع الأعمدة الحاوية على المزيج في جهاز الطرد المركزي وتدور بسرعة 15000xg لمدة دقيقة واحدة إذ يتم التخلص من نواتج الخلايا المتحللة.
9 – يتم التخلص من المحلول الراسب للخلايا المتحللة بعد ذلك ينقل الـ GD coum التي تحوي الحمض النووي إلى أنبوبة جمع collection tube جديدة.
10 –أضيف 500 ميكرو ليتر من محلول ا لـ W1 Buffer المجهز ضمن العدة إلى العمود الحاوي لغسل الحامض النووي وتوضع الأنابيب في جهاز الطرد المركزي وبسرعة 15000xg لمدة دقيقة.
11 – يتم التخلص من الراسب ثم يضاف 750 ميكرو ليترمن محلول الغسل الذي يحوي كحول ايثانول المطلق Wash buffer الموجود من ضمن العدة إلى العمود الموجود فيه الحمض النووي ، للتخلص من الدهون داخل العمود وتوضع الأنابيب في جهاز الطرد المركزي وبسرعة 15000xg لمدة دقيقة واجدة .
12 – يتم التخلص من الراسب وتتم إعادة الأنابيب إلى جهاز الطرد المركزي لمدة ثانية لتجفيف الأعمدة وبسرعة 15000xg ولمدة 3 دقائق.
13 – تنقل الأعمدة التي تحوي الحمض النووي إلى أنابيب ابندروف جديدة ومعقمة .
14 – إضافة 50 ميكرو ليتر من محلول الإذابة PCR Water المجهز من ضمن العدة إلى وسط العمود ،وتترك الأنابيب لمدة خمس دقائق .
15 – توضع الأنابيب في جهاز الطرد المركزي وبسرعة 15000xg لمدة 2 دقيقة لتتم إذابة الحمض النووي وبعد ذلك يحفظ DNA بدرجة(20 -) مْ ليتم بعد ذلك إجراء فحص تفاعل سلسلة البلمرة.
2 - قياس تركيز الحمض النووي المستخلص ونقاوته.
يتم الكشف عن الحمض النووي DNA المستخلص عن طريق استعمال جهاز Nanodrop or spectrophotometerالخاص بالكشف وقياس تركيز الحمض النووي(وحسب طول القطعة يحدد احد الاجهز السابقة) إذ يتم الكشف عن الحمض النووي بواسطة تحديد تركيز الحمض النووي DNA (ng/ul ويتم قياس النقاوة للحمض النووي DNA وذلك من خلال قراءة الامتصاصية وبطول موجي يتراوح بين (260/280nm)وتم استعمال الجهاز على النحو الاتي:
1 – تحدد نوعية العينات المراد قياس تركيزها والمتمثلة بـ DNA ويتم ذالك بالضغط على الزر (Home).
2 – نضيف 3 ميكرو ليتر من (PCR Water)في الموضع المخصص ،ليتم معايرة الجهاز.وبعدها نقوم بتنظيف موضع المعايرة أو الركيزة تماماً من الماء المقطر باستعمال ورق نشاف خاص بالجهاز.
3 – يتم وضع 2 ميكرو ليتر من كل عينة للـ DNA المستخلص في موضع ركيزة المقياس في الجهاز ومن ثم الضغط على مفتاح Measure ليتم قياس تركيز العينات ونقاوتها.ومن الجدير بالذكر يعد الحمض النووي DNA المستخلص نقياً عندما تكون نسبة أو قيمة الامتصاصية أقل من 2 .

3 - تقنية تفاعل البلمرة التسلسلي Polymerase Chain Reaction

وتتم هذة التقنية بخطوات :

1 – تصميم البادئات primers design

صممت البادئات بواسطة بنك الجين (NCBI) للجين 2 Nephrin promoter – تم تحضير عالق البادئات بإذابة البادئ في (PCR Water) بحسب الحجم الموضح على البادئ ويتم رجها بواسطة جهاز الطرد المركزي ليتم إذابة مكونات البادئ ويتم ذلك بحسب التعليمات للشركة المصنعة ،ويتم تخفيفها مرة ثانية بواسطة (PCR Water) حتى تستعمل في التفاعل .

4- طريقة تفاعل البلمرة التسلسلي Methods of Polymerase Chain Reactionحضر مزيج التفاعل لسلسلة البلمرة بالاستعانة بعدة الـ AccuPower PCR premix

بحسب التعليمات الموضوعة من الشركة وكالاتي :

1 – حضر مزيج التفاعل لسلسلة البلمرة في أنابيب الـ PCR المجهزة ضمن العدة المحتوية على مكونات تفاعل سلسلة البلمرة ، إذ تم إضافة المكونات الأخرى لمزيج تفاعل وكما جاء بتعليمات الشركة جدول (3-4) كميات المكونات المستعملة في تفاعل سلسلة البلمرة وتركيزهاmaster mixz PCR

حيث مزجت المكونات المذكورة في الجدول أعلاه في ابندروف Master Mix من نوع 0.2ml ويتم ذلك على جريش الثلج وتحت ظروف نظيفة ومعقمة ويحتوي ابندروف Master Mix على المكونات التالية :

Top DNA polymerase, dNTP(dATP,dCTP,dGTP,dTTP) ,Tris-HCL(PH9.0), KCL, MgCL2 Stabilizer and tracking dey.

5- ظروف تفاعل البلمرة المتسلسل

PCR Thermocycler conditions

تم إجراء فحص تفاعل سلسلة البلمرة باستعمال جهاز الدوار الحراري PCR thermocycler

6- الترحيل الكهربائي لـ DNA Gel electrophoresis

تم إجراء الترحيل الكهربائي إذ استعمل هلام الاكاروز بتركيز % 1.5 ليتم قراءة نتيجة تفاعل سلسلة البلمرة (Sambrook.J & Russell., 2001).PCR وكما يلي :-

1 - تمت إذابة 1.5 غم من هلام الاكاروز Agarose gel في 100 مل من محلول الـ TBE buffer الدارئ وبتركيز 1X واستعملت الصفيحة الحرارية Magnetic hot plate stirrer لمدة 15 دقيقة .

2- يترك الهلام ليبرد بدرجة حرارة 50 م وبعد ذلك نضيف صبغة الحامض النووي المشعة Bromide Eethidium وتمزج بصورة جيدة مع الهلام وبتركيز 0.05m.

3 – يصب هلام الاكاروز داخل قالب الترحيل Tray الذي يحوي على المشط Comb ،ليتم تحديد أماكن عينات PCR ،بعد ذلك يترك الهلام ليتصلب عند درجة حرارة الغرفة ولمدة 15 دقيقة ومن ثم يزال المشط من الهلام بحذر ودقة .

4 – حملت العينات المدروسة إذ استعمل صبغة التحميل Loading dye وتم ذلك على ورق البار افلم Parafilm paper إذ تمت إضافة 1 حجم من صبغة التحميل مقابل 4 حجوم من ناتج PCR ووضعها في حفر الهلام .

5 – تم استعمال سلم القياس 100 DNA ladder للمعايرة مع ناتج البي سي ار ويوضع في الحفرة الأولى .

6 – عند اكتمال عملية التحميل نغمر الهلام الأكاروز بمحلول TBE Buffer الدارئ بتركيز 1X ومن ثم نغلق غطاء الترحيل ،ثم شغل جهاز الترحيل بتيار 100 V و80 A لمدة 1 ساعة .

7 – عند إنهاء عملية الترحيل يفحص الهلام الحاوي على نواتج PCR ونستعمل للفحص مصدر الأشعة فوق البنفسجية UV Light source ،ليتم تحديد الناتج مع وحدة القياس .

7- طريقة التشكل الموافق للخيط المفرد Polmerase Chain Reaction – Single strand conformation polymorphism method (PCR-SSCP).(Orita. M ,*et al.,*1989)

تم استعمال طريقة التشكل الموافق للخيط المفرد المذكورة(PCR-SSCP) ليتم تحديد وجود طفرة وراثية في جين Nephrin promoter إذ طبقت الطريقة على مانتج من الـ PCR ويمكن أن نختصر المراحل الأساسية لتقنية PCR-SSCP وكما يلي :-

1- هلام الاكريلامايد المحضر سابقاً.

2- يتم تحضير نواتج الـ PCR (إذ نأخذ 10µمن نواتج الـ PCR).

3- تمسخ نواتج الـ PCR (نضُيف 10µ من SSCP loading 1 : 1 تضاف الى ناتج الـ PCR).

4 – يتم حضن ناتج الـ PCR وبدرجة حرارة 95 لمدة سبع دقائق وفي حمام مائي .

5 – يتم حضن الناتج من الـ PCR داخل جريش من الثلج ولمدة خمسة دقائق.

6- يتم تحميل الناتج للـ PCR في هلام (نأخذ 10µ من العينةوتوضع في الحفر المخصصة لها .

7 – بعد ذلك يتم الترحيل الكهربائي.إذ(يشغل جهاز الترحيل الكهربائي 250V).

8 – مرحلة التصبيغ (تأتي بعد الترحيل الكهربائي ويوضع الهلام في محلول TBE 1X والحاوي على محلول بروميد الاثيديوم إذ يرج بشكل متوسط بواسطة هزاز لمدة ثلاثين دقيقة).

9- بعد ظهور الحزم تصور بجهاز UV Transilluminator .

3 – 13 التحليل الاحصائي

تم تحليل النتائج باستعمال التصميم تام العشوائية Design Randomized Completey

وكالك تم استخدام اختبار الفرق المعنوي الاصغر(L.S.D)Least significant difference

) تم استعمال البرنامج الجاهزSPSS وتحت مستوى احتمال 0.05 (الراوي، 2000).

4 :النتائج Results

4-1 الملاحظات العيانيه Clinical observations

أظهرت حيوانات التجربة و لمراحل الدراسة وجود بعض الملاحظات العيانية تمثلت بارتجاف تراوحت شدته بين المتوسط إلى الحاد مع ملاحظة وجود رقود جانبي في بعض الأحيان ونقص واضح في النشاط والفعالية وتعب شديد ،كما تمت ملاحظة بعض الاعراض المتمثلة بهيجان عصبي شديد وعدوانية حادة لدى حيوانات المجموعة الثالثة مع حصول نزف من الأنف وتهيج العين لكن بدرجة قليلة مقارنة مع السيطرة .أما الفحص العياني للكبد فأظهر وجود نزف قريب للسطح العلوي وكان واضحاً في المجموعة الثالثة وكذلك تمت ملاحظة وجود تحببات بيض قرب السطح العلوي للكلية واحتقان في الأمعاء الدقيقة للمجموعة الثالثة لمدة 14 يوماً من التجربة في المجاميع المعاملة بالمبيد مقارنة مع حيوانات السيطرة.

4-2 التغيرات الوزنية Weight changes

اظهرت نتائج الدراسة عدم حصول فرق معنوي ($p>0.05$)في وزن الجسم للحيوانات المعاملة لمدة 7 أيام وللمجموعة الأولى (T1)والثانية (T2) بينما لوحظ انخفاض غير معنوي للمجموعة الثالثة(T3) لمدة 7 أيام مع مجموعة السيطرة(C) وكذالك المجموعات كافة لمدة 14 يوماً إذ حصل انخفاض معنوي ($p<0.05$)وعلى المستويات كافة في معدلات الفرق في أوزان الحيوانات قبل الحقن وبعده مقارنة مع مجموعة السيطرة وكذلك لوحظ عدم وجود فرق معنوي بين المجموعتين الثانية والثالثة لمدة 14 يوماً كما وجد أن هناك فرقا معنوياً لانخفاض الوزن للمجاميع الثانية(T2) والثالثة(T3) مع الأولى لفترة 14 يوماً كما في الشكل (8)

4-3 تأثير الكلوربيرفوس في أوزان الأعضاء الداخلية

1- الكبد liver

اظهرت نتائج الدراسة الحالية عدم وجود فرق معنوي في أوزان الكبد وعند مستوى احتمالية ($p>0.05$) في مجاميع الدراسة(T1)و(T2) لمدة 7 أيام مقارنة مع مجموعة السيطرة بينما بينت الدراسة حصول انخفاض غير معنوي بين المجموعة الثالثة (T3) مع مجموعة السيطرة (C) ولوحظ عدم وجود فرق معنوي بين المجموعة الثانية(T2) والثالثة(T3) لمدة 7 أيام. وقد لوحظ ان هنالك فرقا معنوياً لانخفاض الوزن للمجاميع الثانية (T2)والثالثة (T3) مقارنة مع مجموعة السيطرة وبمستوى معنوية ($p<0.05$)عند المدة 14 يوماً كما لوحظ وجود فرق معنوي بين المجموعة الثانية(T2) والثالثة(T3) للمدة 14 يوماً بمستوى معنوية ($p<0.05$) .كما في الشكل(9).

2- الكلية Kidney

بينت الدراسة الحالية عدم تأثر معدلات أوزان الكلية معنوياً لمجموعة الحقن (1/30)(T1)لمدة 7 أيام مقارنة مع مجموعة السيطرة، وكذلك عدم وجود فرق معنوي للمجموعة الثانية(T2)والمعاملة(1/20) ملغم /كغم من وزن الجسم من الجرعة القاتلة مع المجموعة الأولى بمستوى معنوية($p<0.05$) ولمدة 7 أيام .بينما بينت الدراسة أن معدلات اوزان الكلية ولمجاميع الحقن الثانية(T2) والثالثة(T3) لمدة 14 يوماً أظهرت انخفاض معنوياً ($p<0.05$) مقارنه مع مجموعة السيطرة وكان الانخفاض معنوياً ($p<0.05$) لمجاميع الحقن كافة للمدة 14 يوماً باستثناء مجموعة الحقن (1/30)المجموعة الأولى مقارنة مع مجموعة السيطرة(C) للمدة نفسها.كما في الشكل(10).

3- الدماغ Brain

اظهرت نتائج الدراسة عدم وجود فروق معنوية بمستوى احتمالية ($p<0.05$) للمجاميع الأولى(T1) الثانية (T2)مع مجاميع السيطرة للمدة 7 أيام وكذالك بين المجموعة الأولى(T1) للمدة 14 يوماً مع مجاميع السيطرة ولوحظ وجود ارتفاع غير معنوي($p>0.05$) للمجاميع الأولى و الثانية لمدة 14 يوماً مع مجموعة السيطرة. أظهرت النتائج وجود زيادة معنوية($p>0.05$) في وزن الدماغ بين المجموعة الثانية(T2) والثالثة(T3) لمجاميع الحقن للمدة 14 يوماً مقارنة مع مجموعة السيطرة(C) شكل(11).

4-4 التغيرات النسجية المرضية .

1 - تأثير مبيدCPF على انسجة الكبد Liver

شكل رقم (12) توضح مقطعاً عرضياً لكبد الجرذان من مجموعة السيطرة المعاملة بالمحلول الفسلجي ،إذ يحاط الكبد بمحفظة من نسيج ضام رقيق ويظهر نسيج الكبد منتظم بشكل فريد إذ تنتظم الخلايا الكبدية Hepatocytes بحويجزات Tabeculae ومن ثم تكون شرائط كبدية تضم بينها الجبيبانيات الدموية Blood sinusoids ويظهر نسيج الكبد على شكل فصيصات سداسية Hexagonal lobules كل فصيص يتوسطه وريد مركزي Central vein .

اظهرت النتائج وجود وريد مركزي طبيعي محاط بخلايا كبدية طبيعية بشكل شعاعي مع تنكس بسيط و تفجج لمناطق في النسيج الكبدي مع تكاثر الخلايا الكبدية إذ يظهر الانقسام النووي بشكل واضح مع توسع في الجيبانيات الكبدية ،القناة الصفراوية تظهر فيها احتقان قليل وتظهر طبيعية غير متكاثرة مع احتقان قليل في حيوانات المجموعة الأولى (شكل 13)للمدة 7 أيام.كما اظهر الفحص المجهري لحيوانات المجموعة الثانية تنخراً واضحاً في نسيج الكبد مع اختفاء الترتيب الشعاعي للكبد مع وجود نزف بين الخلايا الكبدية وتظهرالخلايا الكبدية متفججة مع توسع في الجيبانيات ،احتقان بسيط في الوريد المركزي Central veinاما القناة الصفراوية تظهر طبيعية وغير متكاثرة لمدة 7 أيام (شكل 14) . وبين الفحص المجهري لكبد حيوانات المجموعة الثالثة ،حدوث احتقان واضح في الوريد المركزي مع فقدان الترتيب ألشعاعي للخلايا الكبدية .نلاحظ احتقان بسيط في القنوات الصفراوية القنوات الصفراوية تظهر طبيعية وغير متكاثرة ، في الحيوانات للمدة 7 أيام.شكل رقم (15).(19).شكل رقم (16) توضح كبد المجموعة الأولى لفترة 14 يوم .يلاحظ تنخراً واضحاً في نسيج الكبد مع اختفاء الترتيب الشعاعي للكبد و شكل رقم (17) للمدة 14 يوماً كبد المجموعة الثانية يلاحظ الخلايا الكبدية تظهر متفججة Vacuolated كذلك يلاحظ توسع الجيبانيات الكبدية القنوات الصفراوية تظهر طبيعية وغير متكاثرة. اظهر الفحص المجهري لكبد حيوانات المجموعة الثالثة لمدة 14 يوماً احتقاناً واضحاً وفرط تنسج في القناة الصفراوية ،الوريد المركزي يظهر محتقناً مع وجود الترتيب ألشعاعي للخلايا الكبدية التي تظهر متنكسة مع الشكل الانقسامي النووي بشكل واضح مع توسع قليل للجيبانيات الكبدية مع وجود نزف في نسيج الكبد، الخلايا الكبدية تظهر متفججة مع تنخر واضح فيها إذ تظهر بعض الخلايا خالية من الانوية (متحللة karyolysis) والبعض الأخر ذات أنويه متغلضة pyknotic كذلك لوحظ توسع في الجيبانيات الكبدية والقناة الصفراوية فيها فرط تنسج واضح مع احتقان ، .شكل (18)(20).

2 - تاثير مبيد CPF على انسجة الكلية Kidney

شكل (21) إذ يبين المقطع العرضي لكلية الجرذان مجموعة السيطرة المعاملة بالمحلول الفسلجي،إذ تحاط الكلية بمحفظة من نسيج ليفي Fibrous capsule نسجيا"تتكون من القشرة Cortex واللب Medulla وحوض الكلية Renal pelvis ،القشرة تتكون من الكبيبات Glomerulus التي تكون محاطة بمحفظة بومان Bowmanns Capsule وتحوي القشرة على النبيبات القريبة والبعيدة Proximal and Distal tubules .

في حيوانات المجموعة الأولى ولمدة 7 أيام وجود كبيبات طبيعية مستديرة كبيرة طبيعية مع توسع قليل للنبيبات الكلوية ،النبيبات الملتوية تظهر مبطنة بخلاياعمودية واطئة وطبيعية شكل (22) .اظهر الفحص المجهري لكلية الحيوانات في المجموعة الثانية أن هناك توسع النبيبات الملتوية الكلوية مع احتقان في النسيج الكلوي ،الكبيبات تظهر متوسعة ومستديرة وطبيعية ،الخلايا المبطنة للنبيبات الكلوية تظهر متنكسة ويظهر انسلاخ فيها.شكل (23)ولمدة 7 أيام.في حين لوحظ تجمع مادة جيلاتينية شفافة (التنكس الزجاجي hyaline degeaeratio) مع احتقان واضح ونزف شديد في النسيج الكلوي ،النبيبات الملتوية الكلوية تظهر متوسعة وذات بطانة متحطمة إذ نلاحظ تنكس الخلايا المبطنة لهذة النبيبات. لنسيج الكلية لحيوانات المجموعة الثالثة، شكل رقم (24)لمدة 7 أيام .يلاحظ في شكل(25) كلية جرذ للمجموعة الأولى للمدة 14 يوماً .وجود كبيبة كبيرة وطبيعية وتوسع قليل في النبيبات الملتوية.الخلايا المبطنة للنبيبات الكلوية تظهر متنكسة مع انسلاخ بعضها. في الشكل(26)لكلية جرذ للمجموعة الثانية للمدة 14 يوماً يظهر تجمع مادة جيلاتينية شفافة(تنكس زجاجي hyaline degeaeration)احتقان ونزف في النسيج الكلوي. اما كلية حيوانات المجموعة

الثالثة لمدة 14 يوماً الشكل (27) نلاحظ نزف في النسيج الكلوي مع توسع النبيبات الملتوية الكلوية ،الكبيبات تظهر مستديرة وطبيعية ونلاحظ كذلك تنكس الخلايا المبطنة للنبيبات الملتوية .

3 - تاثيرمبيد CPF على انسجة الدماغ Brain

شكل (28)(29)يوضح المقطع العرضي لدماغ الجرذ لحيوانات السيطرةالمعاملة بالمحلول الفسلجي ،نسيجاً طبيعياً للدماغ ،الأوعية الدموية محاطة بفراغ (Vircho- Robin space) خلايا النسيج العصبي موجودة بشكل طبيعي مع وجود الخلية العصبية ذات جسم مثلث طبيعي لوحظ وجود احتقان قليل في الأوعية الدموية والتي تظهر محاطة بفراغ (Vircho-Robin space)كذالك نلاحظ تكاثر الخلايا النجمية والقليل من الخلايا الدبقية .شكل رقم (30) . المجموعة الأولى لمدة 7 أيام .اظهر الفحص النسيجي لدماغ حيوانات المجموعة الثانية للمدة 7 أيام حدوث نزف واضح في نسيج الدماغ كذالك تكاثر الخلايا النجمية والخلايا الدبقية مع وجود وذمة دماغية واضحة كذالك نلاحظ التهاباً شديداً في ألأغشية السحائية إذ نلاحظ أرتشاح في الخلايا الالتهابية واحتقان في طبقة السحايا ،بعض الخلايا العصبية تظهر متنكسة إذ نلاحظ تحول أشكالها إلى شكل كروي مع نواة محيطية الموقع وانتشار أجسام نسل داخل الخلية العصبية وهذه الحالة تسمى التحلل الكروماتين المركزي .أشكال رقم (33,32,31,).

نلاحظ عند فحص حيوانات المجموعة الثالثة ولمدة حقن 7 أيام وكما مبين في الشكل رقم (34) وجود الوذمة الدماغية (الخزب) ،تكاثراً واضحاً للخلايا النجمية (estrocytosis cell)والخلايا الدبقية (Gliosis cell) كذلك يلاحظ تفججاً في الخلايا العصبية والتي تظهر كروية الشكل والنواة محيطية مع انتشار أجسام نسل داخل الخلية العصبية وجود احتقان مع خثره كبيرة وهذه الحالة تسمى تحلل الكروماتين المركزي .شكل (35) دماغ جرذ للمجموعة الأولى للمدة 14 يوماً.يلاحظ وجود الو ذمة الدماغية(cerebral odema) في نسيج الدماغ و تكاثر للخلايا النجمية والدبقية ،احتقانات منتشرة على طول الدماغ للأوعية الدموية . شكل (36)دماغ جرذ للمجموعة الثانية للمدة 14 يوماً.وجود وذمة دماغية وبشكل واضح وجود الخلايا يلاحظ تفجج في الخلايا العصبية (Neurons).نلاحظ عند فحص دماغ حيوانات المجموعة الثالثة لمدة 14 يوماً احتقاناً واضحاً في الأوعية الدموية مع احتقان جزئي لمجال أو فراغ Vircho-Robin space حول الوعاء الدموي وتكاثر الخلايا النجميه والدبقيه مع وجود وذمة في نسيج الدماغ.شكل(37).

4-5 الدراسة الوراثية .

1- معامل الانقسام الخلوي للخلايا الجسمية.

بينت نتائج الدراسة انخفاضاً معنوياً في معدلات معامل الانقسام لمجاميع الحقن كافة لمدة 14 يوم عند مقارنتها بمجاميع السيطرة $p<0.05$.ولوحظ عدم وجود فروق معنوية بين المجاميع الأولى(T1) والثانية(T2) مع مجاميع السيطرة(C) لفترة 7 يوم وكذالك وجود فرق معنوي بين المجموعة الثالثة(T3) للحقن مقارنة مع مجموعة السيطرة لفترة 7 يوم.شكل(38).كما لوحظ انحراف وتشوهات كروموسومية متعددة كما في الشكل(39).

2- تركيز النطف .

أظهرت النتائج أن معدلات إعداد النطف بـ (1 مل) أقل معنوية ($p<0.05$)لمجاميع الحقن كافة لمدة 7 أيام مقارنة مع مجموعة السيطرة. ولوحظ عدم وجود فروق معنوية بين المجاميع الثانية(T2) والثالثة(T3) لمدة 7 أيام.كذلك لوحظ انخفاض معنوي ($p<0.05$)في معدلات أعداد النطف ولمجاميع الحقن (T1)(T2)و(T3) لمدة 14 يوماً مقارنة مع مجموعة السيطرة(C) .كما في الشكل(40)،(41).

3- النسب المئوية لحيوية النطف وحركتها وتشوهها :

اظهرت النتائج إن معدلات النسب المئوية لحركة النطف ومعدلات النسب المئوية للنطف السوية ولمجاميع الحقن كافة لمدة 14 يوماً أقل معنوياً ($P<0.05$)عند مقارنتها مع مجموعة السيطرة .وكذالك أن معدلات النسب المئوية لحيوية النطف لم تتأثر في مجموع الحقن (1/30) لمدة 7 أيام عند مقارنتها بالسيطرة.وبينت النتائج أن معدلات النسب المئوية لحيوية النطف للمجاميع المعاملة بالحقن (1/20) لمدة 7 أيام انخفاض معنوي عند مستوى احتمالية ($P<0.05$) مقارنة مع مجموعة السيطرة ،وبينت الدراسة انخفاضاً معنوياً ($P<0.05$)لمعدلات النسب المئوية لحيوية وحركة النطف لمجاميع

الحقن (T1)(T2) و(T3) لمدة 14 يوماً مقارنة مع السيطرة كما في الشكل.(40)،(41) .كما بين الشكل 42 وجود تشوهات في شكل النطف مقارنة مع النطف الطبيعية.

5-4 الدراسة الجزيئية

1- ناتج الترحيل الكهربائي

تمت عملية استخلاص DNA بنجاح إذ تم التأكد من خلال ناتج الترحيل الكهربائي لهلام الاكاروز كما موضح في الشكل (43).

2- ناتج التضخيم PCR

الشكل (44) يوضح ناتج تضخيم PCR لبادئ جين Nephrin promoter gene على هلام الاكاروز وبحجم 771 bp إذ استعمل 100 bp DNA Ladder ،تدل النتائج على نجاح تضخيم البادئ لموقع جين Nephrin gene promoter بحجم 771 .

3- تأثير مبيد الكلوربيرفوس (CPF) على الطفرات في جين Nephrin promoter بتقنية PCR-SSCP

أظهرت النتائج التي حصل عليها بتقنية PCR- SSCP حدوث طفرة وراثية في مواقع محددة أو معينة في جين Nephrin gene promoter في المجاميع المعاملة بمبيد الكلوربيرفوس CPF للمدة14 يوماً و المعاملة بالجرع المذكورة كما في الشكل (45).

5-1 التغيرات العيانية والسلوكية .

بينت الدراسة الحالية ومن خلال الفحص العياني وجود تغيرات واضحة في نسيج الدماغ وللمجاميع المعاملة بمبيد الكلوربيرفوس للمدد أسبوع وأسبوعين في حين لوحظ حدوث نزف في نسيج الكبد وعلى مسافات قريبة من السطح في الحيوانات المحقونة بالمبيد وللمجاميع الثانية والثالثة لمدة أسبوعين و بين الفحص العياني للكلية وجود تحببات على جوانب الكلية عائدة لحيوانات المجاميع نفسها .ويفسر ذالك أن النزف والاحتقان والتغيرات في نسيج الكبد قد تعود إلى الضرر الذي سببه مبيد الكلوربيرفوس وسبب التحبب في سطح الكلية قد يكون بسبب رجوع الإدرار والسوائل إلى الكلية بسبب الاحتباس الذي يسببه المبيد CPF من خلال تأثيره على الخلايا المبطنة للنبيبات الملتوية الكلوية وقد أشار (الخزاعي ، 2013) إلى تأثيرالتعرض لمبيد الأبامكتين وبجرعة 10 ملغم /كغم من وزن الجسم ظهور أعراض عيا نية لنسيج الكبد والكلية .وأظهرت نتائج الدراسة الحالية أن التعرض للمبيد العضوي الفسفوري الكلوربيرفوس أدى إلى تغايرات سلوكية ترافقت مع الأعراض الأخرى السمية والمرضية إذ لوحظ خمول الجرذان مع قلة الشهية وانخفاض في معدل استهلاك الغذاء ولوحظ إفراز اللعاب بصورة زائدة عن المعتاد وكذلك وجود حالات من الإسهال وتبين أن هذه الحالات تزداد مع زيادة التراكيز من المبيد وبحسب التقدم في المجاميع المعاملة .وتفسر هذه التغيرات السلوكية التي شوهدت في هذه الدراسة على الجرذان إلى تأثير مبيد الكلوربيرفوس (المبيد العضوي الفسفوري) المثبط لأنزيم Acetylcholinesterase والذي ينتج عن هذا التثبيط فرط التحفيز في الجهاز العصبي المحيطي اللاإرادي ويكون له تأثير على الجهاز العصبي الإرادي

(Tuormaa, 2003),(Eskenazi & Bradman, 1999).ومن ثم يؤدي هذا إلى تجمع المادة الأساس في الأعصاب المسيطرة والمحركة للعضلات الإرادية مما يسبب الضعف والخمول والتعب وان تراكم المادة الأساس(Ach) في الجهاز العصبي المحيطي اللاإرادي تؤدي إلى زيادة في طرح اللعاب وبعض التشنجات اللاإرادية لعضلات جدران الأمعاء ومن ثم يسبب قلة الشهية وانخفاض في تناول الغذاء وحدوث الإسهال(Eskenazi & Bradman, 1999).

5-2 تأثير مبيد الكلوربيرفوس في وزن الجسم .

ان تقدير الوزن والوزن النسبي للأعضاء والجسم يعد معياراً لتقويم سمية العديد من المركبات ومعظم المبيدات الفسفورية العضوية تسبب في نقصان الوزن للجسم ووزن بعض الأعضاء لحيوانات التجربة التي يظهر فيها انخفاض في استهلاك الغذاء . اظهرت نتائج الدراسة الحالية إن الحيوانات المعاملة لمدة 7 أيام وللمجموعة الأولى (T1)والثانية (T2)عدم حصول فرق معنوي ($p<0.05$)بينما لوحظ انخفاض غير معنوي للمجموعة الثالثة(T3) لفترة 7 أيام مع مجموعة السيطرة(C) وكذلك المجموعات كافة لمدة 14 يوماً إذ حصل انخفاض معنوي ($p<0.05$)وعلى المستويات كافة في معدلات الفرق في أوزان الحيوانات قبل وبعد الحقن مقارنة مع مجموعة السيطرة وكذالك لوحظ عدم وجود فرق معنوي بين المجموعتين الثانية والثالثة لمدة 14 يوم كما وجد أن هناك فرقا معنوياً لانخفاض الوزن للمجاميع الثانية(T2) والثالثة(T3) مع الأولى لمدة 14 يوماً كما في الشكل (8).ان انخفاض الوزن قد يعود إلى انخفاض معدل استهلاك الغذاء بسبب المبيد CPF وهذا يتفق مع دراسة(Baha *et al*.,2006)إذ أكد حدوث انخفاض في الوزن المكتسب للجرذان المعاملة بـCPF لمدة 4 أسابيع .كما تتفق نتائج هذه الدراسة مع ما أشارت إلية منظمة (WHO, 1989)في انخفاض معدل الوزن العام للجسم في الفئران المعاملة بمبيد Dichlorvos (مبيد عضوي فسفوري)وكان إعطاؤها عن طريق مياة الشرب بتراكيز 400,1600.3200,5000 ملغم/لتر ماء ولمدة 10 أسابيع . وتتفق أيضا مـع (Nahid A.Khtar *et al* .,2009)الذي بين حدوث انخفاض في وزن الجسم لذكور الجرذان عند تجريعها بمبيد CPF بجرعات 9,6,3 ملغم /كغم من وزن الجسم لمدة 90 يوماً عن طريق الفم .وكذالك تتفق مع (Tarek M.H.Eik *et al* ., 2013)إذ اكد حصول انخفاض في وزن الجسم للجرذان المجرعة بمبيد الكلوربيرفوس وتشير الدراسة الحالية وللمدة 7 أيام عدم تسجيل أي فقدان في الوزن للجرذان المعاملة بالمبيد CPF وهذه تتفق

(Radhey *et al* ., 2007) إذ أكد عدم حصول انخفاض في وزن الجرذان المعاملة بمبيد CPF .اكد ., (kumara N ishi & Swamdeepsing Hund *et al* 2013) حدوث تغيرات غير مهمة لوزن الجسم رغم استهلاك العلف إذ جرعت الحيوانات o.1,2.5 ملغم /كغم /يوم في حين اكد (T.Leen (Lassiter & Stephen Brimijon.,2008) زيادة في وزن الجسم عند تعرض الجرذان بمبيد الكلوربيرفوس لجرعة2.5 ملغم /كغم ومن يوم الحمل والى ما بعد الولادة لمدة 21 يوماً وكذلك لاحظ (walter , 1977)عدم حصول انخفاض معنوي $p<0.05$ في وزن الجسم عند اعطاء الجرذان ثلاثه أنواع من المبيدات العضوية الفسفورية ولمدة 3 أسابيع .ويفسر ما يفقدة الجسم من وزن بانخفاض في معدل السوائل وكذلك ضعف عام في البنية للجسم ويكون ناتجاً عن قلة استهلاك الغذاء إذ يعمل جسم الحيوان على تهديم الدهون وتحريرها في النسيج الدهني Adipose tissue وقد يرجع السبب إلى عمليات أخرى مثل هدم أحماض أمينية Amino acids ومعظم البروتينات وقد يكون السبب في فقدان الوزن يعود إلى التغيرات التي يسببها الحقن بالمبيد في IP حيث تكون المادة الفعالة للمبيد أكثر فاعلية من التجريع إذ يحدث تغيرات واحتقان في نسيج الأمعاء وبذلك يمنع امتصاص المواد الغذائية أو يكون للمبيد الكلوربيرفوس تأثيرعلى الهرمونات فيعمل على قلة الشهية (Baha *et al*., 2006).ان الانخفاض في الوزن العام الذي لوحظ للمجاميع الثانية والثالثة للمدة 14 يوماً يمكن أن يعزى إلى التأثيرات السمية للمبيد العضوي الفسفوري التي سببت في اعراضاً وتغايرات سلوكية مثل قلة الشهية ومعدلات منخفضة لتناول الغذاء كما جاء في الدراسات التي بحثت التأثير السمي للمبيدات في الجرذان (Zak *et al* ., 1973) و (Singh *et al* ., 1988)وما للتأثير السمي للمبيد في تثبيط عمل الإنزيمات الهاظمة و العصارة الصفراوية بسبب تعطيل أنزيم تعطيل أنزيم Acetylcholinesterase ومن ثم تراكم المادة الأساس في الجهاز العصبي السمبثاوي ،ويؤدي ذلك إلى ظهور أعراض مرضية مثل التشنجات العضلية والغثيان والإسهال ومن ثم يحول دون حصول ارتفاع في وزن الجسم (Tuormaa ,2003).قد يتأثر أنزيم ATP ase بالمبيدات وبذلك تؤثر على إفراز الصفراء من الكبد ومن ثم تؤثر على عملية الهظم وتتأثر بذلك عملية النقل في الكبد اتفق هذا مع ما أشار أليه (Trottman & Desaiah., 1979)وأشار (2000 ،القيسي) من ان تعرض حيوانات التجربة لمبيد السومسدين يؤدي إلى التأثير على تكوين الكلايكوجين للعظام ونموها ومن ثم قلة نمو العظام مما يؤدي إلى قلة الوزن للجسم .قد يعود انخفاض معدل وزن الجسم في الحيوانات المعاملة بالمبيد إلى تأثر الأعصاب الكولونية بالمبيد(العضوي الفسفوري) مسببا تثبيط فعالية إنزيم (AchE) وتراكم مادة (ChE)حيث يمثل كلاهما الآلية الكيموحيوية للسيطرة على سلوك التغذية .(Chuiko, 2000)لذلك يكون من الطبيعي معرفة أسباب الانخفاض الحاصل في معدل الوزن العام للجسم للحيوانات المعاملة بالمبيد مقارنة مع معدلات أوزان حيوانات مجموعة السيطرة.

3-5 تأثير الكلوربيرفوس في النسبة المئوية لوزن الأعضاء .

بينت النتائج الحالية عدم وجود فرق معنوي في انخفاض أوزان الكبد عند مستوى احتمالية ($p<0.05$) في مجاميع الدراسة(T1)و(T2) ولمدة 7 أيام مقارنة مع مجموعة السيطرة بينما لوحظ حصول انخفاض غير معنوي بين المجموعة الثالثة مع مجموعة السيطرة و كذلك عدم وجود فرق معنوي بين المجموعة الثانية والثالثة لمدة 7 أيام. وهنالك فرق معنوي لانخفاض الوزن للمجاميع الثانية والثالثة مقارنة مع السيطرة وبمستوى معنوية ($p<0.05$) ولمدة 14 يوماً . وكذلك لوحظ عدم وجود فرق معنوي بين المجموعة الثانيةوالثالثة للمدة 14 يوماً بمستوى معنوية ($p<0.05$) . وكانت هذه النتيجة متفقه مع دراسة (Banan K. AL-Baggou, 2014) الذي اكد فيه حصول انخفاض في وزن الكبد بشكل ملحوظ حيث عرضت حيوانات التجربة الكتاكيت للكلوربيرفوس بجرعة (100 جزء من المليون)في مدة 28 يوماً حيث سجلت انخفاض في وزن الكبد في يوم 14 يوماً من المعاملة.وقد يفسر ذلك إلى إنا لأنزيمات المصلية ALT,AST Transaminas إنزيمات مهمة في عمليات الجسم البيولوجية حيث توجد هذه الأنزيمات في الخلية الكبدية وعند إصابة الغشاء الخلوي للخلايا الكبدية تتحرر العديد من الأنزيمات الموجودة في الخلية الكبدية مثل ALP,AST,ALT وهي تعد معلمات للإضرار الكبدية. ان المبيدات الفسفورية العضوية تكون سبباً في زيادة نشاط الإنزيمات ALT,ALP,AST المصلية وارتفاع MDA النسجية الناتجة من تفاعل الجذور الحرة مع المكونات الخلوية واهم هذه المكونات أو الجزيئات المستهدفة هي الأحماض الدهنية المتعددة عديمة التشبع إذ

يؤدي هذا التفاعل إلى أكسدتها وتكوين مركبات سامة Malondialdehde (MDA)وبذلك يؤدي إلى تدخل آلية الأكسدة اللبيدية،وهي المتسبب الأول في عرقلة التكامل الوظيفي للغشاء الخلوي مما يسبب عرقلة النفاذية الخلوية ومن ثم تؤدي إلى تسرب الإنزيمات الكبدية إلى المجرى الدموي (Suna *et al* ., 2010). وقد يكون نتيجة حدوث خلل كبدي نسجي أو وظيفي من خلال حدوث انخفاض في أهم البروتينات البلازمية وأكثرها تواجدا والذي يعد ناقلا مهماً للعديد من المركبات الداخلية والخارجية والذي يتم تركيبه على مستوى الكبد وهو Albumine والذي يقل تحت تأثير المبيدات العضوية الفسفورية وخاصة مبيد الكلوربيرفوس (Suna *et al* ., 2010) و لم تتفق هذه النتيجة مع (E.M.Tanvir *et al* ., 2015)الذي أكد زيادة في أوزان الكبد المطلقة لإناث الجرذان المعاملة بمبيد الكلوربيرفوس وبجرعة (5.4 ملغم /كغم)عن طريق الفم لمدة 4 أسابيع.وكذلك لاتتفق مع (Tarek M.Heikal *et al* ., 2012)الذي لاحظ وجود ارتفاع في وزن الكبد مقارنة مع مجموعة السيطرة لحيوانات الجرذ الذكور والمعاملة بمبيد الكلوربيرفوس وبجرعة 1/20 من الجرعة القاتلة ولمدة 28 يوماً .وبينت الدراسة الحالية عدم تأثر معدلات أوزان الكلية معنوياً لمجموعة الحقن (1/30)(T1)لمدة 7 أيام مقارنة مع مجموعة السيطرة٠ وكذالك عدم وجود فرق معنوي للمجموعة الثانية مع المجموعة الأولى بمستوى معنوية($p<0.05$) ولمدة 7 أيام .بينما بينت الدراسة أن معدلات الكلية ولمجاميع الحقن الثانيةوالثالثة لمدة 14 يوماً انخفاض معنوي ($p<0.05$) مقارن مع السيطرة وكان الانخفاض معنوياً باحتمالية ($p<0.05$) لمجاميع الحقن كافة للمدة 14 يوماً.باستثناء مجموعة الحقن (1/30)المجموعة ألأولى مقارنة مع السيطرة للفترة 14 يوماً.

و اكد (EL- Deeb,A.E.A *et al* ., 2007) وجود انخفاض في النسبة المئوية لوزن الكلى عند التجريع الفموي للجرذان المعاملة بمبيد الكلوربيرفوس وبجرع 10.5 ملغم /كغم ،0.955 ملغم / كغم واعتمادا على الجرعة القاتلة وبتركيز 0.1 من المبيد بمقدار مرة كل يوم لمدة 3 أشهر . وقد يعزى ذلك إلى تأثير المبيد CPF إذ يسبب المبيد بزيادة مستوى Creatinine وهو مؤشر مهم على حدوث أضرار كلوية وإتلاف في الوظيفة التشريحية والإخراج الأنبوبي.

(Sameeh and Abdel-Tawab. 2010).وقد يسبب الكلوربيرفوس بارتفاع Uree البلازمي إذ يعد ارتفاع الأخير مؤشراً مهماً لهدم البروتيدات ومن ثم إلى انخفاض القيم المصلية لها،وكذلك نتيجة المعاملة بـ CPF يسبب اضطراب في قيم الشوارد على جانبي الغشاء إذ يتسبب في انخفاض مستوى Na+,k- البلازمي وهذا يؤكد استهداف المبيدات العضوية الفسفورية للعضيات الغشائية ومن ثم الإخلال بالتكامل الوظيفي للغشاء مما يؤدي إلى اضطراب خلوي ويعد الغشاء الخلوي أساس التبادلات الخلوية الحيوية ،وهو مايفسر الضرر النسجي الناتج عن تأثير مبيد CPF في أعضاء جسم الكائن الحي (عائشة ، 2011).كما في الشكل(10).بينت الدراسة الحالية عدم وجود فروق معنوية بمستوى احتمالية ($p<0.05$)لوزن الدماغ للمجاميع الأولى والثانية مع مجاميع السيطرة للفترة 7 يوم ولوحظ وجود ارتفاع غير معنوي($p<0.05$) للمجاميع الأولى و الثانية لمدة 14 يوماً مع مجموعة السيطرة. ولوحظ وجود زيادة معنوية($p<0.05$) في وزن الدماغ بين المجموعة الثانية والثالثة لمجاميع الحقن للمدة 14 يوماً مقارنة مع السيطرة(C).وهذا ما اكده (Nahid AKhtar *et al* ., 2009) عند تجريع الجرذان عن طريق الفم (9.6.3) ملغم/ كغم من وزن الجسم بمبيد الكلوربيرفوس وكذلك بينت دراسة (Banan K,AL- Baggou , 2014)إذ لاحظ زيادة الوزن النسبي للدماغ بشكل كبير لكتاكيت الدجاج المعاملة بمبيد الكلوربيرفوس .الذي يفسر عدم وجود فروقات كبيرة في الوزن وتأثرات قليلة في الدماغ ورغم حساسيتة وتوفرالعوامل المساعدة على التقليل من التوتر التأكسدي فيه ،وذلك بسبب تركيب لبيداته الغشائية الغنية بالأحماض الدهنية عديدة عديمة التشبع ،وزيادة استهلاكه للأوكسجين (Bhatti *et al* ., 2010).

4-5 التغيرات النسجية المرضية .

1-4-5 الكبد Liver

لوحظ في نتائج الدراسة الحالية لحيوانات المجموعة الأولى وجود وريد مركزي طبيعي محاط بخلايا كبدية طبيعية بشكل شعاعي مع تنكس قليل و تفجج لمناطق في النسيج الكبدي مع تكاثر الخلايا الكبدية إذ يظهر الانقسام النووي بشكل واضح مع توسع في الجيبانيات الكبدية ، القناة الصفراوية

يظهر فيها احتقان قليل وتظهر طبيعية غير متكاثرة مع احتقان قليل ،وبين الفحص ألمجهري لحيوانات المجموعة الثانية الخلايا الكبدية ، تظهر متفججة مع توسع في الجيبانيات ،احتقان قليل في الوريد المركزي Central vein القناة الصفراوية تظهر طبيعية وغير متكاثرة.وبين الفحص المجهري لكبد حيوانات المجموعة الثالثة ،حدوث احتقان شديد في الوريد المركزي مع فقدان الترتيب الشعاعي للخلايا الكبدية ،الخلايا الكبدية تظهر متفججة مع تنخر واضح فيها إذ تظهر بعض الخلايا خالية من الانوية(متحللة karyolysis) وبعضهاالاخر ذات أنوية متغلضة pyknotic كذلك نلاحظ توسعاً في الجيبانيات الكبدية والقناة الصفراوية فيها فرط تنسج واضح مع احتقان شكل (15)للمدة 7 أيام.اظهر الفحص المجهري لكبد حيوانات المجموعة الثالثة لمدة 14 يوماً احتقاناً واضحاً وفرط تنسج في القناة الصفراوية ،الوريد المركزي يظهر محتقناً مع وجود الترتيب ألشعاعي للخلايا الكبدية التي تظهر متنكسة (degeneration) مع الشكل الانقسامي النووي بشكل واضح مع توسع قليل بالجيبانيات الكبدية مع وجود نزف في نسيج الكبد . ويتفق مع(Muttappa K *et al* ., 2015) حدوث زيادة في خلايا kuffer وتنخر نسيج الكبد وتشكل فجوات مفرط وبجرع قدرت بـ (0.022)جزء من المليون وبتركيز 1/10 1/15 من الجرعة القاتلة ولمدة 7, 14,21 يوماً بمبيد الكلوربيرفوس لاسماك البلطي .وقد تفسر تلك التغيرات بأن الضرر في الخلايا الكبدية قد يكون مرتبطاً مع الإخلال في مستوى الإنزيمات ALT,AST ويعد الكبد غنياً بهذه الإنزيمات وأي تغير فيها يعد دلالة واضحة على حدوث تغيرات مرضية ويعود الاحتقان إلى توسع في الوريد Vasodilation نتيجة مايجدث من فرط الدم Hyperemia وهذه الحالة تعود إلى زيادة نواتج الايض Metabolites مثل (CO2,H+,K+,lactate)والأخيرة ناتجة من عمليات التهديم لأحماض الدهنية و الامينية ،تعمل هذه المواد الناتجة على ارخاء العضلات الملس الموجودة في الوريد وبذلك تسبب توسع الوريد(Aster *et al* ., 2009)وقد يعزى فقد التنظيم الشعاعي للخلايا الكبدية إلى المعاملة بالمواد السامة والتي تؤثر في الهيكل الخلوي Cytoskeleton وبذلك تسبب تغيراً في شكل الخلايا المتقاربة ومعالمها .ومن العوامل المسببة لموت النسيج هي زيادة تركيز بعض العناصر ومنها الكالسيوم داخل الخلايا بسبب خلل في نفاذية الغشاء الخلوي والذي من الممكن يسبب الموت الخلوي وفي دراسة قد يعمل مبيد الأبامكتين على إحداث نزف نسجي يعود إلى فقدان الجسم لوسيلة منع النزف بسبب عمل الإباماكتين على تثبيط عمل بكتريا مسئولة عن تكوين فيتامين K وانتاجه وبالنتيجة عدم تحفيز إنتاج عوامل التخثر Clotting factors أو يكون له تأثير مباشر على الكبد لمنعه من انتاج عوامل التخثر (Campellone,2007). وقد تحدث هذه التغيرات بسبب الإجهاد التأكسدي الذي يحدثه المبيد نتيجة تولد الجذور الحرة حيث أكد (Celik and Suzek, 2008) المعاملة بالمبيد قد قللت مستويات إنزيم GHSفي الأنسجة للحيوانات المعاملة ، وما هو معروف أن الجذو الاوكسجينية تحث على تضرر الأنسجة (Shyamala *et al*.,2003). أن المعاملة لفترة طويلة بالمبيد قد تسبب خلل في وظائف الكبد مثل ارتفاع نسب أنزيمات الكبد في مصل الدم وتغيرات في الشكل للمايتوكوندريا والشبكة البلازمية والأنوية للخلايا الكبدية، أما تحرك خلايا الدم البيض إلى مواقع الضرر خارج مجرى الدم فيؤكد حصول ضرر في الكبد ويفسر تجمع القطيرات الدهنية على حصول ضرر في عمليات ايض الدهون.(Binukumar *et al*., 2010). (Chen, 2012).

2-4-5 الكلية

ظهر في حيوانات المجموعة الأولى ولمدة 7 أيام وجود كبيبات طبيعية مستديرة كبيرة طبيعية مع توسع قليل للنبيبات الكلوية ،النبيبات الملتوية تظهر مبطنة بخلاياعمودية واطئة وطبيعية أظهر الفحص المجهري لكلية الحيوانات في المجموعة الثانية أن هناك توسع النبيبات الملتوية الكلوية مع احتقان في النسيج الكلوي ،الكبيبات تظهرمتوسعة ومستديرة وطبيعية ،الخلايا المبطنة للنبيبات الكلوية تظهر متنكسة ويظهر انسلاخ فيها.

في حين لوحظ تجمع مادة جيلاتينية شفافة (التنكس الزجاجيhyaline degeaeration) مع احتقان واضح ونزف شديد في النسيج الكلوي ،النبيبات الملتوية الكلوية تظهر متوسعة وذات بطانة متحطمة إذ نلاحظ تنكس الخلايا المبطنة لهذة النبيبات.هذاعند الفحص المجهري لنسيج الكلية لحيوانات المجموعة الثالثة.أظهر الفحص المجهري لكلية حيوانات المجموعة الثالثة لمدة 14 يوماً نلاحظ نزف في النسيج الكلوي مع توسع النبيبات الملتوية الكلوية ،الكبيبات تظهر مستديرة وطبيعية ونلاحظ كذلك تنكس الخلايا المبطنة للنبيبات الملتوية . وهذه النتيجة تتفق على ما جاء في دراســـة

(Rekha *et al* ., 2013) حصول تغيرات عند المعاملة بمبيد CPF تغيرات نسجية في الكلى' إذ اظهر انكماش الكبيبات الكلوية وأتساعاً وفرطاً كبيبيين وتضخماً في الخلايا الطلائية وانحطاطاً في الأنابيب الكلوية وزيادة في الأوعية الدموية والتهاب كبيبات الكلية ونخراً انبوبياً حاداً والتهاب الكلية الخلوي .يرجع حدوث الضرر الكلوي إلى الفعل السام والمؤثر لمبيد الكلوربيرفوس ونواتج أيضة إذ أدى إلى انكماش الكبيبة وأتساع أنبوبي ،فرط الكبيبة ،تضخم في الخلايا الطلائية ،كذالك أن ألتأثير السمي المباشر لمبيد الكلوربيرفوس أدى إلى انحطاط الأنابيب الكلوية وتسلل في الخلايا الليمفاوية وزيادة الأوعية الدموية ،نخر أنبوبي حاد ويؤدي إلى التهاب كبيبات الكلية والتهاب الكلية الخلالي مما يؤدي إلى فشل كلوي حاد.(Rekha *et al* ., 2013). يعود ذلك إلى أن المبيدات الفسفورية العضوية تستطيع تحفيز الجهد التأكسدي على مستوى النبيبات الكلوية وتسبب التنخر فيها(Poovala *et al*., 1999) وقد تكون تلك التأثيرات ناتجة عن انخفاض اخذ الماءو قلة تناول الغذاء بسبب المعاملة المستمرة للمبيد، حيث وجد أن التعامل مع السم العصبي(السيرين)يؤدي إلى الفشل الكلوي الحاد المتولد عن قلة الماء والغذاء (Bloch-Shilderman and Levy, 2007).

5- 4 -3 الدماغ Brain

بينت الدراسة الحالية ومن خلال الفحص المجهري لنسيج الدماغ لحيوانات المجموعة الأولى لمدة أيام نلاحظ وجود احتقان قليل في الاوعية الدموية والتي تظهر محاطة بفراغ Vircho-Robin (space)كذلك نلاحظ تكاثر الخلايا النجمية والقليل من الخلايا الدبقية .اظهر الفحص النسيجي لدماغ حيوانات المجموعة الثانية للمدة 7 أيام حدوث نزف واضح في نسيج الدماغ كذالك تكاثر الخلايا النجمية والخلايا البقية مع وجود وذمة دماغية واضحة كذلك نلاحظ التهاباً شديداً في ألأغشية السحائية إذ نلاحظ ارتشاحاً في الخلايا الالتهابية واحتقاناً في طبقة السحايا ،بعض الخلايا العصبية تظهر متنكسة إذ نلاحظ تحول أشكالها الى شكل كروي مع نواة محيطية الموقع وانتشار أجسام نسل داخل الخلية العصبية وهذة الحالة تسمى التحلل الكروماتين المركزي .لوحظ عند فحص حيوانات المجموعة الثالثة ولمدة حقن 7 أيام وجود الوذمة الدماغية (الخزب) ،تكاثر واضح للخلايا النجمية (estrocytosis cell)والخلايا الدبقية (Gliosis cell) و لوحظ تفجج في الخلايا العصبية ،الخلايا العصبية تظهر كروية الشكل والنواة محيطية مع انتشار أجسام نسل داخل الخلية العصبية وجود احتقان مع خثره كبيرة وهذه الحالة تسمى تحلل الكروماتين المركزي .نلاحظ عند فحص دماغ حيوانات المجموعة الثالثة لمدة 14 يوماً احتقان واضح في الأوعية الدموية مع احتقان جزئي لمجال أو فراغ Vircho-Robin space حول الوعاء الدموي وتكاثر الخلايا ألنجميه وألدبقيه مع وجود وذمة في نسيج الدماغ. وتتفق هذة النتيجة مع دراسة (Amirali Solati *et al* ., 2012) إذ تم معاملة مجموعة من الأرانب النيوزيلندية بمبيد الكلوربيرفوس عن طريق الجلد لمدة 28 يوماً وكانت الجرع يومياً بمقدار 400,250,100 ملغم /كغم من وزن الجسم إذ لوحظ تنخر الخلايا العصبية والتهاب الدماغ واحتقان في الأوعية الدموية وتنخر الخلايا العصبية في المخيخ (purkinje cell)وتكاثر الخلايا الدبقية . ويعزى ذلك إلى التأثير السمي لهذه المبيدات ومنها مبيد CPF بأن لها المقدرة على تثبيط الاستيل كولين أستريز (AchE)في الدماغ والأخير مهم في تحليل الاستيل كولين وتؤثر في ظهور اعراض سريريه توسع الأوعية الدموية وانخفاض ضغط الدم وبطء خفقان القلب وتؤثر على الجهاز العصبي وخمول الأجهزة التي تقع تحت تأثير هذا الجهاز(القماز ، 2003).وقد تكون المبيدات العضوية الفسفورية ومنها الكلوربيرفوس سبب في زيادة مستوى MDA النسيجية في الأعضاءجميعها لكن اقلها في الدماغ وبذلك يكون أقل تضررا مقارنة مع بقية أعضاء الجسم (Astiz *et al* .,2009)(Mustafa *et al* ., 2009).

(Theodore et al .,2005)،وقد يفسر قلة تأثير المركبات السامة ومنها المبيدات على الدماغ وخاصة الجهاز العصبي المركزي إلى أن الأخير بما يتمثل بالمخ بوجود الحاجز الدموي المخي (BBB)لذالك يكون هناك فرق آلية هدم السموم بين الجهاز العصبي المركزي(CNS) والأنسجة المحيطة (Peripheral tissues) (عفيفي،2000).وقد يرجع سب تلك التغيرات إلى التجمع المستمر للـ Ach في المفاصل العصبية والذي يؤدي توليد التسمم العصبي وتسبب في خلل في الأعصاب الكولينية في الدماغ وزيادة تحفيز الـmACh (Muscarinic acetylcholine receptor) ويؤدي ذلك إلى تراكم التسمم العصبي وبصورة غير مباشرة إلى حدوث أضرار عصبية ثانوية متمثلة بموت

الخلية العصبية وفقدان الأعصاب في الدماغ (Chen, 2012) ، ويؤدي التعرض المتواصل للـ Ops إلى التأثير على الدماغ ومهامه (kaur &Gill, 2007) أن التعرض لمبيد الداي كلورفس قد يسبب تسمماً غير كوليني بواسطة التغير في بيروكسدة الدهون المتولد بين الاوكسجين والدهون مكوناً الجذور الحرة وبيروكسيدات شبه ثابتة وقلة مضادات الأكسدة الخلوية (Kaur *et al*., 2007) وهذا بدورة يسبب تضرر ببروتينات المايتكوندريا والـDNA والدهون وباقي العضيات وأغشية الخلايا ومحفزا للموت المبرمج وتسبب التنخر في أنسجة الدماغ وهذا يتفق مع دراسة(Susin .S.A *et al*., 1999).

5-5 الدراسة الوراثية .

5-5-1 الانقسام الخلوي للخلايا الجسمية (نخاع العظم)والتشوهات الكروموسومية .

بينت نتائج الدراسة ظهور أنخفاضاً معنوياً في معدلات معامل الانقسام لمجاميع الحقن كافة لمدة 14 يوماً عند مقارنتها بمجاميع السيطرة .ولوحظ عدم وجود فروق معنوية $p<0.05$ بين المجاميع الأولى(T1) والثانية(T2) مع مجاميع السيطرة(C) لمدة 7 أيام وكذالك وجود فرق معنوي بين المجموعة الثالثة(T3) للحقن مقارنة مع مجموعة السيطرة لمدة 7 أيام. إن من أسباب الانخفاض الحاصل في معامل الانقسام (MI) قد تفسر بسبب العرقلة في دورة الخلية والاستقرار في مرحلة G2 بذلك يمنع الخلية من البدء في الانقسام، وقد يفسر أيضا انخفاض (MI) إلى حدوث ارتفاع معدلات لاختلالات الكروموسومية وهذا ما بينته في هذه الدراسة الحالية و دراسات أخرى بينت قدرة المبيدات الفسفورية العضوية في التسبب لتلك الاختلالات ومن ثم يسبب انخفاض معامل الانقسام، ذكر(Madle et al, 1993) قد يكون الانتخاب في الخلايا عند بدء عملية الانقسام الخلوي قد يتسبب في إبعاد تلك الخلايا الحاوية على الاختلالات الكروموسومية وهذا وٌدي إلى خفض معدلات(MI)، وقد يكون السبب المهم هو التأثير الكبير للمبيدات في التداخل مع البروتينات والأنزيمات المهمة بدورة انقسام الخلية والمسب في تثبيط صنع الـDNA وقد يؤثر على تكوين خيوط المغزل أو توجيها أو تجمعها(Hidalgo et al., 1989) إذ أن تقنية استعمال نخاع العظم التي تكون قصيرة الأمد لمعرفة التأثير السمي. أن اغلب المواد المسرطنة أو المطفرة من المبيدات تنتج تأثيراً معاكساً للنظام الإنزيمي في الخلايا منتجاً للطفرة إضافة لذلك حفز المبيدات إنتاج جذور حرة تستنفذ الكلوتاثيون وتثبط عمل خيـــوط المغزل مما يؤدي لخلل في عملية الانقسام واتفقت نتائج الدراسة مع دراسة (EL- Bendary .H.M, 2010) الذي لاحظ قدرة المبيدات وخاصة مبيد الكلوربيرفوس على إحداث ضرر كبير للمادة الوراثية وظهور عديد من الطرز الكروموسومية الشاذة بصورة معنوية مع المجموعة الضابطة وبينت كذلك وجود علاقة خطية موجبة بين التركيز للمادة السامة للمبيد وتكرار التغيرات الكروموسومية .كما أظهرت الدراسة قدرة مبيد الكلوربيرفوس على زيادة تكرار طفرات النويات الصغيرة لخلايا الدم وبمستويات معنوية عالية مقارنة مع المجموعة الضابطة .وكذلك جاءت الدراسة الحالية مماثلة لما توصل إليـــــــــــة (Moustufa A.Abbassy *et al* ., 2005)إذ أكد أن كل المبيدات قد أحدثت نقصاً معنوياً في معدل الانقسام الخلوي وكان مبيد الكلوربيرفوس أكثر المبيدات تأثيراً وزيادة معنوية في كل من الشذوذات الكروموسومية والأنوية الصغيرة في خلايا نخاع العظم للفئران المعالجة وتتفق مع (Pragyan Dubey *et al* ., 2015)إذ تم معاملة بذور الشعير بنوعين من المبيدات ومن ضمنها الكلوربيرفوس وبتراكيز 0.05,0.1,0.5 لمدة 6 ساعات وخلصت نتائج الدراسة إلى أن الكلوربيرفوس كان أكثر تأثيراً في تشوهات وانحرافات في الكروموسومات ومن ثم احتمال أكبر لإحداث السمية الوراثية في بذور الشعير .

وقد يكون السبب ما أوضحتهُ نتائج دراسة العالم(Yin *et al*., 1998) عند قيامة بإضافة المركب التراكلورفورن للخلايا البيضية للفئران (Mouse oocyte cells) إذ بينت نسب عالية من المغازل غير الطبيعية وكثرة الكروموسومات المحاذية لبعضها وقد يكون ذلك هو السبب لرفع نسب الكروموسومات غير المنفصلة وانخفاض المجموعة الكروموسومية ، و إن

(Sun *et al*.,2000) ذكر أن التراكيز العالية من المركب نفسه تستطيع أن تسبب التأثير السلبي في شكل الكروموسومات مع كثرة تغلظها في الخلاياموٴكداً على التأثيرات السمية الخلوية التي يحدثها

المركب بنفسه.كما بينت الدراسة الحالية عدد من التشوهات الكروموسومية مثل ،كروموسوم حلقي،حذف كروماتيد، في الشكل (39) .

2-5-5 التغيرات في معدلات تركيز ومعالم النطف .

بينت الدراسة أن معدلات إعداد النطف أقل معنوية ($p<0.05$)لمجامع الحقن كافة لمدة 7 أيام مقارنة مع مجموعة السيطرة ولوحظ عدم وجود فروق معنوية بين المجاميع الثانية(T2) والثالثة (T3)لمدة 7 أيام .كذالك لوحظ انخفاض معنوي ($p<0.05$)في معدلات أعداد النطف ولمجاميع الحقن كافة لمدة 14 يوماً . إن عملية تكوين النطف تحتاج إلى تداخل العديد من الهرمونات سواء ما يخلق ويفرز من الفص الأمامي للغدة النخامية كهرموني FSH و LH أو ماتفرزه الخصى كهرمون التستوستيرون(Pineda & Dooley, 2003).وقد يفسر هذا الانخفاض في تركيز النطف إلى الانخفاض الحاصل بمستوى هرمون التستوستيرون الذي له الدور الكبير في عملية تكوين النطف وانقسام الخلايا الجرثومية في الخصى (guyton & Hall , 2001) وللهرمون المحفز للجريب FSHدور مهم من خلال التأثير على خلايا سرتولي في الخصى حيث يزيد من عملية تكوين النطف (Huang *et al.* , 1991). وما هو معروف أن مستقبلات هرمون FSH تقع على أغشية خلايا سرتولي والخلايا الجرثومية الذكرية . وكذلك يزيد من مستقبلات الهرمون اللوتيني(LH) الموجوده على أغشية خلايا لايدك وبذلك يرفع من تأثير هذا الهرمون (Simoni *et al* .,1997). وقد ذكر(T.K.Mandal & N.S.Das ,2012) إن التعرض إلى المركبات العضوية الفسفورية ومنها الكلوربيرفوس يؤدي إلى انخفاض هرمون التستوستيرون و إنخفاض تركيز هرمون الـ LH,FSH في الجرذان. وهذا مايفسر أن لهذه المركبات تأثيراً على عملية تكوين النطف إذ يؤثرعلى مستوى هرمونات الغدة النخامية ومنها المحرضة للقند(ICSH,FSH) . وقد يكون سبب هذا الانخفاض هو تأثير أحد المبيد على عملية تكوين النطف من خلال تأثيره على طلائع النطف حيث تعد هدفاً مباشراً له

(Pina Guman *et al.*,2005) .وأوضحت الدراسة إن معدلات النسب المئوية لحركة النطف ومعدلات النسب المئوية للنطف السوية ولمجاميع الحقن كافة لمدة 14 يوماً أقل معنوياً ($P<0.05$)عند مقارنتها مع مجموعة السيطرة .و أن معدلات النسب المئوية لحيوية النطف لم تتأثر معنويا في مجموعة الحقن (1/30) لمدة 7 أيام عند مقارنتها بالسيطرة.وبينت النتائج أن معدلات النسب المئوية لحيوية النطف للمجاميع المعاملة بالحقن (1/20) لمدة 7 أيام أظهرت انخفاضاً معنوياً ($P<0.05$) مقارنة مع مجموعة السيطرة .وبينت الدراسة انخفاض معنوي ($P<0.05$)لمعدلات النسب المئوية لحيوية وحركة ومعدلات النسب المئوية للنطف السوية ولمجاميع الحقن كافة لمدة 14 .وقد يفسر ذلك إلى تغير التركيب الكروماتيني الذي يسببه المبيد للنطف (Pina – Guzman *et al.*,2005) . إذ لوحظ إن التغير في التركيب الكروماتيني يؤدي إلى إحداث تغيرات نوعية في النطف تشتمل على حيوية النطف وحركتها إضافة إلى تغيرات مظهرية تشمل شكل النطفة (Evenson & Jost ,2000) ، و لا يستبعد تأثير المبيد على عمليات الأيض للنطفة التي ينتج عنها انخفاض في جزيئات الادنوسين ثلاثي الفوسفات ATP التي تعد مصدراً للطاقة اللازمة لحركة النطفة وهذا يتفق مع(Dikshith *et al*.,1975) إن حقن ذكور الجرذان بجرعة مفردة من الديازينون (21.6 ملغم / كغم من وزن الجسم) داخل غشاء الخلب إدت إلى تثبيط إنزيم Succinic dehydrogenase الذي يعد ضروري لإتمام دورة الحامض الثلاثي الكاربوكسيل Krebs cycle .ومما يجدر ذكره تأثر حركة النطف بنشاط إنزيم AchE فقد لاحظ (Sastry et al, 1981)) احتواء حيامن الانسان على إنزيم الـ AchE الذي يفرز في منطقة ذيل النطفة حيث يلعب دوراً مؤثراً في حركة النطفة ومن ثم فإن تثبيط نشاط هذا الإنزيم ربما سيؤدي بدوره إلى تثبيط حركة النطف.وهذا يتفق مع دراسة (Sursh Cjoshi *et al* ., 2007)إذ جرعت مجموعة من الجرذان مبيد الكلوربيرفوس بجرع 17.5,12.5,7.5 ملغم /كغم من وزن الجسم لمدة 30 يوم وأظهرت النتائج انخفاضاً كبيراً في نشاط الخصيتين وانخفاضاً في عدد الحيوانات المنوية وانخفاضاً في تركيز هرمون التستوستيرون في الدم وهذا يتفق مع (Kolawole Victor olorunshola *et al* ., 2011)إذ لاحظ تغييراً معنوياً $p<0.05$ في تركيز الحيامن وحركتها وتغير تركيز هرمون التستوستيرون في الدم من خلال تجريع مجموعة من الجرذان

بجرع 16.3,32.6 ملغم /كغم من وزن الجسم من مبيد الكلوربيرفوس وتتفق نتائج الدراسة الحالية مع (Nour EL.ll, 2009)إذ جرعت مبيدات عضوية فسفورية ومن ضمنها مبيد الكلوربيرفوس – مثيل ولوحظ انخفاض في عدد الحيوانات المنوية وزيادة في عدد الحيوانات المنوية غير الطبيعية في الشكل وانخفاض حركة الحيوانات المنوية وانخفاض هرمون التستوستيرون المصل وفي المجموعات المعاملة كلها ان التعرض للمبيدات ومن ضمنها الكلوربيرفوس أحدث زيادة معنوية في النسبة المئوية لمجموع التشوهات في الخلايا الأولية المكونة للحيوانات المنوية في الخصية.
(Moustafa A.Abbassy *et al* ., 2005). وهذا يتفق مع (EL-Mazoudy,Reda H , 2011)إذ جرعت الحيوانات الفئران بمبيد الكلوربيرفوس وبجرع 9 ملغم /كغم من وزن الجسم لمدة 70 يوم وكان التأثير واضح حول نقص الحيوانات المنوية وقلة حركتها وزيادة كبيرة في وجود حيوانات منوية مشوهه (غير طبيعية).

6-5 الدراسة الجزيئية .

بينت الدراسة وبعد استخلاص الدنا الجينومي للـ DNA للأعضاء المدروسة وتنقية الـ DNA والتأكدمن وجود من خلال الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز وباستعمال تقنية SSCP (طريقة التشكل الموافق للخيط المفرد) حدوث طفرة وراثية في جين Nephrin promoter gene وكما موضح في الشكل (45) . وقد يكون ذالك بسبب تكوين الجذور الحرة ROS و MDA تؤدي إلى حدوث وتقدم حالات التسرطن ، والزيادة في تركيبها يسبب في أضرار خلوية وجزيئية مسببة طفرات في الجينات المثبطة للأورام أو الجينات التي تتحكم في الإنزيمات المضادة للأكسدة (Anugya *et al* 2009,.). تؤدي المبيدات العضوية الفسفورية أو المبيدات بصورة عامة دوراً مهماً بواسطة سميتها الجينية وقد يكون بطريقة مباشرة وذلك من خلال تحفيز أيضي مسببا عن وسائط محبة للالكترونات Electrophiles وتصبح قادرة على التداخل مع الأحماض النووية ،وقد تؤثر بآلية أخرى غير مباشرة كالتوتر التأكسدي ،ويثبط مابين الخلايا من اتصال ،وقد يولد بعض المستقبلات النشطة ،كما تبين أن عدة مبيدات عضوية فسفورية قادرة على إحداث طفرات في الفئران إذ تكون قادرة على تغيير في تتابع DNA ،كسر في DNA وقد يفسر النشاط الذي يحدث الطفرة للمبيدات هو وجود مواقع محبة للالكترونات للجزيئة الأصلية أو الأم وقد تكون تلك المواقع موجودة في النواتج الايضية للجزيئة الأم وهي قادرة على تكوين روابط مع Nucleophilic sites لكثير من المركبات (ismail & huseyin,2008)،

(possamai et al., 2010).للمبيدات نواتج أوكسجينية تعد أكثر سمية من المركبات الأم (لطرش ،2011) وهذه النواتج الايضية التنشيطية لمعظم المبيدات (oxon,paraxon)وتصبح قادرة على بناء روابط مع القواعد الازوتية والتي تسبب الطفرات الجينية وتعتبر الجذور الحرة من المسببات عن طريق الاتصال المباشر مع الأحماض والقواعد الأزوتية وتسبب في تشوهات مورفولوجية للـ DNA وقد يكون لها طريق اخر إذ تتداخل في مختلف المسارات الأيضية المهمة في استقرار وعمل الجزيئات الجينية .

1-6 الاستنتاجات Conclusions

1- أن الكلوربيرفوس مبيد ذو سمية مؤثرة أدى إلى ظهور أعراض مرضية مثل الضعف العام وتهيج العين وضعف عضلي وتهيج المجاري التنفسية وأحياننا يؤدي إلى غيبوبة .

2- حصول تغيرفي الوزن العام للجسم وكذالك الوزن والوزن النسبي (الكبد،الكلية، الدماغ).

3- احدث تغيرات نسجية كبيرة وبالغة في أنسجة الكبد،الكلية، الدماغ.

4- حصول انخفاض في تركيز النطف وارتفاع نسبة النطف الميتة وحدوث تشوهات وتغيرات (معالم النطف)مثل حيوية وحركة النطف.

5- انخفاض في معدل الانقسام الخلوي(الخلايا الجسمية) في خلايا نقي العظم وحدوث تشوهات كروموسومية متعددة.

6- حدوث طفرات وراثية في(Nephrin promoter gene) أحد جينات الـ DNA الكبد ،الكلية والدماغ .

2-6 التوصيات Recommendations:

1- دراسة التأثير السمي للكلوربيرفوس على الجهاز العضلي والجهاز التكاثري الأنثوي والجهاز الهضمي والجلد والغدد في الجسم .

2- دراسة تأثير المبيد على التكوين الجنيني كون المبيد قد يكون عاملاً مشوهاً.

3- دراسة تأثير المبيد على الأسماك والطيور.

4- توفير ترياق مناسب لتقليل الفعل السمي للكلوربيرفوس .

5- توعية أصحاب المزارع والبساتين بضرورة التقيد بنشرات الاستعمال والتقيد بها .

6- الفحص الدوري للعاملين في أنتاج هذه المبيدات وكذلك فحص المزارعين عند استعمالهم للمبيد .

7- توعية أصحاب البساتين بغسل الفواكه والخضر المعاملة بالمبيد ومعرفتهم ببقايا المبيد على الفواكه.

8- توعية أصحاب المنازل والمباني الإنشائية بضرورة التقيد باستعمال المبيد لمكافحة حشرة الأرضة كونه بتماس مباشر مع الأطفال والأمهات الحوامل.

9- استعمال المكافحة البايلوجية لمكافحة الآفات الزراعية والوقاية منها .

10 – محاولة تغيير الصيغة الكيميائية للمبيد لتكون أكثر أمناً.

المصادر العربية

- بيومي ،علاء الدين ،الحميد،زيدان هندي عبد،الخطيب ،الحسيني ،زيادة،ريم محمد.(2003).التقويم الكيميائي الحيوي للنقل المشيمي لجرعة منفردة عن طريق الفم لمبيد الكلوربيرفوس-ميثيل والمثيوميل في الفئران الحوامل .المؤتمر العربي الثامن للعلوم وقاية النبات . البيضاء .ليبيا.ص81A .
- التميمي ، وجدان ثامر مهدي (1996).بعض التأثيرات النسيجية والوراثية للرصاص على التكاثر في الفأر الأبيض.كلية التربية –جامعة القادسية .ص66 .
- ج .ك ،(2009).المبيدات الفسفورية العضوية لاتزال شائعة في الضفة الغربية وقطاع غزة.آفاق البيئة والتنمية،17 .1/7. http://www.maan-ctr.org/magazine/Archive/Issue17/Alrased/index.htm#1
- جاويش ،شفاء،قباقيبي،محمد ماهر ،الخطيب ،سحر(2012). مجلة جامعة دمشق للعلوم الاساسية .المجلد 28 العدد2 ص 518-497 .
- جورج وير(2003)مبيدات الآفات ،النشر العلمي والمطابع – جامعة الملك سعود.ص ب .68953 . 624 ص.
- الخزاعي ،حسين صباح حسين .(2013)التغيرات المرضية النسجية والفسلجية لمبيد الابامكتين في ذكور الجرذان البيض.كلية العلوم .جامعة القادسية.ص81 .
- الراوي ، خاشع محمود (2000) . المدخل الى الاحصاء ،الطبعة الثانية كلية الزراعة والغابات ، جامعة الموصل .
- سابا،ميشيل.(2015)دراسة السمية الحادة للمبيد الحشري كلوربيرفوس chlorpyrifos على ثلاث أنواع من متفرعات القرون cladocerans .مجلةجامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية .سلسلة العلوم البيولوجية.المجلد37 . العدد لعدد 1.
- شعبان،عواد ،الملاح،نزارمصطفى.(1993).المبيدات .جامعة الموصل.دارالكتبللطباعة والنشر. 520 .ص81 .
- العامري،سلام عباس حسن .(2004).التقدير الآني للمبيدات العضوية الفسفورية دورسبان،ديازنون و ملاثيون في عينات بيئية باستعمال الراتنج Amberlite XAD-2وتقنية كروماتوغرافيا الغاز.كلية العلوم .جامعة بغداد.
- عائشة،لطرش.(2011).دراسة الدور الوقائي لكل من فيتامين E وبعض المستخلصات النباتية أتجاة سمية المبيد الكلوربيرفوس .كلية العلوم الطبيعية والحياة.جامعة منتوري . الجزائر.

- عبد الخالق، علاء الدين .(2005).سمية المبيدات والمعادن . الطبعة الأولى.دار النشرللجامعات .القاهرة .مصر.
- العتابي،محمد رجي شبل،(2006). تأثير الديازينون في بعض معايير الكفاءة التناسلية لذكور الفئران البالغة.كلية الطب البيطري .جامعة بغداد.
- عجام ، إسماعيل كاظم والسعدي ،حسين عبد الكريم والحكيم ،مرتضى كمال .(1989).فسلجة التناسل والتلقيح الاصطناعي .الطبعة الثانية ،وزارة التعليم العالي والبحث العلمي – جامعة بغداد .
- العريشي،ندى حسن علي .(2005).دراسة مفردة ومشتركة للسمية الوراثية للكلوربيرفوس والكيورستين في فطر خميرة الخباز السلالةD7 .جامعة الملك عبد العزيز.
- عفيفي ،فتحي عبد العزيز .2000 .التلوث البيئي والسموم الديناميكيةو استجابة الجهاز العصبي لهما.الطبعة الأولى .دار الفجر للنشر والتوزيع.ص -507.

- علوم وتكنولوجيا(2012) مبيد كلوربيرفوس يغير تلافيف المخ لدى الأطفال .مجلة بروسيد نجز-الأكاديمية الأمريكية للعلوم - جامعة كولومبيا - ص 3-1 http://www.dw.com/ar/
- القماز ،سميرغازي .(2003).علم السموم .الطبعة الاولى .دارصفاء للنشر والتوزيع.
- القيسي ، بشرى إبراهيم مصطفى (2000) . التغايرات المرضية والخلوية الوراثية في اسماك الكارب الاعتيادي والجرذان البيض الناجمة عن تأثير السمي لمبيد السومسدين ومتبقيته . دكتوراه ، كلية الطب البيطري أطروحة ، جامعة بغداد صفحة. 209 .

- مجلة الكترونية سيدة الأمارات (2015). الحشرات .مبيد الحشرات خطر على النمو الدماغي للاطفال ص 43-1 (http://Sayidet.el-emarat.com)
- مجيد ،مجدي فيصل،جاسم ،نوفل حمادي.(2008).دراسة بعض التأثيرات الفسلجية والنسيجية للاعضاء الداخلية للفئران المختبرية بعد التعرض للمبيد الحشري الكلوروفوس..Bas.j.vet.Res .المجلد 7. العدد2 . كاطع ،فارس شاكر،حسين،مصطفى عبد المجيد،المالكي ،سامي جبر.(2007).دراسة بعض التغيرات الكيموحيوية في مصل ذكور الفئران المختبرية *Mus musculus L* المعاملة بمبيد الدايكلورفوس.مجلة أبحاث البصرة(العلميات) .33 .2 . 42-37 .

المصادر الانكليزية

- **Anupama ojha, Santosh Kumar yaduvanshi,Satish chnadra pant,Vinay Lomash and Nalini Srivastava.(2011).Evaluation of DNA damage and cytotxicity induced by three commonly used organophosphate pesticicdes individually and in mixture in rat tissues,Environmental Toxicology.volume 28.lssue 10.page 543-552.**
- **Allen, J. W. , Shuler, C. F., Menders, R. W. and Latt, S. A. (1977). A simplified technique for *In* vivo analysis of sister chromatid exchange using 5-bromodeoxyuridine tablets . *J Cytogen , 18* :231-237.**
- **Astiz M, Maia J.T, . Carlos, A M (2009).The impact of simultaneous intoxication with agrochemicals on the antioxidant defense system in rat. Pesticide Biochemistry and Physiology 94 93–99.**
- **Allister Vale & Marcello Lotti(2015),Organophosphorus and carbamate insecticide poisoning.Handb Clin Neurol.131.149-68.**
- **Amirali Solati,Abbas.Tavasoly,Mohammad Kazem,Seid Hosein Marjanmehr & Babek Rezvajoo.(2012).effects of dermal exposure to chlorpyrifos on Liver and Brain structures and biochemical parameters in rabbits.comparative clinical pathology.21.6.pp 1211-1217.**
- **Aungya. M,Radhey S. V , Nalini. S. (2009) Chlorpyrifos induced alterations in the levels of hydrogen peroxide, nitrate and nitrite in rat brain and liver.Pesticide Biochemistry and Physiology 94 (2009) 55–59.**
- **Amira Mahjoub-Samet,Hamadi Fetoui,Kamel Jamoussi,Khansa Chaabouni, Feriel Ellouze,Fadhel Guermazi and Najiba Zeghal.(2005). of chlorpyrifos on cerebrum and cerebellum maturity in rats.Toxicological Impact & Environmental Chemistry .volume 87. Lssue 4.**
- **AL-Rubae, A.Y.(2001).Production of antibodies against I-Naphthol ,the magor metabolite of the insecticide carbaryl .Ibn AL-Haitham journal.for pure and app.Sc.14.2.pp28-37.**
- **Amina T.Farag,Amany H.Radwan,Fardous Sorour,Ahmed El Okazy,El-Sayed El-Agamy and Abd El-Khaliek El-Sebae.(2010).Chlorpyrifos induced reproductive toxicity in male mice.Reproductive Toxicology.29.1.80-85.**
- **Amina T Farag,Ahmed M El-Okazy and Ahmed F El-Aswed .(2003).Developmental toxicity study of chlorpyrifos in rats.Reproductive Toxicology.vol.17.lss.2.p 203-208.**
- **Anita Bhatnagar,Abhay Singh Yadav and Navneet cheema.(2016).Genotoxic Effect of Chlorpyrifos in Freshwater Fish Cirrhinus mrigala Using Micronucleus Assay.Advances in biology.vol.2016.p6.**

- **A.Goel,D.P.Chauhan and D.K.Dhawan.(2000).Protective effects of zinc in chlorpyrifos induced hepatotxicity.Biological of trace Element Research..74.2 .pp171-183.**
- **Aster,Jon;Kumar,Vinay;Abbas,Abul,K and Fausto ,Nelson(2009). Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease .Philadelphia: Saunders .p.113.ISBN 1-4160-312-9.**

Binukumar, B. K. and Gill, k. D. (2010).Cellular & molecular mechanisms of dichlorvos on neurotoxicity: cholinergic, non cholinergic, cell signaling, gene expression & therapeutic aspects .*Indian Exp Bio*, 48: 697-709

Bloch-Shilderman, E. Levy, A. (2007).Transient and reversible nephrotoxicity of sarin in rats. *J.* Appl Toxicol, 27: 189–194.

- **Baha.O,Mehmet.G,Hilmi.D,Meltem.O,Seren.G,Gulnur.T,Tamer M & Irfan A.(2006).Endometrial damage and apoptosis in rats induced by dichlorvos and ameliorating effect of antioxidant ,vitamins E and C ,Reproduction Toxicology. 22.pp 783-790.**
- **Bhatti. G K, Kiran. R, & Sandhir, R. (2010).Modulation of ethion-induced hepatotoxicity and oxidative stress by vitamin E supplementation in male Wistar rats. Pesticide Biochemistry and Physiology 98 26–32.**
- **Banan K.AL-Baggou(2014).Subacute cholinesterase inhibition and behavioral effect of chlorpyrifos experimentally supplied via drinking water in chicks.Human &Veterinary Medicine In .ju.of the Bioflux Society.6.2.pp70.**
- **Bangeppagari Manjunatha and Gundala Harold Philip.(2015).Histopathological alteration in liver anatomy after exposure to chlorpyrifos in zebrafish(Danio rerio).Scholars Research Library .7.7.pp191-197.**
- **Banerjee B.D,Koner B.C ,Pasha S.T and Ray,A.(1999).The influence of various factors on immune toxicity assessment of pesticide chemicals.Toxicology letters.107.pp 21-31.**
- **Benzidane C & Dahamna S.(2013).Chlorpyrifos residues in food plant in the region of steif Algeria.Communications in Agricultural and Applical Biological Sciences.78.2.pp157-160.**
- **Cruickshank. R., Duguid, J. P., Mormion, B. P. and Swain, R. H. A., (1975). Medical Microbiology, Vol. 2, 12th edn. Edinburgh: Churchil Living Stone.**
- **Chen, y.(2012). Organophosphate-induced brain damage: Mechanisms, neuropsychiatric and neurological consequences, and potential therapeutic strategies. Neuro Toxicol, 33 : 391–400.**
- **Campellone ,Joseph V.(2007).Medline Plus.Archived form the original on 13 October 2007.http://www .nl,.nih,gov,medline plus,ency,article,003188.htm.Retrieved 2007-10-02.**
- **Celik I, Suzek H. (2008). Effects of sub acute exposure to dichlorvos at sublethal dosages on erythrocyte and tissue antioxidant defense systems and lipid peroxidation in rats, Fd Chem Toxico, 46: 2796–2801.**

- **Claudia Bolognesi(2001).Genotoxicty of pesticides : areview of human biomonitoring studies.Reviews in Mutation Research.543.3.pp 251-272.**
- **Chuiko, G. M. (2000). Comparative study of acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase in brain and serum of several freshwater fish : specific activities and in vitro inhibition by DDVP , an organophosphorus pesticide. *Comp. Biochem Physio C Toxicol Pharmacol, 127*: 233 - 42**
- **Dikshith T.S, Behari, J. R. , Datta , K. K. and Mathur, A. K .(1975). Effect of diazinon in male rats. Histopathological and biochemical studies. Environ. Physiol. Biochem. 5(5): 9-29.**
- **Dahamna S ,Sekfali N &Walker Ch.(2004).Biochemical indicators of hepatotoxic effects of pesticides .Commun Agric Appl Sci.69.4.821-8.**
- **Dean, J.H, Murray,M.J and Word ,E.C.(1986).Toxic responses of the immune system .In: Klaassen.C.D.;Amdur, M.O. and John basic science of poisons.Macmillan Publishing Company ,New York: 245-285.**
- **Daoud Ali N.S. Nagpure,Sudhir Kumar,Ravindra Kumar,B. Kushwaha and W .S Lakra.(2009).Assessmeny of genotoxic and mutagenic effects of chlorpyrifos in freshwater fish Channa punctatus (Bloch)using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis . Food Chemical Toxicology.47.3.pp.650-656.**
- **Evenson ,D.P. and Jost ,L.K. (2000). Sperm chromatin structure assay for fertility assessment . Methods Cell Sci. 22:230-232.**
- **EL-Deeb,A.E.A,Abd EL-Aleem.I.M.& Sherin.S.Ghaleb(2007). Harmful effect of some insecticides on vital parameters of Albino Rats.J.Egypt.soc.Toxical.36.pp53-60.**
- **Ezzi L.Belhadj Salah I,Haouas Z, Sakly A.Grissa I,Chakroun S,Kerkeni E,Hassine M,Mehid M &Cheikh H.(2016). Histopathological and genotoxic effectsof chlorpyrifos in rats. Environmental science and pollution research.23.5.pp4859-4867.**
- **El-Bendary,HM.(2010).Genotoxic and probable mutagenic effects of some pesticides on mice bone marrow cells ,Egyption Universities Libraries consortium.1.9.pp681-696.**
- **Eskenazi, B. & Bradman, A. (1999). Longitudinal investigation of pesticide and allergen exposures to children living in agricultural communities in California, in: Eskenazi, B.; Bradman, A. & Castorina, R. Exposures of children to organophosphate pesticides and their adverse health effects. Environ. Health perspect, 107:409-419.**
- **EM Tanvir,R Afroz,MAZ Chowdhury ,SH Gan,N Karim,MN isiam and Ml Khalil.(2015).Amodel of chlorpyrifos distribution and its biochemical effects on the liver and kidneys of rats.Human & Experimental Toxicology.jou.SAGE.**
- **El-Mazoudy and Reda H .(2011).Reproductive toxicity induced by chlorpyrifos in male rate.Egyptian Universities libraries Consortium.25.pp 129-157.**

- **Fanta E ,Rios F .S,Romo,S Vianna ,A.C.C,Freiberg S(2003).,Histopathology of the fish Corydorapaleatus contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food .Ecoloxicology and Environmental Safety ,54,119-130.**
- **Guyton , A .C. and Hall , J.E. (2001).Text book of Medical Physiology . 1st ed. Guyton , A .C. and Hall , J.E (eds.) .A Harcourt publisher International company , Philadelphia- London –Toronto Montreal-Sydney-Tokyo .Chapter (80), pp:1003-1015.**
- **Huang .H. F, Pogach L. M. , Nathan. E, Gigilo ,w. and Seebode ,J.J.(1991).Synergistic effect of FSH and testosterone upon the maintenance of spermatogenesis in hypophysectomized rats :relationship with androgen binding protein status . Endocrinology , 128:3152-3.**
- **Hidalgo, A. Gonzalez-Reyes, J.A. Navas, P.& Garcia-Herdugo, G. (1989) Abnormal mitosis and growth inhibition in allium cepa roots induced by propham and chlorpropham. *Cytobios*, *57*:7–14.**
- **Hinting ,A.(1989). Methods of semen analysis .In Assessment of human SPERM Fertilizing Ability. Ph. D. thesis by Hinting ,A. ,University of Michigan State.**
- **Humason, G. (1997). Humason animal tissue techniques. 5th ed. London.**
- **Hui-Ping Wang,Yu-Jie Liang,Ding-Xin Long,Jia-Xiang Chen,Wei-Yuan Hou and Yi-Jun Wu.(2009).Metabolic profiles of serum from Rats after Subchronic Exposure to Chlorpyrifos and carbaryl.Chemical Research in Toxicology..22.6.pp 1026-1033.**
- **Ismail C and Huseyin S.(2008).The hematological effects of methyl parathion in rats.Journal of Hazardous Materials 153.pp1117-1121.**
- **International Union of Pure and applied chemistry.(2015). Chlorpyrifos .https.//en.wikipedia.org/wiki/chlorpyrifos.**
- **J.P.Giesy and K.R.Solomon(2014).Reviews of Environmental contamination and Toxicology .Ecological Risk assessment for chlorpyrifos in terrestrial and aquatic systems in the united states .231.Doi 10.1007/ 978- 3-319-03865-0.**
- **Kumari Nishi and Swamdeep Sing Hundal.(2013).Chlorpyrifos induced toxicity in reproductive organs of female Wistar rats.Food and Chemical Toxicology.62.pp 732-738.**
- **Kamilia Badrakhan Abad elaziz ,Aida Ibrahim EL Makawy ,Ali zain EL-Abidin Abd ELsalam & Ahmed Mohamed Darwish.(2010).Genotoxicity of chlorpyrifos and the Antimutagenic Role of lettuce leaves in male mice .Comunicata Scientiae.1.2.**
- **Kolawole Victor Olorunshola ,L.N.Achie and ,M.L.AKpomiemie.(2011).Ascobic Acid Ameliorates Toxic Effects of Chlopyrifos on Testicular Functions of Albino Rats.British Journal of Pharmacology and Toxicology .2.5.pp 262-269.**
- **Kaur. P, Radotra. B, Minz. R. W. & Gill, K. D. (2007). Impaired mitochondrial energy metabolism and neuronal apoptotic cell death**

after chronic dichlorvos (OP) exposure in rat brain. Neurotoxicol, 28(6):1208-19.

- **Maria Teresa Munoz-Quezada,Boris A .Lucero,Dana B.Ban,Kyle Steenland,Karen Levy,P.B any,Veronica Lglesias,Sergio Alvarado,Carlos Concha ,Evelyn Rojas and Catalina Vega.(2013).Neurodevelopmental effects in children associated with exposure to organophosphate pesticides.Neuro Toxicology.39.pp 158-168.**
- **McCollister .S.B.,R J Kociba,C.G Humiston ,D.D McCollister and p j Gehring(1974).study of the acute and long –term oral toxicityof chlorpyrifos food Cosmet.Toxicol.12:45-61.**
- **Madle, S.; Beek, B. &Nowak, C. (1993).Zum verstanais von chromosomen –mutationest an somezellaen In Fahring R(ed).mutation forschung und genetische :toxikologie wissnescha ftliche buchgeses lscchaft:dramstat,germany.**
- **Mustafa. C ,Ahmet. B , Mehmet .E .B , Fatih. A , Lacine ,T. (2009). Protective roles of vitamin E (a-tocopherol), selenium and vitamin E plus selenium in organophosphate toxicity in vivo: A comparative study. Pesticide Biochemistry and Physiology . 96 113–118.**
- **Moustafa A.A bbassy,A.H.Belal,M.A.EL-Seehy and A.H.Mossa. (2005). IN vivo Genotoxic Effects of Two Organophosphorus and one carbamate insecticides on white albino rats.J.Agric .& Env.Sci.Alex.Univ.,Egypt.**
- **Muttapa K,Reddy .H.R.V,padmanabha.A,Shridhar Bhatt, Prabhdeva.k.n,Basavarajh.y,Gangadhar Gowda,Rajanna..K.B and Chethan.N(2015).Chlorpyrifos induced Histoloical changes in the liver of TILapia (oreochromis mossambicus).).Inter.Jou.of Recent Sci.Res.6.8.pp5819-5823.**
- **Nahid Akhtar,M.K.Srivastav and R.B.Raizada.(2009).Assessment of chlorpyrifos toxicity on certain organs in rat,Rattus norvegicus.Journal of Environmental Biology.30.6.pp 1047-1053.**
- **National pesticide Information Center. (2011).chlorpyrifos Technical Fact Sheet .**
- **NPIC.(2011).Chlopyrifos Technical Fact Sheet.Enviromental protection Agency s webpage.npic @ace.orst.edu.**
- **Nadd .R.B,Johnson.K.A and Klaine.S.J.(2000).Response of *Daphnia* magna to pulsed exposures of chlorpyrifos .Environmental Toxicology and Chemistry.19.2.pp 423-431.**
- **Nour EL-Hoda A.Zidan.(2009).Evaluation of the Reproductive Toxicity of chlorpyrifos-methyl,diazinon and profenofos pesticides in Male Rats .Int.Jour.of pharmacology .5.1.pp51-57.**
- **Orita.M,Iwahana.H,Kanazawa .H,Hayashi.K & Sekiya .T(1989).Detection of 200 polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation 201 polymorphisms .proc.Natl.Acad.Sci.USA.86.PP2766-2770.**

- **Piperakis, S.M., Kontogianni, K., Piperakis, M.M. & Tsilimigaki, S. (2006). Effects of Pesticides on Occupationally Exposed Humans, *The* Scientif World J, *6*: 1211- 1220.**
- **Pragyan Dubey ,Amit Kumar Mishra,Pratiksha Shukia and Ashok Kumar Singh.(2015).Differential sensitivity of barley (Hordeum vulgareL.)to chlorpyrifos and Propiconazole:Morphology,cytogenetic assay and photosynthetic pigments.pesticide Biochemistry and Physiology.pp 1-8.**
- **Poovala. V.S, Huang. H. ,Salahudeen. A.K. (1999). Role of reactive oxygen metabolites in organophosphate-bidrin-induced renal tubular cytotoxicity, *J Am Soc* Nephrol, *10* :1746–1752.**
- **Pina-Guzman B, Solis-Heredia M.J, and Quintanilla-Vega, B.(2005). Diazinon alters sperm chromatin structure in mice by phosphorylating nuclear protamines. Toxicol. Appl. Pharmacol. 202(2): 98-189.**
- **Possamai F.P,Fortunato J.J,Feier G,Agostinho.F.R, Quevedo J,Wilhelm Filho.D and Dal-Pizzol .F.(2010).Oxidativ stre s after s acute and sub-chronic malathion intoxication in Wistar rats.Environmental Toxicology and Pharmacology .23.pp 198-204.**
- **Pragyan Dubey ,Amit Kumar Mishra ,Pratiksha Shukia &Ashok Kumar Singh.(2015).Differential sensitivity of barley (Hordeum vulgare L.)to Chlorpyrifos and propiconazole :Morphology,cytogenetic assay and photosynthetic pigments.pesticide Biochemistry and physiology.124.pp 1-8.**
- **Pineda, M.H. & Dooley ,M. P. (2003). McDonald's Veterinary Endocrinology and Reproduction . 5 th ed. Iowa State Press. A Blackwell Publishing Company . pp. 17-32 ;239-256.**
- **Rodriguez-Fuentes G,Rubbio-Escalante FJ,Norena-Barroso E,Escalante-Herrera KS & SchlenkD.(2015).impacts of oxidative stress on acetylcholinesterase transcription,and activity in embryos of zebrafish (danio rerio)following chlorpyrifos exposure.Europe PubMed Central .Comparative Biochemistry and physiology Toxicology & pharmacology.pp172-173:19-25.**
- **Radhey. S, Verma, A .M, Nalini, S.(2007) In vivo chlorpyrifos induced oxidative stress: Attenuation by antioxidant vitamins Pesticide Biochemistry and Physiology 88 191–196**
- **Rekha ,Sunanda and Sajad Hamid.(2013).Histopathological effects of pesticide -cholopyrifos on kidney in albino rats.Int J Res Med Sci.1.4.pp 465-475.**
- **Sun F. Y, Schmid T. E, Schmid E, Baumgartner, A.& Adler, I.-D. (2000).Trichlorfon induces spindle disturbances in V79 cells and aneuploidy in male mouse germ cells. Muta ,*15*: 17-24.**
- **Sameeh A. M & Abdel-Tawab, H. Mossa. (2009).Lipid peroxidation and oxidative stress in rat erythrocytes induced by chlorpyrifos and the protective effect of zinc. Pesticide Biochemistry and Physiology 93 34–39.**

- **Sambrook.j & Russell.D.W(2001)Molecular cloning,spring Harbor,N.Y.**
- **Sameeh.A. & Abdel-Tawab.H.M.(2010).Oxidative damage ,biochemical and histopathological alterations in rats exposed to chlorpyrifos and the antioxidant role of zinc .Pesticide Biochemistry and Physiology .96.pp14-23.**
- **Shyamala, M.P., Venukumar, M.R. & Latha, M. S. (2003). Antioxidant potential of the *Syzygium aromaticum*. (GAERTN.) LINN. (Cloves)in rats fed with high fat diet. Ind *J* Pharmacol, *35*: 99-103.**
- **Shubber,E.K and AL-Allak ,B M(1986).Spontaneous chromosomel al aberration and SCE inhuman lymphocytes 1.effects of culture conditions Nucleus. Cell. BIO.22.22-98.**
- **Sastry K.V, Sharma K. and Malik. P.V. (1981). Acute and chronic effects of diazinon on the activities of three dehydrogenases in the male reproductive system. Toxicol. Lett. 10:55-59. 23.**
- **Suna .K, Fatma G .U, Dilek. D, Filiz, Yusuf ,K. (2010).Malathion-induced hepatotoxicity in rats: The effects of vitamins C and E. Food and Chemical Toxicology. 48 .pp633–638.**
- **Sambrook. J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, *N Y*, pp.65.**
- **Simoni. M , Gromoll J. and Nieschlag E. (1997). The follicle-stimulating hormone receptor : biochemistry , molecular biology , and pathophysiology .Endocr. Rev. 18:739-773.**
- **Siegmund .O. H. (1979).Reproduction and urinary system .In :The Merck veterinary manual . Siegmund ,O. H. and fraster ,C.M. (eds.), published by Merck and Co. Inc. Rahway ,N.J. USA .pp794-892.**
- **Sofia Grabovska and Yuriy Salyha.(2015).ADHD-like behavior in the offspring of female ratsexposed to low chlorpyrifos doses before pregnancy.Arh Hig Rada Toksikol .66.2624.pp121-127.**
- **Suresh C Joshi,R.Mathur and N.Gulati.(2007).Testicular toxicity of chlorpyrifos (an organophosphate pesticide) in albino rat.Toxicology and Industrial Health.23.7.pp439-444.**
- **Susin, S. A. ,Lorenzo, H.K. ,Zamzami, N. ,Marzo, I. ,Show, B., Brothers, G. ,Mangion, M., Jacotol, J., Costantini, E., Loffler, P, Larochette, M,Goodlett, N., Aebersold, D.,Siderovski, R., Penhinger, D. and Kroemer, G. (1999).Molecular characterization of mitochondrial apoptosis inducing factor. *Nat, 397*:441-446.**
- **Singh A.R. Arthur, A.T. & McCormick, G.C (1988). Diazinon (MG-8) 13-week oral feeding study in rats. Numbers MIN-882011, 88083. Unpublished report prepared by Ciba-Geigy Crop., Summit, NJ.**
- **T.Leon Lassiter & Stephen Brimijoin(2008).Rats gain excess weight after developmental exposure to the organophosphorothionate pesticide, chlorpyrifos .Neurotoxicology and Teratology.30.2.pp 125-130.**

- **Tolliver,D.K.and Robbins. L.W.(1991).Techniques in karyology: The bone marrow extraction method. Cytogenetics and cell genetics.12;69-74.**
- **Tuormaa, T.E. (2003). The adverse effects of agrochemicals on reproductive health. Foresight, the association for the promotion of pre-conceptual care.**
- **Theodore. A S, Colleen. A O. Frederic ,J. Seidler. (2005).Critical periods for the role of oxidative stress in the developmental neurotoxicity of chlorpyrifos and terbutaline, alone or in combination. Developmental Brain Research 157 172 – 18.**
- **T.K.Mandal and N.S.Das.(2012).Testicular gametogenic and steroidogenic activities in chlorpyrifos insecticide-treated rate :a correlation study with testicular oxidative stress and role of antioxidant enzyme defence systems in Sprague –Dawley rats.Andrologia.44.2.pp 102-115.**
- **Tarek M.Heikal,Abdel-Tawab H.Mossa,Mona A.Abdel.Rasoul and Gehan I.Kh.Marei.(2013).the ameliorating effects of green tea extract against cyromazing and chlorpyrifos induced liver toxicity in male rats.Academic Sciences Asian journal of Pharmaceutical and clinical Research.6.1.pp1-8.**
- **Trottman, C.H. & Desaiah, D. (1979). Adenosine triphosphatase activities in brain, kidney and liver of mice treated with toxaphene. J. Environ. Sci. Health, B14(4):393-404.**
- **Tamara Galloway and Richard Handy.(2003).Immunotoxicity of Organophosphorous Pesticides.Ecotoxicology.12.1.pp 345-363.**
- **Walter K. (1977). Influence of DDT, DDVP and malathion on FSH, LH and testosterone serum levels and testosterone concentration in testis. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 18(2): 231-242.Research Library .3.2.pp292-303.**
- **Won Jin Lee,Aaron Bliar,Jane A.Hoppin,Jay H.Lubin,Jennifer A.Rusiecki and Dale P.Sandler.(2004).Cancer Incidence Among Pesticide Applicators Exposed to Chlorpyrifos in the Agricultural Health Study.Journal of the National Cancer Institute.96.23.pp1781-1789.**
- **WHO (1989). Dichlorvos. Environmental Health Criteria 79, International Programme on Chemical Safety, World health Organization, Geneva**
- **Yin. H, Cukurcam S, Betzendahl I., Adler I.D, Eichenlaub- Ritter U., (1998). Trichlorfon exposure, spindle aberrations and nondisjunction in mammalian oocytes. *Chromosoma* 107, 514–522.**
- **Zak. F, Hess R, Luct Kemeier H. & Sachsse, K. (1973). 21-day inhalation study on the rat withZa technical diazinon. Number siss 1679. Unpublished report prepared by Ciba-Geigy Sisseln, Switzerland.**
- **Zabar R,Sarakha M,Lebedev AT,Polyakova OV & Trebse P.(2016).Photochemical fate and photocatalysis of 3,5,6-trichloro-2-pyridinol,degradation product of chlorpyrifos .chemosphere.144.pp 615-620.**

ABSTRACT

The present study is conducted to identify the impact of different doses of Chlorpyrifos on mature rats. The study has been accomplished in the animal house of the college of sciences/ Al-Qadisya University for the period 8/12/2016 to 29/1/2017 to investigate the impact of the insecticide on the body weight and the relative weight of (liver, kidney and brain). Also, the physiological study includes the changes in the sperms as the sperms concentration, activity and the deformation of these sperms. Also, the study tackles the coefficient of cell division in the bone marrow, chromosomatic deformation, genomic DNA of the organs under investigation and study the changes of pathological tissue for these organs.

There are 48 of male rats of 10-12 weeks age, their weight 170-200 grms. The experiment is for two periods, seven days and fourteen days. The animals of each period are divided on four groups, 6 animals for each group, controlling group. They were given normal saline while the second, third and the fourth one were treated with doses of concentration 1/30, 1/20, 1/10 ml/kg of lethal dose of LD50 and CPF for the female rats 135 ml/kg and males 163 ml/kg. They were given 0.1 ml/kg on the daily basis for 21 day. The animals weighted before treatment and after for a week and two weeks. All the observable behavioural changes were documented and the chosen organs taken. The observable changes were registered and half of these organs kept in Formalin for histological study. The second half injected with liquid nitrogen and kept frozen for the genomic DNA. The tail of epididymis was taken to study the concentration of sperms. Thigh and tibia bones were taken to study the coefficient of cell division and the chromosomatic deformation for bone marrow cells. The results showed that there is a relative decrease in the body weight of the animals, which treated by the insecticide by 1/20 and 1/0 ml/kg for 14 days of using Chlorpyrifos. It is observed that the animals weight gain, which treated by 1/30 ml/kg decreased considerably at the level of probability ($p<0.05$). It is noted that the weight of liver and kidney decreased relatively for the second and the third groups who treated with Chlorpyrifos for 14 day at the level $P<0.05$. The histological study of the organs shows that there is congestion in the central vein of the liver with dissolve of peripheral cells, bleeding beside the central vein with congestion in vena portae hepatis NA. Also, there is a clear change in the general shape of liver tissue. The microscopic investigation for the liver shows that the livers of the third group have sever congestion in the central vein and the loss of the radial arrangement for the liver cells. The liver cells appeared vacuolated and other cells appeared

with karyolysis and others are pyknotic. In addition to enlargement in the liver pouches and hepatobiliary duct has hyperplasia and congestion after treatment for 7 days. The microscopic examination for the third group animals (T3) for 14 days shows that there is a clear congestion and hyperplasia in hepatobiliary duct, radial arrangement for the liver cells, which appeared degenerated and clear shape of nuclear division, karyolysis, bleeding in the liver tissue. The microscopic examination for the animals kidney in the second group (T2) shows that there is enlargement in tubuli renales, congestion in the kidney tissues, glomeruli are enlarged, rounded and normal. Tubuli renales are degenerated and molted for 7 days. It is noted that there is transparent gelatin substance (hyaline degeneration) with congestion and sever bleeding in the renal tissue. Tubuli renales are enlarged and destroyed membrane with degeneration of the cells of these tubuli. The study show that there is a clear decrease in the coefficient of division for the injection group for 14 days. It is noted that there is no significant difference at the level $P<0.05$ among the first and the second groups of control sample for 7 days. Also, slides taken from bone marrow are examined and the results show that there are chromosome, deformations, decrease of chromosomes, chromosome dystrophy, chromosome translocation and duplication of chromosome. It is also clear that sperms number decreased for all injection groups for 7 days. The decrease is $P<0.05$ in the average of sperms number for all injection groups during 14 days. The results revealed that the sperms motion, the percentage of normal sperms in comparison with sperms activity are not affected in the injection groups (1/30) for 7 days. The results show that there is a decrease by ($P<0.05$) of the sperms percentage for the abnormal and normal sperms, their motion for all injection groups for 14 days. There are deformations in the sperms as translocation and gyration of the sperm tail in comparison with the normal ones. The molecular study shows a mutation in the nephrin promoter gene by using PCR and PCR-SSCP methods. We conclude from this study that insecticide has clear negative effects on the behaviours of the animals, their weights, weight of organs and causes defects in different tissues. Also, it causes changes in the genetic and sexual cells in addition to genetic mutations in genomic DNA for the organs under investigation.

The Ministry of Higher Education and Scientific Research

University of AL-qadissya
College of Science
Department of Biology

Histological and Molecular Study of the Effect of Trade Pesticide Chlorpyrifos on Mature Male Rats

A Thesis

Submitted to the council of the College of Science

AL- qadissya university

In partial Fulfillment of the requirements for the degree of of Master of Biology/ Zoology

By

Mohammed ALI Matlab AL-Hgeemy

Supervised By

Assis.T.Prof. Dr. Wijdan Th.AL- Al-Timimi

University of Al-Qadisiya \ College of science

1437 A . H **2016 A . C**