

## تأثير مبيد البروبانيل في بعض الاختبارات الدموية والمناعية في ذكور الفأر الابيض

أحسان فليح حسن  
أشواق شاكر نعمة  
كلية الطب البيطري - جامعة القادسية - الديوانية - العراق

### الخلاصة :

صممت الدراسة الحالية لتقييم بعض التأثيرات المناعية للمبيد بروبانيل في ذكور الفئران البيض من خلال بعض المعايير المخبرية . شملت هذه المعايير العدد الكلي لخلايا الدم البيض ومعامل البلعمة ، جرعت الفئران بجرعتين من المبيد (0.1 ، 0.3 ملغم/كغم ) عن طريق الفم وعلى مدى 30 يوماً وبمعدل جرعة واحدة يومياً . اظهرت النتائج انخفاض واضح في عد خلايا الدم البيض حيث بلغ (2240 ) عند التجريب بالتركيز (0.1 ملغم /كغم) مقارنة بالسيطرة السالبة (5490) حيث شكل هذا الانخفاض فرقا معنوياً ، كما انخفض معدل عد خلايا الدم البيض الى (1460) عند التجريب بالتركيز (0.3 ملغم / كغم ) مقارنة بالسيطرة السالبة (5490) والذي شكل بدوره فرقا معنوياً في حين انخفض معامل البلعمة الى (24.60) و (29.20 ) عند التجريب بالتركيزين (0.1 و 0.3 ملغم / كغم ) على التوالي عند المقارنة مع السيطرة السالبة (33.40) حيث شكل هذا الانخفاض فرقا معنوياً كما بينته الطرائق الإحصائية .

### المقدمة :

يعتبر مبيد الادغال بروبانيل (propanil ) (dichloropropion anilide - 3,4 ) المعروف محلياً باسم استام - أف 34 احد المبيدات الانتقائية الجيدة في مكافحة حشيشة الدنان *Echinochloa sppi* في حقول الرز وتدل نتائج البحوث العالمية بان هذا المبيد يتحلل كلياً في التربة بفعل الكائنات الحية الدقيقة حيث ينشط الشق الاليفاتي في الجزئي ويتلاشى في مدى 21 يوماً من المعاملة ، بينما يبقى الشق العطري بالتربة لسنوات عديدة (3) ولقد درس كثير من الباحثين طبيعة المركبات الناتجة وذكروا بان التحول الميكروبي لهذا المبيد في التربة ينتج عنه تكوين المركب DCA (dichloroaniline - 3,4 ) وان كل جزئيتين من هذا المركب تتحد لتعطي جزئياً واحداً من المركب TCAB (3,3,4,4- tetrachloro azobenzene ) ( 4 ) من ناحية اخرى فلقد بين (10) بان المركبات DCA ، TCAB يمكن ان يتكونا في محاليل البروبانيل المخففة بفعل اشعة الشمس عن طريق التحلل الضوئي .

وقد اشارت الدراسات والبحوث العلمية ان المبيد لا يؤثر فقط على التربة المغطاه بالاعشاب بل يتعدى ذلك احتمالية تأثيره على الاشخاص العاملين سواء كان تأثير مباشر او غير مباشر (12) حيث يؤثر على الجهاز المناعي للجسم والمتمثل بالتأثير الواضح على التحفيز المناعي وخصوصاً عند التعرض للمبيد خلال فترة طويلة ، فقد وجد ان المبيد يمتاز بسميته المناعية العالية من خلال تأثيره على اجزاء ومكونات الجهاز المناعي والمتمثلة بخلايا T و B اللمفية وخلايا البلعم الكبير وتقليل قدرتها الالتهامية . (16)

### المواد وطرق العمل :

- حيوانات التجربة Laboratory animals

لقد استخدمت ذكور الفئران البيض (*Mus musculus*) وبمعدل عمر يتراوح بين (9-12) اسبوع ووزن (25 ± 3غم) والتي جهزت من قبل مركز البحوث الطبية لكلية الطب جامعة النهرين في بغداد ووزعت في اقصاف لدائنية بهيئة مجاميع وحسب حاجة التجربة وقد اعطيت الحيوانات الماء والعليقة المتكاملة القيمة الغذائية حيث جرعت الفئران بجرعتين من المبيد (0.1 و 0.3 ملغم /كغم ) عن طريق الفم وعلى مدى ثلاثين يوماً وبمعدل جرعة واحدة يومياً (0.1) مل . قورنت النتائج مع نتائج معاملة السيطرة ، حيث كانت (سيطرة سالبة) والتي جرعت حيواناتها بالماء المقطر فقط .

**- المحاليل المستعملة :-**

1- محلول تخفيف خلايا الدم البيض :- Leucocyte Dilution solution

اتبعت طريقة (13) وكالاتي:-

حضر المحلول باضافة 2 مل من حامض الخليك الثلجي Glacial acetic acid الى 98 مل من الماء المقطر واضيف اليه قطرات من صبغة ازرق المثيلين methylen blue كدليل لوني وحفظ في الثلجة (4م).

2- دارئ الفوسفات الملحي (phosphate buffered saline (PBS

اتبعت طريقة (7) وكالاتي:-

اذيبت المكونات ادناه في 500 مل من الماء المقطر ثم اكمل الحجم الى 1000 مل :-

0.20 غم كلوريد البوتاسيوم kcl

8 غرام كلوريد الصوديوم Nacl

1.15 م فوسفات الصوديوم احادية الهيدروجين  $Na_2HPO_4$

0.20 غم فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين  $KH_2PO_4$

وثبت الرقم الهيدروجيني Ph عند 7.2 وعقم بالموصدة (121 م وضغط 15 باوند/ إنج<sup>2</sup> لمدة 20 دقيقة ) ثم حفظ في الثلجة (4م).

**3- عالق الخميرة المقتولة Heat Killed Yeast**

حضرت الخميرة لغرض دراسة عملية البلعمة وبحسب طريقة (9) مع اجراء بعض التعديلات . حيث استخدمت لهذا الغرض خميرة الخبز الجافة *saccharomyces cervisia* علامة باكاميا التركية ، حيث علق 10 غم من الخميرة في 150 مل من المحلول الفسلجي ووضع العالق في حمام مائي يغلي لمدة ساعة وبعدها برد العالق ورشح عبر شاش ثنائي الطبقة وعدت الخلايا باستعمال hemocytometer حيث ضبط العدد الى ( $10^7$  خلية / مل ) وقسم العالق الى انابيب صغيرة سعة 5 مل ثم حفظت في المجمدة (-20م) وعند الاستعمال نوبت محتويات الانبوبة في حمام مائي بدرجة حرارة 37م وغسلت بالمحلول الفسلجي مرتين قبل استخدامها في اختبار معامل البلعمة

4- مصل الدم AB للإنسان

جهاز مصل الدم للانسان من صنف AB من المركز الوطني لنقل الدم / بغداد وقسم الى احجام متساوية في انابيب معقمة وحفظ في المجمدة (-20م) لحين استعماله في فحص البلعمة كمواد طاهية Opsonins

**الطرائق المختبرية Laboratory Methods**

تضمنت الطرائق المختبرية اجراء بعض الفحوصات الدمويه والمناعية في ذكور الفئران البيض .

**العدد الكلي لخلايا الدم البيض Total Count of Leucocytes**

اتبعت طريقة (6) وكالاتي :-

نظفت شريحة العد (Neabauer Chamber) والماصة الخاصة بتخفيف خلايا الدم البيض ثم سحبت عينة من الدم الى العلامة 0.5 وخففت بمحلول تخفيف خلايا الدم البيض الى علامة (11) ثم مزج محلول التخفيف مع عينة الدم لمدة ثلاث دقائق بعد ذلك تم التخلص من قطرتين الى ثلاث قطرات من الدم المخفف ثم وضعت قطرة واحدة على حافة شريحة العد وتركت الشريحة مدة دقيقتين لكي تستقر الخلايا وبعدها حسب عدد خلايا الدم البيض باستخدام المعادلة الاتية :

عدد الخلايا(خلية/ملم<sup>3</sup> دم) = عدد الخلايا المحسوبة في اربع مربعات كبيرة × تصحيح الحجم × تصحيح التخفيف/4.

## البلعمة phagocytosis

- تعد عملية البلعمة مقياساً للاستجابة المناعية الخلوية اللانوعية واجريت في الزجاج in vitro وبحسب طريقة (9) مع اجراء بعض التعديلات وكالاتي :-
- 1- بعد تخدير الحيوان حقن بحجم 3مل من المحلول رقم (2) في منطقة الخلب intraperitoneal وبعد اجراء تدليك للمنطقة لمدة 3 دقائق شرح الحيوان وبواسطة محقنه باستور جمع المحلول البريتوني ووضع في أنبوب زجاجي .
  - 2- نبذت الانابيب بسرعة 2000 دورة / دقيقة / لمدة 5 دقائق .
  - 3- علق الراسب في 1 مل من المحلول رقم (2) وعدت الخلايا وضبط التركيز الى  $10^6$  خلية / مل
  - 4- اخذ 0.2 ملم من معلق الخلايا وأضيف إليه 0.1 مل من معلق الخميرة ومزج جيداً ثم اضيف اليه 0.1 مل عن مصلى دم انسان AB ومزج ايضاً ووضع في حمام مائي بدرجة حرارة  $37^{\circ}\text{C}$  لمدة 15 دقيقة .
  - 5- وضعت قطرة من معلق الخلايا على شريحة عد الخلايا Hemocytometer وحسبت الخلايا الملتهممة وغير الملتهممة ( على الاقل 100 خلية ) ، ثم حسب معامل البلعمة phagocytic index وبهيئة نسبة مئوية بعد مرور 15 دقيقة .

$$\text{معامل البلعمة (\%)} = \left( \frac{\text{عدد الخلايا الملتهممة}}{\text{العدد الكلي للخلايا}} \right) \times 100$$

### النتائج والمناقشة:

توضح النتائج المبينة في الجدول رقم ( 1 ) بان المبيد بروبانيل يلعب دورا كبيرا في خفض العدد الكلي لخلايا الدم البيض (2240 و 1460 خلية /ملم<sup>3</sup> دم ) عند المعاملة بالتركيزين (0.1 و 0.3 ملغم /كغم ) على التوالي وهذا الانخفاض شكل فرقا معنويا (الاحتمالية  $\geq 0.01$ ) عند المقارنة مع السيطرة السالبة ( 5490 خلية /ملم<sup>3</sup> دم ) وهذه النتائج كانت مشابهة لما اظهرته الدراسات والبحوث العلمية التي اجريت على الفئران حيث ان للمبيد تاثير على الجهاز المناعي للجسم من خلال تاثيره على الخلايا الـ T والـ B اللمفية وكذلك دوره في تثبيط الخلايا القاتلة الطبيعية ( 11 ) .

في حين اظهر الجدول رقم (2) انخفاض واضح في معامل البلعمة بعد مرور 15 دقيقة (24.60 و 29.20 % عند المعاملة بالتركيزين (0.1 و 0.3 ملغم /كغم ) على التوالي عند المقارنة مع السيطرة السالبة (33.40) حيث شكل هذا الانخفاض فرقا معنويا (الاحتمالية  $\geq 0.05$ ) ولكن لم تشكل نتائج المعاملتين اي فروق معنوية فيما بينها حسب نتائج التحليل الاحصائي اشار العديد من الباحثين ومنهم ( 15 ) حول تاثير المبيد في تقليل الاستجابة المناعية من خلال تاثيره على فعالية خلايا البلعم الكبير وتثبيط قدرتها الالتهامية والتي تعتبرها بمثابة الخط الدفاعي الاول للجسم كما ذكر ( 17 ) بان المبيد يثبط السمية الخلوية للخلايا للمفاوية و انتاج السابتوكينات كما توضح الصورة رقم (1) خليه بلعمية غير ملتهممة ، والصورة رقم (2) توضح الخلية البلعمية الملتهممة . في حين لاحظ ( 18 ) ان المبيد يسبب اختزال في حجم الغدة الدرقية في الفئران المعاملة بهذا المبيد والتي تعتبر الغدة الرئيسية في الجسم .

ويعود دور المبيد الواضح في تقليل وتثبيط الفعالية المناعية للجسم من خلال تاثير المبيد الواضح والمتمثل بتثبيط الاحداث الخلوية المميزة حيث يسبب إضعاف الارتفاع الطبيعي للكالسيوم داخل الخلية وهذا يتبعه نفاذ الكالسيوم الداخلي في الخلايا للمفاوية للانسان والحيوان . ( 5 )

في حين اظهرت دراسات اخرى ان التعرض للمبيد يسبب نقصان في انتاج الانترليوكين mRNA2 وبالتالي سوف يقلل من قابلية شريط ال DNA على التضاعف وهذا بدوره يؤثر على عملية استنساخ وتخليق البروتين الضروري لحاجة الخلية (8) وبما ان العوامل الناقلة لأيونات الكالسيوم والمحمولة على غشاء الخلية هي عبارة عن مواد بروتينية بالتالي فان المبيد سوف يؤثر على تصنيع العوامل الناقلة للكالسيوم من والى الخلية . وهذا بدوره يقلل من تركيز الكالسيوم الداخلي و انتاج الانترليوكين ( 2 ) كما ان للمبيد تاثير واضح على السكريات المتعددة والدهون الداخلة في تركيب الغشاء البلازمي للخلية ( 1 )

## References:

- 1-Abraham RT, Weiss A. (2004) Junket T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. *Nat. Rev. Immunol.* 4:301–308
- 2- Barnett J, Gandy J, Wilbourn D, Theus SA. (1992) Comparison of the immunotoxicity of propanil and its metabolite, 3,4-dichloroaniline, in C57Bl/6 mice. *Fundam. Appl. Toxicol.* 18:626–631
- 3-Brundage KM, Barnett JB, Mahaney JE. (2004) The amide class herbicide 3,4-dichloropropionanilide (DCPA) alters the mobility of hydrocarbon chains in T-lymphocyte but not macrophage membranes. *J. Toxicol. Environ. Health A66:2253–2265*
- 4-Feske S, Okamura H, Hogan PG, Rao A. (2003) calcineurin signalling in cells of the immune system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311:1117–1132
- 5-Garrity PA, Chen D, Rothenberg EV, Wold BJ. (1994) Interleukin-2 transcription is regulated in vivo at the level of coordinated binding of both constitutive and regulated factors. *Mol. Cell Biol.* 14:2159–2169
- 6-Hean,p.d ( 1995 ) principles of hematology edited L.H.Young,W.B , publishers, London .
- 7-Hudson , L . and Hay, F.C. (1980) practical immunology . Blackwell .scientific Publications. V.K.
- 8-Lewis RS. (2001) Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 19:497–521
- 9-Metacalf,Gallin,M.D.;Nauseef,M.D.and Root,R.K.( 1986 ) laboratory manual of neutrofil function .Raven press Newyork , U.S.A
- 10-Panyi G, Varga Z, Gaspar R. (2004) Ion channels and lymphocyte activation. *Immunol. Lett.* 92:55–66
- 11-Prakriga M, Feske S, Gwack Y, Srikanth S, Rao A, Hogan PG. (2006) an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nature* 443:230–233
- 12-Quintana A, Griesemer D, Schwarz EC, Hoth M. . (2005) Calcium-dependent activation of T-lymphocytes. *Pflugers Arch* 450:1–12
- 13-Sood,R (1986 ) hematology for student and practitioners . Jaypee brothers, New Delhi , India .
- 14-SPSS.1985 .SPSS-X users' guide. SPSS.Inc,Chicago,IL.
- 15- Vig M, Peinelt C, Beck A, Koomoa DL, Rabah D, Koblan-Huberson M, Kraft S, Turner H, Fleig A, Penner R, et al. (2006) is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca<sup>2+</sup> entry. *Science* 312:1220–1223
- 16-Wu MM, Buchanan J, Luik RM, Lewis RS. (2006) store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane. *J. Cell Biol.* 174:803–813
- 17-Xu P, Lu J, Li Z, Yu X, Chen L, Xu T. (2006) Aggregation of STIM underneath the plasma membrane induces clustering of Orai. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 350:969–976

18-Zhang SL, Yu Y, Roos J, Kozak JA, Deerinck TJ, Ellisman MH, Stauderman KA, Cahalan MD. (2005) sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca<sup>2+</sup> store to the plasma membrane. Nature 437:902–905

#### الطرائق الإحصائية

تم تحليل نتائج هذه الدراسة باعتماد النظام الإحصائي ( SPSS .1985 ) وفقا للنموذج الإحصائي التالي ( One Way classification ) :-

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + e_{ij}$$

$Y_{ij}$  = تمثل معدل الصفة قيد الدراسة

$\mu$  = تمثل المتوسط العام للتجربة

$\alpha_i$  = تمثل تأثير الجرعة حيث :

$i$  = (السيطرة السالبة والجرع 0.1 ملغم / كغم و 0.3 ملغم / كغم)

$e_{ij}$  = تمثل الخطأ العشوائي

وقد استخدم اختبار اقل فرق معنوي

( L.S.D ) Least - Significant – Difference

لمعرفة معنوية الاختلافات بين معدلات العوامل المختلفة

**جدول رقم (1) : معدل العد الكلي لخلايا الدم البيض في ذكور فئران السيطرة السالبة والفئران المجرعة بالمبيد بروبانيل (0.1 و 0.3 ملغم / كغم)**

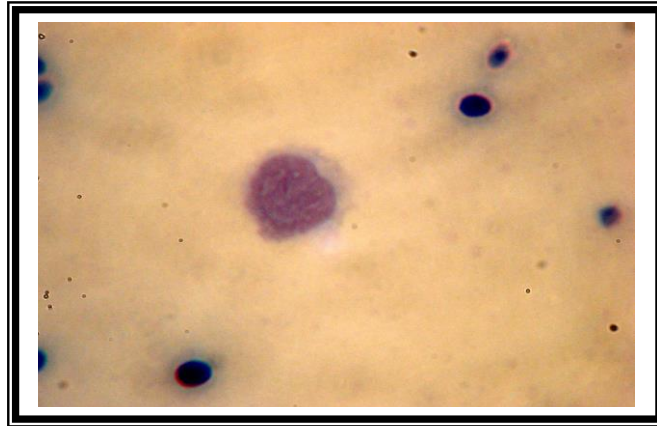
الاحتمالية $\geq$			المعدل $\pm$ الخطأ القياسي (%)			الفترة (يوم)
III	II	I	الحيوانات المجرعة بالمبيد		السيطرة السالبة	
			0.3 ملغم / كغم	0.1 ملغم / كغم		
غير معنوية	0.01	0.01	$\pm$ 1460.00 450.389	$\pm$ 2240.00 450.381	450.379 $\pm$ 5490.0	30

I : المقارنة بين السيطرة السالبة والحيوانات المجرعة بالمبيد الجرعة 0.1 ملغم / كغم الاحتمالية  
 II : المقارنة بين السيطرة السالبة والحيوانات المجرعة بالمبيد الجرعة 0.3 ملغم / كغم الاحتمالية  
 III : المقارنة بين الحيوانات المجرعة بالتركيزين 0.1 و 0.3 ملغم / كغم الاحتمالية

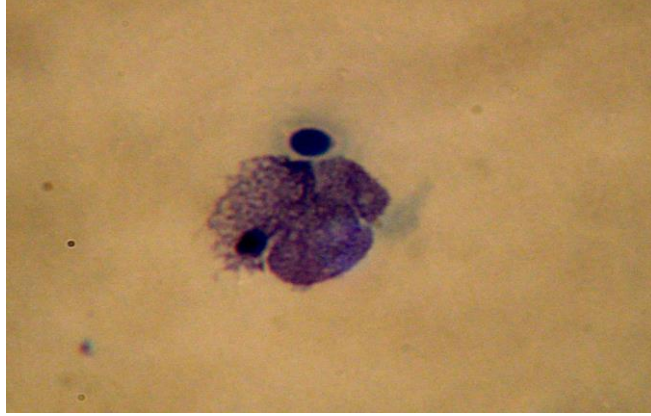
جدول رقم (2) : معامل البلعمة بعد مرور (15 دقيقة) في ذكور فئران السيطرة السالبة والفئران المجرعة بالمبيد بروبانيل ( 0.1 و 0.3 ملغم /كغم )

الاحتمالية $\geq$			المعدل $\pm$ الخطأ القياسي (%)			الفترة (يوم)
III	II	I	الحيوانات المجرعة بالمبيد		السيطرة السالبة	
			0,3 ملغم /كغم	0,1 ملغم /كغم		
غير معنوية	0.05	0.05	$\pm$ 29.200 2.512	$\pm$ 24.600 2.407	$\pm$ 33.400 2.507	30

I : المقارنة بين السيطرة السالبة والحيوانات المجرعة بالمبيد الجرعة 0.1 ملغم /كغم  
II : المقارنة بين السيطرة السالبة والحيوانات المجرعة بالمبيد الجرعة 0.3 ملغم /كغم  
III : المقارنة بين الحيوانات المجرعة بالتركيزين 0.1 و 0.3 ملغم /كغم



صورة رقم ( 1 ) توضح خلية بلعمية غير ملتهمة



صورة ( 2 ) توضح خلية بلعمية ملتهمة

*Effect of Propanil in Some Immunology and Heimolyses  
Tests in Male Albino Mouse*

Ihsan F . Hassan

Ashowk S . Nehma

Veterinary College / University of Al-Qadisiyah /  
Al-Diwaniya / IRAQ

**Abstract**

The present study was designed to evaluate some immunological effects of propanil in mal albino mice ( *Mus Musculus*) by employing some laboratory investigations .The animal ware treated with two oral doses of propanil ( 0.1 and 0.3 mg/kg ) for 30 day .The results showed a clear decevase in the mean count of leucocytes to (2240) in the first dose ( 0.1 mg/kg ) compared with the negative control(4590) and this decreas was significante, Also the mean count of leucocytes decreased to (1460) in the second dos (0.3 mg/kg ) compare with the negative control .While the phagocytic index decreased to (24.60 and 29.20 ) in doses ( 0.1 and 0.3 mg/kg) when compare with negative control (33.40) and this decreae was significant .