اثر تراتوژنیک و سمیت کاربوکسین بر مورفولوژی و سلولهای کبدی جنین جوجه

صابر زهری*[۱]، هوشنگ رفیعی دستجردی[۲]، مهدی امیری‌کیا[۱] و رئوف اعلایی[۱]

۱- اردبیل، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

۲- اردبیل، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده کشاورزی، گروه گیاه پزشکی

تاریخ دریافت: ۸۸/۱۱/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۰/۵/۲۶

چکیده

نیاز غذایی جوامع در حال رشد انسانی مصرف بی رویه آفت کشهای کشاورزی را افزایش داده است. هدف از این تحقیق، بررسی میزان سمیت کاربوکسین (قارچ کش رایج در کشاورزی) بر جنین جانور مدل و کشت سلول کبدی حاصل از آن (اندام اصلی متابولیزه کننده ترکیبات خارجی) می‌باشد. در این تحقیق، با توجه به تراکم بیولوژیک این گونه ترکیبات در بافتهای جانوری، تأثیر تراتوژنی کاربوکسین بر جنین جوجه ۱۸ روزه مورد بررسی قرار گرفت. در روز صفر انکوباسیون غلظتهای ۲۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم از کاربوکسین (محلول در استون) بر هر تخم مرغ به داخل کیسه زرده تزریق گردید (n=۷) و این آزمون برای هر غلظت در ۴ تکرار انجام گرفت. نتایج حاصل از رنگ آمیزی اسکلت جنین نشانگر عدم کلسیفیه شدن مهره های دمی، کجی وکوتاهی استخوانهای بلند و حذف مهره های دمی بود. تزریق ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم نیز ناهنجاری ظاهری، عمدتاً پا چنگکی ایجاد کرد. نتایج حاصل از بررسی اثرات سمیت کاربوکسین بر سلولهای کبدی جنین جوجه ۱۲ روزه نشان داد که غلظتهای ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم / میلی‌لیتر به ترتیب ۲۰، ۲۴، ۳۵، ۴۰ و ۴۸ درصد بقای سلولی را کاهش داده و IC_{50} آن برابر با ۱۰۲ میکروگرم / میلی لیتر است. تجمع بیولوژیکی سموم شیمیایی در بافتها باعث اختلال در فرآیندهای فیزیولوژیکی و رشد می‌گردند ولی سلولهای کبدی به دلیل فعالیت سم زدایی بالایی که دارند تا حدی نسبت به تأثیر این گونه ترکیبات مقاومت نشان می‌دهند.

واژه های کلیدی: کاربوکسین، سمیت سلولی، جنین جوجه، تراتوژنی، پا چنگکی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۴۵۱۵۵۱۲۹۰۲ ، پست الکترونیکی: sazahri@gmail.com

مقدمه

آفت کشها نقشی مهمی در کشاورزی مدرن و تولید غذا دارند. با این وجود مصرف بی رویه آنها منجر به آلودگی محیط زیست شده است (۴و۶). کاربوکسین (۲و۳ دی هیدرو-۵-کاربوکسانیلیدو-۶-متیل ۱و۴ -اگزاتین، ویتاواکس) یکی از چند ترکیب قارچ کش شیمیایی است که برای کنترل قارچهای بیماریزای گیاهان زراعی از آن استفاده می‌شود. قدرت قارچ کشی ترکیبات اگزاتیین در سال ۱۹۶۶ نشان داد که کاربوکسین در موجودات مختلف مکانیسم تأثیر متفاوتی دارد. رشد مخمر ها را از طریق سرکوب سنتز پروتئینها (۸) و مهار اکسیداسیون سوکسینات (در میتوکندری قارچها) مهار می‌کند (۲۰). سوکسینات دهیدروژناز یک آنزیم کلیدی در چرخه کربس و زنجیره انتقال الکترون می‌باشد. مطالعات مولکولی ساختاری نشان داده که کاربوکسین از محل اتصال یوبی کویتین به آنزیم سوکسینات دهیدروژناز متصل شده و فعالیت‌های اصلی میتوکندری را سرکوب می‌کند (۹ و ۱۷). در مورد اثر سمی کاربوکسین بر سلولها و جنین، اطلاعات بسیار محدودی در دسترس است. مطالعات نشان داده که این ترکیب با مهار سنتز پروتئین از رشد مخمر جلوگیری می‌کند (۸) از سوی دیگر یک ترکیب فعال نوری است که در اثر تابش نور

خورشید بر محلول آبی آن، تولید سولفوکسید و برخی ترکیبات دیگر می‌کند که تأثیرات سمی آنها بر دافنی، روتیفر و تعدادی از سخت پوستان مورد بررسی قرار گرفته است (۵). از سوی دیگر، جنین جوجه مدل مفیدی برای مطالعه تأثیر سموم وداروها بر تکوین جنینی است. به راحتی قابل دسترس و دارای هزینه بسیار پایین بوده و جانشین خوبی برای تعمیم در پستانداران محسوب می‌شود(۱۳). در این تحقیق تأثیر تراتوژنیک سم کاربوکسین بر جنین جوجه بررسی و میزان مقاومت سلولهای کبدی نسبت به آن در شرایط آزمایشگاهی مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روشها

تیمار جنین جوجه : تخم مرغهای بارور نژاد راس (Ross) از شرکت آرتا جوجه خریداری و در دمای ۱±۱۰ درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی ۵±۶۵ درصد نگهداری شدند. ترکیب قارچ کش کاربوکسین (۵ و ۶ دی هیدرو-۲- متیل -۱ و ۴- اگزاتین -۳- کاربوکسانیلید) با درجه خلوص ۹۸ درصد از شرکت گیاه تهران تهیه گردید. ۵۰ میکرولیتر سم محلول در استون و با غلظتهای ۲۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و۴۰۰ میکروگرم / تخم مرغ ، در روز صفر انکوباسیون و در شرایط استریل با استفاده از سرنگ هامیلتون از قسمت کیسه هوا به کیسه زرده تخم مرغها (n= ۷) تزریق شد. بلافاصله محل تزریق توسط پارافین مذاب بسته و سپس تخم مرغها در دمای ۳۸ – ۳۷/۷ درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی ۶۵ درصد در انکوباتور نگهداری شدند. به گروه شم (n= ۷) ۵۰ میکرولیتر استون (حلال) تزریق گردید. در هر تکرار یک گروه از تخم مرغها به عنوان کنترل همزمان با گروه تیمار و شم گرماگذاری گردید. جهت کنترل رشد جنینی در طول انکوباسیون، به طور متوسط ۴ بار کندلینگ انجام گرفت. این آزمایشها در چهار تکرار اجرا شد.

بررسی سمیت و خصوصیات تراتوژنیک کاربوکسین: تخم مرغهای تیمار شده و شم، در روز ۱۹ انکوباسیون باز و توزین شدند. میزان مرگ و میر آنها ثبت و با فرمول زیر درصد تلفات محاسبه گردید و ناهنجاریهای ظاهری قابل تشخیص بررسی و ثبت گردید(۳).

۱۰۰× [(در صد تلفات شم-۱۰۰)/(در صد تلفات شم- در صد تلفات تیمار)] = در صد تلفات

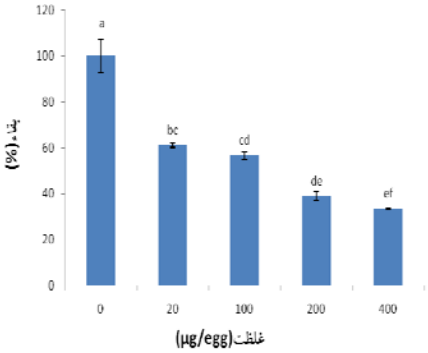
برای بررسی ناهنجاری اسکلتی، پوست جنین جدا و محتویات شکمی تخلیه گردید و به مدت ۳ روز در محلول هیدرواکسید پتاسیم (۲ درصد) قرار گرفت. سپس، جنینها در محلول هیدرواکسید پتاسیم (۱ درصد) حاوی الایزارین (۰/۱ درصد) به مدت۳ روز رنگ آمیزی گردید. شفاف‌سازی نهایی با قراردادن جنین در گلیسرول انجام شد (۲و۴).

بررسی سمیت سلولی کاربوکسین بر سلولهای کبدی جنین: برای بررسی اثرات سایتوتوکسیسیتی، کبد جنین ۱۲ روزه جوجه استخراج و پس از تیمار با آنزیم تریپسین در محیط کشت RPMI (در پلیتهای ۲۴ خانه) قرار گرفت. پس از ۲۴ ساعت، سلولها در فاز رشد با غلظتهای ۵ ،۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم/میلی لیتر برای ۱۶ ساعت تیمار و درصد سلولهای زنده به وسیله آزمون سنجش احیای فورامازون بررسی شدند (۱۸). در سلولهایی که از لحاظ متابولیکی فعال هستند، ترکیب MTT در حضور سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریای احیاء شده به شکل کریستال نا محلول فورامازون در می‌آید که شدت تولید کریستال نشان دهنده حیات سلول می‌باشد. بدین منظور، محیط کشت سلولهای تیمار شده خارج و محیط کشت تازه حاوی ۱۰ در صد محلول MTT (محلول ۵ میلیگرم در میلی‌لیتر در بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH: ۷/۴) به چاهکها اضافه شد. به مدت ۳ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد و در شرایط تاریکی گرماگذاری گردید. کریستالهای ایجاد شده در DMSO حل و جذب آنها در طول موج ۵۷۰

نانومتر ثبت گردید. مقدار IC_{50} به عنوان غلظتی از سم در نظر گرفته شد که باعث ۵۰ درصد کاهش در جذب نوری می‌گردد و میزان درصد سلولهای زنده از رابطه "$OD_{شم}/OD_{تیمار}$" محاسبه گردید(۱۹).

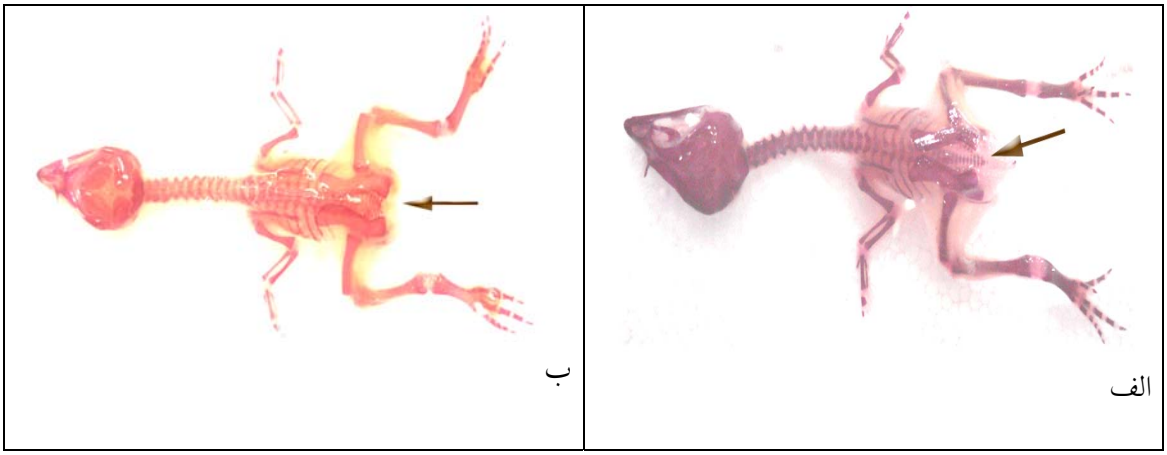
نتایج

تزریق غلظتهای مختلف سم کاربوکسین با حجم ثابت نشان داد که با افزایش غلظت از ۲۰ تا ۴۰۰ میکروگرم / تخم مرغ در روز صفر انکوباسیون (در داخل زرده) افزایش قابل توجهی در مرگ و میر دیده می‌شود، به طوری که در غلظتهای ۴۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰ و۲۰ میکروگرم به ترتیب ۳۳/۶، ۳۸/۹، ۵۶ و۶۱ درصد از جنینها زنده ماندند. به عبارت دیگر افزایش غلظت سم باعث افزایش مرگ و میر گردید. اختلاف کسر بقاء بین گروه شم و هر یک از غلظتهای به کار رفته در سطح ۵ درصد معنی دار بود. اما تعقیب اختلاف بین غلظتهای مختلف نشان داد که این اختلاف در سطح ۵ درصد معنی دار نمی باشد (شکل ۱). بررسی اختلاف میانگین وزن بین نمونه‌های تیمار شده و شم نشان داد که اختلاف قابل ملاحظه ای حتی در بالاترین غلظت در بین تیمارها از نظر وزن جنین بروز نمی‌کند.



شکل ۱- مقایسه درصد بقاء جنین جوجه تیمار شده با غلظتهای مختلف کاربوکسین، با استفاده از اختلاف بین درصد بقاء گروه شم با گروههای تیمار معنی‌دار می‌باشد و میزان بقاء جنین وابسته به غلظت سم می‌باشد. (در هر ستون حروف مشترک، نشان دهنده معنی دار نبودن نتایج بین گروهها است. $P\leq0.05$ ،mean±SE).

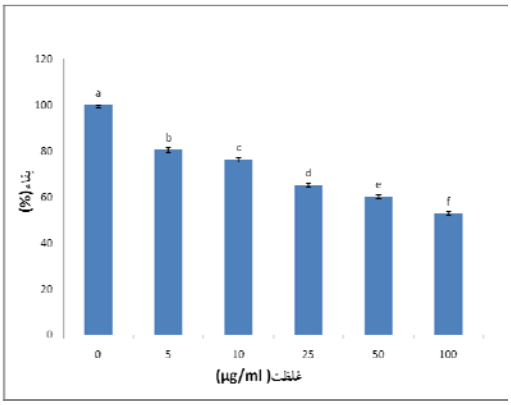
شکل ۲- ناهنجاری از نوع پا چنبری در جنین جوجه ۱۹ روزه تیمار شده با ۲۰۰ میکروگرم / تخم مرغ (ب) و جنین شم (الف)



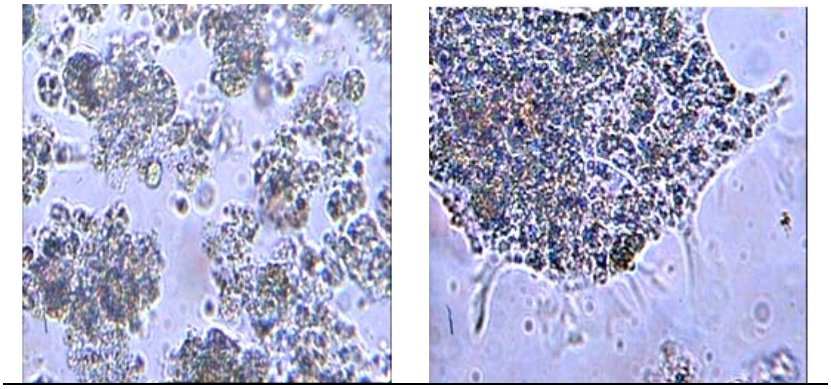
شکل ۳- تأثیر کاربوکسین در جنین جوجه ۱۹ روزه تیمار شده با ۱۰۰ میکروگرم /تخم مرغ که نشانگر تأخیر در کلسیفیه شدن مهره‌های دمی (الف) و عدم تشکیل مهره‌های دمی (ب) می‌باشد.

ناهنجاریهای القاء شده در دو سطح ظاهری و اسکلتی مورد بررسی قرار گرفت. ناهنجاریهای ظاهری قابل تشخیص در نمونه‌های تیمار شده تنها در غلظت ۲۰۰ میکروگرم/ تخم مرغ بروز کردند و در ۱۶/۶ درصد از گروه تیمار مشاهده گردید. شایع ترین نوع ناهنجاریها در این گروه از نوع پاهای چنگکی بود (شکل ۲). بررسی ساختار اسکلتی جنین جوجه‌ها نشان داد که در غلظت ۲۰ میکروگرم / تخم مرغ، هیچگونه ناهنجاری ایجاد نمی‌شود ولی نمونه‌های تیمار شده با غلظت ۱۰۰ میکرو گرم/تخم مرغ ناهنجاری کل با فراوانی ۳۷/۵ درصد را نشان داد که ۲۵ درصد آن مربوط به حذف مهره‌های دمی و ۱۲/۵ درصد آن مربوط به کلسیفه نشدن مهره‌های دمی بود. مجموع ناهنجاریهای ثبت شده در غلظتهای ۲۰۰ میکرو گرم /تخم مرغ، ۵۰ درصد بود که از این مجموع ۳۳/۳ درصد مربوط به کوتاهی و کجی استخوان‌های پا و ۱۶/۶ درصد باقیمانده مربوط به حذف مهره‌های دمی بود. درغلظتهای ۴۰۰ میکرو گرم / تخم مرغ نیز فراوانی ناهنجاری ۵۰ درصد بود که تنها کلسیفه نشدن مهره‌های دمی را شامل می‌شد (شکل ۳).

بررسی درصد بقای کشت سلولهای کبدی پس از ۱۶ ساعت تیمار با قارچ کش کاربوکسین نشان داد که بقای سلولهای کبدی در غلظتهای ۱۰۰، ۵۰، ۲۵،۱۰و ۵ میکروگرم / میلی‌لیتر به ترتیب ۵۲، ۶۰، ۶۵، ۷۶ و ۸۰ ٪ و IC_{50} آن ۱۰۲ میکرو گرم / میلی لیتر بود. (شکل ۴). مطالعات آماری نشانگر معنی دار بودن اختلاف در درصد بقاء بین شم و نمونه‌های تیمار شده است وکاهش درصد بقاء با افزایش غلظت رابطه مستقیم دارد. مطالعات مورفولوژیک سلولها نشان داد که اتصال بین سلولی در سلولهای کبدی تیمار شده جنینی گسسته و حاشیه سلولها نامنظم گردیده و تراکم سیتوپلاسمی افزایش یافته است (شکل ۵).



شکل ۴- مقایسه تأثیر غلظتهای مختلف کاربوکسین در بقاء سلولهای کبدی جنین جوجه نشان می‌دهد که با افزایش غلظت سم تا ۱۰۰µg/ml بیش از ۶۰٪ سلولها زنده مانده‌اند($P\leq0.05$، mean±SE).



ب الف

شکل ۵- کشت سلولهای کبدی (الف) و تیمار شده با کاربوکسین با غلظت ۵ µg/ml (ب) که نشانگر گسسته شدن اتصالات بین سلولی و اتصالات سلولها از بستر کشت می‌باشد.

بحث

مطالعات نشان داده که موادی که اثرات سیتوتوکسیسیتی دارند باعث مهار رشد و مهاجرت سلولها می‌شوند که این عوامل از نظر رشد جنین بسیار مهم هستند. بررسیهای انجام گرفته با میتومایسین این یافته را اثبات کرده است. این ماده در شرایط آزمایشگاهی باعث مهار رشد سلول شده و در عین حال باعث مهار رشد سلولهای غضروفی جنین و در نتیجه باعث کوتاهی استخوانهای بلند می‌گردد (۱۵و۱۶). لذا مهار تکثیر سلولی در بافتهای جنینی که به سرعت در حال تکثیر هستند ممکن است منجر به ناهنجاری شود (۱۴ و ۱۶). مرگ سلولی ناشی از تأثیر ترکیبات سمی باعث اختلال در الگوی میتوز سلولی در بافتها شده و منجر به اختلال در تماس سلولی در طی تمایز می‌شود. این فرآیند منجر به اختلال در عمل القاء تمایز و اندام زایی صحیح می‌گردد. از طرف دیگر تمامی استخوانهای بال و پا بروش داخل غضروفی (Enchondral ossification) استخوانی می‌شوند (۲) لذا تأخیر در رویداد این فرآیند باعث ناهنجاریهایی مانند انحراف استخوانهای دراز خواهد گردید. بررسی‌ها نشان داده، موادی که اثرات تراتوژنیکی دارند به طور مستقیم بر بافت هدف اثر می کنند، مثلاً اثبات شده که دو ماده سورامین و تریپان‌بلو از طریق تأثیر مستقیم بر بافتهای دم و سلولهای آن می توانند اثرات تراتوژنی داشته و ناهنجاری در دم را القاء نمایند (۱۱ و ۱۴). این تحقیق نشانگر تأثیر سیتوتوکسیک قابل توجه کاربوکسین نسبت به کشت سلولی کبدی بود و منجر به گسسته شدن اتصالات بین سلولی و سلول با بستر گردید. تأثیر سم بر جنین جوجه منجر به ناهنجاریهایی مانند عدم تشکیل و رشد مهره‌های دمی شد که ناشی از تأثیر مستقیم آنها بر سلولهای جنینی است. شاخص‌ترین ناهنجاری ظاهری مشاهده شده از نوع پا چنگکی بود و مطالعات قبلی نیز بروز این نوع ناهنجاری را تحت تأثیر کلرید کارباکول نشان داده بود (۱۲). یافته‌ها نشان داده، ترکیباتی که خاصیت تقلید گری کولین دارند باعث افزایش نا هنجاری پا چنگکی در جنین جوجه می شوند. علت این نوع ناهنجاری تحلیل و عدم تکامل بافت ماهیچه ای است که در نتیجه رقابت با استیل کولین برای متصل شدن به گیرنده‌های استیل کولین روی می‌دهد (۷، ۱۰،۱۲). یکی از عوامل نارسایی در تکوین بافتی رویداد مرگ برنامه ریزی شده سلولی می‌باشد. این رویداد ممکن است توسط عوامل خارجی و سمی القاء گردد(۱). بر اساس این تحقیق سلولهای کبدی مقاومت قابل توجهی در مقابل سمیت کاربوکسین نشان دادند که احتمالاً ناشی از توانایی متابولیزه شدن ترکیب توسط این سلولها می‌باشد. با توجه به تجمع زیستی این گونه ترکیبات در بافتهای جانوری، غلظتهای

بالاتر از توان تجزیه بافت کبدی می‌تواند باعث بروز اختلالاتی در تکوین جنین گردد.

منابع

۱- ربانی چادگانی، ع؛ شبانی، ا؛ (۱۳۸۲) بررسی تأثیر نیترات سرب بر فعالیت سلولهای ماکروفاژ ریه موش صحرایی. مجله زیست شناسی ایران، ۱۴ (۱-۲): ۱۲-۲۱

۲- رنجبر، و؛ وطنچییان، م؛ محمدیان، ب؛ میاحی، م؛ (۱۳۸۵) مطالعه زمانی تکوین اسکلت بال و پا در جنین جوجه بکمک تکنیک رنگ آمیزی دوگانه آلیزارین قرمز -آلسین آبی. مجله زیست شناسی ایران، ۱۹(۲): ۱۶۷-۱۷۹

۳- طالبی جهرمی، ک؛ (۱۳۸۷) سم شناسی آفت کشها. انتشارات دانشگاه تهران؛ ص۴۹۲

4- Alhifi, M.A., Khan, M.Z., Higoshai, H.A., Ghole, V.S.(2004) Teratogenic effect of dimethoate on chicken embryo. Journal of Internal Medicine, 3: 1–9

5- DellaGreca, M., Iesce, M.R., Cermola, F., Rubino, M., Isidori, M. (2004) Phototransformation of carboxin in water. Toxicity of the pesticide and its sulfoxide to aquatic organisms. Journal of Agricultural and Food Chemistry**,** 52(20):6228-32.

6- Fogg, P., Boxall, A.B.A., Walker, A., Jukes, A.A. (2003) Pesticide degradation in a biobed composting substrate. Pest Management Science, 59: 527–537

7- Forsyth, C.S., Frank, A., Watrous, B.J., Bohn, A.A. (1994) Effect of coniie on the developing chick embryo .Teratology 49: 306–310

8- Gunasekaran, P., Tauro, P. (1982) Mechanism of action of carboxin and the development of resistance in yeast. Journal of Biosciences, 2:219- 225.

9- Horsefield, R., Yankovskaya, V., Sexton, G., Whittingham, W., Shiomi, K., Omura, S., Byrne, B., Cecchini, G., Iwata, S. (2006) Structural and computational analysis of the quinone-binding site of complex II (succinate–ubiquinone oxidoreductase): a mechanism of electron transfer and proton conduction during ubiquinone reduction. The Journal of Biological Chemistry, 281: 7309–7316.

10- Landour, W. (1975) Cholinomimetic teratogens; Studies with chicken embryo.Teratology, 12: 125–146

11- Manner, J., Seidl, W., Heinicke, F., Hesse, H. (2003).Teratogenic effects of suramin on chick embryo . Anatomy and Embryology, 206: 229–237

12- Paul, K., Moitra, P.K., Mukherjee, I., Maity, C., Ghosol, S.K. (1999) Teratogenicity of arecoline hydrobromide on developing chicken embryos; A preliminary report. Bulletin of Environmental Contamination & Toxicolog, 62: 356–362

13- Petrovova, E., Sedmera, D., Misek, I., Lesnik, F., Luptakova, L. (2009) Bendiocarbamate toxicity in the chick embryo. Folia Biologica, 55: 61–65

14- Ritter, E.J., Scott, W.J., Wilson, J.G. (1971) Teratogensis and inhibition of DNA synthesis induced in rat embryo cytosine arabinoside. Teratology, 4: 7–13

15- Singh, J.D., Singh, S. (1976) Skeletal malformation induced by mitomycin C in chick embryo. Acta Orthopaedica Scandinavica, 47: 509–514

16- Singh, S., Prasad, G.S., Sinha, D.N., Duby, S.S. (1974) Effect of Mitomycin C on the embryonic chick lim bud in vitro. Anatomischer Anzeiger, 135: 191–198

17- Tucker, A.N., Lillich, T.T. (1974) Effect of the systemic fungicide carboxin on electron transport function in membranes of *micrococcus denitrificans*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 6: 572–578

18- Yedjou, C., Moree, P., Techounwou, P.B. (2006) Dose and time-dependent response of human leukemia (HL-69) cells to arsenic trioxide treatment. International Journal of Environmental Research and Public Health, 3:136-140.

19- Zahri, S., Razavi, S.M., Niri, F.H., Mohammadi, S. (2009). Induction of programmed cell death by *prangos uloptera*, a medicinal plant. Biological Res,42, 517-522

20- Ziogas B.N., Georgopoulos S.G. (1979). The effect of carboxin and of thenoyltrifluoroacetone on cyanide-sensitive and cyanide-resistant respiration of *Ustilago maydis* mitochondria. Pesticide Biochemistry and Physiology, 11 (3): 208-217

Teratogenic and toxicity effects of Carboxin on morphology and liver cells of chicken embryo

Zahri S.[1], Rafiee Dastjerdi H.[2], Amirikia M.[1] and Alaee R.[1]

1 - Biology Dept., Faculty of Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, I.R. of Iran

2 - Plant Protection Dept., Faculty of Agriculture, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, I.R. of Iran

Abstract

Inadequacy of foods for human societies has led to an irregular increment of pesticides usage in agriculture. In this study, the teratogenic effects of Carboxin, a broad spectrum fungicide in agriculture, was evaluated on chicken embryo. Carboxin was dissolved in acetone and injected into yolk sac in concentrations range of 20- 400 µg/egg. The compound could cause death and a number of abnormalities in the embryos. Skeletal staining showed the caudal vertebrates were not calcified and the long bones were significantly shortened and distorted. In concentrations of 200 and 400 µg/egg, the main external abnormality was clubfoot. Treatment of the liver cell culture with carboxin showed a significant antiproliferative activity. In the concentrations of 5, 10, 25, 50 and 100 µg/ml, the cell viabilities were 80, 76, 65, 60 and 52%, respectively, showing the IC_{50} of 102 µg/ml for the compound.

Keywords: Carboxin, cytotoxicity, chick embryo, teratogenecity, clubfoot