تأثير المُبيد *Diclofop – Methyl* في الوراثة الخلوية للخلايا اللمفاوية للدم المحيطي للإنسان

بشير إسماعيل عزاوي[1] زهرة محمود الخفاجي[1] ناهي يوسف ياسين[2]

[1] معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الإحيائية للدراسات العليا، جامعة بغداد، العراق
[2] المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية، الجامعة المستنصرية، بغداد، العراق

الخلاصة

درس تأثير مبيد الأدغال Diclofop – Methyl في الوراثة الخلوية للخلايا اللمفاوية للدم المحيطي في الإنسان. تضمنت مؤشرات الوراثة الخلوية المدروسة حساب النسبة المئوية للتشوهات الكروموسومية وأنواعها، وكذلك حث النوى الصغيرة، ودرست مؤشرات السمية الخلوية بقياس معامل الإنقسام. أُستعمل المُبيد بالتراكيز(0.1 و 0.5 و 5 و 25 و50)×10 $^{-5}$ مولاري. أسفرت النتائج عن إن المُبيد حث التشوهات الكروموسومية بزيادة التركيز وبفروق معنوية عن معاملة السيطرة، وكذلك وجود فروق معنوية بين التراكيز المُستعملة (P<0.01). ظهرت التشوهات على شكل كسور كروموسومية في المعاملة الضابطة (0.06 ± 1) وكذلك ظهرت كروموسومات عديمة المركز (0.06 ± 1)، ظهرت مثل هذه التشوهات الكروموسومية عند التركيز الأقل المستعمل (0.1 ×10 $^{-5}$ مولاري) وبدون فروق معنوية عن معاملة السيطرة، فضلاًعن ظهور الكروموسومات الحلقية عند إستعمال التركيز الأخير، أما التشوهات في التراكيز الأخرى فكانت بشكل رئيس على شكل كسور كروموسومية بلغت ذروتها عند إستعمال التركيز الأعلى (50 ×10 $^{-5}$ مولاري) إذ وصلت إلى 10 %. ظهرت الكروموسومات الحلقية في التراكيز المُستعملة جميعاً، ولم تظهر التشوهات الأخرى التي تم التحري عنها مثل الحذف والإنقلاب والتضاعف الكروموسومي سواءً في معاملة السيطرة أو التراكيز المُستعملة. أدت التراكيز المُستعملة الى زيادة حث النوى الصغيرة وبمعامل إرتباط موجب وعالي(0.97 + = r)، أما تأثير التراكيز المختلفة في معامل الإنقسام فلم يكن كبيراً وإن فرق عن معاملة السيطرة بشكل معنوي(P<0.01)، إلا أن التركيز الأعلى أدى إلى زيادة مُعامل الإنقسام إلى 2.87 مقارنة بمعاملة السيطرة (1.6) وفرق معنوي عن التراكيز الأخرى (P<0.01).

FFECT OF DICLOFOP - METHYL ON CYTOGENETICS OF HUMAN PERIPHERAL LYMPHOCYTES

Basheer I. Azawei[1] Zahra M. Al-Khafaji[1] Nahi Y. Yassein [2]

[1]Institute of Genetic Engineering and Biotechnology for Postgraduate Studies, University of Baghdad

[2]The Iraqi Center for Cancer Research & Medical Genetics, University of Mustansseryia, Baghdad, IRAQ

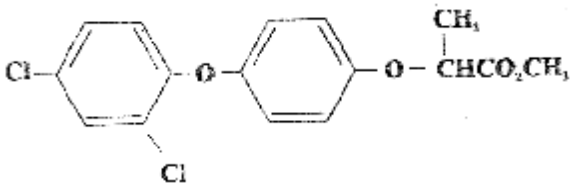
ABSTRACT

The effect of the herbicide Diclofop –Methyl on Cytogenetic of Peripheral Lymphocytes of Human was studied. Genotoxic effect was studied by recording the chromosomal aberrations (CAs) and induction of Micronuclei (MN), Cytotoxicity recorded by estimating the mitotic index (MI) of cultured cells. The pesticide used at concentrations (0.1, 0.5, 5, 25, 50) × 10^{-5}M. Results showed that the pesticide induced an increment in CAs in dose–response pattern. The differences was significant (P<0.01) compared to control treatment and there was significant differences among the concentrations (P<0.01). Among the CAs, broken chromosomes were recorded in control treatment (1±0.06) and a centric chromosomes(1±0.06), such abnormalities appeared upon using lowest concentration (0.1× 10^{-5}M) without significant difference from control treatment, but in addition ring chromosomes appeared at this concentration. The majority of CAs when using other concentrations were broken chromosomes and reached it's maximum value at concentration 50×10^{-5} M (10%), ring chromosomes appeared in all treatments. Other abnormalities which has been investigated such as chromosome deletion, translocations, and gene amplification were not recorded in this study. Using the pesticide induced Mn in dose – response pattern with positive correlation coefficient (r = + 0.97). Different concentrations did not effect the MI strongly, although it caused some decreasing with significant difference (P<0.01); the highest concentration 50×10^{-5} M raised the MI to 2.67 compared to control treatment (1.6) with significant difference (P<0.01) from control treatment and other concentrations.

Key words : Diclofop –Methyl, Lymphocytes, Cytogenetics, Chromosomal aberration

المقدمة

تتنوع المُبيدات المُستعملة في مجال الزراعة لغرض القضاء على آفات زراعية مُختلفة. وتُشكل مُبيدات الأدغال مجموعة كبيرة من المُبيدات البعض منها مُتخصص في الأدغال التي يقضي عليها والأخر يكون عام التأثير ولذلك كان لكل منها ظروف ووقت معين للإستعمال لغرض الإستفادة منها(1). والمُبيد Diclofop – methyl من مُبيدات الأدغال التي تُستعمل للتخلص من الأدغال الرفيعة الأوراق في حقول الحنطة وهو من مجموعة Propanoate وله الصيغة الجزيئية $C_{16}H_{14}Cl_2O_4$ الموضحة في الشكل الآتي



والمُركب مكون من حلقتين مرتبطة مع بعضها وترتبط إحدى الحلقتين بسلسلة جانبية وأخرى بذرتي كلور (2). ويُستورد المُبيد من قبل وزارة الزراعة العراقية ولكن في العادة لا تجرى البحوث والدراسات الخاصة بسُميتها، وقد أُختير المُبيد لتركيبه الحلقي. وتُعد المُبيدات عامة من المُطفرات القوية (3) وهي بذلك تؤثر في الخلايا وتُترك واسمات حيوية Biomarkers التي يُمكن ان تُستعمل لدراسة مدى الضرر الذي تُسببه للكائنات الحية غير المُستهدفة مثل الإنسان (4). تُستعمل الخلايا اللمفاوية للدم المحيطي للإنسان لدراسة التأثيرات السامة وراثياً وخلوياً، وذلك لأن الخلايا تكون في مرحلة غير متكاثرة أي في مرحلة G_0 من دورة الخلية ولها عمر نصفي طويل يصل إلى ثلاث سنوات (5)، كما إن طبيعتها المتنقلة تجعلها عرضة للمواد التي يتعرض لها الجسم على إختلاف أنواع المداخل، وتكون عملية تحضير الكروموسومات منها سهلة مقارنة بالخلايا الأخرى. وتدرس مؤشرات السمية الوراثية في الخلايا المزروعة بقياس التشوهات الكروموسومية من حيث العدد والنوع والتحلل ومنها يمكن تحديد القيمة المحتملة لزيادة حدوث السرطانات (6). تدرس عملية حث الأنوية الصغيرة لتحديد الضرر الحاصل للكروموسومات مثل الكسور وغيرها من التأثيرات مثل التأثير على جهاز المغزل مما يؤدي إلى عدم إنضمام كروموسوم كامل إلى الهيئة الكروموسومية بعد الإنقسام الخيطي(7)، ومن المؤشرات الأخرى التي تُدرس هو قياس مُعامل الإنقسام للخلايا المزروعة لتوضيح السُمية الخلوية (8). هدفت الدراسة الحالية إلى تحديد تأثير مبيد الأدغال Diclofop – methyl في بعض مؤشرات الوراثة الخلوية في لمفاويات الدم المحيطي للإنسان.

المواد وطرائق العمل

أُجريت الدراسة في المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية، الجامعة المستنصرية، بغداد، العراق.

تم الحصول على مبيد Diclofop – methyl من شركة Germany / Nufarm. أُستعمل المُبيد بتراكيز (0.1 و 0.5 و 5 و 25 و 50) × 10 $^{-5}$ مولاري وهي التراكيز المُستعملة لإختبار المواد السامة في مزارع الخلايا اللمفاوية.

مزارع الخلايا اللمفاوية

تم جمع 3 عينات من الدم المُحيطي لأشخاص غير مُدخنين ولا يتعاطون الكحول وغير متعرضين للمُبيدات وزُرعت النماذج وفق طريقة Fenech (9) وتم زراعة ست مكررات لكل نموذج وأُضيفت تراكيز المُبيد المذكورة بعد 24 ساعة من نمو الخلايا، ثم أكملت عملية الحضن لمدة 72 ساعة، وأكمل تحضير الخلايا وصبغ كروموسوماتها ودراستها وفق الطريقة المذكورة.

تقنية التحزيم G – Banding technique : أستعملت في صبغ الكروموسومات وفق طريقة Benn و Perle (10) لتحديد بعض التشوهات الكروموسومية.

فحص التشوهات الكروموسومية

تم الفحص المجهري بالمجهر الضوئي بإستعمال العدسة الزيتية (X100) والعدسة العينية (X16) إذ تم فحص كل كروموسوم بشكل تفصيلي ومُيزت الحزم لكل كروموسوم وحُسبت عدد التشوهات في 100 خلية في الطور الإستوائي Metaphase من إنقسام الخلية وأُستخرج المُعدل (11).

حساب مُعامل الإنقسام

تم حسابه من النسبة المئوية بين عدد الخلايا اللمفاوية المنقسمة إلى عدد الخلايا الكلي المفحوصة إذ تم فحص 1000 خلية، وتم حساب معامل الإنقسام حسب المعادلة الآتية(12) :-

معامل الإنقسام (MI) = (عدد الخلايا المُنقسمة/1000خلية في الطور البيني)×100

فحص وحساب الأنوية الصغيرة

تم الفحص وفق طريقةTawn and Holdsworth (13). حسب عدد الأنوية الصغيرة في 1000خلية وأُستخرجت النسبة المئوية لها عن طريق المعادلة الآتية:-

النسبة المئوية للانوية الصغيرة = (عدد الخلايا التي تحتوي على الأنوية الصغيرة /1000) ×100

تم تحليل نتائج البيانات إحصائياً بإستعمال التصميم العشوائي التام (CRD) وحسب النموذج الإحصائي الآتي:-

$$Yij = M + Ti + eij$$

إذ تُمثل Yij : الصفة المدروسة

M : المتوسط العام

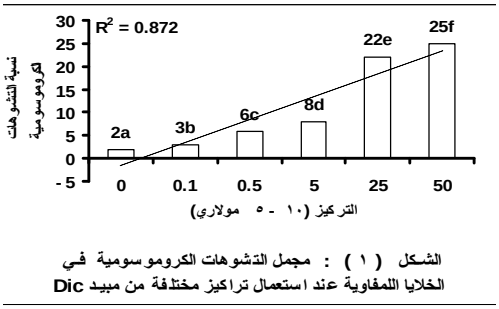
Ti : تاثير المعاملة (C = 1-5)

eij : الخطأ العشوائي

بأعتماد البرنامج الإحصائي الجاهز SPSS (SPSS، 1998). وأُختبرت معنوية الفروق بين المعاملات بإختبار دانكن مُتعدد المديات وعند مستوى إحتمالية 0.01 (14).

النتائج والمناقشة

تُسبب أكثر المواد المسرطنة التسمم الوراثي، لذلك كانت دراسة السُمية الوراثية واسمة حيوية ملائمة إذ أنها تُمثل مرحلة متوسطة لعملية التسرطن (15)، ويوضح الشكل(1) تأثير المُبيد في الخلايا أللمفاوية المزروعة اثرت التراكيز المتزايدة من المُبيد Diclofop – methyl في حث التشوهات الكروموسومية ويلاحظ ان المُبيد سام وراثياً إذ أعطى استجابة متزايدة عند زيادة التركيز Dose- response وهي الميزة التي تمتاز بها المواد السامة وراثياً (4).



الشكل (١) : مجمل التشوهات الكروموسومية في الخلايا اللمفاوية عند استعمال تراكيز مختلفة من مبيد Dic

شكل :(1) مجمل التشوهات الكروموسومية في الخلايا اللمفاوية عند إستعمال تراكيز مختلفة من مبيدDic

وكانت القيم الأساسية (معاملة السيطرة) 2 وقد فرقت معنوياً عن قيم التراكيز المُستعملة بشكل معنوي ($P<0.01$)، إلا أنه بالتراكيز العالية مثل إستعمال 25 ×10 $^{-5}$ مولاري أدى إلى تضاعف التشوهات الكروموسومية إلى 11 ضعف وفي التركيز 50 ×10 $^{-5}$ مولاري تضاعفت التشوهات إلى 12.5 مرة مقارنة بمعاملة السيطرة، وكان معامل إرتباط عدد التشوهات والتراكيز المُستعملة موجب وعالي (r = + 0.934). تقع نسبة التشوهات المُسجلة في معاملة السيطرة ضمن المدى الطبيعي المُسجل في دراسات آخرى (16) وتحصل نتيجة لعدم إنضباط عملية تصليح DNA، أو يمكن ان يُعزى ظهور النسبة المسجلة الى تعرض الأفراد اللذين أُخذت منهم الخلايا إلى العديد من المواد الموجودة في الطبيعة (17)، كما أن تأثير المُبيدات ممكن أن يكون مشابهاً لتأثير الهورمونات إذ أن الهورمونات Steroidal estrogens يُمكن ان تتوسط وتُسبب تدمير للـ DNA بوساطة الجذور الفعالة ROS التي تنتجها (18)، كما أشارت العديد من الدراسات ان حوالي

50% من المُبيدات لها تأثيرات مشابهة للهورمونات مثل تلك التي تؤدي إلى حدوث سرطان الثدي. وتفاصيل أنواع التشوهات موضحة في الجدول (1).

جدول(1): تأثير التراكيز المختلفة من مبيد دايكلوفوب - مثيل (Diclofop-Methyl) في إستحثاث التشوهات الكروموسومية في خلايا الدم اللمفاوية

التشوهات الكروموسومية% Chromosomal Aberration (CA)								
التركيز $Mx\ ^{-5}10$	التضاعف	الانتقال	الانقلاب	الحلقي	الحذف	عديم المركز	ثنائي المركز	الكسور
السيطرة	a 0±0	a 0±0	a 0±0	a 0±0	a 0±0	b 1±0.06	a 0±0	a 1±0.06
0.1	a 0±0	a 0±0	a 0±0	b 1±0.06	a 0±0	b 1±0.06	a 0±0	a 1±0.06
0.5	a 0±0	a 0±0	a 0±0	c 2±0.12	a 0±0	b 1±0.06	a 0±0	b 3±0.19
5	a 0±0	a 0±0	a 0±0	b 1±0.06	b 2±0.12	a 0±0	a 0±0	c 4±0.14
25	a 0±0	a 0±0	a 0±0	c 2±0.12	c 3±0.19	a 1±0.06	b 2±0.12	d 12±0.4
50	a 0±0	a 0±0	a 0±0	c 2±0.12	c 3±0.19	c 3±0.19	c 3±0.19	d 10±0.1

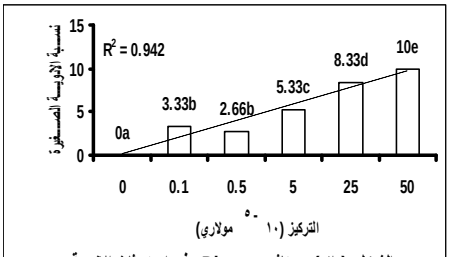
الحروف المتشابهة تدل على عدم وجود فروق معنوية بين تراكيز المُبيد عند مستوى احتمالية (P≤0.01).

يُلاحظ أن معاملة السيطرة قد ظهرت فيها تشوهات من نوع الكسور الكروموسومية (1%) إذ أن المعدل الطبيعي للتشوهات يتراوح بين1-4%. وكذلك ظهور كروموسومات عديمة المركز، وظهرت مثل هذه التشوهات في التركيز الأوطأ المُستعمل (0.1×10^{-5} مولاري) وبدون فروق معنوية مع السيطرة ($P<0.01$) فضلاً عن ظهور الكروموسومات الحلقية كما في الشكل (2). أما بزيادة التراكيز يُلاحظ أن أنواع التشوهات الثلاث المذكورة تواً قد إزدادت وبفروق معنوية، ففي التركيز 5×10^{-5} مولاري ظهرت كروموسومات عانت من حذف قطع منها وإزداد هذا النوع من التشوه عند زيادة التركيز، وتختلف المُبيدات في أنواع التشوهات التي تحثها إعتماداً على المناطق التي تؤثر فيها، بالنسبة للمُبيد المُستعمل لُوحظ تكرار حصول حالة كسر في الكروموسوم رقم 1، وهذا ربما يُفسر على أن هناك منطقة صغيرة في هذا الكروموسوم لها الميل للكسر عند تعرض الخلايا للمواد السامة، والمعروف أن الكروموسوم رقم 1 يحوي على مناطق عديدة وتُعد أكثر المناطق تأثراً في حالة السرطانات مثل سرطان بطانة الجهاز البولي Uroepithelail carcinoma إذ يحوي على أكثر من 95 منطقة قابلة للكسر وأكثر الحُزم تأثراً هي 1q12 (19)، وأشارت الدراسات إلى زيادة حدوث الكسور

الكروموسومية في مناطق ساخنة في كروموسومات أخرى وفي حزم أخرى عند التعرض للمُبيدات الحشرية ومُبيدات الأعشاب وتتمثل بالحزم 1q21(20). والتشوهات الأخرى التي ظهرت هي كروموسومات ثنائية المركز Dicentric

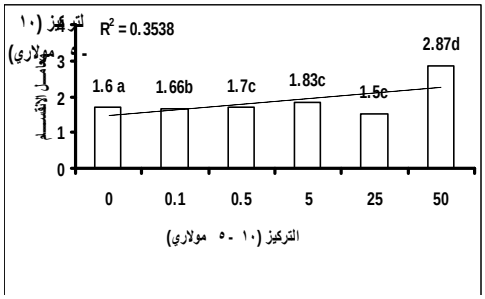
والأُخرى عديمة المركز Acentric مثل هذه لا تستطيع الإنعزال عند الإنقسام الخيطي وتفقد من الخلايا(21)، أما التشوهات المتوازنة مثل الإنقلاب Inversion والإنتقال Translocation وتضاعف الكروموسومات gene amplification والتي تؤدي إلى الأمراض (21) فلم تُسجل في هذه الدراسة.

شكل:(2) خلية لمفاوية في الطور الإستوائي تظهر الكروموسوم الحلقي(160X)



الشكل:(2) تأثير مبيد Dic في إستحثاث الأنوية الصغيرة

كان نمط الحث معتمداً على التراكيز المُستعملة وبمعامل الإرتباط موجب (r = + 0.970)، وكانت الفروق معنوية على مستوى إحتمال($P<0.01$) بين التراكيز عدا التراكيز الواطئة(0.1 و0.5) $\times 10^{-5}$ مولاري إذ لم تكن بينهما فروق معنوية. والمعروف إن الكيمياويات السامة ومنها المُبيدات تزيد من الإجهاد التأكسدي في الأنظمة الحية مما يُؤدي إلى تلف DNA، وإن الخلايا التي تحوي على تشوهات كروموسومية والتي تظهر على شكل أنوية صغيرة فيما بعد تزداد فيها مُركبات الأوكسجين الفعالة ROS مقارنة بالخلايا الطبيعية(22)، وظهور الأنوية الصغيرة يعني أن الخلايا قد تكون تعرضت إلى تأثيرات مباشرة على المادة الوراثيةClastogenic وربما Aneugenic(5). شكل(3) تأثير التراكيز المختلفة في مُعامل الإنقسام.



الشكل:(3)تاثير التراكيزالمختلفة من المبيد Dic في معامل إنقسام الخلايا اللمفاوية

المُلاحظ ان معامل الإنقسام لم ينخفض كثيراً وإن كانت القيم ذات فروق معنوية($P<0.01$)، ولكن في بعض الأحيان إرتفع المعامل بشكل معنوي كما في التركيز 50×10^{-5} مولاري ومثل هذه القيم أثرت في معامل الإرتباط اذ كان ذو قيمة موجبة ولكن ليست عالية ($r = + 0.595$)، وهذا يعني ان المُبيد قد أظهر تحفيزا لعمليات الإنقسام وذلك عن طريق Peroxisome proliferation، ويُعتقد أن المُبيد يُسبب زيادة في تخليق DNA وتكاثر الخلايا فيمكن أن تنمو بصورة غير طبيعية وغير مُسيطر عليها ويؤدي إلى زيادة حدوث الطفرات والتشوهات الكروموسومية ويكون ذلك بوساطة تأثير المُبيد في مستقبلات خاصة في الغشاء الخلوي تعرف بـ Peroxisome proliferation activated receptors (PPAR) وتنشيطها مما يؤدي إلى زيادة التعبيرعن الجينات المسئولة عن تكاثر الخلايا (23). كما ان المُبيد مُشابه في التركيب لعدد من مُبيدات المجموعة Diphenyl ether المعروفة أنها تحث الأورام السرطانية في الفئران والجرذان المختبرية، ومن جهة ثانية فالمُبيد من المركبات الحلقية وعليه تكون هناك إحتمالية إرتباطه بمستلمات خاصة بالمُركبات الحلقية Aromatic hydrocarbon receptors (Ah R)، والمُركبات الحلقية ترتبط إلى هذه المستلمات الموجودة على سطوح الخلايا وتحول إلى مركبات مُسرطنة مباشرةً نتيجة فعاليات إنزيمات الطور الأول والثاني لأيض المواد الداخيلة Xenobiotics وتنتج مُركبات Diol epoxides (كمُسرطنات مباشرة) تتفاعل مع الكوانين في مناطق خاصة من DNA تُعد ساخنة نظراً لقابلية حدوث الطفرات فيها وخاصة في الجينات المهمة مثل P_{53} وهذه التفاعلات يُمكن أن تؤدي إلى حث الأورام (24,4). كما أن المُبيد كباقي مُبيدات الأدغال يؤثر في مؤشرات أُخرى في الجسم فمثلاً المُبيد Pentachlorophenol (PCP) المُستعمل كمُبيد للأدغال(شعبان والملاح، 1993) يؤثر في الإستجابات المناعية سواءً الخلطية Humoral أوالخلوية، فضلاً عن تأثيرها على نسق السايتوكينات خاصة في الأطفال (26,25)، فضلاً عن التأثير في مؤشرات أخرى مثل الإنزيمات.

المصادر

1- شعبان، عواد ونزار الملاح(1993). المُبيدات. دار الكتب للطباعة والنشر. الموصل، العراق.

2- الجبوري، إبراهيم جدوع، وهاشم إبراهيم عواد وصلاح مجيد كسل(2002). المُبيدات المُسجلة في الزراعة والصحة العامة في العراق. اللجنة الوطنية لتسجيل وإعتماد المُبيدات. وزارة الزراعة، العراق.

3- Gabbianelli, R.; Nasuti, C.; Falcioni, G. and Cantalamessa, F.(2004). Lymphocyte DNA damage in Rats exposed to pyrethroids : Effect of Supplementation with Vitamins E and C *Toxicology* 203 : 17 -26.

4- Carpenter, D.; Acaro, K. and Spink, D.(2003). Understanding the Human Health Effects of chemical Mixtures. *Environ. Health Perspect.* 110 : 25 – 42.

5- Pastor, S.; Cerus, A.; Xamena, N.; Siffel, C. and Marcos, R.(2002). Occupational exposure to Pesticides and Cytogenetic damage: Results of Hungarian Population Study using the Micronucleus Assay in Lymphocytes and Buccal Cells. *Environ. Mol. Mutagen*, 40 : 101 -109.

6- Hagmar, L.; Bonassi, S.; Stromberg, U.; Brogger, A.; Knudsen, L.; Norrpa, H. and Reuterwell, C.(1998). Chromosomal Aberrations in Lymphocytes predict Human Cancer: A report from the European Study group on Cytogenetic Biomarkers and Health. *Cancer Res.*, 58: 4117 – 4121.

7- Fenech, M.(2000). The in Vitro Micronucleus Technique. Mut. Res. 455 : 83 – 93.

8- Bhalli, J.; Khan, O.; Haq, A.; Khalid, A. and Nasim, A.(2006). Cytogenetic Analysis of Pakistani Individuals Occupationally exposed to Pesticides in a Pesticide Production industry. *Mutagenesis*, 21: 143 – 148.

9- Fenech, M.(1993). The Cytokinesis – blocked Micronucleus Technique: A detailed Description of the Method and it's Application to Genotoxicity Studies in Human Population. *Mut. Res.*, 285 : 35 – 44.

10- Benn, P. and Perle, A.(1992). Chromosome Staining and Banding Technique. *In* Human Cytogenetics (eds. D.Rooney and B.Czpulkowski). Oxford University Press: UK.

11- Bauchinger, M.; Schmid, E. and Dresp, J.(1983). Quantitative Analysis of Chromosome Damage at First Division of Human Lymphocytes after Radiation. *Rad. Environ. Biophys*., 22: 225-229..

12- Gohosh, B.; Taluker, G. and Shorma, A.(1991). Effect of Culture Media on spontaneous incidence of Mitotic Index, chromosomal aberration, SCE, and Cell Cycle in peripheral Blood Lymphocytes of Male and Female Donors. *Cytogenetic.*, 67:71-75.

13- Tawn, E. and Holdsworth, D.(1992). Mutagen Induced Chromosome Damage in Human Lymphocytes. *In* Human Cytogenetics. (eds. D. Rooney and B. Czpulkowski). Oxford University Press, UK.

14- Duncan, D.(1955). Multiple Range and Multiple F- test. *Biometric*, 11:1 - 42.

15- Hagmar, L.; Stromberg, U.; Tinnerberg, H. and Mikoczy, Z.(2001). The Usefulness of Cytogenetic Biomarkers as Intermediate Endpoints in Carcinogenesis. *Int. Hyg. Environ. Health.,* 204 : 43 – 47.

16- Paz-y-Mino, C.; Bustamante, G.; Sanchz, M. and Leone, P.(2002). Cytogenetic Monitoring in a Population Occupationally Exposed to Pesticides in Ecudor. *Environ. Health Perspect.*, 110 : 1077 – 1080.

17- Knudsen, L.; Norppa, H.; Gamborg, M.; Nielsen, P.; Okkels, H.; Soll-Johanning, H.; Raffin, E.; Jarventaus, H. and Autrup, H.(1999). Chromosomal Aberrations in Humans Induced by urban Air Pollution : Influence of DNA Polymorphisms of glutathione-S-transferase M1 and Acetyltransferase 2. Cancer *Epidemiol. Biomarkerss & Prevent.*, 8 : 303 – 310.

18- Nutter. L. Y. W. and Ngo, E.(2001). An O – quinine form of Estrogen produces free Radicals in Human Breast Cancer cells :Correlation with DNA damage. *Chem. Res. Toxicol.*, 7 : 273 – 281.

19- Fadi. I.(2005). Chromosomal changes in Uroepithelial carcinomas, *Cell and Chromosomes*, 4 : 1 – 9.

20- Garry, V.; Tarone, R.; Long, L.; Kelly, J. and Burroughs, B.(1996). Pesticide Appliers with mixed Pesticide exposure : G – banded analysis and possible Relationship to non- Hodgkin's Lymphoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers & Prevent.*, 5 :11- 16.

21- Strachan, T. and Read, A.(1999). Human Molecular Genetics. BIOS Scientific Publishers, Ltd.

22- Limoli, G.; Giedzinski, E.; Morgan, W.; Stwarts, S.; Jones, G. and Hyun, W.(2003). Presistence Oxidative stress in Chromosomally unstable Cells. *Cancer Res.*, 63:3107 – 3111.

23- Fricke, R.(2000). Evaluation of the Carcinogenic Potential of Diclofop – methyl, cancer assessment document. *Environ.Health Perspect,*. 108:19 – 32.

24- Sarm, R. and Binkova, B.(2000). Molecular Epidemiology Studies on Occupational and Environmental exposure to Mutagens and Carcinogens. *Environ. Health Perspect*,108 :57 – 70.

25- Philips.T.(2000). Assessing Environmental Exposure in Children: Immunotoxicology screening. *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.*, 10:769 – 775.

26- Daniel, V.; Huber, K.; Bauer, K.; Suesal, C.; Mytilineos, J.; Melk, A.; Conradt, C. and Opelz, G.(2001). Association of elevated Levels of Pentachlorophenol (PCP) with cellar and humoral Immnuodeficiencies. *Arch. Environ. Health,* 5:77 – 83.