

تأثیر دورسبان بر روی هورمون های جنسی و تغییرات بافتی بیضه در موش های آزمایشگاهی

اسماعیل فتاحی (PhD)^{۱*}، سید غلامعلی جورسرای (PhD)^۲، علی اکبرمقدم نیا (PhD)^۳

۱- گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت اله املی
۲- مرکز تحقیقات باروری و ناباروری حضرت فاطمه الزهرا (س)، دانشگاه علوم پزشکی بابل
۳- گروه فارماکولوژی و فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بابل

دریافت: ۹۱/۳/۲۳، اصلاح: ۹۱/۶/۸، پذیرش: ۹۱/۱۰/۱۷

خلاصه

سابقه و هدف: دورسبان (کلروپیریفوس)، از متداول ترین سموم ارگانوفسفره ای است که برای کنترل آفت گیاهان مورد استفاده قرار می گیرد. مکانیسم اصلی این گونه ترکیبات، مهار آنزیم کولین استراز بوده و ممکن است بر روی سیستم تولید مثلی، تأثیر منفی داشته باشند. با توجه به استفاده آن در کشاورزی و ضرر احتمالی این سم، تأثیر آن بر روی هورمون های جنسی و تغییرات بافتی در بیضه موش سفید کوچک مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روشها: در یک مطالعه تجربی، ۴۰ سر موش نر بالغ آزمایشگاهی به چهار گروه مساوی شامل کنترل، شم، آزمایشی ۱ و ۲ تقسیم شدند. حیوانات در گروههای تجربی، سم دورسبان را با دوز مکرر ۱۵mg/kg و ۳۰mg/kg به صورت داخل صفاقی به مدت یک ماه (پنج روز اول هفته) دریافت نمودند. به گروه شم روغن زیتون تزریق گردید. گروه کنترل تزریقی نداشتند. با تهیه برش های بافتی از بیضه، رده های مختلف سلولهای اسپرماتوژنیک و سلولهای لایدیگ و قطر لوله های اسپرم ساز با استفاده از عدسی چشمی مدرج اندازه گیری شدند. قطر بیضه نیز توسط میکرومتر اندازه گیری شد. هورمون های گونادوتروپین و تستوسترون با استفاده از روش radioimmunoassay بدست آمدند. سپس داده ها تجزیه و تحلیل شدند.

یافته ها: میزان هورمون های گونادوتروپین و تستوسترون در گروههای آزمایشی ۱ و ۲، کاهش معنی داری نسبت به گروه کنترل و شم پیدا نمود ($p < 0.05$). تعداد سلولهای اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت های اولیه و ثانویه، اسپرماتیدها و سلولهای لایدیگ، قطر بیضه و قطر لوله های اسپرم ساز نیز کاهش معنی داری را در گروههای آزمایشی ۱ و ۲، نسبت به گروه کنترل و شم و همچنین در گروه آزمایشی ۲ نسبت به گروه آزمایشی ۱، نشان داد ($p < 0.05$).

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که احتمالاً سم دورسبان، می تواند باعث کاهش هورمون های جنسی شده و با تخریب بافت بیضه، یکی از عوامل ناباروری تلقی گردد.

واژه های کلیدی: دورسبان، بافت بیضه، اسپرماتوگونی، تستوسترون، گنادوتروپین.

مقدمه

رنگ سفید تا کهربایی، که بویی ملایم مثل گوگرد دارد. به طور گسترده ای در باغات و مزارع کشاورزی، برای کنترل و از بین بردن انواع حشرات و آفت درختان میوه و گیاهان گلدار به کار می رود. مقادیر زیادی از این گونه سموم در خاک، آب و حتی گیاهان، برای ماهها و سال ها ممکن است باقی بمانند (۴). لذا تماس با آنها که به عنوان یکی از مشکلات مهم بهداشتی مطرح است (۵)، می تواند سیستم ایمنی بدن را تحت تأثیر قرار داده (۶) و یا اینکه باعث استرس های

انواع مختلفی از ترکیبات شیمیایی سنتز شده در محیط زیست یافت می شوند که فرآیند تولید آنها مدرنیزه بوده و در کشاورزی و دفع آفات از جمله بلاست و یا کرم ساقه خوار، مورد استفاده قرار می گیرند. از متداول ترین ترکیبات شیمیایی که در کشاورزی به کار می روند، سموم ارگانو فسفره هستند (۱و۲). دورسبان یا کلروپیریفوس با فرمول شیمیایی $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$ از گروه سموم آلی فسفره غیر سیستمیک است (۳). ماده ای است جامد، کریستالی و به

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی به شماره ۵۲۳۹۱۹۰۰۵۰۱۰۰۱ دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت اله املی می باشد.

* مسئول مقاله:

آدرس: امل، جاده قدیم امل - بابل، فرعی دانشگاه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت اله املی، تلفن: ۰۱۲۱-۲۵۱۷۳۲۰

e-mail: e.fattahi@iauamol.ac.ir

امکان وجود دارد که از طریق فسفوریلاسیون پروتئین های هسته سلول، ساختار کروماتین اسپرم را تغییر داده و بر روی بقا، حرکت و مورفولوژی اسپرم، مخصوصا در مراحل نهایی بلوغ آن، اثر منفی بگذارند (۲۹). به نظر می رسد سموم ارگانوفسفره باعث جهش در ژنها، افزایش در تبادلات کروموزومی، اثر منفی بر روی تمایز و بقای سلولی، توقف تقسیم میتوزی در طی رشد و نمو و صدمه به DNA شود (۳۰). همچنین کاهش تعداد اسپرم در بیضه و اپیدیدیم، تغییرات دژنراتیو لوله های اسپرم ساز (۳۱)، افزایش ناهنجاری در ساختار اسپرم، مرگ اسپرم و کاهش میزان باروری از جمله مواردی هستند که در بعضی از مطالعات به آنها اشاره شده است (۳۲).

با توجه به نتایج به دست آمده از پژوهش های گوناگونی که در مورد تاثیر منفی سموم مختلف ارگانوفسفره مثل دیازینون، هینوزان و یا کارباریل، صورت پذیرفته است، این موضوع طراحی گردید تا تاثیر یکی دیگر از سموم ارگانوفسفره، به صورت آنچه که توسط کشاورزان و باغداران، مورد استفاده قرار می گیرد، و همچنین با رعایت دوز کشنده ولی نزدیک به دوز مورد استفاده آن، به صورت مقطعی و بر روی ساختار بافت بیضه و هورمونهای جنسی، در موشهای آزمایشگاهی بررسی شود.

مواد و روشها

تهیه حیوانات: برای انجام این مطالعه از ۴۰ سر موش نر بالغ آزمایشگاهی نژاد NMRI با وزن متوسط 30 ± 5 گرم و سن متوسط ۱۰ تا ۱۲ هفته، که از انستیتو پاستور تهران تهیه شده بودند، استفاده گردید. حیوانات بطور تصادفی به ۴ گروه هشت تایی شامل گروههای آزمایشی ۱، آزمایشی ۲، کنترل و شم تقسیم گردیدند. حیوانات در قفس های استاندارد و دمای ۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. همگی در شرایط مناسب از نظر نور (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) قرار داشتند. اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی زیر نظر کمیته اخلاق در پزشکی معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی آمل انجام پذیرفت.

تهیه و تزریق سم: دورسبان مورد استفاده در این مطالعه ساخت شرکت Agrifar بلژیک بود. سم ابتدا در روغن زیتون حل گردید. حیوانات در گروه تجربی ۱ و ۲، سم دورسبان را به ترتیب با دوزهای ۱۵mg/kg و ۳۰mg/kg به مدت یک ماه (پنج روز اول هفته) بصورت داخل صفاقی دریافت نمودند. گروه شم تنها روغن زیتون (به میزان یک سی سی روغن زیتون) دریافت کردند و گروه کنترل نیز هیچگونه تزریقی نداشتند. یک هفته بعد از پایان تزریق، نمونه برداری از تمام گروهها، تحت بیهوشی عمومی انجام پذیرفت.

تهیه نمونه بافت: جهت مطالعات بافت شناسی، بیضه ها به دقت از بدن خارج شدند. بعد از شستشو و خشک کردن، توزین و در محلول فیکساتیو ده درصد فرمالین قرار گرفتند. پس از انجام مراحل تهیه بافت، قسمت میانی بیضه انتخاب و برش هایی به ضخامت پنج میکرون و به صورت سریال تهیه گردید. تمام برشها با همتوکسیلین و اتوزین رنگ آمیزی شدند. سپس رده های مختلف سلولی شامل اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت ها، اسپرماتید و سلول های لاییدگ و همچنین قطر لوله های اسپرم ساز، با استفاده از گراتیکول یا صفحه چشمی (eye piece) که بر روی عدسی چشمی میکروسکوپ نوری سوار می گردد، در واحد سطح و با

اکسیداتیو و یا اختلالات رفتاری گردد (۷). مکانیسم اصلی آن، مهار آنزیم استیل کولین استراز بوده و با توجه به نقش این آنزیم در سیستم عصبی، می تواند باعث آسیب این بافت شود (۸). سموم ارگانوفسفره ممکن است از طریق مخاط، پوست، سیستم تنفسی و یا دستگاه گوارش، جذب بدن شوند (۹). این امکان وجود دارد که انسان از طریق آلودگی شغلی خود، مانند کشاورزی، آلوده بودن مواد غذایی و یا محیطی که در آن زندگی می کند، در معرض سموم مختلف قرار بگیرد (۱۰). میزان تاثیر این گونه مواد شیمیایی به نوع سم، مدت زمان اثر و ساختار سلولی بافت مورد نظر بستگی دارد (۱۱).

بیش از ۷۰ درصد از سم دورسبان در داخل بدن به متابولیت های فعال تبدیل شده (۱۲) و از طریق کلیه ها دفع می شوند. ولی باقیمانده آن در بعضی از بافتهای بدن تجمع پیدا کرده و ممکن است بر روی اندام های مختلفی مثل مغز، کبد و سیستم تولید مثلی بویژه بیضه و اپیدیدیم تاثیر منفی بر جای گذارد (۱۳و۱۴). پایداری آن در خاک تا حدودی طولانی بوده و معمولا بمدت ۱۲ تا ۶۰ روز به صورت فعال در خاک و بین ۱۰ تا ۱۴ روز بر روی برگ گیاهان باقی می ماند (۱۵). دوز کشنده آن برای انسان، حدود ۱۳۵ تا ۱۶۵ میلی گرم بر هر کیلو گرم وزن بدن تخمین زده می شود (۱۶). گرچه راههای زیادی برای مقابله با آن و سم زدایی وجود دارد، ولی هیچک از این راهها نمی تواند آلودگی محیط را کاملا از بین ببرد و حتی ممکن است، آسیب جدیدی را به محیط زیست وارد سازد (۱۷).

بعضی از گزارشات حاکی از تاثیر آن بر روی سلولهای جنسی نر و احتمال افزایش ناهنجاری در ساختار اسپرم می باشد (۱۸و۱۹). عده ای نیز بر این باورند که، ممکن است دورسبان سطح هورمون های تستوسترون، FSH و LH را در رت کاهش داده و تغییراتی در روند تشکیل سلولهای گامت و یا سلول های مربوط به لایه ژرمینال ایجاد کند (۲۰). کاهش آنزیم های آنتی اکسیدانی مثل سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز و یا گلوکاتایون پراکسیداز و متعاقبا کاهش فعالیت آنزیم های استروئیدوژنیک نیز از جمله مواردی هستند که پس از در معرض قرار گرفتن با دورسبان مشاهده شده است (۲۱). معمولا دورسبان باعث تغییر خاصی در وزن نسبی اندام های حیاتی بدن نمی شود، به جز اینکه باعث افزایش در وزن غده فوق کلیوی شده و در مقابل، وزن بیضه را کاهش می دهد. البته محققین در این زمینه معتقدند که دورسبان مقادیر اسید سیالیک و کلسترول بیضه و تری گلیسرید سرم خون را افزایش داده و پروتئین تام و گلوکز را نیز به طور چشمگیری کاهش می دهد (۲۲).

بعضی نیز گزارش کرده اند که احتمالا سموم ارگانوفسفره، تعداد اسپرماتیدهای طبیعی را کاهش داده (۲۳) و متعاقبا باعث افزایش تعداد اسپرماتیدهای غیر طبیعی، سلول های آپوپتوتیک و اووسیت های لقاح نیافته می شوند و یا اینکه باعث تغییراتی در الگوی بیان ژنی فرآیند اسپرماتوژنزیس می گردند (۲۴). عده ای هم، پراکسیداسیون لیپیدها و تولید رادیکال های آزاد از قبیل اکسیژن های واکنش پذیر حاصل از متابولیسم سم دورسبان و واکنش با ماکرومولکول های سلولی مانند پروتئین ها، اسیدهای نوکلئیک و لیپیدها را به عنوان مکانیسم اصلی در تخریب سلول و القای مرگ سلولی در بافت های مختلف بدن پیشنهاد می کنند (۲۷-۲۵).

سموم ارگانوفسفره، تمایز جنسی گنادها و رشد و نمو دستگاه تولید مثلی را از طریق تاثیر بر سیستم آندوکروینی آن ممکن است تغییر دهند (۲۸). همچنین این

تعداد سلول های اسپرماتوگونی و اسپرماتوسیت ها: تعداد سلولهای اسپرماتوگونی در گروههای آزمایشی ۱ و ۲ (به ترتیب $6/62 \pm 0/19$ و $6/09 \pm 0/19$) نسبت به گروههای کنترل و شم (به ترتیب $7/43 \pm 0/31$ و $7/50 \pm 0/29$) کاهش معنی داری یافت ($p < 0/05$). این اختلاف بین دو گروه کنترل و شم دارای تفاوت معنی داری نبود. ولی اختلاف معنی داری بین دو گروه آزمایشی ۱ و ۲ دیده شد ($p < 0/05$).

همچنین بررسی میکروسکوپی مقاطع بافت بیضه نشان داد که تعداد اسپرماتوسیت ها در دو گروه آزمایشی ۱ و ۲ (به ترتیب $32/89 \pm 0/96$ و $35/81 \pm 0/19$) نسبت به دو گروه کنترل و شم (به ترتیب $31/87 \pm 0/82$ و $35/70 \pm 0/26$) تفاوت معنی داری پیدا کرده است. همچنین تعداد سلول های اسپرماتوسیت، در گروه آزمایشی ۲ نسبت به گروه آزمایشی ۱، کاهش بیشتری از خود نشان داد که از نظر آماری معنی دار بود ($p < 0/05$) (جدول ۲).

تعداد اسپرماتیدها و سلولهای لایدیگ: مقایسه برش های تهیه شده از نمونه های مربوط به گروه های مختلف نشان داد که تفاوت معنی داری بین گروههای آزمایشی، کنترل و شم وجود دارد. تعداد اسپرماتیدها در گروههای آزمایشی ۱ و ۲ (به ترتیب $10/15 \pm 0/25$ و $9/23 \pm 0/18$)، در مقایسه با دو گروه کنترل و شم (به ترتیب $12/32 \pm 0/24$ و $12/40 \pm 0/20$)، کاهش معنی داری پیدا کرده است ($p < 0/05$). همچنین کاهش معنی داری بین سلولهای لایدیگ در دو گروه آزمایشی ۱ و ۲ (به ترتیب $7/76 \pm 0/43$ و $6/81 \pm 0/54$) با دو گروه کنترل و شم (به ترتیب $10/67 \pm 0/45$ و $10/60 \pm 0/50$) مشاهده شد ($p < 0/05$). کاهش تعداد اسپرماتیدها و سلولهای لایدیگ در گروه آزمایشی ۲ نسبت به گروه آزمایشی ۱، نیز معنی دار بود (جدول ۲).

سنجش هورمونهای پلازما: غلظت پلاسمایی هورمون تستوسترون در گروههای تجربی ۱ و ۲ (به ترتیب $10/25 \pm 0/68$ و $9/78 \pm 0/70$)، نسبت به گروههای کنترل و شم (به ترتیب $13/65 \pm 0/87$ و $13/53 \pm 0/84$)، کاهش معنی داری پیدا نمود ($p < 0/05$). میزان غلظت هورمون LH نیز در گروههای آزمایشی ۱ و ۲ (به ترتیب $3/34 \pm 0/18$ و $3/03 \pm 0/20$)، نسبت به گروههای کنترل و شم (به ترتیب $4/50 \pm 0/24$ و $4/41 \pm 0/21$)، کاهش معنی داری پیدا کرد ($p < 0/05$). همچنین کاهش معنی داری در میزان هورمون FSH در گروه های آزمایشی ۱ و ۲ (به ترتیب $2/71 \pm 0/20$ و $2/23 \pm 0/17$)، نسبت به دو گروه کنترل و شم (به ترتیب $3/82 \pm 0/19$ و $3/75 \pm 0/22$)، مشاهده شد ($p < 0/05$). کاهش میزان هورمون های LH، FSH و تستوسترون در گروه آزمایشی ۲ نسبت به گروه آزمایشی ۱ نیز معنی دار بود (جدول ۳).

Interval سه، شمارش و اندازه گیری شدند. در هر مقطع از برش بافت، سه ناحیه انتخاب گردید و در مجموع حدود ۱۰۰ فیلد مورد ارزیابی قرار گرفت. قطر بیضه نیز از طریق ریزسنج اندازه گیری شد (۳۳).

روش اندازه گیری: گراتیکول یا صفحه چشمی مدرج (eye piece)، یک صفحه صد خانه ای است که با مقیاس 10×10 تقسیم شده است. شمارش سلولها بر اساس قرار گرفتن آنها در داخل خانه ها صورت می پذیرد. از لبه صفحه مدرج برای اندازه گیری قطر لوله های اسپرم ساز استفاده گردید (۳۴).

اندازه گیری هورمونها: خون از ناحیه زیر بغل و از طریق باز کردن عروق آگزیلاری، کاملاً جمع آوری شده و سپس سرم خون با استفاده از سانتریفیوژ، به مدت ۱۵ دقیقه و با دور ۳۰۰۰، جدا گردید. با استفاده از روش (Radioimmunoassay) و کیت هورمونی LH و FSH تهیه شده از شرکت کاوشیار ایران و کیت Spectria ساخت کشور فنلاند، هورمون های LH، FSH و تستوسترون، اندازه گیری شدند.

آنالیز داده ها: داده های بدست آمده، به کمک نرم افزار SPSS و با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA و Tukey's HSD مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و $p < 0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

قطر و وزن نسبی بیضه: وزن نسبی بیضه در دو گروه آزمایشی ۱ و ۲ (به ترتیب $7/23 \pm 0/24$ گرم و $6/94 \pm 0/45$ گرم) و همچنین قطر بیضه در دو گروه آزمایشی ۱ و ۲ (به ترتیب $8/23 \pm 0/34$ میلی متر و $7/89 \pm 0/36$ میلی متر)، پس از تزریق داخل صفاقی دورسان، نسبت به وزن و قطر بیضه در گروه کنترل (به ترتیب $8/19 \pm 0/41$ گرم و $9/46 \pm 0/53$ گرم) و وزن و قطر بیضه در گروه شم (به ترتیب $8/07 \pm 0/33$ و $9/32 \pm 0/62$ میلی متر)، کاهش معنی داری پیدا کرد ($p < 0/05$). اختلاف بین قطر بیضه و وزن نسبی آن در گروه کنترل، نسبت به گروه شم معنی دار نبود (جدول ۱).

قطر لوله های اسپرم ساز: قطر لوله های اسپرم ساز در دو گروه آزمایشی ۱ و ۲ (به ترتیب $66/48 \pm 1/41$ میکرومتر و $64/52 \pm 1/28$ میکرومتر)، نسبت به دو گروه کنترل و شم (به ترتیب $71/12 \pm 1/56$ میکرومتر و $70/74 \pm 1/45$ میکرومتر)، کاهش معنی داری پیدا کرده است ($p < 0/05$). همچنین تفاوت اندازه قطر لوله های اسپرم ساز، بین دو گروه آزمایشی ۱ و ۲، نیز معنی دار بود ($p < 0/05$)، (جدول ۱).

جدول ۱. میانگین قطر لوله اسپرم ساز، وزن نسبی و قطر بیضه در گروههای آزمایشی دریافت کننده دورسان، کنترل و شم در موش

پارامترها (واحد)	وزن نسبی بیضه (گرم)	قطر بیضه (میلی متر)	قطر لوله های اسپرم ساز (میکرومتر)
کنترل	$8/19 \pm 0/41$	$9/46 \pm 0/53$	$71/12 \pm 1/56$
شم	$8/07 \pm 0/33$	$9/32 \pm 0/62$	$70/74 \pm 1/45$
گروه تجربی ۱ (15 mg/kg)	$7/23 \pm 0/24$	$8/23 \pm 0/34$	$66/48 \pm 1/41$
گروه تجربی ۲ (30 mg/kg)	$6/94 \pm 0/45$	$7/89 \pm 0/36$	$64/52 \pm 1/28$
P value	$p < 0/05$	$p < 0/05$	$p < 0/05$

جدول ۲. میانگین رده های سلولی در فرآیند اسپرماتوژنیز و سلول های لایدیگ در گروههای آزمایشی دریافت کننده دورسبان، کنترل و شم در موش

پارامترها (واحد سطح)	اسپرماتوگونی ها	اسپرماتوسیت ها	اسپرماتید گرد	سلولهای لایدیگ
کنترل	۷/۴۳±۰/۳۱	۳۵/۸۱±۱/۱۹	۱۲/۳۲±۰/۲۴	۱۰/۶۷±۰/۴۵
شم	۷/۵۰±۰/۲۹	۳۵/۷۰±۱/۲۶	۱۲/۴۰±۰/۲۰	۱۰/۶۰±۰/۵۰
گروه تجربی ۱ (۱۵mg/kg)	۶/۶۲±۰/۲۲	۳۲/۸۹±۰/۹۶	۱۰/۱۵±۰/۲۵	۷/۷۶±۰/۴۳
گروه تجربی ۲ (۳۰mg/kg)	۶/۰۹±۰/۱۹	۳۱/۸۷±۰/۸۲	۹/۲۳±۰/۱۸	۶/۸۱±۰/۵۴
P value	p<۰/۰۵	P<۰/۰۵	p<۰/۰۵	p<۰/۰۵

جدول ۳. میانگین هورمونهای تستوسترون، LH و FSH در گروههای آزمایشی دریافت کننده دورسبان، کنترل و شم

پارامترها (واحد سطح)	میزان LH (U/L)	میزان FSH (IU/L)	میزان تستوسترون (Nmol/L)
کنترل	۴/۵±۰/۲۴	۳/۸۲±۰/۱۹	۱۳/۶۵±۰/۸۷
شم	۴/۴۱±۰/۲۱	۳/۷۵±۰/۲۲	۱۳/۵۳±۰/۸۴
گروه تجربی ۱ (۱۵mg/kg)	۳/۳۴±۰/۱۸	۲/۷۱±۰/۲۰	۱۰/۲۵±۰/۶۸
گروه تجربی ۲ (۳۰mg/kg)	۳/۰۳±۰/۲۰	۲/۲۳±۰/۱۷	۹/۷۸±۰/۷۰
P value	p<۰/۰۵	P<۰/۰۵	p<۰/۰۵

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه، کاهش معنی داری در تعداد سلول های اسپرماتوژنیک و سلولهای لایدیگ بین گروههای آزمایشی، نسبت به گروههای کنترل و شم و همچنین بین گروه آزمایشی ۲ نسبت به گروه آزمایشی ۱، مشاهده گردید. یافته های این مطالعه حاکی از کاهش قطر بیضه و لوله های اسپرم ساز می باشد. نتایج نشان می دهد که، هورمون های LH، FSH و تستوسترون در گروههای آزمایشی، نسبت به گروه کنترل و شم کاهش معنی داری پیدا کرده است. گروه آزمایشی ۲ هم، که سم را با دوز بیشتری دریافت کرده بود، نسبت به گروه آزمایشی ۱، کاهش معنی داری یافته است. وزن بیضه نیز کاهش پیدا کرد. این نتایج با مطالعات بعضی از محققین، که در آن دریافت ارگانوفسفره ها را دلیلی برای آتروفی شدن بافت بیضه ها تلقی کرده بودند، مطابقت دارد (۲۲). باید در نظر داشت که این گونه عوارض تنها به بافت بیضه اختصاص ندارد، بلکه اندام های دیگری از بدن، مثل تخمدان، سمینال ویکول، پروستات و تیروئید نیز ممکن است تحت تاثیر قرار گرفته و موجب کاهش وزن آنها شود (۳۵). از عوامل دیگری که باعث کاهش وزن و یا قطر بیضه می شود، می توان به واکنش اینگونه سموم با ماکرومولکولهای یک سلول، ایجاد رایکال های آزاد و افزایش پراکسیداسیون اشاره نمود (۳۶ و ۳۷).

مطالعات مختلفی در مورد اثر سموم ارگانوفسفره بر روی بیضه، بخصوص بر روی میزان هورمون تستوسترون و هورمون های گنادوتروپین انجام پذیرفته، که بیانگر اختلالات پیشرونده در بافت بیضه و احتمال آسیب، در روند اسپرماتوژنیز می باشد (۳۸). این گونه اختلالات با افزایش دوز سم و مدت زمانی که در معرض

آن قرار می گیرد، می تواند ارتباط مستقیم داشته باشد. در مطالعه ما نیز افزایش دوز دورسبان، موجب اختلالات بیشتری در بافت بیضه شده و تخریب رده های سلولی، این نظریه را قوت می بخشد که دوز بالا می تواند حاکی از آن باشد، که تاثیر سموم ارگانوفسفره می تواند وابسته به دوز بوده و در صورتیکه بیشتر از حد مجاز خود در دفع آفات مورد استفاده قرار گیرد، ممکن است، منشاء بسیاری از آسیب هایی باشد که به نوعی سیستم تناسلی را درگیر سازند. همچنین کاهشی که در هورمون های جنسی دیده می شود (۳۹)، خود دلیل دیگری است که احتمال این آسیب را افزایش می دهد. بعضی از بررسی ها نشان می دهد که ترکیبات آلی فسفره، بر روی سلولهای زایای بافت بیضه اثر منفی گذاشته و در نهایت این احتمال وجود دارد تا در اثر آسیب به روند اسپرماتوژنیز، تعداد اسپرم ها نیز کاهش پیدا کنند (۴۰). لذا نتایج به دست آمده از این پژوهش نیز می تواند تداعی کننده این مطلب باشد که با کند شدن روند اسپرماتوژنیز، رده های سلولی مخصوصا در لایه ژرمینال، دستخوش یک سری تغییراتی شده اند که نهایتا کاهش تعداد اسپرم را به دنبال داشته است. از طرفی این نظریه هم وجود دارد که ارگانوفسفره ها می توانند با تاثیر منفی بر روی غدد درون ریز، باعث اختلال در ترشح بعضی از هورمون ها شوند (۴۱). به همین دلیل، دورسبان که یک نوع ارگانو فسفره است، احتمالا می تواند با تاثیر بر روی هورمون های گنادوتروپین و یا تستوسترون (۴۲)، شروع و دوام اسپرماتوژنیز، را دچار آسیب نماید (۴۳). در این حالت، نقص در مراحل اسپرماتوژنیز و کاهش تعداد اسپرم، دور از انتظار نخواهد بود. همچنین، کاهش در وزن و قطر بیضه، احتمالا به علت کاهش در سلول های مختلف جنسی و سلول های لایدیگ آن می تواند باشد، که نتایج این

پرولاکتین را مهار کرده و سبب کاهش ترشح این هورمون ها می شوند (۵۰). البته هورمون LH نقش مهمی در شروع و ادامه تخریب مراحل مختلف اسپرماتوژنیز داشته و چون این هورمون سلول های لایدیگ را وادار به ترشح تستوسترون می کند. لذا با توجه به اینکه هورمون LH و سلول های لایدیگ در این مطالعه کاهش یافته اند، بدنبال آن تولید هورمون تستوسترون نیز کاهش خواهد یافت، در همین راستا تحقیقات زیادی وجود دارد که معتقدند، سموم ارگانوفسفره، خاصیت ضد آندروژنی داشته و ممکن است بر روی تمایز جنسی اثر منفی بگذارند (۲۸). یا اینکه با مهار تولید استروئیدها (۱۳)، مستقیماً بر روی سلول های لایدیگ اثر گذاشته و باعث کاهش هورمون تستوسترون شوند (۵۱). اینگونه ترکیبات با ایجاد رادیکالهای آزاد و اکسیژن های واکنش پذیر و تخریب DNA و RNA سبب القای مرگ سلولی و آتروفی شدن سلولهای لایدیگ می شوند (۵۲).

با توجه به نتایجی که از مطالعه ما بدست آمده است، مشاهده می شود که، کاهش هورمون تستوسترون، ارتباط مستقیمی با کم شدن تعداد سلولهای لایدیگ پیدا کرده است. تستوسترون که از سلولهای لایدیگ ترشح می شود، برای رشد و تقسیم سلولهای زایای بیضه در مرحله اول ساخت اسپرم ضروری است. لذا می توان گفت، همراه با کاهش این هورمون که شاهد کاهش سلولهای ژرمینال و لایدیگ بوده ایم، این امکان وجود دارد که در دراز مدت سمومی مثل دورسبان باعث گردند تا با تغییر در ساختار بیضه و تخریب سلول های جنسی، یک ناباروری ثانویه در فرد ایجاد گردد. باید در نظر داشت که، هورمون محرک فولیکول (FSH) از غده هیپوفیز قدامی ترشح می شود و گیرنده های آن روی سلولهای سرتولی می باشند. استرادیول از هورمون هایی است که سبب تولید این هورمون از غده هیپوفیز می شود. با توجه به مطالعات دیگر که ترشح استرادیول در اثر این سم کاهش یافته است می توان چنین استنباط کرد که تغییر در استرادیول، کاهش در تولید FSH را به همراه خواهد داشت (۱۳). لذا ممکن است مکانیسم اثر دورسبان و سموم دیگر بر آندوکراین و بافت بیضه از چند طریق صورت گیرد، که می توان به افزایش در کاتابولیسم هورمون های استروئیدی، اثر بر سیستم آندوکرینی و تخریب محور آن، اثر مستقیم بر بافت بیضه و سلولهای تولید کننده این هورمون ها و اثر بر مسیر سیگنالی cAMP اشاره نمود (۳۷ و ۴۴ و ۲۲). حال با توجه به این که ممکن است سم دورسبان باعث کاهش سلول های ژرمینال و متعاقب آن تولید اسپرم گردد، می توان پی برد که بافت های بدن از حساسیت ویژه ای نسبت به این سموم برخوردارند.

یافته های این مطالعه و مطالعات دیگران، بیانگر آنست که سموم شیمیایی همانند دورسبان احتمالاً با اثر بر بافت بیضه و یا غدد آندوکراین که مسئول تولید هورمون های گنادوتروپین و تستوسترون هستند، بر روی باروری انسان اثر منفی داشته و افراد را بسمت یک ناباروری نا خواسته سوق می دهند. لذا بایستی در مصرف اینگونه ترکیبات نظارت بیشتری صورت پذیرد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از حمایت مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت الله آملی و از تمامی افرادی که در این مطالعه ما را یاری نمودند، تشکر و قدرانی می گردد.

مطالعه نیز آنرا تایید می نماید. در این راستا، بعضی از محققین، گزارش کردند که سموم ارگانوفسفره ای مانند دورسبان، ممکن است بر فعالیت های گامت زایی و تولید هورمون های استروئید، تاثیر منفی برجای گذاشته و موجب کاهش هورمون های گنادوتروپین و یا تستوسترون شود (۴۴).

در مطالعه ما نیز مشخص گردید که سم دورسبان باعث تخریب رده های مختلف سلولهای اسپرماتوژنیک در داخل لوله های اسپرم ساز شده و تعداد آنها در واحد سطح کاهش پیدا کرده است. این نتیجه با آنچه بر روی مدل های حیوانی صورت پذیرفته (۴۲) تا حدود زیادی مطابقت داشته و چنین استنباط می شود که افزایش دوز این سم بر بافت بیضه می تواند سبب کاهش بیشتری در تعداد سلولهای اسپرماتوژنیک و یا دیگر پارامترهای آن گردد (۴۵). به نظر می رسد سموم ارگانوفسفره، با توقف تقسیم میتوزی و القای مرگ سلولی باعث کاهش سلولهای ژرمینال شود. از آنجائیکه این سلولها در فرآیند اسپرماتوژنیز بسیار ضروری هستند، لذا کاهش این سلولها، لزوماً رده های سلولی مثل اسپرماتوگونی ها را تحت تاثیر قرار داده و نهایتاً منجر به کاهش تعداد اسپرم خواهد گردید. از جمله یافته های مطالعه حاضر، کاهش قطر لوله های اسپرم ساز بود. نتیجه این مطالعه با گزارش برخی از محققین که بعضی از ارگانوفسفره ها را باعث نکروزه شدن و یا تغییر دژنراتیو در لوله های اسپرم ساز می دانند (۳۶ و ۳۷)، مطابقت دارد. البته، احتمال اینکه، تغییر در کاهش قطر لوله ها به علت کم شدن سلولهای اسپرماتوژنیک در اثر نکروزه شدن آنها باشد را نمی توان نادیده گرفت. بعضی از محققین معتقدند که ارگانوفسفره ها، باعث افزایش آپوپتوز سلولی، پراکسیداسیون لیپیدی و آسیب به DNA شده و همچنین موجب مهار فعالیت آنزیم آنتی اکسیدان ها از قبیل سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز شده و به دنبال آن باعث اکسیداسیون لیپیدها و پروتئین های سیتوپلاسمی می شود و با افزایش استرس اکسیداتیو، مرگ سلولی را در بافت بیضه، القا می کند (۲۷). از آنجائیکه دورسبان به عنوان یک ترکیب آنتی آندروژنیک شناخته شده است. شاید بتواند کاهش چشمگیری در بیوسنتز تستوسترون از طریق سلول های لایدیگ بوجود آورد. همچنین این امکان وجود دارد که دورسبان سبب کاهش بیان آنزیم های استروئیدزیک از قبیل سیتوکروم P450 و پروتئین تنظیم کننده استروئید شود. یا موجب کاهش گیرنده های LH محرک تولید cAMP گردد. لذا آفت کش ها با تاثیر بر روی بیوسنتز آندروژن ها به عنوان یک تهدید جدی برای سیستم تولید مثلی به حساب می آیند (۴۷ و ۴۸).

در این مطالعه تعداد سلول های زایا، اسپرماتوسیت و اسپرماتیدها کاهش چشمگیری داشته اند. به نظر می رسد سموم کشاورزی از قبیل دورسبان از دو مسیر باعث اختلال در روند اسپرماتوژنیز می شوند. یا با تاثیر مستقیم بر روی بافت بیضه و آتروفی نمودن سلول ها و مرگ آنها، باعث کاهش رده های سلولی می شوند و یا اینکه، با اختلالاتی که در روند ترشح هورمون های جنسی، منجمله گنادوتروپین ها و تستوسترون پدید می آورند، فرآیند تولید اسپرم را دچار آسیب می سازند (۴۹ و ۲۱). اسپرماتوژنیز روند پیچیده ای است که بر اثر تحریک هورمون های گنادوتروپیک هیپوفیز قدامی و تستوسترون در تمام لوله های منی ساز انجام می پذیرد. در مطالعه ما، هورمون های FSH و LH بعد از تزریق سم دورسبان کاهش پیدا کرده اند. باید در نظر داشت، پروتئین (Steroid Acute Regulatory, StAR) که در سلولهای لایدیگ وجود دارد توسط هورمون LH تحریک می شود و بعضی از ارگانوفسفره ها، مسیر تحریک LH و

Effects of Dursban on Sexual Hormones and Changes of Testis Tissue in Mice

E. Fattahi (PhD)^{1*}, S.G.A. Jorsaraei (PhD)², A.A. Moghadamnia (PhD)³

1. Department of Biology, Islamic Azad University, Ayatollah Amoli Branch, Amol, Iran

2. Fatemeh Zahra Infertility and Reproductive Health Research Center, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

3. Department of Pharmacology & Physiology, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

J Babol Univ Med Sci; 15(3); May 2013; pp: 42-50

Received: Jun 12th 2012, Revised: Aug 29th 2012, Accepted: Dec 28th 2012.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Dursban is the most common organophosphate pesticides that used for control of pests. The main action of this compound is inhibition of cholinesterase enzyme, which adversely effects on reproductive system. Due to the use of pesticides in agriculture and the possible damage, the effect of this toxin on the sexual hormones and changes of testis tissue in mice was studied.

METHODS: In the experimental study, 40 adult male mice were divided into four equal groups including control, sham, experimental (1 and 2) groups. In the experimental groups, animals were intraperitoneally injected with consecutive doses of 15mg/kg and 30mg/kg dursban for one month (five days per week). The olive oil was injected to sham group and control received no injection. Testes tissue sections were prepared to investigate possible changes occurring in the category of spermatogenic, Leydig cells and seminiferous tubule by eye piece (calibrated ocular lens). Diameter of testis was measured by micrometer. Levels of gonadotropin hormones and testosterone were assayed by radioimmunoassay. Then data were analyzed.

FINDINGS: Levels of gonadotropin hormones and testosterone in experimental (1 and 2) groups were significantly declined compared to control and sham group ($p < 0.05$). The number of spermatogonia, primary and secondary spermatocysts, spermatids, Leydig cells, diameter of testis and seminiferous tubule diameter in the experimental (1 and 2) groups compared to control and sham group and also in the experimental 2 group compared to experimental 1 group were decreased ($p < 0.05$).

CONCLUSION: These results demonstrated that dursban can cause the decrease of sexual hormones and damage of testes tissue that is pushing people toward infertility.

KEY WORDS: *Dursban, testis tissue, Spermatogonia, Testosterone, Gonadotropin.*

*Corresponding Author;

Address: Islamic Azad University, Ayatollah Amoli Branch, P.O. Box: 678, Amol, Iran

Tel: +98 121 2517320

E-mail: e.fattahi @iauaamol.ac.ir

References

- 1.Lemaire G, Terouanne B, Mauvais P, Michel S, Rahmani R. Effect of organochlorine pesticides on human androgen receptor activation in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;196(2):235-46.
- 2.Yucra S, Steenland K, Chung A, Choque F, Gonzales GF. Dialkyl phosphate metabolites of organophosphorus in applicators of agricultural pesticides in Majes Arequipa (Peru). *J Occup Med Toxicol* 2006;1:27.
- 3.Buratti FM, De Angelis G, Ricceri L, Venerosi A, Calamandrei G, Testai E. Foetal and neonatal exposure to chlorpyrifos: biochemical and metabolic alterations in the mouse liver at different developmental stages. *Toxicology* 2011;280(3):98-108.
- 4.-Bharathi P, Reddy AG, Reddy AR, Alpharaj M. A study of certain herbs Against chlorpyrifos-induced changes in lipid and protein profile in poultry. *Toxicol Int* 2011;18(1):44-6.
- 5.Katzung BG. Basic & clinical pharmacology. 10th ed. New York: Simon & Schuster Co 2005; p: 948.
- 6.Leoni C, Balduzzi M, Buratti FM, Testai E. The contribution of human small intestine to chlorpyrifos biotransformation. *Toxicol Lett* 2012;215(1):42-8.
- 7.Oruc E. Oxidative stress responses and recovery patterns in the liver of *Oreochromis niloticus* exposed to chlorpyrifos-ethyl. *Bull Environ Contam Toxicol* 2012;88(5):678-84.
- 8.Cole TB, Jansen K, Park S, Li WF, Furlong CE, Costa LG. The toxicity of mixtures of specific organophosphorus compounds is modulated by paraoxonase 1 status. *Adv Exp Med Biol* 2010;660:47-60.
- 9.Oliveira-Silva JJ, Alves SR, Meyer A, et al. Influence of socioeconomic factors on the pesticides poisoning, Brazil. *Rev Saude Publica* 2001;35(2):130-5.
- 10.Handal AJ, Harlow SD, Breilh J, Lozoff B. Occupational exposure to pesticides during pregnancy and neurobehavioral development of infants and toddlers. *Epidemiology* 2008;19(6):851-9.
- 11.Crane AL, Klein K, Zanger UM, Olson JR. Effect of CYP2B6*6 and CYP2C19*2 genotype on chlorpyrifos metabolism. *Toxicology* 2012;293(1-3):115-22.
- 12.Schroeder JC. Metabolic susceptibility to agricultural pesticides and non-Hodgkin's lymphoma. *Scand J Work Environ Health* 2005; 31(Suppl 1):26-32.
- 13.Singh PB, Singh V, Nayak PK. Pesticide residues and reproductive dysfunction in different vertebrates from north India. *Food Chem Toxicol* 2008;46(7):2533-9.
- 14.Carrl RL, Nail CA. Effect of different administration paradigms on cholinesterase inhibition following repeated chlorpyrifos exposure in late preweanling rats. *Toxicol Sci* 2008;106(1):186-92.
- 15.Konda LN, Czinkota I, Füleky G, Morovján G. Modeling of single-step and multistep adsorption isotherms of organic pesticides on soil. *J Agric Food Chem* 2002;50(25):7326-31.
- 16.Dasgupta R, Chakravorty PP, Kaviraj A. Effects of carbaryl, chlorpyrifos and endosulfan on growth, reproduction and respiration of tropical epigeic earthworm, *Perionyx excavatus* (Perrier). *J Environ Sci Health B* 2012;47(2):99-103.
- 17.Casida JE, Quistad GB. Organophosphate toxicology: safety aspects of nonacetylcholinesterase secondary targets. *Chem Res Toxicol* 2004;17(8):983-98.
- 18.Yucra S, Gasco M, Rubio J, Gonzales GF. Semen quality in Peruvian pesticide applicators: association between urinary organophosphate metabolites and semen parameters. *Environ Health* 2008;7:59.
- 19.Padungtod C, Savitz DA, Overstreet JW, Christiani DC, Ryan LM, Xu X. Occupational pesticide exposure and semen quality among Chinese workers. *J Occup Environ Med* 2000;42(10):982-92.
- 20.Swan SH, Kruse RL, Liu F, et al. Semen quality in relation to biomarkers of pesticide exposure. *Environ Health Perspect* 2003;111(12):1478-84.

- 21.Mandal TK, Das NS. Testicular gametogenic and steroidogenic activities in chlorpyrifos insecticide-treated rats: a correlation study with testicular oxidative stress and role of antioxidant enzyme defence systems in Sprague-Dawley rats. *Andrologia* 2012;44(2):102-15.
- 22.Akhtar N, Srivastava MK, Raizada RB. Assessment of chlorpyrifos toxicity on certain organs in rat, *Rattus norvegicus*. *J Environ Biol* 2009;30(6):1047-53.
- 23.Jorsaraei SG, Beiki AA, Yousef Nia Pasha YR, Alizadeh Navaei R. The in vitro effects of hinosan and diazinon on human sperm parameters. *J Babol Univ Med Sci* 2005;7(2):30-4. [in Persian]
- 24.Bustos-Obregon E, Yucra S, Gonzales GF. *Lepidium meyenii* (Maca) reduces spermatogenic damage induced by a single dose of malathion in mice. *Asian J Androl* 2005;7(1):71-6.
- 25.Gupta SC, Mishra M, Sharma A, et al. Chlorpyrifos induces apoptosis and DNA damage in *Drosophila* through generation of reactive oxygen species. *Ecotoxicol Environ Saf* 2010;73(6):1415-23.
- 26.Rush T, Liu XQ, Hjelmhaug J, Lobner D. Mechanisms of chlorpyrifos and diazinon induced neurotoxicity in cortical culture. *Neuroscience* 2010;166(3):899-906.
- 27.Yu F, Wang Z, Ju B, Wang Y, Wang J, Bai D. Apoptotic effect of organophosphorus insecticide chlorpyrifos on mouse retina in vivo via oxidative stress and protection of combination of vitamins C and E. *Exp Toxicol Pathol* 2008; 59(6):415-23.
- 28.Bernabò I, Gallo L, Sperone E, Tripepi S, Brunelli E. Survival, development, and gonadal differentiation in *Rana dalmatina* chronically exposed to chlorpyrifos. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol* 2011;315(5):314-27.
- 29.Sanchez-pena LC, Reyes BE, Lopez-Carrillo L, et al. Organophosphorous pesticide exposure alters sperm chromatin structure in Mexican agricultural workers. *Toxicol Appl Phamacol* 2004;196(1):108-13.
- 30.Saulsbury MD, Heyliger SO, Wang K, Round D. Characterization of chlorpyrifos-induced apoptosis in placental cells. *Toxicology* 2008;244(2-3):98-110.
- 31.Jorsaraei SGA, Firouzjaei AR., Yousofnia Pasha YR, Tahmasbpour Marzoni E, Sarabi E. Histopathological effects of single dose treatment of diazinon on testes structure in rat. *Cell J Yakhteh* 2010;12(1):39-42.
- 32.Joshi SC, Mathur R, Gulati N. Testicular toxicity of chlorpyrifos (an organophosphate pesticide) in albino rat. *Toxicol Ind Health* 2007;23(7):439-44.
- 33.Fattahi E, Parivar K, Jorsaraei SGA, Moghadamnia AA. The effects of Diazinon on testosterone, FSH and LH levels and testicular tissue in mice. *Iran J Reproduc Med* 2009;7(2):59-64.
- 34.Fattahy E, Jorsaraei S G A, Parivar K, Moghaddamnia AA. The long-term effect of hinosan on spermatogenesis on the balb/C mice. *J Gorgan Univ Med Sci* 2008;9(4):5-10.
- 35.Jeong SH, Kim BY, Kang HG, Ku HO, Cho JH. Effect of chlorpyrifos-methyl on steroid and thyroid hormones in rat F0- and F1-generations. *Toxicology* 2006;220(2-3):189-202.
- 36.Zhang Y, Liu CZ, Li XJ, Wang ZL, Zhang HT, Miao ZG. Structures and energies of the radicals and anions generated from chlorpyrifos. *J Mol Model* 2010;16(8):1369-76.
- 37.Giordano G, Afsharinejad Z, Guizzetti M, Vitalone A, Kavanagh TJ, Costa LG. Organophosphorus insecticides chlorpyrifos and diazinon and oxidative stress in neuronal cells in a genetic model of glutathione deficiency. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007;219(2-3):181-9.
- 38.Arcury TA, Grzywacz JG, Chen H, et al. Variation across the agricultural season in organophosphorus pesticide urinary metabolite levels for Latino farmworkers in eastern North Carolina: project design and descriptive results. *Am J Ind Med* 2009;52(7):539-50.
- 39.Blanco-Muñoz J, Morales MM, Lacasaña M, Aguilar-Garduño C, Bassol S, Cebrián ME. Exposure to organophosphate pesticides and male hormone profile in floriculturist of the state of Morelos, Mexico. *Hum Reprod* 2010;25(7):1787-95.

40. Salazar-Arredondo E, de Jesús Solís-Heredia M, Rojas-García E, Hernández-Ochoa I, Quintanilla-Vega B. Sperm chromatin alteration and DNA damage by methyl-parathion, chlorpyrifos and diazinon and their oxon metabolites in human spermatozoa. *Reprod Toxicol* 2008;25(4):455-60.
41. Lacasaña M, López-Flores I, Rodríguez-Barranco M, et al. Association between organophosphate pesticides exposure and thyroid hormones in floriculture workers. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010;243(1):19-26.
42. Recio-Vega R, Ocampo-Gómez G, Borja-Aburto VH, Moran-Martínez J, Cebrian-Garcia ME. Organophosphorus pesticide exposure decreases sperm quality: association between sperm parameters and urinary pesticide levels. *J Appl Toxicol* 2008;28(5):674-80.
43. Gill-Sharma MK, Choudhuri J, D'Souza S. Sperm chromatin protamination: an endocrine perspective. *Protein Pept Lett* 2011;18(8):786-801.
44. Mandal TK, Das NS. Correlation of testicular toxicity and oxidative stress induced by chlorpyrifos in rats. *Hum Exp Toxicol* 2011;30(10):1529-39.
45. Nandi S, Gupta PS, Roy SC, Selvaraju S, Ravindra JP. Chlorpyrifos and endosulfan affect buffalo oocyte maturation, fertilization, and embryo development in vitro directly and through cumulus cells. *Environ Toxicol* 2011;26(1):57-67.
46. Mikhail TH, Aggour N, Awadallah R, Boulous MN, El-Dessoukey EA, Karima AI. Acute toxicity of organophosphorus and organochlorine insecticides in laboratory animals. *Z Ernährungswiss* 1979;18(4):258-68.
47. Viswanath G, Chatterjee S, Dabral S, Nanguneri SR, Divya G, Roy P. Anti-androgenic endocrine disrupting activities of chlorpyrifos and piperophos. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010;120(1):22-9.
48. Gore AC. Environmental toxicant effects on neuroendocrine function. *Endocrine* 2001;14(2):235-46.
49. Mnif W, Ibn Hadj Hassine A, Bouaziz A, Bartegi A, Thomas O, Roig B. Effect of endocrine disruptor pesticides: a review. *Int J Environ Res Public Health* 2011;8(6):2265-303.
50. Aït-Aïssa S, Laskowski S, Laville N, Porcher JM, Brion F. Anti-androgenic activities of environmental pesticides in the MDA-kb2 reporter cell line. *Toxicol In Vitro* 2010;24(7):1979-85.
51. Hemmer MJ, Salinas KA, Harris PS. Application of protein expression profiling to screen chemicals for androgenic activity. *Aquat Toxicol* 2011;103(1-2):71-8.
52. Ayed-Boussema I, Rjiba K, Mnasri N, Moussa A, Bacha H. Genotoxicity evaluation of dimethoate to experimental mice by micronucleus, chromosome aberration tests, and comet assay. *Int J Toxicol* 2012;31(1):78-85.