مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی گرگان / زمستان ۱۳۸۶ / دوره ۹ / شماره ۴ (پی‌درپی ۲۴) / صفحات ۵ تا ۱۰

تحقیقی

تاثیر طولانی مدت سم هینوزان بر روند اسپرماتوژنزیس موش‌های آزمایشگاهی، نژاد Balb/C

دکتر اسماعیل فتاحی[۱]، دکترسیدغلامعلی جورسرایی[۲]، دکترکاظم پریور[۳]، دکترعلی اکبرمقدم نیا[۴]

۱- استادیار گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت‌الله آملی. ۲- استادیار گروه آناتومی و جنین‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی بابل.

۳- استاد گروه زیست‌شناسی جانوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران. ۴- استاد گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی دانشگاه علوم پزشکی بابل.

چکیده

زمینه و هدف : *هینوزان یکی از سموم ارگانوفسفره است که مکانیسم اصلی آن مهار فعالیت آنزیم استیل‌کولین‌استراز بوده و روی اندام‌های جنسی اثر تخریبی دارد. با توجه به مصرف فراوان این سم در مزارع برنج و باغ مرکبات و ضرر احتمالی آن روی بافت‌های بدن، تأثیر آن بر روند اسپرماتوژنزیس در موش سفید کوچک مورد مطالعه قرار گرفت.*

روش بررسی: *این مطالعه تجربی روی ۴۵ سر موش نر از نژاد Balb/C در سه گروه آزمایشی، کنترل و شم در دانشکده پزشکی بابل انجام پذیرفت. گروه آزمایشی به مدت یک ماه (پنج روز متوالی و دو روز استراحت) به میزان ۲۰mg/kg، سم هینوزان را به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. گروه شم تنها نرمال سالین دریافت کرده و گروه کنترل تزریقی نداشتند. با تهیه برش‌های بافتی از بیضه، رده‌های مختلف سلول‌های اسپرماتوژنیک، سلول‌های لایدیگ و عروق خونی در واحد سطح با استفاده از eye piece شمارش شدند. سپس داده‌ها با آزمون‌های One way - ANOVA Tukey's HSD تجزیه و تحلیل شدند.*

یافته‌ها : *در این مطالعه قطر بیضه و لوله‌های اسپرم‌ساز و تعداد عروق خونی کاهش چشمگیری نشان داد. همچنین با شمارش سلول‌های اسپرماتوژنیک مشخص گردید که تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت‌ها و اسپرماتیدها در گروه آزمایشی نسبت به گروه کنترل تغییر معنی‌داری پیدا کرده است ($P<۰/۰۵$). تعداد سلول‌های لایدیگ نیز به طور معنی‌داری کاسته شد ($P<۰/۰۵$).*

نتیجه‌گیری: *این مطالعه نشان داد که تزریق داخل صفاقی سم هینوزان در موش آزمایشگاهی بر روند اسپرماتوژنزیس، ساختار لوله‌های اسپرم‌ساز و کاهش سلول‌ها موثر است.*

کلید واژه‌ها: *ارگانوفسفره ، هینوزان ، بیضه ، سلول‌های لایدیگ ، اسپرماتوگونی، اسپرماتوژنزیس*

نویسنده مسؤول : دکتر اسماعیل فتاحی ، پست الکترونیکی : ***esmail_fattahy@yahoo.com***

نشانی : آمل، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت‌الله آملی ، گروه زیست شناسی ، تلفن : ۲۵۵۲۷۹۱-۰۱۲۱ ، نمابر : ۲۵۵۲۷۸۹

وصول مقاله : ۸۶/۵/۱۰ ، اصلاح نهایی : ۸۶/۱۱/۲۱ ، پذیرش مقاله : ۸۶/۱۱/۲۷

مقدمه

هینوزان یکی از سموم ارگانوفسفره است که علیه بلاست به کار می‌رود (۱). ماندگاری آن در خاک حدود ۱۲-۱۰ هفته است. در محیط خنثی پایدار بوده و در محیط اسید و باز، هیدرولیز می‌شود. بیشتر در داخل کبد و کمتر در بافت کلیه، با شکسته شدن پیوند استری متابولیزه شده و راه اصلی دفع آن از طریق ادرار و مدفوع است (۲). نوع سمیت آن به حاد و مزمن تقسیم شده و براساس نوع اثر و چگونگی در معرض قرار گرفتن متفاوت است. آثار حاد آن به نوع سم، مدت زمان اثر و ساختار بافت بستگی دارد. در آسیب‌های مزمن، دوز ۱۰تا ۱۰۰ میلی‌گرم به صورت روزانه، قابل انتظار است که عوارض آن شامل اختلال در سیستم تولید مثل و آثار مسمومیت روی جنین بوده (۳) و می‌تواند سیستم عصبی را تخریب کند (۴و۵). ارگانوفسفره‌ها عامل آلکیله کننده هستند و با ماکرومولکول‌های سلول واکنش نشان می‌دهند (۶و۷) و تخریب کروموزوم (۸)، جهش در ژن‌ها و القاء مرگ سلولی (۹) از عوارض احتمالی آن است. بر تمایز سلولی اثر منفی گذاشته و موجب ناهنجاری در مراحل اولیه تشکیل جنین می‌شود (۱۰). هینوزان فعالیت میتوکندری را کاهش داده و باعث مرگ سلول می‌شود (۱۱و۱۲). در طی رشدونمو جنین، تماس با ترکیبات آلی فسفردار تقسیم میتوزی را در مراحل اولیه متوقف کرده و ساختار سلولی و سنتز اسیدهای نوکلئیک را مختل می‌سازد (۱۳). در زنانی که با این‌گونه سموم تماس داشته باشند، ناباروری را تا ۳/۳ برابر افزایش می‌دهد (۱۴). اثرات طولانی مدت ارگانوفسفره باعث تخریب بافت بیضه شده و سطح تستوسترون را کاهش داده (۱۵و۱۶) و باعث کاهش فعالیت و حیات اسپرم می‌شوند (۱۷و۱۸). هینوزان و سمومی مثل متیل پاراتیون و بایلتون، موجب افزایش تبادلات کروموزومی و ناهنجاری‌های میکرونوکلئوس در سلول‌های مغز استخوان و اسپرم می‌شوند (۱۹و۲۰). روی سیستم ایمنی نیز اثر منفی بر جای گذاشته (۲۱) و استفاده داخل صفاقی آن باعث کاهش قابل توجهی در تعداد فولیکول‌های رسیده و افزایش فولیکول‌های آترتیک می‌گردد (۲۲). دوزهای پایین این سم نیز بر اندام‌های تولید مثلی جنس ماده اثر منفی بر جای می‌گذارد (۲۳). این مطالعه، به منظور بررسی تاثیر سم هینوزان روی سیستم تناسلی و روند اسپرماتوژنزیس انجام شد.

روش بررسی

تهیه حیوانات آزمایشگاهی

این مطالعه تجربی روی ۴۵ سر موش آزمایشگاهی با وزن متوسط ۲۵تا۳۰ گرم و سن متوسط ۱۰ تا ۱۲ هفته از نژاد Balb/C که از انستیتو پاستور تهران تهیه شده بودند، در بخش آناتومی و جنین‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بابل در سال ۱۳۸۶ انجام گرفت. موش‌ها به صورت تصادفی به ۳ گروه ۱۵ تایی آزمایشی، کنترل و شم تقسیم شدند. حیوانات در قفس‌های استاندارد و در شرایط ۳±۲۲ درجه سانتی‌گراد و تحت شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ساعت تاریکی قرار گرفتند. کلیه نکات مربوط به کار با حیوانات در این مطالعه رعایت شد.

تهیه محلول هینوزان

با اضافه کردن ۰/۲ میلی‌لیتر سم هینوزان به ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر ۲۵ درجه، امولسیون تهیه شد و بعد از تعیین LD50 دوز تزریقی برابر ۲۰mg/kg تعیین گردید.

تزریق هینوزان

گروه آزمایشی به مدت یک ماه (پنج روز متوالی در هفته و دو روز استراحت) به میزان ۲۰mg/kg هینوزان (تهیه شده از شرکت خدمات حمایتی کشاورزی) به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. به گروه کنترل تنها آب مقطر تزریق شد و گروه شاهد نیز هیچ‌گونه تزریقی نداشت. بعد از گذشت یک ماه به مدت یک هفته موش‌ها در شرایط اپتیموم قرار گرفته، سپس نمونه‌برداری برای هر سه گروه از بیضه سمت راست انجام گرفت.

تهیه نمونه بافت

برای ارزیابی رده‌های سلولی بافت بیضه، سلول‌های لایدیگ و عروق خونی، بیضه‌ها خارج شده و در داخل فرمالین ۱۰درصد قرار گرفت. پس از انجام مراحل تهیه بافت، برش‌هایی به ضخامت ۵ میکرون تهیه و با هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شد (۲۴). سپس رده‌های مختلف سلولی، سلول‌های لایدیگ و عروق خونی، با استفاده از صفحه چشمی مدرج (eye piece) که روی عدسی چشمی میکروسکوپ نوری Motic مدل BA200 سوار می‌شد، در واحد سطح

جدول۱: میانگین قطر لوله اسپرم‌ساز، تعداد عروق خونی، وزن نسبی و قطر بیضه موش Balb/C در تزریق دوز مکرر سم هینوزان

	انحراف معیار±میانگین			ارزش P
	کنترل	شم	آزمایشی	
تعداد عروق خونی	۱/۱ ±۰/۱۱۳	۱/۱۰۵ ±۰/۱۲۶	۰/۷۳۵ ±۰/۰۳۱	<۰/۰۵
وزن نسبی بیضه	۸/۲۲ ±۰/۵۰۷	۸/۳ ±۰/۲۲۶	۸/۸۵ ±۰/۴۸۶	<۰/۰۵
قطر بیضه	۷/۰۱ ±۰/۴۸۲	۶/۹۵ ±۰/۵۱۶	۶/۴۵ ±۰/۲۸۶	<۰/۰۵
قطر لوله‌های اسپرم‌ساز	۷۲/۲۵۴ ±۱/۶۶۵	۷۲/۱۳۹ ±۱/۶۴۵	۶۵/۱۸ ±۱/۳۶۴	<۰/۰۵

جدول ۲: میانگین رده‌های سلولی در فرآیند اسپرماتوژنزیس و سلول‌های لایدیگ بیضه موش Balb/C در تزریق دوز مکرر سم هینوزان

	انحراف معیار±میانگین			ارزش P
	کنترل	شم	هینوزان	
تعداد اسپرماتوگونی‌ها	۹/۰۹۲ ±۰/۳۴۲	۸/۸۰۶ ±۰/۳۹۲	۶/۵۷ ±۰/۱۱	<۰/۰۵
تعداد اسپرماتوسیت‌ها	۳۸/۰۵۵ ±۱/۱۰	۳۸/۱۵ ±۱/۲۵	۳۶/۰۹۵ ±۰/۵۷	<۰/۰۵
تعداد اسپرماتید گرد	۱۲/۰۴ ±۰/۲۵۷	۱۱/۹۱۹ ±۰/۱۹۳	۹/۵۶۵ ±۰/۲۳۸	<۰/۰۵
تعداد سلول‌های لایدیگ	۱۱/۳۷۵ ±۰/۷۶۹	۱۱/۳۲۵ ±۰/۳۰۹	۶/۳۶۵ ±۰/۴۵	<۰/۰۵

شمارش شد. قطر بیضه به وسیله ریزسنج ساخت کارخانه Mititio ژاپن مخصوص و وزن آن با ترازوی دیجیتالی Sartorius Basic و با دقت بسیار بالا اندازه‌گیری شد.

داده‌ها در نرم‌افزار SPSS-13 و با استفاده از آزمون‌های One way –Tukey's HSD ANOVA تجزیه و تحلیل شد. ضریب اطمینان مطالعه ۹۵ درصد (α=۰/۰۵) تعیین شد.

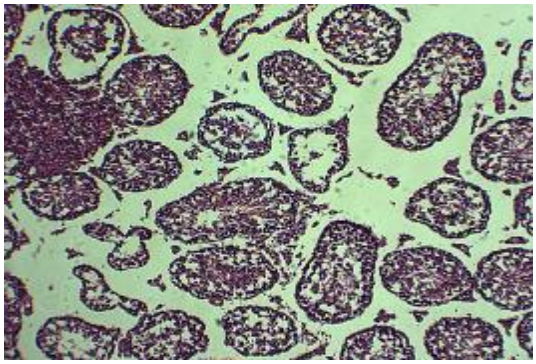
یافته‌ها

قطر و وزن نسبی بیضه

با اندازه‌گیری قطر بیضه در هر سه گروه مشخص گردید که میانگین آن در گروه آزمایشی نسبت به گروه‌های کنترل و شم کاهش معنی‌داری پیدا کرده است (P<۰/۰۵). همچنین وزن نسبی بیضه در گروه آزمایشی نسبت به دو گروه کنترل و شم افزایش معنی‌داری نشان داد. در دو پارامتر قطر و وزن نسبی بیضه، تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های کنترل و شم مشاهده نشد (جدول ۱).

قطر لوله‌های اسپرم‌ساز

مقایسه برش‌های تهیه شده از نمونه‌های مربوط به گروه‌های مختلف نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های آزمایشی، کنترل و شم وجود دارد. در این یافته‌ها مشخص گردید که ساختار لوله‌های اسپرم‌ساز و رده‌های سلولی دچار بی‌نظمی شده و قطر آنها کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل و شم پیدا کرده است (P<۰/۰۵) (جدول ۱ و شکل ۱).



شکل ۱ : مقاطع لوله‌های اسپرم‌ساز گروه آزمایشی هینوزان رنگ‌آمیزی H&E ، درشت‌نمایی x ۲۰۰
تخریب لوله‌های اسپرم‌ساز در گروه آزمایشی کاملاً مشهود است و رده‌های سلولی دچار بی‌نظمی شده‌اند.

تعداد اسپرماتوگونی‌ها و اسپرماتوسیت‌ها

در بررسی میکروسکوپی نمونه‌های مربوط به گروه آزمایشی مشاهده گردید که تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی نسبت به سایر گروه‌ها کاهش یافته است (P<۰/۰۵). ولی تعداد آنها بین دو گروه کنترل و شم تفاوت معنی‌داری نداشت.

همچنین بررسی مقاطع بافت بیضه نشان داد که تعداد اسپرماتوسیت‌ها در گروه آزمایشی هینوزان نسبت به دو گروه کنترل و شم تفاوت معنی‌داری (P<۰/۰۵) یافته است (جدول۲).

تعداد اسپرماتیدها، سلول‌های لایدیگ و عروق خونی

تعداد اسپرماتیدها در گروه آزمایشی نسبت به دو گروه کنترل و شم به شکل معنی‌داری کاهش یافته بود. ولی هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های کنترل و شم وجود نداشت. همچنین این مطالعه نشان داد که تعداد سلول‌های لایدیگ در گروه آزمایشی، نسبت به دو گروه کنترل و شم کاهش معنی‌داری (P<۰/۰۵) پیدا کرده است (جدول ۲). تعداد عروق خونی نیز در واحد سطح، در گروه آزمایشی، در مقایسه با گروه‌های کنترل و شم کاهش یافته بود که از نظر آماری اختلاف معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵) (جدول ۱).

بحث

این مطالعه نشان داد که وزن و قطر بیضه، رده‌های سلولی، سلول‌های لایدیگ، قطر لوله‌های اسپرم‌ساز و تعداد عروق خونی موش آزمایشگاهی در گروه آزمایشی نسبت به دو گروه دیگر کاهش معنی‌داری پیدا کرده است. این نتیجه تاثیرگذاری عوارض ناشی از هینوزان را مورد تاکید قرار می‌دهد و استفاده از دوز mg/kg ۲۰ در این مطالعه باعث کاهش بسیاری از پارامترها در بیضه گردید. بررسی‌ها نشان می‌دهد که سموم ارگانوفسفره باعث افزایش پراکسیداسیون در واکنش متقابل با ماکرومولکول‌های سلول شده و مرگ آنها را القا می‌کنند (۲۵و۲۶). همچنین می‌تواند تقسیم میتوزی را به تاخیر انداخته و باعث توقف آن شود (۲۷). در مطالعه ما مشخص گردید که سم هینوزان رده‌های مختلف سلول‌های اسپرماتوژنیک را در لوله‌های اسپرم‌ساز کاهش داده و قطر لوله‌ها نیز کاسته می‌شود. کاهش قطر لوله‌های اسپرم‌ساز می‌تواند مؤید کاهش تعداد سلول‌های اسپرماتوژنیک در داخل آن باشد. شاید اثر سم هینوزن را بتوان به ایجاد رادیکال‌های آزاد نسبت داد. چون اثر تخریبی رادیکال‌های آزاد روی غشاء پلاسمایی مورد تائید برخی از محققین است و آن را از هم‌گسیختگی بافت بیضه تلقی کرده و معتقدند که لوله‌های اسپرم‌ساز از روز چهارم به بعد در اثر برخورد با هینوزان شروع به تخریب می‌نمایند (۲۸). کاهش تعداد رده‌های مختلف سلول‌های اسپرماتوژنیک و قطر لوله‌های اسپرم‌ساز منجر به کاهش قطر بیضه می‌شود. همین مسأله به نوعی دیگر به صورت کاهش وزن اندام‌های جنسی مثل بیضه، سمینال وزیکول، پروستات در مواجه شدن با سموم ارگانوفسفره بیان شده است (۲۹) که نتایج آن با مطالعه ما در کاهش وزن بیضه مطابقت دارد. البته این‌گونه عوارض تنها اختصاص به جنس نر ندارد، بلکه در جنس ماده نیز باعث کاهش قطر تخمدان شده و با ایجاد بافت نکروزه، میزان فولیکول‌های آترتیک را افزایش می‌دهند و ممکن است با کاهش سطح استرادیول، اووسیت‌های بالغ را تخریب کنند (۳۰). همچنین ممکن است باعث جهش در ژن‌ها و القاء مرگ سلولی شده (۹و۳۱) و بر تمایز سلولی اثر منفی بگذارند و موجب ناهنجاری‌هایی در مراحل اولیه تشکیل جنین شوند (۱۰). ارگانوفسفره‌ها باعث تغییر در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌شوند که احتمالاً با ایجاد رادیکال آزاد و اکسیژن‌های واکنش‌پذیر، موجب القای آسیب‌های تولید مثلی می‌گردند (۲۵و۲۶). ترکیبات آلی فسفردار با ماکرومولکول‌های اصلی سلول، مثل پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و لیپید واکنش نشان می‌دهند (۳۲). بررسی‌ها نشان می‌دهد که میزان اثر این‌گونه سموم به مدت زمان تماس و دوز آنها بستگی دارد. ارگانوفسفره‌ها باعث آتروفی شدن سلول‌های لایدیگ شده و سطح تستوسترون سرم خون را نیز کاهش می‌دهند. این که در مطالعه ما تعداد سلول‌های لایدیگ بافت بیضه، پس از تزریق دوز مکرر هینوزان کاهش یافته است، تا حدودی می‌تواند آن را توجیه نماید. لذا به نظر می‌رسد که اگر این‌گونه سموم به مدت طولانی وارد بدن شوند، ممکن است علاوه بر آسیب به دستگاه‌های مختلف بدن بر سیستم تناسلی نیز تاثیر بگذارند (۳۳). هینوزان به جهت خاصیت مهارکنندگی خود در رشد سلول و القای مرگ آنها (۲۳)، اسپرماتوسیت‌ها و سلول‌های ژرمینال (۳۴) را تحت تاثیر قرار می‌دهد. در مطالعه ما نیز سلول‌های ژرمینال و اسپرماتوسیت‌ها به صورت معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کاهش پیدا کرده‌اند. لذا با توجه به نتایجی که در این تحقیق به دست آمد، می‌توان کاهش این سلول‌ها را ناشی از تزریق طولانی مدت سم هینوزان دانست. از

نتایج مطالعه حاضر و تحقیقات دیگران چنین استنباط می‌شود که تاثیر این‌گونه سموم به دوز و مدت زمان تماس آنها بستگی دارد. به نظر می‌رسد که سموم ارگانوفسفره به خصوص هینوزان، با توقف تقسیم میتوزی و القای مرگ سلولی باعث کاهش سلول‌های ژرمینال شوند. این سلول‌ها در فرآیند اسپرماتوژنزیس بسیار ضروری هستند و کاهش این سلول‌ها لزوماً رده‌های سلولی مثل اسپرماتوسیت‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهند که نهایتاً منجر به کاهش اسپرم خواهد گردید.

هینوزان می‌تواند فعالیت میتوکندری‌ها را نیز کاهش دهد و در اثر کاسته شدن تولید ATP، اسپرم‌ها دچار مرگ سلولی شوند (۱۲). در بعضی از مطالعات اشاره شده است که میتوکندری‌ها، تحت تاثیر رادیکال‌های آزاد شده از طریق سمومی مثل هینوزان، انرژی تولید نمی‌کنند و این مسأله اگر در بافت بیضه اتفاق بیفتد، باعث آن خواهد شد تا حرکت اسپرم‌ها کاهش یافته و ممکن است کاملاً بی‌حرکت شوند (۳۵). بعضی از محققین، اثر و بقاء سموم کشاورزی را بر میزان سلامت و سطح خونی کشاورزان مورد ارزیابی قرارداده و به این نتیجه دست یافتند که اثرات طولانی مدت سم باعث تخریب بافت‌های کبد، کلیه و بیضه می‌شود و سطح تستوسترون نیز کاهش چشمگیری می‌یابد (۳۶) و چون آفت‌کش‌ها عمدتاً از طریق پوست، چشم و یا به وسیله تنفس و بلعیدن وارد بدن می‌شوند. لذا شدت اثرات سوء ناشی از تماس با آفت‌کش‌ها به دوز آن، راه تماس، نحوه جذب، نوع اثرات و متابولیت‌های آن و تجمع و پایداری آفت‌کش در بدن بستگی دارد. بعضی از انواع ارگانوفسفره مثل هینوزان قبل از اینکه سریعاً به صورت متابولیت از بدن دفع شوند، تاثیر آن بر ارگان‌های مختلف به خصوص سیستم تناسلی، نمود پیدا می‌کند (۳۷). اگر چنین فرضی درست باشد، شاید بتوان چنین استنباط نمود که ناهنجاری‌هایی که در میتوکندری‌ها و غشای پلاسمایی اسپرم گزارش شده از عوامل کاهش سلول‌های جنسی قلمداد شوند. اگرچه به طور قطع نمی‌توان براساس این مطالعه مدعی ایجاد ناباروری در کشاورزان منطقه بود، اما با توجه به این که سم هینوزان در مزارع برنج و باغ مرکبات استان‌های شمالی ایران به صورت گسترده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد، لذا پیشنهاد می‌گردد که مدیریتی صحیح در استفاده بهینه از اینگونه سموم صورت پذیرد.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که هینوزان اثرات نامطلوبی بر سیستم تولید مثلی گذاشته و به‌طور مستقیم با اثر روی ساختار بیضه و سلول‌های اسپرماتوژنیک موجود را به سمت ناباروری سوق خواهد داد.

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت‌الله آملی، همچنین از آقایان مهندس محمود شهروزی، دکتر سرابی، نوری و همکاران گروه علوم تشریحی دانشگاه علوم پزشکی بابل آقایان جعفری و موسوی و خانم فرجی قدردانی می‌گردد.

References

1) Khanjani M, Pormirza AA. Toxicology. 3th Ed. Hamadan University of Medical Sciences. 2003; pp:5-15.

2) Timchalk C, Busby A, Campbell JA, Needham LL, Barr DB. Comparative pharmacokinetics of the organophosphorus insecticide chlorpyrifos and its major metabolites diethylphosphate, diethylthiophosphate and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol in the rat. *Toxicology.* 2007;237(1-3):145-57.

3) Rezg R, Mornagui B, Kamoun A, El-Fazaa S, Gharbi N. Effect of subchronic exposure to malathion on metabolic parameters in the rat. *C R Biol.* 2007;330(2):143-7.

4) Leveridge YR. The pattern of poisoning in Costa Rica during 1997. *Vet Hum Toxicol.* 1999;41(2):100-2.

5) Axelrad JC, Howard CV, McLean WG. Interactions between pesticides and components of pesticide formulations in an in vitro neurotoxicity test. *Toxicology.* 2002;173(3):259-68.

6) DeMatteis F. Phosphorothionares. In: Darmani,L.A. (Ed.), Sulphorcontain drugs and related organic compounds. 2nd Ed. Ellis Horwood. Lodon 1989; pp:9-33.

7) Evenson D, Jost L. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. *Methods Cell Sci.* 2000; 22(2-3):169-89.

8) Piña-Guzmán B, Solís-Heredia MJ, Quintanilla-Vega B. Diazinon alters sperm chromatin structure in mice by phosphorylating nuclear protamines. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005;202(2):189-98.

9) Slotkin TA, Tate CA, Ryde IT, Levin ED, Seidler FJ. Organophosphate insecticides target the serotonergic system in developing rat brain regions: disparate effects of diazinon and parathion at doses spanning the threshold for cholinesterase inhibition. *Environ Health Perspect.* 2006;114(10):1542-6.

10) Aluigi MG, Angelini C, Falugi C, Fossa R, Genever P, Gallus

L, et al. Interaction between organophosphate compounds and cholinergic functions during development. *Chem Biol Interact.* 2005;157-158:305-16.

11) Poul JM. Biochemical changes in liver and plasma of rats after oral administration of edifenphos. *Toxicol Lett.* 1983; 16(1-2):31-4.

12) Yamano T, Morita S. Effects of pesticides on isolated rat hepatocytes, mitochondria, and microsomes. *Arch Environ Contam Toxicol.* 1993;25(2):271-8.

13) Pesando D, Huitorel P, Dolcini V, Angelini C, Guidetti P, Falugi C. Biological targets of neurotoxic pesticides analysed by alteration of developmental events in the Mediterranean sea urchin, Paracentrotus lividus. *Mar Environ Res.* 2003;55(1):39-57.

14) Greenlee AR, Arbuckle TE, Chyou PH. Risk factors for female infertility in an agricultural region. *Epidemiology.* 2003;14(4):429-36.

15) Azmi MA, Naqvi SN, Azmi MA, Aslam M. Effect of pesticide residues on health and different enzyme levels in the blood of farm workers from Gadap (rural area) Karachi-Pakistan. *Chemosphere.* 2006; 64(10):1739-44.

16) Hela DG, Lambropoulou DA, Konstantinou IK, Albanis TA. Environmental monitoring and ecological risk assessment for pesticide contamination and effects in Lake Pamvotis, northwestern Greece. *Environ Toxicol Chem.* 2005;24(6):1548-56

17) Swan SH. Semen quality in fertile US men in relation to geographical area and pesticide exposure. *Int J Androl.* 2006; 29(1):62-8; discussion 105-8.

18) Swan SH, Kruse RL, Liu F, Barr DB, Drobnis EZ, Redmon JB, et al. Semen quality in relation to biomarkers of pesticide exposure. *Environ Health Perspect.* 2003;111(12):1478-84.

19) Vijayaraghavan M, Nagarajan B. Mutagenic potential of acute exposure to organophosphorus and organochlorine compounds. *Mutat Res.* 1994;321(1-2):103-11.

20) Jayashree IV, Vijayalaxmi KK, Abdul Rahiman M. The genotoxicity of Hinosan, an organophosphorus pesticide in the in vivo mouse. *Mutat Res.* 1994;322(2):77-85.

21) el-Gendy KS, Aly NM, el-Sebae AH. Effects of edifenphos and glyphosate on the immune response and protein biosynthesis of bolti fish (Tilapia nilotica). *J Environ Sci Health B.* 1998;33(2):135-49.

22) Math JR, Jadaramkunti UC, Kaliwal BB. Effect of edifenphos on follicular dynamics in albino rats. *Indian J Exp Biol.* 1998; 36(1):39-42.

23) Nanda N, Kaliwal BB. Effect of edifenphos on compensatory ovarian hypertrophy, follicular kinetics and estrous cycle in hemicastrated rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 2003; 14(4):373-86.

24) Kouchesfahani HM, Parivar K. General Histological Embryological and Zoological Microtechniques. First Ed. Tehran. Al-Hosein Co. 2001; pp:48-49.

25) Nakagawa Y, Moldéus P. Mechanism of p-hydroxybenzoate ester-induced mitochondrial dysfunction and cytotoxicity in isolated rat hepatocytes.*Biochem Pharmacol.*1998;55(11):1907-14.

26) Altuntas I, Kilinc I, Orhan H, Demirel R, Koylu H, Delibas N. The effects of diazinon on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in erythrocytes in vitro. *Hum Exp Toxicol.* 2004; 23(1):9-13.

27) Whyatt RM, Camann D, Perera FP, Rauh VA, Tang D, Kinney PL, et al. Biomarkers in assessing residential insecticide exposures during pregnancy and effects on fetal growth. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005; 206(2):246-54.

28) Loftin MA, Mask W, Lodvig N. The effect of pesticides on testes tissue in bluegill. *Environ Int.* 1996; 26(3) : 113-17.

29) George FW, Wilson JD. Sex determination and differentiation. In: Knobil E, and Neill JD (eds.). The Physiology of Reproduction. 2nd Ed. Raven Press, New York. 1994. pp: 3-28,

30) Dutta HM, Maxwell LB. Histological examination of sublethal effects of diazinon on ovary of bluegill, Lepomis macrochirus. *Environ Pollut.* 2003;121(1):95-102.

31) Paraoanu LE, Mocko JB, Becker-Roeck M, Smidek-Huhn J, Layer PG. Exposure to diazinon alters in vitro retinogenesis: retinospheroid morphology, development of chicken retinal cell types, and gene expression. *Toxicol Sci.* 2006;89(1):314-24.

32) Kuroda K, Yamaguchi Y, Endo G. Mitotic toxicity, sister chromatid exchange, and rec assay of pesticides. *Arch Environ Contam Toxicol.* 1992;23(1):13-8.

33) Maxwell LB, Dutta HM. Diazinon-induced endocrine disruption in bluegill sunfish, Lepomis macrochirus. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2005;60(1):21-7.

34) Contreras HR, Bustos-Obregón E. Morphological alterations in mouse testis by a single dose of malathion. *J Exp Zool.* 1999;284(3):355-9.

35) Betancourt M, Reséndiz A, Fierro EC. Effect of two insecticides and two herbicides on the porcine sperm motility patterns using computer-assisted semen analysis (CASA) in vitro. *Reprod Toxicol.* 2006;22(3):508-12.

36) Vittozzi L, Fabrizi L, Di Consiqlio E, Testai E. Mechanistic aspects of organophosphothionate toxicity in fish and humans. *Environ Int Italy.* 2001; 26(31): 25-26.

37) Andrews P, Freyberger A, Hartmann E, Eiben R, Loof I, Schmidt U, et al. Feasibility and potential gains of enhancing the subacute rat study protocol (OECD test guideline no. 407) by additional parameters selected to determine endocrine modulation. A pre-validation study to determine endocrine-mediated effects of the antiandrogenic drug flutamide.*Arch Toxicol.*2001; 75(2):65-73.