Original Article

Protective effect of ascorbic acid on sperm parameters and testis structure of the first-generation mouse following mancozeb exposure

Sadein E[1], Haghpanah T[1], Nematollahi Mahani N [2], Ezzatabadipour M [1]*, Dehesh T[3]

1- Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.
2- Physiology Research Center, Institute of Neuropharmacology, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.
3- Modeling in Research Center, Institute for Future Studies in Health, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.

Received: 2021/01/9 | Accepted: 2021/09/12

Abstract

Background: This study aimed to investigate the possible protective effects of ascorbic acid on mancozeb-induced toxicity on sperm parameters and testicular structure in the first-generation mice pups.
Materials and methods: In this experimental study, pregnant female NMRI mice were randomly divided into four groups including: control, sham, mancozeb (500 mg/ kg) and ascorbic acid+ mancozeb (100 mg/ kg ascorbic acid + 500 mg/ kg mancozeb). Treatments started at the first day of pregnancy and continued until weaning. Male pups from each group were maintain until puberty (8-10 weeks). Left testicular weight was measured and its structure was studied. Then, the left epididymis was isolated, and sperm parameters (number, viability, motility and morphology) were studied.
Results: A significant decrease was observed in the sperm parameters of mancozeb group compared to the control and sham groups. However, concomitant use of ascorbic acid could improve the mancozeb-induced negative effects. Also, testicular parameters including weight, gonadosomatic index, diameter of seminiferous tubules, Johnsen`s score, as well as the number of germ cells including spermatogonia, spermatocytes, spermatids and Sertoli showed a significant decrease compared to the control and sham groups, also. While concomitant use of ascorbic acid could improve most of these damaged testicular and sperm parameters.
Conclusion: This study was showed that consumption of ascorbic acid along during pregnancy and breastfeeding periods has a protective effect against the destructive effects of mancozeb on sperm parameters and testicular structure of first-generation male pups.

Keywords: Mancozeb, Ascorbic acid, Pregnancy, Breastfeeding period, Testis, Spermatozoa

***Corresponding Author.**
Email: ezzatabadipm@gmail.com
Tel: 0098 343 325 7666
Fax: 0098 343 325 7667

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, December, 2021; Vol. 25, No 5, Pages 1155-1167

Please cite this article as: Sadein E, Haghpanah T, Nematollahi Mahani N, Ezzatabadipour M, Dehesh T. Protective effect of ascorbic acid on sperm parameters and testis structure of the first-generation mouse following mancozeb exposure. ***Feyz*** 2021; 25(5):1155-67.

اثر محافظتی آسکوربیک‌اسید بر پارامترهای اسپرم و ساختار بیضه نسل اوّل موش پس از مواجهه با منکوزب

اسماعیل سعدین[۱]، طاهره حق‌پناه[۱]، سید نورالدین نعمت‌اللهی ماهانی[۲]، مسعود عزت‌آبادی‌پور*[۱]، تانیا دهش[۳]

خلاصه

سابقه و هدف: هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثرات محافظتی احتمالی آسکوربیک‌اسید بر سمیت ناشی از منکوزب بر پارامترهای اسپرم و ساختار بیضه فرزندان نسل اوّل موش بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه‌ی تجربی، موش‌های ماده‌ی باردار نژاد NMRI به‌طور تصادفی به چهار گروه شامل: کنترل، شم، منکوزب (۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و آسکوربیک‌اسید + منکوزب (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم آسکوربیک‌اسید + ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم منکوزب) تقسیم شدند. تیمارها از روز اوّل بارداری شروع شد و تا پایان شیردهی ادامه داشت. فرزندان نر هر گروه تا سنّ بلوغ (۱۰-۸ هفته) نگهداری شدند. وزن بیضه چپ اندازه‌گیری و ساختار آن مطالعه شد. سپس اپیدیدیم چپ فرزندان جدا و پارامترهای اسپرم (تعداد، حیات، تحرک و مورفولوژی) مطالعه شد.

نتایج: کاهش معنی‌داری در پارامترهای اسپرم گروه منکوزب نسبت به گروه کنترل و شم مشاهده شد ($P<۰/۰۰۱$) و مصرف همزمان آسکوربیک‌اسید اثرات منفی ناشی از منکوزب را بهبود بخشید. همچنین پارامترهای بیضه شامل وزن، شاخص گنادوسوماتیک، قطر لوله‌های اسپرم‌ساز، نمره جانسون، و نیز تعداد سلول‌های زایا از جمله اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید و سرتولی در گروه منکوزب در مقایسه با گروه‌های کنترل و شم کاهش معناداری را نشان داد ($P<۰/۰۱$)؛ در حالی‌که مصرف همزمان آسکوربیک‌اسید اغلب این پارامترهای آسیب‌دیده‌ی بیضه و اسپرم را بهبود بخشید.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که مصرف آسکوربیک‌اسید در دوران بارداری و شیردهی اثر محافظتی در مقابل اثرات مخرب منکوزب بر پارامترهای اسپرم و ساختار بیضه فرزندان نر نسل اوّل موش دارد.

واژگان کلیدی: منکوزب، آسکوربیک‌اسید، بارداری، شیردهی، بیضه، اسپرم

دو ماه‌نامه علمی - پژوهشی فیض، دوره بیست و پنجم، شماره ۵، آذر- دی ۱۴۰۰، صفحات ۱۱۶۷-۱۱۵۵

مقدمه

منکوزب (EBDC, ethylene bis dithiocarbamate)، قارچ‌کشی است که برای اوّلین‌بار در سال ۱۹۴۸ در ایالات متحده معرفی شد. منکوزب بیشترین رشد حجم تولید را در میان قارچ‌کش‌ها دارد؛ به‌طوری‌که براساس آمار منتشرشده در سال ۲۰۱۴ بیش از ۲۰٪ بازار جهانی قارچ‌کش‌ها به آن اختصاص داشت [۱]. در ایران، تعداد زیادی از کشاورزان در معرض خطر ناشی از آفت‌کش می‌باشند و مقدار طبیعی سموم مصرف‌شده، مخصوصاً قارچ‌کش‌ها در هر سال بسیار بیشتر از مقدار موردنیاز است.

۱- گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی افضلی‌پور، دانشگاه علوم پزشکی، کرمان، ایران

۲- مرکز تحقیقات فیزیولوژی، انستیتو نوروفارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی، کرمان، ایران

۳- مدل‌سازی در مرکز تحقیقات سلامت، انستیتو مطالعات آینده در سلامت، دانشگاه علوم پزشکی، کرمان، ایران

*نشانی نویسنده مسئول: دانشکده پزشکی افضلی‌پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، ایران تلفن ۰۳۴۳۳۲۵۷۶۶۶ دورنویس: ۰۳۴۳۳۲۵۷۶۶۷

پست الکترونیک: ezzatabadipm@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۲۰ تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۰/۶/۲۱

علی‌رغم مصرف گسترده آن در سراسر کشور، در حدود ۶۰٪ از همه آفت‌کش‌ها در سه استان شمالی و نزدیک به دریای خزر استفاده می‌شوند که از این میزان، ۲۵٪ به‌تنهایی برای تولید برنج به کار می‌رود [۲]. باوجود تحقیقات وسیعی که درباره مضرات آفت‌کش‌ها بر روی سلامتی کشاورزان در کشورهای دیگر صورت گرفته است، اما در ایران آمار دقیقی از این مواجهه در دسترس نیست [۳]. منکوزب بلافاصله در بدن متابولیزه می‌شود. اگرچه مطالعات حیوانی نشان داده‌اند که سمیت حادّ پایینی دارد [۴]، ولی مواجهه با آن در مناطق پرخطر نظیر مزارع و کشتزارها، طیف گسترده‌ای از آسیب‌ها از جمله آسیب‌های نورولوژیک مانند علائم شبه پارکینسون [۵]، اختلالات وابسته به هورمون تیروئید در زنان [۶] و اختلالات رشد مغز جنین را در بردارد [۷]. از آن‌جایی که منکوزب توانایی عبور از جفت و حضور در شیر مادر را دارد، بنابراین مادران باردار، جنین در حال رشد و حتی نوزادان می‌توانند در معرض خطر با این قارچ‌کش قرار بگیرند [۸]. منکوزب اثرات بیولوژیکی خود را ازطریق متابولیت‌هایش مانند اتیلن‌تیوره و دی‌سولفیدکربن اعمال می‌کند [۹]. دی‌سولفیدکربن باعث کاهش قابل‌توجه در سطح تستوسترون سرم، تخریب بافت بیضه، تأثیر بر روند

اسپرماتوژنز و تغییر در ساختار اپیدیدیم می‌شود [۱۰]. اثرات مخرب منکوزب و دی‌تیوکاربامات‌ها بر روند تولیدمثل ممکن است به دلیل عدم تعادل هورمونی بواسطه اثر بر ترشح گنادوتروپین‌ها باشد [۱۱]. اثر مخرب منکوزب بر سیستم تولیدمثل مردان به‌علت اختلال در مکانیسم دفاع آنتی‌اکسیدانی سلول‌ها، القای استرس اکسیداتیو و آپوپتوز گزارش شده است [۱۲]. گزارشات حاکی از آن است که در حدود ۱/۸ بیلیون نفر از مردم جهان در مشاغل کشاورزی مشغول به کارند که بیشترین تماس با آفت‌کش‌ها را دارند [۱۳]. ازطرفی، تماس‌های غیرشغلی یا محیطی با آن‌ها به‌طور بالقوه بخش‌های بزرگی از مردم را تحت‌تأثیر قرار می‌دهد [۱۴]؛ از این‌رو تاکنون مطالعات بسیاری اثرات مخرب منکوزب را بر سیستم تولیدمثلی نر و نیز استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها برای تخفیف و خنثی‌سازی این اثرات را گزارش داده‌اند. به‌هرحال با توجه به این‌که بیشتر از دو سوم مردان و زنان کارگر در سنین باروری هستند و مواجهه مادران باردار به‌واسطه تماس شغلی و یا مصرف محصولات کشاورزی یا آب آلوده به آفت‌کش‌ها موردخطر می‌باشند [۱۶،۱۵] و از سویی، دوران بارداری زمانی حیاتی برای تشکیل و تکوین سیستم تولیدمثلی جنین است، این مطالعه اثرات منفی مواجهه با منکوزب را در دوران زندگی داخل رحمی و شیرخوارگی بر پارامترهای سیستم تولیدمثلی موش‌های نر [۱۷] و همچنین افزایش سلول‌های آپوپتوتیک را در بافت بیضه و تخمدان فرزندان نسل اوّل نشان می‌دهد [۱۸]. علاوه‌براین، کاهش تعداد تخمک‌های بالغ، میزان لقاح و لانه‌گزینی در فرزندان ماده بالغ در پی مواجهه با منکوزب نیز مشاهده شد [۱۹]. از طرف دیگر، مصرف همزمان آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند ویتامین E موجب کاهش اثر سمی منکوزب بر سیستم تولیدمثلی فرزندان نسل اوّل می‌شود [۱۸]. گزارش‌های متعددی درمورد اثر بهبوددهنده و محافظت‌کننده ویتامین E بر سیستم تولیدمثلی مرد و زن وجود دارد [۲۰]، به‌هرحال آسکوربیک‌اسید نیز به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی در بسیاری از سبزیجات تازه و میوه‌ها به‌وفور یافت می‌شود و توافق عمومی در رابطه با نقش آن در محافظت از لیپیدهای اکسیدشده، کاهش تعداد سلول‌های آپوپتوتیک [۲۳-۲۱] و اثرات مثبت متعدد بر سیستم تولیدمثلی [۲۵،۲۴] وجود دارد. نتایج پژوهش حیدری و همکارانش نشان داد که اگرچه مصرف همزمان ویتامین‌های E و C اثرات مخرب منکوزب بر روند آپوپتوز سیستم تولیدمثلی فرزندان را کاهش می‌دهند، اما به‌طور کلی آسکوربیک‌اسید در مقایسه با ویتامین E اثرات قوی‌تری در کاهش تعداد سلول‌های آپوپتوتیک داشت. بررسی متون نشان می‌دهد که تاکنون اثر مصرف همزمان منکوزب و آسکوربیک‌اسید در دوران جنینی و شیرخوارگی بر سیستم تولیدمثلی فرزندان مطالعه نشده است؛ از این‌رو، مطالعه حاضر به‌منظور بررسی اثر محافظتی احتمالی این ویتامین بر آسیب‌های ناشی از مواجهه با منکوزب در دوره زندگی داخل رحمی و شیرخوارگی بر پارامترهای اسپرم و بیضه فرزندان نر نسل اوّل (F1) انجام شد.

مواد و روش‌ها

پروتکل مطالعه با تأیید کمیته اخلاق حیوانات دانشگاه علوم پزشکی کرمان انجام شد (کد اخلاق: ir.kmu.rec.1393.137). برای انجام این تحقیق تجربی، موش‌های نژاد NMRI (۸-۱۰ هفته، ۳۰-۲۵ گرم) از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند و در قفس‌های پلی‌اتیلن، با دسترسی آزادانه به آب و غذا و شرایط محیطی استاندارد نگهداری شدند. ۱۸ سر موش ماده بالغ (۱۰-۸ هفته) و ۶ سر موش نر بالغ (۱۲-۱۰ هفته) به نسبت ۳ به ۱ جهت جفت‌گیری در قفس قرار داده شدند و صبح روز بعد، تشکیل پلاک واژینال بررسی شد. بعد از مشاهده پلاک واژینال (به‌عنوان روز ۱ بارداری)، موش‌های باردار به‌طور تصادفی در چهار گروه قرار گرفتند (هر گروه ۴ سر موش):

۱- گروه اوّل (کنترل): دست‌نخورده و بدون دریافت هرگونه درمانی.

۲- گروه دوم (شم): دریافت‌کننده روغن زیتون؛ حلال منکوزب (0.1/ 10 gr body weight).

۳- گروه سوم (منکوزب): دریافت‌کننده منکوزب (500 mg/Kg/day) (۱/۱۰ دوز کشنده) [۲۶].

۴- گروه چهارم (آسکوربیک‌اسید + منکوزب): دریافت‌کننده آسکوربیک‌اسید (100 mg/ Kg/ day) [۲۷] سی دقیقه قبل از دریافت دوز منکوزب (500 mg/Kg/day) [۲۸].

به‌جز گروه کنترل و براساس مطالعات قبلی [۲۶] روش تجویز مواد، مطابق با گروه موردنظر گاواژ دهانی بود. تجویز مواد از روز اوّل بارداری شروع شد و تا پایان شیردهی (روز ۲۱ پس از تولد فرزندان) ادامه داشت. بنابراین، جنین و فرزندان به‌ترتیب ازطریق جفت [۲۹] و شیر مادر [۱۸] در معرض منکوزب و آسکوربیک‌اسید قرار گرفتند. پس از دوران شیرخوارگی، فرزندان نر نسل اوّل (از هر گروه ۱۰ نوزاد به‌طور تصادفی انتخاب شدند) و در شرایط استاندارد حیوانخانه و با دسترسی آزاد به آب و رژیم غذایی معمولی تا بزرگسالی (۱۰-۸ هفته) نگهداری شدند. همچنین تمام تلاش‌ها جهت به حداقل رساندن درد و استرس حیوان به‌کار گرفته‌شد. تمامی مواد از شرکت سیگما (سنت لوئیس،

آمریکا) تهیه شد، به‌جز قارچ‌کش کاربامات منکوزب (منگنز روی اتیلن بیس دی تیوکاربامات) که از شرکت ایندوفیل هندوستان [٪۸۰، (CAS: 8018-01-7)] بود. فرزندان نر بالغ ۸ تا ۱۰ هفته از لحاظ وزنی اندازه‌گیری شدند و پس از توزین، با روش جابه‌جایی مهره گردنی (cervical dislocation) کشته شدند. به‌منظور ارزیابی‌های کمّی بیضه، اسکرتوم را با قیچی استریل باز کرده، بیضه چپ بیرون آورده شد و وزن آن با ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری شد. همچنین ناحیه دمی اپیدیدیم چپ جدا شد و به ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت گرم Ham's F10 حاوی مکمل BSA (۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) انتقال داده شد و به‌منظور خروج اسپرم به درون محیط کشت، با سوزن استریل قطعه‌قطعه شد. سپس به‌مدت ۲۵-۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و ٪۵ CO_2 در انکوباتور قرار گرفتند و پس از آن پارامترهای اسپرم از جمله تعداد، حیات، تحرک و مورفولوژی براساس دستورالعمل‌های ارائه‌شده از طرف سازمان بهداشت جهانی WHO موردارزیابی قرار گرفت (ویرایش پنجم، ۲۰۱۰). جهت ارزیابی تحرک اسپرم، در ابتدا ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپرم بر روی لام شیشه‌ای تمیز قرار گرفت و توسط یک لامل ۲۲ × ۲۲ میلی‌متری پوشانده شد. سپس، اسپرم‌ها توسط میکروسکوپ نوری(Olympus BX51, Tokyo, Japan) و با بزرگنمایی ۴۰۰ × ارزیابی شدند. از لحاظ حرکتی حداقل ۲۰۰ اسپرم در ۵ زمینه لام شمارش و درصد تحرک آن‌ها گزارش شد. تحرک اسپرم‌ها با توجه به نوع حرکت شامل متحرک پیش‌رونده، متحرک غیرپیش‌رونده و غیرمتحرک طبقه‌بندی شد [۳۰]. جهت شمارش اسپرم، حجم‌های مساوی از سوسپانسیون اسپرم و فرمالدئید ٪۱۰ مخلوط شدند. سپس، ۱۰ میکرولیتر از محلول رقیق‌شده بر روی یک هموسیتومتر نئوبار قرار گرفت و اسپرم‌ها زیر میکروسکوپ نوری شمارش شدند [۳۱]. همچنین با استفاده از رنگ‌آمیزی ائوزین نگروزین، حیات اسپرم موردارزیابی قرار گرفت. حجم‌های مساوی (۱۰ میکرولیتر) از سوسپانسیون اسپرم و رنگ ائوزین نگروزین با هم مخلوط شدند، پس از یک دقیقه، یک اسمیر بر روی لام شیشه‌ای تمیز تهیه شد. حداقل ۲۰۰ اسپرم توسط میکروسکوپ نوری و با بزرگنمایی ۴۰۰ × شمارش و درصد آن ثبت شد. اسپرم‌های زنده و مرده به‌ترتیب به رنگ صورتی کم‌رنگ و قرمز تیره در لام مشاهده شدند. علاوه‌بر آن، ارزیابی مورفولوژی اسپرم در لام‌های رنگ‌آمیزی‌شده با ائوزین نگروزین توسط میکروسکوپ نوری (و با بزرگنمایی ۲۰۰ ×) انجام شد. حداقل ۲۰۰ اسپرم در هر لام موردبررسی قرار گرفت و درصد هر نوع ناهنجاری در ناحیه سر که در آن سر کوچک‌تر از حدّ نرمال و یا سنجاقی‌شکل بود، یا حتی سر از تنه مجزا بود، ناهنجاری گردنی که بین سر و گردن زاویه وجود داشت و یا ناهنجاری دم که دم کوتاه‌تر از حدّ طبیعی و یا پیچ‌خورده بود، گزارش شد. همچنین شاخص گنادوسوماتیک با درصد GSI (Gonadosomatic index) به‌صورت نسبت وزن بیضه‌ها به وزن بدن محاسبه و ثبت شد [۳۲]. جهت آماده‌سازی بافت بیضه برای بررسی‌های هیستولوژیک، نمونه‌های بافتی از ۲۸ بیضه که متعلق به چهار گروه ۷ تایی بود، به‌مدت ۴۸ ساعت در فرمالدئید ۱۰٪ تثبیت گردیدند و با استفاده از درجات صعودی اتانول (۳۰، ۵۰، ۷۰ و ۹۶ درصد) آبگیری و در پارافین مذاب قالب‌گیری شدند. سپس با استفاده از میکروتوم دوار (Leitz, Germany) به ضخامت ۵ میکرومتر برش داده شدند. مقاطع بافتی توسط هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شدند و زیر میکروسکوپ نوری موردبررسی قرار گرفتند، جهت ارزیابی کمّی و کیفی پارامترهای لوله‌های اسپرم‌ساز، در ابتدا پنج لوله اسپرم‌ساز به‌طور تصادفی به ازای هر مقطع بیضه (۴ مقطع بافتی از هر بیضه/ ۷ بیضه در هر گروه) انتخاب شدند و پارامترهایی از جمله قطر لوله، مجرای لوله، ضخامت اپیتلیوم ژرمینال، تعداد سلول‌های ژرمینال (اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت و اسپرماتید) و همچنین تعداد سلول‌های سرتولی شمارش شدند [۳۳]. سپس پارامترهای کیفی لوله‌های اسپرم‌ساز مانند تغییرات دژنراتیو سلول‌های ژرمینال، لوله‌های نامنظم، جداشدگی اپیتلیوم و سلول‌های ریزش‌یافته بررسی شدند [۳۴]. همچنین از روش جانسون جهت ارزیابی تغییرات کیفی اپیتلیوم ژرمینال و کیفیت اسپرماتوژنز [۳۶،۳۵] در نمره‌بندی دهگانه به شرح زیر استفاده شد: نمره ۱۰: اسپرماتوژنز کامل، تعداد زیادی سراسپرم در حاشیه لومن گرد و منظم قرار دارند، نمره ۹: تعداد زیادی اسپرم وجود دارد ولی لومن گرد و منظم دیده نمی‌شود، نمره ۸: تعداد اسپرم خیلی کم است، نمره ۷: اسپرم دیده نمی‌شود ولی تعداد زیادی اسپرماتید گرد دیده می‌شود، نمره ۶: تعداد کمی اسپرماتید گرد دیده می‌شود، نمره ۵: هیچ اسپرم و اسپرماتید گردی دیده نمی‌شود ولی تعداد زیادی اسپرماتوسیت اوّلیه دیده می‌شود، نمره ۴: تعداد خیلی کمی اسپرماتوسیت اوّلیه دیده می‌شود، نمره ۳: هیچ اسپرماتوسیت اوّلیه دیده نمی‌شود فقط اسپرماتوگونی دیده می‌شود، نمره ۲: هیچ سلول زایا وجود ندارد. فقط سلول سرتولی دیده می‌شود و نمره ۱: نه سلول زایا و نه سلول سرتولی دیده می‌شود و لوله‌ها آتروفیک هستند. در نهایت داده‌های حاصل توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت. از آن‌جا که بسیاری از پارامترهای موردبررسی که به‌عنوان متغیر پاسخ مورد بررسی قرار می‌گیرند با یکدیگر همبسته هستند، بنابراین برای

به‌دست‌آوردن نتایج دقیق، ابتدا این پارامترها براساس همبستگی دسته‌بندی شدند و سپس اثر آسکوربیک‌اسید و منکوزب بر آن‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس چندمتغیره (MANOVA) صورت پذیرفت و درصورت معناداری از آزمون تعقیبی توکی (Tukey) برای مقایسات دوبه‌دو استفاده شد. نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار از میانگین (SEM) گزارش شدند و تفاوت میانگین‌ها در حدّ P <۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد.

نتایج

مصرف منکوزب در دوران بارداری با دوز ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن هیچ علائمی از مسمومیت با منکوزب ازجمله: فلج پا، کاهش مصرف غذا، کاهش وزن، آثار متابولیکی و ارگانیک را سبب نشد. نتیجه آزمون مانوا نشان داد که آسکوربیک‌اسید بر وزن بدن و تمام پارامترهای اسپرم از جمله تعداد، حیات، مورفولوژی غیرطبیعی، تحرک، و همچنین پارامترهای بیضه شامل وزن بیضه‌ها، GSI، اقطار و ضخامت اپیتلیوم لوله اسپرم‌ساز، نمره جانسون، تعداد سلول‌های رده اسپرماتوژنیک و سرتولی تأثیر معناداری دارد. هرچند آزمون توکی جهت مقایسه دوبه‌دو در بعضی از پارامترها تأثیر معناداری را نشان نداد.

بررسی تعداد (۴/۳۳±۰/۵۰) (P<۰/۰۰۱) و حیات (۸۵/۲۳±۱/۷۴) اسپرم فرزندان نر بالغی که در دوران زندگی رحمی و شیرخوارگی با منکوزب مواجه شده بودند، کاهش معناداری را در مقایسه با گروه‌های کنترل و شم نشان دادند (به‌ترتیب P =۰/۰۰۷ و P =۰/۰۱۸). ازطرفی مصرف همزمان آسکوربیک‌اسید توانست درصد حیات (۹۵/۰۱±۱/۰۵) (P =۰/۰۰۴) اسپرم را در مقایسه با گروه منکوزب افزایش معناداری دهد، اما بر تعداد (۶/۴۳±۰/۳۳) (P =۰/۴۴) تأثیر معناداری نداشت (جدول شماره ۱). همان‌گونه که در جدول شماره ۱ نشان داده شده است، درصد اسپرم با مورفولوژی غیرطبیعی در گروه منکوزب (۴۰/۰۳±۲/۹۰) در مقایسه با گروه‌های کنترل و شم به‌طور معناداری افزایش یافت (به‌ترتیب P =۰/۰۰۲ و P <۰/۰۰۱)، به‌طوری‌که اشکال غیرطبیعی اسپرم مانند سر سنجاقی‌شکل، گردن خمیده، قطعه میانی پیچ‌خورده، بدون سر، دم پیچ‌خورده و بدون دم در گروه منکوزب بیشتر از گروه‌های دیگر بود. به هرحال، درصد اسپرم‌ها با شکل غیرنرمال در گروه آسکوربیک‌اسید به همراه منکوزب (۲۰/۳۸±۱/۳۸) در مقایسه با گروه منکوزب (P =۰/۰۱) به‌طور معناداری کاهش یافت.

جدول شماره ۱- مقایسه میانگین تعداد، حیات و مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم در گروه‌های مختلف

گروه‌های آزمایشی	تعداد اسپرم (۱۰^۶ × بر میلی‌لیتر)	حیات اسپرم (٪)	شکل غیرطبیعی اسپرم (٪)
کنترل	۸,۸۳±۰,۴۸	۹۴,۳۷±۱,۳۹	۱۸,۷۱±۱,۴۹
شم	۸,۶۶±۰,۵۶	۹۴,۰۵±۱,۰۸	۱۶,۵۲±۱,۱۲
منکوزب	۴,۳۳±۰,۵۰ ab***	۸۵,۲۳±۱,۷۴ a**b*	۴۰,۰۳±۲,۹۰ a**b***
آسکوربیک‌اسید + منکوزب	۶,۴۳±۰,۳۳	۹۵,۰۱±۱,۰۵ c**	۲۰,۳۸±۱,۳۸ c*

مقادیر به‌صورت Mean±SEM نشان داده شده است، (MANOVA, Tukey's test, P<0.05)، [a] اختلاف معنادار در مقایسه با گروه کنترل، [b] اختلاف معنادار در مقایسه با گروه شم، [c] اختلاف معنادار در مقایسه با گروه منکوزب،
* P <۰/۰۵، ** P <۰/۰۱، *** P< ۰/۰۰۱

جدول شماره ۲ تحرک و نوع حرکت اسپرم را در گروه‌های مختلف نشان می‌دهد. کمترین درصد اسپرم‌های متحرک در گروه منکوزب (۵۴/۴۹±۱/۳۲) مشاهده شد که تفاوت معناداری با گروه‌های کنترل و شم نشان داد (P <۰/۰۰۱). به هرحال، مصرف همزمان آسکوربیک‌اسید با منکوزب (۷۴/۷۲±۰/۹۸) توانست باعث افزایش درصد تحرک اسپرم در مقایسه با گروه منکوزب شود، اما معنادار نبود (P=۰/۱۳، جدول شماره ۲). بیشترین درصد اسپرم‌های غیرپیش‌رونده (۶۲/۳۸±۱/۷۹) و بی‌تحرک (۴۵/۵۰±۱/۳۲) در گروه منکوزب و بالاترین درصد اسپرم متحرک پیش‌رونده (۶۸/۵۴±۱/۵۹) متعلق به گروه آسکوربیک‌اسید + منکوزب بود (جدول شماره ۲). مصرف همزمان آسکوربیک‌اسید و منکوزب موجب کاهش تعداد اسپرم‌های غیر پیش‌رونده (۳۱/۴۵±۱/۵۹) و بی‌تحرک (۲۵/۲۷±۰/۹۸) شد (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۲- مقایسه میانگین تحرک و انواع حرکت اسپرم در گروه‌های مختلف

گروه‌های آزمایشی/ تحرک (٪)	تحرک اسپرم (٪)	متحرک پیشرونده (٪)	متحرک غیرپیشرونده (٪)	بی تحرک (٪)
کنترل	۸۰٫۴۸±۰٫۹۸	۶۵٫۷۷±۰٫۷۷	۳۴٫۲۲±۰٫۷۷	۱۹٫۵۱±۰٫۹۸
شم	۸۰٫۳۱±۰٫۸۷	۶۵٫۱۲±۰٫۷۴	۳۴٫۸۷±۰٫۷۴	۱۹٫۶۸±۰٫۸۷
منکوزب	۵۴٫۴۹±۱٫۳۲ ab***	۳۷٫۶۱±۱٫۷۹ ab**	۶۲٫۳۸±۱٫۷۹ ab**	۴۵٫۵±۱٫۳۲ ab***
آسکوربیک‌اسید + منکوزب	۷۴٫۷۲±۰٫۹۸	۶۸٫۵۴ ±۱٫۵۹ c***	۳۱٫۴۵ ±۱٫۵۹ c***	۲۵٫۲۷±۰٫۹۸

مقادیر به‌صورت Mean±SEM نشان داده شده است، (MANOVA, Tukey's test, $P<0.05$)، [a] اختلاف معنادار در مقایسه با گروه کنترل، [b] اختلاف معنادار در مقایسه با گروه شم، [c] اختلاف معنادار در مقایسه با گروه منکوزب،

* $P<$۰/۰۵، ** $P<$۰/۰۱، *** $P<$ ۰/۰۰۱

در مطالعه حاضر، نتایج بررسی وزن بدن در فرزندان نسل اوّل نشان داد که مواجهه با منکوزب (۳۱/۲۰±۱/۰۹) در دوران زندگی داخل رحمی و پس از آن در دوران شیردهی تأثیر چندانی بر وزن بدن فرزندان ندارد ($P>$۰/۹۹ و $P=$۰/۷۲)، درحالی‌که این پارامتر کاهش معناداری را در گروه منکوزب و آسکوربیک‌اسید در مقایسه با گروه کنترل ($P=$۰/۰۱) و شم ($P<$۰/۰۰۱) نشان داد (جدول شماره ۳). علاوه‌بر این، وزن هر دو بیضه (۰/۰۸±۰/۰۰) در گروه منکوزب به‌طور معناداری در مقایسه با گروه‌های کنترل و شم کاهش یافت ($P<$۰/۰۰۱)، درحالی‌که مقایسه وزن بیضه چپ و راست (۰/۱۰±۰/۰۰) بین گروه‌های منکوزب و آسکوربیک‌اسید به‌همراه منکوزب اختلاف معناداری نداشت (به ترتیب $P=$۰/۱۷ و $P=$۰/۴۱، جدول شماره ۳). همچنین شاخص گنادوسوماتیک یا نسبت وزن هر دو بیضه به وزن بدن (GSI) در گروه منکوزب (۰/۵۴±۰/۰۳) در مقایسه با گروه کنترل ($P<$۰/۰۰۱) به‌طور معناداری کاهش پیدا کرد و مصرف همزمان آسکوربیک‌اسید (۰/۷۷±۰/۰۲) به‌همراه سم توانست تا حدّ قابل‌قبولی این شاخص را در مقایسه با گروه منکوزب افزایش دهد ($P=$۰/۰۰۲، جدول شماره ۳).

جدول شماره ۳- مقایسه میانگین وزن بدن، وزن بیضه و GSI در گروه‌های مختلف

گروه‌های آزمایشی	وزن بدن (گرم)	وزن بیضه چپ (گرم)	وزن بیضه راست (گرم)	GSI
کنترل	۳۱٫۹۰±۰٫۷۲	۰٫۱۲±۰٫۰۰۴	۰٫۱۳±۰٫۰۰۳	۰٫۸۱±۰٫۰۲
شم	۳۴٫۲۰±۱٫۰۵	۰٫۱۲±۰٫۰۰۵	۰٫۱۲±۰٫۰۰۶	۰٫۷۲±۰٫۰۳
منکوزب	۳۱٫۲۰±۱٫۰۹	۰٫۰۸±۰٫۰۰۵ a*** b**	۰٫۰۸±۰٫۰۰۳ ab***	۰٫۵۴±۰٫۰۳ a***
آسکوربیک‌اسید + منکوزب	۲۷٫۵±۰٫۶۰ a* b***	۰٫۱۰±۰٫۰۰۲ a*	۰٫۱۰±۰٫۰۰۲	۰٫۷۷±۰٫۰۲ c**

مقادیر به‌صورت Mean±SEM نشان داده شده است، (MANOVA, Tukey's test, $P<0.05$)، [a] اختلاف معنادار در مقایسه با گروه کنترل، [b] اختلاف معنادار در مقایسه با گروه شم، [c] اختلاف معنادار در مقایسه با گروه منکوزب،

* $P<$۰/۰۵، ** $P<$۰/۰۱، *** $P<$ ۰/۰۰۱

علاوه‌بر اثرات مواجهه با منکوزب بر پارامترهای اسپرم فرزندان نر بالغ، نتایج حاصل از بررسی‌های هیستولوژیک بافت بیضه نشان داد که قطر لوله‌های اسپرم‌ساز در گروه منکوزب (۱۶۹/۴۰±۱۷/۴۷) نسبت به گروه‌های کنترل و شم اختلاف معناداری ندارد ($P>$۰/۹۹) و مصرف همزمان آسکوربیک‌اسید (۱۹۳/۹۷±۵/۶۸) توانست افزایش معناداری را در قطر لوله‌های اسپرم‌ساز در مقایسه با گروه شم ایجاد کند ($P=$۰/۰۳، جدول شماره ۴). همچنین، مصرف منکوزب در مقایسه با گروه‌های کنترل و شم، قطر مجرای لوله اسپرم‌ساز (۹۴/۱۳±۴/۹۵) را به‌طور معناداری افزایش داد (به‌ترتیب $P<$۰/۰۰۱ و $P=$۰/۰۰۲)، درحالی‌که مصرف آسکوربیک‌اسید به همراه منکوزب (۷۰/۲۴±۲/۷۶) به‌طور غیر معناداری قطر مجرای لوله اسپرم‌ساز را نسبت به گروه منکوزب کاهش داد ($P=$۰/۳۳). با این‌وجود، قطر مجاری لوله‌های اسپرم‌ساز در گروه منکوزب و آسکوربیک‌اسید (۷۰/۲۴±۲/۷۶) به‌طور غیرمعناداری بیشتر از گروه‌های کنترل ($P=$۰/۲۴) و شم ($P=$۰/۶۲) بود (جدول شماره ۴). همچنین گرچه کاهش قطر اپیتلیوم ژرمینال گروه منکوزب (۷۵/۲۷±۱۲/۹۱) در مقایسه با گروه‌های کنترل و شم معنادار نبود (به‌ترتیب $P=$۰/۸۶ و $P>$۰/۹۹)، اما مصرف آسکوربیک‌اسید موجب افزایش ضخامت اپیتلیوم این لوله‌ها (۱۲۳/۷۲±۳/۴۰) نسبت به گروه‌های شم ($P=$۰/۰۴) و منکوزب شد ($P=$۰/۰۰۲، جدول شماره ۴).

جدول شماره ۴- مقایسه میانگین اقطار و ضخامت اپیتلیوم لوله اسپرم‌ساز در گروه‌های مختلف

گروه‌های آزمایشی	قطر لوله اسپرم‌ساز (µm)	قطر مجرای لوله اسپرم‌ساز (µm)	ضخامت اپیتلیوم لوله اسپرم‌ساز(µm)
کنترل	۱۵۷,۴۹±۲,۸۴	۵۸,۶۱±۱,۴۳	۹۸,۸۸±۲,۵۸
شم	۱۵۵,۶۲±۳,۱۸	۶۰,۵۲±۲,۲۷	۹۵,۱۰±۲,۹۶
منکوزب	۱۶۹,۴۰±۱۷,۴۷	۹۴,۱۳±۴,۹۵ a***b***	۷۵,۲۷±۱۲,۹۱
آسکوربیک‌اسید + منکوزب	۱۹۳,۹۷±۵,۶۸ c*	۷۰,۲۴±۲,۷۶	۱۲۳,۷۲±۳,۴۰ b* c**

مقادیر به‌صورت Mean±SEM نشان داده شده است، (MANOVA, Tukey's test, $P<0.05$)، [a] اختلاف معنادار در مقایسه با گروه کنترل، [b] اختلاف معنادار در مقایسه با گروه شم، [c] اختلاف معنادار در مقایسه با گروه منکوزب،

* $P<$ ۰/۰۵، ** $P<$ ۰/۰۱، *** $P<$ ۰/۰۰۱

نتایج بررسی کیفیت لوله‌های اسپرم‌ساز و سلول‌های رده اسپرماتوژنیک در گروه‌های مختلف در جدول شماره ۵ نشان داده شده است. آنالیز داده‌های نمره جانسون نشان داد که این نمره در گروه منکوزب (۴/۸۲±۰/۴۸) کاهش معناداری نسبت به گروه‌های کنترل و شم داشت ($P<$ ۰/۰۰۱) و مصرف همزمان آسکوربیک‌اسید با منکوزب (۷/۵۱±۰/۱۵) در مقایسه با گروه منکوزب نتوانست به طرز قابل‌توجهی این کاهش نمره جانسون را تخفیف دهد ($P=$ ۰/۶۶)، (جدول شماره ۵). علاوه‌بر آن، کاهش معناداری در میانگین تعداد سه رده سلولی اسپرماتوژنیک یعنی اسپرماتوگونی (۳۶/۷۹±۶/۱۶)، اسپرماتوسیت (۵۰/۱۹±۱۳/۰۵) و اسپرماتید (۴۲/۷۱±۱۱/۸۴) و همچنین سلول‌های پشتیبان سرتولی در گروه منکوزب نسبت به گروه‌های کنترل ($P<$ ۰/۰۰۳، $P<$ ۰/۰۰۱، $P<$ ۰/۰۰۱ و $P<$ ۰/۰۰۱) و شم ($P<$ ۰/۰۱، $P<$ ۰/۰۰۱، $P=$ ۰/۰۰۱ و $P=$ ۰/۰۰۶) مشاهده شد. با این‌حال مصرف همزمان آسکوربیک‌اسید، نتوانست تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت و اسپرماتید را در مقایسه با گروه منکوزب به طرز چشمگیری افزایش دهد (به‌ترتیب $P>$ ۰/۹۹، $P=$ ۰/۱۱، $P=$ ۰/۴۱ و $P>$ ۰/۹۹۹ جدول شماره ۵)، با این‌حال تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی با مصرف آسکوربیک‌اسید در مقایسه با گروه‌های کنترل و شم اختلاف معناداری را نشان داد (به‌ترتیب $P=$ ۰/۰۰۸ و $P=$ ۰/۰۲ جدول شماره ۵). از طرفی مواجهه با منکوزب (۵/۴۷±۱/۳۰) تعداد سلول‌های سرتولی را در مقایسه با دو گروه کنترل و شم کاهش معناداری داد (به‌ترتیب $P<$ ۰/۰۰۱ و $P=$ ۰/۰۰۶). به‌هرحال مصرف همزمان آسکوربیک‌اسید (۸/۸۹±۰/۲۳)، توانست تعداد این سلول‌ها را در مقایسه با گروه منکوزب افزایش دهد، هرچند به سطح معنی‌داری نرسید ($P>$ ۰/۹۹)، به‌هرحال این مقدار به‌طور معناداری بیشتر از گروه کنترل بود ($P=$ ۰/۰۱، جدول شماره ۵).

جدول شماره ۵- مقایسه میانگین نمره جانسون، تعداد سلول رده اسپرماتوژنیک و سرتولی در گروه‌های مختلف

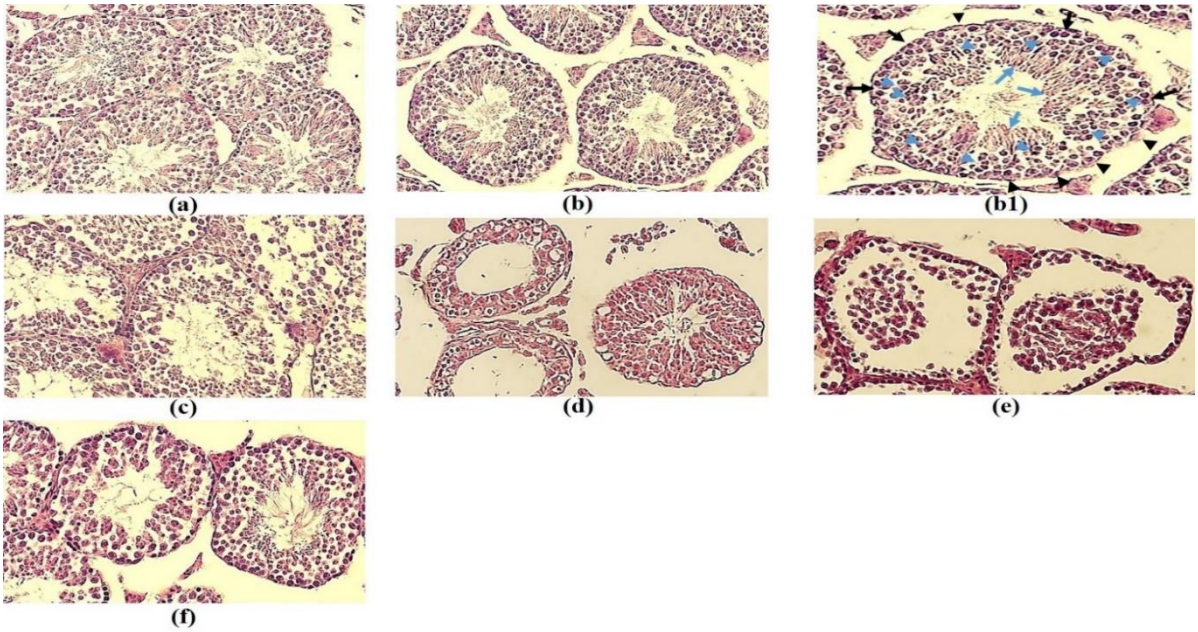
گروه‌های آزمایشی	نمره جانسون	اسپرماتوگونی	اسپرماتوسیت	اسپرماتید	سرتولی
کنترل	۹,۳۲±۰,۱۴	۵۸,۰۵±۰,۵۱	۱۰۳,۵۷±۲,۷۹	۱۳۶,۸۵±۱,۴۲	۱۹,۴۷±۰,۴۶
شم	۹,۳۴±۰,۱۱	۵۷,۵۷±۰,۴۴	۱۱۴,۷۱±۲,۶۹	۱۳۸,۰۱±۶,۹۲	۱۸,۱۳±۰,۳۳
منکوزب	۴,۸۲±۰,۴۸ a**b***	۳۶,۷۹±۶,۱۶ a**b*	۵۰,۱۹±۱۳,۰۵ a*b***	۴۲,۷۱±۱۱,۸۴ a***b**	۵,۴۷±۱,۳۰ a***b**
آسکوربیک‌اسید + منکوزب	۷,۵۱±۰,۱۵	۴۸,۰۱±۰,۳۶ a**b*	۱۰۵,۶۸±۰,۶۲	۱۱۶,۱۶±۰,۴۰	۸,۸۹±۰,۲۳ a*

مقادیر به‌صورت Mean±SEM نشان داده شده است، (MANOVA, Tukey's test, $P<0.05$)، [a] اختلاف معنادار در مقایسه با گروه کنترل، [b] اختلاف معنادار در مقایسه با گروه شم، [c] اختلاف معنادار در مقایسه با گروه منکوزب،

* $P<$ ۰/۰۵، ** $P<$ ۰/۰۱، *** $P<$ ۰/۰۰۱

بررسی کیفی هیستوپاتولوژی بیضه نشان داد که در گروه‌های کنترل و شم، ساختار بافتی لوله‌های اسپرم‌ساز به‌خوبی تمایز یافته، منظم و از نظر اندازه و ظاهر طبیعی بود. این لوله‌ها با ردیف‌های منظمی از سلول‌های زایا در مراحل مختلف تمایز پوشیده شده بودند و در مجرای آن‌ها، اسپرم‌های بالغ مشاهده می‌شد (شکل شماره ۱ a و b). برخلاف آن‌ها، مصرف منکوزب موجب آسیب بافتی و تغییرات دژنراتیور در اکثر لوله‌های اسپرم‌ساز شد. این تغییرات شامل لوله‌های اسپرم‌ساز سازمان‌نیافته و نامتقارن همراه با ظاهری نامنظم در اندازه‌های مختلف بود که روند اسپرماتوژنز در آن‌ها به خوبی انجام نشده بود. لوله‌های اسپرم‌ساز تقریباً فاقد اسپرماتوزوآ و اسپرماتید بودند و درجات مختلفی از تغییرات دژنراتیو سلول‌های ژرمینال را نشان دادند که شامل کاهش تراکم سلولی (شکل شماره ۱ c)، دژنراسیون و واکوئلی شدن سلول‌های

اسپرماتوگونی و سرتولی به‌همراه افزایش قطر مجرای لوله‌های اسپرم‌ساز (شکل شماره ۱ d) و جداشدگی رده‌های سلولی ژرمینال همراه با ریزش آن‌ها از دیواره لوله به داخل مجرا بود (شکل شماره ۱ e). در گروه آسکوربیک‌اسید، فتومیکروگراف بیضه، اپیتلیوم ژرمینال سازمان‌یافته و اسپرماتوژنز فعال را در مقایسه با گروه منکوزب و نزدیک به گروه کنترل نشان داد (شکل شماره ۱ f).



شکل شماره ۱- تصاویر میکروسکوپی از بافت بیضه موش‌های نر بالغ نسل اوّل در گروه‌های مختلف: (a) کنترل، (b) شم، (b1) یکی از مقاطع لوله اسپرم‌ساز شم با بزرگنمایی بیشتر (۶۴۰×)، (c-e) منکوزب و (f) آسکوربیک‌اسید + منکوزب (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ائوزین، بزرگنمایی ۴۰۰×) سر فلش سیاه نشان‌دهنده سلول‌های سروتولی، فلش سیاه نشان‌دهنده سلول‌های اسپرماتوگونی، سر فلش آبی نشان‌دهنده سلول‌های اسپرماتوسیت و فلش آبی‌رنگ نشان‌دهنده سلول‌های اسپرماتید می‌باشد.

بحث

مطالعه حاضر اثر محافظتی آسکوربیک‌اسید را در مقابل آثار مخرب ناشی از منکوزب در نسل اوّل نر نشان می‌دهد؛ به‌طوری‌که اغلب پارامترهایی که در تحقیق حاضر موردارزیابی قرار گرفتند، مانند کاهش درصد حیات، میزان نوع حرکت و بدشکلی اسپرم‌ها در مواجهه با منکوزب با مصرف آسکوربیک‌اسید به‌طور معناداری بهبود پیدا کرد. ضخامت اپیتلیوم لوله‌های اسپرم‌ساز که با مصرف منکوزب کاهش و مجرای آن‌ها افزایش پیدا کرده بود، به‌طور معناداری ترمیم شد. منکوزب ازطریق متابولیت‌هایش مانند اتیلن‌تیوره و دی‌سولفیدکربن اثرات بیولوژیکی خود را نشان می‌دهد [۳۷]. دی‌سولفیدکربن سبب کاهش قابل‌توجهی در سطح سرمی تستوسترون، تغییرات دژنراتیو در بافت بیضه، تأثیر بر اسپرماتوژنز و تغییراتی در اپیدیدیم می‌شود [۱۰]. با کاهش روند اسپرماتوژنز، ضخامت اپیتلیوم ژرمینال کاهش یافته، قطر مجرا بزرگ به نظر می‌رسد. آسکوربیک‌اسید کاهش نمره جانسون را به‌واسطه منکوزب بالا برد، اما به گروه کنترل نرسید. شاخص گونادوسوماتیک با مصرف منکوزب بر روی پارامترهای اسپرم و بافت بیضه پیش از این هم در مطالعات قبلی ما گزارش شده بود. با توجه به نتایج تحقیق حاضر بر روی نسل اوّل، پیامد مواجهه با منکوزب، کاهش پارامترهای فوق و درنتیجه ناباروری در جنس نر خواهد بود که باوجود اثرات قوی آنتی‌اکسیدانی آسکوربیک‌اسید به‌طور مؤثری می‌توان از آن جلوگیری کرد. پیش از این، اثر مصرف همزمان ویتامین‌های E و C بر میزان آپوپتوز سیستم تولیدمثلی زن و مرد بررسی شده بود [۱۸]. به‌طور کلی ویتامین E دارای اثرات تأییدشده بر سیستم تولیدمثلی می‌باشد [۲۰]، اما هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر محافظتی آسکوربیک‌اسید بر آثار مخرب منکوزب بود. مصرف منکوزب که کارگران زمین‌های کشاورزی و مصرف‌کنندگان محصولات کشاورزی آلوده به این آفت‌کش را تهدید می‌کند [۳۸]، روشی مؤثر برای مقابله با آفت‌هاست؛ اما برای سایر ارگانیسم‌ها ازجمله حیوانات و انسان خطرناک است. درصد بالایی از زنان حامله در گروه‌های شهرنشین (۸۵٪)، از بعضی اشکال آفت‌کش‌ها استفاده می‌کنند [۳۹]. ازطرفی افزایش اجتناب‌ناپذیر

دفع مواد شیمیایی و کشاورزی در آب‌های سطحی و ارتباط آن با خطرات و صدمات ناشی از آن در هنگام تولد، تولد تا دوران منوپوز و تمام طول عمر در زنان وجود دارد [۴۰]. سیستم تولیدمثل از جمله ارگان‌هایی است که در معرض آسیب توسط آفت‌کش‌ها می‌باشد. نتایج مطالعه Swan حاکی از افزایش ناباروری مردان به‌واسطه منکوزب بود [۴۱]. کاهش قابل‌توجه تعداد اسپرم‌های اپیدیدیم و بدشکلی اسپرم‌ها در پی مواجهه با منکوزب در تحقیقات دیگری گزارش شد [۴۲] [۴۳،۱]. نتایج Ksheerasagar و همکارانش (۲۰۰۳)، کاهش تعداد سلول‌های زایا و قطر اپیتلیوم لوله‌های اسپرم‌ساز را به‌واسطه مواجهه با منکوزب نشان داد [۴۴]. در مطالعه دیگری Girish و همکارانش (2018) نشان دادند [۴۵] که مواجهه با منکوزب می‌تواند سمیت بیضه‌ای را القا کند و فعالیت آنزیم‌های مربوط به سنتز تستوسترون را کاهش دهد. همچنین محمّدی ساردو در سال ۲۰۱۸ نشان داد [۱۲] که منکوزب می‌تواند با استرس اکسیداتیو و القای آپوپتوز سمیت بیضه‌ای را به پیش ببرد و مصرف آنتی‌اکسیدان‌ها این تأثیرات منفی را تخفیف می‌دهد. همچنین آن‌ها نشان دادند که سدّ خونی بیضه‌ای پس از مواجهه با منکوزب دچار اختلال شده، یکپارچگی خود را از دست می‌دهد. در مطالعه حاضر اثر محافظتی آسکوربیک‌اسید در مقابل آسیب‌های ناشی از منکوزب در دوزی کمتر از دوز کشنده (کمتر از یک‌دهم دوز LD50 ، ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) [۴۶] که احتمالاً بیشتر از دوز آلودگی محصولات کشاورزی و آب آشامیدنی است، بررسی شد [۴۷]. اثرات مخرب منکوزب بر سیستم تناسلی مردان عمدتاً ازطریق اختلال در سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی سلول‌ها و افزایش تولید رادیکال‌های آزاد می‌باشد [۴۸]. اختلال در ساختار DNA، توقف چرخه سلولی، فعال‌نمودن روند آپوپتوز سلول، پراکسیداسیون لیپیدی غشا و تخریب ساختار لیپیدی غشای اسپرم به‌واسطه القای استرس اکسیداتیو و افزایش تولید ROS پیش از این نیز گزارش شده است [۵۲-۴۹]. اگرچه تولید ROS در ارگانی مانند بیضه رخدادی طبیعی است، اما به‌هم خوردن تعادل تولید ROS در بیضه جنین به هنگام مواجهه با منکوزب و القای آسیب اکسیداتیو DNA سلول‌های زایای بیضه جنین، خطری بالقوه برای فرزندان است [۵۴،۵۳،۱۷]. با توجه به این یافته‌ها به‌نظر می‌رسد که یکی از راه‌های مقابله با اثرات مخرب منکوزب، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها و ویتامین‌ها باشد. مطالعات قبلی ما اثر محافظتی ویتامین E را بر پارامترهای اسپرم و آسیب بیضه در فرزندان نر نسل اوّل به‌واسطه مواجهه با منکوزب قبل و بعد از تولد تأیید کرد. نتایج این تحقیقات نشان داد که مصرف همزمان منکوزب و ویتامین E پارامترهای اسپرم و بافت بیضه موش را در مقابل اثرات آپوپتوتیک و مضر منکوزب محافظت می‌کند [۱۸،۱۷]. این یافته‌ها ما را بر آن داشت تا اثر محافظتی یکی دیگر از آنتی‌اکسیدان‌ها (آسکوربیک‌اسید) را در مصرف همزمان با منکوزب بر پارامترهای اسپرم و ساختار بیضه نوزادن نسل اوّل که تاکنون بررسی نشده، مطالعه کنیم. علیرغم اثرات پروآپوپتوتیک، نکروتیک و همچنین ایجاد اختلال در سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی سلول‌ها و افزایش تولید رادیکال‌های آزاد توسط منکوزب [۵۷،۳۸-۵۵]، تعداد زیادی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی می‌توانند اثرات ژنوتوکسیک (Genotoxic) آلوده‌کننده‌های محیطی را به‌طرز چشمگیری کاهش دهند و مانع از اثرات مخرب رادیکال‌های آزاد بر سلول‌ها شوند [۵۸]. آنتی‌اکسیدان‌ها وظایف بیولوژیکی مهمّی در بدن ازطریق حفاظت در برابر صدمات اکسیدانی به DNA دارند [۵۹]. افزایش غلظت آسکوربیک‌اسید در پلاسمای سمینال با حفظ یکپارچگی ژنوم، اسپرم را از صدمات ناشی از حملات ROS به DNA اسپرم محافظت می‌کند [۶۰]. آسکوربیک‌اسید به‌عنوان آنتی‌اکسیدان تقویت‌کننده باروری در پستانداران [۶۱]، باعث افزایش تعداد اسپرم‌های نرمال [۶۲] و حفاظت اسپرم و باروری در مقابل آسیب‌های اکسیداتیو می‌شود [۶۶-۶۳]. مردان دارای اسپرم نرمال سطح بالاتری از این ویتامین و میزان کمتری از پراکسیداسیون لیپیدی را در پلاسمای سمینال دارند. همچنین ارتباط مثبتی بین میزان این ویتامین با توان باروری گزارش شده است [۶۷]. اثرات تخفیف‌دهنده آسکوربیک‌اسید بر سمیت القاشده توسط منکوزب بر پارامترهای اسپرم تأیید شده است [۶۸]؛ به‌طوری‌که این ویتامین می‌تواند اثرات احتمالی سمیت ژنومی (Genotoxicity) و اسپرم‌کشی ناشی از رادیکال‌های آزاد را که در طی متابولیسم سلولی آفت‌کش‌ها تولید می‌شوند، خنثی کند [۶۹]. گزارش El-Missiry نیز تأییدی بر اثر حفاظتی آسکوربیک‌اسید در مقابل استرس اکسیداتیو القاشده توسط آلوکسان و بهبود سطح پلاسمای تستوسترون است [۷۰]. سطوح پایین آسکوربیک‌اسید با افزایش مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم، کاهش تعداد اسپرم، کاهش باروری و آگلوتیناسیون اسپرم همراه است [۷۱]. ازطرفی، آسکوربیک‌اسید جهت حفظ تمامیت فیزیولوژیک، تمایز و عملکرد بیضه‌ای ضروری است [۷۳-۷۱]. با توجه به نقش حیاتی آسکوربیک‌اسید، ذخیره‌ای از آن در بافت بیضه وجود دارد [۷۴]. یافته‌های فوق، نتایج تحقیق حاضر را تأیید می‌کنند. اثرات مخرب منکوزب بر سیستم تولیدمثل نر پیش از این نشان داده شده بود. Runkle و همکاران (۲۰۱۷)، تغییرات ساختاری و بیوشیمیایی بیضه موش صحرایی و آزمایشگاهی را پس از مواجهه طولانی‌مدت با

منکوزب و کاهش تعداد اسپرم و افزایش بدشکلی آن را در تمام گروه‌های مواجه‌شده با منکوزب نشان داده بودند [۱]. همچنین، در سال ۲۰۱۴ عملکرد و تحرک اسپرم گاو به‌دنبال مواجهه کوتاه‌مدت با منکوزب ارزیابی شد و نتایج آن‌ها، یافته‌های مطالعه حاضر را تأیید می‌کند [۷۵]. مقایسه مطالعه ساختار بیضه و آنالیز اسپرم در گروه منکوزب، نشانگر آسیب وسیع ناشی از منکوزب بر بافت بیضه است. کاهش معنادار تعداد سلول‌های زایا و سلول‌های سرتولی پس از مصرف اکتی‌فنول نیز پیش از این گزارش شده بود [۷۶]. همچنین، کاهش نمره جانسون در گروه منکوزب در مطالعه حاضر می‌تواند ناشی از آپوپتوز سلول‌های زاینده بیضه جنینی و به‌دنبال آن کاهش تولید سلول‌های رده اسپرماتوژنیک باشد [۷۷] که به نوبه خود می‌تواند منجر به کاهش باروری و یا ناباروری شود. توده بیضه‌ای که شاخصی ارزشمند از میزان اثرات سمّی قارچ‌کش‌ها بر سیستم تولیدمثل است، در حیوانات نر [۷۸] با افزایش اثرات قارچ‌کش‌ها کاهش می‌یابد و این کاهش در توده بیضه با از دست دادن سلول‌های جنسی همراه است [۷۹]. کاهش تعداد سلول‌های زاینده و اسپرم همراه با کاهش تعداد و عملکرد سلول‌های سرتولی پس از مواجهه با منکوزب خطر بروز ناباروری را افزایش می‌دهد [۷۶]. مواجهه با این آفت‌کش‌ها در دوران جنینی که ارگان‌های جنسی از جمله بیضه‌ها در حال شکل‌گیری و تکامل هستند [۵۳،۸۰]، از اهمیت بسیاری برخوردار است که مورد توجه تحقیق حاضر بود. Shen و همکاران (۲۰۰۱) نشان دادند که استرس اکسیداتیو با کاهش سطح آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی در سلول‌های لیدیگ، سنتز و ترشح تستوسترون را کاهش می‌دهد. با توجه به این‌که تستوسترون، هورمونی ضروری برای روند طبیعی اسپرماتوژنز است، کاهش آن موجب اختلال در تولید اسپرم، تشکیل اسپرم ناقص و کاهش عملکرد اسپرم و ناباروری در مردان می‌شود [۸۱]. اثرات بهبوددهنده آسکوربیک‌اسید در مطالعه حاضر به‌واسطه قابلیت عبور این ویتامین از سدّ جفتی و شیر و احتمالاً حفاظت بیومارکرهای فرزندان از آسیب‌های پراکسیداتیو است [۸]. باتوجه به توانایی عبور منکوزب از جفت (blood-placental-barrier) و شیر (blood-milk-barrier) [۸]، سیستم تولیدمثل جنین در حال رشد تحت‌تأثیر اثرات مخرب ناشی از سموم از جمله منکوزب می‌باشد. Bianchi و همکاران (۲۰۲۰) این موضوع را تأیید می‌کنند [۸۲]. به‌هرحال اغلب مطالعات، اثرات مخرب منکوزب را به افزایش رادیکال‌های آزاد و اثرات مثبت آسکوربیک‌اسید را به خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن نسبت می‌دهند که متأسفانه در این مطالعه موردارزیابی قرار نگرفت، از این‌رو ارزیابی وضعیت استرس اکسیداتیو سرم و بافت بیضه در فرزندان نسل اوّل می‌تواند مکانیسم احتمالی اثرات این مواجهه را توجیه نماید.

نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که مواجهه با منکوزب در طی دوران بارداری و شیردهی، اثرات نامطلوبی بر پارامترهای بافت بیضه و اسپرم فرزندان موش نر دارد و تجویز همزمان آسکوربیک‌اسید با منکوزب، می‌تواند موجب کاهش سمیت القاشده با منکوزب در بافت بیضه موش شود. به‌نظر می‌رسد که احتمالاً آسکوربیک‌اسید به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی توانسته وضعیت استرس اکسیداتیو ناشی از منکوزب را تخفیف دهد، هرچند که دوز بالاتری از آسکوربیک‌اسید ممکن است اثرات مطلوب‌تری بر اثرات مضر ناشی از منکوزب بر بافت بیضه و روند اسپرماتوژنز داشته باشد. بروز اختلال در ساختار و عملکرد بیضه همراه با کاهش پارامترهای اسپرم و احتمال ناباروری از دلایل احتیاط در مواجهه با منکوزب است.

تقدیر و تشکر

مطالعه حاضر، بخشی از پایان نامه دکتری آقای اسماعیل سعدین بود که توسط معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان با شماره گرنت (۹۳۰۲۱۷) مورد حمایت مالی قرار گرفت.

References

[1] Runkle J, Flocks J, Economos J, Dunlop AL. A systematic review of Mancozeb as a reproductive and developmental hazard. ***Environ int*** 2017;99: 29-42.
[2] Hashemi SM, Rostami R, Hashemi MK, Damalas CA. Pesticide use and risk perceptions among farmers in southwest Iran. ***Hum Ecol Risk Assess***: An International Journal 2012;18(2): 456-70.
[3] Shafiee F, Rezvanfar A, Hashemi F. Vegetable growers in southern Tehran, Iran: Pesticides types, poisoning symptoms, attitudestowards pesticide-specific issues and environmental safety. ***Afr J Agric Res*** 7(5): 790-6.
[4] United States Environmental Protection Agency Reregistration Eligibility Decision for Mancozeb. 0643; Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances Washington, DC; 2005. 1-169.
[5] Zhou Y, Shie F-S, Piccardo P, Montine T, Zhang J. Proteasomal inhibition induced by manganese ethylene-bis-dithiocarbamate: Relevance to parkinson′ s disease. ***Neurosci*** 2004;128(2): 281-91.

[6] Goldner WS, Sandler DP, Yu F, Hoppin JA, Kamel F, LeVan TD. Pesticide use and thyroid disease among women in the Agricultural Health Study. ***Am J Epidemiol*** 2010;171(4): 455-64.
[7] Nordby K-C, Andersen A, Irgens LM, Kristensen P. Indicators of mancozeb exposure in relation to thyroid cancer and neural tube defects in farmers' families. ***Scand J Work Environ Health*** 2005: 89-96.
[8] Yadav IC, Devi NL, Syed JH, Cheng Z, Li J, Zhang G, et al. Current status of persistent organic pesticides residues in air, water, and soil, and their possible effect on neighboring countries: a comprehensive review of India. ***Sci Total Environ*** 2015;511: 123-37.
[9] Rath NC, Rasaputra KS, Liyanage R, Huff GR, Huff WE. Dithiocarbamate toxicity-an appraisal. Pesticides in the Modern World—Effects of Pesticides Exposure. Fayetteville: Arkanzas University; 2011;2011: 323-40.
[10] Patel K, Gautam A, Vaghasia Y. Carbon disulphide induced impairments in male reproductive system in rats. ***Indian J Physiol Pharmacol*** 1999;53(1): 22-8.
[11] Stoker TE, Jeffay SC, Zucker RM, Cooper RL, Perreault SD. Abnormal fertilization is responsible for reduced fecundity following thiram-induced ovulatory delay in the rat. ***Biol Reprod*** 2003;68(6): 2142-9.
[12] Mohammadi-Sardoo M, Mandegary A, Nabiuni M, Nematollahi-Mahani S-N, Amirheidari B. Mancozeb induces testicular dysfunction through oxidative stress and apoptosis: protective role of N-acetylcysteine antioxidant.
Toxicol Ind Health 2018;34(11): 798-811.
[13] Alavanja MCR. Pesticides use and exposure extensive worldwide. ***Rev Environ Health*** 2009;24(4): 303.
[14] Jaga K, Dharmani C. Sources of exposure to and public health implications of organophosphate pesticides. Revista panamericana de salud publica. 2003;14(3): 171-85.
[15] Zhang X, Zhao W, Jing R, Wheeler K, Smith GA, Stallones L, et al. Work-related pesticide poisoning among farmers in two villages of Southern China: a cross-sectional survey. ***BMC Public Health*** 2011;11(1): 429.
[16] Vaez-mehrabi-kerman. Determination of organophosphates pesticides in shirud river.[Thesis] Tehran. Azad University. 2000.
[17] Saddein E, Haghpanah T, Nematollahi-Mahani SN, Seyedi F, Ezzatabadipour M. Preventative effects of vitamin E on testicular damage and sperm parameters in the first-generation mice pups due to pre- and postnatal mancozeb exposure. ***J Toxicol*** 2019; 2019.
[18] Mahdi H, Tahereh H, Esmaiel S, Massood E. Vitamins E and C prevent apoptosis of testicular and ovarian tissues following mancozeb exposure in the first-generation mouse pups. ***Toxicol Ind Health*** 2019;35(2): 136-44.
[19] Esmaiel S, Tahereh H, Noreddin N-MS, Massood E. Mancozeb exposure during development and lactation periods results in decreased oocyte maturation, fertilization rates, and implantation in the first-generation mice pups: Protective effect of vitamins E and C. ***Toxicol Ind Health*** 2019;35(11-12): 714-25.
[20] Malmir M, Mehranjani MS, Faraji T, Noreini SN. Antioxidant effect of Vitamin E on the male rat reproductive system by a high oral dose of Bisphenol-A. ***Toxicol Res Appl*** 2021;5: 23978473211005562.
[21] Sadi G, Yılmaz Ö, Güray T. Effect of vitamin C and lipoic acid on streptozotocin-induced diabetes gene expression: mRNA and protein expressions of Cu–Zn SOD and catalase. ***Mol Cell Biochem*** 2008;309(1): 109-16.
[22] Nath RK, Akhter M, Sarker KR, Rahman MR, Chowdhury SS, Ishrat R. Effect of Vitamin C on Blood Glucose & Serum Lipids in Type 2 Diabetes Patients. ***KYAMC j*** 2013;4(1): 337-40.
[23] Shamsi MA, Amin A, Adeghate E. Effect of vitamin C on liver and kidney functions in normal and diabetic rats. ***Ann N Y Acad Sci*** 2006;1084(1): 371-90.
[24] Acharya UR, Mishra M, Patro J, Panda MK. Effect of vitamins C and E on spermatogenesis in mice exposed to cadmium. ***Reprod Toxicol*** 2008; 25(1): 84-8.
[25] Krishnamoorthy G, Venkataraman P, Arunkumar A, Vignesh R, Aruldhas M, Arunakaran J. Ameliorative effect of vitamins (α-tocopherol and ascorbic acid) on PCB (Aroclor 1254) induced oxidative stress in rat epididymal sperm. ***Reprod Toxicol*** 2007;23(2): 239-45.
[26] Rossi G, Buccione R, Baldassarre M, Macchiarelli G, Palmerini MG, Cecconi S. Mancozeb exposure in vivo impairs mouse oocyte fertilizability. ***Reprod Toxicol*** 2006;21(2):216-9.
[27] Ambali SF, Orieji C, Abubakar WO, Shittu M, Kawu MU. Ameliorative effect of vitamin C on alterations in thyroid hormones concentrations induced by subchronic coadministration of chlorpyrifos and lead in wistar rats. ***J Thyroid Res*** 2011; 2011.
[28] Uzunhisarcikli M, Kalender Y, Dirican K, Kalender S, Ogutcu A, Buyukkomurcu F. Acute, subacute and subchronic administration of methyl parathion-induced testicular damage in male rats and protective role of vitamins C and E. ***Pestic Biochem Physiol*** 2007;87(2): 115-22.
[29] Zhang Y, Wang H, Li Y, Peng Y. A review of interventions against fetal alcohol spectrum disorder targeting oxidative stress. ***Int J Dev Neurosci*** 2018;71: 140-5.
[30] Lu J-C, Huang Y-F, Lü N-Q. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human

Semen: its applicability to andrology laboratories in China. ***Zhonghua Nan Ke Xue*** 2010;16(10): 867-71.
[31] Zare M, Haghpanah T, Shekari MA, Eftekhar-Vaghefi SH. The prophylactic effect of date palm (Phoenix dactylifera L.) fruit extract on testicular toxicity induced by formaldehyde: An experimental study. ***Int J Reprod Biomed*** 2020;18(4): 275.
[32] Adebayo A, Oke B, Akinloye A. Characterizing the gonadosomatic index and its relationship with age in greater cane rat (Thryonomys swinderianus, Temminck). ***J Vet Anat*** 2009;2: 53-9.
[33] Guneli E, Tugyan K, Ozturk H, Gumustekin M, Cilaker S, Uysal N. Effect of melatonin on testicular damage in streptozotocin-induced diabetes rats. ***Eur Surg Res*** 2008;40(4): 354-60.
[34] Hakemi SG, Sharififar F, Haghpanah T, Babaee A, Eftekhar-Vaghefi SH. The effects of olive leaf extract on the testis, sperm quality and testicular germ cell apoptosis in male rats exposed to busulfan. ***Int J Fertil Steril*** 2019;13(1): 57.
[35] Zheng Y-Q, Zhang X-B, Zhou J-Q, Cheng F, Rao T, Yao Y. The effects of artery-ligating and artery-preserving varicocelectomy on the ipsilateral testes in rats***. Urol*** 2008;72(5): 1179-84.
[36] Coskun G, Oskun G, Özqur H, Doran Ş, Polat S. Ameliorating effects of curcumin on nicotine-induced mice testes. ***Turk J Med Sci*** 2016;46(2): 549-560.
[37] O'Neil WM, Marshall WD. Goitrogenic effects of ethylenethiourea on rat thyroid. ***Pestic Biochem Physiol*** 1984;21(1): 92-101.
[38] Lushchak VI, Matviishyn TM, Husak VV, Storey JM, Storey KB. Pesticide toxicity: a mechanistic approach. ***EXCLI J*** 2018;17: 1101.
[39] Whyatt RM, Garfinkel R, Hoepner LA, Holmes D, Borjas M, Williams MK, et al. Within-and between-home variability in indoor-air insecticide levels during pregnancy among an inner-city cohort from New York City. ***Environ Health Perspect*** 2007;115(3): 383.
[40] Winchester PD, Huskins J, Ying J. Agrichemicals in surface water and birth defects in the United States. ***Acta Paediatr*** 2009;98(4): 664-9.
[41] Swan SH. Semen quality in fertile US men in relation to geographical area and pesticide exposure. ***Int J Androl*** 2006;29(1): 62-8.
[42] Ashkanani M, Farhadi B, Ghanbarzadeh E, Akbari H. Study on the protective effect of hydroalcoholic Olive Leaf extract (oleuropein) on the testis and sperm parameters in adult male NMRI mice exposed to Mancozeb. ***Gene Rep*** 2020;21: 100870.
[43] Mathur N, Pandey G, Jain G. Pesticides: A review of the male reproductive toxicity. ***J Herb Med Toxicol*** 2010;4(1): 1-8.
[44] Ksheerasagar RL, Kaliwal BB. Temporal effects of mancozeb on testes, accessory reproductive organs and biochemical constituents in albino mice. ***Environ Toxicol Pharmacol*** 2003;15(1): 9-17.
[45] Girish B, Reddy PS. Forskolin ameliorates mancozeb-induced testicular and epididymal toxicity in Wistar rats by reducing oxidative toxicity and by stimulating steroidogenesis. ***J Biochem Mol Toxicol*** 2018;32(2): e22026.
[46] Kamrin MA. Pesticide profiles: toxicity, environmental impact, and fate: Boca Raton: CRC press; 1997. p. 227-240.
[47] Sakr SA, Mahran HA, Abdel-Maksoud AM. Suppressive effect of Ginkgo biloba extract (EGb 761) on topsin induced ovarian toxicity and oxidative stress in albino rats. ***J Appl Pharm Sci*** 2011 Jun 1;1(4): 46.
[48] Kackar R, Srivastava MK, Raizada RB. Induction of gonadal toxicity to male rats after chronic exposure to mancozeb. ***Ind health*** 1997;35(1): 104-11.
[49] Iorio R, Castellucci A, Rossi G, Cinque B, Cifone MG, Macchiarelli G, et al. Mancozeb affects mitochondrial activity, redox status and ATP production in mouse granulosa cells. ***Toxicol In Vitro*** 2015;30(1): 438-45.
[50] Ravie O, Lake P. The phospholipid-bound fatty acids of fowl and turkey spermatozoa. ***Anim Reprod Sci*** 1985;9(2): 189-92.
[51] Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. ***Urol*** 1996;48(6): 835-50.
[52] Bansal AK, Bilaspuri G. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. ***Vet Med Int*** 2011; 2011.
[53] Sharpe RM. Pathways of endocrine disruption during male sexual differentiation and masculinisation. ***Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*** 2006;20(1): 91-110.
[54] Anindita Mitra and Saumen Kumar Maitra. Reproductive toxicity of organophosphate and carbamate pesticides. ***Ann Clin Toxicol***; 2018: 1-8.
[55] Pavlovic V, Cekic S, Ciric M, Krtinic D, Jovanovic J. Curcumin attenuates Mancozeb-induced toxicity in rat thymocytes through mitochondrial survival pathway. ***Food Chem Toxicol*** 2016;88: 105-11.
[56] Srivastava AK, Ali W, Singh R, Bhui K, Tyagi S, Al-Khedhairy AA, et al. Mancozeb-induced genotoxicity and apoptosis in cultured human lymphocytes. ***Life Sci*** 2012;90(21-22): 815-24.
[57] Corsini E, Viviani B, Birindelli S, Gilardi F, Torri A, Codec Ìl, et al. Molecular mechanisms underlying mancozeb-induced inhibition of TNF-alpha production. ***Toxicol Appl Pharmacol*** 2006;212(2): 89-98.
[58] Poljšak B, Fink R. The protective role of antioxidants in the defence against ROS/RNS-mediated environmental pollution. ***Oxid Med Cell Longev*** 2014; 2014.
[59] McCall MR, Frei B. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? ***Free Radic Biol Med*** 1999;26(7-8): 1034-53.

[60] Fraga CG, Motchnik PA, Shigenaga MK, Helbock HJ, Jacob RA, Ames BN. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. ***Proc Natl Acad Sci*** 1991;88(24): 11003-6.
[61] Sönmez M, Türk G, Yüce A. The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels of male Wistar rats. ***Theriogenology*** 2005;63(7): 2063-72.
[62] Harris WA, Harden TE, Dawson EB. Apparent effect of ascorbic acid medication on semen metal levels. ***Fertil Steril*** 1979;32(4):455.
[63] Agarwal A, Prabakaran SA, Said TM. Prevention of oxidative stress injury to sperm. ***J Androl*** 2005;26(6): 654-60.
[64] Eskenazi B, Kidd S, Marks A, Sloter E, Block G, Wyrobek A. Antioxidant intake is associated with semen quality in healthy men. ***Hum Reprod*** 2005;20(4): 1006-12.
[65] Castellini C, Lattaioli P, Dal Bosco A, Minelli A, Mugnai C. Oxidative status and semen characteristics of rabbit buck as affected by dietary. ***Reprod Nutr Dev*** 2003;43(1): 91-103.
[66] Yousef M, Abdallah G, Kamel K. Effect of ascorbic acid and vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. ***Anim Reprod Sci*** 2003;76(1-2): 99-111.
[67] Das P, Choudhari A, Dhawan A, Singh R. Role of ascorbic acid in human seminal plasma against the oxidative damage to the sperms. ***Indian J Clin Biochem*** 2009;24(3): 312-5.
[68] Khan P, Sinha S. Ameliorating effect of vitamin C on murine sperm toxicity induced by three pesticides (endosulfan, phosphamidon and mancozeb). ***Mutagenesis*** 1996;11(1): 33-6.
[69] Machlin LJ, Bendich A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. ***FASEB J*** 1987;1(6): 441-5.
[70] El-Missiry MA. Enhanced testicular antioxidant system by ascorbic acid in alloxan diabetic rats. ***Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*** 1999;124(3): 233-7.
[71] Dawson EB, Harris WA, Powell LC. Relationship between ascorbic acid and male fertility. ***World Rev Nutr Diet*** 1990;62: 1-26.
[72] Salem M, Kamel K, Yousef M, Hassan G, El-Nouty F. Protective role of ascorbic acid to enhance semen quality of rabbits treated with sublethal doses of aflatoxin B 1. ***Toxicol*** 2001;162(3): 209-18.
[73] Murugesan P, Muthusamy T, Balasubramanian K, Arunakaran J. Studies on the protective role of vitamin C and E against polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254)—induced oxidative damage in Leydig cells. ***Free Radic Res*** 2005;39(11): 1259-72.
[74] Mukkadan J. Observations on ascorbic acid content and cholesterol in male rat reproductive tissues. ***Indian J Exp Biol*** 1980;18(10): 1186-8.
[75] Krishanthe K, Abegunawardana W, Rathnayake C, Wijayagunawardane M, Lee K, Kodithuwakku S. Effects of fungicide'Mancozeb'on bovine spermatozoa. ***Proceedings of Peradeniya University International Research Sessions***,(iPURSE'14). 2014 July 18, Sri Lanka.
[76] Bian Q, Qian J, Xu L, Chen J, Song L, Wang X. The toxic effects of 4-tert-octylphenol on the reproductive system of male rats. ***Food Chem Toxicol*** 2006;44(8): 1355-61.
[77] Aktas C, Kanter M, Erboga M, Timurkan H. Effects of experimental diabetes on testis proliferations and apoptosis in rats. ***J Exp Clin Med*** 2011;28(3): 94-8.
[78] Amann RP. A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. ***J Androl*** 1981;2(1): 37-58.
[79] Chapin RE, Lamb JC. Effects of ethylene glycol monomethyl ether on various parameters of testicular function in the F344 rat. ***Environ Health Perspect*** 1984; 57:219.
[80] Skakkebæk NE. Endocrine disrupters and testicular dysgenesis syndrome. ***Horm Res Paediatr*** 2002;57(Suppl. 2): 43.
[81] Shen H-M, Ong C-N. Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. ***Free Radic Biol Med***; 2000; 28(4): 529-536.
[82] Bianchi S, Nottola SA, Torge D, Palmerini MG, Necozione S, Macchiarelli G. Association between Female Reproductive Health and Mancozeb: Systematic Review of Experimental Models. ***Int J Environ Res Public Health*** 2020;17(7): 2580.