The University of Tehran Press

Iaranian Journal of Animal Science

Online ISNN: 2008-4773

Homepage: http:// ijas.ut.ac.ir/

Effect of insecticide Diazinon on expression of steroidogenic genes and DNA methylation of promoter site of StAR gene during in vitro maturation of goat oocyte

Mansoureh Ghorbanalinia [1], Hamid Deldar[2]✉, Ghodrat Rahim Mianji[3], Eissa Dirandeh [4]

1. Department of Animal Science, Sari Agricultural and Natural Resources University, Sari, Iran. Email Address: mansoureh.gh.68@gmail.com
2. Corresponding Author, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Guilan, Rasht, Iran. Email Address: hamiddeldar@guilan.ac.ir
3. Department of Animal Science, Sari Agricultural and Natural Resources University, Sari, Iran. Email Address: rahimimianji@yahoo.com
4. Department of Animal Science, Sari Agricultural and Natural Resources University, Sari, Iran. Email Address: dirandeh@gmail.com

Article Info

Article type:

Research Article

Article history:

Received: 27 July 2022

Received in revised form: 17 November 2022

Accepted: 28 November 2022

Published online: 20 March 2024

Keywords:

Insecticide Diazinon, in vitro maturation of oocyte,

Oocyte cumulus complexes,

DNA methylation.

ABSTRACT

This research was conducted to investigate the effect of different concentrations of Diazinon as a pesticide, that is widely used in agriculture, on the expression of steroidogenic genes and DNA methylation of promoter site of StAR gene in in vitro maturation of goat oocytes. To prepare goat oocytes, ovaries were prepared from a slaughterhouse and transported to the laboratory into the flask containing warm saline (30-34oC). Oocyte-cumulus complexes (COC) was removed from small antral follicles with the slicing method, and transferred to Medium 199. COCs were placed in a maturation medium for 24 hours, and were reached to metaphase stage Π (nuclear maturation). The experiment was examined in a completely randomized design with five treatments included: control, 75, 37.5, and 18.75 µM of Diazinon, and 0.5 µM of DMSO. The results showed that the addition of different concentrations of Diazinon in the goat maturation medium, significantly decreased the maturation rate ($P < 0.05$) compared to the control treatment, and also it led to a decline in the gene expression of CYP11A1, 17βHSD, CYP19 in cumulus cells. However, the expression of StAR gene was increased. Therefore, it can be concluded that Diazinon has a disruptor effect on oocyte maturation rate, and expression of steroidogenic genes in cumulus cells.

Cite this article: Ghorbanalinia, M., Deldar, H., Rahimi Mianji, Gh. & Dirandeh, E., (2024). Effect of insecticide Diazinon on expression of steroidogenic genes and DNA methylation of promoter site of StAR gene during in vitro maturation of goat oocyte. *Iranian Journal of Animal Science*, 55 (1), 131-142. DOI: https://doi.org/10.22059/ijas.2022.345718.653897

© The Author(s).

Publisher: The University of Tehran Press.
DOI: https://doi.org/10.22059/ijas.2022.345718.653897

Extended Abstract

Introduction

Oocyte maturation is a long and complicated process, and occurs when oocyte attains the necessary conditions for fertilization and reaching the blastocyst stage (Ferreira et al., 2009). The nuclear maturation of the oocyte occurs in the metaphase meiosis Π; this stage is confirmed by the appearance of the first polar body and oocyte at this stage has the ability to be fertilized by sperm. Cumulus cells share an intimate communication with the oocyte through gap junctions and paracrine factors, allowing a bidirectional supply of nutrients and signaling molecules that regulate the simultaneous development and maturation of both cell types (Lourenco et al., 2014). Zhang et al.,1995 Research showed that removing cumulus cells before maturation, significantly reduced the rate of oocyte maturation, fertilization, and in vitro development at all stages. Environmental factors play an important role in reproductive disorders (Peterson et al., 2010). Pesticide is a compound or a mixture of several chemical compounds, that it is use in order to stop, destroying or reduce the population of

insects, rodents, nematodes, fungi, weeds, or any kind of plants, bacteria and microorganisms that known as pest (Talebi Jahromi, 2007). Exposure to pesticide causes ovarian failure in cow (Pocar et al., 2003) and may be one of the major causes of various dysfunction in human and animal reproductive system (Johari, et al., 2010). A feature of these chemicals is electrophilicity, which can affect cellular proteins, by changing cellular properties, oocyte and follicular cells lose their normal functionality (Mohseni kuchsefahani et al., 2008). In mice, Diazinon decreases the thickness of granulosa layers which leads to a decrease in estrogen production, which itself exacerbates the reduction of granulosa cells (Mohseni kuchsefahani et al., 2008). Therefore, this research was conducted to investigate the effect of different concentrations of Diazinon as a pesticide, on the oocytes maturation rate, the expression of steroidogenic genes and DNA methylation of promoter site of *StAR* gene, as a key gene in regulation of steroids gene expression, in in vitro maturation of goat oocytes.

Materials and Methods

Unless otherwise stated, all of the chemicals were purchased from Sigma-Aldrich and Gibco. In order to prepare goat oocytes, ovaries were prepared from a slaughterhouse and transported to the laboratory into the flask containing warm saline (30-34°C). Oocyte-cumulus complexes (COC) was removed from small antral follicles with the slicing method, only COCs with at least 3 layers of cumulus cells and homogeneous cytoplasm were selected. The collected COCs were washed 4 times with SOF-HEPES solution and once in maturation medium (TCM-199), then transferred to Medium 199. COCs were placed in a maturation medium for 24 hours, and were reached to metaphase stage II (nuclear maturation). The experiment was examined in a completely randomized design with five treatments included: control, 75, 37.5, and 18.75 µM of Diazinon, and 0.5 µM of DMSO. mRNA was isolated from cumulus cells of oocytes by using RNeasy Micro Kit (QIAGEN, 74140) according to manufacturer's instructions. The isolated mRNA was reverse-transcribed with the QuantiNova Reverse Transcription kit according to manufacturer's instructions. The qPCR mixture (15 µL) consist of 1 µL cDNA, 7.5 µL SYBR Green Mastermix, 0.7 µL reverse primer, 0.7 µL forward primer, sterile ddH2O 5.1 µL (to 15 µL). Temperature profile included initial denaturation at 94°C for 3 min, followed by 40 cycles at 94°C for 10 second and at 60°C for 30 minute. YWHAZ Gene was used for normalization. Standard curves were diluted in water using serial 10-fold dilutions. The data of gene expression profile was analyzed using General Linear Model (GLM) of the Statistical Analysis System (SAS) software program. Genomic DNA was extracted from 150 cumulus cells with using the QIAamp DNA kit according to manufacturer's instructions. The extracted DNA kept in -20°C until DNA bisulfitation. DNA was sodium-bisulfite modified with EpiTect Bisulfite Kit (QIAGEN). DNA bisulfite conversion was prepared by thermal cycling upon addition of the EpiTect bisulfite mix provided in the kit. The PCR reaction was carried out with amplification profile: 1 cycle at 94°C for 3 min (Initial denaturation), 34 cycles at (94°C for 40 sec (Denaturation), 60°C for 40 second (Annealing of primer), 72°C for 1 min (Extension)), 72°C for 10 min (Final extension), hold and cooling to 4°C.

To finding different GC percentage between treatments we used sequencing after the PCR. The percentage of methylation in promotor region of StAR gene was calculated by the following formula:

C / (C + T) * 100 (T is thymine and C is cytosine) (Kacevska et al., 2012).

Results and discussion

This study showed that increase in the concentrations of Diazinon insecticide significantly reduced the oocyte maturation rate compare the control treatment. The percentage of oocytes that reached MII-stage (nuclear maturation) in control treatment were %85±2.28, On the other side the highest concentrations of Diazinon (75 µm of Diazinon) caused almost 98% cell death. According to the results of other treatments, we can say that with the increase in Diazinon concentration, the percentage of oocytes that reach MII-stage steadily decreases. Treatment with 18.75 µm of Diazinon has shown a significant increase in *StAR* gene expression compared to control treatment and it can be related to decrease in DNA methylation in Cpg11 of prompter region (66.5% methylation in control treatment compare to 51.1% methylation in treatment with 18.75 µm of Diazinon). In relation to *CYP11A1* gene expression we saw a significant decrease in 18.75 and 37.5 µm treatments, and also a significant decrease in 37.5 µm of *17βHSD*. In other hand *CYP19* gene expression has shown a remarkable reduction in 18.75 and 37.5 µm of Diazinon.

Conclusion

The addition of different concentrations of Diazinon in the goat maturation medium, significantly decreased the maturation rate of goat oocyte than the control group. Also the gene expression of *CYP11A1*, *17βHSD*, *CYP19* in cumulus cells were reduced, but the expression of *StAR* gene in cumulus cells was increased. So it can be concluded that Diazinon has disruptor effect in maturation rate of oocyte and it is able to interrupt the expression of steroidogenic genes in cumulus cells.

نشریه علوم دامی ایران، دوره ۵۵، شماره ۱

انتشارات دانشگاه تهران

شاپا الکترونیکی: ۷۹۴۹-۲۴۲۳

Homepage: http://ijas.ut.ac.ir//

تاثیر حشره‌کش دیازینون بر بیان ژن‌های تنظیم کننده‌ی استرویید سازی و متیلاسیون DNA جایگاه پروموتر ژن StAR طی تکامل برون تنی اووسایت بز

منصوره قربانعلی نیا [۱] | حمیددلدار [۲]✉ | قدرت رحیمی میانجی [۳] | عیسی دیرنده [۴]

۱. گروه علوم دامی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری ، ایران. رایانامه: mansoureh.gh.68@gmail.com

۲. نویسنده مسئول، گروه علوم دامی ، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت ، ایران. رایانامه: hamiddeldar@guilan.ac.ir

۳. گروه علوم دامی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری ، ایران. رایانامه: rahimimianji@yahoo.com

۴. گروه علوم دامی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری ، ایران. رایانامه: dirandeh@gmail.com

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:

مقالهٔ پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۲۸

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۷/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۸/۰۳

تاریخ انتشار: ۱۴۰۳/۰۱/۰۱

کلیدواژه‌ها:

تکامل برون تنی اووسایت، حشره‌کش دیازینون، کمپلکس اووسایت کومولوس، متیلاسیون DNA.

چکیده

پژوهش حاضر به منظور بررسی تاثیر غلظت های متفاوت حشره‌کش دیازینون به عنوان یک سم پرکاربرد کشاورزی، بر بیان ژن‌های تنظیم کننده‌ی استرویدسازی و متیلاسیون جایگاه پروموتر ژن StAR در تکامل برون‌تنی اووسایت بز انجام شد. تخمدان‌های بز بلافاصله بعد از کشتار، از لاشه‌ی دام جدا و درون فلاسک حاوی سرم فیزیولوژیک به آزمایشگاه منتقل شدند. مجموعه اووسایت–کومولوس با روش برشی از فولیکول‌های آنترال کوچک جدا شدند و در محیط Medium 199 به همراه غلظت‌های متفاوت حشره‌کش دیازینون کشت داده شدند. پژوهش در قالب طرح کاملا تصادفی، با ۵ تیمار آزمایشی شامل تیمارهای شاهد، ۷۵ ، ۳۷/۵ و ۱۸/۷۵ میکرومولار دیازینون و تیمار دارای نیم میکرومولار DMSO، و در ۴ تکرار انجام شد. نتایج پژوهش نشان داد غلظت‌های متفاوت دیازینون به طور معنی‌داری نرخ تکامل برون‌تنی اووسایت‌ها را نسبت به تیمار شاهد کاهش داد ($P < ۰/۰۵$). هم‌چنین با افزودن غلظت‌های متفاوت دیازینون به محیط تکامل برون‌تنی اووسایت بز، بیان ژن‌های CYP11A1، βHSD۱۷، CYP19 در سلول‌های کومولوس کاهش نشان داد. اما در مورد ژن StAR افزایش بیان ژن مشاهده شد، این افزایش بیان ژن می‌تواند به علت کاهش میزان متیلاسیون DNA مشاهده شده در غلظت ۱۸/۷۵ میکرومولار از دیازینون باشد. چنین به نظر می‌رسد که حشره‌کش دیازینون اثر برهم زنندگی در نرخ تکامل برون‌تنی اووسایت و بیان ژن‌های استرویید سازی در سلول‌های کومولوس را دارد.

استناد: قربانعلی نیا، منصوره؛ دلدار، حمید؛ رحیمی میانجی، قدرت، و دیرنده؛ عیسی (۱۴۰۳). تاثیر حشره‌کش دیازینون بر بیان ژن‌های تنظیم کننده‌ی استرویید سازی و متیلاسیون DNA جایگاه پروموتر ژن StAR طی تکامل برون تنی اووسایت بز. *نشریه علوم دامی ایران*، ۵۵ (۱)، ۱۴۲-۱۳۱.
DOI: https://doi.org/10.22059/ijas.2022.345718.653897

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

DOI: https://doi.org/10.22059/ijas.2022.345718.653897

مقدمه

تکامل اووسایت فرآیند طولانی و پیچیده‌ای است، و زمانی اتفاق می‌افتد که اووسایت شرایط لازم را برای بارور شدن و رسیدن به مرحله‌ی بلاستوسیست بدست می‌آورد (Ferreira *et al*., 2009)، و در بر گیرنده‌ی سه مرحله‌ی رشد و نمویی شامل: ۱- تکامل هسته‌ای که مربوط به از سر گیری میوز و تکمیل اولین تقسیم میوزی و توقف اووسایت در متافاز میوز II، ۲- بلوغ اپی‌ژنتیکی اووسایت که در طی دوره‌ی رشد اووسایت اتفاق می افتد و باعث تغییراتی می شود که بیان ژن‌ها را تنظیم می‌کند، و ۳- تکامل سیتوپلاسمی که عموما به عنوان فرآیندهایی شناخته می‌شود که به هنگام رشد و نمو اووسایت، در سیتوپلاسم اتفاق می‌افتد و برای لقاح و رشد و نمو اولیه‌ی رویان ضروری است. تکامل هسته‌ای اووسایت در متافاز میوز II اتفاق می‌افتد، این مرحله با نمایان شدن اولین جسم قطبی تایید می‌شود. اووسایتی که در این مرحله قرار دارد پس از آزاد شدن از تخمدان، توانایی بارور شدن توسط اسپرم را دارد. سلول‌های کومولوس به وسیله‌ی اتصالات شکاف‌دار و فاکتورهای پاراکرینی، با سلول اووسایت یک ارتباط دو طرفه را ایجاد می‌کند، که تبادل مواد مغذی و مولکول‌های سیگنالینگ بین سلول‌های کومولوس و اووسایت را باعث می‌شود، و به طور هم زمان نمو و تکامل هر دو سلول را به همراه دارد (Lourenco *et al*., 2014). سلول‌های کومولوس به وسیله‌ی نگه‌داشتن اووسایت‌ها در مرحله‌ی توقف میوزی، القای از سر گیری میوز و تکامل سیتوپلاسمی، نقش مهمی تکامل اووسایت‌ها دارند (Janssenswillen *et al*., 1995). درگاو، زمانی که سلول‌های کومولوس را پیش از تکامل، از اووسایت جدا کردند، کاهش قابل توجهی در میزان تکامل اووسایت، لقاح، و در نمو آزمایشگاهی مشاهده شد (Zhang *et al*.,1995).

آفت‌کش ترکیب یا مخلوطی از چند ترکیب شیمیایی است که برای جلوگیری، از بین بردن، دور کردن و یا کاهش دادن جمعیت حشرات، جوندگان، نماتدها، قارچها، علف های هرز، ویروس‌ها، باکتری‌ها و میکروارگانیسم‌هایی که آفت شناخته می شوند مصرف می‌شود (Talebi Jahromi, 2007). متاسفانه استفاده‌ی بی‌رویه از آفت کش‌ها باعث آسیب به محیط زیست و گیاهان، حیوانات، آب، زمین و یا خاک شده است. این مواد شیمیایی در انسان باعث مسمومیت حاد و مزمن، سرطان‌زایی، ایجاد جهش و عقیمی می‌شود (Saunders and Harper, 1994). قرار گرفتن در معرض آفت‌کش باعث عقب ماندگی رشد، مرگ داخل رحمی جنین و تولد نوزاد ناقص در انسان (Shepard, 1986) و یا نارسایی تخمدان گاو می‌شود (Pocar *et al*., 2003) و ممکن است یکی از علل عمده‌ی عوارض گوناگون و اختلال در عملکرد تولید مثل انسان و حیوانات باشد (Johari *et al*., 2010). پژوهش Oduma *et al*. (1995) نشان داد که آفت‌کش هپتاکلر در شرایط درون تنی (*in vivo*) باعث کاهش میزان پروژسترون و استرادایول خون می‌شود و در شرایط برون تنی (*in vitro*) تولید هورمون‌ها توسط تخمدان را کاهش می‌دهد، همچنین سم دیوکسین احتمالا از طریق فعال کردن نابه‌جا یا القای نابه‌جای بیان ایزوآنزیم P450 و افزایش تولید استروژن، و در نتیجه افزایش اثرات استروژنی بر بافت اندومتریوم، باعث افزایش اندومتریوز می‌شود (Peterson *et al*., 2010). از دیگر ویژگی‌های این مواد شیمیایی الکتروفیلیک بودن است که در نتیجه می‌توانند پروتئین‌های سلولی را تحت تاثیر قرار دهند. با تغییر خصوصیات سلولی، سلول‌های اووسایت و فولیکولی کارایی طبیعی خود را از دست می‌دهند (Mohseni Kochesfahani *et al*., 2008). اثرات سمی حشره‌کش دیازینون ممکن است به واسطه‌ی تحریک پراکسیداسیون لیپیدی، تغییر در فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی، آسیب به DNA، و رادیکال‌های آزاد که در مرگ سلولی نقش دارند باشد (Ibrahim and El-Gamal, 2003). دیازینون در موش کاهش ضخامت لایه‌های گرانولوزا را در پی دارد، که منجر به کاهش استروژن سازی می‌شود، که این خود نیز سبب کاهش رشد سلول‌های گرانولوزا و افزایش تعداد فولیکول‌های تحلیل رفته می‌شود (Mohseni Kochesfahani *et al*., 2008). بر اساس این ارتباط تنگاتنگ بین اووسایت و سلول‌های کومولوس، این فرضیه ایجاد شده است که سلول‌های کومولوس ممکن است هدفی برای اثر سموم شیمیایی در خلال تکامل اووسایت محسوب شوند (Pocar *et al*., 2003). آفت‌کش‌ها باعث تغییر متیلاسیون DNA در ناحیه پروموتر ژن‌ها نیز می‌شوند (Baccarelli and Bollati., 2009). پژوهش‌ها در ارتباط با خطر سرطان‌زایی دیازینون در انسان نشان داد که این حشره‌کش باعث تغییر متیلاسیون DNA

نواحی CpG پروموتر ژن‌ها می‌شود (Zhang *et al.*, 2012). آفت‌کش‌های ارگانوفسفره دارای ویژگی الکیل کننده هستند و بدین ترتیب می‌توانند بر DNA هسته‌ی سلول اثرگذار باشند.

انتقال کلسترول از غشا بیرونی میتوکندری به غشا درونی میتوکندری مرحله ی محدود کننده ی بیوسنتز استروییدهاست. پروتین *StAR*[1] میانجی انتقال کلسترول به غشا داخلی میتوکندری است، در مرحله بعد *CYP11A1*[2] کلسترول را به پرگننولون تبدیل می کند. *βHSD17*[3] آنزیمی کلیدی در استرادایول و تستوسترون است. آندروستندایون توسط آنزیم Cyp19[4] به استرون تبدیل شده و سپس تحت تاثیر *βHSD17* به استرادایول تبدیل می شود. پژوهش های متعددی نشان می دهد که تکامل اووسایت پستانداران توسط غلظت استرادایول کنترل می شود. در انسان، اووسایت هایی که با موفقیت بارور شدند مربوط به فولیکول هایی بودند که بالاترین میزان استرادایول را داشتند (Carson et al., 1982).

بر این اساس در این پژوهش تاثیر افزودن حشره‌کش دیازینون به عنوان یک آفت‌کش پرکاربرد کشاورزی در محیط تکامل برون‌تنی اووسایت، بر نرخ تکامل اووسایت و بیان نسبی ژن‌های استروییدسازی در سلول‌های کومولوس، و هم چنین متیلاسیون جایگاه پروموتر ژن *StAR* به عنوان ژن کلیدی در مسیر بیوسنتز استروییدها، مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

این پژوهش در آزمایشگاه فیزیولوژی تولید مثل دانشکده علوم دامی و شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری از فروردین ماه سال ۹۴ تا مرداد ماه سال ۹۵ انجام شد.

ترکیبات و مواد مورد استفاده از شرکت سیگما و گیبکو خریداری شدند. پژوهش در قالب طرح کاملا تصادفی با ۵ تیمار و ۴ تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایشی غلظت های متفاوت حشره‌کش دیازینون بودند که بر اساس پیش آزمایش انجام شده تعیین شدند، و در غلظت های صفر (شاهد)، ۷۵ میکرومولار که تیمار با غلظت کشنده، ۳۷/۵ میکرومولار که تیمار با غلظت نیمه کشنده (LC_{50}[5]) و ۱۸/۷۵ میکرومولار که تیمار با نصف غلظت نیمه کشنده، و تیماری با نیم میکرومولار DMSO[6] بودند که به محیط‌های تکامل اووسایت های بز افزوده شدند. از DMSO به عنوان حلال سم دیازینون استفاده شد، تیماری جداگانه به منظور حذف اثر این ماده بر سلول‌ها تهیه و مورد بررسی قرار گرفت. هم چنین تیماری با غلظت ۰/۳۷۵ میکرومولار از حشره‌کش دیازینون (۰/۰۱ غلظت نیمه کشنده) برای بررسی میزان متیلاسیون ژن *StAR* در نظر گرفته شد.

جمع آوری، آماده سازی و بلوغ برون تنی اووسایت

تخمدان‌های بز از کشتارگاه صنعتی جمع‌آوری شدند و پس از جمع‌آوری، درون فلاسک آب در دمای۳۰ تا ۳۳ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه منتقل شد.

تخمدان‌ها در سرم فیزیولوژیک که شامل ۱۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی پنی سیلین و ۱۰۰ میلی گرم استرپتومایسین در هر لیتر است، شستشو شدند. مجموعه اووسایت–کومولوس به روش برشی از فولیکول‌های آنترال (۶–۲ میلی متر) تخمدان جمع‌آوری شدند. از مجموع ۲۰۰ تخمدان جمع آوری شده از کشتارگاه، ۹۰۰ عدد اوسایت نابالغ سالم تهیه و کشت داده شد. اووسایت ها در ۵ تیمار ۱۸۰ تایی و هر تیمار شامل ۴ تکرار دسته بندی شدند. مجموعه اووسایت–کومولوس‌هایی که دارای چند لایه

1Steroidogenic Acute Regulatory
2Cholesterol Side-chain Cleavage Enzyme
317beta-hydroxysteroid dehydrogenase
4Aromatase cytochrome P450
5Lethal Concentration
6Dimethyl sulfoxide

سلول‌های کومولوس و با سیتوپلاسم یکنواخت بودند انتخاب و به کمک میکروسکوپ تشریحی ۴ الی ۵ بار در محلول SOF[1] HEPES شستشو شدند (Cetica *et al.*,2001)، شستشوی پایانی (۴-۳ بار) در محیط تکامل اووسایت ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. در هر پلیت ۶۰×۱۵ میلی لیتری ۱۱ قطره ۵۰ میکرولیتری از محیط کشت تکامل اووسایت گذاشته، و روی قطره‌ها با ۱۰ میلی لیتر روغن معدنی پوشانیده شد. پلیت حاوی قطره‌های تکامل اووسایت قبل از قراردادن مجموعه‌های اووسایت-کومولوس درون آن، به مدت ۲-۱ ساعت در انکوباتور دارای CO_2[2] ۵ درصد، دمای ۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد و با رطوبت ۹۸ درصد قرار داده شد.

هر۱۱-۹ مجموعه اووسایت-کومولوس به درون قطره ۵۰ میکرولیتر از محیط کشت انتقال یافتند و برای ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شدند. مجموعه اووسایت-کومولوس پس از ۲۴ ساعت از قطره‌های محیط کشت به محیط SOF HEPES منتقل شدند و پس از شست وشوی آن‌ها با SOF HEPES، برای اندازه‌گیری نرخ تکامل اووسایت، سلول‌های کومولوس از اووسایت به وسیله‌ی آنزیم هیالورونیداز جدا شدند. مشاهده جسم قطبی، نشان دهنده اووسایت‌هایی بودند که به مرحله متافاز میوز II (اووسایت‌های تکامل یافته) رسیدند.

جداسازی RNA و ساخت cDNA

از کیت RNeasy Micro Kit (QIAGEN, 74104) برای جداسازی RNA کل استفاده شد. برای ساخت cDNA از کیت Quanti NovaTM Reves Transcription استفاده شد. واکنش Real Time PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و کیت real time PCR در دستگاه چرخه حرارتی با تابش نوری کوربت (Corbet) انجام شد.

Quantitative Real-time PCR

برای هر یک از نمونه‌ها چرخه آستانه (CT در دستگاه Real-time PCR) تعیین شد و برای اندازه‌گیری بیان ژن‌ها از روش Livak استفاده شد. بیان ژن *YWHAZ* به عنوان ژن نرمال سازی مورد استفاده قرار گرفت. تیمار شاهد به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. برای ایجاد منحنی استاندارد از سری رقت‌های با ضریب 10^{-1} به گونه‌ای استفاده شد که غلظت cDNA در استاندارد شماره ۵ به مقدار 10^{-5} برابر کمتر از استاندارد نخست بود. آنالیز آماری داده‌های حاصل از بیان ژن با استفاده از نرم افزار SAS (نسخه ۹/۱) انجام شد. برای تجزیه داده ها از رویه GLM[3] استفاده شد. هنگامی که آنالیز داده‌ها معنی‌دار شد، آزمون دانکن برای مقایسه میانگین تیمارهای مجزا به کار برده شد. احتمال وجود داشتن تفاوت معنی‌دار در میانگین تیمارهای گوناگون با آزمون دانکن کوچک‌تر مساوی با ۵ درصد در نظر گرفته شد. برای داده‌های درصدی تبدیل داده Arc sin صورت گرفت و سپس آنالیز شدند. مدل آماری استفاده شده(طرح کاملا تصادفی) به شرح زیر است:

$$Yij^{4} = \mu^{5} + Ti^{6} + eij^{7}$$

در این رابطه، Yij مقدار عددی تکرار jام از تیمار iام، μ میانگین داده، Ti اثر تیمار i و eij اثر عوامل باقیمانده است.

بی‌سولفیت کردن DNA برای اندازه‌گیری میزان متیلاسیون

1Base Oviduct Fluid
2Carbon dioxide
3Linear Model General
4Jth observation for the ith treatment
5Overall mean
6Ith treatment effect
7Random error

DNA ژنومی از تعداد ۱۵۰ سلول کومولوس در هر تیمار با استفاده از کیت EpiTect Bisulfite شرکت کیاژن استخراج شد. DNA استخراج شده تا زمان انجام واکنش بی‌سولفیت، در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. فرآیند بی‌سولفیته کردن DNA با استفاده از کیت EpiTect Bisulfite Kit از شرکت کیاژن انجام شد. تیمار بی‌سولفیت، سیتوزین‌های غیرمتیله را به یوراسیل تبدیل می‌کند، این تغییر در سیتوزین‌های متیله اتفاق نمی‌افتد. بنابراین متیلاسیون DNA را می‌توان براساس سیتوزین‌های تغییر نیافته در نواحی غنی از CpG شناسایی کرد.

به منظور اندازه‌گیری میزان متیلاسیون جایگاه پروموتر ژن *StAR*، ۱۱ ناحیه CpG در جایگاه پروموتر ژن *StAR* مورد بررسی قرار گرفت. اندازه‌گیری میزان متیلاسیون ناحیه‌ی پروموتر با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (Kacevska *et al.*, 2012).

100 * ((C+T)) C/ (C نشانگر باز سیتوزین و T نشانگر باز تیمین است)

جدول ۱. اطلاعات مربوط به آغازگرهای استفاده شده در Real-time PCR

نام ژن	شماره دسترسی	توالی پرایمر	اندازه محصول (bp)
StAR	NM_001009243.1	5′ -GGAGAGCCGGCAGGTCAATG-3′ Forward: 5′-CTTCTGCAGGACCTTGATCTCCTTG-3′ Reverse:	۱۸۴
CYP11A1	NM_001093789.1	5′- AGAGAATCCACTTTCGCCACATC-3′ Forward: 5′- GGTCTTTCTTCCAGGTTCCTGAC-3′ Reverse:	۲۲۷
βHSD17	XM_012133450.2	5′- TGGGAGAATGGGCAGTGATC-3′ Forward: 5′- TGTTAAGGAAATGGCTTGGG-3′ Reverse:	۲۹۷
CYP19	NM_001123000.1	5′- TCGTGGTTAAAATCCAGGGG-3′ Forward: 5′- TCATTGCCTCTTCAACCTGG-3′ Reverse:	۳۶۰
YWHAZ	NM_001267887.1	5′- TGTAGGAGCCCGTAGGTCATCT-3′ Forward: 5′- TTCTCTCTGTATTCTCGAGCCATCT-3′ Reverse:	۱۱۵

جدول ۲. آغازگر مورد استفاده در واکنش PCR متیلاسیون DNA

نام ژن	CG%	توالی پرایمر	اندازه محصول (bp)
StAR	۴۱/۴	Forward: 5′- GGAAGGGATAGTTAGGAAGTTTGAGATAG -3′ Reverse: 5′- CACCAAAAACACTCTACCCAAACCTATTC -3′	۴۳۴

نتایج و بحث

تاثیر حشره‌کش دیازینون بر تکامل برون تنی اووسایت بز و بیان نسبی ژن‌های *CYP11A1*، *17βHSD*، *CYP19*، و ژن *StAR* در سلول‌های کومولوس

با افزایش غلظت حشره‌کش دیازینون، نرخ بلوغ اووسایت به جز در تیمار DMSO، نسبت به گروه شاهد کاهش معنی داری را نشان داد (شکل ۱). حشره‌کش دیازینون اثر منفی روی نمو برون‌تنی اووسایت پستانداران دارد. این حشره‌کش باعث تغییر بیان ژن‌های کدکننده پروتئین‌هایی می شود که نقش اساسی در تنظیم چرخه سلولی دارند (Bonilla et al., 2007). در شرایط برون تنی، اووسایت موش‌هایی که به مدت ۲۴ ساعت در معرض دیازینون قرار گرفتند، کاهش زنده مانی اووسایت و کاهش بیان ژن برخی از پروتئین‌های میتوکندریایی و ریبوزومی را نشان دادند. سمومی مانند کلروپیروفوس و اندوسولفان توسط اثر مستقیم روی اووسایت‌ها و واکنش‌هایی که به واسطه‌ی سلول‌های کومولوس انجام می‌گیرد و هم‌چنین اختلال در فعالیت هورمون‌ها باعث کاهش تکامل هسته‌ای اووسایت‌ها در گاومیش می‌شوند (Nandi *et al.*, 2011). کاهش نرخ تکامل اووسایت به وسیله‌ی آفت‌کش‌ها را می‌توان به علت تغییراتی دانست که در عملکرد غدد درون ریز به خصوص در تنظیم و یا تراوش هورمون‌های گنادوتروپین ایجاد می‌کنند (Prakash and Venkatesh, 1996). بنابر گزارش Byskov *et al.* (1997)

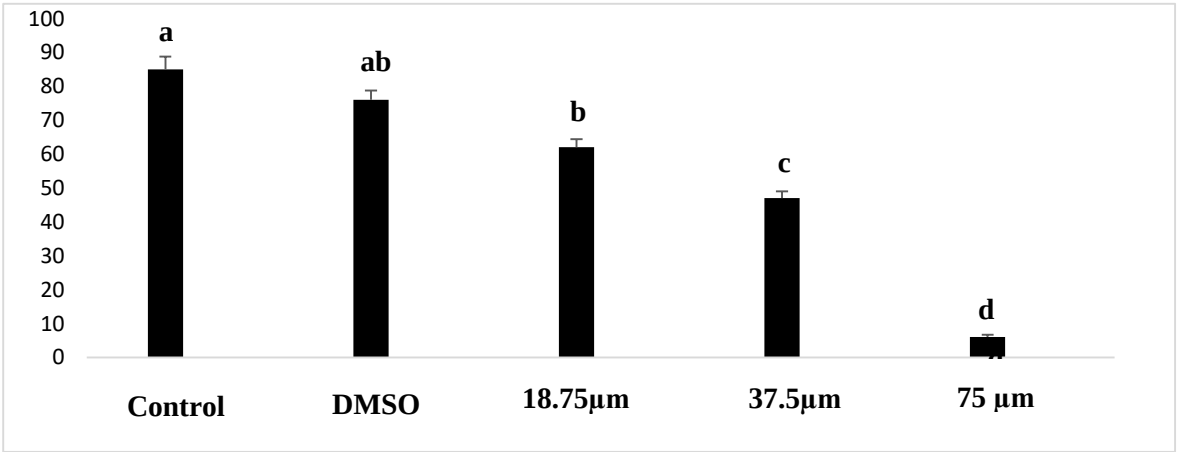
سلول‌های کومولوس گیرنده‌های LH و FSH دارند، و تحت تحریک گنادوتروپین‌ها، فاکتورهایی تراوش می‌کنند که بر تکامل اووسایت اثر می‌گذارد.

برخی از آفت‌کش‌ها قادرند سیستم تولید مثلی یا غدد درون‌ریز را توسط شبیه‌سازی عمل هورمون یا فعالیت به عنوان آنتاگونیست آن، تعدیل سوخت و ساز هورمون‌های درون‌زا، یا تغییر بیان گیرنده‌ی هورمون‌ها، تغییر بدهند (Sonnenschein and Soto, 1998). گزارش‌های گوناگونی نشان می‌دهد که لیندان به صورت مستقیم استروییید سازی را در غده‌ی آرنال و غدد جنسی مهار کرده و از این راه عملکرد تولید مثلی حیوانات را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Walsh and Stocco, 2000). هم چنین ارگانوفسفره‌ها از راه مهار آنزیم‌های سیتوکروم P450 باعث کاهش متابولیسم استرادایول و اختلال در عملکرد آن می‌شوند.

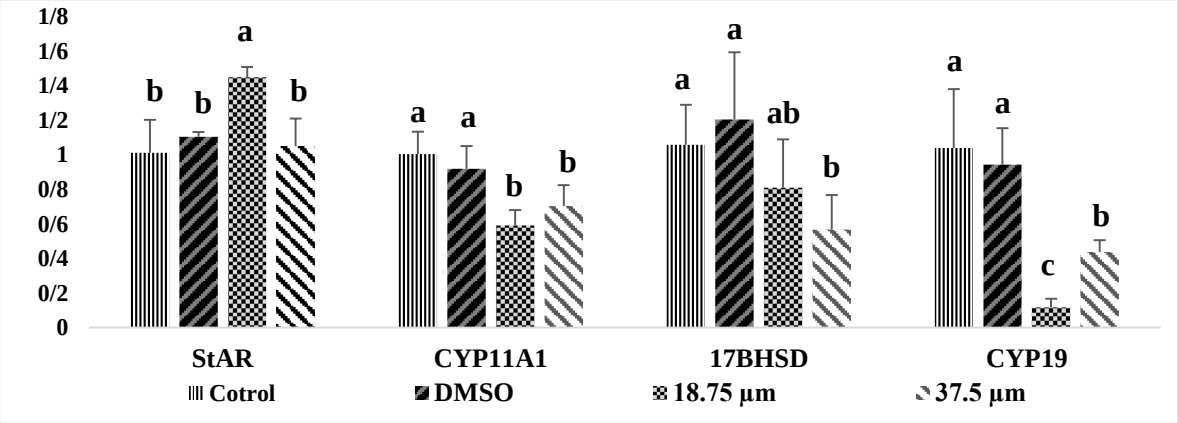
پژوهش حاضر نشان داد که با افزودن غلظت‌های متفاوت حشره‌کش دیازینون به محیط تکامل برون تنی اووسایت بز، بیان ژن های *CYP11A1*، *17βHSD*، *CYP19* کاهش نشان داده است (شکل ۲). نتیجه به دست آمده با نتایج Tiemann *et al.* (1996) که گزارش دادند گروهی از سموم شیمیایی در شرایط کشت برون‌تنی اووسایت، باعث کاهش نرخ رشد اووسایت و مهار ساخت استرادیول ۱۷ و پروژسترون توسط سلول‌های گرانولوزای گاو می شوند، همخوانی دارد، همچنین با پژوهش Mohseni Kochesfahani *et al.* (2008) که نشان داد دیازینون در موش میزان پروژسترون سرم خون، قطر فولیکول گراف و ضخامت لایه‌های گرانولوزا را به طور معنی داری کاهش می‌دهد، و در نتیجه منجر به کاهش استروژن سازی می‌شود. این کاهش در میزان استروژن سازی سبب تشدید کاهش رشد سلول‌های گرانولوزا و افزایش تعداد فولیکول‌های تحلیل رفته می‌شود. اما در مورد ژن *StAR* کاهش بیان ژن در غلظت‌های متفاوت حشره‌کش دیازینون مشاهده نشد، بلکه در غلظت ۱۸/۷۵ µM افزایش معنی‌داری در بیان ژن *StAR* نسبت به گروه شاهد دیده شد (شکل ۲). در پژوهش Guerrero-Netro *et al.* (2015) نشان داده شد که کشت سلول‌های گرانولوزا گاو با Deoxynivalenol (DON) تغییری در میزان mRNA ژن *StAR* و *CYP11A1* نداشته ولی باعث کاهش میزان mRNA ژن *CYP19A1* شده است. هم‌چنین گزارشاتی وجود دارد که نشان می‌دهد برخی از آفت‌کش‌ها، سیستم های آنزیمی مختلفی را القا می‌کنند که ممکن است هیدروکسیلاز استروییید را افزایش دهند (Trapp *et al.*, 1984).

پژوهش Ibrahim and El-Gamal (2003) نشان داد که اثرات سمی دیازینون ممکن است به واسطه ی تحریک پراکسیداسیون لیپیدی، تغییر در فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی، آسیب به DNA، و رادیکال‌های آزاد که در مرگ سلولی نقش دارند، باشد.

سم دیوکسین احتمالا از طریق فعال کردن نا به جا یا القای نا به جای بیان ایزوآنزیم P450 و افزایش تولید استروژن و در نتیجه افزایش اثرات استروژنی بر بافت اندومتریوم، باعث افزایش اندومتریوز می‌شود (Peterson *et al.*, 2010).



شکل ۱. تاثیر غلظت‌های متفاوت دیازینون بر نرخ تکامل برون‌تنی اووسایت بز. هر تیمار شامل ۱۸۰ اووسایت در ۴ تکرار آزمایشی است. حروف نامشابه در



هر ستون نشان دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

شکل ۲. تاثیر غلظت‌های متفاوت حشره‌کش دیازینون بر بیان نسبی ژن‌های *StAR*، *CYP11A1*، *17BHSD* و *CYP19* در سلول‌های کومولوس. حروف نامشابه نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.

جدول ۳. تاثیر غلظت‌های متفاوت حشره‌کش دیازینون بر متیلاسیون جایگاه پروموتر ژن *StAR* در سلول‌های کومولوس.

	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱
شاهد	۸۴/۸	۸۷/۱	۷۲/۵	۹۰/۹	۸۷/۸	۸۸/۲	۸۹/۲	۹۲/۵	۹۶/۲	۸۶/۹	۶۶/۵
DMSO	۸۳/۷	۹۰/۸	۷۱/۶	۸۹/۸	۸۵/۷	۸۴/۱	۸۳/۵	۸۹/۸	۹۱/۷	۸۱/۹	۵۹/۵
µM ۰/۳۷۵	۸۱/۵	۹۱	۶۹/۲	۸۸/۵	۸۴/۵	۸۴	۸۳	۸۸/۵	۸۹/۵	۸۳/۵	۵۷/۲
µM ۱۸/۷۵	۸۴/۸	۹۱/۶	۶۷	۹۰/۵	۸۵/۸	۸۴	۸۴	۹۰	۹۰	۸۰/۶	۵۱/۱
µM ۳۷/۵	۸۰/۷	۸۹/۷	۷۰/۵	۸۹/۱	۸۲	۸۵/۵	۸۳/۵	۸۹	۹۱	۸۲	۵۴/۵

اعداد وارد شده در جدول به درصد هستند. اعداد ۱ تا ۱۱ نشان دهنده‌ی CpG های بررسی شده در جایگاه پروموتر هستند. هر تیمار شامل ۱۸۰ اووسایت در ۴ تکرار آزمایشی است.

تاثیر حشره‌کش دیازینون بر متیلاسیون جایگاه پروموتر ژن *StAR* در سلول‌های کومولوس

تاثیر غلظت‌های متفاوت حشره‌کش دیازینون بر میزان متیلاسیون جایگاه پروموتر ژن *StAR*، در جدول ۳ نشان داده شده است. میزان متیلاسیون ۱۱ مکان CpG در پروموتر ژن مورد بررسی قرار گرفت.

آفت‌کش‌ها از طریق چندین فرآیند سلولی شامل تنش اکسیداتیو یا تولید اکسیژن فعال (Yu *et al.*, 2008) با تغییر در فعالیت DNA متیل‌ترانسفرازها باعث متیلاسیون DNA در موش شده (Shepherd *et al.*, 2006) و بدین ترتیب، با تغییر الگوی متیلاسیون باعث افزایش یا کاهش بیان ژن‌های دخیل در رشد سلولی و بروز سرطان می‌شوند (Zhang *et al.*, 2012). به طور کلی افزایش بیان ژن اغلب با کاهش متیلاسیون پروموتر (Kass *et al.*, 1997) و با کاهش بیان ژن هایپرمتیلاسیون پروموتر ژن همراه است (Orphanides and Reinberg., 2002). در مورد اپی‌ژنتیک این فرضیه وجود دارد که قرار گرفتن در معرض آلاینده‌ها با هایپومتیلاسیون DNA (ارتباط معکوس با متیلاسیون DNA) ارتباط دارد (Deutch and Hansen 2000). در این پژوهش تاثیر غلظت‌های متفاوت حشره‌کش دیازینون بر متیلاسیون جایگاه پروموتر ژن *StAR* در سلول‌های

کومولوس مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده از پژوهش نشان داد که در CPG شماره ۱۱ پروموتر ژن *StAR* مربوط به تیمار با غلظت ۱۸/۷۵ میکرومولار از حشره‌کش دیازینون، نسبت به گروه شاهد کاهش در میزان متیلاسیون وجود دارد. همان گونه که در شکل ۲ نشان داده شده است، بیان ژن *StAR* در غلظت ۱۸/۷۵ میکرومولار نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌داری پیدا کرده است که این افزایش بیان ژن می تواند به علت کاهش میزان متیلاسیون درCPG شماره ۱۱ جایگاه پروموتر باشد. متیلاسیون نابجای DNA با طیف گسترده ای از بیماری‌ها مرتبط است و در افرادی که در معرض آلاینده ها قرار دارند اتفاق می افتد (Balada *et al.*, 2007). منحنی پاسخ به غلظت آلاینده‌ها با متیلاسیون، کاملا خطی نیست (Kim *et al.*, 2010). در واقع تاثیرات غلظت پایین یک ویژگی مهم در مورد تخریب کننده‌های هورمونی است که دارای اثرات زیستی قوی در غلظت‌های پایین هستند اما در غلظت‌های بالا دارای اثرات ضعیف و یا بدون اثر هستند (Welshons *et al.*, 2006). بنابراین در مورد ژن *StAR* می توان احتمال داد که غلظت ۱۸/۷۵ میکرومولار از حشره‌کش دیازینون دارای اثر گذاری بیشتری نسبت به غلظت ۳۷/۵ میکرو مولار است.

نتیجه گیری

یافته‌های به دست آمده از این پژوهش نشان داد که افزایش غلظت‌های حشره کش دیازینون به طور معنی داری نرخ تکامل برون تنی اووسایت ها را نسبت به گروه شاهد کاهش داد. هم چنین غلظت‌های متفاوت حشره کش دیازینون باعث کاهش بیان نسبی ژن‌های CYP11A1، βHSD۱۷، CYP19 نسبت به تیمار شاهد شده است. در مورد ژن StAR بیان نسبی درغلظت ۱۸/۷۵ میکرومولار از دیازینون افزایش نشان داده است، که این افزایش بیان نسبی ژن احتمالا با کاهش متیلاسیون DNA در جایگاه پروموتر ژن StAR در این غلظت از سم مرتبط است.

REFERENCES

Baccarelli, A. and Bollati, V. (2009). Epigenetics and environmental chemicals. *Current Opinion in Pediatrics*, 21: 243–251.

Balada, E., Ordi-Ros, J., Vilardell-Tarrés, M. (2007). DNA methylation and systemic lupus erythematosus. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1108(1):127-36.

Bonilla, E., Hernández, F., Cortés, L., Mendoza, M., Mejía, J., Carrillo, E., Casas, E., Betancourt, M. (2007). Effects of the insecticides malathion and Diazinon on the early oogenesis in mice in vitro. *Environmental Toxicology*, 23: 240–245.

Byskov, A.G., Yding Andersen, C., Hossaini, A., Guoliang, X. (1997). Cumulus cells of oocyte-cumulus complexes secrete a meiosis-activating substance when stimulated with FSH. *Molecular Reproduction and Development*, 46:296– 305.

Carson, R.S., Trounson, A.O., Findlay, J.K. (1982). Successful fertilization of human oocytes in vitro: concentration of 17/β-estradiol, progesterone, and androstenedione in the antral fluid of donor follicles. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 55:798.

Cetica, P.D., Pintos, L.N., Dalvit, G.C., Beconi, M.T. (2001). Antioxidant enzyme activity and oxidative stress in bovine oocyte in vitro maturation. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, 51:57-64.

Deutch, B., Hansen, J.C. (2000). High human plasma levels of organochlorine compounds in Greenland. Regional differences and lifestyle effects. *Danish Medical Bulletin*, 47(2):132.

Ferreira, E.M., Vireque, A.A., Adona, P.R., Meirelles, F.V., Ferriani, R.A., Navarro, P.A.A.S. (2009). Cytoplasmic maturation. of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*, 71:836–48

Guerrero-Netro, H.M., Chorfi Y., Price C.A. (2015). Effects of the mycotoxin deoxynivalenol on steroidogenesis and apoptosis in granulosa cells. *Reproduction (Cambridge, England)*, 149(6):555-61.

Ibrahim, N.A., El-Gamal, B.A. (2003). Effect of diazinon, an organophosphate insecticide, on plasma lipid constituents in experimental animals. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 36:

499-504.

Janssenswillen, C., Nagy, Z.P., Van Steirteghem, A. (1995). Maturation of human cumulus-free germinal vesicle-stageoocytes to metaphase II by Coculture with monolayer Verocells. *Human Reproduction;* 10: 375–376

Johari, H., Shariati, M., Abbasi, S., Sharifi, E., Askari, H.R. (2010). The Effects of Diazinon on Pituitary–Gonad Axis an Ovarian Histological Change in Rats. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 8:125-130

Kacevska, M., Ivanov, M., Wyss, A., Kasela, S., Milani, L., Rane, A., Ingelman-sundberg, M. (2012). DNA methylation dynamics in the hepatic CYP3A4 gene promoter. *Biochimie*, 94(11):2338-44.

Kass, S.U., Landsberger, N., Wolffe, A.P. (1997). DNA methylation directs a time-dependent repression of transcription initiation. *Current Biology*, 7:157–165.

Kim, K.Y., Kim, D.S., Lee, S.K., Kang, J.H., Chang, Y.S., Jacobs Jr D.R., Steffes, M., Lee, D.H. (2010). Association of low-dose exposure to persistent organic pollutants with global DNA hypomethylation in healthy Koreans. *Environmental health perspectives*, 118(3):370.

Lourenco, B., Sousa, A.P., Almeida-Santos, T., Ramalho-Santos, J. (2014). Relation of Cumulus Cell Status with Single Oocyte Maturity, Fertilization Capability and Patient Age. *Journal of Reproduction and Infertility*, 15:15-21.

Mohseni Kouchesfahani, H., Parivar, K., Tahamtani, Y. (2008). Effect of Diazinon as a pesticide on oogenesis and ovary structure of Balb/C Mice Strain. *Journal of science*, 8 (2):143-152. (In Persian)

Nandi, S., Gupta, P., Roy, S., Selvaraju, S., Ravindra, J. (2011). Chlorpyrifos and endosulfan affect buffalo oocyte maturation, fertilization, and embryo development in vitro directly and through cumulus cells. *Environmental toxicology*, 26(1):57-67.

Oduma, J. A., Wango, E. 0. Oduor-Okelo, D., Makawitil, D. W., Odongo, H. (1995). *In vivo* and *in vitro* effects of graded doses of the pesticide heptachlor on female sex steroid hormone production in rats. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 111:191-196.

Orphanides, G. and Reinberg, D. (2002). A Unified Theory of Gene Expression. *Cell*, 108:439–451.

Peterson, C.M., Carrell, D.T., Varner, M., Stanford, J., Croughan, M., Louis, G.B. (2010). The Environment and Reproduction: Endocrine Disruption, Reproductive Impairment, and Epigenetics. *Reproductive Endocrinology and Infertility*. 1st Edition. New York: Springer, New York, USA: 781-803.

Pocar, P., Brevini, T.A.L., Fischer, B., Gandolfi, F. (2003). The impact of endocrine disruptors on oocyte competence. *Reproduction*, 125:313–325.

Prakash, N., and Venkatesh, U. (1996). Human chorionic gonadotrophin (hcG) protects malathion induced plasma luteinizing hormone and testosterone changes in rats. *Indian Journal of Pharmacology*, 28:257–60.

Saunders, D.S., Harper, C. (1994). Pesticides. In: Hayes, A.W. *Principles and Methods of Toxicology*, 3rd Edition. Raven Press, New York, USA: 389–415.

Shepard, T.H. (1986). Human teratogenicity. *Advances in Pediatrics*, 33:225–268.

Shepherd, K.R., Lee, E.S., Schmued, L., Jiao, Y., Ali, S.F., Oriaku, E.T., Lamango, N.S., Soliman, K.F., Charlton, C.G. (2006). The potentiating effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on paraquat-induced neurochemical and behavioral changes in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 83:349–359.

Sonnenschein, C., Soto, A.M. (1998). An updated review of environmental estrogenand androgen mimics and antagonists. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 65:143–150.

Talebi Jahromi. (2007). *Pesticides Toxicology*, 2nd Edition, University of Tehran Press, Iran. (In Persian)

Tiemann, U., Pohland R., Schneider, F. (1996). Influence of organochlorine pesticides on physiological potency of cultured granulosa cells from bovine preovulatory follicles.

Theriogenology, 46:253-265.

Trapp, M., Baukloh, V., Bohnet, H. G., Heeschem, W. (1984). Pollutants in human follicular fluid. *Fertility and Sterility*, 42:146-148.

Walsh L.P. and Stocco D.M. (2000). Effects of Lindane on Steroidogenesis and Steroidogenic Acute Regulatory Protein Expression. *Biology of Reproduction*, 63:1024-1033.

Welshons, W.V., Nagel, S.C., vom Saal, F.S. (2006). Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology*, 147(6): 56-69.

Yu, F., Wang, Z., Ju, B., Wang, Y., Wang, J., Bai, D. (2008). Apoptotic effect of organophosphorus insecticide chlorpyrifos on mouse retina in vivo via oxidative stress and protection of combination of vitamins C and E. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 59:415–423.

Zhang, L.I., Jiang, S., Wozniak, P. J., Yang, X., Godke, R. A. (1995). Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, 40: 338-344.

Zhang, X., Wallace, A.D., Du, P., Kibbe, W.A., Jafari, N., Xie, H., Lin, S., Baccarelli, A., Soares, M.B., Hou, L. (2012). DNA methylation alterations in response to pesticide exposure in vitro. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 53:542–549.