Journal of Birjand University of Medical Sciences

Birjand University of Medical Sciences

Short Communication

Effect of chlorpyrifos on the level of hippocampal caspase 9 in male rats

Sina Nikbin[1, 2], Armin Derakhshideh[1], Mohammad Ali Azarbayjani[1], Nasrin Hosseini[2]*

ABSTRACT

Chlorpyrifos (CPF) is an organophosphate pesticide that can damage the nervous system of insects by causing neurotoxicity. Although the molecular mechanisms related to it are not fully understood, some studies have suggested that apoptotic processes are involved. Caspase 9 is a protease that is related to the process of mitochondrial death and is activated during apoptosis. Therefore, the present study aimed to investigate the effect of CPF exposure on Caspase 9 level in the hippocampus of rats. In this experimental study, 24 male Wistar rats (180-220 g) were randomly divided into four groups, including control, sham, CPF 1mg/kg.bw, and CPF 3mg/kg.bw (n=6). Data analysis was performed using one-way ANOVA and post hoc Tucky statistical tests. The findings pointed to significant differences between control and CPF-1mg ($P<0.01$), as well as between control and CPF 1mg ($P<0.001$) groups. The results of this study pointed out that long-term exposure to even low doses of chlorpyrifos can increase the level of hippocampal caspase 9. Furthermore, receiving chlorpyrifos poison with higher doses caused more toxic effects.

Keywords: Caspase, Chlorpyrifos, Hippocampus

Citation: Nikbin S, Derakhshideh A, Azarbayjani MA, Hosseini N. Effect of chlorpyrifos on the level of hippocampal caspase 9 in male rats]. J Birjand Univ Med Sci. 2023; 30(2): 189-195. [Persian]

DOI http://doi.org/10.32592/

Received: July 22, 2023 **Accepted:** September 10, 2023

[1] Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, Islamic Azad University, Central Tehran Branch, Tehran, Iran
[2] Neuroscience Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

***Corresponding author:**.
Tel: +982186704529 Fax: +982186704529 E-mail: hosseini.n@iums.ac.ir;

مقاله کوتاه

تأثیر سم کلرپیریفوس بر میزان کاسپاز۹ در بافت هیپوکامپ موش صحرایی نر

سینا نیک بین [۱و۲]، آرمین درخشیده [۱]، محمد علی آذربایجانی [۱]، نسرین حسینی [۲]*

چکیده

کلرپیریفوس سمی از دسته ارگانوفسفات¬ها می¬باشد که می¬تواند با ایجاد سمیت عصبی موجب آسیب سیستم عصبی حشرات شود. مکانیسم مولکولی آسیب نورونی ایجاد شده در سیستم عصبی کاملاً شناخته نشده است؛ اما برخی مطالعات پیشنهاد کرده¬اند فرآیندهای آپوپتوزی در آن دخالت دارند. کاسپاز ۹ پروتئازی است که با فرآیند مرگ میتوکندریایی ارتباط دارد و حین آپوپتوز فعال می¬شود. بنابراین مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرسم کلرپیریفوس بر میزان پروتئین کاسپاز ۹ در بافت هیپوکامپ موش‌های صحرایی طراحی و اجرا شد.

در این مطالعه تجربی از ۲۴ سر موش صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار با وزن ۱۸۰-۲۲۰ گرم به‌عنوان آزمودنی استفاده شد. حیوانات به‌صورت تصادفی در گروه‌های کنترل، حلال دارو (شاهد)، دریافت سم ۱ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم وزن بدن و دریافت سم۳ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم وزن بدن قرار گرفتند (در هر گروه n=۶). سم کلرپیریفوس به مدت ۶ هفته (۵ روز در هفته) داخل صفاقی تزریق شد. سپس میزان پروتئین کاسپاز۹ در بافت هیپوکامپ با استفاده از روش الایزا اندازه‌گیری شد. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه و تست تعقیبی توکی استفاده شد.

نتایج نشان داد میزان کاسپاز ۹ در هیپوکامپ در گروه‌های سم ۱ میلی‌گرم ($P<۰/۰۱$) و سم ۳ میلی‌گرم($P<۰/۰۰۱$) نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشته است.

یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد مواجهه طولانی‌مدت حتی با دوزهای کم کلرپیریفوس می‌تواند موجب افزایش میزان کاسپاز۹ شود. همچنین دریافت سم کلرپیرفوس با دوزهای بالاتر دارای اثرات سمی بیشتری می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: کاسپاز ۹، کلرپیرفوس، هیپوکامپ.

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. ۱۴۰۲؛ ۳۰(۲): ۱۸۹-۱۹۵.

دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۳۱ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۱۹

[۱] گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکزی، تهران، ایران

[۲] مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

***نویسنده مسئول:** مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

آدرس: تهران- دانشگاه علوم پزشکی ایران- مرکز تحقیقات علوم اعصاب

تلفن: ۰۲۱-۸۶۷۰۴۵۲۹ نمابر: ۰۲۱-۸۶۷۰۴۵۲۹ پست الکترونیکی: hosseini.n@iums.ac.ir; nasrinhosseini501@yahoo.com

مقدمه

رشد روزافزون جمعیت در کشورهای در حال توسعه و افزایش تقاضا برای یافتن غذا موجب شده است تا کشاورزی به‌عنوان یکی از اساسی‌ترین روش‌های تأمین مواد غذایی به شمار آید. ازطرفی آفات کشاورزی از دشمنان اصلی محصولات کشاورزی می‌باشند که جهت مقابله با آنان و افزایش تولید محصول از سموم مختلفی استفاده می‌شود (۱).

آفت‌کش‌هایی مانند سموم ارگانوکلره، ارگانوفسفره، کاربامات و پیرتروئیدها سمومی هستند که به‌طور معمول استفاده می‌شوند. اگرچه ترکیبات ارگانوفسفره جزو بزرگ‌ترین و متنوع‌ترین آفت‌کش‌های در دسترس هستند که به علت اثر بر طیف وسیعی از آفات و همچنین ارزان‌قیمت بودن، بیشتر از سایر آفت کش‌ها جهت افزایش بازدهی محصول و همچنین کنترل بیماری‌های منتقله توسط بندپایان مورد استفاده قرار می‌گیرند. هرچند اغلب به علت عدم آشنایی کشاورزان و سایر مصرف‌کنندگان از اثرات زیان‌بار آفت‌کش‌ها و اصول صحیح مبارزه، این کار به‌طور ناقص یا بی‌رویه صورت می‌گیرد (۱).

آفت‌کش‌های مورد استفاده در کشاورزی می‌توانند با راه یافتن به منابع آبی باعث آلودگی آب‌ها شوند یا با ورود به زنجیره غذایی، سلامتی افراد را به خطر بیندازند (۱). کلرپیریفوس[1] با نام تجاری دورسبان حشره‌کشی از گروه ارگانوفسفره است که از طریق پوست، مجاری تنفسی و دستگاه گوارش وارد بدن شده و به سرعت در کبد و کلیه به متابولیت فعال تبدیل می‌شود. اکثر مردم به‌طور مستمر در معرض غلظت‌های کم ارگانوفسفات‌ها قرار دارند و مطالعات نشان داده است خطرات اثرات جانبی آن‌ها بیشتر از خطر بروز سرطان می‌باشد. سم کلرپیریفوس نیز به مدت طولانی در آب، خاک و گیاهان پایدار بوده و حتی ممکن است تا هفته‌ها و ماه‌ها نیز باقی بماند. بنابراین فرد می‌تواند از طریق محیط، مواد غذایی یا به‌واسطه شغل با آن‌ها آلوده شده و دچار آسیب شود (۲).

امروزه بحث‌های بسیاری میان طرفداران و مخالفان مصرف آفت‌کش‌ها درباره سود و زیان مصرف این ترکیبات وجود دارد. مهم‌ترین خطرات آفت‌کش‌ها را می‌توان تأثیر سوء آن‌ها بر محیط زیست و سلامتی، حیات وحش، گیاهان و موجودات مفید دانست. از طرف دیگر ایمنی غذایی و بهبود کیفی محیط زندگی انسان، حیوانات اهلی و گیاهان جزو محاسن کاربرد آفت‌کش‌ها در کشاورزی می‌باشند (۱) .

طی دهه‌های اخیر بحث‌های بسیاری در مراکز علمی و نیز جوامع مختلف در مورد مصرف آفت‌کش‌ها وجود داشته است. محققان بر این باورند که امروزه مصرف آفت‌کش‌ها در سطح گسترده با خطرات جدی برای انسان‌ها و محیط همراه می‌باشد. میزان و حدود این خطرات به‌طور دقیق مشخص نشده و آمار دقیقی از تلفاتی که از انواع مسمومیت‌ها حاصل می‌شود نیز در دست نمی‌باشد (۲) .

نتایج مطالعات انجام شده بر روی حیوانات و انسان‌ها اثرات زیان‌بار کلرپیریفوس بر روی ارگان های مختلف مانند سیستم ایمنی، سلول‌های خونی (۳)، دستگاه تولید مثل (۴)، کبد و کلیه (۵) را اثبات کرده‌اند. به نظر می‌رسد اثرات آن بر روی مغز، کبد، کلیه و بیضه با افزایش استرس اکسیداتیو ارتباط دارد (۵). اگرچه هنوز به‌طور دقیق مکانیسم سلولی اثرات زیانبار این سم بر روی سیستم عصبی کاملاً مشخص نشده است.

کاسپازها از خانواده پروتئازها هستند که به عنوان عوامل اصلی در طول آپوپتوز عمل می‌کنند و موجب تجزیه پروتئینی در اکثر ساختارهای سلولی از جمله اسکلت سلولی، اتصالات سلولی، میتوکندری، شبکه آندوپلاسمی، دستگاه گلژی و هسته می‌شوند. کاسپازها آغازگر مسیرداخلی آپوپتوز بوده و با فعال کردن کاسپاز ۳ موجب افزایش آپوپتوز می‌شوند. کاسپاز ۹ نیز پروتئاز اختصاصی اسیدآسپارتیک است که با فرآیند مرگ میتوکندریایی ارتباط دارد و در جریان مرگ برنامه‌ریزی شده سلول یا آپوپتوز فعال می‌شود (۶). لذا در مطالعه حاضر اثر مواجهه ۶ هفته‌ای با دو دوز ۱ و ۳ میلی‌گرم سم کلرپیریفوس به‌منظور بررسی آسیب ایجاد شده از طریق مسیر آپوپتوز و میزان کاسپاز ۹ در بافت هیپوکامپ موش‌های صحرایی بالغ نر انجام شد.

[1] Chlorpyrifos

روش تحقیق

مطالعه حاضر پس از تأیید شورای پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی با کد اخلاق IR/IZU/10111000411001 انجام شد. در این مطالعه از موش‌های صحرایی نژاد ویستار نر بالغ خریداری شده از انستیتو پاستور ایران به وزن ۱۸۰–۲۲۰ گرم استفاده شد. به منظور سازگاری با محیط و کنترل عوامل مخدوش‌کننده، حیوانات به مدت یک هفته قبل از شروع آزمایشات در حیوان‌خانه مستقر شدند. حیوانات در شرایط استاندارد از نظر دسترسی آزاد به آب و غذا، میزان رطوبت (۱۰٪±۵۰٪)، دما (۳±۲۳)، دوره تاریکی روشنایی (۱۲ ساعت روشنایی – ۱۲ ساعت تاریکی) و تهویه نگهداری شدند. در طول آزمایش از قوانین نگهداری از حیوانات آزمایشگاهی (NIH شاهداره ۸۰–۲۳، ویرایش ۱۹۹۶) پیروی شد.

مسمومیت با سم کلرپیریفوس

مسمومیت با استفاده از سم کلرپیریفوس (CPF) [CAS No. 2921-88-2] تهیه شده از شرکت سیگما آلدریچ آمریکا (St. Louis, MO, USA) ایجاد شد. جهت انجام تزریق داخل صفاقی، دارو با استفاده از حلال دی متیل سولفوکساید (Dimethylsulfoxide; DMSO) و نرمال سالین ۰/۹٪ رقیق شد؛ به‌طوری‌که غلظت نهایی حلال دی متیل سولفوکساید بیشتر از ۰/۰۱ نشود و سپس با استفاده از دستگاه سونیکیتور به‌صورت همگن درآورده شد.

گروه‌های آزمایش

حیوانات به‌صورت تصادفی در چهار گروه کنترل (C)، گروه دریافت کننده حلال دارو (Sham)، گروه دریافت کننده سم CPF به مقدار ۱mg/kg.bw (CPF-1) و گروه دریافت کننده سم کلرپیریفوس به مقدار ۳mg/kg.bw (CPF-3) قرار گرفتند. (هر گروه شامل ۶ حیوان بود). در گروه کنترل (C) هیچ‌گونه مداخله‌ای انجام نشد. حیوانات گروه شاهد حلال دارو میزان مساوی از حلال دارو (DMSO در نرمال سالین ۰/۹٪) دریافت کردند. تزریق داخل صفاقی حلال و سم با دوزهای ۱ و ۳ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن به مدت ۶ هفته (۵ روز در هفته) بین ساعت ۲ تا ۳ بعدازظهر انجام شد (۷). در پایان مطالعه، حیوانات با تزریق درون صفاقی ترکیب زایلازین (۸ mg/kg) و کتامین (۸۰ mg/kg) بیهوش شدند. سپس با استفاده از قیچی مخصوص قربانی شده و مغز آن‌ها از داخل جمجمه خارج شدند. جهت اندازه‌گیری میزان کاسپاز ۹، هیپوکامپ‌ها از بافت‌های مغزی جدا شده و در فریزر ۸۰– درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

سنجش میزان کاسپاز ۹ در هیپوکامپ

بافت هیپوکامپ منجمد شده به مدت ۱۵ ثانیه توسط رادیو ایمونواسی بافر (Radioimmunoprecipitation assay buffer; RIPA) لیز شده و سپس با سانتریفوژ کردن به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتیگراد هموژنیزه شدند. بخش رویی مایع جدا شده و به میکروتیوپ‌های قرار داده شده بر روی یخ، منتقل شدند. سپس غلظت پروتئین هر میکروتیوب با استفاده از دستگاه نانودراپ اندازه‌گیری و مشخص شد. در مرحله بعدی ۵۰ میکرولیتر از مایع رویی که حاوی ۲۰۰–۱۰۰ میکروگرم پروتئین بود به میکروپلیت منتقل شده و به هر خانه به میزان ۵۰ میکرولیتر ۲ × راکشن بافر ۷۰ اضافه شد. در پایان، ۵ میکرولیتر سوبسترا اختصاصی و با غلظت نهائی ۲۰۰ میکرو مولار به هر خانه اضافه شد و پلیت‌ها به مدت ۴ ساعت در دمای ^{0c} ۳۷ و در محل تاریک انکوبه شدند.

میزان کاسپاز ۹ در هیپوکامپ با استفاده از کیت آزمایشگاهی حیوانی ZellBio با کد ZB-10627C-M9648 (,Gmbh, ZellBio آلمان) به روش الایزا و طبق دستورالعمل کارخانه سازنده کیت با دامنه پراکندگی ۴۰۰–۵۰ µM و حساسیت کمتر از ۵ µM توسط دستگاه الایزا خوان (Biotech, آمریکا) اندازه‌گیری شد.

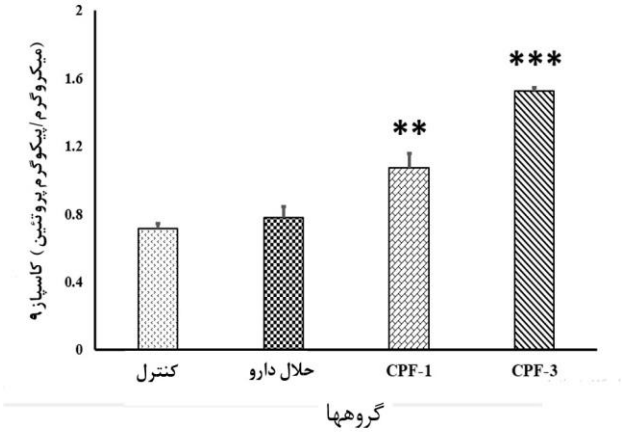
تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری واریانس یک‌طرفه (به همراه تست توکی) و با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸ انجام شد. نتایج

به‌دست آمده به‌صورت مقادیر میانگین و انحراف معیار (mean±SD) گزارش شده و در کلیه آزمون‌ها P<۰/۰۵ به عنوان معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، میزان کاسپاز ۹ در گروه‌های کنترل و شاهد (حلال دارو) تفاوت معنی‌داری نداشته است و حلال دارو تأثیری بر میزان کاسپاز ۹ نداشت. همچنین نتایج نشان داد میزان کاسپاز ۹ در هیپوکامپ در گروه‌های CPF-1 (P<۰/۰۱) و CPF-3 (P<۰/۰۰۱) به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است. نتایج نشان داد سم کلرپیریفوس با غلظت‌های کم و به‌صورت مداوم موجب افزایش کاسپاز ۹ در هیپوکامپ می‌شود.



شکل ۱- میزان کاسپاز ۹ در هیپوکامپ در گروه‌های آزمایشی مختلف. مقدار پروتئین کاسپاز ۹ در بافت هیپوکامپ ۶ هفته پس از دریافت سم کلرپیریفوس در گروه‌های CPF-1 (P<۰/۰۱) و CPF-3 (P<۰/۰۰۱) به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش یافت. (نتایج حاصل از آزمون آماری آنووای یک‌طرفه و تست توکی و براساس میانگین±انحراف معیار گزارش شد. هر گروه شامل ۶ حیوان بود. P<۰/۰۱** و P<۰/۰۰۱***)

بحث

نتایج مطالعات پیشین که همسو با مطالعه حاضر است، نشان داد که مواجهه با سم کلرپیریفوس به‌صورت وابسته به دوز باعث ایجاد تغییرات بافتی در کبد و کلیه موش‌های صحرایی نر و ماده شده است (۸). همچنین گزارش شده است دریافت دو دوز سم کلرپیریفوس از راه خوراکی طی ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت، موجب بروز آسیب DNA و استرس اکسیداتیو درقشر مغز، مخچه و کبد موش‌های صحرایی می‌شود (۹). تحقیقات انجام شده نشان دادند تجویز خوراکی کلرپیریفوس با دوز mg/kg ۵ طی ۲۱ روز موجب انتشار سم در بافت کبد، ریه، قلب، مغز، کلیه، بافت چربی و عضله اسکلتی شده است. بیشترین غلظت انتشار آن مربوط به بافت چربی (۶/۱۸٪) بوده و سپس به ترتیب در کبد (۰/۲۹٪)، مغز (۰/۲۲٪)، کلیه (۰/۱٪) و تخمدان (۰/۰۳٪) دارای بیشترین توزیع بودند. همچنین در این تحقیق ایجاد استرس اکسیداتیو توسط سم کلرپیریفوس با افزایش قابل توجه مقادیر مالون دی آلدئید در کبد همراه بوده است (۱۰). همچنین تجویز خوراکی کلرپیریفوس با دوزmg/kg ۳۰ دو بار در هفته طی ۹۰روز موجب کاهش معنی‌داری در غلظت هموگلوبین، درصد هماتوکریت، میزان ترومبوسیت‌ها، پروتئین کل، میزان آلبومین و آنتی‌اکسیدان‌ها شده است (۱۱).

شواهد متعددی وجود دارد که CPF می‌تواند از سد خونی مغزی[1] عبورنماید. همچنین گزارش شده است سم وارد شده در خون بر یکپارچگی سد خونی مغزی تأثیر گذاشته و موجب افزایش نفوذپذیری آن می‌شود. تغییر در یکپارچگی و نفوذپذیری سد خونی مغزی موجب آسیب‌پذیرترشدن مغز در برابر رادیکال‌های آزاد می‌شود، در نتیجه منجر به تغییرات مورفولوژیکی و عملکردی در سیستم عصبی مرکزی[2] می‌شود (۱۲).

در مطالعات قبلی اثرات سمیت عصبی تزریق زیر جلدی سم با دوز ۳ و ۱۰ میلی‌گرم به مدت ۲۱ روز موجب کاهش فعالیت کولین استرازی در نورون‌های هیپوکامپ موش‌های صحرایی نرشد و تنها دوز ۱۰ میلی‌گرم آن موجب تغییر بیان ژن شده بود (۱۳). نقش کاسپازها در تنظیم آپوپتوز نورونی طی تکامل به‌خوبی اثبات شده

[1] Blood Brain Barrier (BBB)
[2] Central Nervous System (CNS)

است. اگرچه به نقش غیر آپوپتوزی آن‌ها نیز در بسیاری از مطالعات اشاره شده است (۱۴). کاسپاز ۹ یکی از آغازگرهای مهم مسیرهای آپوپتوزی ذاتی است. شواهدی وجود دارد که پیشنهاد می‌کنند کاسپاز ۳ و ۹ نقش مهمی در تکامل طبیعی مغز و پاسخ‌های آپوپتوزی دارند. همچنین نقش کاسپاز ۹ به عنوان آغازگر کاسپازها در هیپوکامپ نیز شناخته شده است و پیشنهاد شده در آپوپتوز طی تکامل پس از تولد نیز نقش دارد. بیان مقادیر زیاد کاسپاز ۹ نشان دهنده نقش آپوپتوزی آن بر نورون‌های هیپوکامپ است (۱۴). نتایج مطالعه حاضر نشان داد میزان کاسپاز ۹ پس از ۶ هفته تزریق داخل صفاقی سم کلرپیریفوس با دوزهای ۱ و ۳ میلی‌گرم در داخل هیپوکامپ موش‌های صحرایی نر نسبت به گروه کنترل افزایش یافته بود. آپوپتوز در مغز، قلب و ماهیچه اسکلتی بالغین با بیماری‌های نورولوژیک مانند بیماری آلزایمرو اسکلروز آمیوتروفیک جانبی ارتباط دارد. به نظر می‌رسد بیان مداوم کاسپاز ۹ در مغز و قلب می‌تواند در ایجاد تروما و اختلالات مختلف مشارکت داشته باشد (۱۵).

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد دریافت سم کلرپیریفوس به مدت طولانی با دوزهای پایین ۱ و ۳ میلی‌گرم می‌تواند موجب آسیب نورونی شود. به نظر می‌رسد بخشی از سمیت نورونی ایجاد شده، به دلیل افزایش مقدار کاسپاز ۹ در هیپوکامپ می‌باشد. برای شناخت مکانیسم های ایجاد سمیت نورونی بیشتر و اثبات کامل آن‌ها انجام تحقیقات بیشتری پیشنهاد می‌گردد.

تقدیر و تشکّر

این مقاله حاصل پایان‌نامه تحت عنوان "تأثیر تمرین هوازی و مسمومیت با کلرپیریفوس بر پروتئین کاسپاز ۹ در بافت هیپوکمپ رت‌های نر"، در مقطع کارشناسی‌ارشد گروه فیزیولوژی ورزش در سال ۱۳۹۶ با کد ۱۰۱۱۱۰۰۰۴۱۱۰۰۱ می‌باشد که با حمایت دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی اجرا شده است. لازم است مراتب تشکّر و قدردانی صمیمانه را از مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی ایران به دلیل مساعدت و همکاری‌های لازم جهت استفاده از امکانات و تجهیزات آن مرکز که ما را در انجام و ارتقاء کیفی این پژوهش یاری دادند، اعلام نماییم.

تضاد منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ گونه تضاد منافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

منابع:

1- Mahajan R, Verma S, Chandel S, Chatterjee S. Organophosphate pesticide: Usage, environmental exposure, health effects, and microbial bioremediation. Microbial Biodegradation and Bioremediation: Elsevier; 2022; 473-90. DOI: 10.1016/B978-0-323-85455-9.00013-8

2- Lerro CC, Koutros S, Andreotti G, Friesen MC, Alavanja MC, Blair A, et al. Organophosphate insecticide use and cancer incidence among spouses of pesticide applicators in the Agricultural Health Study. Occupational and environmental medicine. 2015;72(10):736-44. DOI: 10.1136/oemed-2014-102798

3- Gowri U, Patel P, Suresh B. Evaluation of pesticide induced developmental immunotoxicity in rir chicks. Journal of Cell & Tissue Research. 2010;10(2). URL: https://www.researchgate.net/publication/242014713

4- Li J, Pang G, Ren F, Fang B. Chlorpyrifos-induced reproductive toxicity in rats could be partly relieved under high-fat diet. Chemosphere. 2019;229:94-102. URL: https://www.researchgate.net/publication/242014713

5- Zhang Y, Chang Y, Cao H, Xu W, Li Z, Tao L. Potential threat of Chlorpyrifos to human liver cells via the caspase-dependent mitochondrial pathways. Food and Agricultural Immunology. 2018;29(1):294-305. DOI: 10.1080/09540105.2017.1373271

6- Zama D, Meraihi Z, Tebibel S, Benayssa W, Benayache F, Benayache S, et al. Chlorpyrifos-induced oxidative stress and tissue damage in the liver, kidney, brain and fetus in pregnant rats: The protective role of the butanolic extract

of Paronychia argentea L. Indian Journal of Pharmacology. 2007;39(3):145. URL: https://www.ijp-online.com/text.asp?2007/39/3/145/33434

7- Ribeiro AC, Hawkins E, Jahr FM, McClay JL, Deshpande LS. Repeated exposure to chlorpyrifos is associated with a dose-dependent chronic neurobehavioral deficit in adult rats. Neurotoxicology. 2022;90:172-83. DOI: 10.1016/j.neuro.2022.03.011

8- Mansour SA, Mossa A-TH. Oxidative damage, biochemical and histopathological alterations in rats exposed to chlorpyrifos and the antioxidant role of zinc. Pesticide Biochemistry and Physiology. 2010;96(1):14-23. DOI: 10.1016/j.pestbp.2009.08.008

9- Yahia D, Ali MF. Assessment of neurohepatic DNA damage in male Sprague–Dawley rats exposed to organophosphates and pyrethroid insecticides. Environmental Science and Pollution Research. 2018;25(16):15616-29. DOI: 10.1007/s11356-018-1776-x

10- Tanvir E, Afroz R, Chowdhury M, Gan S, Karim N, Islam M, et al. A model of chlorpyrifos distribution and its biochemical effects on the liver and kidneys of rats. Human & experimental toxicology. 2016;35(9):991-1004. DOI: 10.1177/0960327115614384

11- Elsharkawy EE, Yahia D, El-Nisr NA. Sub-chronic exposure to chlorpyrifos induces hematological, metabolic disorders and oxidative stress in rat: attenuation by glutathione. Environmental toxicology and pharmacology. 2013;35(2):218-27. DOI: 10.1016/j.etap.2012.12.009

12- Weis GCC, Assmann CE, Mostardeiro VB, de Oliveira Alves A, da Rosa JR, Pillat MM, et al. Chlorpyrifos pesticide promotes oxidative stress and increases inflammatory states in BV-2 microglial cells: A role in neuroinflammation. Chemosphere. 2021;278:130417. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2021.130417

13- Lee YS, Lewis JA, Ippolito DL, Hussainzada N, Lein PJ, Jackson DA, et al. Repeated exposure to neurotoxic levels of chlorpyrifos alters hippocampal expression of neurotrophins and neuropeptides. Toxicology. 2016;340:53-62. DOI: 10.1016/j.tox.2016.01.001

14- Chang LR, Liu JP, Song YZ, Lu T, Lu G, Wu Y. Expression of caspase-8 and caspase-9 in rat hippocampus during postnatal development. Microscopy Research and Technique. 2011;74(2):153-8. DOI: 10.1002/jemt.20886

15- Matilainen T, Haugas M, Kreidberg JA, Salminen M. Key apoptosis regulating proteins are down-regulated during postnatal tissue development. International journal of developmental biology. 2007;51(5):409-13. DOI: 10.1387/ijdb.062263sm