

اثرات هیستوپاتولوژیک فیومهای جوشکاری بر اسپرما توژنزیس در موش صحرائی

دکتر محمدرضا عرب (استادیار)*، دکتر آزاده شریفزاده (پزشک عمومی)، دکتر فریدون اول سرگلزایی (استادیار)**، دکتر طاهره
طلایی خوزانی (استادیار)***

* بافت شناسی، گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی زاهدان

** آناتومی، گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی زاهدان

*** بافت شناسی، گروه آناتومی، دانشکده پزشکی شیراز

چکیده

مقدمه: فیومهای جوشکاری الکتریکی یکی از عوامل آلوده کننده محیط کار محسوب می شوند که موجب بروز اختلالات فراوانی از جمله تحریکات مخاطی، تغییرات کیفیت مایع سمن و حتی سرطان در کارگران می گردند. جذب این فیومها می تواند باعث کاهش اسپرمهای با شکل نرمال و کاهش قدرت نفوذ خطی اسپرمها شود. علیرغم تحقیقات فراوانی که در این زمینه تاکنون صورت گرفته است. هنوز اطلاعات ما از تغییرات ساختمانی و مکانیسم عمل این فیومها بر اپی تلیوم ژرمینال بسیار محدود باقی مانده است. هدف از این مطالعه شناسایی تغییرات ساختمانی حاصل از تأثیر این فیومها بر اپی تلیوم ژرمینال در موش صحرائی به عنوان یک مدل حیوانی در شرایط قابل کنترل از نظر میزان آلودگی در محفظه گاز بود.

مواد و روشها: ۶۰ سر موش صحرائی از نژاد Sprague Dawley انتخاب و در گروه آزمایش (۴۰ سر) و کنترل (۲۰ سر) قرار گرفتند. هر یک از گروههای آزمایش و کنترل به چهار زیر گروه ۲، ۴، ۶ و ۸ هفته ای تقسیم شدند، تعداد رتھا در هر زیر گروه آزمایش و کنترل به ترتیب ۱۰ و ۵ سر بود. حیوانات پس از سازش با محیط در شرایط استاندارد نگهداری شدند. در گروه آزمایش رتھا به مدت ۲ ساعت در روز (ساعات ۱۲-۱۴)، ۵ روز در هفته (شنبه تا چهارشنبه) در اتاقک گاز تحت تأثیر فیومهای حاصل از جوشکاری با شدت ۱۰۰ آمپر قرار گرفتند. الکترودها از نوع آما ۲۰۰۰ و سرعت جوشکاری ۰/۱ cm/s بود. با تنظیم هواکش حلزونی سرعت تعویض هوای درون اتاقک ۱۲-۱۵ بار ثابت نگه داشته شد. میزان گازهای $NO + NO_2$ ، CO ، CO_2 ، O_3 و هم چنین میزان عناصر فلزی هوای درون اتاقک اندازه گیری شد. با توجه به زمان بندی هر زیر گروه آزمایش و کنترل، در موعد مقرر از بیضه رتھا نمونه گیری شد و برشهایی به ضخامت ۵-۷ میکرومتر تهیه و با تکنیکهای پاس، آلسین بلو (pH = ۲/۵) و لکتین PNA رنگ آمیزی و مطالعه شدند. ضخامت اپی تلیوم لوله های منی ساز اندازه گیری و به کمک تست کروسکال والیس تجزیه و تحلیل شد.

یافته ها: نتایج حاصله از این مطالعه تغییرات کمی و کیفی فراوانی را در اپی تلیوم ژرمینال بیضه نشان داد. اتساعات عروقی در تونیکا واسکولازا، افزایش ضخامت غشاء پایه، از هم گسیختگی ارتباط سلولهای سرتولی و رده اسپرما توژنیدی، توقف اسپرما توژنزیس در مرحله اسپرما توستیتی تیپ I از یافته های گروه آزمایش بود. هم چنین اختلاف معنی داری میان گروههای آزمایش و کنترل برای ضخامت اپیتلیوم ژرمینال ($p < 0.001$) دیده شد.

نتیجه گیری و توصیه ها: به نظر می رسد علیرغم ایجاد نوعی پاسخ تطابقی در ارگانسیم برای مقابله با این گازها، تغییرات ساختمانی زیادی در پوشش ژرمینال بوجود می آید که میزان این اثرات وابسته به نوع مواد توکسیک، دوز آنها و مدت زمان آلودگی می باشد.

مقدمه

که شناسایی این تغییرات بر ارگانیزم زنگ خطری برای مدیران کارگاهها و کارخانهها است، چرا که نشان داده شده است که با ارتقای سیستمهای تهویه در کارگاهها می توان خطرات آلودگی کارگران در محیطهای کار را به میزان زیادی کاهش داد (۸).

با آنکه گزارشات فراوانی مبنی بر اثرات سوء این فیومها بر انسان وجود دارد، هنوز اثرات دقیق این فیومها بر دستگاه تولید مثلی مشخص نیست، شواهد موجود تغییراتی را در پارامترهای سرمی مثل هیپراسترونیسم و یا ناتوانی جنسی، افزایش سقطهای خودبخودی و حتی ناباروری را نشان داده است (۹). افزایش میزان عقیمی و ناباروری در دهه های اخیر از ۸ به ۱۵ درصد، احتمال تاثیر آلوده کننده های ناشی از محیطهای کار را بصورت جدیتری مطرح کرده است و لذا نیاز به مطالعه در این زمینه روز بروز بیشتر احساس می گردد (۱۰). هدف از این مطالعه شناسایی اثرات هیستوپاتولوژیک این فیومها بر بیضه به روش هیستوشیمی و لکتینی در موش صحرائی به عنوان یک مدل آزمایشگاهی در شرایط قابل کنترل از نظر میزان آلودگی بود.

مواد و روش ها

شش سر موش صحرائی بالغ از نژاد Sprague Dawley با وزن 20 ± 200 انتخاب شدند و در دو گروه آزمایش ($n=40$) و کنترل ($n=20$) قرار گرفتند. هر کدام از زیرگروههای آزمایش و کنترل به چهار زیر گروه ۲، ۴، ۶ و ۸ هفته ای تقسیم شدند. تعداد موشها در هر زیر گروه آزمایش و کنترل به ترتیب برابر ۱۰ و ۵ سر بود. حیوانات پس از سازش با محیط زندگی در شرایط استاندارد از نظر درجه حرارت (22 ± 2)، میزان رطوبت ۴۵-۵۰٪، ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی و دسترسی آزاد به آب و مواد غذایی نگهداری شدند. موشهای گروه آزمایش به مدت ۲ ساعت (۱۲-۱۴)، ۵ روز اول هفته درون اتاقک گاز با حجم حدود $3 m^3$ در معرض گازهای جوشکاری قرار گرفتند. سرعت جوشکاری $1 cm/s$ و سرعت تعویض هوای درون اتاقک ۱۲-۱۵ بار در ساعت ثابت نگه

استفاده از جوشکاری در کارگاهها و کارخانه های صنعتی برای اتصالات فلزی در صنایع مختلف از جمله اتومبیل سازی، کشتی سازی و صنایع سبک و سنگین دیگر هر روز توسعه بیشتری پیدا می نماید. هنگام جوش فلزات به کمک جریان الکتریکی معمولا گازهایی مثل ازون، دی اکسید کربن، مونواکسید کربن و اکسیدهای نیتروژن از محل جوش متصاعد می شود که موجب افزایش میزان این گازها در محیط اطراف می گردد، آن چنان که این میزان نسبت به حد استاندارد بسیار بالاتر می رود. هم چنین هنگام جوش فلزات میزان ذرات فلزی معلق در محیط اطراف نیز افزایش می یابد، این عناصر فلزی عمدتا بصورت ذرات معلق مس، آهن، روی و منگنز می باشند (۱). مطالعات اپیدمیولوژی نشان داده اند که این گازها و ذرات فلزی معلق می توانند به طور جدی سلامت کارگران را به خطر اندازند (۲). با آنکه مطالعات زیادی مبنی بر تعیین اثرات سوء این فیومها بر اپی تلایوم ژرمنال در لوله های منی ساز انجام شده است، هنوز اطلاعات ما در این مورد بسیار محدود و ناچیز است و اتفاق نظر چندانی برای آن وجود ندارد، آنچنان که Bonde و همکاران معتقدند که فیومها و ذرات فلزی معلق فوق تاثیری بر کیفیت مایع منی بوجود نمی آورند (۳). در حالی که این محقق در مطالعه ی دیگری نشان داده است که متعاقب تاثیر این گازها و ذرات فلزی معلق، تعداد اسپرمها، سرعت حرکت آنها و هم چنین تعداد اسپرمهای با شکل طبیعی کاهش می یابد (۴)، به نظر می رسد این تغییرات دائمی و غیر قابل برگشت هستند (۵). مطالعات سیتوژنتیک بر روی کارگران جوشکار تغییرات متعددی را بر ساختار DNA و کروموزومهای آنها نشان داده است (۶). مطالعات قبلی همچنین نشان داده است که میزان آنزیمهای کبدی و آنتی اکسیدانهای مربوطه در افراد با حرفه جوشکاری نسبت به گروه کنترل تغییر نشان می دهد. همچنین بروز بیماریهای انسدادی ریوی و تغییر در ساختمان مجاری هدایتی هوا در افراد با حرفه جوشکاری نسبت به گروه کنترل بیشتر گزارش شده است (۷). مطالعات انجام شده تا کنون مشخص نموده اند

داشته شد. الکترودهای مورد استفاده الکترودهای استاندارد آما ۲۰۰۰ و شدت جریان الکتریکی ۱۰۰ آمپر بود. هر هفته ۲ بار میزان گازهای ازون، مونواکسید کربن، دی اکسید کربن، مونواکسید نیتروژن و دی اکسید نیتروژن و میزان ذرات معلق عناصر فلزی آهن، روی، مس و منگنز به ترتیب به کمک دتکتورهای Galtec و فیلترهای استاندارد استات سلولز با قطر ۸/ میکرومتر و توسط Atomic absorption اندازه گیری شدند. با توجه به جدول زمانی از موشهای گروه کنترل و آزمایش نمونه گیری از بیضه بعمل آمد. این نمونه‌ها مطابق روش معمول بافتی پاساژ داده شده و از بلوکهای پارافینی تهیه شده مقاطعی با ضخامت ۵-۷ میکرومتر تهیه و با رنگ‌آمیزیهای هماتوکسیلین و ائوزین، پاس، آلسین بلو با اسیدیت ۲/۵ و تکنیک لکتینی PNA مورد مطالعه قرار گرفتند. بعد از کالیبراسیون میکروسکوپ Zeiss KF2 به کمک اکولر مدرج اقدام به اندازه گیری ضخامت پوشش لوله‌های منی ساز با ابژکتیو ۴۰× گردید. اطلاعات بدست آمده با نرم افزار آماری SPSS (ver. 10) آنالیز گردید و $p < 0.05$ معنی دار تلقی شد.

نتایج کمی حاصل از آنالیز اطلاعات بدست آمده از اندازه گیری ضخامت اپی تلیوم ژرمنال با تست غیرپارامتری کروسکال والیس در لوله‌های منی ساز نشان داد که اختلاف ضخامت میان گروههای آزمایش و کنترل از نظر آماری معنی دار است ($p < 0.001$). آنالیز بیشتر اطلاعات به کمک تست دو طرفه من ویتنی نشان داد که این اختلاف ضخامت مربوط به گروههای آزمایش و کنترل ۶ هفته‌ای و هم چنین گروههای آزمایش و کنترل ۸ هفته‌ای می‌باشد ($p < 0.001$). مقایسه دوبدوی گروهها در گروه آزمایش نشان داد که اختلاف ضخامت میان گروههای جوشکاری ۲ با ۶ هفته‌ای معنی دار است ($p < 0.001$) (جدول ۱).

در رنگ‌آمیزی پاس بیشترین میزان شدت واکنش برای پوشش لوله‌های سمینفروز مربوط به اسپرمتوزوئیدهای در حال تشکیل و بقایای در حال ریزش اسپرمتیدها و کمترین شدت واکنش مربوط به اسپرمتوگونیاها بود. در مقایسه گروههای آزمایش با کنترل در این رنگ‌آمیزی میزان پاسخ گروههای جوشکاری نسبت به کنترل بیشتر بود.

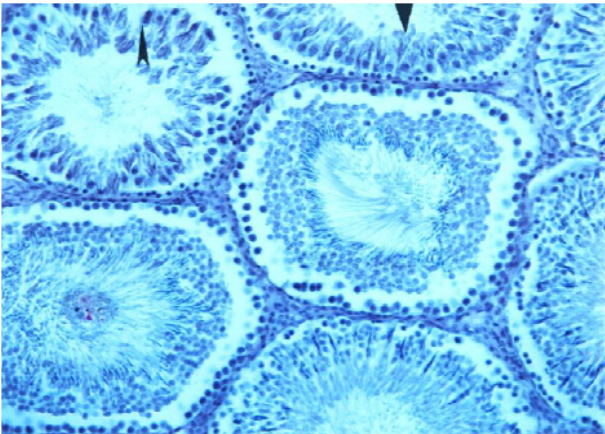
یافته ها

میزان آلاینده‌های گازی ازون، دی اکسید کربن، مونواکسید کربن، دی اکسید نیتروژن و مونواکسید نیتروژن در هوای تنفسی درون اتاقک به ترتیب معادل ۶ppm، ۵۹۲ ppm،

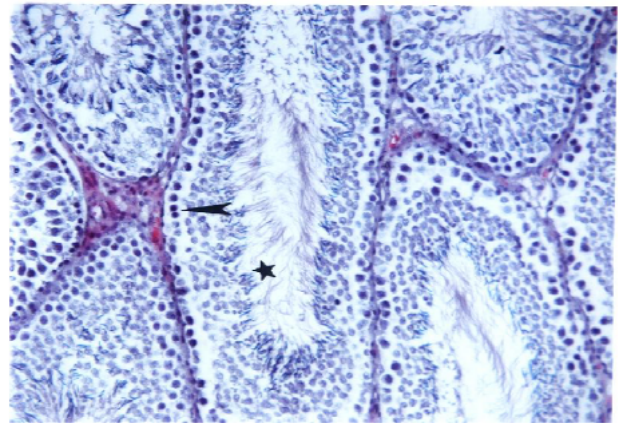
جدول ۱- متوسط ضخامت و انحراف معیار لوله‌های سمینفروز در گروههای آزمایش و کنترل متعاقب تاثیر فیومهای جوشکاری در موش صحرایی

گروهها	کنترل	آزمایش	کنترل	آزمایش	کنترل	آزمایش	کنترل	آزمایش
ضخامت μm	۸۲/۳	۸۵/۴۵	۸۲/۲	۸۰/۷	۷۹	۸۷/۹	۸۰/۸	۹۱/۲
انحراف معیار	۲/۹۴	۱/۶۳	۳/۱۷	۴/۰۱	۲/۳	۲/۶۴	۱/۴۳	۳/۶
نتیجه تست	NS	NS	NS	NS		$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.001$

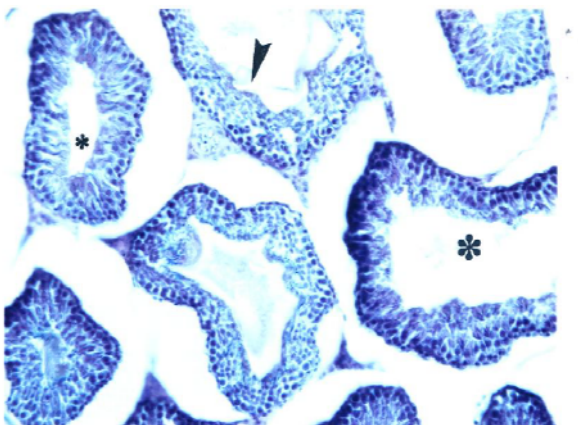
NS=non significant



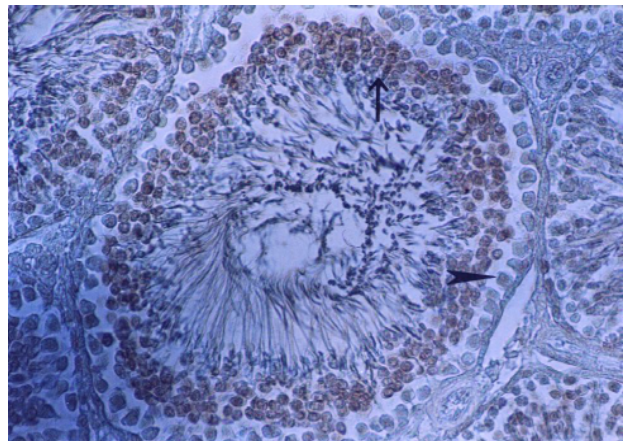
فتمیکروگراف ۳- از همگسیختگی سلول‌های رده اسپرماتوزوئیدی همراه با تغییر ضخامت پوشش ژرمینال (نوک فلش) در نمونه‌ای از گروه جوشکاری ۴ هفته‌ای نشان داده شده است. رنگ آمیزی پاس ۲۰۰×



فتمیکروگراف ۱- سلول‌های اسپرماتوگونی همراه با اسپرماتوزوئیدهای در حال تشکیل (ستاره) در نمونه‌ای از گروه کنترل ۴ هفته‌ای نشان داده شده است. رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین ۲۰۰×



فتمیکروگراف ۴- بهم ریختگی نظم و الگوی لوله‌های منی‌ساز همراه با تغییر غای سلول‌های رده اسپرماتوزوئیدی در این لوله‌ها (ستاره) در نمونه‌ای از گروه جوشکاری ۶ هفته‌ای نشان داده شده است. رنگ آمیزی پاس ۲۰۰×



فتمیکروگراف ۲- عدم واکنش سلول‌های اسپرماتوگونی (نوک فلش) و واکنش هسته‌های سلول‌های رده اسپرماتوزوئیدی به لکتین PNA در نمونه‌ای از گروه جوشکاری ۲ هفته‌ای نشان داده شده است. لکتین PNA/ Alcian blue 2.5 ۳۰۰×



فتمیکروگراف ۵- حذف واکنش اینترا نوکلئار سلول‌های رده اسپرماتوزوئیدی همراه با واکنش شدید سیتوپلاسمی بخشهای در حال

بعلاوه در گروههای جوشکاری اتساع عروقی در تونیکا واسکولوزا، از هم گسیختگی پوشش ژرمینال، از بین رفتن ارتباطات سلول‌های رده اسپرماتوزوئیدی با سلولهای پشتیبان سرتولی و توقف تقسیمات در مرحله اسپرماتوسیتی تیپ I قابل ملاحظه بود که میزان این تغییرات وابسته به زمان در معرض قرار گرفتن با فیومها بود (فتمیکروگرافهای ۱-۳). در واکنش به لکتین PNA بیشترین میزان واکنش در سیتوپلاسم نواحی آپیکال بخصوص نواحی گلژی در اسپرماتیدها و اسپرماتوزوئیدهای در حال تشکیل ملاحظه شد.

ریزش اسپرمتوزوئیدها (نوگ فلش) در نمونه‌ای از گروه جوشکاری ۸ هفته‌ای نشان داده شده است. لکتین PNA/Alcian blue در حالی که اسپرمتوگونیاها واکنشی به لکتین از خود نشان ندادند. بعلاوه حذف واکنش اینترانوکلئار سلولها به لکتین در گروههای آزمایش نسبت به کنترل از یافته‌های مهم این گروه بود (فتومیکروگرافهای ۴-۵).

بحث

نتایج این مطالعه تغییرات کمی و کیفی فراوانی را متعاقب تاثیر فیومهای جوشکاری در لوله‌های منی ساز نشان داد، بهم ریختگی لوله‌های منی ساز، از هم گسیختگی پوشش ژرمینال، توقف روند اسپرمتوزنزیس در مرحله اسپرمتوسیتی تیپ I و تغییر در ضخامت اپی‌تلیوم منی ساز همراه با تغییر واکنش اتوزینوفیلی سلولهای میوئید از جمله تغییرات کیفی در لوله‌های منی ساز بودند. بعلاوه آنالیزهای آماری نشان داد که اختلاف ضخامت لوله‌های سمینفروز میان گروههای جوشکاری و کنترل دو ۲ هفته‌ای و جوشکاری و کنترل ۸ هفته‌ای از نظر آماری معنی دار بود. هم چنین نشان داده شد که شدت تغییرات کمی و کیفی وابسته به زمان بوده و با افزایش زمان جوشکاری بر شدت ضایعات افزوده می‌شود. اختلاف معنی دار آماری ضخامت لوله‌های منی ساز بین گروههای جوشکاری ۲ هفته‌ای با ۶ و ۸ هفته‌ای نشان داد که اثرات گازها حالت تجمعی دارد، آن چنان که شدت این اثرات از هفته ششم به بعد از حد تحمل ارگانسیم بیشتر می‌گردد.

مطالعات Bonde و همکاران نشان داده است که گازهای جوشکاری بطور مشخص باعث کاهش تعداد اسپرمها، کاهش تعداد اسپرمهای با شکل نرمال و حتی میزان حرکت آنها می‌گردد. به نظر می‌رسد که این یافته‌ها انعکاسی از تغییرات هیستوپاتولوژیک بیضه‌ها باشد (۴). مطالعات کاهش تعداد اسپرمها و سرعت حرکت آنها را در کارگرانی که با سرب آلوده شده‌اند نیز نشان داده است. یافته‌های مطالعه حاضر از این نظر با گزارشات Kumar و همکاران مطابقت دارد. نشان

داده شده است که تغییرات درجه حرارت نقش با اهمیتی در روند اسپرمتوزنزیس دارد، آن چنان که درجه حرارت کیسه بیضه برای اسپرمتوزنزیس در بهترین شرایط ۴ درجه پایین تر از درجه حرارت بدن باید باشد. در مطالعه حاضر برای حذف تاثیر درجه حرارت با هدایت گازها توسط فن به اتاقک گاز مانع از افزایش درجه حرارت داخل محفظه گاز شدیم. مطالعات زمان ۶ هفته آلودگی برای تغییر پارامترهای اسپرمی را در کارگران جوشکار نشان داده است (۱۰). بهم ریختگی اپی تلیوم توپولهای سمینفروز، پیکنوزه شدن اسپرمتوسیتها و توقف روند اسپرمتوزنزیس که از یافته‌های این مطالعه بود، قبلا توسط Dabrowski و همکاران نیز گزارش شده است (۱۱-۱۳) به نظر می‌رسد افزایش ضخامت غشای پایه و ضخامت اپی تلیوم ژرمینال و توقف روند اسپرمتوزنزیس تماما نشان دهنده ی اثرات مضر این فیومها بر اپی تلیوم ژرمینال باشد. و از آنجا که سلامت تولید مثل به روند اسپرمتوزنزیس وابسته است، بنابر این احتمال تغییرات ژنتیکی در اسپرمتوزوئیدها ناپستی از نظر دور بماند، و شاید این موضوع بتواند علت سقطهای خودبخودی در همسران کارگران جوشکار را توجیه نماید. با آنکه مطالعات جدید کاهش تعداد اسپرمها در مردان را در طی دهه‌های اخیر نشان داده است، هنوز مکانیسم‌های آن بخوبی روشن نیست (۱۴). مطالعات Stoy و همکاران نشان داده است که افزایش درجه حرارت کیسه بیضه به میزان ۱-۲ درجه سبب کاهش بارزی در تعداد اسپرمها و مایع منی می‌گردد (۱۴). از طرف دیگر مطالعات Jung و همکاران نشان داده است که اختلالات اسپرمتوزنزیس در کارگران جوشکار نمی تواند به دلیل تغییرات درجه حرارتی در کیسه بیضه باشد (۱۵). بنابر این می‌توان تصور کرد که اختلالات کیفیت مایع منی در این کارگران می‌تواند مربوط به تاثیر سیستمیک و موضعی فیومهای فوق بر بیضه باشد که این مطالعه توانسته است بخشی از این تغییرات کمی و کیفی را در بیضه نشان دهد. توجه به تاثیرات مضر فیومهای فوق بر پارامترهای اسپرومتری و اندکس‌های خونی مثل میزان اسیدپتیه پلازما و فشار گازهای اکسیژن و دی اکسید کربن نه تنها در کارگران جوشکار، که در کارگران معادن نیز توجه محققان زیادی را به خود جلب کرده است. در این

ارتباط مطالعات Osim و همکاران تغییرات زیادی را در اندکس‌های اسپیرومتري و پلاسمایی کارگران معادن که در معرض ذرات معلق در معادن هستند را نشان داده است (۱۶). با عنایت به اینکه روند اسپریماتوژنیزس نیاز به اکسیژناسیون کافی دارد، شاید بتوان بخشی از اختلالات ساختمانی بیضه متعاقب تاثیر گازهایی مثل مونواکسید کربن را به علت کاهش میزان اکسیژناسیون در لوله‌های منی ساز دانست. این مساله که آیا عوامل آلوده کننده محیط‌های کار مستقیماً باعث اختلالات تولید مثلی می‌گردند یا از طریق تغییر عوامل هورمونی باعث

این اختلالات می‌گردند هنوز بخوبی روشن نیست^۱. به نظر می‌رسد برای درک بیشتر تغییرات ساختمانی در بیضه‌ها و ارتباط آن با عوامل هورمونی و یا چگونگی عملکرد فیومها و ذرات معلق ناشی از جوشکاری بر ارگانسم هنوز نیاز به مطالعات بیشتری داشته باشیم.

تقدیر و تشکر

از همکاران محترم شورای پژوهشی دانشکده پزشکی زاهدان برای تصویب این کار پژوهشی تشکر و قدر دانی می‌گردد.

منابع

1. Yu Se, K S Song, H K Chang, J H Ham, K J Kim. Lung fibrosis in Sprague Dawley rats, Induced by exposure to manual metal arc stainless welding fumes. *Toxicology Science*, 63, 99-106, 2001.
2. Broska L. Health risk of occupational exposure in welding process. *Acta Medica*, 46(1):31-35, 2003.
3. Bonde J P. Sex hormones and semen quality in welders exposed to hexavalent chromium. *Hum Exp Tox*, 11(4): 256-63 1992.
4. Bonde J P. Semen Quality and sex hormone among mild steel and stainless steel welders: a cross sectional study. *Br J Ind Med*, 74(8): 508-14, 1990.
5. Bonde JP. Semen quality in welders before and after three weeks of non-exposure. *Br J Ind Med* 47(8): 515-8, 1990.
6. Jeimert O. Hamsteen FL. Langard S. 1995. Cytogenetic studies of stainless steel welders using the tungsten anent gas metal inert gas methods for welding. *Mutat Res*, 342(1-2) 77-85.
7. Stepnewski M, Kolarzyk E, Pietrzyka M. et al. Antioxidant Enzymes and pulmonary function in steel welders. *Int Occup Med Environ Health*. 16(1): 41-7 2003.
8. Kroczycki RE. Occupational health concerns in the welding industry. *Appl Occ Environ Hyg*. 15(12): 936-45 2000.
9. Baranski B. Effects of the workplace on fertility and related reproductive outcomes. *Environ Health Perspect. Suppl 2: (101): 81-90 1993.*
10. Kumar S. Occupational exposure associated with reproductive dysfunction. *J Occup. Health* 46: 1-19 2004.
11. Hicks R, Lam HF, Shamma KJ. Pnumoconiotic effect of welding fume particle from mild and stainless steel deposited in lung of the rat. *Arch Toxicol* 55(1): 1-10 1984.
12. Hicks R, A L Shamma, Lam H F. An investigation of fibrogenic and other toxic effect of arc welding fume particle deposited in the rat lung 1983.
13. Likhecheu Iup, Batsura Iup, Direcu V I. The role of several occupational factor in the development of pulmonary alveolar proteinosis. *Arch Pathol*. 37(2): 63-9 1975.
14. Julie Stoy, Niels Herink, Hermann Burr, Jens Peter Bonde. Semen quality and sedentary work position. *Internation. J Andrology* 27(1): 5-10 2004.
15. Jung A, W B Schill, H C Schuppe. Genital heat stress in men of barren couples: a prospective evaluation by means of questionnaire. *Andrologia* 34(6): 349-55 2002.
16. Osim E, M Tandai, H M Chinayaga, h T Matarina, K K Mudamo. Lung function, blood gases, ph and serum electrolyte of small scale miners exposed to chrome ore dust on great Dyke in Zimbabwe. *Tropical Medicine & International Health*. 4(9): 621-30 1999.