

## ORIGINAL ARTICLE

# **Protective Effects of the Essence and Aqueous Extract of Achillea millefolium and Vitamin E on Atrazine-induced Follicular Atresia in Rats**

Shapour Hasanzadeh<sup>1</sup>,  
Raana Esmaeily Maleki<sup>2</sup>,  
Farzaneh Bonyadi<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Associate Professor, Department of Basic Science, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

<sup>2</sup> Doctor of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

<sup>3</sup> PhD in Comparative Histology, Department of Basic Science, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

(Received July 4, 2016 Accepted May 1, 2017)

### **Abstract**

**Background and purpose:** Atrazine causes certain biological effects including atresia in ovarian follicles. The essence and aqueous extract of *Achillea millefolium* and vitamin E have attracted interest due to their preventive effects on follicular atresia. Therefore, we evaluated the effects of these substances on ovarian tissue.

**Materials and methods:** In an experimental study, 54 adult female rats were divided into 9 groups. Groups 1 and 2 received atrazine 300 and 150 mg/kg/day, respectively. Groups 3 and 4 received atrazine 300 and 150 mg/kg/day respectively along with 150 mg/kg/day water extract of *A. millefolium*. Groups 5 and 6 were treated with atrazine 300 and 150 mg/kg/day, respectively along with 100 mg/kg/day essence of *A. millefolium*. Groups 7 and 8 received atrazine 300 and 150 mg/kg/day, respectively and a single dose of vitamin E on first day (150 mg/kg). The last group was set as control. Microscopic sections were prepared from ovaries and statistical data analysis was conducted.

**Results:** Histomorphological studies revealed that the severity of changes in untreated groups with essence and aqueous extract of *A. millefolium* and vitamin E were more than those of the groups treated with these substances. The results showed highly significant differences between treated and untreated groups in number of follicles ( $P < 0.001$ ). The most follicular rescue was in groups treated with aqueous extract of *A. millefolium*.

**Conclusion:** The essence and aqueous extracts of the *A. millefolium* and vitamin E are effective in reduction of adverse changes of ovarian follicles following atrazine exposure.

**Keywords:** atrazine, *Achillea millefolium*, follicular atresia, rat, vitamin E

J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 27 (150):1-16.(Persian).

# مقایسه اثر محافظتی اسانس و عصاره آبی گیاه بومادران با ویتامین E بر آسیب ناشی از آترازین بر فولیکول های تخدمانی موش صحرایی

شاپور حسن زاده<sup>۱</sup>رعنا اسماعیلی ملکی<sup>۲</sup>فرزانه بنیادی<sup>۳</sup>

## چکیده

**سابقه و هدف:** سم آترازین باعث تداخلات خاص بیولوژیکی از جمله آترزی در فولیکول های تخدمانی می شود. اسانس و عصاره آبی گیاه بومادران و ویتامین E نیز از لحاظ جلوگیری از اثرات آترزی حائز اهمیت هستند، از این رو در این مطالعه اثرات آنها بر بافت تخدمان بررسی گردید.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه تجربی، ۵۴ سر موش صحرایی ماده بالغ انتخاب شدند. حیوانات به ۹ گروه تقسیم شدند. گروه های آزمایشی اول و دوم روزانه به ترتیب ۱۵۰ mg/kg.bw و ۳۰۰ mg/kg.bw محلول آترازین، گروه آزمایشی سوم و چهارم به ترتیب bw ۳۰۰ mg/kg.bw محلول آترازین را به همراه ۱۵۰ mg/kg.bw عصاره آبی گیاه بومادران و گروه آزمایشی چهارم و پنجم به ترتیب bw ۳۰۰ mg/kg.bw محلول آترازین را به همراه ۱۰۰ mg/kg.bw اسانس گیاه بومادران دریافت کردند. گروه آزمایشی هفتم و هشتم نیز روزانه به ترتیب با bw ۳۰۰ mg/kg.bw و ۱۵۰ mg/kg.bw آترازین گواژ داده شده و به آنها ۱۵۰ mg/kg.bw ویتامین E به صورت تک دوز تزریق شد. نهمین گروه به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد. مقاطع میکروسکوپی از تخدمان ها تهیه و بررسی شدند. داده ها مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

**یافته ها:** نتایج هیستومورفولوژیکی نشان دادند که شدت تغییرات تحلیلی در گروه های درمان نشده با عصاره و اسانس گیاه بومادران و ویتامین E بیش تر از گروه های درمان شده بود. نتایج گویای تفاوت بسیار معنی دار ( $P<0.001$ ) در اکثر جمعیت های فولیکولی مایین گروه های بدون درمان و درمان شده بود. بیش ترین نجات فولیکولی از روند آترزی، مربوط به گروه های درمان شده با عصاره بومادران بود.

**استنتاج:** اسانس و عصاره گیاه بومادران، هم چنین ویتامین E به طور نسبی از اثرات تحلیلی آترازین روی فولیکول های تخدمانی می کاهند.

**واژه های کلیدی:** آترازین، بومادران، آترزی فولیکولی، موش صحرایی، ویتامین E

## مقدمه

در حال حاضر نگرانی رو به رشدی در مورد پیامدهای اثرات سوء مواد شیمیایی بر سیستم تولید مثلی،

Email:s.hasanzadeh@urmia.ac.ir

مولف مسئول: شاپور حسن زاده ارومیه، دانشکده پزشکی، دانشگاه ارومیه

۱. دانشیار دانشگاه ارومیه، گروه علوم پایه دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲. دکتری عمومی دامپزشکی دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۳. دکتری تخصصی بافت شناسی دانشگاه ارومیه، گروه علوم پایه دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

\*\* تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۴/۱۴ تاریخ ارجاع چهت اصلاحات: ۱۳۹۵/۴/۲۹ تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۲/۱۱

(ROS) می‌گردد(13). ROS برای سلول‌های زنده، سمنی باشد(14). بنابراین در مسمومیت‌ها توسط مواد آفت‌کش ممکن است تولید ROS تشدید گردد(14). ویتامین E به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی(15) می‌تواند از عوارض جانبی استرس اکسیداتیو با مهار گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) جلوگیری کند(16). عملکرد و فعالیت اصلی ویتامین E، محافظت از زنجیره اسیدهای چرب غیرنشایع با چندین پیوند دوگانه در فسفولیپیدهای غشاها بیولوژیک و لیپوپروتئین‌های پلاسمما است. در سطح سلول به نظر می‌رسد ویتامین E از طریق جمع کردن رادیکال‌های آزاد که دارای اکسیژن هستند، غشاها سلولی و زیر مجموعه‌های سلولی را از تخریب محافظت کند. بنابراین نقش مهم ویتامین E به عنوان یک آنتی‌اکسیدان، در بی اثر ساختن رادیکال‌های آزاد و اثرات مضر آن‌ها می‌باشد(17).

گزارش شده است که تجویز همزمان ویتامین E با میداتیون (Methidathion) و سموم ارگانوفسفره، مانع از اثرات مضر این مواد شیمیایی در اندام‌های تناسلی می‌شود(15). هم‌چنین در بررسی اثر پنتوکسی‌فیلین و ویتامین E بر تخدمان پس از القاء ایسکمی تخدمان در موش، نشان داده شده که تأثیر مصرف همزمان ویتامین E به عنوان آنتی‌اکسیدان و پنتوکسی‌فیلین به عنوان یک سم در کاهش صدمات ایسکمی، ری پروفیوژن (برقراری مجدد جریان خون) موثرتر از زمانی است که هر یک از آن‌ها به تنها مصرف شوند(18).

بومادران گیاهی از خانواده کمپوزیته یا آستراسه می‌باشد. این گیاه بالغ بر 3000 سال است که به عنوان دارو در پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرد(19). انسان بومادران خاصیت ضد تورمی دارد. این گیاه به علت دارا بودن تانن و مواد تلخ معطر، بر سلسله اعصاب و قلب نیز اثر می‌گذارد و در مواردی مانند خستگی عمومی، ضعف قلب، بیماری‌های عصبی مانند ضعف مفیدی می‌دهد(3). هم‌چنین گیاه بومادران دارای خواص ضد التهابی، ضد توموری، ضد باکتریایی و

سلام به در برده‌اند، احتمال بروز ناباروری نگرانی عمده بیماران را سبب شده است(2). با به کارگیری مواد شیمیایی، راندمان تولید در صنعت کشاورزی افزایش می‌یابد، با این حال خسارات جبران‌ناپذیری به چرخه طبیعی جانداران وارد می‌شود. یکی از علف‌کش‌های رایج که در مزارع مختلف کشاورزی استفاده می‌گردد، آترازین علف‌کشی با فرمول شیمیایی 2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-1-3-5-triazin یکی از پرمصرف‌ترین علف‌کش‌ها در اکثر کشورهای غربی و آسیایی از جمله ایران است(3). بقایای این علف‌کش ممکن است در خاک و آب‌های سطحی مناطق مورد استفاده یافتد شود. نیمه عمر آترازین در خاک حدود 4 روز است، ولی این زمان به طور معمولی می‌تواند تا 385 روز در مناطق خشک و شنی افزایش یابد. در آب خالص نیمه عمر آترازین 3 روز است. این نیمه عمر در آب دریا 30 روز بوده و در رسوبات دریایی 35 روز می‌باشد(3). ترکیبات تغییر یافته آترازین همانند ترکیب اصلی آن به صورت فراوان در آب و خاک به مدت طولانی باقی می‌مانند(4). در زمینه مضرات این سم در جنس نر خصوصاً موش صحرایی نر تحقیقات گسترهای صورت گرفته است، ولی در خصوص دستگاه تولیدمثلی جنس ماده به خصوص تخدمان‌ها تحقیقات کم‌تری صورت پذیرفته است(5-8).

مطالعات نشان داده‌اند تماس با انواع آفت‌کش‌ها اثرات سوء بر سلامت جمیعت دامی و انسانی دارد(9). این مواد به عنوان آلاینده‌های مهم محیط زیست و هم‌چنین خون و شیر انسان شناخته شده‌اند(10). مطالعات انجام شده در زمینه اثرات این مواد، نشان‌دهنده اثرات نوروتوکسیسیتی، کاهش رشد سیستم‌های تولیدمثلی و سرطان‌هایی مانند سرطان سینه می‌باشد(11). در این زمینه افرادی که در معرض مستقیم این مواد هستند، به خصوص کشاورزان باید بیش تر مورد توجه قرار گیرند(12). پروسه التهاب حاد در طی روند تخمک گذاری، احتمالاً موجب افزایش گونه‌های فعال اکسیژن

- کردند. هیچ گونه درمانی برای دو گروه T1 و T2 در نظر گرفته نشد.
- 3- گروه آزمایشی 3 (T3): حیوانات این گروه آترازین را روزانه (به میزان 300 mg/kg.bw) دریافت کردند. درمان با عصاره آبی گیاه بومادران (mg/kg.bw 150) انجام گرفت.
- 4- گروه آزمایشی 4 (T4): حیوانات این گروه آترازین را روزانه (به میزان 150 mg/kg.bw) دریافت کردند. درمان با عصاره آبی گیاه بومادران (mg/kg.bw 150) انجام گرفت.
- 5- گروه آزمایشی 5 (T5): حیوانات این گروه آترازین را روزانه (به میزان 300 mg/kg.bw) دریافت کردند. درمان با عصاره آبی گیاه بومادران (mg/kg.bw 100) انجام گرفت.
- 6- گروه آزمایشی 6 (T6): حیوانات این گروه آترازین را روزانه (به میزان 150 mg/kg.bw) دریافت کردند. درمان با عصاره آبی گیاه بومادران (mg/kg.bw 100) انجام گرفت.
- 7- گروه آزمایشی 7 (T7): حیوانات این گروه آترازین را روزانه (به میزان 300 mg/kg.bw) دریافت کردند. درمان با ویتامین E (150 mg/kg.bw) به صورت تک دوز و داخل عضلانی انجام گرفت.
- 8- گروه آزمایشی 8 (T8): حیوانات این گروه آترازین را روزانه (به میزان 150 mg/kg.bw) دریافت کردند. درمان با ویتامین E (150 mg/kg.bw) به صورت تک دوز و داخل عضلانی انجام گرفت.
- 9- گروه کنترل (C): حیوانات این گروه به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند و هیچ نوع کار تحقیقاتی روی آنها انجام نگردید.
- حیوانات آترازین را از طریق گواژه، روزانه و به صورت محلول در آب دریافت کردند. گیاه بومادران نیز در دوزهای تهیه شده از طریق گواژه به حیوانات داده شد. دوره در نظر گرفته شده برای گروهها، 21 روز بود. لازم به ذکر است آترازین سمیت حد کمتری دارد و در موش‌های صحرابی و از طریق خوراکی دارای

آنتی اکسیدانتی است (20). مطالعات نشان داده‌اند خواص آنتی اکسیدانتی می‌تواند به دلیل وجود مجموعه‌ای از مواد فنلی و فلاونوئیدی آن، باشد (21). از آن جا که تا به حال مطالعه‌ای در زمینه تاثیر عصاره و اسانس بومادران در کاهش عوارض جانبی آترازین بر بافت تخدمان صورت نگرفته است، در این مطالعه اثر حفاظتی بومادران بر بهبود پارامترهای باروری در موش‌های تحت تاثیر آترازین، بررسی شد.

## مواد و روش‌ها

### حیوانات آزمایشگاهی

این مطالعه تجربی روی 54 سر موش صحرابی سفید ماده بالغ نژاد ویستار (میانگین سنی 7 الی 8 ماهه) با میانگین وزن بدنی  $20 \pm 210$  گرم انجام شد. حیوانات از یک مرکز استاندارد دانشگاهی پرورش و نگهداری تهیه شدند. گروه‌ها در قفس‌های مخصوص و در شرایط محیطی ثابت و استاندارد (12 ساعت روشناختی و 12 ساعت تاریکی، دمای 18-26 درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی 60-70 درصد) نگهداری شدند. تمامی حیوانات در شرایط تغذیه‌ای یکسان با گندم، ذرت، پلت مخصوص موش صحرابی تغذیه شدند. امکان دسترسی آزاد به آب برای تمامی حیوانات وجود داشت. متعاقب یک هفته سازگاری با شرایط محیط و پس از توزین، موش‌ها به صورت تصادفی به 8 گروه 6 تایی به شرح زیر تقسیم شدند. 6 سر موش نیز به عنوان کنترل در نظر گرفته شدند. در تمام آزمایش‌ها موazin اخلاقی در خصوص حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید.

### گروه‌ها

- 1- گروه آزمایشی 1 (T1): حیوانات این گروه آترازین را روزانه (به میزان 300 mg/kg.bw) دریافت کردند.
- 2- گروه آزمایشی 2 (T2): حیوانات این گروه آترازین را روزانه (به میزان 150 mg/kg.bw) دریافت

کارتوش ریخته شد. دستگاه نصب گردید و در داخل بالون 200 cc آب ریخته شد. مایع حاصل از تبخیر پس از سرد شدن توسط مبرد، بازگشته و داخل کارتوش ریخته شد. برای جداسازی مخلوط عصاره و آب موجود در کارتوش، از روش تبخیر در خلا (Rotary evaporator) استفاده گردید. به طوری که در دمای 40 درجه سانتی گراد آب جدا شده و مایع غلیظی باقی ماند که تحت تاثیر گاز نیتروژن، کاملاً خشک گردید. بدین ترتیب عصاره مورد نظر به دست آمد(19).

### اسانس گیری

اسانس گیری توسط دستگاه کلروینجر (Clevenger) انجام شد. به طور خلاصه، گیاه بومادران در محفظه دستگاه و درون الكل جوشانده شد تا اجزاء فرار آن بخار شوند. بخار حاصل توسط آب سرد دستگاه خنک شده و دوباره به مایع تبدیل گشت. در نتیجه دو لایه مجزا شامل اسانس و الكل، در ستون دستگاه تشکیل شد. در نهایت باز کردن شیر دستگاه، الكل خارج گشته و مایع رویی که در واقع اسانس حاصل بود، در ظرفی جداگانه جمع آوری گردید(25). بر اساس نتایج آزمایش‌های اندازه گیری ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی، میزان این ترکیبات در عصاره هیدروالکلی بومادران به ترتیب برابر با  $2/5 \text{ mg/g}$  و  $147/25 \pm 1/5 \text{ mg/g}$  بود(26).

### 3. ویتامین E

ویتامین E به فرمول  $C_{29}H_{50}O_2$  یک ترکیب هتروسیکلیک است و دارای خاصیت آنتی اکسیدانتی می باشد. این ماده از شرکت دارویی A.C Grace Company, USA تهیه شد. در گروههایی که باستی ویتامین E دریافت می نمودند، تزریق به صورت تک دوز صورت گرفت.

نمونه برداری، تهیه مقاطع میکروسکوپی و بررسی های میکروسکوپی 21 روز بعد از دریافت سم و تجویز دارو، حیوانات با گاز  $CO_2$  کشته شدند، سریعاً ناحیه شکم آنها در خط

$LD50 > 3000 \text{ mg/kg.bw}$  می باشد. یعنی دوز کشنده این سم برای 50 درصد جمعیت، بالاتر از 3000 میلی گرم بر کیلو گرم وزن بدن است(22).

### سم و داروهای مورد استفاده

#### 1. سم علف کش آترازین (*Atrazine*)

آترازین (2-کلرو-4-اتیل آمینو-6-ایزوپروپیل-8-تیازین) یک علف کش کلرو-8-تربازینی با فرمول شیمیایی  $C_8H_{14}ClN_5$  است. آترازین مورد استفاده در Shenzhen King (Quenson Industry Co, China) به سفارش کشور ایران بود. این سم به شکل پودر و قابل حل در آب و روغن می باشد. درجه ذوب 177-175 درجه سانتی گراد و با درجه حلایت 30 میلی گرم در هر لیتر در 20 درجه سانتی گراد می باشد(23). میزان ماده موثره سم 80 درصد به همراه 20 درصد مواد نگهدارنده بوده و محاسبه میزان مصرف بر اساس محتوای خالص آن انجام گرفت. جهت تجویز، میزان هر دوز در  $0/2$  میلی لیتر روغن ذرت به عنوان حلال این سم استفاده شد. تجویز به صورت دهانی بود، به صورتی که 6 روز از هفته تجویز روزانه و 1 روز استراحت انجام گرفت.

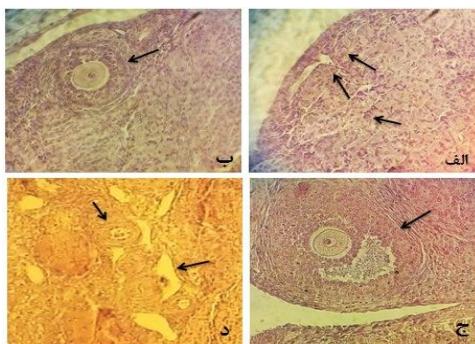
#### 2. گیاه بومادران (*Achillea millefolium*)

گیاه *A.millefolium* (خرداد تا مرداد ماه) از زیستگاه طبیعی خود در اطراف شهر ارومیه در استان آذربایجان غربی جمع آوری شد(19). سپس توسط اساتید گیاه‌شناس دانشکده علوم دانشگاه ارومیه با شماره هر باریم 7519 شناسایی شد(24). این گیاه به دو صورت عصاره آبی و اسانس مورد استفاده قرار گرفت. دوزهای تعیین شده برای هر کدام از گروههای آزمایشی از طریق گاواآ مورد استفاده قرار گرفتند.

### عصاره گیری

برای تهیه عصاره از دستگاه سوکسله استفاده گردید. 30 گرم خشک شده گیاه بومادران در داخل

اجسام زرد (CL) می‌باشند. فولیکول‌های بدبوی اکثراً به صورت توده‌های مجتمع و گاهی به صورت انفرادی مشاهده شدنند. انواع فولیکول‌های در حال رشد شامل فولیکول‌های اولیه تک لایه‌ای، فولیکول‌های اولیه چند لایه‌ای، فولیکول‌های ثانویه و فولیکول‌های ثالث در قسمت‌های عمقی قشر تخدمان دیده شدنند. در کنار فولیکول‌های سالم در حال رشد، فولیکول‌های آتریک در رده‌های مختلف (بدبوی، اولیه، ثانویه و ثالث) مشاهده گردید (تصویر شماره ۱). در گروه‌های آزمایشی تغییرات اساسی در بافت‌شناسی ساختار تخدمان دیده شد. بیشترین شدت تغییرات در گروه‌های آزمایشی ۱ و ۲ دیده شد. این تغییرات شامل افزایش تحلیل در تمامی رده‌های فولیکولی به خصوص در فولیکول‌های بدبوی و در درجه دوم در فولیکول‌های اولیه بود. تغییرات در فولیکول‌های بدبوی شامل چروکیدگی و پیکوزه شدن هسته اووسیت، حبابی شدن اووپلاسم آنها و در برخی موارد بروز آنتروم پیش‌رس بود. در هر صورت بسیاری از فولیکول‌های بدبوی دچار تغییرات تحلیلی شدنند (تصویر شماره ۲).



تصویر شماره ۱: تخدمان گروه کنترل. (الف) فولیکول‌های بدبوی به صورت خوش‌های و تجمع یافته. فلش‌های سیاه رنگ نمونه‌ای از این فولیکول‌های بدبوی را نشان می‌دهند (رنگ آمیزی H&E، درشت‌نمایی  $400\times$ ). (ب) فولیکول اولیه چندلایه‌ای (رنگ آمیزی H&E، درشت‌نمایی  $400\times$ ). (ج) فولیکول ثانویه (رنگ آمیزی H&E، درشت‌نمایی  $400\times$ ). (د) بخش مرکزی تخدمان. فلش‌های سیاه رنگ عروق خونی طبیعی را نشان می‌دهند (رنگ آمیزی H&E، درشت‌نمایی  $400\times$ ).

میانی باز شده و تخدمان‌ها به طور کامل برداشت شدند. نمونه‌های تهیه شده بلا فاصله در داخل ماده ثابت گشته فرمولین بافی ۱۰ درصد به مدت یک هفته ثبیت شدند. تمامی نمونه‌ها پس از اصلاح، با روش‌های معمول بافت‌شناسی پاساز داده شده و بلوک‌های پارافینی از آن‌ها تهیه گردید. پس از برش‌های ممتدا ۷ میکرومتری، با روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین - اوزین رنگ آمیزی شده و به وسیله میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند. پس از تهیه لام‌ها، مطالعات هیستومورفولوژیکی توسط میکروسکوپ نوری انجام گرفت. در تمامی گروه‌ها انواع فولیکول‌های تخدمانی سالم و آتریک به طور جداگانه شمارش و ثبت شدند.

در بخش هیستومورفولوژیکی تمامی نمونه‌های حیوانات در گروه‌های آزمایشی و کنترل ابتدا زیر میکروسکوپ نوری بسته به نوع و حساسیت مطالعه با درشت‌نمایی‌های مختلف مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفتند. این بررسی‌ها شامل ساختار تخدمان در برگیرنده بافت پوششی، سفید پرده تخدمانی، انواع فولیکول‌های موجود در بخش قشری تخدمان شامل فولیکول‌های بدبوی، فولیکول‌های اولیه، ثانویه، ثالث و گراف در دو رده سالم و آتریک و اجسام زرد (شامل فعال و غیر فعال)، مورد بررسی کامل قرار گرفتند.

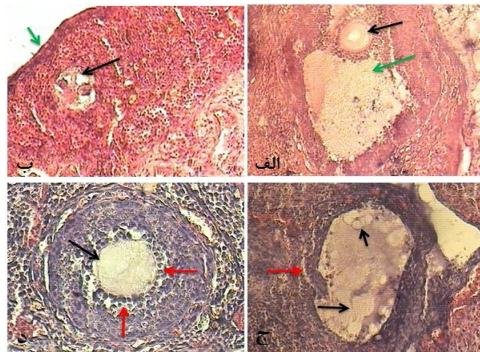
### تجزیه و تحلیل آماری

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸ مورد ارزیابی قرار گرفتند. جهت مقایسه بین گروه‌ها، تست‌های آماری ANOVA و آزمون تعقیبی دانکن انجام شد. سطح معنی‌داری  $p < 0.05$  در نظر گرفته شد. از نرم‌افزار Excel جهت ترسیم نمودارها استفاده گردید.

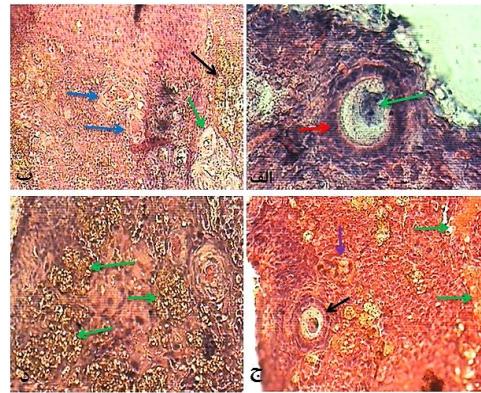
### یافته‌ها

مشاهدات هیستومورفولوژیک تخدمان در گروه کنترل نتایج حاصل از این بررسی مشخص کرد که در اکثریت موارد تخدمان‌ها دارای

و بدون تاثیر بومادران (*Achillea millefolium*) بودند، جمعیت اجسام زرد فوق العاده پایین بود و آن‌هایی که مشاهده می‌شدند، در حال تحلیل بودند. عکس آن نیز صادق بود. به صورتی که در گروه‌های آزمایشی که دوزهای پایینی از آترازین را دریافت کرده و یا هماره با بومادران درمان شده بودند، تعداد اجسام زرد فعال بیش تر بود. برخی از فولیکول‌های درحال رشد اولیه و ثانویه، حالت های پرتروفی را در لایه گرانولوزا و لایه تکی گروه آزمایشی یک به وضوح نشان دادند. برخی از فولیکول‌های در حال رشد اووسیت خود را از دست داده و حفره آنتروم‌شان بسیار بزرگ شده بود. لایه گرانولوزا به شدت نازک شده و مایع انبوهی در حفره آنتروم آن‌ها انباشته شده بود. این فولیکول‌ها به عنوان فولیکول‌های سیستیک مشاهده شدند (تصویر شماره ۳).



تصویر شماره ۳: الف. گروه آزمایشی ۵ (T5). یک فولیکول ثالث در حال تحلیل مشاهده می‌گردد. فلاش سیاه اووسیت و فلاش سبز حفره آنتروم را نشان می‌دهد. انبوهی از سلول‌های فولیکولی در حال پیکنوزه دیده می‌شود. برخی از سلول‌های گرانولوزای پیکنوزه شده در حفره آنتروم شناور هستند (رنگ آمیزی H&E، درشت‌نمایی ۴۰ $\times$ ). ب. گروه آزمایشی ۸ (T8). فلاش سیاه یک فولیکول حاوی دو اووسیت را نشان می‌دهد که در حال تحلیل است. فلاش‌های سیاه بافت همبند سست تاچیه کورتکس را نشان می‌دهد. فلاش سبز رنگ بافت پوششی سطح تخدمان را نشان می‌دهد (رنگ آمیزی H&E، درشت‌نمایی ۴۰ $\times$ ). ج. گروه آزمایشی ۱ (T1). یک فولیکول ثالث در مرحله پیشرفت‌های آترزی دیده می‌شود. فلاش‌های سیاه رنگ جباب‌های اتساع یافته موجود در آنتروم را نشان می‌نمایند. فلاش قرمز رنگ تاچیه یک این فولیکول را مشخص می‌کند (رنگ آمیزی H&E، درشت‌نمایی ۴۰ $\times$ ). د. گروه آزمایشی ۶ (T6). یک فولیکول اولیه چندلایه‌ای مشاهده می‌گردد. فلاش قرمز رنگ اووسیت پر از حفره‌های اووسیت را نشان می‌دهد. در اطراف فولیکول، عروق خونی بسیار مشاهده می‌گردد (رنگ آمیزی H&E، درشت‌نمایی ۱۶۰ $\times$ ).



تصویر شماره ۲: الف. گروه آزمایشی ۴ (T4). یک فولیکول یک لایه‌ای سالم دیده می‌شود. هسته اووسیت توسط فلاش سبز رنگ نشان داده شده است (رنگ آمیزی H&E، درشت‌نمایی ۴۰ $\times$ ). ب. گروه آزمایشی ۲ (T2). فلاش سیاه رنگ تاچیه‌ای از کورتکس را نشان می‌دهد که تعداد زیادی از فولیکول‌های بدوى در آن تحلیل یافته‌اند. فلاش سبز رنگ فولیکول بدوى را نشان می‌دهد که در آن تغییرات تحلیلی شروع شده است. فلاش‌های آبی عروق خونی اتساعی یافته را در کورتکس نشان می‌دهند (رنگ آمیزی H&E، درشت‌نمایی ۱۶۰ $\times$ ). ج. گروه آزمایشی ۱ (T1). بخشی از کورتکس پر عروق تخدمان که عروق پر خون متسع در آن توسط فلاش سبز رنگ نشان داده شده‌اند. فلاش سیاه رنگ یک فولیکول اولیه تک‌لایه‌ای را که در آن تغییرات تحلیلی اووسیت شروع شده است، نشان می‌دهد. فلاش آبی رنگ یک فولیکول بدوى در حال تحلیل را نشان می‌دهد (رنگ آمیزی H&E، درشت‌نمایی ۱۶۰ $\times$ ). د. گروه آزمایشی ۷ (T7). بخشی از کورتکس تخدمان که فلاش‌های سبز رنگ فولیکول‌های بدوى در حال تحلیل را نشان می‌دهند (رنگ آمیزی H&E، درشت‌نمایی ۴۰ $\times$ ).

از نظر بافت‌شناسی، اختلاف قابل توجهی در بخش میانی (مدولا) تخدمان‌ها در بین گروه‌های آزمایشی و کنترل مشاهده نگردید، اما در برخی از گروه‌های آزمایشی که سم بیش تری دریافت کرده بودند، مقداری پرخونی و آثاری از ادم در هر دو بخش میانی و قشری تخدمان مشاهده شد. اجمام زرد در تخدمان‌های گروه کنترل و در تمامی گروه‌های آزمایشی مشاهده شدند که در مراحل متفاوتی بودند. به این معنی که برخی از آن‌ها در ابتدای تشکیل بودند و برخی حالت فعال داشتند و تعدادی هم در حال تحلیل بودند. اجسام زردی که در حال تشکیل و فعالیت بودند، دارای نو رگرسانی خوبی بودند، اما در مورد اجسام در حال تحلیل رگرسانی کاهش پیدا کرد. در گروه‌های آزمایشی که آترازین را با دوز بالا دریافت کرده بودند

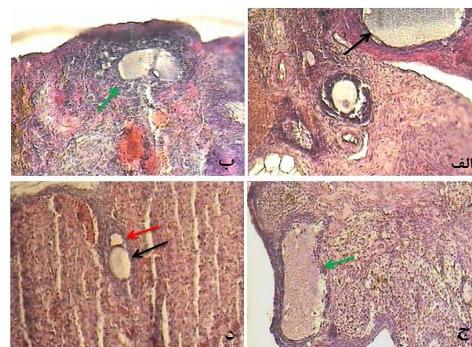
رنگ یک فولیکول بدبوی در حال تغییر تحلیلی را نشان می‌دهند (رنگ آمیزی H&E، درشت‌نمایی  $160\times$ ). ج. گروه آزمایشی 1 (T1). فلش‌های آبی بخشی از کورتکس تخدمان را که در آن تغییرات تحلیلی شدید فولیکول‌های بدبوی دیده می‌شود، نشان می‌دهد (رنگ آمیزی H&E، درشت‌نمایی  $40\times$ ). د. گروه آزمایشی 3 (T3). فلش سبز رنگ یک فولیکول ثانویه را که در آن اوسویت در حال تحلیل می‌باشد، نشان می‌دهد (رنگ آمیزی H&E، درشت‌نمایی  $160\times$ ).

#### مطالعات هیستومورفولوژیکی فولیکول‌ها

تمامی فولیکول‌های سالم اعم از فولیکول‌های بدبوی، اولیه، ثانویه و ثالث در گروه آزمایشی 1 و 2 کاهش معنی‌داری ( $p<0.05$ ) در مقایسه با گروه کنترل نشان دادند، در حالی که جمعیت فولیکول‌های آتریک در تمامی گروه‌ها افزایش نشان داد، با توجه به این که شدت آن در گروه 2 نسبتاً کم‌تر بود. در گروه آزمایشی 3، کاهش نسبی قابل ملاحظه‌ای در جمعیت فولیکول‌های آتریک در تمامی رده‌های فولیکولی به خصوص در فولیکول‌های بدبوی مشاهده شد (جدول شماره 1). در گروه آزمایشی 4، کاهش قابل ملاحظه و در گروه آزمایشی 5، کاهش نسبی در آترزی فولیکول‌های تخدمانی دیده شد، در حالی که در گروه آزمایشی 6، کاهش قابل ملاحظه‌ای در آترزی فولیکولی دیده نشد (جدول شماره 1).

ویتامین E نیز باعث کاهش نسبی (نه مطلق) آترزی فولیکول‌های تخدمانی در گروه‌های آزمایشی 7 و 8 شد. الگوی اثر ممانعتی ویتامین E تقریباً مشابه الگوی ممانعتی عصاره گیاه بومادران بود (جدول شماره 1). آنالیز آماری هیچ تفاوت معنی‌داری در پارامترهای مطالعه شده (جمعیت فولیکول‌های بدبوی، اولیه، ثانویه و

گروه‌هایی که سم بیشتری را دریافت کرده بودند، پرخونی بسیاری را در بخش‌های قشری و میانی تخدمان نشان دادند. تفاوت‌های قابل تفسیر در هیستومورفولوژی گروه آزمایشی 2 در مقایسه با گروه کنترل، همانند گروه آزمایشی 1 بوده و تمام علائم مذکور به همان صورت مشاهده شد. در گروه‌های آزمایشی که به همراه سم از عصاره، اسانس و ویتامین E جهت مقابله با اثرات سوء سم آترازین استفاده شده بود، تفاوت‌های هیستومورفولوژیکی بسیار زیادی با گروه‌های آزمایشی 1 و 2 (گروه‌هایی که سم آترازین را به میزان  $300\text{ mg/kg.bw}$  و 150 دریافت کرده بودند) مشاهده نشد، اما به نظر می‌رسید شدت تغییرات تحلیلی در گروه‌هایی که همراه با سم آترازین عصاره گیاه بومادران را دریافت کرده بودند، کم‌تر بود (تصویر شماره 4).



تصویر شماره 4: الف. گروه آزمایشی 2 (T2). یک فولیکول ثالث در حال آترزی شدید دیده می‌شود. فلش سبز توده‌ای از سلول‌های گرانولوزای در حال تحلیل و هسته پیکنوze آنها را نشان می‌دهد. فلش سیاه رنگ حفره وسیع آتروم این فولیکول را نشان می‌دهد که سلول‌های تحلیل رفته گرانولوزایی به طور انبو در آن شناورند (رنگ آمیزی H&E، درشت‌نمایی  $40\times$ ). ب. گروه آزمایشی 6 (T6). فلش سبز بخشی از کورتکس تخدمان را نشان می‌دهد که در آن یک فولیکول تکلایه‌ای با حفره آتروم پیش‌رس وجود دارد. فلش قرمز رنگ سلول‌های فولیکولی مکعبی شکل و فلش سیاه

جدول شماره 1: مقایسه آماری انواع فولیکول در گروه کنترل با گروه‌های آزمایشی (Mean $\pm$ SE).

نوع فولکول		فولکول بدوی سالم		فولکول بدوی آتریک		فولکول بدوی آمریشی		
فولکول	فولکول ثالث	فولکول	فولکول	فولکول	فولکول	فولکول	فولکول	
سیستیک	آتریک	سالم	آنالوگ	آتریک	سالم	آتریک	سالم	
0	3/8±0/25***	3/8±0/8***	34±8/2***	48±4/8***	142±5/6***	188±2/5***	48±3/8*	250±3/2***
0	0/66±0/04	0/25±0/02	3/5±0/94	0/5±0/23	12/33±0/94	1/87±0/96	40/167±5/73	6/83±2/95
0	3/8±0/25**	3/8±0/8**	34±8/2**	48±4/8**	142±5/6**	188±2/5**	48±3/8*	250±3/2**
0/3±0/2**	1/37±0/48	0/4±0/2	4/3±0/5	0/6±0/2	17/77±4/11	3/2±0/44	41/6±6/83	18/7±6/83
0	3/8±0/25**	3/8±0/8*	34±8/2***	48±4/8***	142±5/6***	188±2/5***	48±3/8	250±3/2***
0	0	2±0/5	3±0/001	6±0/001	3±2/01	4±0/001	65±15/15**	45±15/15
0	3/8±0/25**	3/8±0/8**	34±8/2***	48±4/8***	142±5/6***	188±2/5***	48±3/8*	250±3/2**
0/16±0/02**	1/66±0/49	0/75±0/35	3/33±0/61	1/83±0/3	11±4/9	5/3±1/5	34/16±8/23	37/33±14/9
0	3/8±0/25**	3/8±0/8***	34±8/2***	48±4/8***	142±5/6***	188±2/5***	48±3/8	250±3/2***
0/5±0/1*	2±0/8	1/5±0/3	5/5±2/0	4±1/0	10±3/0	6/5±3/0	80±20/2**	50±10/0
0	3/8±0/25**	3/8±0/8**	34±8/2***	48±4/8***	142±5/6***	188±2/5***	48±3/8	250±3/2***
0/16±0/02*	2/16±0/4	2/25±0/38	10/75±2/17	0/75±0/3	20/33±3/77	6/33±1/44	42/83±3/69	11/5±1/61
0	3/8±0/25**	3/8±0/8**	34±8/2***	48±4/8***	142±5/6***	188±2/5***	48±3/8*	250±3/2***
0	0/25±0/02	0	3/75±1/1	1/0±0/4	10/33±5/5	0/5±0/2	27/5±6/2	45±6/4
0	3/8±0/25***	3/8±0/8***	34±8/2***	48±4/8***	142±5/6***	188±2/5***	48±3/8	250±3/2***
0	0/12±0/02	0/12±0/02	4/25±1/3	1/5±0/4	12/25±5/1	2/6±0/53	51/25±9/32	24/75±4/72

در هر ردیف گروههای آزمایشی با گروه کنترل مقایسه آماری شده است. ( $p < 0.001$ ) = \*\*\*. ( $p < 0.01$ ) = \*\*. ( $p < 0.05$ ) = \*

**جدول شماره 2:** مقایسه انواع فولیکول‌های آتريک در بین گروه‌های آزمایشی (Mean  $\pm$  SE).

گروههای آزمایشی		انواع فوبیکول آنریک		
فولیکول ثالث	فولیکول ثانویه	فولیکول اولیه	فولیکول پدری	
0/2 ± 0/13	0/4 ± 0/16	2/6 ± 0/8	7/9 ± 2/23	1
0/4 ± 0/22	0/6 ± 0/22	3/2 ± 0/44	18/7 ± 6/2	2
1/5 ± 0/42	~ 3/9 ± 0/86	4/00 ± 0/001	~ 45/00 ± 5/00	3
0/7 ± 0/3	~ 1/7 ± 0/21	5/9 ± 1/2	~ 41/6 ± 11/6	4
~ 1/1 ± 0/23	~ 3/3 ± 0/55	~ 6/5 ± 1/16	~ 5/00 ± 3/3	6
~ 1/3 ± 3/6	0/9 ± 0/27	~ 7/5 ± 1/36	11/3 ± 1/2	7
0/0/00	0/6 ± 0/23	~ 0/5 ± 0/16	~ 45/00 ± 4/00	8
0/2 ± 0/13	~ 1/8 ± 0/46	2/7 ± 0/44	~ 29/3 ± 3/8	
0/4 ± 0/22	0/6 ± 0/22	3/2 ± 0/44	18/7 ± 6/2	2
1/5 ± 0/42	~ 3/9 ± 0/86	4/00 ± 0/001	~ 45/00 ± 5/00	3
0/7 ± 0/3	~ 1/7 ± 0/21	5/9 ± 1/2	~ 41/6 ± 11/6	4
1/1 ± 0/23	~ 3/3 ± 0/55	~ 6/5 ± 1/16	~ 5/00 ± 3/3	5
~ 1/3 ± 3/6	0/9 ± 0/27	~ 7/5 ± 1/36	11/3 ± 1/2	6
0/0/00	0/6 ± 0/23	~ 0/5 ± 0/16	~ 45/00 ± 4/00	7
0/2 ± 0/13	~ 1/8 ± 0/46	2/7 ± 0/44	~ 29/3 ± 3/85	8
1/5 ± 0/42	3/9 ± 0/86	4/00 ± 0/001	45/00 ± 5/00	
0/7 ± 0/3	1/7 ± 0/21	5/9 ± 1/2	41/6 ± 11/6	3
1/1 ± 0/23	3/3 ± 0/55	6/5 ± 1/16	5/000 ± 3/3	4
1/3 ± 3/6	0/9 ± 0/27	7/5 ± 1/36	11/3 ± 1/2	6
0/0/00	0/9 ± 0/23	~ 0/5 ± 0/16	45/00 ± 4/00	7
~ 0/2 ± 0/13	1/8 ± 0/46	~ 2/7 ± 0/44	~ 29/3 ± 3/85	8
0/7 ± 0/3	1/7 ± 0/21	5/9 ± 1/2	41/6 ± 11/6	4
1/1 ± 0/23	~ 3/3 ± 0/55	6/5 ± 1/16	5/000 ± 3/3	5
1/3 ± 3/6	0/9 ± 0/27	7/5 ± 1/36	11/3 ± 1/2	6
0/0/00	0/6 ± 0/23	~ 0/5 ± 0/16	45/00 ± 4/00	7
0/2 ± 0/13	1/8 ± 0/46	2/7 ± 0/44	~ 29/3 ± 3/85	8
1/1 ± 0/23	3/3 ± 0/55	6/5 ± 1/16	5/000 ± 3/3	5
1/3 ± 3/6	~ 0/9 ± 0/27	7/5 ± 1/36	~ 11/3 ± 1/2	6
0/0/00	~ 0/9 ± 0/23	~ 0/5 ± 0/16	~ 45/00 ± 4/00	7
~ 0/2 ± 0/13	~ 1/8 ± 0/46	~ 2/7 ± 0/44	~ 29/3 ± 3/85	8
1/3 ± 3/6	0/9 ± 0/27	7/5 ± 1/36	11/3 ± 1/2	6
~ 0/0/00	0/6 ± 0/23	0/5 ± 0/16	~ 45/00 ± 4/00	7
0/2 ± 0/13	1/8 ± 0/46	2/7 ± 0/44	~ 29/3 ± 3/85	8
0/2 ± 0/13	0/0/00	0/5 ± 0/16	~ 45/00 ± 4/00	

# در هر ردیف فولیکول های آترتیک یک گروه آزمایشی با بقیه گروه های آزمایش مقابله شده است.

ثالث) بین دو گروه آزمایشی 1 و 2 نشان نداد ( $p > 0/05$ )، در حالی که تفاوت قابل ملاحظه‌ای در جمعیت فولیکول‌های بدبوی و ثانویه بین گروه‌های آزمایشی 1 و 3 مشاهده گردید. همین وضعیت بین گروه آزمایشی 1 و 4 هم وجود داشت. تفاوت بسیار معنی‌داری ( $p < 0/001$ ) بین گروه آزمایشی 1 و 5 در جمعیت فولیکول‌های بدبوی با ثانویه و جمعیت فولیکول‌های اولیه با ثالث مشاهده شد. بین گروه آزمایشی 1 و 6 در جمعیت فولیکول‌های اولیه، تفاوت بسیار معنی‌دار ( $p < 0/001$ ) و در مورد فولیکول‌های ثالث تفاوت قابل ملاحظه‌ای ( $p < 0/01$ ) دیده شد. بین گروه آزمایشی 1 و 7 نیز تفاوت بسیار معنی‌داری ( $p < 0/001$ ) در جمعیت فولیکول‌های بدبوی و تفاوت قابل ملاحظه‌ای ( $p < 0/01$ ) در جمعیت فولیکول‌های ثانویه مشاهده گردید. بین گروه‌های 1 و 8 تفاوت بسیار معنی‌داری ( $p < 0/01$ ) در جمعیت فولیکول‌های بدبوی و تفاوت قابل ملاحظه‌ای ( $p < 0/01$ ) در جمعیت فولیکول‌های ثانویه دیده شد (جدول شماره ۱).

بین گروههای ۲ و ۳ و همچنین ۲ و ۴ تفاوت قابل ملاحظه‌ای ( $p < 0.01$ ) در جمعیت فولیکول‌های بدبوی و تفاوت بسیار معنی‌داری ( $p < 0.001$ ) در فولیکول‌های ثانویه مشاهده شد. گروههای ۲ و ۵ تفاوت بسیار معنی‌داری ( $p < 0.001$ ) را در جمعیت فولیکول‌های بدبوی با ثانویه و تفاوت معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) در جمعیت فلکولهای، او له نشان دادند.

فولیکول‌های اولیه، ثانویه و ثالث مشاهده گردید. تفاوت بسیار معنی‌داری ( $p<0.001$ ) در جمعیت فولیکول‌های بدبوی، اولیه و ثالث و تفاوت معنی‌داری ( $p<0.05$ ) در جمعیت فولیکول‌های ثانویه در بین گروه‌های ۵ و ۸ نیز مشاهده گردید (جدول شماره ۲).

آنالیز آماری گروه‌های ۶ و ۷ گویای تفاوت بسیار معنی‌داری ( $p<0.001$ ) در جمعیت فولیکول‌های بدبوی، اولیه و ثالث بود. بین گروه‌های ۶ و ۸ تفاوت بسیار معنی‌داری ( $p<0.001$ ) در جمعیت فولیکول‌های بدبوی و اولیه و تفاوت معنی‌داری ( $p<0.05$ ) در جمعیت فولیکول‌های ثالث مشاهده گردید (جدول شماره ۲). در بین گروه‌های ۷ و ۸ تفاوت قابل ملاحظه‌ای ( $p<0.01$ ) در جمعیت فولیکول‌های بدبوی و تفاوت بسیار معنی‌داری ( $p<0.001$ ) در جمعیت فولیکول‌های اولیه و تفاوت معنی‌داری ( $p<0.05$ ) در جمعیت فولیکول‌های ثالث مشاهده شد (جدول شماره ۲).

## بحث

یکی از مشکلات امروز جوامع بشری استفاده از مواد شیمیایی و علف‌کش‌ها در چرخه تولید موادغذایی می‌باشد که باعث اثرات جبران‌ناپذیری در بیولوژی حیوان و متعاقب آن انسان می‌شوند. علف‌کش آترازین با این که اثر کشنده‌گی کم تری دارد(22)، ولی بر اساس مطالعات محدود قبلی(8,5)، اثرات منفی بیولوژیکی به ویژه بر تولید سلول‌های جنسی ماده دارد و بخش قابل توجهی از این موارد در این مطالعه مشخص شدند که در ادامه به آن‌ها به طور مفصل خواهیم پرداخت. بر اساس یافته‌های این تحقیق، علف‌کش آترازین توانسته است آثار مخربی بر ساختار بافت‌شناسی کلی تخدمان به خصوص ساختار انواع فولیکول‌های در حال رشد تخدمانی شامل فولیکول‌های بدبوی، اولیه، ثانویه و ثالث بگذارد. تغییرات تحلیلی (آترنیک) در انواع فولیکول‌ها به دنبال اثرات این ماده متفاوت بود، به طوری که برخی از فولیکول‌های در حال رشد اولیه و ثانویه دچار

تفاوت قابل ملاحظه‌ای ( $p<0.01$ ) در جمعیت فولیکول‌های اولیه و تفاوت معنی‌داری ( $p<0.05$ ) در جمعیت فولیکول‌های ثالث بین گروه‌های ۲ و ۶ دیده شد. گروه‌های ۲ و ۷ نیز تفاوت بسیار معنی‌داری ( $p<0.001$ ) در جمعیت فولیکول‌های بدبوی، اولیه و ثالث داشتند. آنالیز آماری بین گروه‌های ۲ و ۸ تفاوت قابل ملاحظه‌ای ( $p<0.01$ ) را در جمعیت فولیکول ثانویه نشان داد (جدول شماره ۲). تفاوت معنی‌داری ( $p<0.05$ ) در جمعیت فولیکول‌های ثانویه گروه‌های ۳ و ۴ دیده شد. در حالی که بین گروه‌های ۳ و ۵ هیچ تفاوتی در پارامترهای مورد مطالعه مشاهده نشد.

گروه‌های ۳ و ۶ تفاوت بسیار معنی‌داری ( $p<0.001$ ) در جمعیت فولیکول‌های بدبوی، تفاوت معنی‌داری ( $p<0.05$ ) در جمعیت فولیکول‌های اولیه و تفاوت قابل ملاحظه‌ای ( $p<0.01$ ) در جمعیت فولیکول‌های ثانویه داشتند. بین گروه‌های ۳ و ۷ نیز تفاوت بسیار معنی‌داری ( $p<0.001$ ) در جمعیت فولیکول‌های اولیه، ثانویه و ثالث دیده شد. هم‌چنین گروه‌های ۳ و ۸ تفاوت معنی‌داری ( $p<0.05$ ) در جمعیت فولیکول‌های بدبوی و تفاوت قابل ملاحظه‌ای ( $p<0.01$ ) در جمعیت فولیکول‌های اولیه داشتند (جدول شماره ۲). تفاوت معنی‌داری ( $p<0.05$ ) در جمعیت فولیکول‌های ثانویه بین گروه‌های ۴ و ۵ دیده شد. در گروه‌های ۴ با ۶ و ۸ نیز تفاوت معنی‌داری ( $p<0.05$ ) در جمعیت فولیکول‌های اولیه مشاهده شد. بین گروه‌های ۴ و ۷ تفاوت بسیار معنی‌داری ( $p<0.001$ ) در فولیکول‌های اولیه و ثانویه و تفاوت معنی‌داری ( $p<0.05$ ) در جمعیت فولیکول‌های ثالث مشاهده گردید (جدول شماره ۲).

گروه‌های ۵ و ۶ گویای تفاوت بسیار چشمگیر و معنی‌دار ( $p<0.001$ ) در جمعیت فولیکول‌های بدبوی و ثانویه بودند. بین گروه‌های ۵ و ۷ نیز تفاوت قابل ملاحظه‌ای ( $p<0.01$ ) در جمعیت فولیکول‌های بدبوی و تفاوت بسیار معنی‌داری ( $p<0.001$ ) در جمعیت

از این مراحل و روندها شامل روندهای خارج تخدمانی مثل هیپوتalamوس و هیپوفیز و یا روندهای داخل تخدمانی تداخل ایجاد کند، موجب اختلال در تولید، رشد و بلوغ سلول‌های جنسی خواهد شد. براساس گزارشی، آترازین مسیر هیپوتalamوسی - هیپوفیزی را در مغز تحت تاثیر قرار می‌دهد، اما این تاثیر در سطح تولید گنادوتروپین‌ها در غده هیپوفیز دیده نمی‌شود(31).

در مطالعه‌ای نیز نشان داده شده است که تغییر در محور هیپوتalamوسی - هیپوفیزی بر اثر سم آترازین، بر هورمون‌های جنسی اثر گذاشته و باعث ایجاد تغییرات بافی در تخدمان و القای آترزی فولیکولی می‌شود. در ماهی‌ها این سم بر روند تخمک گذاری و تخمریزی نیز تاثیر بسیاری را نشان داده است(32). براساس این مطالعات، کاهش جمعیت فولیکول‌های سالم در گروه‌های آزمایشی 1 و 2 در تحقیق ما نیز می‌تواند با تغییرات محور هیپوتalamوسی - هیپوفیزی - گنادی مرتبط باشد. آترازین باعث اختلال کنترلی هیپوتalamوس بر هیپوفیز و متعاقباً هیپوفیز بر روی گنادها می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند که آترازین باعث اختلال CNS می‌شود(33). مواد شیمیایی که دارای پتانسیل اختلال عملکرد آندوکرینی هستند، بیشتر آنزیم‌های مسیرهای بیوستتر استروئید را مورد هدف خود قرار می‌دهند. تداخلات مختلف با بیوستتر هورمون‌های استروئیدی موجب اختلال و کاهش در تولیدمثل، تغییرات در تمایزات جنسی و رشد شده و توسعه برخی سرطان‌ها را باعث می‌گردند(34). در سنتز استروئیدها، آنزیم‌هایی مانند ردوكستاز (Reductase)، استروئید دهیدروژناز و آروماتاز نقش دارند(35). به ویژه P450 آروماتاز که آندروژن‌ها را به استروژن تبدیل می‌کند. اگر آترازین وارد عمل شود، با تاثیر روی این آنزیم موجب عدم تبدیل آندروژن به استروژن شده و به دنبال آن نرینگی در جنس ماده بروز می‌کند(36). هم‌چنین بر اساس یک بررسی مشخص شده است که آترازین

هیپرتروفی در لایه گرانولوزا و لایه تیکی شده بودند. در عین حال برخی از این فولیکول‌ها با خصوصیات فوق‌الذکر حتی اووسیت خود را نیز از دست داده بودند و آن‌تروم آن‌ها به شدت وسیع شده و در مواردی به فولیکول‌های سیستیک تبدیل شده بودند. در این خصوص مطالعات نشان داده‌اند که مختلط کننده‌های آندوکرینی مثل آترازین زمانی که در مقدار پایین 21 mg/kg.bw/day) از روز 14 آبستنی تا روز 21 بعد از تولد استفاده شوند، موجب تغییرات چندگانه در الگوی نوروژنراتیو در برخی نقاط مغز موش می‌شوند(27). آترازین تاثیرات منفی بر عملکردهای غدد درون ریز در مهره‌داران نیز دارد(28). به نظر می‌رسد اثرات نوروتوکسیک آترازین به احتمال زیاد مرتبط با الگوی ظاهر دی‌مورفیک تحت گونه‌های به خصوص از سوماتوستاتین باشد، اما بیشتر اثرات روی مناطق هیپوتalamیکی و خارج هیپوتalamیکی موش است. هر عاملی که محور هیپوتalamوسی - هیپوفیزی - گنادی را مختلط کند، موجب به هم‌ریختگی در عملکرد این محور شده و در نهایت منجر به اختلال در تولید سلول‌های جنسی خواهد شد. لازم به ذکر است در تخدمان علاوه بر هورمون‌های معروف استروئیدی (استروژن و پروژسترون)، هورمون‌ها و فاکتورهای دیگری همانند فلوستاتین (Folestatin)، اینهیبن (Inhibin) و اکتیوین (Activin) نیز تولید می‌شوند که به عنوان عوامل درون تخدمانی شناخته شده‌اند(29). هر فولیکول تخدمانی اختصاصات سلولی مشخصی را نشان می‌دهد که در ارتباط با مرحله رشدی آن است. زمانی که فولیکول اولیه دارای چهار لایه از سلول‌های گرانولوزا است، هنوز گیرنده‌هایی برای هورمون FSH ندارد، ولی از این زمان به بعد گیرنده‌های مذکور در سطح سلول‌های فولیکولی ظاهر می‌شوند. زمانی که یک فولیکول در حال رشد از این مرحله عبور می‌کند، بقاء و تکامل آن وابسته به عوامل بیرون تخدمانی (هورمون‌های هیپوفیزی) خواهد بود(30). اگر سم آترازین در هر کدام

در معرض آترازین قرار گرفته بودند، همسو با میزان دریافت ماده فوق الذکر و وابسته به دوز بود. بیان شده است که مرگ برنامه ریزی شده سلول‌های گرانولوزا که حمایت هورمونی را برای اوپوسیت‌ها فراهم می‌کنند، مکانیسم طبیعی است که توسط آن آترزی فولیکول‌های تخدمانی در پستانداران، پرندگان<sup>(46)</sup> و احتمالاً ماهی‌ها<sup>(47)</sup> اتفاق می‌افتد. مطالعه‌ای نشان داده است که آترازین با تغییر پروتئین‌های شوک حرارتی مثل HSP90 در موش صحرایی می‌تواند باعث القای اختلال در فولیکول‌ژنر شده و از آن طریق بر آترزی فولیکولی تاثیر گذارد<sup>(8)</sup>. شاید بتوان این طور نتیجه‌گیری کرد که آترازین می‌تواند با تاثیر بر فرآیندهای آغازی و تنظیم کننده آترزی بر اوژن‌ز تخدمان تاثیر گذاشته و موقفيت تولید مثلی را کاهش دهد. علاوه بر این هر چند در مورد مکانیسم عمل آترازین اطلاعات چندانی موجود نیست، اما Jin و همکارانش<sup>(48)</sup> نشان دادند که این ماده سبب ایجاد استرس اکسیداتیو در کبد و تخدمان می‌شود و غلظت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت را تغییر می‌دهد، که این عامل خود می‌تواند سر آغاز مرگ سلولی و تخریب عملکرد آن باشد.

هر چند فولیکول‌های آتریک شاخص مهم تاثیرات محیطی بر روی تخدمان هستند، مکانیسم‌هایی که این فرآیند را آغاز و تنظیم می‌کنند هنوز به طور کامل شناخته نشده‌اند و ارائه اطلاعات در این زمینه نیاز به مطالعات بیشتری دارد<sup>(41)</sup>.

گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) در طیف وسیعی از عملکردهای فیزیولوژیکی باروری از قبیل بلوغ تحملک، استروئیدوژن تخدمان، تحملک گذاری، لانه‌گزینی، تشکیل بلاستوسیت و عملکرد جسم زرد شرکت دارند<sup>(49)</sup>. در چند دهه اخیر استفاده از مواد موثره گیاهی به عنوان آنتی‌اکسیدانت و مقابله کننده با ROS و هم‌چنین رادیکال‌های آزاد مورد توجه قرار گرفته است. بومادران (*Achillea millefolium*) گیاهی است که از زمان‌های قدیم مورد توجه قرار گرفته و خاصیت

می‌تواند سبب تاخیر در بلوغ جنسی و تغییر در دوره جنسی موش صحرایی ماده شود<sup>(37)</sup>. چندین مطالعه در ماهی‌ها، دوزیستان، خزندگان و پستانداران نیز پیشنهاد می‌کنند که آترازین می‌تواند سیستم طبیعی درون ریز را تغییر دهد<sup>(38)</sup> و به تکوین گنادی طبیعی آسیب بزند<sup>(39)</sup>. هم‌چنین در مطالعه دیگر نشان داده شده است که این ماده می‌تواند غلظت هورمون‌های استروئیدی را در خون محیطی ماهی‌های در معرض قرار گرفته، تغییر دهد<sup>(40)</sup>.

آترزی فولیکولی یک فرآیند کنترل شده هورمونی و تحلیل کننده طبیعی است که برای توصیف شکست و دوباره جذب شدن گامت‌ها استفاده می‌شود. آترزی فولیکولی یک فرآیند تخریبی است که سبب می‌شود فولیکول‌های تخدمانی مهره‌داران یکپارچگی خود را از دست داده و پیش از تحملک گذاری حذف شوند<sup>(41)</sup>. هر چند این فرآیند به عنوان یک مکانیسم طبیعی و فیزیولوژیک تعریف می‌شود<sup>(42)</sup>، گزارش شده است که مکانیسم مهار آترزی ممکن است توسط عوامل مختلفی از جمله هیپوفیز برداری، واکنش نوری، فقر غذایی، استرس‌ها و آلودگی‌ها آغاز شود<sup>(43)</sup>.

مطالعه انجام شده در ماهی طلایی بالغ (*Carassius auratus*) القای به هم ریختگی ساختاری در بیضه و بالا رفتن سطح آترزی در تخدمان‌ها را بر اثر آترازین نشان داده است<sup>(40)</sup>. هم‌چنین کاهش تخم در تخدمان ماهی کپور نیز بر اثر سم آترازین ثابت شده است<sup>(44)</sup>. حضور چندین سیستم تخدمانی در جمعیت تحت تیمار در خوک‌هایی که مقدار کمی آترازین را دریافت کرده بودند نیز گزارش شده است<sup>(45)</sup>. هم‌چنین بر اساس نتایج حاصل از تحقیق ما، کاهشی در جمعیت تمامی رده‌های فولیکولی موجود در تخدمان‌ها و افزایش آترزی آن‌ها، بر اثر سم آترازین نشان داده شد که با نتایج حاصل از مطالعات قبلی، همخوانی دارد. در مطالعه حاضر، تغییرات تحلیلی چه در ساختار خود تخدمان و چه در ساختار فولیکول‌های تخدمانی در تمامی گروه‌هایی که

در نتیجه سم آترازین در حالت وابسته به دوز باعث کاهش در جمعیت تمامی انواع فولیکول‌های تخمدانی می‌شود. در صورتی که عصاره و اسانس گیاه بومادران و ویتامین E می‌توانند اثرات ضد آترزی بسیار خوبی از خود نشان دهند. اطلاعات بسیار کمی در مورد چگونگی تاثیر این مواد و نقاط تاثیر آن‌ها (هیپوفیز، هیپوتالاموس یا تخمدان) در دست است. تحقیقات آتی در این زمینه می‌توانند این نکات مهم را نیز آشکار سازند.

### سپاسگزاری

این تحقیق با کمک مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه ارومیه و با مساعدت‌های ریاست و معاونت پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه انجام گرفته است که از آن‌ها تقدیر می‌گردد. از اعضای آزمایشگاه بافت‌شناسی دانشکده نیز به خاطر مساعدت‌های تکنیکی تقدیر و تشکر می‌گردد.

### References

1. Bakhtiary Z, Shahrooz R, Hmadi A, Soltanalinejad F. Protective effects of crocin on testes of adult cyclophosphamide treated mice. Armaghan-e- Danesh. 2013; 19(1): 12-23.
2. Bakhtiary Z, Shahrooz R, Ahmadi A, Soltanalinejad F. Protective Effect of Crocin on DNA Damage of Sperm and in Vitro Fertilization (IVF) in Adult Male Mice Treated with Cyclophosphamide. J Mazandaran Univ Med Sci. 2014; 24(114): 49-59.
3. Naderi MR, Khaje pur MR. Application of for weed control of corn. 1<sup>st</sup> ed. Esfahan: University of Esfahan; 1997.
4. Akkoyunlu G, Erdogru T, Seval Y. Immunolocalization of glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) and its receptor

دارویی آن شناخته شده است (50). در این تحقیق دو فرم استخراجی آن یعنی اسانس و عصاره آبی مورد استفاده قرار گرفتند. ویتامین E نیز یک آنتی‌اکسیدان معروف و شناخته شده است. به همین خاطر این ویتامین نیز به عنوان اثباتگر استاندارد برای گیاه بومادران مورد استفاده قرار گرفت. نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان دادند که در درجه اول عصاره و سپس اسانس گیاه بومادران و ویتامین E بیشترین اثر منع تخریبی جمعیت‌های فولیکولی را دارند. هم‌چنین استفاده از عصاره گیاه بومادران، افزایش قابل ملاحظه‌ای در جمعیت انواع فولیکول‌های سالم نشان داد. با توجه به این که اثر مقابله‌ای عصاره آبی بومادران در مقابل آترازین بیشتر از اسانس آن ارزیابی شد، علت می‌تواند وجود عوامل مرکب در ترکیب عصاره باشد. ویتامین E نیز تا حدودی از تخریب فولیکول‌ها مخصوصاً فولیکول‌های بدوي جلوگیری کرده است.

از بین رفن ROS توسط خاصیت آنتی‌اکسیدانی ویتامین E (51) و گیاه بومادران می‌تواند دلیلی برای کاهش تعداد فولیکول‌های آتریک باشد (24).

5. Cooper RL1, Stoker TE, Tyrey L, Goldman JM, McElroy WK. Atrazine Disrupts the Hypothalamic Control of Pituitary-Ovarian Function. Toxicol Sci. 2000; 53(2): 297-307.
6. Laws SC, Ferrell JM, Stoker TE, Schmid J, Cooper RL. The Effects of Atrazine on Female Wistar Rats: An Evaluation of the Protocol for Assessing Pubertal Development and Thyroid Function. Toxicol Sci. 2000; 58(2): 366-376.
7. Goldman JM1, Davis LK, Murr AS, Cooper RL. Atrazine-induced elevation or attenuation of the LH surge in the ovariectomized, estrogen-primed female rat:

- role of adrenal progesterone. *Reproduction.* 2013; 146(4): 305-314.
8. Juliani CC, Silva-Zacarin ECM, Santos DC, Boer PA. Effects of atrazine on female Wistar rats: Morphological alterations in ovarian follicles and immunocytochemical labeling of 90 kDa heat shock protein. *Micron.* 2008; 39(5): 607-616.
  9. Grote K, Stahlschmidt B, Talsness CE, Gericke C, Appel KE, Chahoud I. Effects of organotin compounds on pubertal male rats. *Toxicol.* 2004; 202(3): 145-158.
  10. Agarwal A, Allamaneni SS. Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction. *Reprod Biomed Online.* 2001; 57(3): 442-448.
  11. Cohn BA, Wolff MS, Cirillo PM, Sholtz RI. DDT breast cancer in young women: new data on the significance of age at exposure. *Environ Health Perspect.* 2007; 115(10): 1406-1414.
  12. Caffarelli V, Correnti E, Gatti R, Musmeci G, Morali G, Spagnoli G, et al. Pesticides re-entry dermal exposure of workers in greenhouses. *Commun Agric Appl Biol Sci.* 2004; 69(4): 733-742.
  13. Shkolnik K, Tadmor A, Ben-Dor S, Nevo N, Galiani D, Dekel N. Reactive oxygen species are indispensable in ovulation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011; 108(4): 1462-1467.
  14. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol.* 2005; 3: 28.
  15. Guney M, Demirin H, Oral B, Ozguner M, Bayhan G, Altuntas I. Ovarian toxicity in rats caused by methidathion and ameliorating effect of vitamins E and C. *Hum Exp Toxicol.* 2007; 26(6): 491-498.
  16. Zadak Z, Hyspler R, Ticha A, Hronek M, Fikrova P, Rathouska J, et al. Antioxidants and vitamins in clinical conditions. *Physiol Res.* 2009; 58(suppl 1): S13-17.
  17. Combs GF. Vitamins In: Mahan LK, Escott-stump S. Krauses Food, Nutrition, and Diet therapy. 1<sup>st</sup> ed. Philadelphia: Saunders Company Press; 2000. P. 79-81.
  18. Ugurlap S, Bay Karabulut A, Mizrak B. Effects of pentoxifylline and vitamin E on the bilateral ovary after experimental ovarian ischemia. *Eur J Pediatr Surg.* 2005; 15(2): 107-113.
  19. Shalizar Jalali A, Hasanzadeh Sh, Malekinejad H. Beneficial effects of *Achillea millefolium* aqueos extract against cyclophosphamide-induced reproductive toxicity. *J Exp Integr Med.* 2013; 3(2): 113-119.
  20. Candan F, Unlu M, Tepe B, Daferera D, Polissiou M, Sokmen A, Akpulat HA. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). *J Ethnopharmacol.* 2003; 87(2-3): 215-220.
  21. Konyalioglu S, Karamenderes C. Screening of total flavonoid, phenol contents and antioxidant capacities of *Achillea* L. species growing in Turkey. *Acta Pharmaceutica Turcica.* 2004; 46: 163-170.
  22. Holloway AC, Anger DA, Crankshaw DJ, Wu M, Foster EG. Atrazine-induced changes in aromatase activity in estrogen sensitive target tissues. *J Appl Toxicol.* 2008; 28(3): 260-270.
  23. Worthing CR, Walker SB. The pesticide manual: a world compendium. 8<sup>th</sup> ed. Thoronton Health, Eng, British Crop Protection Council.1987.
  24. Asleiranifam N, Hasanzadeh Sh, Sam MR, Najafi Tazehkand GR. The Effects of Hydro-alcoholic Extract of *Achillea millefolium* on Sperm Parameters and Apoptotic Changes in Cyclophosphamide Treated Mice. *J*

- Mazandaran Univ Med Sci. 2015; 26(133): 77-90 (Persian).
25. Kumar R, Tripathi YC. Getting Fragrance from Plants. Forest Research Institute, Dehradun (Indian), 2011; p. 77-102.
26. Asleiranifam N, Hasanzadeh Sh, Sam MR, Najafi Tazehkand Gh R. The Effects of Hydro-alcoholic Extract of Achillea millefolium on Sperm Parameters and Apoptotic Changes in Cyclophosphamide Treated Mice. J Mazandaran Univ Med Sci. 2016; 26(133): 77-90 (Persian).
27. Giusi GR, Facciolo RM, Canonaco M, Alleva E, Belloni V, Dessi-Fulgheri F, Santucci D. The Endocrine Disruptor Atrazine Accounts for a Dimorphic Somatostatinergic Neuronal Expression Pattern in Mice. Toxicol Sci. 2006; 89(1): 257-264.
28. Cooper RL, Laws SC, Das PC, Narotsky MG, M.Goldman J, et al. Atrazine and reproductive function: mode and mechanism studies. Birth Defects Be Dev Reprod Toxicol. 2007; 80(2): 98-112.
29. Rey F, Gonzalez M, Zayas MA, Stoker C, Durando M, Luque EH, et al . Prenatal exposure to pesticides disrupts testicular histoarchitecture and alters testosterone levels in male. Gen Comp Endocrinol. 2009; 162(3): 286-292.
30. Shibayama H, Kotera T, Shinoda Y, Hanada T, Kajihara T, Ueda M, et al. Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity. Two- or four-week repeated-dose studies and fertility study of atrazine in female rats. J Toxicol Sci. 2009; 34(suppl 1): 147-155.
31. Oka T, Too O, Mitsui N, Miyahara M, Ohnishi Y, Takase M, et al. Effect of atrazine on metamorphosis and sexual differentiation in *Xenopus laevis*. Aquat Toxicol. 2008; 87(4): 215-226.
32. Wirbisky SE, Freeman JL. Atrazine Exposure and Reproductive Dysfunction through the Hypothalamus-Pituitary-Gonadal (HPG) Axis .Toxic. 2015; 3: 414-450.
33. Cooper RL, Stoker TE, Tyrey L, Goldman JM, McElroy WK. Atrazine Disrupts the Hypothalamic Control of Pituitary- Ovarian Function. Toxicol Sci. 2000; 53(2): 297-307.
34. Trentacoste SV, Friedmann AS, Youker RT, Breckenridge CB, Zirkin BR. Atrazine effects on testosterone levels and androgen-dependent reproductive organs in peripubertal male rats. J Androl. 2001; 22(1): 142-148.
35. Spano L, Tyler CR, Van Aerle R, Devos P, Mandiki SN, Silvestre F, et al . Effects of atrazine on sex steroid dynamics, plasma vitellogenin concentration and gonad development in adult goldfish (*Carassius auratus*). Aquat Toxicol . 2004; 66(4): 369-379.
36. Sanderson JT, Letcher RJ, Heneweer M, Giesy JP, Van den Berg M. Effects of chloro-s-triazine herbicides and metabolites on aromatase activity in various human cell lines and on vitellogenin production in male carp hepatocytes. Environ Health Perspect. 2001; 109(10): 1027-1031.
37. Laws SC, Ferrell JM, Stoker TE, Cooper R. The Effects of Atrazine on Female Wistar Rats: An Evaluation of the Protocol for Assessing Pubertal Development and Thyroid Function. Toxicol Sci. 2003; 76(1): 190-200.
38. Hayes TB, Collins A, Lee M, Mendoza M, Norigena N, Ali sturat A, et al. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. Proc Nati Acad Sci USA. 2002; 99(8): 5476-5480.
39. Tavera-Mendoza L, Ruby S, Brousseau P, Fournier M, Cyr D, Marcogliese D. Response of the amphibian tadpole *Xenopuslaevis* to

- atrazine during sexual differentiation of the ovary. Environ Toxicol Chem. 2002; 21(6): 1264-1267.
40. Spano L, Tyler CR, Aerle RV, Devos P, Mandiki SN, Silvestre F, Thome JP, et al. Effects of atrazine on sex steroid dynamics, plasmavitellogenin concentration and gonad development in adult goldfish (*Carassius auratus*). *Aqua Toxicol.* 2004; 66(4): 369-379.
41. Santos HB, Sato Y, Moro L, Bazzoli N, Rizzo E. Relationship among follicular apoptosis, integrin beta1 and collagen type IV during early ovarian regression in the teleost *Prochilodus argenteus* after induced spawning. *Cell Tissue Res.* 2008; 332(1): 159-170.
42. Wood AW, Van Der Kraak GJ. Apoptosis and ovarian function: novel perspectives from the teleosts. *Biol Reprod.* 2001; 64(1): 264-271.
43. Wood AW, Kraak GVD. Inhibition of apoptosis in vitellogenic ovarian follicles of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by salmon gonadotrophin, epidermal growth factor and 17 $\beta$ estradiol. *Mol Reprod Dev.* 2002; 61(4): 511-518.
44. Tillitt DE, Papoulias DM, Whyte JJ, Richter CA. Atrazine reduces reproduction in fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aqua Toxicol.* 2010; 99(2): 149-159.
45. Gojmerac T, Kartal B, Curic S, Zuric M, Kusevic S, Uvetic Z. Serum biochemical changes associated with cystic ovarian degeneration in pigs after atrazine treatment. *Toxicol Lett.* 1996; 85(1): 9-15.
46. Hsueh AJ, Billig H, Tsafirri A. Ovarian follicle atresia: A hormonally controlled apoptotic process. *Endocr Rev.* 1994; 15(6): 707-724.
47. Janz DM, Kraak GVD. Suppression of apoptosis by gonadotropin, 17-estradiol, and epidermal growth factor in rainbow trout preovulatory ovarian follicles. *Gen Comp Endocrinol.* 1997; 105(2): 186-193.
48. Jin Y, Zhang X, Shu L, Chen L, Sun L, Qian H, et al. Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere.* 2010; 78(7): 846-852.
49. Zhang X, Sharma RK, Agarwal A, Falcone T. Effect of pentoxifylline in reducing oxidative stress-induced embryotoxicity. *J Assist Reprod Genet.* 2005; 22(11-12): 415-417.
50. Suzawa M, Ingraham HA. The Herbicide Atrazine Activates Endocrine Gene Networks via Non-Steroidal NR5A Nuclear Receptors in Fish and Mammalian Cells. *PLoS ONE.* 2008; 3 (5): 211-217.
51. Guney M, Demirin H, Oral B, Ozguner M, Bayhan G, Altuntas I. Ovarian toxicity in rats caused by methidathion and ameliorating effect of vitamins E and C. *Hum Exp Toxicol.* 2007; 26(6): 491-498.