Effect of 2,4-D pesticide on the histological structure of the testes in Albino mice (*Mus musculus*)

تأثير مبيد 2,4,D على التركيب النسجي لخصى الفئران البيض *Mus musculus*

م. د. ذكرى عطا إبراهيم أمل محمود علوان حمد*
قسم علوم الحياة – كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى
***البحث مستل من رسالة الماجستير للباحث الثاني**

المستخلص

بينت النتائج المستحصلة من هذه الدراسة أن جميع حيوانات مجموعتي التجارب التي عوملت بمبيد 2,4-D أظهرت تغيراً في سمك جدار الأنابيب المنوية للخصى وإنكماشها حيث أصبح مظهرها متموجاً غير منتظماً، وكذلك تم ملاحظة ضمور في بعض الأنابيب المنوية، وإنسلاخ واستنزاف بعض الخلايا الجرثومية وتجمعها في تجويف الأنابيب المنوية وأيضاً تم ملاحظة انحلال في بعض خلايا سيرتولي.

كلمات مفتاحية: خصية، خلايا سرتولي، مبيد، 2,4-D، الأنابيب المنوية ، خلايا لايديج

Abstract

The results obtained from this study showed that all animals of two experiment groups that treated with 2, 4-D pesticide indicated a change in the thickness of seminiferous tubule wall of the testes and contraction in them where its appearance became irregularly and crooked as well as observed atrophy in some seminiferous tubule and depletion of some germ cells and collected in the cavity of the seminiferous tubule. Also an increase in the area between Sertoli cells was observed.

Key words: testis, Sertoli cells, Pesticide, 2,4-D, seminiferous tubules, Leydig cells, *Mus musculus*

المقدمة

إزداد إستخدام مبيدات الأعشاب بشكل كبير في جميع أنحاء العالم على مدى العقود الستة الماضية [1] . وبحلول عام 2001 تم إستعمال أكثر من مليون طن من مبيدات الأعشاب على الصعيد العالمي من أجل السيطرة على الغطاء النباتي غير المرغوب في القطاعات الزراعية المتنوعة [2]. وفي السنوات الأخيرة. ازداد قلق بشأن التأثيرات الظاهرة والمتوقعة والآثار الضارة المحتملة لمختلف الملوثات البيئية وبصورة خاصة المبيدات على صحة الإنسان والحيوان والبيئة على حدٍ سواء نتيجة لما تخلفه هذه المبيدات من مواد كيميائية تصنّف على أنها متبقيات حيوية Xenobiotics (التي هي المادة التي لا تنتج ولكنها تكون موجودة في جسم الكائن الحي بعد تعرضه لأي مادة كيمياوية). ومن بين تأثيرات المبيدات التي باتت واضحة على مختلف أجهزة وأعضاء جسم الإنسان، تأثيرها الكبير على صحة وتركيب ووظيفة وأداء الجهاز التناسلي البشري عموماً والذكري على وجه الخصوص [3]. إنّ مبيدات الأعشاب بصورة عامة تكون منخفضة إلى معتدلة السمّية في تاثيرها على البشر والحيوانات لأن معظمها تستهدف المسارات الكيميائية التي تمتلكها سوى النباتات (على سبيل المثال التمثيل الضوئي)، ولكن مع ذلك فإن بقايا هذه المبيدات المتخلّفة أو المتبقية أو المتراكمة في مختلف عناصر البيئة الأساسية كالهواء والماء والتربة وأيضاً المتواجدة في الغذاء أوالتعرض لتراكيز معينة منها من الممكن أن تترافق مع مجموعة واسعة من الآثار الضارة خصوصاً إذا توافرت الظروف المساعدة لهذه المبيدات على إلحاق الضرر الصحي لمختلف الكائنات الحية. فمثلاً إنّ إستنشاق رذاذ المبيدات المتطاير يسبب السعال، والحرقة في الممرات الأنفية والصدر في أغلب الأحيان، وإن عملية الإستنشاق لفترات طويلة تؤدي إلى الاغماء، أمّا إذا تمّ إبتلاع المبيد فكثيراً ما يسبب التقيؤ، وحرقة المعدة، والإسهال، وإرتعاش العضلات وغيرها من الأعراض المرضية الأخرى (4). يمثل إستخدام مبيدات الأعشاب 36٪ ، تليها المبيدات الحشرية بنسبة 25٪، ومن ثمّ مبيدات الفطريات حوالي 10٪ من الإستخدام العالمي للمبيدات المختلفة [5,4]. وعلى مدى عقود سابقة فقد تم إستخدام العديد من أنواع المبيدات العشبية على نطاق واسع وما زال إستخدامها مستمراً في الوقت الحاضر من أجل السيطرة على الأعشاب الضارة (التي تنافس الإنسان في غذائه أو تؤدي إلى إتلافه) ولكن دون مراعاة آثارها السميّة الخطيرة على الكائنات الحية والبيئة على حدٍ سواء [5] . ويعد مبيد 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid)، أحداً أنجح المبيدات العشبية المستخدمة في العالم وأوسعها إستعمالاً في الزراعة الحديثة، حيث أنه مركب كيمياوي يتضمن جزأين أساسيين متحدين هما مركب الفينول بصيغة (الفينوكسي -phenoxy) متحداً مع ذرتين من عنصر الكلور (dichloro-) وكلا الجزئين يعطيان لهذا المبيد تأثيره الحامضي. سابقاً تم استخدام مبيد 2,4-D بتراكيز عال للسيطرة على العديد من أنواع الأعشاب عريضة الأوراق في المعاشب والحدائق والحقول الزراعية والغابات [6]. إن الآثار السمية لمبيد 2,4-D قد تم توثيقها في العديد من البحوث العلمية، حيث لوحظ أن التعرض لمبيد (2,4-D) ينشأ عنه مجموعة متنوعة من الأضرار في القوارض، مثل الاضرار الجينية [7] والكبدية [8] والعصبية [9] والسمية الكلوية [10]. وكذلك فأن الجهاز التناسلي الذكري يكون حساساً جدا للكثير من

المواد الكيميائية الموجودة في البيئة والتي تسهم بشكل أو بآخر في إحداث العقم بين الذكور [12,11]. تبين أن مبيد الأعشاب 2,4-D يزيد من أكسدة الدهون في كل من الخلايا الحيوانية والانسان [14,13]، وكذلك يسبب طفرات خلوية يمكن أن تؤدي إلى الإصابة بأنواع معينة من مرض السرطان، وهذا المبيد (الذي يسلك سلوك المطفر) يحتوي على مركبات الديوكسين (Dioxin)، ومجموعة من المواد الكيمياوية المعروفة التي تكون خطرة على صحة الإنسان والبيئة [15]. إن لمبيد 2,4-D تأثيراً خافضاً لسكر الدم في الفئران [16]، وفي القوارض يسبب هذا المبيد ارتفاعاً في مستويات إفراز هرمون البروجسترون (Progesterone) وأيضاً هرمون البرولاكتين (Prolactin)، بالإضافة إلى ذلك إتضح أنه يسبب تشوهات في دورة شبق (Estrous cycle) [17]. فضلاً عن كل الآثار السابقة فقد لوحظ حصول زيادة واضحة وإرتفاعاً ملحوظاً في معدلات العيوب الخلقية بين الأطفال حديثي الولادة لمواليد السكّان الذين يقطنون في المناطق الزراعية التي يتمّ فيها إستخدام مبيد 2,4-D وغيره من مبيدات الأعشاب من نفس الفئة [18]. ومع ذلك، فقد بذلت محاولات قليلة لمراقبة تاثير مبيد 2,4-D على الجهاز التناسلي الذكري التي يمكن أن تعمل إما بشكل مباشر أو غير مباشرعلى هذا الجهاز الحساس من جسم الإنسان [19]. إنّ الهدف من الدراسة الحالية هو تحديد مدى تاثير مبيد 2,4-Dعلى التركيب النسجي للخصى في الفار الابيض نوع (*Mus musculus*)، ممّا يعطي إنطباعاً واضحاً وصورة مقاربة إلى حدٍ كبير لتأثير هذا المبيد على الإنسان نظراً للتشابه العالي في الخريطة الجينية بين الإنسان والفأر. يهدف هذا البحث إلى تقييم تاثير مبيد 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid pesticide – والذي يعرف إختصاراً بإسم (2,4-D) – على التركيب النسجي للخصى في الفئران السويسرية من نوع (*Mus musculus*).

المواد وطرق العمل

تحضير الجرعة

حضِّرت الجرعة المحددة من مبيد 2,4-D بالإعتماد على الجرعة النصفية المميتة (LD_{50}) والتي تبلغ قيمتها في الفئران (370 ملغم من مبيد 2,4-D\كغم من وزن الجسم) [20]. تمّ اختيار تركيزين (جرعتين) من مبيد 2,4-D لإختبار تأثيره السمّي وهما (150 و 200) ملغم\كغم، فيما تراوحت أوزان الفئران المستخدمة في التجارب بين (20- 30) غم، وتم تجريع الفئران الكمية المطلوبة من المبيد وفقاً للتركيز (الجرعة) المحدد عن طريق الفم مرة واحدة في اليوم لمدة شهر واحد (30 يوماً) لكل تركيز. وقد أمكن حساب كمية المبيد المجرعة للفئران المستخدمة في هذه الدراسة بالإعتماد على المعادلة التالية :

$$\frac{x}{D} = \frac{W_{mouse}}{1000}$$

حيث أنَّ :

x : كمية المبيد الواجب تجريعها للفئران (غم) في التجربة.

D : الجرعة المحددة من المبيد وهي إما 150 أو 200 (ملغم من مبيد 2,4-D\كغم من وزن الجسم)

W_{mouse} : وزن الفأر المستخدمة في التجربة والذي تراوح بين 20 – 30 (غم)

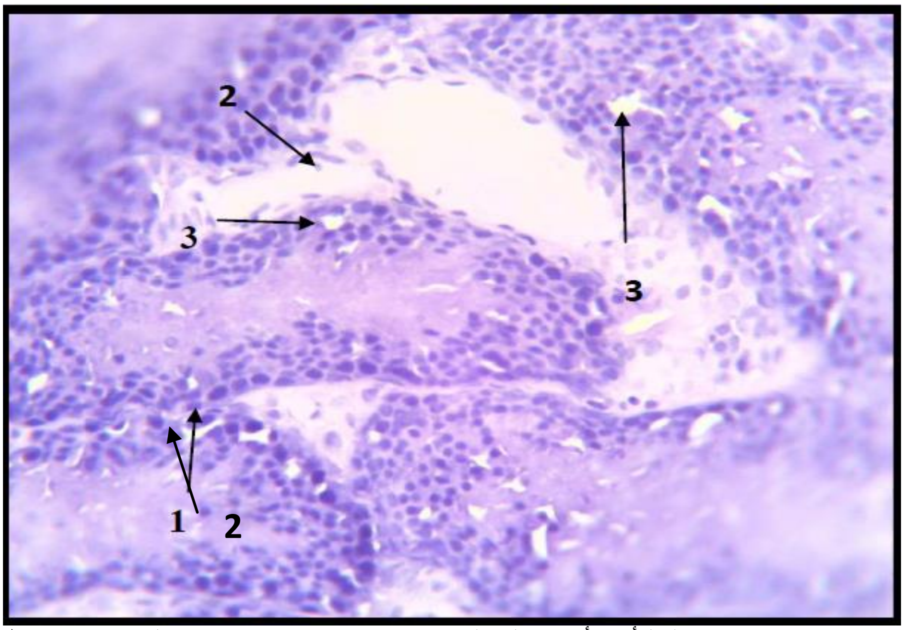
الحيوانات المستخدمة في التجارب والدراسة النسجية

أستخدمت في هذه الدراسة 20 فأراً من ذكور الفئران البيض السويسرية (*Mus musculus*)، تم الحصول عليها من البيت الحيواني التابع لقسم علوم الحياة - كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى، وقد كان معدل أوزانها يتراوح بين (20 – 30) غم وعمرها بين (8 – 10) أسابيع. قسمت هذه الفئران بصورة عشوائية الى مجموعتين كانت تفاصيلها كالآتي: المجموعة الاولى هي مجموعة السيطرة بعدد 4 فئران والمجموعة الثانية هي مجموعة الإختبار وكان عددها 16 فأراً، وهذه المجموعة بدورها قسمت بالتساوي الى مجموعتين ثانويتين (8 فئران لكل مجموعة). تم تجريع فئران المجموعتين الثانويتين بالمبيد بتركيز (150 و 200 ملغم من مبيد 2,4-D \ كغم من وزن الجسم) يوميا لمدة 30 يوماً وفي نهاية التجربة تم تخدير الفئران بمادة الكلوروفورم Chloroform ومن ثم شرحت الحيوانات وتمّ إستئصال الخصى من موقعها. بعد ذلك تم تثبيت العينات بمحلول الفورمالين لمدة 24 ساعة ومن ثمّ غسلت بماء الحنفية ونقلت الى كحول 70% للحفظ . حضّرت المقاطع النسجية تبعا لطريقة (Bancroft and Gamble) [21] ، حيث مررت النماذج للإنكاز بسلسلة تصاعدية من الكحول الأثيلي بعدها وضعت بمحلول الزايلين للترويق ثم طمرت بشمع البرافين وقطعت قوالب الشمع المحضّرة بإستعمال المشراح الدوارRotary microtome وبسمك 7 مايكرون. المقاطع الزجاجية المستحصلة تمّ تلوينها بإستخدام صبغة هارس هيماتوكسلين – أيوسين (Haemotoxylin and Eosin (H&E)) stain حسب الطريقة المتبعة في (Yano and Dolder,) [22]. حملت المقاطع الزجاجية الملوّنة بمادة كندا بلسم بعدها فحصت العينات وصوّرت بإستعمال المجهرالضوئي المزوّد بكاميرا رقمية.

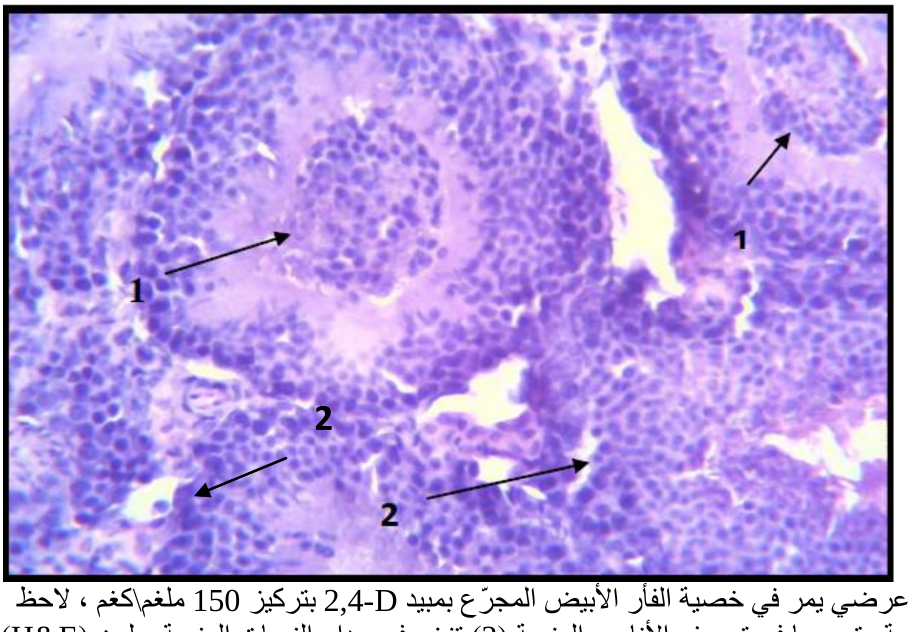
النتائج والمناقشة

تعد الخصية (testis) العضو الأكثر أهمية في الجهاز التناسلي الذكريMale reproductive system. إذ تتميز بوظيفيتين رئيسيتين الأولى هي إنتاج هرمون الستيرويد Steroid Hormone وتكوين الحيوانات المنوية Spermatozoa [23]. هناك العديد من العوامل المختلفة التي تؤثر على تكوين الحيوانات المنوية، ومن بين هذه العوامل هي عوامل كيميائية مثل العقاقير والمبيدات والعناصر الكيميائية السامة الملوثة للبيئة [24]. بينت نتائج الدراسة الحالية أن الفئران التي جرّعت بتركيز (150 و200 ملغم/كغم) من مبيد 2,4-D قد ظهرت عليها تغيرات نسجية واضحة تمثلت بالزيادة الملحوظة في سماكة جدران الأنابيب المنوية Seminiferous tubule وإنكماشها حيث أصبح مظهرها العام متموج وغير منتظم، فضلاً عن حدوث ضمور في بعض الأنابيب

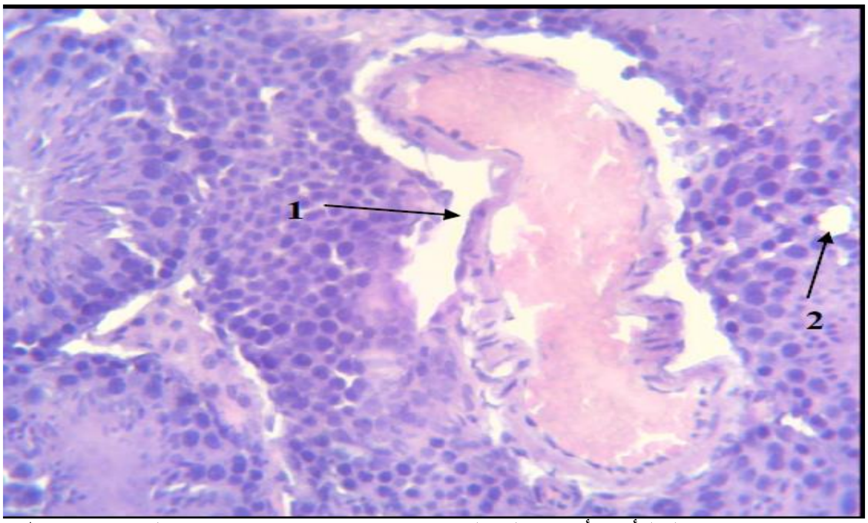
المنوية، وأيضاً عدم إنتظام الظهارة المنوية وكما مبين في الشكل (1). تتفق هذه النتيجة مع ما توصل إليه Richardson وزملاؤه (1989) [25] حيث ذكروا أن الصفيحة القاعدية المتاثرة تلعب دوراً هاماً في الحفاظ على نقل المواد بين الأنسجة الخلالية والظهارة الجرثومية Spermatogonic والحفاظ على الشكل والتركيب والوظيفة في هذه الأنسجة . بينما أشار (Zheng *et al*) [26] إلى أن زيادة سمك الجدار الأنابيب المنوية يُضعف العلاقة بينه وبين النسيج البيني ومع زيادة السمك الجدار تظهر العديد من الاضطرابات المرضية داخل الخصية خاصة في وظيفة خلايا سيرتولي حيث تؤثر على تمايز الخلايا الجرثومية وتثبيط تكوين الحيوانات المنوية . في حين بيَّن (Winters) [27] ، أن خلايا سيرتولي Sertoli cells تفرز ألياف الكولاجين من النوع الرابع Collagen Fibers IV والتي تسبب سماكة جدران الأنابيب المنوية، وهي بذلك تؤدي الى ضعف تكوين الحيوانات المنوية. لقد أظهرت نتائج الدراسة بالإضافة لذلك غياب الحيوانات المنوية Spermatozoa في بعض تجاويف النبيبات المنوية وكذلك ظهور تفجي Vaculation في بعض مناطق الخصية، وتبيّن بصورة واضحة إتساع المسافة بين الخلايا الجرثومية، وإنسلاخها من النسيج الظهاري وتجمعها في تجويف الأنابيب المنوية وحدوث تنكس في خلايا سيرتولي وزيادة المساحة بين خلايا سيرتولي المجاورة وكما مبين في الأشكال (1،2،3). كما بينت نتائج هذه الدراسة ظهور خلايا بلعمية كبيرة داخل تجويف النبيبات المنوية كما موضح في الشكل (4).



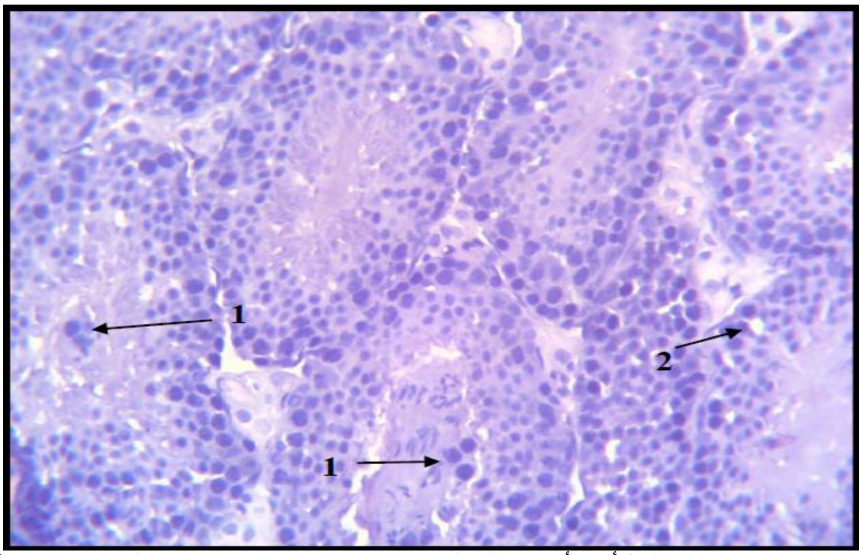
شكل (1) مقطع عرضي يمر في خصية الفأر الأبيض المجرّع بمبيد 2,4-D بتركيز 150 ملغم\كغم ، لاحظ (1) عدم انتظام الظهارة المنوية، (2) تفجى ، (3) تنخر في النبيبات المنوية . ملون (H&E) .40 ×



شكل (2) مقطع عرضي يمر في خصية الفأر الأبيض المجرّع بمبيد 2,4-D بتركيز 150 ملغم\كغم ، لاحظ (1) انسلاخ الخلايا الجرثومية وتجمعها في تجويف الأنابيب المنوية (2) تنخر في جدار النبيبات المنوية..ملون (H&E) ×40 .



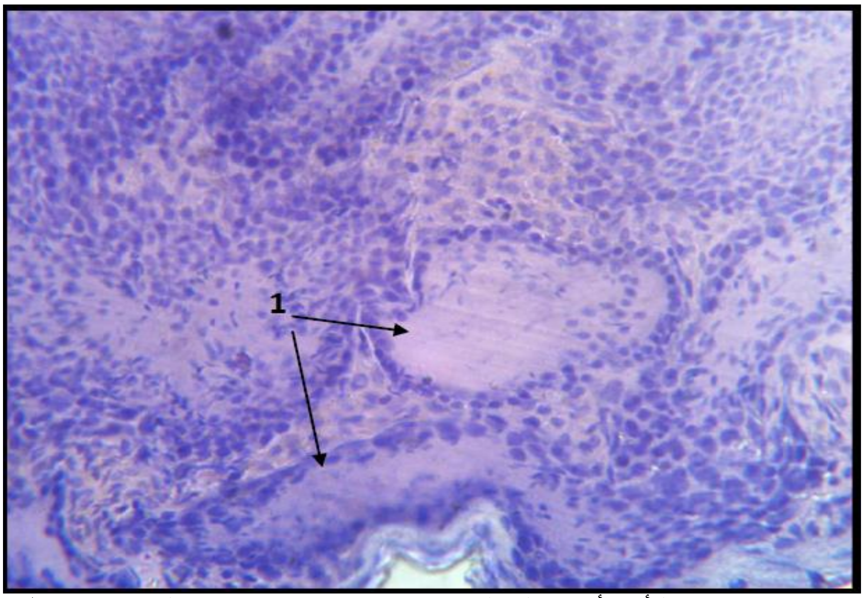
شكل (3) مقطع عرضي يمر في خصية الفأر الأبيض المجرّع بمبيد 2,4-D بتركيز 150 ملغم\كغم لاحظ (1) مساحات منسلخة في نسيج الظهاري للنبيبات المنوية (2) تنكس او تحلل خلايا سرتولي .ملون (H&E) .40 ×



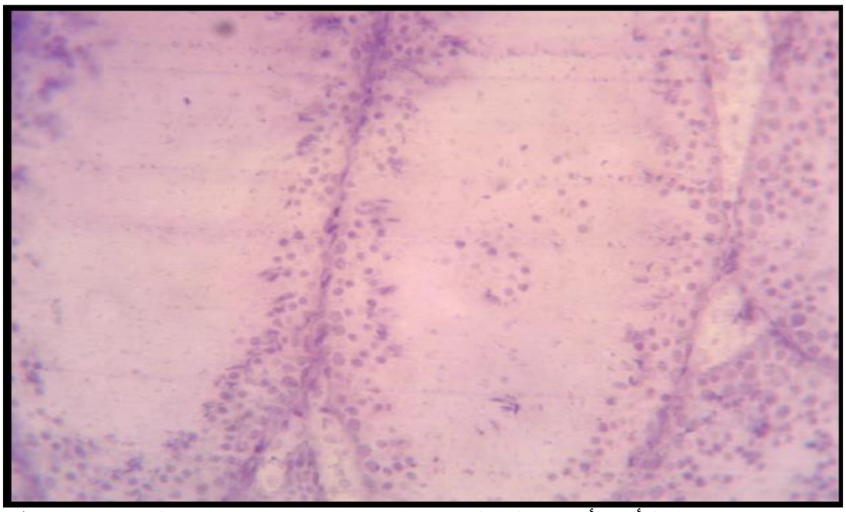
شكل (4) مقطع عرضي يمر في خصية الفأر الأبيض المجرّع بمبيد 2,4-D بتركيز 150 ملغم\كغم، لاحظ (1) ظهور خلايا بلعمية كبيره في داخل تجويف النبيبات المنوية (2) تنكس او تحلل خلايا سرتولي .ملون (H&E) .40 ×

لقد أشار (Monsees *et. al*) [28] إلى أن حدوث اضطراب في خلايا سيرتولي سيؤثر حتماً على الخلايا الجرثومية ويؤدي في النهاية إلى حدوث خلل في أنسجة الخصية . بينما ذكر (Reis *et al*) [29] أن خلية سيرتولي لها دور ضروري في تطوير الخلايا الجرثومية من خلال تشكيل حاجز الخصية الدموية الذي يحمي الخلايا الجرثومية، ونقل المواد الغذائية والهرمونات إلى الخلايا الجرثومية . ويعتقد ان جميع هذه العلامات المرضية هي بسبب حدوث خلل في تركيب ووظيفة خلايا سيرتولي. كشفت نتائج الدراسة الحالية أن مبيد 2,4-D له تأثير بيّن على الخلايا ليديج (Leydig Cells) والنسيج البيني Interstitial tissue، وهذا ما كان واضحاً من خلال ظهور تحلل و تنخر وأيضاً ظهور التفجى في النسيج الخلالي وكما يبيّن ذلك الشكل (2) . تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما توصل إليه (Kaur *et. al.*,) [30] من أن خلايا ليديج تعد مركزاً لتنظيم الخصوبة وذلك من خلال إنتاج هرمون التيستستيرون Testosterone Hormone . بينما ذكر (Papaioannou *et. al*) [31] أن خلايا ليديج تحث بواسطة هورمون Luteinizing Hormone LH المحفز لحمض الأراكيدونيك arachidonic acid وهرمون التيستستيرون . لقد اظهرت نتائج الدراسة الحالية أن تجريع الفئران بتركيز 200 ملغم / كغم من مبيد 2,4-D أدّى الى زيادة إنكماش الأنابيب المنوية وإستنزاف depletion في بعض الطبقات الجرثومية للانابيب المنوية وأدّى في نفس الوقت إلى حدوث تحلل degeneration وتفجي، وموت الخلايا apoptosis في أمهات المني Spermatogonia، والخلايا المنوية الأولية Primary sperm cells وأرومة النطفة والنطفة الناضجة وعودة أرومة النطفة والنطف الناضجة إلى داخل الأنابيب المنوية. من ناحية أخرى بيّنت النتائج أنّ العديد من الأنابيب المنوية كانت مفرغة من الخلايا الجرثومية وكما مبين في الشكلين (5،6). يعتقد أن السبب في ذلك قد يعزى إلى حدوث خلل في خلايا سيرتولي وهذا الخلل سيؤثر بدوره على البروتينات الأساسية المطلوبة في عملية تخليق و واللازمة لتمايز الخلايا الجرثومية، حيث تفرز هذه البروتينات في أعلى مستوى لها خلال مرحلة تمايز أرومة النطفة. تتفق هذه النتيجة مع ما توصّل إليه (Manivannan *et. al.*,) [32] من خلال دراستهم المتعلقة بخصائص الحيوانات المنوية والتركيب الدقيق

للخصيتين في الفئران بعد المعاملة طويلة الأمد بالميثانول وأيضاً مع ما ذكره (Foley,) [33] أن الحركة الرجوعية لارومة النطفة والنطفة الناضجة ضمن جدار الأنابيب المنوية ربما تكون ناتجة عن تنبّهها لسمّية الخصية بواسطة المبيد D- 2,4.



شكل (5) مقطع عرضي يمر في خصية الفأر الأبيض المجرّع بمبيد 2,4-D بتركيز 200 ملغم\كغم، لاحظ (1)استنزاف او نضوب depletion في بعض طبقات الجرثومية للانابيب المنوية . . ملون (H&E) .40 ×



شكل (6) مقطع عرضي يمر في خصية الفأر الأبيض المجرّع بمبيد 2,4-D بتركيز 200 ملغم\كغم، لاحظ الإستنزاف depletion الحاصل في بعض الطبقات الجرثومية للانابيب المنوية . ملون (H&E) 40×.

المصادر

1. Gianessi L. P. and Reigner N. P., (2007), "The value of herbicides in U.S. crop production", *Weed Science Society of America*, Volume 21, pp: 559-566.
2. Kiely T., Donaldson D. and Grube A., (2004), "Pesticides Industry Sales and Usage: 2000 and 2001 Market Estimates", *U.S. Environmental Protection Agency Office of Prevention*, EPA-733-R-04-001, Washington, DC, May, pp: 33.
3. Bonde J. P. and Giwercman A., (2014), "Environmental xenobiotics and male reproductive health", *Asian Journal of Andrology*, Volume 16, pp: 3–4, doi:
4. B. Bukowska, (2006), "Toxicity of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid–Molecular Mechanisms", *Polish Journal of Environmental Studies*, Volume 15, No. 3, pp: 365-374.
5. Chinalia F. A., Regali-Seleghin M. H. and Correa E. M., (2007), "2,4-D Toxicity: Cause, Effect and Control", *Terrestrial and Aquatic Environmental Toxicology*, Volume 1, Issue 2, pp: 24–33.

6. Joshi S. C., Tibrewal P., Sharma A. and Sharma P., (2012), "Evaluation of Toxic Effect of 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid) on Fertility and Biochemical Parameters of Male Reproductive System of Albino Rats", *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, Volume 4, Supplied 3. ISSN- 0975-1491.
7. Madrigal-Bujaidar E., Hernandez-Ceruelos A. and Chamorro G., (2001), "Induction of sister chromatid exchanges by 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid in somatic and germ cells of mice exposed in vivo", *Food and Chemical Toxicology*, Volume 39, Issue 9, September, Pages 941-946.
8. Tayeb W., Nakbi A., Trabelsi M., Attia N., Miled A. and Hammami M., (2010), "Hepatotoxicity induced by sub-acute exposure of rats to 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid based herbicide "Désormone lourd"", *Journal of Hazardous Materials*, Volume 180, Issues 1–3, 15 August, pp: 225-233.
9. Bortolozzi A., Evangelista de Duffard A. M., Dajas F., Duffard R. and Silveira R., (2001), "Intracerebral administration of 2,4-diclorophenoxyacetic acid induces behavioral and neurochemical alterations in the rat brain", *NeuroToxicology*, Volume 22, Issue 2, April, Pages 221-232.
10. Uyanikgil Y., Ateş U., Baka M., Biçer S., Oztaş E. and Ergen G., (2009), "Immunohistochemical and histopathological evaluation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-induced changes in rat kidney cortex", *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, June, Volume 82, Issue 6, pp: 749–755.
11. Oliva A., Spira A. and Multigner L., (2001), "Contribution of environmental factors to the risk of male infertility", *Human Reproduction*, Volume 16, Issue 8, August. DOI:
12. Mehrpour O., Karrari P., Zamani N., Tsatsakis A. M. and Abdollahi M., (2014), "Occupational exposure to pesticides and consequences on male semen and fertility: a review", *Toxicology Letters*, Volume 230, Issue 2, 15 October, pp: 146-156.
13. Palmeira C. M., Moreno A. J. and Madeira M. C., (1995), "Thiols metabolism is altered by the herbicides paraquat, dinoseb and 2,4 D: A study in isolated hepatocytes", *Toxicology Letters*, Volume 81, Issue 2-3, 15 November, pp: 115-123.
14. Bukowska B., Kopka A., Michalowicz J. and Duda W., (2006), "Comparison of the effects of Aminopielik D pesticide and its active components on human erythrocytes", Environmental Toxicology and Pharmacology, Volume 22, Issue 2, September, pp: 189-193.
15. Littorin M., Hansson M., Rappe C.and Kogevinas M., (1994), "Dioxins in Blood from Swedish Phenoxy Herbicide Workers", *The Lancet*, Volume 344, Issue 8922, 27 August, Pages 611-61..
16. Mikov I., Vasović V., Mikov A., Goločorbin-Kon S., Stankov K. and Mikov M., (2010), "Hypoglycemic Effect of Herbicide 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D)", Pesticides Phytomedicine (Belgrade), Volume 25, No.4, pp: 349-352.
17. Coady K. K., Kan H. L., Schisler M. R., Gollapudi B. B., Neal B., Williams A. and LeBaron M. J., (2014), "Evaluation of potential endocrine activity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid using in vitro assays", *Toxicology in Vitro*, Volume 28, Issue 5, August, pp: 1018-1025.
18. Garry V. F., Schreinemachers D., Harkins M. E. and Griffith J., (1996), "Pesticide appliers, biocides, and birth defects in rural Minnesota", *Environmental Health Perspectives Journal*, Volume 104, Issue 4, April, pp: 394–399.
19. Anbu J., Nithya S., Kannadhasan R., Kishore G., Anjana A. and Suganya S., (2012), "Antioxidant and protective effect of aqueous extract of *Ichnocarpus frutescens* and *Cyperus rotundus* against Cisplatin induced testicular toxicity in rodents", *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences,.,*; Volume 4, Issue 1, pp: 437-441.
20. Kaulbars C. and Vaillancourt G., (2014), "How Herbicide Work, Biology to Application", Alberta Agricultural and Rural Development, Canada. ISBN: 0773261311.
21. Bancroft J. D., and Gamble M., (2008), "Theory and Practices of Histological Technique", 6^{th} edition. Churchill Livingstone, Elsevier, Philadelphia.

22. Suvarna S. K., Layton C. and Bancroft J. D., (2013), "Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques", Churchill Livingstone, Elsevier, e-Book ISBN: 9780702058172. Hardcover ISBN: 9780702042263.
23. Carreau S., Bourguiba S., Lambard S., Galeraud-Denis I., Genissel C., Levallet J., (2002), "Reproductive system: aromatase and estrogens", *Molecular and Cellular Endocrinology*, Volume 193, Issues 1–2, 31 July, pp: 137–143.
24. Yano C. L. and Dolder H., (2002), "Rat testicular structure and ultrastructure after paracetamol treatment", *Contraception*, Volume 66, Issue 6, December, Pages 463-467.
25. Richardson L. L., Kleinman H. K. and Dym M. (1998), "Altered basement membrane synthesis in the testis after tissue injury", Journal of Andrology, Volume 19, Issue 2, March-April, pp: 145-155.
26. Zheng Y., Zhang X., Zhon J., Cheng F, Rao T. and Yao Y., (2002), "Expression of extracellular matrix proteins and vimentin in testes of azoospermic man: an immunohistochemical and morphometric study", Asian Journal of Andrology, Volume 4, Issue 1, pp:55-60.
27. Winters S. J., (2004), "Male Hypogonadism: Basic, Clinical, and Therapeutic Principles", Humana Press Inc., Totowa, NJ. Chapter 2: Leydig Cell Function in Man by Dong Q. and Hardy M. P., pp:23-43.
28. Monsees T. K., Franz M., Gebhardt S., Winterstein U.,Schill W. B. and Hayatpour J., (2000), "Sertoli cells as a target for reproductive hazards", Androlgia, Volume 32, Issue 4-5, September, pp: 239–246.
29. Reis M. M., Moreira A. C., Sousa M., Mathur P. P., Oliveira P. F. and Alves M. G., (2015), "Sertoli cell as a model in male reproductive toxicology: Advantages and disadvantages", *Journal of Applied Toxicology*, Volume 35, Issue 8, August, pp: 870–883.
30. Kaur G., Thompson L. A. and Dufour J. M., (2014), "Sertoli cells--immunological sentinels of spermatogenesis", Seminars in Cell & *Developmental Biology*, Volume 30, June, pp: 36-44.
31. Papaioannou M. D., Pitetti J., Ro S., Park C., Aubry F., Schaad O., Vejnar C. E., Descombes P., Zdobnov E. M., McManus M. T., Guillou F., Harfe B. D., Yan W., Jégou B. and Nef S., (2009), "Sertoli cell Dicer is essential for spermatogenesis in mice", *Developmental Biology*, Volume 326, Issue 1, 1 February, pp: 250–259.
32. Manivannan B., Mittal R., Goyal S., Ansari A. S. and Lohiya N. K., (2009), "Sperm characteristics and ultrastructure of testes of rats after long-term treatment with the methanol subfraction of *Carica papaya* seeds", *Asian Journal of Andrology*, Volume 11, Issue 5, September, pp: 583–599.
33. Foley G. L., (2001), "Mechanisms of Male Reproductive Organ Toxicity", *Toxicologic Pathology*, Volume 29, No 1, pp 49 –63.