

تأثیر مورفین بر گلیکوکانجوگه های اپیتیلیوم منی ساز در موش سفید کوچک با استفاده از روش لکتین هیستوشیمی

علیرضا محمودیان^{۱*}، فرزانه زمان سلطانی^۲، سیدحسن علوی^۱، علیرضا فاضل^۳

۱- استادیار گروه علوم تشریح و ژنتیک دانشگاه علوم پزشکی مشهد-۲- استادیار گروه علوم تشریح دانشگاه علوم پزشکی قزوین-۳- استاد گروه تشریح و ژنتیک دانشگاه علوم پزشکی مشهد

سابقه و هدف: تجویز مورفین در حیوانات باعث اختلالات فراوانی دربیضه و باروری میگردد. ازسوی دیگر نقش حیاتی گلیکوکانجوگیتها در اسپرماتوژن نیز در بررسی های مختلف مورد تأکید قرار گرفته است. لکتینها ترکیباتی هستند که می توانند به طور اختصاصی قندهای انتهایی گلیکوکانجوگیتها را شناسائی کنند. لذا این مطالعه به منظور بررسی آثار احتمالی مورفین بر گلیکوکانجوگیتها بیضه انجام شد.

مواد و روشها: ۱۰۲ سر موش نر BALB/C ۲ تا ۴ ماهه، درسه گروه مساوی ببررسی شدند. به یک گروه سولفات مورفین و به گروه دیگر سرم فیزیولوژی تزریق شد و گروه سوم بدون تغییر مطالعه شد. پس از تهیه بلوكهای پارافینی از بیضه ها، مقاطع ۵ میکرومتری به دست آمده با استفاده از لکتین هیستوشیمی تحت تأثیر لکتینهای مختلف قرار گرفتند. شدت واکنش در سلولها ایپیتیلیوم منی ساز با استفاده از میکروسکپ نوری مطالعه ورتبه بندی گردید و سپس توسط آزمون آنالیز واریانس تجزیه و تحلیل انجام شد.

یافته ها: میانگین شدت واکنش به لکتین Wheat Germ Agglutinin (WGA) که برای اسید سیالیک اختصاصی است، بین گروه تجربی و گروه های شاهد و درکلیه سلولها، تفاوت معنی دار نشان داد ($p < 0.05$). در مردم سایر لکتینها که برای قندهای فوکوز، ان - استیل گالاكتوز آمین و دی ساکارید گالاكتوز- استیل گالاكتوز آمین اختصاصی هستند، تفاوت معنی دار آماری مشاهده نشد.

نتیجه گیری: کاهش واکنش به WGA، نشان دهنده کاهش میزان اسید سیالیک در نمونه های مورفینی است. با توجه به اهمیت اسید سیالیک در اسپرماتوژن، می توان پیش بینی کرد که به دنبال کاهش محتوای اسید سیالیک، فرآیند اسپرماتوژن دستخوش تغییرات نا مطلوبی شده و از میزان لفاح کاسته خواهد شد.

واژه های کلیدی: اسپرماتوژن سیسیس، مورفین، گلیکوکانجوگیتها، اسید سیالیک، لکتینها.

مجله دانشگاه علوم پزشکی بابل، دوره هشتم، شماره ۱، زمستان ۱۳۸۴، صفحه ۵۲-۶۴

مقدمه

بیضه ها، کاهش قطر لوله های منی ساز و مهارفرآیند اسپرماتوژن شده است(۲). در بررسی دیگر، تزریق مورفین به رتهای نر منجر به کاهش معنی دار وزن بیضه ها، سمینال و زیکول و پروستات، افزایش میزان حاملگی کاذب و کاهش تعداد لانه گزینی ها در جفت های آنها گردیده است(۳). همچنین مطالعات دیگر نشان داده اند که رتهای نری که مادرشان در زمان بارداری، تحت تأثیر مورفین قرار

اعتياد بکی از مشکلات بزرگ جوامع امروزی است که بیش از همه مردان جوان در سنین باروری با میانگین سنی 33 ± 10 را مبتلا می سازد(۱). آگاهی افراد از تأثیرات جسمانی منفی این مواد میتواند در جلوگیری از گرایش جوانان به آن مؤثر واقع شود. مطالعات قبلی، عوارض نامطلوب مصرف مواد مخدر بر باروری را نشان داده اند. در یک مطالعه، تجویز پتیدین به رت های نر باعث کاهش وزن

اختصاصی به قندهای انتهائی متصل می شوند. مطالعات فراوانی درمورد «لکتین هیستوشیمی» بافت طبیعی بینه در انسان و سایر حیوانات صورت گرفته است و الگوی واکنش و توزیع قندهای مختلف توصیف گردیده است. از جمله می توان به مطالعات صورت گرفته توسط Soderstrom و همکارانش بر روی رت (۹)، Arya و همکارانش بر روی بیضه رت (۱۰)، گاو (۱۱)، موش (۱۲ و ۱۳) و بالاخره بر روی انسان اشاره نمود (۱۴ و ۱۵) در حالیکه تا کنون هیچ مطالعه ای درمورد اثر مواد مخدر بر روی گلیکوکانجوگیت های بافت بینه صورت نگرفته است، لذا در پاسخ به این سؤال که آیا وابستگی مزمن داروئی به مورفین باعث ایجاد تغییر در گلیکوکانجوگیت های لوله های منی ساز - که در فرآیند اسپرماتوژنر اهمیت زیادی دارند - می شود یا خیر، این تحقیق انجام شد.

مواد و روشها

تعداد ۱۰۲ سر موش نر بالغ از نژاد BALB/c از مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی مشهد تهیه گردید. کلیه حیوانات در سن ۲ تا ۴ ماهگی و وزن بین ۲۵ تا ۳۰ گرم انتخاب شدند. پس از توزیع به طور تصادفی به سه گروه کنترل ۱ یا گروه طبیعی (Intact)، کنترل ۲ یا گروهی که سرم فیزیولوژی دریافت کردنده (Sham) و گروه تجربی (Experimental) که سولفات مورفین دریافت کردنده، تقسیم شدند. تمامی حیوانات در شرایط استاندارد از نظر درجه حرارت (22 ± 2 درجه سانتیگراد)، رطوبت (۵۰٪)، ۱۲ ساعت روشناهی و تاریکی متناوب و دسترسی آزاد به آب و مواد غذائی، نگهداری شدند.

ایجاد وابستگی داروئی مزمن: میزان و نحوه تزریق مورفین براساس جدول مقیاس بندی دوز و پروتکلهای ارائه شده در منابع موجود تعیین گردید (۱۶). به این ترتیب که تزریق سولفات مورفین در ۷ روز متوالی و به ترتیب دوزهای ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۰۰ میلیگرم بر کیلوگرم وزن حیوانات به صورت زیر پوستی (S.C.) انجام شد. مقدار دارو در هر روز منقسم بر سه بخش و به صورت سه بار در روز به حیوانات تزریق گردید (۱۶). جهت کنترل و اطمینان از ایجاد وابستگی داروئی در حیوانات در روز هشتم مقدار ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم نالوکسان به صورت زیر پوستی

گرفته اند، نیز دچار آسیب هایی نظیر فیبروز و آتروفی لوله های منی ساز، از بین رفتن سولولهای زایا و لیدیگ و کاهش استروئید سازی بیضه می شوند (۴). از سوئی دیگر کربوهیدرات ها از ترکیبات بسیار ضروری و مورد نیاز در فرآیند اسپرماتوژنر می باشند. گلیکوکانجوگیتها و به ویژه قندهای انتهائی آنها نقشی اساسی در چسبیدن سولولهای زایا به سولولهای سرتولی (۵)، تشکیل آکروزوم و غشاء سلولی، تکثیر و تمایز سولولهای زایا (۶) و حیات اسپرم (۵) دارند. مطالعات گسترده ای در خصوص اهمیت و نقش گلیکوکانجوگیت ها در فرآیند اسپرماتوژنر صورت گرفته است. Fujimoto و همکارانش به بررسی اهمیت یک گلیکولیپید به نام سمینولیپید پرداختند. این ترکیب دارای بنیان انتهائی گالاکتوز می باشد. آنها از موشهای جهش یافته ای استفاده کردند که قادر به انتقال گالاکتوز به پیش میان مینولیپید نبودند و مشاهده کردند که در این موشهای اسپرم اسپرماتوژنر در انتهای مرحله پاکیتن ختم شده و سولولهای اسپرماتوژنیک دچار دزنازیون و نابودی می شوند (۶). یکی دیگر از قندهای انتهائی بسیار مهم، اسید سیالیک می باشد. Froman و همکارانش دریافتند که پس از برداشتن اسید سیالیک از سطح اسپرم، میزان باروری در نتیجه افزایش میزان توقیف و یا سرکوب توسط سیستم ایمنی در دستگاه تناسلی ماده به مقدار زیادی کاهش می یابد. به نظر می رسد که برداشته شدن اسید سیالیک که پوششی بر روی نواحی آنتی ژنیک اسپرمها بوده است موجب ظاهر شدن این مناطق شده است (۷). اسید سیالیک همچنین در ترکیب گانگلیوزیدهای کمپلکس وجود دارد. نقش گانگلیوزیدهای کمپلکس را انتقال تستوسترون از سلول های لیدیگ به جریان خون و لوله های منی ساز مطرح کرده اند. این ترکیبات علاوه بر اسید سیالیک دارای قند انتهائی ان - استیل گالاکتوز آمین نیز می باشند. در موشهای انتهائی انتقال این قند به پیش میان گانگلیوزیدها صورت نمی گیرد، سطح سرمی تستوسترون پائین بوده در حالیکه در سولولهای لیدیگ تجمع می یابد. آتروفی بیضه ها و عقیمی نیز از نتایج دیگر این اختلال گزارش شده است (۸).

یکی از روشهایی که به وسیله آن می توان قندهای انتهائی را شناسائی کرد استفاده از لکتین ها است (۹). لکتینها پروتئین یا گلیکوپروتئین های با منشاء گیاهی یا جانوری هستند که به طور

استیل گالاکتوز آمین اختصاصی است، Arachis Hypogaea Agglutinin(PNA) اختصاصی برای دی ساکارید انتهائی گالاکتوز- ان استیل گالاکتوز آمین، Lotus Tetragonolobus Agglutinin(LTA) که لکتین اختصاصی برای قدر انتهائی فوکوز می باشد و Wheat Germ Agglutinin(WGA) اختصاصی برای اسید سیالیک (ان - استیل نورآمینیک اسید).

لامهای تهیه شده با استفاده از میکروسکپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند. بر اساس شدت واکنش به لکتینها، نمرات صفر (عدم واکنش) تا چهار (حد اکثر واکنش) برای هر یک از سلولها منظور شد. این روش رتبه بندی واکنش‌ها بر اساس مطالعات Arya (۱۱) و Burkett (۲۱) انجام شد.

تحلیل آماری: داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون‌های آماری آنالیز واریانس (ANOVA) و توکی (Tukey) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و $p < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

SBA آنالیز واریانس داده‌های حاصل از لکتینهای LTA PNA و مقایسه سه گروه با هم تفاوت معناداری بین میانگین‌های شدت واکنش‌ها را نشان نداد. در مورد لکتین LTA به طور کلی هیچ گونه واکنشی در بافت بیضه مشاهده نشد. این عدم واکنش در SBA مورد هر سه گروه مورد بررسی مشاهده گردید. در مورد لکتین که واکنش‌های قابل توجهی در گروه طبیعی ایجاد نمودند، وضعیت مشابهی از نظر شدت و الگوی واکنش در گروههای کنترل ۲ و تجربی نیز مشاهده گردید. به این ترتیب که در سلولهای اسپرما توانگنی واکنشی مشاهده نشد و واکنش‌ها در اسپرما متوجههای اولیه ظاهر شده و با پیشروع فرآیند اسپرمیوژن در میزان واکنش‌ها به ویژه در ناحیه آکروزی اسپرم بلوغ اسپرم‌ها، شدت این واکنش‌ها کاهش نشان می‌داد. در هر سه گروه همین الگوی واکنش مشاهده گردید (تصاویر ۱ و ۲). واکنش به لکتین MPA مشابه با SBA بود (تصاویر ۱ و ۲). این تفاوت که به طور کلی شدت واکنش‌ها در کلیه موارد بیشتر از SBA بود. ولی در مورد این لکتین نیز هر سه گروه به نحو مشابهی پاسخ دادند و تفاوتی مشاهده نگردید.

تزریق شد (۱۶). مشاهده پرشهایی که در آن چهار دست و پای حیوان همزمان از سطح افقی فاصله می‌گیرد به عنوان علامت وابستگی داروئی و سندروم ترک در نظر گرفته شد. برای حذف تأثیر احتمالی استرس تزریق بر نتایج، به گروه کنترل ۲، با حجم و دفعات مشابه، سرم فیزیولوژی تزریق گردید. تحت شرایط بیهوشی با کلروفرم، بیضه‌ها خارج و به مدت ۴۸ ساعت در فیکساتیو B4G قرار گرفتند. B4G شامل شش درصد کلرید مرکوریک، یک درصد گلوتارالدئید و یک درصد استات سدیم می‌باشد. pH این محلول باید ۶ باشد (۱۷). پس از فیکساسیون مراحل آماده سازی معمولی یعنی آب گیری در الکلهای سعودی، شفاف سازی در گزیل، آغشته سازی و قالب گیری با پارافین را طی کرده و از بلوک‌های پارافینی به دست آمده برشهای ۵ میکرونی تهیه شد (۱۸).

مقاطعه، به منظور برداشتن کامل املاح مرکوریک موجود در فیکس B4G به مدت ۵ دقیقه در محلول Alcoholic Iodine قرار گرفتند. سپس برای خنثی کردن پراکسیدازهای با منشاء داخلی (Endogenous Peroxidases) به مدت ۴۵ دقیقه در محلول ۱٪ آب اکسیژنه در متانول و در شرایط تاریکی قرار داده شدند (۱۹). پس از شستشو در محلول بافر فسفات بر روی هر لام چند قطره لکتین رقیق شده با بافر فسفات به نسبت ۱:۱۰۰ ریخته شد (۱۷ و ۲۰). لکتینها به صورت کونتروگه با Horse Radish Peroxidase (HRP) از شرکت Sigma-Aldrich خریداری شده بود. پس از گذشت ۲ ساعت، کلیه لامها با بافر فسفات سالین شسته و به مدت ۰/۳ دقیقه در مجاورت DAB (Diaminobenzidine) با غلظت ۰/۰۳ گرم در صد سی سی بافر فسفات که به آن ۲۰۰ میکرو لیتر آب اکسیژنه افزوده شده، قرار گرفتند. از آنجاییکه اتصال لکتین به قند انتهائی قابل مشاهده نیست، از DAB استفاده می‌شود. با اتصال این انتهائی اسپرمیوژن به لکتین متوصل است، به طور غیر مستقیم محل اتصال به قندها مشخص می‌گردد. سپس کلیه لامها به مدت پنج دقیقه در محلول آسین بلو با pH ۲/۵ بمنظور ایجاد رنگ زمینه قرار گرفتند (۱۷ و ۲۰).

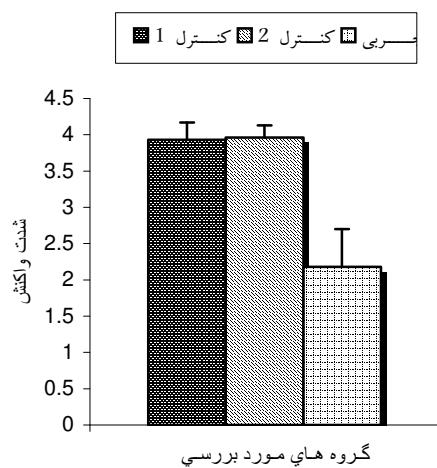
لکتین‌ها را بکار برده شده در این مطالعه عبارتند از: Glycine Max Agglutinin (SBA) که برای قند انتهائی آن -

جدول ۱. مقایسه میانگین شدت واکنش به لکتین WGA در سلول های مختلف اپیتالیوم منی ساز در گروه های مورد مطالعه

اسپرماتوگونی	اسپرماتید طویل	اسپرماتید گرد	اسپرماتوسیت اولیه	سلول سرتولی	سلولها گروهها
۲/۰۹±۰/۲۹	۲/۸۷±۰/۳۳	۱/۲۴±۰/۴۳	۱/۰۶±۰/۲۴	۲/۰۶±۰/۲۴*	کنترل ۱
۲/۰۶±۰/۲۴	۲/۹۳±۰/۲۴	۱/۳۳±۰/۴۷	۱/۰۳±۰/۱۷	۲/۰۹±۰/۲۹*	کنترل ۲
۰/۹۰±۰/۲۹	۱/۲۴±۰/۴۳	۰/۹۶±۰/۳۰	۰/۵۷±۰/۵۰	۰/۰۹±۰/۲۹*	تجربی
<۰/۰۰۰۱**	<۰/۰۰۰۱**	<۰/۰۰۱**	<۰/۰۰۰۱**	<۰/۰۰۰۱**	P ارزش

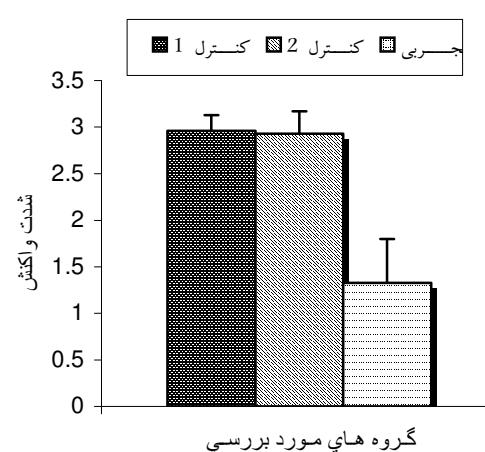
*=Mean ± SEM

** = p<0.05 = Significant



نمودار ۲. مقایسه میانگین واکنش ها در آکروزم اسپرماتید طویل به WGA در گروه های مختلف مورد بررسی. تفاوت بین گروه های کنترل با گروه تجربی معنی دار است ($p<0.05$).

معنی دار واکنش ها به لکتین WGA می باشد (تصاویر ۳ و ۴) و می توان نتیجه گرفت که واستگی مزمن داروئی به مورفین باعث تغییر در گلیکوکانجوگیتهای حاوی این قند انتهائی و کاهش مقدار این قند انتهائی می گردد. وجود مقدار فراوان این قند در نمونه های طبیعی و اهمیت فوق العاده آن در ارتباط با اسپرماتوزنر به عنوان یک گیرنده سطحی و یا مهارکننده سایر گیرنده ها، ایجاد شارژ منفی در سطح سلولها، دخالت در میان کنش های سلولی (۲۲ و ۲۳)، بلوغ بعدی اسپرمها و حتی لقاح دارد، میتوان پیش بینی کرد که احتمالاً با کاهش میزان اسید سیالیک به دنبال تجویز مورفین از میزان لقاح کاسته شده و یا در توانایی باروری اختلال ایجاد شود.

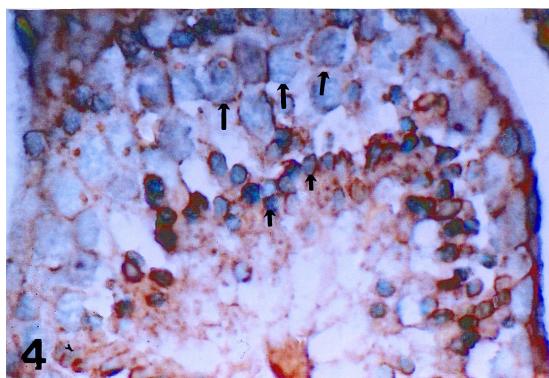


نمودار ۱. مقایسه میانگین واکنش ها در آکروزم اسپرماتید گرد به WGA در گروه های مختلف مورد بررسی. تفاوت بین گروه های کنترل با گروه تجربی معنی دار است ($p<0.05$).

در خصوص لکتین WGA وضعیت متفاوت بود و تفاوت معنی دار آماری بین سه گروه مشاهده گردید. به منظور مشخص شدن گروه هایی که این اختلاف میان آنها وجود دارد تست توکی انجام شد. نتایج تست توکی نشان داد که میانگین کلیه واکنشها به لکتین WGA بین گروه های کنترل ۱ و ۲ در مقایسه با گروه تجربی، تفاوت معنادار آماری دارد (تصاویر ۳ و ۴)، در حالیکه هیچیک از تفاوت های بین گروه های کنترل ۱ و ۲ با یکدیگر معنی دار نبودند. نتایج مربوط به این لکتین در جدول (۱) و نمودارهای (۳ و ۴) آمده است.

بحث و نتیجه گیری

مقایسه گروه های کنترل با گروه تجربی نشان دهنده کاهش



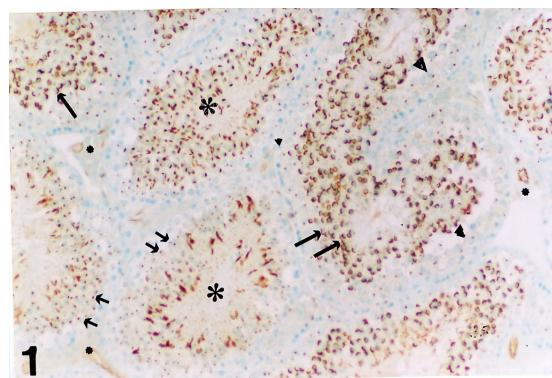
تصویر ۴. بخشی از مقطع عرضی یک لوله منی ساز درموشی که مورفین دریافت کرده است. رنگ آمیزی شده با WGA و آلسین بلو، $\times 1000$. فلش‌های بلند: اسپرماتوسیت اولیه، فلش‌های کوتاه: اسپرماتید، شدت واکنش‌ها در نمونه‌های مورفینی کاهش نشان میدهد.

در بسیاری از موارد پاتولوژیک منجر به نایاروری نیز کاهش

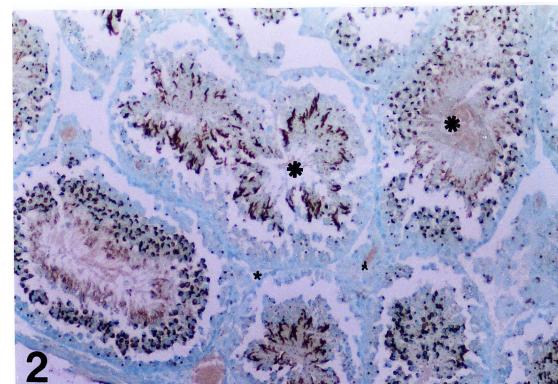
مقدار اسید سیالیک یکی از تغییراتی است که گزارش شده است و می‌تواند تایید کننده ارتباط و نقش اسید سیالیک در توانائی باروری باشد(۱۵و۲۴). در حالیکه در میزان گیرنده‌های لکتینهای PNA باشد ($\times 20$). یعنی دی ساکارید گالاکتوز- ان استیل SBA (تصویر ۱و۲). یعنی دی ساکارید گالاکتوز- ان استیل گالاکتوز‌آمین و قند انتهائی ان - استیل گالاکتوز آمین تغییری مشاهده نمی‌شود. عدم واکنش به لکتین LTA در نمونه طبیعی نشان می‌دهد که قند انتهائی فوکوز در ارتباط با اسپرما توزن، احتمالاً نقشی به عهده ندارد و وابستگی مزمن به مورفین نیز تغییری در این وضعیت ایجاد نمی‌کند. از آنجاییکه تا کنون هیچ مطالعه‌ای در ارتباط با اثرات مورفین و یا سایر مواد مخدر دیگر بر گلیکوکانجوگیتهای بافت بیضه انجام نشده است، تا بتوان نتایج بدست آمده را با آنها مقایسه نمود، پیشنهاد می‌گردد تا در مطالعات آینده با استفاده از سایر حیوانات آزمایشگاهی، فیکساتیوهای دیگر، لکتینهای دیگر که برای سایر قندهای انتهائی اختصاصی هستند و یا حتی بررسی اثر مورفین بر گلیکوکانجوگیتها با استفاده از روش‌های دیگری به جز لکتین هیستوشیمی، این بررسی تکرار گردد.

تقدیر و تشکر

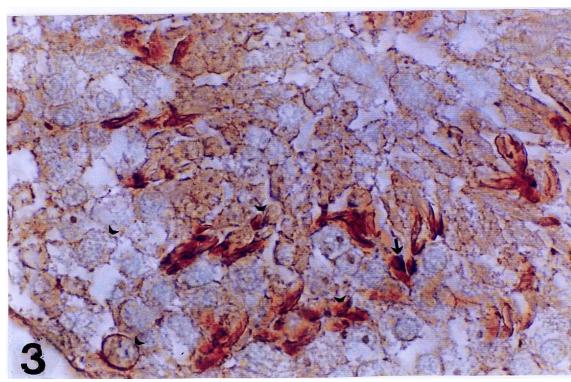
بدینوسیله از حمایت مالی و همکاری معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد و همچنین از خدمات فنی خانم متعدد در امرکمک به انجام کارهای آزمایشگاهی تقدیر می‌شود.



تصویر ۱. مقطع لوله‌های منی ساز دریک موش طبیعی. رنگ آمیزی شده با آلسین بلو و لکتین SBA $\times 200$. پیکان کوتاه: اسپرماتید گرد در ابتدای اسپرمیوژن، پیکان بزرگ: اسپرماتید گرد در انتهای تکامل خود، سرفلش کوچک: سلول اسپرماتوکوئنی، ستاره کوچک: بافت بینابینی، ستاره بزرگ: مجرای لوله منی ساز



تصویر ۲. مقطع لوله‌های منی ساز درموشی که مورفین دریافت کرده است. رنگ آمیزی شده با آلسین بلو و لکتین SBA $\times 200$. ستاره کوچک: بافت بینابینی، ستاره بزرگ: مجرای لوله منی ساز، همانطور که مشاهده می‌شود از شدت واکنش در سلولها در مقایسه با بافت طبیعی کاسته نشده و تغییری مشاهده نمی‌شود.



تصویر ۳. بخشی از مقطع عرضی یک لوله منی ساز دریک موش طبیعی، رنگ آمیزی شده با لکتین WGA و آلسین بلو، $\times 1000$. فلش‌های بلند: اسپرماتوسیت اولیه، فلش‌های کوتاه: اسپرماتید.

References

- Mokri A. Brief overview of the status of drug abuse in Iran. *Arch Iranian Med* 2002; 5(3): 184-90.
- Patil S, Patil S, Londonkar R, Patil SB. Effect of pethidine on spermatogenesis in albino rats. *Indian J Pharmacol* 1998; 30(1): 249-53.
- Cicero TJ, Davis LA, LarRegina MC, Meyer ER, Schlegel MS. Chronic opiate exposure in the male rat adversely affected fertility. *Pharmacol Biochem Behav* 2002; 72(1-2): 157-63.
- Siddiqui A, Haq S, Shaharyar S, Haider SG. Morphine induces reproductive changes in female rats and their male offspring. *Reprod Toxicol* 1995; 9(2): 143-51.
- Akama TO, Nakagawa H, Sugihara K, et al. Germ cell survival through carbohydrate mediated with sertoli. *Science* 2002; 295(5552): 53-4.
- Fujimoto H, Tadano Aritomi K, Tokumasu A, Ito K, Hikita T, Suzuki K, Ishizuka I. Requirement of seminolipid in spermatogenesis revealed by UDP-galactose: ceramide galactosyltransferase deficient mice. *J Biol Chem* 2000; 275(30): 22623-6.
- Montreuil J, Vliegenthart JFG, Schachter H. Glycoproteins II, 1st ed, Amsterdam. Elsevier Science 1997; pp: 357-403.
- Takamia K, Yamamoto A, Furukawa K, et al. Complex gangliosides are essential in spermatogenesis of mice: possible roles in the transport of testosterone. *Biochemistry* 1998; 95(21): 12147-52.
- Soderstrom KO, Malmi R, Karjalainen K. Binding of fluorescein isothiocyanate conjugated lectins to rat spermatogenetic cells in tissue sections. Enhancement of lectin fluorescence obtained by fixation in Bouin's fluid. *Histochemistry* 1984; 80(6): 575-9.
- Arya M, Vanha Perttula T. Distribution of lectin binding in rat testis and epididymis. *Andrologia* 1984; 16(6):495-508.
- Arya M, Vanha Perttula T. Lectin binding pattern of bull testis and epididymis. *J Androl* 1985; 6(4): 230-42.
- زمان سلطانی ف، محمودیان ر، علوی ح، فاضل ع ر. بررسی لکتین هیستوشیمیایی گلیکوکانجوگیت های اپیتلیوم منی ساز در موش. مجله علوم تشريح ايران ۱۳۸۲؛ ۵: ۳۷-۲۹.
- زمان سلطانی ف، محمودیان ر، علوی ح، فاضل ع ر. بررسی توزیع طبیعی اسید سیالیک دروند اسپرماتوژن موش. علوم پایه پزشکی ایران ۱۳۸۲؛ ۶ (۲): ۵۴-۱۴۹.
- Malmi R, Kallajoki M, Suominen J. Distribution of glycoconjugates in human testis. A histochemical study using fluorescein- and rhodamine- conjugated lectins. *Androl* 1987; 19(3): 322-32.
- Gheri G, Sgambati E, Thyron GD, Vichi D, Orlandini GE. The oligosaccharidic content of the glycoconjugates of the prepubertal descended and undescended testis: Lectin histochemical study. *Ital Anat Embryol* 2004; 109(2): 69-84.
- Kest B, Palmese CA, Hopkins E, Adler M, Juni A. Assessment of acute and chronic morphine dependence in male and female mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2001; 70(1): 149-56.
- Fazel A, Schulte B, Thompson R. Lectin histochemistry of the embryonic heart: Fucose specific lectin binding sites in developing rats and chicks. *Am J Anat* 1989; 184(1): 76-84.

18. Bancroft JD, Gamble M. Theory and practice of histological techniques, 5th ed. New york, Churchill Livingstone 2002; pp: 86-8, 761.
19. Gotz W, Qondumatteo F. Glycoconjugate distribution in early human notochord and axial mesenchyme. *Acta Histochem* 2001; 103(1): 21-35.
20. Ganji FC, Fazel AR. Lectin binding pattern in the microenvironment of the mouse developing T-cell. *Ir Biomed J* 2003; 7(1): 19-22.
21. Burkett BN, Schulte BA, Spicer SS. Histochemical evaluation of glycoconjugates in the male reproductive tract with lectin-horseradish peroxidase conjugates. *Am J Anat* 1987; 178(1): 23-9.
22. Ertl C, Wrobel KH. Distribution of sugar residues in the bovine testis during postnatal ontogenesis demonstrated with lectin-horse radish peroxidase conjugates. *Histochemistry* 1992; 97(2): 161-7.
23. Russinova AI, Atanassova NN, Paskaleva ML, Kancheva LS. Acrosomal component of rat round spermatids recognized by a novel monoclonal antibody. *Endocr Regul* 1998; 32(3): 155-9.
24. Gupta RS, Bhatnager AK, Joshi YC, Sharma R, Sharma A. Effects of Plumieride, an iridoid on spermatogenesis in male albino rats. *Phytomedicine* 2004; 11(2-3): 169-74.