

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

علیرضا محمودیان^{۱*}، فرزانه زمان سلطانی^۲، سیدحسین 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 در بیضه و باروری میگردد. ازسوی دیگر نقش حیاتی گلیکوکانجوگیتها در اسپرماتوژنز 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 گلیکوکانجوگیتهای بیضه انجام شد.

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

یافته ها: میانگین شدت واکنش به لکتین (WGA) Wheat Germ Agglutinin که برای اسید سیالیک اختصاصی است، بین گروه تجربی و گروه های شاهد و در کلیه سلولها، تفاوت معنی دار نشان داد ($p < 0.05$). درمورد سایر لکتینها که برای قندهای فوکوز، ان - استیل گالاکتوز آمین و دی ساکارید گالاکتوز - استیل گالاکتوز 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 اسپرماتوژنز، می توان پیش بینی کرد که به دنبال کاهش محتوای اسید سیالیک، فرآیند اسپرماتوژنز دستخوش تغییرات نامطلوبی شده و از میزان لقاح کاسته خواهد شد.

واژه های کلیدی: اسپرماتوژنزیس، مورفین، گلیکوکانجوگیتها، اسید سیالیک، لکتینها.

مقدمه

اعتیاد 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

بیضه ها، کاهش قطر لوله های منی ساز و مهار فرآیند اسپرماتوژنز شده است (۲). در بررسی دیگر، تزریق مورفین به رتهای نر منجر به کاهش معنی دار وزن بیضه ها، سمینال وزیکول 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

گرفته اند، نیز دچار آسیب هائی نظیر فیبروز و آتروفی لوله های منی ساز، از بین رفتن سلولهای 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 اسپرماتوژنز می باشند. گلیکوکانجوگیتها و به ویژه قندهای انتهائی آنها نقشی اساسی در چسبیدن سلولهای زایا به سلولهای سرتولی(۵)، تشکیل آکروزوم و غشاء سلولی، تکثیر و تمایز سلولهای زایا(۶) و حیات اسپرم(۵) دارند. مطالعات گسترده ای در خصوص اهمیت و نقش گلیکوکانجوگیت ها در فرآیند اسپرماتوژنز 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 ساز سمینولیپید نبودند و مشاهده کردند که در این موشها اسپرما توژنز در انتهای مرحله پاکتین ختم شده و سلولهای اسپرماتوژنیک دچار دژنراسیون 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 موشهایی که انتقال این قند به پیش ساز گانگلیوزیدها صورت نمی گیرد، سطح سرمی تستوسترون پائین بوده درحالیکه در سلولهای 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

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

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 توزین به طور تصادفی به سه گروه کنترل ۱ یا گروه طبیعی (Intact)، کنترل ۲ یا گروهی که سرم فیزیولوژی دریافت کردند(Sham) و گروه تجربی (Experimental) که سولفات مورفین دریافت کردند، تقسیم شدند. تمامی حیوانات در شرایط استاندارد از نظر درجه حرارت (22 ± 2 درجه سانتیگراد)، رطوبت(۵۰٪)، ۱۲ ساعت روشنائی و تاریکی متناوب و دسترسی آزاد به آب و مواد غذائی، نگهداری شدند.

ایجاد وابستگی دارویی مزمن: میزان و نحوه تزریق مورفین براساس جدول مقیاس بندی دوز و پروتکل های ارائه شده در منابع موجود تعیین گردید(۱۶). به این ترتیب که تزریق سولفات مورفین در ۷ روز متوالی و به ترتیب دوزهای ۲۰، ۴۰، ۸۰، 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 درروز به حیوانات تزریق گردید(۱۶). جهت کنترل و اطمینان از ایجاد وابستگی دارویی درحیوانات در روز هشتم مقدار ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم نالوکسان به صورت زیر پوستی

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 قند 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 واکنش ها بر اساس مطالعات Arya (۱۰ و ۱۱) و Burkett (۲۱) انجام شد.

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

یافته ها

آنالیز واریانس داده های حاصل از لکتینهای LTA، SBA، PNA و مقایسه سه گروه با هم تفاوت معناداری بین میانگین های شدت واکنش ها را نشان نداد. در مورد لکتین LTA به طور کلی هیچ گونه واکنشی در بافت بیضه مشاهده نشد. این عدم واکنش در مورد هر سه گروه مورد بررسی مشاهده گردید. در مورد لکتین SBA که واکنش های 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 اسپرماتوگونی واکنشی مشاهده نشد و واکنش ها در اسپرماتوسیتها اولیه ظاهر شده و با پیشروی فرآیند اسپرمیوژن در میزان واکنش ها به ویژه در ناحیه آکروزمی سلول ها افزایش مشاهده شد. در مراحل انتهائی اسپرمیوژن و بلوغ اسپرم ها، شدت این واکنش ها کاهش نشان می داد. در هر سه گروه همین الگوی واکنش مشاهده گردید (تصاویر ۱ و ۲). واکنش به لکتین MPA مشابه با SBA بود با این تفاوت که به طور کلی شدت واکنش ها 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 پشهائی که در آن چهار دست و پای حیوان همزمان از سطح افقی فاصله می گیرد به عنوان علامت وابستگی دارویی و سندرم 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، بیضه ها خارج و به مدت ۴۸ ساعت در فیکساتیو B4G قرار گرفتند. B4G شامل شش درصد کلرید مرکوریک، یک درصد گلو تارالدئید و یک درصد استات سدیم می باشد. pH این محلول باید ۶ باشد (۱۷). پس از فیکساسیون مراحل آماده سازی معمولی یعنی آب گیری در الکلهای صعودی، شفاف سازی در گزلیل، آغشته سازی و قالب گیری با پارافین را طی کرده و از بلوک های پارافینی به دست آمده برشهای ۵ میکرونی تهیه شد (۱۸).

مقاطع، به منظور برداشتن کامل املاح مرکوریک موجود در فیکس B4G به مدت ده دقیقه در محلول Alcoholic Iodine قرار گرفتند. سپس برای خنثی کردن پراکسیدازهای با منشأ داخلی (Endogenous Peroxidases) به مدت ۴۵ دقیقه در محلول ۱٪ آب اکسیژنه درمتانول 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 (۲۰ و ۱۷). لکتینها به صورت کونژوگ با *Horse Radishe Peroxidase* (HRP) از شرکت Sigma -Aldrich خریداری شده بود. پس از گذشت ۲ ساعت، کلیه لامها با بافر فسفات سالین شسته و به مدت ده دقیقه در مجاورت Diaminobenzidine (DAB) با غلظت ۰/۰۳ با غلظت ۰/۰۳ گرم در صد سی سی بافر فسفات که به آن ۲۰۰ میکرو لیتر آب اکسیژنه افزوده شده، قرار گرفتند. از آنجائیکه اتصال لکتین به قند انتهائی قابل مشاهده نیست، از DAB استفاده می شود. با اتصال این ترکیب به HRP در مجاورت H_2O_2 رنگ قهوه ای ظاهر می شود. از آنجائیکه HRP نیز به لکتین متصل است، به طور غیر مستقیم محل اتصال به قندها مشخص می گردد. سپس کلیه لامها به مدت پنج دقیقه در محلول آلسین بلو با pH ۲/۵ بمنظور ایجاد رنگ زمینه قرار گرفتند (۲۰ و ۱۷).

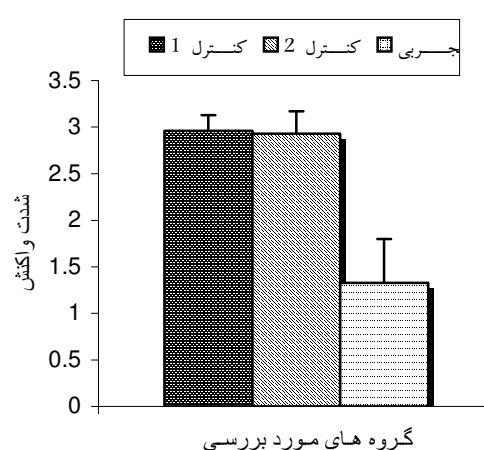
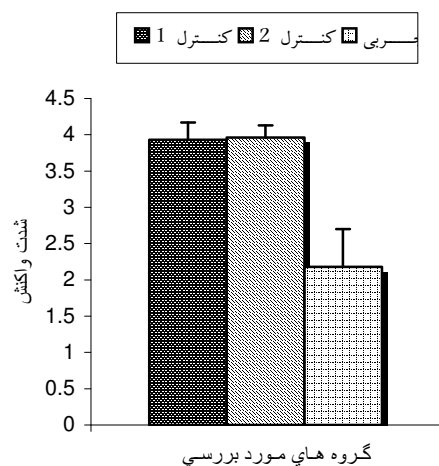
لکتین ها ی بکار برده شده در این مطالعه عبارتند از: Glycine Max Agglutinin (SBA) که برای قند انتهائی ان -

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

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

* = Mean ± SEM

** = p<0.05 = Significant



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

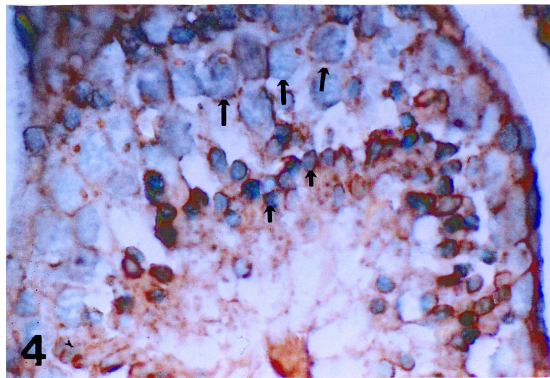
معنی دار واکنش ها به لکتین WGA می باشد (تصاویر ۳ و ۴) و می توان نتیجه گرفت که وابستگی مزمن دارویی به مورفین باعث تغییر در گلیکوکانجوگیتهای حاوی این قند انتهائی و کاهش مقدار این قند انتهائی می گردد. وجود مقدار فراوان این قند در نمونه های طبیعی و اهمیت فوق العاده آن در ارتباط با اسپرما توژنز به عنوان یک 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 اسپرماها 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 توانائی باروری اختلال ایجاد شود.

نمودار ۱. مقایسه میانگین واکنش ها در آکروزم اسپرما تید 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 هائی 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 (۲ و ۱) آمده است.

بحث و نتیجه گیری

مقایسه گروه های کنترل با گروه تجربی نشان دهنده کاهش

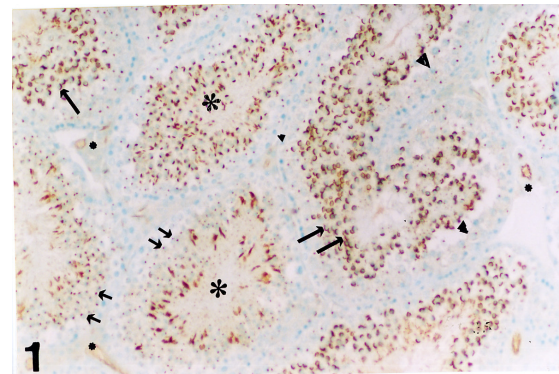


تصویر ۴. بخشی از مقطع عرضی یک لوله منی ساز درموشی که مورفین دریافت کرده است. رنگ آمیزی شده با WGA و آلسین بلو، ۱۰۰۰×، فلشهای بلند: اسپرماتوسیت اولیه، فلش های کوتاه: اسپرماتید. شدت واکنش ها در نمونه های مورفینی کاهش نشان میدهند.

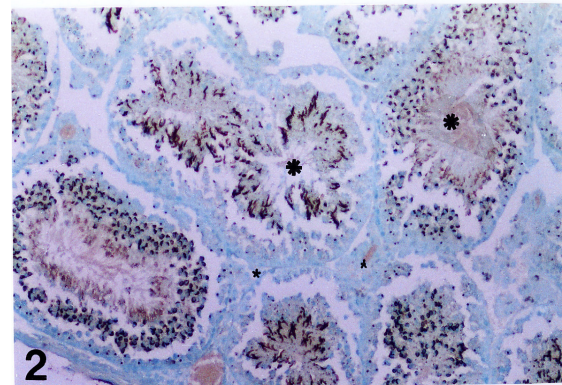
در بسیاری از موارد پاتولوژیک منجر به ناباروری نیز کاهش مقدار اسید سیالیک یکی از تغییراتی است که گزارش شده است و می تواند تایید کننده ارتباط و نقش اسید سیالیک در توانایی باروری باشد (۱۵ و ۲۴). درحالیکه در میزان گیرنده های لکتهای PNA، SBA (تصویر ۲ و ۱). یعنی دی ساکارید گالاکتوز- ان استیل گالاکتوزآمین و قند انتهائی ان - استیل گالاکتوز آمین تغییری مشاهده نمی شود. عدم واکنش به لکتهای LTA در نمونه طبیعی نشان می دهد که قند انتهائی فوکوز درارتباط با اسپرما توژنز، احتمالاً نقشی به عهده ندارد و وابستگی مزمن به مورفین نیز تغییری در این وضعیت ایجاد نمی کند. از آنجائیکه تا کنون هیچ مطالعه ای درارتباط 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 می گردد تا در مطالعات آینده با استفاده از سایر حیوانات آزمایشگاهی، فیکساتیوهای دیگر، لکتهای دیگر که برای سایر قندهای انتهائی اختصاصی هستند و یا حتی بررسی اثر مورفین بر گلیکوکانجوگیتهای با استفاده از روشهای دیگری به جز لکتهای هیستوشیمی، این بررسی تکرار گردد.

تقدیر و تشکر

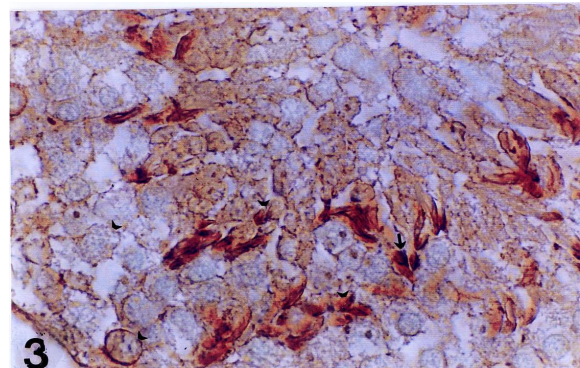
بدینوسیله از حمایت مالی و همکاری معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد و همچنین از خدمات فنی خانم متجدد در امر کمک به انجام کارهای آزمایشگاهی تقدیر می شود.



تصویر ۱. مقاطع لوله های منی ساز دریک موش طبیعی. رنگ آمیزی شده با آلسین بلو و لکتهای SBA ۲۰۰×، پیکان کوتاه: اسپرماتید گرد درابتدای اسپرمیوژنز، پیکان بزرگ: اسپرماتید گرد در انتهای تکامل خود، سرفلش کوچک: سلول اسپرماتوگونی، ستاره کوچک: بافت بینابینی، ستاره بزرگ: مجرای لوله منی ساز



تصویر ۲. مقاطع لوله های منی ساز درموشی که مورفین دریافت کرده است. رنگ آمیزی شده با آلسین بلو و لکتهای SBA ۲۰۰×، ستاره کوچک: بافت بینابینی، ستاره بزرگ: مجرای لوله منی ساز، همانطور که مشاهده میشود از شدت واکنش در سلولها درمقایسه 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 لکتهای WGA و آلسین بلو، ۱۰۰۰×، فلش های بلند: اسپرماتوسیت اولیه، فلش های کوتاه: اسپرماتید.

References

1. Mokri A. Brief overview of the status of drug abuse in Iran. Arch Iranian Med 2002; 5(3): 184-90.
2. Patil S, Patil S, Londonkar R, Patil SB. Effect of pethidine on spermatogenesis in albino rats. Indian J Pharmacol 1998; 30(1): 249-53.
3. 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.
4. 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.
5. Akama TO, Nakagawa H, Sugihara K, et al. Germ cell survival through carbohydrate mediated with sertoli. Science 2002; 295(5552): 53-4.
6. 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.
7. Montreuil J, Vliegenthart JFG, Schachter H. Glycoproteins II, 1st ed, Amsterdam. Elsevier Science 1997; pp: 357-403.
8. 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.
9. Soderstrom KO, Malmi R, Karjalainen K. Binding of fluorescein isothiocyanate conjugated lectins to rat spermatogenic cells in tissue sections. Enhancement of lectin fluorescence obtained by fixation in Bouin's fluid. Histochemistry 1984; 80(6): 575-9.
10. Arya M, Vanha Perttula T. Distribution of lectin binding in rat testis and epididymis. Andrologia 1984; 16(6):495-508.
11. Arya M, Vanha Perttula T. Lectin binding pattern of bull testis and epididymis. J Androl 1985; 6(4): 230-42.
۱۲. زمان سلطانی ف، محمودیان ع ر، علوی ح، فاضل ع ر. بررسی لکتین هیستوشیمیایی گلیکوکانجوگیت های اپیتلیوم منی ساز در موش. مجله علوم تشریح ایران ۱۳۸۲؛ ۵: ۲۷-۲۹.
۱۳. زمان سلطانی ف، محمودیان ع ر، علوی ح، فاضل ع ر. بررسی توزیع طبیعی اسید سیالیک در روند اسپرماتوژنز موش. علوم پایه پزشکی ایران ۱۳۸۲؛ ۶(۲): ۵۴-۱۴۹.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.

* آدرس نویسنده مسئول: مشهد، دانشگاه علوم پزشکی، گروه علوم تشریح، تلفن: ۰۵۱۱-۸۵۴۴۰۸۱-۴

arm@yahoo.com