مقاله تحقیقی

بررسی لکتین هیستوشیمیایی گلیکوکانجوگیتهای اپی‌تلیوم منی‌ساز در موش

فرزانه زمان‌سلطانی M.Sc.*، علیرضا محمودیان Ph.D.*، حسن علوی Ph.D.*، علیرضا فاضل Ph.D.*

* گروه علوم تشریح دانشگاه علوم‌پزشکی مشهد

تاریخ وصول: بهمن ماه ۸۲، تاریخ پذیرش: اسفند ماه ۸۲

چکیده

هدف: تعیین الگوی طبیعی توزیع گلیکوکانجوگیتهای دارای قندهای انتهایی خاص در لوله‌های منی ساز موش با استفاده از روش لکتین هیستوشیمی.

مواد و روشها: نمونه‌های بیضه از ۱۵ موش سالم بارور تهیه شد. پس از تثبیت و طی مراحل معمول آزمایشگاهی، از بلوک‌های پارافینی برشهای ۵ میکرومتری تهیه شد. برای تعیین حضور گلیکوکانجوگیت‌ها در لوله‌های منی ساز روش لکتین هیستوشیمی مورد استفاده قرار گرفت. برای این‌کار هفت لکتین کونژوگه با پراکسیداز به‌کار برده شد.

یافته‌ها: در سلولهای اسپرماتوگونی هیچ نوع واکنشی نسبت به لکتینها مشاهده نشد. واکنش به لکتین‌های (Peanut agglutinin) PNA، MPA (Madura pamifera agglutinin)، SBA (Soybean agglutinin) و VVA (Vicia villasa agglutinin) در غشا، سیتوپلاسم و گرانولهای پیش آکروزومی اسپرماتوسیت اول ظاهر شده و در اسپرماتیدهای اولیه بر شدت آن افزوده شد. از شدت واکنش در اسپرماتیدهای انتهایی کاسته شد. لکتین LTA هیچ واکنشی در سلولهای زایا ایجاد نکرد. واکنش در سلولهای سرتولی فقط نسبت به لکتین‌های MPA و PNA ملاحظه شد.

نتیجه‌گیری: قندهای انتهایی گالاکتوز ان‌استیل گالاکتوز آمین در سیتوپلاسم، غشا و آکروزوم سلولهای زایای پس از اسپرماتوگونیا به مقدار فراوانی وجود دارند که نقش احتمالی و مهم آنها در تمایز و تکامل این سلولها را مطرح می‌کند. به نظر می‌رسد این قندها در مراحل انتهایی تکامل اسپرماتید به منظور حفاظت توسط اسید سیالیک پوشانده می‌شوند و در نتیجه از شدت واکنشها کاسته می‌شود. شدیدترین واکنشها در آکروزوم سلولهای زایا ملاحظه شد.

واژه‌های کلیدی: اسپرماتوژنز، لکتین، گلیکوکانجوگیت، بیضه

مقدمه

اسپرماتوژنز فرایندی است که در آن سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی در قاعده لوله‌های منی ساز تقسیم شده، تمایز می‌یابند تا در نهایت در سطح آزاد لوله‌های منی ساز به اسپرماتوزآ تبدیل شوند [۱] که بالغ متعاقب آنها در اپیدیدیم به اسپرم متحرکی تبدیل می‌شوند که قادر به بارور ساختن تخمک هستند [۲]. غشای پلاسمایی این سلولها در طول اسپرماتوژنز دچار تغییراتی شده و ویژگیهای متفاوتی کسب می‌کنند که در حین عبور از اپیدیدیم نیز ادامه می‌یابد [۲].

در میان فاکتورهای تعیین کننده و مهم در تمایز و میان کنشهای سلولی در طول اسپرماتوژنز پستانداران که شامل تکثیر میتوزی، میوزی، تغییرات بارز شکل سلول و اتصال شدید سلولهای زایا به سلولهای سرتولی در اپیتلیوم منی ساز می‌باشد، می‌توان از گلیکوکانجوگیتها نام برد [۳]. این ترکیبات در تمایز سلولی بسیاری از سیستمهای بیولوژیکی دخالت داشته و در سایر اعمال نظیر پینوسیتوز و تکثیر نیز احتمالاً نقش دارند [۳]. گلیکوکانجوگیتهای سطح سلول عوامل تعدیل کننده‌ای هستند که از دسترسی لیگاندها به گیرنده‌های غشا جلوگیری می‌کنند و خود نیز به‌عنوان گیرنده‌های ویژه می‌توانند

آدرس مکاتبه: مشهد، دانشگاه علوم‌پزشکی مشهد، گروه علوم تشریح، کد پستی ۹۱۳۷۶ Email:Arm@yahoo.com

عمل کنند [۴]. در بیضه پستانداران، میزان زیادی گلیکوپروتئین ساخته می‌شود که در ارتباط با بازسازی و جایگزینی گلیکوپروتئین‌های غشای پلاسمایی، ساخت تنظیم شده و مقطعی آنزیم‌های آکروزومی و ترشح گلیکوپروتئین‌های خاص توسط اپیتلیوم اپیدیدیم است [۳]. بسیاری از آنزیم‌های آکروزومی گلیکوپروتئین هستند [۵]. در مورد عمل و تشکیل پلی ساکاریدهای آکروزوم اطلاعات کمی در دسترس است. عمل احتمالی آنها را با ظرفیت‌گیری اسپرم و فعال‌سازی آکروزوم مرتبط دانسته‌اند [۵].

سلولهای مذکور در پستانداران حاوی گلیکولیپیدی خاص به نام سمینولیپید است که منحصراً در لایه خارجی غشای اسپرم قرار دارد و یکی از نقش‌های آن را در ارتباط با اتصال اسپرم به منطقه شفاف تخمک مطرح کرده‌اند [۶]. در طول اسپرماتوژنز سمینولیپید که دارای بنیان قندی انتهایی گالاکتوز است به سرعت در فاز اولیه تکامل اسپرماتوسیت ساخته شده و در مراحل بعدی در سلول زایا باقی می‌ماند. این ساخت سریع و تنظیم شده عملی ویژه و احتمالاً ضروری را برای این گلیکوکانجوگیت در اسپرماتوژنز پیشنهاد می‌کند. در غیاب این ترکیب سیکل اسپرماتوژنز ناتمام مانده و سلولها دژنره و ناپدید می‌شوند [۷].

از گلیکوکانجوگیتهای مهم دیگر می‌توان به گانگلیوزیدهای پیچیده اشاره کرد که دارای بنیان قندی انتهایی انااستیل گالاکتوز آمین (GalNAc) و سیالیک اسید است و دارای نقش مهمی در فرایند اسپرماتوژنز هستند [۸]. موشهای جهش یافته‌ای که قادر به ساخت این ترکیبات نیستند، عقیم هستند. نقش این ترکیبات را در ارتباط با انتقال تستوسترون از لوله‌های منی ساز به سلولهای سرتولی و جریان خون می‌دانند [۸].

یکی از روشهای بسیار سودمند که برای ارزیابی و ردیابی گلیکوکانجوگیتها با قندهای انتهایی خاص مورد استفاده قرار می‌گیرد، لکتین هیستوشیمی است. لکتین‌ها در سال ۱۹۸۰ به‌عنوان پروتئین‌های متصل شونده به کربوهیدرات‌ها شناخته شدند که آنزیم یا آنتی‌بادی نیستند، سلولها را آگلوتینه کرده و باعث جداسازی و ته‌نشین شدن پلی‌ساکاریدها یا گلیکوکانجوگیتها می‌شوند [۹]. این ترکیبات تمایلی متفاوت برای اتصال به کربوهیدراتهای ویژه و اختصاصی داشته و ابزاری سودمند برای بررسی سطح سلول، پیگیری تمایز و تغییر شکل سلولی هستند. لکتین‌ها به‌صورت تجاری و خالص در دسترس هستند [۵]. از این ترکیبات به‌صورت کونژوگه با فلوروکرم‌ها، فرتین یا پراکسیدازها استفاده می‌شود [۲].

مطالعات متعددی در مورد اسپرماتوژنز با استفاده از لکتینها صورت گرفته که اکثراً با استفاده از سوسپانسیون سلولی صورت گرفته است. بررسی یافت بیضه به‌صورت مقاطع بافتی نیز در برخی از گونه‌ها با استفاده از لکتینهای کونژوگه با فلئورسئین ایزوسیانات [۵] و رودامین [۲] صورت گرفته، این بررسیها روی رت [۲و۵]، انسان [۱۰]، گاو [۱۱]، گراز [۱۲] صورت گرفته و درکلیه این مطالعات از تثبیت کننده بوئن برای استفاده شده و در هر یک نیز تعدادی معدود و خاص از لکتینها به‌کار برده شده است. بنابراین با توجه به این که طرح یا الگوی واکنش با لکتینهای مختلف کونژوگه با پراکسیدازها در موش تا کنون گزارش نشده است و همچنین استفاده از تثبیت کننده B4G [۱۵-۱۳] در لکتین هیستوشیمی بیضه تاکنون تجربه نشده است. نظر به اهمیت گلیکوکانجوگیتها برای تعیین الگوی طبیعی توزیع قندهای انتهایی در بیضه با استفاده از روش لکتین هیستوشیمی این بررسی صورت گرفت.

مواد و روشها

این بررسی روی ۱۵ موش مذکر بالغ و بارور از نژاد BALB/C با سنین ۲ تا ۴ ماهه، تهیه شده از مرکز سرم‌سازی رازی مشهد، انجام شد که در شرایط استاندارد از نظر درجه حرارت، تاریکی و روشنایی، غذا و آب قرار داشتند. تحت شرایط بیهوشی با کلروفرم، بیضه‌ها خارج و به‌مدت ۴۸ ساعت در تثبیت کننده B4G [۱۳و۱۴] قرار گرفتند. B4G شامل شش درصد کلرید مرکوریک، یک درصد گلوتارالدئید و یک درصد استات سدیم است. pH این محلول باید ۶ باشد [۱۵]. پس از تثبیت مراحل آماده‌سازی معمولی یعنی آب‌گیری در الکلهای صعودی، شفاف‌سازی در گزیلل، آغشته‌سازی و قالب‌گیری با پارافین را طی کرده و از بلوک‌های پارافینی به‌دست آمده برشهای ۵ میکرونی تهیه شد [۱۶-۱۳].

جدول ۱. انواع مختلف لکتین مورد استفاده در مطالعات هیستوشیمیایی

Lectin	Abbreveation	binding Carbohydrate specificity
Glycine max (soybean) agglutinin	SBA	β, α D-GalNAc
Arachis hypogaea (peanut) agglutinin	PNA	D-Gal-(β1-3)-D-GalNAc
Maclura pamifera agglutinin	MPA	Gal- (β1-3) - GalNAc
Vicia villosa agglutinin	VVA	GalNAc
Griffonia simplicifolia agglutinin	GSAI-B4	α-D-Gal
Lotus tetragonolobus agglutinin	LTA	L-fuc (α 1-3) GlcNAc
Ulex europeus agglutinin	UEA-I	L-fuc (a 1-2) Gal (β 1-4) Glc

گلوکز : Glc ، استیل‌گالاکتوز آمین : GalNAc ، گالاکتوز : Gal ، فوکوز : Fuc

مقاطعی که با B4G تثبیت شده بودند، به منظور برداشتن کامل املاح مرکوریک موجود در تثبیت کننده BAG به‌مدت ده دقیقه در محلول Alcoholic iodine قرار گرفتند [۱۳]. پس از شستشو به‌مدت نیم ساعت در محلول بافر فسفات سالین قرار گرفتند [۱۳]. روی هر لام چند قطره از لکتینهای ذکر شده در (جدول ۱)، رقیق شده با بافرفسفات به نسبت ۱:۱۰۰ ریخته شد [۱۴و۱۵]. این لکتین‌ها به‌صورت کونژوگه با HRP (Horse radish peroxidase) از شرکت سیگما خریداری شده بود. پس از گذشت ۲ ساعت، کلیه لامها با بافر فسفات سالین شسته و به‌مدت ده دقیقه در مجاورت Diaminobenzidine (DAB) با غلظت ۰/۰۳ گرم در صد سی‌سی بافر فسفات که به آن ۲۰۰ میکرولیتر آب اکسیژنه افزوده شده، قرار گرفتند. سپس کلیه لامها به‌مدت پنج دقیقه در محلول آلسین بلو با pH=۲/۵ به منظور ایجاد رنگ زمینه قرار گرفتند [۱۵-۱۳]. پس از آن مراحل معمول آزمایشگاهی برای آماده‌سازی لامها صورت گرفته و لامهای آماده شده با میکروسکوپ معمولی نوری مورد بررسی قرار گرفتند [۱۵-۱۳] براساس شدت واکنش در سلولهای مختلف نسبت به لکتین‌ها که به‌صورت رنگ قهوه‌ای ظاهر می‌شود و با استفاده از روش به‌کار برده شده در مطالعات [۲Arya] و Burkett [۱۷] نمرات منفی تا ۴+ برای هر یک منظور شد.

همان‌طور که جدول ۱ مشاهده می‌شود انواع مختلف لکتین که در مطالعات هیستوشیمیایی بیضه مورد استفاده قرار گرفتند [۲، ۵، ۹و ۱۸].

یافته‌ها

در سلولهای اسپرماتوگونی هیچ یک از لکتینهای استفاده شده واکنشی ایجاد نکردند (شکلهای ۱ تا ۶) در مورد اسپرماتوسیت اول SBA واکنشی به‌صورت نقطه کوچک واحد و منفردی در سیتوپلاسم به شدت (+۴) ایجاد کرد ولی در سیتوپلاسم فقط در مراحل انتهایی پاکیتن واکنشی ضعیف (+۱) در آنها مشاهده شده (شکلهای ۱و۲). لکتینهای PNA و MPA نیز واکنشی مشابه ایجاد کردند با این تفاوت که واکنش سیتوپلاسمی آنها در اسپرماتوسیت اول متوسط (+۲) بود (شکلهای ۳ تا ۶). VVA در نقاط مدور مشابه ذکر شده واکنشی قوی (+۳) ایجاد نمود.

در مورد اسپرماتیدها؛ نقاط مدور ذکر شده با شدت واکنش حداکثر (+۴) در اسپرماتیدهای گرد یا اولیه در واکنش به لکتینهای فوق نیز وجود داشت که با پیشرفت اسپرمیوژنز و تکامل اسپرماتیدهای گرد در مراحل بعدی به تدریج گسترش یافته و به‌شکل کلاهکی تبدیل می‌شوند (شکلهای ۱ تا ۶). این واکنشهای در ابتدای تشکیل اسپرماتید انتهایی یا طویل ادامه می‌یابد ولی از شدت واکنشها در مراحل انتهایی اسپرمیوژنز در مورد لکتینهای SBA،PNA و VVA کاسته می‌شود. در مورد سلولهای سرتولی؛ واکنش سیتوپلاسمی و غشایی ضعیف در پاسخ به PNA و متوسط تا قوی به MPA ملاحظه شد.

برای بررسی و نتیجه‌گیری راحت‌تر و سریعتر کلیه نتایج به‌دست آمده در جدول ۲ ارایه شده است.

جدول ۲. خلاصه‌ای از واکنش لکتین‌های متفاوت در سلولهای مختلف اپی‌تلیوم منی‌ساز

لکتین	سرتولی	اسپرماتوسیت I		اسپرماتید گرد		اسپرماتید انتهایی	
		سیتوپلاسم	نقطه سیتوپلاسمی	سیتوپلاسم	نقطه یا کلاهک	سیتوپلاسم	کلاهک سیتوپلاسمی
SBA	-	+	++++	++	++++	++	++
MPA	++	++	++++	++	++++	+++	++++
PNA	+	++	++++	++	++++	+	++
VVA	-	-	+++	+++	++++	-	+
GSA1	-	-	-	-	-	++	+++
LTA	-	-	-	-	-	-	-
UEA1	-	-	-	-	+++	-	-

-: منفی +: ضعیف ++: متوسط +++: قوی ++++: حداکثر

اسپرماتید گرد یا اولیه (round or early): از زمان تشکیل اسپرماتید تا مرحله ۱۸ اسپرمیوژنز

اسپرماتید انتهایی یا طویل (elongate or late): از مرحله ۹ تا ۱۹ اسپرمیوژنز را شامل می‌شود.

بحث

با توجه به اهمیت قندهای انتهایی در فرایند اسپرماتوژنز که به‌وسیله روشهای ژنتیکی و حیوانات آزمایشگاهی جهش یافته روشن شده است بررسی و تعیین الگوی طبیعی توزیع این قندها دربافتهای طبیعی ضروری به نظر می‌رسد. نتایج به‌دست آمده از این بررسی عدم واکنش سلولهای اسپرماتوگونی به کلیه لکتینهای به‌کار برده شده و ظهور این واکنش در اسپرماتوسیت اول و سلولهای تمایز یافته بعدی را نشان می‌دهد که خود گویای این مسأله است که گلیکوکانجوگیتها با قندهای انتهایی خاص در تکامل و تمایز این سلولها نقش دارند و ساخت این ترکیبات، تنظیم شده و وابسته به تکامل است [۷]. نقش این ترکیبات به‌عنوان گیرنده‌های سطح سلول [۴] یا عواملی که در تکثیر و تمایز سلولهای زایا دخالت دارند قبلاً مورد توجه قرار گرفته است [۳].

ظهور مناطقی مدور که شدیداً به لکتینها واکنش می‌دهند و تغییر شکل این نقاط به‌صورت هلالی که به تدریج صورت می‌گیرد تا در نهایت به آکروزومی شباهت می‌یابد که در اسپرماتید انتهایی دیده می‌شود، این احتمال را مطرح می‌سازد که این ساختمانهای مدور کوچک باید گرانولهای پیش آکروزومی باشند که با تکامل بیشتر سلولها به آکروزوم تبدیل می‌شوند. دستگاه گلژی در سلولهای زایا نقش مهم ساخت آکروزوم و آنزیم‌های آن را بر عهده داشته [۵و ۱۱] و گلیکوزیلاسیون اجزا و مورد سلولی در کمپلکس گلژی صورت می‌گیرد [۱۱و ۱۹]. ظهور واکنشها و ساختمانهای مدور پیش آکروزومی می‌تواند گویای این مسأله باشد که ساخت آنزیم‌های آکروزومی از زمان اسپرماتوسیت اول شروع می‌شود. در مطالعه صورت گرفته توسط Soderstrom [۵] روی رت نیز واکنشهای نقطه‌ای کوچک، آکروزوم در مراحل ابتدای تکامل و کلاهکی، آکروزوم تکامل یافته نامگذاری شده است. چنین تعابیری توسط Arya [۲] نیز مطرح شده است.

واکنش منفی کلیه سلولهای زایا به LTA با یافته‌های Arenas [۱۰] و همکارانش در مطالعه روی بافت بیضه انسان هماهنگی دارد. از این نتایج چنین استنباط می‌شود که قند فوکوز احتمالاً نقش چندانی در اسپرماتوژنز ندارد.

ظهور واکنش نسبت به لکتینهای VVA، SBA، PNA و MPA در اسپرماتوسیتهای اول و افزایش آن تا انتهای تکامل اسپرماتیدهای اولیه با کاهش قابل توجهی در اسپرماتیدهای انتهایی دنبال می‌شود. این الگو در مورد PNA در مطالعات Arya و Soderstrom نیز مشاهده شده است. این کاهش می‌تواند به دو دلیل باشد، دلیل اول عدم نیاز به نقش این ترکیبات قندی در مراحل انتهایی اسپرمیوژنز پس از ایفای نقش خود در تمایز سلولهای زایا و دوم پنهان شدن و پوشانده شدن آنها توسط اسیدسیالیک که خود یک قند انتهایی است. این قند تمایل شدیدی برای ماسک کردن قندهای دیگر دارد [۹]. از سوی دیگر میزان اسید سیالیک با پیشرفت فرایند اسپرماتوژنز افزوده می‌گردد و این افزایش در اپیدیدیم نیز ادامه می‌یابد [۲۰]. با توجه به این مطالب و نقش ذکر شده برای اسید سیالیک که آن را پوششی بر روی قندهای انتهایی دیگری می‌داند که می‌توانند نقش آنتی‌ژنی داشته و باعث از بین رفتن و توقیف اسپرم‌ها در مسیر تناسلی مؤنث شوند [۹] به نظر می‌رسد که کاهش واکنش بیشتر به‌دنبال پوشیده شدن توسط اسید سیالیک باشد.

به‌طور کلی ترکیبات قندی که با استفاده از این لکتینها در سلولهای زایا ردیابی شدند عبارتنداز اناستیل گالاکتوز آمین، گالاکتوز و به مقدار ناچیزی فوکوز و در سلولهای سرتولی نیز قندهای گالاکتوز اناستیل گالاکتوز آمین ردیابی شدند.

ظهور قندهای انتهایی گالاکتوز ان استیل گالاکتوزآمین در اسپرماتوسیت اول و افزایش آنها در اسپرماتید اولیه با پیدایش و افزایش میزان سمینولیپیدها در این سلولها همخوانی دارد و قطعاً بخشی از این قندها مربوط به این ترکیب خواهد بود. سمینولیپیدها دارای قند انتهایی گالاکتوز هستند [۷]. روشهای ایمنولوژیکی نشان داده‌اند که سمینولیپید در سطح اسپرماتوسیت اول و اسپرماتید گرد وجود دارد ولی روی اسپرماتوگونی در رت حضور ندارد [۷] که با یافته‌های تحقیق حاضر نیز هماهنگی دارد. موشهایی که به‌صورت ژنتیکی در ساخت سمینولیپید نقص دارند، عقیم هستند. در این موشها ژن سازنده آنزیم انتقال دهنده گالاکتوز به بخش چربی پیش‌ساز سمینولیپید دچار نقصان می‌شود [۷]. این نمونه اهمیت حیاتی این قند را در اسپرماتوژنز نشان می‌دهد.

تقدیر و تشکر

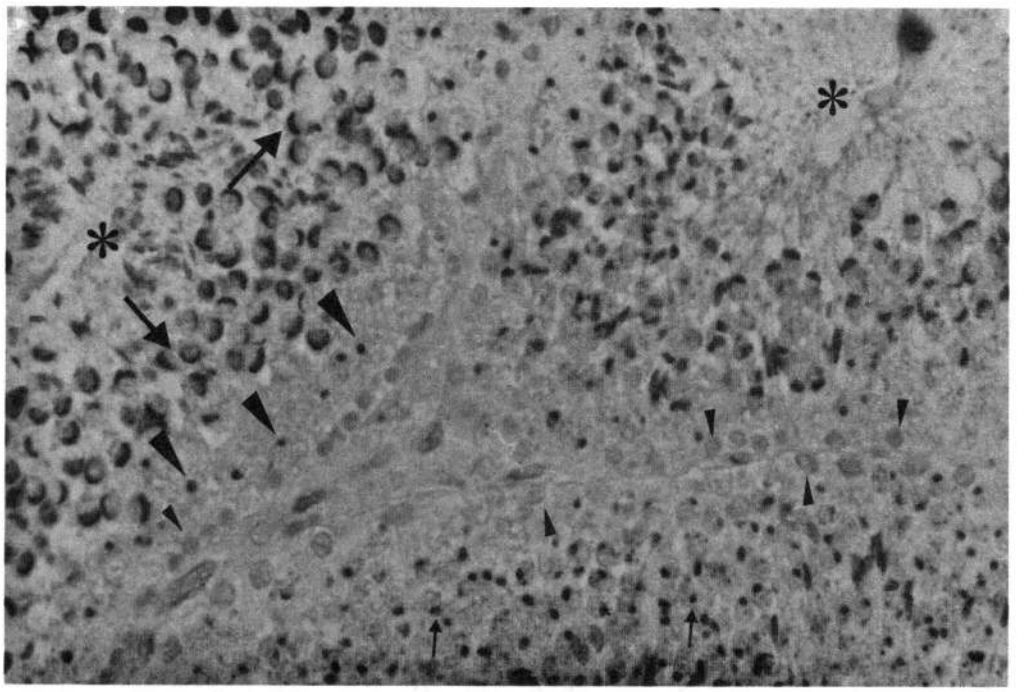
نویسندگان مقاله کمال تشکر و قدردانی خود را از حمایت مالی و همکاری‌های صمیمانه معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد ابراز می‌دارند. خدمات فنی خانم متجدد در امر کمک به انجام کارهای آزمایشگاهی نیز قابل تقدیر است.

References

1. **Weiss L.** Histology cell and tissue biology, Fifth edith, Elsevier science, New York, 1983, p 1004
2. **Arya M, Vanha-Perttula T.** Distribution of lectin binding in rat testis and epididimis, Andrologia. 1984; 16: 495-508
3. **Clarke FMB, Keyes S.** Identificatoin of spermatogenic cell plasma membrane glycoproteins by two dimensional electrophoresis and lectin blotting. J Cell Science. 1984; 65: 233-248
4. **Tomoya OA, Hioaki N, Kazuhiro S, Sonoko N.** Germ cell survival through carbohydrate mediated with sertoli cells. Science. 2002; 295: 124-127
5. **Soderstrom KO, Malmi R, Karjalainen K.** Binding of fluorescein isothiocyanate conjugated lectins to rat spermatogenic cels in tissue sections. Histochemistry. 1984; 80(6): 575-579
6. **Frits M, Barend MG.** Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. Biochem Biophys Acta. 2000; 1469: 197-235
7. **Fujimoto H, Tadano-Aritomi K, Tokumasu A, Ito K, Hikita T, Suzuki K, Ishizuka I.** Requirement of seminolipid in spermatogenesis revealed by UDP-galactose. J Biol Chem. 2000; 275(30): 22623-22626
8. **Takamia K, Yamamato A, Furukawa K, Zhao J, Fukumoto S, Yamashiro S, Okada M, Haraguchi M, Shin M, Kishikawa M, Shiku H, Aizawa S.** Complex gangliosides are essential in spermatogenesis of mice, possible roles in the transport of testosterone. Biochemistry. 1998; 95(21): 12147-12152
9. **Montreuil J, Vliegenthart JFG, Schachter H.** Glycoproteins II, Elsevier Science BV. Amsterdam, 1997, pp 403-455
10. **Arenas MI, Madrid JF, Bethencourt FR, Fraile B, Paiagua R.** Lectin histochemistry of the human testis. Int J Androl. 1998; 21(6): 332-342
11. **Ertl C, Wrobel K.** Distribution of sugar residues in the bovine testis during postnatal ontogenesis demonstrated with lectin-horse radish peroxidase conjugates. Histochmistry, 1992; 97(2): 161-171
12. **Calvo A, Pastor LM, Bonet S, Pinart E, Ventura M.** Chracterization of the glycocojugates of boar testis and epididymis. J Reprod Fertil. 2000; 120(2): 325-335
13. **فاضل علیرضا.** مطالعات هیستوشیمیایی ترکیبات قندی سطح سلولی لنفوسیت‌های T در روند تکامل جنینی. مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم‌پزشکی مشهد. ۱۳۷۴ ؛ جلد ۳۸ (شماره ۴۹): ۱۳-۳
14. **فاضل علیرضا، قربانی کلخواجه رستم.** نقش اختصاصی برخی از گلیکوکانجوگیت‌ها در تکامل اولیه جوانه اندام جنین. مجله علوم‌پایه پزشکی ایران. ۱۳۷۸ ؛ جلد ۲ (شماره ۳): ۱۶۵-۱۵۸
15. **نیکروش محمدرضا، فاضل علیرضا، جلالی مهدی.** از مزانشیم تا

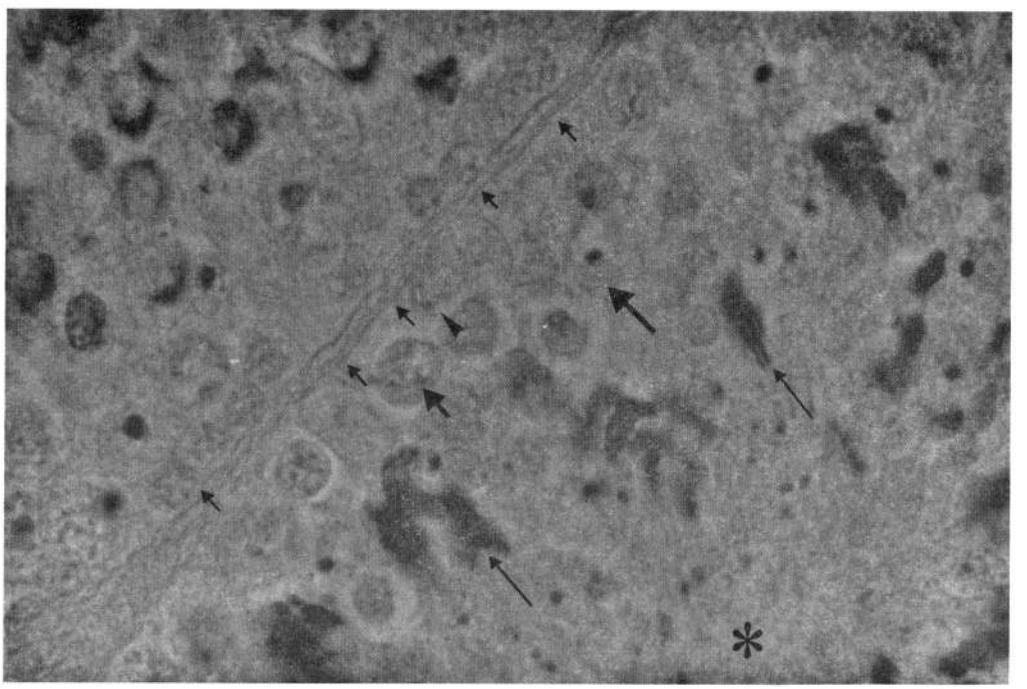
غضروف: مطالعات لکتین هیستوشیمی در مزانشیم ناحیه شکمی - داخلی لوله عصبی در طی رویان. مجله علوم‌پایه پزشکی ایران. ۱۳۸۰؛ جلد ۵ (شماره ۲): صفحات ۱۰۶-۱۰۰

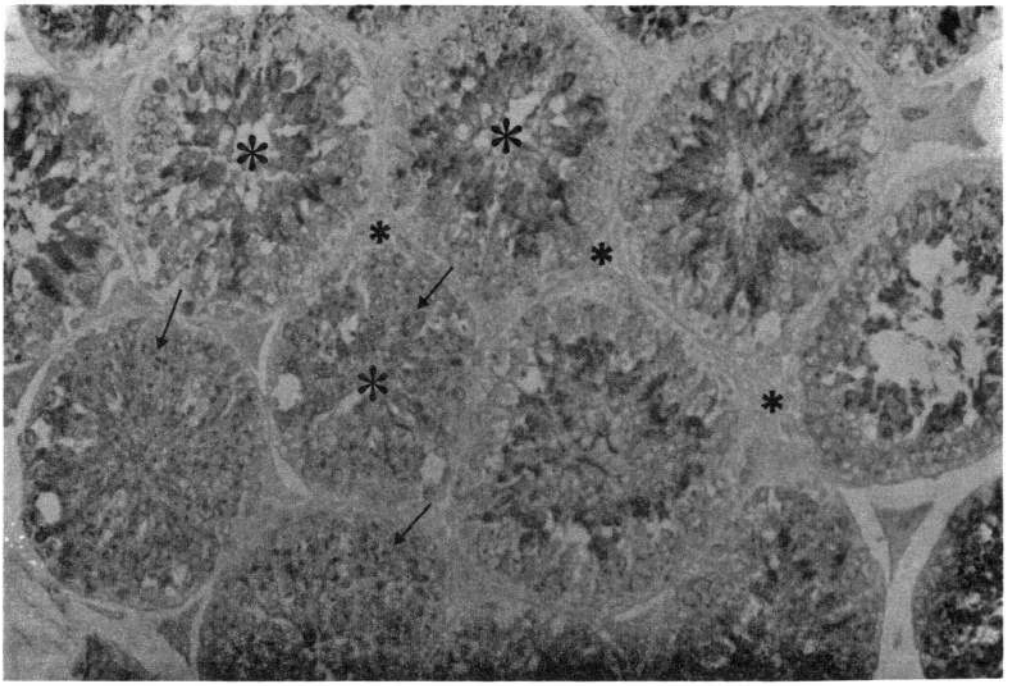
16. **Bancrof JD, Stevens A.** Theory and practice of histological techniques, 5nd edit, Churchill Livingstone, New York, 1991, pp. 20-82
17. **Burkett B, Schulte B, Spicer S.** Histochemical evalution of glycoconjugates in the male reproductive tract with lectin-horseradish peroxidase conjugates. The American Journal of Anatomy. 1987; 178: 23-29
18. **Saez FJ, Aparicio R, Alonso E, Hernandez F.** Glycan residues of N- and O- linked oligosaccarides in the premeiotic spermatogenic cells and of the urodele amphibian Pleurodeles Waltl. Characterized by means of lectin histochemistry. Tissue & Cell. 2000; 32(4): 302-311
19. **Alberts B, Johnson A, Lewis J, Roberts K, Watter P.** Molecular biology of the cell, Garland science, New York, 2002, pp. 620-635
20. **Magargee SF, Kunze E, Hammerstedt RH.** Changes in lectine binding features of ram sperm surfaces associated with epididymal maturation and ejaculation. Biol Reprod. 1988; 38(3): 667-685



شکل ۱. مقاطع عرضی لوله‌های منی‌ساز، رنگ‌آمیزی شده با SBA و آلسین بلو. ستاره : لومن لوله منی‌ساز، سرفلش کوچک: سلول اسپرماتوگونی، سرفلش بزرگ: اسپرماتوسیت I ، پیکان کوتاه: اسپرماتید گرد در ابتدای اسپرمیوژنز، پیکان بزرگ: اسپرماتید گرد در انتهای تکامل خود. بزرگنمایی: ۱۰۰۰ ×

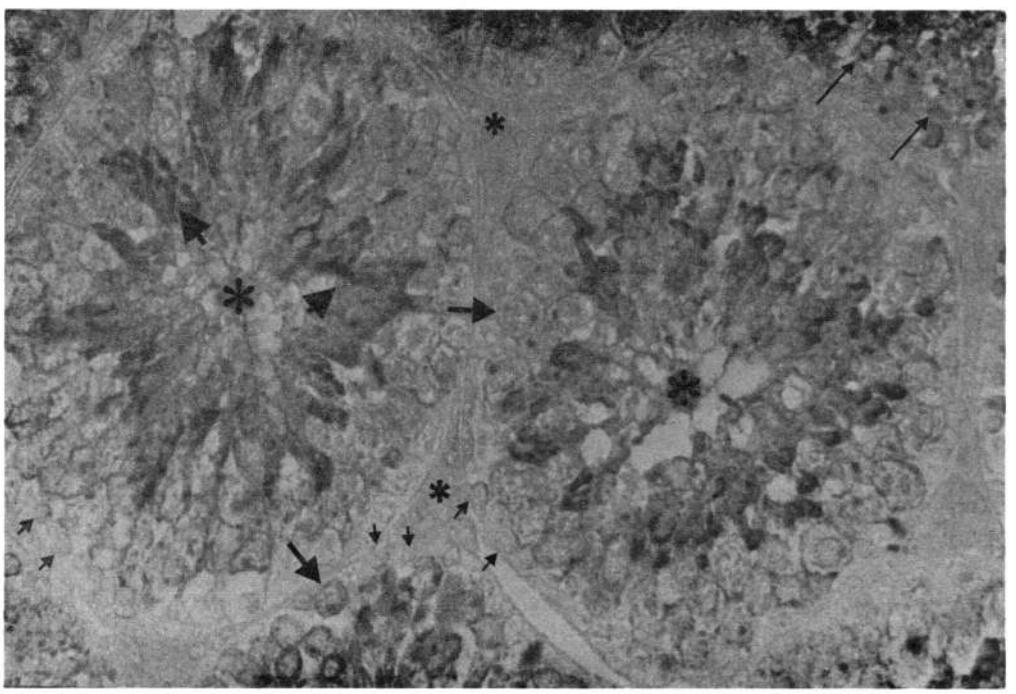
شکل ۲. بخشی از مقاطع عرضی دو لوله منی‌ساز، رنگ‌آمیزی شده با SBA و آلسین بلو. ستاره : لومن لوله منی‌ساز، سرفلش : سلول اسپرماتوگونی، پیکان متوسط: اسپرماتوسیت I ، پیکان بزرگ: اسپرماتید گرد، فلش کوچک بلند: اسپرماتید انتهایی در اواسط تکامل خود، فلش‌های کوچک: غشاء پایه لوله منی‌ساز. بزرگنمایی: ۲۵۰۰×

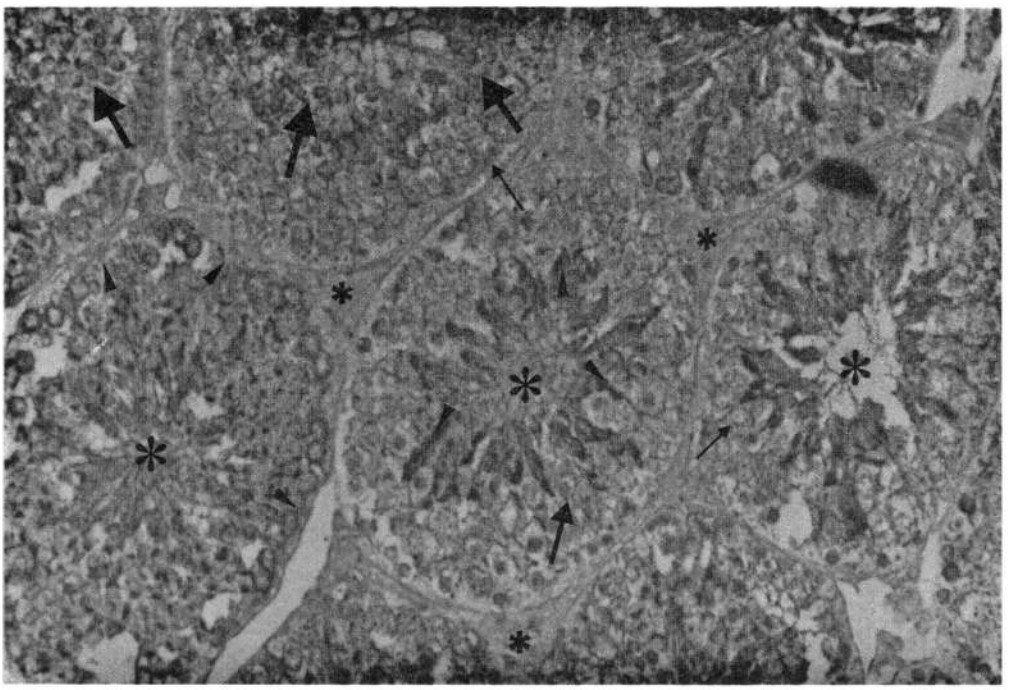




شکل ۳. مقاطع عرضی لوله‌های منی‌ساز، رنگ‌آمیزی شده با PNA و آلسین بلو. ستاره بزرگ: لومن لوله منی‌ساز، ستاره کوچک: بافت بینابینی، فلش بلند: اسپرماتید گرد در مراحل مختلف تکامل. بزرگنمایی: ۵۰۰ ×

شکل ۴. مقاطع عرضی لوله‌های منی‌ساز، رنگ‌امیزی شده با PNA و السین بلو. ستاره بزرگ: لومن لوله منی‌ساز، ستاره کوچک: بافت بینابینی، فلش کوچک: سلول اسپرماتوگونی، فلش بزرگ: اسپرماتوسیت I ، فلش بلند: اسپرماتید گرد، فلش پهن کوتاه: اسپرماتید انتهایی. بزرگنمایی: ۱۰۰۰ ×





شکل ۵. مقاطع عرضی لوله‌های منی‌ساز، رنگ‌آمیزی شده با MPA و آلسین بلو. ستاره بزرگ: لومن لوله منی‌ساز، ستاره کوچک: بافت بینابینی، فلش کوچک: اسپرماتوسیت I ، فلش متوسط: اسپرماتید گرد در ابتدای اسپرمیوژنز، فلش بزرگ: اسپرماتید گرد در انتهای تکامل، سرفلش: اسپرماتید انتهایی، سرفلش بزرگ: اسپرماتوگونی. بزرگنمایی: ۶۶۰ ×

شکل ۶. مقاطع عرضی لوله‌های منی‌ساز، رنگ‌آمیزی شده با MPA و آلسین بلو. ستاره بزرگ: لومن لوله منی‌ساز، ستاره کوچک: بافت بینابینی، فلش کوتاه پهن: اسپرماتوگونی، فلش باریک و بلند: اسپرماتوسیت I ، فلش بزرگ: اسپرماتید انتهایی، سرفلش: سرتولی. بزرگنمایی: ۱۳۳۰ ×