

## اثر وابستگی به مورفین بر گلیکوکانجوگه‌های اپیتلیوم اپیدیدیم در موش با استفاده از روش لکتین هیستوشیمی

دکتر علیرضا محمودیان\*؛ دکتر فرزانه زمان سلطانی\*\*؛ دکتر سیدحسن علوی\*؛ دکتر علیرضا فاضل\*

### چکیده

**سابقه و هدف:** مطالعات نشان داده‌اند که تجویز مواد مخدر در حیوانات باعث اختلالات فراوانی در باروری و غدد ضمیمه تناسلی می‌گردد. از سوی دیگر در بررسی‌های انجام‌شده بر نقش حیاتی گلیکوکانجوگیت‌ها در بلوغ اپیدیدیمی اسپرم‌ها تأکید شده است؛ لذا این مطالعه با هدف پاسخ دادن به این سؤال که آیا ممکن است تأثیرات نامطلوب مصرف مواد مخدر با ایجاد تغییرات در این گلیکوکانجوگیت‌ها که در بلوغ اسپرمی بسیار مهم هستند رخ دهد، انجام گردید. برای این منظور از لکتین‌ها استفاده شد که می‌توانند به طور اختصاصی قندهای انتهایی گلیکوکانجوگیت‌ها را شناسایی کنند.

**مواد و روش‌ها:** ۱۰۲ سر موش BALB/c مذکر و بالغ به سه گروه مساوی تقسیم شدند. به گروه تجربی سولفات مورفین و به گروه دیگر سرم فیزیولوژی تزریق شد. گروه سوم نیز بدون تغییر بررسی شد. وابستگی مزمن با تزریق زیر جلدی و به صورت سه بار در روز و به مدت ۷ روز ایجاد شد (دوز دارو در روزهای ۱ تا ۷ به ترتیب: ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۴۰، ۸۰، ۸۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود). سپس اپیدیدیم‌ها در هر سه گروه خارج شدند و بعد از تثبیت و طی مراحل معمول آزمایشگاهی از بلوک‌های پارافینی تهیه شده مقاطع ۵ میکرومتری به دست آمد. این مقاطع با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی شدند. شدت واکنش‌ها در سلول‌های مختلف، بر اساس مطالعات مرتبط قبلی رتبه‌بندی شد (نمره صفر برای عدم واکنش، ۱ برای واکنش ضعیف، ۲ برای واکنش متوسط و ۳ برای واکنش قوی در نظر گرفته شد). سپس نتایج با استفاده از آزمون آماري کراسکال والیس و دان با یکدیگر مقایسه شدند.

**یافته‌ها:** میانگین شدت واکنش به Wheat Germ Agglutinin (WGA)، اختصاصی برای قند اسیدسیالیک، بین گروه تجربی و گروه‌های شاهد و در کلیه سلول‌ها، تفاوت آماری معناداری نشان داد ( $P < 0.05$ ). در مورد سایر لکتین‌ها که برای ردیابی قندهای فوکوز، ان-استیل گالاکتوز آمین و دی ساکارید ان استیل گالاکتوز آمین - گالاکتوز به کار برده شدند، تفاوت معنادار آماری مشاهده نشد.

**نتیجه‌گیری:** کاهش واکنش به WGA، نشان‌دهنده کاهش میزان اسیدسیالیک در نمونه‌های تیمار شده با مورفین است. با توجه به اهمیت اسیدسیالیک در حفاظت اسپرم‌ها و بلوغ اپیدیدیمی آن‌ها، می‌توان پیش‌بینی کرد که به‌دنبال این کاهش، فرایند بلوغ اپیدیدیمی اسپرم‌ها دست‌خوش تغییرات نامطلوبی خواهد شد. تأثیر مورفین در محور هیپوتالاموسی - هیپوفیزی و ترشح هورمون‌های آزاد کننده گنادوتروپین‌ها، اثر مستقیم بر هیپوفیز و ترشح گنادوتروپین‌ها و یا تأثیر در عوامل تنظیم‌کننده موضعی می‌توانند از عوامل احتمالی بروز این تغییرات باشند.

**کلیدواژه‌ها:** مورفین - گلیکوکانجوگیت، اسید سیالیک، لکتین، اپیدیدیم موش «دریافت: ۱۳۸۳/۱۱/۳ پذیرش: ۱۳۸۴/۱۱/۱۸»

\*استادیار گروه علوم تشریحی و ژنتیک دانشگاه علوم پزشکی مشهد \*\*استادیار گروه علوم تشریحی دانشگاه علوم پزشکی قزوین

\*عهده‌دار مکاتبات: مشهد، خیابان دانشگاه، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریحی و ژنتیک. تلفن ۴-۸۵۴۴۰۸۱، فاکس ۸۵۹۱۹۲۲-۵۱۱

## مقدمه

اپیتلیوم اپیدیدیم و ترشحات آن در بلوغ اسپرم‌ها نقش حیاتی دارند. سلول‌های این اپیتلیوم، از نظر مورفولوژیک و هیستوشیمی متفاوت هستند (۱). این اپیتلیوم اکثراً از سلول‌های اصلی و قاعده‌ای و به تعداد کمتری از سلول‌های فلاسک یا باریک و روشن تشکیل شده است (۲ و ۳). در سلول‌های فلاسک و روشن مقدار فراوانی میتوکندری وجود دارد (۳). عمل سلول‌های فلاسک و روشن عمدتاً ناشناخته مانده است، ولی احتمالاً آن‌ها نیز در ترشح گلیکوکانجوگیت‌ها دخالت دارند (۲). پروتئینی به نام H(+)-ATPase نیز به مقدار فراوانی در این سلول‌ها وجود دارد. نقش این پروتئین را اسیدی کردن اپیدیدیم عنوان کرده‌اند که با مقدار فراوان میتوکندری‌ها در این سلول‌ها هماهنگی دارد (۴). سلول‌های قاعده‌ای ممکن است سلول‌های بنیادی برای ترمیم اپیتلیوم باشند (۵). نقش سلول‌های اصلی را جذب آب از برون‌ده بیضه و ترشح گلیکوکانجوگیت‌های مرتبط با بلوغ اسپرم‌ها می‌دانند. در ترشحات اپیدیدیم مقدار فراوانی گلیکوکانجوگیت وجود دارد. از جمله گلیکوپروتئین اسیدی اپیدیدیمی، گلیکوپروتئین ۴۹ (GP-49)، گلیکوپروتئین ۸۳ (GP-83) و آنتی‌ژن بلوغ اسپرم (Sperm Maturation Antigen-4) می‌باشند که در سطح اسپرم بالغ موش وجود دارد و در حین عبور از اپیدیدیم به آن افزوده می‌شود (۱). GP-49، GP-83 و SMA<sub>4</sub> دارای قند انتهایی اسید سیالیک می‌باشند (۱، ۶ و ۷). SMA<sub>4</sub> که به وسیله سلول‌های بخش پروگزیمال جسم اپیدیدیم ترشح می‌شود و در حین انتقال اپیدیدیمی به سطح تاژک اسپرم منتقل می‌گردد، از چسبیدن دم به دم

اسپرم‌ها در حین عبور یا ذخیره شدن در اپیدیدیم جلوگیری می‌کند (۴). نقش GP-83 و GP-49 در بلوغ اسپرم ناشناخته مانده است (۱). این دو گلیکوپروتئین که احتمالاً توسط سلول‌های اصلی جسم اپیدیدیم ترشح می‌شوند، در هنگام عبور اسپرم از اپیدیدیم به غشای سر اسپرم منتقل می‌گردند (۶).

در مورد قوچ نیز عبور اسپرم از اپیدیدیم و بلوغ آن با افزایش محتوای اسیدسیالیک اسپرم‌ها همراه است (۸). اسیدسیالیک نقش مهمی در پوشاندن نواحی آنتی‌ژنیک سطح اسپرم دارد و باعث حفاظت اسپرم‌ها در حین عبور از مسیر تناسلی مؤنث می‌شود.

یکی از روش‌های بسیار سودمند که برای ارزیابی و ردیابی گلیکوکانجوگیت‌ها با فندهای انتهایی خاص مورد استفاده قرار می‌گیرد، لکتین هیستوشیمی است. لکتین‌ها آنزیم یا آنتی‌بادی نبوده، سلول‌ها را آگلوتینه کرده و باعث ته‌نشین شدن پلی‌ساکاریدها یا گلیکوکانجوگیت‌ها می‌شوند (۹). لکتین‌ها تمایلات متفاوتی برای اتصال به کربوهیدرات‌های ویژه و اختصاصی دارند و ابزاری سودمند برای بررسی سطح سلول، پی‌گیری تمایز و تغییر شکل سلولی می‌باشند (۱۰).

از سوی دیگر، مطالعات صورت گرفته قبلی، عوارض نامطلوب مصرف مواد مخدر را بر باروری نشان داده‌اند. به عنوان نمونه تزریق پتدین به موش‌های مذکر، باعث کاهش تعداد اسپرم‌های ناحیه دم اپیدیدیم و کاهش وزن غدد جنسی فرعی می‌شود (۱۱). در یک بررسی با تزریق مورفین به موش‌های مذکر، کاهش وزن بیضه‌ها، سمینال وزیکول‌ها، اپیدیدیم و پروستات مشاهده شده است. در همین بررسی پس از ایجاد وابستگی مزمن دارویی در

۲- ایجاد وابستگی دارویی مزمن: میزان و نحوه تزریق مورفین براساس جدول مقیاس‌بندی دوز و پروتکل‌های ارائه‌شده در منابع موجود تعیین گردید (۱۴). به این ترتیب که تزریق سولفات مورفین در ۷ روز متوالی و به ترتیب روزها ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۴۰، ۸۰، ۸۰ و سرانجام ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت زیرجلدی انجام شد. مقدار دارو منقسم بر سه بخش و به صورت سه بار در روز به حیوانات تزریق گردید (۱۴). برای اطمینان از ایجاد وابستگی دارویی در حیوانات در روز هشتم مقدار ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم نالوکسان تزریق شد (۱۴). مشاهده پرش‌هایی که در آن چهار دست و پای حیوان همزمان از سطح افقی فاصله می‌گیرد، به عنوان یکی از علائم وابستگی و سندرم ترک در نظر گرفته شد. سولفات مورفین و نالوکسان از طریق معاونت دارو و غذای دانشگاه علوم پزشکی مشهد تهیه گردید. برای حذف تأثیر احتمالی استرس تزریق بر نتایج تحقیق، به گروه کنترل ۲ با حجم و دفعات مشابه، سرم فیزیولوژی تزریق گردید.

۳- آماده‌سازی بافت‌ها و تهیه برش‌های بافتی: تحت شرایط بیهوشی، اپیدیدیم‌ها 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 می‌باشد (۱۵ و ۱۶). سپس مراحل آماده‌سازی معمولی، یعنی آب‌گیری در الکل‌های صعودی، شفاف‌سازی در گزلیل، آغشته‌سازی و قالب‌گیری با پارافین را طی کردند و از بلوک‌های پارافینی به دست آمده برش‌های ۵ میکرونی تهیه شد (۱۷).

۴- روش لکتین هیستوشیمی: مقاطع، به منظور برداشتن کامل املاح مرکوریک موجود در فیکساتیو B4G

موش‌های مذکر و جفت‌گیری آن‌ها با موش‌های مؤنث سالم، کاهش تعداد جنین‌ها و افزایش مرگ و میر نوزادان آن‌ها گزارش شده است (۱۲).

در بافت بیضه سه نوع گیرنده اپیوئیدی به نام‌های Delta، Mu و Kappa شناسایی شده‌اند. این گیرنده‌ها نقش میانجی را در اعمال فیزیولوژیک و فارماکولوژیک پپتیدهای اپیوئیدی با منشأ داخلی و خارجی به عهده دارند (۱۳). گرچه این گیرنده‌ها در بیضه شناسایی شده‌اند، ولی در خصوص اپیدیدیم و سایر مجاری تناسلی مذکر گزارشی نیافتیم.

مکانیسم‌های مولکولی پدیدآورنده تأثیرات نامطلوب ذکر شده کاملاً ناشناخته مانده‌اند، لذا در پاسخ به این سؤال که آیا ممکن است تأثیرات نامطلوب مصرف مواد مخدر با ایجاد تغییرات در این گلیکوکانجوگیت‌ها رخ دهد، این مطالعه انجام گردید.

## مواد و روش‌ها

۱- حیوانات: تعداد ۱۰۲ سر موش مذکر بالغ از نژاد BALB/c تهیه‌شده از مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی مشهد در سنین ۲ تا ۴ ماهگی با وزن بین ۲۵ تا ۳۰ گرم انتخاب شدند. پس از توزین به‌طور تصادفی به سه گروه کنترل ۱ یا گروه طبیعی، کنترل ۲ یا گروهی که سرم فیزیولوژی دریافت کردند و گروه تجربی که سولفات مورفین دریافت کردند، تقسیم شدند. تمامی حیوانات در شرایط استاندارد از نظر درجه حرارت ( $22 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد)، رطوبت ( $50 \pm 5$ ٪)، ۱۲ ساعت روشنایی و تاریکی متناوب و دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند.

مجاورت  $H_2O_2$  به صورت رنگ قهوه‌ای ظاهر می‌شود. از آنجا که HRP نیز به لکتین متصل است، به‌طور غیرمستقیم محل قندها مشخص می‌گردد. سپس کلیه لام‌ها به مدت پنج دقیقه در محلول آلسین بلو با  $pH=2.5$  (یک گرم آلسین بلو در ۹۷ سی‌سی آب مقطر و ۳ سی‌سی اسید استیک گلاسیال) به منظور ایجاد رنگ زمینه قرار گرفتند (۱۵، ۱۶ و ۱۹).

۵ - بررسی مقاطع تهیه‌شده و جمع‌آوری یافته‌ها: لام‌ها با استفاده از میکروسکپ نوری بررسی شدند. واکنش به لکتین‌ها به صورت رنگ قهوه‌ای با شدت و ضعف‌های مختلف ظاهر می‌شود. رتبه‌بندی شدت واکنش یا همان شدت رنگ براساس مطالعات Arya (۲۰ و ۲۱) و Burkett (۲) انجام شد. در این مطالعات که در روی بافت‌های بیضه و اپیدیدیم صورت گرفته است، کلیه واکنش‌ها براساس مشاهده و نظر محقق رتبه‌بندی می‌شود، به‌این‌ترتیب که در صورت عدم مشاهده رنگ قهوه‌ای در یک ساختمان یا سلول برای آن رتبه صفر در نظر گرفته می‌شود. رتبه ۱ برای رنگ قهوه‌ای کم‌رنگ یا واکنش ضعیف، رتبه ۲ برای واکنش متوسط یا رنگ قهوه‌ای متوسط و رتبه ۳ برای رنگ قهوه‌ای پررنگ یا واکنش

به مدت ده دقیقه در محلول Alcoholic Iodine (نیم درصد ید در الکل ۷۰ درجه) قرار گرفتند. سپس به منظور خنثی کردن پراکسیدازهای با منشأ داخلی به مدت ۴۵ دقیقه در محلول یک درصد آب اکسیژنه در اتانول ۷۰ درجه و در شرایط تاریکی قرار داده شدند (۱۸). پس از شستشو به مدت نیم‌ساعت در محلول بافر فسفات سالین قرار گرفتند. در روی هر لام ۳ قطره از لکتین‌های ذکر شده در جدول ۱ ریخته شد، به نحوی که کلیه قسمت‌های بافت به‌طور کامل توسط محلول لکتین دربرگرفته شود. کلیه لکتین‌ها به صورت رقیق‌شده و به نسبت ۱۰ میکروگرم در یک میلی‌لیتر بافر فسفات استفاده شدند (۱۵، ۱۶ و ۱۹). لکتین‌ها به صورت کونژوگه با Horse Radish Peroxidase (HRP) و از شرکت Sigma Aldrich خریداری شده بودند. پس از گذشت ۲ ساعت، کلیه لام‌ها با بافر فسفات سالین شسته شد و به مدت 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 بود، قرار گرفتند. از آنجا که اتصال لکتین به قند انتهایی قابل مشاهده نیست، از DAB استفاده می‌شود. اتصال این ترکیب با HRP در

جدول ۱- لکتین‌های مختلف به کار برده شده در مطالعه

نوع لکتین	علامت اختصاری مخفف	کربوهیدرات اختصاصی
Glycine Max (Soybean) Agglutinin	SBA	$\beta, \alpha$ -D-GalNAc*
Arachis Hypogaea (Peanut) Agglutinin	PNA	D-Gal-** ( $\beta$ 1-3)-D-GalNAc
Lotus Tetragonolobus Agglutinin	LTA	$\alpha$ L-fuc***
Wheat Germ Agglutinin	WGA	Sialic Acid

\*\*\*Fuc=Fucose

\*GalNAc=N-Acetylgalactosamine

\*\*Gal= Galactose

### یافته‌ها

نتایج به دست آمده در خصوص لکتین‌های SBA، LTA و PNA و مقایسه سه گروه با هم تفاوت معناداری را نشان نداد، ولی در مورد لکتین WGA وضعیت متفاوت بود که نتایج آن در جدول ۲ آمده است.

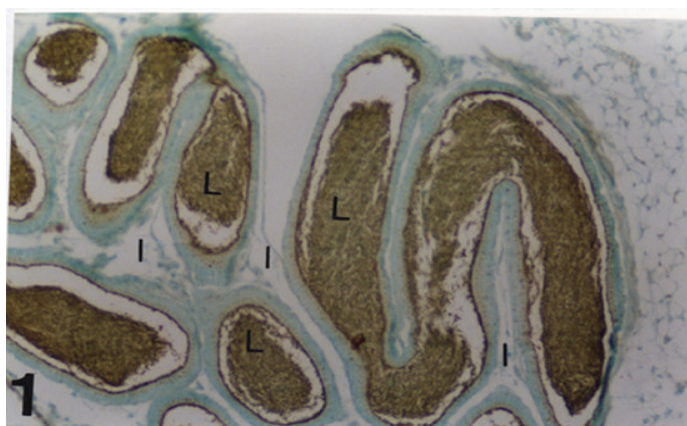
با توجه به اینکه در کلیه موارد به جز سلول‌های قاعده‌ای ناحیه سر اپیدیم، بین گروه‌های مورد بررسی تفاوت معنادار آماری مشاهده می‌گردید ( $P < 0/05$ )، برای مشخص نمودن گروه‌هایی که این تفاوت بین آنها وجود دارد، آزمون Dunn انجام شد. نتایج آزمون Dunn در کلیه موارد نشان داد که این تفاوت آماری بین گروه کنترل ۱.

شدید در نظر گرفته می‌شود. در هر گروه، یک لام از هر موش بررسی شد و در مورد هر سلول میانگین رتبه‌های آن به دست آمد. سپس میانگین‌های به دست آمده با استفاده از آزمون آماری Kruskal-Wallis مورد مقایسه قرار گرفتند.

این آزمون که برای داده‌های رتبه‌بندی شده به کار می‌رود، مشخص می‌کند که به طور کلی اختلافی بین گروه‌های مورد بررسی وجود دارد یا خیر. چنانچه این اختلاف وجود داشته باشد ( $P < 0/05$ )، برای مشخص کردن اینکه تفاوت بین کدام یک از دو گروه وجود دارد، آزمون Dunn انجام می‌شود.

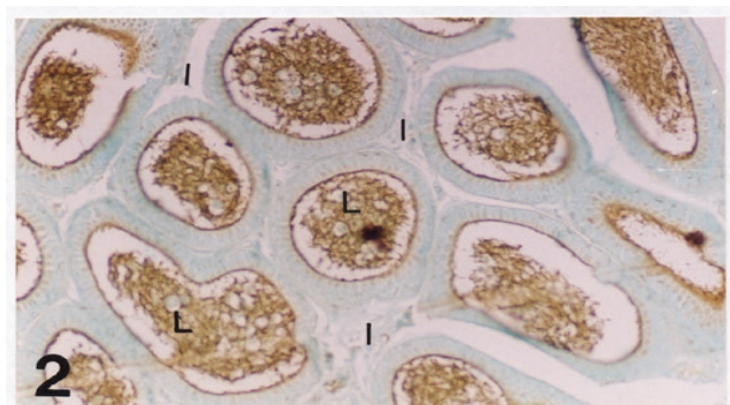
جدول ۲- نتایج آزمون Kruskal-Wallis برای اختلاف بین میانگین گروه‌ها

نتیجه آزمون Kruskal Wallis	گروه			نوع سلول	بخش‌های مختلف اپیدیم
	تجربی	کنترل ۲	کنترل ۱		
<0/0001	0/15±0/36	1/48±0/50	1/51±0/50	اصلی	سر
0/32	0/06±0/24	0/18±0/39	0/15±0/36	قاعده ای	
<0/0001	2/45±0/50	2/87±0/33	2/84±0/36	فلاسک	
در این ناحیه وجود ندارند				روشن	
<0/0001	0/18±0/39	1/66±0/47	1/69±0/46	اصلی	جسم
<0/0001	0/75±0/43	2/42±0/50	2/39±0/49	قاعده ای	
<0/0001	0/87±0/33	2/42±0/50	2/36±0/48	فلاسک	
<0/0001	1/18±0/39	2/57±0/50	2/75±0/43	روشن	
<0/0001	1/09±0/29	1/69±0/46	1/18±0/39	اصلی	دم
<0/0001	0/78±0/41	1/78±0/41	1/84±0/36	قاعده ای	
در این ناحیه وجود ندارند				فلاسک	
<0/0001	2/12±0/33	2/93±0/24	2/93±0/24	روشن	

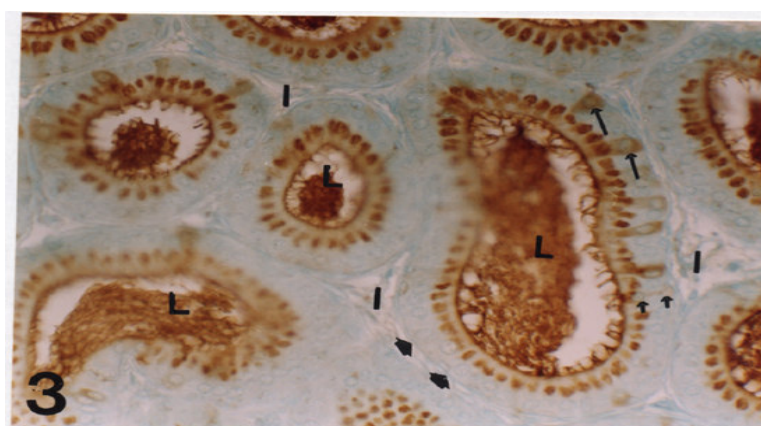


تصویر ۱- مقاطع ناحیه دم اپیدیدیم در یک موش طبیعی، رنگ آمیزی شده با آلسین بلو و لکتین SBA،  $\times 100$ ، در اسپرم های مجرا واکنش قابل ملاحظه ای مشاهده می شود و در ناحیه رأسی سلول های اصلی نیز واکنش های خفیف تا متوسط ملاحظه می شود. I: بافت بینابینی، L: مجرای

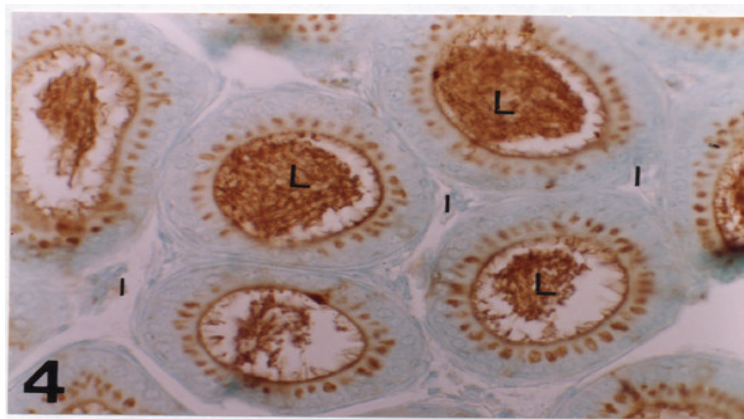
اپیدیدیم.



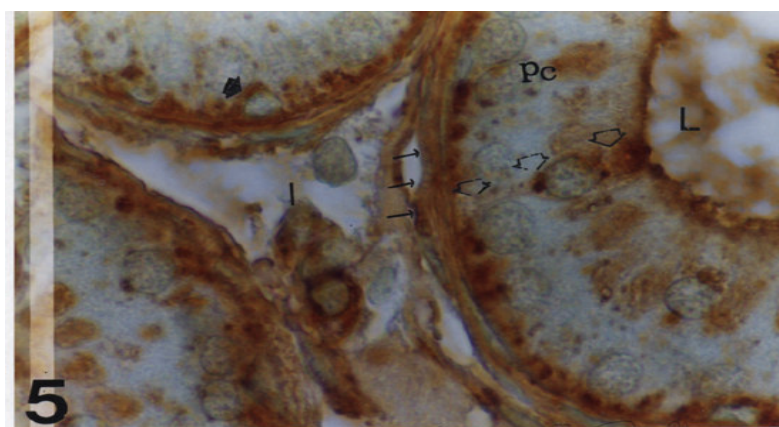
تصویر ۲- مقاطع ناحیه دم اپیدیدیم در موشی که مورفین دریافت کرده است، رنگ آمیزی شده با آلسین بلو و لکتین SBA،  $\times 200$ ، در مقایسه با نمونه های طبیعی مشابه، تغییر معناداری در شدت واکنش ها مشاهده نمی شود. I: بافت بینابینی، L: مجرای اپیدیدیم.



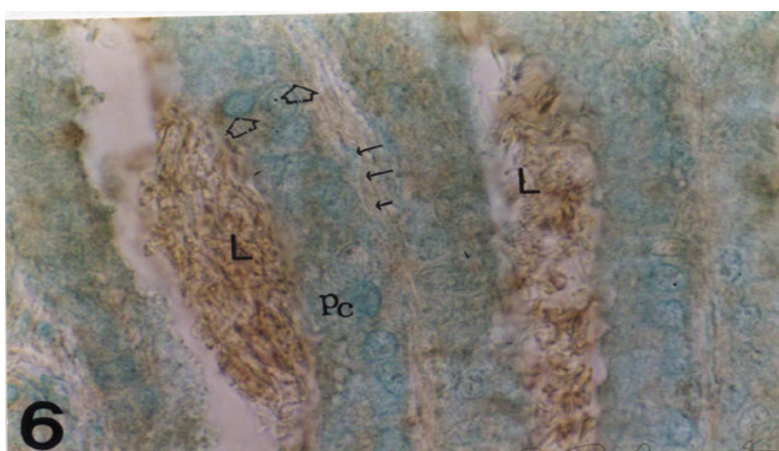
تصویر ۳- مقاطع ناحیه جسم اپیدیدیم در یک موش طبیعی، رنگ آمیزی شده با آلسین بلو و لکتین LTA،  $\times 400$ ، واکنش های شدید نواحی رأسی سلول های اصلی، اسپرم های مجرا و همچنین ناحیه رأسی سلول های فلاسک (پیکان های کوچک) دیده می شود، در حالی که در سلول های روشن (فلش های بلند) واکنش در سراسر سلول وجود دارد. I: بافت بینابینی، L: مجرای اپیدیدیم، پیکان های پهن: غشای پایه اپیدیدیم.



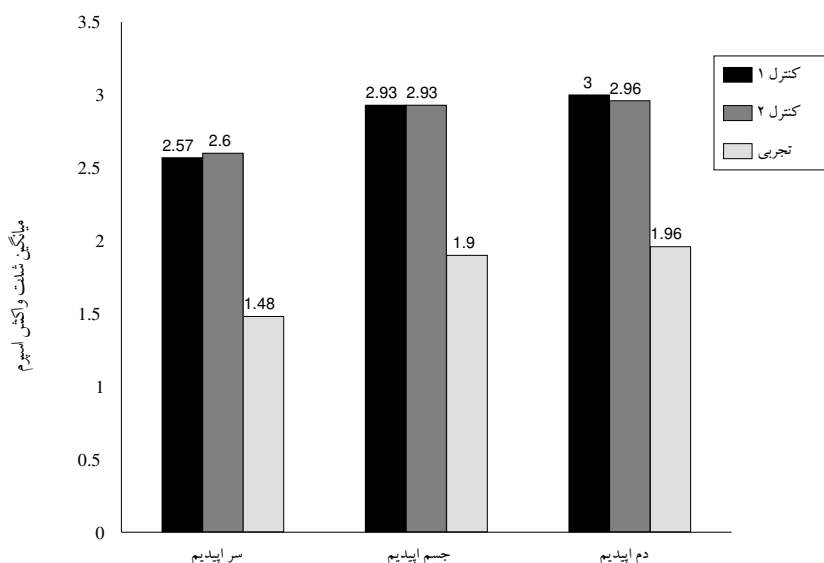
تصویر ۴- مقاطع عرضی از جسم اپیدیدیم در موشی که مورفین دریافت کرده است، رنگ آمیزی شده با آلسین بلو و لکتین LTA،  $\times 400$ ، در مقایسه با نمونه‌های طبیعی مشابه، تغییر معناداری در شدت واکنش‌ها مشاهده نمی‌شود. I: بافت بینابینی، L: مجرای اپیدیدیم.



تصویر ۵- بخش‌هایی از مقاطع اپیدیدیم در یک موش طبیعی، رنگ آمیزی شده با آلسین بلو و لکتین WGA،  $\times 1000$ ، یک سلول قاعده‌ای (پیکان کوتاه سیاه) با واکنش قوی مشاهده می‌شود. همچنین یک سلول فلاسک (پیکان‌های پهن توخالی) با واکنش شدید در ناحیه رأسی نیز دیده می‌شود. I: بافت بینابینی، L: مجرای اپیدیدیم، فلش‌های بلند: غشای پایه، Pc: سلول اصلی.



تصویر ۶- مقاطع دم اپیدیدیم در موشی که مورفین دریافت کرده است، رنگ آمیزی شده با آلسین بلو و لکتین WGA،  $\times 1000$ ، کاهش قابل ملاحظه واکنش‌ها در کلیه سلول‌های اپیتلیوم و همچنین اسپرم‌های مجرا دیده می‌شود. L: مجرای اپیدیدیم، Pc: سلول اصلی، پیکان‌های توخالی: سلول فلاسک، فلش‌ها: غشای پایه.



نمودار ۱- مقایسه میانگین شدت واکنش اسپرم های مجرا در قسمت های مختلف اپیدیم به لکتین WGA در سه گروه مورد بررسی

به ترتیب توسط لکتین های LTA، SBA و PNA ردیابی می شوند، تغییری به وجود نمی آید.

مشاهده واکنش های شدید سلول های روشن و نواحی رأسی سلول های اصلی و فلاسک به لکتین LTA در نمونه های طبیعی (تصویر ۳) نشان دهنده وجود مقدار فراوانی قند  $\alpha$  L-fuc در این سلول ها و ترشحات آنها می باشد، در حالی که عدم واکنش و یا واکنش های بسیار خفیف به SBA در اپیتلیوم نشان می دهد که قند انتهایی D-GalNac در ترشحات اپیدیم و همچنین بلوغ اسپرمی احتمالاً نقش مهمی ندارد (تصویر ۱). واکنش های قوی به WGA (تصویر ۵) نیز در نمونه های طبیعی نشان دهنده وجود مقدار فراوانی اسید سیالیک در اپیتلیوم و ترشحات آن خواهد بود که برای بلوغ اسپرمی مورد نیاز است.

اسید سیالیک در بلوغ اسپرم ها و لقاح نقش مهمی دارد (۱، ۶ و ۷) و در برخی از عوامل رشد اپیدیمی مانند GP-83 و GP-49 (۱۰۶) و همچنین در ترکیب SMA<sub>4</sub>

در مقایسه با گروه تجربی و گروه کنترل ۲ در مقایسه با گروه تجربی وجود دارد، در حالی که بین گروه های کنترل ۱ و ۲ تفاوتی وجود ندارد

## بحث

نتایج به دست آمده نشان می دهند که با تجویز مورفین، شدت واکنش به لکتین WGA در گروه تجربی در مقایسه با گروه های کنترل به شدت کاهش می یابد (تصاویر ۵ و ۶). در صورتی که در مورد لکتین های LTA (تصاویر ۳ و ۴) و SBA (تصاویر ۱ و ۲) و PNA این تفاوت مشاهده نمی شود. از آنجاکه لکتین WGA به طور اختصاصی به قند انتهایی اسید سیالیک متصل می شود، کاهش واکنش ها می تواند نشان دهنده کاهش میزان اسید سیالیک در بافت مورد بررسی و سلول های آن باشد. به نظر می رسد که در میزان قندهای فوکوز و اناستیل گالاکتوز آمین و دی ساکارید گالاکتوز- ان استیل گالاکتوز آمین که



دیگر در ناحیه سر اپیدیدیم و خصوصاً بخش ابتدایی آن ساخت ترکیبات و پروتئین‌ها توسط عوامل موجود در مایع بیضه‌ای تنظیم می‌گردد (۲۲)؛ لذا کلیه تغییرات هورمونی ذکرشده با ایجاد تغییر در ترکیب مایع بیضه‌ای نیز می‌تواند عملکرد اپیدیدیم را تحت تأثیر قرار دهد.

- تأثیر مستقیم مورفین در سلول‌های اپیتلیوم اپیدیدیم و ایجاد اختلال در عملکرد آن‌ها: در مورد سیستم عصبی مرکزی، هیپوتالاموس، هیپوفیز و همچنین بافت بیضه گیرنده‌های اپیوئیدی شناسایی شده‌اند (۱۳ و ۲۴)، ولی در مورد اپیدیدیم گزارشی در این مورد نیافتیم. گرچه به احتمال زیاد سلول‌های این بافت نیز مانند بیضه گیرنده‌های ذکرشده را دارا هستند و ممکن است مورفین با استفاده از این گیرنده‌ها عملکرد سلول را تحت تأثیر قرار دهد.

در مورد لکتین WGA، مقایسه قسمت‌های مختلف اپیدیدیم نشان می‌دهد که به طور کلی ناحیه جسم و دم اپیدیدیم در مقایسه با سر، در پاسخ به مورفین، تغییرات بیشتری را نشان می‌دهند. در نمونه‌های طبیعی نیز ناحیه جسم و دم واکنش‌های شدیدتری را در مقایسه با سر نشان می‌دهند که می‌تواند بیانگر فعالیت بیشتر سلول‌های این نواحی در ساخت و ترشح ترکیبات باشد، درحالی‌که در ناحیه سر واکنش‌های کمتر، می‌تواند نشان‌دهنده نقش سلول‌های آن در جذب آب از برون بیضه باشد.

از آنجاکه تاکنون مطالعات مشابهی در ارتباط با تأثیرات مواد مخدر بر گلیکوکانجوگیت‌ها انجام نشده است، امکان مقایسه نتایج به‌دست آمده از این بررسی با سایر مطالعات مشابه وجود ندارد.

که مانع از آگلوتیناسیون اسپرم‌ها می‌گردد (۷)، وجود دارد. همچنین باعث پوشاندن نواحی آنتی‌ژنیک سطح سلول و حفاظت آن می‌گردد (۹). در نتیجه به‌نظر می‌رسد که با کاهش این عوامل مهم احتمالاً در فرایند بلوغ اپیدیدیمی اسپرم‌ها اختلال ایجاد شده است و به دنبال آن از توانایی باروری و همچنین میزان لقاح کاسته می‌شود. همچنین کاهش میزان اسیدسیالیک می‌تواند بیانگر ایجاد اختلال در عملکرد سلول‌های اپیدیدیم در ساخت و ترشح ترکیبات مورد نیاز برای بلوغ اسپرم باشد.

در مورد مکانیسم‌های احتمالی که ممکن است باعث کاهش گیرنده‌های WGA (اسیدسیالیک) و بروز اختلال در عملکرد اپیدیدیم شوند. می‌توان به موارد ذیل اشاره نمود:

- اثر مورفین بر محور هیپوتالاموسی - هیپوفیزی و هورمون‌های آزادکننده گنادوتروپین‌ها. کاهش میزان هورمون آزادکننده LH با تأثیرگذاری پتیدین در این محور قبلاً گزارش شده است (۱۱).

- اثر مستقیم مورفین بر هیپوفیز و ترشح گنادوتروپین‌ها. بررسی‌های انجام‌شده کاهش سطح LH سرم را در موش‌های مذکر و بالغی که تحت تأثیر مورفین قرار گرفته‌اند را نشان داده است (۲۳).

- تأثیر موضعی مورفین در بافت بیضه و ترشح آندروژن‌های بیضه‌ای: کاهش سطح تستوسترون خون در موش‌هایی که مورفین دریافت کرده بودند، قبلاً گزارش شده است (۲۳). عمل آندروژن‌ها برای تکامل و حفظ عملکرد طبیعی سلول‌های اپیدیدیمی بسیار ضروری است (۴). به‌ویژه در ناحیه دم اپیدیدیم ساخت ترکیبات و پروتئین‌ها توسط آندروژن‌ها تنظیم می‌شود. از سوی

مهمی دارد، کاهش مقدار این قند انتهایی ممکن است باعث بروز اختلال در فرایندهای ذکر شده گردد. به نظر می‌رسد که مصرف مورفین در میزان قندهای انتهایی دیگر نظیر فوکوز، اناستیل گالاکتوز آمین و دی ساکارید اناستیل گالاکتوز آمین - گالاکتوز تغییری ایجاد نمی‌کند.

### تقدیر و تشکر

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

در خانمه می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که مصرف مورفین با کاستن از مقدار اسیدسیالیک در سلول‌های اپیتلیوم اپیدیدیم و اسپرم‌ها می‌تواند در فرایند بلوغ و حفاظت اسپرم‌ها اختلال ایجاد نماید.

### نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این بررسی نشان می‌دهد که تجویز مورفین در موش‌های مذکر بالغ، منجر به کاهش میزان قند انتهایی اسیدسیالیک در سلول‌های اپیتلیوم اپیدیدیم و اسپرم‌های موجود در مجرای آن می‌شود. از آنجاکه اسیدسیالیک در فرایند بلوغ و حفاظت اسپرم‌ها نقش

## Abstract:

### *Morphine Dependency Effect on Mouse Epididymis Epithelium by Means of Lectin Histochemistry*

Mahmoudian A.R.<sup>1</sup>; Zamansoltani, F.<sup>1</sup>; Alavi S.H.; Fazel A.R.<sup>1</sup>

1- Assistants Professor in Anatomical Sciences of Genetics, Mashhad University of Medical Sciences.

**Introduction:** Studies have shown that opiates cause disorders in fertilization and accessory reproductive glands in animals. On the other hand studies have shown important role of glycoconjugates in sperm epididymal maturation. Lectins can detect glycoconjugates with specific terminal glucose molecules. Therefore this study was conducted to assess the possible effects of opiates on these important glycoconjugates in sperm maturation. Lectins were used in this study since they can bind with glucose terminal in specific manner.

**Materials & Methods:** 102 BALB/c adult male mice were assigned to three groups with 34 mice. The experimental group was injected with sulphate morphine, control group by normal saline and the third group was considered as intact group. Chronic drug dependency was induced by three daily

*subcutaneous injections for 7 days (dose on days from 1 to 7 were: 10, 20, 40, 40, 80, 80 and 100 mg/kg respectively). After chronic drug dependency induction, epididymides were dissected. Paraffin blocks were obtained after fixation using routine laboratory methods. 5  $\mu$ m sections from the blocks were exposed to different lectins by means of lectin histochemistry. Reaction intensity in different cells was investigated by light microscopy and were ranked according to the previous approved studies (0 = no reaction, 1 = mild, 2 = moderate and 3 = strong reactions). Kruskal-Wallis and Dunn tests were used for statistical analysis.*

**Results:** *There was a significant difference ( $p < 0.05$ ) in the reaction to wheat germ agglutinin (WGA), specifically for sialic acid between experimental and control groups. No significant difference was found in using other lectins such as Galactose, Fucose and Galactose- N Acetyl Galactoseamin.*

**Conclusion:** *Decreasing reaction to WGA indicates reduction of sialic acid content in morphine treated samples. With regard to sialic acid important role in sperm protection and epididymal maturation, adverse changes in sperms epididymal maturation will be predicted due to sialic acid deficiency in epididymal cells. Morphine effect on hypothalamic-hypophyseal portal system and secretion of gonadotropin releasing hormones, direct effect on pituitary and secretion of gonadotropins and effect on local regulatory factors may be more likely mechanisms for these changes.*

**Key Words:** *Morphine- Glycoconjugate- Sialic Acid- Lectin- Mouse Epididymis*

## منابع

1. Liu HW, Shang ST, Chao CF, Muller C. The secretion of two sperm maturation-related glycoproteins in BALB/c mouse epididymis. *Cell Tissue Res* 1991; 265(3):409-14.
2. 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):11-22.
3. Arenas MI, Madrid JF, Bethencourt FR, Fraile B, Paniagua R. Identification of N- and O-linked oligosaccharides in human epididymis. *J Histochem Cytochem* 1998; 46(10):1185-8.
4. Fisher JS, Pastor-Soler N, Sharpe RM, Bretor S. Modulation of onset of postnatal development of H (+)-ATPase rich cells by steroid hormones in rat epididymis. *Biol Reprod* 2002; 67(4):1106-14.
5. Williams PL, Bannister LH, Berry MM, Collins P, Dyson M, Dussek JE, et al. *Gray's anatomy*. 38th ed. New York: Churchill Livingstone; 1995, PP. 1849-53.
6. Sun GH, Lin YC, Cha TL, Yu DS, Chang SY, Liu HW. Conjugation of maturation-related wheat-germ-lectin-binding proteins to caput epididymal sperm in co-cultures with corpus epididymal epithelial cells of BALB/c mouse. *Arch Androl* 2000; 45(1): 43-52.
7. Feuchter FA, Tabet AJ, Green MF. Maturation antigen of the mouse sperm flagellum: analysis of its secretion, association with sperm, and function. *Am J Anat* 1988; 181(1): 67-76.
8. 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):161-71.
9. Montreuil J, Vliegenthart JFG, Schachter H. *Glycoproteins II*. Amsterdam: first ed; Elsevier Science; 1997, PP. 357-403.
10. Soderstrom KO, Malmi R, Karjalainen K. Binding of fluorescein isothiocyanate conjugated lectins to rat spermatogenic cells in tissue sections. *Histochemistry* 1984; 80(6):575-9.
11. Patil S, Patil S, Londonkar R, Patil SB. Effect of pethidine on spermatogenesis in albino rats. *Indian J Pharmacol* 1998; 30(1):249-53.
12. Cicero TJ, Davis LA, Lar Regina MC, Meyer ER, Schlegel MS. Chronic opiate exposure in the male rat adversely affected fertility. *Pharmacol Biochem Behav* 2002; 72(1-2):157-63.
13. Jenab S, Morris PL. Interlukin-6 regulation of Kappa opioid receptor gene exoression in primary sertoli cells. *Endocrine* 2000; 13(1):11-5.

14. 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.
15. Fazel AR, Schulte BA, Thompson RP. Lectin histochemistry of the embryonic heart: fucose-specific lectin binding sites in developing rats and chicks. *Am J Anat* 1989; 184(1):76-84.
16. Fazel AR, Thompson RP, Sumida H, Schulte BA. Histochemistry of the embryonic heart: Expression of terminal and penultimate galactose residues in developing rats and chicks. *Am J Anat* 1989; 184(1):85-94.
17. Bancroft JD, Gamble M. *Theory and practice of histological techniques*. 5th ed. New York: Churchill Livingstone; 2002, PP. 86-8.
18. Gotz W, Qondumatteo F. Glycoconjugate distribution in early human notochord and axial mesenchyme. *Acta Histochem* 2001; 103(1):21-35.
19. Ganji FC, Fazel AR. Lectin-binding pattern in the microenvironment of the mouse developing T-cell. *Ir Biomed J* 2003; 7(1):19-22.
20. Arya M, Vanha-Perttula T. Distribution of lectin binding in rat testis and epididymis. *Andrologia* 1984; 16(6): 495-508.
21. Arya M, Vanha- Perttula T. Lectin- binding pattern of bull testis and epididymis. *J Androl* 1985; 6(4):230-42.
22. Jones R, Brown CR, Von Glos KI, Parker MG. Hormonal regulation of protein synthesis in the rat epididymis: characterization of androgen-dependent and testicular fluid-dependent proteins. *Biochem J* 1980; 188(3): 667-76.
23. Cicero TJ, O'Connor L, Nock B, Adams ML, Miller BT, Bell RD, Meyer ER. Age-related differences in sensitivity to opiate- induced perturbation in reproductive endocrinology in the developing and adult male rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1989; 248(1):256-61.
24. Wittert G, Hope P, Pyle D. Tissue distribution of opioid receptor gene expression in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 218(3):877-81.