

## بررسی تغییر شاخصهای قندی منطقه شفاف فولیکول در طی چرخه تخمدانی

دکتر محمد بربرستانی\*، سید محمد حسینی پناه\*\*، دکتر علیرضا فاضل\*\*\*، دکتر مهران حبیبی رضایی\*\*\*\*  
دکتر مصطفی حسینی\*\*\*\*\*، دکتر محمد اکبری\*، دکتر فرید ابوالحسنی\*\*\*\*\*  
دکتر میرعباس میر عبدالوهابی\*\*\*\*\*

### چکیده:

از آنجائیکه تمام سلولها در روی سطوحشان کربوهیدراتها را به اشکال گوناگون گلیکوپروتئینها، گلیکولیپیدها، پلی ساکاریدها حمل مینمایند و از طرفی کربوهیدراتها حاوی پتانسیل فوق العاده ای برای کشف رموز اطلاعات بیولوژیکی بوده و همچنین در ماتریکس خارج سلولی هم موجود میباشند لذا این پژوهش با هدف شناسائی قندهای انتهایی منطقه شفاف در طی روند تکاملی فولیکولها انجام گردید ناحیه ای که بعنوان ماتریکس خارج سلولی، حاصل همکاری مشترک اووسیت و سلولهای فولیکولی در حین تکامل فولیکول تشکیل میگردد.

تعداد شصت راس موش بالغ که دارای علائمی از سیکل تخمدانی بودند انتخاب شدند و تخمدانهای آنها خارج گردید. بعد از طی مراحل پاساژ در بلوکهای پارافینی قرار داده شدند و از آنها برشهایی با ضخامت سه میکرون تهیه گردید و سپس مقاطع با روش هیستوشیمی لکتینی رنگ آمیزی شدند. در این مطالعه از پنج نوع لکتین BSA1، PNA، Con A، DBA، WGA استفاده گردید.

واکنشها نسبت به لکتین BSA1 در طی چرخه تخمدانی منفی بود ولی نسبت به لکتین Con A کمی دیده شد که بیانگر درگیری بسیار کم گلوکز، مانوز و گالاکتوز میباشد و با توجه به واکنش نسبت به لکتینهای PNA، WGA، DBA حضور بقایای ان-استیل گالاکتوز آمین و ان-استیل گلوکز آمین و اسید سیالیک در طی روند تکوینی فولیکولها مورد بررسی قرار میگیرد.

اهمیت حضور بقایای ان-استیل گالاکتوز و گلوکز شایان توجه است که در این مطالعه توسط دو لکتین اختصاصی آنها به اثبات رسید.

کلید واژه ها: تخمدان / گلیکوکونزوگیت / لکتین

### مقدمه:

پلاسمایی اووسیت پستانداران را در بر می گیرد. این غشاء نسبتاً ضخیم بوده و حاوی ماتریکس خارج سلولی با میزان بالائی گلیکان می باشد. این ماتریکس حداقل چهار نقش مهم در طی تکامل فولیکول ایفاء می نماید:

برای رسیدن به یک لقاح موفق، اسپرماتوزوئید میبایست پوشش خارج سلولی تخم یعنی منطقه شفاف را تشخیص داده و به آن متصل شود پوششی که غشاء

\* دانشیار گروه آناتومی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

\*\* عضو هیأت علمی گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان

\*\*\* دانشیار گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

\*\*\*\* استادیار گروه زیست شناسی و مدیریت بیوتکنولوژی دانشکده علوم دانشگاه تهران

\*\*\*\*\* استادیار گروه آمار دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران

\*\*\*\*\* استادیار گروه آناتومی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

مختلف فولیکولها به دسته های زیر تقسیم بندی گردید (۸-۱۱):

مرحله I: این مرحله تحت عنوان فولیکولهای در حال استراحت (Resting follicles) نامیده می شود که شامل:

الف) فولیکول Primordial، هنگامی است که اووسیت ها توسط لایه ای از سلولهای پهن فولیکولی در بر گرفته می شود.

ب) فولیکول Intermediate، اووسیت توسط مخلوطی از سلولهای پهن و مکعبی احاطه شده است.

ج) فولیکول Primary، هنگامی است که اووسیت توسط سلولهای مکعبی در بر گرفته می شود.

مرحله II: فولیکول (Secondary) (Growing)، که با افزایش ردیفهای مختلف سلولهای مکعبی فولیکول و ظهور فضائی در بین آنها مشخص می شود که شامل:

الف: فولیکول Preantral، که عبارت از هنگام ظهور فضاها بصورت پراکنده در بین سلولهاست.

ب: فولیکول Antral، وقتی است که فضا یک سوم حجم فولیکول را در بر گیرد.

مرحله III: فولیکول (Tertiary) (Graafin)، فولیکول انتخاب شده است و با فضائی بزرگتر از دو سوم حجم فولیکول می باشد.

مرحله IV: فولیکول Preovulatory، فولیکولی است که جهت تخمک گذاری آماده است.

آماده سازی بافت و رنگ آمیزی: پس از ثابت شدن، تخمدانها از محلول فرمالین خارج شدند و پس از چند بار شستشو در آب مقطر طبق روال معمول بافت شناسی قالب گیری گردیدند و سپس برشهایی به ضخامت سه میکرون تهیه شد و از هر مورد یک مقطع جهت بررسی نمای کلی با روش هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی شده و با میکروسکوپ نوری بررسی گردیدند که اینکار جهت سنجیدن کیفیت مقاطع و تایید صحت تهیه مقطع صورت گرفت.

لکتین هیستوشیمی: لکتینهایی که از طریق هلال احمر جمهوری اسلامی ایران از شرکت سیگما خریداری شده بودند، مورد استفاده قرار گرفتند. این لکتینها تماماً با Horseradish Peroxidase (HRP) متصل بوده و در بافر PBS حاوی ۰/۰۲ گرم کلرید منیزیم، ۰/۰۲ گرم کلرید منگنز، ۰/۰۵ گرم کلرید کلسیم و pH=6.8 رقیق شدند بطوریکه غلظت لکتین در بافر ده میکروگرم در میل لیتر

(۱) تنظیم نمائی از اندوکراین طبیعی در طول تکامل، (۲) تشکیل سدی در مقابل لقاح غیرگونه ای، (۳) تشکیل سدی در مقابل لقاح چند اسپرمی در بعضی از پستانداران (۴) محافظت جنین در طی تکامل دوره پیش از لانه گزینی (۴-۱).

در این مطالعه به نقش کربوهیدراتها در مرحله اول از مراحل مذکور پرداخته می شود. ضمن آنکه نقش کربوهیدراتها در خیلی از مراحل لقاح خاصاً اتصال اسپرم به منطقه شفاف مشخص می باشد.

مشارکت بقایای قندهای مانوز و فوکوز در اتصال اسپرم و منطقه شفاف به میزان وسیعی در مطالعات گذشته صورت گرفته است (۵) و همچنین مشارکت بقایای ان - استیل گلوکز آمین منطقه شفاف در طی عکس العمل منطقه شفاف قبلاً بررسی شده و در جای دیگر بکاربردن لکتین خاص آن سبب مهار کامل اتصال اسپرم شده است (۵). از آنجائیکه لکتینها موادی با دقت و حساسیت بالا برای شناسائی قندهای انتهائی هستند لذا در این مطالعه توزیع طبیعی گلیکوکونژوگیتها در طی روند تکامل فولیکول و بطور اختصاصی در منطقه شفاف بررسی میشود. بدون شک تعیین توزیع طبیعی این ترکیبات راه را برای درک حالات غیر طبیعی در ناباروریهای با منشأ جنس مؤنث تسهیل نموده و همچنین می تواند سبب ابداع روشی نو جهت جلوگیری از باروری طبیعی گردد (۶).

## روش کار:

حیوانات مورد آزمایش: در این پژوهش از موشهای سفید (سوری) جوان نژاد N-MARI با سن ۸-۱۲ هفته و با وزن ۲۵-۳۰ گرم استفاده شد. این موشها در سن پنج هفتگی از مؤسسه رازی ابتیاع و جهت عادت به محیط و برقراری شرایط معمول فیزیکی (گرما، سرما، رطوبت و نور) و تغذیه به حیوانخانه بخش علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران منتقل گردیدند. سپس بعد از رسیدن به سن بلوغ و با مشاهده تغییراتی در نمای واژینال آنها (۷) و پس از اطمینان از آغاز سیکل جنسی با قطع نخاع بلافاصله تخمدانهای آنها خارج و در محلول فرمالین ۱۰٪ ثابت گردیدند.

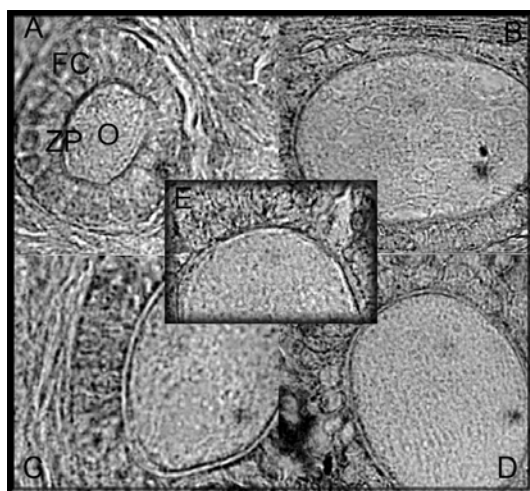
در این مطالعه تعداد شصت عدد موش ماده مورد استفاده قرار گرفت که در هر برش مقاطع مختلفی از فولیکولها در طی چرخه تخمدانی وجود داشت مقاطع

با  $P < 0.05$  اختلاف معنی داری را بین فولیکولها نشان داد.

جدول ۱: شدت رنگ آمیزی مراحل مختلف فولیکولها توسط لکتینها

Follicles	Lectins				
	BSA1	DBA	PNA	WGA	ConA
Primordial	-	-	+	++	-
Intermediate	-	-	+	+	-
Primary	-	+	++	+	-
Secondary	-	++	+++	++	±
Tertiary	-	+++	+++	++	±
Preovulatory	-	+++	+++	++	±

لکتین ConA: رنگ آمیزی لکتین *Conavalia ensiformia* (ConA) جهت ایجاد نواحی مشخص در شکل ۱ نشان داده شده که با مطالعه فولیکولهای Intermediate تا Preovulatory بیان گردیده است.



شکل ۱: روند تکامل فولیکولی با استفاده از رنگ آمیزی هیستوشیمی توسط لکتین ConA نشان داده شده است (بزرگنمایی تمام مقاطع ۱۰۰۰ برابر میباشد). (A) فولیکول Intermediate مرحله I, (B) فولیکول Preantral مرحله II, (C) فولیکول Antral مرحله II, (D) فولیکول Postantral مرحله II, (E) فولیکول Tertiary مرحله III.

لکتین BSA1: منطقه شفاف هیچ محل اتصال برای لکتین BSA1 در جهت بلوغ فولیکولها نشان نداده است (شکل ۲).

انتخاب شد پس از آب دادن مقاطع به روش معمول بافت شناسی و حذف پیگمان کلرید برای خنثی کردن Endogenose Peroxidase بمدت پنج تا ده دقیقه در محلول ۰/۰۱ آب اکسیژنه در متانول قرار گرفتند آنگاه مقاطع بمدت یک ساعت در محلول بافر شستشو داده شده و بمدت دو ساعت در اتافک مرطوب در مجاورت لکتینها قرار داده شدند پس از شستشو در محلول بافر مقاطع در محلول حاوی DAB و بافر بمدت ده دقیقه قرار گرفتند. محلول فوق با غلظت ۰/۰۳ گرم DAB در بافر بوده و آب اکسیژنه بمیزان ۲۰۰ میکرولیتر به ازاء هر میلی لیتر بافر به محلول اضافه شد. پس از خارج کردن مقاطع از محلول فوق بمدت پنج تا ده دقیقه در آب جاری شستشو داده شدند. سپس بمدت پنج دقیقه در آلسین بلو pH=2.5 جهت رنگ زمینه استفاده شد. آنگاه بقیه مراحل آماده سازی مقاطع با روشهای معمول بافت شناسی انجام شد. سپس توزیع مناطق اتصالی برای پنج نوع لکتین براساس روش (1997) Gony مورد استفاده قرار گرفت. بر اساس این روش و با استفاده از میکروسکوپ نوری درجه بندی شدت رنگ آمیزی مطابق جدول زیر بدست آمد (۱۲-۱۴).

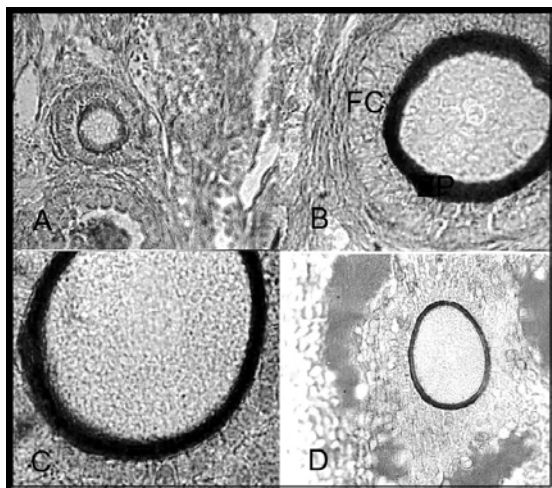
جدول درج بندی شدت رنگ آمیزی

تعریف	
-	هیچ رنگی ملاحظه نشد
±	شدت رنگ آمیزی بسیار کم
+	شدت رنگ آمیزی کم
++	شدت رنگ آمیزی متوسط
+++	شدت رنگ آمیزی زیاد

پس از تهیه جداول مربوط به هر رنگ آمیزی، اطلاعات آن کدگذاری گردید و توسط کامپیوتر به روش آنالیز واریانس یکطرفه غیر پارامتری کروسکال-والیس (Kruskall-Walis) وبا استفاده از برنامه SPSS آنالیز شد و سپس تحلیل آماری توسط تست Mann-Whitney انجام شد.

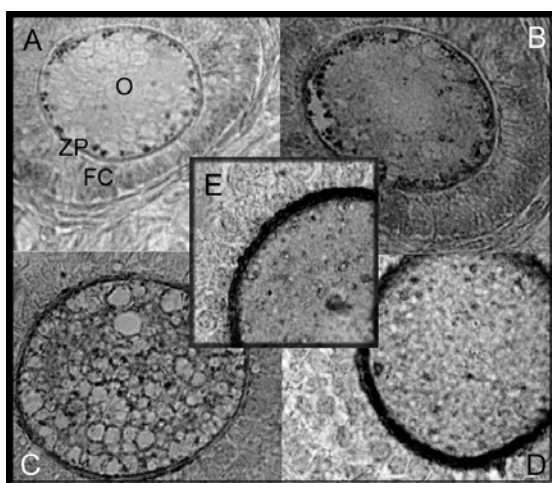
### نتایج:

نتایج توزیع مناطق اتصالی برای پنج نوع لکتین در جدول ۱ نشان داده شده است و همچنین تحلیل آماری

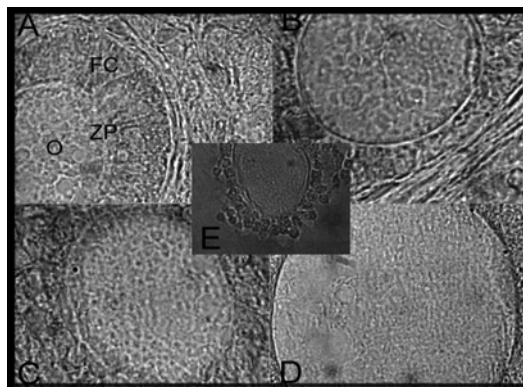


شکل ۴: مراحل متوالی از تکامل فولیکول با بکاربردن لکتین PNA نشان داده می شود (بزرگنمایی مقاطع A و D برابر ۴۰۰ ولی B و C برابر ۱۰۰۰ است). A فولیکول Intermediate مرحله I، B فولیکول Preantral مرحله II، C فولیکول Antral مرحله II، D فولیکول Tertiary مرحله III، E فولیکول Preovulatory مرحله IV.

لکتین DBA: در تشخیص محل‌های اتصالی لکتین Dolichos biflorus (DBA) اتصال ضعیفی در منطقه شفاف فولیکول در طی مراحل تکاملی از فولیکول‌های Primary تا Preantral دیده می شود اما سپس در مراحل بعدی تکامل منطقه شفاف پاسخ واضح مثبتی را نشان می دهد (شکل ۵).

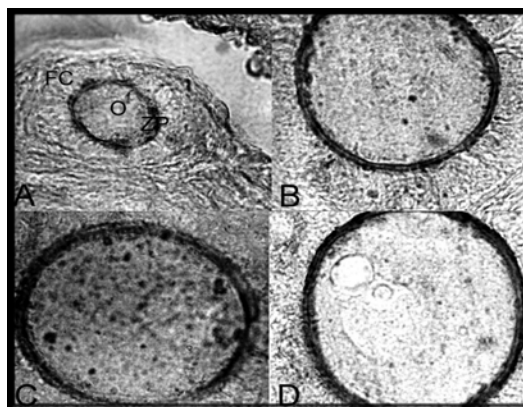


شکل ۵: محل قرار گیری مناطق اتصالی لکتین DBA در طی بلوغ فولیکول مشاهده می شود (بزرگنمایی تمام مقاطع برابر ۱۰۰۰ است). A فولیکول Primary مرحله I، B فولیکول Preantral مرحله II، C فولیکول Antral مرحله II، D فولیکول Tertiary مرحله III، E فولیکول Preovulatory مرحله IV.



شکل ۲: مراحل متوالی از روند تکاملی فولیکول که توسط لکتین BSA1 رنگ آمیزی هیستوشیمی گردیده است (تمام مقاطع بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر ولی نمای E بزرگنمایی ۴۰۰ برابر دارد). A فولیکول Primary مرحله I، B فولیکول Preantral مرحله II، C فولیکول Antral مرحله II، D فولیکول Tertiary مرحله III، E فولیکول Preovulatory مرحله IV.

لکتین WGA: نشانه های قندی جهت منطقه شفاف از مرحله اولیه تکامل فولیکولها تا بلوغ آنها در شکل ۳ تراکم یکسانی را در رنگ آمیزی با لکتین Triticum vulgare (WGA) نشان می دهد.



شکل ۳: عکس العمل لکتینی تکامل فولیکول توسط لکتین WGA نشان داده شده است (بزرگنمایی تمام مقاطع ۱۰۰۰ برابر است). A فولیکول Intermediate مرحله I، B فولیکول Preantral مرحله II، C فولیکول Antral مرحله II، D فولیکول Tertiary مرحله III.

لکتین PNA: تراکم رنگ آمیزی با لکتین Arachis hypogaea (PNA) همراه بلوغ فولیکولها افزایش می یابد. در این مشاهدات افزایش اتصال پیشرونده ای از لکتین PNA در فولیکول Intermediate مرحله I تا فولیکول Preovulatory در مرحله IV وجود دارد (شکل ۴).

## بحث:

منطقه شفاف یک پوشش شفاف ضخیم و غیر سلولی است که غشاء پلاسمائی اووسیت پستانداران را در تمام مراحل رشد در بر میگیرد. این ساختمان نقشهای مهمی را در طی اووژنز، لقاح و تکامل پیش از لانه‌گزینی جنین ایفاء می‌کند (۱۵). مطالعات قبلی بر روی منطقه شفاف قویاً بیانگر این است که این پوشش یک گلیکوکالیکس بوده (۱۶)، که بر اساس چندین مطالعه رنگ آمیزی لکتینی مطرح می‌شود (۱۷، ۱۸). گزارشاتی مبنی بر مشارکت قندهای نشاندار شده با رادیو اکتیو وجود دارد (۱۹).

بیان شده است که توزیع بقایای قندی در طی تکامل اووسیت متغیر است (۱۸). در این روند تغییرات سریع ساختمان کمپلکس کربوهیدراتی در طی تکامل جنین (۱۸) و پاتولوژی (۱۹) برای دیگر بافتها همانند اووسیت باثبات رسیده و درگیری ساختمانی گلیکوکونژوگیتها در ارتباطات سلول به سلول مانند لقاح بطور گسترده‌ای تجزیه و تحلیل شده است (۲۰) و چندین مطالعه دال بر نقش قطعی آنها در همراهی گلیکانها در منطقه شفاف و در ارتباط با عکس العمل اسپرم و اووسیت وجود دارد (۲۰). همچنین بعد از لقاح روند اتصالاتی قندها در طی تکامل، تحت تشخیص تواتر اولیگوساکاریدها همراه با گلیکوکونژوگیتهای منطقه شفاف می‌باشد. نتایج حاضر نشان می‌دهد که توزیع بقایای قندهایی که هدف لکتینهای مربوطه هستند، بسیار جالب است و مسیر تغییرات بیوشیمیائی آنها نشانگر تغییر ساختمانی قندی در طول تکامل و بلوغ اووسیت می‌باشد.

از پنج نوع لکتین متصل به HRP، که در مراحل مختلف تکامل فولیکولها مورد استفاده قرار گرفتند دو نوع از آنها در مسیر بلوغ فولیکولها نمایان نگردیدند. کلاً لکتینهای Con A و BSA1 محللهای اتصالاتی مشخصی را در مراحل تکامل اووسیت نشان ندادند. این رفتار لکتینها در مشاهده منطقه شفاف منعکس کننده عدم حضور رفتار بیوشیمیائی قندهای D-گلوکز و D-مانوز همراه با D-گالاکتوز بترتیب در ارتباط با لکتینهای Con A و BSA1 در تمام مسیر تکامل فولیکول می‌باشد. در ارتباط با این یافته، مهار غیر مؤثر لکتین Con A در هنگام اتصال اسپرم و غشاء اووسیت مد نظر قرار گرفت، که

ثابت گردید بقایای گلوکز و مانوز در غشاء اووسیت در هنگام لقاح درگیر نمی‌شود (۲۱). مطالعه مهار لکتین BSA1 که ثابت کننده بقایای گالاکتوز است حضور آنها در لقاح منکر می‌گردد (۲۲).

از طرف دیگر لکتین WGA قویاً اثبات کننده تمایل آن در تکامل اووسیت از مراحل اولیه تا انتهائی می‌باشد. لکتین WGA رفتار اتصالاتی به منطقه شفاف را در برابر حضور بقایای بتا-D-ان-استیل گلوکزآمین و اسید سیالیک در تمام طول مراحل تکاملی فولیکول دارد. در طی این مسیر شاهد حضور مؤثر بقایای ان-استیل گلوکزآمین در اتصال اسپرم با منطقه شفاف وجود دارد همچنانکه اووسیت حاوی لکتین اختصاصی GlcNAc، سبب عدم بروز عکس العملهای اتصالاتی به اسپرم می‌شود (۲۳).

تعیین اتصال لکتینی در منطقه شفاف برای دو لکتین که توانائی تشخیص ان-استیل گالاکتوز را دارند، وجود دارد. لکتینهای DBA و PNA نتایجی از روند منفی به مثبت آنها در طی تکامل فولیکول نشان می‌دهند که دال بر واکنش ترکیبات کربوهیدراته غشاء اووسیت موش بوده و در طی مسیر تکاملی تغییرات محسوسی را نشان می‌دهد. لکتین PNA سبب تشخیص بتا-D-ان-استیل گلوکزآمین (β-D-GalNAc) و لکتین DBA مشخص کننده آلفا-D-ان-استیل گالاکتوزآمین (α-D-GalNAc) می‌باشد که دال بر اهمیت مشارکت شکل‌های ان-استیل گالاکتوز و گلوکز در طی تکوین ساختمانی و عمل فولیکول به دنبال ارتباطات سلول به سلول می‌باشد. اخیراً نقش شایان توجهی را برای بقایای ان-استیل گالاکتوزآمین و نه گالاکتوز در طی اتصال اسپرم به غشاء اووسیت بیان داشته‌اند. در این رنگ آمیزی لکتینی مراحل تکاملی موفق منطقه شفاف و اهمیت حضور بقایای ان-استیل گالاکتوز و گلوکز با نشانگرهای لکتینی مشخص در طی روند تکوینی، پیگیری و اثبات گردید.

نتیجه اینکه روند ان-استیلاسیون گلوکز و گالاکتوز آمین در طی روند تکاملی فولیکول توسط سلولهای فولیکولی و اووسیت انجام میشود زیرا منطقه شفاف در اثر مشارکت این دو سلول تشکیل می‌گردد پس راهکار آینده در جهت ارزیابی این پدیده و سهم مشارکت هر کدام از سلولهای مذکور خواهد بود. بنابراین در صورت

7. Medialska A. Manipulating the mouse embryo. 2nd ed. London: Churchill Livingstone, 1994: 175-238.
8. Sadler TW. Langman's medical embryology. 8th ed. London: Lippincott Williams & Wilkins, 2000: 19-23.
9. Larsen WJ. Human embryology. 3rd ed. London: Churchill Livingstone, 2000:11-16.
10. Junqueira LC, Caneiro J, Kelley RO. Basic histology. 9th ed. Stamford: Appleton & Lange, 1998:421-426.
11. Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates : Facts and Hypothesis. *Endocrine Rev* 1996;17(2):121-149.
12. Fazel AR, Schulte BA, Thompson RP, Spicer SS. Presence of a unique glycoconjugate on the surface of rat primordial germ cells during migration. *Cell differentiation* 1987; 21: 199-211.
13. Fazel AR, Sumida H, Schulte BA, Thompson RP. Lectin histochemistry of the embryonic heart: Fucose specific lectin binding sites in developing rats & chicks. *Am J Anat* 1989;184:76-84.
14. Pedini V, Scocco P, Radaelli G, Ceccarelli P. Carbohydrate histochemistry of the alimentary canal of the Shi Drum, *Umbrina Cirrosa* L. *Anat Histol Embryol* 2001;30: 345-349.
15. Gwatkin RBL , Williams DT. Receptor activity of the hamster and mouse solubilized zona pellucida before and after zona reaction. *J Reprod Fertil* 1976;49:55-5.
16. Bleil JD , Wassarman PM. Structure and function of the zona pellucida: Identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. *Dev Biol* 1980; 76:185-202.
17. Shalgi R, Maymon R, Bar-shira B. Distribution of lectin receptor sites in the zona pellucida of follicular and ovulated rat oocytes. *Mol Reprod Dev* 1991;29:365-372.
18. Maymon BB, Maymon R, Ben-Nun I. Distribution of carbohydrate in zona

ترغیب روند ان استیلایسیون در سلولهای مذکور بیان ان استیلایسیون گلوکز آمین و گالاکتوز آمین در منطقه شفاف بیشتر صورت گرفته و سبب رفع ناباروری ناشی از عدم اتصال اسپرم و اووسیت خواهد شد(۶).  
از طرفی عواملی که سبب توقف و کاهش فوق العاده این روند در سلولهای مذکور گردند میتوانند بعنوان وسائل جلوگیری از حاملگی تلقی شده و با توجه به عدم تاثیر بر روی محور هورمونی سالمتر از وسائل مذکور قلمداد گردند.

### سپاسگزاری :

این پژوهش با استفاده از حمایت مالی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران و همکاری صمیمانه پرسنل آزمایشگاه هیستوشیمی گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی مشهد و آزمایشگاه پاتولوژی بیمارستان مباشر کاشانی ، دانشگاه علوم پزشکی همدان خصوصاً استاد گرامی جناب آقای دکتر محمود ستاری و آقای مهندس سید محمد امیر حسینی پناه اجرا شده است که بدین وسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از نامبردگان اعلام می داریم.

### منابع :

1. Keenan JA, Sacco AG, Subramanian MG. Endocrine response in rabbits immunized with native versus deglycosylated porcine zona pellucida. *Biol Reprod* 1991;44:150-156.
2. Liu C, Litscher ES, mortillo S. Targeted disruption of the mZP3 gene results in production of eggs lacking a zona pellucida and infertility in female mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:5431-5436.
3. Wassarman PM. Zona pellucida glycoproteins. *Ann Rev Biochem* 1998; 57:415-442.
4. Wassarman PM. Role of carbohydrates in receptor-mediated fertilization in mammals. *CIBA Foundation Symp* 1989; 145:135-149.
5. Wassarman PM. Mouse gamete adhesion molecules. *Biol Reprod* 1992;46:186-191.
6. Loret de mola JR, Garside WT, Bucci J. Age and hormonal environment affect the thickness of the human zona pellucida. *Ann Meet Am Soc Reprod Med* 1996;S19.

- pellucida of human oocytes. J Reprod Fertile 1994;102:81-86.
19. Ozgur K, Patanka MS, Oehninger S, Clark GF. Direct evidence for the involvement of carbohydrate sequences in human sperm-zona pellucida binding. Mol Hum Reprod 1998;4(4):318-324.
  20. Benoff S. Carbohydrates and fertilization. Mol Hum Reprod 1997; 3 (7):599-637.
  21. Legge M, Sellens MH. Mouse zygotes express endogenous lectins. Mol Reprod Dev 1990;26(4):308-312.
  22. Miranda PV, Echererria FG, Briggiler CIM, Brandelli A, Blanquier GA, Tezon JG. Glycosidic residues involved in human sperm-zona pellucida binding in vitro. Mol Hum Reprod 1997;3(5):399-404.
  23. Pedini V, Scocco P, Radaelli G, Ceccarelli P. Carbohydrate histochemistry of the alimentary canal of the Shi Drum, Umbrina Cirrosa L. Anat Histol Embryol 2001; 30:345-349.