نشریه دامپزشکی
در
پژوهش و سازندگی شماره ۱۰۹ زمستان ۱۳۹۴
DOI: 10.22034/vj.2015.103034

موقعیت‌یابی ایمنوهیستوشیمی آروماتاز در بافت بیضه و غدد ضمیمه جنسی بز

• صباح محمدی
فارغ التحصیل کارشناسی ارشد علوم دامی دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه کردستان، ایران
• اسعد وزیری (نویسنده مسئول)
عضو هیات علمی دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه کردستان
• امجد فرزین پور
عضو هیات علمی دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه کردستان

تاریخ دریافت: بهمن ماه ۹۳ تاریخ پذیرش: خردادماه ۹۴
Email: sabahsanandaj@gmail.com

چکیده

هدف از این مطالعه موقعیت‌یابی ایمنوهیستوشیمی سیتوکروم آروماتاز P۴۵۰ در دستگاه تناسلی بز نر بود. آروماتاز آنزیم نهایی است که آندروژن‌ها را به استروژن‌ها تبدیل می‌کند. در این تحقیق جستجو و موقعیت‌یابی آروماتاز با روش ایمنوهیستوشیمی (IHC) در بافت بیضه، اپیدیدیم، غده وزیکول سمینال و غده پروستات بز بومی با استفاده از آنتی‌بادی پلی کلونال آنتی آروماتاز به‌عنوان آنتی‌بادی اولیه و آنتی‌بادی پلی کلونال ضد IgG موشی کونژوگه شده با HRP به‌عنوان آنتی‌بادی ثانویه انجام گرفت. نمونه‌های بیضه و غدد ضمیمه جنسی از ۵ بز نر بومی سالم ۲ تا ۴ ساله (پس از کشتار دام‌ها دستگاه تناسلی به‌طور کامل جدا شده و از هر قسمت نمونه‌هایی به ابعاد ۱×۰/۵×۰/۵ سانتی متر گرفته شد) تهیه و برای آزمایش IHC در محلول بوئن نگهداری شدند. سپس طی مراحلی بلوک‌های پارافینی و در نهایت مقاطع میکروسکوپی تهیه و آزمایش IHC جهت موقعیت‌یابی آروماتاز انجام شد. واکنش مثبت ایمنوپروکسیداز در مراحل اسپرماتوژنز، سلول لایدیگ، سلول‌های اپیتلیال مجاری آوران اپیدیدیم و سیتوپلاسم سلول‌های ترشحی غده وزیکول سمینال و غده پروستات مشاهده شد. یافته‌های بدست آمده نشان می‌دهد که آروماتاز موجود در سلول‌های مختلف بیضه و غدد ضمیمه جنسی آندروژن‌ها را به استروژن‌ها تبدیل کرده و ممکن است استروژن‌ها به‌طور موضعی فعالیت‌های اتوکرین و پاراکرین در مجرای تولید مثلی داشته باشند.

کلمات کلیدی: آروماتاز P۴۵۰، استروژن‌ها، اپیدیدیم، پروستات، وزیکول سمینال

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 109 pp: 83-89

Immunohistochemical Localization of Aromatase in Goat Testicular Tissue and Accessory Glands

By: Mohammadi, S., Graduated Master of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Iran.; Vaziry, A. (Corresponding Author), Assistant Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Iran and Farzinpour, A., Assistant Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Iran

.

Email: sabahsanandaj@gmail.com

Received: January 2014 **Accepted: May 2015**

The aim of the present study was to immunohistochemical localization of Cytochrome P450 Aromatase in male goat reproduction system. Aromatase is a terminal enzyme which transforms androgens in to estrogens. This study investigated the immunohistochemical localization of aromatase in native male goat testis, efferent ductules of epididymis, vesicle seminal and prostate glands using polyclonal anti aromatase antibody as primary antibody and anti-mouse IgG (HRP) Polyclonal antibody as secondary antibody. Samples of testis and accessory glands collected from five native male goat (2-4 years old), and for IHC test were kept in Bowen solution. Then paraffin block and histological section for IHC test were prepared. Immunoreactions was observed in stages of spermatogenesis, Leydig cells, efferent ductules of epididymis, cytoplasm of vesicle seminal and prostate glands cells. The results show that aromatase in testicular cells and sexual glands converts androgens to estrogens and may be locally estrogens have a paracrine and autocrine activates in reproductive tract.

Key words: Aromatase P450, Estrogens, Epididymis, Prostate, Vesicle seminal

مقدمه

استروژن‌ها مدت‌ها به‌عنوان هورمون مخصوص جنس ماده در پستانداران مورد نظر بودند. اماجداسازی استروژن‌ها از ادرار اسب نر توسط زوندک در دهه ۴۰ دیدگاه جدیدی از نقش استروژن‌ها در جنس نر را مطرح نمود (۳ و۱۰و ۱۵). بیضه پستانداران یک اندام پیچیده است که دو عمل سنتز هورمون‌های استروئیدی و تولید اسپرم را انجام می‌دهد. به‌خوبی مشخص شده که رشد طبیعی بیضه و حفظ اسپرماتوژنز به وسیله گنادوتروپین‌ها کنترل می‌شود و این اثرات به‌وسیله عوامل موضعی تولید شده تنظیم می‌شود و در این میان استروژن‌ها از اهمیت بالایی برخوردار هستند (۲ و ۵).

در سال‌های اخیر شواهد فراوانی به‌دست آمده که نشان می‌دهد استروژن‌ها برای باروری جنس نر دارای نقش مهمی هستند. بنابراین تجویز استروژن و گزنواستروژنها در طی رشد جنینی و نوزادی سبب بروز اختلالات جنسی شامل نهان‌بیضگی، نواقص اپیدیدیمی، اختلال در باروری و افزایش میزان بروز سرطان بیضه می‌گردد. آزمایشات انجام گرفته روی موش فاقد گیرنده استروژن (ERαKO)[1] نشان داد که یکی از دلایل ناباروری عدم رشد و تکامل لوله‌های وابران در غیاب استروژن‌ها است (۱۲). همچنین تحقیقات دیگر نشان داد که ناباروری موش‌های فاقد ژن عملکردی آروماتاز به دلیل عدم رشد سلول‌های زایای بیضه در غیاب استروژن‌ها بوده است (۸ و۱۳).

در حال حاضر پذیرفته شده که استروژن‌ها نقش فیزیولوژیکی مهمی در تولیدمثل جنس نر دارند (۷). سیتوکروم آروماتاز P450 آنزیمی است که تبدیل آندروژن‌ها به استروژن‌ها را کاتالیز می‌کند (۴). فعالیت این آنزیم و بیان آن در مجاری تناسلی جنس نر موجب بیوسنتز موضعی استروژن‌ها می‌گردد. در پستانداران مختلف (از جمله انسان، اسب، میمون، قوچ، گاو، خرس، خوک، موش و خروس) آروماتاز در سلول‌های لایدیگ، سلول‌های سرتولی و سلول‌های زایا شناسایی شده است. بنابراین پیشنهاد شده که استروژن در رشد بیضه و بلوغ اسپرم نقش دارد (۹). موقعیت‌یابی آروماتاز P۴۵۰ درسلول‌های بیضه پستانداران در طی چند دهه گذشته موضوع جالب و بحث برانگیزی بوده است. حضور آروماتاز P450 در سلول‌های زایا و سلول‌های لایدیگ بیضه پستانداران با آزمایش ایمونوهیستوشیمی تأیید شده است (۷ و ۱۲). از آنجا که آروماتاز درمجاری تناسلی بز نر تایید و گزارش نشده است، هدف از انجام این مطالعه موقعیت‌یابی ایمونوهیستوشیمی آروماتاز در سیستم تولیدمثل بز نر بود

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری بافتی بیضه از دام‌های ۴-۱ ساله کشتار شده در کشتارگاه دام سنندج انجام گرفت. نمونه‌های تهیه شده شامل قسمت‌های سر، بدنه، دم اپیدیدیم، قسمت مرکزی و حاشیه‌ای بافت بیضه به ابعاد ۱×۰/۵×۰/۵ سانتی متر بود، تهیه شد و نمونه‌ها بعد از قرار گرفتن در یونیکاست‌های پلاستیکی به مدت ۲۴ ساعت در محلول فیکساتیو بوئن (۷۵ ml اسید پیکریک اشباع شده، ۲۵ ml فرمالین تجاری و ۵ ml اسید استیک گلاسیال) قرار گرفت. بعد از مراحل آبگیری (قرار دادن اسلایدها در الکل‌های با درجات مختلف، الکل مطلق، ۹۵، ۸۰، ۷۰ و ۵۰ درجه و

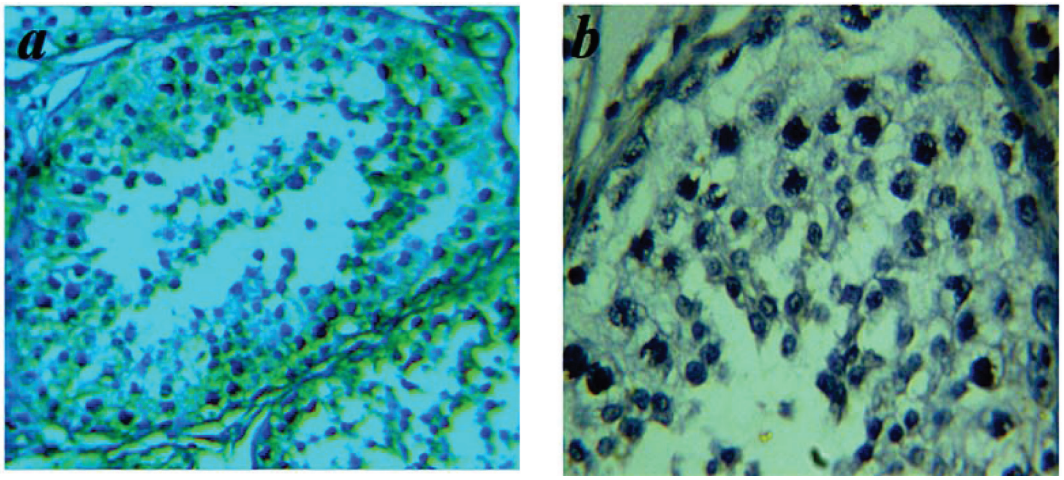
در هر کدام به مدت سه دقیقه قرار گرفت)، شفاف‌سازی، آغشته‌سازی با پارافین، قالب‌گیری، بلوک‌های پارافینی تهیه شد و مقاطع بافتی به ضخامت ۵-۴ میکرون توسط دستگاه میکروتوم تهیه و برروی لام‌های آغشته شده به چسب سیتولوژی فیکس شدند.

روش ایمنوهیستوشیمی: ابتدا مقاطع بافتی پارافینی در گرمخانه ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند. لام‌ها با استفاده از زایلین دپارافینه و با آب جاری شستشو داده شدند و سپس توسط الکل اتیلیک با درجات مختلف آبدهی شده دوباره با آب جاری به مدت ۲ دقیقه شستشو داده شدند بعد با محلول PBS به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شدند. لام‌ها در H_2O_2٪۳ در PBS برای غیرفعال شدن فعالیت پروکسیداز اندوژنوسی به مدت ۶۰ دقیقه قرار گرفتند. لام‌ها در PBS به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شدند. بعد لام‌ها جهت بازیابی آنتی‌ژن با استفاده از بافر سیترات (10 nM, pH=6) درآوون میکرویو در حداکثر قدرت به مدت ۵ دقیقه قرار داده شدند و این کار سه بار تکرار شد. سپس لام‌ها را در دمای اتاق به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری شد تا خنک شدند. بعد در PBS به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شدند. لام‌ها با سرم ۵٪ گاوی در PBS به مدت ۱۵دقیقه برای دو بار شستشو داده شدند. سپس لام‌ها با آنتی‌بادی اولیه (پلی‌کلونال آنتی بادی تولید شده در موش از شرکت Abbiotec) رقیق شد به نسبت در PBS حاوی ۱٪ BSA در اتاق مرطوب در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت یک شبانه روز خوابانده شدند. لام‌ها در PBS برای ۳ بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شدند. لام‌ها با آنتی‌بادی ثانویه (آنتی بادی پلی‌کلونال ضد IgG موش از شرکت Abbiotec) کونژوگه شده با HRP رقیق شده در PBS به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه خوابانده شدند. لام‌ها در PBS به مدت ۱۰ دقیقه شستشو داده شدند. بعد جهت نمایان کردن واکنش آنتی‌ژن و آنتی‌بادی از محلول سوبسترای دی‌آمینوبنزیدین (DAB) در H_2O_2 به مدت ۶-۴ دقیقه استفاده شد. لام‌ها در آب جاری شستشو داده شدند. از محلول رنگ‌آمیزی زمینه هماتوکسیلین استفاده شد. سپس لام‌ها توسط الکل اتیلیک آبگیری و شفاف‌سازی شدند و با قرار دادن یک قطره چسپ سیتولوژی روی لام و گذاشتن لامل، عمل مونته کردن انجام و برای بررسی اسلایدها از میکروسکوپ نوری استفاده شد. با بررسی نمونه‌های تهیه شده ظهور رنگ قهوه‌ای روشن تا تیره در مقاطع بافتی نشان از واکنش ایمنوپراکسیداز در نمونه‌های بافتی تهیه شده بود.

نتایج و بحث

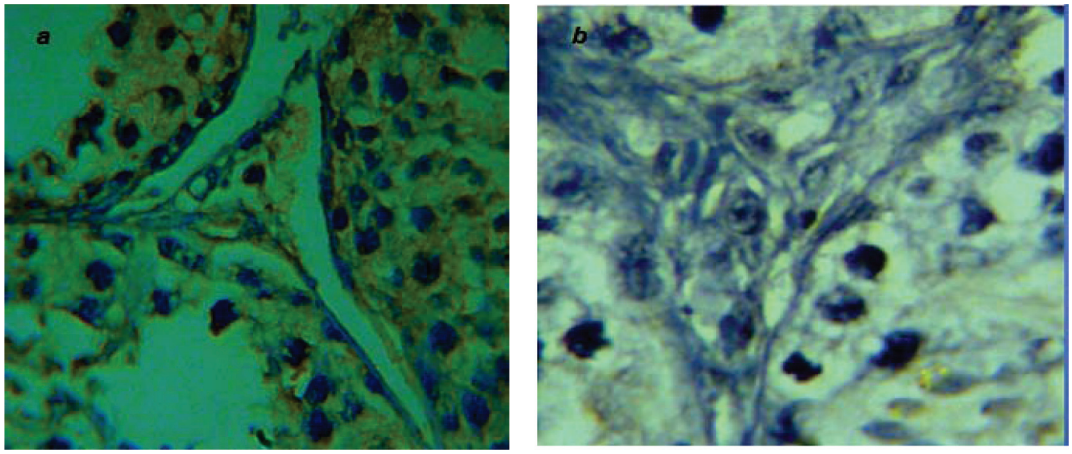
واکنش‌های رنگی در مراحل مختلف اسپرماتوژنز (شکل۱)، سلول لایدیگ (شکل۲)، سر اپیدیدیم (شکل۳)، غده پروستات (شکل۴) و غده وزیکول سمینال (شکل۵) قابل مشاهده بود. لازم به ذکر است که در این تحقیق جهت راه اندازی آزمایش ایمنوهیستوشیمی از نمونه بیضه گوسفند که قبلاً وجود آروماتاز در آن تأیید شده بود به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

با توجه به یافته‌های به‌دست آمده می‌توان گزارش نمود که آنتی ژن آروماتاز P450 در مراحل اسپرماتوژنز، سلول‌های لایدیگ، سر اپیدیدیم، غدد پروستات و وزیکول سمینال قابل‌ردیابی و شناسایی است. واکنش ایمنوپروکسیداز در سیتوپلاسم سلول‌های لایدیگ و سرتولی و همچنین در سلول‌های ترشحی غدد پروستات و ویزیکول سمینال و نیز اپیتلیوم اپیدیدیم مشاهده شد. لازم به ذکر است که شدت رنگ‌پذیری واکنش ایمنوپروکسیداز در غده پروستات و وزیکول سمینال نسبت به دیگر بافت‌ها (شدت رنگ پذیری که قابل مشاهده است) بیشتر بود. به نظر می‌رسد که هر کدام از سلول‌ها می‌توانند به‌طور متفاوت در سنتز استروژن‌ها شرکت کنند. احتمالاً آروماتاز موجود در این سلول‌ها آندروژن‌ها را به استروژن



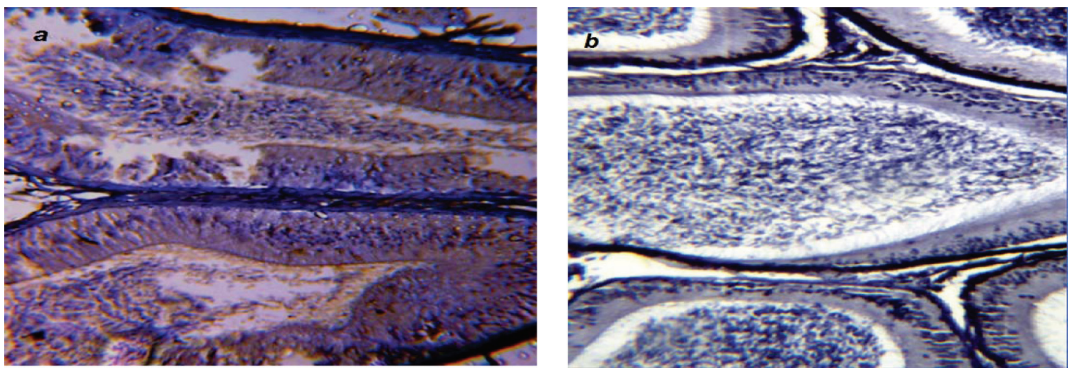
شکل۱- مقاطع عرضی بافت بیضه بز ۴ ساله (۱۰۰×).

(a) نمونه آزمایشی مقطع عرضی بافت بیضه بز: نمونه انکوبه شده با آنتی‌بادی اختصاصی ضد آروماتاز تهیه شده از موش. رنگ قهوه‌ای روشن در سیتوپلاسم سلول‌های سرتولی و مراحل اسپرماتوژنز نشان دهنده واکنش مثبت ایمنوپروکسیداز است.
(b) کنترل منفی: نمونه انکوبه شده با سرم موش. عدم رنگ قهوه‌ای در مراحل اسپرماتوژنز نشان دهنده منفی بودن واکنش ایمنوپروکسیداز است.



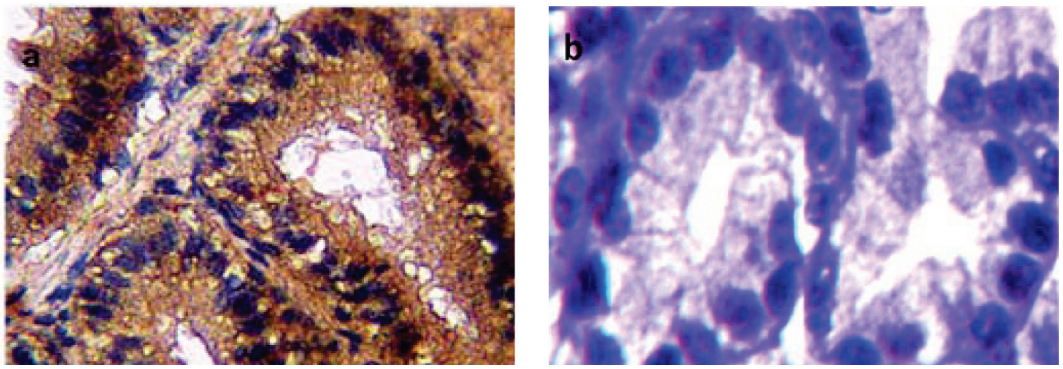
شکل۲ – مقاطع عرضی بافت بیضه بز ۴ ساله (۴۰۰×)

(a) نمونه آزمایشی مقطع عرضی بافت بیضه بز: نمونه انکوبه شده با آنتی بادی اختصاصی ضد آروماتاز تهیه شده از موش. در مقاطع با بزرگنمایی بیشتر مشخص شد که واکنش ایمنی (رنگ قهوه‌ای روشن) بیشتر در سیتوپلاسم سلول لایدیگ و سلول‌های سرتولی می‌باشد. رنگ قهوه‌ای نشان دهنده واکنش مثبت ایمنوپروکسیداز می‌باشد.
(b) کنترل منفی: نمونه انکوبه شده با سرم موش. عدم رنگ قهوه‌ای در مراحل اسپرماتوژنز نشان دهنده منفی بودن واکنش ایمنوپروکسیداز است.



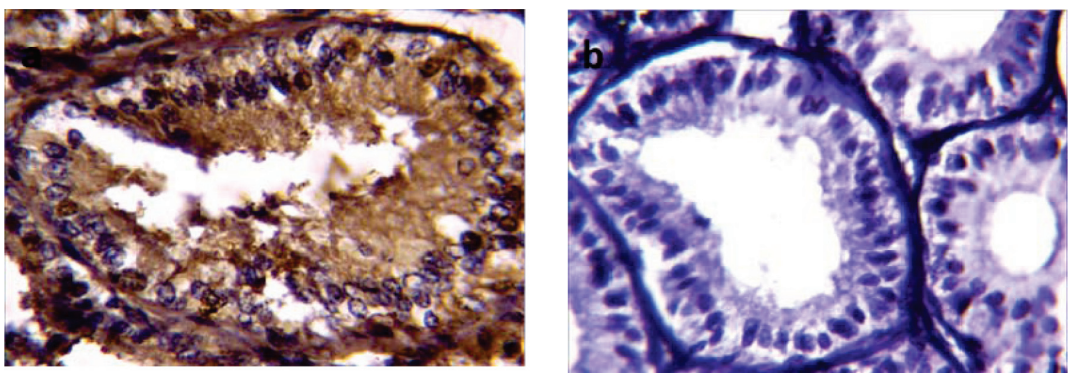
شکل۳ – مقاطع عرضی بافت اپیدیدیم بز ۴ ساله (۱۰۰×)

(a) نمونه آزمایشی مقطع عرضی بافت اپیدیدیم: نمونه انکوبه شده با آنتی بادی اختصاصی ضد آروماتاز تهیه شده از موش. واکنش ایمنی (رنگ قهوه‌ای) در سلول‌های اپیتلیوم سر اپیدیدیم و همچنین اسپرم‌های موجود در مجرای اپیدیدیم نشان دهنده واکنش مثبت ایمنوپروکسیداز می‌باشد.
(b) کنترل منفی: نمونه انکوبه شده با سرم موش. عدم رنگ قهوه‌ای در سلول‌های اپیتلیوم سر اپیدیدیم نشان دهنده منفی بودن واکنش ایمنوپروکسیداز است.



شکل۴-: مقاطع عرضی بافت غده پروستات بز ۴ ساله (۴۰۰×).

(a) نمونه آزمایشی مقطع عرضی بافت غده پروستات: نمونه انکوبه شده با آنتی بادی اختصاصی ضد آروماتاز تهیه شده از موش. در مقاطع با بزرگنمایی بیشتر مشخص شد که واکنش ایمنی (رنگ قهوه‌ای) بیشتر در سیتوپلاسم سلول‌های ترشحی غده پروستات می‌باشد و شدت رنگ‌پذیری در غده پروستات خیلی بیشتر بود. رنگ قهوه‌ای نشان دهنده واکنش مثبت ایمنوپروکسیداز می‌باشد.
(b) کنترل منفی: نمونه انکوبه شده با سرم موش. عدم رنگ قهوه‌ای در غده پروستات نشان دهنده منفی بودن واکنش ایمنوپروکسیداز است.



شکل۵- مقاطع عرضی بافت وزیکول سمینال بز ۴ ساله (۴۰۰×)

(a) نمونه آزمایشی مقطع عرضی بافت وزیکول سمینال: نمونه انکوبه شده با آنتی بادی اختصاصی ضد آروماتاز تهیه شده از موش. در مقاطع با بزرگنمایی بیشتر مشخص شد که واکنش ایمنی (رنگ قهوه‌ای) بیشتر در سیتوپلاسم سلول‌های غده وزیکول سمینال می‌باشد و شدت رنگ‌پذیری در غده وزیکول سمینال بیشتر بود. رنگ قهوه‌ای نشان دهنده واکنش مثبت ایمنوپروکسیداز می‌باشد.
(b) کنترل منفی: نمونه انکوبه شده با سرم موش. عدم رنگ قهوه‌ای در غده وزیکول سمینال نشان دهنده منفی بودن واکنش ایمنوپروکسیداز است.

تبدیل کرده و اســتروژن تولید شــده به‌طور موضعی یــا به روش اتوکرین / پاراکرین عملکرد این سلول‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد.

تولید استروژن توسط سلول‌های زایای بیضه منبع موضعی استروژن در لوله‌های اسپرم‌ســاز بوده که می‌تواند سلول‌های سرتولی یا سایرسلول‌های زنجیــره اســپرماتوژنز را تحــت تأثیر قرار دهد و نیز ممکن اســت از طریق کنتــرل فیدبــک فعالیت ســلول‌های لایدیگ را در تولید آنــدروژن تنظیم کند. همچنین احتمال دارد بر روی ســاختار یا فعالیت سلول‌های اپیتلیوم اپیدیدیم نقش داشته باشند (۱۱).

اگر چه وجود آروماتاز در دام‌های مختلف گزارش شده است اما حضور آروماتاز در دســتگاه تناسلی بز نر برای اولین بار گزارش می‌گردد. از طرفی دیگر حضور آروماتاز در غدد وزیکول ســمینال و پروستات هیچ گونه دامی گزارش نشده است، لذا وجود این آنزیم در غدد وزیکول سمینال و پروستات بز برای اولین بار در بین تمام گونه‌های دامی مطالعه شــده مورد تأیید قرار گرفت.

با بررســی نمونه‌های تهیه شــده ظهور رنگ قهوه‌ای روشــن تا تیره در مقاطع بافتی نشــان از واکنش مثبت ایمنوپراکســیداز در نمونه‌های بافتی تهیه شده بود.

این نتایج با نتایج ســایر محققین که حضــور آروماتاز را هم در مراحل اسپرماتوژنز و هم در سلول لایدیگ موش صحرایی (۷)، اسب (۱۰) و انسان (۲) شناســایی کرده بودند، موافق بود، اما با نتایــج هنری موتمبی (۹) که وجود آروماتاز را فقط در ســلول‌های لایدیگ خوک شناســایی کرده بودند و گزارش کرده‌اند که آروماتاز ضرورتاً در ســلول‌های لایدیگ است، مخالف بود، الیم و همکاران (۱۶) و همچنین ســتورات و همــکاران (۱۱) آروماتاز را در غده پروســتات انسان شناســایی کرده بودند. لازم به ذکر است که تا اکنون وجود آروماتاز در غدد پروســتات و وزیکول سمینال هیچ گونه دامی گزارش نشده است.

آنتی‌ژن آروماتاز اساســاً در داخل سلول و عمدتاً در شبکه آندوپلاسمی وجود دارد. چرا که این آنزیم یک آنزیم داخل ســلولی اســت. هورمون‌های استروئیدی هورمون‌های داخل سلولی بوده و گیرنده‌های آنها در سیتوپلاسم و نیز هســته قرار دارد. در این تحقیق عمدتاً رنگ قهوه‌ای در سیتوپلاســم مشــاهده شد؛ و بررســی حضور آروماتاز در نقاط مختلف سلول به مطالعات بیشــتر و تکنیک‌های بافتی پیشــرفته‌تر نیاز دارد. شناســایی گیرنده‌های اســتروژن آلفا و بتا در مجاری تناسلی بز نر این احتمال را افزایش می‌دهد که آروماتاز با تبدیل تستوسترون به استروژن، لیگاند این گیرنده‌ها را فراهم می‌نماید.

وجــود گیرنده‌های اســتروژن در بیضه و اپیدیدیم نشــان می‌دهد که اپیدیدیم یک بافت مورد هدف اســتروژن‌ها می‌باشــد و اینکه ممکن است نقش تنظیم کننده در این نواحی داشــته باشند. نقش مجاری وابران انتقال اسپرم از شبکه بیضه به مجرای اپیدیدیم، بازجذب تقریباً ۹۰٪ مایع موجود در مجرا بوده که سبب تغلیظ اسپرم می‌گردد. ثابت شده است که استروژن‌ها با واســطه گیرنده‌های استروژنی بازجذب سدیم و انتقال غیرفعال آب را در مجاری وابران انواع موش تنظیم می‌کنند و همچنین مسئول حفظ ساختار سلول‌های رأسی اپیدیدیم هستند (۴ و۱۱). وقوع بیماری‌های پروستات در پیری وقتی که ســطوح آندروژن‌ها کاهش می‌یابد، بیشتر می‌شود. با توجه به اینکه هر دو گیرنده استروژن‌ها در پروستات شناسایی شده‌اند، پروستات به‌طور مســتقیم به استروژن‌ها پاســخ می‌دهد. اخیراً تأیید شده که دزهای بالای استروژن در غدد پروســتات موجب شروع سرطان پروستات می‌شود (۱۵).

مطالعات نشــان داده کــه نه تنهــا آندروژن‌ها بلکه اســتروژن‌ها برای تمایز جنســی، حفظ اســپرماتوژنز و بلوغ اسپرم ضروری هستند. در نتیجه، احتمال دارد آروماتازی که به طور موضعی در ســلول‌های سرتولی، مراحل اســپرماتوژنز، ســر اپیدیدیم و غدد ضمیمه جنســی تولید می‌شــود، برای اســپرماتوژنز، مخصوصاً برای تکثیر اسپرماتوگونی و میوز و یا اسپرمیوژنز و همچنین بلوغ اسپرم و ضروری باشد (۶).

براســاس یافته‌های این تحقیق حضــور آنزیم آروماتاز در ســلول‌های لایدیگ، مراحل اسپرماتوژنز، سر اپیدیدیم، غدد وزیکول سمینال و پروستات مورد تأیید قرار گرفت. از آنجا که مراحل مختلف اسپرماتوژنز، بلوغ اسپرم و ظرفیت پذیری اسپرم تحت کنترل استروژن‌ها از طریق مسیرهای ژنومی و غیر ژنومی می‌باشــد، لذا احتمال نقش آنزیم آروماتاز جهت تولید استروژن مورد نیاز در این نواحی افزایش می‌یابد.

پاورقی‌ها

1-Horseradish Peroxidase

2-Estrogen Receptor alpha Knock Out

منابع مورد استفاده

1.Ada, C.M. Charles, E.R. Henry, L.S. Jon, A.R. (2001). Cytochrome P450 Aromatase in Testisand Epididymis of Male Rhesus Monkeys. Journal of Endocrine, Vol, 16, No, 1. Pp: 15–19.

2.Arthur, C, G. M. Johne, E.H. (2003). Text Book of Medical Physiology. Book 11st. Pp: 1256-1273.

3.Benson, T.A. (2005). Estrogen regulation of testicular function. Journal of Reproductive Biology and Endocrinology. pp:3-51.

4.Carpino, A. Romeo, F and Rago, V. (2004). Aromatase immunolocalization in human ductuliefferent's and proximal ductus epididymis. Journal of Anatomical society of great Britain and Ireland. Vol, 204, pp: 217-220.

5.Carreau, S.Silandre, D. Bois, C. Bouraima, H. Galeraud-Denis, I.C. (2007). Estrogens: a new player in spermatogenesis.Journal of Folia Histochemical Et Cytobiological. Vol, 45, Supp, 1. pp: 5-10.

6.Carreau, S. Slaweck, W. and Isabelle, G.D. (2009). Aromatase, oestrogen and Human Male Reproduction. Journal of Biological Sciences.Vol, 365, pp: 1571-1579.

7.Carreau, S. Sophie, L. Christelle, D. Isabelle, D. G. Barbara, B. and Sonia, B. Review. (2003). Aromatase Expression and Role of Estrogens in Male Gonad. Journal of Reproductive Biology and Endocrinology. Vol, 1, No, 35. pp 1-6.

8.Couse J. F, Korach, K.S.(1999): Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? Endocrinology Review. Vol, 20, pp: 358-417.

9.Hayakawa, D. Motoki, S. Masatsugu, S. Toshio, T. Hiromasa, I. Koichi, K and Nobuo, K. (2010). Immunohistochemical Localization of Steroidogenic Enzymes in the Testis of the Sika Deer (Cervusnippon) During Developmental and Seasonal Changes. Journal of Reproduction and Development, Vol. 56, No, 1. pp: 117-123.

10.Hees R.A. Carnes, K. (2004). The Role of Estrogen in Testis and the Male Reproductive Tract: a Review and Species Comparison. Journal of Animal Reproduction. Vol, 1, No, 1. pp: 5-30.

11.Janulis L. Janice, M. B. Rex, A.H. Sarah, J. Yoshio, O. (1998). Rat Testicular Germ Cells and Epididymal Sperm Contain Active P450 Aromatase. Journal of Andrology. Vol,19, No, 1. pp:65-71.

12.Lambard S. Silander, D. Delalande. I. Galeraud-Denis, I. Bourguiba, S. and Carreau, S. (2005). Aromatase in Testis: Expression and Role in Male Reproduction. Journal of Steroid Biochemistry or Molecular Biology. Vol, 95, pp: 63-69.

13.Mutembei, H.M. (2006). Expression of Estrogen Receptor Alpha and Beta, Aromatase, Steroid Sulfates and Estrogen Sulfotransferase in Testes of Immature and Mature Boars. Book. 1st Edition.

14.Sipahutar, H. Pascal, S. Safa, M. Bruno, P and Gilles-Eric, S. (2003). Immunolocalization of Aromatase in Stallion Leyding Cells and Seminiferouse Tubules. Journal of The Histochemical Society, Inc. Vol, 51, No, 3. pp: 311-318.

15. Stuart J. E. P. galil, P. Risbridger. (2010). Aromatase and regulating the estrogen: androgen ration in the prostate gland. Journal of Stroid Biochemistry and Molecular Biology.Vol,118, pp: 246-251.

16.Stuart, J., E. G. Risbridger. 2009. The Dual, Opposing roles of estrogen in the prostate. Stroid enzyms and cancer.Journal of Annuals of the New York Academy of Sciences. Vol, 1155, pp: 174-186.